



تجزیه زیستی پیرن توسط مخمر تحمل کننده نمک با زیدیوآسکوس پرسیکوس

عالیه کامیابی^۱، حمید مقیمی^{۲*}

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش زیست‌فناوری میکروبی

^۲ استادیار، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی، بخش زیست‌فناوری میکروبی

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای یکی از مهمترین ترکیبات سمی موجود نفت خام و آلاینده های محیطی می باشند. هدف از انجام این پژوهش جداسازی مخمرهای تحمل کننده نمک تجزیه کننده هیدروکربن پیرن بود. **مواد و روش ها:** ابتدا جداسازی مخمرها از خاک‌های آلوده و شور مناطق نفت خیز جنوب صورت گرفت. سپس غربالگری این مخمرها بر اساس توانایی رشد بر روی محیط نمکی و همچنین قابلیت حذف نفت انجام شد. پس از انتخاب و شناسایی مولکولی سویه توانمند، توانایی تحمل نمک و رشد در حضور آلاینده پیرن و همچنین توانایی تجزیه پیرن و سایر هیدروکربن‌های سبک مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در این پژوهش، جدایه EBL-C16 با رشد در غلظت‌های ۰ تا ۱۵٪ نمک و حذف ۷۵/۵۱٪ نفت خام، به عنوان جدایه برتر انتخاب شد. شناسایی مولکولی این جدایه شباهت ۱۰۰ درصدی به زیدیوآسکوس پرسیکوس را نشان داد. بررسی رشد نشان داد که این مخمر در غلظت صفر تا ۲۰٪ نمک قادر به رشد است. بررسی حذف در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر پیرن و ۲/۵ درصد نمک نشان داد که این مخمر پس از ۲۱ روز توانایی حذف ۷۸/۵۷٪ از پیرن را دارد و در این شرایط میزان رشد آن به ۱/۴ گرم در لیتر وزن خشک و تولید CO₂ آن نیز به ۳/۱ میلی‌گرم رسید. همچنین زیدیوآسکوس پرسیکوس توانایی تجزیه فناترن و آنتراسن نیز داشت.

نتیجه گیری: یافته‌های حاصل می‌تواند به منظور استفاده از مخمرهای تحمل کننده نمک برای پاکسازی زیستی مناطق شور آلوده به نفت به کار گرفته شود.

واژگان کلیدی: پیرن، تجزیه زیستی، زیدیوآسکوس پرسیکوس، شرایط نمکی.

پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۶

دریافت مقاله: دی ماه ۹۶

مقدمه

آلاینده‌های زیست محیطی هستند که از طریق فعالیت‌های طبیعی و مصنوعی به طور گسترده وارد محیط می‌شوند. در حال حاضر احتراق ناقص مواد آلی، فرآیند تولید کُک، آتش‌سوزی جنگل‌ها، سوزاندن زباله‌ها و انتشار ترکیبات نفتی، منابع اصلی ورود PAHs به محیط می‌باشند (۱).

این ترکیبات به دلیل ویژگی آب‌گریزی و حلالیت کم در آب، برای مدت زمان طولانی در محیط‌زیست باقی می‌مانند. تجزیه

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons= PAHs) به دسته‌ای از هیدروکربن‌های آروماتیک گفته می‌شود که شامل دو یا بیش از دو حلقه بنزنی باشند. این هیدروکربن‌ها گروهی از

(* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست‌شناسی.

و غیر اختصاصی آنزیم‌هایی مانند لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز بوده و به کمک آن‌ها می‌توانند طیف وسیعی از ترکیبات آلاینده موجود در نفت را تجزیه کنند.

قارچ‌ها همچنین می‌توانند در محیط‌های پر تنش مانند pH کم، شوری بالا و محیط‌های غذایی فقیر نیز رشد کرده و در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های محیطی به خوبی بقا داشته باشند (۱۱ و ۱۲). در سال‌های اخیر مطالعات انگشت‌شماری، تجزیه پیرن در حضور نمک را بررسی کرده‌اند. در سال ۲۰۱۴ سوی (Cui) و همکاران او تجزیه پیرن در حضور ۳٪ نمک را توسط سه سویه از سیکلوکلاستیوکوس (*Cycloclasticus*) بررسی کردند (۱۳). در سال ۲۰۱۵ دو تحقیق بر روی تجزیه پیرن توسط دو سویه متفاوت از تالاسوسپیرا (*Thalassospira*) در غلظت نمک ۵٪ صورت گرفت (۴ و ۱۴). تجزیه پیرن توسط مارینوباکتر فلاویماریس (*Marinobacter flavimaris*) در ۹٪ نمک در سال ۲۰۱۶ مطالعه شد (۱۵). به تازگی هادیباراتا (*Hadibarata*) تجزیه پیرن توسط مخمر کاندیدا (*Candida sp.*) را در غلظت ۲/۵ درصد نمک بررسی کرده است (۱۶).

هدف از این پژوهش، ارزیابی توانمندی و ویژگی‌های مخمرهای بومی تجزیه کننده پیرن به عنوان مدل

جدول ۱: تعداد جدایه‌های مخمری در مناطق نمونه‌برداری

نام منطقه	موقعیت	تعداد جدایه
نفت شهر	33°59'51.0"N 45°29'26.7"E	۱
سیری	25°54'47.9"N 54°31'49.1"E	۱
سرخون	27°23'49.0"N 56°25'00.9"E	۳
پازنان	30°20'54.9"N 50°44'49.1"E	-
قم	34°47'18.9"N 51°01'31.1"E	۲
کویر سمنان	35°16'14.7"N 52°54'20.3"E	۱
ماراب	34°45'42.9"N 46°49'26.9"E	۴
تالاب هشیلان	34°35'21.2"N 46°52'29.6"E	۵
خوزستان	30°31'30.4"N 49°09'25.6"E	۲
خرم‌آباد	33°28'41.6"N 48°23'14.6"E	۲
مشهد	35°36'46.9"N 59°50'04.2"E	۱
ایلام	33°44'11.2"N 46°22'11.1"E	۲
بناب	37°17'46.5"N 45°56'42.0"E	۱
کرمانشاه	35°01'38.2"N 46°23'14.8"E	۳

ناپذیری و سمیت آنها برای انسان و سایر موجودات زنده و جهش‌زایی و سرطان‌زایی آنها منجر به قرار گرفتن آنها در ردیف آلاینده‌های بسیار خطرناک اولیه، توسط آژانس حفاظت محیط‌زیست آمریکا (EPA)، شده است (۲).

از طرف دیگر، محیط‌های شور و بسیار شور، معمولاً به دلیل فعالیت‌های صنعتی دارای آلاینده‌های آلی هستند. به علاوه در بسیاری از صنایع از جمله کشاورزی، نفت، نساجی و چرم، پساب بسیار شور و با محتوای آلی بالا تولید می‌شود. نشت این پساب‌ها، بر زندگی آبزیان و کشاورزی تاثیر می‌گذارد.

پیرن از جمله هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا می‌باشد که در مناطق آلوده به آلاینده‌های آلی از جمله مناطق شور یافت می‌شود که به عنوان مدل در مطالعات مربوط به این دسته از هیدروکربن‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد. این هیدروکربن به دلیل وزن مولکولی بالا حلالیت کمتری در آب داشته و در نتیجه تجزیه آن محدودیت‌هایی را در پی دارد (۳ و ۴).

مطالعات بسیاری نشان داده است که در محیط‌های آبی و خاکی، انواع میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و مخمرها به عنوان عوامل اصلی تجزیه کننده مولکول‌های آلاینده به ویژه هیدروکربن‌های نفتی هستند (۵-۸). عملکرد تجزیه آلاینده‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها در شرایط شور کاهش می‌یابد، در نتیجه برای غلبه بر این محدودیت می‌توان از میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست یا تحمل کننده نمک استفاده کرد. اطلاعات بسیار کمی در ارتباط با سرنوشت هیدروکربن‌ها در محیط‌های شور وجود دارد (۹ و ۱۰).

پاک سازی زیستی با استفاده از قارچ‌ها به دلیل وجود توانمندی‌های خاص در این میکروارگانیسم‌ها و نیز برتری آن‌ها در برخی موارد نسبت به باکتری‌ها در پژوهش‌های مختلف مورد توجه قرار گرفته است. قارچ‌ها با تولید سریع میسلیم می‌توانند در بافت خاک رشد کرده و گسترش یابند و با افزایش سطح دسترسی زیستی به ترکیبات آلاینده، موجب کاهش سمیت خاک شوند. علاوه بر این قارچ‌ها دارای سیستم‌های آنزیمی بسیار کارآمد و توانمند برای تولید و ترشح اختصاصی

ب) سنجش میزان حذف نفت در جدایه‌ها: برای غربالگری سویه‌های جداسازی شده با توانایی تجزیه هیدروکربن‌های سبک و سنگین در محیط نمکی، ابتدا سنجش رشد جدایه‌ها بر روی غلظت‌های مختلف نمک صورت پذیرفت و سپس، حذف نفت توسط همان جدایه‌ها، به روش کمی مطابق با روش رحمان (Rahman) و همکاران (۱۸)، بررسی شد. در این روش به ارلن‌های کشت جدایه‌ها در نفت، حلال تلون (هم حجم با محیط کشت) به منظور استخراج هیدروکربن‌های نفتی از محیط کشت و ورود به فاز آلی اضافه می‌شود. در مرحله بعدی فاز آلی حاوی هیدروکربن‌های نفتی جدا شده و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گردید. برای بررسی میزان حذف نفت، جذب نمونه‌های تیمار با نمونه کنترل مقایسه شده و میزان حذف گزارش شد. برای ارزیابی توانایی سویه‌های حاصل از مرحله قبل، ابتدا پلیت‌های PDA حاوی غلظت‌های مختلف نمک (از صفر تا ۱۵٪) تهیه شده و رشد هر یک از سویه‌ها در این محیط‌ها پس از سه روز مورد بررسی قرار گرفت. از طرف دیگر، از جدایه‌های خالص شده، در محیط باشنل هاوس (Bushnell-Haas medium) (واجد $\text{MgSO}_4 \cdot 0.2 \text{g/L}$ ، $\text{CaCl}_2 \cdot 0.2 \text{g/L}$ ، $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{g/L}$ ، $\text{NH}_4\text{NO}_3 \cdot 1 \text{g/L}$ و $\text{FeCl}_3 \cdot 0.05 \text{g/L}$) دارای ۱٪ گلوکز و ۰/۱ درصد نفت به عنوان منابع کربن، پیش‌کشت تهیه شد. پیش‌کشت‌ها به مدت یک شبانه روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۲۰ rpm و دمای ۲۸ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. پیش از تلقیح پیش‌کشت‌ها درون محیط کشت اصلی، زیست‌توده موجود در ۱ میلی‌لیتر پیش‌کشت به منظور حذف منبع کربن پیشین (گلوکز)، در شرایط استریل رسوب داده شد و شستشو گردیدند. پس از آن زیست‌توده در سرم فیزیولوژی استریل مجدداً حل و به حجم ۱ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس زیست‌توده‌های آماده شده از هر سویه در محیط کشت اصلی باشنل هاوس حاوی ۱٪ نفت و ۲/۵ درصد نمک تلقیح شد (۱۹).

ج) انتخاب و شناسایی سویه برتر: بر اساس نتایج به‌دست آمده در مرحله غربالگری، سویه ای که در حضور غلظت نمکی ۱۵٪

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا بود.

مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری نمونه و جداسازی مخمرها: به منظور جداسازی مخمرهای تحمل‌کننده نمک نمونه برداری از خاک‌های مناطق مختلف مطابق جدول ۱ انجام شد.

برای این منظور خاک‌ها با رعایت شرایط استریل و با استفاده از قاشقک از عمق صفر تا ۲۰ سانتی‌متری برداشت شده و در کوتاه‌ترین زمان ممکن به آزمایشگاه منتقل شد. در ادامه خاک‌ها با استفاده از هاون چینی کوبیده و آسیاب گشت. در نهایت خاک‌های کوبیده شده با الک ۰/۵ میلی‌متری همگون شده و ذرات درشت آن‌ها جداسازی شد. به منظور جداسازی اولیه مخمرهای تحمل‌کننده نمک از روش کشت گسترده (سطحی) در پلیت (Spread plate technique) استفاده شد. در این روش ابتدا از نمونه‌های خاک رقت‌های 10^{-2} ، 10^{-3} ، 10^{-4} تهیه شد. بدین منظور ۱ گرم از هر یک از نمونه‌ها وزن شده و به ۱۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل اضافه شد (رقت 10^{-1}). در ادامه با اضافه نمودن ۱ میلی‌لیتر از رقت آماده شده به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل رقت بعدی (10^{-2}) و به همین طریق رقت‌های دیگر آماده شد. برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها، میزان 100mg/L آنتی‌بیوتیک تراسایکلین به محیط کشت رزبنگال آگار (مرک، آلمان) دارای ۲/۵ درصد نمک اضافه شد. سپس رقت‌های تهیه شده به مدت ۵ دقیقه با استفاده از همزن کاملاً مخلوط شده و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های به دست آمده بر روی محیط کشت رزبنگال آگار حاوی نمک و آنتی‌بیوتیک انتقال و به طور یکنواخت در سراسر محیط کشت پخش شد. برای هر یک از خاک‌ها این عمل در سه تکرار صورت پذیرفت. به منظور رشد مخمرها پس از انجام تلقیح، پلیت‌های کشت داده شده به مدت ۳ تا ۴ روز در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلیسیوس گرماگذاری شدند. سپس مخمرهای رشد کرده در سطح این پلیت‌ها به طور جداگانه بر روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) خالص‌سازی شدند (۱۷).

PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به همراه ۱ میکرولیتر از DNA قارچی با غلظت ۴۰ نانوگرم به ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط آماده شرکت آمپلیکون دانمارک اضافه شد. برنامه PCR به صورت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس و اسرشت سازی اولیه انجام شد. در ادامه ۳۰ سیکل دمایی به صورت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلیسیوس، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سلیسیوس و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلیسیوس انجام شد. در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس ویال گرمادهی شدند (۷). محصول به دست آمده پس از خالص‌سازی، به منظور تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتیجه حاصل از تعیین توالی ژن ITS و LSU، برای انطباق با بانک‌های ژنی توسط نرم‌افزار BioEdit مورد ویرایش قرار گرفت و در ادامه با توالی‌های موجود در بانک‌های ژنی NCBI و CBS مقایسه گردید. در نهایت با مقایسه میزان شباهت بین توالی مورد نظر و توالی‌های موجود، میکروارگانیسم مورد نظر شناسایی شد. درخت تکاملی این سویه با توالی هر دو ژن ITS و LSU این سویه و سایر جنس و سویه‌های نزدیک به این سویه توسط نرم‌افزار *Mega7* رسم گردید (۷).

د) بررسی تحمل شوری و رشد سویه منتخب در حضور غلظت‌های مختلف نمک: برای این منظور ابتدا سویه منتخب در محیط مایع و نمکی با شغل هاوس همراه با ۱٪ گلوکز به عنوان منبع کربن پیش‌کشت داده شد و به مدت یک شبانه روز درون شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلیسیوس و دور ۱۲۰ rpm گرماگذاری گردید. محیط کشت با شغل هاوس که شامل ۳٪ گلوکز به عنوان تنها منبع کربن و درصد‌های مختلف نمک (۰، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۱۵٪) آماده و استریل شدند. سپس از پیش‌کشت حاصل به مقدار ۱۰٪ حجمی/حجمی (۵ میلی‌لیتر) درون ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۵ میلی‌لیتر محیط با شغل هاوس، تلقیح شد. ارلن‌ها در شرایط یاد شده برای پیش‌کشت گرماگذاری شدند و در ساعت‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ پس از کشت در شرایط استریل و زیر هود لامینار از آن‌ها نمونه‌برداری گردید و سریع به شرایط گرماگذاری برگردانده

رشد کرده و نیز توانایی آن در حذف نفت بیشتر بود، به عنوان سویه برتر برای ادامه سنجش‌ها انتخاب شد. به منظور شناسایی مولکولی سویه منتخب از ژن‌های ITS (Internal Transcribed Spacer) و (Large Subunit) LSU استفاده گردید (۳ و ۲۰). به این منظور ابتدا جدایه منتخب در محیط PDB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلیسیوس گرماگذاری شد. سپس زیست‌توده با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. سپس به کمک روش کوبیدن زیست‌توده منجمد شده در ازت مایع، سلول‌ها شکسته شد و DNA آن به روش استخراج با فنل-کلروفرم جداسازی شد (۲۱). در این روش ابتدا عصاره سلولی به دست آمده در میکروفیوژ با دور ۸۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس رومانند جدا شده که حاوی مولکول‌های DNA می باشد، به یک ویال استریل منتقل گردید. در این مرحله هم حجم روشن‌آور از مخلوط فنل-کلروفرم (به نسبت ۱:۱) به ویال افزوده شد. سپس ویال به مدت ۲ دقیقه تکان داده شد تا محتویات آن با هم مخلوط شود. در ادامه ویال در میکروفیوژ با دور ۱۳۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه قرار داده شد. فاز رویی درون یک ویال استریل دیگر ریخته شد. حجم تقریبی محتوای ویال تعیین شد و به میزان ۰/۱ حجم آن محلول سدیم استات ۳ مولار با pH برابر ۵ و ۳ برابر حجم آن اتانول مطلق سرد افزوده شد. سپس ویال برای ۳۰ دقیقه به فریزر با دمای ۲۰- درجه سلیسیوس منتقل شد. در ادامه فاز رومانند با دور ۱۳۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه جدا و دور ریخته شد و ۷۰۰µl اتانول ۷۰٪ به رسوب DNA افزوده شد و مجدداً با دور ۱۳۰۰۰rpm برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب حاصل در ۱۵ تا ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید (۲۲).

PCR ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی با پرایمرهای ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ژن RNA ریپوزومی زیر واحد بزرگ (LSU) با پرایمرهای NL1: 5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3' و NL4: 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3' انجام شد. واکنش

گرفت. هلیوم (۹۹/۹۹٪) با سرعت ثابت ۱ ml/min به عنوان گاز حامل استفاده شد. درجه حرارت اجاق گاز به صورت: دمای اولیه ۸۰ درجه سلیسیوس (برای ۱ دقیقه) و سپس با سرعت ۲۰ C/min تا ۲۹۰ درجه سلیسیوس تنظیم شد و دمای FID نیز در ۳۰۰ درجه سلیسیوس نگهداری شد (۴).

(و) بررسی میزان رشد جدایه مخمیری در حضور پیرن از طریق اندازه‌گیری وزن خشک و میزان تولید CO_2 . زیست‌توده جدا شده در مرحله قبل خشک شده و برای اندازه‌گیری وزن خشک زیست‌توده تولید شده مورد استفاده قرار گرفت. همچنین، برای بررسی تولید گاز دی اکسید کربن که نشان دهنده مصرف منبع کربنی و در نتیجه رشد می‌باشد، تمام شرایط یادشده برای فلاسک‌های تنفس سنجی ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت اعمال شد. با این تفاوت که پس از تلقیح پیش‌کشت به مقدار ۱۰٪ حجمی/حجمی، به مدت ۳ دقیقه در شرایط استریل و با استفاده از فیلتر، اکسیژن به درون فلاسک‌ها فرستاده شده تا هوای داخل فلاسک‌های مهر و موم شده با اکسیژن اشباع شود. برای سنجش میزان گاز دی اکسید کربن تولیدی، هر سه روز یک بار، فلاسک‌ها از شیکر انکوباتور خارج شده و به صورت استریل گاز اکسیژن به داخل فلاسک‌ها دمیده شد. خروجی فلاسک که حاوی گاز دی اکسید کربن تولید شده توسط جدایه مخمیری بود از طریق انتقال در ویال‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محلول KOH ۰/۲ مولار، به دام انداخته شد. سپس از محلول $BaCl_2$ ۰/۵ مولار به مقدار یک میلی‌لیتر و از معرف فنل فتالین ۱٪ به میزان ۳ قطره، به ویال‌ها افزوده شده و محلول سود موجود درون ویال‌ها توسط HCl ۰/۱ مولار تیتر شد. با قرار دادن مقدار HCl مورد استفاده درون فرمول ۱ ($V_B = \text{حجم HCl}$ برای تیتراسیون شاهد، $V_A = \text{حجم HCl}$ برای تیتراسیون نمونه، $M_{CO_2} = \text{جرم مولی } CO_2$ ، $M_{HCl} = \text{غلظت مولی HCl}$ ، $M_{KOH} = \text{غلظت مولی KOH}$) مقدار گاز CO_2 تولید شده محاسبه شد (۲۴). شایان یادآوری است که مانند بخش قبل از هر فلاسک سه تکرار در نظر گرفته شد، که برای گزارش نتیجه از میانگین سه تکرار استفاده شد.

$$\text{فرمول ۱: } CO_2(mg) = (V_B - V_A) \times \left(\frac{M_{CO_2}}{2}\right) \times M_{HCl} \times \left(\frac{M_{HCl}}{M_{KOH}}\right)$$

شدند. برای بررسی رشد سویه منتخب، جذب نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۰۰ nm نسبت به نمونه شاهد (محیط کشت باشنل هاوس تلقیح نشده) خوانده شد. در نهایت باتوجه به نتایج به‌دست آمده نمودار رشد سویه در غلظت‌های مختلف از نمک NaCl در طول زمان رسم شد (۲۳).

(ه) سنجش میزان حذف پیرن و رشد جدایه منتخب در حضور پیرن: برای ادامه پژوهش غلظت ۵۰۰ mg/L از پیرن و ۲/۵٪ از نمک برای بررسی میزان حذف پیرن و رشد با زیادهای آسکوس پرسیکوس انتخاب شد. در ابتدا به مدت یک شبانه روز از سویه منتخب درون باشنل هاوس دارای ۱٪ گلوکز پیش‌کشت تهیه شد. محیط‌های باشنل هاوس دارای ۲/۵ درصد نمک به میزان ۱۰ میلی‌لیتر در ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری برای بررسی حذف پیرن در هر ۷۲ ساعت، آماده و استریل شد و پس از آن غلظت ۵۰۰ mg/L از پیرن درون ارلن‌ها تهیه شد. به دلیل حل شدن پیرن درون استون و از آنجایی که حلال استون احتمالاً برای سویه سمی می‌باشد، پس از افزودن پیرن به ارلن‌ها، ارلن‌ها به همراه پیش‌کشت برای تبخیر حلال استون به شیکر منتقل شدند. پس از گذشت یک شبانه روز و رسیدن میزان زیست‌توده به $OD_{600nm} = 0.5 - 0.6$ ، به میزان ۱۰٪ حجمی/حجمی (۱ میلی‌لیتر) تلقیح درون ارلن‌های کشت صورت گرفت. برای هر ۷۲ ساعت سنجش، سه تکرار در نظر گرفته شد و نمونه شاهد بدون تلقیح نیز در شرایط مشابه سایر کشت‌ها قرار داده شد. هر ۷۲ ساعت سه تکرار نمونه مربوطه از شیکر انکوباتور خارج شده و پس از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ rpm) و جدا نمودن زیست‌توده به منظور اندازه‌گیری مقدار رشد، پیرن باقیمانده در محیط توسط مقدار مساوی از حلال تولوئن (۱۰ ml) استخراج شد. در نهایت از دستگاه کروماتوگرافی گازی (Agilent 6890, USA) مجهز به ورودی split-splitless و یک آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) برای جداسازی و تعیین پیرن استفاده شد. ورودی در ۳۰۰ درجه سلیسیوس نگه‌داری شد و جداسازی‌ها نیز با ستون موئینه DB-5 (۰.۵٪ فنیل و ۹۵٪ متیل پلی سیلوکسان) خریداری شده از کمپانی Agilent صورت

student استفاده شد. مرز معنی در $p < 0/05$ قرار داده شد.

یافته‌ها

الف) جداسازی مخمرها از مناطق شور و آلوده: به منظور جداسازی مخمرها، پس از کشت سطحی نمونه‌های خاک بر روی پلیت، کلنی‌های مخمری رشد کرده بر روی محیط جداسازی رزینگال آگار، بر روی پلیت‌های جدید خالص شده و پس از حذف جدایه‌های مشابه، سایر جدایه‌ها برای غربالگری رزینگال نگه‌داری شدند. در کل ۲۹ جدایه مخمری برای غربالگری در نظر گرفته شد (جدول ۱).

ب) غربالگری: ارزیابی توانایی رشد جدایه‌های مخمری در محیط حاوی نمک و نفت: برای انجام غربالگری، ابتدا توانایی رشد هر یک از جدایه‌ها بر روی محیط جامد PDA با غلظت‌های صفر، ۵، ۷/۵، ۱۰ و ۱۵٪ نمک، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این غربالگری در جدول ۲ قابل مشاهده است. همانطور که دیده می‌شود تنها ۱۳ جدایه از ۲۹ جدایه قادر به رشد در حضور نمک بودند و سایر جدایه‌ها هیچگونه رشدی در حضور نمک از خود نشان ندادند. از بین این ۱۳

ز) بررسی توان مصرف فنانترن و آنتراسن توسط جدایه منتخب: برای این بررسی پیش‌کشت مطابق قبل تهیه شد. برای ساخت محیط کشت‌ها از ارلن‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط باشنل هاوس دارای ۲/۵ نمک استفاده شد که پس از اتوکلاو شدن، از محلول غلیظ هیدروکربن‌های مختلف، برای ساخت غلظت‌های ۳۰۰، ۵۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر در این ارلن‌ها، استفاده شد. از هر غلظت هیدروکربن‌های آنتراسن و فنانترن سه تکرار آماده شد که به همراه پیش‌کشت برای تبخیر حلال استون بر روی شیکر قرار گرفتند. پس از یک شبانه روز به مقدار ۱۰٪ حجمی/حجمی از پیش‌کشت درون ارلن‌ها تلقیح شد و کشت‌ها برای ۲۱ روز گرماگذاری شدند. نمونه‌های شاهد آماده شده از چهار غلظت مختلف دو هیدروکربن یاد شده، تلقیح نشده و در شرایط مشابه گرماگذاری شدند. پس از ۲۱ روز هیدروکربن باقیمانده در نمونه‌ها توسط مقدار مساوی از حلال تولوئن (۱۰ میلی‌لیتر) استخراج شد. در نهایت از دستگاه کروماتوگرافی گازی گرفته شده برای سنجش مقدار این هیدروکربن‌ها استفاده شد (۴).

ح) آنالیز آماری: به منظور ارزیابی حذف فنانترن از آزمون T-

جدول ۲: نتایج رشد سویه‌ها بر روی غلظت‌های مختلف از نمک

نام جدایه‌ها	بدون نمک	۵٪ نمک	۷/۵٪ نمک	۱۰٪ نمک	۱۵٪ نمک
EBL-A23	+	+	-	-	-
EBL-A25	+	+	-	-	-
EBL-B10	+	+	+	+	+
EBL-B22	+	+	+	-	-
EBL-C11	+	+	-	-	-
EBL-C12	+	+	+	+	+
EBL-C16	+	+	+	+	+
EBL-C23	+	+	-	-	-
EBL-D12	+	+	-	-	-
EBL-E27	+	+	+	-	-
EBL-K1	+	+	+	+	+
EBL-S1	+	+	+	-	-
EBL-S3	+	+	-	-	-

* علامت + نشان دهنده رشد و - نشان دهنده نبود رشد است.

جدول ۳: درصد حذف نفت سویه‌ها با قابلیت رشد در محیط نمکی

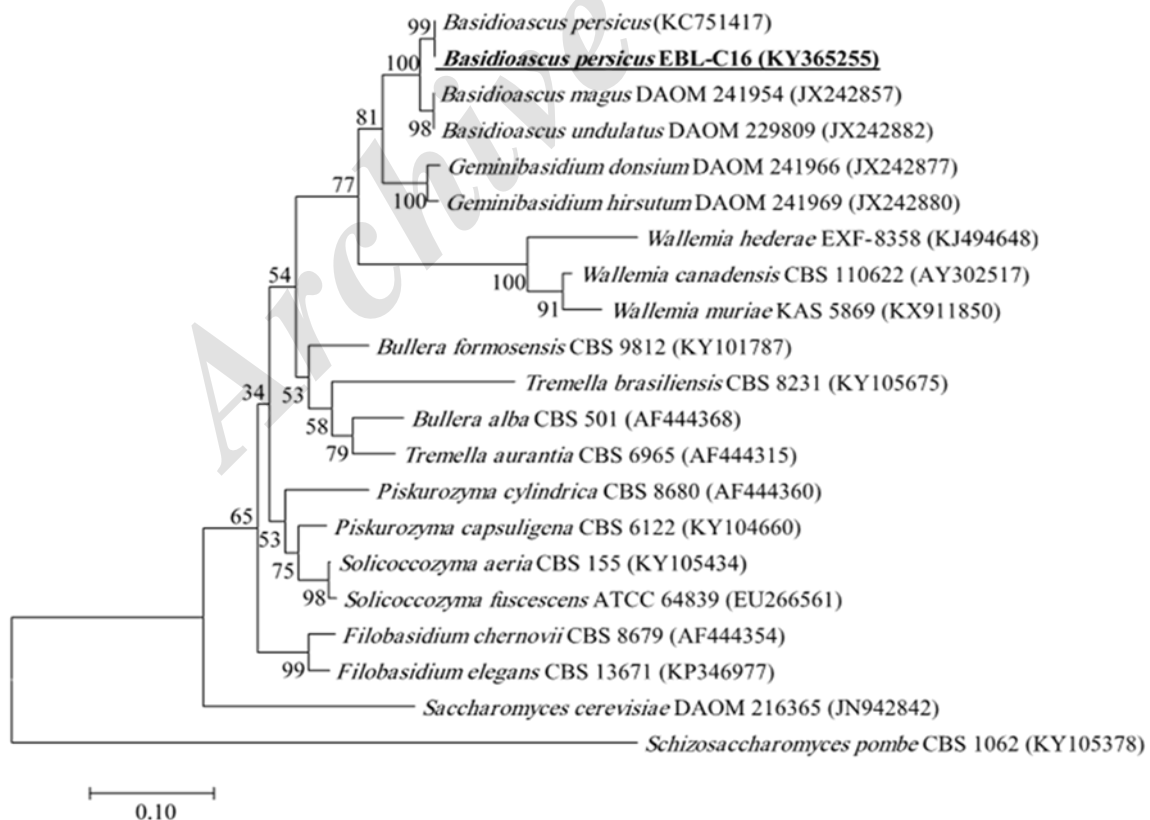
نام جدایه‌ها	مقدار حذف نفت (%)
EBL-B22	۱۶/۵۳
EBL-C11	۲۹/۱۳
EBL-C16	۷۵/۵۱
EBL-D12	۳۲/۲۸
EBL-D26	۴۰/۱۵
EBL-E3	۱۴/۹۶
EBL-E27	۱۹/۶۸
EBL-S1	۳۵/۴۳
EBL-S3	۲۹/۹۲

محاسبه شد. در بین ۲۹ جدایه مخمري، ۹ جدایه تجزیه کننده انتخاب شدند. درصد حذف نفت توسط این ۹ جدایه در جدول ۳ مشاهده می‌شود. از بین این ۹ جدایه تنها جدایه EBL-C16، با بهترین جدایه‌های اولین مرحله از غربال مشترک بود. در نتیجه، جدایه EBL-C16 به دلیل رشد در حضور ۱۵٪ نمک و همچنین مقدار حذف نفت بالای ۷۰٪، برای ادامه پژوهش انتخاب گردید.

ج) شناسایی مولکولی سویه برتر: پس از ارزیابی نتایج توالی یابی و مقایسه آن با توالی‌های موجود در پایگاه‌های ژنی مشخص گردید که سویه جداسازی شده با شباهت ۱۰۰ درصدی به جنس و گونه بازیديوآسکوس پرسیکوس تعلق داشت. این توالی‌ها در پایگاه ژنی NCBI با کد دسترسی KY365255 و MF574401 ثبت شدند. همچنین درخت فیلوژنی رسم شده برای این سویه توسط ژن ITS در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

جدایه نیز، تنها ۴ جدایه تا توانستند در بیش‌ترین غلظت از نمک (۱۵٪) رشد نمایند.

سپس تمام جدایه‌ها در محیط نمکی با شغل هاوس دارای ۱٪ نفت و ۲/۵٪ نمک، به منظور غربالگری مخمرهای تجزیه کننده، کشت داده شدند و درصد حذف نفت برای تمام جدایه‌ها



شکل ۱: درخت فیلوژنی سویه بازیديوآسکوس پرسیکوس EBL-C16 با استفاده از پرایمرهای ITS، رسم شده با الگوریتم Neighbor Joining و ارزش بوت استرپ ۱۰۰۰ در نرم‌افزار Mega7.

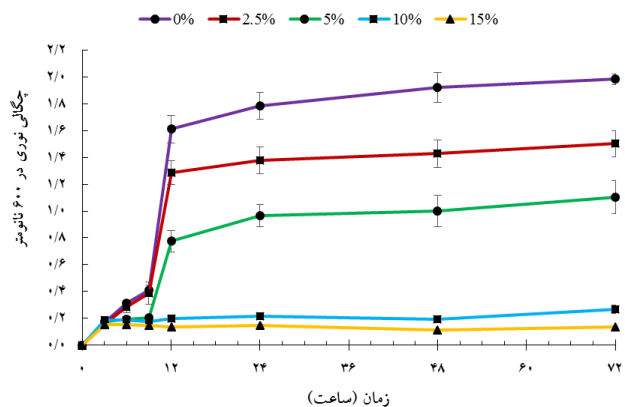
تا انتهای سنجش تقریباً ثابت ماند.

۵) میزان حذف و رشد در حضور پیرن: برای بررسی رشد و حذف پیرن توسط بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16، از غلظت 500 mg/L پیرن استفاده شد. بدین منظور هر ۷۲ ساعت یک بار نمونه برداری صورت گرفت. همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود هم زمان با مصرف پیرن به عنوان تنها منبع کربن و انرژی، مخمر رشد داشت و تقریباً ۸۰٪ پیرن از محیط حذف گردید. همچنین مرحله لگاریتمی رشد، در سه روز اول سپری شد، اما در این مدت شیب حذف پیرن کمتر بود.

با رشد هرچه بیشتر بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 و ورود رشد به مرحله سکون، شیب حذف پیرن نیز افزایش پیدا نمود. اما در تمام طول ۲۱ روز شیب نمودار و در نتیجه نرخ تجزیه پیرن ثابت بود. در انتهای مرحله رشد مخمر، ۷۸/۵۷٪ پیرن حذف شد و زیست‌توده به $1/4$ گرم در لیتر وزن خشک رسید.

همچنین مشخص شد که مقدار گاز دی اکسید کربن تولید شده با گذشت زمان افزایش می‌یابد (نمودار ۲). این امر نشان‌دهنده رشد بازیدیواسکوس پرسیکوس در حضور پیرن می‌باشد. بیشترین میزان تولید CO_2 در سه روز انتهایی دیده شد و مقدار نهایی تولید گاز دی اکسید کربن در محیط پایه نمکی برابر با $3/1$ میلی‌گرم بود.

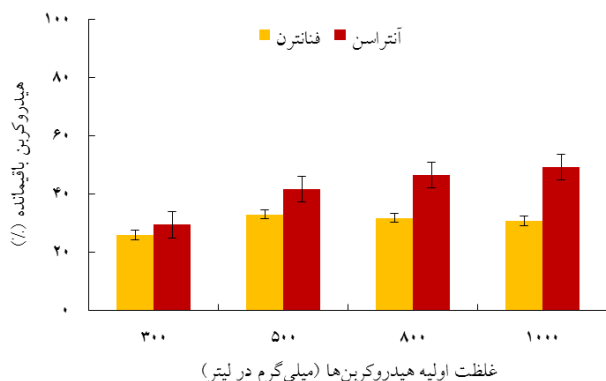
۶) مصرف فنانترن و آنتراسن: با افزایش غلظت فنانترن به



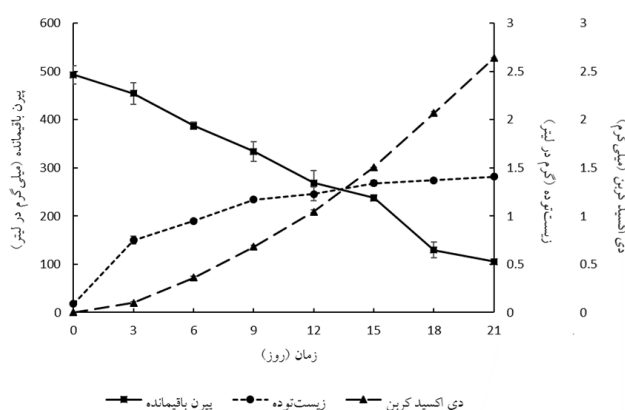
نمودار ۱: رشد بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 در حضور غلظت‌های مختلف نمک در مدت زمان ۷۲ ساعت

۷) آزمون تحمل نمک: پس از شناسایی بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16، در ابتدا رشد مخمر در محیط کشت مایع با درصدهای مختلف از نمک طعام (NaCl) بررسی شد. اگرچه رشد در عدم وجود نمک و پس از آن در ۲/۵ و ۵٪ به ترتیب بیشترین مقادیر را داشت، اما رشد در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش (تا ۱۵٪ نمک) نشان داد که می‌توان این جدایه را به عنوان یک مخمر تحمل کننده نمک یا هالتولرانت در نظر گرفت (نمودار ۱) (۹).

همچنین، همان گونه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود بیشترین رشد در ساعت ۱۲ و در غلظت نمک صفر درصد به دست آمد. کمترین رشد نیز در غلظت ۱۵٪ نمک دیده شد که از ساعت ۳



نمودار ۳: حذف غلظت‌های مختلف فنانترن و آنتراسن توسط بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16



نمودار ۲: حذف و رشد بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 در حضور پیرن

خوبی دارند (۲۹). به همین دلیل در این پژوهش جداسازی مخمرها مورد توجه قرار گرفت. اگرچه در رابطه با تجزیه پیرن توسط مخمرها گزارش‌های بسیار اندکی موجود است، با این حال بر روی کپک‌ها و یا قارچ‌های خوراکی بررسی‌هایی صورت گرفته است (۳، ۸، ۱۲، ۲۵، ۳۳-۳۰).

از دیگر عوامل اصلی مورد نظر در این پژوهش، حضور نمک و انجام تجزیه زیستی در محیط‌های حاوی نمک بود. به همین دلیل تمام آزمون‌ها در شرایط نمکی ۲/۵٪ انجام شد. شایان یادآوری است که حضور نمک به خودی خود می‌تواند موجب کاهش توانایی حذف هیدروکربن‌ها شود. میکروارگانیسم‌های نمک دوست قادر به رشد و انجام عملکردهای متابولیکی خود در شرایط بسیار شور می‌باشند. میکروارگانیسم‌های غیر نمک دوست، رشد بهینه خود را در زیر ۲٪ نمک نشان می‌دهند. اما میکروارگانیسم‌های تحمل کننده نمک و یا وابسته به نمک می‌توانند تا حضور ۳۰٪ نمک رشد کنند. با توجه به نمودار ۱ مخمر بازیدیوآسکوس پرسیکوس EBL-C16 تحمل کننده نمک می‌باشد.

مطالعات انجام شده در رابطه با تجزیه پیرن در حضور نمک، بیشتر شامل سوبه‌های باکتریایی می‌شود. چندین پژوهش صورت گرفته نشان می‌دهد که حتی در رابطه با میکروارگانیسم‌های نمک دوست نیز، مقدار بهینه نمک هنگام حذف هیدروکربن‌ها، در حدود ۲ تا ۵٪ می‌باشد.

فنگ (Feng) و همکاران مقدار تجزیه فناترن (۲۰۰mg/L) توسط باکتری نمک دوست ماتیلیلا (*Marteella sp. AD-3*) را در حضور نمک (۰/۲ تا ۲/۰٪) مورد سنجش قرار دادند و گزارش نمودند که بالاترین مقدار تجزیه در حضور ۳٪ نمک صورت می‌گیرد (۳۴). همچنین ژو (Zhou) و همکاران نیز تاثیر عواملی مختلفی مانند نمک را در تجزیه پیرن توسط باکتری نمک دوست تالاسوسپیرا سوبه TSL5-1 مورد مطالعه قرار دادند. از بین غلظت‌های ۰/۵ تا ۱۹/۵ نمک، بالاترین تجزیه (۴۳٪) را در ۳/۵ و ۵٪ نمک گزارش کردند (۴).

به همین صورت، باکتری‌های نمک دوست اکراباکتروم (*Ochrobactrum*) و ۳ سوبه از سیکلوکلاستیکوس، در حضور

عنوان سوبسترا مقدار حذف از ۷۴/۱۲٪ به ۶۹/۲۶٪ کاهش می‌یابد (نمودار ۳). آنالیز آماری نشان داد که توزیع داده‌های حذف فناترن نرمال است. بر این اساس در کل تفاوت چندانی بین مقادیر مصرف شده از فناترن در غلظت‌های مختلف آن وجود نداشت. در رابطه با آنتراسن نیز با افزایش غلظت مقدار حذف ۲۰٪ کاهش یافت و مقدار بیشتری از آنتراسن در محیط ماند.

بحث

قارچ‌ها دارای سیستم آنزیمی داخل سلولی به ویژ سیتوکروم P450 مونواکسیژناز و اپوکسید هیدرولاز هستند که قادر به اکسیداسیون PAHs می‌باشد. قارچ‌ها همچنین غلظت‌های بالای ترکیبات بازدارنده را تحمل می‌کنند و در شرایط سخت مانند دمای بالا و pH پایین، رشد می‌کنند. از طرفی قارچ‌ها میسلیموم‌های بزرگ و منشعب ایجاد می‌کنند که می‌توانند آن‌ها را درون شبکه‌های (ماتریکس) جامد توزیع کنند و باعث تخریب PAHs در مناطق آلوده شوند. قارچ‌ها همچنین می‌توانند PAHs را در شرایط بسیار کم اکسیژن تخریب کنند. علاوه بر تجزیه زیستی و معدنی سازی PAHs، قارچ‌ها این ترکیبات را بر روی دیواره سلولی آب‌گریز خود جذب کرده یا در وزیکول‌ها و اندامک‌های دیگر درون سلولی ذخیره می‌کنند. در مجموع تمام این سازوکارها باعث کاهش PAHs در محیط زیست می‌شود (۲۵).

گزارش‌های متعدد در مورد تجزیه PAHs نشان داده است که قارچ‌هایی مانند ترمیتس ورسی کالر (*Trametes versicolor*)، فانروشیت کریسوسپوریوم (*Phanerochaete chrysosporium*)، پلوروتوس اوستراتوس (*Pleurotus ostreatus*)، بیرکانداریا آداستا (*Bjerkandera adusta*) و کانیکامیلیا الگانس (*Cunninghamella elegans*) نقش مهمی در تجزیه این ترکیبات دارند (۲۸-۲۵).

مخمرها، به ویژه انواع ساکن در محیط‌های دریایی، پتانسیل بالایی در زمینه اکسیداسیون PAHs دارند. همچنین، گزارش شده است که مخمرها در محیط‌های فاضلاب غنی از نفت رشد

بررسی تجزیه لجن نفتی مشخص شد که جدایه‌های سودوموناس آئروجینوسا (*P. aeruginosa*) و باسیلوس مگاتریوم (*B. megaterium* BB6) رشد بیش از حد میکروبی در طول زمان و افزایش تولید CO_2 تجمعی را نشان می‌دهند. نتایج مشابهی نیز در جدایه‌های باسیلوس سرئوس (*B. cereus*) و استنوتروفوموناس اسیدامینیفیل (*S. acidaminiphila*) مشاهده شد که نشان دهنده کمترین مقدار تولید CO_2 تجمعی و کمترین میزان غلظت میکروارگانیسم بود (۲۴).

بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 هیدروکربن‌های آروماتیک متنوعی را تجزیه می‌کند. به عنوان نمونه در مطالعه Juckpech و همکاران نشان داده شد که قارچ فانروکیت (*Phanerochaete*) توانایی تجزیه فلورن، فناترن و فلورانتن را دارد، اما پیرن را تجزیه نمی‌کند. کورویولاریا (*Curvularia*) تنها قادر به تجزیه فلورن بود و همانند فانروکیت پیرن را تجزیه نمی‌کرد. همچنین قارچ لنتینوس (*Lentinus*) نیز بر خلاف فانروکیت و کورویولاریا تنها فلورانتن را تجزیه نمی‌کند (۲۵).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج به دست آمده، مخمر بازیدیواسکوس پرسیکوس علاوه بر نفت قادر به تجزیه هیدروکربن‌های پلی آروماتیک سبک و سنگین از جمله فناترن، آنتراسن و پیرن نیز بود. این مخمر به دلیل قابلیت تحمل شرایط سختی مانند غلظت‌های بالای نمک، برای استفاده در شرایط میدانی پیشنهاد می‌شود. از طرفی این باکتری می‌تواند در حذف آلودگی‌های نفتی در دریاها نیز مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از سرکار خانم هدی نوری به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال تشکر و امتنان را دارند.

۳٪ نمک، به ترتیب ۳ میلی‌گرم در لیتر پیرن را به میزان ۸۴٪ (پس از ۷ روز) و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر پیرن را به مقدار ۵۲ تا ۶۳٪ (پس از ۲۱ روز)، تجزیه نمودند (۱۳ و ۳۵).

بر طبق این تحقیقات، تجزیه زیستی پیرن توسط بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 در محیط حاوی ۲/۵٪ نمک بررسی شد. نمودار حاصل از مطالعه کینتیک حذف پیرن نشان داد که مصرف پیرن و در نتیجه آن رشد و تولید زیست‌توده به همراه هم صورت می‌گیرند. افزایش مقدار زیست‌توده تا روز سوم دارای شیب زیادی بود. این امر نشان دهنده مرحله لگاریتمی رشد بازیدیواسکوس پرسیکوس-EBL-C16 است و پس از آن رشد تقریباً با شیب کم و ثابتی افزایش می‌یابد. در مدت ۲۱ روز و در حضور ۲/۵٪ نمک، ۵۰۰ mg/L از پیرن به میزان ۷۸/۵۷٪ تجزیه شد.

در مطالعه‌ای مشابه، در مدت زمان ۲۰ روز و در حضور ۹٪ نمک، ۱۰۰ mg/L پیرن به مقدار ۷۸٪ توسط باکتری مارینوباکتر فلاویماریس تجزیه شده است (۱۵). عملکرد مارینوباکتر فلاویماریس و بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 نسبت به تالاسوسپیرا با حذف ۲۰ mg/L از پیرن به میزان ۴۱/۴٪ در حضور ۵٪ نمک و پس از ۲۵ روز، بهتر بوده است (۴).

از دیگر میکروارگانیسم‌هایی که حذف پیرن توسط آن‌ها در حضور ۳٪ نمک بررسی شده می‌توان به اکراباکتروم با حذف ۸۴٪ از ۳ mg/L پیرن (۳۵) و سه سویه از سیکلوکلاستیکوس با حذف ۵۲-۶۳٪ از ۲۰ mg/L پیرن (۱۳) اشاره کرد.

با توجه به پایین بودن غلظت پیرن برای اکراباکتروم و سیکلوکلاستیکوس می‌توان ادعا کرد که بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 در حذف غلظت‌های بالای پیرن توانمند می‌باشد.

از طرفی ارزیابی تولید CO_2 که نشان دهنده فعالیت میکروبی است نیز با نتایج حاصل از کدورت سنجی هم خوانی داشت. این مساله نشان می‌دهد که تولید CO_2 به طور مستقیم با رشد میکروب ارتباط دارد. تولید این گاز در حضور پیرن نشان‌دهنده رشد بازیدیواسکوس پرسیکوس EBL-C16 با مصرف پیرن می‌باشد که در طی زمان افزایش یافته است. به همین ترتیب در

References

1. Yao L, Teng Y, Luo Y, Christie P, Ma W, Liu F, Wu Y, Luo Y, Li Z. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Trichoderma reesei* FS10-C and effect of bioaugmentation on an aged PAH-contaminated soil. *Bioremediat J*. 2015; 19(1): 9-17.
2. Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol*. 2005; 80(7): 723-736.
3. Ortega-González DK, Cristiani-Urbina E, Flores-Ortíz CM, Cruz-Maya JA, Cancino-Díaz JC, Jan-Roblero J. Evaluation of the removal of pyrene and fluoranthene by *Ochrobactrum anthropi*, *Fusarium* sp. & their coculture. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015; 175(2): 1123-1138.
4. Zhou H, Wang H, Huang Y, Fang T. Characterization of pyrene degradation by halophilic *Thalassospira* sp. strain TSL5-1 isolated from the coastal soil of Yellow Sea, China. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016; 107: 62-69.
5. 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): 324-34.
6. Hassanshahian M, Zeynalipour MS, Musa FH. Isolation and characterization of crude oil degrading bacteria from the Persian Gulf (Khorramshahr provenance). *Mar Pollut Bull*. 2014; 82(1): 39-44.
7. Moghimi H, Tabar RH, Hamed 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.
8. Zafra G, Moreno-Montaña A, Absalón ÁE, Cortés-Espinosa DV. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. *Environ Sci Pollut Res*. 2014; 1: 1-9.
9. Castillo-Carvajal LC, Sanz-Martín JL, Barragán-Huerta BE. Biodegradation of organic pollutants in saline wastewater by halophilic microorganisms: a review. *Environ Sci Pollut Res*. 2014; 21(16): 9578-9588.
10. Fathepure BZ. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Front Microbiol*. 2014; 5.
11. Pointing S. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001; 57(1): 20-33.
12. Acevedo F, Pizzul L, del Pilar Castillo M, Cuevas R, Diez MC. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the Chilean white-rot fungus *Anthracoxyllum discolor*. *J Hazard Mater*. 2011; 185(1): 212-219.
13. Cui Z, Xu G, Gao W, Li Q, Yang B, Yang G, Zheng L. Isolation and characterization of *Cycloclasticus* strains from Yellow Sea sediments and biodegradation of pyrene and fluoranthene by their syntrophic association with *Marinobacter* strains. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2014; 91: 45-51.

14. Hui W, Haiyan Z, Yong HUANG TF. Isolation and degradation characteristics of a HMW-PAHs degrading halophilic strain. *Tsinghua Sci Technol.* 2015; 55(1): 87-92.
15. Gomes M, Gonzales-Limache E, Sousa S, Dellagnezze B, Sartoratto A, Silva L, Gieg L, Valoni E, Souza R, Torres A. Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2018; 126: 231-242.
16. Hadibarata T, Khudhair AB, Kristanti RA, Kamyab H. Biodegradation of pyrene by *Candida* sp. S1 under high salinity conditions. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2017; 40(9): 1411-1418.
17. Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan A. Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology: Springer Science & Business Media; 2012.
18. Rahman K, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat I. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour Technol.* 2002; 85(3): 257-261.
19. Heidarytabar R, Azin E, Moghimi H. Introduction of halotolerant *Mucor circinelloides* UTMC 5032 for bioremediation crude oil hydrocarbons. *Biol J Microorganism.* 2017; 6(21): 31-45.
20. Hesham AE-L, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Lv W, Yang M. Isolation and identification of a yeast strain capable of degrading four and five ring aromatic hydrocarbons. *Ann Microbiol.* 2006; 56(2): 109.
21. 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.
22. Amberg DC, Burke DJ, Strathern JN. Methods in Yeast Genetics: A cold spring harbor laboratory course manual, 2005 Edition (Cold Spring). 2005.
23. Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp.(ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour Technol.* 2012; 112: 83-90.
24. Cerqueira VS, Hollenbach EB, Maboni F, Vainstein MH, Camargo FA, Maria do Carmo RP, Bento FM. Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial cultures. *Bioresour Technol.* 2011; 102(23): 11003-11010.
25. Juckpech K, Pinyakong O, Rerngsamran P. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by newly isolated *Curvularia* sp. F18, *Lentinus* sp. S5, and *Phanerochaete* sp. T20. *Sci Asia.* 2012; 38: 147.
26. Singh H. Mycoremediation: fungal bioremediation: John Wiley & Sons; 2006.

27. Cerniglia CE. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: past, present and future applications in bioremediation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1997; 19(5): 324-333.
28. Pozdnyakova NN, Rodakiewicz-Nowak J, Turkovskaya OV, Haber J. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. *Enzyme Microb Technol*. 2006; 39(6): 1242-1249.
29. Deng Y, Zhang Y, Hesham AE-L, Liu R, Yang M. Cell surface properties of five polycyclic aromatic compound-degrading yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010; 86(6): 1933-1939.
30. Chen B, Wang Y, Hu D. Biosorption and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous solutions by a consortium of white-rot fungi. *J Hazard Mater*. 2010; 179(1): 845-851.
31. Arun A, Eyini M. Comparative studies on lignin and polycyclic aromatic hydrocarbons degradation by basidiomycetes fungi. *Bioresour Technol*. 2011; 102(17): 8063-8070.
32. Ting W, Yuan S, Wu S, Chang B. Biodegradation of phenanthrene and pyrene by *Ganoderma lucidum*. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2011; 65(1): 238-242.
33. Ghosh I, Mukherji S. Diverse effect of surfactants on pyrene biodegradation by a *Pseudomonas* strain utilizing pyrene by cell surface hydrophobicity induction. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016; 108: 67-75.



Pyrene biodegradation by halo-tolerant yeast *Basidioascus persicus*

Aliyeh Kamyabi¹, Hamid Moghimi²

¹M.Sc. student, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. ²Assistant Professor, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Poly-aromatic hydrocarbons are one of the most important toxic compounds of crude oil and environmental pollutants. The purpose of this study was to isolate halo-tolerant pyrene- degrading yeast.

Materials & Methods: Isolation of yeasts from contaminated and saline soils of oil-rich southern regions was carried out, at first. Then, screening of yeast isolates was performed based on their ability to grow in the salty medium and biodegrade oil. After screening and molecular identification of the optimal strain, its ability to tolerate salt and grow in the presence of pyrene, as well as the ability to degrade pyrene and other low molecular weight hydrocarbons were studied.

Results: In this study, EBL-C16 was selected as the superior isolate, with growth in salt concentrations of 0-15% and eliminating 75.51% of the crude oil. Molecular identification of this isolate showed 100% similarity to *Basidioascus persicus*. Growth analysis showed the ability of this yeast isolate to grow in salt concentrations of 0 to 20 %. Growth and removal studies in the presence of 500 mg/l of pyrene and 2.5% salt showed 78.57% pyrene removal after 21 days, with the growth rate of 1.4 g/l of dry weight, as well as CO₂ production of 3.1 mg. *B. persicus* had the ability to break down phenanthrene and anthracene, as well.

Conclusion: The results can be used to use halo-tolerant yeasts for bioremediation of oil-contaminated saline areas.

Keywords: Pyrene, Biodegradation, *Basidioascus persicus*, Saline conditions.

Correspondence to: Hamid Moghimi

Tel: +98 21 66415495

E-mail: hmoghimi@ut.ac.ir

Journal of Microbial World 2019, 11(4): 353-366.