

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

معرفی قارچ تحمل‌کننده نمک *Mucor circinelloides* UTMC 5032 به‌منظور حذف ترکیبات

هیدروکربنی نفت خام

رضوان حیدری تبار: کارشناس ارشد زیست‌فناوری میکروبی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، rezvan_heidary@ut.ac.ir
احسان آذین: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، ایران، ehsanazin@ut.ac.ir
حمید مقیمی*: استادیار میکروبیولوژی، بخش زیست‌فناوری 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 بازدارنده 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 تجزیه‌کننده نفت خام از خاک‌های مناطق شور آلوده به نفت ایران، انجام شد. در ادامه توانمندی هر یک از جدایه‌ها از نظر میزان حذف نفت خام در حضور ۵۰ گرم برلیتر 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 FTIR، TPH و اندازه‌گیری وزن خشک و نیز توانایی تولید بیوسورفکتانت جدایه منتخب ارزیابی شد. در نهایت برترین جدایه با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی گردید.

نتایج: در مرحله جداسازی، ۱۵ گونه قارچی به دست آمد. آزمون TPH در حضور نفت و نمک در این جدایه‌ها نشان داد که جدایه S-05 با حدود ۶۰ درصد حذف، بیشترین میزان حذف نفت در حضور ۵۰ گرم برلیتر نمک، توانمندترین جدایه در حذف هیدروکربن‌های نفتی است. آنالیز FTIR حذف ۹۰ درصد ترکیبات آلیفاتیک را نشان داد. سنجش تولید بیوسورفکتانت 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 گونه *Mucor circinelloides* است.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست آمده نشان داد که جدایه تحمل‌کننده 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 تحمل‌کننده نمک، *Mucor circinelloides* UTMC 5032

* نویسنده مسئول مکاتبات

مقدمه

فراورده‌های نفتی از پر مصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن امروز محسوب می‌شوند. محصولات مشتق از نفت خام، منبع اصلی انرژی مورد استفاده در صنعت و زندگی روزمره بشر هستند (۱). روزانه مقادیر زیادی نفت و فراورده‌های نفتی، در حجم زیاد و از راه‌های مختلف به محیط زیست وارد می‌شود که آثار منفی و طولانی مدتی 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 عدم تعادل 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 ۱۰ درصد و گاه در حد اشباع دارای نمک است که پس از جداسازی نفت از آن، میزان قابل توجهی 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. تصفیه این‌گونه پساب‌ها با روش‌های متداول

بسیار دشوار و گاه غیرممکن بوده و نیازمند توسعه 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 در اصطلاح پاک‌سازی زیستی^۱ 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. در واقع با توجه به کاهش حلالیت هیدروکربن‌ها و اکسیژن در آب شور و کاهش تنوع میکروبی به سبب آثار بازدارنده 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 محدوده 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

خالص سازی شد. برای این منظور در روش غنی سازی، جهت فعال کردن و سازگاری جمعیت های قارچی تخریب کننده ترکیبات نفتی خاک، از محیط تغییر یافته پایه نمکی^۴ همراه با یک درصد نفت خام سبک جزیره سیری به عنوان منبع کربن و ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر کلرامفنیکل به منظور مهار رشد باکتریایی و ۵۰ گرم بر لیتر نمک استفاده شد (۱۳). ترکیبات این محیط کشت شامل (گرم بر لیتر): NaNO_3 (۲)، $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، KH_2PO_4 (۰/۱)، MgSO_4 (۰/۲)، $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (۰/۱)، KCl (۱) و عصاره مخمر (۰/۲) در یک لیتر آب مقطر دیونیزه، همراه با ۲ میلی لیتر محلول عناصر جزئی شامل (گرم بر لیتر): $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (۰/۷۵)، $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۸)، $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۸)، $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۷۵)، $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (۰/۷۵)، $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (۰/۰۵)، H_3BO_3 (۰/۱۵) بود. pH اولیه پیش از اتوکلاو $6/8 \pm 0/2$ تنظیم شد (۱۴). ارلن های غنی سازی از نمونه های خاک همگن شده به مدت سه هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد و ۱۸۰ دور بر دقیقه گرما گذاری شد. بعد از این مدت ۱۰۰ میکرو لیتر از محیط غنی شده بر روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار^۵ و ساپرو دکستروز آگار^۶ دارای کلرامفنیکل و ۱ درصد نفت خام و ۵۰ گرم بر لیتر نمک پخش و به مدت دو هفته در انکوباتور گرما گذاری گشت. پس از این مدت جدایه های قارچی حاصله بر روی محیط کشت PDA خالص سازی شد. علاوه بر روش ذکر شده از روش کشت گسترده در پلیت نیز برای جداسازی قارچ های نفت خوار استفاده شد. برای این منظور ابتدا از نمونه های خاک، رقت های 10^{-2} ، 10^{-3} و 10^{-4} تهیه و سپس رقت های حاصله به مدت ۱۵ دقیقه با

از شرایط محیطی سخت مثل فشار اسمزی بالا و یا خشکی و یا pH پایین نسبت به باکتری ها مقاومت و فعالیت بیشتری دارند؛ علاوه بر این، گزارش های متعددی درباره برخی از قارچ ها منتشر شده است که نشان می دهد که این قارچ ها، میکروارگانیسم های توانمندی در تجزیه ترکیبات هیدروکربنی هستند که علت این توانمندی بالا ترشح آنزیم های خارج سلولی از قبیل لاکاز، لیگنین پراکسیداز و منگنز پراکسیداز است (۱۱). بنابراین هدف از انجام این پژوهش در گام نخست غربالگری جدایه های قارچی توانمند در تحمل نمک از مناطق شور آلوده به آلاینده های نفتی و دستیابی به جدایه قارچی بومی توانمند در تولید ترکیبات فعال زیستی و حذف ترکیبات نفتی است که برای این منظور بعد از جداسازی و غربالگری جدایه های قارچی، با استفاده از روش های استاندارد تولید ترکیبات سورفکتانتی و حذف آلاینده های نفتی در حضور نمک برای بهترین ایزوله قارچی بررسی شد.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه: نمونه های خاک از ۴ منطقه آلوده به نفت شامل قم، پوند ۳ پالایشگاه نفت تهران، منطقه نفتی مارون و جزیره سیری جمع آوری و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه ها در آزمایشگاه با الکت ۰/۵ میلی متر همگن شد و ذرات درشت آن جداسازی شد. در ادامه اسیدیته و هدایت الکتریکی خاک ها به منظور بررسی شوری خاک اندازه گیری و جهت جداسازی قارچ ها استفاده شد (۱۲).

جداسازی قارچ های تخریب کننده ترکیبات نفتی:

جدایه های قارچی موجود در نمونه های خاک با استفاده از دو روش غنی سازی^۲ و کشت در پلیت^۳ جداسازی و

۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم بر لیتر 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. زیست‌توده قارچی حاصله، از محیط با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۱ جدا شد و به مدت یک شبانه‌روز در دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد خشک گردید. سپس وزن خشک به دست آمده بر اساس گرم در لیتر گزارش شد (۱۸). با توجه به بهینه شرایط رشد قارچ منتخب در حضور نمک، جدایه قارچی در غلظت‌های متفاوت نمک همراه با ۱ درصد نفت خام در محیط پایه 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 پایه نمکی همراه با ۱ درصد نفت خام و غلظت بهینه ۲۵ گرم بر لیتر نمک کشت شد و در انتهای روز پانزدهم محتوای هیدروکربنی باقیمانده در محیط کشت با استفاده از حلال تتراکلرید کربن استخراج شد. در این روش هم‌حجم محیط، از حلال تتراکلرید کربن به فلاسک افزوده شد و محتوای فلاسک به مدت ۵ دقیقه ورتکس شد و در ادامه به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در مرحله بعدی فاز آلی حاوی هیدروکربن‌های نفتی جدا شد و در نهایت با استفاده از سل مایع، طیف‌سنجی FT-IR انجام شد. در نهایت میزان حذف نفت با توجه به نمونه شاهد تعیین شد (۱۷).

استفاده از همزن مخلوط و سپس سونیکاسیون نمونه‌ها توسط دستگاه اولتراسونیک^۷ انجام شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از رقت‌ها بر روی محیط‌های PDA و SDA دارای ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک همراه با ۱ درصد نفت خام و ۵۰ گرم بر لیتر 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 به مدت دو هفته در انکوباتور گرماگذاری شد (۱۵).

سنجش میزان حذف نفت: جهت تعیین توانمندی

جدایه‌های حاصله در حذف نفت خام در حضور ۵۰ گرم بر لیتر نمک، هریک از جدایه‌ها با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی بر اساس روش رحمان^۸ و همکاران از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۴۲۰ نانومتر ارزیابی شد و جدایه برگزیده حاصل از این مرحله برای ادامه 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 به خوبی همزده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ rpm سانتریفوژ شود. در مرحله 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 نمونه کنترل مقایسه شد و میزان حذف گزارش گردید (۱۶ و ۱۷).

تعیین بازده میزان تحمل‌پذیری نمک و میزان

حذف: جدایه برتر از نظر میزان تحمل‌پذیری نمک در غلظت‌های متفاوت نمکی شامل صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵،

ارزیابی تولید بیوسورفاکتانت در حضور نمک:

به منظور تشخیص تولید بیوسورفاکتانت و اثر آن در حذف نفت، در حضور ۲۵ گرم برلیتر نمک و بدون نمک، جدایه منتخب در محیط پایه نمکی دارای روغن آفتابگردان با غلظت ۵ درصد 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 جدا کردن یک حلقه 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 هر بار اندازه‌گیری کشش سطحی آب مقطر و محیط کشت فاقد تلقیح نیز به عنوان شاهد سنجیده شد (۵).

شناسایی جدایه قارچی: برای شناسایی جدایه‌های

قارچی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی آنها از قبیل شکل میسلیم، آرایش اسپورها، آرایش و رنگ کلنی و پیگمان‌های تولیدی، از طریق رنگ آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو و تهیه اسلاید کالچر و نیز با توجه به کلیدهای شناسایی ریخت‌شناسی بررسی شد (۱۹). به منظور شناسایی مولکولی ابتدا جدایه منتخب در محیط PDB به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس میسلیم‌های قارچ با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. در ادامه از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست‌توده منجمد شد و با استفاده از ازت مایع، سلول‌ها شکسته شد و DNA آن به روش استخراج با فنل-کلروفرم جداسازی شد (۲۰). در این روش ابتدا عصاره سلولی به دست آمده در میکروفیوژ با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. سپس

روش‌ناور جدا شده که حاوی مولکول‌های DNA است، به یک ویال استریل منتقل شد. در این مرحله هم حجم روش‌ناور، از مخلوط فنل-کلروفرم (به نسبت ۱:۱) به ویال افزوده شد. سپس ویال به مدت دو دقیقه تکان داده شد تا محتویات آن با هم مخلوط شود. در ادامه ویال در میکروفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد و پس از این مدت‌زمان به آرامی 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 به میزان ۰/۱ آن محلول سدیم استات 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 به مدت ۵ دقیقه جدا و دور ریخته شد و ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد به رسوب DNA افزوده شد و مجدداً با دور rpm ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز رویی موجود در ویال دور ریخته شد. در نهایت رسوب حاصل در ۱۵ تا ۲۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد. PCR توالی ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی^{۱۱} با پرایمرهای ITS1 و ITS4 (ITS1): TCC 5'-3' GTA GGT GAA CCT GCG G-5' و ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3' انجام شد. جهت اضافه کردن مواد به منظور انجام واکنش PCR، ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت با غلظت ۱۰ پیکومول به همراه ۱ میکرولیتر از DNA قارچی با غلظت ۴۰ نانوگرم به ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط آماده شرکت آمپلیکون دانمارک^{۱۱} اضافه شد و حجم نهایی ویال با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. برنامه PCR به شکل ۵ دقیقه در دمای ۹۴

تکنیک غنی‌سازی و گسترده در حضور نمک، ۱۵ جداییه قارچی مختلف با ویژگی‌های ریخت‌شناسی متفاوت جداسازی شد.

جدول ۱- برنامه دمایی PCR برای تکثیر ژن ITS

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

جدول ۲- مواد استفاده شده در واکنش زنجیره پلیمرز

| حجم (میکرولیتر) | اجزای واکنش PCR |
|------------------------------|----------------------------|
| متغیر وابسته به DNA استخراجی | آب مقطر استریل |
| ۱ | پرایمر رفت ^{۱۲} |
| ۱ | پرایمر برگشت ^{۱۳} |
| متغیر | DNA استخراج شده |
| ۱۲/۵ | Master mix |
| ۲۵ | حجم کل |

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. در نهایت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و یال گرمادهی شدند (جدول ۱ و ۲). محصول به دست آمده بعد از خالص‌سازی از روی ژل جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج تعیین ترادف در بانک ژنی و از طریق هم‌ردیفی توالی ارزیابی شد (۲۰).

نتایج

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌های

تجزیه‌کننده نفت: در این مطالعه از ۴ منطقه آلوده به نفت نمونه برداری انجام و میزان شوری و pH نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. pH تمام نمونه‌ها خنثی و براساس نتایج هدایت‌سنجی الکتریکی، بیشترین شوری به ترتیب مربوط به نمونه‌های خاک پوند پالایشگاه تهران و مارون بود و منطقه سیری و قم شوری متوسطی داشتند (جدول ۳). در ادامه با کشت نمونه‌های موردنظر با استفاده از دو

جدول ۳- محل نمونه برداری و ویژگی‌های هریک از نمونه‌های آلوده به نفت جمع‌آوری شده

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

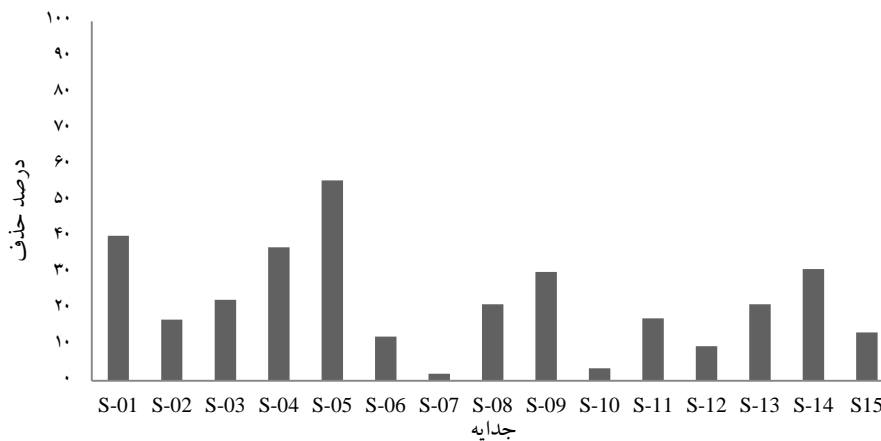


شکل ۱- توانایی حذف نفت خام جدایه S-05 در محیط کشت پایه نمکی در مقایسه با نمونه شاهد

سنجش میزان حذف نفت و رشد در جدایه‌ها: پس

از خالص‌سازی، توانایی هریک از جدایه‌ها در حذف نفت و تولید زیست‌توده در محیط کشت پایه نمکی دارای ۱ درصد نفت خام و ۵۰ گرم برلیتر نمک طی مدت ۱۵ روز بررسی شد (شکل ۱).

در این میان جدایه S-05 جداسازی شده از خاک آلوده به نفت منطقه مارون با بیش از ۵۵ درصد حذف نفت خام در غلظت ۵۰ گرم برلیتر نمک به‌عنوان توانمندترین جدایه در حذف نفت خام انتخاب شد (شکل ۲).

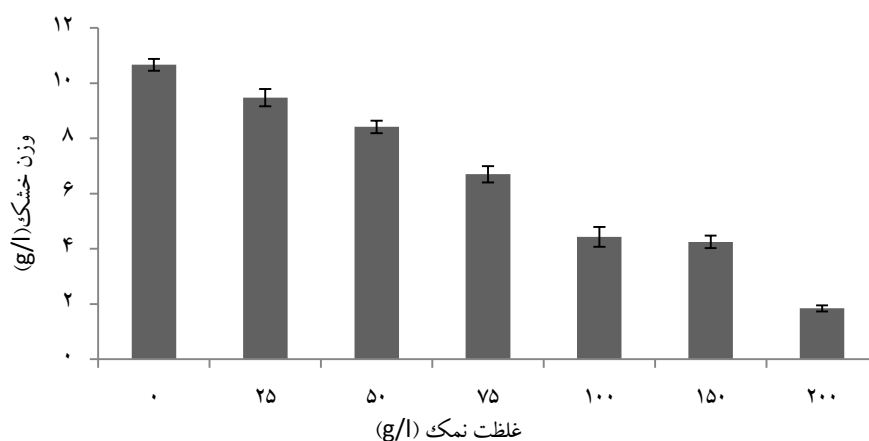


شکل ۲- درصد حذف نفت خام توسط جدایه‌های قارچی در محیط کشت پایه نمکی دارای ۱ درصد نفت همراه با غلظت ۵۰ گرم برلیتر نمک بعد از ۱۵ روز

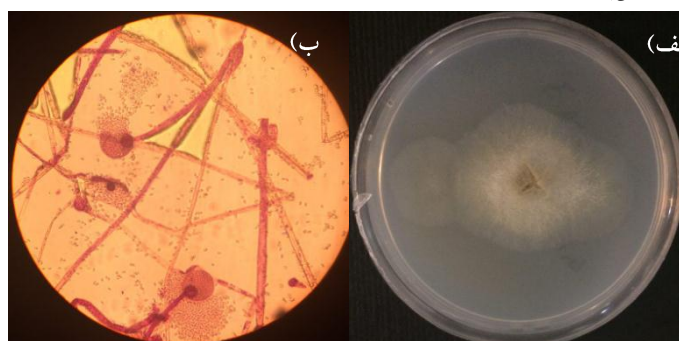
S-05 از PCR و تعیین ترادف ژن ITS و مقایسه توالی به‌دست آمده در بانک ژنی نشان داد که جدایه S-05 با میزان شباهت ۹۹ درصد متعلق به *Mucor circinelloides* KR263057 است. این جدایه در بانک ژنی با کد دستیابی *M. circinelloides* UTMC 5032 در ثبت شد و با کد کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت و نگهداری شد. تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه S-05 در شکل ۴ مشاهده می‌شود (شکل ۴). رسم درخت فیلوژنی این جدایه نشان داد که این سویه بیشترین نزدیکی را به *M. circinelloides* f. *circinelloides* دارد (شکل ۵).

در ادامه، بررسی میزان تحمل‌پذیری نمک در این سویه در حضور غلظت‌های متفاوت نمک شامل صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ گرم برلیتر 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 گرم برلیتر نمک کلرید سدیم رشد مناسبی را نشان داده و تا غلظت ۱۵۰ گرم برلیتر همچنان قادر به تولید زیست‌توده و تحمل نمک است (شکل ۳).

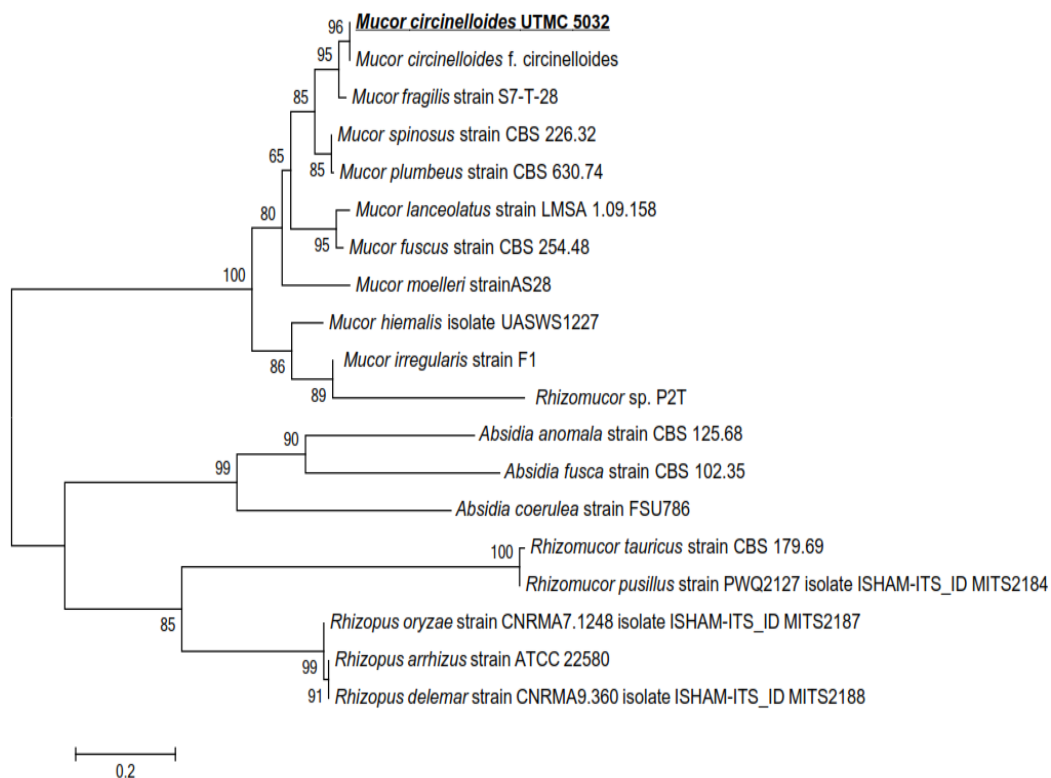
شناسایی سویه منتخب: نتیجه انجام آزمایش‌های ریخت‌شناسی و نیز مولکولی لازم برای شناسایی جدایه



شکل ۳- میزان تحمل پذیری نمک و تولید بیومس خشک در غلظت‌های مختلف نمک توسط جدایه S-05



شکل ۴- (الف) مورفولوژی کلنی، (ب) شمای میکروسکوپی *M. circinelloides* UTMC 5032

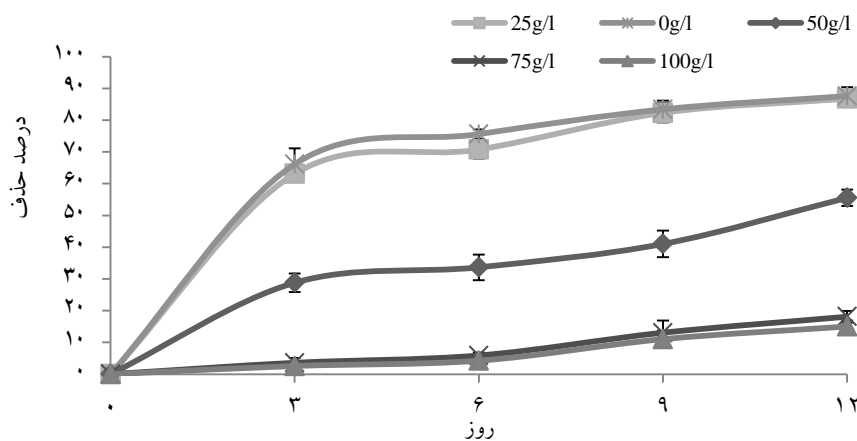


شکل ۵- درخت فیلوژنی *Mucor circinelloides* UTMC ۵۰۳۲ با استفاده از پرایمرهای ITS، با الگوریتم اتصال- همسایگی برای هم‌ردیفی و تعیین فاصله توالی‌ها و نیز نرم‌افزارهای مگا ۵ نشان می‌دهد

حذف نفت و تولید زیست توده در غلظت ۲۵ گرم بر لیتر نمک نسبت به محیط بدون نمک تغییر معنی داری نشان نداده و این میزان نمک اثر بازدارندگی بر جدایی مورد نظر نداشته و به میزان حدود ۹۰ درصد حذف ترکیبات نفتی در حضور ۲۵ گرم بر لیتر نمک توسط این جدایه انجام شده است. همچنین نتایج نشان داد که با افزایش غلظت نمک به غلظت ۵۰ گرم بر لیتر ۵۵ درصد حذف و در غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ گرم بر لیتر به ترتیب تنها ۱۵ و ۱۸ درصد حذف نفت حاصل می شود (شکل ۶).

بررسی میزان حذف نفت در حضور غلظت های

مختلف نمک: میزان حذف نفت خام توسط سویه منتخب در حضور غلظت های متفاوت نمک ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ گرم بر لیتر همراه با ۱ درصد نفت خام سنجش شد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که سویه *M. circinelloides* UTMC 5032 در حضور نمک همچنان قادر به حذف ترکیبات نفتی است؛ ولی با افزایش میزان نمک قدرت تجزیه کنندگی نفت توسط این سویه کاهش می یابد (شکل ۶)؛ با این حال، همان طور که در شکل ۶ نشان داده شده است، میزان

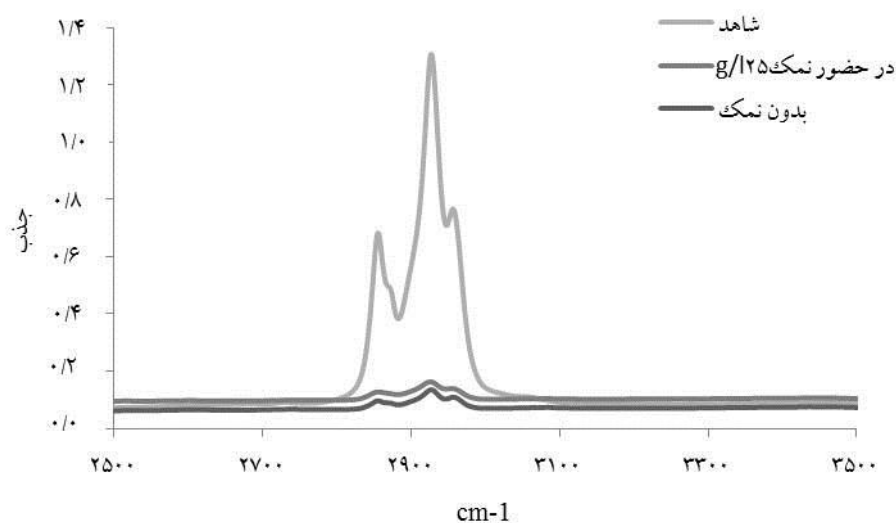


شکل ۶- درصد حذف نفت خام در *M. circinelloides* UTMC 5032 در محیط کشت پایه نمکی دارای ۱ درصد نفت همراه با غلظت های مختلف ۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ گرم بر لیتر نمک کلرید سدیم

حضور و عدم حضور نمک کاهش قابل توجهی را نشان می دهد که نشان از حذف این ترکیبات آلیفاتیک توسط سویه قارچی دارد. نتایج حاصل از این سنجش و مقایسه آن با نمونه شاهد و تیمار نشده نشان داد که این ایزوله قادر به تجزیه و کاهش ۹۰ درصدی 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).

طیف سنجی FTIR: در ادامه جهت بررسی و تخمین

دقیق تری از حذف ترکیبات آلیفاتیک توسط سویه *M. circinelloides* UTMC 5032 در محیط پایه نمکی دارای ۱ درصد نفت خام در حضور ۲۵ گرم بر لیتر نمک و بدون نمک مورد آنالیز باقیمانده نفت خام با روش FTIR قرار گرفت. بررسی طیف به دست آمده از این روش نشان داد که پیک ایجاد شده بین طول موج های $2930-2960 \text{ cm}^{-1}$ که مربوط به ترکیبات آلیفاتیک است در نمونه های کشت داده شده با سویه قارچی در

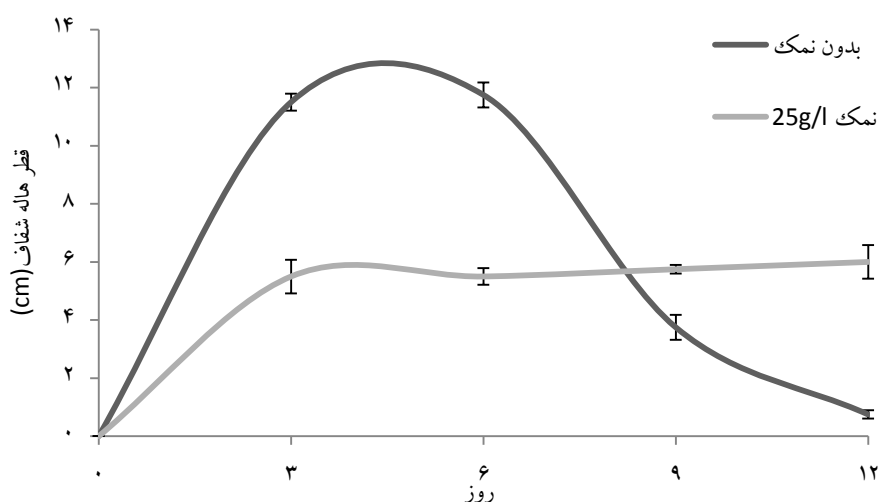


شکل ۷- طیف‌سنجی FTIR - مقایسه میزان کاهش ترکیبات آلیفاتیک توسط *M. circinelloides* UTMC 5032 در حضور ۱ درصد نفت خام و ۲۵ گرم برلیتر نمک و بدون حضور نمک

می‌کند. با افزودن یک قطره از سوپرناتانت کشت قارچی در آزمون گسترش روغن، هاله شفاف به قطر ۱۲ سانتیمتر در محیط بدون نمک و ۶ سانتیمتر در حضور ۲۵ گرم برلیتر نمک بعد از گذشت ۶ روز از تلقیح ایجاد شد (شکل ۸).

سنجش تولید بیوسورفاکتانت در حضور نمک:

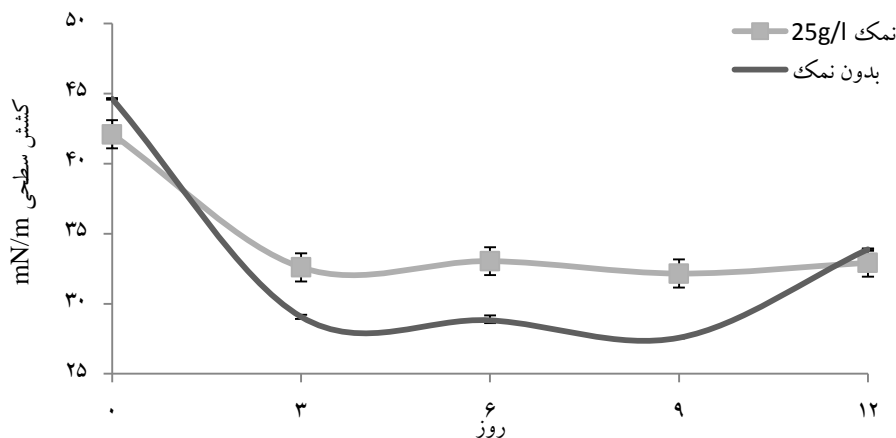
ارزیابی‌های انجام شده با استفاده از روش گسترش روغن نشان داد که سویه منتخب توانایی تولید ترکیبات فعال در سطح را دارد؛ به طوری که پس از تلقیح در محیط کشت نمکی حاوی روغن به عنوان تنها منبع کربن، سویه ذکر شده با تولید بیوسورفاکتانت از روغن موجود در محیط استفاده کرده و به میزان قابل ملاحظه‌ای رشد



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

نمک و 33 mN/m در محیط حاوی نمک کاهش یافته و سوبه ای توانمند در تولید ترکیبات فعال سطحی طی تجزیه ترکیبات نفتی است (شکل ۹).

اندازه گیری کشش سطحی سوپرناتانت کشت قارچی در روزهای مختلف با استفاده از روش تنسیومتری نیز نشان داد که میزان کشش سطحی محیط کشت از 45 mN/m به عدد 28 mN/m در محیط بدون



شکل ۹- میزان کشش سطحی در طی روزهای مختلف در محیط بدون نمک و دارای ۲۵ گرم برلیتر نمک

این تنش انجام می گیرد. نمک به دلیل ایجاد حالت پلاسمولیز، بر متابولیسم میکروارگانیسم‌ها تأثیر می گذارد و کارآمدی حذف آلودگی را کاهش می دهد و پاک سازی را بسیار زمان بر می کند (۱۷)؛ بنابراین برای پاک سازی این مناطق استفاده از میکروارگانیسم های نمک دوست و یا تحمل کننده نمک یک ضرورت است. در میان پژوهش های انجام شده بر میکروارگانیسم های تجزیه کننده ترکیبات نفتی، اطلاعات موجود در خصوص تجزیه هیدروکربن ها توسط قارچ ها به عنوان یک عامل بسیار مؤثر و توانمند در حذف ترکیبات نفتی و تحمل کننده شرایط تنش زای محیطی بسیار کم است و نیازمند بررسی های بیشتر در زمینه یافتن و بررسی سازوکارهای حذف در این گروه از میکروارگانیسم ها است (۲۳ و ۲۴). در این پژوهش به منظور بررسی تجزیه هیدروکربن های نفتی در شرایط شور، در گام اول از

بحث و نتیجه گیری

آلودگی محیط های شور به انواع ترکیبات آلاینده نفتی مشکلات زیست محیطی متعددی را برای انسان و سایر موجودات اکوسیستم ها ایجاد کرده و توسعه روش های پاک سازی زیستی با قابلیت کاربرد در شرایط شور از دیدگاه کاربردی بسیار مهم است؛ با وجود این، اطلاعات در خصوص تجزیه هیدروکربن ها در محیط های شور بسیار کم است (۲۱). یک پاک سازی زیستی موفق نیازمند به جمعیت توانمندی از میکروارگانیسم ها در محل آلوده است که قادر باشند از ترکیبات نفتی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کنند و با تحمل شرایط تنش زای محیطی و تولید ترکیباتی مانند مواد فعال زیستی موجبات حذف آلاینده را از محیط زیست فراهم کنند (۲۲). روش های پاک سازی زیستی در محیط های شور بسیار پیچیده تر و با کارآمدی کمتری نسبت به محیط های بدون

قارچ *Phanerochaete chrysosporium* انجام دادند، نشان داده شد که با افزایش غلظت نمک از ۰ تا ۴۰ گرم بر لیتر میزان حذف نفت از ۵۰ درصد به ۲۰ درصد کاهش می‌یابد (۱۷). بررسی‌های FTIR باقیمانده هیدروکربن‌های نفتی توسط سویه *M. circinelloides* UTMC 5032 نشان داد که بیش از ۹۰ درصد ترکیبات آلیفاتیک بعد از گذشت ۱۲ روز در محیط بدون نمک و نیز ۲۵ گرم بر لیتر 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 تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی و ارتباط آن با تولید بیوسورفکتانت انجام شده است؛ با این حال، پژوهش‌های اندکی بر آثار مهارکنندگی نمک بر رشد و تولید بیوسورفکتانت و نیز ارتباط میان غلظت نمک و میزان آثار بازدارندگی حذف نفت در قارچ‌ها انجام پذیرفته است. نتایج به دست آمده از تولید بیوسورفکتانت توسط *M. circinelloides* UTMC 5032 در محیط با نمک و بدون نمک در مقایسه با نمونه شاهد نیز نشان داد که جدایه معرفی شده مولد ترکیبات فعال سطحی است و به میزان قابل توجهی 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 به دست آمده 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؛ در حالی که 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 به دلیل

خاک‌های مناطق شور آلوده به نفت ایران به منظور 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 به عنوان 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 جدایه خالص سازی شده در این مطالعه سویه *M. circinelloides* UTMC 5032 با توانایی حذف بیش از ۵۵ درصد نفت خام در محیط با شوری ۵۰ گرم بر لیتر و توانایی رشد و تولید زیست‌توده تا غلظت ۱۵۰ گرم بر لیتر نمک به عنوان سویه منتخب تحمل‌کننده نفت و نمک انتخاب شد (شکل ۲ و ۴)؛ در حالی که بررسی توانمندی سایر جدایه‌های قارچی در حذف نفت در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر 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 جداسازی شده از محیط دارای استرس شوری، دو قارچ *Drechslera* و *Fusarium lateritium* sp. را به عنوان قارچ‌های تحمل‌کننده ۱۰ درصد نمک NaCl و توانمند در حذف ترکیبات نفتی معرفی کردند (۲۶). در مطالعه دیگری نیز که بهنود^{۱۵} و همکاران بر تخریب زیستی نفت خام از پساب‌های شور با استفاده از

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.

ناپایداری در محیط فعالیت خود را از دست می دهد و یا اینکه به دلیل فقر مواد غذایی در روزهای پایانی، سوپه قارچی از این ترکیب به عنوان منبع کربن و انرژی خود برای رشد استفاده می کند و با این کار موجب کاهش مقدار بیوسورفکتانت محیط می شود. همچنین نتایج نشان داد که وجود نمک در محیط موجب کاهش تولید بیوسورفکتانت در محیط می شود که علت احتمالی آن را می توان تأثیر منفی نمک بر رشد سلول قارچی و عملکرد بیوسورفکتانت دانست.

مطالعات نشان داده است که آنزیم های تولید شده از *M. circinelloides* قادر به افزایش تجزیه هیدروکربن های روغن های دیزل است (۲۷)؛ همچنین مطالعات نشان از توانمندی این گونه قارچ در تولید آنزیم پروتئاز خارج سلولی داشته است (۲۸)؛ همچنین بررسی ها نشان داده است که این گونه قارچی توانمند در تولید گاما-لینولنیک اسید است (۲۹). براساس نتایج به دست آمده در این پژوهش برای اولین بار *Mucor circinelloides* UTMC 5032 با ویژگی نفت خوری در عدم حضور و غلظت ۲۵ گرم برلیتر نمک با درصد حذف بیش از ۹۰ ترکیبات آلیفاتیک و حدود ۵۵ درصد حذف نفت در غلظت ۵۰ گرم برلیتر نمک از خاک های بومی ایران جداسازی و خالص سازی شده است با توجه به توانایی این سوپه در تولید بیوسورفکتانت و کاهش کشش سطحی محیط کشت به میزان ۱۷/۶ mN/m واحد در محیط بدون نمک و ۸/۹۴ mN/m واحد در محیط نمکی نسبت به نمونه شاهد و گزارش نکردن آن به عنوان عامل زیستی حذف کننده ترکیبات نفتی در محیط های با این میزان شوری، این جدایه می تواند به عنوان گزینه ارزشمند و مناسبی در جهت پاک سازی زمین های شور آلوده به نفت در کشور معرفی شود.

- (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., Kleinstaub 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