

## بررسی تجزیه زیستی آکریلونیتریل و الیاف آکرلیک حاوی نانوذره نقره-تیتانیوم

فرانک ماوندانژاد<sup>۱\*</sup>، روحا- کسری کرمانشاهی<sup>۲</sup>، مجید ممهد هروی<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۳

تاریخ تصویب: ۹۳/۸/۳

### چکیده

الیاف آکرلیک حاوی ۸۵٪ آکریلونیتریل می باشد که به همراه نانوذره نقره-تیتانیوم در صنعت نساجی به عنوان الیاف ضد میکروب استفاده می شود. این الیاف پس از مصرف وارد طبیعت شده و اثر سوء بر روی محیط زیست و میکروارگانیسم‌های مفید موجود در خاک می‌گذارند. بنابراین تجزیه زیستی این الیاف می‌تواند راه مفیدی برای از حذف آن‌ها از محیط باشد. باتوجه به اینکه این الیاف حاوی نانوذره تیتانیوم- نقره بوده لذا برای جداسازی اولیه، میکروارگانیسم‌های مقاوم به نانوذره جداسازی و سپس تجزیه مونومر تشکیل‌دهنده الیاف و الیاف آکرلیک مورد بررسی قرار گرفت. محیط PHGII حاوی

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س) (نویسنده مسئول)؛

faranak.mavandadnejad@gmail.com

<sup>۲</sup> استاد میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهراء (س)

<sup>۳</sup> استاد شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء (س)

۰ ppm نانوذره  $p105$  برای جداسازی باکتری های مقاوم به آن استفاده شد و سپس باکتری های جداسازی شده در محیط BPM که حاوی  $1007 \text{ ppm}$  آکریلونیتریل بود، تلقیح گردید و سپس تجزیه آکریلونیتریل توسط دستگاه GC مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت الیاف آکریلیک در داخل محیط BPM قرار داده شد و توسط دستگاه HPLC تولید آکریلیک اسید بررسی شد.

در این پژوهش *Kluyvera georgiana* از پساب کارخانه پلی آکریل اصفهان جداسازی گردید که به نانوذره  $p105$  مقاوم و قادر به تجزیه  $969,9 \text{ ppm}$  آکریلونیتریل بود اما الیاف آکریلیک توسط این میکروارگانیسم تجزیه نشد.

**واژه های کلیدی:** تجزیه زیستی، نانوذره نقره، آکریلونیتریل، الیاف آکریلیک.

#### مقدمه

آکریلونیتریل باشد، اطلاق می شود (Bruce et al. 2007). الیاف آکریلیک دارای کاربردهای گوناگونی در صنعت نساجی است به طوری که این الیاف به همراه نانوذره نقره در ساخت الیاف ضد میکروبی به کار برده می شود (Scorzoni, Capone et al. 2004, et al. 2007).

مونومر این الیاف آکریلونیتریل می باشد که یک ترکیب نیتریل دار است. در واقع نیتریل ها ترکیباتی هستند که دارای یک یا چند گروه فعال سیانو بوده که بسیار سمی و سرطان زا می باشند (Kim et al. 2000, Singh et al. 2006, Zhou et al. 2005 Kohyama et al. 2000, Demakov et al. 2007, Tauber et al. 2007).

نخستین گزارش مربوط به تولید آکریلونیتریل و پلی آکریلونیتریل توسط آقای Moureu شیمیدان فرانسوی منتشر شد (Bruce et al. 2007). اولین حلال برای PAN (پلی آکریلونیتریل) قبل از جنگ جهانی دوم در آلمان توسط آقای Rein کشف شد و پس از آن با توجه به فرآیند پذیری پلیمر با حلال تولید آن گسترش پیدا کرد. بطوریکه اولین الیاف تجاری آکریلیک

در سال ۱۹۴۳ بوسیله شرکت Dupont بنام Orlon به دنیا معرفی گردید. اصطلاح الیاف اکریلیک به الیافی که زنجیره پلیمر آن شامل حداقل ۸۵ درصد وزنی کومونومر

### مواد و روش‌ها

ویژگی نانوذره به کار رفته در این پژوهش نانوذره P105 از شرکت نانونصب تهران تهیه گردید که حاوی ۹۵٪ دی اکسید تیتانیوم با پوشش ۵ درصد وزنی نقره بود و اندازه آن در حدود ۱۰۰ نانومتر گزارش گردید.

### ویژگی دستگاه GC

Varian series 2400

Colum: PropakQ

Mesh size: 80/100 l=3f

Detector=FID

### محیط کشت پایه فلزی PHGII

ترکیبات این محیط در ۱۰۰۰ میلی لیتر برابر است با:

پیتون: ۴ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم، گلوکز ۲ گرم

ترکیبات مذکور را در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و pH محیط را با pH متر برابر ۷ تنظیم کرده و به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد در اتوکلاو استریل می‌شود. پس از اینکه دمای محیط به ۵۰ الی ۵۵ درجه سانتی‌گراد رسید محلول فلزی مورد نظر را با غلظت مورد نظر پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر به محیط اضافه کرده و با دستگاه همزن مغناطیسی و مگنت استریل به خوبی مخلوط گردید. این محیط جهت جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به

میکروارگانیسم‌هایی وجود دارند که با دارا بودن آنزیم‌هایی چون نیتریلاز و نیتریل هیدراتاز این ترکیبات سمی را به اسید آکرلیک و آمونیاک تبدیل می‌کنند به طوریکه نیتریلاز مستقیماً ترکیبات نیتریل دار را به آمونیاک و اسید کربوکسیلیک مربوطه تبدیل و نیتریل هیدراتاز با ایجاد حد واسط آمید و با کمک آنزیم آمیداز تولید آمونیاک و اسید کربوکسیلیک مربوطه می‌کند (Hoyle et al. 1989, Linton et al. 1986, Kobayashi et al., Padmakumar et al. 1999 al. 2007 Sari et al. 2007, Dias et al. 2000). از طرف دیگر برخی میکرو ارگانیسم‌ها بویژه *Rhodococcus rhodochrous* که بر روی گروه‌های نیتریل سطحی موجود در الیاف آکرلیک (پلیمر آکریلونیتریل) اثر گذار بوده و آنها را به صورت جزئی تجزیه می‌کند (Tauber et al. 2000). الیاف آکرلیک حاوی نانوذره پس از مصرف وارد طبیعت شده و اثرات سوء بر روی محیط زیست می‌گذارند در نتیجه تجزیه زیستی این الیاف می‌تواند راه مفیدی برای از بین بردن این الیاف شود. در این پژوهش ابتدا میکروارگانیسم‌های مقاوم به نانوذره تیتانیوم- نقره موجود در الیاف جداسازی شده و سپس تجزیه مونومر تشکیل‌دهنده الیاف (آکریلونیتریل) و خود الیاف مورد بررسی قرار گرفته است.

نانوذره نقره (P105) استفاده شد (Martinkova et al. 1999).

### جداسازی باکتری‌های مقاوم به نانوذره تیتانیوم-نقره (P105)

از آنجایی که الیاف آکریلیک حاوی نانوذره تیتانیوم-نقره می باشد لذا در اولین مرحله سعی بر جداسازی میکروارگانیسم‌های مقاوم به نانوذره تیتانیوم-نقره شد. نمونه برداری از لجن فعال کارخانه پلی‌آکریل اصفهان صورت گرفت و به مقدار یک میلی‌لیتر از لجن فعال در آب استریل برای رقت‌سازی استفاده گردید. از آنجایی که به میزان ۵۰ ppm از این نانوذره در الیاف آکریلیک استفاده شده است لذا غلظت نانوذره‌ای که در محیط PHGII مایع استفاده گردید نیز معادل ۵۰ ppm بود.

محیط کشت پایه نمکی مایع حاوی آکریلونیتریل تنها منبع نیتروژن و کربن (BPM) ترکیبات این محیط در ۱۰۰۰ میلی لیتر برابر است با محیط اصلی حاوی سولفات منیزیم ۷ آبه ۰/۲ گرم، کلرید کلسیم ۲ آبه ۰/۰۰۲ گرم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات ۱ گرم، پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۱ گرم است و محلول حاوی مواد مغذی جزئی شامل: سولفات آهن ۰/۳ گرم، کلرید منیزیم ۶ آبه ۰/۲۱ گرم، کلرید کبالت ۶ آبه ۰/۱۰۶ گرم، سولفات روی ۰/۰۰۴ گرم و  $Na_2MoO_4$  ۰/۰۰۳۴ گرم می باشد.

### تجزیه مونومر الیاف آکریلیک (آکریلونیتریل)

با توجه به این که آکریلونیتریل مونومر اصلی الیاف آکریلیک است لذا در ابتدا تجزیه این مونومر مورد بررسی قرار گرفت. در این مرحله میکروارگانیسم‌های جداسازی شده مقاوم به نانوذره P105 به محیط BPM با غلظت ۱۰۰۷ ppm آکریلونیتریل به عنوان تنها منبع نیتروژن و کربن تلقیح نموده و به مدت ۸ روز در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۵ rpm گرمخانه‌گذاری شد. میزان رشد باکتری‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج

برای تهیه این محیط کشت پایه نمکی، نمک‌های سولفات منیزیم، کلرید کلسیم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، دی هیدروژن فسفات را جداگانه در آب مقطر حل کرده و استریل نموده و محلول مواد مغذی جزئی نیز هر کدام جداگانه در آب مقطر حل کرده و استریل گردیده و به ازای هر لیتر محیط کشت اصلی یک میلی لیتر از محلول حاوی مواد غذایی جزئی به محیط اضافه و در نهایت Ph محیط برابر ۷ تنظیم گردید. آکریلونیتریل در نهایت با عبور دادن از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر به محیط اضافه شد (Wang et al. 2007).

داده شد و سپس با قرار دادن الیاف بر روی کاغذ صافی و قیف استریل، ۱۰ مرتبه با آب مقطر استریل الیاف را آبکشی نموده و در آخر با پنس استریل واحد امکان آب آن را خارج نموده و سپس در فور با دمای ۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده تا الیاف خشک گردد. برای اطمینان حاصل کردن از استریل بودن الیاف شستشو الیاف دوبار انجام شد.

#### بررسی تجزیه الیاف

در این آزمایش ۲ نوع محیط آماده گردید و الیاف شستشو داده شده به محیطها اضافه شد. محیط اول تنها حاوی الیاف و محیط پایه نمکی بود که ۰/۰۱ گرم الیاف توزین نموده و در ارلن حاوی محیط BPM قرار داده شد. محیط دوم حاوی الیافهای حرارت دیده بود که به مدت ۳ روز در فور در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد و به محیط پایه نمکی اضافه گردید. رشد باکتریها توسط اسپکتروفتومتر تعیین OD در طول موج برابر ۶۰۰ نانومتر انجام گردید و در نهایت با عبور دادن محیط از کاغذ صافی الیاف جمع‌آوری شده تغییر وزن و همچنین تولید اسید آکرلیک نیز توسط دستگاه HPLC مورد بررسی قرار گرفت.

۶۰۰ نانومتر بررسی گردید. همچنین تولید آمونیاک به روش نسلر و تغییر pH محیط توسط pH متر و در نهایت میزان تجزیه آکریلونیتریل توسط دستگاه GC (گاز کروماتوگرافی) مورد ارزیابی قرار گرفت.

#### گلوکز به عنوان منبع کربن و آکریلونیتریل به عنوان منبع نیتروژن

در این مرحله میکروارگانیسمها به محیط BPM با ۱٪ گلوکز به عنوان منبع کربن کمی افزوده شد.

#### کلرید آمونیوم به عنوان منبع نیتروژن و آکریلونیتریل به عنوان منبع کربن

در این مرحله ۱٪ کلرید آمونیوم به محیط BPM به عنوان منبع نیتروژن کمی افزوده شد.

#### شستشو الیاف

برای این کار ۰/۵ گرم از الیاف مورد نظر را در ارلن که حاوی ۰/۵٪ از پودر لباسشویی که در بن ماری به دمای ۷۰ رسیده اضافه کرده و به مدت ۳ دقیقه با دور ۲۰۰ دور در دقیقه عملیات شستشو روی هیتر انجام شد. سپس الیاف را خارج کرده و داخل ارلنهای که حاوی آب مقطر استریل بود قرار داده شد و بلافاصله از ارلن مذکور خارج و در ارلن دیگری که حاوی آب مقطر استریل بود قرار

شناسایی ژنتیکی جدایه مقاوم به نانوذره  
 و تجزیه کننده آکریلونیتریل  
 استخراج DNA جهت شناسایی ژنتیکی  
 جدایه به روش فنل-کلروفرم انجام شد و  
 جهت شناسایی باکتری جداسازی شده توالی  
 قطعه rDNA16S توسط دستگاه PCR  
 بررسی شد. در این فرایند، داخل ویال ۰/۲  
 میکرومتری مواد جدول ۱ اضافه شد.

جدول ۱- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)

حجم مورد نظر	غلظت نهایی (در ۵۰ میکرولیتر)	
5	1X	Buffer 10X
1	50mM	MgCl <sub>2</sub>
1	0.2 Mm	dNTP
1	0.3 μm	Primer F
1	0.3 μm	Primer R
1	50ng/ μl	DNA Template
0.5	1U/μl	Taq polymerase

حجم مواد فوق در مجموع ۵۰ میکرولیتر  
 می باشد. سپس ویال ها در داخل دستگاه  
 PCR قرار داده شد. برنامه دستگاه به  
 صورت جدول ۲ تنظیم شد.

جدول ۲- برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر PCR

شماره برنامه	نام مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد واکنش ها
۱	واسرشتی ابتدایی	۹۴	۵ دقیقه	۱
۲	واسرشتی	۹۴	۱ دقیقه	۳۰
	اتصال	۴۵-۵۵	۱ دقیقه	
۳	گسترش	۷۲	۱ دقیقه	۱
	گسترش نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	
۴	اتصال نهایی	۴	۱۰ دقیقه	۱

## جدول ۳- پرایمر های مورد استفاده و توالی نوکلئوتیدی آن

نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی (۳' ۵')
27f	AGAAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492r	GGTACCTTGTTACGACTT

نانوزره نقره بود (Klaus et al. 1999). در سال ۲۰۰۷ شاهوردی و همکارانش *Klebsiella pneumonia* را جداسازی کردند که قادر به تولید نانوزره نقره بوده و به این نانوزره قاعدتاً مقاوم بود. اندازه نانوزره در میکروب کشی آن موثر است و بسته به اندازه نانوزره اثر میکروب کشی آن تحت تاثیر قرار می گیرد (Shirvastava et al. 2007). در واقع Shirvastava و همکارانش بیان داشتند که نانوزره نقره بر روی باکتری گرم مثبت اثر مهاری کمتری در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی دارد. در این تحقیق باکتری‌های گرم مثبت و نگرم منفی جداسازی شده از لجن فعال در محیط حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر نانوزره نقره-تیتانیوم رشد داشته و مقاومت قابل توجهی به نانوزره P105 از خود نشان دادند در واقع قسمت اعظم این نانوزره اکسیدتیتانیوم بوده و تنها ۵ درصدوزن این نانوزره از نقره می‌باشد. مکانیسم مقاومت به نانوزره نقره در باکتری‌های گرم مثبت در سال ۲۰۰۷، توسط Shirvastava و همکارانش این گونه بیان شد که باکتری‌های گرم منفی اگرچه لایه لیپوپلی ساکاریدی در خارج داشته اما یک

همچنین ویال‌های دارای محلول واکنش بدون DNA الگو به عنوان کنترل منفی در دستگاه قرار گرفت تا آلودگی‌های احتمالی مشخص شود. پس از تعیین توالی و مقایسه در بانک اطلاعاتی ژنتیکی NCBI درخت فیلوژنتیکی جدایه رسم گردید.

## روش‌های آماری

با استفاده از نرم‌افزار SPSS نرمال بودن و معنی‌دار بودن داده‌ها بررسی گردید و طبق آزمون T و همچنین آزمون آنالیز واریانس داده‌ها تحلیل و نتایج حاصله مورد بررسی قرار گرفته شد.

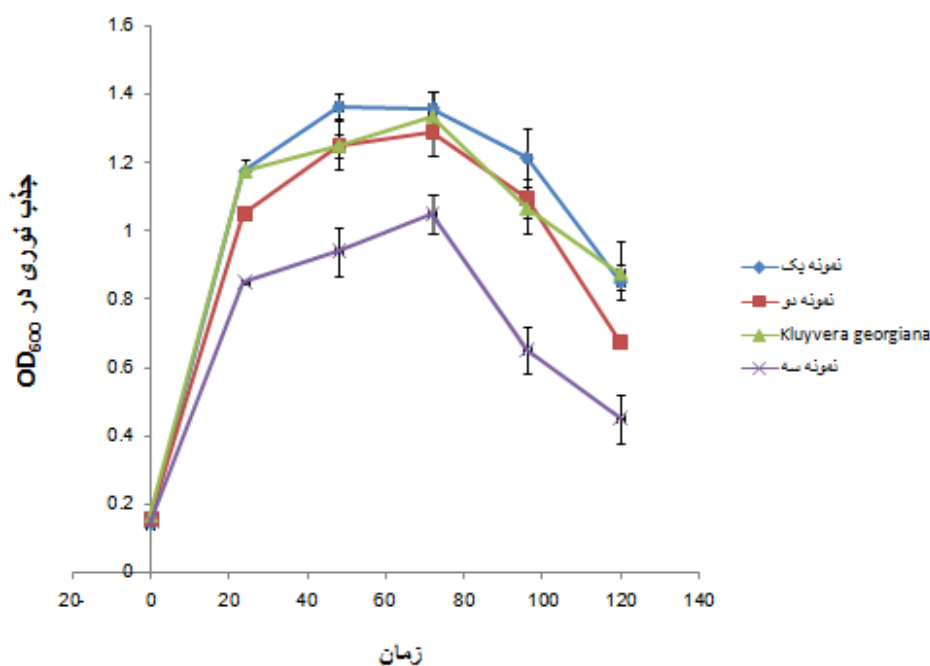
## نتایج

## جداسازی باکتری‌های مقاوم به نانوزره تیتانیوم-نقره

نمونه برداری از لجن فعال صورت گرفت و به محیط PHGII با غلظت ۵۰ ppm اضافه و باکتری‌های مقاوم به این نانوزره جداسازی گردید. رشد باکتری‌های جداسازی شده بعد از ۵ روز مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۱). در سال ۱۹۹۹ *Pseudomonas utzeri* جداسازی گردید که قادر به تولید

ساختار سه بعدی محکمی را ایجاد کرده که نه تنها مانع از اتصال نانوذره به دیواره شده بلکه مانع از ورود این نانوذره به داخل سلول می‌شود. در واقع می‌توان این‌گونه استنباط کرد که اندازه نانوذره نقره هرچه کوچکتر باشد این نفوذپذیری راحت‌تر بوده و میکروارگانیسم بهتر از بین می‌رود (Shirvastava et al. 2007). در این پژوهش باکتری‌هایی جدا شده به نانوذره p105 مقاوم بوده و نمی‌توان ادعا کرد که این باکتری به نانوذره‌های دیگری مقاوم و یا حساس است.

لایه نازک ۷-۸ نانومتری از پپتیدوگلیکان در زیر آن قرار دارد و استحکام و پایداری ضعیفی نسبت به باکتری گرم مثبت دارد در ضمن بارهای منفی لایه لیپوپلی ساکاریدی به بارهای مثبت ضعیفی که بر روی نانوذره نقره است جذب شده و این خود در اثرگذاری نانوذره نقره بر روی دیواره و در نهایت باکتری موثر می‌باشد. در باکتری گرم مثبت پپتیدوگلیکان دارای ضخامتی در حدود ۲۰-۸۰ نانومتر بوده و همچنین این پپتیدوگلیکان دارای زنجیره‌های کوتاه خطی است که به پپتیدها متصل شده و یک



نمودار ۱. رشد باکتری‌های مقاوم به نانوذره نقره در محیط PHGII با غلظت ۵۰ ppm به مدت ۵ روز



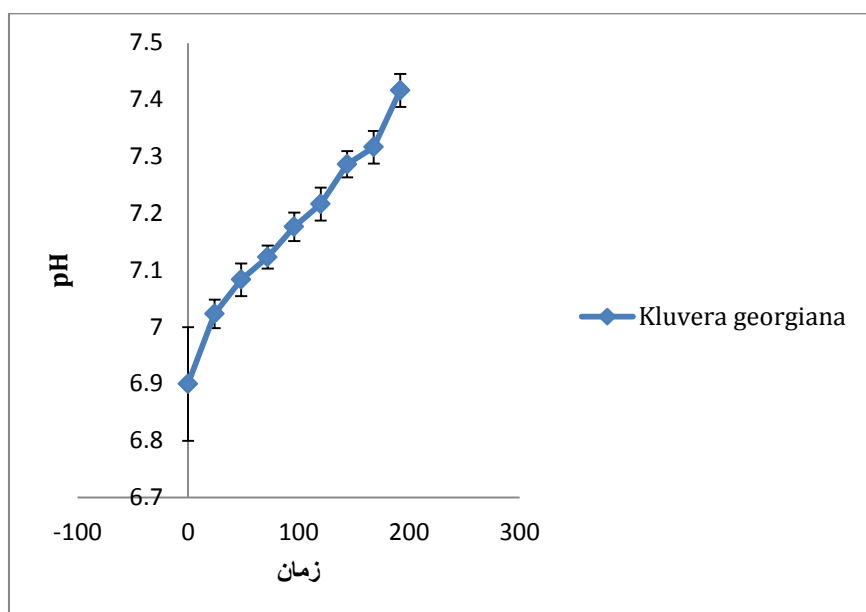
### تجزیه زیستی آکریلونیتریل

باکتری‌های مقاوم به نانوذره p105 در محیط PMB با غلظت ۱۰۰۷ ppm به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن تلقیح شد. در این پژوهش تنها یک باکتری جداسازی گردید که این باکتری قادر بود ۹۶۹,۹ppm را بعد از ۸ روز تجزیه کند. آمونیاک تولید شده توسط روش نسلسر بررسی شد و pH محیط توسط pH متر اندازه‌گیری گردید (نمودار ۲). آمونیاک تولید شده و تغییر pH محیط نشانگر تجزیه آکریلونیتریل است. میزان آکریلونیتریل تجزیه شده توسط دستگاه GC مورد بررسی قرار گرفت و در محیط BPM بعد از ۸ روز کاهش مقدار آکریلونیتریل مشاهده گردید (شکل ۱).

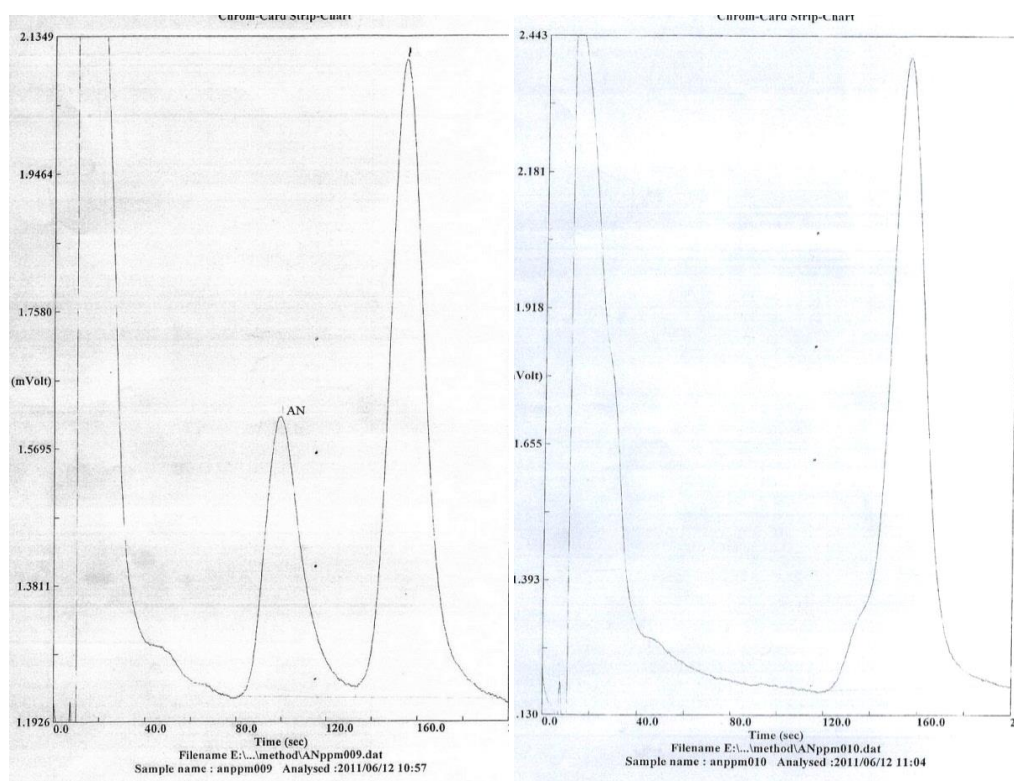
در سال ۱۹۸۶، Linton و همکارانش از باکتری *Nocardia rhodococcus* LL100 برای تجزیه آکریلونیتریل استفاده نمودند که این باکتری قادر بود از آکریلونیتریل تنها به عنوان منبع نیتروژن استفاده کند. در سال ۱۹۸۷، Watanabe و همکارانش باکتری‌های *Arthrobacter globiformis* IFO12136 و *Microbacterium flavum* را از خاک

جداسازی نمودند که قادر به تبدیل آکریلونیتریل به آکریل آمید بود و کاربرد صنعتی داشتند.

در سال ۱۹۹۰، همچنین Kobayashi و همکارانش باکتری گرم مثبت *Rhodococcus rhodochrous* 22 را از خاک جدا نموده که این باکتری نیز در محیط غنی دارای منبع کمی کربن و نیتروژن به همراه آکریلونیتریل قادر به تجزیه این ترکیب نیتریل‌دار بوده است. در پژوهش‌های اخیر باکتری‌های جداسازی شده قادر به رشد در محیط BPM به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن بوده اما در این پژوهش جدایه برتر قادر به رشد در محیط BPM به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن نبوده (نمودار ۳) و تنها قادر به تجزیه کردن این ماده بوده است. منبع کمی گلوکز و کلرید آمونیوم نیز در این محیط نتوانست به رشد باکتری کمک کند (نمودار ۴) (نمودار ۵). داده‌های حاصل از تجزیه آکریلونیتریل توسط دستگاه GC و آمونیاک تولیدی و تغییر pH محیطی نشان‌دهنده تجزیه این ماده در محیط BPM می‌باشد.



نمودار ۲. تغییرات pH در محیط BPM با غلظت ۱۰۰۷ ppm آکریلونیتریل به مدت ۸ روز

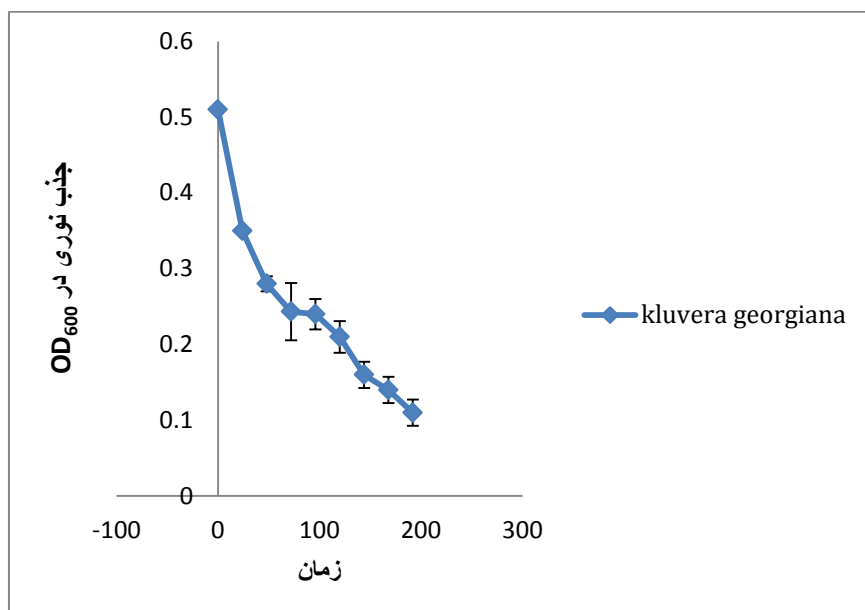


(الف)

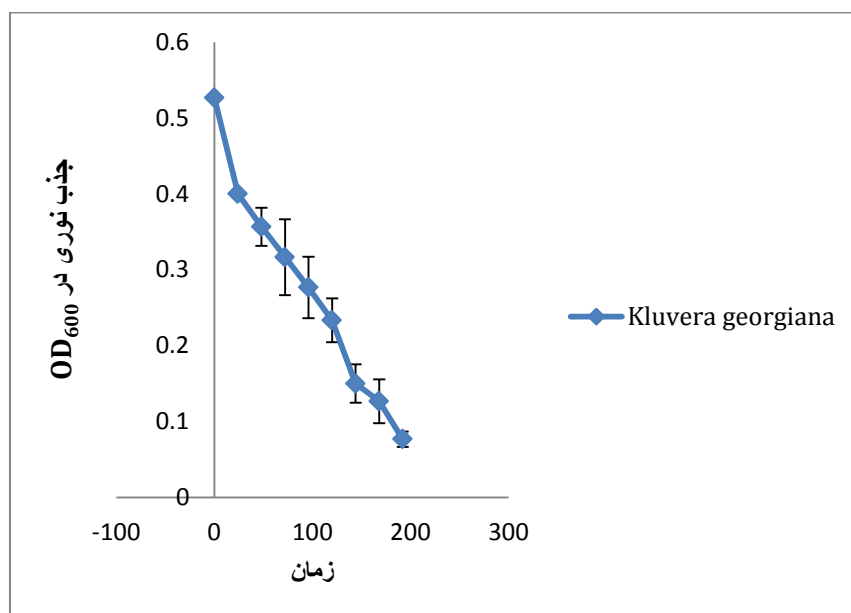
(ب)

شکل ۱. الف) محیط BPM با غلظت ۱۰۰۷ ppm آکریلونیتریل قبل از تلقیح باکتری

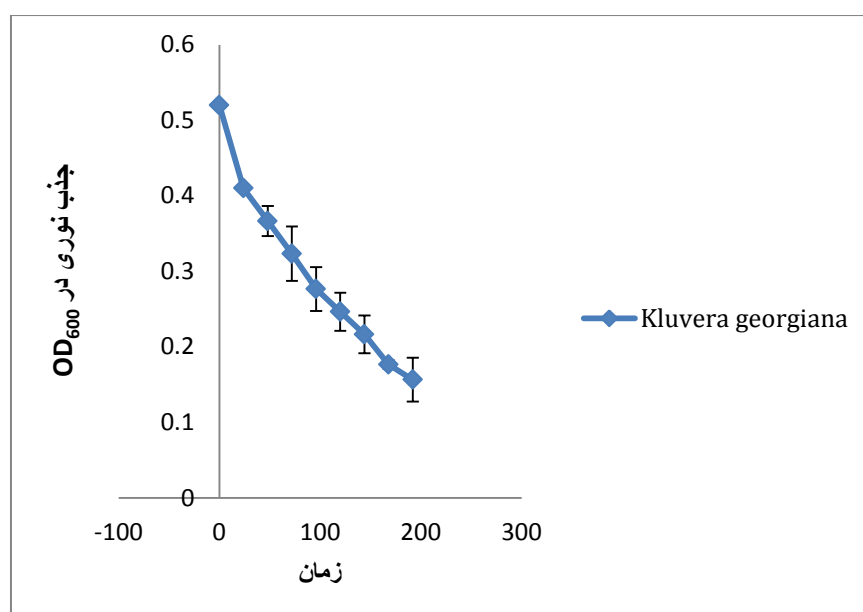
ب) محیط BPM بعد از تلقیح باکتری بعد از ۸ روز



نمودار ۳. کاهش رشد باکتری در محیط BPM با غلظت ۱۰۰۷ ppm آکریلونیتریل به عنوان تنها منبع کربن و نیتروژن بعد از ۸ روز



نمودار ۴. کاهش رشد باکتری در محیط BPM با غلظت ۱۰۰۷ ppm آکریلونیتریل منبع نیتروژن و گلوکز منبع کربن کمی بعد از ۸ روز



نمودار ۵. کاهش رشد باکتری در محیط BPM با غلظت ۱۰۰۷ ppm آکریلونیتریل

منبع کربن و کلرید آمونیوم منبع نیتروژن کمکی بعد از ۸ روز

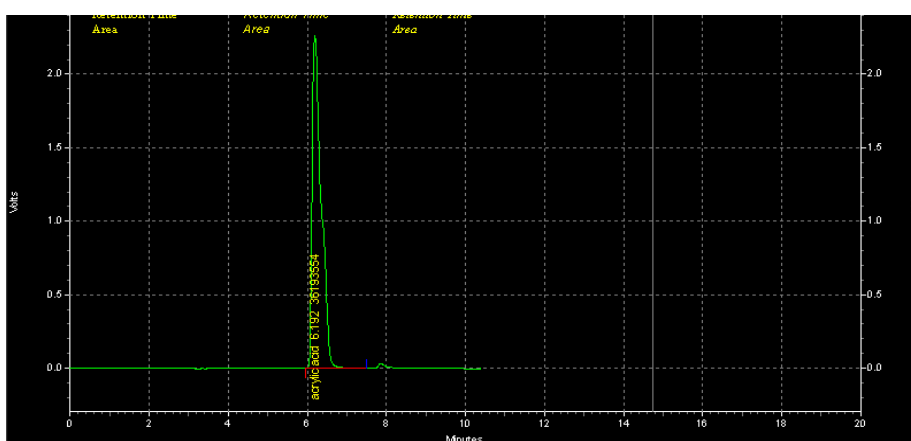
به عنوان الیاف ضد میکروبی معرفی شدند. نوشته‌ها و مقالات مکتوب زیادی در خصوص تجزیه مونومر این الیاف یعنی آکریلونیتریل در دست می‌باشد و میکروارگانیسم‌های زیادی قادر به تجزیه زیستی این ماده سمی هستند. اما الیاف آکریلیک که به صورت پلیمر ساخته می‌شود قابلیت تجزیه شدن آن مانند مونومر آکریلونیتریل نمی‌باشد. پلیمرها اصولاً ترکیبات بسیار پایدار و محکمی هستند و قابلیت تجزیه شدن آنها نسبت به مونومرهای تشکیل‌دهنده‌شان بسیار پایین‌تر و سخت‌تر می‌باشد. تاکنون گزارشی در خصوص تجزیه زیستی کامل الیاف آکریلیک ثبت نشده تنها در سال ۲۰۰۰، Tauber و همکارانش از آنزیم نیتریل هیدراتاز و آمیداز باکتری

## تجزیه الیاف آکریلیک حاوی نانوذره نقره و تیتانیوم

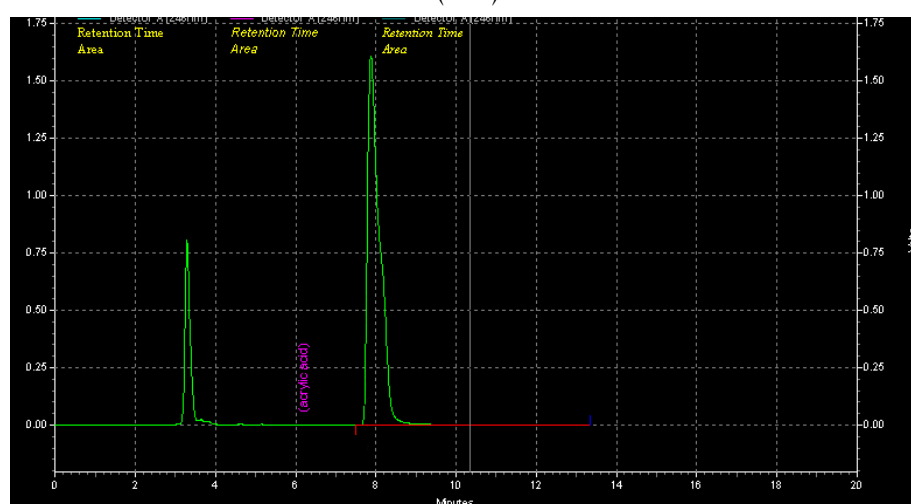
الیاف آکریلیک طبق پروتکل شسته شد و در محیط پایه نمکی BPM قرار داده شد. در این محیط نه الیاف حرارت دیده و نه الیاف معمولی توسط باکتری تجزیه نشد. آمونیاک و تغییر pH و عدم رشد باکتری نشان دهنده عدم تجزیه الیاف آکریلیک بود همچنین HPLC نیز تولید آکریلیک اسید شناسایی نکرد (شکل ۲). در واقع جدایه برتر بر خلاف تجزیه مونومر این الیاف قادر به تجزیه پلیمر الیاف آکریلیک نبود. الیاف آکریلیک اصفهان که ۹۱٪ آن از مونومر آکریلونیتریل تشکیل شده و به عنوان یک پلیمر مقاوم به حساب می‌آید در ساخت الیاف ضد میکروبی استفاده شده و این الیاف حاوی نانوذره نقره

گزارشات درباره الیاف آکرلیک بدون نانوذره بوده و هیچ گونه گزارشی مبنی بر تجزیه زیستی الیاف آکرلیک حاوی نانوذره نقره یافت نشد. در این پژوهش نیز اگرچه آکرلونیتریل قابلیت تجزیه شدن توسط میکروارگانیسم‌های جدا شده از پساب کارخانه آکرلیک اصفهان را داشت اما این میکروارگانیسم‌ها قادر به تجزیه الیاف آکرلیک که پلیمر محکم و بسیار پایدار این مونومر می‌باشد، نیست.

*Rhodococcus hodochrous* استفاده کرده که تنها ۱۶٪ گروه‌های نیتریل سطحی تجزیه شده است. آنها همچنین بیان کردند اگرچه آکرلونیتریل می‌تواند سوبسترای خوبی برای برخی میکروارگانیسم‌ها باشد اما گزارشی در خصوص تجزیه آنزیمی الیاف آکرلیک به ثبت نرسیده است. در سال ۲۰۰۳، نیز La-lei و همکارانش نیز بیان کردند که الیاف آکرلیک به سختی قادر به تجزیه شدن از طریق میکروارگانیسم‌ها خواهد بود. این



(الف)



(ب)

شکل ۲. الف) پیک نمونه استاندارد اسید آکرلیک (ب) عدم شناسایی اسید آکرلیک توسط HPLC در نمونه

پرایمر f27 و r1492، توالی تکثیر شده توسط هر یک از پرایمرها به کمک برنامه‌ی BioEdit در هم ادغام (Overlap) شد و توالی با طول حدوداً ۱۴۴۱ جفت باز به دست آمد. توالی به دست آمده در بانک‌های اطلاعاتی NCBI و EzTaxon، Blast شد و میزان شباهت مترادف نوکلئوتیدی با باکتری‌های ثبت شده در بانک‌های ژنی به دست آمد.

#### درخت فیلوژنتیک

درخت فیلوژنی پس از یافتن توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNAs جداییه و مقایسه‌ی آن با گونه‌های نزدیک، به کمک نرم‌افزار Mega version 5 ۱۴۴۱ جفت باز رسم شد (شکل ۳).

دادن الیاف پلی آکریلیک حاوی نانوذره و همچنین دانشگاه الزهرا برای فراهم کردن آزمایشگاه کمال تشکر را دارد.

#### شناسایی جداییه به کمک تعیین توالی 16srDNA

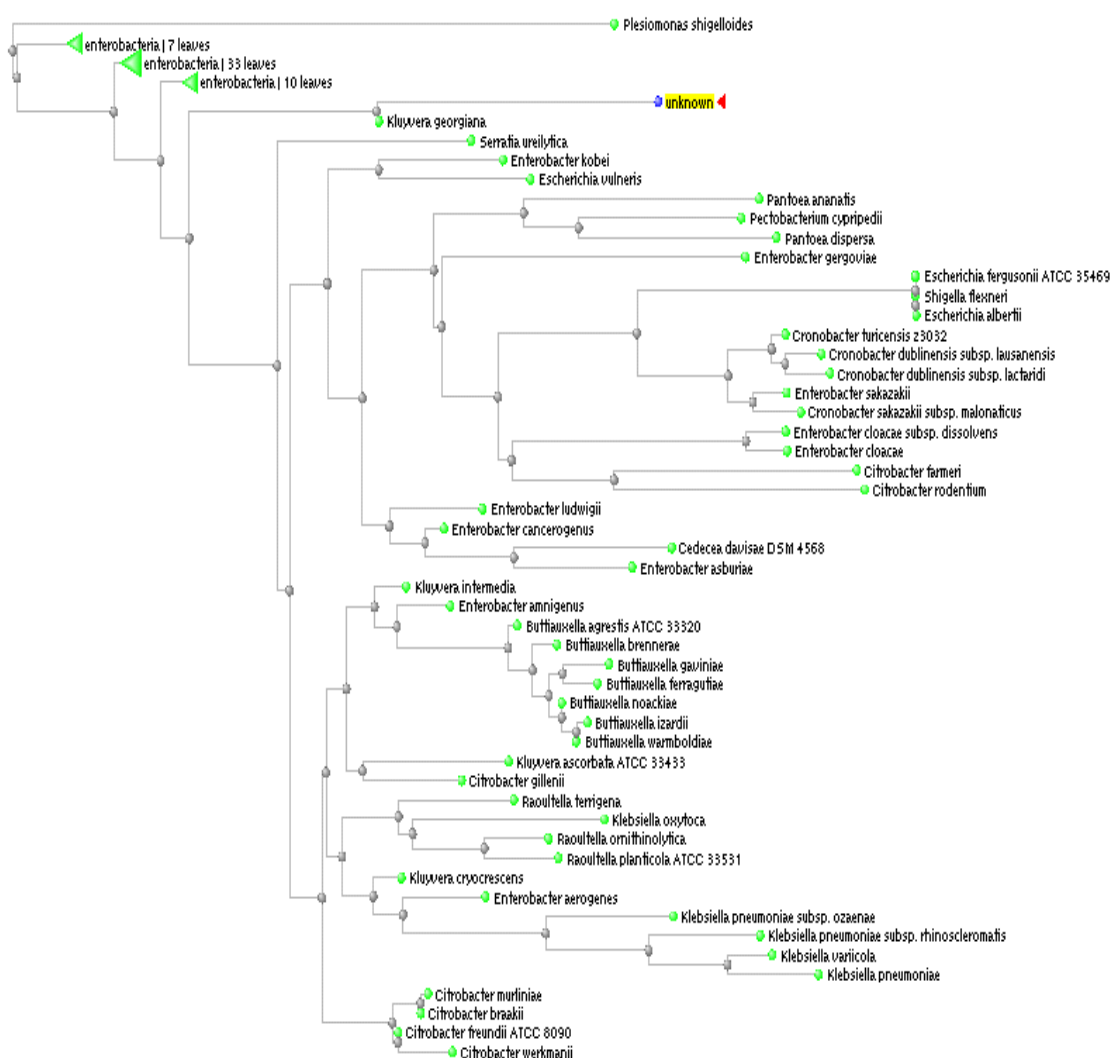
پس از انجام PCR برای صحت واکنش انجام شده و تأیید دست یابی به باند 16SrDNA باکتری مورد نظر، الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ انجام شد تا قطعه تکثیر یافته مشاهده گردد. به منظور حذف دایمر پرایمر و تخلیص PCR از کیت DNA Extraction استفاده گردید DNA استخراج شده برای بررسی حاصل استفاده از کیت، مجدداً الکتروفورز شد. که در نهایت یک باند 1500 جفت بازی بدون وجود هرگونه دایمر پرایمر و ناخالصی حاصل گردید.

#### بررسی شباهت توالی نوکلئوتیدی ژن 16srDNA جداییه با باکتری‌های ثبت شده در بانک ژنی

پس از تعیین توالی محصول به دست آمده از تکثیر ژن 16S rDNA جداییه به کمک دو

#### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از شرکت پلی آکریل اصفهان و از ریاست محترم این شرکت به ویژه جناب آقای مهندس علیجانلو برای همکاری‌های بی‌شائبه و در دسترس قرار



شکل ۳. با توجه به درخت رسم شده باکتری *Kluuyverageorgiana* ۹۱٪ با جدایه قرابت دارد.

## منابع

- Bruce, G. (2007). AcrylicFibers. HandbookofFiberChemistry. ThirdEdition. Edited by Menachem Lewin.
- Capone, G. J. Masson, J. C. (2004). Acrylic Fibers. Encyclopedia Of Polymer Science and Technology. Published Online: 15 MAR 2004.
- Dias, J. C. T. Rezende, R. P. Rosa, C. A. Lachance, M. Linardi, V. R. (2000). Enzymatic degradation of nitriles by a *Candida guilliermondii* UFMG-Y65. Canadian Journal of Microbiology. 46: 525–531.

- Demakov, V. A. Maksimov, Yu. A. Kuznetsova, M. V. Ovechkina, G. V. Remezovskaya, N. B. Maksimova, Yu. G. (2007). Biological Diversity of Nitrile-Metabolizing Bacteria in Soils of the Perm Region Affected by Human Activities. *Ecologia*. 38:185–190.
- Hoyle, A. J. Bunch, A. W. Knowles, Ch. J. (1989). The nitrilases of *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 11216. *Enzyme and Microbial Technology*. 23:475–482.
- Kim, S. oriel, P. (2000). Cloning and expressin of nitrlehydratase and amidase genes from *Bacillus sp. BR449. Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 492\_501.
- Klaus, T. Joerger, R. Ossoin, E. Granqvist, Cl. (1999) Silver-based Crystalline Nanoparticles, Microbial Fabricated. *Journal of Applied Physics*;96:(24)13611-13614.
- Kohyama, E, Dohi, M, Yoshimura, A, Yoshida ,T, Nagasawa, T. (2007). Remaining acetamide in acetonitrile degradation using nitrile hydratase- and amidase-producing microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 74:829–835.
- Kobayashi, M. Shimizu, S. (2000) Nitrile hydrolases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 4:95–102.
- Kobayashi, M. Yana, N. Nagasawa, T. Yamada, H. (1999) Purification and Characterization of a Novel Nitrilase of *Rhodococcus rhodochrous K22* That Acts on Aliphatic Nitriles. *Journal of Bacteriology*. 172: 4807-4815.
- La-lei, Zh. ,Jianfu, Zh. GuGuo, Wei. (2003). Biodegradation kinetic organic compound of acrylic fibr wastewater in biofilm. *Journal of Environmental Sciences*. 15:(6).757-761.
- Linton, E.A and Knowles, Ch.J. (1986). Utilization of aliphatic amides and nitriles by *Nocardi arhodochrous LL100-21*. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 132:1493-1501.
- Martinkova, L., Vejvoda, V., Kaplan, O., Kubáč, D., Malandra, A and Pumpel. T. (1999). A rapid screening method for the isolation of metal accumulating microorganism. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 14:213-217.
- Padmakumar, R and Oriol, P. (1999). Bioconversion of Acrylonitrile to Acrylamide Using a Thermostable Nitrile Hydratase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77:671-679.
- Shahverdi, A.R., Minaeian, S. Shahverdi, H.R and Nohi, A. (2007). Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. *Process Biochem*.42: 919–923.
- Sari, M. Jaouen, M. RaoSaroja, N. Artaud, I. (2007). Influence of cobalt substitution on the activity of iron-type nitrile hydratase: Are cobalt type nitrile hydratases regulated by carbon monoxide? *Journal of Inorganic Biochemistry*.101: 614–622.



- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G. Ramachandrarao, P.Dash,D.(2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 18:1-9
- Scorzoni, L. Benaducci, T. Almeida, A.M. Silva, F., Bolzani, D.H.S and Mendes-Giannini, M. J. S. (2007). Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeasts *Candidaspp* and *Cryptococcus* sp. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 28:25-35.
- Singh, R., Sharmac, R., Tewarib, N., Jalid. G and Rawata, D. S. (2006). Nitrilase and Its Application as a \_Green\_ Catalyst. *Chemistry & Biodiversity*. 3:1279-1282.
- Tauber, M., M.Cavaco-Paulo, A., Robra, K.H. and Bitiz, G.GU, M. (2000). Nitrile hydratase and amidase from *Rhodococcus rhodochrous* hydrolyze acrylic fibers and granular polyacrylonitriles. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:1634-1638.
- Wang, Ch., Lee, Ch and Chen, Li-Jung. (2007). Removal of Nitrile from Synthetic Wastewater by Acrylonitrile Utilizing Bacteria *Journal of Environmental Health*. 39: (7).1767-1779.
- Watanabe, I. Satoh, Y. and Nomoto, K. (1987). Screening, Isolation and Taxonomical Properties of Microorganisms Having Acrylonitrile hydrating Activity. *Agricultural and Biological Chemistry*.51: (3)193-3199.
- Zhou, Z. ashimo, YH. Kabayashi, M. (2005). Nitrile degradation by *Rhodococcus*:useful microbial metabolism for industrial products. *Actinomyceological*. 19:18-26.