Introduction of halotolerant *Mucor circinelloides* UTMC 5032 for bioremediation crude oil hydrocarbons

Rezvan Heidarytabar
M.Sc. of Microbial Biotechnology, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, rezvan_heidary@ut.ac.ir
Ehsan Azin
M.Sc. student in Microbial Biotechnology, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, ehsanazin@ut.ac.ir
Hamid Moghimi *
Assistant professor in Microbiology, Department of Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Biodegradation of hydrocarbons in the saline environment is diminished due to the reduced solubility of hydrocarbons and oxygen and lower microbial diversity because of inhibitory effect of salt.

Materials and methods: In this research, fungi isolation was carried out from salty oil contaminated soil from different parts of Iran. Then, the ability of crude oil degradation was measured for each isolate in the presence of 50 g/l NaCl by total petroleum hydrocarbon (TPH) assay. The salt tolerance and crude oil degradation capacity of the selected isolate was evaluated in medium containing different salt concentration by analysis of TPH, FTIR and dried cell weight assay. Finally, the selected isolate was studied for biosurfactant production and identified using morphological and molecular approach.

Results: In this study, 15 different halotolerant fungal species were isolated. TPH assay in medium containing crude oil (1%) and salt (50 g/l) showed that the isolate S-05 with 60 % oil removal was the best strain. FTIR analysis revealed that 90% of aliphatic compounds were removed when treated with S-05. Biosurfactant production assay indicated that this strain can produce surface active compounds in presence and absence of salt. Molecular identification confirmed that the S-05 belongs to *Mucor circinelloides* with 100% similarity.

Discussion and conclusion: Our results indicate that *M. circinelloides* UTMC 5032 is potent fungus for bioremediation in saline oil contaminated soils.

Key words: Bioremediation, Saline soils, Halotolerant fungi, *Mucor circinelloides* UTMC 5032

* Corresponding author
Received: April 28, 2015/ **Accepted:** December 30, 2015

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۴۵-۳۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۲/۰۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

معرفی قارچ تحمل‌کنندهٔ نمک *Mucor circinelloides* UTMC 5032 به‌منظور حذف ترکیبات هیدروکربنی نفت خام

رضوان حیدری تبار: کارشناس ارشد زیست فناوری میکروبی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران ، rezvan_heidary@ut.ac.ir
احسان آذین: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست فناوری میکروبی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، ehsanazin@ut.ac.ir
حمید مقیمی*: استادیار میکروبیولوژی، بخش زیست فناوری میکروبی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: کاهش حلالیت هیدروکربن‌ها و اکسیژن در آب شور و همچنین کاهش تنوع میکروبی به‌سبب آثار بازدارندهٔ نمک، باعث ماندگاری ترکیبات هیدروکربنی در محیط‌های شور می‌شود و پاکسازی زیستی این محیط‌ها با چالش زیادی همراه است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت خام از خاک‌های مناطق شور آلوده به نفت ایران، انجام شد. در ادامه توانمندی هریک از جدایه‌ها ازنظر میزان حذف نفت خام در حضور ۵۰ گرم‌برلیتر نمک طعام با روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی(TPH) اندازه‌گیری شد. همچنین میزان تحمل‌پذیری به نمک و میزان حذف نفت در حضور غلظت‌های مختلف نمکی با استفاده از سنجش‌های TPH، FTIR و اندازه‌گیری وزن خشک و نیز توانایی تولید بیوسورفاکتانت جدایهٔ منتخب ارزیابی شد. درنهایت برترین جدایه با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی گردید.

نتایج: در مرحلهٔ جداسازی، ۱۵گونهٔ قارچی به دست آمد. آزمون TPH در حضور نفت و نمک در این جدایه‌ها نشان داد که جدایهٔ S-05 با حدود ۶۰درصد حذف، بیشترین میزان حذف نفت در حضور ۵۰ گرم‌برلیتر نمک، توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن‌های نفتی است. آنالیز FTIR حذف ۹۰درصد ترکیبات آلیفاتیک را نشان داد. سنجش تولید بیوسورفاکتانت نیز نشان داد که این جدایه به‌طور کارآمدی در محیط نمکی و بدون نمک مولد ترکیبات فعال سطحی است. نتایج حاصل از شناسایی نشان داد که S-05 متعلق به گونهٔ *Mucor circinelloides* است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که جدایهٔ تحمل‌کنندهٔ نمک *M. circinelloides* UTMC 5032 برای اولین بار به‌عنوان قارچی توانمند در جهت حذف زیستی خاک‌های شور آلوده به نفت گزارش شده است.

واژه‌های کلیدی: پاک‌سازی زیستی، خاک‌های شور، قارچ تحمل‌کنندهٔ نمک، *Mucor circinelloides* UTMC 5032

---

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2017, 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

فراورده‌های نفتی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن امروز محسوب می‌شوند. محصولات مشتق از نفت خام، منبع اصلی انرژی مورداستفاده در صنعت و زندگی روزمرهٔ بشر هستند (۱). روزانه مقادیر زیادی نفت و فراورده‌های نفتی، در حجم زیاد و از راه‌های مختلف به محیط‌زیست وارد می‌شود که آثار منفی و طولانی‌مدتی را بر منابع طبیعی و زندگی موجودات زنده به دنبال دارد (۲). این آلودگی‌ها تهدید بزرگی برای حیات موجودات زنده و هم‌چنین سلامت انسان‌ها است. وجود این آلاینده‌ها تعادل اکولوژیکی را بر هم می‌زند که این عدمِ‌تعادل ممکن است تا سال‌ها در محیط باقی بماند (۳). در این میان توجه به این نکته بسیار ضروری است که منشأ بسیاری از مخازن نفتی، محیط‌هایی با شوری بالا است. به عبارت دیگر، نفت خام به‌طور معمول با آب شور همراه است و معمولاً در مجاورت با محیط‌های آبی با شوری بالا و تبخیر زیاد یافت می‌شود. با توجه به فعالیت‌های صنعت نفت مانند حفاری، انتقال و پالایش نفت در این‌گونه مناطق، همواره احتمال آلودگی مناطق شور با آلاینده‌های نفتی اجتناب‌ناپذیر است (۴). علاوه بر این، پساب خروجی بسیاری از تأسیسات نفتی دارای درصد بالایی نمک محلول است و همچنین آب خروجی از چاه‌ها معمولاً بیش از ۱۰درصد و گاه در حد اشباع دارای نمک است که پس از جداسازی نفت از آن، میزان قابل‌توجهی ترکیبات آروماتیک در آن به جا می‌ماند. رهاسازی این پساب در محیط علاوه بر آلودگی هیدروکربنی، سبب افزایش شوری محیط می‌شود (۵). بنابراین لازم است قبل از رهاسازی این پساب در محیط، بازیافت و تصفیه‌سازی انجام گیرد. تصفیهٔ این‌گونه پساب‌ها با روش‌های متداول بسیار دشوار و گاه غیرممکن بوده و نیازمند توسعهٔ روش‌های پاک‌سازی با قابلیت کاربرد در محیط‌های شور است (۵ و ۶). یکی از روش‌های اصلی در جهت حذف آلودگی‌های نفتی استفاده از توان میکروارگانیسم‌های زنده یا دراصطلاح پاک‌سازی زیستی[1] است (۷). روش پاک‌سازی زیستی که به‌طور معمول شامل تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیرسمی با استفاده از فعالیت میکروارگانیسم‌ها است، فرایند بسیار امیدوارکننده‌ای برای تیمار آلودگی‌های نفتی به شمار می‌رود (۷ و ۸)؛ اما در این راستا، در پاک‌سازی زیستی محیط‌های آلوده به نفت مناطق شور بسیاری از انواع میکروارگانیسم‌ها توانایی تحمل تنش شوری و سمیت نفت را ندارند و پاک‌سازی زیستی به‌کندی صورت می‌گیرد. درواقع با توجه به کاهش حلالیت هیدروکربن‌ها و اکسیژن در آب شور و کاهش تنوع میکروبی به‌سبب آثار بازدارندهٔ نمک، ترکیبات هیدروکربنی در محیط‌های شور، ماندگاری بالایی دارد و پاک‌سازی این‌گونه مکان‌های آلوده با روش‌های زیستی متداول مقدور نیست و نیازمند استفاده از میکروارگانیسم‌های با توان تحمل‌کنندگی نمک است. این امر سبب شده که زیست‌پالایی آلاینده‌های نفتی در محیط‌های شور به‌سختی انجام گیرد که تاکنون کمتر به آن پرداخته شده است (۹ و ۱۰). علاوه بر این، تاکنون محدودهٔ پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه بر باکتری‌ها تمرکز داشته؛ حال آنکه پاک‌سازی زیستی این محیط‌ها با استفاده از قارچ‌ها به‌علت وجود توانمندی‌های خاص موجود در این میکروارگانیسم‌ها و نیز برتری آنها در برخی موارد نسبت به باکتری‌ها در پژوهش‌های مختلف تا حدودی نادیده گرفته شده است؛ در این راستا، می‌توان به قارچ‌ها اشاره کرد که در برخی

از شرایط محیطی سخت مثل فشار اسمزی بالا و یا خشکی و یا pH پایین نسبت به باکتری‌ها مقاومت و فعالیت بیشتری دارند؛ علاوه بر این، گزارش‌های متعددی دربارهٔ برخی از قارچ‌ها منتشر شده است که نشان می‌دهد که این قارچ‌ها، میکروارگانیسم‌های توانمندی در تجزیهٔ ترکیبات هیدروکربنی هستند که علت این توانمندی بالا ترشح آنزیم‌های خارج سلولی از قبیل لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز است (۱۱). بنابراین هدف از انجام این پژوهش در گام نخست غربالگری جدایه‌های قارچی توانمند در تحمل نمک از مناطق شور آلوده به آلاینده‌های نفتی و دستیابی به جدایهٔ قارچی بومی توانمند در تولید ترکیبات فعال زیستی و حذف ترکیبات نفتی است که برای این منظور بعد از جداسازی و غربالگری جدایه‌های قارچی، با استفاده از روش‌های استاندارد تولید ترکیبات سورفکتانتی و حذف آلاینده‌های نفتی در حضور نمک برای بهترین ایزولهٔ قارچی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: نمونه‌های خاک از ۴ منطقهٔ آلوده به نفت شامل قم، پوند ۳ پالایشگاه نفت تهران، منطقهٔ نفتی مارون و جزیرهٔ سیری جمع‌آوری و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه با الک ۰/۵ میلی‌متر همگن شد و ذرات درشت آن جداسازی شد. در ادامه اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک‌ها به‌منظور بررسی شوری خاک اندازه‌گیری و جهت جداسازی قارچ‌ها استفاده شد (۱۲).

جداسازی قارچ‌های تخریب‌کنندهٔ ترکیبات نفتی: جدایه‌های قارچی موجود در نمونه‌های خاک با استفاده از دو روش غنی‌سازی[۲] و کشت در پلیت[۳] جداسازی و خالص‌سازی شد. برای این منظور در روش غنی‌سازی، جهت فعال‌کردن و سازگاری جمعیت‌های قارچی تخریب‌کنندهٔ ترکیبات نفتی خاک، از محیط تغییریافتهٔ پایهٔ نمکی[۴] همراه با یک‌درصد نفت خام سبک جزیرهٔ سیری به‌عنوان منبع کربن و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلرامفنیکل به‌منظور مهار رشد باکتریایی و ۵۰ گرم‌برلیتر نمک استفاده شد (۱۳). ترکیبات این محیط کشت شامل(گرم‌برلیتر): $NaNO_3$ (۲)، $CaCl_2.2H_2O$ (۰/۱)، KH_2PO_4 (۳)، $MgSO_4$ (۰/۲)، $FeSO_4.7H_2O$ (۰/۰۱)، $Na_2HPO_4.12H_2O$ (۳)، KCl (۱) و عصارهٔ مخمر (۰/۰۲) در یک لیتر آب مقطر دیونیزه، همراه با ۲ میلی‌لیتر محلول عناصر جزئی شامل **(گرم‌برلیتر):** $FeCl_3.6H_2O$ (۰/۰۸)، $ZnSO_4.H_2O$ (۰/۷۵)، $CoCl_2.6H_2O$ (۰/۰۸)، $CuSO_4.5H_2O$ (۰/۰۷۵)، $MnSO_4.H_2O$ (۰/۷۵)، $NaMoO_4.2H_2O$ (۰/۰۵)، H_3BO_3 (۰/۱۵) بود. pH اولیه پیش از اتوکلاو ۶/۸±۰/۲ تنظیم شد (۱۴). ارلن‌های غنی‌سازی از نمونه‌های خاک همگن‌شده به‌مدت سه هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و ۱۸۰ دور بر دقیقه گرماگذاری شد. بعد از این مدت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط غنی‌شده بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار[۵] و سابرودکستروز آگار[۶] دارای کلرامفنیکل و ۱درصد نفت خام و ۵۰ گرم‌برلیتر نمک پخش و به‌مدت دو هفته در انکوباتور گرماگذاری گشت. پس از این مدت جدایه‌های قارچی حاصله بر روی محیط کشت PDA خالص‌سازی شد. علاوه بر روش ذکرشده از روش کشت گسترده در پلیت نیز برای جداسازی قارچ‌های نفت‌خوار استفاده شد. برای این منظور ابتدا از نمونه‌های خاک، رقت‌های 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه و سپس رقت‌های حاصله به‌مدت ۱۵ دقیقه با

استفاده از همزن مخلوط و سپس سونیکاسیون نمونه‌ها توسط دستگاه اولتراسونیک[۷] انجام شد. درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از رقت‌ها بر روی محیط‌های PDA و SDA دارای ۵۰ میکروگرم‌برمیلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک همراه با ۱درصد نفت خام و ۵۰ گرم‌برلیتر نمک پخش شد. برای هریک از نمونه‌های خاک در ۳ تکرار این عمل انجام شد. در ادامه برای رشد قارچ‌ها، پلیت‌های کشت داده شده در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد به‌مدت دو هفته در انکوباتور گرماگذاری شد (۱۵).

سنجش میزان حذف نفت: جهت تعیین توانمندی جدایه‌های حاصله در حذف نفت خام در حضور ۵۰ گرم‌برلیتر نمک، هریک از جدایه‌ها با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی براساس روش رحمان[۸] و همکاران از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر ارزیابی شد و جدایهٔ برگزیده حاصل از این مرحله برای ادامهٔ آزمایش‌ها استفاده شد. برای این منظور، به ارلن‌ها هم‌حجم با محیط کشت، حلال تلوئن به منظور استخراج هیدروکربن‌های نفتی از محیط کشت و ورود به فاز آلی اضافه شد. برای جداسازی و تفکیک بهتر فاز آبی از آلی، مخلوط فوق برای مدت ۵ دقیقه با استفاده از ورتکس به‌خوبی همزده و به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شود. در مرحلهٔ بعدی فاز آلی حاوی هیدروکربن‌های نفتی جدا شد و میزان جذب با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گشت. نهایتاً برای تعیین میزان حذف نفت، جذب نمونه‌های تیمار با نمونهٔ کنترل مقایسه شد و میزان حذف گزارش گردید (۱۶ و ۱۷).

تعیین بازده میزان تحمل‌پذیری نمک و میزان حذف: جدایهٔ برتر ازنظر میزان تحمل‌پذیری نمک در غلظت‌های متفاوت نمکی شامل صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم‌برلیتر نمک طعام در محیط کشت PDB در طی مدت یک هفته ارزیابی شد؛ در این راستا، اندازه‌گیری وزن خشک زیست‌توده به‌عنوان معیار تحمل‌پذیری نمک و رشد جدایه‌های قارچی استفاده شد. زیست‌تودهٔ قارچی حاصله، از محیط با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ جدا شد و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد خشک گردید. سپس وزن خشک به‌دست‌آمده براساس گرم‌درلیتر گزارش شد (۱۸). با توجه به بهینهٔ شرایط رشد قارچ منتخب در حضور نمک، جدایهٔ قارچی در غلظت‌های متفاوت نمک همراه با ۱درصد نفت خام در محیط پایهٔ نمکی کشت شد و میزان حذف نفت و بیومس تولیدی سنجش شد.

سنجش میزان حذف نفت با استفاده از طیف‌سنجی FT-IR: با توجه به اینکه گروه‌های هیدروکربنی در cm^{-1} ۲۹۳۰ و cm^{-1} ۲۹۶۰ دارای جذب هستند، میزان حذف نفت توسط طیف‌سنجی FT-IR بررسی و اندازه‌گیری دقیق شد (۱۸)؛ برای این منظور جدایه‌های قارچی برگزیده در محیط کشت پایهٔ نمکی همراه با ۱درصد نفت خام و غلظت بهینهٔ ۲۵گرم‌برلیتر نمک کشت شد و در انتهای روز پانزدهم محتوای هیدروکربنی باقیمانده در محیط کشت با استفاده از حلال تتراکلریدکربن استخراج شد. در این روش هم‌حجم محیط، از حلال تتراکلرید کربن به فلاسک افزوده شد و محتوای فلاسک به‌مدت ۵ دقیقه ورتکس شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مرحلهٔ بعدی فاز آلی حاوی هیدروکربن‌های نفتی جدا شد و در نهایت با استفاده از سل مایع، طیف‌سنجی FT-IR انجام شد. درنهایت میزان حذف نفت با توجه به نمونهٔ شاهد تعیین شد (۱۷).

ارزیابی تولید بیوسورفاکتانت در حضور نمک: به‌منظور تشخیص تولید بیوسورفاکتانت و اثر آن در حذف نفت، در حضور ۲۵ گرم‌برلیتر نمک و بدون نمک، جدایهٔ منتخب در محیط پایهٔ نمکی دارای روغن آفتابگردان با غلظت ۵درصد کشت داده شد و محلول رویی کشت قارچی در طی مدت ۱۲ روز با استفاده از روش‌های گسترش روغن و تنسیومتری حلقه دونوی[۹] ارزیابی شد. این روش براساس اندازه‌گیری نیروی لازم برای جداکردن یک حلقهٔ سیمی از سطح یا بین دو سطح است که این نیروی جداسازی متناسب با کشش بین سطحی است و می‌توان آن را با یک تنسیومتر اتوماتیک اندازه‌گیری کرد. در هربار اندازه‌گیری کشش سطحی آب مقطر و محیط کشت فاقد تلقیح نیز به‌عنوان شاهد سنجیده شد (۵).

شناسایی جدایهٔ قارچی: برای شناسایی جدایه‌های قارچی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی آنها از قبیل شکل میسلیوم، آرایش اسپورها، آرایش و رنگ کلنی و پیگمان‌های تولیدی، ازطریق رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو و تهیهٔ اسلاید کالچر و نیز با توجه به کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی بررسی شد (۱۹). به‌منظور شناسایی مولکولی ابتدا جدایهٔ منتخب در محیط PDB به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس میسلیوم‌های قارچ با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. در ادامه ازطریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست‌توده منجمد شد و با استفاده از ازت مایع، سلول‌ها شکسته شد و DNA آن به‌روش استخراج با فنل-کلروفرم جداسازی شد (۲۰). در این روش ابتدا عصارهٔ سلولی به‌دست‌آمده در میکروفیوژ با دور ۸۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس روشناور جداشده که حاوی مولکول‌های DNA است، به یک ویال استریل منتقل شد. در این مرحله هم‌حجم روشناور، از مخلوط فنل-کلروفرم (به نسبت ۱:۱) به ویال افزوده شد. سپس ویال به‌مدت دو دقیقه تکان داده شد تا محتویات آن با هم مخلوط شود. در ادامه ویال در میکروفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و پس از این مدت‌زمان به‌آرامی ویال از درون دستگاه خارج شد تا فازها با هم مخلوط نشوند و فاز رویی درون یک ویال استریل دیگر ریخته شد. در ادامه حجم تقریبی محتوای ویال تعیین شد و به‌میزان ۰/۱ آن محلول سدیم‌استات ۳ مولار با pH برابر ۵ و ۳ برابر حجم تعیین شد و اتانول مطلق سرد افزوده شد. سپس ویال به مدت ۳۰ دقیقه به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شد. در ادامه فاز رویی با دور rpm ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه جدا و دور ریخته شد و ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰درصد به رسوب DNA افزوده شد و مجدداً با دور ۱۳۰۰۰ rpm به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و فاز رویی موجود در ویال دور ریخته شد. درنهایت رسوب حاصل در ۱۵ تا ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. PCR توالی ناحیهٔ فاصله‌انداز رونویسی‌شوندهٔ داخلی[۱۰] با پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1: 5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′ و ITS4: 5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) انجام شد. جهت اضافه‌کردن مواد به‌منظور انجام واکنش PCR، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به‌همراه ۱ میکرولیتر از DNA قارچی با غلظت ۴۰ نانوگرم به ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط آمادهٔ شرکت آمپلیکون دانمارک[۱۱] اضافه شد و حجم نهایی ویال با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. برنامهٔ PCR به شکل ۵ دقیقه در دمای ۹۴

درجه سانتیگراد تقلیب اولیه انجام شد و در ادامه ۳۰ سیکل دمایی به شکل ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. درنهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد ویال گرمادهی شدند (جدول ۱ و ۲). محصول به‌دست‌آمده بعد از خالص‌سازی از روی ژل جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج تعیین ترادف در بانک ژنی و ازطریق هم‌ردیفی توالی ارزیابی شد (۲۰).

نتایج

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کنندهٔ نفت: در این مطالعه از ۴ منطقهٔ آلوده به نفت نمونه‌برداری انجام و میزان شوری و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. pH تمام نمونه‌ها خنثی و براساس نتایج هدایت‌سنجی الکتریکی، بیشترین شوری به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های خاک پوند پالایشگاه تهران و مارون بود و منطقهٔ سیری و قم شوری متوسطی داشتند (جدول ۳). در ادامه با کشت نمونه‌های موردنظر با استفاده از دو تکنیک غنی‌سازی و گسترده در حضور نمک، ۱۵ جدایهٔ قارچی مختلف با ویژگی‌های ریخت‌شناسی متفاوت جداسازی شد.

جدول ۱- برنامهٔ دمایی PCR برای تکثیر ژن ITS

تکرار	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتیگراد)	مراحل واکنش
۱	۵	۹۴	واسرشت‌شدن اولیه
۳۰	۰/۵	۹۴	واسرشت‌شدن
۳۰	۰/۵	۵۷	اتصال پرایمر
۳۰	۱	۷۲	پلیمریزاسیون
۱	۵	۷۲	پلیمریزاسیون نهایی

جدول ۲- مواد استفاده‌شده در واکنش زنجیره پلیمراز

حجم (میکرولیتر)	اجزای واکنش PCR
متغیر وابسته به DNA استخراجی	آب مقطر استریل
۱	پرایمر رفت[۱۲]
۱	پرایمر برگشت[۱۳]
متغیر	DNA استخراج‌شده
۱۲/۵	Master mix
۲۵	حجم کل

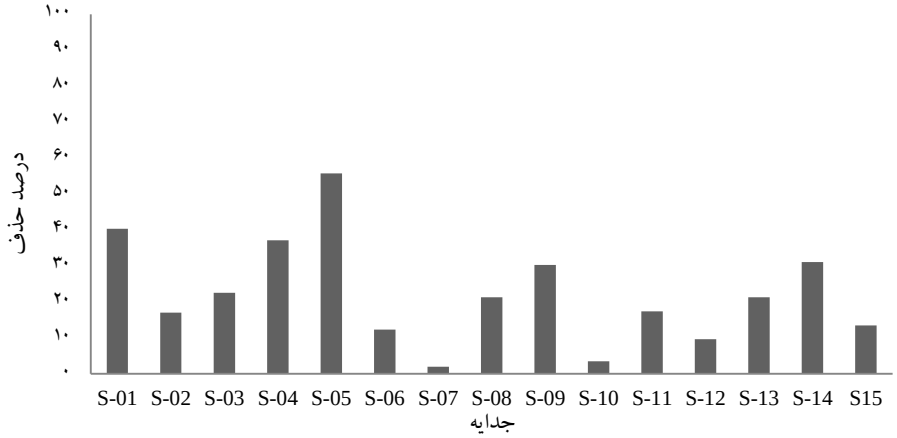
جدول ۳- محل نمونه‌برداری و ویژگی‌های هریک از نمونه‌های آلوده به نفت جمع‌آوری‌شده

محل نمونه‌برداری	موقعیت (ثانیه-دقیقه-درجه)	علت آلودگی	EC (ds/m)	pH
قم	N: ۳۴ ۴۴ ۴۳/۵ E: ۵۰ ۵۳ ۴۳/۶	چشمهٔ طبیعی نفت	۷/۹	۷/۶۲
سیری	N: ۲۵ ۵۴ ۵۱ E : ۵۴ ۳۱ ۳۸	پایانهٔ اصلی صادرات نفت کشور	۵/۸	۷/۳
پوند ۳ پالایشگاه تهران	N : ۳۵ ۳۱ ۱۲,۷ E : ۵۱ ۲۴ ۵۶,۶	حوضچهٔ تبخیر پساب‌های پالایشگاه نفت	۹/۶	۷/۵۱
مارون	N : ۳۰ ۵۱ ۱۳ E : ۴۹ ۵۰ ۱۹	میدان نفتی در اهواز	۱۰	۷/۹

سنجش میزان حذف نفت و رشد در جدایه‌ها: پس از خالص‌سازی، توانایی هریک از جدایه‌ها در حذف نفت و تولید زیست‌توده در محیط کشت پایهٔ نمکی دارای ۱درصد نفت خام و ۵۰گرم‌برلیتر نمک طی مدت ۱۵روز بررسی شد (شکل ۱).

در این میان جدایهٔ S-05 جداسازی‌شده از خاک آلوده به نفت منطقهٔ مارون با بیش از ۵۵درصد حذف نفت خام در غلظت ۵۰ گرم‌برلیتر نمک به‌عنوان توانمندترین جدایه در حذف نفت خام انتخاب شد (شکل ۲).

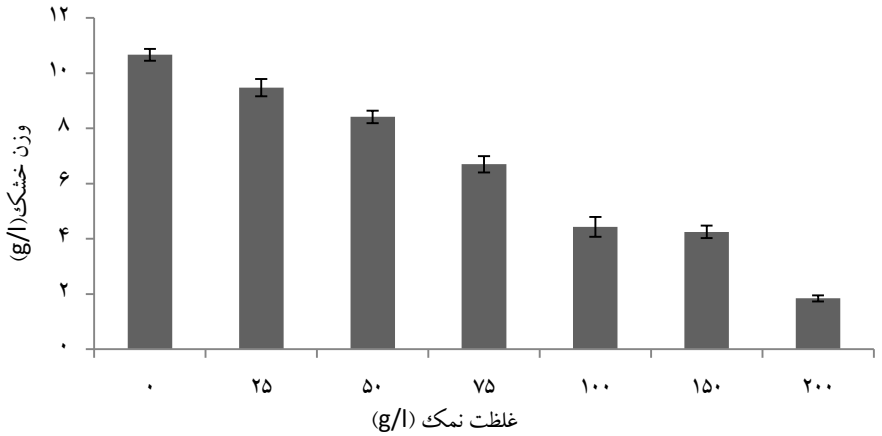
شکل ۱- توانایی حذف نفت خام جدایهٔ S-05 در محیط کشت پایهٔ نمکی در مقایسه با نمونهٔ شاهد



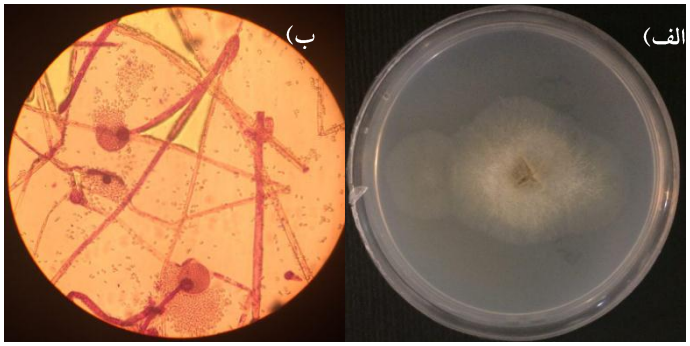
شکل ۲- درصد حذف نفت خام توسط جدایه‌های قارچی در محیط کشت پایهٔ نمکی دارای ۱درصد نفت همراه با غلظت ۵۰ گرم‌برلیتر نمک بعد از ۱۵ روز

در ادامه، بررسی میزان تحمل‌پذیری نمک در این سویه در حضور غلظت‌های متفاوت نمک شامل صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم‌برلیتر در محیط کشت PDB سنجش شد. نتایج گویای آن بود که با افزایش غلظت نمک میزان رشد قارچی نیز کاهش می‌یابد؛ با این حال، قارچ موردنظر تا غلظت ۷۵ گرم‌برلیتر نمک کلرید سدیم رشد مناسبی را نشان داده و تا غلظت ۱۵۰ گرم‌برلیتر همچنان قادر به تولید زیست‌توده و تحمل نمک است (شکل ۳).

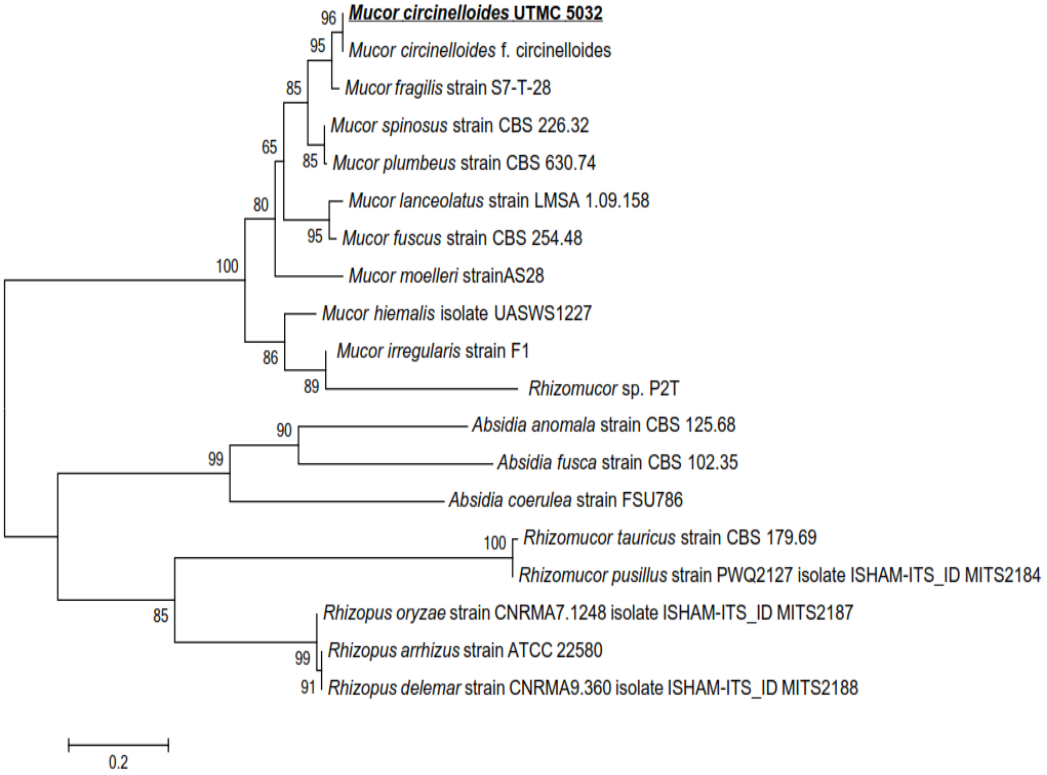
شناسایی سویهٔ منتخب: نتیجهٔ انجام آزمایش‌های ریخت‌شناسی و نیز مولکولی لازم برای شناسایی جدایهٔ S-05 از PCR و تعیین ترادف ژن ITS و مقایسهٔ توالی به‌دست‌آمده در بانک ژنی نشان داد که جدایهٔ S-05 با میزان شباهت ۹۹درصد متعلق به *Mucor circinelloides* است. این جدایه در بانک ژنی با کد دستیابی KR263057 ثبت شد و با کد *M. circinelloides* UTMC 5032 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت و نگهداری شد. تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه S-05 در شکل ۴ مشاهده می شود (شکل۴). رسم درخت فیلوژنی این جدایه نشان داد که این سویه بیشترین نزدیکی را به *M. circinelloides* f. circinelloides دارد (شکل ۵).



شکل ۳- میزان تحمل‌پذیری نمک وتولید بیومس خشک در غلظت‌های مختلف نمک توسط جدایهٔ S-05

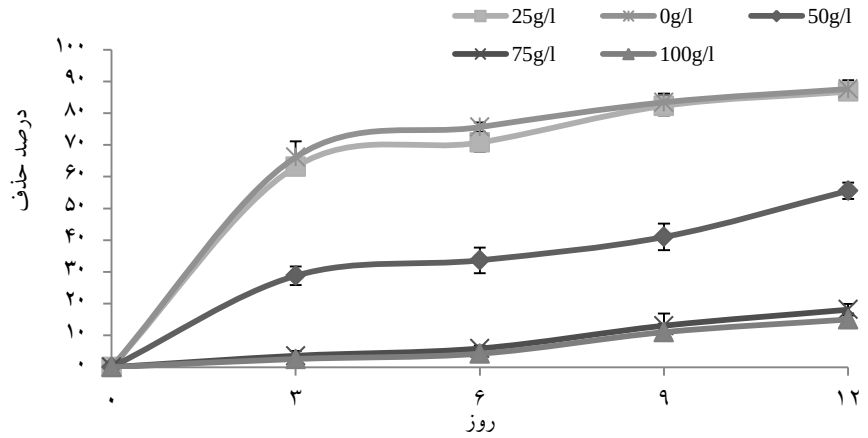


شکل۴- الف) مورفولوژی کلنی، ب) شمای میکروسکوپی *M. circinelloides* UTMC 5032



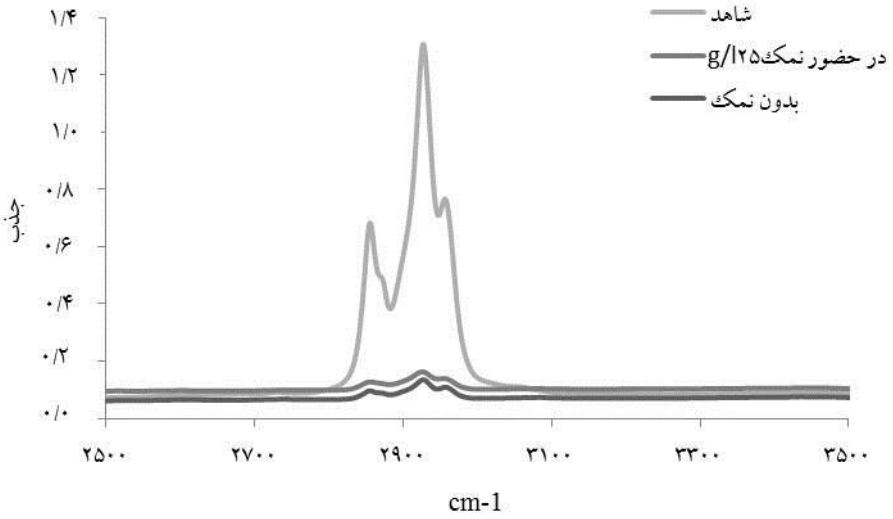
شکل ۵- درخت فیلوژنی *Mucor circinelloides* UTMC ۵۰۳۲ با استفاده از پرایمرهای ITS، با الگوریتم اتصال- همسایگی برای هم‌ردیفی و تعیین فاصلهٔ توالی‌ها و نیز نرم‌افزارهای مگا ۵ نشان می‌دهد

بررسی میزان حذف نفت در حضور غلظت‌های مختلف نمک: میزان حذف نفت خام توسط سویهٔ منتخب در حضور غلظت‌های متفاوت نمک ۰، ۲۵،۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ گرم‌برلیتر همراه با ۱درصد نفت خام سنجش شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که سویهٔ *M. circinelloides* UTMC 5032 در حضور نمک همچنان قادر به حذف ترکیبات نفتی است؛ ولی با افزایش میزان نمک قدرت تجزیه‌کنندگی نفت توسط این سویه کاهش می‌یابد (شکل۶)؛ با این حال، همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، میزان حذف نفت و تولید زیست‌توده در غلظت ۲۵ گرم‌برلیتر نمک نسبت به محیط بدون نمک تغییر معنی‌داری نشان نداده و این میزان نمک اثر بازدارندگی بر جدایهٔ موردنظر نداشته و به‌میزان حدود ۹۰درصد حذف ترکیبات نفتی در حضور ۲۵ گرم‌برلیتر نمک توسط این جدایه انجام شده است. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک به غلظت ۵۰ گرم‌برلیتر ۵۵درصد حذف و در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ گرم‌برلیتر به‌ترتیب تنها ۱۵ و ۱۸درصد حذف نفت حاصل می‌شود (شکل ۶).



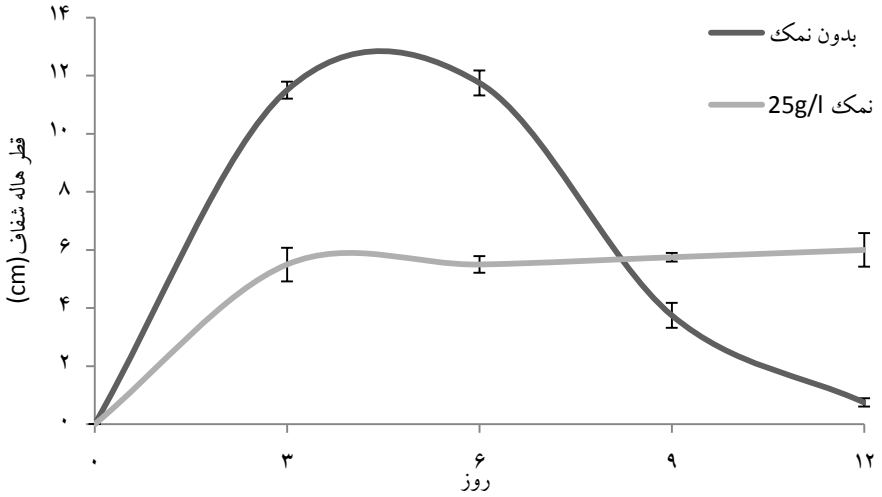
شکل ۶- درصد حذف نفت خام در *M. circinelloides* UTMC 5032 در محیط کشت پایهٔ نمکی دارای ۱درصد نفت همراه با غلظت‌های مختلف ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ گرم بر لیتر نمک کلرید سدیم

طیف‌سنجی FTIR: در ادامه جهت بررسی و تخمین دقیق‌تری از حذف ترکیبات آلیفاتیک توسط سویهٔ *M. circinelloides* UTMC 5032، در محیط پایهٔ نمکی دارای ۱درصد نفت خام در حضور ۲۵ گرم‌برلیتر نمک و بدون نمک مورد آنالیز باقیماندهٔ نفت خام با روش FTIR قرار گرفت. بررسی طیف به‌دست‌آمده از این روش نشان داد که پیک ایجادشده بین طول موج‌های cm^{-1} ۲۹۶۰-۲۹۳۰ که مربوط به ترکیبات آلیفاتیک است در نمونه‌های کشت‌داده‌شده با سویهٔ قارچی در حضور و عدمِ‌حضور نمک کاهش قابل‌توجهی را نشان می‌دهد که نشان از حذف این ترکیبات آلیفاتیکی توسط سویهٔ قارچی دارد. نتایج حاصل از این سنجش و مقایسهٔ آن با نمونهٔ شاهد و تیمارنشده نشان داد که این ایزوله قادر به تجزیه و کاهش ۹۰درصدی ترکیبات آلیفاتیک در حضور و نیز بدون حضور نمک بوده و این میزان نمک تغییر محسوسی در حذف ترکیبات آلیفاتیک نفتی ایجاد نکرده است (شکل ۷).



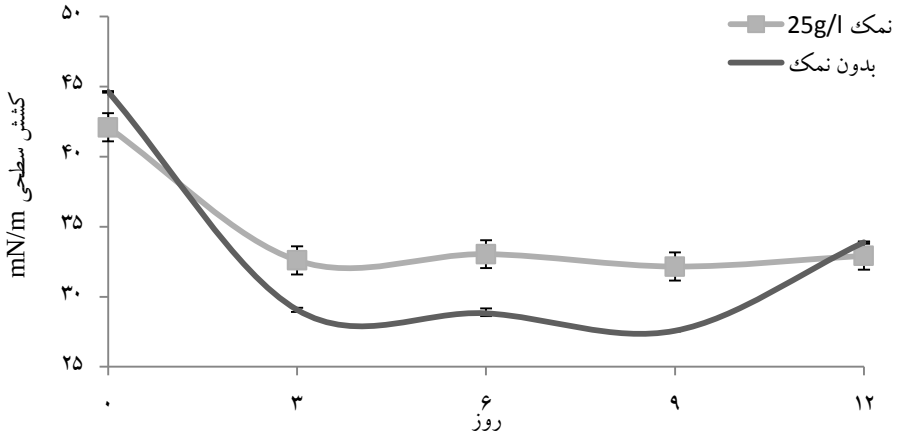
شکل ۷- طیف‌سنجی FTIR – مقایسهٔ میزان کاهش ترکیبات آلیفاتیک توسط *M. circinelloides* UTMC 5032 در حضور ۱درصد نفت خام و ۲۵ گرم‌برلیتر نمک و بدون حضور نمک

سنجش تولید بیوسورفاکتانت در حضور نمک: ارزیابی‌های انجام‌شده با استفاده از روش گسترش روغن نشان داد که سویهٔ منتخب توانایی تولید ترکیبات فعال در سطح را دارد؛ به‌طوری که پس از تلقیح در محیط کشت نمکی حاوی روغن به‌عنوان تنها منبع کربن، سویهٔ ذکرشده با تولید بیوسورفکتانت از روغن موجود در محیط استفاده کرده و به‌میزان قابل‌ملاحظه‌ای رشد می‌کند. با افزودن یک قطره از سوپرناتانت کشت قارچی در آزمون گسترش روغن، هالهٔ شفاف به‌قطر ۱۲ سانتیمتر در محیط بدون نمک و ۶ سانتیمتر در حضور ۲۵ گرم‌برلیتر نمک بعد از گذشت ۶ روز از تلقیح ایجاد شد (شکل ۸).



شکل ۸- قطر هالهٔ شفاف تولیدی در روش گسترش روغن در طی روزهای مختلف در محیط بدون نمک کلرید سدیم و دارای ۲۵ گرم‌برلیتر نمک

اندازه‌گیری کشش سطحی سوپرناتانت کشت قارچی در روزهای مختلف با استفاده از روش تنسیومتری نیز نشان داد که میزان کشش سطحی محیط کشت از mN/m ۴۵ به عدد mN/m ۲۸ در محیط بدون نمک و mN/m ۳۳ در محیط حاوی نمک کاهش‌یافته و سویه ای توانمند در تولید ترکیبات فعال سطحی طی تجزیهٔ ترکیبات نفتی است (شکل ۹).



شکل۹- میزان کشش سطحی در طی روزهای مختلف در محیط بدون نمک و دارای ۲۵ گرم‌برلیتر نمک

بحث و نتیجه‌گیری

آلودگی محیط‌های شور به انواع ترکیبات آلایندهٔ نفتی مشکلات زیست‌محیطی متعددی را برای انسان و سایر موجودات اکوسیستم‌ها ایجاد کرده و توسعه روش‌های پاک‌سازی زیستی با قابلیت کاربرد در شرایط شور از دیدگاه کاربردی بسیار مهم است؛ با وجود این، اطلاعات درخصوص تجزیهٔ هیدروکربن‌ها در محیط‌های شور بسیار کم است (۲۱). یک پاک‌سازی زیستی موفق نیازمند به جمعیت توانمندی از میکروارگانیسم‌ها در محل آلوده است که قادر باشند از ترکیبات نفتی به‌عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و با تحمل شرایط تنش‌زای محیطی و تولید ترکیباتی مانند مواد فعال زیستی موجبات حذف آلاینده را از محیط زیست فراهم کنند (۲۲). روش‌های پاک‌سازی زیستی در محیط‌های شور بسیار پیچیده‌تر و با کارآمدی کمتری نسبت به محیط‌های بدون این تنش انجام می‌گیرد. نمک به‌دلیل ایجاد حالت پلاسمولیز، بر متابولیسم میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد و کارآمدی حذف آلودگی را کاهش می دهد و پاک‌سازی را بسیار زمان‌بر می‌کند (۱۷)؛ بنابراین برای پاک‌سازی این مناطق استفاده از میکروارگانیسم‌های نمک‌دوست و یا تحمل‌کنندهٔ نمک یک ضرورت است.

در میان پژوهش‌های انجام‌شده بر میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی، اطلاعات موجود درخصوص تجزیهٔ هیدروکربن‌ها توسط قارچ‌ها به‌عنوان یک عامل بسیار مؤثر و توانمند در حذف ترکیبات نفتی و تحمل‌کنندهٔ شرایط تنش‌زای محیطی بسیار کم است و نیازمند بررسی‌های بیشتر درزمینهٔ یافتن و بررسی سازوکارهای حذف در این گروه از میکروارگانیسم‌ها است (۲۳ و ۲۴). در این پژوهش به‌منظور بررسی تجزیهٔ هیدروکربن‌های نفتی در شرایط شور، در گام اول از

خاک‌های مناطق شور آلوده به نفت ایران به‌منظور جداسازی قارچ‌های تجزیه‌کننده نمونه‌گیری و غنی‌سازی انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سمیت آلاینده‌های نفتی و نیز شرایط شوری محیط از رشد جدایه‌های قارچی جلوگیری نمی‌کنند و آنها می‌توانند از ترکیبات نفتی موجود در محیط به‌عنوان منبع کربن و مواد غذایی برای رشد و تولید زیست‌توده استفاده کنند. آزمایشات حاکی از آن بود که با افزایش غلظت نمک توانایی جدایه‌های قارچی در حذف نفت کاهش می‌یابد. این موضوع با نتایج سایر پژوهشگران هم‌راستا است (۲۱ و ۲۵) که در ارتباط با کاهش تنوع و فعالیت متابولیکی جدایه‌های تخریب‌کننده در محیط‌های با شوری بالا هستند.

از میان ۱۵ جدایهٔ خالص‌سازی‌شده در این مطالعه سویهٔ *M. circinelloides* UTMC 5032 با توانایی حذف بیش از ۵۵درصد نفت خام در محیط با شوری ۵۰ گرم‌برلیتر و توانایی رشد و تولید زیست‌توده تا غلظت ۱۵۰ گرم‌برلیتر نمک به‌عنوان سویهٔ منتخب تحمل‌کنندهٔ نفت و نمک انتخاب شد (شکل ۲ و ۴)؛ درحالی‌که بررسی توانمندی سایر جدایه‌های قارچی در حذف نفت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر نمک نشان داد که این جدایه‌ها توانمندی کمتری نسبت به *M. circinelloides* UTMC 5032 دارند و میزان حذف آنها بین ۲ تا ۴۰ درصد گزارش شده است. ابکوی[۱۴] و همکاران در مطالعه بر قارچ‌های جداسازی‌شده از محیط دارای استرس شوری، دو قارچ *Fusarium lateritium* و *Drechslera* sp. را به‌عنوان قارچ‌های تحمل‌کننده ۱۰درصد نمک NaCl و توانمند در حذف ترکیبات نفتی معرفی کردند (۲۶). در مطالعهٔ دیگری نیز که بهنود[۱۵] و همکاران بر تخریب زیستی نفت خام از پساب‌های شور با استفاده از قارچ *Phanerochaete chrysosporium* انجام دادند، نشان داده شد که با افزایش غلظت نمک از ۰ تا ۴۰ گرم‌برلیتر میزان حذف نفت از ۵۰درصد به ۲۰درصد کاهش می‌یابد (۱۷). بررسی‌های FTIR باقیماندهٔ هیدروکربن‌های نفتی توسط سویهٔ *M. circinelloides* UTMC 5032 نشان داد که بیش از ۹۰درصد ترکیبات آلیفاتیک بعد از گذشت ۱۲روز در محیط بدون نمک و نیز ۲۵ گرم‌برلیتر نمک توسط این سویه تجزیه شده‌اند و وجود این میزان نمک بر حذف نفت تأثیر بسزایی نداشته است (شکل ۷).

پژوهش‌های زیادی در رابطه با توانایی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ ترکیبات نفتی و ارتباط آن با تولید بیوسورفاکتانت انجام شده است؛ با این حال، پژوهش‌های اندکی بر آثار مهارکنندگی نمک بر رشد و تولید بیوسورفاکتانت و نیز ارتباط میان غلظت نمک و میزان آثار بازدارندگی حذف نفت در قارچ‌ها انجام پذیرفته است. نتایج به‌دست‌آمده از تولید بیوسورفکتانت توسط *M. circinelloides* UTMC 5032 در محیط با نمک و بدون نمک در مقایسه با نمونهٔ شاهد نیز نشان داد که جدایهٔ معرفی‌شده مولد ترکیبات فعال سطحی است و به‌میزان قابل‌توجهی قادر به کاهش کشش سطحی محیط کشت است. این موضوع را می‌توان به یکی از دلایل حذف نفت بالا توسط این جدایه نسبت داد (شکل ۸ و ۹). نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نشان داد که مقدار تولید بیوسورفکتانت در طی ۶ روز اول رو به افزایش است و بیشترین میزان تولید در روز ششم است؛ درحالی‌که بعد از این مدت مقدار بیوسورفکتانت موجود کاهش یافته است که علت این نتیجه را می‌توان به این صورت تفسیر نمود که احتمالاً یا میزان پایداری بیوسورفکتانت در محیط پایین است و بعد از تولید به‌دلیل

ناپایداری در محیط فعالیت خود را از دست می‌دهد و یا اینکه به‌دلیل فقر مواد غذایی در روزهای پایانی، سویهٔ قارچی از این ترکیب به‌عنوان منبع کربن و انرژی خود برای رشد استفاده می‌کند و با این کار موجب کاهش مقدار بیوسورفکتانت محیط می‌شود. همچنین نتایج نشان داد که وجود نمک در محیط موجب کاهش تولید بیوسورفکتانت در محیط می‌شود که علت احتمالی آن را می‌توان تأثیر منفی نمک بر رشد سلول قارچی و عملکرد بیوسورفکتانت دانست.

مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های تولیدشده از *M. cirninelloides* قادر به افزایش تجزیهٔ هیدروکربن‌های روغن‌های دیزل است (۲۷)؛ همچنین مطالعات نشان از توانمندی این‌گونه قارچ در تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی داشته است (۲۸)؛ همچنین بررسی‌ها نشان داده است که این‌گونه قارچی توانمند در تولید گاما-لینولنیک اسید است (۲۹). براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش برای اولین بار *Mucor cirninelloides* UTMC 5032 با ویژگی نفت‌خواری در عدمِ‌حضور و غلظت ۲۵ گرم‌برلیتر نمک با درصد حذف بیش از ۹۰ ترکیبات آلیفاتیک و حدود ۵۵درصد حذف نفت در غلظت ۵۰ گرم‌برلیتر نمک از خاک‌های بومی ایران جداسازی و خالص‌سازی شده است با توجه به توانایی این سویه در تولید بیوسورفاکتانت و کاهش کشش سطحی محیط کشت به‌میزان ۱۷/۶ mN/m واحد در محیط بدون نمک و ۸/۹۴ mN/m واحد در محیط نمکی نسبت به نمونهٔ شاهد و گزارش‌نکردن آن به‌عنوان عامل زیستی حذف‌کننده ترکیبات نفتی در محیط‌های با این میزان شوری، این جدایه می‌تواند به‌عنوان گزینهٔ ارزشمند و مناسبی در جهت پاک‌سازی زمین‌های شور آلوده به نفت در کشور معرفی شود.

References

(1) Bustamante M., Durán N., Diez MC. Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 2012; 12(4): 667-87.

(2) SINGH H. *MYCOREMEDIATION: Fungal Bioremediation.* New Jersey: John Wiley & Sons, Inc; 2006.

(3) Gogoi B., Dutta N., Goswami P., Krishna Mohan T. A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. *Advances in Environmental Research* 2003; 7(4): 767-82.

(4) McGenity TJ., Gramain A. Cultivation of Halophilic Hydrocarbon Degraders. In: Timmis K, editor. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.* Berlin: Springer Heidelberg; 2010. p. 3847-54.

(5) Dastgheib SM., Amoozegar MA., Khajeh K., Ventosa A. A halotolerant Alcanivorax sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Applied microbiology and biotechnology* 2011; 90(1): 305-12.

(6) Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008; 15(2-3): 74-92.

(7) Gadd GM. *Fungi in Bioremediation.* New York: Cambridge University Press; 2001.

(8) Mancera-López ME., Esparza-García F., Chávez-Gómez B., Rodríguez-Vázquez R., Saucedo-Castañeda G., Barrera-Cortés J. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2008; 61(2): 151-60.

(9) Hua X., Wang J., Wu Z., Zhang H., Li H., Xing X, et al. A salt tolerant Enterobacter cloacae mutant for bioaugmentation of petroleum-and salt-contaminated soil. *Biochemical Engineering Journal* 2010; 49(2): 201-6.

(10) Martins LF., Peixoto RS. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. *Brazilian Journal of Microbiology* 2012; 43(3): 865-72.

(11) Mouhamadou B., Faure M., Sage L., Marçais J., Souard F., Geremia RA. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fungal Biology* 2013; 117(4): 268-74.

(12) Page, A.L., *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. American Society of Agronomy, Soil Science Society of America. 1982

(13) Zhang G-l., Wu Y-t., Qian X-p., Meng Q. Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. *Journal of Zhejiang University Science B* 2005; 6: 725–30.

(14) Sepahi AA., Golpasha ID., Emami M., Nakhoda AM. isolation and characterization of crude oil degrading bacillus spp. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2008; 5: 149-54.

(15) Ekundayo FO., Olukunle OF., Ekundayo EA. Biodegradation of Bonnylight crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, Ondo state. *Malaysian Journal of Microbiology* 2012; 8(1): 42-6.

(16) Rahman KS., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource technology* 2002; 85(3): 257- 261.

(17) Behnood M., Nasernejad B., Nikazar M. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus Phanerochaete chrysosporium. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2013.

(18) Weisman W., Group TPHCW. *Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media*.vol 1. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers; 1998.

(19) Watanabe T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*.Third Edition. :CRC press; 2011.

(20) Sambrook J. *Molecular cloning :a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

(21) Le Borgne S., Paniagua D., Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 2008; 15(2): 74-92.

(22) Fan C-Y., Krishnamurthy S. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *Journal of the Air & Waste Management Association* 1995; 45(6): 453-60.

(23) Shankar S., Kansrajh C., Dinesh MG., Satyan RS., Kiruthika S., Tharanipriya A. Application of indigenous microbial consortia in bioremediation of oil-contaminated soils. *International Journal of Environmental Science and Technology* 2014; 11(2): 367-76.

(24) Husaini A., Roslan H., Hii K., Ang C. Biodegradation of aliphatic hydrocarbon by indigenous fungi isolated from used motor oil contaminated sites. *world Journal of Microbiology and Biotechnology* 2008; 24(12): 2789-97.

(25) Riis V., Kleinsteuber S., Babel W. Influence of high salinities on the degradation of diesel fuel by bacterial consortia. *Canadian journal of microbiology* 2003; 49(11): 713-21.

(26) Obuekwe CO., Badrudeen AM., Al-Saleh E., Mulder JL. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2005; 56(4): 197-205.

(27) Olga M., Ewa K., Dorota W., Tadeusz A. Biodegradation of diesel oil hydrocarbons enhanced with Mucor circinelloides enzyme preparation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2015; 104: 142-148.

(28) Vânia S A., Leonie A S., Kasutaka F., Makoto M., Kazuko N., Galba M and et al. production of extracellular proteases by *mucor circinelloides* using d-glucose as carbon source / substrate. *Brazilian Journal of Microbiology* 2002; 33(2)

(29) J.C.du Preez., M. Immelman, J.L.F. Kock, S.G. Kilian. Production of gamma-linolenic acid by *Mucor circinelloides* and *Mucor rouxii* with acetic acid as carbon substrate. *Biotechnology letters* 1995; 17(9): 933-938.

[1]- Bioremediation
[2]- Enrichment technique
[3]- Spread plate technique
[4]- MSM
[5]- Potato dextrose agar(PDA)
[6]- Sabouraud dextrose agar (SDA)
[7]- Ultrasonic
[8]- Rahman
[9]- Du Nouy ring method
[10]- Internal Transcribed Spacer (ITS)
[11]- Ampliqon master mix, Denmark
[12]- Forward primer
[13]- Reverse primer
[14]- Obuekwe
[15]- Behnood