یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۲۰ الی ۲۹ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Nova Biologica Reperta 6(1): 20-29 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

بررسی تجزیه‌زیستی پلیمر ایمپرانیل توسط قارچ ساروکلادیوم کیلینس

نشاط صفارزاده و حمید مقیمی
بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی ، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: حمید مقیمی، hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده. ایمپرانیل DLN، دسته‌ای از پلاستیک‌ها از خانواده پلی‌یورتان‌ها است که به‌عنوان پوشش در صنعت استفاده می‌شود. هدف از پژوهش، بررسی قابلیت مخمر جداشده در تولید آنزیم و تجزیه ایمپرانیل است. در این مطالعه، ایزوله‌های مخمری از نمونه‌های خاک جنگل و پساب صنایع روغن‌کشی جدا شدند که قابلیت رشد در محیط پایه نمکی حاوی ۱٪ ایمپرانیل DLN به عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط را دارا بودند. ایزوله مخمری NS-10 به عنوان جدایه توانمند در تجزیه ایمپرانیل انتخاب، و توسط PCR و پرایمرهای ITS1 و ITS4 ژن ITS تعیین توالی و شناسایی شد. قابلیت تولید آنزیم‌های استراز، اوره‌آز و پروتئاز توسط جدایه به صورت کیفی بررسی شد. سپس تجزیه ایمپرانیل و میزان حذف سنجش شد. در این مطالعه، ۴۰ جدایه مخمری جداسازی شد که براساس قابلیت رشد در محیط حاوی ایمپرانیل، فعالیت آنزیمی و میزان مصرف و حذف ایمپرانیل، جدایه NS-10 به‌عنوان سوش برتر انتخاب شد. تعیین توالی ژن ITS مشخص کرد که این جدایه ۱۰۰ درصد مشابه با *Sarocladium kiliense* است. این سوش توانایی تولید هر ۳ آنزیم خارج سلولی شامل استراز، اوره‌آز و پروتئاز را داشت. *S. kiliense* توانست طی۱۴ روز، ۱۰ گرم در لیتر ایمپرانیل را ۱۰۰٪ حذف و در پلیت حاوی ایمپرانیل هاله ایجاد کند. در نهایت، توانمندی سوش برتر در تجزیه صفحات پلی‌یورتان از طریق تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره(SEM) بررسی شد. نتایج حاصل از پژوهش نشان می‌دهد که سوش *S. kiliense* توانایی تجزیه کامل ایمپرانیل را دارد. این پژوهش می‌تواند در معرفی سوش‌های مخمری توانمند در تجزیه پلاستیک‌ها و همچنین درک مکانیسم تجزیه‌زیستی این ترکیبات کمک‌کننده باشد.

واژه‌های کلیدی. پاکسازی زیستی، پلاستیک، پلی یورتان، فعالیت آنزیمی، میکروسکوپ الکترونی نگاره

The study of impranil (DLN) polymer biodegradation by fungus *Sarocladium kiliense*

Neshat Saffarzadeh & Hamid Moghimi
Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
Correspondent author: Hamid Moghimi, hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract. Impranil DLN is a class of plastics belonging to the polyurethane family with high application in textile industries. The aim of this study was to evaluate the potential of native strain to degrade impranil DLN. In this study, yeast strains were isolated from different areas and purified in minimal medium containing 1% impranil. Isolate NS-10 was selected as the superior strain capable of degrading impranil and identified through PCR and ITS gene. Esterase, urease and protease assays were carried out for the superior strain. Finally, the biodegradation of impranil was investigated. In total, 40 yeast strains were isolated and isolate NS-10 was selected as a superior strain based on impranil removal assay. NS-10 strain was identified as *Sarocladium kiliense* with 100% homology. Enzymatic assays showed that the *S. kiliense* could produce esterase, urease and protease. In addition, it could produce significant clear zones on impranil plates. Degradation rate for impranil was 100% for 10 g/l within 14 days. Finally, *S. kiliense* was taken to medium containing pure polyurethane film and the capacity of degradation was investigated by the scanning electron microscopy. Our results indicated that *S.kiliense* is capable of degrading impranil. These results could contribute to a better insight into the mechanism of plastic biodegradation.

Keywords. bioremediation, enzymatic activity, plastic, polyurethane, scanning electron microscopy

Received 17.07.2017/ Revised 30.08.2018/ Accepted 03.09.2018/ Published 01.05.2019 دریافت ۱۳۹۶/۰۴/۲۶/ اصلاح ۱۳۹۷/۰۶/۰۸/ پذیرش ۱۳۹۷/۰۶/۱۲/ انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

مقدمه

پلاستیک‌ها ترکیبات پلیمری بلندزنجیری هستند که ساخته دست بشر هستند. بیش از نیم قرن پیش، جایگزینی پلیمرهای مصنوعی به جای مواد طبیعی آغاز شده و امروزه پلاستیک بخش ضروری از زندگی انسان‌ها است. با گذشت زمان، پایداری و دوام پلاستیک درحال بهبود بوده و از این رو، درحال حاضر، این گروه از مواد به عنوان مواد مقاوم به بسیاری از تاثیرات زیست‌محیطی در نظر گرفته می‌شوند (Scot, 1990). در این بین، پلی‌یورتان‌ها به علت انطباق-پذیری بالایی که در میان پلیمرها دارا هستند، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده‌اند و به صورت تجاری در شکل‌های مختلف به صورت گسترده در پزشکی، اتومبیل‌سازی و صنایع گوناگون مورد استفاده قرار می‌گیرند (Cangemi *et al.*, 2008). بیش‌ترین شکل مورد مصرف آن‌ها به صورت فوم بوده و به عنوان ششمین نوع پرمصرف پلاستیک شناخته شده‌اند و بیش از ٪۷-۶ از تولید کل پلاستیک در دنیا را به خود اختصاص داده‌اند (Mahajan & Gupta, 2015).

پلی‌یورتان اولین بار توسط اتو بایر در سال ۱۹۳۷ تولید شد و به-تدریج و با گذشت زمان در صنعت مورد استفاده قرارگرفت و تولید آن گسترش یافت تا جایی‌که امروزه نقش مهمی را در زندگی مدرن ایفا می‌کند. مواد خامی که به منظور تولید این نوع پلاستیک مورد استفاده قرارمی‌گیرند شامل دی‌ایزوسیانات‌ها، پلی-ال‌ها و توسعه‌دهنده‌های زنجیره هستند (Vega *et al.*, 1999). پلی‌یورتان‌ها عمدتاً در مبلمان‌سازی، ساخت وساز، لوازم خانگی و الکترونیک، اتومبیل‌سازی، کفش و بسته‌بندی مورد استفاده قرار-می‌گیرند. همچنین این ترکیب درحال جایگزینی با پلیمرهای قدیمی‌تر است که از علت‌های اصلی آن می‌توان چگالی کم، انعطاف‌پذیری بالا، استحکام‌کششی و نقطه‌ذوب بالا را نام برد که باعث دوام بالای این ترکیب شده‌است (Mahajan & Gupta, 2015). مقاومت آن‌ها به تجزیه توسط آب، روغن‌ها و حلال‌ها نیز یکی دیگر از دلایل جایگزینی آن‌هاست. پلی‌یورتان‌ها براساس ماده اولیه‌ای که مورد استفاده قرارمی‌گیرد و حمله زیستی که به آن‌ها می‌شود، به دو دسته پلی‌استری و پلی‌اتری تقسیم می‌شوند (Peng *et al.*, 2014). ایمپرانیل‌ها، پلی‌یورتان‌هایی هستند که قابلیت حل شدن در آب را دارا بوده و در بسیاری از صنایع به ویژه صنایع پوششی به عنوان ماده اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرند (Khan *et al.*, 2017). تجمع پلاستیک‌ها در طبیعت امرزوه به عنوان یک معضل بزرگ زیست‌محیطی مطرح شده و راهکارهای مختلفی برای آن ارائه شده‌است. استفاده از توانمندی میکروارگانیسم‌ها در تجزیه ترکیبات پلیمری سخت تجزیه‌پذیر از جمله راهکارهایی است که امروزه مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته است (Biffinger *et al.*, 2015; Khan *et al.*, 2017)؛ لذا در این زمینه مطالعات مختلفی توسط دانشمندان انجام شده است. بیشترین رویکرد و توجه به استفاده از باکتری های تجزیه کننده بوده و کمتر مطالعه ای روی قارچ ها انجام شده است. Russel و همکاران (2011) نشان دادند که قارچ اندوفیت *Pestalotiopsis microspora* که از جنگل‌های آمازون جداسازی شده بود، قادر به تجزیه پلی‌یورتان در محیط‌های مایع و جامد و همچنین در شرایط هوازی و بی‌هوازی بوده ولی با توجه به شرایطی که فراهم شد، محیط هوازی بهترین گزینه برای تجزیه این ترکیب پلی‌استری پلی‌یورتان بود. Howard و همکاران (2012) با جداسازی و شناسایی جدایه باکتریایی به نام *Acinetobacter gerneri* از خاک و بررسی توانایی تجزیه‌ی پلی‌یورتان نتیجه گرفتند که این جدایه، آنزیمی به نام پلی‌یورتاناز تولید کرده که باعث تجزیه‌زیستی این ترکیب پلاستیکی می‌شود. Shah و همکاران (2013) با جداسازی باکتری تجزیه‌کننده‌ای از خاک به نام *Pseudomonas aeruginosa* سوش MZA-85 مشاهده کردند که تغییراتی روی صفحات پلی‌یورتان حاصل شده و در نهایت باعث کاهش گروه‌های عاملی استری شده‌است که با فعالیت میکربی زنجیره پلی‌مری پلی‌یورتان کوتاه‌تر شده‌است. در نهایت با آنالیزهایی که انجام شد، مشخص شد که عامل اصلی دخیل در این تجزیه، تولید آنزیم استرازی است که این باکتری تولید می‌کند. در تحقیق Peng و همکاران (2014) جدایه‌های باکتریایی تازه‌ای از خاک زمین‌های کشاورزی و لجن‌فعال بدست آمد که قابلیت تجزیه پلی‌یورتان را دارا بودند. پس از شناسایی در نهایت ۳ جدایه حاصل شد که مهم‌ترین آن‌ها *Pseudomonas putida* بود که قابلیت تجزیه ایمپرانیل را به میزان ٪۹۲ پس از گذشت ۴ روز دارا بود. Biffinger و همکاران (2015) از ترکیب خاصی از پلی‌یورتان به نام ایمپرانیل به منظور تجزیه استفاده نمودند. در این آزمایش از آنزیم‌هایی که از جدایه‌های مختلفی جدا شده بود، استفاده کرده و در نهایت به این نتیجه رسیدند که آنزیم لیپاز نقش مهمی در تجزیه‌ی این ترکیب دارا است. بر این اساس هدف از

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

انجام این مطالعه، بررسی حذف زیستی ایمپرانیلDLN توسط مخمرهای بومی ایران و همچنین بررسی مراحل تجزیه و آنزیم‌های دخیل در این فرایند بوده‌است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

به‌منظور جداسازی جدایه‌های مخمری توانمند جهت حذف ایمپرانیل به عنوان پلیمری پلاستیکی، ۷ نمونه خاک و پساب از ۴ منطقه‌ی متفاوت شامل جنگل‌های سراوان، کوهستان لاهیجان، بام سبز لاهیجان و صنایع روغن‌کشی لادن، با توجه به استانداردهای معمول جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و تا انجام آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به منظور جمع‌آوری نمونه‌های خاک از قاشقک و کیسه‌های زیپ‌دار سترون، و منظور جمع‌آوری نمونه‌های پساب از بطری‌های شیشه‌ای سترون استفاده شد که بر روی آن‌ها تاریخ و محل نمونه برداری مشخص شد. در ادامه، نمونه‌های خاک با کمک الک ۰/۵ میلی‌متری همگن شده و ذرات درشت آن جداسازی شد.

جداسازی مخمرهای مصرف‌کننده ایمپرانیل DLN

به‌منظور جداسازی مخمرهای تجزیه‌کننده ایمپرانیل از نمونه‌های خاک و پساب، در مرحله اول ۱ گرم از خاک یا ۱ میلی‌لیتر از پساب داخل ۱۰ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون شده و پس از هم‌زدن و همگن شدن، ۱ میلی‌لیتر از آن داخل ۹ میلی‌لیتر محلول سرم فیزیولوژی دیگر، مخلوط و رقت‌سازی تا 10^{-4} انجام شد و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های 10^{-3} و 10^{-4} با ۳ تکرار بر روی پلیت حاوی محیط‌کشت کمپلکس رزبنگال-آگار شامل(گرم در لیتر): پودر محیط‌کشت رزبنگال (۳۱)، عصاره‌مخمر (۱۰)، رنگ رزبنگال (۰/۰۵) و آگار (۱۷) به صورت کشت گسترده برده و داخل انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. همچنین به منظور جلوگیری از رشد باکتری‌ها از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به میزان ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. در ادامه جدایه‌های رشدیافته، بر روی پلیت حاوی محیط‌کشت GPY شامل (گرم در لیتر): گلوکز (۲۰)، عصاره مخمر (۱۰)، پپتون (۵) و آگار (۱۷) کشت داده شدند تا خالص‌سازی و بررسی مرفولوژی ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها انجام شود(۷). درنهایت بر روی محیط‌کشت پایه نمکی M9 شامل (گرم در لیتر): Na_2HPO_4 (۳/۳۹)، KH_2PO_4 (۳)، NH_4Cl (۱) و NaCl (۲/۵) برده شده و توانایی رشد آن‌ها در حضور ۱٪ ایمپرانیل DLN به عنوان تنها منبع کربن بررسی شد (Biffinger *et al.*, 2015; Mukherjee *et al.*, 2011). تمام مواد و ترکیبات محیط‌کشت از شرکت مرک و ایمپرانیل DLN از شرکت بایر تهیه شد. برای هر یک از نمونه‌ها، تمامی مراحل با ۳ تکرار انجام شد.

بررسی فعالیت آنزیمی جدایه‌های بدست آمده

پس از رشد سوش‌ها، پلیت‌های تری‌بوتیرین آگار، اسکیم-میلک آگار و اسلنت اوره‌آگار با توجه به روش زیر تهیه شد تا به ترتیب فعالیت استرازی، پروتئازی و اوره‌آزی جدایه‌ها بررسی شود (Howard *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2013). به منظور بررسی فعالیت استرازی از محیط‌کشت تری‌بوتیرین آگار(TBA) استفاده شد. بدین منظور تری‌بوتیرین آگار بیس و توئین داخل آب مقطر حل و به حجم رسانده و روی حرارت قرار داده شد تا کاملاً حل شود و درنهایت تری‌بوتیرین افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شد. جهت بررسی فعالیت پروتئازی پلیت اسکیم‌میلک آگار شامل (گرم در لیتر): پودر اسکیم‌میلک (۸) و آگار (۱۷) تهیه و در دمای ۱۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه استریل شد (Jones *et al.*, 2007). در نهایت اسلنت اوره آگار شامل (گرم در لیتر): پپتون (۱)، سدیم کلرید(۵)، پتاسیم‌دی‌هیدروژن فسفات (۲)، فنل‌رد (۰/۰۱۲)، گلوکز(۱)، اوره (۲۰٪) و آگار (۱۷) تهیه و همانند قبل اتوکلاو شد. اوره به علت حساس بودن به دمای بالا و تجزیه و غیرفعال شدن آن، فیلتر و پس از اتوکلاو و خنک شدن محیط افزوده شد. بررسی کیفی آنزیم‌های استراز و پروتئاز براساس هاله ایجاد شده در اثر فعالیت جدایه‌ها بود. فعالیت اوره‌آزی براساس تغییر رنگ محیط‌کشت از زرد به ارغوانی سنجیده شد. هرچه شدت رنگ تولیدی بیش‌تر باشد، نشان‌دهنده فعالیت اوره‌آزی بیش‌تر جدایه است. در نهایت، جدایه‌ها براساس فعالیت آنزیمی و توانایی رشد و بر اساس شدت تغییر رنگ یا هاله ایجاد شده تقسیم بندی شدند.

شناسایی جدایه منتخب

جهت بررسی جدایه قارچی منتخب، ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی آن از قبیل آرایش و رنگ کلنی و پیگمان‌های

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

تولیدی آن از طریق کشت بر روی پلیت و رنگ‌آمیزی ساده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا داخل محیط GPY مایع به مدت ۴۸ ساعت با دور ۱۲۰rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس جدایه رشد یافته توسط سانتریفوژ از محیط‌کشت جدا و با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد. در ادامه زیست‌توده قارچی به کمک ازت مایع، منجمد شده و تحت کوبیدن قرار گرفت تا شکستن فیزیکی سلول‌ها انجام شود و DNA آن به کمک کیت شرکت Gene All استخراج و جداسازی شد. در مرحله بعد، PCR آن توسط پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1: 5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′ و ITS4: 5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) انجام شد. محصول حاصل، پس از بررسی روی ژل، جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. درنهایت، نتایج بدست آمده در بانک ژنی تعیین ترادف و مورد ارزیابی قرار گرفت (White *et al.*, 1990).

بررسی کیفی فعالیت تجزیه ایمپرانیل توسط جدایه‌های منتخب

پس از بررسی فعالیت آنزیمی جدایه‌های منتخب برای ۳ آنزیم متفاوت استراز، پروتئاز و اوره‌آز، این بار فعالیت پلاستیک خواری جدایه‌ها بر روی پلیت حاوی محیط‌کشت M9 و ۱٪ ایمپرانیل DLN به عنوان تنها منبع کربن، مورد بررسی قرار گرفت و جدایه‌هایی که خاصیت تجزیه را نداشتند، حذف شدند (Peng *et al.*, 2014; Osman *et al.*, 2017).

بررسی کمی فعالیت تجزیه ایمپرانیل توسط جدایه‌های منتخب

به‌منظور بررسی کمی تجزیه ایمپرانیل از محیط پایه نمکی M9 شامل (گرم در لیتر): Na_2HPO_4 (۳/۳۹)، KH_2PO_4 (۳)، NH_4Cl (۱) و NaCl (۲/۵) همراه با ایمپرانیل ۱٪ به عنوان تنها منبع کربن تهیه شد. محیط‌کشت بعد از استریل‌شدن با ۵ درصد از جدایه منتخب تلقیح شد و به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر با دور ۱۲۰ rpm گرماگذاری شد. در طی این مدت، هر ۴۸ ساعت ۲ میلی‌لیتر از محیط برداشته و بر روی پلیت GPY به منظور شمارش کلنی‌ها، کشت داده شد و نیز به منظور بررسی غلظت ایمپرانیل موجود در دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب آن خوانده شد (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016؛ Biffinger *et al.*, 2015). منحنی استاندارد غلظت ایمپرانیل از طریق تهیه رقت‌های ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ و خوانش جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر بدست آمد. به منظور رسم منحنی استاندارد، میزان متفاوتی از ایمپرانیل در محیط‌کشت سوسپانسیون شد تا غلظت‌های مورد نظر تهیه شود. شمارش کلنی به روش شمارش کلنی‌های زنده و با استفاده از پلیت محیط‌کشت GPY انجام شد. بدین صورت که هر ۴۸ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از ارلن حاوی سوش منتخب برداشته شده و روی پلیت GPY توسط میله شیشه‌ای سرکج پخش شد. سپس در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرماگذاری شد تا به خوبی رشد کند. درنهایت، کلنی‌های حاصل شمارش شد. نتایج ارائه شده حاصل از بررسی تعداد مخمر و همچنین تجزیه ایمپرانیل حاصل از سه بار تکرار مختلف است (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016).

کشت سوش منتخب در محیط کشت حاوی صفحات پلی‌یورتان

برای کشت سوش منتخب در محیط‌کشت حاوی پلی‌یورتان به عنوان تنها منبع کربن، ابتدا صفحات پلی‌یورتان با اندازه معین تهیه شد. بدین منظور ۰/۲۵ گرم پلی‌یورتان به ۲۵ میلی‌لیتر حلال تتراهیدروفوران (THF) افزوده شد و از مگنت و همزن مغناطیسی جهت حل شدن کامل پلی‌یورتان استفاده شد. پس از حل شدن کامل در حلال، محلول حاصل داخل ۴ پلیت شیشه ای به یک اندازه ریخته شد و زمان داده شد تا کاملاً خشک و حلال آن‌ها تبخیر شود. سپس به کمک اسکالپل و پنس استریل به صورت صفحاتی ۲×۲ سانتی‌متری برش داده شد (Shah *et al.*, 2013; Osman *et al.*, 2017; Zafar *et al.*, 2014). در مرحله بعد، ۲۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع M9 در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده و پس از سرد شدن، صفحه ی ۲×۲ سانتی‌متری پلی‌یورتان به آن افزوده شد و با ٪۵ از جدایه منتخب تلقیح شد. درنهایت، محیط‌کشت تلقیح شده به مدت ۳۰ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شد تا جدایه منتخب بتواند با محیط سازگار شده و پلی‌یورتان موجود در محیط را به عنوان تنها منبع کربن مصرف کرده و باعث تجزیه آن شود.

بررسی صفحات پلی‌یورتان با استفاده از میکروسکوپ الکترونی نگاره

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

به‌منظور بررسی صفحات پلی‌یورتان، از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد که بدین منظور مراحل آماده‌سازی لازم به شرح زیر انجام شد. ابتدا صفحات از ارلن حاوی محیط‌کشت و سوش مخمری خارج شد. سپس به مدت ۲ ساعت در گلوتارآلدهید ٪۲۵ قرار داده شد تا کاملاً تثبیت شود. در این مرحله، آب‌گیری توسط الکل ٪۲۵ به مدت ۲ ساعت انجام شد. بدین منظور، صفحات پلی‌یورتان از گلوتارآلدهید خارج شده و توسط آب مقطر شستشو شدند و داخل الکل ٪۲۵ به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. این فرایند برای غلظت های ۵۰، ۷۵ و ٪۱۰۰ الکل تکرار شد تا درنهایت آب‌گیری به صورت کامل انجام شود. صفحات خشک‌شده به منظور مشاهده بر روی لام حاوی چسب کربن منتقل شدند و روی آن‌ها لایه‌ای از طلا به عنوان پوشش اضافه شد. درنهایت تصویر برداری با دستگاه میکروسکوپ الکترونی نگاره Zeiss مدل EVO18 انجام شد (Osman *et al.*, 2017).

نتایج

جمع‌آوری نمونه و بررسی جدایه‌های مخمری توانمند در تولید آنزیم

در این مرحله از ۱۲ نمونه خاک و پساب بدست آمده از ۴ منطقه‌ی جغرافیایی مختلف، ۴۰ جدایه مخمری جداسازی و و خالص‌سازی شدند تا ویژگی‌های میکروسکوپی و ماکروسکوپی آن‌ها مورد بررسی قرار گیرد. سپس قابلیت رشد آن‌ها در محیط حاوی ایمپرانیل DLN سنجیده‌شد و جدایه‌هایی که توانایی رشد در این محیط را نداشتند، حذف شدند.

بررسی فعالیت‌های آنزیمی جدایه‌های مخمری

تست‌های آنزیمی استراز، پروتئاز و اوره‌آز برای جدایه‌های حاصل، انجام شد و براساس شدت رنگ و هاله ایجاد شده در تست های آنزیمی جدایه های دسته بندی شدند. در این مرحله جدایه هایی که هیچ یک از آنزیم‌های مطرح شده را تولید نمی-کردند، حذف شدند. از این مرحله تنها ۹ جدایه بدست آمد. در مرحله‌ی بعد، تست کیفی تجزیه ایمپرانیل انجام شد و سوش‌های توانمند در حذف ایمپرانیل با توجه به میزان هاله‌ای که تولید کردند، رتبه‌بندی شدند. بر اساس نتایج بدست آمده در این مرحله جدایه NS-10 به عنوان بهترین تجزیه‌کننده ایمپرانیل و تولید کننده آنزیم های استراز، اوره آز و پروتئاز انتخاب شد. پس از انجام تست‌های آنزیمی برای سوش منتخب و اندازه‌گیری قطر هاله‌های بدست آمده در نتیجه‌ی فعالیت آنزیمی، براساس اندازه هاله‌ها و تغییر رنگ محیط، امتیازدهی انجام شد. بیش‌ترین فعالیت به ترتیب مربوط به آنزیم اوره‌آز، استراز و در نهایت پروتئاز به دست آمد (جدول ۱).

شناسایی جدایه منتخب

نتیجه شناسایی مولکولی از PCR و تعیین ترادف ژن ITS و مقایسه توالی بدست آمده در بانک ژنی و همچنین جدایه منتخب NS-10 نشان داد که با میزان شباهت ٪۱۰۰ متعلق به سوش *Sarocladium kiliense* است. سپس در بانک ژنی NCBI ثبت شد و شماره دستیابی آن مشخص گردید (جدول ۲).

بررسی تجزیه‌زیستی ایمپرانیل توسط *S. kiliense*

از محیط جامد و مایع حاوی ایمپرانیل به منظور بررسی تجزیه زیستی این ترکیب توسط *S .kiliense* استفاده شد. مشاهده هاله‌ای شفاف بر روی پلیت حاوی ایمپرانیل نشان‌دهنده توانایی مصرف و تجزیه ایمپرانیل به عنوان تنها منبع کربن در این محیط بود (شکل ۱). فعالیت کمی مخمر برتر در جهت تجزیه ایمپرانیل به نحوی بود که با گذشت زمان، تغییرات حاصل در ارلن به وضوح قابل مشاهده بود و محیطی که به حال سوسپانسیون در ابتدای آزمایش بود با گذشت زمان دارای لخته‌های سفید رنگ ایمپرانیل شد. مقایسه نتیجه بدست آمده در روز ۱۴ در سمت راست با کنترل در سمت چپ نشان‌دهنده این تغییر است (شکل ۱ B). شمارش کلنی‌های مخمری به مدت ۱۴ روز پس از تلقیح، مصرف ایمپرانیل و رشد سوش تا زمانی که کاملاً منبع کربن حذف شود، به‌خوبی مشاهده شد. همچنین با گذشت زمان، غلظت این ترکیب کاهش یافته تا به صفر رسید که نشان‌دهنده این واقعیت است که *S. kiliense* توانسته به صورت ٪۱۰۰ ایمپرانیل DLN را از محیط حذف نماید (شکل ۲).

در شکل ۲ منحنی آبی مربوط به کاهش جذب نوری طی این ۱۴ روز است که نشان می‌دهد که با گذشت زمان و فعالیت مخمر برتر در جهت تجزیه ایمپرانیل، غلظت این پلیمر در محیط‌کشت کاهش یافته تا در نهایت به میزان صفر رسیده‌است. همچنین طی این مدت ۱۴ روز، تعداد مخمرهای زنده محیط با گذشت زمان افزایش یافته تا در نهایت به حد معینی رسیده و با به اتمام رسیدن منبع کربن که همان پلیمر ایمپرانیل است، تعداد مخمرهای زنده کاهش می یابد (شکل ۲).

بررسی صفحات پلی‌یورتان توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

به منظور بررسی ساختار فیزیکی و پلیمریزه شدن مخمر روی صفحات پلی یورتان از میکروسکوپ الکترونی نگاره استفاده شد.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

جدول ۱- بررسی فعالیت آنزیمی و تجزیه ایمپرانیل توسط جدایه‌های منتخب.

Table 1. Analysis of enzymatic activities and impranil degradation by selected isolates.

آنزیم	NS-01	NS-04	NS-07	NS-09	NS-10	NS-12	NS-24	NS-27	NS-38
اوره‌آز	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	–	+
استراز	++	+	+	+	++	++	+	+	++
پروتئاز	+++	++	+	+	+	–	–	–	–
ایمپرانیلاز	+	+	–	–	+++	++	–	–	–

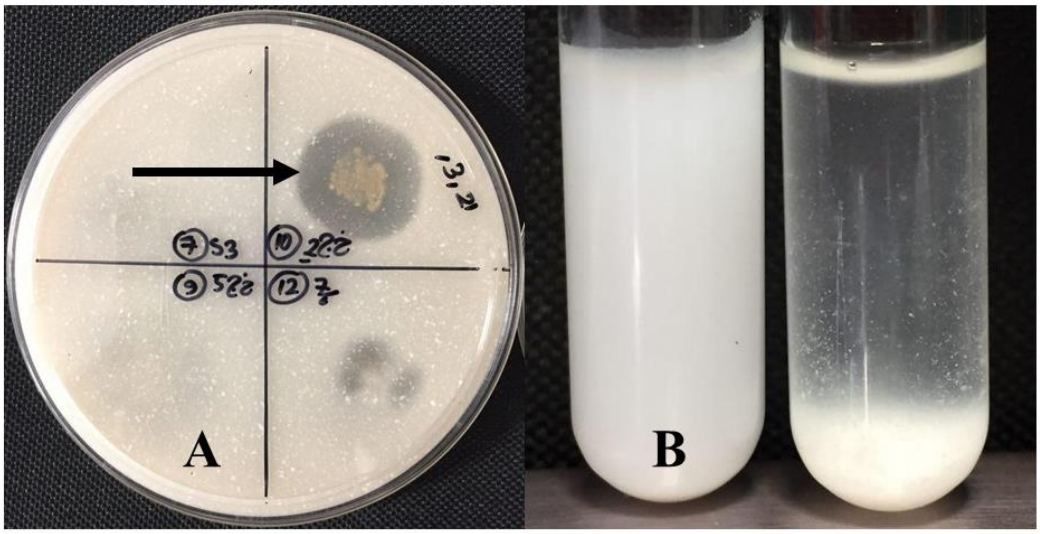
(–) عدم فعالیت، (+) فعالیت آنزیمی ضعیف، (++) فعالیت آنزیمی متوسط، (+++) فعالیت آنزیمی بالا.

(-) no activity, (+) low activity, (++) moderate activity, (+++) high activity.

جدول۲- شناسایی مولکولی جدایه منتخب و شماره دستیابی آن در NCBI.

Table 2. Molecular identification of selected strain and GenBank code in NCBI.

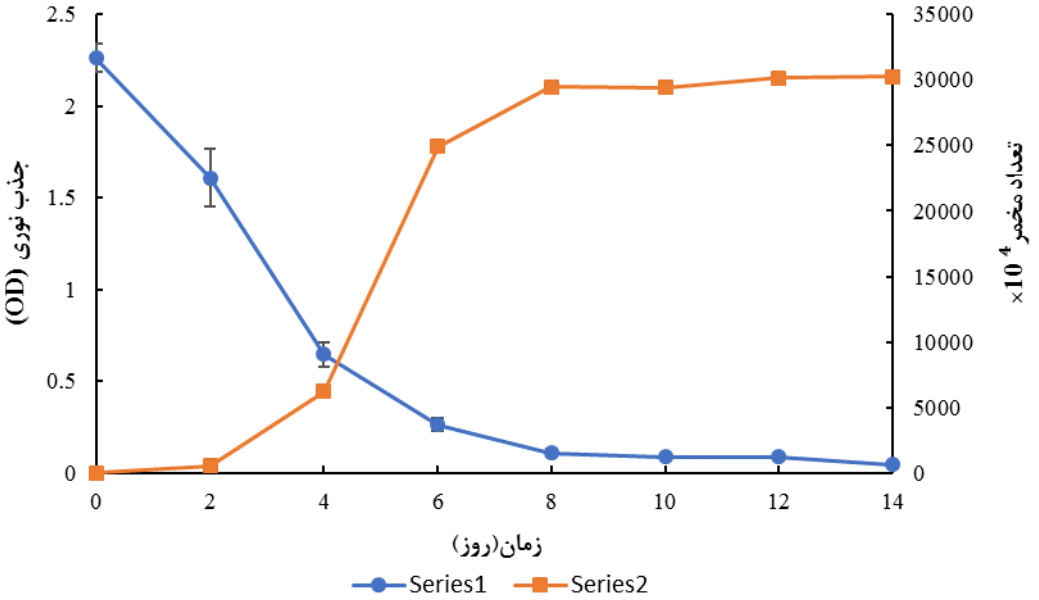
نام جدایه	شماره دستیابی(GenBank)	نام جدایه منتخب	ژن مورد نظر	درصد شباهت
NS-10	MF623796.1	*Sarocladium kiliense*	ITS	۱۰۰٪



شکل۱- تجزیه ایمپرانیل DLN در محیط جامد (A) و مایع(B) توسط *S. kiliense*. **A**. هاله حاصل از تجزیه و فعالیت سوش منتخب. **B**. شفاف شدن محیط مایع حاصل از فعالیت *S. kiliense*.

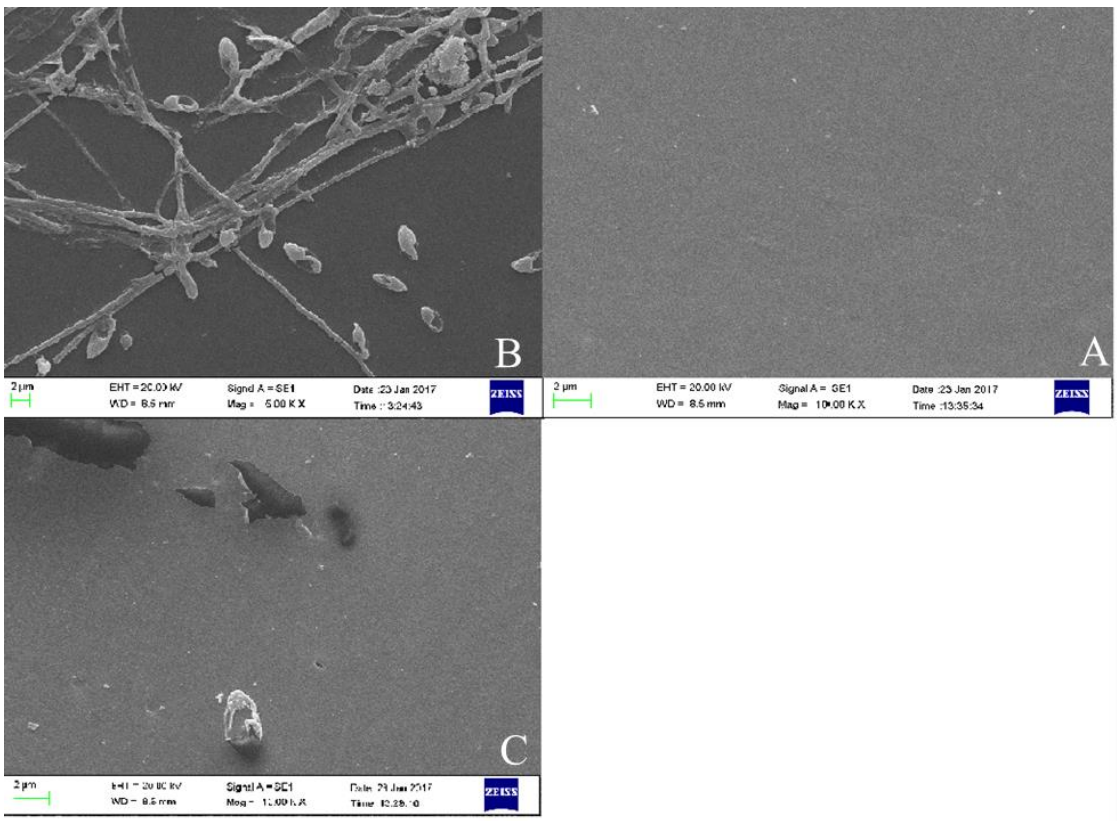
Fig.1. Degradation of impranil DLN in solid (A) and broth (B) medium by *S. kiliense*. **A**. Clear halos created from impranil degradation and activities of designated strain. **B**. Clearing of broth medium from *S. kiliense* activity.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]



شکل ۲- تجزیه‌زیستی ایمپرانیل DLN توسط *S. kiliense* منحنی آبی نشان‌دهنده جذب نوری در طی ۱۴ روز و منحنی نارنجی رنگ بیانگر تعداد مخمرهای زنده موجود در محیط طی همان زمان معین است.

Fig. 2. Biodegradation of impranil DLN by *S. kiliense*. Blue curve shows optical density within 14 days and orange curve represents the number of living yeast cells in the medium at the same time.



شکل ۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی نگاره. **A.** نمونه تیمارنشده بدون تغییرات در سطح 10.00K×. **B.** نمونه تیمارشده دارای بیوفیلم *S .kiliense* در سطح 5.00K×. **C.** نمونه تیمارشده دارای حفره ایجاد شده در سطح 10.00K×.

Fig. 3. Scanning electron microscopy. **A.** Untreated sample without changes on the surface ×10.00K. **B.** Treated sample with producing of biofilm by *S. kiliense* on the surface ×5.00K. **C**. Treated sample contain holes on the surface ×10.00K.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

تصاویر بدست آمده، نشان‌دهنده‌ی تغییرات ایجاد شده بر سطح صفحات، میزان تخریب و همچنین انتشار سوش مخمری برتر بر روی صفحه پلی یورتان است که ایجاد بیوفیلم کرده است (شکل ۳).

بحث

تاکنون تحقیقات زیادی در جهت جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های توانمند در تجزیه‌ی پلی‌یورتان انجام شده‌است که بیش‌تر موارد شامل سوش‌های باکتریایی است. مطالعه‌ای توسط Zafar و همکاران (2014) انجام شد که طی آن تعدادی صفحات پلی‌یورتان در خاک کمپوست به مدت ۶ ماه مدفون شدند و پس از آن جمعیت میکربی خاک حاوی صفحات پلی‌یورتان با نمونه بدون صفحه توسط کشت‌دادن و تکنیک‌های مولکولی مورد مقایسه قرار گرفت و نشان داده شد که جمعیت قارچی با قابلیت تجزیه پلی‌استر پلی‌یورتان به سرعت بر سطح صفحات منتشر شده و افزایش می‌یابد. همچنین کاهش دما باعث افزایش تنوع جمعیت قارچی روی صفحات شد که با نمونه کنترل بسیار متفاوت بود. در مطالعه‌ای دیگر، Howard و همکاران (2012) باکتری از خاک جداسازی کردند که قابلیت تولید آنزیمی به نام پلی‌یورتاناز به منظور تجزیه ایمپرانیل به عنوان پلیمری پلاستیکی را دارا بود که پس از ورود به محیط حاوی آن پلیمر، تا ۵ ساعت اول رشد لگاریتمی داشته، ثابت شده و پس از ۹ ساعت با تشکیل رسوب ایمپرانیل حاصل از تجزیه‌شدن، تعداد باکتری‌های زنده کاهش یافته‌است. همچنین عکسبرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره بیانگر تشکیل مجموعه‌ای متشکل از باکتری‌های زنده و پلاستیک موجود در محیط بود که در نهایت به نام *Acinetobacter gerneri* شناسایی شد. پژوهشی توسط Russell و همکاران (2011) انجام شد که طی آن دو قارچ اندوفیت از جنس *Pestalotiopsis* بدست آمدند که توانایی تجزیه پلی‌یورتان را دارا بودند که هم در محیط هوازی و هم بی-هوازی توانایی تجزیه را داشتند. پس از بررسی‌های دقیق‌تر نشان داده شد که مسئول تجزیه، آنزیمی سرین هیدرولازی است. Shah و همکاران (2008)، با دفن صفحات پلی‌یورتان در خاک و بررسی آن‌ها پس از گذشت ۶ ماه، توانستند تعدادی سوش جداسازی و شناسایی کنند که عبارتند از: *Bacillus* sp.، *Pseudomonas* sp.، *Micrococcus* sp.، *Arthrobacter* sp. و *Corynebacterium* sp. پس از بررسی‌های فراوان به این نتیجه رسیدند که فعالیت استرازی باعث تجزیه‌شدن این صفحات و ایجاد تغییرات بر روی صفحات پلی‌یورتان شده‌است. Cosgrove و همکاران (2007) با آماده‌سازی صفحات پلی‌یورتان و دفن آن‌ها در خاک به مدت چندین ماه مشاهده کردند که در اطراف این صفحات طیف محدودی از میکروارگانیسم‌ها حیات دارند که از این ترکیب به عنوان منبع کربن استفاده کرده و آن را تجزیه می‌کنند. بدین منظور از ۲ محیط اسیدی و خنثی استفاده نمودند و در نهایت به این نتیجه رسیدند، با این که تجزیه در هر ۲ محیط صورت می‌گیرد ولی در محیط خنثی بهتر از محیط اسیدی اتفاق می‌افتد. Rowe و Howard (2002) نشان دادند که باکتری *Bacillus subtilis* قابلیت رشد در محیط حاوی پلی‌یورتان را با بررسی کینتیک میکروارگانیسم داشته و همچنین توانایی تجزیه این ترکیب را داراست. در نهایت توانستند آنزیم تجزیه‌کننده پلی‌یورتاناز که در واقع فعالیت لیپازی را دارا بود را شناسایی و جداسازی کنند. جداسازی و شناسایی ۲ آنزیم با فعالیت استرازی و پروتئازی که قابلیت تجزیه پلی‌یورتان را دارند در جدایه *Pseudomonas chlororaphis* توسط Ruiz و همکاران (1999) مورد بررسی قرار گرفت که در این تحقیق یکی از آنزیم‌ها تنها دارای خاصیت استرازی بود در حالی که آنزیم دیگر علاوه بر فعالیت استرازی، دارای فعالیت پروتئازی نیز بود. لذا نتیجه‌گیری شد که فعالیت استرازی نقش مهمی در این جدایه به منظور تجزیه پلی‌یورتان دارد. بیش‌تر پژوهش‌هایی که تاکنون انجام شده در جهت یافتن مکانیسم دقیق و عامل اصلی تجزیه‌کننده پلی‌یورتان به عنوان پلاستیک است. بسیاری از پژوهش‌ها احتمال دخالت آنزیم‌های خارج‌سلولی مانند استراز، اوره‌آز و پروتئاز به عنوان عامل اصلی یاد می‌کنند اما این مسئله به صورت قطعی تاکنون به اثبات نرسیده است. به طور کلی مراحل تجزیه پلی‌یورتان به سه مرحله خلاصه شده است. این مراحل شامل اتصال یا اضافه شدن سوش میکربی به سطح صفحات، رشد و انتشار بر سطح صفحات و در نهایت تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده پلی‌یورتان است (Shah *et al.*, 2013). همچنین گزارشات کم‌تری در مورد کپک‌ها و مخمرها به چشم می‌خورد در حالی که این دسته از میکروارگانیسم‌ها دارای مزایای قابل توجهی نسبت به سوش‌های باکتریایی هستند. در این پژوهش تلاش شده است فعالیت آنزیم‌هایی

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

که احتمال داده می‌شود در تجزیه پلی‌یورتان دخیل باشند، بررسی شده و هم میزان قابلیت سوش مخمری بدست آمده از محیط بررسی شود. همچنین به منظور بررسی بیش‌تر سوش، از دو مدل متفاوت پلیمر پلاستیکی استفاده شد که براساس نتایج بدست آمده این سوش در تولید آنزیم‌های خارج‌سلولی استراز، اوره‌آز و پروتئاز و تجزیه پلی‌یورتان بسیار توانمند است به نحوی که پلی به سمت بررسی‌های بیش‌تر ایجاد می‌نماید. براساس مقالات کار شده تا به امروز، اولین بار است که سوش مخمری *S. kiliense* به عنوان تجزیه‌کننده پلیمری از خانواده پلی‌یورتان‌ها مطرح شده است. نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان داد که مخمرها توانمندی بالایی در تولید آنزیم های تجزیه‌کننده پلیمرهای پلاستیکی داشته و *S. kiliense* دارای توان بالایی در تجزیه ترکیب مدل ایمپرانیل DLN است. این نتایج می‌تواند در استفاده از قارچ ها به منظور تجزیه زیستی پلیمرهای پلاستیکی و کمک به پاکسازی محیط زیست کمک‌کننده باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران جهت حمایت مالی بخشی از این پژوهش تشکر می‌کنند.

REFERENCES

Álvarez-Barragán, J., Domínguez-Malfavón, L., Vargas-Suárez, M., González-Hernández, R., Aguilar-Osorio, G. and Loza-Tavera, H. 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. – Appl. Environ. Microbiol. 82: 5225-5235.

Biffinger, J.C., Barlow, D.E., Cockrell, A.L., Cusick, K.D., Hervey, W.J., Fitzgerald, L.A., Nadeau, L.J., Hung, C.S., Crookes-Goodson, W.J. and Russell, J.N. 2015. The applicability of Impranil® DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes. – Polym. Degrad. Stab. 120: 178-185.

Cangemi, J.M., Santos, A.M.D., C Neto, S. and Chierice, G.O. 2008. Biodegradation of polyurethane derived from castor oil. – Polím. 18: 201-206.

Cosgrove, L., McGeechan, P.L., Robson, G.D. and Handley, P.S. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. – Appl. Environ. Microbiol. 73: 5817-5824.

Howard, G.T., Norton, W.N. and Burks, T. 2012. Growth of *Acinetobacter gerneri* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. – Biodegrad. 23: 561-573.

Jones, B.V., Sun, F. and Marchesi, J.R., 2007. Using skimmed milk agar to functionally screen a gut metagenomic library for proteases may lead to false positives. – Lett. Appl. Microbiol. 45: 418-420.

Khan, S., Nadir, S., Shah, Z.U., Shah, A.A., Karunarathna, S.C., Xu, J., Khan, A., Munir, S. and Hasan, F. 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. – Environ. Pollut. 225: 469-480.

Mahajan, N. and Gupta, P. 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. – RSC Adv. 5: 41839-41854.

Mukherjee, K., Tribedi, P., Chowdhury, A., Ray, T., Joardar, A., Giri, S. and Sil, A.K. 2011. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. – Biodegrad. 22: 377-388.

Osman, M., Satti, S.M., Luqman, A., Hasan, F., Shah, Z. and Shah, A.A. 2017. Degradation of Polyester Polyurethane by *Aspergillus sp.* Strain S45 Isolated from Soil. – J. Polym. Environ. 26: 301-310.

Peng, Y.H., Shih, Y.H., Lai, Y.C., Liu, Y.Z., Liu, Y.T. and Lin, N.C. 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. – Environ. Sci. Pollut. Res. 21: 9529-9537.

Rowe, L. and Howard, G.T. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. – Int. Biodeterior. Biodegrad. 50: 33-40.

Ruiz, C., Main, T., Hilliard, N.P. and Howard, G.T. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. – Int. Biodeterior. Biodegrad. 43: 43-47.

Russell, J.R., Huang, J., Anand, P., Kucera, K., Sandoval, A.G., Dantzler, K.W., Hickman, D., Jee, J., Kimovec, F.M., Koppstein, D. and Marks, D.H. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. – Appl. Environ. Microbiol. 77: 6076-6084.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]

Scott, G. 1990. Photo-biodegradable plastics: their role in the protection of the environment. – Polym. Degrad. Stab. 29: 135-154.

Shah, A.A., Hasan, F., Akhter, J.I., Hameed, A. and Ahmed, S. 2008. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. – Ann. Microbiol. 58: 381-386.

Shah, Z., Hasan, F., Krumholz, L., Aktas, D.F. and Shah, A.A. 2013. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GC–MS. – Int. Biodeterior. Biodegrad. 77: 114-122.

Vega, R.E., Main, T. and Howard, G.T. 1999. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. – Int. Biodeterior. Biodegrad. 43: 49-55.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols. – Academic Press, San Diego, CA.

Zafar, U., Nzeram, P., Langarica-Fuentes, A., Houlden, A., Heyworth, A., Saiani, A. and Robson, G.D. 2014. Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. – Bioresour. Technol. 158: 374-377.

*****

How to cite this article:

Saffarzadeh, N. and Moghimi, H. 2019. The study of impranil (DLN) polymer biodegradation by fungus *Sarocladium kiliense* – Nova Biol. Reperta 6: 20-29.

صفارزاده، ن. و مقیمی، ح. ۱۳۹۸. بررسی تجزیه زیستی پلیمر ایمپرانیل توسط قارچ ساروکلادیوم کیلینس. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۲۹-۲۰.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-09]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.8.3]

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.20]