



تجزیه زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک و الیفاتیک سنگین توسط آسپرژیلوس کالیدوستوس

حسن قربان‌نژاد^۱، حمید مقیمی^{۲*}، سید محمد مهدی دستغیب^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش زیست‌فناوری میکروبی، ^۲ استادیار، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش زیست‌فناوری میکروبی، ^۳ استادیار، مرکز تحقیقات صنعت نفت ایران، تهران، گروه تحقیقاتی میکروبیولوژی و بیوتکنولوژی.

چکیده

سابقه و هدف: امروزه مشخص شده که قارچ‌ها و با تاکید بیشتر کپک‌ها توانایی قابل توجهی در حذف ترکیبات به خصوص هیدروکربن‌های سمی و سنگین دارند. هدف از این پژوهش بررسی توانمندی جدایه‌های کپکی در حذف آلاینده‌های نفتی و همچنین بررسی تاثیر ترکیبات فعال سطحی در افزایش کارایی تجزیه این ترکیبات بود.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های کپکی از خاک‌های آلوده به نفت منطقه سرخون استان هرمزگان جداسازی شدند. توانایی تجزیه نفت خام توسط این سویه‌ها در محیط پایه نمکی حاوی یک درصد نفت خام مورد سنجش قرار گرفت. سپس بهترین سویه به عنوان سویه برتر انتخاب و با استفاده از ژن ITS شناسایی گردید. میزان تجزیه زیستی ۵۰۰ ppm پیرن (هیدروکربن آروماتیک سنگین) و یک درصد تتراکوزان (هیدروکربن آلیفاتیک سنگین) توسط سویه منتخب بررسی شد. در نهایت میزان تجزیه این آلاینده‌ها در حضور رامنولپید (۰/۰۱ درصد) و توپین ۸۰ (۰/۲ درصد) بررسی گردید.

یافته‌ها: در مجموع از میان ۴۰ جدایه قارچی مختلف، سویه F11 بر اساس میزان تجزیه نفت خام به عنوان جدایه برتر انتخاب گردید. بر اساس شناسایی مولکولی سویه F11، شباهت ۹۹/۵۲ درصدی با آسپرژیلوس کالیدوستوس داشت. این سویه توانست در مدت زمان ۲۱ روز میزان نفت خام، پیرن و تتراکوزان را به ترتیب ۵۴/۵۹، ۵۱/۴۳ و ۵۸/۸۴ درصد کاهش دهد. همچنین میزان تجزیه نفت خام، تتراکوزان و پیرن در حضور رامنولپید به مقادیر ۷۰/۹۷، ۷۹/۴۴ و ۶۳/۷۷ درصد و در حضور توپین ۸۰ به مقادیر ۶۶/۸۸، ۷۴/۷۴ و ۶۰/۱۷ درصد افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که آسپرژیلوس کالیدوستوس توانایی تجزیه هیدروکربن‌های سنگین به میزان قابل توجهی دارد. همچنین سورفاکتانت‌ها می‌توانند میزان تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی را افزایش دهند. اما تاثیر این ترکیبات بر روی هیدروکربن‌های آلیفاتیک مانند تتراکوزان بیشتر از ترکیبات آروماتیک همچون پیرن بیشتر بود.

واژگان کلیدی: تجزیه زیستی، پیرن، تتراکوزان، رامنولپید، آسپرژیلوس کالیدوستوس.

پذیرش برای چاپ: مهر ماه ۹۶

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۶

مقدمه

خاک‌های سطحی در اثر مشکلات مربوط به حمل و نقل، می‌توانند به عمق خاک نیز نفوذ کرده و باعث آلودگی آب‌های زیرزمینی گردند (۲). نفت خام یک ترکیب پیچیده متشکل از انواع مختلف ترکیبات هیدروکربنی است که بسیاری از آن‌ها دارای اثرات مخرب و سمی روی محیط زیست و موجودات زنده هستند. ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای (Poly Aromatic Hydrocarbons=PAHs) از جمله ترکیبات

آلودگی‌های زیست‌محیطی و به ویژه آلودگی‌های وابسته به صنایع نفتی و پتروشیمیایی در طول دهه‌های اخیر، توجه زیادی را به خود معطوف کرده اند (۱). هیدروکربن‌های نفتی علاوه بر آلوده کردن هوا در اثر سوختن و همچنین آلودگی آب و

(* آدرس برای مکاتبه: تهران، پردیس علوم، دانشگاه تهران، بخش زیست‌فناوری میکروبی،
تلفن: ۰۲۱۶۶۴۱۵۴۹۵ پست الکترونیک: hmoghimi@ut.ac.ir

قارچی (Mycoremediation) است (۱ و ۷). در محیط‌های آبی هیدروکربن‌های نفتی حلالیت پایینی دارند. این حلالیت با افزایش وزن مولکولی و تعداد اتم‌های کربن کاهش پیدا می‌کند. همانطور که اشاره شد ترکیبات سنگین‌تر موجود در نفت خام به نسبت سایر ترکیبات دارای ماندگاری بیشتری در محیط زیست هستند. حلالیت پایین این ترکیبات موجب کاهش دسترسی زیستی و در نتیجه کاهش میزان تجزیه آن‌ها توسط ارگانسیم‌های زنده می‌گردد (۸). سولفورفکتانت‌های شیمیایی و بیوسورفکتانت‌ها به عنوان ترکیبات فعال سطحی، از طریق آمیزندگی هیدروکربن‌های موجود در نفت خام، موجب افزایش انحلال پذیری این ترکیبات در محیط‌های آبی می‌گردند. به دنبال بالا رفتن انحلال‌پذیری هیدروکربن‌های نفتی در آب، دسترسی زیستی ارگانسیم‌های زنده به این ترکیبات افزایش یافته و شرایط برای تجزیه و مصرف آن‌ها بهبود می‌یابد (۹). تحقیقات مختلفی در سطح ملی و جهانی در زمینه تجزیه ترکیبات نفت خام توسط میکروارگانسیم‌های مختلف انجام شده است. در سال ۱۹۴۶ زوبل (Zobell) برای اولین بار متوجه شد که بسیاری از میکروارگانسیم‌ها توانایی استفاده از هیدروکربن‌ها را به عنوان منبع کربن و انرژی دارا هستند. توانایی میکروارگانسیم‌های موجود در خاک برای پاکسازی هیدروکربن‌های نفتی بسیار متنوع بوده و طبق تحقیقات انجام شده قارچ‌های موجود در خاک ۶ تا ۸۲ درصد از ترکیبات آلاینده را تجزیه می‌کنند (۱۰ و ۱۱). در سال ۲۰۰۴، چالیان (Challian) و همکاران گونه‌های قارچی و مخمری مختلفی را از خاک‌های آلوده جداسازی کردند و اعلام نمودند که فعالیت قارچ‌های کپکی در خاک بیش از مخمرها و باکتری‌ها است. در سال ۲۰۰۶ نیز سینگ (Singh) دسته‌ای از قارچ‌های خاکی به نام‌های اسپرژیلوس (*Aspergillus*)، سفالوسپوریوم (*Cephalosporium*) و پنی‌سیلیوم (*Penicillium*) را جداسازی نمود که قادر به تجزیه بالای ترکیبات نفتی بودند. در میان قارچ‌ها دو جنس تریکودرما (*Trichoderma*) و مورتیرلا (*Mortierella*) فراوان‌ترین

سمی و سرطان‌زای موجود در نفت هستند که با افزایش وزن مولکولی، انحلال پذیری آن‌ها در محیط به شدت کاهش یافته و سرعت تجزیه آن‌ها کاهش چشمگیری پیدا می‌کند. با توجه به این مطالب یافتن راهی برای پاکسازی این ترکیبات سخت تجزیه پذیر اجتناب ناپذیر است (۳ و ۴). علاوه بر ترکیبات آروماتیک موجود در نفت خام، ترکیبات آلیفاتیک هم بخش قابل توجهی از نفت خام را تشکیل می‌دهند. این ترکیبات به نسبت به ترکیبات PAH سمیت کمتری هستند. اما آلیفاتیک‌های سنگین و میان وزن که تعداد اتم‌های کربن آن‌ها بیش از ۱۵ عدد است، به دلیل پایین بودن میزان انحلال و دسترسی زیستی، می‌توانند مدت زیادی در محیط باقی‌مانده و باعث بروز مشکلات جدی مانند تغییرات اکولوژی میکروبی محیط آلوده گردند. این پدیده بر زندگی‌های گیاهی و جانوری منطقه به شدت تاثیر گذار خواهد بود (۵). روش‌های متعددی توسط دانشمندان مختلف به منظور پاکسازی محیط‌های آلوده به آلاینده‌های نفتی معرفی شده است که از این میان می‌توان به روش‌های زیستی، شستشوی خاک به وسیله سولفورفکتانت و سوزاندن اشاره نمود. با توجه به اهمیت مسائل زیست محیطی و همچنین گستردگی فراوان آلودگی‌های نفتی، یافتن روش‌های ساده، سریع و ارزان قیمت بسیار ضروری می‌باشد (۶). بیشتر تحقیقات انجام شده در زمینه پاکسازی زیستی بر روی باکتری‌های تجزیه کننده هیدروکربن‌های نفتی بوده است. با این حال قارچ‌ها و با تاکید بیشتر کپک‌ها نیز با مکانیسمی متفاوت، توانایی قابل توجهی در حذف این ترکیبات به خصوص هیدروکربن‌های سمی‌تر و سنگین‌تر دارند. توانایی رشد در محیط‌هایی با شرایط ویژه مانند خشکی و سرما و نیز قابلیت تولید آنزیم‌های خارج سلولی متعدد از جمله نکاتی است که توجه دانشمندان را به استفاده از قارچ‌ها در پاکسازی زیستی آلاینده‌های مختلف، جلب کرده و قارچ‌ها را به مورد مناسبی برای استفاده در پاکسازی زیستی معرفی کرده است (۷). همچنین تولید ریشه‌های (*Hyphae*) رونده که باعث نفوذ میکروارگانسیم به مناطق عمقی و افزایش دسترسی می‌گردد از دیگر ویژگی‌های بارز استفاده از کپک‌ها در پاکسازی زیستی

ب) محیط کشت و شرایط رشد: برای جداسازی سویه‌های قارچی، یک گرم از خاک منطقه آلوده به ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژیک اضافه گردید و به مدت دو ساعت در شیکر با دور rpm ۱۲۰ هم زده شد. سپس به منظور غنی سازی جدایه های توانمند در حذف نفت، ۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی باشنل هاس (مرک، آلمان) شامل (g/l) : $(\text{MgSO}_4 (0/2))$ ، $(\text{CaCl}_2 (0/02))$ ، $(\text{K}_2\text{HPO}_4 (1))$ ، $(\text{NH}_4\text{NO}_3 (1))$ و $(\text{FeCl}_2 (0/05))$ و یک گرم نفت خام به عنوان تنها منبع کربن افزوده شد و در دمای 28°C و دور شیکر rpm ۱۲۰ گرماگذاری گردید. پس از رسیدن OD_{600} به $0/4$ (توسط دستگاه طیف سنج نوری Rayleigh مدل UV160 ساخت آمریکا)، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط بر روی پلیت‌های حاوی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) (Ibresco، ایران) انتقال داده شد و به مدت ۵ روز در دمای 28°C گرماگذاری شدند. جدایه‌های قارچی بر روی محیط PDA خالص سازی شدند (۵).

ج) غربالگری جدایه‌های کپکی تجزیه کننده نفت خام: به منظور غربالگری اولیه سویه‌های جداسازی شده با توانایی تجزیه نفت خام به عنوان تنها منبع کربن در محیط مایع پایه نمکی، روش سنجش کمی بر اساس میزان رشد در محیط باشنل هاس حاوی نفت خام صورت پذیرفت. جدایه‌های قارچی خالص شده به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط باشنل هاس به همراه یک درصد گلوکز به عنوان پیش‌کشت اضافه شدند و در دمای 28°C و دور شیکر rpm ۱۲۰ گرماگذاری شدند. پس از گذشت حدود ۲۴ ساعت از گرماگذاری و رسیدن OD_{600} نمونه‌ها به $0/6$ ، یک میلی‌لیتر از کشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۴۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. روماندر دور ریخته شد و رسوب حاصل سه بار به وسیله سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و مجدداً به کمک سرم فیزیولوژیک به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. سوسپانسیون سلولی نهایی به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط باشنل هاس و یک درصد نفت اضافه شدند و به مدت ۷ روز در دمای 28°C و دور شیکر rpm ۱۲۰ گرماگذاری شدند.

جنس‌های موجود در میان خاک‌های آلوده به نفت هستند و در کنار آن‌ها دو جنس آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم نیز به فراوانی از محیط‌های خاکی و هم محیط‌های آبی جدا شده‌اند (۱۲). در پژوهشی که در سال ۲۰۱۳ توسط بلاجی (Belaji) و همکاران انجام شد قارچ‌های مختلف با توانایی تولید آنزیم‌های برون سلولی جهت تجزیه ترکیبات PAH نفتی جداسازی شدند. در این تحقیق ۲۱ گونه قارچی توانمند در زمینه تجزیه ترکیبات PAH مربوط به ۹ خانواده قارچی مختلف از خلیج مکزیک جداسازی گردید (۱۳).

همچنین محسن‌زاده (Mohsenzadeh) و همکاران (۱۴) و چراغی راد (Cheraghi Rad) و همکاران (۱۵) در تحقیقات خود گونه‌های قارچی متفاوتی را از مناطق ریزوسفری گیاهان رشد یافته در مناطق آلوده به نفت جداسازی نمودند. هدف از این مطالعه جداسازی یک جدایه قارچی با توانایی بالا در تجزیه هیدروکربن‌های سنگین و سخت تجزیه پذیر نفت خام و نیز بررسی اثر استفاده از ترکیبات فعال کننده سطحی شیمیایی و زیستی بر تجزیه نفت خام و هیدروکربن‌های سنگین و مقایسه میزان اثر هر کدام از این ترکیبات در افزایش میزان تجزیه زیستی بود.

مواد و روش‌ها

الف) محل نمونه برداری: در این مطالعه مقطعی توصیفی به منظور دستیابی به میکروارگانیسم‌های کپکی با قابلیت بالا در تجزیه ترکیبات سنگین نفتی، از خاک منطقه سرخون واقع در استان هرمزگان، دارای آلودگی‌های قدیمی ۲۰ تا ۳۰ ساله استفاده گردید. تعداد ۵ نمونه مختلف از این منطقه تهیه شد. نمونه‌های ۱ و ۲ از خاک‌های مناطق آلوده قدیمی، نمونه‌های ۳ و ۴ از خاک آلوده اطراف میدان گازی و نمونه ۵ از منطقه زیر لجن‌های بسیار قدیمی گرفته شدند. برای این منظور از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری خاک میزان ۱۰۰ گرم خاک با بیلچه ضد عفونی شده داخل کیسه های پلاستیکی تمیز ریخته شد. نمونه ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شدند و تا زمان جداسازی در دمای 4°C نگهداری شدند (۱۶).

منتخب، در ابتدا با استفاده از روش کشت بر روی لام و رنگ لاکتوفنول کاتن بلو، ویژگی‌های مورفولوژیک و میکروسکوپی جدایه منتخب مورد بررسی قرار گرفت. روش کشت بر روی لام امکان بررسی ساختمان کامل قارچ‌ها به ویژه ساختار انتهایی هایف‌ها را بدون تخریب ساختاری زیر میکروسکوپ فراهم می‌نماید (۲۰). سپس برای شناسایی مولکولی، قطعه ITS مربوط به ژن DNA ریپوزومی به وسیله واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) و با استفاده از دو پرایمر ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') تکثیر گردید. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل شامل ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای F و R (غلظت ۱۰ pm)، ۱۲/۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase 2x master mix و ۱-۰/۱ میکرولیتر از DNA استخراج شده (غلظت ۱۰۰-۵۰ nm) انجام شد (۲۰). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Multigene، آمریکا) در ۳۰ سیکل به ترتیب واسرشت شدن اولیه در ۹۶ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه، واسرشت شدن در ۹۸ درجه سلیسیوس به مدت ۲۰ ثانیه، اتصال پرایمر در دمای ۵۸ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، طولی سازی ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت طولی سازی نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت (۲۱). در نهایت قطعه تکثیر شده برای توالی یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. شرایط واکنش PCR و همچنین مواد استفاده شده در این فرایند در دو جدول ۱ و ۲ آورده شده است. نتیجه‌ی توالی‌یابی محصول PCR قطعه‌ی ژنی ITS با پایگاه اطلاعاتی CBS مطابقت داده شد و گونه‌ی مربوط به جدایه‌ی منتخب مشخص گردید (۲۰). همچنین به منظور رسم درخت فیلوژنی ابتدا توالی‌های مربوط به جدایه برتر در بانک اطلاعاتی مربوطه (بانک اطلاعاتی CBS) بلاست شد. توالی سویه‌های نزدیک به جدایه که دارای توالی معتبر بودند به صورت فایل Fasta دانلود شدند و توالی سویه‌های دورتر از قسمت تاکسونومی مربوط به هر بانک گرفته شدند. این توالی‌ها در کنار هم توسط نرم افزار BioEdit

پس از این مدت جذب نوری مربوط به محیط حاوی هر کدام از جدایه‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی گردید. با توجه به میزان جذب نوری در این طول موج که بیانگر میزان رشد میکروارگانیسم‌هاست، بهترین جدایه‌ها انتخاب شدند (۱۷).
(د) بررسی حذف نفت خام توسط جدایه‌های قارچی: برای یافتن جدایه منتخب از میان جدایه‌های کپکی خالص‌سازی شده، توان این جدایه‌های کپکی در حذف نفت خام مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌های قارچی خالص شده به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط باشنل هاس به همراه یک درصد گلوکز و ۰/۱ درصد نفت به عنوان پیش‌کشت اضافه شدند و در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرماگذاری شدند. پس از رسیدن OD₆₀₀ نمونه‌ها به ۰/۶، یک میلی‌لیتر از هر پیش‌کشت به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید و سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و مجدداً با سرم فیزیولوژی به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. سوسپانسیون سلولی نهایی به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط باشنل هاس و یک درصد نفت خام اضافه شد و به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm گرماگذاری شد. پس از پایان زمان گرماگذاری به هر ارلن ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید و به مدت نیم ساعت بر روی شیکر با دور ۱۲۰ قرار داده شدند. نفت موجود در محیط توسط تولوئن استخراج گردید و به روش وزن سنجی، میزان نفت موجود مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). برای انجام وزن سنجی، نفت محلول در تولوئن، به یک ظرف شیشه‌ای تمیز که وزن خالی آن نوشته شده است انتقال یافت. پس از تبخیر شدن حلال و باقی‌ماندن بقایای هیدروکربن‌های نفت در ظرف، تفاوت وزن آن قبل و بعد از تست اندازه‌گیری شد و بدین ترتیب میزان نفت باقی‌مانده در هر ارلن محاسبه گردید. برای به دست آوردن درصد حذف، میزان نفت باقی‌مانده در هر ارلن با ارلن کنترل منفی که فاقد تلقیح بود، مقایسه شد (۱۹). در نهایت جدایه‌ای که بیشترین میزان حذف را داشت به عنوان سویه منتخب برای ادامه پژوهش مورد استفاده قرار گرفت.
(ه) شناسایی جدایه منتخب: برای شناسایی جدایه قارچی

توسط تولوئن، محلول آلی حاصل به ویال‌های شیشه‌ای تمیز انتقال داده شد. پس از تبخیر حلال در دمای اتاق، پیرن باقی‌مانده در یک میلی‌لیتر استونیتریل حل گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل به سیستم HPLC (مدل دستگاه: Agilent Technologies, USA) تزریق گردید و جداسازی کروماتوگرافی در ستون‌های ACE LiChrosorb C18 به ابعاد $250 \times 4/6 \text{ mm}$ و قطر ذرات $5 \mu\text{m}$ در دمای 28°C انجام پذیرفت. فاز مایع متحرک از مخلوط ۸۰:۲۰ آب مقطر و استونیتریل تهیه شد و میزان جریان فاز متحرک برابر 1 ml.min^{-1} بود. در نهایت میزان پیرن توسط شناساگر UV در 254 nm اندازه‌گیری گردید. شرایط تزریق نمونه‌های استاندارد پیرن برای رسم منحنی کالیبراسیون نیز همانند شرایط یاد شده بود. یک نمودار استاندارد با مقادیر ۲۵، ۵۰، ۷۵ و 100 ppm برای پیرن تهیه شد (۲۵).

ح) کروماتوگرافی گازی (GC) برای سنجش میزان تتراکوزان: پس از استخراج تتراکوزان باقی‌مانده مربوط به هر نمونه توسط هگزان، محلول آلی حاصل به ویال‌های شیشه‌ای تمیز انتقال داده شد و برای جلوگیری از تبخیر حلال در محل سرد و خنک نگهداری شد. تزریق نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی گازی shimidzu مجهز به ستون موئین اینوواکس به طول ۳۰ متر و قطر خارجی $0/25$ میلی‌متر و قطر داخلی $0/25$ میکرومتر انجام شد. دمای اولیه آون 100°C بود و پس از یک دقیقه با سرعت 20°C در دقیقه به دمای 320°C درجه رسید و به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰ ثانیه در این دما ثابت ماند. از گاز هلیوم با خروجی ثابت یک میلی‌لیتر بر دقیقه به عنوان گاز حمل استفاده شد. حجم تزریق ۱ میکرولیتر و دمای تزریق 250°C بود. نوع دکتور دستگاه یونیزاسیون شعله‌ای (Flame Ionization Detector: FID) بود. شرایط تزریق نمونه‌های استاندارد تتراکوزان برای رسم منحنی کالیبراسیون نیز همانند شرایط یاد شده بود. نمودار استاندارد با مقادیر $0/25$ ، $0/5$ ، $0/75$ و ۱ درصد برای تتراکوزان تهیه شد (۲۶).

ط) بررسی اثر استفاده سورفکتانت‌های شیمیایی و زیستی در افزایش بازده حذف زیستی: در این مطالعه از توپین-۸۰ به

هم‌تراز سازی شدند. سپس درخت فیلوژنی مربوطه توسط نرم افزار Mega 7 با الگوریتم neighbor-joining برای هم‌ردیفی و تعیین فاصله‌ها رسم گردید (۲۲).

و) بررسی حذف پیرن و تتراکوزان توسط جدایه قارچی منتخب: بدین منظور برای اضافه کردن تتراکوزان و پیرن (مرک، آلمان) در محیط مایع، محلولی با غلظت بالا (برای پیرن با غلظت 20000 ppm و برای تتراکوزان با غلظت ۲۰ درصد وزنی/حجمی) از هر کدام به ترتیب در دو محیط هگزان و استون تهیه گردید. سپس میزان مناسب از این محلول‌ها به هر ارلن افزوده شد. ابتدا برای تهیه پیش‌کشت مناسب، جدایه منتخب به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت باشنل هاس حاوی ۱ درصد گلوکز همراه با 100 ppm پیرن یا $0/1$ درصد تتراکوزان اضافه گشت و مانند مرحله قبل در دمای 28°C و دور 120 rpm شیکر گرماگذاری شدند. پس از رسیدن OD_{600} نمونه کشت اولیه جدایه منتخب به $0/6$ ، یک میلی‌لیتر از این کشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دور 4000 rpm سانتریفیوژ گردید. در ادامه سه بار با سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و مجدداً با سرم فیزیولوژی به حجم یک میلی‌لیتر رسانده شد. سوسپانسیون سلولی نهایی به ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط باشنل هاس همراه با 500 ppm پیرن یا یک درصد وزنی/حجمی تتراکوزان به عنوان منابع کربن اضافه گردید و به مدت ۲۱ روز در دمای 28°C و دور 120 rpm گرماگذاری شد. سپس نمونه‌های حاوی پیرن توسط ۱۰ میلی‌لیتر تولوئن و نمونه‌های حاوی تتراکوزان توسط ۱۰ میلی‌لیتر هگزان جداسازی شدند. میزان پیرن توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و میزان تتراکوزان توسط گاز کروماتوگرافی (GC) مورد بررسی قرار گرفتند. برای به دست آوردن درصد حذف میزان پیرن و تتراکوزان هر ارلن با نمونه شاهد منفی مربوط به خودش که تمام شرایط مشابه را طی کرده اما فاقد تلقیح میکروبی بود، مورد مقایسه قرار گرفت (۲۳ و ۲۴).

ز) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای سنجش تجزیه زیستی پیرن: پس از استخراج پیرن باقی‌مانده در هر ارلن

دست آمد. از این ۴۰ جدایه، ۲۱ جدایه در تمام مناطق نمونه برداری حضور داشتند. به منظور انجام غربالگری اولیه، توانایی هر یک از این جدایه‌ها در استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۲۲ جدایه قادر به استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی نبودند و در مقایسه با نمونه شاهد هیچگونه توانایی رشد از خود نشان ندادند. بنابراین از ادامه بررسی‌ها حذف شدند. ۱۱ جدایه نیز به مقدار کمی (کمتر از ۱۰ درصد) از نفت محیط را حذف کردند. در نهایت ۷ عدد از جدایه‌های کپکی که بالاترین توانمندی در رشد و حذف نفت خام را در این محیط از خود نشان دادند، برای ادامه کار انتخاب شدند. از میان ۷ جدایه نهایی، ۴ جدایه در تمام مناطق نمونه برداری حضور داشتند. یک جدایه تنها در منطقه ۵ و دو جدایه دیگر هم در دو منطقه ۱ و ۲ حضور داشتند.

ب) حذف نفت خام توسط جدایه‌های قارچی: نتایج مرحله قبل تعداد جدایه‌های مورد بررسی را از ۴۰ عدد به ۷ عدد کاهش داد. در نهایت برای به دست آوردن جدایه کپکی منتخب برای انجام ارزیابی‌های تکمیلی، توان این ۷ جدایه کپکی در تجزیه یک درصد نفت خام در محیط پایه نمکی با شغل هاس مورد بررسی قرار گرفت. نمودار ۱ نشان دهنده میزان حذف هر یک از این جدایه‌های مختلف است. همانطور که مشخص است، جدایه F11 با ۵۵/۵۹ درصد، بیشترین میزان حذف نفت خام را از خود نشان داد. به همین دلیل این جدایه برای ادامه آزمون‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

ج) شناسایی جدایه منتخب: برای شناسایی سویه منتخب (F11) ابتدا نتایج مربوط به شناسایی میکروسکوپی و کشت بر روی اسلاید شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به تصویر میکروسکوپی حاصل از کشت بر روی اسلاید شیشه‌ای، ساختار کلوملا و کندیوسپورهای جنس اسپرژیلوس به وضوح مشاهده شد (شکل ۱).

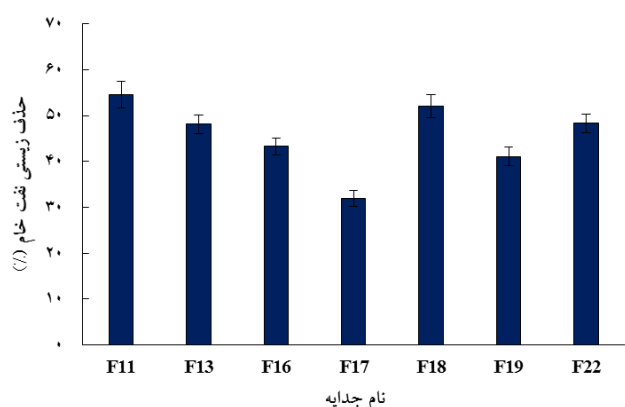
در ادامه به منظور تشخیص قطعی جدایه مورد نظر و شناسایی مولکولی، توالی قطعه‌ی ITS مربوط به جدایه منتخب با پایگاه اطلاعاتی CBS مطابقت داده شد که نشان دهنده شباهت

عنوان یک سورفکتانت شیمیایی و رامنولیبید به عنوان یک ماده فعال سطحی زیستی برای بررسی اثر این مواد در بهبود فرایند پاک‌سازی زیستی استفاده شد. کشت‌های این مرحله برای تمام موارد تجزیه زیستی نفت خام، پیرن و تتراکوزان در حضور ۰/۲ درصد (وزنی/حجمی) تویین-۸۰ و ۰/۰۱ درصد (وزنی/حجمی) رامنولیبید به صورت مجزا در شرایط کاملاً مشابه با آزمون‌های پیشین، شامل تهیه کشت اولیه مناسب و کشت در دمای ۲۸ °C و دور شیکر ۱۲۰ rpm به مدت ۲۱ روز انجام شد. در این مطالعه میزان استفاده شده از دو سورفکتانت تویین-۸۰ و رامنولیبید با توجه به مقادیر بهینه اعلام شده توسط چن (Chen) و همکاران و لای (Lai) و همکاران انتخاب شد (۲۷ و ۲۸).

ی) بررسی‌های آماری: نتایج به دست آمده از آزمون‌های مختلف با استفاده از نسخه بیست و دوم نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند. ارزیابی تجزیه زیستی در آزمون‌های مختلف به کمک آزمون آنالیز واریانس مقایسه شدند. در این مطالعه، مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ اختلاف آماری معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

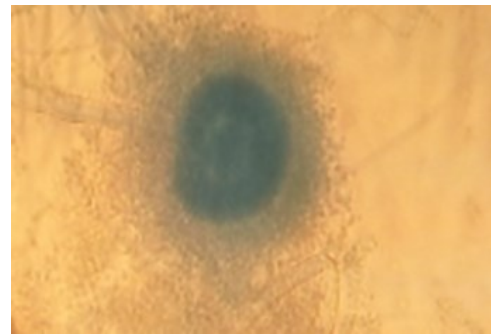
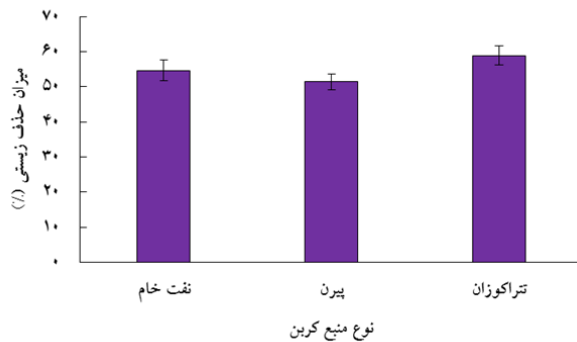
الف) ارزیابی رشد جدایه‌های کپکی در محیط نمکی حاوی نفت خام: پس از خالص‌سازی کپک‌ها از خاک منطقه آلوده، ۴۰ جدایه کپکی با مورفولوژی متفاوت در سطح پلیت‌های مختلف (برای هر منطقه نمونه برداری ۴ پلیت مختلف) به



نمودار ۱: میزان حذف نفت خام توسط جدایه‌های مختلف پس از ۲۱ روز.

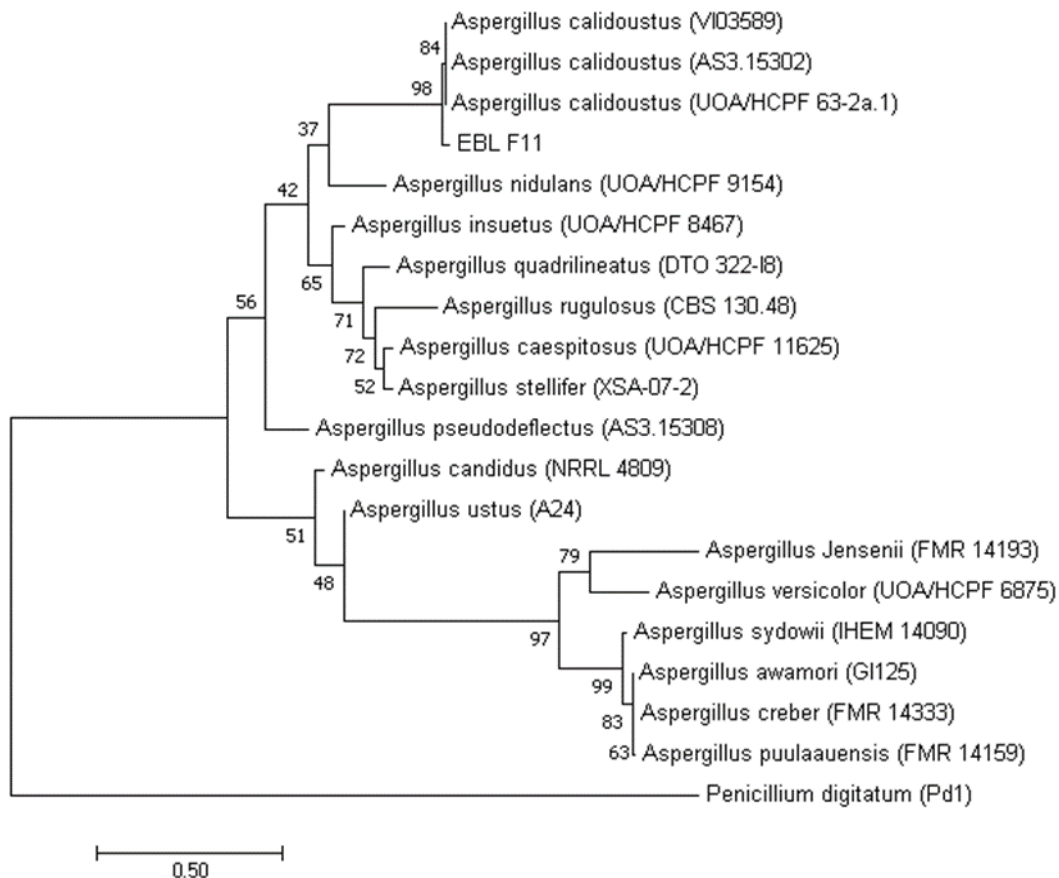
در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت گردید. (د بررسی توانایی حذف پیرن و تتراکوزان توسط *آسپرژیلوس کالیدوستوس*: در نمودار ۲ میزان حذف پیرن و تتراکوزان توسط *آسپرژیلوس کالیدوستوس* F11 با میزان حذف نفت خام توسط این کپک مقایسه شده است. نتایج نشان داد که میزان تجزیه

۹۹/۵۲ درصدی جدایه F11 با گونه *آسپرژیلوس کالیدوستوس* (*Aspergillus calidoustus*) بود. در نهایت درخت فیلوژنی مربوط به جدایه F11 با استفاده از الگوریتم neighbor joining و نرم افزار Mega 7 رسم شد (شکل ۲). این جدایه با نام *Aspergillus* sp. Strain F11 با شماره دسترسی KY565482



نمودار ۲: میزان تجزیه آلاینده‌های مختلف در طول ۲۱ روز توسط *آسپرژیلوس کالیدوستوس* F11.

شکل ۱: تصویر میکروسکوپی مربوط به جدایه منتخب با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰× و استفاده از رنگ لاکتوفنول بلو.



شکل ۲: درخت فیلوژنی حاصل برای سویه *آسپرژیلوس کالیدوستوس* F11 (EBL F11) با استفاده از پرایمرهای ITS، با الگوریتم neighbor joining و نرم افزار Mega 7.

تعداد بالای کربن و هیدروژن به شدت غیر قطبی بوده و انحلال پذیری پایینی دارند که موجب دسترسی کم میکروارگانیسم‌ها می‌شود. این عوامل باعث تجمع ترکیبات سنگین نفت خام و تشکیل لجن‌زارهای نفتی و تغییرات اکولوژیکی وسیع در محیط زیست می‌گردد. به همین دلیل یافتن روش‌هایی برای تجزیه و پاکسازی محیط از این دسته ترکیبات موجود در نفت خام بسیار حائز اهمیت است (۲۹).

انتخاب منطقه جداسازی مناسب، قدم مهمی برای دستیابی به سویه‌ای میکربی توانمند در تجزیه نفت خام و هیدروکربن‌های سنگین موجود در آن می‌باشد. تعدادی از مناطق آلوده نفتی موجود در ایران، دارای آلودگی‌های بسیار قدیمی با عمری بیش از ۲۰ سال هستند. در این مناطق هیدروکربن‌های سنگین موجود در نفت خام با گذشت سال‌ها متمادی تجمع یافته‌اند و به همین دلیل سویه‌های میکربی موجود در این مناطق برای تجزیه زیستی این دسته از هیدروکربن‌ها سازگار شده‌اند. به همین دلیل تحقیقات بسیاری مبنی بر جداسازی سویه‌های توانمند در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های سنگین از مناطق دارای آلودگی‌های بسیار قدیمی صورت گرفته است (۳۰).

به طور مثال در سال ۲۰۰۴ پوتین (Potin) و همکاران با استفاده از خاک دارای آلودگی قدیمی اطراف یک ایستگاه استخراج گاز که دارای تجمع بسیار بالای ترکیبات PAH سنگین، توانستند ۲۱ نوع قارچ مختلف را جداسازی کنند. از این میان دو قارچ فوزاریوم و کونیوتریوم از توانایی مناسبی به منظور تجزیه زیستی مخلوطی از ترکیبات PAH مختلف برخوردار بودند (۳۱). در مرحله غربالگری میکروارگانیسم‌های قابل کشت، ۲۲ کلنی خالص به دست آمد که فاقد فعالیت رشد بر روی محیط پایه نمکی دارای هیدروکربن بودند. در پژوهشی که در سال ۲۰۰۵ توسط آتانگانا (Atangana) و همکاران بر روی تجزیه ترکیبات PAH توسط قارچ‌ها انجام شد، از میان ۲۳ جدایه اولیه خالص‌سازی شده، تعداد ۸ جدایه غیر تجزیه کننده در کشت غنی سازی تهیه شده روی هیدروکربن حاصل شد (۳۲).

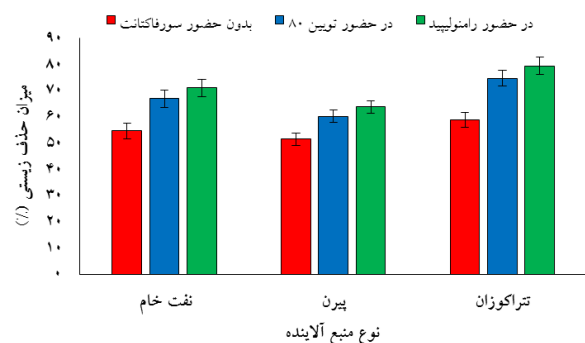
علاوه بر این حسن شاهیان (Hassanshahian) و همکاران نیز در تحقیقی که در سال ۲۰۱۲ انجام دادند، از کشت غنی سازی

زیستی پیرن توسط اسپرژیلوس کالیدوستوس F11 با ۵۱/۵۴ درصد به نسبت تراکوزان و نفت خام در مدت زمان و شرایط مشابه، که به ترتیب برابر با ۵۸/۸۴ درصد و ۵۴/۵۵ درصد است، مقدار کمتری را به خود اختصاص داده است.

مقایسه اثر توپین ۸۰ و رامنولیپید در افزایش تجزیه زیستی: در این پژوهش تاثیر سورفاکتانت شیمیایی توپین ۸۰ و رامنولیپید به عنوان یک بیوسورفاکتانت در تجزیه زیستی نفت خام، پیرن و تراکوزان مقایسه گردید. تاثیر استفاده از توپین ۸۰ (به میزان ۰/۲ درصد وزنی/حجمی) و رامنولیپید (به میزان ۰/۱ درصد وزنی/حجمی) در نمودار ۳ نشان داده شده است. این نمودار نشان دهنده تاثیر مثبت استفاده از مواد فعال سطحی در افزایش میزان تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی است. همانطور که در نمودار ۳ مشخص است تاثیر استفاده از رامنولیپید به عنوان یک بیوسورفاکتانت به نسبت توپین-۸۰ که یک سورفاکتانت شیمیایی است در مقدار بسیار کمتر (۱:۲۰) بسیار بیشتر بوده است.

بحث

در مناطقی که به طور دائم در معرض منابع آلاینده نفتی قرار دارند، هیدروکربن‌های سبک‌تر موجود در آلاینده‌ها معمولاً به سرعت به دلیل عوامل مختلفی مثل فراریت، تغییرات شیمیایی و یا فعالیت میکروارگانیسم‌های موجود در منطقه از بین می‌رود و ترکیبات سنگین‌تر که گاهی توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قابل تجزیه نیستند و همچنین به دلیل وزن مولکولی بالا و



نمودار ۳: میزان حذف زیستی نفت خام، پیرن و تراکوزان توسط اسپرژیلوس کالیدوستوس F11 در حضور و عدم حضور سورفاکتانت.

داده است که میزان تجزیه زیستی پیرن توسط اسپرژیلوس کالیدوستوس F11 در مقادیر بالاتر از ۵۰۰ ppm به شدت افت می‌کند. بر اساس پژوهش‌های انجام شده قبلی مشخص گردید که در شرایط محیطی یکسان، ترکیبات آلیفاتیک به نسبت ترکیبات آروماتیک چندحلقه به مقدار بیشتری تجزیه می‌شوند و اختلاف میزان تجزیه زیستی انجام شده بر روی ترکیبات آلیفاتیک با آروماتیک چند حلقه زیاد است (۳۵).

اما چون سویه اسپرژیلوس کالیدوستوس مورد استفاده خود از منطقه‌ای جدا شده که دارای آلودگی‌های متعدد و قدیمی نفتی است و در نتیجه مرور زمان و تجزیه ترکیبات سبک، دارای مقادیر زیادی ترکیبات سنگین نفتی بوده است، این جدایه برای تجزیه این دسته از ترکیبات سازگاری مناسبی داشت. پاکسازی محیط از ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای مانند پیرن به مراتب حساس‌تر و سخت‌تر از پاکسازی محیط از تراکوزان و سایر ترکیبات آلیفاتیک است. طبق اعلام العلوی (El-Alawi) و همکاران در سال ۲۰۰۲، پیرن و بنزوپیرن به نسبت تمام ترکیبات PAH دارای کمترین میزان حلالیت هستند (۳۶).

دیانا (Diana) و همکاران در سال ۲۰۱۵ به مقایسه حذف پیرن و فنانترن در غلظت ۵۰ ppm و مدت ۷ روز توسط ۵ جدایه مختلف قارچی و باکتریایی پرداختند. در نهایت مشخص گردید که سویه کپکی فوزاریوم FPyF3 بهترین توانایی را در حذف ترکیبات آروماتیک چند حلقه‌ای دارد (۵). دده (Dede) و همکاران نیز در تحقیق خود به بررسی حذف آلیفاتیک‌های نفت خام توسط یک جدایه‌ی کپکی پرداختند. نتایج آنها نشان داد که به طور کلی ترکیبات آلیفاتیک در مقایسه با سایر ترکیبات موجود در نفت خام سریع‌تر تجزیه می‌شوند و آلیفاتیک‌های زیر ۱۰ کربن تقریباً در ۵ روز اول به طور کامل تجزیه می‌شوند و در مدت ۳۰ روز حدود ۹۰ درصد کل آلیفاتیک‌های موجود در نفت خام تجزیه می‌شوند. اما این مقدار در مورد آلیفاتیک‌های بالاتر از ۲۰ کربن حدود ۵۰ درصد گزارش شد (۴).

با توجه به این مطلب می‌توان نتیجه گرفت که سویه اسپرژیلوی کالیدوستوس F11 توانایی مناسبی در حذف مشتقات نفتی

شده خلیج فارس ۶ سویه را جداسازی کردند. از این میان تنها دو جدایه مربوط به جنس یاروویا دارای توانایی تجزیه نفت خام بودند. دلیل این امر آن است که در محیط دارای آلودگی نفتی انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌ها به صورت مستقیم و غیرمستقیم در تجزیه ترکیبات آلاینده نفتی نقش دارند. از آنجایی که هر نوع خاص میکروارگانیسم تنها توانایی حذف تعداد محدودی از ترکیبات نفتی را دارد، وجود یک مجموعه از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده اثر بیشتری دارد (۳۳).

به عنوان نمونه میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده نفت با حمله مستقیم به ترکیبات نفتی و مصرف آن‌ها به عنوان منبع مغذی به فعالیت می‌پردازند. در کنار این گروه دسته‌ای از میکروارگانیسم‌ها وجود دارند که از مواد واسطه حاصل از تجزیه ناقص نفت توسط میکروارگانیسم‌های پیشین استفاده کرده و آن‌ها را به مواد ساده‌تری تجزیه می‌کنند. در میان این مجموعه‌های تجزیه کننده گروه دیگری از میکروارگانیسم‌ها وجود دارند که با تولید بیوسورفکتانت و انواع مواد فعال سطحی دسترسی بین ترکیبات نفتی و تجزیه کننده‌ها را افزایش می‌دهند (۳۴).

در این مطالعه پس از انجام غرباگری‌های اولیه و ثانویه، جدایه برتر انتخاب گردید. پس از شناسایی‌های مورفولوژیکی و مولکولی مشخص شد که جدایه مورد نظر شباهت ۹۹/۵۲ درصدی با اسپرژیلوس کالیدوستوس دارد. پس از بررسی سوابق تحقیقاتی که بر روی سویه‌های مختلف این گونه قارچی انجام شده است، مشخص گردید که تا کنون هیچ گونه گزارشی مبنی بر توانایی این گونه کپکی در تجزیه کپک‌ها اعلام نشده است. در هنگام بررسی توانایی تجزیه زیستی پیرن و تراکوزان به وسیله سویه اسپرژیلوس کالیدوستوس F11 یکی از نکات شایان توجه این است که مقادیر استفاده شده از تراکوزان در این پژوهش ۲۰ برابر بیشتر از پیرن بود. اما با این حال مقدار بیشتری از آن در طول فرآیند تجزیه حذف گشته است. این یافته می‌تواند نشان دهنده سمیت بالاتر، سخت تجزیه‌پذیر بودن یا دسترسی زیستی کمتر پیرن در مقایسه با تراکوزان باشد. همچنین آزمون‌های دیگر انجام شده در همین آزمایشگاه نشان

نشان داد. چن (Chen) و همکاران در سال ۲۰۱۳ اعلام کردند که تاثیر استفاده از رامنولپید بر روی هیدروکربن‌های موجود در نفت خام به صورت PAHs > biomarkers > n-alkans است (۲۸). این یافته با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارد.

نتیجه گیری

عملکرد مناسب اسپرژیلوس کالیدوستوس F11 جداسازی شده در این پژوهش در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های سنگین نفتی نشان می‌دهد که این جدایه می‌تواند در پاکسازی زیستی مناطقی که دارای آلودگی‌های بسیار قدیمی یا آلودگی با هیدروکربن‌های سنگین هستند، مورد استفاده قرار گیرد. از طرف دیگر دو سورفکتانت استفاده شده در این تحقیق عملکرد مناسبی در زمینه افزایش میزان تجزیه از خود نشان دادند. به طوری که رامنولپید میزان تجزیه پیرن، نفت خام و تراکوزان را به ترتیب در حدود ۲۴، ۳۰ و ۳۵ درصد افزایش داد که بسیار قابل توجه می‌باشد. نتایج به دست آمده در این مطالعه می‌تواند به استفاده از یک عامل زیستی در زیست پالایی مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی با آلودگی قدیمی کمک نماید.

تشکر و قدردانی

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

آروماتیک و آلیفاتیک دارد. در هنگام استفاده از رامنولپید و توپین ۸۰ در تجزیه زیستی نفت خام، پیرن و تتراکوزان، رامنولپید بیشترین میزان تاثیر مثبت را از خود نشان داد. این یافته نشان دهنده کارایی بالای این ترکیب دارد. علاوه بر این به دلیل پایه زیستی رامنولپید، این ترکیب زیست تخریب پذیر بوده و آلودگی ثانویه و سمیت خاصی برای آن گزارش نشده است. این نتایج به خوبی نشان دهنده تاثیر بالاتر رامنولپید در افزایش تجزیه زیستی، آن هم در مقادیر ۲۰ برابر کمتر به نسبت توپین ۸۰ می‌باشد. لای (Lai) و همکاران در سال ۲۰۰۹ اثر رامنولپید، سورفکتین، توپین ۸۰ و تریتون ایکس ۱۰۰ (مقادیر برابر ۰/۲ درصد وزنی/حجمی) را در افزایش حذف زیستی نفت خام سنگین از خاک مورد بررسی قرار دادند. یافته های آنها نشان داد که هر کدام از این مواد میزان حذف را به ترتیب ۲۳، ۱۴، ۶ و ۴ درصد افزایش می‌دهند و رامنولپید بهترین میزان تاثیر را دارد (۲۷).

در مطالعه دیگری چن (Chen) و همکاران اثر رامنولپید را در محیط شبیه‌سازی شده دریایی با مقدار ۰/۰۲ درصد بررسی کردند و اعلام نمودند که در این محیط رامنولپید میزان حذف را ۵/۶۳ درصد افزایش می‌دهد (۲۸). علاوه بر تاثیر بالاتر رامنولپید نسبت به توپین، نکته دیگری که از این نتایج به دست آمد، تاثیر پذیری بیشتر تجزیه زیستی تتراکوزان به عنوان یک آلیفاتیک به نسبت نفت خام پیرن به عنوان یک ترکیب آروماتیک است. در واقع با توجه به این نتایج تاثیر مواد فعال سطحی را می‌توان به صورت PAHs Crude Oils < Aliphatics

References

1. Husaini A, Roslan HA, Hii KS, Ang CH. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. World J Microbiol Biotechnol. 2008; 24(12): 2789-2797.
2. Plohl K, Leskovsek H, Bricelj M. Biological degradation of motor oil in water. Acta Chim Slov. 2002; 49(2): 279-290.
3. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. Bioresour Technol. 2017; 223:

277-286.

4. Yanto DH, Tachibana S. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis sp.* NG007. *Int Biodeter Biodegr.* 2013; 85:438-350.
5. Ortega-González DK, Cristiani-Urbina E, Flores-Ortiz CM, Cruz-Maya JA, Cancino-Díaz JC, Jan-Roblero J. Evaluation of the removal of pyrene and fluoranthene by *Ochrobactrum anthropi*, *Fusarium sp.* and their coculture. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015; 175(2): 1123-1138.
6. Rajesh D, Sunil C, Lalita R, Sushila S. Impact assessment of soils treated with refinery effluent. *Eur J Soil Biol.* 2009; 45(5): 459-465.
7. Acevedo F, Pizzul L, del Pilar Castillo M, Cuevas R, Diez MC. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoophyllum discolor*. *J Haz Mat.* 2011; 185(1): 212-219.
8. Mnif I, Mnif S, Sahnoun R, Maktouf S, Ayedi Y, Ellouze-Chaabouni S, Ghribi D. Biodegradation of diesel oil by a novel microbial consortium: comparison between co-inoculation with biosurfactant-producing strain and exogenously added biosurfactants. *Environ Sci Pollut Res.* 2015; 22(19): 14852-14861.
9. Souza EC, Vessoni-Penna TC, de Souza Oliveira RP. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *Int Biodeter Biodegr.* 2014; 89:88-94.
10. Jones JG, Knight M, Byrom JA. Effect of gross pollution by kerosine hydrocarbons on the microflora of a moorland soil. *Nature.* 1970; 227(5263): 1166.
11. Pinholt Y, Struwe S, Kjøller A. Microbial changes during oil decomposition in soil. *Ecography.* 1979; 2(3): 195-200.
12. Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66(3): 1007-1019.
13. Balaji V, Arulazhagan P, Ebenezer P. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *J Environ Biol.* 2014;35(3):521-529.
14. Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, Zafari D, Khodakaramian G, Chehregani A. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010; 73(4): 613-619.

15. Mohsenzadeh F, Rad AC, 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.
16. Margesin R, Schinner F. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl Environ Biotechnol*. 2001; 67(7): 3127-3133.
17. Rahman KS, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour Technol*. 2002; 85(3): 257-261.
18. Mukred AM, Hamid AA, Hamzah A, Yusoff WW. Development of three bacteria consortium for the bioremediation of crude petroleum-oil in contaminated water. *J Biol Sci*. 2008; 8(4): 73-79.
19. Latha R, Kalaivani R. Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Adv Appl Sci Res*. 2012; 3(5): 2789-2795.
20. Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan A, editors. *Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology*. Springer Sci Buss Med; 2012.
21. Sambrook J, Russell DW. *The condensed protocols from molecular cloning: a laboratory manual*. 2006.
22. Hall BG. Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol Biol Evol*. 2013; 30(5): 1229-1235.
23. Deng F, Liao C, Yang C, Guo C, Ma L, Dang Z. A new approach for pyrene bioremediation using bacteria immobilized in layer-by-layer assembled microcapsules: dynamics of soil bacterial community. *RSC Adv*. 2016; 6(25): 20654-20663.
24. Goudarztalejerdi A, Tabatabaei M, Eskandari MH, Mowla D, Iraj A. Evaluation of bioremediation potential and biopolymer production of pseudomonads isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated areas. *Int J Environ Sci Technol*. 2015; 12(9): 2801-2808.
25. Srujana K, Khan AB. Isolation and characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading soil microbes from automobile workshop sediments. *Int J Environ Sci Technol*. 2012; 5(1): 74-83.
26. Pugazhendi A, Abbad Wazin H, Qari H, Basahi JM, Godon JJ, Dhavamani J. Biodegradation of low and high molecular weight hydrocarbons in petroleum refinery wastewater by a thermophilic bacterial consortium. *Environ Technol*. 2017; 38(19): 2381-2391.

27. Lai CC, Huang YC, Wei YH, Chang JS. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. *J Haz Mat.* 2009; 167(1): 609-614.
28. Chen Q, Bao M, Fan X, Liang S, Sun P. Rhamnolipids enhance marine oil spill bioremediation in laboratory system. *Marine Poll Bull.* 2013; 71(1): 269-275.
29. Gogoi BK, Dutta NN, Goswami P, Mohan TK. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Adv Environ Res.* 2003; 7(4): 767-782.
30. 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): 1049-1055.
31. Potin O, Rafin C, Veignie E. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *Int Biodeter Biodegr.* 2004; 54(1): 45-52.
32. Atagana HI, Haynes RJ, Wallis FM. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. *Water Air Soil Pollut.* 2006; 172(1): 201-219.
33. Fan CY, Krishnamurthy S. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *J Air Waste Manag Assoc.* 1995; 45(6): 453-460.
34. Zhao D, Liu C, Liu L, Zhang Y, Liu Q, Wu WM. Selection of functional consortium for crude oil-contaminated soil remediation. *Int Biodeter Biodegr.* 2011; 65(8): 1244-1248.
35. Song R, Hua Z, Li H, Chen J. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by two *Pseudomonas aeruginosa* strains with different uptake modes. *J Environ Sci Heal Part A.* 2006; 41(4): 733-748.
36. El-Alawi YS, McConkey BJ, Dixon DG, Greenberg BM. Measurement of short and long-term toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons using luminescent bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002; 51(1): 12-21.



Biodegradation of high-molecular-weight aliphatic and aromatic hydrocarbons by *Aspergillus calidoustus*

Hassan Ghorbannezhad¹, Hamid Moghimi², Seyed Mohammad Mehdi Dastgheib³

¹ M.Sc. student, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. ² Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. ³ Assistant Professor, Microbiology and Biotechnology Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: It is now realized that fungi, specifically molds, have the potential to eliminate a variety of compounds, especially toxic and heavy hydrocarbons. The aim of this study was to investigate the ability of native mold isolates in biodegradation of petroleum pollutants and also the effect of surface active compounds on the removal efficiency.

Material & Methods: Plenty of mold strains were isolated from an oil-contaminated area in Sarkhoon area of Hormozgan state. The capability of these isolates in petroleum biodegradation was studied in a salt-based medium containing one percent crude oil. The superior strain was selected and characterized by Internal transcribed spacer (ITS) gene sequencing analysis. Biodegradation rate of 500 ppm pyrene (heavy aromatic hydrocarbons) and 1% tetracosane (heavy aliphatic hydrocarbons) by selected strain was investigated. Finally, biodegradation rate of these pollutants in the presence of rhamnolipid (0.01%) and tween 80 (0.2%) was studied.

Results: Among 40 different fungal isolates of this study, the F11 strain was selected as the superior one, base on crude oil biodegradation rate. The molecular identification showed 99.52% similarity of F11 strain to *Aspergillus calidoustus*. In 21 days, *A. calidoustus* could degrade crude oil, pyrene, and tetracosane about 54.59%, 51.43%, and 58.84%, respectively. Furthermore, crude oil, tetracosane, and pyrene biodegradation were increased to 70.97%, 79.44%, and 62.77% in the presence of rhamnolipid and to 66.78%, 74.74%, and 60.16%, in the presence of tween 80, respectively.

Conclusion: According to the results of this study, *A. calidoustus* has a great ability in biodegradation of heavy hydrocarbons. Also, it was shown that surfactants can increase the rate of hydrocarbons degradation, with much effect on aliphatic hydrocarbons, such as tetracosane, than aromatic compounds like pyrene.

Keywords: Biodegradation, Pyrene, Tetracosane, Rhamnolipid, *Aspergillus calidoustus*.

Correspondence to: Hamid Moghimi

Tel: +98 2166495495

E-mail: hmoghimi@ut.ac.ir

Journal of Microbial World 2018, 10(4): 346-359.