پاک‌سازی زیستی نفت‌خام توسط قارچ تحمل‌کننده نمک Embellisia sp. UTMC 5051

کیان جناب، حمید مقیمی*، جواد حامدی

بخش زیست‌فناوری میکربی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران
مرکز پژوهشی فناوری‌ها و فرآورده‌های میکربی دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: 94/10/7 پذیرش: 95/8/25

چکیده

نفت‌خام از مهم‌ترین آلاینده‌های محیط‌زیست از جمله محیط‌های آبی و خاکی حاوی نمک محسوب می‌شود. در دو دهه اخیر، وجود آنزیم‌های تجزیه‌کننده قدرتمند در قارچ‌های نمک‌دوست و تحمل‌کننده نمک آن‌ها را به گزینه‌های مناسبی برای حذف زیستی نفت‌خام در مناطق شور تبدیل کرده‌است. مطالعه حاضر برای اولین بار به حذف زیستی نفت‌خام توسط قارچ تحمل‌کننده نمک .Embellisia sp می‌پردازد. ارزیابی حذف نفت در محیط Minimal Salt Medium (MSM) حاوی 1% نفت در غلظت‌های نمک 0، 2/5% و 5% انجام شد. همچنین منحنی حذف نفت و رشد سویه در محیط‌های کشت PDB حاوی شوری 0، 2/5% و 5% رسم شد. بررسی ارلن‌ها، حذف زیستی نفت در غلظت نمک 0، 2/5% و 5% به ترتیب 62/1%، 37/3% و 44/7% را نشان داد. در مجموع، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که قارچ .Embellisia sp می‌تواند در پاک‌سازی زیستی محیط‌های حاوی آلاینده‌های نفتی در مناطق شور مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: .Embellisia sp، نفت‌خام، پاک‌سازی زیستی، خاک شور آلوده

مقدمه

امروزه، نفت‌خام و فراورده‌های آن به عنوان منبع اصلی انرژی و مواد اولیه صنایع دیگر اهمیت فراوانی دارند. در نتیجه، احتمال آلودگی محیط‌زیست توسط نفت در هنگام تولید، انتقال و مصرف این ترکیبات زیاد است [1] سالانه میلیاردها گالن فاضلاب آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در فرایندهای تولید، انتقال و پالایش نفت‌خام تولید می‌شود که از عوامل اصلی آلودگی محیط‌زیست هستند[2]. هیدروکربن‌های نفتی برای انسان سرطان‌زا هستند و همچنین باعث بیماری‌های کبدی می‌شوند [3 و4]. این ترکیبات همچنین برای جانوران و گیاهان سمی هستند [3 و 4]. تعدادی از مناطق آلوده نفتی دارای شوری معتدل یا شدید هستند. ورود

* hmoghimi@ut.ac.ir

مقدار زیادی از پساب‌های نفتی در حین تولید، انتقال و پالایش نفت به محیط‌های حاوی خاک و آب شور باعث ایجاد مناطق آلوده همراه با نمک می‌شود[2]. حضور نمک در غلظت‌های مختلف در مناطق آلوده به هیدروکربن‌های نفتی، باعث ایجاد مشکلات زیادی در تیمار و پاک‌سازی زیستی این مناطق می‌شود [6 و 7]. همچنین افزایش شوری باعث کاهش تعداد و نوع‌های سوبستراهای قابل تجزیه توسط میکروارگانیسم‌ها می‌شود که در مورد هیدروکربن‌های نفتی، محدود به آلکان‌ها می‌شود [8]. در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی در محیط‌های شور، باکتری‌ها و قارچ‌های تحمل‌کننده نمک بیش‌ترین کاربرد را دارند [1]. بسیاری از قارچ‌ها در تجزیه زیستی هیدروکربن‌های نفتی از باکتری‌ها توانمندتر هستند [9] ولی از آنها در محیط‌های شور کم‌تر استفاده شده است [8]. دلیل آن، تازگی تحقیقات در مورد حضور قارچ‌ها در محیط‌های پرشور است که بیش از 80 سال بعد از تحقیقات اولیه در مورد حضور باکتری‌ها شروع شده است. تحقیقات اخیر دانشمندان نشان می‌دهند که بسیاری از قارچ‌ها از ساکنین فعال مناطق پرشور هستند [10]. قارچ‌های نمک دوست، قارچ‌هایی هستند که قادراند در محیط آزمایشگاهی، در محیط دارای NaCl بالای 17 درصد رشد کنند و در مناطق مختلف دارای شوری بالای 10 درصد به صورت مکرر جداسازی شوند. قارچ‌های تحمل‌کننده نمک هم مانند قارچ‌های نمک دوست، باید در غلظت بالای 17 درصد NaCl در محیط آزمایشگاه رشد کنند ولی در مناطق دارای شوری 10 درصد به‌صورت پراکنده جداسازی می‌شوند [11]. آلودگی خاک به هیدروکربن‌های نفتی از جمله آلاینده‌های رایج در مناطق نفت خیز کشور است که با توجه به شور بودن خاک برخی از این مناطق، پاک‌سازی زیستی آن را با مشکل مواجه کرده است. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که قارچ‌های نمک دوست و تحمل‌کننده نمک قادر به تجزیه زیستی نفت‌خام هستند [1] ولی مطالعات در این زمینه محدود بوده است. بنابراین این تحقیق که برای اولین بار انجام شده است به بررسی تجزیه زیستی نفت‌خام توسط قارچ تحمل‌کننده نمک جدا شده از مناطق شور و تأثیر حضور نمک در حذف آلاینده‌های نفتی پرداخته شده است. لازم به توضیح است که بررسی تجزیه زیستی آلاینده‌های نفتی در حضور نمک توسط قارچ‌ها نوآوری اصلی پژوهش صورت گرفته است که با توجه به حضور نمک در بسیاری از آب‌ها و خاک‌های آلوده کشور نتایج به‌دست آمده در این پژوهش حائز اهمیت است.

روش تحقیق

نمونه‌برداری و جداسازی

در این مطالعه در ابتدا نمونه‌های خاک از مناطق دارای خاک‌های شور جمع‌آوری شد. در ادامه pH و هدایت الکتریکی[1] نمونه‌های خاک تعیین شد. سپس، جداسازی به روش غنی‌سازی انجام شد. برای جداسازی جدایه‌های قارچی رقت 10^{-2} تهیه شد و از محیط‌کشت‌های Potato Dextrose Agar (PDA) و Malt Extract Agar (MEA) استفاده شد. به محیط‌های کشت، 10 درصد نمک NaCl برای جداسازی قارچ‌های تحمل‌کننده نمک اضافه شد. همچنین، 100 میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین برای جلوگیری از

[1] Electrical Conductivity (EC)

رشد باکتری‌ها اضافه شد. پلیت‌های کشت شده به مدت یک هفته در دمای 28 °C در انکباتور گرماگذاری شدند. قارچ‌ها بر روی محیط کشت PDA دارای شوری 5 درصد خالص‌سازی شدند [12 و 13]

بررسی ریخت‌شناسی

ویژگی‌های ریخت‌شناسی جدایه‌های برتر بر اساس شکل ظاهر کلنی‌ها، ویژگی‌های رشد و خصوصیاتی از قبیل قطر کلنی، ایجاد پیگمان‌های رنگی، شکل و خصوصیات اسپورها، ویژگی‌های سطحی کلنی روی محیط PDA حاوی 5 درصد شوری بررسی شد [14]. علاوه بر ویژگی‌های ماکروسکوپی، ویژگی‌های میکروسکوپی با روش اسلایدکالچر مورد مطالعه قرار گرفت. برای تهیه اسلایدکالچر، ابتدا یک لوله U شکل پس از استریل شدن، کف یک پلیت حاوی لایه نازکی از آب مقطر استریل قرار گرفت. لام در شرایط سترون بر روی میله شیشه‌ای U شکل قرار داده شد. یک برش بسیار نازک از محیط کشت جامد PDA روی لام قرار گرفته و با استفاده از آنس سترون، میسلیوم قارچی در 4 نقطه از محیط روی لام تلقیح شد. سپس لامل سترون‌شده بر روی قطعه محیط کشت تلقیح شده قرار داده و بعد از گذاشتن درب، پلیت‌ها در انکوباتور 28 °C تا رشد میسلیوم‌های قارچی گرماگذاری گردید. در انتها میسلیوم‌های رشد کرده روی لامل با استفاده از رنگ‌آمیزی به روش لاکتوفن کاتن بلو زیر میکروسکوپ نوری بررسی گردید [15].

بررسی تحمل به شوری و رشد در حضور نمک در جدایه‌های قارچی

برای بررسی مقدار تحمل‌پذیری و رشد در حضور نمک جدایه‌های به‌دست آمده از مرحله قبل بر روی محیط‌های کشت PDA دارای شوری 10، 17 و 20 درصد در دمای 28 °C به مدت 4 روز گرماگذاری شدند و رشد جدایه‌ها و تشکیل کلونی بر روی پلیت مورد مطالعه قرار گرفت.

شناسایی مولکولی

شناسایی سویه منتخب توسط شناسایی مولکولی از طریق استخراج ژن سویه مورد نظر توسط نیتروژن مایع و روش فنول–کلروفوم انجام شد و PCR ژن ITS[1] با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS4 انجام شد و توالی حاصل از طریق همردیفی در پایگاه اطلاعاتی EzTaxon.org server version 2 مورد بررسی قرار گرفت [16].

غربال‌گری جدایه‌های تجزیه‌کننده نفت‌خام

در این آزمایش محیط کشت Minimal Salt Medium (MSM) حاوی 1 درصد نفت‌خام (حجمی– حجمی) و شوری 2/5 و 5 درصد تهیه شد و به مقدار 10 میلی‌لیتر در ارلن‌های 50 میلی‌لیتری ریخته شد. pH محیط کشت روی 7 تنظیم شد. به هر ارلن، 1 سانتی مترمربع از کشت تازه از جدایه‌ها اضافه شد. برای

[1] Internal Transcribed Spacer (ITS)

غلظت‌های مختلف شوری، نمونه شاهد بدون تلقیح جدایه‌ها قرار داده شد. این آزمایش در دو تکرار انجام شد. ارلن‌ها به مدت 14 روز در شیکرانکوباتور دور 170 دور در دقیقه و دمای 28 °C گرماگذاری شدند[1].

میزان تولید زیست‌توده در محیط کشت حاوی 1 درصد نفت‌خام

در این آزمایش، محیط کشت PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام (حجمی– حجمی) و شوری 0، 2/5 و 5 درصد تهیه شد و به مقدار 10 میلی‌لیتر در ارلن‌های 50 میلی‌لیتری ریخته شد. pH محیط کشت به مقدار 7 تنظیم شد به هر ارلن، مربع 1 در 1 سانتی‌متری کشت تازه از جدایه اضافه شد. این آزمایش در دو تکرار انجام شد. برای سنجش میزان رشد سویه، زیست توده قارچی از محیط کشت جدا شده و توسط سرم فیزیولوژی شستشو داده شد و به مدت یک شبانه روز در دمای 50°C در آون خشک گردید. سپس وزن خشک به دست آمده براساس گرم در 10 میلی‌لیتر گزارش شد [8].

اندازه‌گیری محتوای کل هیدروکربنی نفت

مقدار تجزیه نفت به روش اندازه‌گیری مقدار کل هیدروکربن‌های نفت[1] با دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. برای سنجش TPH از تولوئن به عنوان حلال نفت استفاده شد و رقت یک دهم از تولوئن و نفت باقی‌مانده تشکیل شد و جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 420 نانومتر خوانده شد. مقدار تجزیه نفت‌خام توسط معادله زیر به‌دست آمد [17]:

(جذب نوری شاهد)/(جذب نوری نمونه)-(جذب نوری شاهد) = میزان حذف نفت‌خام

نتایج و بحث

نمونه‌برداری و جداسازی

در این پژوهش 20 نمونه خاک شور از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شد. سپس به‌منظور جداسازی قارچ‌های مقاوم به شوری از روش کشت در پلیت با تهیه رقت‌های مختلف از نمونه‌های خاک شور استفاده شد در طی این مطالعه 73 کلنی قارچی از محیط‌های PDA، MEA و CZP حاوی 10 درصد شوری جداسازی شد. محل نمونه‌برداری از خاک‌های شور در جدول شماره 1 ارائه شده است.

بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌های به‌دست آمده

در این مرحله 73 جدایه با استفاده از روش اسلاید کالچر و رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل‌کاتن بلو مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت بر اساس شکل و ظاهر کلنی و نتایج حاصل از بررسی‌های میکروسکوپی، جدایه‌های تکراری از ادامه مسیر غربالگری حذف شده و باقی جدایه‌ها به‌منظور بررسی میزان حذف نفت‌خام انتخاب شدند.

[1]Total Petroleum Hydrocrbons (TPH)

جدول 1. محل‌های نمونه برداری خاک

شماره خاک	محل نمونه‌برداری	مختصات جغرافیایی	هدایت الکتریکی (ms/cm)	pH	تعداد جدایه‌ها
1	خراسان 50 کیلومتری جاده مشهد- نیشابور	36°10'59.2"N 58°50'48.3"E	23.4	7.9	5
2	دامغان - حسن اباد	35°55'18.6"N 54°20'36.3"E	19.1	6.4	8
3	سمنان دامغان امیریه به کویر	36°28'00.6"N 54°57'31.8"E	27.9	7.4	4
4	سمنان – بستر رودخانه حبله رود	35°18'08.8"N 52°25'26.3"E	58.8	7.6	2
5	پل سفید – دامنه کوه	36°06'51.9"N 53°03'01.4"E	42.1	7.4	1
7	5 کیلو متری سرخه به سمت تهران	35°27'04.2"N 53°09'59.2"E	10.8	7.5	15
8	خطیر کوه	35°53'42.3"N 53°05'34.2"E	10	7.1	1
10	60 کیلومتری دامغان	36°12'37.5"N 54°18'05.7"E	8.4	8	6
11	قم - دریاچه حوض سلطان	34°58'09.9"N 50°55'23.4"E	38.3	7.5	2
13	قم – دریاچه نمک	34°35'05.1"N 51°45'54.0"E	194.7	6.7	1
14	منطقه بیابانی سمنان	35°32'53.6"N 53°21'00.0"E	27.5	7.7	14
15	جنوب دریاچه ارومیه	37°20'13.6"N 45°23'45.0"E	83.5	7.1	14

ارزیابی توانایی تخریب و حذف نفت‌خام جدایه‌های منتخب

در این مرحله هریک از جدایه‌ها در محیط پایه نمکی MSM حاوی 1 درصد نفت‌خام کشت در شوری‌های 0، 2/5 و 5 درصدکشت داده شدند. جهت ارزیابی میزان حذف نفت از روش سنجش TPH با دستگاه

اسپکتروفوتومتر استفاده شد. در بین جدایه‌ها، جدایه S59 با میزان حذف نفت مناسب جهت ادامه آزمایشات انتخاب شدند. نتایج TPH در جدول 2 آمده است.

جدول 2. درصد حذف زیستی نفت‌خام در جدایه S59 حاوی 1% نفت‌خام

غلظت NaCl	0	%2/5	%5
درصد حذف نفت‌خام	%62.1	%37.3	%44.7

بررسی تحمل شوری در جدایه S59

رشد و تحمل شوری جدایه‌ها در محیط‌های PDA حاوی 10، 17 و 20 درصد بررسی شد که نشان‌دهنده رشد جدایه S59 در غلظت‌های نمک 10 و 17 درصد و عدم رشد آن در غلظت 20 درصد بود. نتایج به‌دست آمده در جدول 3 ارائه شده است.

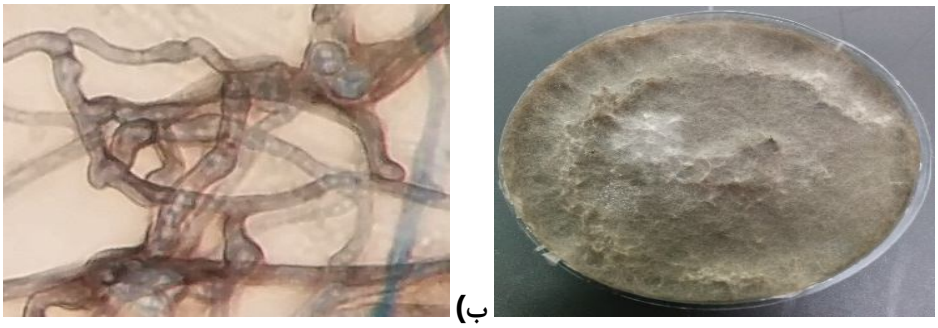
جدول 3. رشد جدایه‌ها در غلظت‌های مختلف NaCl

نام جدایه / شوری	%10	%17	%20
S59	++	++	-

-: عدم رشد +: رشد کم ++: رشد متوسط +++: رشد زیاد

شناسایی مولکولی جدایه S59

نتایج به‌دست آمده از شناسایی مولکولی و تعیین ترادف ژن‌های ITS و مقایسه توالی به‌دست آمده در بانک ژنی ExTaxon نشان داد که جدایه S59 با میزان شباهت 100 درصد متعلق به *Embellisia* sp. است. این جدایه با کد UTMC 5051 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت و نگهداری شد. شکل میکروسکوپی و کلنی سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051 در شکل 1 آمده است.

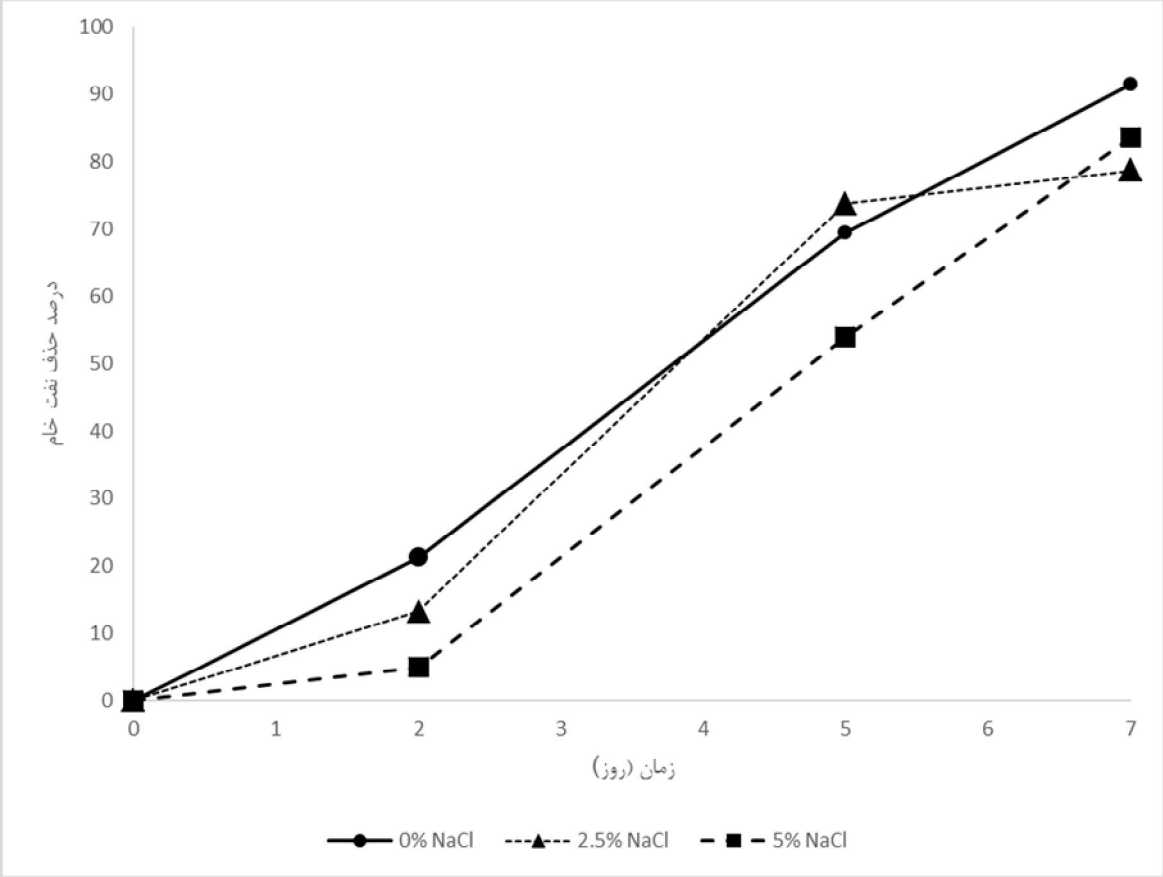


الف) **ب)**

شکل 1. تصویر الف) کلنی جدایه S59 در محیط PDA، ب) تصویر میکروسکوپی *Embellisia* sp. UTMC 5051 رنگ آمیزی شده با لاکتوفنل کاتن بلو (بزرگنمایی 400×)

ارزیابی توانایی تخریب و حذف نفت‌خام در محیط کشت PDB

برای ارزیابی توانایی میزان حذف نفت، خام، سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051 در محیط PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام در شوری‌های 0، 2/5 و 5 درصد به‌مدت 7 روز گرماگذاری شد و طی روزهای 2، 5 و 7 مورد سنجش کل محتوای هیدروکربنی باقیمانده قرار گرفت. این سویه در مدت 7 روز، در محیط PDB غیرشور، 91/5 درصد از نفت‌خام را حذف کرد و در شوری‌های 2/5 و 5 درصد، به‌ترتیب، 78/8 و 83/6 درصد از نفت‌خام را حذف کرد. شکل 2، نمودار درصد حذف نفت‌خام در محیط PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام در شوری‌های 0، 2/5 و 5 درصد توسط سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051 در طی 7 روز را نشان می‌دهد.

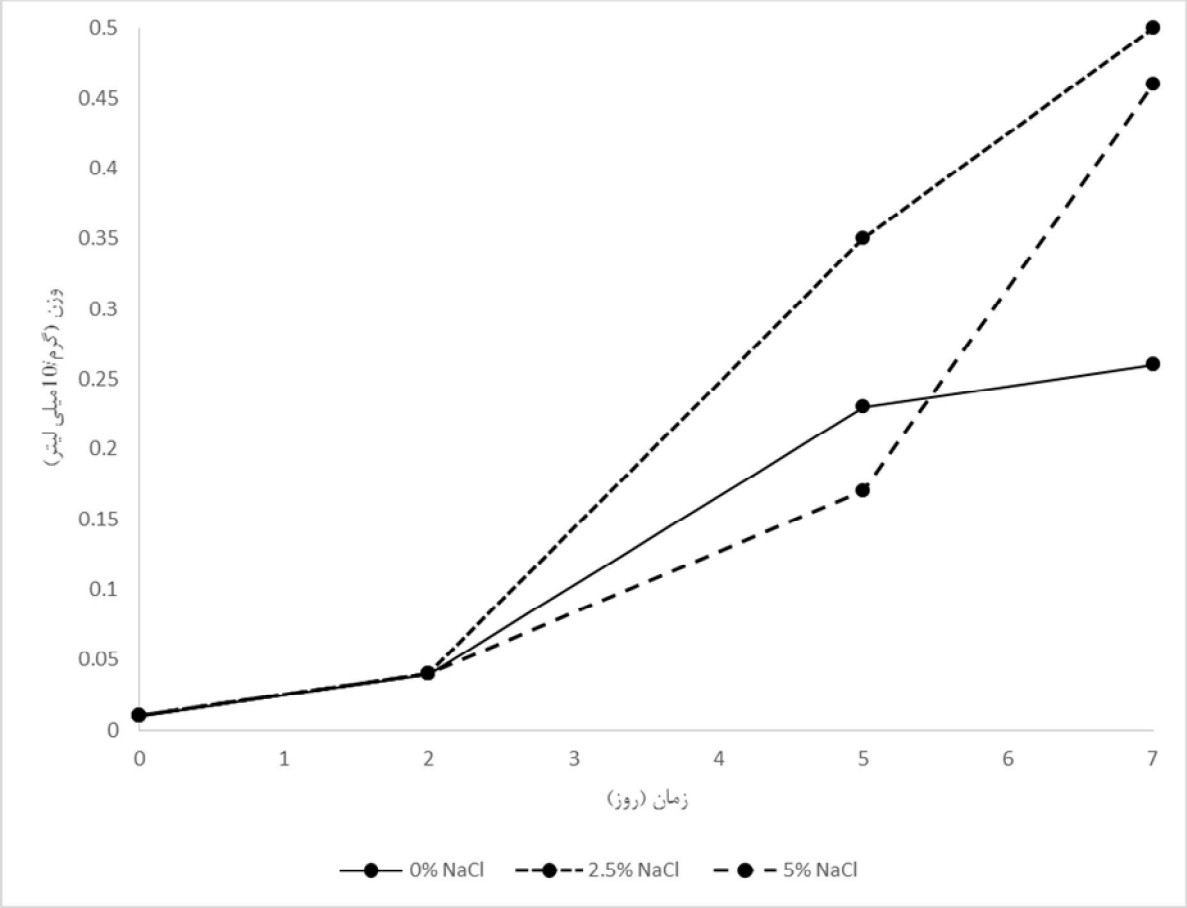


شکل 2، نمودار درصد حذف نفت‌خام در محیط PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام در شوری‌های 0، 2/5 و 5 درصد توسط سویه Embellisia sp. UTMC 5051

میزان تولید زیست‌توده در محیط کشت PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام

برای ارزیابی میزان تولید زیست‌توده، سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051 در محیط PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام در شوری‌های 0، 2/5 و 5 درصد به‌مدت 7 روز گرماگذاری شد و طی روزهای 2، 5 و 7 وزن زیست‌توده خشک مورد سنجش قرار گرفت. وزن زیست‌توده خشک در پایان 7 روز در محیط کشت PDB غیر شور 26 گرم در لیتر و در شوری‌های 2/5 و 5 درصد، به‌ترتیب 50 و 46 گرم در لیتر بود. شکل 3، تولید

زیست‌توده در محیط PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام در غلظت نمک‌های 0، 2/5 و 5 درصد توسط سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051 در طی 7 روز را نشان می‌دهد.



شکل 3. تولید زیست‌توده در محیط PDB حاوی 1 درصد نفت‌خام در غلظت نمک‌های 0، 2/5 و 5 درصد توسط سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051

بحث

منطقه خلیج‌فارس و خاورمیانه با دارا بودن بیش از 60 درصد کل نفت مورد نیاز دنیا از مهم‌ترین مناطق آلوده به آلاینده‌های نفتی محسوب می‌شود. از آنجا که این منطقه و ازجمله کشور ایران در کمربند بیابانی دنیا قرار گرفته است بسیاری از محیط‌هایی که آلودگی نفتی دارند به میزان کم تا زیاد همراه با نمک بوده و شور هستند. شوری بالا تجزیه زیستی ترکیبات نفتی را با مشکل روبرو می‌کند به دلیل اینکه این شرایط برای بسیاری از میکروارگانیسم‌ها کشنده است [2]. در این شرایط، میکروارگانیسم‌هایی که قادر به رشد در مناطق شور هستند، نقش اصلی را در پاک‌سازی این مناطق دارند [18]. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که سویه *Embellisia* sp. قادر به تجزیه نفت در محیط‌های شور و غیرشور هست. همچنین مطالعات نشان می‌دهد این قارچ در حضور نمک در محیط PDB رشد بیش‌تری نسبت به محیط PDB فاقد نمک داشته است. همچنین در مقایسه شوری 2/5 درصد با 5 درصد در محیط‌های کشت MSM و PDB، با افزایش

شوری، تجزیه نفت‌خام افزایش می‌یابد. هرچند، در محیط کشت PDB، تجزیه نفت‌خام از محیط‌های شور بیش‌تر است.

در مطالعات بهنود و همکاران، نشان می‌دهد که قارچ *Phanerochaete chrysosporium* قادر به حذف زیر 30 درصد نفت‌خام در محیط کشت MSM در شوری 4 درصد و 1 درصد گلوکز است [1] اما نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نشان داد که سویه معرفی شده قادر به حذف 44/7 درصدی نفت‌خام در محیط کشت MSM بدون گلوکز در شوری 5 درصد می‌باشد.

قارچ‌های خاکزی نیز مانند گونه‌های *Fusarium*, *penicillium*, *Graphium*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Giiocladium*, *Hansenula*, *Mortierella*, *Mucor*, *Rhodosporidium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sphaeropsidales*, *Sporobolomyces*, *Torulopsis* و اعضای *Sphaeropsidales* قادر به تخریب هیدروکربن‌های نفت‌خام می‌باشند [19، 20، 21 و 22]. این توزیع از مخمرها و قارچ‌ها نقش مهم آن‌ها در تخریب نفت نشت یافته در محیط و لزوم تحقیقات بیش‌تر را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج ارائه شده در این پژوهش این اولین گزارش از تجزیه نفت‌خام توسط سویه .Embellisia sp است و تا کنون گزارشی از این سویه در زیست‌پالایی نشده است درگزارشات این جنس در کنترل زیستی نماتد Heterodera Schachtii که آفت در کشاورزی است، به‌کار می‌رود [23]. همچنین در تولید ماده ترپستاسین که مانع رگ‌زایی در درمان سرطان می‌شود، از سویه‌های این جنس استفاده می‌شود [24]. نتایج ارائه شده نشان می‌دهد این سویه توان‌مندی بالایی در زیست‌پالایی نفت‌خام در حضور نمک داشته و می‌توان از آن به منظور حذف آلاینده‌های نفتی از خاک‌های آلوده شور و نیمه‌شور کشور استفاده کرد.

نتیجه‌گیری

نتایج نشان دهنده قابلیت حذف نفت‌خام توسط سویه *Embellisia* sp. UTMC 5051 در محیط‌های کشت MSM و PDB حاوی غلظت NaCl 0، 2/5 و 5 درصد می‌باشد. همچنین این سویه قادر به رشد تا شوری 17 درصد در محیط‌کشت PDA می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بدینوسیله از مدیریت محترم پژوهش و فناوری شرکت ملی پالایش و پخش فرآورده‌های نفتی ایران و کارشناسان محترم آن مجموعه به خاطر زحمات و همکاری‌های صورت گرفته در طول انجام پروژه و همچنین حمایت مالی آنها صمیمانه تشکر می‌نمایند.

فهرست علائم و نشانه‌ها

Ms/cm	**Milli siemens per centimeter**
°C	**degree centigrade**

منابع

[1] M. Behnood, B. Nasernejad, and M. Nikazar, "Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus Phanerochaete chrysosporium," *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 20, no. 4, pp. 1879–1885, 2014.

[2] M. P. Diaz, K. G. Boyd, S. J. W. Grigson, and J. G. Burgess, "Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 79, no. 2, pp. 145–153, 2002.

[3] Q. Chaudhry, M. Blom-Zandstra, S. K. Gupta, and E. Joner, "Utilising the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance breakdown of organic pollutants in the environment (15 pp)," *Environ. Sci. Pollut. Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 34–48, 2005.

[4] Sathishkumar M, Binupriya A, Baik S et al. Biodegradation of crude oil by individual bacterial strains and a mixed bacterial consortium isolated from hydrocarbon contaminated areas. *CLEAN – Soil, Air, Water*. 2008;36:92–6.

[5] C. C. Wiltse, W. L. Rooney, Z. Chen, A. P. Schwab, and M. K. Banks, "Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes," *J. Environ. Qual.*, vol. 27, no. 1, pp. 169–173, 1998.

[6] F. Kargi and A. R. Dinçer, "Use of halophilic bacteria in biological treatment of saline wastewater by fed-batch operation," *Water Environ. Res.*, vol. 72, no. 2, pp. 170–174, 2000.

[7] C. R. Woolard and R. L. Irvine, "Treatment of hypersaline wastewater in the sequencing batch reactor," *Water Res.*, vol. 29, no. 4, pp. 1159–1168, 1995.

[8] C. O. Obuekwe, A. M. Badrudeen, E. Al-Saleh, and J. L. Mulder, "Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress," *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, vol. 56, no. 4, pp. 197–205, 2005.

[9] A. Elshafie, A. Y. AlKindi, S. Al-Busaidi, C. Bakheit, and S. N. Albahry, "Biodegradation of crude oil and n-alkanes by fungi isolated from Oman," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 54, no. 11, pp. 1692–1696, 2007.

[10] N. Gunde-Cimerman, J. Ramos, and A. Plemenitaš, "Halotolerant and halophilic fungi," *Mycol. Res.*, vol. 113, no. 11, pp. 1231–1241, 2009.

[11] N. Gunde-Cimerman, J. C. Frisvad, P. Zalar, A. Plemenitaš, S. K. Deshmukh, and M. K. Rai, *Halotolerant and halophilic fungi.* Science Publishers, Inc., 2005.

[12] I. Ali, L. Kanhayuwa, S. Rachdawong, and S. K. Rakshit, "Identification, phylogenetic analysis and characterization of obligate halophilic fungi isolated from a man-made solar saltern in Phetchaburi province, Thailand," *Ann. Microbiol.*, vol. 63, no. 3, pp. 887–895, 2013.

[13] S. a. Cantrell, L. Casillas-Martínez, and M. Molina, "Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques," *Mycol. Res.*, vol. 110, no. 8, pp. 962–970, 2006.

[14] T. Watanabe, *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC press, 2010.
[15] V. K. Gupta, M. G. Tuohy, M. Ayyachamy, K. M. Turner, and A. O'Donovan, *Laboratory protocols in fungal biology: current methods in fungal biology*. Springer Science & Business Media, 2012.
[16] Sambrook J, MacCallum P. Molecular cloning: a laboratory manual. Zoological Research; 2013.
[17] K. S. M. Rahman, J. Thahira-Rahman, P. Lakshmanaperumalsamy, and I. M. Banat, "Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium," *Bioresour. Technol.*, vol. 85, no. 3, pp. 257–261, 2002.
[18] R. Margesin and F. Schinner, "Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 56, no. 5–6, pp. 650–663, 2001.
[19] A. R. Hashem, "Bioremediation of petroleum contaminated soils in the Arabian Gulf region: a review," *Science (80-.).*, vol. 19, no. 1, 2007.
[20] O. Obire and R. R. Putheti, "Fungi in Bioremediation of Oil Polluted Environments," *Sigma*, pp. 1–10, 2009.
[21] B. C. Ferrari, C. Zhang, and J. Van Dorst, "Recovering greater fungal diversity from pristine and diesel fuel contaminated sub-Antarctic soil through cultivation using both a high and a low nutrient media approach," *Front. Microbiol.*, vol. 2, 2011.
[22] J. L. S. Lemos, A. C. Rizzo, V. S. Millioli, A. U. Soriano, M. I. de Moura Sarquis, R. Santos, and O. Cruz, "Petroleum degradation by filamentous fungi," in *The 9th Annual International Petroleum Environmental Conference*, 2002, pp. 22–25.
[23] A. A. H. Jalali, R. Segers, and J. Coosemans, "Biocontrol of Heterodera Schachtii Using Combinations of the Sterile Fungus, Stfch1-1, Embellisia Chlamydospora and Verticilli Um Chlamydospori Um," *Nematologica*, vol. 44, no. 4, pp. 345–355, 1998.
[24] H. J. Jung, H. B. Lee, C. J. Kim, J.-R. Rho, J. Shin, and H. J. Kwon, "Anti-angiogenic Activity of Terpestacin, a Bicyclo Sesterterpene from Embellisia chiamydospora," *J. Antibiot. (Tokyo).*, vol. 56, no. 5, pp. 492–496, 2003.