فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۲۰- ۱۱۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۴/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

بررسی اثر سورفکتانت توئین ۸۰ بر رشد و مصرف دی‌بنزوتیوفن توسط قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* جداسازی شده از خاک آلوده به نفت

فاطمه علمی: کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، f.elmi2@sci.ui.ac.ir
زهرا اعتمادی‌فر *: دانشیار میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، z_etemadifar@yahoo.com
گیتی امتیازی: استاد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiazi@yahoo.com

چکیده

مقدمه: نفت یکی از مهم‌ترین منابع تولید انرژی است که حاوی انواعی از ترکیبات آلی گوگرددار است. در طول سوختن این ترکیبات اکسید گوگرد تولید شده و آلودگی اتمسفر و خاک را سبب می‌شود. دی‌بنزوتیوفن به عنوان یک مدل برای انجام آزمایش‌های گوگردزدایی زیستی به کار می‌رود، و سورفکتانت توئین ۸۰ موجب افزایش حلالیت این ترکیب سمی شده و طی فرآیند گوگردزدایی زیستی به میزان بیشتری توسط میکروارگانیسم مصرف می‌شود.

مواد و روش‌ها: برای بررسی توانایی حذف دی‌بنزوتیوفن توسط قارچ *اگزوفیالا اسینیفرای* جداسازی شده از روش اسپکتروفوتومتری و جذب اختصاصی دی‌بنزوتیوفن در طول موج ۳۲۳ نانومتر استفاده شد. سپس، تأثیر غلظت‌های مختلف سورفکتانت توئین ۸۰ بر رشد و مصرف دی‌بنزوتیوفن توسط این قارچ بررسی شد.

نتایج: قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* قادر به حذف ۱۰۰ درصد دی‌بنزوتیوفن پس از ۷ روز انکوباسیون در یک انکوباتور شیکردار با دور rpm ۱۸۰ و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. در این مطالعه، غلظت‌های مختلف سورفکتانت توئین ۸۰ بر رشد و فعالیت این قارچ مشاهده شد که حضور سورفکتانت در محیط کشت موجب افزایش رشد و کاهش بیشتر غلظت دی‌بنزوتیوفن می‌شود به‌طوری که میزان مصرف دی‌بنزوتیوفن در غلظت ۰/۴ درصد از سورفکتانت نسبت به شاهد فاقد سورفکتانت ۳۰ درصد افزایش یافت. البته غلظت‌های بسیار بالای سورفکتانت توئین ۸۰ (غلظت ۱ میلی‌مولار) موجب کاهش رشد و مصرف دی‌بنزوتیوفن توسط قارچ یاد شده می‌شود.

بحث و نتیجه‌گیری: قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* مورد مطالعه در پژوهش حاضر از خاک آلوده به نفت جداسازی شده است که قادر به مصرف ترکیب سمی دی‌بنزوتیوفن به عنوان منبع گوگرد در حضور سایر منابع کربنی همانند گلوکز بوده است. بنابراین، سویه قارچی جداسازی شده می‌توانند کاندیدای مناسبی برای گوگردزدایی از نفت باشد و این نخستین گزارش از توانایی گوگردزدایی DBT در قارچ *اگزوفیالا* است. رشد و حذف دی‌بنزوتیوفن توسط قارچ یاد شده در حضور سورفکتانت توئین ۸۰ افزایش یافته است. پس به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که سورفکتانت افزایش انتقال دی‌بنزوتیوفن بین فاز آلی و آبی را به همراه دارد و قابل استفاده در سیستم پاکسازی زیستی دی‌بنزوتیوفن توسط بیوکاتالیست قارچی مورد مطالعه است.

واژه‌های کلیدی: پاکسازی زیستی، توئین ۸۰، دی‌بنزوتیوفن، قارچ

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

پس از غذا، سوخت مهم‌ترین منبع انرژی بشر است به‌طوری که ۸۵ درصد انرژی از سوخت‌های فسیلی، ۸ درصد از انرژی هسته‌ای و ۷ درصد از منابع دیگر که به‌طور کلی برق آبی و چوب است، تأمین می‌شود. زغال‌سنگ، نفت و گاز طبیعی سه سوخت اصلی هستند که نفت ۴۰ درصد، زغال سنگ حدود ۲۴ درصد و گاز طبیعی هم ۱۲ درصد از مصرف کل جهان را در بر می‌گیرند (۱). بر این اساس، نفت مهم‌ترین این سوخت‌هاست که به‌طور کلی از هیدروکربن تشکیل شده است که پس از کربن و هیدروژن، گوگرد سومین عنصر فراوان در آن است (۲).

استفاده از سوخت‌های فسیلی به عنوان منبع انرژی موجب آلودگی محیطی با ترکیباتی با منشا غیر زیستی شده است زیرا این سوخت‌های فسیلی محتوی گوگرد هستند که سوختن مستقیم آن‌ها موجب آزادسازی مقدار فراوانی از اکسید گوگرد به اتمسفر می‌شود (۳). اکسید گوگرد تولیدی مسؤول کیفیت بد هوا، باران اسیدی و کاهش لایه اوزون است (۴). علاوه بر این، اکسید گوگرد موجب به خطر افتادن سلامتی انسان می‌شود به گونه‌ای که مشکلاتی از قبیل: سرطان دستگاه تنفسی، بیماری‌های قلبی و تنفسی را به همراه خود دارد (۵).

روش رایج برای حذف گوگرد نفت در پالایشگاه‌ها در حال حاضر به شکل فیزیکی- شیمیایی[1] (HDS) است که در این روش اتم گوگرد در حضور گاز هیدروژن و کاتالیزور به سولفید هیدروژن احیا می‌شود و بسته به میزان گوگردزدایی و نوع هیدروکربن HDS در درجه حرارت ۲۰۰ تا ۴۲۵ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵۰ تا ۲۵۰ پوند بر اینچ مربع گاز هیدروژن انجام می‌شود (۶ و ۷)، اگرچه در فرآیند HDS ترکیبات گوگردی از قبیل: تیول، سولفید و دی‌سولفید به‌طور مؤثری حذف می‌شوند اما بسیاری از ترکیبات آروماتیک گوگرددار از قبیل: دی‌بنزوتیوفن[2] (DBT) به این فرآیند مقاوم هستند و پس از گوگردزدایی در نفت باقی می‌مانند (۸). بنابراین، به علت مقاومت بالای ترکیبات تیوفنی و ترکیبات هتروسیکلیک آروماتیک گوگرددار به HDS و همچنین، هزینه بالای آن برای ایجاد فشار و دمای زیاد، گوگرددزایی زیستی[3] (BDS) به عنوان یک روش مکمل و یا جایگزین فرآیند گوگردزدایی هیدروژنی استفاده شده است (۹).

امروزه پژوهش‌های بسیاری برای توسعه گوگردزدایی زیستی انجام شده است که در تمامی این پژوهش‌ها از DBT به عنوان ترکیب مدل استفاده شده است (۱۰).

تا به امروز چندین جنس که دارای فعالیت گوگردزدایی هستند گزارش شده است که بیشتر آن‌ها به جنس *رودوکوکوس* متعلق هستند که شاخص‌ترین آن‌ها *رودوکوکوس اریتروپولیس* سویه IGTS8 است (۱۱). از میان یوکاریوت‌ها هم قارچ *Cunninghamella elegans* قادر به گوگردزدایی DBT است. این قارچ DBT را به DBT-5-oxide و DBT-5-dioxide بدون تولید بی‌فنیل تبدیل می‌کند. علاوه بر این، قارچ *Paecylomyces* موجب اکسیداسیون اختصاصی DBT می‌شود و در نهایت، دی‌هیدروکسی‌بی‌فنیل تولید می‌شود (۱۲).

سورفکتانت‌ها ترکیباتی آمفی فیلیک (دارای هر دو ویژگی هیدروفوبیک و هیدروفیلیک) هستند که به علت داشتن ویژگی‌های برجسته و مطلوبی از قبیل: افزایش حلالیت، کاهش کشش سطحی و..... در صنعت استفاده می‌شوند. گزارش‌های محدودی در مورد کاربرد

سورفکتانت در گوگردزدایی توسط میکروارگانیسم‌ها وجود دارد (۱۳). مارزونا[۴] و همکارانش در سال ۱۹۹۷ دریافتند که اتصال DBT و بنزوتیوفن به سورفکتانت سیکلودکسترین حلالیت این ترکیبات را در آب افزایش می‌دهد (۱۴).

هدف از پژوهش حاضر، بررسی توانایی مصرف DBT در قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرای* جداسازی شده از خاک آلوده به نفت مناطق حفاری چاه در خوزستان و مطالعه اثر سورفکتانت توئین ۸۰ بر رشد و فعالیت مصرف DBT این قارچ است.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش ساخت کارخانجات سیگما و مرک برای کاربرد آزمایشگاهی است.

محیط کشت پایه معدنی[۵] BSM: این محیط کشت حاوی ۴ گرم Na_2HPO_4، ۴ گرم KH_2PO_4، ۲ گرم NH_4Cl، ۰/۲ گرم $MgCl_2.6H_2O$، ۰/۰۰۱ گرم $CaCl_2.2H_2O$، و ۰/۰۰۱ گرم $FeCl_3.6H_2O$، در یک لیتر آب دو بار تقطیر بوده است. گلوکز به میزان ۱ گرم در لیتر به آن اضافه و اسیدیته محیط با استفاده از HCl 6 نرمال بین ۶ تا ۶/۷ تنظیم شد (۱۵).

بررسی مصرف DBT: در این قسمت ابتدا قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* (با شماره دسترسی KC952672) در محیط BSM حاوی ۱ درصد گلوکز به عنوان منبع کربن و ۰/۳ میلی‌مولار از DBT حل شده در اتانول به عنوان منبع گوگرد کشت و در یک انکوباتور شیکردار با ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا زمانی که یک سوسپانسیون کنیدی با کدورت معادل ۰/۵ به‌دست آمد و سپس، ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۵۰ میلی‌لیتر از محیط کشت BSM حاوی ۱ درصد گلوکز و ۰/۳ میلی‌مولار DBT در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۱۴ روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر ۱۸۰ دور در دقیقه انجام شد. در زمان‌های صفر، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۴ روز برای بررسی مصرف و کاهش غلظت DBT از محیط کشت یاد شده نمونه‌برداری شد. به این شکل که ۳ میلی‌لیتر از محیط کشت به لوله آزمایش منتقل و اسیدیته آن با استفاده از اسید کلریدریک ۶ نرمال اسیدی شد و سپس، به میزان حجم مساوی به آن اتیل استات اضافه شد. در نهایت، جذب UV نمونه‌های استخراج شده در طول موج ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر به‌دست آمده، ماکزیمم جذب اختصاصی DBT در طول موج ۳۲۳ نانومتر تعیین شد و با استفاده از نمودار استاندارد غلظت DBT باقیمانده در محیط به‌دست آمد (۱۵ و ۱۶).

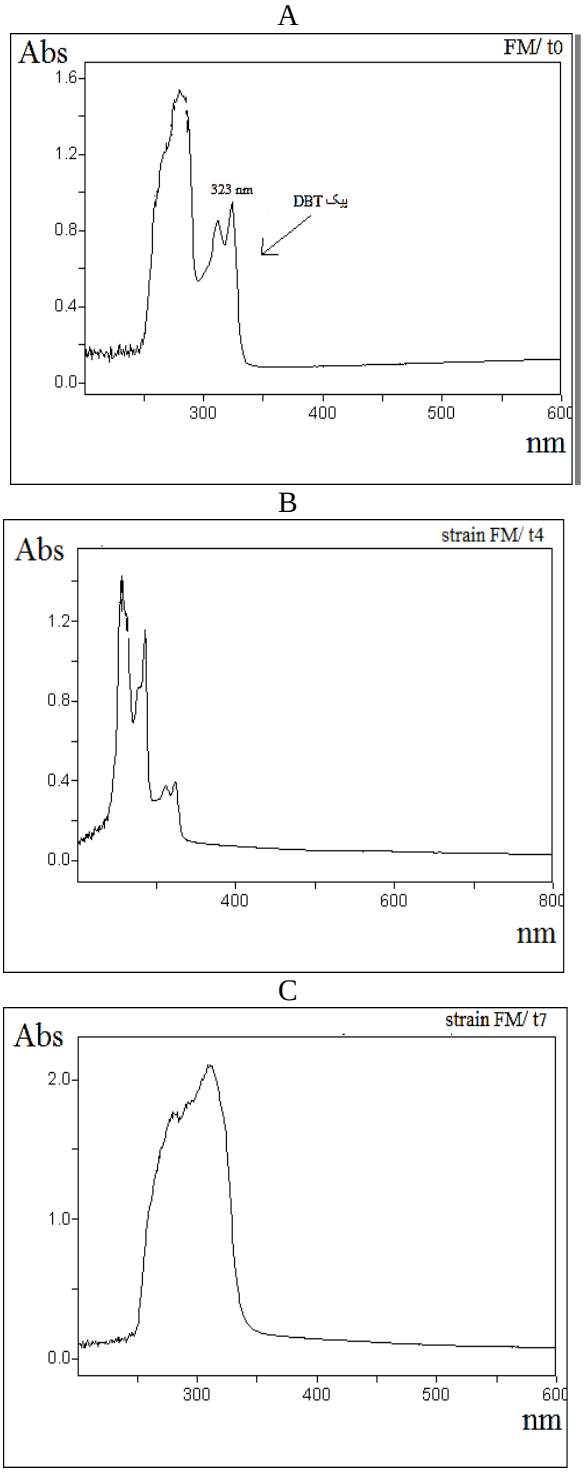
بررسی اثر سورفکتانت Tween80 بر رشد قارچ: غلظت‌های مختلف از سورفکتانت Tween80 به محیط BSM حاوی ۰/۳ میلی‌مولار DBT و ۱ درصد گلوکز افزوده و سپس، محیط در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. پس از سرد شدن محیط از سوسپانسیون کنیدی با کدورت معادل ۰/۵ به میزان ۱ میلی‌لیتر به تمامی ارلن‌ها اضافه شد. ارلن‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه و بررسی رشد پس از ۹۶ ساعت انجام شد. به این شکل که ۱ میلی‌لیتر از تمامی ارلن‌ها در زمان ۹۶ ساعت سانتریفیوژ، رسوب حاصل به مدت ۲۴ ساعت در داخل آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و در نهایت، وزن توده‌های سلولی محاسبه شد (۱۷ و ۲۷).

بررسی اثر سورفکتانت Tween80 بر مصرف DBT: برای انجام این بخش، از ارلن‌های حاوی غلظت‌های مختلف سورفکتانت پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون، به میزان سه میلی‌لیتر برداشت و به حجم مساوی به آن اتیل استات اضافه شد. سپس، به منظور جدا کردن فاز آلی سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام، پس از آن فاز آلی جدا و کاهش میزان DBT با دستگاه اسپکتروفتومتر UV در طول موج ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر بررسی شد (۱۷ و ۲۷). نمونه‌های شاهد شامل BSM حاوی DBT بدون قارچ و محیط BSM حاوی قارچ بدون سورفکتانت در کنار نمونه‌های آزمون استفاده شد.

تحلیل آماری نتایج: تمام آزمایش‌ها به شکل دو بار تکرار انجام شده و نتایج، میانگین تکرارهاست. معنادار بودن و نبودن تغییرات عامل‌های یاد شده بر رشد و فعالیت گوگردزدایی قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶,۰، روش One Way Anova و آزمون دانکن بررسی شد.

نتایج

بررسی مصرف DBT: قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرای* جداسازی شده از خاک آلوده به نفت (۱۷) قادر به رشد بر DBT به عنوان منبع گوگرد و حذف آن بود، به‌طوری که با بررسی جذب UV مربوط به DBT در طول موج ۳۲۳ نانومتر در زمان‌های مختلف مشاهده شد که پس از ۱۶۸ ساعت، جذب اختصاصی مربوط به DBT در طول موج ۳۲۳ نانومتر از بین رفته است. این امر بیانگر مصرف کامل این ترکیب سمی توسط قارچ یاد شده است. در شکل ۱ نتیجه بررسی حذف DBT توسط قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* نشان داده شده است.



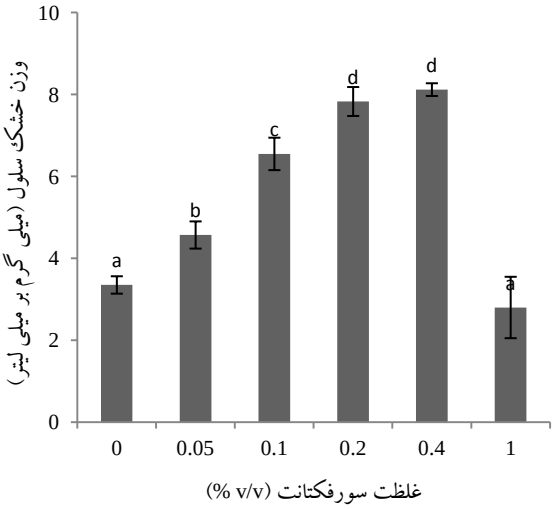
شکل ۱- طیف جذبی قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* در محیط BSM حاوی ۱درصد گلوکز و ۰/۳ میلی‌مولار DBT طی زمان‌های مختلف انکوباسیون با شیکر ۱۸۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد.

A: لحظه صفر، **B**: ۹۶ ساعت، **C**: ۱۶۸ ساعت.

همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرای* جداسازی شده، قادر به مصرف کامل DBT موجود در محیط کشت به عنوان تنها منبع گوگرد است، به‌طوری که با مقایسه شکل‌های A 1 و B 1 و C 1 مشاهده می‌شود که قارچ یاد شده پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۸۰ rpm قادر به مصرف ۶۷ درصد از DBT موجود در محیط کشت و پس از گذشت ۷ روز از انکوباسیون در شرایط یاد شده، موجب حذف کامل DBT در محیط کشت شد. به‌طوری که پیک مربوط به DBT در شکل C1 مشاهده نمی‌شود و این امر بیانگر مصرف کامل آن توسط قارچ جداسازی شده است.

اثر سورفکتانتTween80 بر رشد و گوگردزدایی: اثر سورفکتانت بر رشد قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* در شکل ۲ آورده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود میزان رشد قارچ بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر وزن خشک سلول (۱۸) (DCW mg/ml) طی ۴ روز انکوباسیون در حضور غلظت‌های مختلف سورفکتانت نسبت به شاهد که فاقد سورفکتانت می‌باشد، افزایش یافته است. به‌طوری که بیش‌ترین میزان رشد در حضور ۰/۴درصد سورفکتانت توئین ۸۰ است. اما میزان رشد در غلظت ۱ درصد از سورفکتانت نسبت به شاهد کمتر شده است. بنابراین، می‌توان استنباط کرد که افزایش بیش از حد سورفکتانت موجب کاهش رشد قارچ یاد شده می‌شود.

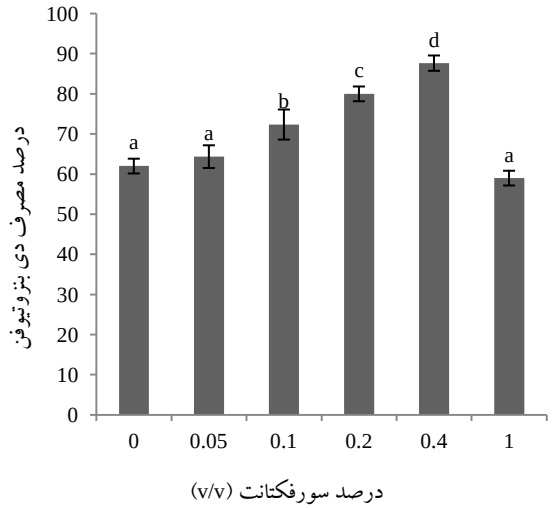
میزان رشد در حضور غلظت‌های مختلف سورفکتانت Tween80 نسبت به شاهد با تحلیل دانکن دارای تفاوت معناداری است (در سطح معنادار ۰/۰۵).



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف سورفکتانت Tween80 بر رشد قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* در محیط BSM حاوی ۱درصد گلوکز و ۰/۳ میلی‌مولار DBT طی ۴ روز انکوباسیون با شیکر ۱۸۰ rpm و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد. (مقادیر با حروف متفاوت نسبت به هم اختلاف معنادار ندارند ولی مقادیر با حروف متفاوت دارای اختلاف معناداری هستند به گونه‌ای که غلظت ۰/۲ و ۰/۴ دارای اختلاف معناداری نیستند. به این معنا که افزایش غلظت بیش از این بازه افزایش چشمگیری را در فعالیت قارچ یاد شده به همراه نخواهد داشت)

اثر سورفکتانت توئین ۸۰ بر مصرف DBT توسط قارچ جداسازی شده در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان کاهش غلظت DBT و مصرف آن توسط قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* در حضور سورفکتانت Tween80 نسبت به شاهد فاقد سورفکتانت بیشتر است. با به‌کارگیری تحلیل دانکن مشاهده شد که درصد حذف DBT در حضور غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد از سورفکتانت نسبت به شاهد دارای سطح معناداری هستند. اما غلظت ۱ درصد سورفکتانت توئین ۸۰ نسبت به شاهد فاقد سورفکتانت، معنادار نیست. بنابراین، می‌توان گفت وجود سورفکتانت در محیط موجب افزایش مصرف DBT می‌شود. اما غلظت‌های

بالای آن کاهش فعالیت قارچ را سبب می‌شود به‌طوری که میزان مصرف این ترکیب سمی در نبود سورفکتانت نسبت به غلظت‌های بسیار بالای آن بیشتر است.



شکل ۳- اثر غلظت‌های مختلف سورفکتانت Tween80 بر میزان مصرف DBT توسط قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* در محیط BSM حاوی ۱درصد گلوکز و ۰/۳ میلی‌مولار DBT طی ۴ روز انکوباسیون با شیکر rpm ۱۸۰و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

بحث و نتیجه‌گیری

پس از کربن و هیدروژن، گوگرد سومین عنصر فراوان در نفت است و بسته به منبع از ۰/۰۵ تا ۵ درصد نفت خام را شامل می‌شود. وجود ترکیبات گوگردی در نفت از نگرانی‌های بشر در دهه‌های اخیر بشمار می‌رود (۱۹)، زیرا احتراق ترکیبات گوگرددار در سوخت‌های فسیلی همراه با تولید اکسید گوگرد بوده که نقش مهمی در ریزش باران‌های اسیدی و آلودگی هوا دارد. اما حذف گوگرد نیاز به زمان زیاد و فرآیندهای طولانی دارد. این مسائل باعث جلب توجه به ترانسفورماسیون میکروبی ترکیبات گوگردی شده و گوگردزدایی میکروبی برای حذف گوگرد و دست‌یابی به سوخت‌هایی با مقدار پایین گوگرد استفاده شد (۲۰ و ۲۱). اما تاکنون بیش‌ترین مطالعات در این زمینه بر روی باکتری‌ها انجام شده است و پژوهش‌های کمتری در مورد قارچ‌ها یافت می‌شود، در حالی‌که قارچ‌ها از طریق سیتوکروم P-450 و آنزیم‌های خارج سلولی خود قادر به متابولیزه کردن طیف وسیعی از مواد شیمیایی و هیدروکربن‌ها هستند. از این آنزیم‌های خارج سلولی تولید شده توسط قارچ‌ها به علت دارا بودن ویژگی‌های گسترده‌ای از قبیل: توانایی اتصال به سوبستراهایی با وزن مولکولی بالا و امکان ایجاد تغییرات شیمیایی درآن‌ها برای افزایش تحمل و پایداری، می‌توان به عنوان کاتالیزورهای زیستی استفاده کرد (۲۲). علاوه بر این، قارچ‌ها به علت دارا بودن مزیت‌هایی از قبیل: قابلیت رشد در اسیدیته پایین و شرایط فقرغذایی (در صورتی که رشد باکتری دراین شرایط محدود می‌شود)، حمل ونقل آسان، دست‌کاری ژنتیکی راحت و تولید در مقیاس وسیع، می‌توانند کاندیدای مناسبی برای گوگردزدایی از نفت باشند (۲۳). همچنین، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* هم قادر به مصرف DBT به عنوان منبع گوگرد به شکل کومتابولیسم با سایر منابع کربنی همانند گلوکز است. این نخستین گزارش از توانایی گوگردزدایی DBT در قارچ *اگزوفیالا* است. فاسیون[۶] و همکارانش در سال ۱۹۹۱ به این نتیجه رسیدند که قارچ *Paecylomyces* بر روی DBT رشد کرده و طی مسیر اکسیداسیون اختصاصی گوگرد، DBT را به دی هیدروکسی بی فنیل تبدیل می‌کند (۲۴). بنابراین، از آنجا که ایران از جمله کشورهایی است که دارای بالاترین مقدار ترکیبات آلی گوگرددار در ذخایر نفتی خود است، استفاده از قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* با توانایی مصرف DBT می‌تواند در

پاکسازی زیستی این آلاینده بسیار راهگشا باشد.

حلالیت هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سیکلیک همانند DBT در محلول‌های آبی بسیار کم بوده و دسترسی زیستی این ترکیبات یک عامل محدود کننده برای حمله قارچی و میکروبی به آنهاست و به همین منظور اضافه کردن سورفکتانت‌هایی از قبیل: توئین ۸۰ موجب افزایش حلالیت و دسترسی زیستی این ترکیبات می‌شود (۱۳). به‌طوری که مشاهده شده است سرعت اکسیداسیون این ترکیبات توسط قارچ *Bjerkandera* sp. BOS55 در حضور سورفکتانت‌های مختلف ۲ تا ۵ برابر افزایش می‌یابد (۲۵). همچنین، فاسیون و همکاران در پژوهش خود بر روی گوگردزدایی توسط قارچ *Paecilomyces* sp. TLI برای پراکندگی یکنواخت DBT در فاز آبی و افزایش گوگردزدایی آن، سورفکتانت توئین ۸۰ را به‌کار بردند (۲۴).

در مطالعات انجام شده بر گوگردزدایی باکتریایی DBT، نتایج مشابهی مرتبط با به‌کارگیری سورفکتانت‌ها در افزایش دسترسی زیستی DBT و گوگردزدایی آن به‌دست آمده است که به مواردی از آن در ادامه مطالب اشاره می‌شود.

هو[۷] و همکاران اثر سورفکتانت‌ها را در افزایش گوگردزدایی بررسی کردند. آن‌ها توانستند ۷۲ درصد از گوگرد آلی نفت خام را طی ۷۲ ساعت با استفاده از توئین ۸۰ توسط *سودوموناس* دلافیلدی سویه R-8 حذف کنند (۲۶).

وانگ[۸] و همکاران از میان سورفکتانت‌های مورد بررسی خود شامل توئین ۸۰، سیکلودکسترین، تریتون X100 و بریج، بیش‌ترین توانایی حل کردن DBT را در توئین ۸۰ تشخیص داده و آن را به عنوان سورفکتانت مناسب انتخاب کردند. این سورفکتانت، رشد *کورینه باکتریوم* سویه ZD-1 را به علت افزایش جذب و تجزیه DBT توسط باکتری و تامین منبع گوگرد کافی برای رشد افزایش داده است (۲۷). اعتمادی‌فر[۹] و همکاران تاثیر توئین ۸۰ را بر افزایش ۲۷ درصدی گوگردزدایی از دی‌بنزوتیوفن توسط *رودوکوکوس اریتروپولیس* سویه R1 در غلظت ۱ گرم بر لیتر از سورفکتانت با افزایش قابلیت زیستی آن نشان دادند (۲۸).

در پژوهش حاضر نیز نتایج مشابهی با مطالعات قبلی به‌دست آمد به‌طوری که قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرای* جداسازی شده در حضور غلظت‌های مختلف توئین ۸۰ کشت داده شد و طبق نتایج به‌دست آمده مشاهده شد که رشد و گوگردزدایی قارچ یاد شده در حضور این سورفکتانت افزایش یافته است. همان‌طور که قبلا اشاره شد، سورفکتانت‌ها با افزایش حلالیت DBT در آب، انتقال DBT را بین دو فاز آلی و آبی تقویت، و قابلیت دسترسی آن‌را افزایش می‌دهند، اما به علت اثر متفاوتشان بر سویه‌های مختلف، به‌طور متفاوتی بر گوگردزدایی اثر می‌گذارند.

در پژوهش حاضر نشان داده شده که DBT به عنوان یکی از آلودگی‌های مقاوم در سوخت‌های فسیلی توسط قارچ *اگزوفیالا اسپینیفرا* جداسازی شده از خاک آلوده به نفت به شکل کومتابولیسم با سایر منابع کربنی قابل مصرف است و با به‌کارگیری سورفکتانت توئین ۸۰ می‌توان میزان فعالیت این قارچ را تا ۳۰ درصد افزایش داد. این نخستین گزارش از توانایی مصرف DBT در قارچ *اگزوفیالا* است. بنابراین، این قارچ می‌تواند کاندیدای مناسبی در گوگردزدایی از سوخت‌های فسیلی باشد.

References

(1) Gupta N., Roychoudhury PK., Deb JK. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Applied Environmental Microbiology* 2005; 66: 356-66.

(2) Baldi F., Pepi M., Fava F. Growth of *Rhodosporidium toruloides* Strain DBVPG 6662 on Dibenzothiophene Crystals and Orimulsion. *Applied Environmental Microb*iology 2003; 69 (8): 4689- 96.

(3) Monticello DJ. Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Current Opinion Microbiology* 2000; 11: 540- 6.

(4) Malik A., Dastidar MJ., Roychoudhury PK. Biodesulfurization of coal: mechanism and rate limiting factors. *Environmental Science Healthy* 2001; 36: 1113- 28.

(5) Schmidt M., Siebert W., Bangall KW. *The chemistry of sulphur., selenium., tellurium and polonium, Pergamon Text in Inorganic Chemistry*. 115, New York: Pergamon Press, Oxford; 1973.

(6) Prayuenyong P. Coal biodesulfurization process. *Science Technology* 2012; 24: 493-507.

(7) Soleimani M., Bassi M., Margaritis M. Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advanced* 2007; 25: 570- 96.

(8) Kilbane JJ. Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels. *Energy Biotechnology* 2006; 17: 305- 14.

(9) Ma CQ., Feng JH., Zeng YY., Cai., XF., Sung BP., Zhang ZB. Method for the preparation of a biodesulfurization biocatalyst using *Rhodococcus* sp. *Chemosphere* 2007; 65: 165- 9.

(10) Lin L., Hong L., Jianhua Q., Jinjuan X. Progress in the technology for desulfurization of crude oil. *China Petroleum Processing Petrochemical technology* 2010; 12 (4): 1- 6.

(11) Denome S.A., Olson ES., Young KD. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8. *Applied Environmental Microbiology* 1993; 59: 2837- 43.

(12) Etemadifar Z., Emtiazi G., Nahvi I. Microtitre plate assay for detection of growth, respiratory activityand biofilm formation in dibenzothiophene utilized strain of *Trichosporon*. *Iranian Journal of Biology* 2009; 21 (5): 891- 99.

(13) Miao- dong W., Wei L., Yao S., Da- hui W. Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium* sp. Zd-1 in the presence of organic phase. *Zheijang University Science* 2006; 7: 371- 75.

(14) Marzona M., Pessione E., Martino S.D., Giunta C. Benzothiophene and dibenzothiophene as the sole sulfur source in *Acinetobacter*: growth kinetics and oxidation products. *Fuel Process Technology* 1997; 52: 199- 205.

(15) Etemadifar Z., Emtiazi G., Peimanfar Sh. Removal of dibenzothiophene, biphenyl and phenol from waste by *Trichosporon* sp. *Scientific Research and Essay* 2006; 1 (3): 072- 6.

(16) Tanaka Y., Matsui T., Konishi J., Maruhashi K., Kurane R. Biodesulfurization of benzothiophene and dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus* strain. *Applied Microbiology Biotechnology* 2002; 59 (3): 325- 28.

(17) Elmi F. Isolation and molecular identification of dibenzothiophene desulfurize fungi. [Dissertation] Isfahan: Isfahan University; 2013.

(18) Rodriguez M.L.A., Ocana L.L., Coronado J.M.L., Rodriguez E., Martinez M.J., Larriba G., et al. Cork taint of wines: role of the filamentous fungi isolated from cork in the formation of 2,4,6- trichloroanisole by methylation of 2,4,6- trichlorophenol. *Applied Enviromental Microbiology* 2002; 68 (12): 5869- 9.

(19) Evance WC. Biochemistry of the bacterial catabolism of aromatic compounds in anaerobic enviroments. *Nature* 1997; 270: 17- 22.

(20) Stoner D.L., Wey JE., Barrett KB., Jolley JG., Wright RB., Dugan PR. Modification of water- soluble coal- derived products by Dibenzothiophene- Degrading Microorganisms. *Applied Environmental Microbiology* 1990; 56 (9): 2667- 76.

(21) Van Hamme JD., Singh A., Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003; 67: 503- 49.

(22) Bezalel L., Hadar Y., FU P., Fremman JP., Cerniglia CJ. Metabolism of Phenanthrene by the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Environmental Microbiology* 1996; 62 (7): 2547- 53.

(23) Csutak O., Stoica I., Ghindea I., Tanase AM., Vassu T. Insights on yeast bioremediation processes. *Biotechnology Letters* 2010; 15 (2): 1- 6.

(24) Faison BD., Clar TM., Lewis SN., Ma CY. Degradation of organic sulfur compounds by a coal- solubilizing fungus. *Applied Biochemical Biotechnology* 1991; 28: 237- 51.

(25) Pozdnyakova NN. Involvement of the lignolytic system of white-rot and litter-decomposing fungi in the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Research International* 2012; 1- 20.

(26) Hou Y., Kong Y., Yong J., Zhang J. Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilize cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1. *Fuel* 2005; 84 (14): 1975- 9.

(27) Wang M., Li W., Shi Y., Wang D., Feng H. Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium* sp. ZD-1 in the presence of organic phase. *Zhejiang University Science* 2006; 23 (7): 371- 5.

(28) Etemadifar Z., Cappello S., Zarkesh-Esfahani SH. Characteristics of dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus erythropolis* R1 and its Dsz-negative mutant. *Biological Journal of Microorganism* 2014; 2 (8): 1- 14.

---

[1]- Hydrodesulfurization (HDS)
[2]- Dibenzothiophene (DBT)
[3]- Biodesulfurization (BDS)
[4]- Marzona
[5]- Basal Salt Medium (BSM)
[6]- Fasion
[7]- Hou
[8]- Wang
[9]- Etemadifar

Effects of the surfactant Tween 80 on the growth and dibenzothiophene utilization by *Exophiala spinifera* isolated from oil- contaminated soil

Fatemeh Elmi
M.Sc. of Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, f.elmi2@sci.ui.ac.ir
Zahra Etemadifar *
Associate Professor of Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, z_etemadifar@yahoo.com
Giti Emtiazi
Professor of Microbiology, University of Isfahan, Isfahan, Iran, emtiazi@yahoo.com

Abstract

Introduction: Oil is one of the most important energy sources that contain variety of organosulfur compounds that are combustible and can produce sulfur dioxide which will cause pollution over the atmosphere and the soil. Dibenzothiophene (DBT) is often used as a model for biodesulfurization studies and surfactant Tween80 increases the solubility of DBT in water that leads to higher consumption by microorganisms.

Materials and methods: DBT specific UV spectrophotometry at a wavelength of 323 nm was used to evaluate the ability of isolated *Exophiala spinifera* fungus in removal of DBT. The effect of various concentrations of surfactant Tween80 on the growth of the fungus and DBT utilization was studied.

Results: *Exophiala spinifera* was able to remove 100% DBT after 7 days of incubation at 30 ° C and 180 rpm shaking. The effect of different concentrations of surfactant Tween80 on growth and DBT utilization by this fungus was examined and it was observed that the presence of surfactant in the culture medium increased the growth and removal of DBT, therefore the amount of DBT utilized with 0.4% concentration of the surfactant was about 30% more than that utilized without surfactant. However, higher concentrations of surfactant Tween80 decreased the growth and consumption of DBT by fungi.

Discussion and conclusion: *Exophiala spinifera* was isolated from oil contaminated soil and able to utilize toxic compound DBT as a sulfur source in the presence of other carbon sources such as glucose. So this isolated strain could be a good candidate for the petroleum desulfurization and it is the first report about desulfurization of DBT by fungus *Exophiala spinifera*. Growth and removal of DBT by fungus increased in the presence of surfactant Tween80. It can be concluded that the surfactant increases the total DBT transfer between the organic and aqueous phases and has a potential application in DBT bioremediation system by the studied fungus biocatalyst.

Key words: Bioremediation, Dibenzothiophene, Fungus, Tween80

* Corresponding author
Received: July 6, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014