

# جداسازی، شناسایی و تعیین ویژگی دو گونه تریکوسپورون مخمری تجزیه کننده فنل جداسازی شده از پساب کارخانه کک سازی زرنده کرمان

مهدی حسن شاهیان<sup>۱</sup>، مریم کریمی<sup>۲</sup>، زرین دخت امامی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران  
۲- الف: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران  
ب: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم تحقیقات کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران  
(نویسنده مسئول) ۰۹۱۳۱۶۷۱۹۲۲@karimii.m2015@gmail.com  
۳- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، عضو هیئت علمی واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

(دریافت ۹۲/۱۱/۷ پذیرش ۹۲/۶/۱۲)

## چکیده

فنل و ترکیبات فنلی، آلوده‌کننده‌های محیطی هستند که در پساب صنایع مختلف از جمله زغال سنگ، پالایشگاه‌های نفت، کارخانه‌های فراورده‌های شیمیایی و پتروشیمی وجود دارند. حذف فنل از خروجی پساب صنایع اهمیت زیادی در حفظ محیط زیست دارد. تجزیه فنل، معمولاً به وسیله روش‌های فیزیوشیمیایی صورت می‌گیرد، اما این روش‌ها هزینه‌بر بوده و واسطه‌های خطرناک تولید می‌کنند. تجزیه بیولوژیکی فنل در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. از بین میکروارگانیسم‌ها، مخمرها اهمیت خاصی در تجزیه فنل دارند. در این پژوهش، مخمرهای تجزیه‌کننده فنل ابتدا از نمونه‌های محیطی (خاک و پساب) کارخانه کک‌سازی زرنده کرمان جداسازی شد. سپس کل مخمرهای هتروتروف و تجزیه‌کننده شمارش شدند که نمونه‌های خاک، دارای میزان بالاتری از مخمرهای تجزیه‌کننده نسبت به نمونه‌های پساب بودند. پس از سه بار پاساژ دادن مخمرها، میزان رشد آنها اندازه‌گیری شد که مخمرهای K1 و K11 دارای بیشترین میزان رشد بودند. همچنین همین مخمرها قادر به حذف فنل بودند که سنجش آن توسط معرف گیبس صورت گرفت. سپس اثر چهار غلظت مختلف فنل (۰/۰۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲ و ۰/۲۷۵ گرم در لیتر) بررسی شد و دو الگوی تجزیه‌ای در این مخمرها مشاهده شد. همچنین مقدار فعالیت امولسیون‌کنندگی و هیدروفوبیسیتیه هر یازده مخمر اندازه‌گیری شد. در نهایت پس از یک سری آزمون‌های بیوشیمیایی، شناسایی مولکولی مخمرهای قوی در تجزیه فنل با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی S rRNA18 با پرایمرهای ویژه این ژن (Euk-A, Euk-B) انجام شد. توالی حاصله علیه بانک‌های ژنی مقایسه شد و بالاترین همولوژی (بالاتر از ۹۸ درصد) به عنوان جنس و گونه مخمر تجزیه‌کننده تعیین شد. مخمرهای جداسازی شده مربوط به جنس‌های تریکوسپورون موتناویدینس و تریکوسپورون کوتانوم بودند.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه زیستی، فنل، زغال سنگ، مخمر

## ۱- مقدمه

می‌اندازد [۲، ۳ و ۴]. روش تجزیه فیزیکی و شیمیایی، غلظت فنل را به ۰/۴ - ۰/۳ گرم در لیتر کاهش می‌دهد [۵]. برای سال‌های متمادی از لجن فعال برای تغییر در بار فنل به منظور حذف آن استفاده می‌شد [۵، ۶ و ۷].

در مقایسه با روش‌های فیزیکی و شیمیایی، روش‌های بیولوژیکی تجزیه، نقش مهمی را در ساماندهی پساب دارند [۱]. روش‌های تجزیه، بیولوژیکی، به دلیل مزیت‌های اقتصادی و امکان تولید محصولات جانبی کم، ترجیح داده می‌شوند [۷]. فنل به آسانی قابل تجزیه نیست و می‌تواند از سرعت رشد میکروارگانیسم‌ها حتی در گونه‌هایی که ظرفیت استفاده از آن به عنوان سوبسترا را دارند، جلوگیری کند. همواره میکروارگانیسم‌های متنوعی برای تجزیه فنل

فنل و ترکیبات فنلی، آلوده‌کننده‌های محیطی هستند که در پساب صنایع مختلف از جمله زغال سنگ، پالایشگاه‌های نفت، کارخانه‌های فراورده‌های شیمیایی و پتروشیمی وجود دارند. با توجه به خواص سمی ترکیبات فنلی، حذف مؤثر این ترکیبات از پساب صنعتی، از اهمیت کاربردی بالایی برای حفاظت از محیط زیست برخوردار است [۱]. این ترکیبات به طور گسترده خاک و آب‌های زیر زمینی را آلوده می‌کنند و سمیت آنها به طور جدی بر موجودات زنده تأثیر می‌گذارد. هنگامی که فاضلاب حاوی ترکیبات فنلی وارد آب دریاها و رودخانه‌ها شود، زندگی ماهی‌ها را حتی در غلظت پایین به عنوان مثال غلظت ۵ تا ۲۵ میلی‌گرم در لیتر، به خطر

## ۲- مواد و روش‌ها

در این پژوهش از سه منطقه خاک و سه منطقه پساب کارخانه کک‌سازی زرنده کرمان نمونه‌گیری انجام شد. به این ترتیب که نمونه خاک از عمق ۲ سانتی‌متری و نمونه پساب از عمق ۱ سانتی‌متری برداشته و در ظروف استریل بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل شد.

### ۲-۱- شمارش کل هتروتروف‌ها و مخمرهای تجزیه‌کننده

برای شمارش کل هتروتروف‌ها، رقیق‌سازی صورت گرفت. در مورد نمونه‌های خاک از رقت ۵- و ۴- و در مورد نمونه‌های آب از رقت ۴- و ۳-، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به محیط کشت انتقال داده شد. پس از دو روز، تعداد کلنی‌های رشد یافته شمارش شد. برای شمارش مخمرهای تجزیه‌کننده، پس از پاساژ سوم همین کار تکرار شد و تعداد مخمرها از رابطه زیر به دست آمد:

$$(1) \text{تعداد کلنی در هر میلی لیتر} = \text{میانگین تعداد کلنی در سه پلیت} \times \text{عکس ضریب رقت} \times 10$$

### ۲-۱-۱- روش جداسازی مخمرهای تجزیه‌کننده فنل

در ابتدا ۳/۲۷ گرم از محیط بوشنل هاووس در یک لیتر آب مقطر حل و اتوکلاو شد. pH محلول بین ۵/۵ تا ۶، دما ۱۲۱ درجه سلسیوس و زمان ۱۵ دقیقه بود. ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط بوشنل-هاووس و ۴۰۰ میکرولیتر کلرامفنیکل ۵/۰ درصد و ۱/۰ گرم فنل به هر ارلن اضافه شد. ۵ گرم از نمونه خاک و ۵ میلی‌لیتر از نمونه پساب به صورت جداگانه به هر ارلن اضافه شد. نمونه‌ها بر روی شیکر با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند، سپس ۵ میلی‌لیتر از این محیط به یک محیط بوشنل هاوس جدید منتقل شد و این عمل تا سه بار انجام شد و در نهایت مخمرهای تجزیه‌کننده که در محیط بوشنل هاوس در پاساژ سوم رشد کرده بودند، بر روی محیط سابورودکستروز آگار جداسازی شدند [۱۸]. پس از رقیق‌سازی، برای نمونه‌های خاک از رقت ۳- و ۴- و در مورد نمونه‌های آب، از رقت ۴- و ۵- برداشته و در محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شد و پس از دو روز، کلنی‌های متفاوت تفکیک و جداگانه کشت داده شدند و در زیر میکروسکوپ از جهت خالص بودن مخمر مورد بررسی قرار گرفته و نامگذاری شدند.

### ۲-۲- حذف فنل به وسیله سویه‌های جدا شده

مقدار ۵۰ میلی لیتر محیط بوشنل-هاووس و ۱/۰ گرم فنل به علاوه یک لوپ کشت تازه هر مخمر در pH حدود ۵/۵ تا ۶ به ارلن‌ها اضافه شد. نمونه‌ها بر روی شیکر با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. کدورت نمونه‌ها در طول موج ۶۰۰

به قصد بهبود فرایند بیولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفته است. تعدادی از مطالعات انجام شده در تجزیه فنل با میکروارگانیسم‌های پروکاریوتی انجام شده است [۸، ۹، ۱۰، ۱۱ و ۱۲]. با این حال، استفاده از این فناوری با توجه به خاصیت سمی ترکیبات فنلی به خصوص ۴-کلروفنل، برای میکروارگانیسم‌ها محدود است [۱]. برخی سویه‌های مخمر که قادر به استفاده از فنل هستند گزارش شده است [۵]. تنها برخی از اعضای جنس مخمرها چون *تریکوسپورون* <sup>۱</sup> *رودوتورولا* <sup>۲</sup> و *کاندیدا* <sup>۳</sup> می‌توانند ترکیبات فنلی را به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی متابولیزه کنند [۱۰]. استفاده از مخمرها در تجزیه ترکیبات سمی و همچنین تصفیه پساب‌هاست به‌طور مثال *رودوتورولا موسیلاژینوزا* <sup>۴</sup> قادر به تجزیه ترکیبات فنلی از جمله: وانیلیک <sup>۵</sup>، پروتوکاتکونیک <sup>۶</sup>، پی-کوماریک اسید <sup>۷</sup> و تیروسول <sup>۸</sup> بوده و به علاوه قادر به کاهش گالیک اسید <sup>۹</sup> و کاتکول <sup>۱۰</sup> است [۱۳].

در سال ۲۰۱۳، تجزیه بیولوژیکی ۴-کلروفنل توسط *کاندیدا/تروپیکالیس پی-اچ-بی* <sup>۱۱</sup> از طریق بهینه‌سازی پارامترهای فیزیوشیمیایی انجام شده است. نتایج نشان داده که این مخمر قادر به رشد بر روی ۴-کلروفنل و همچنین متابولیسم این ماده است [۱۴].

در سال ۲۰۱۳، تجزیه زیستی فنل به وسیله مخمر *کاندیدا/تروپیکالیس* انجام شده که از روش ان-ام-آر اسپکتروسکوپی <sup>۱۲</sup> برای سنجش حذف فنل استفاده شده است. آزمایش نشان داد که فنل به‌طور کامل به دی‌اکسید کربن و آب تقریباً در مدت ۲۰ ساعت تجزیه می‌شود [۱۵]. در سال ۲۰۱۲، به توانایی بالای دو گونه مخمر *یاروویا لایپولیتیکا* سویه‌های پی-جی-۲۰ و پی-جی-۳۲ جدا شده از مناطق آلوده به نفت برای تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک پی بردند [۱۶]. در همان سال، *کاندیدا/تروپیکالیس* را از خاک آلوده به نفت جدا نمودند که توانایی بالایی برای تولید بیوسورفاکتانت داشت و قادر به تجزیه روغن دیزل در طی بیش از ده روز بود [۱۷]. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و شناسایی مخمرهای تجزیه‌کننده فنل از پساب کارخانه کک‌سازی زرنده کرمان بود.

1 *Trichosporon*

2 *Rhodotorula*

3 *Candida*

4 *Rhodotorula mucilaginosa*

5 Vanillic

6 Protocatechuic

7 P-coumaric acids

8 Tyrosol

9 Gallic acid

10 Catechol

11 *Candida tropicalis* PHB5

12 NMR Spectroscopy

13 *Yarrowia lipolytica* strains PG- 20 and PG-32

تعیین توالی به شرکت بیونره<sup>۱</sup> کره جنوبی فرستاده شد. نتایج حاصل از تعیین توالی در بانک‌های ژنی NCBI قسمت بلاست<sup>۲</sup> وارد شد و میزان همسانی آنها با توالی‌های موجود در بانک ژنی مقایسه شد و قرابت بالاتر از ۹۷ درصد به‌عنوان جنس و گونه مخمری مجهول لحاظ شد [۹].

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- نتایج حاصل از شمارش تعداد مخمرهای تجزیه‌کننده فنل در نمونه‌های جمع‌آوری شده

نتایج حاصل از این شمارش در جدول‌های ۱ و ۲ آمده است. همان‌طور که در این جداول دیده می‌شود، نمونه‌های خاک‌های آلوده دارای میزان بالاتری از مخمرهای تجزیه‌کننده نسبت به نمونه‌های پساب جمع‌آوری شده می‌باشند. در نمونه ۱ پساب جمع‌آوری شده، هیچ‌گونه مخمر تجزیه‌کننده شمارش نشد، که این می‌تواند به سمیت بالای ترکیبات موجود در پساب نسبت داده شود و نمونه ۳ خاک دارای بیشترین تعداد مخمر تجزیه‌کننده بود.

جدول ۱- شمارش مخمرهای هتروتروف و تجزیه‌کننده در نمونه‌های پساب جمع‌آوری شده

نمونه پساب	تعداد مخمر هتروتروف (cfu/ml)	تعداد مخمر تجزیه‌کننده (cfu/ml)
پساب ۱	$1 \times 10^5$	صفر
پساب ۲	$28 \times 10^5$	$17 \times 10^2$
پساب ۳	$1 \times 10^2$	$5 \times 10^2$

جدول ۲- شمارش مخمرهای هتروتروف و تجزیه‌کننده در نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده

نمونه‌های خاک	تعداد مخمر هتروتروف (cfu/ml)	تعداد مخمر تجزیه‌کننده (cfu/ml)
خاک ۱	$5 \times 10^2$	$6 \times 10^2$
خاک ۲	$6 \times 10^2$	$3 \times 10^2$
خاک ۳	$15 \times 10^2$	$2 \times 10^2$

#### ۳-۲- سنجش رشد مخمرهای تجزیه‌کننده فنل

نتایج حاصل از سنجش رشد مخمرهای تجزیه‌کننده فنل در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، مخمرهای K1 و K11، با داشتن اعداد جذب  $1/674$  و  $1/509$  در  $600$  نانومتر دارای کدورت بیشتری نسبت به سایر مخمرهای

<sup>1</sup> Bionner  
<sup>2</sup> BLAST

نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد [۱۹] و [۲۰]. برای ارزیابی حذف فنل توسط مخمرهای تجزیه‌کننده از روش گیبیس استفاده شد [۵].

#### ۲-۲-۱- تعیین رشد مخمرهای جدا شده در غلظت‌های مختلف فنل

مخمرهای جداسازی شده در غلظت‌های مختلف فنل ( $0/05$ ،  $0/125$ ،  $0/2$ ،  $0/275$  گرم در لیتر) تلقیح شده و سپس ارلن‌ها بر روی شیکر با دور  $180$  rpm به مدت  $10$  روز در دمای  $30$  درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس جذب آن‌ها در طول موج  $600$  نانومتر خوانده شد [۲۰ و ۲۱]. روش محاسبه درصد حذف فنل به صورت زیر است:

(۲)

$$100 \times \frac{\text{میزان جذب نمونه شاهد بدون مخمر} - \text{میزان جذب نمونه مخمری}}{\text{میزان جذب نمونه شاهد بدون مخمر}} = \text{درصد حذف}$$

برای استخراج DNA از روش استاندارد فنل-کلروفرم استفاده شد [۸].

#### ۲-۲-۲- تعیین غلظت DNA استخراج شده

برای تعیین غلظت DNA استخراج شده، جذب نوری محلول DNA استخراج شده در طول موج  $260$  نانومتر اندازه‌گیری شد و طبق رابطه زیر غلظت DNA استخراج شده به دست آمد

(۳)

$$OD_{260} \times \text{dilution factor} = \text{DNA concentration } (\mu\text{g/ml})$$

پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق با سفارش از شرکت سیناژن تهیه شد. یک جفت پرایمر برای شناسایی ژن 18S rRNA به کار رفت. پرایمرهای

(-3'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT EukA و

(5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3') EukB

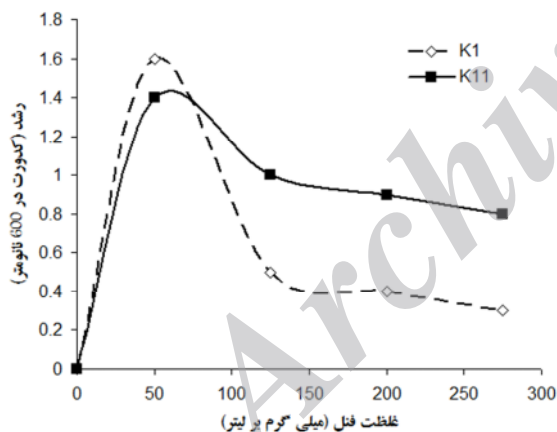
برنامه PCR به این به صورت بود: دمای دناتوراسیون  $94$  درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمرها  $50$  درجه سلسیوس به مدت  $1$  دقیقه و دمای تکثیر  $72$  درجه سلسیوس به مدت  $1$  دقیقه و تعداد سیکل‌ها  $35$  بود. محصول حاصل از PCR در ژل آگاروز  $1$  درصد بارگذاری شد و سپس باند  $1400$  bp از ژل آگاروز طبق دستورالعمل کیت فرمنتاز (K0513) استخراج و برای

جداسازی شده هستند. به همین علت این مخمرها برای مطالعه و بررسی بیشتر انتخاب شدند.

### ۳-۴- اثر غلظت‌های مختلف فنل بر روی رشد مخمرهای برتر تجزیه‌کننده

اثر چهار غلظت مختلف فنل (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) (۱ درصد)، (۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر) (۲/۵ درصد)، (۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (۴ درصد) و (۲۷۵ میلی‌گرم در لیتر) (۵/۵ درصد) بر روی مخمرهای انتخاب شده بررسی شد. همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، بهترین غلظتی از فنل که بالاترین رشد مخمر را موجب شد، غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بود. رشد مخمر در غلظت‌های بالای فنل (۱۲۵ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) الگوی کاهشی داشت که علت آن افزایش سمیت فنل در اثر افزایش غلظت آن است که باعث می‌شود مخمرها تحمل خود را به سمیت فنل از دست بدهند و تعداد و رشدشان کاهش یابد.

چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، الگوی رشد در مخمرهای تجزیه‌کننده یکسان است اما روند کاهش متفاوت است. به این صورت که مخمر K1 در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بهترین رشد را دارد. اما با افزایش غلظت فنل رشد آن به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. در حالی که مخمر K11 در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر فنل بیشترین رشد را دارند. در این مخمر با افزایش غلظت فنل رشد با شیب کمتری کاهش پیدا می‌کند و می‌توان گفت افزایش غلظت تأثیر کمی روی رشد آن دارد.



شکل ۱- مقایسه رشد نمونه های مخمر K1 و K11 تجزیه کننده فنل در غلظت‌های مختلف فنل (جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر)

### ۳-۵- شناسایی مولکولی سویه‌های برتر تجزیه کننده فنل

شناسایی مولکولی مخمرهای قوی در تجزیه فنل با تکثیر قسمتی از ناحیه ژنی 18S rRNA با پرایمرهای ویژه این ژن (Euk-A, Euk-B) انجام شد. در شکل ۲ ناحیه تکثیر یافته نشان داده شده است. توالی حاصله و بالاترین همسانی پس از مقایسه کردن توالی

جدول ۳- میزان رشد سویه‌های مخمر تجزیه کننده فنل با اندازه‌گیری جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر

مخمر	جذب نوری در ۶۰۰ نانومتر
شاهد	۰
K1	۱/۶۷۴
K2	۰/۶۷۴
K3	۰/۳۰۸
K4	۰/۳۴۳
K5	۰/۱۳۵
K6	۰/۳۴۴
K7	۰/۵۰۹
K8	۰/۲۴۱
K9	۰/۲۴۰
K10	۰/۱۲۸
K11	۱/۵۰۹
K12	۰/۳۰۰

### ۳-۳- حذف فنل توسط مخمرهای جدا شده

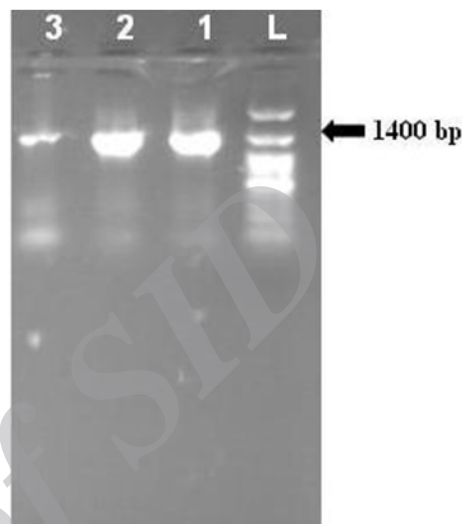
سنجش حذف فنل در مخمرها توسط معرف گیبس انجام شد که نتایج آن در جدول ۴ آمده است. نتایج سنجش جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر (که مربوط به حلقه فنل است) نشان می‌دهد که مخمرهای K1 و K11 با دارا بودن عدد جذب نوری صفر قادر به حذف فنل بوده‌اند. به دلیل عدم وجود فنل باقیمانده در محیط کشت، واکنش گیبس منفی بود. سایر مخمرها حذف فنل را انجام ندادند و بنابراین فنل موجود در محیط کشت با معرف گیبس واکنش داده و رنگ محیط به آبی تیره تغییر کرد.

جدول ۴- بررسی حذف فنل در محیط کشت توسط مخمرها با استفاده از روش گیبس

مخمر	جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر (مربوط به حلقه فنلی)
شاهد	۰/۱۷۵
K1	۰
K2	۱/۲
K3	۱/۴۰۲
K4	۱/۵۹۳
K5	۱/۲۵۴
K6	۱/۱۳۱
K7	۱/۲
K8	۱/۹۵۴
K9	۱/۴۸۹
K10	۱/۳۹۱
K11	۰
K12	۱/۲۱۳

به دست آمده در بانک‌های ژنی به صورت جداگانه برای هر سویه در زیر شرح داده شده است.

توالی به دست آمده برای سویه K1 پس از مقایسه کردن علیه بانک ژنی بالاترین همسانی (۹۹ درصد) را با جنس و گونه تریکوسپورون *montevideense* نشان می‌دهد. توالی به دست آمده برای سویه K11 بالاترین همسانی (۹۹ درصد) را با جنس و گونه تریکوسپورون *montevideense* نشان می‌دهد.



شکل ۲- تصویر ژل الکتروفورز تکثیر ژن 18S rDNA برای شناسایی مولکولی مخمرها  
چاهک (La): DNA مارکر 100 bp، چاهک (۱): سویه K1 چاهک (۲): سویه K11، چاهک (۳): کنترل مثبت (*Y. lipolytica* PG-20)

### ۳-۶- درخت فیلوژنی

توالی‌های حاصل از سویه‌های جداسازی شده، همراه با توالی سویه استاندارد در نرم‌افزار مگا ۴ وارد شد. قرابت و نزدیکی سویه‌ها به صورت درخت فیلوژنی به دست آمد (شکل ۳).

بر طبق آخرین گزارش‌ها در مقالات علمی چند سویه مخمر شناخته شده است که می‌توانند از هیدروکربن‌های آروماتیک به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند. در سال ۲۰۱۲، چاندران و داس، پنج گونه مخمر کریپتوکوکوس لورتی<sup>۱</sup>، کاندیدا تروپیکالیس<sup>۲</sup>، رودوتورولا موسیلاژینوزا، تریکوسپورون آشایی<sup>۳</sup> و کاندیدا روگوزا<sup>۴</sup> را از خاک آلوده به نفت جدا کردند [۲۲]. در همان سال جربویا و همکاران مخمر رودوتورولا موسیلاژینوزا را از پساب کارخانه روغن زیتون در تونس جدا کردند [۱۳]. کاراکایا و همکاران نیز رودوتورولا گلوتنیس را از پساب کارخانه روغن زیتون در ترکیه جدا نمودند [۲۳]. در این تحقیق مخمرهای تجزیه‌کننده فنل که از اکوسیستم‌های خاک و آب آلوده پساب کارخانه کک‌سازی بودند، به عنوان منبع جداسازی به کار برده شدند. اکوسیستم‌های انتخاب شده در این تحقیق با اکوسیستم‌های انتخاب شده توسط محققان ذکر شده همخوانی دارد. برای شناسایی مخمرهای تجزیه‌کننده ترکیبات آروماتیک (فنل) روش‌های گوناگونی تاکنون استفاده شده است. از جمله این روش‌ها می‌توان روش‌های بر مبنای آزمایش‌های بیوشیمیایی، روش‌های مولکولی بر مبنای تعیین توالی ژن 18s rRNA و توالی‌یابی DNA<sup>۵</sup> را نام برد. با این روش‌های

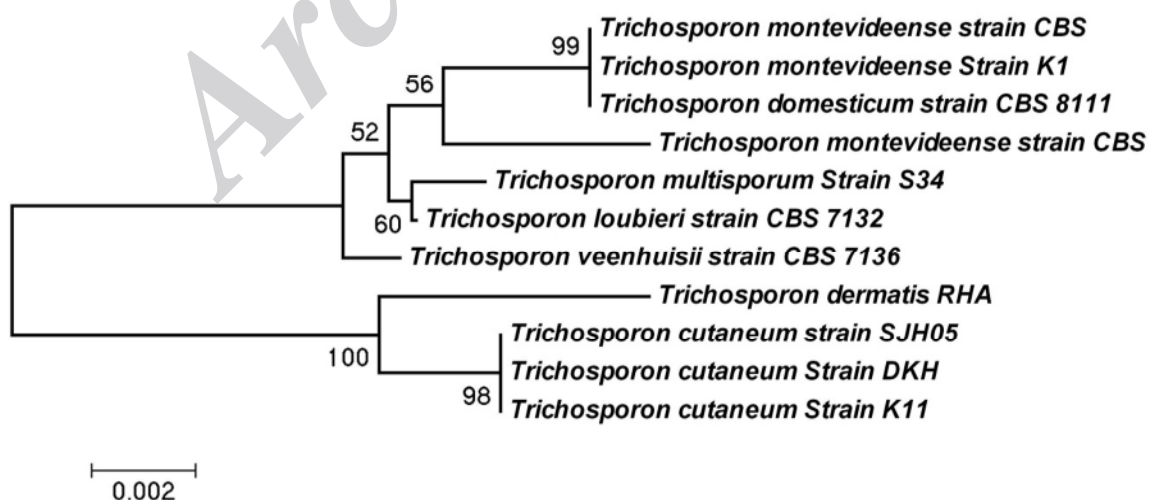
<sup>1</sup> MEGA-4

<sup>2</sup> *Cryptococcus laurentii*

<sup>3</sup> *Trichosporon asahii*

<sup>4</sup> *Candida rugosa*

<sup>5</sup> DNA Sequencing



شکل ۳- درخت فیلوژنی مخمرهای جداسازی شده



۲۰۰۸ در تحقیقی که برای تجزیه فنل با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از مخمر *Candida tropicalis* آن-سی-آی-ام<sup>۶</sup> استفاده کردند و نشان دادند که این گونه در زمان ۱۶ ساعت به حداکثر تجزیه (۹۶/۲۸ درصد) رسید و پس از ۴۸ ساعت، تجزیه تقریباً کامل (۹۹/۸۷ درصد) صورت گرفت [۲۶]. کاکوزورگ و همکاران در سال ۲۰۱۲، بیان کردند که مخمرهای *Candida* و *Yarrowia* بدون اضافه کردن سورفاکتانت توانستند هیدروکربن را به مقدار ۶۷ تا ۶۸ درصد تجزیه کنند [۲۷]. لیمینگ وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱، در تحقیقی غلظت فنل را برای *Candida tropicalis* جی-اچ/۸، تا مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بالا بردند که این مقدار فنل، در طی ۷۲ ساعت کاملاً حذف شد [۲۸]. لیو و همکاران در سال ۲۰۱۱ به این نتیجه رسیدند که مخمر *Trichosporon montevideense* پی-اچ/سی، تحمل خوبی را به سمیت فنل تا غلظت ۲۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر داراست و با مطالعه بر روی فرایند تجزیه دریافتند که این مخمر می‌تواند در مدت زمان ۱۸ ساعت، مقدار ۹۹ درصد فنل با غلظت ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر را حذف کند [۲۴].

#### ۴- نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف فنل بر روی میزان رشد مخمرهای تجزیه‌کننده مورد بررسی قرار گرفت. دو الگوی متفاوت از حداکثر میزان تجزیه فنل توسط مخمرهای تجزیه‌کننده دیده شد. به طوری که در K1 با افزایش غلظت فنل رشد مخمرها سریعاً کاهش می‌یافت که این می‌تواند به سمیت اعمال شده بر روی این مخمرها، در غلظت نسبت داده شود. در الگوی دوم K11 رشد با افزایش غلظت کاهش یافت، اما شدت کاهش به اندازه الگوی اول نبود. اصل کلی کاهش رشد در اثر افزایش غلظت که توسط محققان در تحقیقات به آن اشاره شده است، در تحقیق حاضر نیز دیده می‌شود و نتیجه این پژوهش با محققان دیگر همخوانی دارد.

شناسایی جنس و گونه‌های متعددی توسط محققان مختلف به‌عنوان مخمر تجزیه‌کننده فنل گزارش شده که در ادامه مثال‌هایی از آن آورده شده است. در سال ۲۰۱۱، لیو و همکاران، مخمر *Trichosporon montevideense* پی-اچ/سی<sup>۱</sup> را توسط روش توالی‌یابی DNA از نمونه خاک میدان نفتی در چین شناسایی نمودند [۲۴]. در همان سال بلو و همکاران ۳۰۰ گونه مخمر را از پساب کارخانه روغن زیتون در ایتالیا جدا کردند و با روش‌های مولکولی آن‌ها را شناسایی کردند که متعلق به گونه‌های *Rhodotorula*، *Pichia*<sup>۲</sup>، *Trichotrycom*<sup>۳</sup>، *Saccharomyces*<sup>۴</sup> و *Candida* بودند [۲۵]. در سال ۲۰۱۲، حسن شاهیان و همکاران توسط توالی‌یابی 18S rRNA دو سویه مخمر *Yarrowia lipolytica* سویه‌های پی-جی ۲۰ و پی جی ۳۲ را که از خاک و رسوب آلوده به نفت از خلیج فارس جدا کرده بودند، شناسایی نمودند [۱۶]. در همان سال، جربویا و همکاران مخمر *Rhodotorula mucilaginosa* را که از پساب کارخانه روغن زیتون در تونس جدا کرده بودند، توسط پی-سی-آر<sup>۵</sup> و 18S rRNA شناسایی کردند [۱۳]. در سال ۲۰۱۲ توسط چاندران و داس، مخمر *Candida tropicalis* تا حد گونه توسط 2-Viktek شناسایی شد [۲۲]. با مقایسه جنس‌های شناسایی شده مشخص شد که دو مخمر تعیین توالی شده‌ای که از پساب کارخانه کک‌سازی زرنند کرمان جداسازی شده بود متعلق به جنس‌های *Trichosporon montevideense* و *Trichosporon* است. بر طبق آنچه از توالی‌یابی مخمرها به دست آمده، نتایج این کار با نتایج سایر محققان از جمله حسن شاهیان و همکاران، لیو و همکاران، بلو و همکاران و بسیاری دیگر از محققان همخوانی دارد. در این تحقیق نیز از روش پی-سی-آر بر اساس ژن 18S rDNA برای شناسایی مخمرها استفاده شد.

اصول کلی که در همه تحقیقات به چشم می‌خورد این است که با افزایش غلظت میزان تجزیه کاهش پیدا می‌کند. وارما و همکاران

<sup>6</sup> *Candida tropicalis* NCIM 3556

<sup>7</sup> *Candida tropicalis* JH8

<sup>1</sup> *Trichosporon montevideense* PHE1

<sup>2</sup> *Pichia*

<sup>3</sup> *Geotrichum*

<sup>4</sup> *Saccharomyces*

<sup>5</sup> Polymerase Chain Reaction (PCR)

#### ۵- مراجع

1. Yan, J., Wen., J. Lan., and Hu, Z. (2007). "Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by the yeast *Candida tropicalis*." *Biodegradation*, 18, 719-729.
2. Chung, T.P., Tseng, H.Y., and Juang, R.S. (2003). "Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems." *Process Biochemistry*, 38, 1497-1507.

3. Kibret, M., Somitsch, W., and Robra, K.H. (2000). "Characterization of a phenol degrading mixed population by enzyme assay." *Water Research*, 4, 1127-1134.
4. Kumar, A., Kumar, S., and Kumar, S. (2005). "Biodegradation kinetics of phenol and catechol using *Pseudomonas putida* MTCC 1194." *Biochemical Engineering Journal*, 22, 151-159.
5. Godjevargova, T., Ivanova, D., Alexieva, Z., and Dimova, N. (2003). "Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production wastewater by free and immobilized *trichosporon cutaneum* R57." *Process Biochemistry*, 38, 915-920.
6. Topalova, Y., Dimkov, R., Ivanov, I., Sergieva, S., and Arsov, R. (1992). "Ortho-nitrophenol removal in two types activated sludge: the role of microbiological and enzymological adaptation." *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 12, 91-95.
7. Zlatka, A., Maria, G., Plamena, Z., and Nadejda, P. (2004). "Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities." *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 242-247.
8. Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A., and Streichsbier, F. (1992). "Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII." *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37, 252-259.
9. Leonard, D., and Lindley, N. (1999). "Growth of *Ralstonia eutropha* on inhibitory concentrations of phenol: Diminished growth can be attributed to hydrophobic perturbation of phenol hydroxylase activity." *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 271-277.
10. Piakong, M.T., Nooraini, A.B., and Madihah, M. D (2009). "Degradation pathway of phenol through ortho— cleavage by *Candida tropicalis* RrtI-Cr1." *Borneo Science*, 24, 9-15.
11. Roper, D.I., Stringfellow, J.M., and Cooper, R.A. (1995). "Sequence of the hpcC and hpcG genes of the meta-fission homoproteo catechuic acid pathway of *Escherichia coli* C: Nearly 40% amino acid identity with the analogous enzymes of the catechol pathway." *Gene*, 156, 47-51.
12. Wagner, K.H., Schwarz, T., and Kaufmann, M. (1999). "Phenol degradation by an enterobacterium: A *Klebsiella* strain carries a TOL-like plasmid and a gene encoding a novel phenol hydroxylase." *Canadian J. of Microbiology*, 45, 162-171.
13. Jarbouia, R., and Baati, H., Fetoui, F., Gargour, A., Gharsallah, N., and Ammar, M. (2012). "Yeast performance in wastewater treatment: Case study of *Rhodotorula mucilaginosa*." *Environmental Technology*, 33(2), 951-960.
14. Basak, B., and Bhunia, B., Dutta, S., and Dey, A. (2013). "Enhanced biodegradation of 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* PHB5 via optimization of physicochemical parameters using Taguchi orthogonal array approach." *International Biodeterioration and Biodegradation*, 78, 17-23.
15. Phalgune, U.D. and Rajamohana, P.R., Gaikwad, B. G., Varma, R.J., and George, S. (2013). "Biodegradation of phenol by the yeast *Candida tropicalis*: An investigation by NMR spectroscopy." *Biochemistry Biotechnology*, 169, 2029-2037.

16. Hassanshahian, M., Tebyanian, H., and Cappello, S. (2012). "Isolation and characterization of two crude oil-degrading yeast strains, *Yarrowia lipolytica* PG-20 and PG-32, from the Persian Gulf." *Marine Pollution Bulletin*, 64 (7), 1386-1391.
17. Chandran, P., and Das, N. (2012). "Role of sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by *Candida tropicalis*." *Bioremediation Journal*, 16, 19-30.
18. Hassanshahian, M., Emtiazi, G., and Cappello, S. (2012). "Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea." *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1386-1391.
19. Alef, K., and Nanniper, P. (2008). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Press, New York.
20. Karlsson, A., Ejlertsson, J., and Svensson, B.H. (2009). "Degradation of phenol under meso and thermophilic anaerobic condition." *Metabolism Microbial Chemistry*, 2, 25-35.
21. Prieto, M.B., Serra, J.L., and Lama, M.J. (2002). "Biodegradation of phenol in synthetic and industrial wastewater by *Rhodococcus erythropolis* UPV-1 immobilized in air stirred reactor with clarifier." *Applied and Environmental Biotechnology*, 58, 853-859.
22. Chandran, P., and Das, N. (2012). "Role of plasmid in diesel oil degradation by yeast species isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soil." *Environmental Technology*, 33, 19-36.
23. Karakaya, A., Laleli, Y., and Takaç, S. (2012). "Development of process conditions for biodegradation of raw olive mill wastewater by *Rhodotorula glutinis*." *International Biodeterioration and Biodegradation*, 75, 75-82.
24. Liu, H., and Ya, Q. J., Wang, G., Ye, F., and Cong, Y. (2011). "Biodegradation of phenol at high concentration by a novel yeast *Trichosporon montevidense* PHE1." *Process Biochemistry*, 46, 1678-1681.
25. Bleve, G., and Lezzi, C., Chiriatti, M.A., Ostuni, I.D., Tristezza, M., Divenera, D., Sergio, L., Mita, G., and Grieco, F. (2011). "Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters." *Bioresource Technology*, 102, 982-989.
26. Varma, R.J., and Gaikwad, B.G. (2008). "Rapid and high biodegradation of phenols catalyzed by *Candida tropicalis* NCIM 3556 cells." *Enzyme and Microbial Technology*, 43(6), 2358-2367.
27. Chrzanowski, L., Kaczorek, E., Oszanawski, A., and Pijanowska, A. (2008). "Yeast and bacteria cell hydrophobicity and hydrocarbon biodegradation in the presence of natural surfactants: Rhamnolipides and saponins." *Bioresource Technology*, 99, 4285-4291.
28. Wang, L., and Lin, Y., Yang, L., Yu, P., Xie, Z., and Luo, Y. (2011). "*Candida tropicalis*: Characterization of a strain capable of degrading high concentrations of phenol." *Biotechnology Letters*, 33, 943-946.