

نقش سمیت زدای باکتری‌های تجزیه‌کننده پلاستیک (پلی‌اتیلن) و اثر آن بر شاخص‌های

رشد بذر کاهو (*Lactuca sativa*)

حمیده مظاهری و سنبل ناظری*

ایران، همدان، دانشگاه بوعلی‌سینا، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۱۷

چکیده

فعالیت‌های بشری هر سال مقادیر بالایی از پلاستیک‌های سنتزی، با اثرات منفی در رشد و بقا موجودات زنده (از جمله گیاهان)، را وارد محیط‌زیست می‌کند. با کمک روش‌های مختلف و بویژه روش‌های زیستی، باید به دفع و حذف این آلودگی‌ها پرداخته شود. هدف از انجام این تحقیق جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده پلی‌اتیلن کم‌چگال (LDPE) و بررسی میزان سمیت ترکیبات حاصل از تجزیه پلی‌اتیلن، بر جوانه‌زنی بذر کاهو (*Lactuca sativa*) بعثت حساسیت بالای این گیاه نسبت به آلوده‌کننده‌ها است. اثر پنج سویه باکتری جدا شده از خاک دفن زباله استان همدان، روی جوانه‌زنی نسبی (SG)، طویل شدن هیپوکوتیل (HE)، طویل شدن ریشه (RE) و شاخص جوانه‌زنی (GI) بذر کاهو مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های B6، B22، B23 و A20 باعث افزایش شاخص‌های HE و SG نسبت به تیمار حاوی محیط کشت MS و پلی‌اتیلن (MS+PE) شدند. سویه B28 در تمام شاخص‌ها نسبت به سایر سویه‌ها عملکرد پایین‌تری داشت. نتایج این آزمایش نشان داد که به این علت که گیاه حساس کاهو در این محیط قادر به رشد بوده است، احتمالاً تجزیه‌زیستی پلی‌اتیلن توسط این سویه‌ها، سازگار با محیط‌زیست است. در تیمار سویه‌های باکتریایی مختلف، فرآورده‌های هیدرولیزی با مقادیر متفاوتی توسط آنالیز GC-MS شناسایی شد. بیشترین مقدار تولید فرآورده هیدرولیز مشترک بین تمام سویه‌ها، مربوط به تیمار سویه B6 بود.

واژه‌های کلیدی: زیست‌پالایی، پلی‌اتیلن، باکتری، شاخص رشد، کاهو

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۸۳۱۹۱۵۶۵، پست الکترونیکی: Snazeri@basu.ac.ir

مقدمه

فعال و انفعالات بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی به قطعات کوچک تبدیل و اثرات مخربی بر روی حیات می‌گذارند (۱۴، ۳۰، ۳۵).

پلاستیک‌ها عمدتاً دارای مواد افزودنی مانند بیسفنول A و فتالات هستند که باعث آلودگی محیط بخصوص دریا می‌شوند (۴۸)، این ترکیبات همچنین یک تهدید جدی برای اکوسیستم خاک‌های آلوده به مواد پلاستیکی هستند (۴۶). بلعیده شدن این مواد به همراه قطعات ریز پلاستیک، توسط جانداران، باعث ورود این ترکیبات سمی به زنجیره غذایی می‌شود (۲۷) و با تبدیل شدن به بخشی از

یکی از اصلی‌ترین مشکلات کره زمین، آلودگی‌های محیط زیستی است. فعالیت‌های انسان هر سال مقادیر زیادی از آلاینده‌ها را وارد قسمت‌های مختلف زیست‌کره زمین شامل هوا، آب و خاک می‌کند. آلودگی محیط با پلاستیک-ها یکی از بحرانی‌ترین چالش‌های قرن حاضر است که روی اکوسیستم تأثیر می‌گذارد (۳۲). تقریباً ۱۴۰ میلیون تن پلاستیک در سال در سراسر جهان تولید می‌شود (۷) که نزدیک به ۷۰ درصد آن به محل دفن زباله و نیز بازیافت پلاستیک منتقل می‌شود (۲۰). سی درصد پلاستیک باقیمانده وارد زیستگاه‌های آبی و خشکی شده و در اثر

در تحقیقات زیست‌پالایی توجه به ترکیبات تولید شده پس از انجام آزمایش، از اهمیت بالایی برخوردار است. زیرا در برخی از آزمایشات، ترکیبات تولید شده پس از آزمایش، از ترکیب اولیه سمی‌تر هستند. به همین علت استفاده از یک آزمون مناسب جهت بررسی میزان سمیت محیط پس از آزمایش، ضروری است. به خصوص اگر قرار باشد که پس‌آزمایش به محیط‌زیست برگردد، در این شرایط اندازه‌گیری سمیت محلول باقیمانده بسیار مهم است (۳).

پلی‌اتیلن (PE) (Poly Ethylene) و به طور خاص پلی‌اتیلن با چگالی کم (LDPE) (Low-Density Polyethylene)، یکی از رایج‌ترین انواع پلیمر مصرفی در جهان است (۳۴). در کشاورزی از ورق‌های LDPE (مالچ پلاستیکی) برای محافظت از محصولات، کنترل علف‌های هرز، تنظیم دما و جلوگیری از تبخیر آب از خاک، استفاده می‌شود (۱۳). از آنجایی‌که در استفاده از باکتری‌ها برای تجزیه زیستی پلاستیک، توجه به حذف اثرات سمی مواد پلاستیکی و نیز مواد حاصل از تجزیه بسیار مهم و بخش تکمیل‌کننده آزمایش‌های زیست‌پالایی به حساب می‌آید؛ در تحقیق حاضر، اثر محلول پس از آزمایش (تجزیه زیستی پلی‌اتیلن توسط باکتری‌های جدا شده از دفن زباله استان همدان) روی جوانه‌زنی بذر کاهو مورد بررسی قرار گرفت. بذر کاهو به علت تنوع ژنتیکی کم، حساسیت زیاد به آلوده‌کننده‌ها و قدرت جوانه‌زنی بالا گزینه بسیار مناسبی برای انجام آزمون سمیت است (۳، ۳۳، ۳۹).

مواد و روش‌ها

۱. جداسازی باکتری‌های تجزیه‌کننده پلی‌اتیلن از خاک محل دفن زباله همدان (حاوی مواد پلاستیکی) از عمق‌های مختلف و مدت زمان دفن متفاوت، نمونه‌برداری انجام شد و پس از انتقال به آزمایشگاه با آب مقطر استریل، محلول خاک تهیه گردید. محلول به مدت پنج دقیقه روی

اکوسیستم غذایی زندگی انسان را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (۴۳). مواد پلاستیکی باعث تغییر ترکیب شیمیایی خاک شده و با اثرگذاری روی ساختار خاک ارگانسیم‌ها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۲). تأثیر ذرات پلاستیک روی گیاهان در سه سطح مختلف جامعه گیاهی، گیاه منفرد و سطح سلولی دارای اهمیت است (۵۰). پلاستیک‌ها با ایجاد اثرات منفی روی خاک و گیاهان می‌توانند باعث حذف و یا کاهش رشد برخی گونه‌های حساس شده و در نتیجه با برهم‌زدن تنوع و ترکیب گیاهی منطقه، تعادل اکوسیستم را مختل کنند (۴۱، ۴۵). مطالعات مختلف نشان می‌دهد که آلودگی‌های پلاستیکی روی جوانه‌زنی و سایر پارامترهای رشد گیاه اثرگذار هستند (۵۰). کاهش سرعت جوانه‌زنی (۸)، کاهش زیست توده ریشه (۴۲)، مهار رشد برگ‌ها و تداخل در عملکرد کلروفیل (۱۸، ۳۱) و تداخل در فعالیت آنزیمی گیاهان (۲۶) از جمله این اثرات مخرب است. پلاستیک‌ها در سطح سلولی می‌توانند با تغییر سلول‌های اپیدرمی در ناحیه ریشه، گیاهان را تحت تأثیر قرار دهند (۵۰).

برای حذف انواع مشتقات پلاستیکی از محیط زیست، محققین از روش‌های مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی استفاده می‌کنند، روش‌های غیربیولوژیکی معایب زیادی دارند، به عنوان مثال آتش زدن زباله‌های پلاستیکی باعث آزاد شدن گازهای سمی و ورود مواد شیمیایی خطرناک به محیط زیست می‌شود. در روش بیولوژیکی میکروارگانسیم‌ها عمل تجزیه آلاینده‌ها را انجام می‌دهند. امروزه تحقیقات گسترده‌ای روی روش‌های تجزیه زیستی پلاستیک‌ها، توسط میکروارگانسیم‌ها در حال انجام است و بسیاری از محققان با استفاده از جداسازی میکروارگانسیم‌های بومی که دارای قدرت تجزیه انواع پلیمرها هستند؛ گامی بزرگ در تجزیه بیولوژیکی این ترکیبات برداشته‌اند (۲۵).

$$SG = \frac{\text{بذرهای جوانه‌زده در محیط حاوی باکتری و پلی‌اتیلن}}{\text{بذرهای جوانه‌زده در محیط شاهد}} \times 100$$

$$HE = \frac{\text{میانگین طول هیپوکوتیل در محیط حاوی باکتری و پلی‌اتیلن}}{\text{میانگین طول هیپوکوتیل در محیط شاهد}} \times 100$$

$$RE = \frac{\text{میانگین طول ریشه در محیط حاوی باکتری و پلی‌اتیلن}}{\text{میانگین طول ریشه در محیط شاهد}} \times 100$$

$$GI = \frac{SG \times RE}{100}$$

۳. آنالیز گاز کروماتوگرافی - طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

ترکیبات حاصل از تجزیه پلی‌اتیلن توسط باکتری

جهت بررسی ترکیبات حاصل از تجزیه پلی‌اتیلن، از کشت باکتری‌ها (یک نمونه از هر باکتری) در محیط نمک‌های حداقلی و فیلم پلی‌اتیلن استفاده شد. پس از حذف باکتری، به ده میلی‌لیتر از محلول آزمایش، سه میلی‌لیتر محلول نرمال-هگزان اضافه شد و سپس بمدت پنج دقیقه روی تکان‌دهنده الکتریکی با سرعت ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفت و جهت جداسازی کامل فازهای آبی و آلی به مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. در نهایت یک میلی‌لیتر از فاز آلی (نرمال-هگزان) از ستون غیر قطبی با قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ارتفاع ۳۰ متر و شدت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه به روش آون (دمای ۵۰ °C، افزایش دما ۱۰ °C بر دقیقه تا ۲۸۵ °C به مدت ۱۶/۵ دقیقه، نگهداری در همین دما به مدت ۴۰ دقیقه) جهت انجام آزمون GC-MS (GC-Agilent7890A-MASS395) عبور داده شد (۲۱، ۳۶). کروماتوگرام‌های به دست آمده جهت تعیین نوع آلکان با کتابخانه NIST مورد مقایسه قرار گرفت.

۴. تجزیه داده‌ها

در این تحقیق تمام آزمایش‌ها در سه تکرار و آنالیز آماری داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS26 انجام شد. در شاخص GI به علت غیریکنواختی در واریانس داخلی تیمارها، تبدیل داده (جدری) صورت گرفت و سپس آنالیز آماری انجام شد. گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

تکان دهنده الکتریکی با سرعت ۷۰ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از ۳۰ دقیقه از قسمت بالای محلول ته نشین شده، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پس از ده بار رقیق‌سازی، به محیط نوترینت آگار انتقال داده شد. پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور (دمای ۳۱ °C) قرار گرفتند. در ادامه برای خالص‌سازی، کشت تک‌کلونی برای تمام نمونه‌ها انجام شد. یک میلی‌لیتر از محیط حاوی باکتری‌ها، به محیط نمک‌های حداقلی (۳۶) و پودر پلی‌اتیلن با چگالی پایین (MSP) (Minimal Salt Polyethylene) منتقل و به مدت یک ماه در انکوباتور (دمای ۳۱ °C) قرار گرفتند. پس از یک ماه ارلن‌هایی که کدورت بالایی داشتند برای ادامه مراحل انتخاب شدند (۳۶). آزمون گرم باکتری، با استفاده از محلول پتاسیم هیدروکسید سه درصد انجام شد (۴).

۲. آزمون سمیت

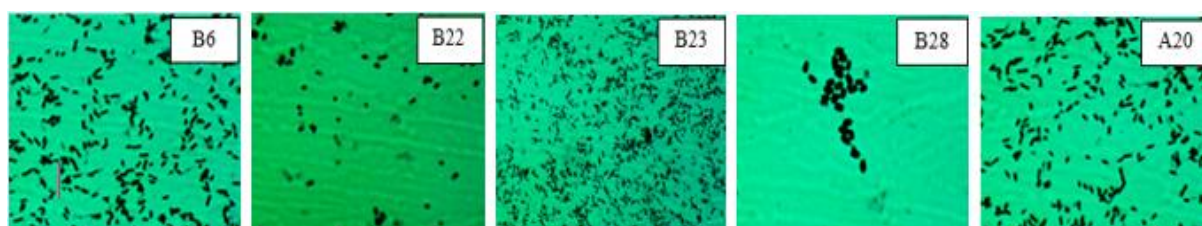
جهت بررسی میزان سمیت محلول انکوباسیون پس از اتمام آزمایش‌های تجزیه‌زیستی، از بذر کاهو (*Lactuca sativa* L.) استفاده شد. جهت انجام آزمایش، درون هر پلیت کاغذصافی استریل گذاشته و روی آن ۲۰ بذر کاهو (که از قبل استریل شده بودند) قرار داده شد. پنج میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی باکتری و ورق LDPE (کشت یک ماهه)، پس از عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتر (جهت حذف باکتری از محلول و آلوده نشدن بذور)، به آرامی روی بذرها ریخته شد. پتری‌ها به مدت پنج روز در اتاقک رشد و در شرایط تاریکی قرار گرفتند. طبق روش‌های استاندارد پس از پنج روز، جوانه‌زنی بذرها و طول ریشه‌چه و هیپوکوتیل آن‌ها اندازه‌گیری شد. در این آزمایش تیمار کنترل شامل محیط MS با حضور پلی‌اتیلن (MS+PE) ولی بدون باکتری بود و محیط MS بدون حضور باکتری و پلی‌اتیلن (MS) به عنوان تیمار شاهد استفاده شد. جوانه‌زنی - نسبی (SG)، طولیل شدن هیپوکوتیل (HE)، طولیل شدن ریشه (RE) و شاخص جوانه‌زنی (GI) طبق روش استاندارد و از طریق فرمول‌های زیر محاسبه شدند (۳).

خطای استاندارد هر تیمار بر روی ستون‌های نمودار نمایش داده شده است.

نتایج

در مرحله آخر غربالگری، ۵۲ سویه باکتری جداسازی گردید که از بین آن‌ها ۲۶ سویه رشد بهتر و کدورت بیشتری در محیط نمک‌های حداقلی و پودر پلی‌اتیلن داشتند. ۸۵ درصد از باکتری‌های جدا شده، از نوع میله‌ای (۷۳ درصد گرم منفی و ۲۷ درصد گرم مثبت) و ۱۵ درصد

جزو باکتری‌های کروی (۵۰ درصد گرم منفی و ۵۰ درصد گرم مثبت) بودند. سویه‌های B22 و B28 گرم مثبت و سایر سویه‌ها گرم منفی و تمامی آن‌ها جزو باکتری‌های کروی بودند (شکل ۱). از بین ۲۶ سویه، ۵ سویه (B6، B22، B23، B28 و A20) که بر اساس میزان کدورت و قدرت تشکیل بیوفیلم (۳۶)، دارای قدرت تجزیه‌کنندگی بهتری بودند، برای ادامه مراحل انتخاب شدند.



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی سویه‌های باکتری کشت شده در محیط نوترینت‌براث با بزرگنمایی 100X.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر نوع باکتری روی شاخص‌های مختلف بذر کاهو

F	میانگین مربعات	درجه آزادی	منابع تغییرات	
۵/۸۱**	۰/۵۴۹	۶	تیمار	جوانه زنی نسبی
		۱۴	خطا	(SG)
		۲۰	کل	
۶/۷۵۲**	۰/۲۴۵	۶	تیمار	طول هیپوکوتیل
		۱۴	خطا	
		۲۰	کل	
۳/۲۳۸**	۰/۰۷۹	۶	تیمار	طول ریشه
		۱۴	خطا	(RE)
		۲۰	کل	
۵/۳۱۳**	۲۸/۹۶۲	۶	تیمار	شاخص جوانه‌زنی
		۱۴	خطا	(GI)
		۲۰	کل	

مشاهده گردید. بیشترین مقدار فرآورده هیدرولیزی مشترک در بین تمام سویه‌ها، در سویه B6 (با بالاترین میانگین درصد فرآورده ۴/۹۷۱) مشاهده شد. در این سویه، سه ترکیب با بیشترین فراوانی؛ ماده ۲۲ کربنه و اکسیژنه Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester، ماده ۲۰ کربنه و

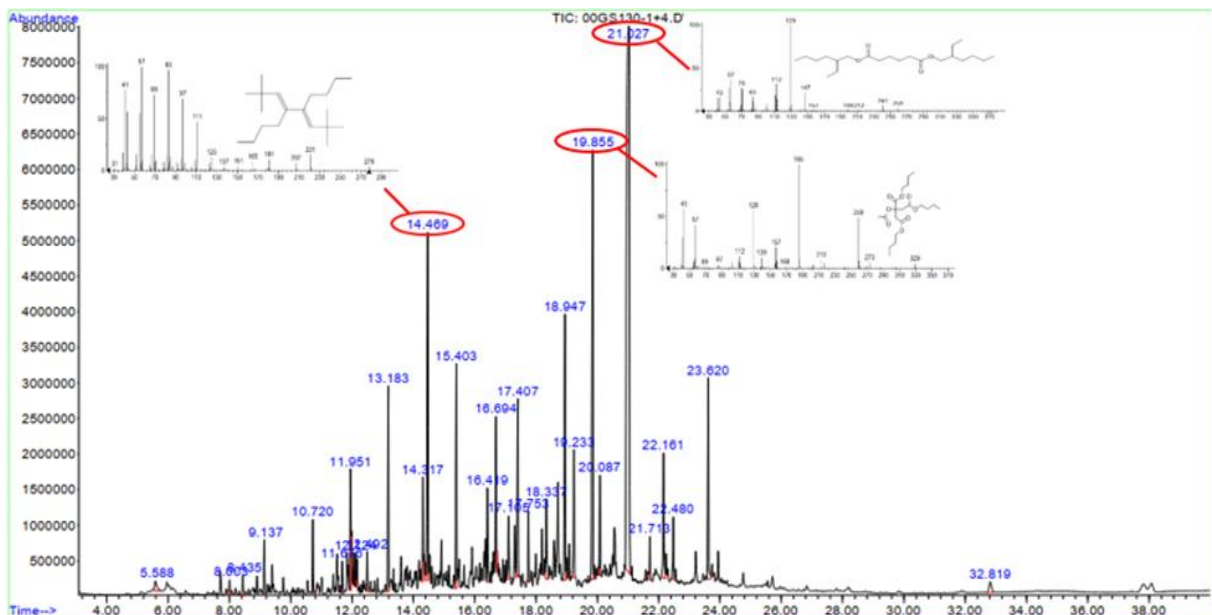
آنالیز GC-MS حضور ترکیبات مختلف (C9-C54) را با درصد‌های متفاوتی در تیمارهای باکتریایی نشان داد که عنوان‌کننده تولید فرآورده‌های هیدرولیزی متفاوت توسط سویه‌های مختلف است. در تیمارهای مختلف باکتریایی ترکیبات مختلف (مشابه یا غیرمشابه) با میزان متفاوت

در بررسی شاخص SG، تمام تیمارهای باکتریایی به جز سویه B28، باعث افزایش این شاخص نسبت به تیمار MS+PE شدند و براساس فرمول، تیمار باکتریایی سویه‌های B6، B22، B23 و A20 در این شاخص دارای عملکرد مشابهی بودند (شکل ۳).

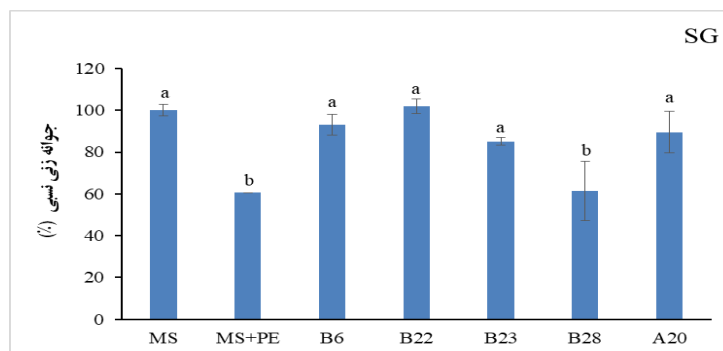
در شاخص GI در بین تیمارهای باکتری کمترین مقدار (۹/۸۸) مربوط به سویه B28 بود و این شاخص در تیمار سایر سویه‌ها در سطح مشابهی قرار داشت (شکل ۴).

اکسیژنه Tributyl acetyl citrate و ماده ۱۶ کربنه 2-Dodecen-1-yl(-)-succinic anhydride مشاهده گردید (شکل ۲).

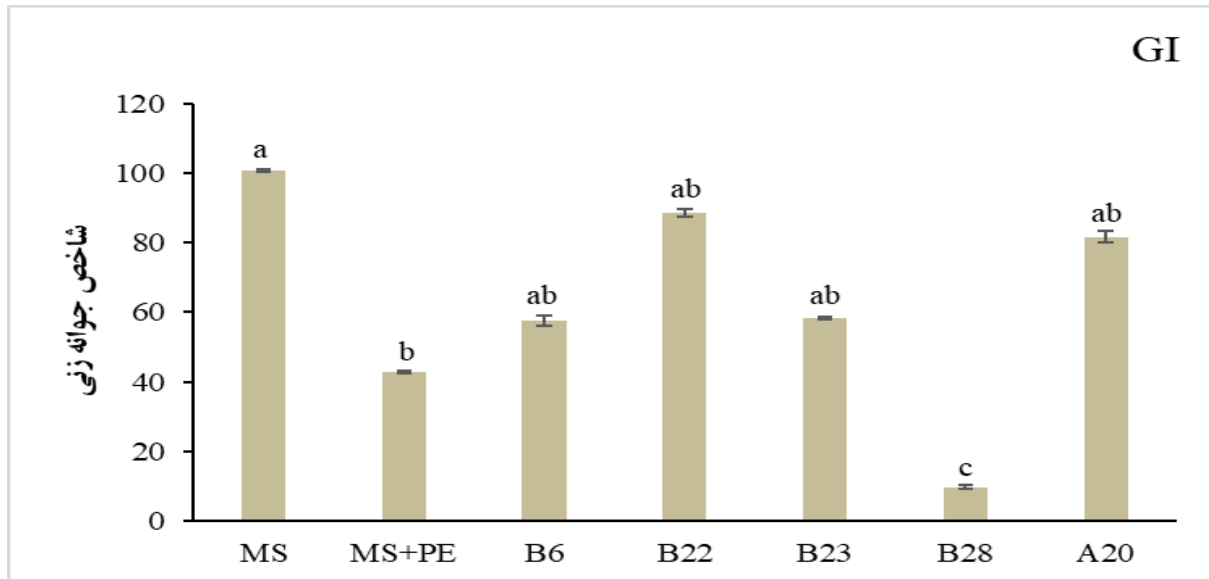
بررسی حضور باکتری‌های زیست‌پالا در سمیت‌زدایی پلی‌اتیلن و اثر آن بر شاخص‌های رشدی گیاه کاهو، اثرات مثبت این باکتری‌ها را نشان داد. همانطور که در جدول ۱ مشخص است، آنالیز داده‌ها بر اساس طرح کاملاً تصادفی، اثر معنی‌دار نوع باکتری روی تمام شاخص‌های مورد بررسی در بذر کاهو را نشان می‌دهد.



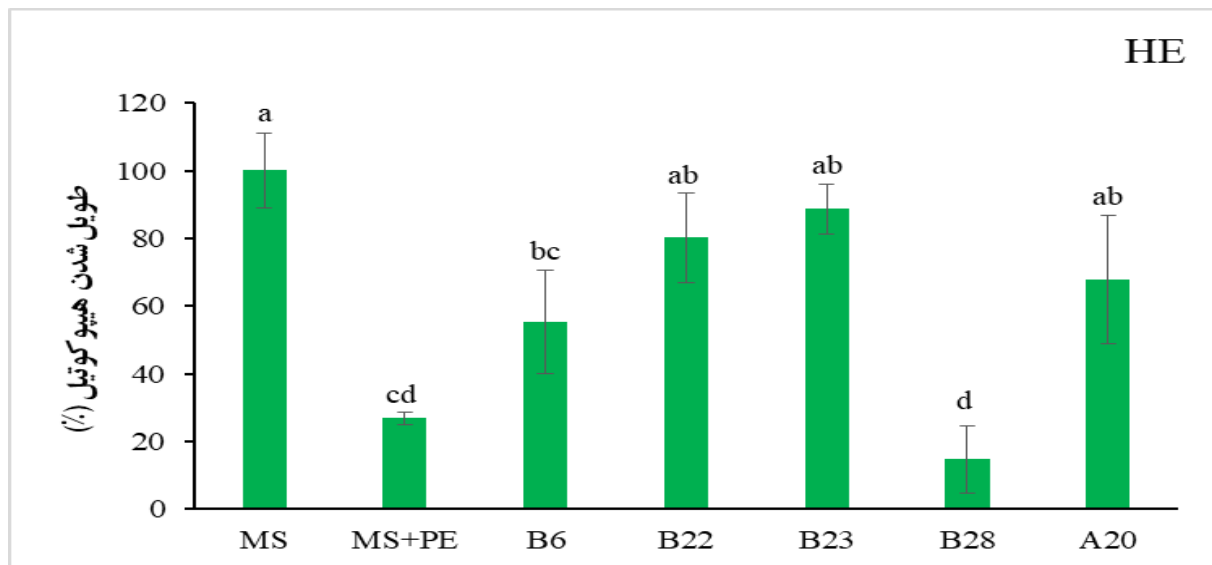
شکل ۲- کروماتوگرام محصولات تجزیه پلی‌اتیلن توسط سویه B6 (پیک‌های علامت‌گذاری شده به ترتیب از راست به چپ، مربوط به ترکیبات Hexanedioic acid, bis(2-ethylhexyl) ester، Tributyl acetyl citrate، و 2-Dodecen-1-yl(-)-succinic anhydride است).



شکل ۳- اثر باکتری‌های B6، B22، B23، B28 و A20؛ محیط نمک‌های حداقلی (MS) و محیط نمک‌های حداقلی و پلی‌اتیلن (MS+PE)، روی جوانه زنی نسبی بذر کاهو (*Lactuca sativa*).



شکل ۴- اثر باکتری‌های A20 و B28, B23, B22, B6؛ محیط نمک‌های حداقلی (MS) و محیط نمک‌های حداقلی و پلی‌اتیلن (MS+PE)، روی شاخص جوانه‌زنی بذر کاهو (*Lactuca sativa*).

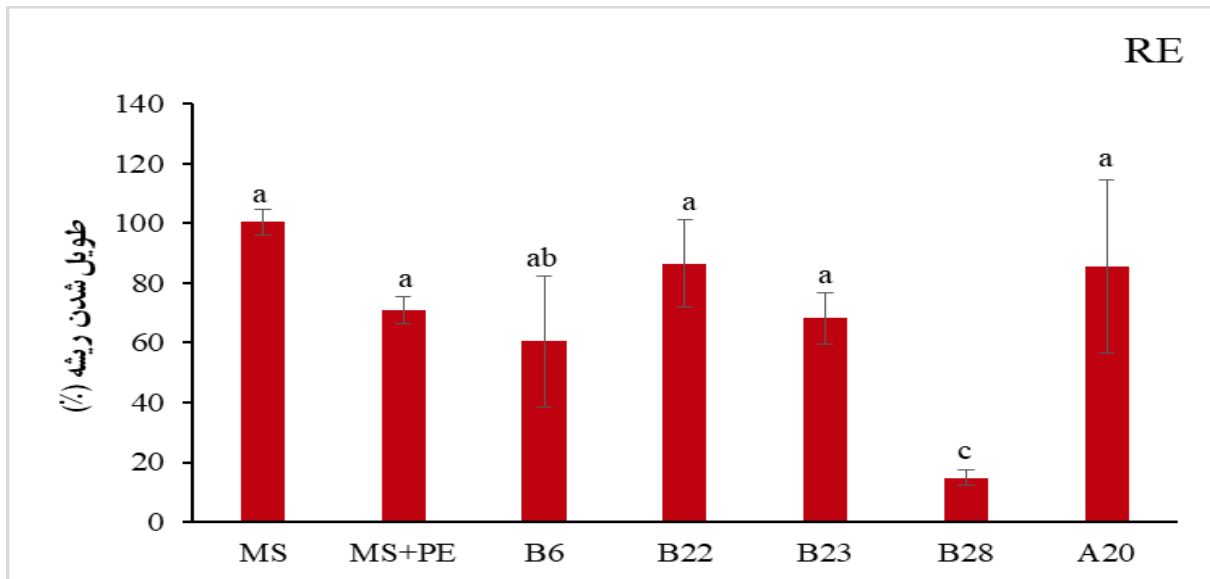


شکل ۵- اثر باکتری‌های A20 و B28, B23, B22, B6؛ محیط نمک‌های حداقلی (MS) و محیط نمک‌های حداقلی و پلی‌اتیلن (MS+PE)، روی شاخص طول هیپوکوتیل بذر کاهو (*Lactuca sativa*).

باکتریایی با تیمار MS در یک سطح بودند. تیمار سویه B28 در بین تیمار سویه‌های باکتریایی دارای کمترین مقدار (۱۴/۶۹) و با تیمار MS+PE در یک سطح بود (شکل ۵).

برای دقیق‌تر بودن آزمون سمیت در این تحقیق، رشد گیاهچه‌های کاهو براساس طول ریشه‌ها و هیپوکوتیل مورد بررسی قرار گرفت. در شاخص HE، تمام سویه‌های

شاخص RE در تمام تیمارها، بجز سویه B28 (۱۴/۸۴)، در یک سطح بود (شکل ۶).



شکل ۶ - اثر باکتری‌های B28, B23, B22, B6 و A20؛ محیط نمک‌های حداقلی (MS) و محیط نمک‌های حداقلی و پلی‌اتیلن (MS+PE)، روی شاخص طول ریشه بذر کاهو (*Lactuca sativa*).



شکل ۷ - گیاهچه‌های *Lactuca sativa* تحت تیمار سویه‌های باکتری B6, B22, B23, B28 و A20.

در شکل ۷ تفاوت در میزان رشد گیاهچه‌های کاهو در تیمار سویه‌های مختلف قابل مشاهده است.

در مطالعات متعدد در تجزیه زیستی پلی‌اتیلن، تولید ترکیبات مشابه و گاه متفاوت با تحقیق حاضر، گزارش شده است. السید و همکاران (۱۵) تولید فرآورده‌های جانبی مختلف از جمله ارگانوسیلیکون ($C_{16}H_{50}O_7Si_8$)، Hexadecanoic acid و Dibutyl phthalate ($C_{16}H_{22}O_4$) را توسط دو سویه باکتری گزارش نمودند. آسوال (۵) تولید محصولاتی از جمله بتامتازون استات، اتر، پروپیل استر را در جریان تجزیه پلی‌اتیلن توسط باکتری، گزارش نمود. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، با توجه به اثر مثبت بیشتر سویه‌های باکتریایی مختلف (بجز

تجزیه - زیستی پلی‌اتیلن گزارش نمودند. شهنواز و همکاران (۴۷) تولید ترکیبات مختلف حاصل از زیست‌پالایی پلی‌اتیلن از جمله Hexadecanoic acid و Dibutyl phthalate ($C_{16}H_{22}O_4$) را توسط دو سویه باکتری گزارش نمودند. آسوال (۵) تولید محصولاتی از جمله بتامتازون استات، اتر، پروپیل استر را در جریان تجزیه پلی‌اتیلن توسط باکتری، گزارش نمود. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، با توجه به اثر مثبت بیشتر سویه‌های باکتریایی مختلف (بجز

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعات متعدد در تجزیه زیستی پلی‌اتیلن، تولید ترکیبات مشابه و گاه متفاوت با تحقیق حاضر، گزارش شده است. السید و همکاران (۱۵) تولید فرآورده‌های جانبی مختلف از جمله ارگانوسیلیکون ($C_{16}H_{50}O_7Si_8$)، Hexadecanoic acid ($C_{17}H_{34}O_2$) و Stearic acid, 3-

انرژی را در گیاه مختل نموده و باعث کاهش محصول نهایی می‌شوند (۲۲). حیات و همکاران (۲۳) اعلام نمودند که پلاستیک‌ها منجر به کاهش غلظت اسید آمینه‌های مهم پروتئین‌سازی گیاه از جمله پرولین، فنیل‌آلانین، گلیسین، سرین، ترئونین، آلانین، آسپاراتات و گلوتامات می‌شوند. طبق مطالعات انجام شده، قرار گرفتن گیاه در معرض پلاستیک‌ها همچنین می‌تواند باعث اختلال در نسبت کربن به نیتروژن در آن می‌شود (۲۲). بوسکر و همکاران (۸) با تحقیق بر روی گیاه *Lepidium sativum* عنوان نمودند که، ذرات ریز پلاستیک منجر به تولید سطوح بالای گونه‌های مختلف اکسیژن فعال، مهار جوانه‌زنی و کاهش بنیه گیاهی می‌شوند. طبق گزارش ژو و همکاران (۵۱) ذرات پلاستیک‌ها باعث کاهش غلظت تنظیم‌کننده رشد (جاسمونیک اسید) در برنج شدند و در نتیجه کاهش رشد و افزایش استرس اکسیداتیو در ریشه گیاه مشاهده گردیدند.

ذرات پلاستیک می‌توانند به سلول‌های اپیدرم گیاه متصل شده و با ایجاد انسداد در فضاهای بین میکروفیبریل‌های سلولزی در ماتریکس دیواره سلولی (در سطح بذر)، جذب آب و مواد مغذی را مهار کنند (۸، ۴۹). از آنجا که ذرات پلاستیکی بزرگ با تجمع در پوشش دانه و انسداد حفره‌ها و در نتیجه کاهش جذب آب، باعث تعویق جوانه‌زنی می‌شوند (۲۲)، و نیز اینکه جوانه اولین رابط تبادل مواد بین گیاه در حال رشد و محیط است، این مرحله به عنوان یکی از مراحل حساس رشدی گیاه در برابر آلودگی‌های محیطی شناخته شده است (۱۴، ۱۶، ۱۹). کوردون و همکاران (۲۸) اعلام کردند که جوانه‌زنی بذر شاخص مناسبی برای تعیین سمیت محیط است. لی و همکاران (۲۹) در تحقیقی اثر منفی و قابل توجه پلاستیک پلی اتیلن را بر روی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و زنده‌مانی جوانه‌های بذر سویا (*Glycine max*) گزارش کردند. آسوال (۵) نیز در نتایج مشابه، تاثیر مثبت باکتری‌های زیست پالا را گزارش کرد. در تحقیق فوق محلول فیلتر شده حاصل از

تیمار B28) روی شاخص‌های مختلف بذر کاهو، می‌توان عنوان نمود که احتمالاً این باکتری‌ها تا حدودی اثرات سمی پلی اتیلن را خنثی کرده و اینکه محصولات حاصل از تجزیه پلی اتیلن توسط این باکتری‌ها اثر سمی بر روی گیاه نداشته و سازگار با محیط‌زیست هستند. نتایج مشابه در تحقیقات سایر محققین گزارش شده است (۱۵، ۴۷).

در این میان، کاهش شاخص‌های مختلف رشد بذر کاهو در تیمار باکتری B28 مشاهده گردید. در نتایج GC-MS این باکتری ترکیباتی مانند: دکان (C₁₀)، هگزاکوزان (C₁₆)، ایزوپروپیل مریستات (C₁₇) و همچنین مانند سایر سویه‌ها هیدروکربن‌های با تعداد کربن بالاتر (C₂₀-C₂₂-C₃₀) نیز مشاهده گردید. مطالعات نشان داده است که هیدروکربن‌های با تعداد کربن پایین مانند دکان می‌تواند اثرات سمی بر روی گیاهان داشته باشند (۶). هیدروکربن دکان در تیمار سایر سویه‌ها مشاهده نشد. بنابراین، کاهش شاخص‌های مختلف رشد در این ایزوله می‌تواند، مربوط به حضور این ترکیبات باشد. سویه‌های مختلف باکتری، در هنگام تجزیه‌زیستی پلی اتیلن، ترکیبات مختلف را با غلظت‌های متفاوتی تولید می‌کنند، بنابراین یکی از دلایل تفاوت اثر باکتری‌های مختلف روی شاخص‌های رشد بذر کاهو می‌تواند همین موضوع باشد.

آلودگی‌های پلیمری می‌توانند گیاهان را از جنبه‌های مختلف تحت تأثیر قرار دهند. ذرات ریز پلاستیک می‌توانند توسط سلول‌ها جذب شده و به طور بالقوه باعث تغییرات مولکولی و متابولیکی شوند (۱۱). این ذرات ریز پلاستیکی با کاهش دسترسی به آب و مواد مغذی در گیاهان، منجر به بسته شدن روزنه و در نهایت کاهش فتوسنتز می‌شوند (۱۰، ۱۲). اسیدهای آلی مولکول‌های کلیدی در متابولیسم کربن هستند و در تنفس سلولی و فتوسنتز نقش مهمی ایفا می‌کنند. آلودگی‌های پلیمری با اثر بر غلظت اسیدهای مالیک، سوکسینیک و فوماریک که واسطه‌های مهم چرخه کربس در میتوکندری هستند، تولید

مثبت میکوریزا بر شاخص‌های مختلف گیاه *Pistacia vera* تحت شرایط تنش را اعلام نمودند.

در تحقیق حاضر، بطور مشخص حضور میکروارگانیسم توانست اثر منفی پلی اتیلن (LDPE) بر روی جوانه زنی نسبی و طول هیپوکوتیل را در گیاه کاهو خنثی نماید. اما شاخص طول ریشه، در تیمارهای پلی اتیلن به تنهایی یا با حضور غالب میکروارگانیسم‌ها، با تیمار گیاه شاهد تفاوت معنی دار نداشت. احتمالاً به همین دلیل، در شاخص جوانه زنی نیز تفاوت معنی دار با تیمار شاهد مشاهده نگردید. در تحقیق صورت گرفته توسط لی و همکاران (۳۱) ذرات پلیمری PVC توانست اثر منفی بر رشد ریشه کاهو ایجاد کند.

فعالیت‌های بشری هر سال مقادیر بالایی از آلاینده‌ها از جمله پلاستیک‌ها و به خصوص پلی‌اتیلن را وارد اکوسیستم می‌کند. پلی‌اتیلن ترکیبات سمی وارد محیط-زیست می‌کند و در اثر عوامل مختلفی نظیر فرسایش آبی، تولید میکروپلاستیک می‌کند. این ترکیبات سمی و میکروپلاستیک‌های آزاد شده در محیط روی شاخص‌های مختلف گیاه از جمله جوانه‌زنی، رشد ریشه و هیپوکوتیل اثرات قابل توجهی دارند. تجزیه زیستی این مواد یکی از راه‌های مقرون‌به‌صرفه و دوست‌دار محیط‌زیست جهت حذف آن‌ها از اکوسفر است. هر چند، در جریان آزمایش-های زیست‌پالایی میکروبی، بررسی سمیت محلول پس از آزمایش بسیار مهم است. بسیاری از میکروارگانیسم‌ها با تجزیه میکروپلاستیک‌ها، بدون تولید مواد مضر، اثر منفی آن‌ها بر روی گیاهان را کاهش می‌دهند. نتایج این مطالعه نشان داد که مناطق دفن زباله می‌توانند منبعی مهم برای جداسازی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده پلاستیک باشند. غالب باکتری‌های جداسازی شده، در جریان زیست‌پالایی توانایی کاهش اثرات سمی پلاستیک‌ها و تولید ترکیبات مختلف سازگار با محیط زیست را دارند. شناسایی آنزیم-های مؤثر در زیست‌پالایی و استخراج آن‌ها از

Pseudomonas aureginosa تجزیه زیستی پلی‌اتیلن توسط *Bacillus cereus* و *Aspergillus niger* روی بذر آفتابگردان اثر منفی روی جوانه‌زنی نداشت. اثر ترکیبات حاصل از تجزیه زیستی LDPE، توسط باکتری *Bacillus lichiformis* SARR1 بر روی جوانه زنی و سرعت آن در گیاه *Vigna radiata* مورد بررسی قرار گرفت و در مقایسه با تیمار شاهد (فاقد باکتری) به ترتیب بیش از ۹۰ و ۴۰ درصد افزایش شاخص‌ها مشاهده شد (۴۴). پاتک و کومار (۴۰) افزایش در شاخص‌های ارتفاع ساقه، طول برگ و طول ریشه در بذر گیاه *Vigna mango* پس از تیمار با محلول حاصل از تجزیه LDPE توسط *Bacillus sp.* و *Pseudomonas sp.* نسبت به تیمار شاهد را گزارش نمودند.

جیانگ و همکاران (۲۶) اثر نانو و میکروپلاستیک‌های پلی‌استیرن را بر روی گیاه *Vicia faba* ارزیابی کردند و کاهش قابل توجه طول ریشه را گزارش نمودند. داس و کومار (۹) اثر مثبت محصولات تجزیه زیستی پلی‌اتیلن، توسط دو سویه *Bacillus sp.1* و *Bacillus sp.2* را بر رشد ریشه در گیاهان *Cicer arietinum* و *Vigna radiata* گزارش نمودند. شهنواز و همکاران (۴۷) اعلام کردند که محصول تجزیه پلی‌اتیلن توسط باکتری‌های *Lysinibacillus fusiformis* و *Bacillus cereus* باعث افزایش رشد ریشه در گیاه *Sorghum sp.* شد.

در مورد اثر میکروارگانیسم‌های زیست‌پالا بر روی شاخص‌های مختلف رشدی در گیاهان نتایج متفاوتی مشاهده شده است. جانکزاک و همکاران (۲۴) اثر مثبت باکتری تجزیه‌کننده پلی‌اتیلن ترفتالات *Arthrobacter sulfonivorans* را روی گیاه *Brassica napus* و *Salix viminalis* گزارش نمودند. آن‌ها همچنین عنوان نمودند که *Clitocybe sp.* اثری روی رشد گیاهان مورد مطالعه نداشت. بدخشان و همکاران (۱) اثر مثبت باکتری‌های جنس *Thiobacillus spp* را روی حجم ریشه گیاه گوجه‌فرنگی گزارش کردند. محمدحسینی‌جور و همکاران (۲) نیز اثر

سپاسگزاری

از خانم دکتر زهرا منتظر، بخاطر تأمین پلی‌اتیلن تشکر می‌گردد.

میکروارگانسیم‌های جداسازی شده در مقیاس صنعتی، می‌تواند به حذف و تجزیه آلوده‌کننده‌های پلیمری کمک بزرگی نماید. همچنین با تزریق میکروبی‌های زیست‌پالا به خاک در شرایط طبیعی، می‌توان از ظرفیت آن‌ها برای تجزیه پلاستیک‌ها در محل‌های دفن زباله کمک گرفت.

منابع

- ۱- بدخشان، ن.، منصوری، س.م.، مظفری، ح. و مهرپور، م.، ۱۴۰۱. بررسی اثر قارچ *Trichoderma harizianum* T22 و باکتری *Thiobacillus spp.* روی برخی شاخص‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و رشدی گیاه گوجه‌فرنگی، *Lycopersicon esculentum* تحت تنش زیستی آفت کرم میوه *Helicoverpa armigera* پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران).
- ۲- محمدحسینی جور، ف.، احمدی مقدم، ع.، اسرار، ز. و محمدی، س.ض.، ۱۳۹۹. بررسی نقش مثبت همزیستی اکتومیکوریزی در تخفیف اثرات سمیت ناشی از فلز سنگین روی در گیاه پسته رقم بادامی (*Pistacia vera L.*)، پژوهش‌های گیاهی (مجله زیست‌شناسی ایران) صفحات ۱۶۹-۱۸۲.
- 3- Angelini, V. A., Orejas, J., Medina, M. I., Agostini, E., 2011. Scale up of 2, 4-dichlorophenol removal from aqueous solutions using *Brassica napus* hairy roots. *Journal of hazardous materials*, 185(1), 269-274.
- 4- Arthi, K., Appalaraju, B., Parvathi, S. 2003. Vancomycin sensitivity and KOH string test as an alternative to gram staining of bacteria. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 21(2), 121-123.
- 5- Aswale P., 2010. Studies on bio-degradation of polythene. PhD thesis, Dr Babasaheb Ambedkar Marathwada University, Aurangabad, India.
- 6- Baker, J.M., 1970. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution* (1970), 1(1), pp.27-44.
- 7- Bardají, D. K. R., Furlan, J. P. R., Stehling, E. G., 2019. Isolation of a polyethylene degrading *Paenibacillus sp.* from a landfill in Brazil. *Archives of microbiology*, 201(5), 699-704.
- 8- Bosker, T., Bouwman, L.J., Brun, N.R., Behrens, P., Vijver, M.G., 2019. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere* 226, 774-781.
- 9- Das, M. P., Kumar, S., 2013. Comparative study of germination rate and plant growth by secondary metabolites and in vitro LDPE biodegraded fragments by microbes. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 21(2), 134-136.
- 10- de Souza Machado, A. A., Lau, C. W., Till, J., Kloas, W., Lehmann, A., Becker, R., Rillig, M. C., 2018. Impacts of microplastics on the soil biophysical environment. *Environmental science and technology* 52(17), 9656-9665.
- 11- de Souza Machado, A.A., Kloas, W., Zarfl, C., Hempel, S., Rillig, M.C., 2018. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global change biology*, 24(4), pp.1405-1416.
- 12- de Souza Machado, A.A., Lau, C.W., Kloas, W., Bergmann, J., Bachelier, J.B., Faltin, E., Becker, R., Görlich, A.S., Rillig, M.C., 2019. Microplastics can change soil properties and affect plant performance. *Environmental science and technology* 53(10), 6044-6052.
- 13- Duis, K., Coors, A., 2016. Microplastics in the aquatic and terrestrial environment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*, 28(1), 1-25.
- 14- Eitzen, L., Ruhl, A.S., Jekel, M., 2020. Particle size and pre-treatment effects on polystyrene microplastic settlement in water: implications for environmental behavior and ecotoxicological tests. *Water*, 12(12), p.3436.
- 15- El-Sayed, M.T., Rabie, G.H. and Hamed, E.A., 2021. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigatus*. *Environment, Development and Sustainability*, 23(10), pp.14556-14584.

- 16- Ernst, W. H. O., 1998. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic level. John Wiley & Sons in Ecotoxicology 587-620.
- 17- Farré, M., Barceló, D., 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry 22(5), 299-310.
- 18- Gao, M.L., Liu, Y., Song, Z.G., 2019. Effects of polyethylene microplastic on the phytotoxicity of di-n-butyl phthalate in lettuce (*Lactuca sativa* L. var. ramosa Hort). Chemosphere 237, 124-482.
- 19- Gong, P., Wilke, B.M., Fleischmann, S., 1999. Soil-based phytotoxicity of 2,4,6- trinitrotoluene (TNT) to terrestrial higher plants. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 36(2), 152-157.
- 20- Grover, A., Gupta, A., Chandra, S., Kumari, A., Khurana, S. M., 2015. Polythene and environment. International Journal of Environmental Sciences, 5(6), 1091-1105.
- 21- Guzik, M.W., Kenny, S.T., Duane, G.F., Casey, E., Woods, T., Babu, R.P., Nikodinovic-Runic, J., Murray, M. and O'Connor, K.E., 2014. Conversion of post consumer polyethylene to the biodegradable polymer polyhydroxyalkanoate. Applied microbiology and biotechnology, 98(9), pp.4223-4232.
- 22- Hartmann, G.F., Ricachenevsky, F.K., Silveira, N.M., Pita-Barbosa, A., 2022. Phytotoxic effects of plastic pollution in crops: what is the size of the problem?. Environmental Pollution, 292, p.118420.
- 23- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments: a review. Plant signaling & behavior, 7(11), pp.1456-1466.
- 24- Janczak, K., Dąbrowska, G.B., Raszowska-Kaczor, A., Kaczor, D., Hryniewicz, K., Richert, A., 2020. Biodegradation of the plastics PLA and PET in cultivated soil with the participation of microorganisms and plants. International Biodeterioration & Biodegradation, 155, p.105087.
- 25- Jeon, H.J., Kim, M.N., 2014. Degradation of linear low density polyethylene (LLDPE) exposed to UV-irradiation. European Polymer Journal. 52,146-153.
- 26- Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M., Klobuar, G., 2019. Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. Environment Pollution 250, 831-838.
- 27- Kedzierski, M., d'Almeida, M., Magueresse, A., Le Grand, A., Duval, H., César, G., Sire, O., Bruzard, S., Le Tilly, V., 2018. Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants. Marine pollution bulletin, 127, pp.684-694.
- 28- Kordon, H.A., 1992. Seed viability and germination: a multi-purpose experimental system. Journal of Biological Education 26, 247-251.
- 29- Li, B., Huang, S., Wang, H., Liu, M., Xue, S., Tang, D., Cheng, W., Fan, T., Yang, X., 2021. Effects of plastic particles on germination and growth of soybean (*Glycine max*): A pot experiment under field condition. Environmental Pollution 272, 116418.
- 30- Li, C., Busquets, R., Campos, L. C., 2020. Assessment of microplastics in freshwater systems: A review. Science of the Total Environment, 707, 135578.
- 31- Li, Z.X., Li, Q.F., Li, R.J., Wang, G., 2020. Physiological responses of lettuce (*Lactuca sativa* L.) to microplastic pollution. Environmental Science and Pollution Research (2), 1-9.
- 32- Liwarska-Bizukojc, E., 2021. Effect of (bio) plastics on soil environment: A review. Science of The Total Environment, 795, 148889.
- 33- Lyu, J., Park, J., Pandey, L.K., Choi, S., Lee, H., De Saeger, J., Depuydt, S., Han, T., 2018. Testing the toxicity of metals, phenol, effluents, and receiving waters by root elongation in *Lactuca sativa* L. Ecotoxicology and environmental safety, 149, pp.225-232.
- 34- Malpass, D. B., 2010. Introduction to industrial polyethylene: properties, catalysts, and processes. John Wiley & Sons.
- 35- Mekaru, H., 2020. Effect of agitation method on the nanosized degradation of polystyrene microplastics dispersed in water. ACS omega, 5(7), pp.3218-3227.
- 36- Montazer, Z., Habibi Najafi, M. B., Levin, D. B., 2019. Microbial degradation of low-density polyethylene and synthesis of polyhydroxyalkanoate polymers. Canadian journal of microbiology, 65(3), 224-234.
- 37- Montazer, Z., Habibi-Najafi, M. B., Mohebbi, M., Oromiehei, A., 2018. Microbial degradation of UV-pretreated low-density polyethylene films by novel polyethylene-degrading bacteria isolated from plastic-dump soil. Journal of

- Polymers and the Environment, 26(9), 3613-3625.
- 38- Oyehan, T. A., Al-Thukair, A. A., 2017. Isolation and characterization of PAH-degrading bacteria from the Eastern Province, Saudi Arabia. Marine pollution bulletin, 115(1-2), 39-46.
- 39- Park, J., Yoon, J.H., Depuydt, S., Oh, J.W., Jo, Y.M., Kim, K., Brown, M.T., Han, T., 2016. The sensitivity of an hydroponic lettuce root elongation bioassay to metals, phenol and wastewaters. Ecotoxicology and environmental safety, 126, pp.147-153.
- 40- Pathak, V. M., Kumar, N., 2017. Implications of SiO₂ nanoparticles for in vitro biodegradation of low-density polyethylene with potential isolates of *Bacillus*, *Pseudomonas*, and their synergistic effect on *Vigna mungo* growth. Energy, Ecology and Environment 2(6), 418-427.
- 41- Poeta, G., Fanelli, G., Pietrelli, L., Acosta, A.T.R., Battisti, C., 2017. Plasticsphere in action: evidence for an interaction between expanded polystyrene and dunal plants. Environmental Science and Pollution Research, 24 (12), 11,856–11,859.
- 42- Qi, Y., Yang, X., Pelaez, A. M., Lwanga, E. H., Beriot, N., Gertsen, H., Garbeva, P., Geissen, V., 2018. Macro-and micro-plastics in soil-plant system: effects of plastic mulch film residues on wheat (*Triticum aestivum*) growth. Science of the Total Environment 645, 1048-1056.
- 43- Rajeswari, T. R., 2014. Impact of plastics on environmental pollution. Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences, 3, 87-93.
- 44- Rani, R., Rathee, J., Kumari, P., Singh, N. P., Santal, A. R., 2022. Biodegradation and detoxification of low-density polyethylene by an indigenous strain *Bacillus licheniformis* SARR1. Journal of Applied Biology and Biotechnology, 10(1), 9-1.
- 45- Rillig, M.C., Ziersch, L., Hempel, S., 2017. Microplastic transport in soil by earthworms. Scientific Reports, 7, 1362.
- 46- Sajiki, J., Yonekubo, J., 2003. Leaching of bisphenol A (BPA) to seawater from polycarbonate plastic and its degradation by reactive oxygen species. Chemosphere, 51(1), 55-62.
- 47- Shahnawaz, M., Sangale, M. K., Ade, A. B., 2016. Bacteria-based polythene degradation products: GC-MS analysis and toxicity testing. Environmental Science and Pollution Research, 23(11), 10733-10741.
- 48- Waring, R. H., Harris, R. M., Mitchell, S. C., 2018. Plastic contamination of the food chain: A threat to human health?. Maturitas, 115, 64-68.
- 49- Wu, X., Liu, Y., Yin, S., Xiao, K., Xiong, Q., Bian, S., Liang, S., Hou, H., Hu, J., Yang, J., 2020. Metabolomics revealing the response of rice (*Oryza sativa* L.) exposed to polystyrene microplastics. Environmental Pollution, 266, p.115159.
- 50- Wu, X., Lu, J., Du, M., Xu, X., Beiyuan, J., Sarkar, B., Bolan, N., Xu, W., Xu, S., Chen, X., Wu, F., 2021. Particulate plastics-plant interaction in soil and its implications: A review. Science of The Total Environment, 792, p.148337.
- 51- Zhou, C.Q., Lu, C.H., Mai, L., Bao, L.J., Liu, L.Y., Zeng, E.Y., 2021. Response of rice (*Oryza sativa* L.) roots to nanoplastic treatment at seedling stage. Journal of Hazardous Materials, 401, p.123412.

The detoxifying role of plastic (polyethylene) degrading bacteria and its effect on the growth indices of lettuce seeds (*Lactuca sativa*)

Mazaheri H. and Nazeri S.*

Dept of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Every year, human activities introduce large amounts of synthetic plastics into the environment, with negative effects on the growth and survival of living organisms (including plants). It is necessary to remove these pollutants with different methods, especially biological ones. The purpose of this research is to isolate low-density polyethylene (LDPE) degrading bacteria and investigate the toxicity test solution containing bacteria and polyethylene on the growth indicators of *Lactuca sativa* seeds due to the high sensitivity of this plant to environmental pollution. The effect of five bacterial strains isolated from the landfill soil of Hamadan province was investigated on the percentage of seed germination (SG), hypocotyl elongation (HE), root elongation (RE) and germination index (GI) of lettuce seeds. Strains of B6, B22, B23 and A20 increased the HE and SG growth indexes of lettuce seeds compared to the treatment containing MS medium and polyethylene (MS+PE). B28 strain had a lower performance in all indices than other strains. The results of this experiment showed that because the sensitive lettuce plant was able to grow in this condition, probably the biodegradation of polyethylene by these strains is consistent with Environment. In the treatment of different strains, hydrolysis products with different amounts were identified by GC-MS analysis. The highest production amount of common hydrolysis product among all strains was related to the treatment of strain B6.

Keywords: Bioremediation, polyethylene, bacteria, growth index, *Lactuca sativa*