Nova Biologica Reperta 4 (3): 246-254 (2017) یافته‌های نوین در علوم زیستی، جلد ۴، شمارهٔ ۳: ۲۵۴-۲۴۶

ارزیابی تجزیه زیستی آنتراسن توسط *Gliomastix* sp. جدا شده از خاک های آلوده پالایشگاه شازند، ایران

رضوان حیدری تبار و حمید مقیمی*

دریافت: ۱۳۹۵/۶/۳۱/ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۴/ چاپ: ۱۳۹۶/۹/۳۰

گروه زیست‌فناوری میکروبی، دانشکدهٔ زیست‌شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
*مسئول مکاتبات: hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده. در این پژوهش جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام از خاک‌های آلوده به نفت پالایشگاه شازند اراک انجام شد. در مرحله جداسازی ۱۲ جدایه قارچی بدست آمد. آزمون TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) در حضور ۱٪ نفت در این جدایه‌ها نشان داد که جدایه ADH-02 با ۷۵ درصد حذف نفت خام، توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن‌های نفتی است. آنالیز FTIR حذف ۹۱ درصد ترکیبات آلیفاتیک در این جدایه را نشان داد. نتایج حاصل از شناسایی نشان داد که ADH-02 با ۹۹ درصد شباهت متعلق به جنس *Gliomastix* است. بررسی تجزیه ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای مدل در محیط پایه نمکی با HPLC توسط این سویه نشان داد که این سویه قادر است ٪۶۷ آنتراسن را طی ۱۴ روز تجزیه کند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که سویه *Gliomastix* sp. برای اولین بار به‌عنوان قارچی توانمند در جهت حذف زیستی نفت خام و ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه ای گزارش شده است.

واژه‌های کلیدی. پاک‌سازی زیستی، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای، قارچ، نفت خام

Evaluation of anthracene biodegradation by *Gliomastix* sp. isolated from contaminated soil of Shazand oil refinery, Iran

Rezvan Heydaritabar & Hamid Moghimi*

Received 29.02.2016/ Accepted 15.03.2017/ Published 21.12.2017

Department of Microbial Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran
*Correspondent author: hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract. In this study, fungal strains with crude oil biodegradation activity were screened from Shazand oil refinery (Arak). Twelve fungal strains were isolated in PDA medium. TPH assay in the presence of 1% of crude oil showed that the ADH-02 was the most capable strain of oil degradation with an efficiency of 75%. FTIR analysis was revealed that 91% of aliphatic hydrocarbons were degraded by ADH-02. This strain proved to belong to *Gliomastix* genius with a similarity of 99%. Polycyclic aromatic hydrocarbons degradation analysis with HPLC demonstrated that this strain is capable of removing 67% of anthracene in 14 days. The results showed that *Gliomastix* sp. was a potent fungal strain in bioremediation of crude oil and polycyclic aromatic hydrocarbon.

Keywords. bioremediation, polycyclic aromatic hydrocarbon, fungus, crude oil

مقدمه

محصولات مشتق از نفت خام، منبع اصلی انرژی مورد استفاده در صنعت و زندگی روزمره‌ی بشر را تشکیل می‌دهند (Bustamante *et al*., 2012). روزانه مقادیر زیادی نفت و فراورده‌های نفتی، در حجم زیاد و از راه‌های مختلف به محیط‌زیست وارد می‌شود که اثرات منفی و طولانی مدتی بر منابع طبیعی و زندگی موجودات زنده دارد (Singh, 2006). وجود این آلاینده‌ها تعادل اکولوژیکی را برهم می‌زند که این عدم تعادل ممکن است تا سال‌ها در محیط باقی بماند (Gogoi *et al*., 2003). با توجه به فعالیت‌های صنعت نفت مانند حفاری، انتقال و پالایش نفت، همواره احتمال آلودگی مناطق شور با آلاینده‌های نفتی اجتناب‌ناپذیر است (McGenity *et al*., 2010). علاوه بر این پساب خروجی بسیاری از تأسیسات نفتی دارای ترکیبات آروماتیک بوده که پس از پالایش نفت، میزان قابل‌توجهی از ترکیبات آروماتیک در پساب به جا می‌ماند. رهاسازی این پساب در محیط سبب آلودگی محیط زیست به هیدروکربن های نفتی می‌شود (Dastgheib *et al*., 2011; Kathi & Khan, 2012). بنابراین لازم است قبل از رهاسازی این پساب در محیط بازیافت و تصفیه سازی انجام گیرد. تصفیه‌ی این‌گونه پساب‌ها با روش‌های متداول بسیار دشوار، هزینه بر و گاه غیرممکن است و نیازمند توسعه‌ی روش‌های پاک‌سازی با قابلیت کاربرد بالا است (Varjani, 2016). یکی از روش‌های اصلی در جهت حذف آلودگی‌های نفتی استفاده از توان میکروارگانیسم‌های زنده یا در اصطلاح پاک‌سازی زیستی است (Varjani, 2016). روش پاک‌سازی زیستی که به‌طورمعمول شامل تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیر سمی با استفاده از فعالیت میکروارگانیسم‌ها است، فرایند بسیار امیدوارکننده‌ای برای تیمار آلودگی‌های نفتی به شمار می‌رود (Gadd, 2001; Mancera- Lopez *et al*., 2012) اما در این راستا، در پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به نفت بسیاری از انواع میکروارگانیسم‌ها توانایی تحمل سمیت ناشی از غلظت بالای نفت را نداشته و پاک‌سازی زیستی به‌کندی صورت می‌گیرد. ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای از مهمترین آلاینده‌های موجود در نفت بوده که به دلیل سمیت بالای این ترکیبات تلاش های زیادی جهت پاکسازی این ترکیبات از محیط زیست صورت گرفته است. ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه ای به دلیل کاهش حلالیت با افزایش تعداد حلقه‌ها و همچنین سمیت زیاد، ماندگاری بالایی داشته و پاک‌سازی آن با دشواری بیشتری همراه است (Anwar *et al*., 2016; Mancera-López *et al*., 2012). بیشتر پژوهش های صورت گرفته در زمینه پاکسازی زیستی هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای بر روی باکتری‌ها تمرکز داشته؛ حال آنکه پاک‌سازی زیستی این ترکیبات با استفاده از قارچ‌ها به علت وجود توانمندی‌های خاص موجود در این میکروارگانیسم‌ها و نیز برتری آن‌ها در برخی موارد نسبت به باکتری‌ها در پژوهش‌های مختلف کمتر مورد توجه قرار گرفته است. قارچ‌ها میکروارگانیسم‌های توانمندی در تجزیه هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای می‌باشند که علت این توانمندی بالا ترشح آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل لاکاز، لیگنین پراکسیداز، منگنز پراکسیداز، مونواکسیژناز و همچنین دی‌اکسیژنازها است (Mouhamadou *et al*., 2013). بنابراین هدف از انجام این پژوهش در گام نخست غربالگری جدایه‌های قارچی توانمند از مناطق آلوده به آلاینده‌های نفتی و دستیابی به جدایه قارچی بومی توانمند در تولید ترکیبات فعال زیستی و حذف ترکیبات نفتی بوده که برای این منظور بعد از جداسازی و غربالگری جدایه‌های قارچی، با استفاده از روش‌های استاندارد حذف زیستی نفت خام و همچنین هیدروکربن‌های آروماتیک سه حلقه‌ای آنتراسن برای بهترین ایزوله قارچی تحت بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های خاک از منطقه‌ی آلوده به نفت خام پالایشگاه شازند اراک در پلاستیک های ۲۵ در ۲۵ سانتی‌متری جمع‌آوری و داخل محفظهٔ عالق حرارتی و همراه با یخ سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد . نمونه‌ها در آزمایشگاه با الک ۰/۵ میلی متر همگن شده و ذرات درشت آن جداسازی شد. در ادامه pH خاک اندازه گیری شده و نمونه های الک شده جهت جداسازی قارچ‌ها مورداستفاده قرار گرفت (Page, 1982).

جداسازی قارچ‌های تجزیه کننده ترکیبات نفتی

جدایه‌های قارچی موجود در نمونه‌های خاک با استفاده از روش غنی‌سازی جداسازی و خالص‌سازی شد. برای این منظور، جهت

فعال‌کردن و سازگاری جمعیت‌های قارچی تجزیه کننده ترکیبات نفتی خاک، از محیط تغییریافته پایه‌ی نمکی همراه با یک درصد نفت خام سبک به‌عنوان منبع کربن و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیترکلرامفنیکل به‌منظور مهار رشد باکتریایی استفاده شد (Ekundayo *et al*., 2012). ترکیبات این محیط کشت شامل (گرم بر لیتر): $NaNO_3$ (۲)، $CaCl_2.2H_2O$ (۰/۱)، KH_2PO_4 (۳)، $MgSO_4$ (۰/۲)، $FeSO_4.7H_2O$ (۰/۰۱)، Na_2H-$PO_4.12H_2O$ (۳)، KCl (۱) و عصاره مخمر (۰/۰۲) در یک لیتر آب مقطر دیونیزه، همراه با ۲میلی‌لیتر محلول عناصر جزئی شامل (گرم بر لیتر): $ZnSO_4.H_2O$، (۰/۰۸) $FeCl_3.6H_2O$، (۰/۷۵)، $CoCl_2.6H_2O$ (۰/۰۸)، $CuSO_4.5H_2O$ (۰/۰۷۵)، $MnSO_4.H_2O$ (۰/۷۵)، $NaMoO_4.2H_2O$ (۰/۰۵)، H_3BO_3 (۰/۱۵) بود. pH اولیه پیش از اتوکلاو ۶/۸±۰/۲ تنظیم شد(Sepahi *et al*., 2008). ارلن‌های غنی‌سازی از نمونه‌های خاک همگن شده به مدت سه هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شد. بعد از این مدت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط غنی‌شده بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار دارای کلرامفنیکل و ۱درصد نفت خام پخش و به مدت دو هفته در انکوباتورگرماگذاری گشت. پس از این مدت جدایه‌های قارچی حاصله بر روی محیط کشت PDA خالص‌سازی شد (Ekundayo *et al*., 2012).

سنجش میزان حذف نفت

جهت تعیین توانمندی جدایه‌های حاصله در حذف نفت خام، هر یک از جدایه‌ها با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی بر اساس روش رحمان و همکاران (2002) از طریق اسپکتروفتومتری در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و جدایه برگزیده حاصل از این مرحله برای ادامه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور هر جدایه داخل ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت پایه نمکی Minimal Salt Medium (MSM) همراه با ۱ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کرین تلقیح شده و به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱۲۰ دور در دقیقه گرماگذاری شدند. به منظور سنجش میزان حذف نفت، هم حجم محیط کشت حلال تولوئن برای استخراج هیدروکربن‌های نفتی از محیط کشت و ورود به فاز آلی اضافه گردید. برای تفکیک بهتر فاز آبی از آلی، مخلوط فوق برای مدت ۵ دقیقه با استفاده از ورتکس به خوبی همزده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ۴۰۰۰ سانتریفوژ شود. در مرحله‌ی بعدی فاز آلی حاوی هیدروکربن-های نفتی جداشده و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گشت. نهایتاً برای تعیین میزان حذف نفت، جذب نمونه‌های تیمار با نمونه‌ی شاهد مقایسه شده و میزان حذف گزارش گردید (Rahman *et al*., 2002; Behnood *et al*., 2013).

شناسایی جدایه قارچی

برای شناسایی جدایه‌های قارچی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی آن‌ها از قبیل شکل میسلیوم، آرایش اسپورها، آرایش و رنگ کلنی و پیگمان های تولیدی، از طریق رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو و تهیه اسلاید کالچر و نیز با توجه به کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی موردبررسی قرار گرفت (Watanabe, 2011). به‌منظور شناسایی مولکولی ابتدا جدایه منتخب در محیط PDB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس میسلیوم های قارچ با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. در ادامه از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست‌توده منجمد شده با استفاده از ازت مایع، سلول‌ها شکسته شد و DNA آن به روش استخراج با فنل-کلروفرم جداسازی شد (Green & Sambrook, 2012). توالی ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی با پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1: 5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′ و ITS4: 5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) انجام گشت (Kamyabi *et al*,. 2017). برنامه PCR به صورت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی-گراد تقلیب اولیه انجام شد و در ادامه ۳۰ سیکل دمایی به صورت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجهٔ سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد ویال گرمادهی شد. محصول به‌دست‌آمده بعد از خالص‌سازی از روی ژل جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج تعیین ترادف در بانک ژنی NCBI و از طریق هم‌ردیفی توالی مورد ارزیابی قرار گرفت (Green & Sambrook, 2012).

سنجش میزان حذف نفت با استفاده از طیف‌سنجی FT-IR

توسط جدایه ADH-02

با توجه به اینکه گروه‌های هیدروکربنی در $2930\ cm^{-1}$ و $2960\ cm^{-1}$ دارای جذب می‌باشند، میزان حذف نفت توسط طیف‌سنجی FT-IR تحت بررسی و اندازه‌گیری دقیق قرار گرفت (Weisman & Group, 1998). برای این منظور جدایه قارچی برگزیده در محیط کشت پایهٔ نمکی همراه با ۱ درصد نفت خام کشت شده و در انتهای روز پانزدهم محتوای هیدروکربنی باقیمانده در محیط کشت با استفاده از حلال تتراکلرید کربن استخراج شد. در این روش هم‌حجم محیط، از حلال تتراکلرید کربن به فلاسک افزوده شد و محتوای فلاسک برای ۵ دقیقه ورتکس شده و در ادامه به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مرحلهٔ بعدی فاز آلی حاوی هیدروکربن‌های نفتی جداشده و نهایتا با استفاده از سل مایع، طیف‌سنجی FT-IR انجام شد. درنهایت میزان حذف نفت با توجه به نمونه شاهد تعیین شد (Behnood *et al*., 2013).

سنجش میزان حذف هیدروکربن آروماتیک چند حلقه‌ای آنتراسن با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای سمی‌ترین و مهم‌ترین آلاینده در نفت خام محسوب می‌شوند. این ترکیبات به‌صورت ترکیبات سبک (۲ و ۳ حلقه ای) و سنگین (تعداد حلقه های بیشتر از ۴) شناخته شده و دارای ۱۶ ترکیب هستند. به‌طور رایج از فنانترن و آنتراسن به عنوان ترکیبات پلی آروماتیک سه حلقه ای و پیرن به عنوان ترکیب چهار حلقه‌ای در بسیاری از تحقیقات به عنوان مدل و الگو استفاده می شود (Aranda *et al.,* 2016). در این پژوهش حذف زیستی آنتراسن به‌عنوان ترکیب مدل سه حلقه ای و شاخص مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور بررسی میزان حذف هیدروکربن آروماتیک سه‌حلقه‌ای آنتراسن از HPLC استفاده شد. برای این منظور، پیش کشت *Gliomastix* sp. در محیط کشت MSM همراه با ۰/۵٪ گلوکز در شیکر انکوباتور با ۱۸۰rpm و دمای $28\ ^{\circ}C$ به مدت ۴ روز گرماگذاری شد. سپس ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط پایه نمکی و ۰،۵٪ گلوکز به همراه ۱۰۰ppm آنتراسن تهیه و ۵ درصد از پیش-کشت به ارلن‌ها تلقیح شد، ارلن‌ها با شرایط قبل به مدت دو هفته گرماگذاری شدند، فلاسک‌هایی با شرایط مشابه، بدون تلقیح جهت کنترل و مقایسه با نمونه‌ها تهیه شد (Romero *et al*., 2002). برای استخراج PAHs باقی‌مانده در محیط از ۴ میلی لیتر هگزان استفاده شد. پس از اضافه کردن حلال، مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار داده شد و در نهایت به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد. سپس فاز آلی با دقت در ویال شیشه‌ای جمع آوری شد و حلال هگزان تبخیر شد. ۱۰۰µl از نمونه‌ها پس از محلول سازی در استونیتریل به دستگاه تزریق شد. به منظور انجام HPLC از ستون C18، فاز متحرک استونیتریل و آب مقطر دی‌یونیزه با نسبت ۸۰ به ۲۰، شدت جریان ۱ml/min، طول موج جذب ۲۵۴ nm استفاده شد نمودار استاندارد آنتراسن در غلظت‌های ppm ۱۰۰و ۷۵، ۵۰، ۲۵ به صورت جداگانه رسم شد (Srujana & Khan, 2012). تمام آزمایشات به صورت سه بار تکرار و در دو تکرار زیستی متفاوت انجام شد.

نتایج

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت

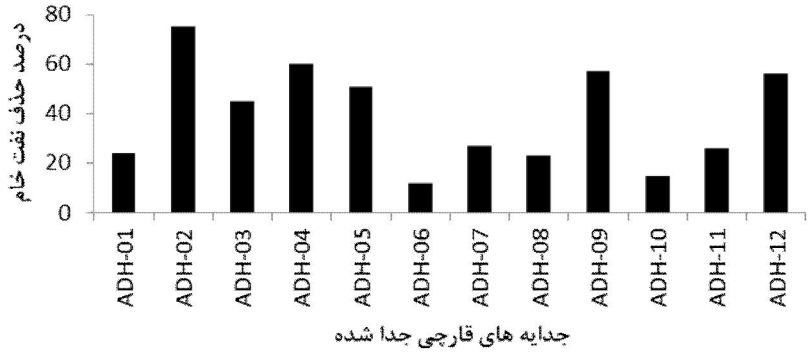
به‌منظور جداسازی جدایه‌های قارچی، نمونه‌های خاک آلوده به نفت از نقاط مختلف پالایشگاه شازند اراک جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. موقعیت جغرافیایی محل نمونه‌برداری شامل ۳۵ درجه ۵ دقیقه و ۸ ثانیه شمالی و ۴۹ درجه ۴۱ دقیقه و ۲ ثانیه شرقی اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه با الک ۰/۵ میلی‌متر همگن‌شده و ذرات درشت آن جداسازی شد. در ادامه pH و هدایت الکتریکی خاک‌ها به‌منظور بررسی شوری خاک اندازه‌گیری و جهت جداسازی جدایه‌ها مورداستفاده قرار گرفت. pH نمونه‌های خاک بین ۷ تا ۷/۵ و میزان شوری خاک ۳/۲ ds/m اندازه گیری شد.

سنجش میزان حذف نفت و رشد در جدایه‌ها

پس‌از خالص‌سازی، توانایی ۱۲ جدایه بدست آمده در حذف نفت در محیط کشت پایه‌ی نمکی دارای ۱ درصد نفت خام به عنوان تنها منبع کربن طی مدت ۱۴روز بررسی شد (شکل ۱). در این میان جدایه ADH-02 با بیش از ۷۵ درصد حذف نفت خام به‌عنوان توانمندترین جدایه در حذف نفت خام انتخاب شد.

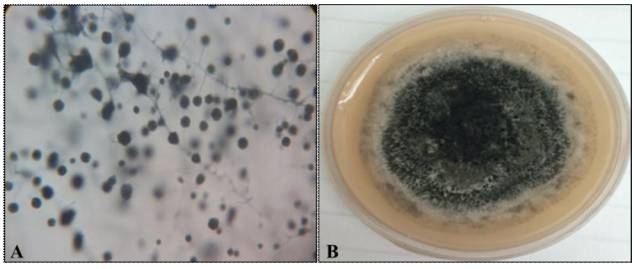
شناسایی سویه منتخب

نتیجه شناسایی مولکولی جدایه ADH-02 با PCR ژن ITS و تعیین ترادف آن و مقایسه‌ی توالی بدست آمده در بانک ژنی نشان



شکل ۱- درصد حذف نفت خام توسط جدایه‌های قارچی در محیط کشت پایه نمکی دارای ۱درصد نفت خام بعد از ۱۴ روز.

Fig. 1. Crude oil removal by fungal isolates in minimal salt medium with 1% crude oil after 14 days.



شکل ۲- A: تصویر میکروسکوپی .*Gliomastix* sp، **B:** مورفولوژی کلونی .*Gliomastix* sp در محیط PDA.

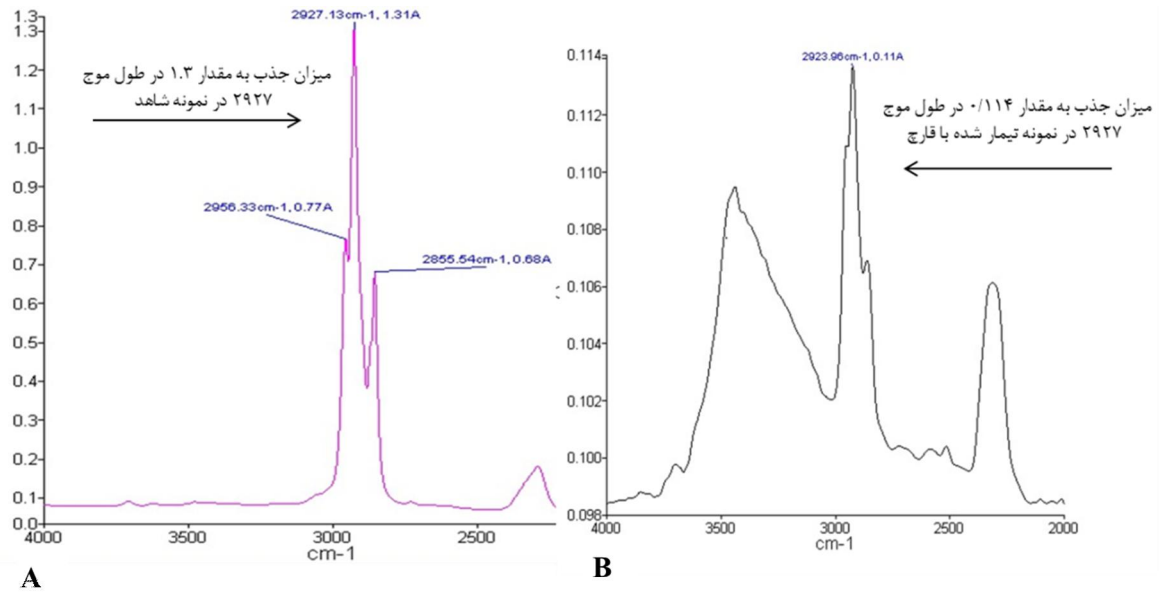
Fig. 2. A: microscopic of *Gliomastix* sp., **B:** fungal colony of *Gliomastix* sp. in PDA medium**.**

داد که جدایه ADH-02 با میزان شباهت ۹۹ درصد متعلق به جنس .*Gliomastix* sp است. بر اساس مطالعات ریخت شناسی بررسی کلونی به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی از طریق بررسی اسلاید کالچر مشخص شد که .*Gliomastix* sp در محیط Potato Dextrose Agar (PDA) و همچنین Malt Extract Agar (MEA) دارای کلونی های با میسیلوم های پنبه ای و به رنگ سبز تیره می باشد (شکل ۲). بلوغ کلونی و تولید اسپور ظرف ۵ تا ۷ روز گرماگذاری در ۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد بدست آمد. بررسی اسلایدهای میکروسکوپی از این سویه نشان داد که *Gliomastix* میسلیوم های بلند حاوی تیغه میانی، کاملاً رنگ پذیر با لاکتوفنول کاتن بلو و همراه با کنیدسوپورهای انتهایی متورم می باشد. اسپورهای غیر جنسی قارچ به صورت کروی و سطح صاف گزارش می شود (شکل ۲).

طیف‌سنجی FTIR در سویه .*Gliomastix* sp

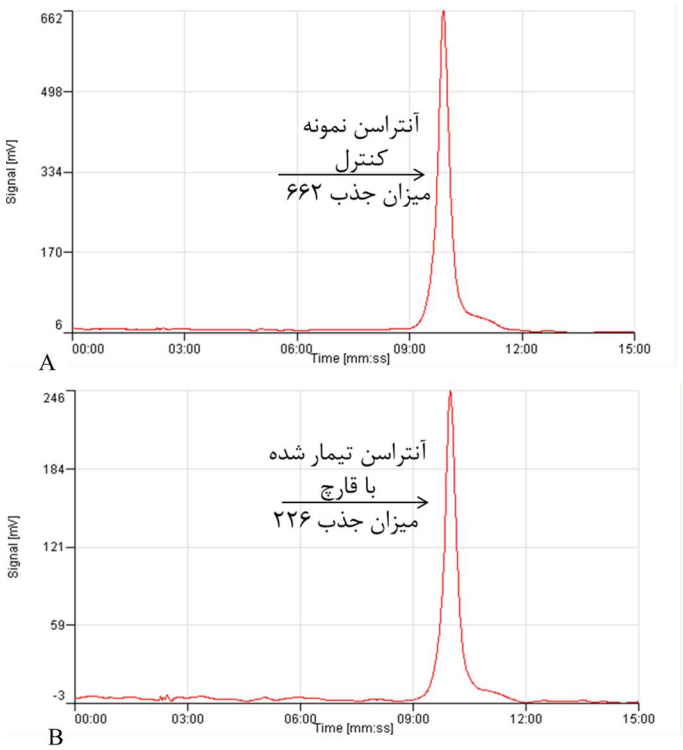
در ادامه جهت بررسی و تخمین دقیق‌تری از حذف ترکیبات آلیفاتیک توسط سویه .*Gliomastix* sp در محیط پایه نمکی دارای ۱درصد نفت خام، آنالیز باقیمانده نفت خام با روش FTIR انجام شد. بررسی طیف به‌دست آمده از این روش نشان داد که پیک ایجاد شده بین طول موج‌های $2960-2930\ cm^{-1}$ که مربوط به ترکیبات آلیفاتیک است در نمونه‌های کشت داده شده با سویه قارچی کاهش قابل توجهی را نشان می‌دهد که نشان از حذف ترکیبات آلیفاتیکی توسط سویه قارچی دارد. نتایج حاصل از این سنجش و مقایسه آن با نمونه‌ی شاهد و تیمار نشده نشان داد که این ایزوله قادر به تجزیه و کاهش ۹۱ درصدی ترکیبات آلیفاتیک است (شکل ۳). این میزان حذف با در نظر گرفتن میزان جذب در ۲۹۲۷ نانومتر در نمونه شاهد به مقدار ۱/۳ و در مقایسه با نمونه شاهد که این مقدار به میزان ۰/۱۱۴ کاهش یافته است بدست آمده است. ظهور پیک های اضافی در شکل ۳-B در ۳۴۰۰ و ۲۳۰۰ نانومتر به واسطه کاهش پیک اصلی در منطقه ۲۹۲۷ نانومتر به میزان ۹۰ درصد است که در شکل ۳-A به دلیل مقدار بالای جذب به صورت کوچک مشاهده می شوند.

سنجش حذف زیستی آنتراسن توسط .*Gliomastix* sp



شکل ۳- طیف سنجی FTIR و مقایسه میزان کاهش ترکیبات آلیفاتیک توسط *Gliomastix* sp. در حضور **A:** شاهد و **B:** ۱ درصد نفت خام در مقایسه با نمونه شاهد.

Fig. 3. FTIR spectroscopy and comparison of aliphatic compounds reduction by *Gliomastix* sp.in the presence of **A:** control sample and **B:** 1% crude oil in comparison with control sample.



شکل ٤- کروماتوگرام مربوط به حذف آنتراسن **A:** نمونه شاهد با غلظت ppm ۱۰۰ و **B:** نمونه پس از تیمار توسط سویه *Gliomastix* sp.

Fig. 4. Anthracene removal chromatogram **A:** control sample with 100 PPM and **B:** sample after treatment with *Gliomastix* sp

میزان حذف هیدروکربن آروماتیک سه حلقه ای آنتراسن توسط *Gliomastix* sp. بوسیله‌ی HPLC مورد سنجش قرار گرفت. نتایج در مقایسه با نمودارهای استاندارد، به صورت درصد حذف بیان شده است. بر اساس نتایج بدست آمده از حذف زیستی آنتراسن *Gliomastix* sp. توانسته است ٪۶۷ آنتراسن موجود در محیط را به عنوان تنها منبع کرین مورد استفاده قرار دهد. بر اساس نتایج بدست آمده این سویه قادر به حذف زیستی حدود ٪۸۰ از نفت خام، ٪۹۰ از تکیبات آلیفاتیک و حدود ٪۷۰ آنتراسن به عنوان ترکیب مدل آروماتیک است.

بحث

آلودگی محیط زیست به انواع ترکیبات آلاینده نفتی مشکلات زیست‌محیطی متعددی را برای انسان و سایر موجودات اکوسیستم‌ها ایجاد کرده و توسعه روش‌های پاک‌سازی زیستی از دیدگاه کاربردی بسیار حائز اهمیت است (Varjani, 2016). یک پاک‌سازی زیستی موفق نیازمند به جمعیت توانمندی از میکروارگانیسم‌ها در محل آلوده است که قادر باشند از ترکیبات نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و با تحمل شرایط تنش‌زای محیطی و تولید ترکیباتی مانند مواد فعال زیستی موجبات حذف آلاینده را از محیط‌زیست فراهم سازند (Ghosal *et al.*, 2016; Saucedo-Castañeda & Barrera-Cortés, 2008). درمیان پژوهش‌های انجام‌شده روی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده‌ی ترکیبات نفتی، اطلاعات موجود در خصوص تجزیه هیدروکربن‌ها توسط قارچ‌ها به‌عنوان یک عامل بسیار مؤثر و توانمند در حذف ترکیبات نفتی و تحمل‌کننده‌ی شرایط تنش‌زای محیطی بسیار کم بوده و نیازمند بررسی‌های بیشتر درزمینه یافتن و بررسی سازوکارهای حذف در این گروه از میکروارگانیسم‌ها است (Shankar *et al*., 2014; Husaini *et al*., 2008). در پژوهشی که Atagana و همکاران (2006) بر روی تجزیه هیدروکربن‌های پلی آروماتیک توسط قارچها انجام دادند مشخص شد آن دسته از میکروارگانیسم ها توانمندی بالایی در تجزیه زیستی ترکیبات پلی آروماتیک دارند. مطالعه روی قارچ های جداشده از زمین های آولده به ترکیبات نفتی نشان داده است که گونه‌هایی از جنس *Alternaria*، *Aspergillus* و *Penicillium* از رایج‌ترین گونه‌ها در مناطق آلوده بوده اند (Mohsenzadeh *et al.*, 2012). گزارش‌هایی از تجزیه هیدروکربن‌های نفتی توسط گونه‌های جنس *Fusarium* نیز مبنی بر استفاده از نفت خام به عنوان تنها منبع کربن و انرژی وجود دارد (Aranda, 2016). نتایج حاصل از آنالیز IR توسط این جدایه قارچی نشان داد که *Gliomastix* sp. قادر به تجزیه ٪۹۰ از ترکیبات الیفاتیک است. در مطالعه انجام شده توسط Behnood و همکاران (2013) عنوان شد که قارچ مدل تجزیه کننده ترکیبات مختلف *Phanerochaete chrysosporium* قادر به حذف ٪۶۰ ترکیبات آلیفاتیک موجود در نفت از طریق آنالیز IR است.

در این پژوهش به‌منظور بررسی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی، در گام اول از خاک‌های مناطقه پالایشگاه شازند اراک به‌منظور جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده نمونه‌گیری و غنی‌سازی انجام شد. نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که سمیت آلاینده‌های نفتی از رشد ایزوله های قارچی ممانعت نکرده و آن‌ها می‌توانند از ترکیبات نفتی موجود در محیط به‌عنوان منبع کربن و مواد غذایی برای رشد و تولید زیست‌توده استفاده کنند (شکل ۱). از میان ۹ جدایه خالص‌سازی شده در این مطالعه سویه *Gliomastix* sp. با توانایی حذف بیش از ۷۵ درصد نفت خام، به‌عنوان سویه منتخب تحمل‌کننده نفت انتخاب شد (شکل ۱). بررسی‌های FTIR باقیمانده‌ی هیدروکربن‌های نفتی توسط سویه *Gliomastix* sp. نشان داد که ۹۱ درصد ترکیبات آلیفاتیک توسط این سویه تجزیه شده‌اند (شکل ۳).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج بدست آمده در این پژوهش برای اولین بار *Gliomastix* sp. با ویژگی نفت‌خواری از خاک‌های بومی ایران معرفی شده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که این سویه توانایی حذف ۹۱ درصد ترکیبات آلیفاتیک، ۷۵ درصد حذف نفت خام و ۶۷ درصد حذف آنتراسن به عنوان PAHs را دارا است. با توجه به توانایی این سویه در حذف زیستی نفت خام و آنتراسن و عدم گزارش آن به‌عنوان عامل زیستی ترکیبات PAHs این جدایه می‌تواند به‌عنوان کاندید مناسبی به منظور پاک‌سازی خاک و پساب آلوده به هیدورکربن‌های آروماتیک نفتی باشد.

سپاسگزاری

بخشی از هزینه‌های این پژوهش توسط معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و در قالب گرنت شماره ۳۲۱۲۶۵/۰۱/۱ تامین شده است. نویسندگان مقاله از دکتر سیدرضا یوسفی به واسطه کمک در آنالیز نمونه های HPLC قدردانی می نمایند.

REFERENCES

Anwar, Y., Hanafy, A.A.E., Sabir, J.S., Al-Garni, S.M. and Ahmed, M.M.M. 2016. Microbes using PAHs as energy source: relationship with diseases. – Res. J. Biotechnol. 11: 94-109.

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

Atagana, H.I., Haynes, R., and Wallis, F. 2006. Fungal bioremediation of creosote-contaminated soil: a laboratory scale bioremediation study using indigenous soil fungi. – Water, Air, & Soil Pollut. 172: 201-219.

Behnood, M., Nasernejad, B. and Nikazar, M. 2013. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. – J. Ind. Eng. Chem. 20: 1879-1885.

Bustamante, M., Durán, N, and Diez, M.C. 2012. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. – J. Soil. Sci. Plant. Nutr. 12: 667-687.

Dastgheib, S.M., Amoozegar, M.A., Khajeh, K. and Ventosa, A. 2011. A halotolerant Alcanivorax sp. strain with potential application in saline soil remediation. – Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 305-312.

Ekundayo, F.O., Olukunle, O.F. and Ekundayo, E.A. 2012. Biodegradation of Bonnylight crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, Ondo state. Malays. – J. Microbiol. 8: 42-46.

Gadd, GM. 2001. Fungi in bioremediation. – Cambridge University Press, 481 pp.

Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T.K., and Ahn, Y. 2016. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. – Front. Microbiol. doi: 10.3389/fmicb.2016.01369.

Gogoi, B., Dutta, N., Goswami. P. and Krishna Mohan, T. 2003. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. – Adv. Environ. Res. 7: 767-782.

Green M.R. and Sambrook, J. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. – Cold Spring Harbor Laboratory (4th edition), 2028 pp.

Husaini, A., Roslan, H., Hii, K. and Ang, C. 2008. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. World. – J. Microbiol. Biotechnol. 24: 2789-2797.

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

Kathi, S, and Khan, A.B. 2012. Isolation and characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading soil microbes from automobile workshop sediments. – J. Environ. Sci. Technol. 5: 74-83.

Mancera-López, M.E., Esparza-García, F., Chávez-Gómez, B., Rodríguez-Vázquez, R., Martins, L.F. and Peixoto, R.S. 2012. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. – Braz. J. Microbiol. 43: 865-872.

McGenity, T.J. and Gramain, A. 2010. Cultivation of halophilic hydrocarbon degraders. In: Timmis K, editor. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. – Springer Heidelberg; p. 3847-3854.

Mohsenzadeh, F., Chehregani Rad, A., and Akbari, M. 2012. Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. – Iranian J. Environ. Health Sci. Eng. 15: 9-26.

Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F. and Geremia, R.A. 2013. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. – Fungal Biol. 117: 268-74.

Page, A.L. 1982. Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. – American Society of Agronomy, Soil Science Society of America Publication.

Rahman, K.S., Thahira-Rahman, J., Lakshmanaperumalsamy, P. and Banat, I.M. 2002. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. – Bioresour. Technol. 85: 61-57.

Romero, M., Cristina Mónica, L., Salvioli, M., Cecilia Cazau, and Arambarri, A.M. 2002. Pyrene degradation by yeasts and filamentous fungi. – Environmen. Pollut. 117: 159-163.

Saucedo-Castañeda, G. and Barrera-Cortés, J. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. – Int. Biodet. Biodeg. 61: 151-160.

Sepahi, A.A., Golpasha, I.D., Emami, M. and Nakhoda, A.M. 2008. Isolation and characterization of crude oil degrading Bacillus SPP. – J. Environ. Health Sci. Eng. 5: 149-154.

Shankar, S., Kansrajh, C., Dinesh, M.G., Satyan, R.S., Kiruthika, S. and Tharanipriya, A. 2014. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. – Int. J. Environ. Sci. Technol. 11: 367-376.

Singh, H. 2006. Mycoremediation: Fungal bioremediation. – John Wiley & Sons, Inc, 592 pp.

Srujana, K. and Khan, A.B. 2012. Isolation and characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading soil microbes from automobile workshop sediments. – J. Environ. Sci. Technol. 5: 74-83.

Varjani, S.J. 2016. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. – Bioresour. Technol. 223: 277-286.

Watanabe, T. 2011. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. Third Edition. – CRC Press, 426 pp.

Weisman, W. and Group TPHCW. 1998. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media. Vol 1. – Amherst Scientific Publishers, 98 pp.

*****

How to cite this article:

Heydaritabar, R. and Moghimi, H. 2017. Evaluation of anthracene biodegradation by *Gliomastix* sp. isolated from contaminated soil of Shazand oil refinery, Iran. – Nova Biologica Rep. 4: 246-254.

حیدری‌تبار، ر. و مقیمی، ح. ۱۳۹۶. ارزیابی تجزیه زیستی آنتراسن توسط *Gliomastix* sp. جدا شده از خاک های آلوده پالایشگاه شازند، ایران. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۴: ۲۵۴-۲۴۶.