Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 4 (02-2016)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Evaluation of crude oil biodegradation by *Phaeosphaeria* spp. UTMC 5003

Hamid Moghimi[1,2], Rezvan Heidarytabar[1,2] , Javad Hamedi[1,2]

1. Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

2. Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran.

Article Information

Article history:
Received: 2015/07/29
Accepted: 2015/12/12
Available online:2016/01/10

Article Subject:
Microbial Biotechnology

IJMM 1394; 9(4): 63-72

Corresponding author at:
Dr Hamid Moghimi

Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran | Microbial Technology and Products Research Center, University of Tehran, Tehran, Iran.

Tel:
+98 21 66415081
Email:
hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract

Background and Aim: Environmental pollution by petroleum compounds have turned into one of the global concerns. The aim of the present research was evaluation of the indigenous fungal strains of Iran to remove crude oil pollutants.

Materials and Methods: First, the contaminated soil samples were collected. The samples were enriched in minimal salts medium (MSM) medium with 1% crude oil and chloramphenicol for 3 weeks and the isolates were purified. The crude oil degradation was measured by total petroleum hydrocarbon (TPH) assay method at 420 nm. In order to confirm the amount of oil degradation by selected isolate, the residual hydrocarbon content was evaluated by FTIR. Laccase activity in the presence of 1% crude oil was measured. Finally, the selected isolate was identified using morphological and molecular methods.

Results: In this study 30 fungal strains were isolated. The isolate G-05 was selected as a premium isolate by TPH test. This strain showed that 66% degradation of petroleum hydrocarbons after 15 days. Residual crude oil analysis with FTIR spectrophotometry showed that G-05 is able to degrade 90% of aliphatic compounds. Evaluation of laccase activity showed that this isolate can produced 1440 U/l of enzyme after 15 days. Presence of laccase activity in G-05 was showed that using of non-specific ligninolytic enzymes are the main mechanisms of oil hydrocarbons degradation in mentioned strain. The strain was identified as a member of Phaeosphaeria genus by molecular and morphological tests.

Conclusions: Fungi have high potential in bioremediation of contaminants such as crude oil pollutants; however, few studies have been carried out in this field. For the first time, the results of this study showed that Phaeosphaeria has a high potential in bioremediation of the oil contaminated soils.

Key Words: Fungi, Bioremediation, Crude oil, *Phaeosphaeria* spp.

Copyright © 2016 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Moghimi H, Heidarytabar R, Hamedi J. Evaluation of crude oil biodegradation by Phaeosphaeria spp. UTMC 5003. Iran J Med Microbiol. 2016; 9 (4) :63-72

www.SID.ir

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران
سال ۹ – شماره ۴– زمستان ۱۳۹۴
Journal homepage: www.ijmm.ir

ارزیابی تجزیه زیستی آلودگی های نفتی بوسیله سویه *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳

حمید مقیمی[۱،۲]، رضوان حیدری تبار[۱،۲]، جواد حامدی[۱،۲]

۱. بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲. مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فراورده های میکربی دانشگاه تهران، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۳/۰۶/۲۶
پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۶
انتشار آنلاین: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰
موضوع:
بیوتکنولوژی میکروبی
IJMM 1394; 9(4): 63-72

نویسنده مسئول:
دکتر حمید مقیمی

بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی و قطب تبار زایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران، مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فراورده های میکربی دانشگاه تهران، تهران

تلفن: ۰۲۱۶۶۴۱۵۰۸۱

پست الکترونیک:
hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: آلودگی محیط زیست با آلاینده‌های نفتی یکی از نگرانی‌های جهانی است. هدف از این پژوهش جداسازی و بررسی توانمندی قارچ‌های بومی ایران به منظور پاکسازی مناطق آلوده به ترکیبات نفتی می‌باشد.

مواد و روش ها: ابتدا نمونه های خاک آلوده به نفت جمع آوری و در محیط پایه حداقل نمک همراه با ۱٪ نفت خام و کلرامفنیکل به مدت سه هفته غنی سازی و جدایه ها خالص سازی شد. در ادامه توانمندی هر یک از جدایه ها از نظر میزان تخریب نفت خام با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی نفت (TPH) در ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. جهت تایید میزان حذف نفت، محتوای هیدروکربنی باقیمانده با روش FT-IR نیز بررسی شد. سپس فعالیت لاکازی جدایه منتخب ارزیابی گشت. در نهایت برترین جدایه از طریق ریخت شناسی و مولکولی شناسایی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه ۰۳ گونه قارچی جداسازی شد. تست TPH در این جدایه ها نشان داد که جدایه G-۰۵ با ۶۶٪ میزان حذف نفت طی ۵۱ روز توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن‌های نفتی می‌باشد. آنالیز FTIR نیز حاکی از حذف ۹۰٪ ترکیبات آلیفاتیک توسط این جدایه بود. همچنین ارزیابی فعالیت لاکاز نشان داد این جدایه قادر به تولید ۱۴۴۰ U/L آنزیم در انتهای روز ۱۵ می‌باشد. حضور آنزیم لاکاز در این جدایه نشان داد که استفاده از آنزیم های لیگنولیتیک و به صورت غیر اختصاصی مسیر تجزیه هیدروکربن های نفتی در این جدایه است. شناسایی‌های ریخت شناسی و مولکولی نشان داد که G-۰۵ متعلق به جنس *Phaeosphaeria* می‌باشد.

نتیجه‌گیری: با وجود توانمندی بالای قارچها در حذف زیستی آلاینده ها مطالعات کمی در این زمینه صورت گرفته است. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد جدایه *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ برای اولین بار در جهت حذف زیستی نفت به عنوان قارچی توانمند در پاکسازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در دنیا گزارش شده است.

کلمات کلیدی: قارچ، حذف زیستی، نفت خام، *Phaeosphaeria spp*

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آلودگی محیط زیست با نفت و محصولات پتروشیمی در دهه های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. امروزه نشت و گسترش آلودگیهای نفتی در اثر ناکارآمدی فرآیندهای استخراج، انتقال و پالایش و همچنین بروز سوانح در بخشهای مختلف صنعت نفت اعم از مناطق تولید نفت، پالایشگاه‌ها و خطوط حمل و نقل امری اجتناب ناپذیر است (۱). ورود ترکیبات نفتی به محیط زیست پیامدهای زیانباری از قبیل به خطر انداختن سلامت عمومی، آلوده‌سازی منابع طبیعی و آب‌های زیرزمینی و تهدید محیط زیست را به دنبال داشته است . بنابراین پاکسازی محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی امروزه به یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های زیست محیطی تبدیل شده است. برای پاکسازی محل‌های آلوده به نفت انواع متنوعی از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و زیستی ارائه شده است (۲). روش پاکسازی زیستی که به طور معمول شامل تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیر سمی با استفاده از فعالیت میکروارگانیسم‌ها است، فرایند بسیار امیدوار کننده‌ای برای تیمار آلودگی‌های نفتی به شمار می‌رود. پاکسازی زیستی در مقایسه با

www.SID.ir

سایر روشهای پاکسازی فیزیکی و شیمیایی، دارای مزایای اقتصادی و زیست محیطی فراوانی است؛ زیرا انرژی کمی نیاز دارد، از لحاظ اقتصادی به صرفه بوده، ساختار خاک را حفظ می‌کند و کمترین اثرات سوء را بر سلامت انسان و اکوسیستم‌ها به دنبال دارد (۳،۱). پاکسازی زیستی با استفاده از قارچها و مخمرها به علت وجود توانمندی‌های خاص موجود در این میکروارگانیسم‌ها و نیز برتری آن‌ها در برخی موارد نسبت به باکتری‌ها در پژوهش‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است (۴). قارچها با داشتن صفات خاص از جمله تولید سریع میسلیوم می‌توانند در بافت خاک رشد کرده و گسترش یابند و با افزایش سطح دسترسی زیستی به ترکیبات آلاینده موجب کاهش سمیت خاک شوند (۵). علاوه بر این قارچها دارای سیستم‌های آنزیمی بسیار کارامد و توانمند برای تولید و ترشح اختصاصی و غیر اختصاصی آنزیم‌هایی مانند آنزیم‌های لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز بوده و به کمک آنها می‌توانند طیف وسیعی از ترکیبات آلاینده موجود در نفت را تجزیه کنند (۶،۷). قارچها همچنین می‌توانند در محیطهای پرتنش مانند pH کم و محیط‌های غذایی فقیر نیز رشد کرده و در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های محیطی به خوبی بقاء داشته باشند (۸). تاکنون تحقیقات زیادی در جهت معرفی و شناسایی جدایه‌های توانمند در پاکسازی زیستی آلاینده‌های هیدروکربنی انجام شده است. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که توسط Mohsenzadeh و همکاران در سال ۲۰۱۲ انجام شد، از قارچهای *Alter-naria* spp. *Acromonium* spp. *Penicillium* spp. و *Aspergillus terreus* به منظور پاکسازی زیستی ترکیبات نفتی استفاده گردید (۹). به طور کلی، از جمله قارچهای رایجی که تاکنون برای حذف نفت و مشتقات آن توسط محققان گزارش شده است، می‌توان به جنس‌های *Penicil-lium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Pleurotus*, *Phanerochaete* , *Polyporus*, *Rhodotolura*, *Saccharomyces*, *Fusarium* و *Torulopsis* ,*Talaromyces* , *Trametes* اشاره نمود (۱۴، ۱۲، ۹، ۴ و ۱). به طور کلی بر اساس توانایی در معدنی‌سازی ترکیبات لیگنینی و پلی آروماتیک موجود در نفت قارچ ها به دو دسته‌ی اصلی طبقه‌بندی می‌شوند: شامل قارچهای لیگنولیتیک که بر روی چوب و بستر برگهای جنگل رشد می‌کنند. توانایی بازکردن و معدنی سازی حلقههای آروماتیکی لیگنین وترکیبات PAH با استفاده از آنزیمهای لیگنولیتیکی (لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز، لاکاز) از مشخصه‌های قارچهای لیگنولیتیک می‌باشد و قارچهای غیرلیگنولیتیک که اکثریت جمعیت‌های قارچی را تشکیل داده، بر روی چوب رشد نمی کنند. این قارچها سازوکارهای متفاوتی برای تغییر ترکیبات پلی آروماتیک نفت و سایر آلاینده‌ها دارند. در این میان بیان این نکته ضروری می‌باشد که برخی از قارچهای ریشه سفید مانند *Phanerochaete chrysosporium* و *Pleurotus ostreatus* هر دو مکانیسم را دارا می باشند (۱۰،۶).

با توجه به مطالب ذکر شده و توانایی قارچها در تجزیه زیستی ترکیبات نفتی، هدف از انجام این پژوهش در گام نخست غربالگری جدایه‌های قارچی توانمند از مناطق آلوده به آلاینده‌های نفتی در کشور بوده که در ادامه میزان حذف زیستی در جدایه‌ها بررسی و بهترین جدایه انتخاب و شناسایی و برای اولین بار گزارش شد. در نهایت سویه منتخب از نظر فعالیت آنزیمی لاکاز به عنوان یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در حذف ترکیبات نفتی با فعالیت بسیار بالا برای اولین بار در جنس *Phaeosphaeria* گزارش شد.

مواد و روش‌ها

جمع آوری نمونه

نمونه‌های خاک از ۴ منطقه شامل قم، پوند ۳ پالایشگاه نفت تهران، منطقه نفتی مارون و جزیره سیری جمع‌آوری شد. در هر جایگاه نمونه‌برداری، خاک آلوده در چند نقطه از عمق ۵ تا ۲۰ سانتیمتری برداشته و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه با الک ۰/۵ mm همگن شده و ذرات درشت آن جداسازی شد. در ادامه pH و هدایت الکتریکی خاک‌ها به منظور بررسی شوری خاک اندازه گیری و جهت جداسازی قارچها مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی قارچهای تخریب کننده ترکیبات نفتی

جدایه‌های قارچی موجود در نمونه‌های خاک با استفاده از دو روش غنی سازی (Enrichment technique) و کشت در پلیت (Spread plate technique) جداسازی و خالص‌سازی شد. برای این منظور در روش غنی‌سازی، جهت فعال‌کردن و سازگاری جمعیت‌های قارچی تخریب کننده‌ی ترکیبات نفتی خاک، از محیط تغییر یافته پایه‌ی نمکی (MSM) همراه با ۱٪ نفت خام سبک جزیره سیری به عنوان منبع کربن و ۵۰µg/ml کلرامفنیکل به منظور مهار رشد باکتریایی استفاده گردید (۱۰). ترکیبات این محیط کشت شامل(g/l): $NaNO_3$ (۲)، NaCl (۱)، $CaCl_2.2H_2O$ (۰/۱)، KH_2PO_4 (۳)، $MgSO_4$ (۳)، $Na_2HPO_4.12H_2O$ (۰/۲)، $FeSO_4.7H_2O$ (۰/۰۱)، KCl (۱) و عصاره مخمر(۰/۰۰۲). در یک لیتر آب مقطر دیونیزه، همراه با ۲ ml محلول عناصر جزیی شامل (g/l): $FeCl_3.6H_2O$ (۰/۰۸)، $ZnSO_4.H_2O$ (۰/۷۵)، $CoCl_2.6H_2O$ (۰/۰۸)، $CuSO_4.5H_2O$ (۰/۰۷۵)، $MnSO_4.H_2O$ (۰/۰۷۵)، $NaMoO_4.2H_2O$ (۰/۰۵)، H_3BO_3 (۱۵/۰) بود. pH اولیه پیش از اتوکلاو در حدود ۶/۸ ±۰/۲ تنظیم شد (۱۱). در این راستا در ارلن های ml ۱۰۰، g ۰/۲۵ از نمونه‌های خاک همگن شده به ml ۲۵ از محیط کشت غنی سازی (MSM) و ۱٪ نفت خام اتوکلاو شده و۵۰ µg/ml کلرامفنیکل افزوده و به مدت سه هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ °C و دور rpm ۱۸۰ گرماگذاری شد. بعد از این مدت µl ۱۰۰ از محیط غنی شده بر روی محیط

Archive of SID
www.SID.ir

کشت سیب زمینی دکستروز آگار(PDA) و سابرودکستروز آگار (SDA) دارای کلرامفنیکل و ۱٪ نفت خام پخش و به مدت دو هفته در انکوباتور گرماگذاری گشت. پس از این مدت جدایه‌های قارچی حاصله بر روی محیط کشت PDA خالص سازی شد.

علاوه بر روش ذکر شده از روش کشت گسترده در پلیت نیز برای جداسازی سویه‌های نفت‌خوار استفاده گردید. برای این منظور ابتدا از نمونه‌های خاک، رقت‌های 10^{-2}، 10^{-3}و 10^{-4} تهیه و سپس رقت‌های حاصله به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از همزن مخلوط و سپس سونیکاسیون نمونه‌ها توسط دستگاه (Elmasonic P) انجام شد. در نهایت ۱۰۰ µl از هریک از رقت‌ها بر روی محیط‌های PDA و SDA دارای ۵۰ mg/l آنتی بیوتیک همراه با ۱ درصد نفت خام انتقال داده شد و به طور یکنواخت در سراسر محیط کشت پخش شد. برای هر یک از نمونه‌های خاک در ۳ تکرار این عمل انجام گردید. در ادامه برای رشد قارچها، پلیت‌های حاصله در دمای ۲۸ ºC به مدت دو هفته در انکوباتور گرماگذاری شدند (۱۲). در نهایت جدایه‌های حاصله در محیط PDA جداسازی و خالص‌سازی گشت. جدایه‌های بدست آمده در هر دو روش برای ادامه تحقیقات در ۴ ºC نگه‌داری شد.

سنجش میزان حذف نفت

جهت تعیین توانمندی جدایه‌های حاصله در حذف نفت خام، ابتدا هر یک از جدایه‌ها با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی از طریق اسپکتروفتومتری ارزیابی و سپس ۱۵ جدایه برگزیده‌ی از این مرحله که دارای حداکثر فعالیت حذف بودند با استفاده از روش طیف سنجی FTIR جهت تایید میزان حذف و انتخاب برترین جدایه مورد سنجش قرار گرفتند(۱۴،۱۳).

سنجش کل محتوای هیدروکربنی با روش اسپکتروفتومتری

برای ارزیابی توانایی رشد و تخریب نفت‌خام جدایه‌های قارچی، از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی (TPH, Total petroleum hydrocarbon) بر اساس روش Rahman و همکاران استفاده شد(۱۳). برای این منظور هر یک از جدایه‌های قارچی به طور جداگانه به ارلن های ۵۰ میلی لیتری حاوی ml ۱۰ محیط کشت MSM همراه با ۱٪ نفت خام به عنوان تنها منبع کربن تلقیح و برای مدت ۱۵ روز در شیکر انکوباتور در دمای ºC ۲۸ و دور rpm ۱۸۰ گرماگذاری شد. در فواصل روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ محتوای هیدروکربنی باقیمانده موجود در ارلن ها با حلال تولوئن استخراج و بعد از سانتریفیوژ در ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه، میزان جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین شد. منحنی استاندارد با استفاده از از نفت خام رسم شده و میزان غلظت کل محتوای هیدروکربنی نمونه های تیمار شده‌ی با منحنی استاندارد و نیز نمونه شاهد (محیط کشت همراه با ۱٪ نفت و بدون قارچ) مقایسه گشت . آزمایش TPH در سه بچ مختلف و هر بچ در سه ارلن جداگانه برای هر جدایه انجام شد.

سنجش میزان حذف نفت با استفاده از طیف سنجی FTIR

در مرحله بعد با توجه به اینکه گروه‌های هیدروکربنی در $2930\ cm^{-1}$ و $2960\ cm^{-1}$ دارای جذب می‌باشند، میزان حذف نفت توسط جدایه‌های برگزیده‌ی حاصل از مرحله‌ی قبل توسط طیف سنجی FT-IR مورد بررسی و اندازه‌گیری دقیق قرار گرفت (۱۵). برای این منظور جدایه‌های قارچی برگزیده در محیط کشت PDB همراه با ۱٪ نفت خام کشت شده و در انتهای روز ۱۵ محتوای هیدروکربنی باقیمانده در محیط کشت با استفاده از حلال تتراکلرید کربن استخراج و با استفاده از سل مایع، طیف سنجی FT-IRانجام شد. میزان حذف نفت در هر یک از جدایه‌ها با توجه به نمونه‌ی شاهد تعیین شد (۱۴).

تعیین میزان رشد جدایه‌های قارچی

اندازه گیری وزن خشک میسلیوم‌ها به عنوان معیار میزان رشد جدایه‌های قارچی استفاده شد. برای این منظور زیست توده قارچی حاصله در محیط پایه نمکی و ۱٪ نفت خام بعد از اندازه گیری میزان حذف نفت، از محیط با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ جدا شده و به مدت یک شبانه روز در دمای ºC ۱۰۵ خشک گردید. سپس وزن خشک به دست آمده بر اساس گرم در لیتر گزارش شد (۱۴) .

ارزیابی توانایی تولید بیوسورفکتانت

برای تعیین توانایی تولید بیوسورفکتانت های کوچک مولکول، کشش سطحی محیط کشت نمونه های تیمار شده با قارچ اندازه گیری شد. برای این منظور کشش سطحی مایع رویی جدایه ی منتخب بعد از کشت در انتهای روز ۱۵ با استفاده از دستگاه تنسیومتر به روش حلقه‌ی دونوی(du Noüy) اندازه گیری شد. در هر بار اندازه گیری کشش سطحی آب مقطر و محیط کشت فاقد تلقیح نیز به عنوان شاهد سنجیده شد (۱۶).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی لاکاز

برای اندازه‌گیری فعالیت و میزان آنزیم لاکاز (EC ۱،۱۰،۳،۲) ، جدایه برگزیده در محیط کشت PDB دارای ۱٪ نفت کشت و بعد از گرماگذاری در دمای ۲۸ºC و ۱۸۰ RPM ، در روز ۵ و ۱۵ بعد از تلقیح میزان آنزیم تولید شده تعیین گشت. جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی لاکاز از سوبستراهای مختلفی استفاده می‌گردد. تمامی این سوبستراها پس از تاثیر آنزیم به مادهای تبدیل می‌شوند که در طول موج خاصی جذب نور دارند. با این حال از میان سوبستراهای مورد استفاده در سنجش این آنزیم سوبستری ۲و۲-

Archive of SID
www.SID.ir

آزینوبیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABT) از پرکاربردترین مواد جهت اندازه گیری و اثبات تولید لاکاز می باشد که در این تحقیق نیز به کار گرفته شد. این سوبسترا با اکسید شدن توسط آنزیم لاکاز به رادیکال کاتیونی تبدیل می شود که با تشکیل رنگ سبز در ۴۲۰ نانومتر جذب خواهد داشت (۲۶). برای این منظور محیط کشت حاوی قارچ به مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور سانتریفیوژ و مایع‌روئی حاصله برای سنجش فعالیت آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (۱۷). برای اندازه گیری میزان آنزیم تولید شده، اکسیداسیون ABTS و تشکیل رنگ سبز بررسی شد. مخلوط واکنش برای سنجش آنزیم شامل ۳۷۵ µl ،H2O µl ۱۲۵سدیم استات (با غلظت ۴۰۰ mM و pH= ۲/۵)، ۲۵۰ µl، ۲۵۰ µl ABTS به عنوان سوبسترای واکنش آنزیمی و ۲۵۰ µλ مایع تخمیر صاف شده بود. تولید و میزان آنزیم لاکاز با تشکیل رنگ سبز و با استفاده از اسپکتروفتومتر Shimadzu-UV ۱۶۰A، در طول موج ۴۲۰ نانومتر و در دمای ۳۰ °C اندازه گیری شد (۱۸). یک واحد فعالیت آنزیمی، حجم آنزیمی است که ۱ میکرومول از ABTS را در طی یک دقیقه در دمای آزمایش اکسید کند. تمامی واحد های حاصل بر حسب یونیت آنزیم بر لیتر گزارش گردید.

آمده بعد از خالص‌سازی از روی ژل جهت تعیین ترادف به شرکت (Macrogene, South Korea) ارسال شد. نتایج تعیین ترادف در بانک ژنی و از طریق هم‌ردیفی توالی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌های تخریب کننده‌ی نفت

در این مطالعه از ۴ منطقه‌ی آلوده به نفت نمونه برداری انجام و میزان شوری و pH نمونه ها اندازه گیری شد (جدول ۱). pH تمام نمونه ها خنثی و تنها نمونه جزیره سیری شور گزارش شد (جدول۱) در ادامه با کشت نمونه های مورد نظر، ۳۰ جدایه قارچی مختلف با ویژگی‌های ریخت شناسی متفاوت جداسازی و در محیط PDA خالص سازی گشت. جدایه‌های به دست آمده از خاک آلوده قم با منشأ آلودگی به صورت چشمه‌ی طبیعی نفت، با جداسازی ۱۴ جدایه با ظاهر متفاوت نسبت به سایر نمونه‌ها، تنوع قارچی بالاتری را نشان داد (جدول ۲). .

جدول۱: خاک‌های نمونه گیری شده از مناطق آلوده به نفت ایران و ویژگی‌های مربوط به هر خاک.

منطقه‌ی نمونه گیری	منبع آلودگی	EC (ms/cm)	pH
مارون	نشت نفت	۱/۴۸	۷
قم	چشمه‌ی طبیعی نفت	۱/۶۸	۷/۳۵
پوند ۳ پالایشگاه نفت تهران	محل پالایش فرآورده‌های نفتی	۰/۵	۷/۵
سیری	محل استخراج فرآورده‌های نفتی	۳	۷/۸۳

(۱۷).

شناسایی جدایه‌های قارچی

برای شناسایی جدایه‌های قارچی، ویژگی‌های ریخت شناسی آن‌ها از قبیل شکل میسلیوم، آرایش اسپورها، آرایش و رنگ کلنی و پیگمان های تولیدی، از طریق رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو و تهیه اسلاید کالچر و نیز با توجه به کلیدهای شناسایی ریخت شناسی مورد بررسی قرار گرفت (۱۹). به منظور شناسایی مولکولی ابتدا جدایه منتخب در محیط PDB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ °C گرماگذاری شد. سپس میسلیوم های قارچ با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. در ادامه از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست توده منجمد شده با استفاده از ازت مایع، سلول‌ها شکسته شد و DNA آن به روش استخراج با فنل-کلروفرم جدا سازی شد (۲۰). PCR با پرایمرهای nu-SSU-۰۸۱۷ و nu-SSU-۱۵۳۶ abf ترتیب با توالی ۵′-TTAGCATG-GAATAATRRAATAGGA -۳′ و ۵′-ATTGCAATG-CYCTATCCCCA-۳′ انجام گشت (۲). محصول به دست

سنجش میزان حذف نفت و رشد در جدایه ها

پس از خالص سازی، توانایی هر یک از جدایهها در میزان حذف نفت و میزان تولید زیست توده در طی مدت ۱۵روز در محیط کشت پایه‌ی نمکی دارای ۱٪ نفت بررسی شد. جدول ۲ نتایج به دست آمده از این مرحله را نشان می‌دهد. در این میان جدایهG-۰۵ با حدود ۶۶٪ حذف نفت خام و نیز تولید ۱۵ گرم در لیتر زیست توده خشک سلولی در طی مدت ۱۵ روز دارای بیش‌ترین توانایی حذف نفت و بیشترین توان در رشد سلولی در محیط پایه نمکی حاوی ۱٪ نفت خام بود (شکل ۱ و جدول ۲). همچنین بررسی حذف نفت خام توسط این جدایه در طی روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ نشان داد که G-۰۵ در طول ۱۵ روز گرماگذاری در محیط پایه نمکی شیب پایدار و ثابتی در حذف نشان داد. نتایج مربوط به درصد حذف نفت خام در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ در نمودار ۱ ارائه شده است. با توجه به نتایج بدست آمده، در ادامه به عنوان جدایه منتخب مورد سنجش و بررسی‌های فراتر قرار گرفت. نتایج حاصل از آنالیز FT-IR کشت جدایه G-۰۵ و مقایسه با نمونه‌ی شاهد و تیمار نشده نشان داد که G-۰۵ در محیط PDB قادر به

Archive of SID
www.SID.ir

جدول۱: قارچ‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به آلاینده های نفتی و تعیین مقدار حذف نفت و تولید زیست توده در روز ۱۵ توسط هر جدایه – G: نمونه های خالص‌سازی شده از قم، P: پوند ۳ پالایشگاه نفت تهران، S : جزیره سیری، M: منطقه نفتی مارون.

ردیف	شماره نمونه	وزن خشک (گرم/لیتر)	OD۴۲۰ (۱۵ روز)	درصد تجزیه نفت
۱	G-۰۱	۷	۰/۴۳۷	۳۷/۵٪
۲	G-۰۵	۱۵	۰/۲۴۷	۶۶٪
۳	G-۰۲	۹.۵	۰/۳۴۸	۵۰/۲۸٪
۴	G-۰۳	۶	۰/۶۷۷	۳٪
۵	G-۰۴	۲.۵	۰/۶۶۹	۴/۴٪
۶	G-۰۶	۵	۰/۴۲۴	۳۹/۴٪
۷	G-۰۷	۶	۰/۵۳۰	۲۴/۲٪
۸	G-۰۸	۱۰	۰/۳۸۰	۴۵/۷۱٪
۹	G-۰۹	۵	۰/۳۵۹	۴۸/۷۱٪
۱۰	G-۱۰	۷.۵	۰/۳۳۱	۵۲/۷۱٪
۱۱	G-۱۱	۸	۰/۲۸۹	۵۸/۷۱٪
۱۲	G-۱۲	۵	۰/۳۹۳	۴۳/۸۵٪
۱۳	G-۱۳	۹	۰/۳۰۳	۵۶/۷۱٪
۱۴	G-۱۴	۹	۰/۴۰۲	۴۲٪
۱۵	M-۰۱	۸.۵	۰/۲۹۰	۵۸٪
۱۶	M-۰۲	۶	۰/۵۱۳	۲۶/۶٪
۱۷	M-۰۳	۶.۴	۰/۳۹۰	۴۴٪
۱۸	M-۰۴	۳	۰/۴۶۰	۳۵/۵٪
۱۹	M-۰۵	۴.۳	۰/۴۰۱	۴۳/۵٪
۲۰	M-۰۶	۵	۰/۳۱۶	۵۵/۴۹٪
۲۱	M-۰۷	۷.۷	۰/۴۳۶	۳۸/۵۹٪
۲۲	M-۰۸	۴.۵	۰/۶۰۰	۱۵/۶٪
۲۳	P۳-۰۱	۸	۰/۴۵۲	۵۵/۲٪
۲۴	P۳-۰۲	۵	۰/۵۱۳	۲۷/۳٪
۲۵	P۳-۰۳	۶.۵	۰/۳۱۸	۵۷٪
۲۶	S-۰۱	۵	۰/۳۳۵	۵۲/۸٪
۲۷	S-۰۲	۹	۰/۴۹۷	۳۰٪
۲۸	S-۰۳	۷	۰/۵۰۵	۲۸٪
۲۹	S-۰۴	۸	۰/۳۰۰	۵۹٪
۳۰	S-۰۵	۱.۵	۰/۶۱۰	۱۴/۰۸٪

تجزیه و کاهش ۹۰ درصدی ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک است (شکل ۲). به این ترتیب که میزان جذب بعد از ۱۵ روز در طول موج $2960\ cm^{-1}$ با بیش از ۹۰٪ کاهش از ۱/۱۳ در نمونه شاهد به ۰/۱۱ و در طول موج $2930\ cm^{-1}$ با حدود ۸۸٪ کاهش از ۰/۷۷ به ۰/۹۰ رسیده است.

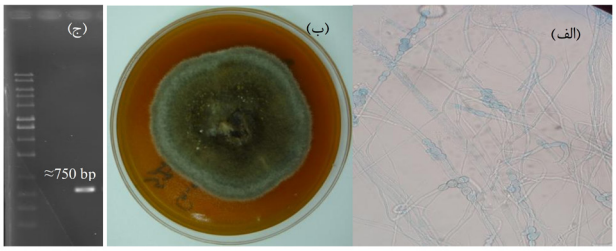
اندازه‌گیری میزان کشش سطحی

تولید ترکیبات فعال در سطح از جمله بیوسورفکتانت ها از جمله شاخص‌های میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده آلاینده‌های نفتی است . با توجه به اینکه کاهش کشش سطـــحی تا زیر

Archive of SID

www.SID.ir

تصویر شماره‌ی ۱: ارلن تیمار شده با جدایه G-۰۵ بعد از مدت ۱۵ روز در محیط کشت MSM به همراه ۱٪ نفت خام در مقایسه با نمونه شاهد بدون قارچ



تصویر شماره‌ی ۲: (الف) تصویر میکروسکوپی از G-۰۵ رنگ آمیزی شده با لاکتوفنل کاتن بلو (بزرگنمایی ۴۰۰) (ب) مورفولوژی کلنی *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ در محیط PDA، (ج) ژل الکتروفورز PCR ژل ۱۸s rRNA جدایه *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳

۴۰ mN/m را شاخص تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته می شود (۲۱)؛ آزمایش تولید بیوسورفاکتانت برای جدایه G-۰۵ نشان داد که این جدایه با کاهش کشش سطحی محیط کشت در محیط‌های PDB و MSM توانمند در تولید ترکیبات زیستی فعال در سطح بوده و کاهش کشش سطحی در محیط مشاهده می‌شود (جدول ۳). بر اساس نتایج بدست آمده جدایه G-۰۵ در محیط MSM قادر به کاهش کشش سطحی به میزان ۱۰ mN/m در مقایسه با نمونه شاهد بود (جدول۳).

اندازه گیری فعالیت آنزیم لاکاز

سنجش فعالیت آنزیم لاکاز با استفاده از سوبسترای ABTS، در روزهای ۵ و ۱۵ از کشت مایع تخمیر قارچی در محیط PDB همراه با ۱٪ نفت خام نشان داد که این سویه با تولید ۱۴۴۰ U/L، قادر به تولید مقدار بالایی آنزیم خارج سلولی لاکاز است (جدول ۴). نتایج به دست آمده از سنجش آنزیم در روزهای مختلف نشان داد که آنزیم تا روز ۵ تخمیر شیب تولید بالایی داشته و میزان تولید آنزیم به ۱۲۸۰ U/L رسیده، ولی با افزایش روزهای تخمیر سرعت تولید آنزیم کاهش می یابد.

شناسایی سویه‌ی منتخب

جدول۲: کشش سطحی قارچ G-۰۵ در محیط‌های سیب زمینی دکستروز آگار و پایه نمکی همراه با نفت.

میزان کشش سطحی(mN/m)	نمونه
۴۸/۰۶	PDB medium
۳۶/۳	محیط PDB همراه با ۱٪ نفت در حضور قارچ بعد از ۱۵ روز
۴۰/۳	محیط MSM همراه با ۱٪ نفت در حضور قارچ بعد از ۱۵ روز

جدول۳: سنجش فعالیت آنزیمی لاکاز در روزهای ۵ و ۱۵ بعد از تلقیح قارچ.

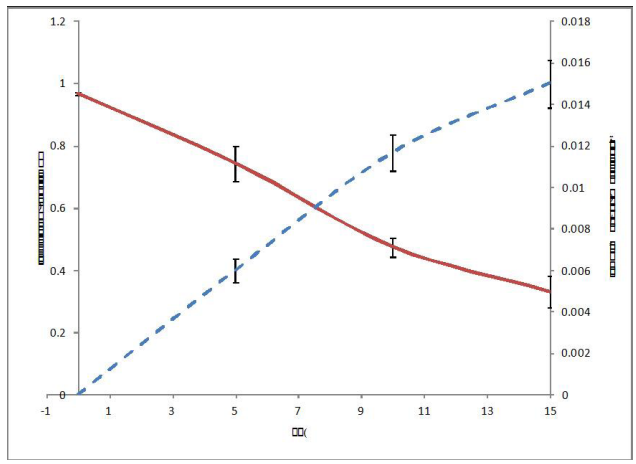
فعالیت آنزیمی (Unit of enzyme/liter)		نمونه
روز پانزدهم	روز پنجم	
۱۴۴۲ U/L	۱۲۸۰ U/L	سنجش آنزیمی در محیط PDB همراه با ۱٪ نفت خام

نتیجه انجام آزمایش های لازم برای شناسایی جدایه G-۰۵ در شکل ۲ نشان داده شده است. نتیجه بدست آمده از PCR و تعیین ترادف ژن ۱۸S rRNA و مقایسه‌ی توالی بدست آمده در بانک ژنی نشان داد که جدایه G-۰۵ با میزان شباهت ۹۹ درصد متعلق به جنس *Phaeosphaeria* است (شکل ۲). با توجه به اینکه این جدایه تاکنون به عنوان عامل زیستی حذف کننده‌ی ترکیبات نفتی گزارش نشده است می‌تواند به عنوان گزینه ارزشمند و مناسبی در جهت پاکسازی زمین‌های آلوده به نفت معرفی شود. این جدایه با کد *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت و نگهداری شد.

بحث

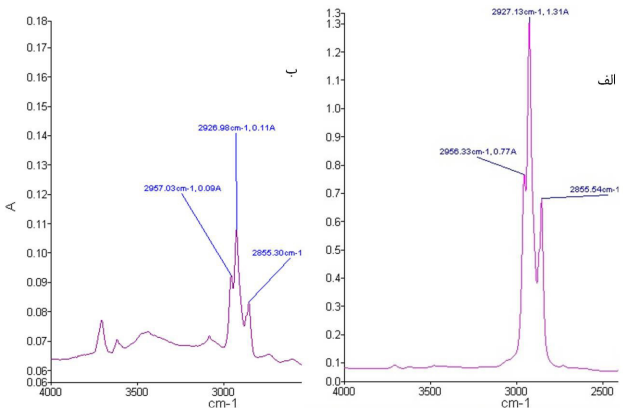
آلودگی محیط زیست با نفت و مشتقات حاصل از آن به ویژه در کشورهای تولیدکننده نفت به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است. توسعه روشهای پاکسازی زیستی با قابلیت کاربرد در محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی بسیار حائز اهمیت است (۱). اطلاعات موجود در خصوص تجزیه هیدروکربن‌ها توسط قارچها به عنوان یک عامل بسیار موثر و توانمند در حذف ترکیبات نفتی بسیار کم بوده و نیازمند بررسی‌های بیشتر در زمینه سازوکارهای حذف و تولید آنزیم‌های خارج سلولی در این گروه از میکروارگانیسم‌ها

Archive of SID
www.SID.ir



تصویر شماره‌ی ۳: نمودار حذف (خط) و تولید زیست توده (نقطه چین) توسط *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ در طی روز های مختلف بعد از تلقیح در محیط پایه نمکی و ۱٪ نفت به عنوان تنها منبع کربن

است (۲۲). نتایج حاصله از این تحقیق نشان می‌دهد که سمیت آلاینده‌های نفتی از رشد جدایه‌های قارچی 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. بنابراین از این ویژگی قارچها می‌توان در پاکسازی محیط‌های آلوده به ترکیبات نفتی بهره جست. نتایج حاصل از این تحقیق با یافته‌های سایر محققان در رابطه با دیگر قارچها مطابقت دارد (۲،۶). به عنوان مثال مطالعه روی قارچها جدا شده از زمین‌های آلوده به ترکیبات نفتی نشان داده است که گونه‌هایی از *Alternaria* spp. *Penicillium* spp و *Aspergillus spp.* از رایج‌ترین گونه‌ها در این مناطق محسوب می‌شوند (۹). هیدروکربن‌های نفتی توسط جدایه هایی از *Fusarium* نیز جذب شده و می‌توانند به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار گیرند(۲۳). در مطالعه دیگر انجام شده *Graphium putredinis* ، *Eupenicillium javanicum* و *Aspergillus flavipes* به عنوان جدایه های توانمند معرفی شدند که قادر به جذب بیش از ۴۰٪ هیدروکربن‌های اشباع و ۳۰٪ ترکیبات آروماتیک هستند (۲۴). نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان داد (نمودار۱) که *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ ظرف دو هفته توانایی حذف ۶۶٪ نفت خام را دارا می‌باشد. بررسی‌های FTIR نشان داد که بیش از ۹۰ درصد ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک بعد از گذشت دو هفته توسط *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ تجزیه شده‌اند (نمودار۲). با توجه به میزان تخریب ۶۶٪ بدست آمده در سنجش TPH چنین می‌توان عنوان کرد که بیشتر ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک در نفت تجزیه شده و ترکیبات پیچیده در نفت مثل رزین و آسفالتن کمتر توسط *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ مورد استفاده قرار گرفته است. نتایج بدست آمده از تولید بیوسورفکتانت توسط *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ در مقایسه با نمونه شاهد نشان می‌دهد که جدایه معرفی شده مولد ترکیبات فعال سطحی است ولی با توجه به اختلاف ۱۰



تصویر شماره‌ی ۴: طیف جذبی FTIR برای *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ : الف: طیف جذبی نمونه شاهد و ب: طیف جذبی در محیط کشت PDB همراه با ۱ درصد نفت. کاهش ۹۰ درصدی در طول موج $2930\ cm^{-1}$ و $2960\ cm^{-1}$ در نمونه تیمار شده نسبت به نمونه‌ی شاهد قابل مشاهده است

واحدی با نمونه شاهد میزان تولید بیوسورفکتانت توسط *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ قابل توجه نیست (جدول۳).

سنجش فعالیت‌های آنزیمی توسط میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده از جمله معیارهای انتخاب جدایه‌های توانمند است . در این پژوهش فعالیت آنزیم لاکاز به عنوان یک آنزیم موثر و پرکاربرد در پاکسازی زیستی مورد توجه قرار گرفت. فعالیت لاکازی تاکنون در جنس‌هایی متعلق به آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌های مانند *Aspergillus* ، *Curvularia* و *Penicillium* گزارش شده است (۲۵, ۲۶). Hidayat و همکاران از قارچ*Fusarium* در جهت تخریب زیستی ترکیبات آلیفاتیک نفتی میزان ۴۸/۸ U/L فعالیت آنزیماتیکی لاکاز را در طی ۲۰ روز گزارش کردند (۲۷) .

نتایج بدست آمده از تولید بیوسورفکتانت توسط *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد که جدایه معرفی شده مولد ترکیبات فعال سطحی بوده و قادر است به میزان قابل توجهی کشش سطحی محیط کشت را کاهش دهد. این نتیجه با یافته های سایر محققان در مورد اثبات تولید بیوسورفکتانت و تاثیر آن در افزایش حذف زیستی هم راستا می‌باشد. به عنوان مثال Gnanamani و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی پاکسازی زیستی آلودگیهای نفت‌خام با استفاده از جداسازی میکروارگانیسم‌های تولیدکننده‌ی ترکیبات فعال زیستی نشان دادند که تولید بیوسورفکتانت ارتباط مستقیمی با جذب سوبستراهای هیدروکربنی موجود در محیط داشته و موجب انجام موفق پاکسازی زیستی زمین‌های آلوده را رقم می‌زند .(۳۰)در مطالعه دیگر انجام شده در سال ۲۰۰۵ با غربالگری خاکهای جمع‌آوری شده از مناطق جنگلی برای یافتن جدای‌های با داشتن فعالیت آنزیمی لاکاز، سویه‌ی *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ را به عنوان جدایهای مثبت در تولید لاکاز بیان کردند که قادر به اکسیداسیون

www.SID.ir
Archive of SID

سریع سوبسترای ABTS می باشد (۲۶).

بر اساس پژوهش های انجام شده جنس *Phaeosphaeria* دارای کاربرد های متعددی در زیست فناوری است . به عنوان مثال این قارچ به عنوان یکی از مهم ترین تولید کننده ی انواع مختلفی از ژیبرلین مطرح می باشد(۲۸). علاوه بر این ازمحیط تخمیر این قارچ مواد فعال زیستی با خاصیت ضد میکروبی و ضد مایکوباکتریومی جداسازی و خالص سازی شده است (۲۹). با توجه به نتایج بدست آمده جدایه *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ با تولید U/L ۱۴۴۰ آنزیم لاکاز در طی ۱۵ روز در حضور محیط حاوی نفت در تولید این آنزیم بسیار توانمند گزارش می‌شود. بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش برای اولین بار *Phaeosphaeria* spp. UTMC ۵۰۰۳ با ویژگی نفت‌خواری با درصد حذف بیش از ۹۰ درصدی ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک از خاک‌های بومی ایران جداسازی و خالص‌سازی شده است. این سویه با توانمندی بالا در تولید آنزیم خارج سلولی لاکاز و به عنوان آنزیم اصلی در حذف هیدروکربن‌های نفتی می‌تواند در جهت پاکسازی زیستی خاک‌های آلوده به نفت و تولید آنزیم‌های ارزشمند و همچنین بررسی‌های تکمیلی ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان بدینوسیله از سرکار خانم دکتر فاطمه محمدی‌پناه به خاطر مساعدت و همکاری صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایند.

Reference

1. Gadd GM. Fungi in Bioremediation. Cambridge University Press: British Mycological Societ; 2001.

2. Megharaj M, Ramakrishnan B, Venkateswarlu K, Sethunathan N, Naidu R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. Environment international. 2011;37(8):1362-1375.

3. Mancera-López ME, Esparza-García F, Chávez-Gómez B, Rodríguez-Vázquez R, Saucedo-Castañeda G, Barrera-Cortés J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. International Biodeterioration & Biodegradation. 2008;61(2):151-160.

4. Mouhamadou B, Faure M, Sage L, Marçais J, Souard F, Geremia RA. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. Fungal Biology. 2013;117(4):268-274.

5. Pointing SB. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi :review. Appl Microbiol Biotechnol. 2001;57:20-23.

6. Obire ORP. Fungi in bioremediation of oil polluted environments. Sigma Xi Scientific Research Society. 2009.

7. Ferrari BC, Zhang C, van Dorst J. Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach. Frontiers in microbiology. 2011;2:217.

8. Leonardi V, Šašek V, Petruccioli M, D'Annibale A, Erbanová P, Cajthaml T. Bioavailability modification and fungal biodegradation of PAHs in aged industrial soils. International Biodeterioration & Biodegradation. 2007;60(3); 165-170.

9. 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. Iranian journal of environmental health science & engineering. 2012; 9(1); 26.

10. Zhang G-l, Wu Y-t, Qian X-p, Meng Q. Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. J Zhejiang Univ Sci B. 2005;6:725–730.

11. Sepahi AA, Golpasha ID, Emami M, Nakhoda AM. Isolation and charactrization of croude oil degrafing bacillus spp. Iranian journal of environmental health science & engineering. 2008;5:149-54.

12. Ekundayo FO, Olukunle OF, Ekundayo EA. Biodegradation of Bonnylight crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, Ondo state. Malaysian Journal of Microbiology. 2012;8(1):42-46.

13. Rahman KS, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil

Archive of SID
www.SID.ir

degradation by a mixed bacterial consortium. Bioresource technology. 2002;85(3):257-261.

14. Behnood M, Nasernejad B, Nikazar M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. Journal of Industrial and Engineering Chemistry. 2013.

15. Weisman W, Group TPHCW. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media: Amherst Scientific Publishers; 1998.

16. Dastgheib SM, Amoozegar MA, Khajeh K, Ventosa A. A halotolerant Alcanivorax sp. strain with potential application in saline soil remediation. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;90(1):305.

17. Acevedo F, Pizzul L, Castillo Mdel P, Cuevas R, Diez MC. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus Anthracophyllum discolor. Journal of hazardous materials. 2011;185(1):212-219.

18. Jonsson LJ, Saloheimo M, Penttila M. Laccase from the white-rot fungus Trametes versicolor: cDNA cloning of lcc1 and expression in Pichia pastoris. Current genetics. 1997;32(6):425-430.

19. Watanabe T. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species,Third Edition: Taylor & Francis; 2011.

20. Sambrook J. Molecular cloning : a laboratory manual / Joseph Sambrook, David W. Russell. Russell DW, Cold Spring Harbor L, editors. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

21. Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. Journal of microbiological methods. 2004;56(3):339-347.

22. Shankar S, Kansrajh C, Dinesh MG, Satyan RS, Kiruthika S, Tharanipriya A. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. Int J Environ Sci Technol. 2014;11(2):367-376.

23. Flippin RS, Smith C, Mickelson MN. Fusarium Growth Supported by Hydrocarbons. Applied Microbiology. 1964;12(2):93-95.

24. Oudot J, Dupont J, Haloui S, Roquebert MF. Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. Soil Biology and Biochemistry. 1993;25(9):1167-1173.

25. Scherer M, Fischer R. Purification and characterization of laccase II of Aspergillus nidulans. Archives of microbiology. 1998;170(2):78-84.

26. Junghanns C, Moeder M, Krauss G, Martin C, Schlosser D. Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. Microbiology (Reading, Englan) 2005;45-57.

27. Hidayat A, Tachibana S. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon in three types of crude oil by Fusarium sp. F092 under stress with artificial sea water. J Environ Sci Technol. 2012;5:64-73.

28. Kenmoku H, Oozone T, Sugai T, Sassa T. Mass production of pure gibberellin A1 by Phaeosphaeria sp. L487 and the fungal preparation of [U-13C] gibberellin A1. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2001;65(9):2095-2097.

29. Zhang C, Ondeyka JG, Zink DL, Basilio A, Vicente F, Collado J, et al. Isolation, structure, and antibacterial activity of phaeosphenone from a Phaeosphaeria sp. discovered by antisense strategy. Journal of natural products. 2008;71(7):1304-1307.

30. Gnanamani A, Kavitha V, Radhakrishnan N, Mandal AB. Bioremediation of Crude Oil Contamination Using Microbial Surface-Active Agents: Isolation, Production and Characterization. J Bioremed Biodegrad. 2010; 1(2):1-8.

Archive of SID

www.SID.ir