جداسازی و شناسایی مخمر *Rhodotrula sp.* به عنوان سویه‌ای بومی توان‌مند در تولید بیوسورفکتانت از خاک‌های آلوده نفتی

پروین حسنی‌زاده[1] و حمید مقیمی[2] *

[1]دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکربی، بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

[2]استادیار میکروبیولوژی، بخش زیست فناوری میکربی، دانشکده زیست شناسی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

دریافت: 95/5/11 پذیرش: 96/5/25

چکیده

بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات فعال سطحی هستند که توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. این ترکیبات دارای کاربردهای بسیاری در صنایع گوناگون به ویژه در صنعت نفت و پاک سازی آلودگی‌های نفتی هستند. در این پژوهش از میان 22 جدایه‌ی مخمر جداسازی شده از 8 نمونه خاک آلوده به هیدروکربن‌های نفتی در نهایت جدایه‌ی G-13 با قطر هاله‌ی 13/1 سانتی متر و کاهش کشش سطحی به میزان 26 میلی - نیوتون بر متر به عنوان جدایه‌ی برتر انتخاب گردید. نتایج شناسایی مشخص کرد که این جدایه شباهت 100% با Rhodotrula sp. داشته و با کد UTMC 5032 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت گردید. شاخص امولسیون زایی (EI_1 و EI_{24}) این جدایه برای تولوئن و دیزل برابر 100% تعیین شد. بر نتایج سویه‌ی Rhodotrula sp. توانایی بالایی در تولید ترکیبات زیستی فعال سطحی و ایجاد امولسیون با ترکیبات آب گریز دارد و می‌تواند به‌عنوان سویه‌ای توانمند در حذف آلودگی‌های نفتی معرفی شود.

کلمات کلیدی: بیوسورفکتانت‌ها، پاک سازی زیستی، کشش سطحی، مخمر

مقدمه

صدها ترکیب طبیعی و مصنوعی مختلف با فعالیت سطحی تحت عنوان سورفکتانت در صنایع گوناگون استفاده می‌شوند [1]. این ترکیبات دارای کاربردها و توانمندی‌های بسیاری در صنایع گوناگون به‌ویژه در صنعت نفت و پاک سازی آلودگی‌های نفتی هستند. در حال حاضر سورفکتانت‌های رایج همگی محصولات پتروشیمیایی هستند و عموما ساختار آلکیل بنزن سولفانات[1]، آلکیل فنول اتوکسیلات[2] و یا الکل چرب

* hmoghimi@ut.ac.ir

[1]Alkylbenzene sulfonate

[2]Alkylphenol ethoxylates

سنتتیک[1] دارند [2]. گرچه این سورفکتانت‌ها کارا هستند اما استفاده‌ی بی رویه از آن‌ها باعث ایجاد اثرات مخربی بر محیط زیست شده است. بیوسورفکتانت‌ها، سورفکتانت‌هایی با منشأ زیستی هستند که به طور عمده توسط میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند و مزیت‌های فراوانی نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی دارند. از جمله این مزیت‌ها می‌توان به غیر سمی بودن یا سمیت پایین، زیست تخریب پذیری، قابلیت تولید از مواد ارزان قیمت و تجدیدپذیر، اختصاصیت، پایداری و کارایی در شرایط سخت فیزیکی، قابلیت شکستن و از بین بردن امولسیون و فعالیت سطحی و بین سطحی کارامدتر اشاره کرد [3]. بیوسورفکتانت‌ها توسط طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها و انواعی از باکتری‌ها تولید می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها عمدتاً مصرف کننده‌ی سوبستراهای هیدروکربنی هستند [4، 5]. قارچ‌ها و به طور ویژه مخمرها نیز از جمله تولیدکنندگان بیوسورفکتانت به شمار می‌آیند. قارچ‌ها بازده خوبی در تولید بیوسورفکتانت در مقایسه با باکتری‌ها دارند و علت این موضوع شاید حضور دیواره‌ی سلولی سخت در آن‌ها باشد. به نظر می‌رسد که این بازده زیاد، استفاده از قارچ‌ها در صنعت و جایگزینی سورفکتانت‌های شیمیایی با این بیوسورفکتانت‌ها را ممکن می‌سازد. مزیت بزرگ استفاده از مخمرها در تولید بیوسورفکتانت، ایمن بودن یا GRAS[2] بودن آن‌ها است [6 ، 7]. تاکنون مطالعات زیادی بر روی تولید بیوسورفکتانت‌ها به وسیله‌ی باکتری‌ها انجام شده است، در حالی‌که مطالعات صورت گرفته در زمینه‌ی بیوسورفکتانت‌های قارچی کم بوده و تا به حال تعداد نسبتاً کمی قارچ مولد بیوسورفکتانت شناسایی و معرفی شده است [7]. بر این اساس هدف از انجام این پژوهش دست‌یابی به جدایه‌های مخمری بومی و توان‌مند در جهت تولید ترکیبات فعال سطحی به منظور استفاده در پاک‌سازی مناطق آلوده به هیدروکربن‌ها و لکه‌های نفتی بوده است. در این پژوهش برای اولین بار از مخمرهای بومی استفاده شده است.

روش تحقیق

نمونه برداری

خاک‌های آلوده به نفت با رعایت شرایط اسپتیک، با استفاده از قاشقک استریل از عمق 0 تا 20 سانتی متری از 8 منطقه آلوده جمع‌آوری و در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه منتقل شد. در ادامه خاک‌ها با استفاده از هاون چینی استریل کوبیده و آسیاب گشت. در نهایت نمونه‌ها در آزمایشگاه با الک 0/5 میلی-متری همگون شده و ذرات درشت آن‌ها جداسازی شد.

جداسازی قارچ‌ها از نمونه‌های خاک آلوده به نفت و گاز

در این پژوهش از دو روش کشت گسترده در پلیت و روش غنی سازی با نفت خام به منظور جداسازی مخمرهای مولد بیوسورفکتانت از نمونه‌های خاک آلوده به ترکیبات آب گریز استفاده گردید.

[3]Synthetic fatty alcohol
[4]Generally Recognize As Safe

روش کشت گسترده در پلیت: در این روش ابتدا از نمونه‌های خاک، رقت‌های 10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه شد. سپس رقت‌های تهیه شده به مدت 5 دقیقه با استفاده از همزن مخلوط و سونیکاسیون[1] نمونه‌ها توسط دستگاه سونیکاتور انجام شد. در نهایت 100 میکرولیتر از رقت‌های تیمار شده‌ی حاصل بر روی محیط کشت اختصاصی قارچ سیب زمینی دکستروز آگار (PDA[2]) حاوی آنتی بیوتیک تتراسایکلین با غلظت 50 میلی گرم بر لیتر (جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها) و (w/v) 1% نفت خام (به عنوان منبع کربن) انتقال داده شد و با استفاده از لوله‌ی شیشه‌ای L شکل استریل به طور یکنواخت در سراسر محیط کشت پخش شد. پلیت‌های کشت داده شده به مدت 7 روز در انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری[3] شدند [8].

روش غنی سازی با سوبسترای هیدروکربنی: در این پژوهش به منظور غنی سازی مخمرهای مولد بیوسورفکتانت از محیط کشت بوشنل هاس حاوی (w/v) 1% نفت خام به عنوان منبع کربن و تتراسایکلین با غلظت 50 گرم بر لیتر برای جلوگیری از ایجاد آلودگی‌های باکتریایی استفاده گردید. در فلاسک‌های 250 میلی لیتری، 0/5 گرم نمونه خاک همگن شده و 50 میلی لیتر محیط کشت مایع بوشنل هاس استریل و (w/v)1% نفت خام سترون اضافه شد. این فلاسک‌ها به مدت دو هفته در شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی‌گراد و دور 180 rpm گرماگذاری شدند. پس از گرماگذاری، 100 میکرولیتر از مایع تخمیر هر فلاسک به عنوان مایه‌ی تلقیح، به محیط کشت PDA (سیب زمینی دکستروز آگار) حاوی (w/v) 1% نفت خام افزوده گردید. سپس با استفاده از لوله‌ی شیشه‌ای L شکل سترون، مایع تلقیح در سراسر محیط کشت پخش شده و پلیت حاصل به مدت 5 روز در انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی گراد گرماگذاری شد [9].

جدول 1. نمک‌های مورد استفاده برای تهیه‌ی محیط کشت بوشنل هاس و غلظت آن‌ها

نوع نمک	غلظت (گرم بر لیتر)
$MgSO_4.7H_2O$	0/2
KH_2PO_4	1
K_2HPO_4	1
$FeCl_3$	0/5
NH_4NO_3	1

خالص سازی کولونی‌های مخمری: بعد از گرماگذاری مناسب پلیت‌های PDA تلقیح شده در روش غنی - سازی و کشت گسترده، کولونی‌های مخمری رشد کرده در سطح این پلیت‌ها به طور جداگانه بر روی محیط PDA خالص سازی شده و بر اساس شکل ظاهری کولونی، جدایه‌های تکراری شناسایی و حذف گردیدند.

[1]Sonication
[2]Potato Dextrose Agar
[3]Incubation

تهیه پیش کشت و محیط کشت مورد استفاده در غربالگری جدایه‌ها

برای تهیه یک کشت تازه از جدایه‌ها به منظور تلقیح در محیط کشت غربالگری، ابتدا هرکدام از جدایه‌ها در 10 میلی لیتر محیط کشت سیب زمینی دکستروز براث (PDB[1]) کشت داده شده و به مدت 5 روز در انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. به منظور ارزیابی توانایی جدایه‌های مورد بررسی در تولید بیوسورفکتانت، 1 میلی لیتر مایع تلقیح درون فلاسک 250 میلی لیتری حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت ذکر شده در جدول 2 حاوی پسماند روغن خوراکی با غلظت (v/v) 5% به عنوان منبع کربن تلقیح گردید. نمونه‌ی شاهد در این آزمایش همانند سایر فلاسک‌ها حاوی محیط کشت استریل و روغن بوده، ولی تلقیح در آن صورت نگرفت. فلاسک‌های تلقیح شده و شاهد در شیکر انکوباتور با دمای 28 درجه سانتی‌گراد و دور 180 rpm به مدت 9 روز گرماگذاری شدند.

جدول 2. ترکیبات محیط کشت مورد استفاده در غربالگری جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت [10]

ترکیبات محیط کشت
پسماند روغن خوراکی (v/v) 5%، عصاره‌ی مخمر (g/L)1،
0/25 (g/L) KH_2PO_4، 3 (g/L) $NaNO_3$،
0/25 (g/L) $MgSO_4(H_2O)_7$
(pH 7)

ارزیابی توانایی جدایه‌ها در تولید بیوسورفکتانت

به‌منظور ارزیابی توانایی جدایه‌ها در تولید بیوسورفکتانت، تلقیح هر جدایه به میزان 5 درصد درون فلاسک 250 میلی لیتری حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت انجام گرفت. بعد از 9 روز گرماگذاری فلاسک‌های تلقیح شده در دمای $30\ ^{\circ}C$ و دور شیکر 120 rpm، محتویات هر فلاسک در فالکن‌های 50 میلی لیتری تمیز ریخته شد و به مدت 20 دقیقه با دور 2630 g سانتریفوژ گردید. به این ترتیب زیست توده جدا گردید. سپس مایع تخمیر از کاغذ صافی واتمن شماره‌ی 1 عبور داده شد. با استفاده از دکانتور روغن باقی مانده در مایع تخمیر فاقد سلول جدا گردید و برای هر جدایه مایع رویی فاقد روغن به منظور سنجش توانایی تولید بیوسورفکتانت توسط آن جدایه با استفاده از روش‌های گسترش روغن و پارا فیلم مورد بررسی قرار گرفت [۱۱،۱۲]. همچنین توانایی مایع تخمیر جدایه‌ها در امولسیون سازی سوبستراهای هیدروکربنی با استفاده از دو آزمون EI_1 و EI_{24} مورد بررسی قرار گرفت [13، 14]. به منظور تایید نتایج پژوهش از آب مقطر، محیط کشت بدون میکروارگانیسم و همچنین سویه‌ی غیرمولد (مخمر نانوایی) به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

روش گسترش روغن: در این روش ابتدا 40 میلی لیتر آب مقطر درون یک پلیت شیشه‌ای تمیز با قطر 15 سانتی متر ریخته شد. سپس با استفاده از سمپلر 20 میکرولیتر نفت خام در مرکز این پلیت قرار داده شد به صورتی که یک لایه نفت خام بر روی سطح آب درون پلیت تشکیل گردید. 10 میکرولیتر از مایع رویی

[1] Potato Dextrose Broth

حاصل از سانتریفوژ مایع تخمیر هر جدایه در مرکز لایه نفت ایجاد شده در سطح پلیت ریخته شد. کنار زدن نفت و ایجاد هاله با اضافه کردن مایع تخمیر هر جدایه به عنوان شاخصی از تولید بیوسورفکتانت توسط آن جدایه مورد بررسی قرار گرفت [11].

روش پارافیلم: در این روش 25 میکرولیتر از مایع رویی صاف شده‌ی حاصل از سانتریفوژ مایع تخمیر بر روی سطح آب گریز پارافیلم آزمایشگاهی قرار داده شد. در صورت حضور بیوسورفکتانت در نمونه‌ی مورد بررسی، قطره حاصل با سطح آب گریز واکنش داده و پخش می‌گردد. به این ترتیب پخش شدن قطره‌ی حاصل نسبت به شاهد (محیط کشت تلقیح نشده) و آب مقطر به عنوان شاخصی از وجود بیوسورفکتانت به صورت کیفی مورد تحلیل و بررسی قرار گرفت [12].

روش EI_{24} و EI_1: برای اندازه گیری شاخص EI_1، 5 میلی لیتر از مایع رویی صاف شده‌ی حاصل از سانتریفوژ مایع تخمیر هر جدایه و 5 میلی لیتر تولوئن درون لوله آزمایش ریخته شده و محتویات لوله به مدت 2 دقیقه با دور بالا ورتکس گردید. سپس این لوله به مدت 1 ساعت در دمای اتاق قرار داده شد و شاخص EI_1 طبق فرمول 1 محاسبه گردید. شاخص EI_{24} نیز به همین صورت محاسبه گردید با این تفاوت که در این روش سوبسترای آب گریز مورد استفاده دیزل بود و شاخص مذکور 24 ساعت پس از مخلوط شدن دو فاز اندازه گیری شد [13، 14]. این دو شاخص نشان دهنده‌ی میزان توانایی مایع تخمیر در مخلوط کردن دو فاز است.

$$EI_1=\frac{\text{ارتفاع لایه امولسیفیه شده}}{\text{ارتفاع کل ستون مایع}}\times 100$$

شناسایی مولکولی جدایه‌ی برتر

به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ی برتر از ژن ITS[1] استفاده گردید. ابتدا این ژن به روش PCR تکثیر گردید. سپس توالی ژن مذکور با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی مقایسه گردید. بر اساس میزان شباهت ژن مورد نظر با ژن‌های شناسایی شده موجود در این بانک‌ها، شناسایی جدایه‌ی برتر صورت گرفت. جدایه‌ی قارچی با بیشترین توانمندی در تولید ترکیبات فعال سطحی برای شناسایی انتخاب گردید. مورفولوژی ماکروسکوپی (ظاهر، اندازه، شکل و رنگ کولونی) با مشاهده پلیت PDA حاوی کولونی‌های این جدایه تعیین شد. به منظور شناسایی مولکولی جدایه‌ی برتر، این جدایه در محیط کشت سیب زمینی دکستروز براث تلقیح و تا رسیدن به مقدار مناسب زیست توده در دمای 28 درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. پس از این مدت زمان زیست توده حاصله با استفاده از سانتریفوژ جدا و با سرم فیزیولوژی شستشو گردید. با روش منجمد کردن با نیتروژن مایع و سپس کوبیدن، شکستن سلول‌ها صورت گرفت و DNA با روش استخراج با فنول/کلروفورم جداسازی گردید. PCR با پرایمرهای ITS1 و ITS2 صورت گرفت. در این پژوهش به‌منظور شناسایی جدایه قارچی برتر از PCR ژن ITS استفاده گردید. پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعات ژنی در این پژوهش از شرکت سینا ژن تهیه گردید و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده توسط آب مقطر استریل به غلظت مورد نظر رسانده شد. مواد مورد نیاز واکنش PCR شامل 1 میکرولیتر

[1]Internal transcripted spacer

پرایمر رفت با غلظت 10 پیکو مول[1]، 1 میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت 10 پیکو مول[2]، 50 نانوگرم از محلول حاوی DNA ژنومی، 12/5 میکرولیتر Master mix و 5 میکرولیتر بافر HQ (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده) درون میکروتیوپ ریخته شد. حجم نهایی محلول PCR با استفاده از آب مقطر استریل به 25 میکرولیتر رسانده شد. تکثیر قطعات در دستگاه ترموسایکلر[3] صورت گرفت. زمان و دمای واسرشت شدن DNA به ترتیب 5 دقیقه و 94 درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. فرایند تکثیر در 30 چرخه شامل سه بازه دمایی 94 درجه سانتی گراد به مدت 30 ثانیه، 54 درجه سانتی گراد 30 ثانیه و 72 درجه سانتی گراد به مدت 1 دقیقه انجام گرفت. محصول به دست آمده با استفاده از الکتروفورز افقی با ژل آگارز 1% خالص شد. به این منظور 2 میکرولیتر از نمونه‌ی DNA با 2 میکرولیتر رنگ مخلوط شده و درون چاهک تزریق گردید. بعد از اعمال ولتاژ مناسب DNA شروع به حرکت از قطب منفی به قطب مثبت کرده و قطعات DNA بر اساس طول از هم جدا گردیدند. محصول خالص حاصل از الکتروفورز به منظور تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال شد. پس از تعیین توالی هم‌ردیفی این توالی با توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI صورت گرفت و بر اساس درصد شباهت شناسایی صورت گرفت و این سویه در بانک میکروارگانیسم-های دانشگاه تهران ثبت گردید [15].

تعیین میزان کاهش کشش سطحی جدایه‌ی برتر به روش حلقه‌ی دونوی

برای تعیین میزان کاهش کشش سطحی محیط کشت مقدار 20 میلی لیتر از مایع رویی (فاقد روغن) حاصل از مایع تخمیر، درون ظرف نمونه‌ی دستگاه تنسیومتر ریخته شد. دمای نمونه به 25 درجه سانتی‌گراد رسانده شد. حلقه پلاتینیومی به گونه‌ای درون نمونه قرار داده شد که در مایع غوطه‌ور گردد و سپس حلقه به آرامی و با سرعتی یکنواخت از درون مایع به خارج کشیده شد. نیروی لازم برای جدا کردن حلقه از سطح مایع توسط دستگاه تنسیومتر ثبت گردیده و به عنوان کشش سطحی (نیوتون بر متر) در نظر گرفته شد [16]. به منظور تایید نتایج پژوهش از آب مقطر، محیط کشت بدون میکروارگانیسم و همچنین سویه‌ی غیرمولد (مخمر نانوایی) به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

رسم نمودار تولید بیوسورفکتانت و نمودار رشد جدایه‌ی برتر

به این منظور تلقیح 1 میلی لیتر مایع تلقیح جدایه برتر در فلاسک‌های 250 میلی لیتری حاوی 50 میلی لیتر محیط کشت تولید بیوسورفکتانت صورت گرفت. گرماگذاری در دمای 28 درجه‌ی سانتی گراد و دور شیکر 180 rpm صورت گرفت. سپس در فواصل زمانی 24 ساعته سنجش نسبی میزان بیوسورفکتانت تولید شده با روش گسترش روغن صورت گرفت. به این ترتیب نمودار تولید بیوسورفکتانت این سویه رسم گردید.

[1]Forward primer
[2]Reverse primer
[3]Thermocycler

نتایج و بحث

پاک‌سازی زیستی، فرایند بسیار امیدوارکننده‌ای برای تیمار آلودگی‌های نفتی به شمار می‌رود. این روش نسبت به سایر روش‌ها دارای مزایای بسیاری است، چرا که به انرژی کمی نیازمند بوده، مقرون به صرفه و اقتصادی می‌باشد، ساختار خاک را حفظ می‌کند و می‌تواند آلاینده‌های سخت را نیز سم زدایی کند [17]. یکی از مهم‌ترین چالش‌های به‌کارگیری روش‌های زیستی برای پاک‌سازی خاک و آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی به‌خصوص هیدروکربن‌های پلی آروماتیک، در دسترس نبودن ترکیبات آلاینده برای سلول‌ها و در نتیجه سرعت پایین فرایندهای زیستی است. توانایی سورفکتانت‌ها در امولسیونه کردن مخلوط‌های آب و هیدروکربن سبب افزایش در دسترس بودن و تسریع تجزیه‌ی این هیدروکربن‌ها در محیط می‌شود. توانایی سورفکتانت‌ها در افزایش سرعت تجزیه‌ی زیستی، به علت تشکیل امولسیون با ترکیبات آلاینده‌ی نامحلول و افزایش میزان در دسترس بودن زیستی آن‌ها است [18]. به علت مزایای زیاد بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های مصنوعی به خصوص زیست سازگار بودن آن‌ها، در دهه‌ی گذشته تحقیقات به سمت پاک‌سازی زیستی ترکیبات هیدروکربنی با بیوسورفکتانت‌ها متمرکز شده است. با توجه به اهمیت فوق‌العاده بیوسورفکتانت‌ها در صنعت، در حال حاضر دست‌یابی به سویه‌های توان‌مند با بازده بالا در تولید بیوسورفکتانت از اهمیت زیادی برخوردار است. میکروارگانیسم‌های متنوعی شامل باکتری‌ها، کپک‌ها و مخمرها قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند، ولی اکثر مطالعات صورت گرفته در این حوزه مربوط به باکتری‌ها می‌باشد [19]. با توجه به پتانسیل بالای قارچ‌ها در تولید بیوسورفکتانت و تعداد کم مطالعات صورت گرفته در این زمینه و همچنین کارایی این ترکیبات در پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی به عنوان یک معضل مهم زیست محیطی، هدف از این پژوهش دستیابی به سویه‌ی مخمری بومی و توانمند در تولید بیوسورفکتانت به منظور استفاده در پاک سازی زیستی آلودگی‌های نفتی تعیین شد.

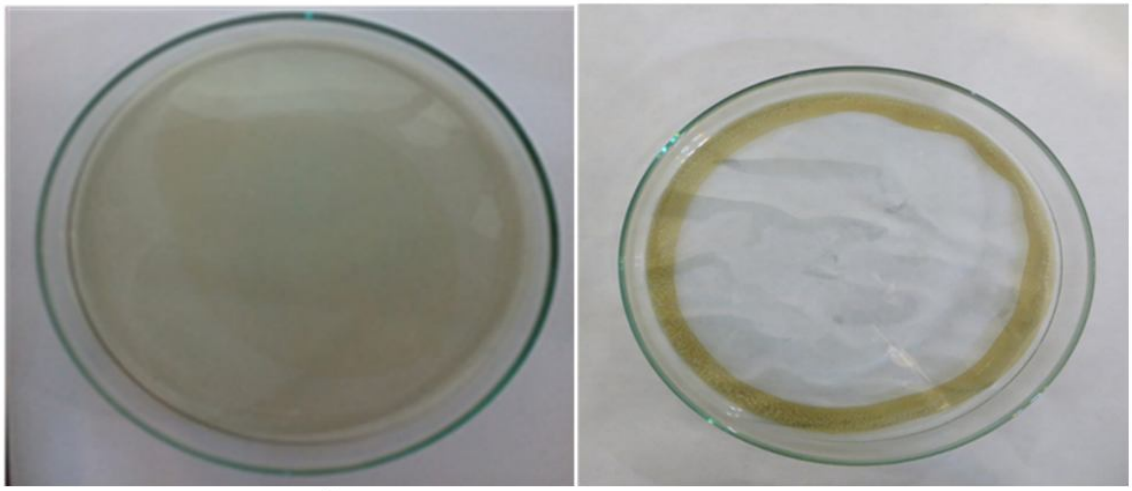
بنا به یافته‌های Ron و Rosenberg، بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند نقش‌های فیزیولوژیک مختلفی را در میکروارگانیسم‌ها بر عهده داشته باشند و مزیت‌های زیادی برای میکروارگانیسم‌های مولد داشته باشند [20]، بنابراین میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت را می‌توان در محیط‌های متفاوتی پیدا کرد. با این وجود Bodour و همکاران نشان دادند که خاک‌های آلوده به ترکیبات آب گریز، بازده بیشتری در جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت نسبت به خاک‌های غیرآلوده دارند [21]. در این راستا در این پژوهش نمونه برداری از مناطق آلوده به ترکیبات نفتی صورت گرفت.

در این پژوهش برای جداسازی سویه‌های مولد بیوسورفکتانت علاوه بر روش کشت سطحی گسترده در پلیت، از روش غنی سازی با نفت خام و دیزل نیز استفاده شد. روش غنی سازی محیط با ترکیبات آب گریز به عنوان روشی بسیار مناسب در جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت گزارش شده است. این روش نوعی غربالگری غیر مستقیم است که در آن رشد بر روی سوبسترای آب گریز نشان دهنده‌ی تولید بیوسورفکتانت می‌باشد. از مجموع 8 نمونه خاک آلوده به نفت مورد استفاده در این پژوهش با دو روش غنی‌سازی و کشت سطحی گسترده در پلیت 22 جدایه‌ی مخمری متفاوت از لحاظ شکل و رنگ کولونی به دست آمد.

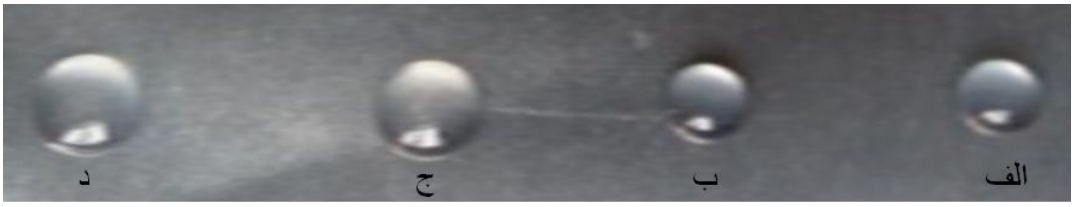
در این پژوهش روش پارافیلم و گسترش روغن به عنوان روش‌های سریع و کارآمد در غربال‌گری جدایه‌های حاصل مورد استفاده قرار گرفتند. روش گسترش روغن توسط Morikawa ابداع شد. این روش علاوه بر اینکه روشی کیفی و سریع برای غربالگری اولیه‌ی سویه‌های مورد بررسی می‌باشد، می‌تواند به عنوان روشی کمی در سنجش نسبی میزان بیوسورفکتانت تولید شده مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس نتایج پژوهش‌های صورت گرفته ارتباط مستقیمی میان قطر هاله‌ی ایجاد شده در این روش با فعالیت سطحی و غلظت سورفکتانت موجود در نمونه وجود دارد [22]. بر اساس نتایج به دست آمده جدایه‌ی G-13 با قطر هاله‌ی 13/1 سانتی متر توانمندترین جدایه در تولید ترکیبات فعال سطحی بود (شکل 1) و در آزمون پارافیلم نیز قطره‌ی حاصل از مایع تخمیر این جدایه به میزان قابل توجهی نسبت به نمونه‌ی شاهد روی سطح پارافیلم پخش گردید (شکل 2). همچنین مایع تخمیر دو جدایه‌ی KH-02 و KR-01 فعالیت سطحی قابل توجهی در این دو آزمون نشان داد. نتایج آزمون‌های گسترش روغن و پارافیلم برای این جدایه‌ها در جدول 3 نشان داده شده است.

جدول 3. نتایج آزمون‌های گسترش روغن (قطر هاله) و پارافیلم برای جدایه‌های مورد بررسی. "++" نشان دهنده پخش گسترده قطره (بالای 10 میلی متر)، "+" نشان دهنده‌ی پخش محدودتر (کمتر از 10 میلی متر) و "-" نشان دهنده‌ی عدم پخش قطره نسبت به نمونه‌ی شاهد روی سطح پارافیلم می‌باشد.

جدایه	تولید بیوسورفکتانت		جدایه	تولید بیوسورفکتانت	
	قطر هاله (cm)	آزمون پارافیلم		قطر هاله (cm)	آزمون پارافیلم
SH-03	0	-	G-14	0	-
KH-02	4/5	++	M-5	0/8	+
KR-05	0/6	+	G-16	0	-
KR-06	0	-	G-17	0/5	-
KR-01	6/2	++	G-18	0	-
M-02	2.1	++	SR-1	0	-
KH-08	0	-	G-20	0/8	+
M-6	3	++	BB-2	0/2	-
G-13	13/1	++	G-2	0/9	+
G-1	1/8	++	G-10	0	-
G-2	0	-	G-7	0	-



شکل 1. الف) کنترل آب مقطر ب) آزمون گسترش روغن، تولید هاله‌ای شفاف به قطر 13/1 سانتی متر با اضافه کردن مایع تخمیر صاف شده‌ی حاصل از کشت جدایه‌ی G-13 در روز 7 تخمیر



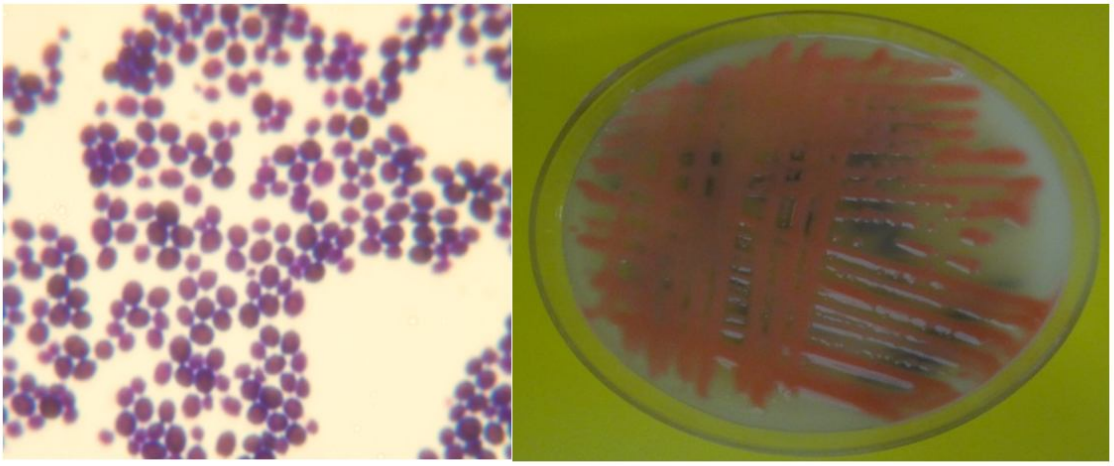
شکل 2. آزمون پارافیلم: الف) آب؛ عدم پخش شدن قطره‌ی آب بر سطح آب گریز پارافیلم، ب) محیط کشت بدون تلقیح قارچی، ج و د) مایع تخمیر صاف شده‌ی جدایه G-13؛ قطره مورد نظر با سطح آب گریز واکنش داده و پخش می‌گردد.

بر اساس نتایج حاصل از تست‌های گسترش روغن و پارافیلم 6 جدایه (با قطر هاله‌ی بالاتر از 1 سانتی متر و پخش قطره‌ی بالای 10 میلی متر) برای ادامه‌ی آزمایش‌ها انتخاب شد. در مرحله بعد، توانایی مایع تخمیر این جدایه‌ها در امولسیون سازی سوبستراهای هیدروکربنی با آزمون‌های ظرفیت امولسیون زایی مورد بررسی قرار گرفت. میزان هر یک از شاخص‌های محاسبه شده در این روش‌ها متناسب با غلظت بیوسورفکتانت موجود در هر نمونه است. نتایج حاصل از آزمون بررسی فعالیت امولسیون زایی این جدایه‌ها به روش EI_1 و EI_{24} در جدول 4 ذکر شده است. بر اساس نتایج به دست آمده جدایه‌ی G-13 بیشترین میزان خاصیت امولسیون سازی را نشان داد و پس از آن جدایه‌های KR-01، KH-02، M-6، M-02 و G-1 به ترتیب بیشترین تا کمترین میزان فعالیت امولسیفیه کنندگی را نشان دادند.

جدول 4. بررسی فعالیت امولسیون کنندگی 9 جدایه‌ی برتر حاصل از غربالگری اولیه

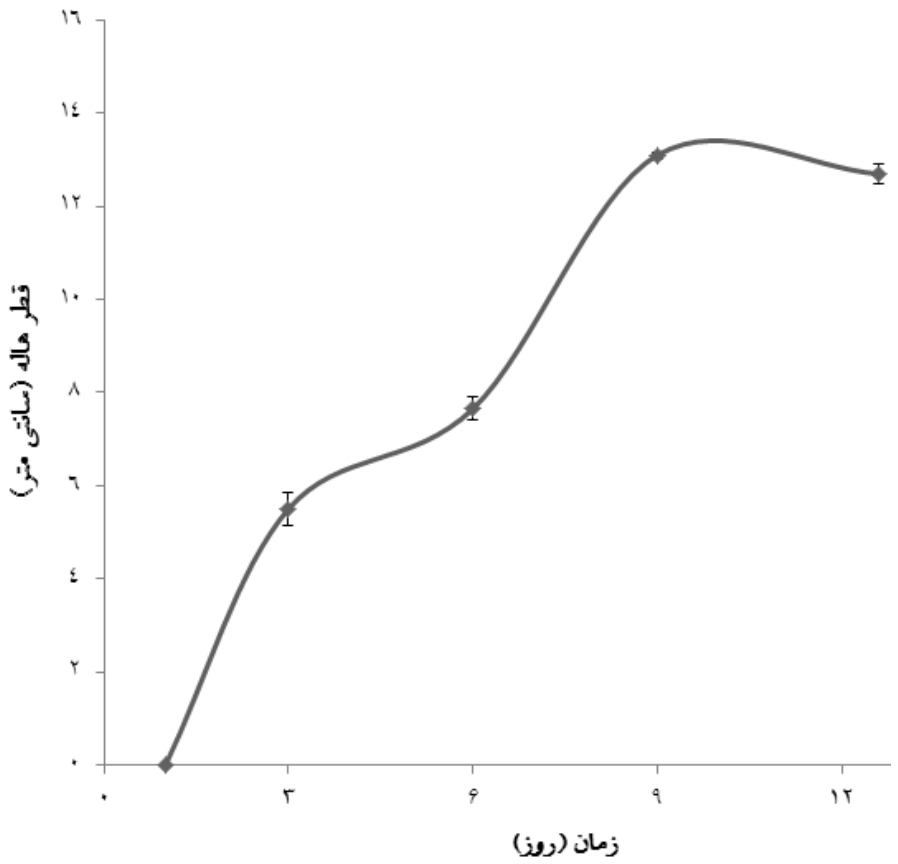
ردیف	جدایه	درصد EI_1	درصد EI_{24}
1	KH-02	%43	%20
2	KR-01	%60	%20
3	M-02	%25/3	0
4	G-1	%19	0
5	M-6	%40	0
6	G-13	%100	%100
7	شاهد (آب)	0	%0
8	شاهد (محیط کشت تلقیح نشده)	%10	%0

بر اساس نتایج حاصل، در نهایت جدایه‌ی G-13 به عنوان توان‌مندترین جدایه در تولید ترکیبات فعال در سطح انتخاب شد. شناسایی مولکولی این جدایه با پرایمرهای ITS نشان داد این جدایه با میزان شباهت 99% متعلق به *Rhodotrula* sp. بوده و با کد دسترسی UTMC 5046 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت گردید (شکل 3). بر اساس تعاریف کاهش کشش سطحی تا زیر 40 میلی نیوتن بر متر معیاری از تولید بیوسورفکتانت در نظر گرفته می‌شود [9]. اندازه گیری کشش سطحی برای مایع تخمیر سویه‌ی منتخب انجام گرفت و این سویه قادر بود کشش سطحی را به میزان 26 میلی نیوتون بر متر کاهش دهد. سنجش تولید بیوسورفکتانت توسط این سویه در بازه‌های زمانی 3 روزه و با استفاده از آزمون گسترش روغن انجام گرفت و نمودار تولید بیوسورفکتانت برای سویه مذکور طی مدت زمان 12 روز رسم گردید. بر اساس نمودار شکل 4، بیشترین میزان تولید توسط سویه‌ی *Rhodotrula* sp. در روز 9 گرماگذاری صورت گرفت.



ب الف

شکل 3. تصویر کلی (الف) و شکل میکروسکوپی (بزرگنمایی 40 ×) (ب) کولونی سویه‌ی UTMC 5046 *Rhodotrula* sp.



شکل 4. نمودار تولید بیوسورفکتانت توسط *Rhodotrula* sp. UTMC 5046 در محیط کشت پایه نمکی حاوی (v/v) 5% روغن سرخ شده به عنوان منبع کربن و (w/v) 0/1% عصاره مخمر به عنوان منبع نیتروژن طی 12 روز

با مقایسه نتایج به دست آمده در این تحقیق با مقادیر گزارش شده در مقالات، سویه‌ی منتخب *Rhodotrula* sp. UTMC 5046 با تولید هاله‌ای شفاف در آزمون گسترش روغن به میزان 13/1 سانتی‌متر، مولد بیوسورفکتانت بوده و قادر است کشش سطحی محیط را به میزان 26 میلی نیوتن بر متر کاهش دهد؛ که این میزان کاهش کشش سطحی در مقایسه با مقادیر گزارش شده برای سویه‌های مولد قابل توجه است. به عنوان مثال در تحقیق انجام شده توسط Andrade و همکاران، سویه‌ی قارچی *C. echinulate* به عنوان مولد بیوسورفکتانت کشش سطحی محیط کشت را به میزان 36 میلی نیوتن بر متر کاهش داده و قطر هاله-ی حاصل از آزمون گسترش روغن، 4/7 سانتی متر گزارش گردید [23]. بر اساس گزارش Yin و همکاران، سویه‌ی *Psuedomonas aeruginosa* S6 با تولید رامنولیپید کشش سطحی را به میزان 33/9 میلی نیوتن بر متر کاهش می‌دهد [24]. در این پژوهش فعالیت امولسیفیه کنندگی مایع تخمیر جدایه‌های مولد بیوسورفکتانت بر روی ترکیبات آب گریز با استفاده از آزمون EI_1 و EI_{24} مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون EI_1 و EI_{24} مایع تخمیر سویه‌ی برتر، امولسیون‌های پایداری به ترتیب با تولوئن و دیزل (به میزان 100%)

تولید کرد. در پژوهش انجام شده توسط Bento و همکاران بیشترین میزان شاخص EI_{24} محاسبه شده برای مایع تخمیر سویه‌های مولد بیوسورفکتانت با استفاده از دیزل به عنوان سوبسترای آب گریز 18/4% و مربوط به *Bacillus cereus* بود. میزان شاخص EI_{24} محاسبه شده برای کنسرسیوم این سویه‌های مولد نیز 48% گزارش شد [25]. امانی و همکاران نیز میزان شاخص EI_{24} برای سویه‌ی *Bacillus subtilis* با استفاده از نفت خام را 75% گزارش کردند [26].

نتیجه گیری

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش سویه‌ی منتخب *Rhodotrula* sp. با کاهش کشش سطحی به میزان 26 میلی نیوتون بر متر سویه‌ای توانمند در تولید بیوسورفکتانت بوده و بیوسورفکتانت تولید شده توسط این سویه توانایی بالایی در امولسیون سازی هیدروکربن‌های نفتی دارد به صورتی که شاخص EI_{24} مشاهده شده برای این سویه 100% بود. بر اساس اطلاعات ما این گزارش، اولین گزارش از تولید بیوسورفکتانت توسط این سویه مخمری در داخل کشور بوده و سایر پژوهش های انجام شده داخل کشور روی باکتری ها صورت گرفته است. امروزه آلودگی های هیدروکربنی ناشی از صنعت نفت در مناطق خشکی و آب یکی از معضلات مهم زیست محیطی کشور است. با توجه به پتانسیل بالای این سویه در تولید بیوسورفکتانت و امولسیون سازی ترکیبات هیدروکربنی، این سویه می‌تواند به عنوان گزینه‌ای ارزشمند و مناسب در جهت پاک‌سازی مناطق آلوده به نفت و لکه‌های نفتی معرفی شود.

منابع

1. Rahman P.K. and Randhawa K.K.S., Editorial: Microbiotechnology based surfactants and their applications, Frontiers in microbiology, Vol.6, 2015.
2. Sekhon K.K., Khanna S. and Cameotra S.S., Biosurfactant production and potential correlation with esterase activity, Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, Vol.3, 2012, pp 1-10.
3. Banat I.M., Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review, Bioresource technology, Vol.51, 1995, pp 1-12.
4. Fakruddin M., Biosurfactant: production and application, Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, Vol.3, 2012, pp 1-5.
5. Hommel R.K., Formation and function of biosurfactants for degradation of water-insoluble substrates, in Biochemistry of microbial degradation, 1994, Springer, pp 63-87.
6. Amaral P.F., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M. and Coutinho J.A., Biosurfactants from yeasts: characteristics, production and application, in Biosurfactants, 2010, Springer, pp 236-249.
7. Bhardwaj G., Cameotra S.S., and Chopra H.K., Biosurfactants from fungi: A Review, Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology, Vol.4, 2013, pp 160-166.
8. Ekundayo F.O., Olukunle O.F. and Ekundayo E.A., Biodegradation of Bonny light crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, Ondo state, Malaysian Journal of Microbiology, Vol.8, 2012, pp 42-46.

9. Willumsen P.A. and Karlson U., Screening of bacteria isolated from PAH-contaminated soils for production of biosurfactants and bioemulsifiers, Biodegradation, Vol.7, 1996, pp 415-423.
10. Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K. and Kitamoto D., Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus Pseudozyma, Applied microbiology and biotechnology, Vol.75, 2007, pp 521-531.
11. Qazi M.A., Kanwal T., Jadoon M., Ahmed S. and Fatima N., Isolation and characterization of a biosurfactant-producing *Fusarium* sp. BS-8 from oil contaminated soil, Biotechnology progress, Vol.3, 2014, pp 1065-1075.
12. Techaoei S., Leelapornpisid P., Santiarwarn D. and Lumyong S., Preliminary screening of biosurfactant producing microorganisms isolated from hot spring and garages in northern Thailand, KMITL Science and Technology Journal, Vol.7, 2007, pp 38-43.
13. Kuiper I., Lagendijk E.L., Pickford R., Derrick J.P., Lamers G.E., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J. and Bloemberg G.V., Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms, Molecular microbiology, Vol.51, 2004, pp 97-113.
14. Cooper D.G. and Goldenberg B.G., Surface-active agents from two *Bacillus* species, Applied and environmental microbiology, Vol.53, 1987, pp 224-229.
15. Green M.R. and Sambrook J., Molecular cloning: a laboratory manual, Vol.1, 2012: Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
16. Walter V., Syldatk C. and Hausmann R., Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms, in Biosurfactants, 2010, Springer, pp 1-13.
17. Banat I.M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M.G., Fracchia L., Smyth T.J. and Marchant R., Microbial biosurfactants production, applications and future potential, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.87, 2010, pp 427-444.
18. Bustamante M., Durán N. and Diez M., Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review, Journal of soil science and plant nutrition, Vol.12, 2012, pp 667-687.
19. Guerra-Santos L.H., Käppeli O. and Fiechter A., Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.24, 1986, pp 443-448.
20. Das K. and Mukherjee A.K., Characterization of biochemical properties and biological activities of biosurfactants produced by *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid strains isolated from hydrocarbon-contaminated soil samples, Applied microbiology and biotechnology, Vol.69, 2005, pp 192-199.
21. Bodour A.A., Drees K.P. and Maier R.M., Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils, Applied and Environmental Microbiology, Vol.69, 2003, pp 3280-3287.
22. Youssef N.H., Duncan K.E., Nagle D.P., Savage K.N., Knapp R.M. and McInerney M.J., Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms, Journal of Microbiological Methods, Vol.56, 2004, pp 339-347.
23. Andrade Silva N.R., Luna M.A., Santiago A.L., Franco L.O., Silva G.K., de Souza P.M., Okada K., Albuquerque C.D., Silva C.A. and Campos-Takaki G.M., Biosurfactant-and-bioemulsifier produced by a promising *Cunninghamella echinulata*

isolated from Caatinga soil in the northeast of Brazil, International journal of molecular sciences, Vol.15, 2014, pp 15377-15395.

24. Yin H., Qiang J., Jia Y., Ye J., Peng H., Qin H., Zhang N. and He B., Characteristics of biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* S6 isolated from oil-containing wastewater, Process Biochemistry, Vol.44, 2009, pp 302-308.
25. Bento F.M., de Oliveira Camargo F.A., Okeke B.C. and Frankenberger W.T., Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil, Microbiological research, Vol.160, 2005, pp 249-255.
26. Amani H., Sarrafzadeh M.H., Haghighi M. and Mehrnia M.R., Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, Journal of Petroleum Science and Engineering, Vol.75, 2010, pp 209-214.