

**МИКРООРГАНИЗМЛАРНИ ПОЛИЭТИЛЕННИ ПАРЧАЛАШДА ОПТИМАЛ
ЎСИШ ҲАРОРАТИ ТАЪСИРИНИ ҚИЁСИЙ ЎРГАНИШ****¹Назирова Муҳаммад Латиф, ²Халилов Илхом, ³Қобилов Фазлиддин, ⁴Зувайдуллаев
Бахром., ⁵Сафаров Хуснидин**^{1,2,3,4,5}ЎзРФА Микробиология институти, Тошкент, Ўзбекистон<https://doi.org/10.5281/zenodo.8367176>

Аннотация. *Pseudomonas* авлодига мансуб бактерия штаммларининг LPEM2 минерал озиқа муҳитида полиэтиленни биопарчалаганишига турли хил ҳароратларнинг таъсири ўрганилди. Бактериал парчалаш жараёни 35 оС ҳароратда олиб бориши натижасида, УВ-спектрофотометрни 190 ва 340 нм тўлқин узунлигида контролга нисбатан 19,72 марта кўп ПЭ ни парчаланганиши *Pseudomonas putida* штаммида қайд этилди. *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* штаммлари мос равишда контролга нисбатан 10,89; 13,46 ва 12,04 марта кўп културал суюқликка органик бирикмалар ҳосил қилганлиги ўрганилди. Ҳарорат 40°С да олиб борилганда ҳам бошқа штаммларга таққослаганда ПЭ парчаланганиши контролга нисбатан 24,21 марта кўпроқ *P.putida* штаммида кузатилди. Қолган *Pseudomonas* штаммлари - *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* бактерия штаммлари мос равишда контролга нисбатан 14,04; 16,36 ва 13,01 марта кўп органик моддалар ҳосил қилиши билан ПЭ ни деградация қилиши аниқланди. Бактериялар таъсирида 45 оС ҳароратда ПЭ ни парчаланганиши, *P. stutzeri* штаммида контролга нисбатан 17,51 марта кўп органик моддалар ҳосил қилганлиги аниқланди. *P.putida* штаммида 22,25; *P. fluorescens* штаммида 16,6 ва *P. aeruginosa* штаммида эса контролга нисбатан 13,47 марта кўп органик модда ҳосил қилганлиги кузатилди. Тадқиқотлар натижасига асосланиб *Pseudomonas putida* штамми 40°С ҳароратда бошқа штаммларга нисбатан ПЭни биопарчалаши жараёнида кўпроқ органик моддалар ҳосил қилиши аниқланди.

Калим сўзлар: Полиэтилен (ПЭ), бактерия, ҳарорат, УВ-спектрофотометр, биопарчаланганиши, *Pseudomonas*.

Аннотация. Изучено влияние различных температур на биодegradацию полиэтилена бактериальными штаммами рода *Pseudomonas* на минеральной питательной среде LPEM2. В результате бактериальной деградации штаммом *Pseudomonas putida* при 35°С определено, что деградация ПЭ в 19,72 раза больше, чем в контроле при длине волны 190 и 340 нм на УФ-спектрофотометре. Установлено, что в культуральной жидкости штаммы *P. stutzeri*, *P. Fluorescens* и *P. aeruginosa* образовывалось - 10,89, 13,46 и 12,04 раза больше органических соединений по сравнению с контролем. При температуре 40°С по сравнению с другими штаммами деградация ПЭ наблюдалась в 24,21 раза больше у штамма *P. putida* по сравнению с контролем. В остальные бактериальные штаммы *P.stutzeri*, *P.fluorescens* и *P.aeruginosa* при деградации полиэтиленана 14,04, 16,36 и 13,01 раза большего образовали органических веществ по сравнению с контролем. При разложении ПЭ под влиянием бактерий при 45°С штамм *P.stutzeri* продуцировал в 17,51 раза больше органического вещества по сравнению с контролем. Установлено, что по сравнению с контролем штамм *P.putida* - 22,25 раза, штамм *P.fluorescens* в 16,6 раза и штамм *P.aeruginosa* в 13,47 раза больше продуцировал органического вещества в культуральную жидкость. По результатам исследований установлено, что при

биоразложении ПЭ штамм *Pseudomonas putida* продуцирует больше органических веществ, чем другие штаммы при температуре 40°C.

Ключевые слова: Полиэтилен (ПЭ), бактерии, температура, УФ-спектрофотометр, биodeградация, *Pseudomonas*.

Abstract. The effect of different temperatures on polyethylene biodegradation in LPEM2 mineral medium of *Pseudomonas* bacteria strains was studied. As a result of carrying out the bacterial degradation process at a temperature of 35 oC, the UV-spectrophotometer at 190 and 340 nm wavelengths showed that *Pseudomonas putida* strain decomposed 19.72 times more PE than the control. It was studied that *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, and *P. aeruginosa* strains produced 10.89, 13.46, and 12.04 times more organic compounds in the culture liquid compared to the control, respectively. Even though the experiment was conducted at 40oC, *P putida* strain showed more PE degradation compared to other strains and controls. The remaining *Pseudomonas* strains - *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, and *P. aeruginosa* bacterial strains were found to degrade PE by producing 14.04, 16.36, and 13.01 times more organic matter than the control, respectively. Degradation of PE by bacteria at 45 oC was found in *P. stutzeri* strain to produce 17.51 times more organic substances compared to the control. It was observed that *P. putida* strain produced 22.25, *P. fluorescens* 16.6 and *P. aeruginosa* 13.47 times more organic matter compared to the control. Based on the results of the research, it was found that *Pseudomonas putida* strain produces more organic matter during PE biodegradation than other strains at 40 oC.

Keywords: Polyethylene (PE), bacteria, temperature, UF-spectrophotometer, biodegradation, *Pseudomonas*.

Ҳозирги кунда дунё миқёсида ҳар йили 140 миллион тоннадан ортиқ синтетик полимерлар ишлаб чиқарилади. Полиэтиленнинг чекланган табиий парчаланиши унинг сув ва тупроқдаги микдорининг кун сайин ортиб боришига бу эса атроф-муҳитни ифлосланиши олиб келади [1]. Полиэтиленлар кимёвий, термал, фотооксидланиш ва биodeградация механизмлари билан парчаланиши мумкин. Бу эса полимернинг молекуляр оғирлигига боғлиқ бўлган ҳолда узок вақт талаб қилади. Полимерларнинг баъзи турлари парчаланиши учун 1000 йилгача вақт талаб қилади [2]. Энг кўп термопластик полиэтилен ишлатилади. Жуда кўп такрорланадиган этилен мономерлари занжиридан иборат бўлиб, улар турли шаклларда учрайди, жумладан HDPE (Юқори зичликли Полиэтилен), LDPE (паст зичликдаги Полиэтилен) ва LLDPE (чизиқли паст зичликли Полиэтилен). Улар жуда гидрофоб бирикмалар бўлиб, улар кимёвий реакцияга киришмайди ва микроблар томонидан тўлиқ парчаланишга қодир эмас [3]. Бу биodeградация жараёнининг рекалситант табиати билан боғлиқ. Полиэтиленни бузишга қодир бўлган баъзи микроблар ҳозиргача тупроқ, дэнгиз суви, компост ва фаол лойдан ажратилган [4].

Ҳозирги вақтда ферментатив биodeградация энг кэнг тарқалган парчалаш усули бўлиб пластик чиқиндилар микроорганизмлар фаолияти натижасида оксидланади [5]. Умуман олганда, полиэтиленлар аэроб микроорганизмлар орқали парчаланганда карбонат ангидрид ва сув гача, анаэроб микроорганизмлар фаолияти натижасида эса карбонат ангидрид, сув ва метан ҳосил қилади [6]. Ушбу усуллардан фойдаланиш атроф-муҳитга зарар етказмасдан парчалаш имконини беради [7]. LDPE ни парчалашда *Bacillus megateium*, *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter*, *Ralstonia*, *Halomonas sp.*, бактериялардан фойдаланган [8]. Бундан ташқари, полиэтиленнинг биodeградация жараёнига таъсир қилувчи ферментлар

Brevibacillus sp. va *Bacillus sp.* авлодларига мансуб микроорганизмларда аниқланган [9]. Ушбу жараёнга ҳарорат, рН, тадқиқот вақти, бактерияларнинг тури ва сони, озуқа модаларининг мавжудлиги, қўшимча моддалар ва шўрланиш каби омиллар таъсир қилиши аниқланган [10]. *Thiobacillus sp.* va *Clostridium sp.* бактериялари LDPE ни парчалаш жараёнига рН ва ҳароратнинг таъсири ўрганилган. Бунда оғирликдаги фарқ ва инфрақизил спектроскопиясида (ФТИР) функционал гуруҳлардаги ўзгаришлар аниқланганда, LDPE нинг энг юқори парчаланиши рН 7 ва 30 °С да содир бўлиб, 30 кун давомида 2-7% гача парчалангани аниқланган [11]. Учта полиэтилен PCL (Polycaprolactone), PNB (Polyhydroxybutyrate) ва PNBV (Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) биологик парчаланиши ўрганилганда 24 °С ҳароратдагига нисбатан 46 °С да парчаланиши тезроқ кечиши аниқланган [12]. Аэроб шароитда тупроққа қўмиш орқали PNBV нинг парчаланиши 52 °С га қараганда 30 °С да тезроқ парчаланиши қайд этилган [13].

Ушбу тадқиқотнинг мақсади *Pseudomonas* авлодига мансуб 4 та бактерия штаммлари фаолияти натижасида LDPE нинг парчаланишига энг муҳим абиотик омиллардан бири бўлган ҳароратнинг тасирини ўрганишдан иборат.

Тажрибада *Pseudomonas putida*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens* ва *P. aeruginosa* бактерия штаммлари қўлланилди.

Тажриба учун қуйи зичликли ПЭ тури (LDPE) ишлатилди. ПЭ плёнкаси агарли чашкаларда инкубация қилиш учун оғирлиги ўлчанди. ПЭ 75% этанолда стерилизация қилинди ва кейин ламинар боксдаги ҳаво оқими билан қуритилди. Бактериялар кўпроқ биомасса олиш учун олдин озика элементларига бой бўлган суюқ LB Broth (Miller) озика муҳитида 3 кун давомида ўстирилди. Сўнг пробиркаларга ПЭ парчаси солинган модификацияланган LPEM2 (ASTM G22-76, 1996) озика муҳитида ўстирилди [14].

Модификацияланган LPEM2 озика муҳити қуйидагича тайёрланади: 900 мл дистилланган сувга NH_4NO_3 -1,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,7 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1,0 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,7 г; микроэлемент-1мл; (100 мл микроэлемент тайёрлаш учун NaCl -0,5 г; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,2 г; Fe EDDHA-0,2 г; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ -0,2 г; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -0,1 г.) қўшилади.

Фосфат буфери учун 100 мл дистилланган сувга KH_2PO_4 -0,7 г; K_2HPO_4 -0,7 г қўшилади; рН-6,5. Назорат сифати LPEM озика муҳитига фақат ПЭ ни қўшилди.

Озика муҳитлари 20 дақиқа 121 ° С да автоклав қилинди. Озика муҳитлари совигандан сўнг 900 мл LPEM2 га 100 мл фосфат буфери қўшилди.

Бактерия штаммлари модификацияланган LPEM2 озикасига экилиб, 1 ой давомида 30 °С ҳароратда тебратгичда ўстирилди. Сўнгра културал суюқлик ПЭ дан ажратилиб спектроскопия қилинди [15].

УБ-спектрлари Specord 210 UV-Vis (Analytik Jena, Германия) спектрофотометрида диаметри 1 см ли кварцли кюветларда қайд этилди. Сканерлаш соҳаси 190-800 нм, тирқиши 1 нм, тезлиги 5 нм/с.

ПЭ ни парчалашда абиотик омиллардан бири ҳарорат ҳам асосий омиллардан бири ҳисобланади. Шу мақсадда юқорида келтирилган *Pseudomonas* авлодига мансуб 4 та бактерия штаммларини 35°C, 40°C ва 45°C ўстириб, ПЭ ни парчаланишига таъсири ўрганилди. Контрол сифатида LPEM2 озика муҳитига ПЭ солиниб 30 кун инкубация қилингандан кейин ҳосил бўлган органик бирикмаларни УБ спектроскопияда чиққан намуналарни 1 деб олинди.

1-жадвал.

Pseudomonas авлодига мансуб бактерия штамлари таъсирида олинган ютилиш чизиқларининг деконволюция натижалари

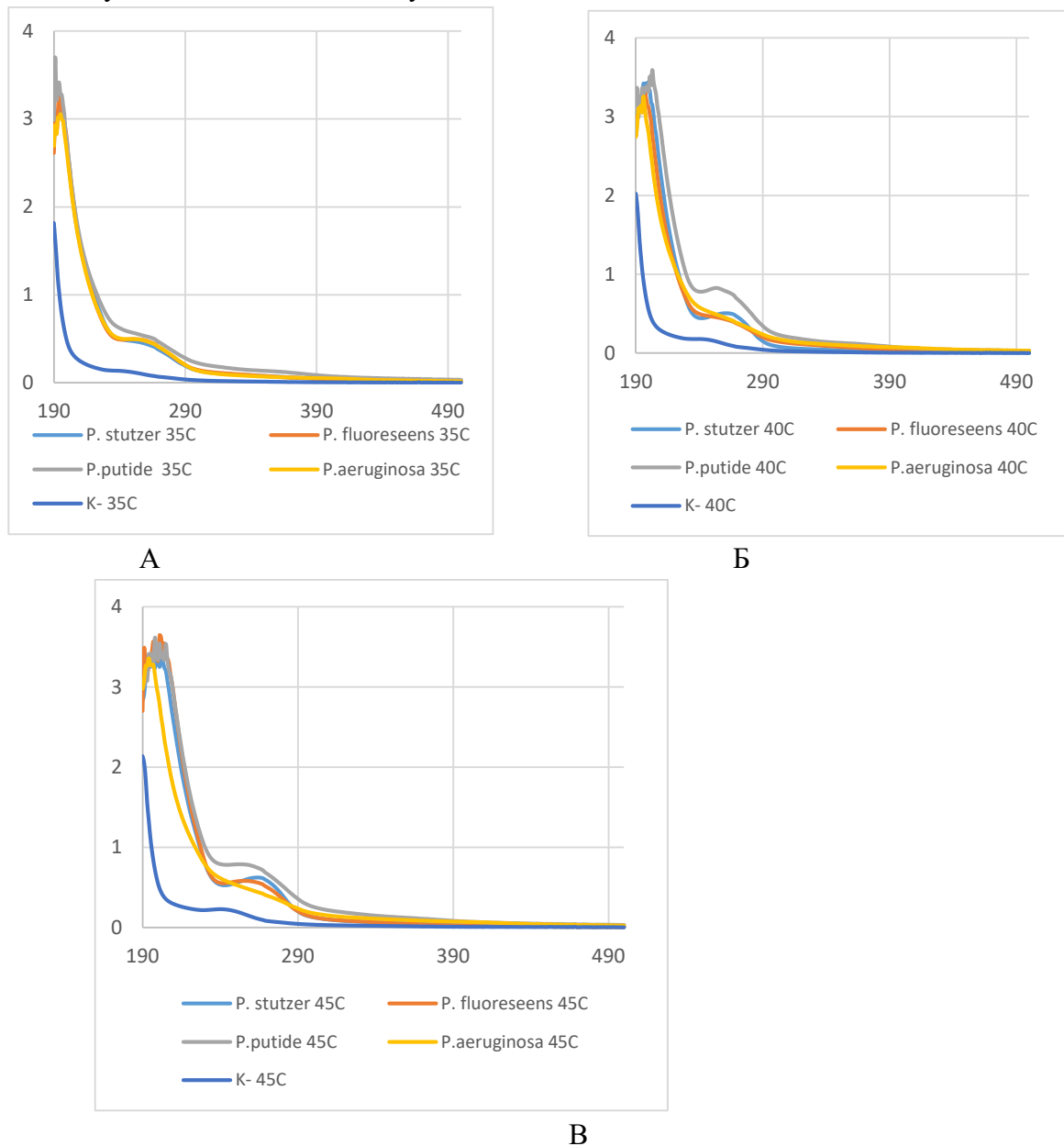
Турли ҳароратда ПЭ билан ўстирилган бактерия штамлари	Ютилиш чизиғи, λ, нм				
	Нисбат	190-200	210-214	246-264	340
Ҳарорат 35°C					
<i>P. stutzeri</i>	10,89	7,06	2,94	0,75	0,14
<i>P. fluorescens</i>	13,46	9,13	3,52	0,69	0,12
<i>P. putida</i>	19,72	12,79	4,43	2,19	0,31
<i>P. aeruginosa</i>	12,04	2,47	0,71	0,55	0,31
Назорат	1,00	0,48	0,17	0,36	0,00
Ҳарорат 40°C					
<i>P. stutzeri</i>	14,04	9,93	3,44	0,62	0,05
<i>P. fluorescens</i>	16,36	11,55	3,96	0,54	0,31
<i>P. putida</i>	24,21	13,29	7,45	3,28	0,19
<i>P. aeruginosa</i>	13,01	7,29	4,73	0,68	0,31
Назорат	1,00	0,52	0,20	0,29	0,00
Ҳарорат 45°C					
<i>P. stutzeri</i>	17,51	9,52	3,92	3,68	0,39
<i>P. fluorescens</i>	16,6	11,52	2,90	1,79	0,39
<i>P. putida</i>	22,25	12,41	7,25	1,12	0,47
<i>P. aeruginosa</i>	13,47	8,43	3,90	0,90	0,24
Назорат	1,00	0,53	0,21	0,26	0,00

1-жадвал натижалари шуни кўрсатдики, барча *Pseudomonas* штамлари учун 40°C оптимал ҳисобланди. Қўлланилган штамлар орасида *P. putida* ва *P. fluorescens* штамлари контролланган нисбатан мос равишда 24,21 ва 16,36 марта озиқа муҳитига органик бирикмалар ҳосил қилганлиги аниқланди (1-жадвал). Айниқса, УБ спектрнинг 190-200 нм (карбонил гуруҳлар) ва 240-300 нм (алдегид гуруҳларни) орасида ютилиш чизиғида намоён бўлмоқда. Бу эса озиқа муҳити таркибида карбонил гуруҳлар ва алдегидлар ҳосил бўлганлигидан далолат беради.

45° С ҳарорат таъсирида 40°C нисбатан камроқ миқдорда органик бирикмалар ҳосил бўлганлигини кузатиш мумкин. Бунда, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. putida* ва *P. aeruginosa* мос равишда назоратга нисбатан 17,51 16,6 22,25 ва 13,47 марта кўп карбоксил ва алдегидлар кўринишида органик бирикмалар ҳосил қилганлиги қайд этилди (1-расм). Айтиш муҳимки, 35°C ҳароратда ўстирилган *Pseudomonas* штамлари 40°C ва 45°C ҳароратга нисбатан камроқ даражада органик бирикмалар ҳосил қилганлиги кузатилди. 35°C ҳароратда *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *P. putida* ва *P. aeruginosa* бактерия штамлари мос равишда контролланган нисбатан 10,89; 13,46; 19,72 ва 12,04 марта кўп органик бирикмалар озиқа муҳитида ҳосил қилганлиги тадқиқ этилди.

Шундай қилиб, *Pseudomonas* авлодига мансуб штамларнинг юкори ҳароратда ПЭ парчалашда фаоллашуви аниқланди. Тадқиқ этилган 4 та штамлар орасида *P. putida* ўрганилган барча ҳароратда ПЭ ни парчалашда энг фаол эканлиги аниқланди. Бу ҳолатни

айниқса 40°C ҳароратда ПЭ парчаланishiдан ҳосил бўлган карбоксил ва алдегидларни ҳосил бўлиши билан изоҳлаш мумкин.



1-расм. *Pseudomonas* авлодига мансуб бактериялар штаммлари таъсирида ПЭни парчаланishiдан ҳосил бўлган органик бирикмалар таркибини УБ спектри. А-35°C ҳарорат таъсирида, Б- 40°C ҳарорат таъсирида, В- 45°C ҳарорат таъсирида.

Лекин, ўрганилган ҳароратлардаги 4 та *Pseudomonas* авлодига мансуб штаммларни ПЭ парчалашдан олинган натижалар умумлаштириладиган бўлса, контролга нисбатан 35°C да - 57,11 марта, 40°C ҳароратда 68,62 марта ва 45°C ҳароратда эса 70,83 марта кўп органик бирикмалар ҳосил қилганлиги аниқланди. Бу шуни билдирадики, *Pseudomonas* авлодига мансуб бактерия штаммлари юқори ҳароратга чидамли эканлиги ва ўрганилган ҳароратлар орасида 45°C да ПЭ ни кўпроқ парчалаши қайд этилди.

REFERENCES

1. Joshi P. A., Jaysawal S. R. Isolation and characterization of poly- β hydroxyalkanoate producing bacteria from sewage sample// *J. of Cell and Tissue Research*. (2010).10. P.2165-2168.
2. Pramila R., Ramesh K. V. Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by fungi isolated from municipal landfill area// *J. Microbiol Biotechnol*. (2011). 1. P. 131-136.
3. Kavitha R., Mohanan A. K., Bhuvanewari V. Biodegradation of low density polyethylene by bacteria isolated from oil contaminated soil// *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. (2014). 4(3), P.601- 610.
4. Yoon M. G., Jeon H. J. and Kim M. N. Biodegradation of Polyethylene by a Soil Bacterium and AlkB Cloned Recombinant Cell// *J. Bioremed Biodegrad*. (2012). 3(4) P.1-8.
5. Kaseem M., Hamad K., and Deri F. Thermoplastic starch blends: A review of recent works// *Polymer Science Series A*. (2012). 54.P.165-176.
6. Alshehrei F. Biodegradation of Synthetic and Natural Plastics by Microorganisms//*J. of Applied & Environmental Microbiology*. (2017).5(1) P.8-19.
7. Asmita K., Tanwar S., Shanbhag T. Isolation of Plastic Degrading Micro-organisms from Soil Samples Collected at Various Locations in Mumbai, India *International Research// J. of Environment Sciences*. (2015). 4(3). P. 77 – 85.
8. Chee J. Y., Yoga S. S., Lau N. S., Ling S. C., Abed R. M. M., Sudesh K. L. Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources into Bioplastics *Appl Microbiol & Microbiol Biotech*, a Mendez Vilas (Ed)// *Current research, technology and education topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. (2010). 2. P.1395-1404.
9. Sivan A. New Perspectives in Plastics Biodegradation// *Curr. Open Biotechnol*. (2011). 22. P. 422-426.
10. Sihag S. Factors Affecting the Rate of Biodegradation of Polyaromatic Hydrocarbons// *International Journal of Pure & Applied Bioscience*. (2014). 2(4) 185-202.
11. Islami A. N., Tazkiaturrizki T. A Rinanti The effect of pH-temperature on plastic allowance for LowDensity Polyethylene (LDPE) by *Thiobacillus sp.* and *Clostridium sp.*//*J. Phys.: Conf*. (2019). Ser. 1402 033003.
12. Lotto N.T., Calil M.R., Guedes C.G.F., Rosa D.S., The effect of temperature on the biodegradation test// *Mater. Sci. Eng. C 24* (2004) P.659-662. <https://doi.org/10.1016/j.msec>.
13. Nishide H., Toyota K., Kimura M. Effects of soil temperature and anaerobiosis
14. on degradation of biodegradable plastics in soil and their degrading microorganisms// *Soil Sci. Plant Nutr*. 1999). 45 (4). (963e972, <https://doi.org/10.1080/00380768.1999.10414346>).
15. Talkad M. S., Maria S., Raj A. and Javed A. Microbial Degradation of Plastic (LDPE) & domestic waste by induced mutations in *Pseudomonas putida* *International//Journal of Ethics in Engineering & Management Education* (2014). 1(5). P. 2348-4748.
16. Mahdiyah D., Mukti B. H. Isolation of Polyethylene Plastic Degrading-Bacteria *Biosci. Inter*. (2013). 2(3) P. 29-32.