Journal of Microbial World
Volume 13, No. 1, April 2020

Original Article

Optimizing the production of new polyhydroxybutyrate strain of *Bacillus cereus* isolated from petrochemical effluent

Saba Amiri Kojuri[1], Khosro Issazadeh[2], Zoheir Heshmatipour[3], Mirsasan Mirpour[2], Saeid Zarrabi[4]

[1]Ph.D. student, Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran. [4]Assistant Professor, Department of Chemistry, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Polyhydroxybutyrate is a biopolymer Produced by bacteria. Also, having chemical and physical characteristics similar with artificial plastics are completely biodegradable and compatible with life-environment. This study has been done with the purpose of separating and knowing one local strain with the ability of high-production for industrial purposes.

Materials & Methods: In this analytical research, sampling from petrochemical waste-water has been accomplished. The existence of polyhydroxybutyrate in separations has been studied with Sudan black staining. A *Bacillus* strain was chosen to increase the production of polyhydroxybutyrate. This separation was distinguished with biochemical methods and 16S rRNA gene sequencing. The final confirmation of Polyhydroxybutyrate synthesis was done through Fourier transform infrared spectroscopy and Proton nuclear magnetic resonance. To increase polyhydroxybutyrate production, the effect of different factors including carbone, nitrogen, pH and temperature were assessed.

Results: As a whole, eight bacterial isolation producing polyhydroxybutyrate were separated that among them one novel strain of *Bacillus cereus* was chosen. The best conditions to increase more production of polyhydroxybutyrate, was the application and usage of glucose as carbon source, ammonium sulphate as nitrogen source, pH 7and temperature of 30°C.

Conclusion: Valuable data on optimized conditions for PHB production has been obtained through the present research which can be used at industrial level for PHB production, so it can be called a quick appearing alternation for petroleum based on synthetic plastic.

Keywords: Polyhydroxybutyrate, Bioplastic, Petrochemical waste-water, Optimization.

Correspondence to: Zoheir Heshmatipour

Tel: +98 9112911915

E-mail: zheshmat@gmail.com

Journal of Microbial World 2020, 13(1): 21-35.

DOI:

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال سیزدهم شماره اول (پیاپی ۴۲) بهار ۱۳۹۹
صفحات ۳۵-۲۱

Original Article

بهینه سازی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات سویه جدید *باسیلوس سرئوس* جدا شده از پساب پتروشیمی

صبا امیری کجوری[۱]، خسرو عیسی زاده[۲]، زهیر حشمتی پور*[۳]، میرساسان میرپور[۲]، سعید ضرابی[۴]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه میکروب شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران،[۲]استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، [۳]استادیار، گروه میکروب شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران، [۴]استادیار، گروه شیمی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پلی هیدروکسی بوتیرات یک بیوپلی مر تولید شده توسط باکتری ها است. این ترکیبات با وجود داشتن خواص فیزیکی و شیمیایی مشابه با پلاستیک های مصنوعی کاملاً زیست تخریب پذیر و سازگار با محیط زیست می باشند. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی یک سویه بومی تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات با قابلیت تولید مناسب برای اهداف صنعتی انجام شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه تحلیلی، نمونه برداری از پساب شرکت پتروشیمی انجام شد. وجود پلی هیدروکسی بوتیرات در جدایه ها با رنگ آمیزی سودان سیاه مورد بررسی قرار گرفت. یک جدایه *باسیلوس* به منظور افزایش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات انتخاب شد. این جدایه با روش های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن 16S rRNA شناسایی شد. تأیید نهایی سنتز پلی هیدروکسی بوتیرات توسط آنالیزهای طیف سنجی مادون قرمز و رزونانس مغناطیسی هسته پروتون انجام شد. به منظور تولید بیشتر پلی هیدروکسی بوتیرات تأثیر عوامل مختلف مانند منابع کربن و نیتروژن، pH و دما ارزیابی شدند.

یافته ها: در مجموع ۸ جدایه باکتریایی تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات جداسازی شد که از این میان یک سویه جدید *باسیلوس سرئوس* به عنوان جدایه برتر انتخاب گردید. شرایط بهینه به منظور تولید بیشتر پلی هیدروکسی بوتیرات، استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن، سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن، pH ۷ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس بود.

نتیجه گیری: مطالعه حاضر نتایج ارزشمندی را در مورد شرایط بهینه برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات فراهم آورده است که می تواند در سطح صنعتی برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات به عنوان یک جایگزین سریع پلاستیک های مصنوعی مبتنی بر نفت مورداستفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: پلی هیدروکسی بوتیرات، *پلاستیک زیستی*، پساب پتروشیمی، بهینه سازی.

دریافت مقاله: آذرماه ۹۸ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۸

مقدمه

امروزه پلاستیک ها به عنوان یکی از مهمترین منبع آلایندها در جهان هستند که به دلیل کاربردهای گسترده، تولید آنها روز به روز در حال افزایش است (۱). در واقع پلاستیک ها به بخشی جدایی ناپذیر از زندگی ما تبدیل شده اند. پلاستیک ها در مقادیر زیاد در محیط زیست انباشته شده، در نتیجه تهدیدی جدی را برای سیاره ما ایجاد می کنند. همچنین توسط منابع

*) آدرس برای مکاتبه: تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۱۲۹۱۱۹۱۵ پست الکترونیک: zheshmat@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

غیر تجدیدپذیر مانند نفت، زغال سنگ و گاز طبیعی تولید می شوند و چندین دهه زمان نیاز دارند تا در طبیعت تجزیه شوند (۲). سوزاندن پلاستیک ها باعث آزاد سازی ترکیبات سمی به محیط می شود و دفع آنها معضلات زیست محیطی را به همراه دارد (۳). همچنین تجمع طولانی مدت پلی مرهای غیر تخریب پذیر در خاک علاوه بر مشکلات زیست محیطی منجر به کاهش باروری خاک می شود (٤). چالش های زیست محیطی، اقتصادی و ایمنی بسیاری از دانشمندان را برانگیخته، که پلیمرهای زیست تخریب پذیر یعنی پلاستیک های زیستی را تا حدودی جایگزین پلی مرهای مبتنی بر پتروشیمی نمایند (۵). پلاستیک های زیستی بهترین راه حل برای محافظت از محیط زیست در برابر خطرات ناشی از پلاستیک های بر پایه نفت هستند زیرا طبیعت سازگار با محیط زیست دارند. انواع بسیاری از پلاستیک های قابل تجزیه با درجه های مختلفی از تجزیه پذیری وجود دارند که در بین آنها تنها پلی هیدروکسی بوتیرات (PHB) صد در صد تجزیه پذیر است (٦). PHB توسط باکتری ها به طور کامل به آب، دی اکسید کربن و متان تجزیه می شود. در نتیجه با تجزیه آن هیچ نوع مواد سمی و مضری در طبیعت آزاد نمی گردد (۷). پلی هیدروکسی بوتیرات دارای خواص فیزیکی مشابهی با پلی پروپیلن است. با توجه به این خصوصیات پلی هیدروکسی بوتیرات قادر است دید پژوهشگران را نسبت به مطالعه و تولید آن جلب کند. دلیل دیگر برای بدست آوردن اولویت این است که استفاده از پلاستیک های زیست تخریب پذیر به طور قطع آلودگی ناشی از انتشار دی اکسید کربن حاصل از ضایعات پلاستیکی را کاهش می دهند (۸). پلی هیدروکسی بوتیرات یک ماکرومولکول تولید شده توسط باکتری ها است. وقتی باکتری ها در شرایط تنش های مختلف رشد می کنند این بیوپلی مر به صورت گرانول و به عنوان ذخیره انرژی در داخل سیتوپلاسم باکتری تجمع می یابد. تجمع گرانول های PHB در پاسخ به شرایط نامطلوب مانند کمبود مواد مغذی (نیتروژن، فسفر، گوگرد، منیزیم، اکسیژن) و در حضور مقدار اضافی منبع کربن آغاز می شود. این گرانول ها می توانند به عنوان منبع مواد مغذی مورد استفاده قرار گیرند و از مرگ سلول های باکتریایی در شرایط گرسنگی جلوگیری نمایند (۹). از مهمترین باکتری هایی که توانایی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات را دارند می توان به گونه های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Azotobacter*، *Ralstonia*، *Clostridium*، *Corynebacterium*، *Nocardia*، *Rhodococcus*، *Acinetobacter*، *Staphylococcus* و *Streptomyces* اشاره کرد (۱۰). PHB کاربردهای گسترده ای در پزشکی، دامپزشکی، داروسازی، بسته بندی مواد غذایی و کشاورزی دارد (۱۱). بیوسنتز PHB از طریق سه واکنش آنزیمی انجام می شود. آنزیم های درگیر در این مسیر بیوسنتزی شامل بتا-کتوتیولاز، استو استیل کوآنزیم A ردوکتاز و PHB سنتاز هستند. ژن های کد کننده این آنزیم ها به ترتیب شامل *phbA*، *phbB* و *phbC* هستند (۱۲). جانگرا و نهرا (Jangra و Nehra) در سال ۲۰۱۷ باکتری های تولید کننده PHB را از خاک و پساب جداسازی و شناسایی نمودند. باکتری های جداسازی شده مربوط به جنس های *باسیلوس* و *سودوموناس* بودند (۱۳). همچنین نهرا (Nehra) و همکاران در سال ۲۰۱۵ موفق به جداسازی دو باکتری *باسیلوس آنتراسیس* و *باسیلوس سوبتیلیس* تولید کننده PHB از خاک شدند (١٤). مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی یک سویه بومی تولید کننده PHB با قابلیت تولید بالا برای اهداف صنعتی انجام شد.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری و جداسازی باکتری: نمونه پساب از شرکت پتروشیمی جم (عسلویه، ایران) از عمق ۳ متری در پاییز ۱۳۹۷ جمع آوری شد. نمونه پساب در ظرف تیره نگهداری و به آزمایشگاه تحقیقات میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن منتقل گردید. سپس از نمونه پساب رقت های متوالی 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه شد و ۰/۱ میلی لیتر از هر رقت در محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) حاوی ترکیبات (۵ گرم پپتون، ۵ گرم NaCl، ۱/۵ گرم عصاره گوشت، ۱/۵ گرم عصاره مخمر، ۱۵ گرم آگار، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل) کشت داده شدند و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه

سلسیوس گرمخانه گذاری گردیدند. به منظور خالص سازی کلنی ها، کلنی های رشد یافته بر روی محیط نوترینت آگار که از نظر رنگ و شکل ظاهری متفاوت بودند به روش کشت خطی، کشت داده شدند و این روش تا خلوص کامل کلنی ها تکرار شد (۱۵).

ب) غربالگری باکتری تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات: به منظور انتخاب باکتری تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات از ۲ روش رنگ آمیزی سودان سیاه به شرح زیر استفاده شد.

۱- رنگ آمیزی سودان سیاه داخل پلیت: در این روش کلنی تک هر یک از جدایه ها به طور جداگانه، در مرکز پلیت حاوی محیط نوترینت آگار کشت داده شد. سپس تمامی پلیت های کشت داده شده برای بررسی های ماکروسکوپی در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پس از گرمخانه گذاری محلول سودان سیاه بر روی کلنی ها ریخته شد

جدول ۱: نتایج آزمون های بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه برتر.

آزمون	نتیجه
کاتالاز	مثبت
اکسیداز	مثبت
مصرف سیترات	مثبت
احیا نیترات	مثبت
متیل رد	منفی
وژس-پروسکوئر	مثبت
هیدرولیز کازئین	مثبت
هیدرولیز ژلاتین	مثبت
هیدرولیز نشاسته	مثبت
هیدرولیز اوره	منفی
رشد در غلظت ۳٪ NaCl	مثبت
رشد در غلظت ۵٪ NaCl	مثبت
رشد در غلظت ۱۰٪ NaCl	مثبت
رشد در غلظت ۱۵٪ NaCl	مثبت
حرکت	مثبت
اندول	منفی
تولید H_2S	منفی
تخمیر قندها	
گلوکز	مثبت
ساکارز	مثبت
فروکتوز	مثبت
لاکتوز	مثبت
مالتوز	مثبت
گالاکتوز	مثبت
سوربیتول	منفی
آدونیتول	منفی
رافینوز	منفی
مانوز	مثبت
زایلوز	مثبت
مانیتول	مثبت

و پلیت ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. برای تهیه محلول سودان سیاه ۰/۳ گرم سودان سیاه در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حل گردید. سپس پلیت ها را با اتانول ۹٦ درصد شستشو داده، در نهایت کلنی هایی که به رنگ سیاه مشاهده شدند توانایی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات را داشتند.

۲- رنگ آمیزی سودان سیاه و بررسی زیر میکروسکوپ نوری: به منظور بررسی میکروسکوپی بر روی لام یک گسترش مناسب از جدایه ها تهیه شد. پس از خشک شدن با عبور سریع لام از روی شعله تثبیت شدند. سپس سطح اسمیر به محلول سودان سیاه آغشته گردید. پس از ۱۰ دقیقه لام را با زایلن شست و شو داده تا شفاف شود. سپس گسترش با سافرانین به مدت ۱۰ ثانیه رنگ شد. برای تهیه محلول سافرانین، ۵ گرم سافرانین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل حل گردید. پس از شست و شو با آب مقطر و خشک کردن، لام ها زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۱۰۰ بررسی شدند (۱٦).

ج) شناسایی مورفولوژیکی و بیوشیمیایی باکتری تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات: بررسی های میکروسکوپی مانند رنگ آمیزی گرم و رنگ آمیزی اسپور به روش شیفر فولتون انجام شد (۱۷). ویژگی های ماکروسکوپی مانند شکل و رنگ کلنی مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه بر اساس کتاب راهنمای سیستماتیک باکتری شناسی برجی (Bergeys) بررسی شد. به منظور شناسایی ویژگی های بیوشیمیایی از آزمون های مختلفی مانند کاتالاز، اکسیداز، حرکت، تولید اندول، تولید H_2S، متیل رد و وگس پروسکوئر، مصرف سیترات، احیا نیترات، هیدرولیز نشاسته، ژلاتین، کازئین و اوره، رشد در غلظت ۳، ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد NaCl استفاده شد (۱۸). به منظور انجام آزمون تخمیر قندها مانند (گلوکز، ساکارز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، گالاکتوز، سوربیتول، آدونیتول، رافینوز، مانوز، زایلوز و مانیتول) از روش واشیست (Vashist) و همکاران در سال ۲۰۱۳ استفاده گردید (۱۹).

د) تولید پلی هیدروکسی بوتیرات:

برای این منظور از دو محیط کشت استفاده شد. محیط کشت اول با عنوان محیط کشت اولیه (Pre culture) شامل محیط نوترینت براث، حاوی ترکیبات ۵ گرم پپتون، ۵ گرم NaCl، ۱/۵ گرم عصاره گوشت، ۱/۵ گرم عصاره مخمر در حجم ۵ میلی لیتر بود. پس از آماده سازی این محیط، یک کلنی از جدایه منتخب در شرایط استریل به آن تلقیح، و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت g ۱۵۰ به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس ۵ میلی لیتر از محیط کشت اولیه پس از رسیدن به کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند به ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط کشت تولید پلی هیدروکسی بوتیرات که شامل محیط Mineral Salt Medium (MSM) (مرک، آلمان) با ترکیبات (گرم بر لیتر): Na_2HPO_4. $12H_2O$: ۹، Na_2HPO_4: ۱/۵، $MgSO_4.7H_2O$: ۰/۲، NH_4Cl: ۱، $CaCl_2.2H_2O$: ۰/۰۲، Fe^{+3}-NH_4 citrate: ۰/۰۰۱۲ بود تلقیح شد. همچنین محلول عناصر کمیاب حاوی (گرم بر لیتر): EDTA: ۵۰، $FeCl_3$: ۸/۳، $ZnCl_2$: ۰/۸۴، $CuCl_2.2H_2O$: ۰/۱۳، $CoCL_2.6H_2O$: ۰/۱، $MnCl_2.6H_2O$: ۰/۰۱۶ و H_3BO_3: ۰/۱ بود که پس از آماده سازی و اتوکلاو شدن به طور جداگانه در شرایط استریل به میزان ۱ میلی لیتر به محیط کشت تولید اضافه گردید. سپس ارلن در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت g ۱۵۰ به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد (۲۰ و ۲۱).

ه) استخراج بیوپلیمر: پس از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، محیط کشت تولید به مدت ۱۰ دقیقه، با سرعت g ۴۵۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. روماند دور ریخته شد و رسوب سلولی را با ۱۰ میلی لیتر فسفات بافر سالین (pH ۷/۵) شست و شو داده و دوباره سانتریفیوژ گردید. سپس روماند را دور ریخته و رسوب حاصله در آون با دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک و وزن خشک سلول اندازه گیری شد. ۱۰ میلی لیتر سدیم هیپوکلریت (۶٪) به رسوب سلولی اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. مخلوط حاصله به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت g ۴۵۰۰ در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ و روماند دور ریخته شد. رسوب سلولی را با آب مقطر استریل، استون و متانول شستشو داده و مجدداً سانتریفیوژ گردید. در این مرحله به رسوب سلولی ۱۰ میلی لیتر کلروفرم اضافه و در بن ماری با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از تبخیر کلروفرم پلی هیدروکسی بوتیرات حاصل در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفت تا خشک شود. سپس وزن خشک بیوپلیمر استخراج شده به وسیله ترازو اندازه گیری و درصد PHB تولید شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۲۴-۲۲).

درصد = PHB وزن خشک PHB (گرم بر لیتر) × ۱۰۰/وزن خشک سلول (گرم بر لیتر)

و) بهینه سازی به منظور افزایش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات:

۱- تأثیر منابع کربن: جدایه منتخب به ارلن های حاوی ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط Mineral Salt Medium (MSM) با منابع مختلف کربن شامل (گلوکز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز و نشاسته) در غلظت ۱٪ تلقیح شد. ارلن ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت g ۱۵۰ به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس میزان پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده بررسی و بهترین منبع کربن انتخاب گردید.

۲- تأثیر منابع نیتروژن: به منظور انتخاب بهترین منبع نیتروژن در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات، باکتری مورد نظر به ارلن های حاوی ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط Mineral Salt Medium (MSM) به همراه بهترین منبع کربن و منابع مختلف نیتروژن شامل (آمونیوم سولفات، آمونیوم کلراید، آمونیوم نیترات، پپتون و عصاره مخمر) در غلظت ۱٪ تلقیح شد. ارلن ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت g ۱۵۰ به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس میزان PHB تولید شده بررسی و بهترین منبع نیتروژن انتخاب گردید.

۳- تأثیر pH: تأثیر pH محیط در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات، با تلقیح جدایه منتخب به ارلن های حاوی ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط MSM به همراه بهترین منبع کربن و

نیتروژن در pH های (۹-۵) انجام شد. تنظیم pH محیط به وسیله HCl و NaOH صورت گرفت. سپس ارلن ها در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ g به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری شدند. پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده اندازه گیری و بهترین pH به منظور افزایش بازده تولید PHB انتخاب شد.

٤- تأثیر دما: به منظور تعیین دمای بهینه در تولید PHB، جدایه منتخب به ارلن های حاوی ۱۰۰۰ میلی لیتر محیط MSM به همراه بهترین منبع کربن، نیتروژن و pH تلقیح، و در گرمخانه با دماهای (۲۵، ۳۰، ۳۷، ٤٠ و ٤٥) درجه سلسیوس به مدت ٤٨ ساعت نگهداری شدند. سپس میزان تولید پلی هیدروکسی بوتیرات در دماهای مختلف بررسی گردید (۲۰).

ز) آزمون های تأییدی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات:

۱) طیف سنجی مادون قرمز (FTIR): برای تعیین حضور گروه های عاملی مختلف در PHB استخراج شده از دستگاه طیف سنجی مادون قرمز (WQF-510A، چین) استفاده شد. آنالیز FTIR به روش تامر (Tamer) و همکاران در سال ۲۰۱۵ انجام شد. برای این منظور ۵ میلی گرم از نمونه PHB با پتاسیم بروماید (KBr) مخلوط شد و طیف جذب FTIR در cm^{-1} ٤٠٠٠-٤٠٠ ثبت گردید (۲۵).

۲) طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون (H NMR): ۱۰ میلی گرم از بیوپلیمر استخراج شده در ۱ میلی لیتر کلروفرم دوتریم دار ($CDCl_3$) حل شد. سپس با استفاده از دستگاه H-NMR (Bruker Avance II 500 MHz) آنالیز گردید (۲٦).

ح) شناسایی مولکولی جدایه: به منظور استخراج DNA از کیت استخراج DNA (شرکت Gene All کره) استفاده شد. به منظور تکثیر ناحیه ژنی 16S rRNA از پرایمرهای fD1 (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و rP2 (5′-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3′) استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر Master Mix (شرکت تاکارای ژاپن)، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر، ٦ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده و ۵ میکرولیتر DNA الگو انجام شد. واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ٤٠ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۱دقیقه، اتصال در دمای ٦٠ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۷). محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد منتقل و پس از الکتروفورز به منظور تعیین توالی به شرکت ژن فناوران ارسال گردید. نتیجه حاصل از تعیین توالی در بانک ژنی *BLAST* و همولوژی آن بررسی شد. درخت فیلوژنتیک به وسیله روش اتصال–همسایگی (neighbour-joining) و با استفاده از نرم افزار *MEGA X* ترسیم شد.

ط) آنالیز آماری داده ها: تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نسخه بیست و دوم نرم افزار *SPSS* انجام شد. آزمون ها در ۳ تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین و خطای استاندارد از میانگین بیان گردید. همچنین به منظور بررسی تأثیر متغیرهای کربن، نیتروژن، pH و دما در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات از آزمون آماری واریانس یک طرفه (*One-way ANOVA*) و سپس روش دانکن در آزمون *post hoc* استفاده شد. نتایج با مقدار ($P<0.05$) به عنوان نتایج معنی دار تلقی شد.

یافته ها

الف) جداسازی و شناسایی باکتری های تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات و انتخاب جدایه برتر: تعداد ۱۵ جدایه باکتریایی از پساب شرکت پتروشیمی جداسازی شد. تمام جدایه ها براساس رنگ آمیزی سودان سیاه، مورد غربالگری قرار گرفتند. از مجموع ۱۵ باکتری جداسازی شده، ۸ جدایه توانایی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات را نشان دادند. به منظور انتخاب جدایه برتر، از بین جدایه ها با پتانسیل تولید PHB، تنها یک جدایه *باسیلوس* براساس محتوای پلیمر درون سیتوپلاسم باکتری انتخاب شد. در جدایه منتخب پس از ٤٨ ساعت گرمخانه گذاری، براساس بررسی میکروسکوپی افزایش میزان تجمع پلیمر درون سیتوپلاسم نسبت به سایر

جدایه ها مشاهده شد. پلی هیدروکسی بوتیرات به صورت گرانول های سیاه درون سیتوپلاسم صورتی رنگ مشاهده گردید. همچنین رنگ آمیزی سودان سیاه داخل پلیت حضور گرانول های لیپوفیلیک را در جدایه ها نشان داد و کلنی ها به رنگ سیاه ظاهر شدند که از نظر شدت رنگ پذیری متفاوت بودند. جدایه منتخب براساس این تکنیک نیز شدت رنگ پذیری بیشتری را نسبت به سایر جدایه ها نشان داد.

ب) ویژگی های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه برتر: براساس نتیجه حاصل از رنگ آمیزی گرم جدایه به شکل باسیل گرم مثبت مشاهده شد. براساس رنگ آمیزی اسپور، اندوسپور به رنگ سبز، بیضوی شکل و در موقعیت مرکزی و سلول رویشی به رنگ صورتی مشاهده گردید. همچنین کلنی ها در محیط نوترینت آگار به شکل گرد و زرد رنگ مشاهده شدند. سایر نتایج در جدول ۱ نشان داده شده است.

ج) بهینه سازی شرایط محیط کشت به منظور افزایش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات:

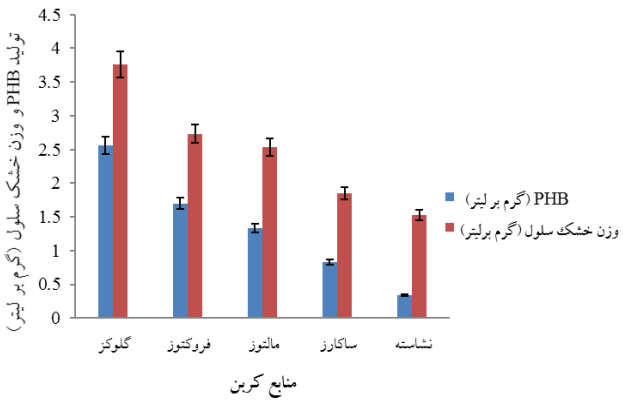
۱- تأثیر منابع کربن: در بین منابع مختلف کربن مورد آزمایش، گلوکز به عنوان بهترین منبع کربن برای تولید حداکثر PHB به میزان ۲/۵۶ گرم بر لیتر بود. همچنین کمترین مقدار تولید PHB از منبع نشاسته به میزان ۰/۳٤ گرم بر لیتر حاصل شد. نتایج در شکل ۱ نشان داده شده است.

۲- تأثیر منابع نیتروژن: نتایج حاصل از بررسی تأثیر منابع مختلف نیتروژن در تولید حداکثر PHB و انتخاب بهترین منبع نشان داد که سولفات آمونیوم، کلراید آمونیوم، نیترات آمونیوم، پپتون و عصاره مخمر به عنوان سوبسترای تولید PHB می توانند توسط جدایه منتخب مورد استفاده قرار گیرند. در بین منابع مختلف نیتروژن مورد آزمایش سولفات آمونیوم به عنوان بهترین منبع نیتروژن به منظور افزایش تولید PHB به میزان ۳/۱ گرم بر لیتر بود. پس از سولفات آمونیوم، کلراید آمونیوم به عنوان بهترین منبع انتخاب شد. کمترین مقدار تجمع PHB به میزان ۰/۵ گرم بر لیتر از عصاره مخمر حاصل شد. نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.

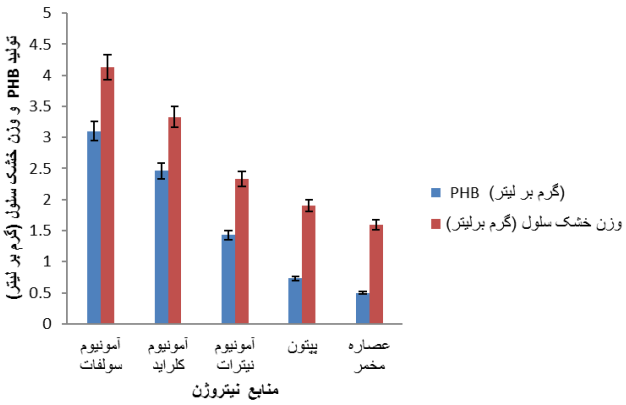
۳- تأثیر pH: نتایج نشان داد که pH ۷ به عنوان pH بهینه به منظور تولید PHB توسط جدایه برتر است. میزان PHB سنتز شده در این pH به میزان ۳/٤ گرم بر لیتر می باشد. کمترین میزان سنتز در pH ۵ به میزان ۰/۱٦ گرم بر لیتر مشاهده شد. نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است.

٤- تأثیر دما: نتایج بررسی دماهای مختلف نشان داد که مناسب ترین دما به منظور تولید حداکثر PHB دمای ۳۰ درجه سلسیوس می باشد. جدایه در این دما قادر به تولید ٦ گرم بر لیتر PHB بود. همچنین دمای ٤۵ درجه سلسیوس با میانگین تولید ۰/٤٦ گرم بر لیتر کمترین مقدار تولید PHB را به خود اختصاص داد. نتایج در شکل ٤ نشان داده شده است. با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و سپس روش دانکن در آزمون post hoc مشخص گردید که تأثیر متغیرهای کربن، نیتروژن، pH و دما در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات معنی دار می باشند.

د) طیف سنجی مادون قرمز: در طیف سنجی مادون قرمز



شکل ۱: تأثیر منابع کربن مختلف بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات.

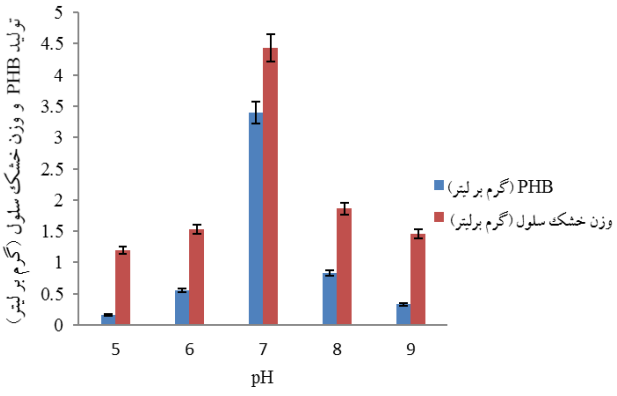


شکل ۲: تأثیر منابع نیتروژن مختلف بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات.

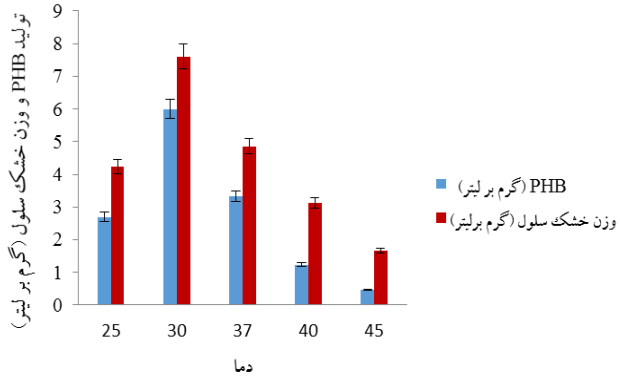
حاصل از پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده توسط جدایه منتخب، باند جذبی مشاهده شده در ناحیه $3442\ cm^{-1}$ مربوط به ارتعاشات کششی O-H، باندهای جذبی مشاهده شده در عدد موجی $2924\ cm^{-1}$ و $1442\ cm^{-1}$ به ترتیب مربوط به ارتعاشات کششی و خمشی C-H، همچنین باند جذبی در عدد موجی $1723\ cm^{-1}$ به ارتعاش کششی C=O و باند جذبی ظاهر شده در عدد موجی $1233\ cm^{-1}$ به ارتعاش کششی C-O مربوط می باشد (شکل ۵).

ه) طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون: طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون ترکیب پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده در شکل ٦ نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود سیگنال مربوط به پروتون های CH_3 به صورت دوتایی با سطح زیر پیک معادل سه اتم هیدروژن در جابجایی شیمیایی ۱/۲۹ ppm، سیگنال مربوط به پروتون های دیاستروتاپیک CH_2 به صورت دو سیگنال دوتایی –دوتایی با سطح زیر پیک معادل دو اتم هیدروژن در جابجایی شیمیایی ۲/٦٥–۲/٤٦ ppm و سیگنال مربوط به پروتون های CH به صورت چندتایی با سطح زیر پیک معادل یک اتم هیدروژن در جابجایی شیمیایی ۵/۳۰–۵/۲٦ ppm ظاهر شد که با ساختار ترکیب مورد نظر هم خوانی دارد.

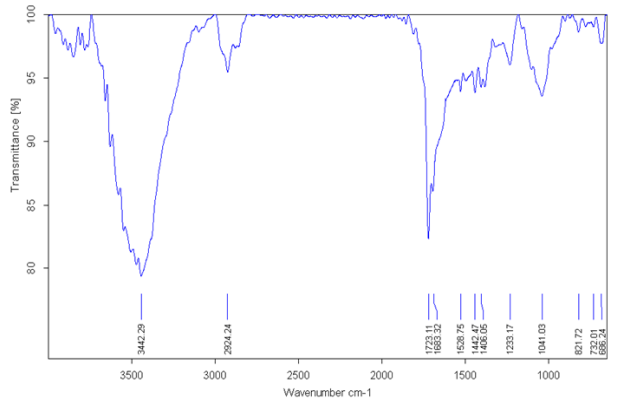
و) شناسایی مولکولی: الکتروفورز محصولات PCR ژن 16S rRNA بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حضور قطعه حدوداً ۱۵۰۰ جفت بازی را تأیید کرد. با بررسی نتایج حاصل از تعیین توالی، با استفاده از برنامه *BLAST* در سایت NCBI و با مقایسه توالی ژن 16S rRNA جدایه منتخب با سایر توالی های ثبت شده در این پایگاه درصد شباهت جدایه با سایر باکتری ها به دست آمد. بر اساس این نتایج و رسم درخت فیلوژنتیک مشخص گردید که باکتری منتخب متعلق به جنس *باسیلوس* و



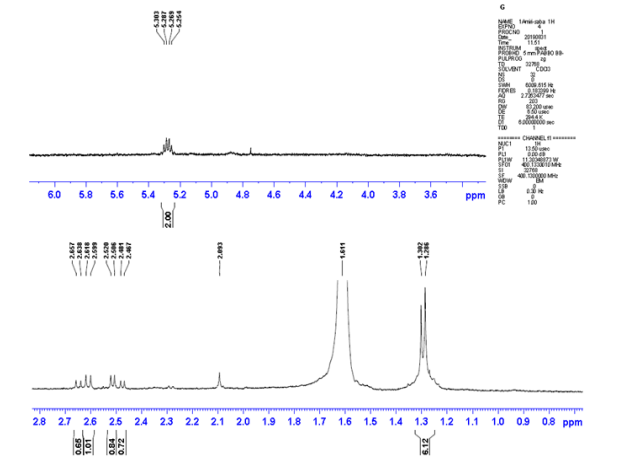
شکل ۳: تأثیر گستره pH بر تولید پلی هیدروکسی بوتیرات.



شکل ٤: تأثیر دماهای مختلف در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات.



شکل ۵: نمودار طیف سنجی مادون قرمز حاصل از PHB تولید شده توسط باکتری *باسیلوس سرئوس*.

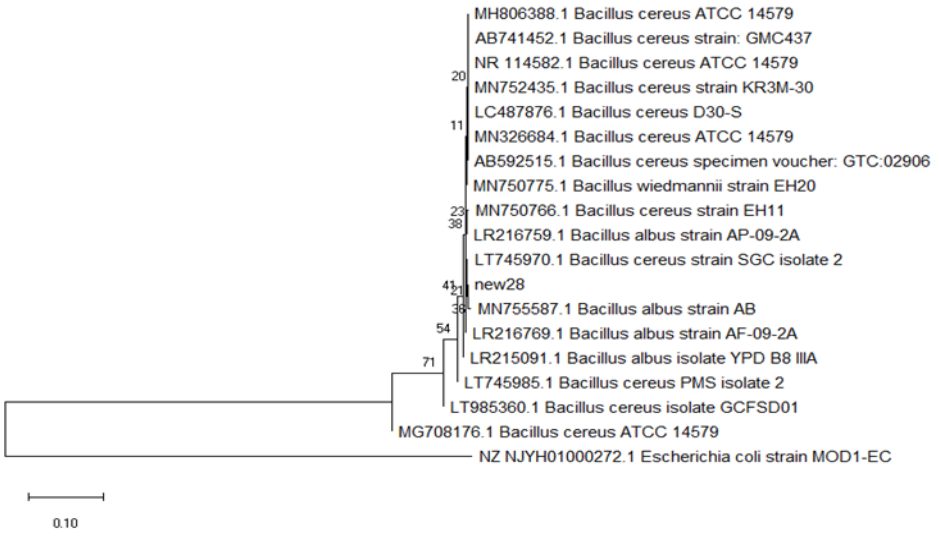


شکل ٦: نمودار طیف سنجی رزونانس مغناطیسی هسته پروتون حاصل از PHB تولید شده توسط باکتری *باسیلوس سرئوس*.

گونه *سرئوس* است و جدایه دارای ۹۹ درصد همولوژی با *باسیلوس سرئوس* می باشد (شکل ۷). همچنین شباهتی با سایر سویه های شناخته از این خانواده ندارد. بنابراین می توان این جدایه را به عنوان یک سویه جدید از نظر تاکسونومی در نظر گرفت.

بحث

انواع آلودگی های منابع مختلف به ویژه پسماندهای پلی اتیلن در زندگی روزمره ما وجود دارد (۲). محصولات پتروشیمی غیر تخریب پذیر مورد استفاده برای ساخت پلاستیک ها، در صورت عدم مدیریت پسماند و کنترل بسترها به عنوان تهدید بزرگی برای محیط زیست محسوب می شوند. میکروارگانیسم ها از پتانسیل بالایی برای تبدیل بیولوژیکی پلیمرهای پلاستیکی به محصولات ساده تر توسط مکانیسم های هوازی و بی هوازی برخوردار هستند (۲۸). بنابراین نیاز زیادی به شناسایی سویه های میکروبی جدید و مکانیسم های آنها برای تجزیه پلی مرهای مبتنی بر فسیل وجود دارد. تاکنون باکتری های تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات از محیط های گوناگون از جمله خاک، کارخانه های نفت، مناطق آلوده به روغن ماشین، فاضلاب خانگی، لجن، آب دریا، پساب های صنعتی مانند صنعت لبنیات، قند و نساجی جداسازی شده اند. همچنین مطالعه ای به منظور جداسازی باکتری های تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات از پساب صنایع پتروشیمی عسلویه صورت نگرفته است. پژوهش حاضر اولین گزارش مبنی بر جداسازی باکتری تولید کننده پلی هیدروکسی بوتیرات از این منطقه است. محیط های آلوده حاوی مواد مغذی ضروری هستند و برای تولید پلی هیدروکسی بوتیرات غنی می باشند (۲۹). پساب صنایع پتروشیمی به دلیل آلودگی صدمات زیادی را برای جامعه انسانی ایجاد می کنند که امروزه این مساله به یکی از نگرانی های عمده در ارتباط با تأثیر صنایع بر سلامت انسان تبدیل شده است (۳۰). پساب صنایع پتروشیمی در معرض آلاینده های هیدروکربنی یا نفتی قرار دارند. بنابراین در این اکوسیستم باکتری ها از هیدروکربن ها به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می کنند و آن را به فرم پلی هیدروکسی بوتیرات ذخیره می کنند. در مطالعه حاضر از میان باکتری ها با توانایی تولید پلی هیدروکسی بوتیرات یک جدایه *باسیلوس* به عنوان جدایه برتر براساس روش رنگ آمیزی سودان سیاه داخل پلیت و مشاهده میکروسکوپی انتخاب شد. روش رنگ آمیزی با استفاده از سودان سیاه داخل پلیت به عنوان روشی به منظور غربالگری سریع باکتری های تجمع کننده پلی هیدروکسی بوتیرات است. معیار انتخاب در این روش براساس شدت



شکل ۷: درخت فیلوژنی سویه جدید *باسیلوس سرئوس* با استفاده از روش Neighbor Joining و ضریب Boot Strap ۱۰۰.

رنگ پذیری است (۲۹). دسوکی (Desouky) و همکاران در سال ۲۰۱٤ از این روش به منظور جداسازی باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* (*Bacillus thuringienesis*) از خاک استفاده نمودند (۳۱). در مطالعه دیگری هامشاری (Hamshary) و همکاران در سال ۲۰۱۸ به منظور جداسازی باکتری های تولید کننده پلاستیک زیستی از این روش استفاده کردند (۲۳). به *طور کلی میکروب ها به دلیل سازگاری زیاد در شرایط مختلف محیطی تولید کننده های قدرتمند* پلی هیدروکسی بوتیرات هستند. هزینه زیاد تولید پلاستیک زیستی یکی از موانع عمده تولید PHB می باشد، از این رو تکنیک های مختلفی به منظور تولیدشان در مقیاس صنعتی پیشنهاد شده است. انتخاب انواع مناسب باکتری ها که قادر به تولید یا تجمع PHB در مقیاس بزرگ هستند مهمترین معیار است (۲). از این میان باکتری های گرم مثبت مانند گونه های *باسیلوس* برای تولید PHB از توانایی بسیار بالایی برخوردار هستند و به طور گسترده برای تولید صنعتی PHB استفاده می شوند. به نظر می رسد این باکتری ها به دلیل بازده تولید بیشتر در شرایط تخمیر، شرایط فقر مواد مغذی و عدم وجود لیپوپلی ساکارید (LPS)، کاندیدای مناسبی برای تولید PHB هستند. همچنین باکتری های یاد شده PHB خالص تری تولید می کنند و بدین ترتیب می توانند هزینه تولید را به میزان قابل توجهی کاهش دهند (۲۹ و ۳۲). بر این اساس در مطالعه حاضر به منظور تولید PHB و با هدف بهینه سازی تولید آن یک گونه *باسیلوس* به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. براساس نتایج آزمون های بیوشیمیایی مشخص شد که جدایه منتخب در این مطالعه به جنس *باسیلوس* تعلق دارد. سپس براساس تکثیر ژن 16S rRNA و مطالعات مربوط به روابط فیلوژنتیک مشخص شد که این جدایه می تواند به عنوان یک سویه جدید از *باسیلوس سرئوس* معرفی گردد. تأیید نهایی سنتز پلی هیدروکسی بوتیرات توسط جدایه مورد مطالعه به وسیله آنالیزهای طیف سنجی مادون قرمز و رزونانس مغناطیسی هسته پروتون انجام و با پژوهش های گزارش شده قبلی مقایسه شد. آنالیز فیزیکوشیمیایی پلی هیدروکسی بوتیرات تولید شده در مطالعه حاضر نشان داد که این نتایج با طیف های حاصل از PHB استخراج شده از گونه های *باسیلوس* مورد مطالعه توسط جانگرا و نهرا (Jangra و Nehra) در سال ۲۰۱۷ و هاسان (Hassan) و همکاران در سال ۲۰۱٦ هم خوانی دارد (۱۳ و۲٦). با توجه به نقش مهم منابع کربن، نیتروژن، pH و دما در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات، اثر این پارامترها به منظور تعیین شرایط بهینه برای به حداکثر رساندن تولید PHB توسط جدایه منتخب بررسی شد. یکی از مهمترین عوامل مؤثر در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات منبع کربن است (۱٦). به همین منظور در این مطالعه تأثیر منابع مختلف کربن مانند گلوکز، فروکتوز، مالتوز، ساکارز و نشاسته بر تولید PHB بررسی شد. تأثیر این منابع بر بازده تولید این بیوپلیمر نشان داد که باکتری در حضور قند گلوکز به عنوان بهترین منبع در غلظت ۱٪، قادر به تولید ٦۸/۰۸٪ از این بیوپلیمر است. همچنین کمترین میزان تولید از منبع نشاسته به میزان ۲۲/۲۲٪ حاصل شد. منبع کربن به عنوان یکی از موارد کلیدی در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات به وسیله میکروارگانیسم ها است. منابع کربن ۳ عملکرد مختلف را شامل می شوند: سنتز زیست توده، محافظت از سلول، پلی مریزاسیون پلی هیدروکسی بوتیرات (۲۲). نهرا (Nehra) و همکاران در سال ۲۰۱۵ گلوکز را به عنوان بهترین منبع کربن به منظور تولید حداکثر PHB معرفی نمودند (۱٦). رستم زاد و همکاران در سال ۲۰۱۷ با جداسازی *باسیلوس سرئوس* تولید کننده PHB از خاک آلوده به پساب کارخانه شیر بیان نمودند که شرایط بهینه به منظور تولید حداکثر PHB استفاده از گلوکز به عنوان منبع کربن است (۳۳). با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر و نتایج قبلاً گزارش شده می توان بیان نمود که قند ساده ای مانند گلوکز به راحتی توسط باکتری ها استفاده شده و این امر منجر به افزایش بازده تولید PHB می شود. در مقابل قند پیچیده ای مانند نشاسته به راحتی توسط باکتری ها مورد استفاده قرار نمی گیرد. در نتیجه افزایش پیچیدگی نشاسته منجر به کاهش تولید پلی هیدروکسی بوتیرات می شود (۱٦). در پژوهش حاضر در بین منابع مختلف نیتروژن مورد بررسی سولفات آمونیوم با میزان تولید ۷۵/۰٦٪

پلی هیدروکسی بوتیرات به عنوان بهترین منبع انتخاب شد. ایمان (Iman) و همکاران در سال ۲۰۱۷، آمونیوم سولفات را به عنوان منبع مناسب نیتروژن به منظور تولید PHB به میزان ۱/۰۳ گرم بر لیتر توسط *سودوموناس آئروجینوسا* Dw_7 (*Pseudomonas aeruginosa* Dw_7) معرفی نمودند (۳٤). همچنین میزان PHB تولید شده در مطالعه آنها در مقایسه با مطالعه ما کمتر بود. در بررسی انجام شده توسط رانگانادها ردی (Ranganadha Reddy) و همکاران در سال ۲۰۱۸ آمونیوم سولفات به عنوان بهترین منبع نیتروژن به منظور بیشترین میزان تولید PHB در *اسینتوباکتر نوسوکمی آلیس* RR20 (*Acinetobacter nosocomialis* RR20) گزارش شد (۲۰). آل شهری (Alshehrei) در سال ۲۰۱۹ به منظور تولید پلی هیدروکسی بوتیرات باکتری *باسیلوس* (*Bacillus*. sp) را از خاک در عربستان سعودی جداسازی نمود. این باکتری به عنوان جدایه برتر در محیط حاوی آمونیوم سولفات به عنوان بهترین منبع نیتروژن قادر به سنتز ٤٨/٣٨ درصد PHB بود (۳۵). بنابراین نوع منبع نیتروژن و نوع میکروارگانیسم هایی که از آن استفاده می کنند عامل اصلی برای تولید کارآمد PHB هستند (۲۲). در مطالعه حاضر بررسی تأثیر ارزیابی pH نشان داد که pH ۷ به عنوان pH بهینه برای تولید بیوپلی مر توسط جدایه منتخب است. همچنین با توجه به بازده کم تولید در pH ۵ و ۹ می توان بیان نمود که pH بالاتر و پایین تر از حد بهینه ممکن است آنزیم های درگیر در سنتز بیوپلی مر را تحت تأثیر قرار داده و باعث تخریب آنها شود. گودهامان (Gowdhaman) و همکاران در سال ۲۰۱٦ گزارش نمودند که pH ۷ برای تولید PHB توسط *باسیلوس سرئوس* BB613-A بهینه است (۳٦). این نتیجه همسو با یافته های مطالعه ما بود. در مطالعه دیگری هاواس (Hawas) و همکاران در سال ۲۰۱٦ pH ۷ را به عنوان بهترین pH برای تولید PHB به میزان ٦۱٪ توسط *سودوموناس بورئوپولیس* J1 (*Pseudomonas boreopolis* J1) معرفی کردند (۲٤). میزان PHB تولید شده در مطالعه آنها کمتر از مطالعه حاضر بود. نتایج مطالعه ما نشان داد که در pH ۷ میزان PHB تولید شده به میزان ۷٦/۷٤٪ است. همچنین چاندانی (Chandani) و همکاران در سال ۲۰۱۸ نشان دادند که حداکثر تولید PHB از pH ۸ به میزان ۲/۷۷ گرم بر لیتر توسط *Acinetobacter* sp. K3 حاصل شد. این نتیجه ناهمسو با نتایج پژوهش حاضر بود. این تفاوت در نتایج می تواند به دلیل اختلاف در باکتری های مورد مطالعه باشد. بنابراین کنترل صحیح pH بسیار مهم است. زیرا تغییر جزئی در pH می تواند در فرآیند متابولیک یک ارگانیسم تأثیرگذار باشد (۲۲). از بین ۵ شرایط دمایی مختلف، حداکثر میزان تولید بیوپلی مر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به میزان ٦ گرم بر لیتر صورت پذیرفت. این دما به عنوان دمای بهینه برای تولید PHB توسط جدایه برتر بود. کمترین سطح تولید PHB در دمای ٤۵ درجه سلسیوس مشاهده شد. در واقع به نظر می رسد با افزایش دما فعالیت آنزیم های دخیل در سنتز PHB کاهش می یابد و حساسیت آنزیم ها به دمای بالا را می توان عامل کاهش تولید بیوپلی مر دانست. این نتایج مطابق با یافته های اس نها (Sneha) و همکاران در سال ۲۰۱۷ است که دمای ۳۰ درجه سلسیوس را به عنوان دمای بهینه به منظور تولید حداکثر PHB به وسیله *باسیلوس سرئوس* گزارش نمودند (۳۷). در مطالعه دیگری بلال و فرید (Belal و Farid) در سال ۲۰۱٦، دمای بهینه به منظور تولید PHB توسط *باسیلوس سرئوس* جدا شده از خاک را دمای ۳۰ درجه سلسیوس معرفی نمودند (۳۸). با این تفاوت که *باسیلوس سرئوس* شناسایی شده در مطالعه حاضر توانایی بالاتری را در تولید پلی هیدروکسی بوتیرات نسبت به نتایج مطالعات گزارش شده نشان داد. در مطالعه ایرسات (Irsath) و همکاران در سال ۲۰۱۵ دمای ۳۷ درجه سلسیوس به عنوان دمای بهینه برای تولید PHB به وسیله *باسیلوس سوبتیلیس* معرفی شد (۳۹). همیه (Hamieh) و همکاران در سال ۲۰۱۳ دمای ۳۷ درجه سلسیوس را به عنوان دمای بهینه به منظور تولید PHB توسط *باسیلوس تورنجینسیس* و *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) معرفی نمودند (٤۰). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر و سایر نتایج گزارش شده، تأیید کننده یافته های تایرومالا (Thirumala) و همکاران در سال ۲۰۱۰ است که گزارش نمودند PHB توسط

گونه های *باسیلوس* در محدوده ۳۸-۳۰ درجه سلسیوس تولید می شود (۳۲).

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان تولید PHB را می توان با بهینه سازی شرایط تخمیر بهبود بخشید. بنابراین شرایط بهینه کشت برای تولید حداکثر PHB توسط باکتری جدا شده از پساب پتروشیمی شامل گلوکز به عنوان منبع کربن، سولفات آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن، pH ۷ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس است. شناسایی سویه های باکتریایی با پتانسیل تولید بالای PHB و بهینه سازی شرایط به منظور تولید حداکثر این بیوپلی مر برای جایگزینی پلاستیک های زیستی به جای پلاستیک های غیر تخریب پذیر و کاهش آلودگی محیط زیست بسیار مؤثر است. بنابراین جدایه باکتریایی مطالعه حاضر می تواند به عنوان یک سویه بومی کاندیدای مناسب به منظور تولید صنعتی پلی هیدروکسی بوتیرات با استفاده از شرایط کشت بهینه باشد. همچنین پساب صنایع پتروشیمی به عنوان یک زیستگاه مناسب به منظور جداسازی باکتری های تولید کننده این بیوپلی مر با ارزش است. به منظور بهبود توانایی تولید این پلی مر تجزیه پذیر زیستی توسط میکروارگانیسم ها و کاهش هزینه های تولید، استفاده از سوبستراهای ارزان قیمت مانند ملاس، پسماندهای پتروشیمی و کشاورزی به عنوان منبع کربن پیشنهاد می شود. همچنین می توان با دستکاری های ژنتیکی در ژن های مسئول ساخت بیوپلی مر بازده تولید را افزایش داد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به دلیل حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد.

References

1. Kampa M, Castanas E. Human health effects of air pollution. Environ Pollut J. 2008; 151: 362- 367.
2. Shivalkar YK, Prabha R. Polyhydroxybutyrate as bio-degradable plastic – a review. J Environ Sci Tox Food Technol. 2017, 11 (5): 10-12.
3. Sharma M, Dhingra HK. Poly-β-hydroxybutyrate: a biodegradable polymer, biosynthesis and biodegradation. BMJR. 2016; 14(3): 1-11.
4. Vijaya C, Reddy RM. Impact of soil composting using municipal solid waste on biodegradation of plastics. Indian J Biotechnol. 2008; 7: 235–239.
5. Reddy RL, Reddy VS, Gupta GA. Study of bio-plastics as green and sustainable alternative to plastics. Int J of Emerging Technol and Advanced Eng. 2013; 3(5): 82-89.
6. Getachew A, Woldesenbet F. Production of biodegradable plastic by polyhydroxybutyrate (PHB) accumulating bacteria using low cost agricultural waste material. BMC Res Notes. 2016; 9(509): 1-9.
7. Al-Kaddo KHB, Sudesh K, Samian MR. Screening of bacteria for - PHA production using waste glycerol as carbon source and the ability of new strain to produce P(3HB-co-3HV)

copolymer. Mal J Microbiol. 2016; 12(3): 245-253.

8. Panchal Sh. Recent developments on biodegradable polymers and their future trends. Int Res J Sci Eng. 2016; 4 (1): 17-26.

9. Sharma M, Dhingra HK. Poly-β-hydroxybutyrate: a biodegradable polyester, biosynthesis and biodegradation. British Microbiology Res J. 2016; 14(3): 1-11.

10. Chaitanya K, Mahmood SK, Kausar R, Sunilkumar N. Biotechnological production of polyhydroxyalkanoates by various isolates: a review. Int J Pharma Sci Invent. 2014; 3(9): 1-11.

11. UMA Maheswari M, Dhandayuthapani K. Fermentation optimization for production of polyhydroxybutyrate (PHB) by newly isolated Azotobacter vinelandii KDP. Int J Pharm BioSci. 2013; 4(3): 779-787.

12. Shah KR. Optimization and production of polyhydroxybutyrate (PHB) by *Bacillus subtilis* G1S1 from soil. Int J Curr Microbiol App Sci. 2014; 3(5): 377-387.

13. Jangra MR, Nehra KS. Isolation, screening and characterization of new strains with optimization studies to augment bacterial PHB production. Bull Env Pharmacol Life Sci. 2017; 6(8): 34-44.

14. Nehra K, Chhabra N, Sidhu PK, Lathwal P, Rana JS. Molecular identification and characterization of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) producing bacteria isolated from contaminated soils. Asian J Microbiol Biotech Env Sci. 2015; 17(4): 281-290.

15. Bhagowati P, Pradhan Sh, Hirak R, Surajit D. Production, optimization and characterization of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic by Bacillus spp. Biosci Biotech Biochem. 2015; 79(9): 1454- 1463.

16. Nehra K, Jaglan A, Shaheen A, Yadav J, Lathwal P. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) by bacteria isolated from rhizospheric soils. Int J Microbial Res Technol. 2015; 2(3): 38 -48.

17. Doetsch RN. Determinative methods of light microscopy. In: Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood WA, Krieg NR, Phillips GB. Manual of methods for general bacteriology. 2nd ed. Washington. American Society of Microbiology-; 1981-: 22-31.

18. Garrity G-M, Brenner D-J, Krieg N-R, Staley J-T. Bergey's manual of systematic bacteriology. 3nd ed. New York. Springer; 2005.

19. Vashist H, Sharma D, Gupta A. A review on commonly used biochemical test for bacteria. Inov J Life Sci. 2013; 1(1): 1-7.

20. Ranganadha Reddy A, Venkateswarulu TC, Sudhakar P, Krupanidhi S, Vidya Prabhakar K. Optimization of process parameters for polyhydroxybutyrate production from isolated Acinetobacter nosocomialis RR20 through submerged fermentation. Current Trends in Biotechnol Pharmacy. 2018; 12 (2): 159-168.

21. Zohri AN, El-Dean AMK, Abuo-Dobara MI, Ali M-I, Bakr MN, Ramy A-KH. Production of polyhydroxyalkanoate by local strain of *Bacillus megaterium* AUMC b 272 utilizing sugar beet wastewater and molasses. Egyptian Sugar J. 2019; 13: 45-70.

22. Chandani N, Mazumder PB, Bhattacharjee A. Biosynthesis of biodegradable polymer by a potent soil bacterium from a stress-prone environment. J Applied Biology Biotechnol. 2018; 6 (2): 54-60.

23. El- Hamshary OIM, Kadi HA, AI-Twaty NH. Molecular characterization and uv improvement of some bioplastic-producing bacteria isolated from plants in Taif city, Saudi Arabia. Pharmacophore. 2018; 9(2): 7-18.

24. Hawas JM, El-Banna T, Belal EBA, El-Aziz AA. Production of bioplastic from some selected bacterial- strains. Int J Curr Microbiol App Sci. 2016; 5(1): 10-22.

25. Tamer TM, Omer AM, Hassan MA, Hassan ME, Sabet MM, Eldin MSM. Development of thermos-sensittive poly N- isopropyl acrylamide grafted chitosan derivatives. J Applied Pharmaceutical Sci. 2015; 5(3): 1-6.

26. Hassan MA, Bakhiet EK, Salah GA, Hussien HR. Production and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus* sp. isolated from Egypt. J Applied Pharmaceutical Sci. 2016; 6(4): 46-51.

27. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J Bacteriol. 1991;173: 697–703.

28. Ahmed T, Shahid M, Azeem F, Rasul I, Shah AA, Noman M, Hameed A, Manzoor N, Muhammad S. Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. Environ Sci Pollut Res. 2018; 25(8):7287-7298.

29. Mascarenhas J, Aruna K. Screening of polyhydroxyalkonates (PHA) accumulating bacteria from diverse habitats. J Global Biosci. 2017; 6: 4835-4848.

30. Keshmiri S, Pordel S, Raeesi AR, Nabipour I, Darabi H, Jamali S, Dobaradaran S, Heidari GH, Ostovar A, Ramavandi B, Tahmasebi R, Marzban M, Khajeian AM, Sanati AM, Farrokhi Sh. Environmental pollution caused by gas and petrochemical industries and its effects on the health of residents of Assaluyeh region, iranian energy capital: a review study. Iran South Med J. 2018; 21(2): 162-185. [In Persian]

31. Desouky SE, El-Shiekh HH, Elabd MA, Shehab AM. Screening, optimization and extraction of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from *Bacillus thuringienesis*. J of Advances in Biology and Biotechonol. 2014; 1(1): 40-54.

32. Thirumala M , Reddy S-V, Mahmood S-K. Production and characterization of PHB from two novel strains of *Bacillus* spp. isolated from soil and activated sludge. J Ind Microbiol Biotechnol. 2010; 37(3):271–278.

33. Rostamzad A, Rezaee H, Hoshmndfar R. Isolation of biodegradable plastic producing bacteria from soil contaminated sewage in Ilam milk manufactory. J Ilam Univ Med Sci. 2017; 25(3): 125-138. [In Persian]

34. Iman HG, Nadhim HH, Saad HKH. Bioplastic (poly -3-hydroxybutyrate) production by local *pseudomonas aeruginosa* isolates utilizing waste cooking oil. World J Pharma Res. 2017; 6 (8): 289-302.

35. Alshehrei F. Production of polyhydroxybutyrate (PHB) by bacteria isolated from soil of Saudi Arabia. J Pure Appl Microbiol. 2019; 13-(2): 897-904.

36. Bharathi B, Gowdhaman D, Ponnusami V. Isolation and identification of polyhydroxybutyrate (PHB) producing *Bacillus cereus* BB613-A novel isolate. Int J ChemTech Res. 2016; 9(11): 224-228.

37. Sneha P, Changam SS, Balakumuran MD. Optimization, purification and characterization of polyhydroxybutyrate (PHB) produced by *Bacillus cereus* isolated from sewage. Int J Chem

Tech Res-. 2017;- 10(7): 884-904.

38. Belal EB, Farid MA. Production of poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) by *Bacillus cereus*. Int J Curr Microbial App Sci. 2016; 5(7): 442-460.

39. Irsath H, Santhosh S, Hemalatha V, Vikramathithan M, Dhanasekar R, Dhandapani R. Production and optimization of polyhydroxybutyrate using *Bacillus subtilis* BP1 isolated from sewage sample. Int J Pure App BioSci. 2015; 3(1): 158-166.

40. Hamieh A, Olama Z, Holail H. Microbial production of polyhydroxybutyrate, a biodegradable plastic using agro-industrial waste products. Glo Adv Res J Microbiol . 2013; 2(3): 54-64.