Nova Biologica Reperta 6(1): 79-87 (2019)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press

یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۶، شماره ۱، صفحات ۷۹ الی ۸۷ (۱۳۹۸)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

مطالعه تأثیرعوامل محیطی و منابع کربن مختلف بر روی گوگردزدایی دی بنزوتیوفن توسط قارچ *Exophiala spinifera*

فاطمه علمی، زهرا اعتمادی‌فر و گیتی امتیازی
گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
مسئول مکاتبات: زهرا اعتمادی‌فر، z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

چکیده. از آن جایی که کیفیت سوخت‌های فسیلی اثر مستقیمی بر سلامت محیط زیست دارد ضروری است که مقدار گوگرد موجود در این سوخت‌ها کاهش یابد. در این تحقیق سویه جدیدی از قارچ *Exophiala spinifera* به نام سویه FM استفاده شد که قادر به کاهش دی‌بنزوتیوفن (DBT) به عنوان یک مدل از ترکیب‌های گوگردی حلقوی موجود در سوخت‌های فسیلی بود. با انجام تحلیل HPLC مشاهده شد که قارچ مورد نظر طی ۷ روز قادر به کاهش ٪۹۹ از غلظت DBT در محیط کشت پایهٔ نمکی است. این قارچ DBT را به‌مثابهٔ منبع گوگرد و به صورت کومتابولیسم با سایر منابع کربنی مانند گلوکز مصرف می‌کند. قارچ *E. spinifera* در منابع کربنی مختلف شامل گلوکز، سوکسینات، گلوکز و اتانول به همراه DBT به عنوان منبع گوگرد کشت داده شد و بیش‌ترین رشد و فعالیت گوگردزدایی پس از ۹۶ ساعت در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن بدست آمد. در غلظت‌های مختلف DBT بهترین رشد و فعالیت گوگردزدایی در غلظت ۰/۳ میلی‌مولار مشاهده شد. بیش‌ترین میزان گوگرددزایی DBT و رشد قارچ فوق در ۲۶ تا ۳۰ درجه سلسیوس مشاهده گردید. pH مناسب برای رشد ماکزیمم و بهترین فعالیت گوگردزدایی حدود ۴ تا ۵ به‌دست آمد.

واژه‌های کلیدی. بهینه سازی، قارچ، کومتابولیسم، گوگرد آلی، گوگردزدایی زیستی

Study the effect of environmental factors and different carbon sources on dibenzothiophene desulfurization by *Exophiala spinifera*

Fatemeh Elmi, Zahra Etemadifar & Giti Emtiazi
Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran
Correspondent author: Zahra Etemadifar, z.etemadifar@sci.ui.ac.ir

Abstract. It is necessary to reduce the amount of sulfur in fossil fuels due to direct impact of the quality of these fuels on the environment. In this research, a novel fungus strain of *Exophiala spinifera*, namely FM, was used to desulfurize dibenzothiophene (DBT) as a model cyclic sulfur compounds in oil and fossil fuels. HPLC analysis indicated that the fungus was capable of reducing 99% of DBT concentration in BSM medium after seven days. This fungus utilized DBT as a sulfur source by co-metabolism reaction with other carbon sources such as glucose. *Exophiala spinifera* was inoculated in BSM medium containing DBT with various carbon sources including ethanol, glucose, succinate, and glycerol. This fungus had the highest growth and desulfurization capability on glucose as a carbon source after 96 h**.** *E. spinifera* had best growth and desulfurization rates in 0.3mM DBT. Optimum DBT desulfurization and growth rate of this fungus was observed at 26-30 ºC. Suitable pH for the optimum growth and desulfurization activity of *E. spinifera* strain FM ranged 4-5.

Keywords. biodesulfurization, co-metabolism, fungus, optimization, organic sulfur

Received 19.11.2016/ Revised 23.09.2018/ Accepted 20.11.2018/ Published 01.05.2019
دریافت ۱۳۹۵/۰۸/۲۹/ ویرایش ۱۳۹۷/۰۷/۰۱/ پذیرش ۱۳۹۷/۰۸/۲۹/ انتشار ۱۳۹۸/۰۲/۱۱

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]

مقدمه

در نفت خام مقدار قابل توجهی از ترکیب‌های گوگرددار با وزن مولکولی پایین از قبیل تیول آلکیل حلقوی، بنزوتیوفن، دی‌بنزوتیوفن (DBT) و مشتقات آلکیله‌ی آن‌ها وجود دارد. این ترکیب‌ها برای چند دهه است که از نگرانی‌های بشر هستند (Soleimani *et al.*, 2007)، زیرا احتراق ترکیبات گوگرددار در سوخت‌های فسیلی همراه با تولید اکسید گوگرد بوده که به ریزش باران اسیدی و آلودگی هوا منجر می‌شود (Van Hamme *et al.*, 2003). از آن جایی که کیفیت سوخت‌های فسیلی اثر مستقیمی بر محیط زیست دارد ضروری است که جهت کاهش آلودگی ناشی از اکسید گوگرد مقدار گوگرد در نفت کاهش یابد (Mezcua *et al.*, 2007). روش‌های گوگردزدایی متنوعی وجود دارد که گوگرد را از سوخت‌های فسیلی حذف می‌کند اما گوگردزدایی هیدروژنی (هیدرودسولفوریزاسیون) از رایج ترین این روش‌ها به شمار می‌آید (Ma *et al.*, 2007). اگر چه فرایند گوگردزدایی هیدروژنی از سال‌ها پیش بطور تجاری مورد استفاده قرار گرفته است و ترکیبات گوگردی از قبیل تیول، سولفید و دی‌سولفید را بطور مؤثری حذف می‌کند (Kilbane, 2006) اما بسیاری از ترکیبات آروماتیک گوگرددار از قبیل DBT به این فرایند مقاوم هستند و بعد از گوگردزدایی در نفت باقی می‌مانند (Stoner *et al.*, 1990). از این رو فرایندهای بیوتکنولوژی از قبیل گوگردزدایی زیستی می‌تواند به عنوان یک روش مکمل و یا جایگزین فرایند گوگردزدایی هیدروژنی مورد استفاده قرار گیرد (Van Hamme *et al.*, 2003). DBT یک مدل برای تحقیق‌های گوگردزدایی است به گونه‌ای که کشت‌های میکروبی زیادی شامل کشت باکتری گرم مثبت، گرم منفی و مخمر بر مبنای توانایی مصرف DBT به عنوان منبع گوگرد جداسازی شده است (Lin *et al.*, 2010). باکتری‌های دارای فعالیت گوگردزدایی بیشتر متعلق به گروه گرم مثبت و بطور عمده از جنس *Rhodococcus* هستند (Bezalel *et al.*, 1997). تاکنون بیشترین تحقیق بر روی این جنس صورت گرفته است به گونه‌ای که آنزیم خالص آن جداسازی شده و سیستم ژنتیکی گوگردزدایی دی‌بنزوتیوفن این باکتری شناخته شده است اما تحقیق کمتری در مورد قارچ‌ها صورت گرفته است (Bezalel *et al.*, 1996; Campos-Martin *et al.*, 2010). قارچ‌ها از طریق عمل سیتوکروم P-450 و آنزیم‌های خارج سلولی خود قادر به متابولیزه کردن طیف وسیعی از مواد شیمیایی و هیدروکربن‌ها از جمله هیدروکربن‌های چند حلقه‌ای آروماتیک، بی‌فنیل و انواع ترکیبات پلیمری هستند، بنابراین قارچ‌ها می توانند کاندیدای مناسبی برای گوگردزدایی باشند (Van Hamme *et al.*, 2003; Etemadifar *et al.*, 2006; Etemadifar *et al.*, 2010).

از میان مطالعه‌های صورت گرفته بر روی مصرف DBT توسط قارچ‌ها، Faison و همکاران (1991) گزارش کردند که قارچ *Paecilomyces* sp. TLI، DBT را با یک مسیر اکسیداسیون گوگرد به ترکیب ۲-۲- دی‌هیدروکسی‌بی‌فنیل تبدیل می‌کند. هدف تحقیق حاضر بررسی اثر عامل‌های مختلف از قبیل دما، pH، منابع کربنی مختلف، غلظت‌های مختلف DBT بر روی فعالیت گوگردزدایی قارچ *Exophiala spinifera* strain FM جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت و گازوییل با قابلیت مصرف DBT بعنوان منبع گوگرد بوده است.

مواد و روش‌ها

محیط کشت

محیط پایه نمکی (BSM) برای آزمایش‌ها تهیه شد. این محیط شامل ۴ گرم Na_2HPO_4، ۲ گرم KH_2PO4، ۰/۲ گرم NH_4Cl، ۰/۰۰۱ گرم $MgCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$ و ۰/۰۰۱ گرم $FeCl_3.6H_2O$ است که در یک لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شده است و منابع کربنی مختلف به ان اضافه شد (Piddington *et al.*, 1995). استریلیزاسیون محیط کشت در اتوکلاو ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه انجام و DBT بصورت محلول در اتانول پس از استریل شدن محیط کشت به آن اضافه شد.

مواد شیمیایی

کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق ساخت کارخانجات Sigma و Merck جهت کاربرد آزمایشگاهی است.

انتخاب میکروارگانیسم

قارچ *Exophiala spinifera* strain FM که در تحقیق قبلی جداسازی و با شماره دسترسی KC952672 در سایت NCBI ثبت شده در این مطالعه استفاده شد (Elmi *et al.*, 2015).

بررسی مصرف DBT

در این قسمت ابتدا قارچ مورد مطالعه در محیط BSM حاوی ۱درصد گلوکز بعنوان منبع کربن و ۰/۳ میلی مولار از DBT حل

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]

شده در اتانول به عنوان منبع گوگرد کشت و در یک انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. تا زمانیکه یک سوسپانسیون با کدورت معادل ۰/۵ بدست آمد و سپس ۱ میلی لیتر از این سوسپانسیون به ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت BSM حاوی ٪۱ گلوکز و ۰/۳ میلی مولار DBT در ارلن ۲۵۰ میلی لیتری اضافه شد. انکوباسیون به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد روی شیکر ۱۸۰rpm صورت گرفت. در زمان‌های ۰، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز جهت بررسی مصرف و کاهش غلظت DBT از محیط کشت فوق نمونه برداری شد، بدین صورت که ۳ میلی لیتر از محیط کشت به لوله آزمایش منتقل و pH آن با استفاده از اسید کلریدریک ۶ نرمال اسیدی و سپس به میزان حجم مساوی به آن اتیل استات اضافه شد و به دستگاه HPLC تزریق شد. در نهایت غلظت DBT موجود در نمونه‌های تست با استفاده از منحنی استاندارد ترسیم شده با غلظت‌های مشخصی از DBT محاسبه شد (Bahuguna *et al.*, 2011).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف DBT در میزان رشد و گوگردزدایی

غلظت‌های مختلف DBT از ۰/۱ تا ۸ میلی‌مولار به محیط BSM استریل حاوی ٪۱ گلوکز بعنوان منبع کربن افزوده و از سوسپانسیون با کدورت معادل ۰/۵ به میزان ۱ میلی‌لیتر به هر یک از ارلن‌ها تلقیح شد. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰rpm انکوبه شدند و در نهایت رشد و گوگردزدایی از DBT پس از ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی رشد و گوگردزدایی در منابع کربنی مختلف به همراه DBT

منابع کربنی مختلف از قبیل گلوکز، گلیسرول، اتانول و سوکسینات هر یک به میزان یک درصد به محیط پایه اضافه شد. سوکسینات و گلیسرول همراه با BSM بوسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه استریل شدند. اتانول پس از استریل کردن به همراه BSM و گلوکز بوسیله فیلتر سرنگی استریل شده به BSM استریل اضافه گردید. به همه ارلن‌ها میزان ۰/۳ میلی مولار DBT بعنوان منبع گوگرد و در نهایت از سوسپانسیون با کدورت معادل ۰/۵ به میزان ۱ میلی‌لیتر به تمامی ارلن‌ها اضافه شد. محیط‌های کشت در انکوباتور شیکردار با دور ۱۸۰rpm و دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوباسیون گردید و سپس میزان رشد و گوگردزدایی در حضور هر یک از منابع کربنی پس از ۹۶ ساعت اندازه‌گیری شد (Zakharyant *et al.*, 2004).

اثر دماهای مختلف در میزان رشد و گوگردزدایی

محیط BSM استریل حاوی ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون کنیدی با کدورت معادل ۰/۵، ٪۱ گلوکز بعنوان منبع کربن و ۰/۳ میلی‌مولار DBT بعنوان منبع گوگرد، در دماهای مختلف ۲۵، ۳۰، ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰rpm در یک انکوباتور شیکردار انکوبه شد و سپس میزان رشد و گوگردزدایی پس از ۹۶ ساعت بررسی شد.

اثر pHهای مختلف در میزان رشد و گوگردزدایی

محیط پایه BSM بوسیله NaOH یک مولار و HCL یک مولار در pHهای مختلف: ۳، ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ تنظیم شد و پس از استریل کردن بوسیله اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه به میزان ۱ درصد گلوکز استریل شده بوسیله فیلتر سرنگی به هر یک از ارلن‌ها اضافه شد. DBT هم به میزان ۰/۳ میلی‌مولار به هر ارلن اضافه و در نهایت ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون با کدورت معادل ۰/۵ به هر یک از محیط‌های کشت تلقیح شد. انکوباسیون ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با دور ۱۸۰rpm صورت گرفت و سپس میزان گوگردزدایی و رشد قارچ‌های جداسازی شده پس از ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت.

تحلیل آماری نتایج

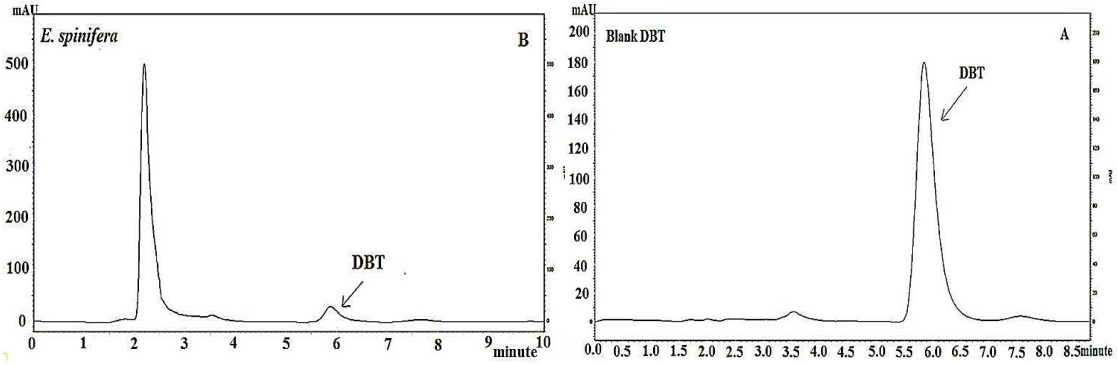
تمام آزمایش‌ها بصورت دو بار تکرار انجام گرفته است و نتایج میانگین تکرارها است. معنی‌دار بودن و نبودن تغییر عامل‌های مذکور بر روی رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ *E. spinifera* سویه FM با استفاده از نرم افزار SPSS روش One Way ANOVA و آزمون دانکن بررسی شد.

نتایج

بررسی مصرف DBT

قارچ *E. spinifera* قادر به رشد بر روی DBT به عنوان منبع گوگرد و حذف آن بود بطوریکه با بررسی کاهش غلظت DBT در زمان‌های مختلف از طریق تکنیک HPLC مشاهده شد قارچ *E. spinifera* قادر به مصرف ٪۹۹ از غلظت DBT موجود در محیط کشت بعنوان تنها منبع گوگرد است (شکل ۱). از مقایسه شکل ۱ B (مربوط به قارچ FM) با شکل ۱ A (مربوط به شاهد

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]



شکل ۱- بررسی کاهش غلظت DBT توسط سویه FM از طریق تکنیک HPLC با استخراج محیط اسیدی شده بوسیله اتیل استات پس از گذشت ۱۶۸ ساعت رشد در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور rpm ۱۸۰ (**A.** شاهد DBT بدون قارچ. **B.** *E. spinifera*).

Fig. 1. Decrease of DBT concentration by the FM strain using HPLC analysis with extraction of acidified medium by ethyl acetate after 168h of growth at 30ºC and 180 rpm (**A.** DBT control without fungi. **B.** *Exophiala spinifera*).

DBT دار بدون قارچ) می‌توان نتیجه گرفت که قارچ مذکور قادر به کاهش ٪۹۹ DBT پس از گذشت ۷ روز از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور rpm۱۸۰ است به گونه‌ای که غلظت DBT از ۰/۳ میلی‌مولار به ۰/۰۰۳ میلی‌مولار در این مدت زمان کاهش می‌یابد.

بررسی اثر منابع کربنی مختلف بر رشد قارچ و گوگردزدایی از DBT

نتایج مربوط به رشد و گوگردزدایی از DBT توسط قارچ *E. spinifera* strain FM در منابع کربنی مختلف شامل اتانول، گلوکز، گلیسرول و سوکسینات با DBT بعنوان منبع گوگرد در شکل ۲ A، B نشان داده شده است. با توجه به نتایج بدست آمده در این مطالعه بیشترین رشد و گوگردزدایی پس از ۹۶ ساعت در حضور گلوکز به عنوان منبع کربن بدست آمده و در حضور گلیسرول بعنوان تنها منبع کربن کمترین میزان رشد و در حضور اتانول بعنوان منبع کربن کمترین میزان گوگردزدایی از DBT صورت گرفته است.

بررسی اثر غلظت‌های مختلف DBT بر رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ *E. spinifera*

اثر غلظت‌های بالای DBT بر رشد و فعالیت گوگرددزایی قارچ مذکور در شکل ۳ A، B نشان داده شده است. این آزمایش در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۳ ، ۱، ۲، ۴، ۶ و ۸ میلی‌مولار DBT انجام شده، اما در غلظت‌های ۶ و ۸ میلی‌مولار هیچ گونه رشد و فعالیت گوگردزدایی دیده نشده است (اطلاعات نشان داده نشده است). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که غلظت‌های بیش از ۴ میلی‌مولار برای این سویه بسیار سمی بوده بطوریکه رشد آن را مهار می‌کند. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می‌شودحداکثر فعالیت گوگردزدایی و رشد قارچ در غلظت ۰/۳ میلی‌مولار DBT بدست آمده است.

تاثیر دماهای مختلف بر روی رشد قارچ *E. spinifera* و گوگردزدایی از DBT

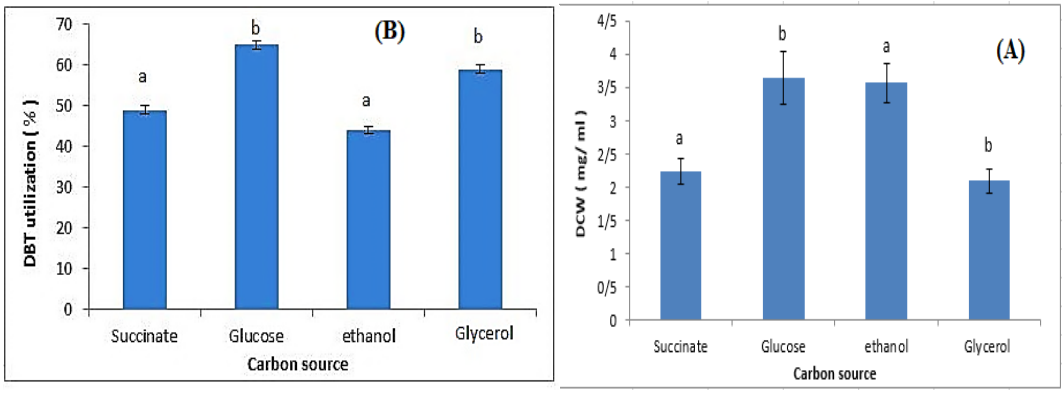
نتایج مربوط به رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ مذکور در دماهای مختلف در شکل ۴ A، B نشان داده شده است. همانطور که در این تصاویر مشاهده می‌شود بیشترین میزان رشد در دمای ۲۶ درجه سلسیوس و بیشترین میزان گوگردزدایی از DBT توسط این قارچ در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بدست آمد. همچنین در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد رشد و گوگردزدایی به شدت کاهش یافت بطوریکه میزان رشد در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد ٪۳۰ میزان رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بود.

قابل ذکر است با وجود اینکه بیشترین میزان رشد در دمای ۲۶ درجه سلسیوس بدست آمد اما با تحلیل دانکن مشخص شد که در سطح معنی‌دار ۰/۰۵، اختلاف معنی‌داری به لحاظ رشد بین دماهای ۲۶ و ۳۰ درجه سلسیوس وجود ندارد. بنابراین قارچ *E. spinifera* رشد تقریبا مشابهی در دماهای ۲۶ و ۳۰ درجه سلسیوس دارد. با توجه به نتایج فوق می‌توان گفت در دمای بین ۲۶ تا ۳۰ درجه سلسیوس میزان رشد و فعالیت گوگرددزایی DBT این قارچ در بیشترین مقدار خود قرار دارد.

بررسی اثر pH های مختلف در رشد و گوگردزدایی از DBT قارچ *E. spinifera*

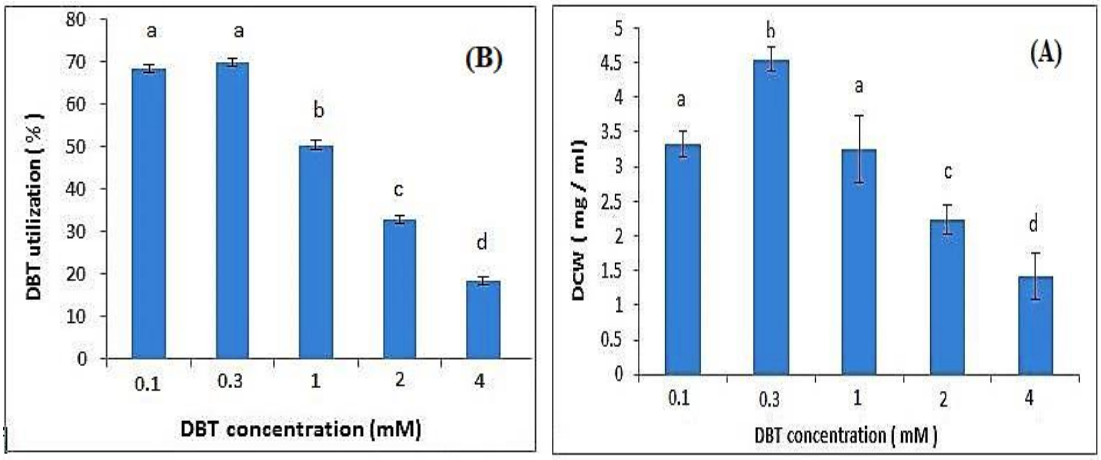
همان‌طور که در شکل ۵ A، B مشاهده می‌شود این قارچ بیشترین میزان رشد را در pH=۵ و بیشترین میزان

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]



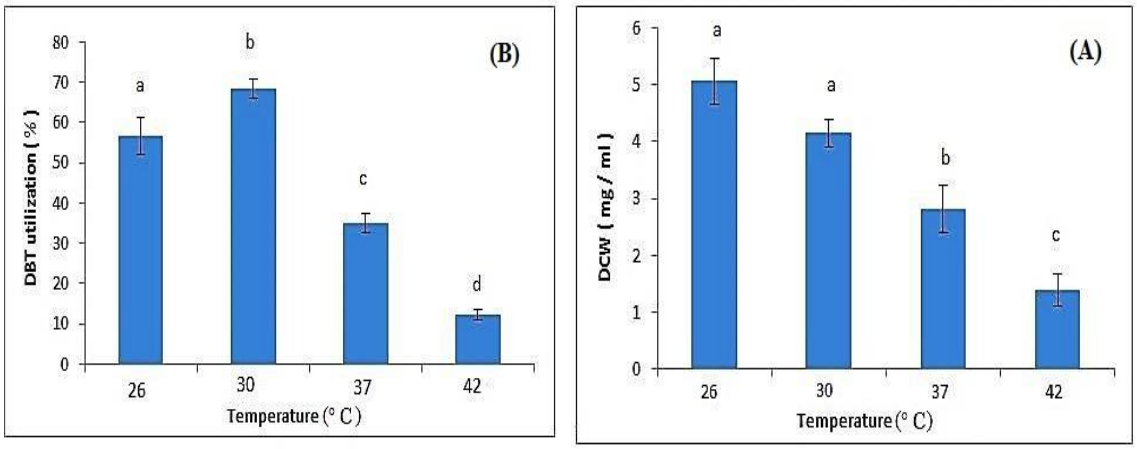
شکل ۲- مقایسه **A.** رشد و **B.** گوگردزدایی از DBT توسط سویه FM در حضور منابع کربنی مختلف پس از گذشت ۹۶ ساعت رشد در دمای ۳۰ درجه‌سلسیوس و دور ۱۸۰rpm

Fig. 2. Comparison of **A.** Growth and **B.** DBT desulfurization by strain FM in the presence of various carbon sources after 96h growth at 30 ^{O}C and 180 rpm.



شکل ۳- بررسی میزان رشد (**A**) و گوگردزدایی از DBT (**B**) توسط سویه FM در حضور غلظت‌های مختلف DBT پس از ۹۶ ساعت کشت در BSM همراه با ۱٪ گلوکز و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰rpm

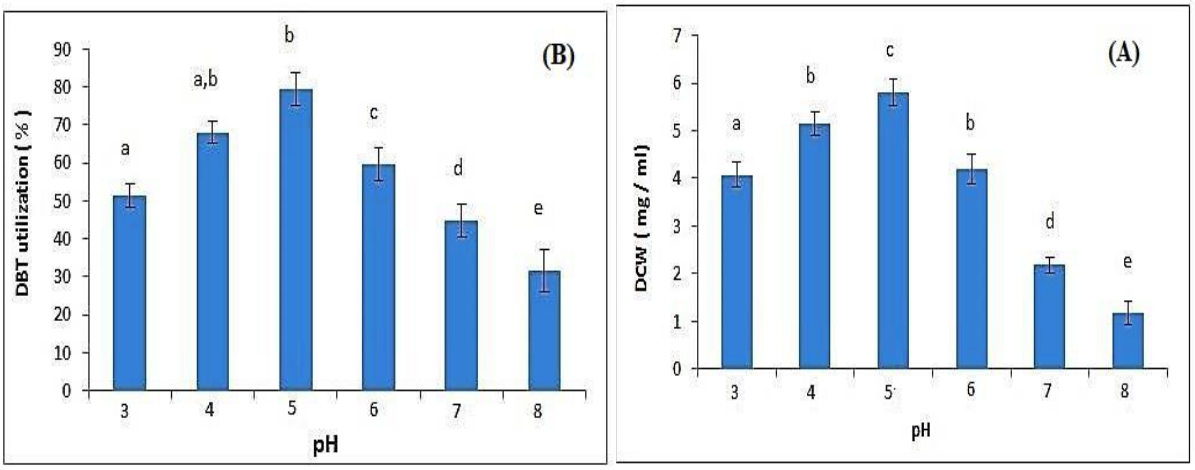
Fig. 3. The study of **A.** Growth and **B.** DBT desulfurization by the FM strain in the presence of various DBT concentrations after 96 of cultivation in BSM supplemented with 1% glucose and incubation in an incubator shaker with 30 ^{O}C and 180 rpm.



شکل ۴- تاثیر دماهای انکوباسیون مختلف بر میزان رشد (**A**) و گوگردزدایی از DBT (**B**) توسط سویه FM (شرایط کشت در BSM حاوی ۰/۳ mM DBT و ۱٪ گلوکز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و بر روی شیکر ۱۸۰ rpm به مدت ۹۶ ساعت)

Fig. 4. The effect of various incubation temperatures on **A.** Growth and **B.** DBT desulfurization rates by the FM strain (96h cultivation in BSM medium contain 0.3 mM DBT and 1% glucose and incubation in 30 ^{O}C and 180 rpm in an incubator shaker).

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]



شکل ۵- تاثیر pHهای مختلف بر **A.** رشد و فعالیت **B.** گوگردزدایی از DBT توسط اگزوفیالا اسپینیفرا سویه FM پس از ۹۶ ساعت کشت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و دور ۱۸۰ rpm در یک انکوباتور شیکردار.

Fig. 5. Effect of various pH on **A.** Growth and **B.** DBT desulfurization by *Exophiala spinifera* strain FM after 96h cultivation at 30 ^{O}C and 180 rpm in an incubator shaker.

گوگردزدایی از DBT هم در محدوده ۴ تا ۵ نشان می‌دهد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت رشد و فعالیت متابولیکی قارچ مذکور در pHهای اسیدی بیشتر است و با قلیایی شدن محیط میزان رشد و گوگردزدایی کمتر می‌شود بطوریکه در pH=۸ میزان رشد و گوگردزدایی تقریبا ٪۲۰ رشد و گوگردزدایی در pH=۵ است.

بحث

در تحقیق حاضر از قارچ *E. spinifera* strain FM جدا شده از خاک‌های آلوده به نفت و گازوییل استفاده شد که قادر به کاهش ٪۹۹ غلظت DBT بعد از گذشت ۱۶۸ ساعت رشد در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکر دار با دور ۱۸۰rpm بوده است که کارائی و فعالیت آنزیم‌های درگیر در فعالیت گوگردزدایی این قارچ همانند سایر میکروارگانیسم‌ها به شرایط عمل‌کرد آن بستگی دارد بطوریکه حداکثر کارائی در سطح بهینه پارامترهای موثر حاصل می‌شود و به همین منظور در تحقیق حاضر جهت دستیابی به حداکثر فعالیت گوگردزدایی و رشد قارچ مذکور، اثر شرایط عملکردی مهم از قبیل غلظت DBT، دما و pH مورد بررسی قرار گرفت که در ادامه در مورد هر فاکتور بطور جداگانه توضیح داده خواهد شد.

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که قارچ‌ها هم همانند باکتری‌ها قادر به مصرف DBT به عنوان منبع گوگرد به صورت کومتابولیسم با سایر منابع کربنی همانند گلوکز هستند به طوری که Faison و همکاران (1991) در تحقیق خود بر روی مصرف DBT توسط قارچ *Paecilomyces* sp. به این نتیجه رسیدند که این قارچ بر روی DBT به تنهایی رشد نمی‌کند و رشد آن فقط در حضور یک منبع کربن دیگر از قبیل مالتوز صورت می‌گیرد پس قارچ *Paecilomyces* sp. قادر است به شکل کومتابولیسم DBT را ترانسفورم کند. Eibes و همکاران (2006) در مطالعه خود بر روی تجزیه DBT توسط قارچ *Bjerkandera* sp. گزارش کردند که هیدروفوبیسیته بالای DBT مانع از تجزیه ان در محیط کشت می گردد و استفاده از حلال آلی از قبیل اتانول و استون موجب کمک به عمل آنزیم های تجزیه کننده DBT می‌شود و همچنین Setti و همکاران (2003) گزارش کردند که افزودن DBT حل شده در اتانول به محیط رشد و گوگردزدایی بیشتری را نسبت به DBT بدون حلال اتانول سبب می شود. Gilbert و همکاران (1998) هم دریافتند که گلیسرول می تواند جایگزین منبع فروکتوز برای گوگردزدایی DBT توسط گوردونا سویه 213EA شود. Zakharyants و همکاران (2004) هم سوکسینات را بعنوان منبع کربن برای گوگردزدایی DBT توسط رودوکوکوس اریتروپولیس بکار بردند. به همین منظور با توجه به منابع کربنی مختلف استفاده شده در تحقیق های فوق، میزان رشد و فعالیت گوگردزایی قارچ جداسازی شده در تحقیق حاضر در چهار منبع کربنی ذکر شده در قسمت روش‌ها بررسی شد و دیده شد این قارچ در حضور گلوکز، گلیسرول، سوکسینات و اتانول رشد خوبی داشته ولی میزان رشد و گوگرددزایی در حضور گلوکز

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]

نسبت به سایر منابع کربنی بیشتر بود. می‌توان گفت گلوکز بهترین منبع کربن جهت رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ فوق است بطوریکه در بیشتر مطالعه‌های صورت گرفته بر روی مصرف قارچی DBT از گلوکز بعنوان منبع کربن استفاده شده است. DBT بعنوان منبع گوگرد برای رشد بکار می‌رود ولی غلظت‌های بالای آن می‌تواند برای سلول سمیت داشته باشد و موجب مهار رشد و فعالیت گوگرددزایی سویه‌های میکروبی گردد (Kim *et al.*, 2004)، و این امر در مورد قارچ *E. Spinifera* strain FM جداسازی شده هم مشاهده شد بطوریکه بالاترین رشد قارچ مذکور در غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۳ میلی‌مولار از DBT صورت گرفت و در غلظت ۰/۳ میلی‌مولار حداکثر میزان گوگردزدایی را داشت که نشان دهنده بیشترین فعالیت متابولیکی قارچ مذکور در حضور این غلظت از DBT است. این قارچ توانایی رشد و فعالیت گوگردزدایی تا غلظت ۴ میلی‌مولار از DBT را داشت به گونه‌ای که در غلظت‌های بالاتر از ۴ میلی‌مولار رشدی مشاهده نشد. با توجه به مطالعه‌های صورت گرفته در زمینه مصرف DBT توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌توان گفت که تحمل قارچ‌ها نسبت به غلظت‌های بالای DBT نسبت به باکتری‌ها بیشتر است بطوریکه Etemadifar و همکاران (2010) در تحقیق خود بر روی مخمر *Trichosporon* sp. مشاهده کردند که مخمر مذکور همانند قارچ *E. spinifera* جداسازی شده در تحقیق حاضر توانایی رشد تا غلظت ۴ میلی‌مولار از DBT را دارد. همچنین Faison و همکاران (1991) در مطالعه خود بر روی قارچ *Paecilomyces* sp. TLI مشاهده کردند که این قارچ توانایی گوگردزدایی از غلظت ۲ میلی‌مولار DBT را دارد. در حالیکه در مورد باکتری‌ها Maghsoudi و همکاران (2011) مشاهده کردند که باکتری *Rhodococcus* P32C1 بالاترین فعالیت گوگردزدایی را در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار DBT دارد. Yushikawa و همکاران (2002) هم فعالیت بالایی از گوگردزدایی DBT را در غلظت ۰/۱ میلی‌مولار توسط *Rhodococcus erythropolis* بدست آوردند و در غلظت بالاتر از ۱ میلی‌مولار مهار رشد سلولی را مشاهده نمودند. همچنین نتایج حاصل از تحقیق Kim و همکاران (2004) نشان داد گوگردزدایی تا غلظت ۱/۵ میلی‌مولار DBT توسط *Gordonia* افزایش یافته است و به ۲/۷ برابر میزان آن در ۰/۳ میلی‌مولار رسیده است. اما افزایش بیشتر DBT موجب کاهش میزان گوگردزدایی شده است بطوریکه در غلظت ۳ میلی‌مولار رشد بسیار کم و در غلظت ۴ میلی‌مولار از DBT رشدی مشاهده نشد.

به طور معمول فرایندهای متابولیکی بسیار حساس به تغییرات pH هستند، بطوریکه تغییرات میزان اسیدی یا بازی بودن محیط کشت علاوه بر تاثیر بر رشد میکروارگانیسم می‌تواند میزان فعالیت آنزیم‌ها را هم تحت تاثیر قرار دهد بطوریکه حتی در موارد تغییرات بالای میزان pH محیط نه تنها ساختار آنزیم بلکه ساختار و بار الکترونی سطح سوبسترا را نیز تغییر می دهد به شکلی که سوبسترا نمی تواند به جایگاه فعال آنزیم اتصال یابد و یا تمی‌تواند توسط آنزیم کاتالیز شود. بنابراین این فاکتور هم مشابه منبع کربن و عناصر ضروری مورد نیاز میکروارگانیسم ها بعنوان یک فاکتور محدود کننده است که کنترل صحیح آن ضروری است و باید مورد توجه قرار گیرد (Wei *et al.*, 2011). به همین منظور جهت دستیابی به نقطه بهینه pH و با توجه به رنج استفاده شده در مطالعات صورت گرفته در این زمینه بر روی قارچ، میزان رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ *E. spinifera* strain FM در pHهای مختلفی بررسی شد و دیده شد بیشترین میزان رشد و گوگردزدایی از DBT برای قارچ مذکور در pH بین ۴ تا ۵ است و این امر نشان می‌دهد که فعالیت متابولیکی این قارچ در pH اسیدی بیشتر از pH قلیایی یا خنثی است و می‌توان گفت این امر بعلت ویژگی اسید دوست بودن قارچ‌ها و اینکه تحمل آن‌ها نسبت به شرایط اسیدی بیشتر از باکتری‌ها است. به طوری که Eibes و همکاران (2006) در مطالعه خود از محیط کشت مناسب با pH= ۴/۵ جهت بررسی مصرف تجزیه DBT توسط قارچ *Bjerkandera* sp. BOS55 استفاده کردند.

دمای محیط بعنوان یک فاکتور بر هم کنش کننده باید مورد بررسی قرار گیرد زیرا بر تمام واکنش‌های شیمیایی و بیوشیمیایی اثر می‌گذارد و از طرفی هم دارای اثر قابل توجهی در سرعت رشد میکروبی است. علاوه بر این دما تجزیه زیستی نفت را از طریق تاثیر بر روی ماهیت فیزیکی و تجزیه شیمیایی نفت، سرعت متابولیسم میکروارگانیسم‌ها و اجزای میکروبی نفت تحت تاثیر قرار می‌دهد (Garapati & Mishra, 2012). به همین منظور جهت دستیابی به نقطه بهینه دما و طبق مطالعات انجام شده در این زمینه میزان رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ جداسازی در تحقیق

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]

حاضر درمقادیر مختلفی از دما مورد بررسی قرار گرفت و حداکثر فعالیت گوگردزدایی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد بدست آمد که بیانگر مزوفیل بودن این قارچ است و از طرفی هم مشاهده شده است که بیشتر قارچ‌های مصرف کننده ترکیبات بنزنی، ارگانیسم‌های مزوفیل هستند.

میزان ترکیبات آلی گوگرددار موجود در نفت خام ایران بین ۳/۲۳ الی ۵/۲۵ درصد وزنی تخمین زده شده است. لذا ایران از جمله کشورهایی است که دارای بالاترین مقدار ترکیبات آلی گوگرددار در ذخایر نفتی خود می باشد. پس بکارگیری قارچ‌هایی با توانایی گوگردزدایی از نفت در حذف ترکیبات آلی گوگرددار در نفت یا سایر سوخت‌های فسیلی به علت دستکاری ژنتیکی راحت، و تشکیل توده زیستی زیاد می‌تواند بسیار قابل ملاحظه و راهگشا باشد و از طرفی با توجه به بیماریزا بودن این قارچ برای نحوه استفاده آن در حذف گوگرد آلی از نفت و کاربرد آن در صنعت باید مطالعات بیشتری در این زمینه انجام داد و امکان استفاده از ژنهای سولفورزدایی این قارچ با کلون کردن در سویه های ایمن را بررسی نمود.

سپاسگزاری

بدین وسیله نویسندگان از دانشگاه اصفهان به خاطر فراهم نمودن امکانات و همکاری های لازم در انجام این تحقیق قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

Bahuguna, A., Madhuri, K.L., Munjal, A., Ravindra, N.S., Dangwal, K. 2011. Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7 isolated from diesel contaminated soil. – J. Environ. Sci. 23: 975-982.

Bezalel, L., Hadar, Y. and Cerniglia, C.E. 1997. Enzymatic Mechanisms Involved in Phenanthrene Degradation by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. – Appl. Environ. Microbiol. 63: 2495-2501.

Bezalel, L., Hadar, Y., FU, P.P., Fremman, J.P. and Cerniglia, C.J. 1996. Metabolism of Phenanthrene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. – App. Environ. Microbiol. 62: 2547-2553.

Campos-Martin, J.M., Capel-Sanchez, M.C., Perez-Presas, K. and Fierro, J.L. 2010. Oxidative processes of desulfurization of liquid fuels. – J. Chem. Technol. Biot. 85: 879-890.

Eibes, G., Cajthaml, T., Moreira, M.T., Feijoo, G. and Lema, J.M. 2006. Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. – Chemosphere 64: 408-414.

Elmi, F., Etemadifar, Z. and Emtiazi, G. 2015. A novel metabolite (1,3-benzodiol, 5- hexyl) production by *Exophiala spinifera* strain FM through dibenzothiophene desulfurization. – World J. Microbiol. Biotechnol. 31: 813-821.

Etemadifar, Z., Emtiazi, G., and Nahvi, I. 2010. Survey of the growth, respiration and biofilm formation of dibenzothiophene consumer yeast, *Trichosporon* sp. by microtiter plate method. – Iran. J. Biol. 21: 891-899.

Etemadifar, Z., Emtiazi, G. and Peimanfar, S. 2006. Removal of dibenzothiophene, biphenyl and phenol from waste by *Trichosporon* sp. – Sci. Res. Essays. 1: 072-076.

Faison, B.D., Clark, T.M., Lewis, S.N., Ma, C.Y., Sharkey, D.M. and Woodward, C.A. 1991. Degradation of organic sulfur compounds by a coal-solubilizing fungus. – Appl. Biochem. Biotechnol. 28: 237-251.

Garapati, V.K. and Mishra, S. 2012. Hydrocarbon degradation using fungal isolate: nutrients optimized by combined grey relational analysis. – Int. J. Eng. Res. Appl. 2: 390-399.

Gilbert, S.C., Morton, J., Buchanan, S., Oldfield, C. and McRoberts, A. 1998. Isolation of a unique benzothiophene- desulphurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulphurization pathway. – Microbiology 144: 2545-2553.

Kilbane, J.J. 2006. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. – Curr. Opin. Biotechnol. 17: 305-314.

Kim, Y.J., Chang, J.H., Cho, K.S., Ryu, H.W. and Chang, Y.K. 2004. A physiological study on growth and dibenzothiophene (DBT) desulfurization characteristics of *Gordonia* sp. – CYKS1. Chem. Eng. J. 21: 436-441.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]
[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]

Lin, L., Hong, L., Jianhua, Q. and Jinjuan, X. 2010. Progress in the Technology for Desulfurization of Crude Oil. – China. Pet. Process. pp 12: 1-6

Ma, C.Q., Feng, J.H., Zeng ,Y.Y., Cai, X.F., Sun, B.P., Zhang, Z.B., Blankespoor, H.D. and Xu, P. 2007. Methods for the preparation of a biodesulfurization biocatalyst using *Rhodococcus* sp. – Chemosphere 65: 165-169.

Maghsoudi, S., Vossoughi, M., Kheirolomoom, A., Tanaka, E. and Katoch, S. 2001. Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by *Rhodococcus* sp. Strain P32C1. – Biochem. Eng. j. 8: 151-156.

Mezcua, M., Fern´andez-Alba, A.R., Rodr´ıguez, A., Boltes., K., Leton, P. and Garcia-Calvo, E. 2007. Chromatographic methods applied in the monitoring of biodesulfurization processes-state of the art. – Talanta 73: 103-114.

Piddington, C.S., Kovacevich, B.R., and Rambosek, J. 1995. Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. – Appl. Environ. Microbiol. 61: 468-475.

Setti, L., Bonoli, S., Badiali, E. and Giuliani, S. 2003. Inverse phase transfer biocatalysis for a biodesulfurization process of middle distillates. – Becth. Mock. 44: 80-83.

Soleimani, M., Bassi, A. and Margaritis, A. 2007. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. – Biotechnol. Adv. 25: 570-596.

Stoner, D.L., Wey, J.E., Barrett, K.B., Jolley, J.G., Wright, R.B. and Dugan, P.R. 1990 .Modification of water- soluble coal- derived products by Dibenzothiophene- Degrading Microorganisms. – Appl. Environ. Micro-biol. 56: 2667-2676.

Van Hamme, J.D., Wong, E.T., Dettman, H., Gray, M.R. and Pickard, M.A. 2003. Dibenzyl sulfide metabolism by white rot fungi. – Appl. Environ. Microbiol. 69: 1320-1324.

Wei, Y., Chen, W., Huang, C., Wu, H., Sun, Y., Lo, C. and Janarthanan, O. 2011. Screening and evaluation of polyhydroxybutyrate- producing strains from indigenous isolate *Cupriavidus taiwanensis* strains. – Int. J. Mol. Sci. 12: 252-265.

Yushikawa, O., Ishii, Y., Koizumi, K.I., Ohshiro, T., Izumi, Y. and Maruhashi, K. 2002. Enhancement and stabilization of desulfurization activity of *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by feeding ethanol and sulfur components. – J. Biosci. Bioeng. 94: 447-452.

Zakharyants, A.A., Murygina, V.P. and Kalyuzhnyi, S.V. 2004. Screening of *Rhodococcus* species revealing desulfurization activity with regard to dibenzothiophene. – In: Biocatalytic Technology and Nanotechnology. Zaikov, G.E. (ed.). Nova Science Publishers, Inc, New York, United States. pp: 51-58.

*****

How to cite this article:

Elmi, F., Etemadifar, Z. and Emtiazi, G. 2019. Study the effect of environmental factors and different carbon sources on dibenzothiophene desulfurization by *Exophiala spinifera*. – Nova Biol. Reperta 6: 79-87.

علمی، ف.، اعتمادی‌فر، ز. و امتیازی، گ. ۱۳۹۸. مطالعه تأثیر عوامل محیطی و منابع کربن مختلف بر روی گوگردزدایی دی بنزوتیوفن توسط قارچ *Exophiala spinifera*– یافته‌های نوین در علوم زیستی ۶: ۸۷-۷۹.

[Downloaded from nbr.khu.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1398.6.1.1.6]

[DOI: 10.29252/nbr.6.1.79]