مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۵) تابستان ۱۳۹۷
صفحات ۱۹۸-۱۸۸

Original Article

تجزیه زیستی نفت خام و ترکیبات پلی آروماتیک چند حلقه ای توسط مخمر *اگزوفیالا* UTMC 5043

فرحناز اکبرزاده[۱]، حمید مقیمی*[۲]، شمس الضحی ابولمعالی[۳]، جواد حامدی[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، گروه زیست فناوری، پردیس علوم و فناوری های نوین، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران، [۲]استادیار، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، [۳]استادیار، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران، [۴]استاد، بخش زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران.

چکیده

سابقه و هدف: فرآورده های نفتی از پر مصرف ترین مواد شیمیایی در دنیای امروز محسوب می شوند. روزانه مقادیر زیادی از نفت خام و فرآورده های نفتی در حجم زیاد به محیط زیست وارد می شود. هدف از این پژوهش جداسازی و ارزیابی مخمرهای بومی ایران به منظور زیست پالایی مناطق آلوده نفتی بود.

مواد و روش ها: نمونه خاک از مناطق مختلف آلوده به آلاینده های نفتی در ایران جمع آوری گردید. سپس در محیط باشنل هاس همراه با ۰/۵ درصد نفت خام و تراسایکلین ($100mg\ l^{-1}$) به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. میزان تخریب نفت خام با استفاده از خواندن جذب کل هیدروکربن های نفتی سنجیده شد. با استفاده از روش HPLC حذف 100 ppm فـنانترن، آنتراسن و پیرن به عنوان ترکیبات پلی آروماتیک چندحلقه ای مدل مورد بررسی قرار گرفت. جدایه منتخب از طریق تکثیر ژن ITS، تعیین توالی و همردیفی توالی در پایگاه داده شناسایی گردید.

یافته ها: در این مطالعه ۴۷ گونه مخمر جداسازی گردید. سنجش میزان حذف TPH نشان داد که جدایه FA14 با ۸۹ درصد حذف نفت، طی ۱۴ روز توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن های نفتی می باشد. شناسایی مولکولی این جدایه با کمک توالی یابی ژن ITS و همردیف یابی آن در پایگاه داده های NCBI نشان داد که جدایه FA14 با ۹۹ درصد شباهت، متعلق به جنس *اگزوفیالا* می باشد. نتایج نشان داد که فنانترن، آنتراسن و پیرن به ترتیب ۹۷/۶۷، ۵۷ و ۹۵/۳۸ درصد به وسیله FA14 و طی ۱۴ روز از محیط حذف گردیدند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که *اگزوفیالا* در حذف هیدروکربن-های آروماتیک چند حلقه ای توانایی بالایی دارد. بنابراین می تواند به عنوان کاندید مناسب به منظور زیست پالایی محیط آلوده به نفت خام معرفی گردد.

واژگان کلیدی: آنتراسن، پیرن، زیست پالایی، فنانترن، *اگزوفیال*.

دریافت مقاله: شهریور ماه ۹۶ پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۶

مقدمه

نفت و فرآورده های نفتی مخلوط پیچیده و متنوعی از ترکیبات شیمیایی غیرهیدروکربنی و هیدروکربنی هستند (۱). فرآورده های نفتی از پرمصرف ترین مواد شیمیایی در دنیای امروز محسوب می شوند. محصولات به دست آمده از نفت خام منبع اصلی انرژی و مواد مورد استفاده در صنعت و زندگی روزمره بشر را تشکیل می دهند (۲). افزایش تقاضا برای نفت خام به عنوان یک منبع انرژی و به عنوان ماده خام اولیه برای صنایع مختلف، به ویژه لوازم آرایشی، رنگ، پلاستیک و غیره

*) آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی.
تلفن: ۰۲۱۶۶۴۱۵۴۹۵ پست الکترونیک: hmoghimi@ut.ac.ir

موجب افزایش تولید، حمل و نقل و پالایش آن شده، که به نوبه خود منجر به آلودگی وسیع محیط زیست شده است (۳).

آلودگی های نفتی یک پیامد اجتناب ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و فرآیند صنعتی شدن است که به دنبال آن آلودگی خاک توسط هیدروکربن های نفتی به شکل وسیع در اطراف تأسیسات اکتشاف و پالایش و به شکل موضعی در مسیرهای انتقال این مواد قابل مشاهده است. روزانه مقادیر زیادی از نفت و فرآورده های نفتی، در حجم زیاد به محیط زیست وارد می شود (۲). با توجه به اینکه نفت حاوی مواد شیمیایی خطرناکی مانند بنزن، تولوئن، اتیل، بنزن، زایلن، نفتالن است، می تواند اثرات منفی طولانی مدتی را بر منابع طبیعی و زندگی موجودات زنده به دنبال داشته باشد (٤). هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons =PAHs) از مهمترین آلودگی های نفتی هستند که در خاک و رسوبات وجود دارند. بنابراین حذف آن ها در بهبود زندگی و حفاظت از محیط زیست نقش اساسی دارد. این ترکیبات به دلیل ساختار و ماهیت، از جمله ترکیبات سخت تجزیه پذیر نفتی محسوب شده که با پیچیده شدن ساختار و افزایش تعداد حلقه ها سمیت و پایداری آن نیز افزایش پیدا می کند (۲).

پاکسازی خاک ها و آب خوان های آلوده به نفت به علت تهدید حاصلخیزی خاک، آسیب رسانی به آب های زیر زمینی و سلامت جهانی، بسیار حائز اهمیت می باشد. ایران، به عنوان یک کشور نفت خیز، دارای محیط های آلوده به مواد نفتی زیادی می باشد. این آلودگی ها در سال های اخیر در حال افزایش هستند (۵). در این راستا انواع مختلفی از روش های تیمار شیمیایی، فیزیکی و زیستی جهت پاکسازی محل های آلوده به نفت ارائه شده است (۲). در این بین، روش پاکسازی زیستی (Bioremediation) که به طور معمول شامل تبدیل آلودگی ها به مواد غیر سمی با استفاده از فعالیت میکروارگانیسم ها است، بسیار مؤثر و کارآمد بوده به طوری که توجه بسیاری از محققان در سراسر دنیا را به خود جلب کرده است (۳).

پاکسازی زیستی، فرآیند بسیار امیدوار کننده ای برای کاهش و یا برطرف کردن آلودگی های نفتی به شمار می رود. طیف گسترده ای از میکروارگانیسم ها، از جمله باکتری ها، قارچ ها و جلبک ها، دارای توانایی سوخت و ساز هیدروکربن های آلیفاتیک و آروماتیک هستند.

توانایی های مختلفی در قارچ ها و باکتری ها برای متابولیزه کردن هیدروکربن ها وجود دارد. مکانیسم های مشابهی در سوخت و ساز هیدروکربن ها در باکتری و قارچ ها شناخته شده است. قارچ ها حاوی آنزیم های خارج سلولی خاصی هستند که به تخریب اولیه هیدروکربن ها کمک می کنند (٦).

پژوهش های زیادی بر روی تجزیه زیستی هیدروکربن های نفتی و ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای انجام شده است. در این پژوهش ها از باکتری ها، مخمرها و قارچ ها برای از بین بردن ترکیبات نفتی استفاده شده است. داس (Das) و چاندران (Chandran) در سال ۲۰۱۰ عنوان کردند که جنس های *کاندیدا لیپولیتیکا* (*Candida lipolytica*)، *رودوتورولا موسیلاژینوزا* (*Rhodotorula mucilaginosa*)، *تریکوسپورون موکوئیدس* (*Trichosporon mucoides*) و *گونه های ژئوتریکوم* (*Geotrichum* sp.) قابلیت تجزیه هیدروکربن های نفتی و PAHs را دارند (۷).

در مطالعه دیگر گارگوری (Gargouri) و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان دادند که طیف گسترده ای از مخمرها و قارچ های رشته ای قابلیت تجزیه زیستی آلاینده های آلی را دارند. در این مطالعه *یاروویا لیپولیتیکا* (*Yarrowia lipolytica*) به عنوان توانمندترین سویه مخمری که توانایی استفاده از هیدروکربن های مختلف از جمله تری گلیسیریدها و آلکن ها را دارد معرفی گردید (۸). با توجه به مطالب یاد شده، موضوع آلودگی محیط زیست به انواع ترکیبات نفتی و اختلالات اکوسیستمی حاصل از آن، در کشورهای تولید کننده نفت به ویژه ایران مسأله بسیار مهمی است. بنابراین، توسعه روش های پاکسازی زیستی با قابلیت کاربرد در اکوسیستم های طبیعی بسیار حائز اهمیت می باشد.

هدف از این مطالعه بررسی توانمندی تجزیه زیستی مخمرهای

بومی در تخریب نفت خام و ترکیبات آروماتیک چند حلقه ای مدل بود.

مواد و روش ها

الف) نمونه برداری: برای جداسازی سویه های مخمری توانمند در فرآیند زیست پالایی ترکیبات هیدروکربنی نفت، از یازده منطقه آلوده به ترکیبات نفتی شامل خاک های آلوده قم، خارک، پوند ۳ پالایشگاه تهران، مارون، پالایشگاه نفتی شازند اراک، کارون، خانگیران، ۲۰ کیلومتری سراب، قزوین و سیری نمونه برداری صورت پذیرفت. خاک های آلوده از مناطق مختلف ذکر شده از عمق ۲۰ سانتی متری با استفاده از بیلچه برداشت و در کوتاه ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شدند. در ادامه خاک ها با استفاده از هاون چینی استریل کوبیده و آسیاب شدند. در نهایت نمونه ها در آزمایشگاه با الک ۰/۵ میلی متری همگن شده و ذرات درشت آن جداسازی گردید و به منظور جداسازی مخمرها مورد استفاده قرار گرفت (۹).

ب) جداسازی مخمرهای توانمند در تخریب هیدروکربن های نفتی از خاک: ابتدا رقت های سریالی از خاک تهیه شد و ۱۰۰ میکرولیتر از رقت های تیمار شده حاصله بر روی محیط های کشت اختصاصی مخمرها؛ GPY (گلوکز: ۵ گرم، پپتون: ۵ گرم، عصاره مخمر: ۱۰ گرم، آگار: ۲۰ گرم در ۱ لیتر آب مقطر)، (۹) به همراه ۱۰۰ µg/l رزبنگال دارای آنتی بیوتیک تتراسایکلین (۱۰۰mg/l) همراه با ۱ درصد نفت خام انتقال داده شد. سپس با استفاده از لوله شیشه ای L شکل استریل، به صورت یکنواخت در سراسر محیط کشت پخش گردید. این عمل برای هر یک از نمونه های خاک در سه تکرار انجام شد. پس از انجام تلقیح، به منظور رشد مخمرها پلیت های کشت داده شده در دمای ۲۸ °C به مدت یک هفته در انکوباتور گرماگذاری گردید. همچنین در روش غنی سازی (Enrichment Technique) با هدف فعال کردن و افزایش جمعیت تجزیه کننده هیدروکربن های خاک از محیط کشت پایه نمکی (Bushnell Haas) ($MgSO_4$: ۰/۲ گرم، $CaCl_2$: ۰/۰۲ گرم، KH_2PO_4: ۱ گرم، KNO_3: ۱ گرم، $H_2NH_4PO_4$: ۱ گرم، $FeCl_3$: ۰/۰۵ گرم در ۱ لیتر آب مقطر) (۱۰)، همراه با ۱ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن، ۰/۲ درصد عصاره مخمر به عنوان عامل محرک رشد و ۱۰۰ mg/l تتراسایکلین استفاده شد. به این منظور ۰/۵ گرم از نمونه خاک همگن به ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت همراه با ۱ درصد نفت استریل اضافه گردید و به مدت سه هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ ±۰/۲ درجه سلیسیوس و ۱۸۰ rpm گرما گذاری شد. پس از این مدت ۱۰۰ میکرولیتر از مایع روماند موجود در هر ارلن برداشته شد و به عنوان مایه تلقیح به محیط های کشت GPY به همراه ۱ درصد نفت خام و ۱۰۰ µg/l رزبنگال اضافه گردید (۱۱). با استفاده از لوله شیشه ای استریل، مایه تلقیح در سراسر محیط کشت پخش شد. در نهایت پلیت های حاصله به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در گرمخانه با دمای ۲۸ °C گرماگذاری شدند. هر یک از جدایه های مخمری که با استفاده از روش های غنی سازی و کشت سطحی بعد از گرماگذاری کافی بر روی محیط های جامد رشد کردند، به طور جداگانه بر روی محیط PDA (عصاره سیب زمینی ۴ گرم، دکستروز ۲۰ گرم، آگار ۱۵ گرم در ۱ لیتر آب مقطر) و GPY خالص سازی شدند (۱۲). در ادامه سویه های تکراری نیز بر اساس ظاهر کلنی و بررسی های میکروسکوپی حذف شدند. تمامی نمک ها و محیط های کشت آزمایشگاهی استفاده شده از شرکت مرک-آلمان تهیه شدند.

ج) بررسی توانمندی هر یک از جدایه های مخمری در تخریب نفت خام: به منظور تعیین توانمندی جدایه های به دست آمده در حذف نفت خام، در ابتدا هر یک از جدایه ها با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی از طریق اسپکتروفتومتری و نیز اندازه گیری میزان رشد مخمری از طریق سنجش زیست توده خشک ارزیابی شدند (۱۳). با استفاده از نتایج حاصله از این دو آزمایش، غربالگری اولیه برای انتخاب جدایه های برتر در تجزیه هیدروکربن های نفتی انجام پذیرفت. برای ارزیابی توانایی سویه های جداسازی شده در حذف نفت خام، پیش کشت جدایه ها در محیط کشت پایه نمکی باشنل هاس حاوی ۰/۵ درصد نفت خام و ۰/۱ درصد

گلوکز به عنوان منبع کربن و ۰/۰۲ درصد عصاره مخمر کشت داده شدند و در شیکر انکوباتور با rpm ۱۸۰ و دمای °C ۲۸ به مدت ٤٨ ساعت گرماگذاری گردید. سپس فلاسک های ۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط باشنل هاس حاوی ۱ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن تهیه شد. ۵ درصد از پیش کشت ها به محیط جدید تلقیح و به مدت دو هفته با شرایط قبل گرماگذاری شد. برای تأیید میزان حذف نفت از نمونه کنترل، بدون تلقیح مخمر استفاده شد (١٤). دو هفته پس از تلقیح جدایه ها به محیط کشت پایه نمکی، فلاسک ها به منظور استخراج کل محتوای هیدروکربنی (Total Petroleum Hydrocarbon= TPH) و تعیین میزان نفت باقی مانده بررسی شدند. به منظور استخراج هیدروکربن های نفتی از محیط، به فلاسک ها هم حجم با محیط کشت (۱۰ میلی لیتر) حلال تولوئن اضافه گردید. پس از اضافه کردن حلال، مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. برای جداسازی و تفکیک بهتر فاز آبی از آلی، به مدت ۱۵ دقیقه با g ٤۰۰۰ سانتریفیوژ شد. در ادامه با کمک دکانتور فاز آلی حاوی تولوئن و نفت باقیمانده استخراج شده، از فاز آبی جداسازی شد. نمونه حاوی ترکیبات نفت باقی مانده به نسبت یک به ده با حلال تولوئین رقیق سازی شد. سپس میزان جذب رقت حاصله با دستگاه اسپکتروفتومتر (شیمادزو-مدل A160- ژاپن) در طول موج ٤٢۰ نانومتر قرائت گردید. در نهایت برای تعیین میزان حذف نفت، جذب نمونه های تیمار با نمونه کنترل مقایسه و میزان حذف ثبت شد. از نمونه محیط کشت حاوی نفت و بدون تلقیح مخمر به عنوان نمونه کنترل استفاده شد و از غلظت های مختلف نفت خام (۰/۲۵ تا ۱ درصد) برای رسم منحنی استاندارد استفاده گردید (۱۳).

د) اندازه گیری میزان رشد: اندازه گیری وزن خشک زیست توده مخمری در محیط کشت پایه نمکی همراه با ۰/۵ درصد نفت خام، نماینده ای از میزان مصرف هیدروکربن های نفتی و به دنبال آن رشد جدایه ها می باشد. برای این منظور زیست توده مخمری حاصله در محیط پایه نمکی و ۰/۵ درصد نفت خام، پس از اندازه گیری میزان حذف نفت، از محیط کشت با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ جدا شده و به مدت یک شبانه روز در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس خشک گردید. سپس وزن خشک به دست آمده بر اساس گرم در لیتر ارائه شد (۱۵).

ه) انتخاب جدایه مناسب: برای انتخاب میکروارگانیسم های مناسب و توانمند در حذف هیدروکربن های نفتی، جدایه های به دست آمده بر اساس نتایج سنجش TPH و همچنین میزان رشد سلولی انتخاب شدند (۱۳ و ۱۵).

و) شناسایی مولکولی جدایه های منتخب: به منظور شناسایی مولکولی، ابتدا جدایه منتخب در محیط GPY به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. توده زیستی با سانتریفیوژ ۱۰ میلی لیتر از کشت در g ٤۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جدا شد. در ادامه پس از دو بار شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد و سلول‌ها با روش کوبیدن زیست‌توده منجمد شده با استفاده از ازت مایع، شکسته شدند. DNA مخمر به روش فنل-کلروفرم استخراج و با الکل رسوب داده شد (۱۷). برای تأیید حضور DNA، الکتروفورز افقی با ژل آگاروز ۱ درصد صورت گرفت. به منظور تکثیر ژن ITS از پرایمرهای ITS1 (5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′) و ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATTGA TATGC-3′) (ماکروژن، کره جنوبی) استفاده گردید. واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس آنزیم Taq DNA پلی مراز (اپلیکم، دانمارک) و ۸/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (لب نت- آمریکا) در ۳۰ چرخه شامل واسرشتگی اولیه در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤ دقیقه و واسرشتگی در دمای ٩٤ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمرها به DNA الگو در دمای ٥٤ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن رشته الگو در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و طویل شدن نهایی به مدت ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس بود. محصول PCR پس از خالص سازی با کیت (شرکت ژن-آل، کره جنوبی) جهت تعیین توالی به شرکت بیونیر-کره جنوبی

ارسال گردید (۱۷). همچنین برای شناسایی و بررسی نزدیک ترین سویه از لحاظ توالی ژن ITS به سویه منتخب، از انطباق توالی به دست آمده با اطلاعات توالی های موجود در پایگاه داده CBS و بانک ژنی استفاده شد.

ز) سنجش مقدار حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC): در این مطالعه برای بررسی مقدار حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای از روش HPLC استفاده شد (سیسیل، انگلستان). برای این منظور، پیش کشت جدایه های منتخب در محیط کشت باشنل هاس همراه با ۰/۵ درصد گلوکز در شیکر انکوباتور با ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸ °C به مدت ٤٨ ساعت گرماگذاری شد. فلاسک های ۵۰ میلی لیتری حاوی ۹ میلی لیتر محیط پایه نمکی و ۱۰۰ ppm از هر یک از سه ترکیب PAHs مدل شامل فنانترن، آنتراسن و پیرن به صورت جداگانه تهیه و ۵ درصد از پیش کشت به فلاسک ها تلقیح گردید و در شیکر انکوباتور با ۱۸۰ rpm و دمای ۲۸ °C به مدت دو هفته گرماگذاری شدند. فلاسک هایی با شرایط مشابه، بدون تلقیح جهت کنترل و مقایسه با نمونه ها تهیه گردید (١٦). برای استخراج PAHs باقی مانده در محیط از حلال هگزان استفاده شد (به ازای هر ۵ میلی لیتر محیط کشت ۲ میلی لیتر حلال)، پس از اضافه کردن حلال، مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد. برای تفکیک بهتر فاز آلی از فاز آبی به مدت ۱۵ دقیقه با ٤۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. فاز آلی با دقت در ویال شیشه ای جمع آوری گردید. سپس حلال هگزان تبخیر شد و رقت سازی مناسب با استفاده از استونیتریل تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه ها به دستگاه تزریق شد. نوع ستون مورد استفاده، C18، فاز متحرک آب مقطر دی یونیزه و استونیتریل با نسبت ۱:۱، شدت جریان ml/min ۱، طول موج جذب ۲٥٤ nm و حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر به عنوان شرایط انجام HPLC در نظر گرفته شد (۱۸).

یافته ها

الف) جداسازی مخمرهای توانمند در تخریب هیدروکربن های نفتی از خاک: در این مطالعه با استفاده از دو روش جداسازی مستقیم و غنی سازی، ٤٧ کلنی مخمری جداسازی شد که با توجه به شکل و ظاهر کلنی ها و همچنین محل جداسازی، در محیط کشت GYP خالص سازی شدند. در جدول ۱ تعداد کلنی های جداسازی شده از هر منطقه گزارش شده است.

ب) ارزیابی توانایی تخریب و حذف نفت خام در هریک از جدایه های مخمری: در این مرحله هریک از جدایه های مخمری در محیط پایه نمکی پس از پیش تیمار ٤٨ ساعته کشت داده شدند. به منظور ارزیابی میزان حذف از روش سنجش TPH همراه با اندازه گیری میزان رشد جدایه استفاده شد. سویه FA14 که از خاک نفتی قم جداسازی شده بود، با بیشترین میزان رشد و حدود ۹۰ درصد حذف نفت به عنوان توانمندترین جدایه معرفی شد و جهت ادامه آزمایش ها انتخاب گردید. همچنین ۱۷ جدایه در محیط حاوی نفت به عنوان تنها منبع کربن رشد نکردند و سایر جدایه ها نیز درصد حذف نفت اندازه گیری شده زیر ۵۰ درصد داشتند. آزمون یادشده به منظور تأیید نتایج در دو تکرار ۷ و ١٤ روزه انجام شد و نتایج مشابهی به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده میزان حذف نفت با تولید زیست توده ارتباط مستقیم دارد. به طوری که در مدت زمان ۷ روز از ابتدای آزمون حذف بسیار سریع اتفاق افتاد و با گذشت زمان مطابق با کاهش رشد میزان حذف نیز کاهش یافت. اما در ۷ روز دوم به حالت ایستا رسید. نمودار ۱ درصد حذف نفت و مقدار زیست توده تولید شده را

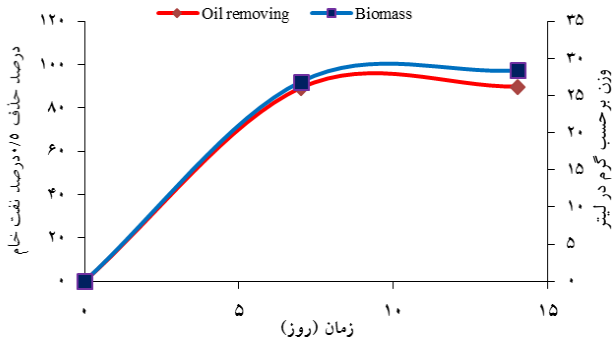
جدول ۱: تعداد کلنی های جداسازی شده با استفاده از دو روش غنی سازی و کشت در پلیت از نمونه های مختلف آلوده به نفت.

ردیف	نام منطقه ی	تعداد
۱	قم	۵
۲	خارک	۲
۳	سیری	٤
۴	پوند ۳ پالایشگاه تهران	٤
۵	شازند اراک	۳
۶	بی بی حکیمه	۳
۷	مارون	۰
۸	خانگیران	۷
۹	کارون	۵
۱۰	قزوین	۷
۱۱	۲۰ کیلومتری سراب	۷
۱۲	جمع	٤۷

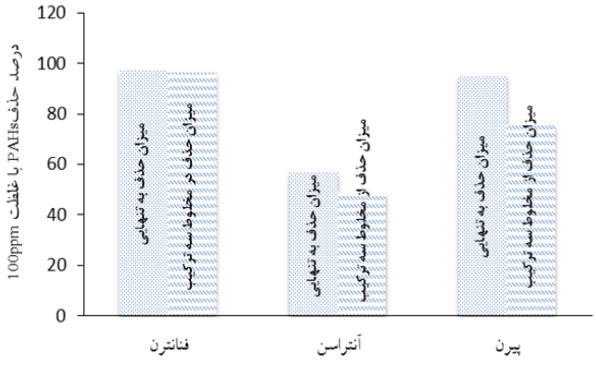
نشان می دهد.

ج) شناسایی مولکولی جدایه FA14: در این مرحله با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون های قبل از پرایمر ITS1 برای تکثیر منطقه رونویسی شونده بین ژن های 18S و 28S استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده جدایه FA14 دارای ۹۹ درصد شباهت به مخمر *اگزوفیالا کروستیکولا* (*Exophiala crusticola*) بود و تحت عنوان *اگزوفیالا* UTMC 5043 نامگذاری و در کلکسیون میکروارگانیسم های دانشگاه تهران با کد UTMC 5043 و بانک ژنی NCBI با کد KY284628.1 ثبت و نگهداری شد.

د) بررسی میزان حذف هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای مدل با HPLC: بر اساس نتایج به دست آمده مشخص



نمودار ۱: درصد حذف نفت در سنجش TPH برای جدایه FA14، در محیط پایه نمکی حاوی ۰/۵ درصد نفت خام بعد از ۷ و ۱۴ روز (قرمز) و میزان تولید زیست توده خشک سلولی در طی ۷ و ۱۴ روز (آبی).

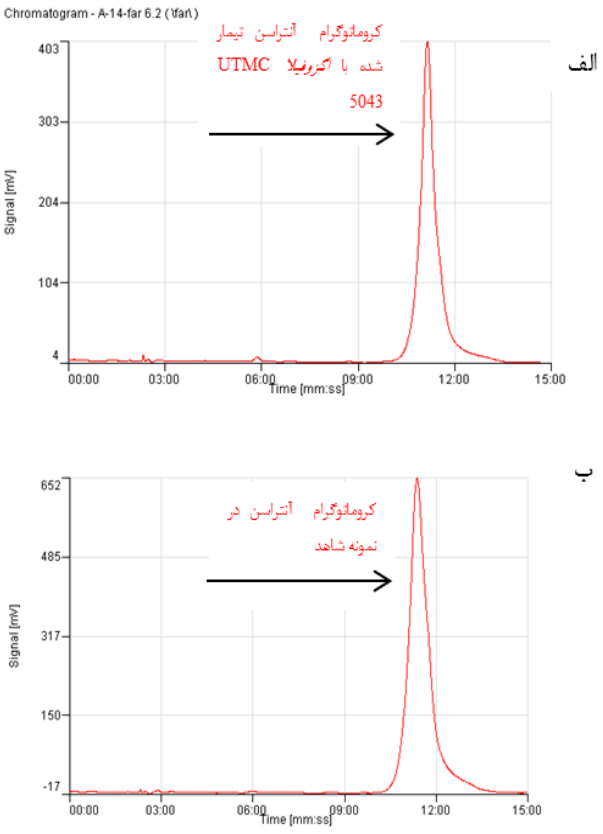


نمودار ۲: حذف ترکیبات PAHs مدل با غلظت ppm ۱۰۰ توسط *اگزوفیالا* UTMC 5043 در محیط پایه نمکی طی ۱۴ روز، حذف هر یک از PAHs (طرح نقطه ای)، حذف مخلوط PAHs (طرح خط منقطع).

شد که *اگزوفیالا* UTMC 5043 در طی ۱۴ روز توانایی حذف ۹۷ درصد فنانترن، ۵۷ درصد آنتراسن و ۹۵ درصد پیرن را دارد (نمودار ۲). در ادامه سویه منتخب در محیط کشت پایه نمکی حاوی مخلوطی از سه هیدروکربن پلی آروماتیک با غلظت ppm ۱۰۰ تلقیح شد و نتایج مشابهی در مدت ۱۴ روز به دست آمد. نمودار ۲ حذف هر یک از این ترکیبات را به طور جداگانه و مخلوط نشان می دهد. همچنین نمونه ای از کروماتوگرام حذف مربوط به آنتراسن به عنوان نمونه توسط *اگزوفیالا* UTMC 5043 در شکل ۱ ارائه شده است.

بحث

از میان پژوهش های انجام‌شده بر روی میکروارگانیسم های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی، اطلاعات موجود در مورد تجزیه هیدروکربن ها توسط قارچ ها شامل کپک ها و مخمرها به



شکل ۱: نمونه ای از کروماتوگرام حذف آنتراسن توسط *اگزوفیالا* UTMC 5043 . الف) نمونه تیمار شده، ب) نمونه شاهد.

عنوان یک عامل بسیار مؤثر و توانمند در حذف ترکیبات نفتی و تحمل‌کننده شرایط تنش‌زای محیطی بسیار اندک است و نیازمند بررسی‌های بیشتر در زمینه یافتن و بررسی سازوکارهای حذف در این گروه از میکروارگانیسم‌ها می باشد (۱۹).

در جداسازی میکروارگانیسم توانمند از نمونه های محیطی، انتخاب نقاط نمونه برداری یکی از مراحل مهم محسوب می شود. برای دست یابی به مخمرهایی که در فرآیند تجزیه و پاکسازی ترکیبات هیدروکربنی قابل استفاده باشند، اولین و بهترین گزینه استفاده از میکروفلور مناطق آلوده به نفت است که در آن ها غنی سازی میکروارگانیسم های توانمند در تجزیه هیدروکربن ها به طور طبیعی صورت گرفته است. بر این اساس تاکنون تحقیقات زیادی برای جداسازی میکروارگانیسم های بومی از مناطق آلوده به نفت در دنیا انجام شده است (۱۹ و ۲۰). با توجه به این موضوع، در این پژوهش جداسازی مخمرهای بومی از نمونه های آلوده به نفت تهیه شده از ۱۱ منطقه کشور که سابقه آلودگی هیدروکربنی داشتند (به عنوان نمونه منطقه نفتی قم با آلودگی به سبب چشمه طبیعی نفت و نشت مخزن زیر زمینی، منطقه ی بی بی حکیمه به دلیل شکستگی و ترکیدگی خطوط انتقال نفت، مناطق تولید و پالایش فراورده های نفتی مانند پالایشگاه های تهران، شازند اراک و خانگیران و نیز میادین اصلی نفت خیز کشور مانند مارون، سیری، قزوین، سراب و خارک)، انجام پذیرفت. در این پژوهش از بین ٤٧ کلنی مخمری جداسازی شده، ۱۰ درصد از جدایه ها قادر به تجزیه هیدروکربن های نفتی بودند. باقی جدایه ها توانمندی تجزیه هیدروکربن های نفتی را نداشتند و یا میزان حذف آن ها بسیار اندک بود. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که جدایه های مختلف توانایی متفاوتی در حذف و استفاده از نفت خام به عنوان منبع کربن از خود نشان می دهند. با این حال سمیت آلاینده‌های نفتی از رشد برخی جدایه های مخمر ممانعت نکرده و آن‌ها می‌توانند از ترکیبات نفتی موجود در محیط به عنوان منبع کربن و مواد غذایی برای رشد و تولید زیست توده استفاده کنند. نتایج حاصل از این تحقیق با یافته های سایر محققان در رابطه با دیگر مخمرها مطابقت دارد (۳ و ۲۱).

در ادامه با انجام روش های مولکولی جدایه مورد نظر شناسایی گردید. سویه FA14، جدا شده از خاک های نفتی قم از نظر توالی ITS، دارای شباهت ۹۹ درصدی به *اگزوفیالا کروستیکولا* بود. نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان می دهد که گونه *اگزوفیالا* UTMC 5043 توانایی حذف بیش از ۸۹ درصد نفت را از محیط دارا می باشد. در این راستا با توجه به پژوهش های قبلی انجام شده در حذف هیدروکربن های نفتی تاکنون گزارش های متعددی با تأکید بر توانایی جنس ها و گونه های متعدد قارچی در حذف ترکیبات نفتی گزارش شده است. از نمونه این پژوهش ها می توان به یک مخمر بازیدیومیستی که مصرف کننده آلکان اشاره نمود که قادر به تجزیه ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک متعددی به عنوان تنها منبع کربن و انرژی می باشد (۲۲).

همچنین کامیابی (Kamyabi) و همکاران در سال ۲۰۱٦ نشان دادند که گونه های مخمری جنس های *ساراکلادیوم* (*Saracladium*) و *کریپتوکوکوس* (*Cryptococcus*) توانمندی بالایی در حذف زیستی نفت خام و تولید ترکیبات فعال سطحی داشته و در کشت همزمان آن اثرات افزایشی در حذف گزارش شد (۱۷). شایان یادآوری است که تحقیقات زیادی بر روی باکتری های تجزیه کننده نفت خام نیز انجام شده است. به عنوان نمونه در مطالعه ای مشابه اسدی راد (Assadirad) و همکاران در سال ۲۰۱٦ نشان دادند که باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس* می تواند در مدت زمان ۳۰ روز تقریباً ۸۹ درصد از نفت خام را در غلظت ۳ درصد حذف نماید (۲۳).

بررسی توان حذف سه هیدروکربن آروماتیک چند حلقه ای (فنانترن، آنتراسن و پیرن) در سویه FA14 نشان داد که این جدایه سویه قابلیت حذف هر یک از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای را به میزان قابل توجهی دارد. به طوری که در مدت ١٤ روز می توانست فنانترن را حدود ۹۷ درصد، آنتراسن ۵۷ درصد و پیرن ۹۵ درص از محیط حذف کند. این نتایج با یافته های سایر محققان در این زمینه هم خوانی دارد. چنانچه رومرو (Romero) و همکاران در تحقیق بر روی برخی

از هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با وارد کردن غلظتی معادل نصف غلظت هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای استفاده شده در این پژوهش به نتایج مشابهی دست یافتند (۱۶). بر اساس نتایج به دست آمده در آزمون ها و سنجش های مختلف توانایی سویه یاد شده در حذف نفت و هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای به اثبات رسید و می توان از این قابلیت در زیست پالایی مناطق آلوده استفاده نمود. در پژوهش های مختلف انجام شده بر روی تجزیه هیدروکربن های پلی آروماتیک توسط قارچ ها و مخمرها، مشخص شده است که این دسته از میکروارگانیسم ها، توانمندی بالایی در تجزیه زیستی ترکیبات پلی آروماتیک دارند. مطالعه بر روی قارچ های جداشده از زمین های آلوده به ترکیبات نفتی نشان می دهد که کپک های جنس *آلترناریا*، *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنی سیلیوم* و مخمرهای *کریپتوکوکوس*، *بازیدوآسکوس* و *ساراکلادیوم* توانمندی استفاده از ترکیات PAHs را دارند (۱۷، ۲۶-۲۴). بر این اساس مطالعه حاضر اولین گزارش از معرفی گونه های بومی جنس *اگزوفیالا* در استفاده از PAHs با توانمندی بالا را معرفی می نماید.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج به دست آمده در این پژوهش برای اولین بار گونه مخمری *اگزوفیالا* با ویژگی نفت‌خواری از خاک‌های بومی ایران معرفی گردید. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که این سویه در مدت زمان حدود دوهفته تقریباً حذف کاملی از فنانترن، آنتراسن و پیرن در غلظت ppm ۱۰۰ را دارد. با توجه به توانایی این سویه در حذف زیستی نفت خام و هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و عدم گزارش آن به عنوان عامل زیستی ترکیبات PAHs این جدایه می‌تواند کاندید مناسبی به منظور پاک سازی خاک و پساب آلوده به هیدورکربن های آروماتیک نفتی باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به دلیل همکاری صمیمانه و تامین بخشی از هزینه های اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

References

1. Ron EZ, Rosenberg E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. Curr Opin Biotecnol. 2014; 27:191-194.
2. Mohanty S, Jasmine J, Mukherji S. Practical considerations and challenges involved in surfactant enhanced bioremediation of oil. BioMed Res Int. 2013; doi:10.115/2013/328608.
3. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresour Technol. 2017; 223: 277-286.
4. Singh H. Mycoremediation: fungal bioremediation. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA; 2006.
5. Mohsenzadeh F, Chehregani Rad A, Akbari M. Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. Iran J Environ Health Sci Eng. 2012; 9(1): 26-35.
6. Singh A, Ward OP. Biodegradation and bioremediation. Springer-Verlag, Berlin, Heidelbberg; 2004.
7. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an

overview. Biotechnol Res Int. 2011; doi:10.4061/2011/941810.

8. Gargouri B, Mhiri N, Karray F, Aloui F, Sayadi S. Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading yeast strains from petroleum contaminated industrial wastewater. Biomed Res Int. 2015; doi: 10.1155/2015/929424.

9. Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. 5th Ed. Elsevier Science, Amesterdam; 2011.

10. Eriksson M, Dalhammar G, Borg-Karlson AK. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. Appl Micro Biotechnol. 2000; 53(5): 619-626.

11. Pasumarthi R, Chandrasekaran S, Mutnuri S. Biodegradation of crude oil by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia fergusonii* isolated from the Goan coast. Mar Pollut Bull. 2013; 76 (1): 276-282.

12. Rinaldi MG. Use of potato flakes agar in clinical mycology. J Clinical Microb. 1982; 15(6): 1159-1160.

13. Rahman K, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresour Technol. 2002; 85(3): 257-261.

14. Dritsa V, Rigas F, Natsis K, Marchant R. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. Bioresour Technol. 2007; 98(9): 1741-1747.

15. Behnood M, Nasernejad B, Nikazar M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J Ind Eng Chem. 2014; 20(4): 1879-1885.

16. Romero MC, Salvioli ML, Cazau MC, Arambarri AM. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. Env Pollution. 2002; 117(1): 159-163.

17. Kamyabi A, Nouri H, Moghimi H. Synergistic effect of *Sarocladium* sp. and *Cryptococcus* sp. co-culture on crude oil biodegradation and biosurfactant production. Appl Biochem Biotechnol. 2017; 182(1): 324-334.

18. Srujana K, Khan AB. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading soil microbes from automobile workshop sediments. J Env Sci Technol. 2012; 5(1): 74-83.

19. Moghimi H, Tabar RH, Hamedi J. Assessing the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and laccase production by new fungus Trematophoma sp. UTMC 5003. World J Microbiol Biotechnol. 2017; 33(7): 136.

20. Bento FM, Camargo FA, Okeke BC, Frankenberger WT. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. Bioresour Technol. 2005; 96(9): 1055-1049.

21. Atagana HI, Haynes R, Wallis F. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. Water, air, soil Pollut. 2006; 172(1): 201-219.

22. Middelhoven WJ, Scorzetti G, Fell JW. T*richosporon veenhuisii* sp. nov., an alkane-assimilating anamorphic basidiomycetous yeast. Int J Syst Evol Microb. 2000; 50(1): 381-387.

23. Assadirad MHA, Assadi MM, Rashedi H, Nejadsattari T. Isolation and phylogenetic analysis of indigenous oil-degrading bacteria from soil of Karoon area in Ahvaz. J Microb World. 2016; 9(3): 236-246. [In Persian]

24. Aranda, E. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. Curr Opin Biotechnol. 2016; 38: 1-8.

25. Zhang JH, Xue QH, Gao H, Ma X, Wang P. Degradation of crude oil by fungal enzyme preparations from *Aspergillus* spp. for potential use in enhanced oil recovery. J Chem Technol Biotechnol. 2016; 91(4): 865-875.

26. Simister RL, Poutasse CM, Thurston AM, Reeve JL, Baker MC, White HK. Degradation of oil by fungi isolated from Gulf of Mexico beaches. Mar Pollut Bull. 2015; 100(1): 327-333.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 2, June 2018

Original Article

Crude oil and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) biodegradation by *Exophiala* sp. UTMC 5043

Farahnaz Akbarzadeh[1], Hamid Moghimi[2], Shamsozoha Abolmaali[3], Javad Hamedi[4]

[1]M.Sc. student, Department of Biotechnology, Faculty of New Science and Technology, Semnan University, Semnan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.
[3]Assistant Professor, Faculty of Basic Science, Department of Biology, Semnan University, Semnan, Iran.
[4]Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Today, crude oil products are one of the most widely used chemicals in the world. Daily, large volumes of crude oil and their derivatives are poured into the environment. The aim of this study was to isolate and evaluate Iranian indigenous yeast strains for the purpose of bioremediation of crude oil pollutants.

Materials & Methods: Soil samples were collected from different oil-contaminated areas of Iran. The samples were cultured for 14 days on Bushnell Hass medium containing 0.5 % crude oil and 100 mg l^{-1} tetracycline. The crude oil degradation was measured by TPH assay at 420 nm. Removal of 100 ppm of phenanthrene, anthracene, and pyrene as model polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was studied using HPLC method. The superior yeast strain was identified by *ITS* gene sequencing and alignment in the NCBI database.

Results: Totally, 47 yeast strains were isolated. TPH assay showed that FA14 isolate with 89% degradation rate within 14 days was the most powerful isolate in the removal of PAHs. *ITS* gene sequencing followed by alignment in NCBI indicated that FA14 belongs to the genus *Exophiala* sp., showing 99% similarity. Furthermore, the results indicated that within 14 days phenanthrene, anthracene, and pyrene were degraded by FA14 with the rate of 97.67 %, 57.0 %, and 95.38 %, respectively.

Conclusion: Our results showed that *Exophiala* sp. has a high ability for biodegradation of crude oil and PAHs. Therefore, it could be introduced as a potent strain for bioremediation of oil-contaminated soil samples.

Keywords: Anthracene, Pyrene, Bioremediation, Phenanthrene, *Exophiala.*

Correspondence to: Hamid Moghimi

Tel: +98 21 66415495

E-mail: hmoghimi@ut.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 11(2): 188-198.