Journal of Microbial World
Volume 14, No. 3, December 2021

Original Article

Molecular Identification of Native Pseudomonas Strains with Polyethylene Degradation Ability from Soil

Hanieh Shahreza[1], Abbas Akhavan Sepahy[2], Farzaneh Hosseini[2], Ramezanali Khavari Nejad[1]

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Nowadays, high consumption plastics such as polyethylene are recognized as one of the major environmental pollutants by the World Environment Organization. The aim of this study was to isolate and identify native Pseudomonas bacterial strains with the polyethylene packaging degradation ability.

Materials & Methods: In order to conduct this study, soil samples were collected. In order to isolate the isolates with polyethylene degradation ability, two methods of direct culture and culture by pre-enrichment method were used. After culturing the bacteria in MSM medium and examining the percentage of plastic weight loss, the superior strain was selected for DNA extraction and PCR of *alk-B* gene. PCR results were sequenced and examined phylogenetically.

Results: The results of the present study showed that the percentage of degradation of polyethylene by Pseudomonas strains was 7.2% at most and 4.5% on average. Also, all purified degrading bacteria in this study harbored alk-B gene.

Conclusion: The results showed that the degradation of polyethylene materials can be significantly accelerated by using and optimizing bacteria isolated from soil. It seems that by promoting genetic methods based on the genome of bacteria, especially the strain of *Pseudomonas aeruginosa*, it is possible to develop methods during which all commonly used types of polyethylene are degraded in a much shorter time than normal.

Keywords: Polyethylene, Pseudomonas aeruginosa, alk-B gene, gene cloning.

Received: 9 June 2021 Revised: 2 October 2021 Accepted: 22 November 2021

Correspondence to: Abbas Akhavan Sepahy
Tel: +98 21 22941083
E-mail: a_akhavan@iau-tnb.ac.ir

Journal of Microbial World 2021, 14(3): 37-46
DOI: 10.30495/jmw.2021.690446

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 چهاردهم شماره سوم (پیاپی ۴۸) پاییز ۱۴۰۰
صفحات ۴۶-۳۷

Original Article

جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری‌های سودوموناس بومی تجزیه کننده بسته بندی‌های پلی‌اتیلن از خاک مراکز دفن پسماند در شهرهای تهران و کرمان

هانیه شاه رضا [۱]، عباس اخوان سپهی [*۲]، فرزانه حسینی [۲]، رمضانعلی خاوری نژاد [۱]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی رشته میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. [۲] دانشیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه پلاستیک‌های پر مصرف همچون پلی‌اتیلن به عنوان یکی از عمده‌ترین آلاینده‌های محیط زیست از طرف سازمان جهانی محیط زیست شناخته می‌شوند. هدف از این پژوهش جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی سودوموناس با قدرت تجزیه کنندگی بسته بندی‌های پلی‌اتیلنی بوده است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک جمع‌آوری و به منظور جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن از دو روش کشت مستقیم و کشت به روش پیش غنی سازی استفاده شد. پس از کشت باکتری‌ها در محیط MSM و بررسی از نظر درصد کاهش وزن پلاستیک، سویه برتر برای استخراج DNA و PCR ژن *alk-B* انتخاب شد. نتایج PCR مورد توالی یابی و همچنین بررسی فیلوژنتیک قرار گرفت.

یافته‌ها: درصد تجزیه پلی‌اتیلن توسط سویه‌های سودوموناس در بیشترین حالت ۷/۲٪ و به طور میانگین برابر با ۴/۵ درصد بوده است. همچنین تمامی باکتری‌های تجزیه کننده جداسازی شده در این مطالعه دارای ژن *alk-B* بودند.

نتیجه‌گیری: یافته‌ها نشان داد که می‌توان با استفاده و بهینه سازی باکتری‌های جداسازی شده از خاک روند تجزیه‌ی مواد پلی‌اتیلنی را به صورت چشمگیری تسریع بخشید. به نظر می‌رسد که با ارتقاء روش‌های ژنتیکی مبتنی بر ژنوم باکتری‌ها به خصوص سویه *سودوموناس آئروژینوزا*، بتوان روش‌هایی را ابداع نمود که در طی آن‌ها تمام انواع پر کاربرد پلی‌اتیلن در مدت زمان بسیار کمتر از حالت طبیعی مورد تجزیه قرار گیرند.

واژگان کلیدی: پلی‌اتیلن، سودوموناس آئروژینوزا، ژن alk-B، کلونینگ ژن.

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۳/۱۹ ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۷/۱۰ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۱

مقدمه

امروزه پلاستیک‌ها به عنوان یک ماده مصنوعی و ساخت دست بشر نقش بسیار مهمی در تولیدات صنایع مختلف ایفا می‌کنند. خواص منحصر به فرد و بسیار خوب پلاستیک‌ها و نیز آلایژهای آن‌ها باعث شده که جایگزین بسیار مناسبی برای فلزات، چوب و شیشه برای کاربردهای مختلف باشند. از طرف دیگر استفاده وسیع و تولیدات روز افزون این مواد و تجزیه ناپذیری آن‌ها سبب بروز مشکلات عمده زیست محیطی شده است. به طوری که پلاستیک‌ها به عنوان یکی از عمده‌ترین

*) آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱۲۲۹۴۱۰۸۳ پست الکترونیک: a_akhavan@iau-

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.

آلاینده‌های محیط زیست از طرف سازمان جهانی محیط زیست معرفی شده‌اند (۱و۲و۳).

۷۵ درصد پلاستیک‌های سنتتیک مصرفی در جهان، از پلی‌اتیلن، پلی‌پروپیلن، پلی‌استایرن و پی وی سی تشکیل شده اند، بنابراین مشکلات محیط زیست امروزه عمدتا ناشی از مصرف این دسته از پلاستیک‌ها می‌باشد. پلی‌اتیلن یک پلیمر ترمو پلاستیک (قابل ارتجاع درگرما) با ساختار کریستال نرم است که به عنوان یک پلاستیک پر مصرف در بیشتر صنایع از جمله خودرو سازی، لوازم خانگی، بسته‌بندی، بهداشتی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، به طوری که صنایع بسته بندی بیشترین سهم را در مصرف این پلیمر مصنوعی و به واسطه آن در آلودگی‌های زیستی نشان می‌دهد (٤).

درشت مولکول‌های درون ساختار پلیمری پلی‌اتیلن از تجزیه طبیعی این مواد جلوگیری می‌کنند. از سوی دیگر اثبات گردیده است که روش‌های بیولوژیک از مهمترین و کم ضررترین روش‌های از بین بردن آلودگی‌های زیستی شناخته می‌شوند. از این رو در سال‌های اخیر، پژوهش‌های زیادی برای بررسی عملکرد باکتری‌ها در زمینه تجزیه مواد غیر قابل بازیافت و آلوده کننده محیط زیست صورت گرفته است. اکثر باکتری‌هایی که توانایی تجزیه چنین موادی را دارند، عموما اکستریموفیل نامیده می‌شوند. برخی از این باکتری‌های در محیط‌هایی کشف شده‌اند که هیچ منبع کربنی به جز پلی‌اتیلن در آن وجود نداشته و بنابراین نتیجه‌گیری شده است که در نتیجه بروز جهش‌های مختلف و انتخاب طبیعی، جمعیت باکتری‌های دارای آنزیم‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن بیش از سایرین خواهد بود (٥و٦).

تجزیه پلاستیک‌های مختلف در شرایط طبیعی، بسته به نوع و ساختار آن‌ها بین ۱۰۰ تا ۷۰۰ سال و حتی بیشتر به طول می‌انجامد. روش‌های بیولوژیک از مهمترین روش‌های از بین بردن آلودگی‌های زیستی به خصوص در حوزه آلودگی‌های شیمیایی به شمار می‌روند. از سوی دیگر بررسی قابلیت باکتری‌ها برای تجزیه مواد غیر قابل بازیافت و آلوده کننده محیط زیست از مهمترین بسترهای مطالعاتی در سالیان اخیر بوده است (۷).

مطالعات در نقاط مختلف جهان نشان داده است که در میان جنس سودوموناس، دو گونه *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین میزان تجزیه پلاستیک‌های پلی‌اتیلن را در مدت یک ماه انجام می‌دهند.

Nanda و همکاران در سال ۲۰۱۰ مطالعه‌ای برروی تجزیه پلی‌اتیلن توسط سویه‌های باسیلوس، سودوموناس و رودوکوکوس نشان دادند که سویه‌های سودوموناس در میان بقیه سوش‌ها بیشترین توانایی تجزیه پلی‌اتیلن را دارند. در پژوهشی مشابه Hussein و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی جداسازی و غربالگری و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن با وزن مولکولی پایین (Low-density polyethylene, LDPE) جدا شده از خاک آلوده با ضایعات پلاستیکی مطالعه نموده و نتایج بدست آمده از میان ۱٦۹ جدایه به دست آمده از ٦٤ نمونه خاک *سودوموناس فلورسانس* و *سودوموناس آئروژینوزا* بیشترین تجزیه LDPE را نشان دادند (۸و۹).

از سوی دیگر مطالعات مختلف اثبات کرده اند که ژن alk-B با تولید آنزیم آلکان هیدروکسیلاز باعث تجزیه زنجیره‌های آلکان و پلی‌اتیلن می‌شود (۱۰و۱۱و۱۲). این مطالعه در نظر داشته است تا با جداسازی سویه‌های باکتریایی سودوموناس دارای ژن alk-B با قدرت تجزیه کنندگی بسته بندی‌های پلی‌اتیلنی و همسان سازی آن در باکتری *اشریشیا کلی* قدمی را برای استفاده از آن‌ها در جهت تسریع تجزیه بیولوژیک پسماندهای پلاستیکی به صورت صنعتی بردارد.

مواد و روش‌ها

از مهر ۱۳۹۹ تا دی ۱۳۹۹ تعداد ۵۵ نمونه خاک و پلاستیک‌های دفن شده در ۱۰ واحد بازیافت شهرداری تهران و کرمان توسط اسپاتول‌های استریل از لایه‌های سطحی و عمق‌های ۱۵ و ۲۰سانتی‌متری خاک، خصوصا مناطقی که رطوبت خاک حفظ شده بود، جمع‌آوری و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه ارسال شد. نمونه‌ها تا زمان انجام تست‌ها در دمای ۲ تا ۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

الف) کشت و جداسازی باکتری‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن: از دو روش کشت مستقیم و کشت به روش پیش غنی‌سازی (pre enrichment) استفاده شد. در روش کشت مستقیم برای هر نمونه مقدار ۱۰ گرم خاک در ۹۰ میلی‌لیتر محلول رینگر ۱/٤ ریخته و بعد از ۱۰ دقیقه قرارگیری بر روی شیکر 150rpm، از سوسپانسیون ایجاد شده رقت های ۱-۱۰ تا ۵-۱۰ تهیه گردید و ۱ میلی‌لیتر داخل ظروف گندزدا ریخته شد.

از کلیه رقت‌های مورد نظر، کشت سطحی بر ر وی محیط کشت تریپتیک سوی آگار (Trypticase soy agar or tryptone soya agar (TSA)) (اکسیر لند، ایران) و ستریمایید آگار (Cetrimide agar) (اکسیر لند، ایران) انجام شد و پتری دیش‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۳۰ درجه و به صورت وارونه گرما گذاری گردیدند (۱۳).

در روش کشت پیش غنی سازی، مقدار ۵ گرم از خاک به ۹۵ میلی‌لیتر از محیط مالاشیت گرین براث افزوده و بعد از مخلوط کردن در دمای ۳۷درجه سلسیوس به مدت ٤۸ ساعت گرمخانه-گذاری گردید. سپس در صورت وجود کدورت در محیط، محتویات آن در سطح محیط جامد ستریماید آگار به صورت خطی کشت داده شده و پلیت‌ها بمدت ۲٤-٤۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند (۱٤).

برای تخلیص باکتری‌های هدف کشت داده شده توسط این دو روش، در سطح محیط‌های کشت محلول اکسیداز ریخته شد و کلنی‌هایی که در کمتر از ۱۰ثانیه بنفش تیره می‌شدند سریعا توسط سوزن برداشته و در سطح محیط کشت جامد تریپتیک سوی آگار به صورت زیگزاکی کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه بمدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت گرماگذاری و پس از آن از لحاظ رشد و خلوص برای مراحل بعدی بررسی گردیدند. باکتری‌های گرم منفی و اکسیداز مثبت مشکوک به گونه سودوموناس به منظور نگهداری کوتاه مدت، در محیط تریپتیک سوی آگار شیب دار در دمای ۲ تا ۵ درجه و برای نگهداری طولانی مدت در لوله‌های حاوی نسبت مساوی گلیسرول و محیط مایع تریپتیک سوی براث در دمای ۲۰- قرار داده شدند (۱۵).

ب) غربالگری سویه‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن: پس از تهیه گرانول‌های پلی‌اتیلن، قطعات ۲ در ۲ سانتیمتری آن به مدت ۱۵ دقیقه در گزیلول و در بن ماری ۱۰۰ قرار داده شدند تا حل شوند، سپس با اضافه کردن اتانول ۸۰ درصد، مخلوط حاصل در دمای ٦۰ درجه خشک شد. به منظور غربالگری اولیه ۰/۱ درصد وزن حجمی از پودر پلی‌اتیلن به محیط حداقل نمکی MSM (minimal salt medium) افزوده شد و در دمای ۱۲۱ درجه به مدت ۱۵ دقیقه و فشار ۱۵ پوند استریل شده و در پلیت‌ها ریخته شد.

سپس سویه‌های جدا شده از خاک و سویه‌های کنترل پس از کشت نقطه‌ای در آن به مدت ۷ روز در دمای ۳۰ درجه گرماگذاری شده و وجود هاله در اطراف کلنی بررسی گردید. در آخر، جدایه های سودوموناس از خاک و سودوموناس شاهد از نظر درصد کاهش وزن پلاستیک مقایسه و سویه برتر برای آنالیزهای مولکولی انتخاب شد. برای بررسی درصد کاهش وزن پلاستیک از فرمول ذیل استفاده گردید (۱٦).

$$\frac{\text{وزن از دست داده} - \text{وزن اولیه}}{\text{وزن اولیه}} \times ۱۰۰$$

ج) بررسی‌های ژنومی: از بین ٦۰ سویه جداسازی شده دو سویه سودوموناس که بیشترین درصد تجزیه پلی‌اتیلن را داشتند برای آنالیزهای مولکولی انتخاب شدند. استخراج DNA باکتری در این مطالعه با استفاده از کیت اختصاصی استخراج DNA باکتری‌های گرم منفی (کیت مرکز ذخایر ژنتیک ایران) و به روش ستونی (mini column) اجرا گردید.

پرایمرهای اختصاصی ژن alkB شامل F5'- TCGAGCACATCCGCGGCCACCA-3 و R5'-CCGTAGTGCTCGACGTAGTT-3 با محصولی به طول ۳۳۰ جفت باز از مطالعه Kohno و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۷) استخراج گردید و پس از بلاست در سایت NCBI برای ساخت به شرکت آرین طب سفارش داده شد. سپس واکنش PCR به حجم ۲۰ میکرولیتر در ۳۰ سیکل، به صورت: واسرشت سازی ۳۰ ثانیه در ۹٤ درجه، اتصال ۳۰ ثانیه در ٦۱ درجه و طویل‌سازی ٤۵ ثانیه در ۷۲ درجه انجام شد.

پس از انجام PCR بر روی DNA حاصل از نمونه‌ها، برای مشاهده قطعات DNA، محصولات تکثیر شده در حضور کنترل منفی (بلانک) و کنترل مثبت (ژن تایید شده ۳۳۰ جفت بازی alk-B که در مطالعه‌ای مشابه تولید شده بود) بر روی آگاروز ۱درصد الکتروفورز شدند. محصولات به دست آمده PCR که دارای طول ۳۳۰ جفت باز بودند مورد توالی یابی قرار گرفتند و توالی‌های به دست آمده توسط نرم افزار Bio Edit بررسی شدند. بعد از اطمینان از صحت توالی‌های به دست آمده از دو رشته توالی یابی شده مستقیم و معکوس توسط نرم افزار DNA BASER رشته واحدی از '۵ به '۳ مرتب شد. توالی‌های حاصله با جدایه‌های ثبت شده در NCBI مقایسه شدند و هر توالی به صورت جداگانه در بانک ژن جستجو گردید.

د) آنالیز فیلوژنتیک: پس از هم ردیف نمودن توالی‌ها توسط نرم افزار Clustal W با استفاده از برنامه‌های MEGA7 درخت فیلوژنتیک ترسیم شد. در این فرآیند Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار برای انجام برنامه MEGA7 انتخاب گردید. به منظور ترسیم هیستوگرام مربوط به نمایش نمودار فواصل درون گونه‌ای پس از تعیین فواصل نوکلوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم افزار Excel نمودار مربوطه رسم شد.

ه) کلونینگ ژن: پس از تایید توالی‌های محصولات به دست آمده از باکتری‌های تخلیص شده، کلونینگ ژنی به روش TA کلونینگ با استفاده از کیت اختصاصی (Sinaclon, Iran) صورت گرفت. برای انجام واکنش کلونینگ، ۲ میکرولیتر محلول حاوی وکتور PTG19-T، ۱ میکرولیتر بافر الحاق (X10)، ۱/۵ میکرولیتر قطعه تخلیص شده، ۰/٦ واحد آنزیم T4 DNA لیگاز در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر مخلوط گردیدند. وکتور PTG 19-T با توجه به مطالعات مشابه قبلی انتخاب گردید (۱۸و۱۹). واکنش کلونینگ طبق دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. وارد شدن محصول الحاق به سلول‌های مستعد شده باکتری *اشریشیا کلی* سویه XL1-Blue با استفاده از روش شوک حرارتی انجام شد. پس از اضافه کردن ۸۰۰ میکرولیتر از محیط کشت LB فاقد آنتی‌بیوتیک به میکروتیوب‌ها و گرماگذاری به مدت ۱ ساعت در ۳۷ درجه، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول باکتری ترانس فرم شده روی پتری دیش حاوی ٤٠ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آمپی سیلین، XGal و IPTG گسترده و در دمای ۳۷ درجه به مدت ١٤ ساعت نگهداری شد. به منظور انتخاب کلونی‌های انتقال ژن شده، غربالگری کلونی‌های سفید و آبی انجام و کلونی‌های سفید از محیط کشت جدا سازی و پلاسمید نوترکیب از آن‌ها استخراج شد. از پلاسمیدهای استخراج شده در مرحله کلونینگ، نمونه‌ای که دارای پلاسمید نوترکیب حاوی ژن هدف بود، انتخاب گردید و محصول PCR ناحیه کد کننده ژن alkB به همراه وکتور مورد توالی یابی (Bioneer, South Korea) قرار گرفت. جواب‌های بدست با استفاده از نرم افزار DNAMAN و سکانس موجود در Genebank مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

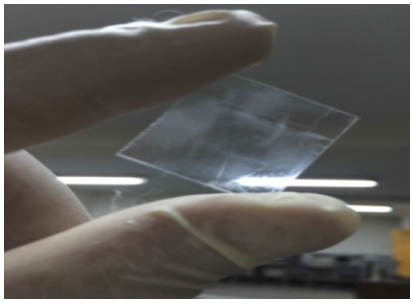
یافته‌ها

الف) جداسازی سویه‌ها و میزان تجزیه پلی‌اتیلن در محیط کشت: نتایج کشت و میزان رشد جدایه‌ها نشان داد از ۵۲ نمونه خاک مورد بررسی، ۸ سویه گرم منفی، کاتالاز مثبت، IMVIC مثبت و اکسیداز مثبت در محیط کشت رشد نمودند که سویه سودوموناس در نظر گرفته شدند. نتایج بررسی میزان تجزیه پلی‌اتیلن نشان داد در همه محیط‌های کشت (به جز محیط کشت کنترل) تمام انواع پلی‌اتیلن‌های موجود در محیط، وزنی کمتر از وزنشان هنگام شروع آزمایش داشته و تماما درصدی از وزن خود را از دست داده‌اند (جدول ۱). نتایج همچنین نشان داد میانگین درصد تجزیه پلی‌اتیلن توسط سویه‌های سودوموناس ٤/٥ درصد بوده است.

ب) تکثیر و توالی‌یابی ژن alkB: الکتروفورز محصولات PCR ناحیه کد کننده ژن alkB روی ژل آگاروز ۱ درصد نشان داد که قطعات اختصاصی به طول ۳۳۰ جفت باز، به خوبی تکثیر گردیده‌اند (شکل۲). وجود یک باند اختصاصی در ستون های نمونه‌ها نشان دهنده اختصاصیت پرایمرهای طراحی شده در اتصال به ناحیه کد کننده ژن alkB است. همچنین حضور قطعات اختصاصی و عدم حضور باند در ستون کنترل منفی نشان از صحت و دقت انجام واکنش داشت.

جدول ۱: تغییرات در وزن پلی‌اتیلن موجود در محیط کشت حداقل نمک (MSM).

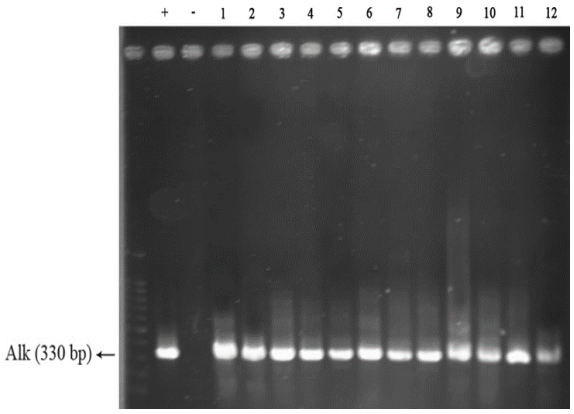
شماره پلیت	وزن پلی‌اتیلن پس از طی دوره رشد باکتری	میزان وزن از دست رفته	درصد وزن از دست رفته
۱	۰/۱۶۸	۰/۰۰۷	۴/۱
۲	۰/۱۸۰	۰/۰۰۷	۳/۹
۳	۰/۱۵۹	۰/۰۰۶	۳/۶
۴	۰/۱۷۶	۰/۰۰۴	۲/۲
۵	۰/۱۸۰	۰/۰۱۳	۷/۲
۶	۰/۱۷۵	۰/۰۰۸	۴/۵
۷	۰/۱۷۴	۰/۰۰۹	۵/۱
۸	۰/۱۶۸	۰/۰۰۹	۵/۳
۹	۰/۱۶۴	۰	۰
(شاهد)			



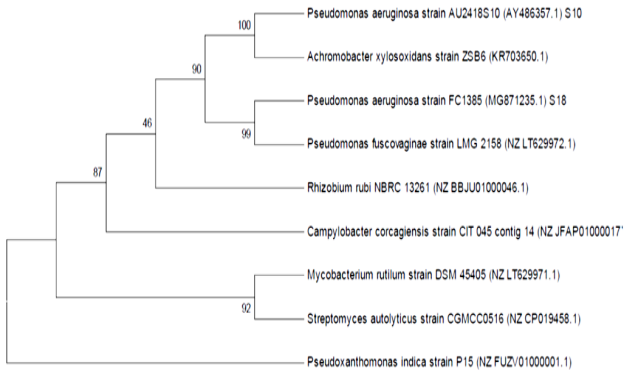
شکل ۱: نمونه‌ای از تغییرات در سطح پلی‌اتیلن پس از مدت زمان گرمخانه‌گذاری که توسط باکتری‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن ایجاد شده است.

ج) نتایج آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی DNA: درخت فیلوژنی نشان دهنده ارتباط بین توالی‌های 16SrRNA جدایه‌های مورد مطالعه و توالی‌های مرجع در GenBank است. اعداد واقع در گره کلادها نمایانگر ارزش Bootstrap(٪) می‌باشد. از باکتری *Pseudoxanthomas* به عنوان outgroup استفاده شد. دو نمونه مجهول مطالعه حاضر (S10,S18)، دارای درصد تشابه ۹۹ و ۱۰۰ درصد با سویه *Pseudomonas aeruginosa* بودند (شکل ۳).

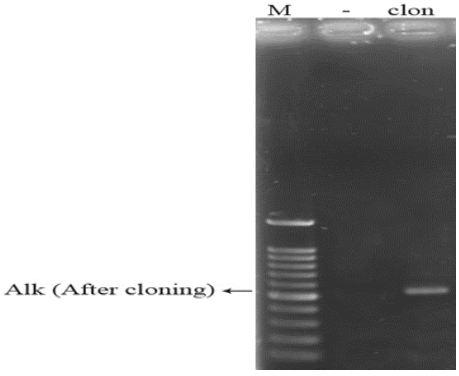
د) نتایج TA کلونینگ و توالی یابی ژن alkB: نتایج الکتروفورز محصولات تکثیر قطعه ژنی هدف در سویه‌های ذکر شده در شکل ٤ آورده شده است. پس از کلونینگ، محصولات به دست آمده توالی‌یابی گردیدند و مقایسه توالی‌ها تایید کننده تکثیر و کلون ژن *alkB* بود (شکل ۵).



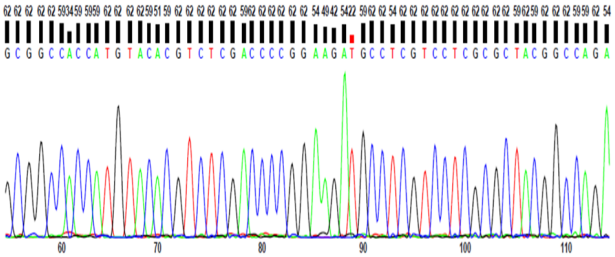
شکل۲: فراوانی ژن *alkB* در سویه‌های سودوموناس. از سمت چپ به ترتیب ستون M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون+: کنترل مثبت، ستون – : کنترل منفی و ستون۱ –۱۲: محصولات PCR ژن *alkB* سویه‌های سودوموناس شماره‌های ۱ تا ۱۲ جداسازی شده از خاک.



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک نشانگر ارتباط بین توالی‌های 16srRNA جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه و توالی مرجع.



شکل ٤: نتایج الکتروفورز محصولات PCR تکثیر ژن *alkB* در سویه‌های *اشریشیا کلی XL1-Blue* کلون شده با قطعه مورد نظر(طول قطعه بعد کلونینگ ۵۵۰bp).



شکل ۵: تصویر بخشی از نتایج توالی‌یابی ژن alkB پس از کلونینگ. آنالیز تعیین توالی ژن alkB در پلاسمید PTG-19-T با استفاده از سایت اینترنتی www.NCBI.nlm.nih.gov.

بحث

مطالعات نشان داده‌اند که در محیطی با تراکم بسیار پایین مواد مغذی یا منابع کربنی، طی جهش‌های اتفاقی و بر اساس انتخاب طبیعی برخی باکتری‌ها توانایی ترشح آنزیمی را پیدا می‌کنند که می‌تواند منجر به تجزیه پلی اتیلن به اتیلن شود. بدین ترتیب باکتری‌های استفاده کننده از پلی اتیلن به عنوان منبع کربنی دارای بیشترین جمعیت خواهند بود (۲۰). دانشمندان در مطالعات بسیاری سعی بر این داشته‌اند که از این ویژگی در جهت تجزیه پسماندهای پلاستیکی استفاده نمایند (۲۱). تحقیق ما با هدف تسریع تجزیه بیولوژیکی پسماندهای پلاستیکی به جداسازی و شناسایی سویه‌های باکتریایی *سودوموناس* با قدرت تجزیه کنندگی قطعات پلی اتیلنی و کلونینگ ژن *alk-B* پرداخته است.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درصد تجزیه پلی اتیلن توسط سویه‌های سودوموناس در بیشترین حالت ۷/۲ و به طور میانگین برابر با ٤/٥ درصد بوده است. همچنین تمامی باکتری‌های تجزیه کننده تخلیص شده در این مطالعه دارای ژن *alk-B* بوده‌اند. در مطالعه انجام شده توسط Hussein و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی جداسازی، غربالگری و شناسایی باکتری‌های تجزیه کننده LDPE جدا شده از خاک آلوده با ضایعات پلاستیکی، نشان داده شد که از میان ۱٦۹ سویه جدا شده از ٦٤ نمونه خاک *سودوموناس فلورسانس* و *سودوموناس آئروژینوزا* موجب بیشترین تجزیه LDPE گردیده‌اند (۸). در تحقیق دیگری توسط Nanda و همکاران که در سال ۲۰۱۰ برروی تجزیه پلی‌اتیلن توسط سوش‌های *باسیلوس*، *سودوموناس* و *رودوکوکوس* انجام شد، نتایج نشان داد که سویه‌های سودوموناس در میان بقیه سوش‌ها بیشترین توانایی تجزیه پلی‌اتیلن را دارند (۹). Singh و همکاران در پژوهش دیگری در سال ۲۰۱٦ بر روی تجزیه پلی‌اتیلن توسط باکتری‌های جداشده از خاک، مطالعاتی را انجام دادند. آن‌ها میزان تجزیه‌ی پلی‌اتیلن را با اندازه‌گیری میزان جرم از دست رفته در طی ٤۰ روز اندازه گیری کردند. از میان ۱٥ باکتری جداشده از نواحی مختلف خاک تنها ۳ سویه استافیلوکوکوس، سویه سودوموناس و سویه باسیلوس بیشترین توانایی تجزیه پلی‌اتیلن را داشتند (۲۲). نتایج به دست آمده در این مطالعه از نظر اثبات توانایی تجزیه پلی‌اتیلن در باکتری‌های جدا شده از خاک به خصوص سویه *سودوموناس*، مطابق با مطالعات Singh، Nanda و Hussein بوده است.

بررسی مقایسه‌ای درصد تجزیه پلی‌اتیلن نشان می‌دهد که در مطالعه حاضر در بهترین حالت ۷/۲ درصد از وزن پلی‌اتیلن تجزیه گردیده است این در حالی است که در مطالعه Nanda و همکارانش پس از ۳ هفته گرمخانه‌گذاری بیشترین درصد تجزیه پلی‌اتیلن توسط سودوموناس برابر با ٤۰/٥ درصد بوده است، همچنین درصد تجزیه در مطالعه Vatseldutt و همکارانش در مورد باکتری سودوموناس ۱۱ درصد گزارش گردیده است (۲۳). در مطالعه‌ای با نتایج مشابه با مطالعه ما Roy و همکارانش دریافتند که بیشترین میزان تجزیه پلی‌اتیلن ۸/٤ درصد و توسط باکتری *باسیلوس سرئوس* بوده است (۲٤). تفاوت در درصد تجزیه پلی‌اتیلن می‌تواند به تفاوت در سویه‌های باکتری‌های جداسازی شده و نیز بیان ژن‌های مختلف تجزیه کننده پلی‌اتیلن نسبت داده شود.

در پژوهش دیگری Hara و همکاران ژن‌های *alk-B1* و *alk-B2* باکتری *P. putida* را در باکتری *Alcanivorax borkumensis* کلون نمودند و متعاقباً این دو ژن را در سویه اصلی تخریب کردند و خصوصیات رشدی موتانت‌های بهم ریخته را مورد تحقیق قرار دادند. نتایج نشان داد آنزیم *alk-B* مسئول تجزیه آلکان‌ها می‌باشد (۱٦). این بررسی از نظر تایید نقش آن در تجزیه آلکان‌ها و محصولات آن‌ها همچون پلی‌اتیلن در راستای

مطالعه حاضر بود.

Vanbeilen و همکاران در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای ژن *alk-B* را از سویه‌های *P. putida* جدا شده از محیط‌های مختلف از قبیل خاک آلوده به نفت و آب‌های زیرزمینی در *اشریشیا کلی* کلون کردند (۶). این مطالعه در راستای نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژن آلکان هیدروکسیلاز در تمامی باکتری‌های تجزیه کننده پلی‌اتیلن وجود داشته است و مطالعات بیشتر بر روی کلونینگ این سویه بومی می‌تواند در جهت جداسازی و صنعتی سازی این خاصیت صورت پذیرد.

سلیمانی و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۲۱ تجزیه بیولوژیکی فیلم پلی اتیلن با چگالی پایین با استفاده از گونه‌های اکتینوباکتریایی را بررسی نمودند. آن‌ها اعلام کردند که سویه‌های جدا شده در مطالعه آن‌ها از گونه‌های رودوکوکوس، نوکاردیا و استرپتومایسس پس از دوره ۶۰ روزه کشت قادر به تجزیه پلی‌اتیلن به میزان بیشینه ۱/۵ میلی‌گرم بر گرم در روز بوده‌اند (۲۵).

نتایج مطالعه سلیمانی و همکاران در راستای داده‌های به دست آمده در مطالعه حاضر بوده است. همچنین نتایج به دست آمده نشان داد که پیش غنی سازی محیط کشت اهمیت بسزایی در افزایش تجزیه پلاستیک توسط باکتری‌ها دارد. زهرا منتظر و همکاران به بررسی زیست تخریب پذیری فیلم‌های پلی‌اتیلنی با دانسیته پایین تیمار شده با تابش خورشید توسط باکتری‌های تجزیه کننده پلاستیک *اسفنگوباکتریوم مولتیورورم* و *دلفتیا تسوروهاتنزیس* در رآکتورهای زیستی پرداختند. درصد کاهش وزن نمونه‌های پلی‌اتیلن پرداخت شده خورشیدی تحت تاثیر دو باکتری به ترتیب ۰/۰۱۳±۳/۳۱٪ و ۰/۰۲۵±۳/۹۸٪ بودند و گروه‌های عاملی کربونیلی در این نمونه‌ها در اثر هیدرولیز باکتریایی به صورت معنی‌داری کاهش یافتند (۲۶). یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که بیشینه تجزیه پلی‌اتیلن در تحقیق ما بیش از مطالعه منتظر و همکاران بوده است که می‌تواند به مراحل پیش غنی سازی و نیز تفاوت در سویه ها یا نمونه برداری نسبت داده شود.

مطالعه دیگری توسط تقوی و همکاران در سال ۲۰۲۰ در زمینه تجزیه پلاستیک توسط سویه های باکتریایی انجام شد و نشان داد که سویه‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *پنی سیلین گلوکوروزئوم* و سودوموناس بومی ایران دارای توانایی تجزیه پلی‌اتیلن با میزان بیشینه ۵/۵ درصد بوده اند (۲۷). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که سویه‌های بومی مورد مطالعه توانایی تجزیه پلاستیک را با بیشینه ۷/۲ درصد و میزان متوسط ۴/۵ درصد دارند و این سویه‌های جداسازی شده از خاک می‌توانند به عنوان باکتری‌های جدید بومی در زمینه تجزیه پلاستیک مورد بررسی بیشتر قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که با استفاده از میکروارگانیسم‌های جداسازی شده از خاک روند تجزیه ی پلاستیک‌ها به صورت چشمگیری تسریع می‌یابد. بدین ترتیب به نظر می‌رسد که با ارتقاء روش‌های ژنتیکی مبتنی بر ژنوم باکتری‌ها به خصوص سویه *سودوموناس آئروژینوزا*، تمام انواع پر کاربرد پلی‌اتیلن در مدت زمان بسیار کمتر از حالت طبیعی مورد تجزیه قرار گیرند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، برای بررسی و تصویب پروژه پژوهشی حاضرتقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. da Costa JP, Santos PS, Duarte AC, Rocha-Santos T. (Nano) plastics in the environment–sources, fates and effects. Science of The Total Environment. 2016;566:15-26.
2. Lassen C, Hansen SF, Magnusson K, Hartmann NB, Jensen PR, Nielsen TG, et al. Microplastics: occurrence, effects and sources of releases to the environment in Denmark. 2015.
3. Iwata T. Biodegradable and bio-based polymers: future prospects of eco-friendly plastics. Angewandte Chemie International Edition. 2015;54(11):3210-5.
4. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. Science advances. 2017;3(7):e1700782.
5. Jorge CD, Borges N, Bagyan I, Bilstein A, Santos H. Potential applications of stress solutes from extremophiles in protein folding diseases and healthcare. Extremophiles. 2016;20(3): 251-9.
6. Van Beilen JB, Marín MM, Smits TH, Röthlisberger M, Franchini AG, Witholt B, et al. Characterization of two alkane hydroxylase genes from the marine hydrocarbonoclastic bacterium Alcanivorax borkumensis. Environmental microbiology. 2004;6(3):264-73.
7. Gambarini V, Pantos O, Kingsbury JM, Weaver L, Handley KM, Lear G. Phylogenetic Distribution of Plastic-Degrading Microorganisms. Msystems. 2021;6(1):e01112-20.
8. Hussein AA, Al-Mayaly IK, Khudeir SH. Isolation, Screening and Identification of Low Density Polyethylene (LDPE) degrading bacteria from contaminated soil with plastic wastes. Mesopotamia Environ J. 2015;1(4):1-14.
9. Nanda S, Sahu SS. Biodegradability of polyethylene by Brevibacillus, Pseudomonas, and Rhodococcus spp. New York Science Journal. 2010;3(7):95-8.
10. Miri M, Bambai B, Tabandeh F, Sadeghizadeh M, Kamali N. Production of a recombinant alkane hydroxylase (AlkB2) from Alcanivoraxborkumensis. Biotechnology letters. 2010;32 (4):497-502.
11. Nie Y, Chi C-Q, Fang H, Liang J-L, Lu S-L, Lai G-L, et al. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. Scientific reports. 2014;4:4968.
12. Long H, Wang Y, Chang S, Liu G, Chen T, Huo G, et al. Diversity of crude oil-degrading bacteria and alkane hydroxylase (alkB) genes from the Qinghai-Tibet Plateau. Environmental monitoring and assessment. 2017;189(3):116.
13. Warghane AJ, Wagh G, Nag B, Jisnani M, Thaware R, Kitey H. Isolation and characterization of Pseudomonas species from Godavari river sample. Asiat J Biotechnol Resour. 2011;2 (07):862-6.
14. Hongbo G, Jingzhi D. Study on Universal Preenrichment Method of Nine Species Animal Food Borne Pathogenic Bacteria. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University. 2010.

15. Careaga M, Fernández E, Dorantes L, Mota L, Jaramillo ME, Hernandez-Sanchez H. Antibacterial activity of Capsicum extract against Salmonella typhimurium and Pseudomonas aeruginosa inoculated in raw beef meat. International Journal of Food Microbiology. 2003;83(3):331-5.

16. Hara A, Baik Sh, Syutsubo K, Misawa N, Smits TH, Van Beilen JB, et al. Cloning and functional analysis of alkB genes in Alcanivorax borkumensis SK2. Environmental Microbiology. 2004;6(3):191-7.

17. Kohno T, Sugimoto Y, Sei K, Mori K. Design of PCR primers and gene probes for general detection of alkane-degrading bacteria. Microbes and Environments. 2002;17(3):114-21.

18. Heydari F, Aliasgari E, Amini K. Molecular screening and cloning of the Protease encoded gene from Streptomyces strains isolated from Persian Gulf. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 2020;10(1).

19. Tavafi H, Ali AA, Ghadam P, Gharavi S. Screening, cloning and expression of a novel alginate lyase gene from P. aeruginosa TAG 48 and its antibiofilm effects on P. aeruginosa biofilm. Microbial pathogenesis. 2018;124:356-64.

20. Khandare SD, Chaudhary DR, Jha B. Marine bacterial biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic. Biodegradation. 2021;32(2):127-43.

21. Charnock C. Norwegian Soils and Waters Contain Mesophilic, Plastic-Degrading Bacteria. Microorganisms. 2021;9(1):94.

22. Singh G, Singh AK, Bhatt K. Biodegradation of polythenes by bacteria isolated from soil. Int J Res Dev Pharm L Sci. 2016;5(2):2056-62.

23. Vatseldutt SA. Isolation and characterization of polythene degrading bacteria from polythene dumped garbage. Biotechnol Lett. 2004;53:1181-9.

24. Roy P, Titus S, Surekha P, Tulsi E, Deshmukh C, Rajagopal C. Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by bacterial consortium. Polymer Degradation and Stability. 2008;93(10):1917-22.

25. Soleimani Z, Gharavi S, Soudi M, Moosavi-Nejad Z. A survey of intact low-density polyethylene film biodegradation by terrestrial Actinobacterial species. International Microbiology. 2021;24(1):65-73.

26. Montazer Z, Habibi-Najafi MB, Mohebbi M, Oromieyee AR. Study on Biodegradation of Sun Treated Low-Density Polyethylene (Ld-PE) Films by Plastic Degrading Bacteria in Bioreactors. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(2):231-40.

27. Taghavi N, Singhal N, Zhuang W-Q, Baroutian S. Degradation of plastic waste using stimulated and naturally occurring microbial strains. Chemosphere. 2021;263:127975.