فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۹، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۱۲۶- ۱۱۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

تجزیهٔ زیستی فنل توسط مخمر هالوتولرانت *Trichosporon cutaneum* در محیط نمکی

هدی نوری: دانشجوی دکتری زیست فناوری میکربی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، hoda.nouri@ut.ac.ir
حمید مقیمی*: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: فنل و مشتقات آن از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند که غالباً در پساب‌های صنعتی یافت می‌شوند. با وجود سمی‌بودن، فنل می‌تواند به‌عنوان تنها منبع کربن و انرژی توسط برخی میکروارگانیسم‌ها مصرف شود.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جداسازی مخمرهای تحمل‌کنندهٔ نمک و تجزیه‌کنندهٔ فنل در محیط کشت GPY و MA حاوی ۲۵۰ppm فنل و۵درصد NaCl انجام شد. از میان جدایه‌های به‌دست‌آمده، جدایهٔ مخمری با توانایی مصرف بالای فنل در حضور ۵درصد NaCl انتخاب و از طریق PCR ژن *ITS* شناسایی شد. مقاومت این جدایه نسبت به غلظت‌های مختلف فنل و آثار سمی آن و همچنین تجزیهٔ فنل و در حضور ۵درصد NaCl ازطریق سنجش مقدار فنل باقیمانده به‌روش اسپکتروسکوپی و اندازه‌گیری وزن خشک سلولی انجام شد.

نتایج: در این پژوهش ۱۵ جدایه جداسازی شد که براساس توانایی رشد در غلظت‌های فنل و نمک، جدایهٔ ADH8 به‌عنوان جدایهٔ منتخب انتخاب شد. تعیین توالی ژن *ITS* این جدایه را به‌عنوان *Trichosporon cutaneum* معرفی کرد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده تأثیر ممانعت‌کنندهٔ فنل در محیط حاوی ۵درصد NaCl در غلظت‌های بیشتر از ppm ۱۲۵۰ مشاهده شد که در نتیجهٔ آن، کاهش قابلِ‌ملاحظه‌ای در رشد و حذف فنل صورت گرفت. در غلظت‌های ۷۵۰ و ۱۰۰۰ ppm فنل، تمامی غلظت اولیهٔ فنل پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون مصرف شد؛ ولی در غلظت ppm ۱۲۵۰ به‌دلیل سمیت فنل بر *T.cutaneum*، سرعت رشد سلولی و مصرف فنل متفاوت بود و با فاز تأخیری و زمان انکوباسیون طولانی‌تر، حذف فنل آغاز و پس از ۴۸ ساعت، تمام فنل اولیه مصرف شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که سویهٔ *T.cutaneum* تحمل‌کنندهٔ نمک، با مقاومت بالا نسبت به فنل می‌تواند به‌عنوان ابزار بالقوه‌ای جهت ازبین‌بردن آلودگی‌های فنلی در تصفیهٔ پساب و خاک حاوی نمک استفاده شد.

واژه‌های کلیدی: تجزیهٔ زیستی، فنل، هلوتولرانت، *Trichosporon cutaneum*.

* نویسندهٔ مسئول 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

آلودگی محیط زیست با آلاینده‌های آلی به‌ویژه محصولات پتروشیمی در دهه‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده است. امروزه نشت و گسترش ترکیبات پتروشیمی در اثر ناکارآمدی فرآیندهای استخراج، انتقال و پالایش و همچنین بروز سوانح در بخش‌های مختلف اعم از مناطق تولید، پالایشگاه‌ها و خطوط حمل‌ونقل، امری اجتناب‌ناپذیر است (۱ و ۲). فنل (*هیدروکسی بنزن*) و ترکیبات فنلی از جمله مشتقات زغال سنگ هستند که به‌طور طبیعی به‌وسیلهٔ قطران زغال سنگ به دست می‌آید. فنل به‌عنوان فراوان‌ترین آلایندهٔ آروماتیک توسط پساب بسیاری از صنایع به‌ویژه صنعت نفت و پتروشیمی تولید و رهاسازی می‌شود (۱). آژانس حفاظت از محیط زیست مقدار مجاز فنل را در خروجی پساب صنایع ppb ۵۰۰ و در آب آشامیدنی حداکثر ۱ تا ۲ ppb تعیین کرده است (۳ و ۴). روش‌های متعددی برای تصفیهٔ پساب‌های آلوده به ترکیبات فنلی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش‌های فیزیکی و شیمیایی و زیستی اشاره کرد. تولید پساب و هزینهٔ زیاد و ایجاد حدِواسط‌های خطرناک از مهم‌ترین معایب استفاده از روش‌های فیزیکی و شیمیایی است و سرعت بالا در حذف، اجرای ساده و نیازنداشتن به نیروی متخصص از جمله مزایای آن است (۲). استفاده از قابلیت میکروارگانیسم‌ها به‌منظور تجزیهٔ زیستی آلاینده‌های آلی از جمله فنل به‌عنوان مهم‌ترین جایگزین تیمار پساب‌های حاوی فنل معرفی شده است. در این زمینه مطالعات زیادی به‌ویژه با استفاده از باکتری‌ها به‌منظور تجزیهٔ زیستی فنل و مشتقات آن انجام شده است (۵ و۶). باکتری‌های مزوفیل هوازی به‌عنوان مهم‌ترین تجزیه‌کنندگان فنل معرفی شده‌اند. در میان پژوهش‌های انجام‌شده بر روی میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ فنل، اطلاعات کمی درخصوص تجزیه توسط قارچ‌ها به‌عنوان یک عامل بسیار مؤثر و توانمند در حذف ترکیبات فنلی موجود است (۱ و ۷). قارچ‌ها مخمرهایی هستند که سیستم‌های آنزیمی بسیار کارآمد و توانمند برای تولید و ترشح آنزیم‌های اختصاصی و غیراختصاصی دارند و به‌کمک آن‌ها می‌توان طیف وسیعی از ترکیبات آلاینده را تجزیه کرد (۱). قارچ‌ها به‌دلیل وجود ساختارهای مقاوم می‌توانند در محیط‌های پرتنش مانند pH کم و محیط‌های غذایی فقیر نیز رشد کنند و در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌های محیطی به‌خوبی بقا داشته باشند (۱و۳). علی‌رغم مطالعات گسترده بر حذف زیستی فنل توسط میکروارگانیسم‌های مختلف، مطالعات چندانی در محیط‌های آلوده با شرایط سخت از جمله محیط‌های با دمای بالا و یا پایین، اکوسیستم‌های شور و یا با pH بالا و یا پایین صورت نگرفته است (۷- ۹). با توجه به شوربودن بسیاری از خاک‌های کشور، پساب حاوی فنل تولیدی صنایع مختلف از جمله صنایع دارویی، صنایع نفتی، صنایع تولید آفت‌کش، رنگ و ساخت رزین‌های مصنوعی و صنایع سیمان (۱۰) می‌تواند منجر به تولید پساب و خاک شور آلوده به فنل شود که این امر لزوم استفاده از میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کنندهٔ فنل و تحمل‌کنندهٔ نمک را بیش از پیش آشکار می‌کند (۱۱ و ۱۲). براین‌اساس، هدف از انجام این پژوهش جداسازی و معرفی جدایه‌های مخمر توانمند در حذف زیستی غلظت بالای فنل در شرایط نمکی بود. همچنین به‌منظور ارزیابی توانمندی جدایهٔ منتخب، تأثیر غلظت‌های مختلف فنل در حضور ۵درصد نمک بر رشد و تجزیهٔ زیستی فنل بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: به‌منظور جداسازی مخمرهای تحمل‌کنندهٔ نمک و تجزیه‌کنندهٔ فنل از خاک‌های مختلف آلوده با آلاینده‌های نفتی و شور، نمونه‌برداری انجام شد. برای این منظور ۱۵ نمونه خاک آلوده به نفت از نقاط مختلف پالایشگاه قم، شازند اراک، خارک، بی‌بی حکیمهٔ گچساران و جزیرهٔ سیری جمع‌آوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه با الک ۰/۵ میلی‌متر همگن شد و ذرات درشت آن جداسازی شد.

جداسازی مخمرهای تجزیه‌کنندهٔ فنل در محیط حاوی نمک: به‌منظور جداسازی جدایه‌های مخمری با توانایی مصرف فنل در محیط نمکی، از دو روش غنی‌سازی و کشت در پلیت استفاده شد. محیط کشت گلوکز-پپتون-عصارهٔ مخمر[1] (GPY) و مالت آگار[2] (MA) به‌همراه ۲۵۰ppm فنل و ۵درصد NaCl بدین منظور استفاده شد. در روش غنی‌سازی، نمونه‌های خاک همگن‌شده به‌مدت یک هفته در محیط‌های مایع GPY و MB (مالت براث) به‌همراه ۲۵۰ppm فنل ، ۵درصد NaCl و ۵۰ mg/l کلرامفنیکل در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۶۰ rpm گرماگذاری شد. بعد از این مدت ۱۰۰ میکرولیتر از محیط غنی‌شده بر روی محیط کشت دارای کلرامفنیکل و ۵درصد NaCl پخش و به‌مدت یک هفته در انکوباتور گرماگذاری شد. در روش کشت گسترده در پلیت نیز ابتدا از نمونه‌های خاک، رقت‌های 10^{-3} و 10^{-4} تهیه شد و درنهایت ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از رقت‌ها بر روی محیط‌های GPY و MA دارای آنتی‌بیوتیک همراه با ۵درصد NaCl پخش شد. پلیت‌های به‌دست‌آمده در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته در انکوباتور گرماگذاری شدند (۱۰).

سنجش میزان حذف فنل: به‌منظور بررسی توانمندی جدایه‌های به‌دست‌آمده در حذف فنل، هریک از جدایه‌ها در غلظت‌های ۲۵۰-۱۲۵۰ ppm بررسی شدند. به‌منظور سنجش میزان حذف فنل، از روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۷۰ نانومتر استفاده شد (۱۳). منحنی استاندارد غلظت‌های مختلف فنل نیز با همین روش رسم شد. سنجش میزان فنل به‌صورت ۳بارتکرار و در دو آزمایش مستقل انجام شد.

بررسی رشد سویهٔ منتخب در غلظت‌های مختلف فنل: به‌منظور بررسی رشد سویهٔ منتخب و تعیین سمیت فنل بر رشد، محیط حاوی پایه معدنی بر حسب گرم در لیتر شامل $MgCl_2.2H_2O$ (۰/۳گرم) KH_2PO_4 (۴/۳گرم) K_2HPO_4 (۳/۴گرم) به‌همراه ۰/۵گرم عصاره مخمر به‌عنوان فاکتور محرک رشد در یک لیتر آب مقطر و ۵درصد NaCl و فنل به‌عنوان تنها منبع کربن در غلظت‌های ۷۵۰،۱۰۰۰،۱۲۵۰ ppm استفاده شد. شمارش سلولی توسط لام هموسایتومتر و اندازه‌گیری وزن خشک سلولی در طی ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت پس از گرماگذاری انجام شد. سنجش تودهٔ سلولی خشک به‌صورت ۳بار تکرار و در دو آزمایش مستقل و سنجش تعداد سلول دو نمونه به‌صورت جداگانه در هربار شمارش انجام شد.

بررسی میزان حذف فنل توسط سویهٔ منتخب در غلظت‌های مختلف فنل: به‌منظور بررسی توانایی سویهٔ منتخب در حذف فنل، میزان باقیماندهٔ غلظت‌های ppm ۷۵۰،۱۰۰۰،۱۲۵۰ از فنل در محیط مشابه بررسی شد، سنجش میزان فنل باقیمانده در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از گرماگذاری انجام شد. سنجش میزان حذف فنل به‌صورت ۳بارتکرار و در دو آزمایش مستقل انجام شد.

شناسایی جدایهٔ منتخب: به‌منظور شناسایی مولکولی، ابتدا جدایهٔ منتخب در محیط GPY به‌مدت ۲۴ ساعت

در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. تودهٔ زیستی با سانتریفیوژ ۱۰ میلی‌لیتر از کشت در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه جدا شد. سلول‌های مخمر جداشده توسط سانتریفیوژ، بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شدند. در ادامه از طریق شکستن فیزیکی با کمک روش ساییدن زیست‌تودهٔ منجمدشده با استفاده از ازت مایع، سلول‌ها شکسته شدند (۱۴). DNA مخمر به‌روش فنل-کلروفرم استخراج و با الکل رسوب داده شد (۱۴). برای تأیید حضور DNA الکتروفورز افقی با ژل آگاروز ۱درصد صورت گرفت (۱۴). سپس تکثیر ژن *ITS* توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از 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 (۱۵). مخلوط واکنش PCR حاوی ۲ میکرولیتر DNA به‌عنوان الگو، ۱ میکرولیتر از هرکدام از پرایمرها (۱۰ پیکومول)، ۱۲/۵ میکرولیتر 2X Taq DNA polymerase master mix و ۸/۵ میکرولیتر آب مقطر دوبارتقطیر بود. محصول PCR برای تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد(۱۶). برای شناسایی و بررسی نزدیک‌ترین سویه ازلحاظ توالی ژن *ITS* به سویهٔ منتخب، از انطباق توالی به‌دست‌آمده با اطلاعات توالی‌های موجود در پایگاه داده بانک ژنی استفاده شد. به‌منظور انجام هم‌ردیفی چندگانه بین توالی‌ها از برنامهٔ کروماس پرو[۳] استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار بیوادیت[۴] توالی‌های هم‌ردیف‌شده مرتب شد و برای رسم درخت فیلوژنی به کار گرفته شد. در رسم درخت‌های فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار مگا-۶[۵]، از الگوریتم اتصال- همسایگی[۶] استفاده شد. برای اطمینان از تکرارپذیربودن درخت فیلوژنی، میزان بوت استرپ[۷] پس از ۵۰۰ بار تکرار تعیین شد.

نتایج

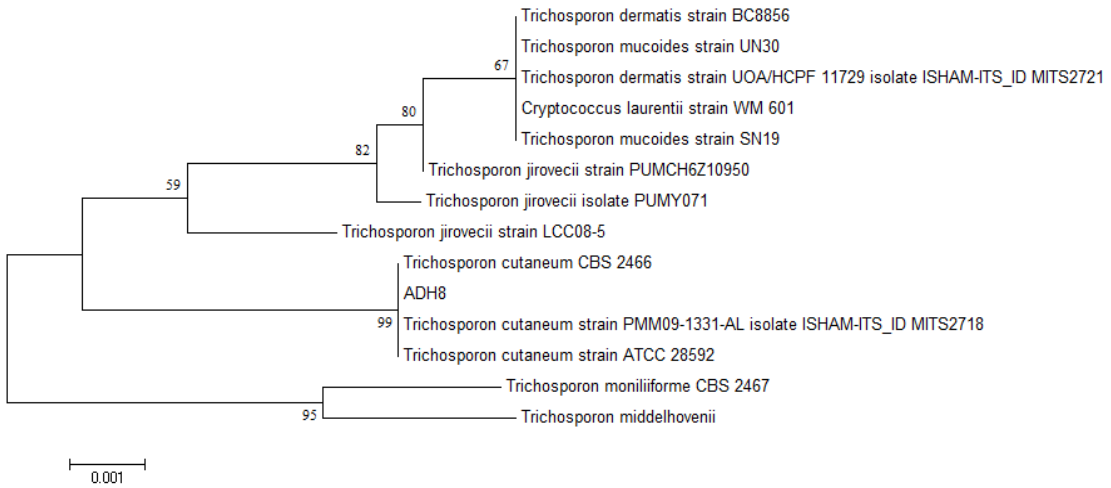
جداسازی جدایهٔ مخمری تجزیه‌کنندهٔ فنل در محیط پایه نمکی: با استفاده از دو روش غنی‌سازی و کشت در پلیت حاوی فنل و نمک، ۱۵ جدایهٔ مخمری جداسازی شدند که در غربالگری‌های بعدی استفاده شدند. جدایه‌های به‌دست‌آمده بعد از بررسی مارکروسکوپی و میکروسکوپی روی محیط GPY خالص‌سازی شدند و برای انجام سنجش میزان حذف فنل استفاده شدند.

سنجش میزان حذف فنل: به‌منظور بررسی توانمندی سویه‌ها در حذف فنل و غربالگری بهترین جدایه، هرکدام از آن‌ها در غلظت‌های ppm ۱۲۵۰-۲۵۰ از فنل بررسی شدند. از ۱۵ سویهٔ جداسازی‌شده، جدایهٔ ADH8 به‌عنوان جدایهٔ منتخب با حداکثر تحمل ppm ۱۲۵۰ و رشد در حضور ۵درصد NaCl انتخاب شد. فنل در غلظت‌های بالاتر از ppm ۱۲۵۰برای این سویه در محیط حاوی ۵درصد NaCl سمیت داشت و باعث کاهش رشد قابلِ‌توجهی در سلول‌های مخمری شد.

شناسایی سویهٔ منتخب: نتایج تعیین توالی و هم‌ردیفی با نزدیک‌ترین سویه‌ها در پایگاه دادهٔ NCBI نشان داد که جدایهٔ ADH8 با میزان شباهت ۱۰۰درصد نزدیک‌ترین سویه به *Trichosporon cutaneum* است. توالی به‌دست‌آمده از *T. cutaneum* با کد دسترسی KT962836 در بانک ژنی ثبت شد. جدول ۱ ویژگی‌های ژن تعیینِ‌توالی‌شده و سویهٔ مشابه به‌دست‌آمده را نشان می‌دهد.

جدول ۱- نتایج حاصل از آنالیز ژن تعیینِ‌توالی‌شده جدایهٔ ADH8

نام جدایهٔ منتخب	شماره دستیابی	تعداد نوکلئوتیدهای تعیینِ‌توالی‌شده	ژن موردنظر	درصد شباهت
Trichosporon cutaneum	KT962836	۵۰۰	*ITS*	۱۰۰

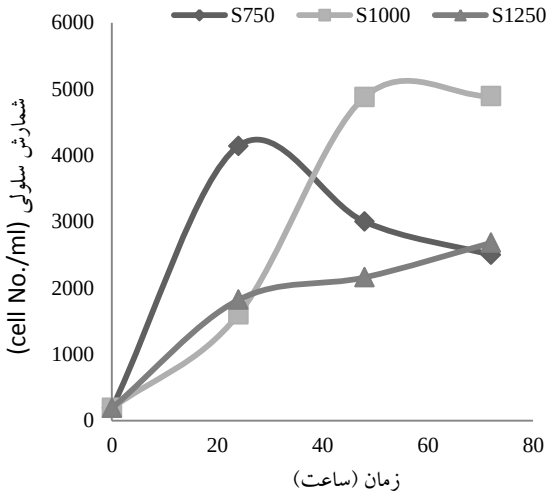


شکل ۱- درخت فیلوژنی با استفاده از پرایمرهای ژن *ITS*، با الگوریتم اتصال- همسایگی و تعیین فاصلهٔ توالی‌ها

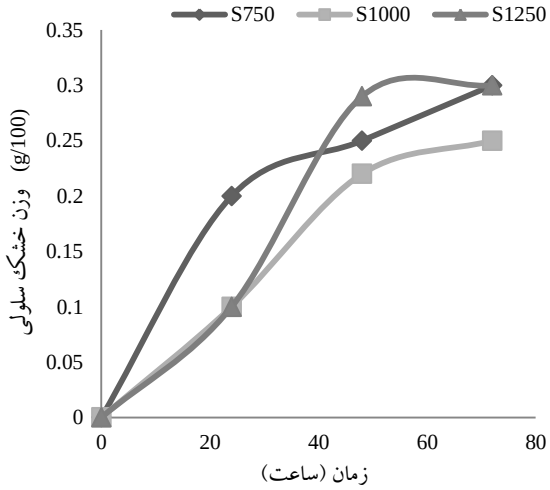
بررسی رشد *T. cutaneum* در غلظت‌های مختلف فنل: بررسی رشد *T. cutaneum* و تعیین میزان سمیت فنل بر رشد در غلظت‌های ۷۵۰ ppm، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ نشان داد که این سویه در غلظت‌های ۷۵۰ ppm و ۱۰۰۰ رشد قابلِ‌توجهی داشته و از فنل به‌عنوان تنها منبع کربن موجود در محیط استفاده کرده است. در غلظت ۷۵۰ ppm حداکثر میزان رشد پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری مشاهده شد (شکل ۲ و۳) و پس از آن به‌دلیل مصرف منبع کربن، کاهش در تعداد مخمرهای زنده دیده شد. ازآنجایی‌که این سویه توانایی رشد و تحمل سمیت در غلظت ۱۰۰۰ ppm را داراست، به‌دلیل منبع کربن در دسترس بیشتر، این سویه نسبت به غلظت ۷۵۰ ppm، رشد بیشتری را نشان می‌دهد. در غلظت ۱۲۵۰ ppm به‌دلیل سمیت موجود در محیط، فاز تأخیر طولانی‌تر و رشد کندتر مشاهده شد و *T. cutaneum* برای استفاده از فنل نیاز به زمان تطبیق بالاتر با شرایط کشت داشته است (شکل ۲ و ۳). با مقایسهٔ وزن خشک سلولی و تعداد سلول‌ها در غلظت‌های ۱۰۰۰ ppm و ۱۲۵۰ در شکل ۲ و۳ مشاهده می‌شود که علی‌رغم انتظار و برخلاف نتایج حاصل از شمارش سلولی در وزن تر مقدار زیست‌توده در غلظت فنل ۱۲۵۰ ppm در مقایسه با ۱۰۰۰ ppm افزایش یافته که ازآنجایی‌که از فنل به‌عنوان تنها منبع کربن موجود محیط کشت است افزایش میزان تودهٔ سلولی در غلظت‌های بالاتر منطقی به نظر می‌رسد هرچند که به‌دلیل سمیت فنل در غلظت ۱۰۰۰ ppm و ۱۲۵۰ نسبت به ۷۵۰ ppm رشد با تأخیر شروع شده است.

بررسی میزان حذف فنل توسط *T. cutaneum* در غلظت‌های مختلف فنل: به‌منظور بررسی توانایی *T. cutaneum* در حذف فنل، در غلظت‌های ۷۵۰، ۱۰۰۰و ۱۲۵۰ ppm ، سنجش فنل در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از گرماگذاری انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که *T.*

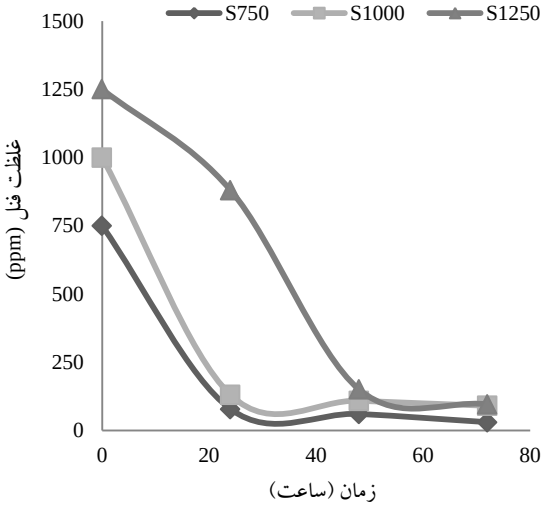
cutaneum توانایی مصرف فنل در غلظت‌های ۷۵۰ ppm و ۱۰۰۰ را داشت و پس از گذشت ۲۴ ساعت تمامی فنل اولیهٔ موجود در محیط را مصرف کرده است. در غلظت ۱۲۵۰ ppm به‌دلیل فاز تأخیر طولانی‌تر و نیاز سویه به تطبق خود به سمیت فنل موجود در محیط، حذف کامل فنل پس از ۴۸ ساعت انجام شد (شکل ۴).



شکل ۲- نمودار رشد: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف فنل بر تعداد سلول‌های زنده موجود در محیط حاوی ۵درصد NaCl کشت *T. cutaneum*



شکل۳- نمودار رشد: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف فنل بر بیومس خشک در محیط حاوی ۵ درصد NaCl کشت *T. cutaneum*



شکل۴- نمودار حذف فنل: بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف بر حذف فنل در محیط حاوی ۵درصد NaCl کشت *T. cutaneum*

بحث و نتیجه‌گیری

از مخمرها به‌صورت گسترده به‌منظور تجزیهٔ زیستی فنل و تولوئن استفاده شده است (۱۷). زیست‌تخریب‌پذیری فنل توسط گونه‌های میانه‌دوست مخمری از جمله *Candida tropicalis* (۱۷)، *C. maltosa* (۱۸)، *C. phenolicus* (۱۹) و همچنین گونه‌های مزوفیل *Trichosporon* (۲۰ و ۲۱) بررسی و مطالعه شده است؛ اما تجزیهٔ زیستی فنل در اکوسیستم‌های آلوده با شرایط سخت محیطی از جمله سرما، گرما، pH بالا و پایین و شوری کمتر موردِتوجه پژوهشگران بوده است (۷ و ۸). در مطالعه‌ای که مارگسین[۸] و همکارانش در سال ۲۰۰۳ انجام داده‌اند از مخمرهای انطباق‌یافته برای رشد در سرما به‌منظور پاکسازی زیستی فنل و هیدروکربن‌های نفتی استفاده شد. در این پژوهش نشان دادند که میزان متابولیسم در مخمرها در مقایسه با باکتری‌ها بالاتر است و می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها به‌منظور پاکسازی زیستی مناطق سرد آلوده استفاده کرد (۲۲). براساس اطلاعات موجود،

در این مطالعه حذف فنل در شرایط نمکی توسط *T. cutaneum* برای اولین بار موردِتوجه قرار گرفته است. البته باید اشاره کرد که در مطالعات مشابه انجام‌شده این جنس به‌عنوان مخمر تجزیه‌کنندهٔ فنل معرفی شده است (۱و۲۱). اما شرایط حذف فنل در این مطالعات در شرایط مزوفیل و بدون استرس بوده است. در مطالعه‌ای که آلکسیویا[۹] و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام داده‌اند، غلظت ۴۰۰ ppm از فنل توسط *T. cutaneum* به ppm ۱۰۰ در شرایط بدون استرس کاهش یافته است (۱). در مطالعهٔ انجام‌شده غلظت ۱۲۵۰ ppm از فنل در حضور ۵درصد NaCl به حدود صفر کاهش داده شده است که این نتایج نشان می‌دهد جدایهٔ منتخب توانایی بالاتری دارد. در مطالعهٔ انجام‌شده بر حذف زیستی فنل در شرایط نمکی باستوس[۱۰] و همکارنش در سال ۲۰۰۰ دو جدایهٔ شامل باکتری *Alcaligenes faecalis* و مخمر *Candida tropicalis* را از رودخانه آمازون جداسازی کردند. در این مطالعه عنوان شد که مخمر *C. tropicalis* قادر به تحمل ۱۵۰۰ ppm فنل در حضور ۱۵درصد نمک است درصورتی‌که باکتری *A. faecalis* مزان تحمل ۱۰۰۰ ppm و ۵/۶درصد نمک را دارد. در این مطالعه میزان حذف فنل بررسی نشده است (۱۰). همچنین Hinteregger و Streichsbier در سال ۱۹۹۷ باکتری تحمل‌کنندهٔ نسبی نمک *Halomonas* sp برای تیمار محیط‌های آلوده فنلی همراه با نمک معرفی کرد. در این پژوهش از غلظت ۱۰۰ ppm فنل و غلظت‌های نمک ۰ تا ۱۴درصد استفاده شد و عنوان شد که بهترین نتایج در غلظت ۵درصد نمک به دست آمد (۲۳). در مطالعهٔ انجام‌شدهٔ دیگری مشخص شده است که *T. cutaneum* توانایی تجزیهٔ ترکیبات زنوبیوتیک مختلف از جمله کروزول، مشتقات فنلی از جمله ۲، ۶ دی نیتروفنل، ۳ نیتروفنل و ۴ نیتروفنل را به‌میزان کمی در شرایط بدون استرس دارد (۲۰). نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش و سایر پژوهش‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که *T. cutaneum* توانمندی بالایی در تجزیهٔ ترکیبات منوآروماتیک از جمله فنل و مشتقات فنلی دارد. براساس نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش مشخص شد که *T. cutaneum* توانایی بالایی در مصرف فنل در شرایط نمکی دارد و به‌عنوان یک سویهٔ ارزشمند قابلیت استفاده در پاکسازی زیستی پساب و خاک‌های آلوده به نمک و شور دارد. براساس نتایج ارائه‌شده در این پژوهش *T. cutaneum* قادر به حذف کامل فنل با غلظت ۱۲۵۰ ppm در طی ۴۸ ساعت و در حضور ۵درصد نمک است. با مقایسهٔ نتایج به‌دست‌آمده با سایر پژوهش‌های انجام‌شده می‌توان چنین ادعا کرد که نتایج ارائه‌شده، میزان حذف فنل را در *T. cutaneum* تا ۳ برابر مقدار گزارش‌شدهٔ قبلی و در حضور ۵درصد نمک نشان می‌دهد. با توجه به آلودگی وسیع خاک و پساب کشور درنتیجهٔ فعالیت صنایع نفت و پتروشیمی، صنایع سیمان و دارویی و غیره و همچین با توجه به شوری ۳ تا ۵درصدی خاک‌های بسیاری از مناطق کشور (۲۴) یافته‌های این پژوهش می‌تواند به‌منظور پاکسازی زیستی خاک و پساب‌های آلودهٔ حاوی نمک موردِتوجه و ارزشمند باشد.

References

(1) Alexieva Z, Gerginova M, Manasiev J, Zlateva P, Shivarova N, Krastanov A. Phenol and cresol mixture degradation by the yeast Trichosporon cutaneum. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008; 35(11):1297–1301.

(2) Singh A, Kumar V, Srivastava JN. Assessment of bioremediation of oil and phenol contents in refinery waste water via bacterial consortium. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology*. 2013; 4(3):145-149

(3) Santos V, Monteiro A, Telles BD, Santoro M. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 2009; 161(2-3): 1413–1420.

(4) Whiteley AS, Bailey MJ. Bacterial community structure and physiological state within an industrial phenol bioremediation. *System Applied and Environmental Microbiology*. 2000; 66(6): 2400-2407.

(5) Adav SS, Chen MY, Lee DJ, Ren NQ. Degradation of phenol by *Acinetobacter* strain isolated from aerobic granules. *Chemosphere*. 2007; 67(8): 1566–1572.

(6) Karigar C, Mahesh A, Nagenahalli M, Yun DJ. Phenol degradation by immobilized cells of Arthrobacter citreus. *Biodegradation*. 2006; 17(1): 47–55.

(7) Margesin R, Gander S, Zacke G, Gounot AM, Schinner F. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles*. 2003; 7(6): 451–458.

(8) Margesin R and Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 2001; 5(2): 73–83.

(9) Woolard CR and Irvine RL. Biological treatment of hypersaline wastewater by a biofilm of halophilic bacteria. *Water Environmental Research*. 1994; 66(3): 230–235.

(10) Bastos AER, Moon DH, Rossi A, Trevors JT, Tsai SM. Salt-tolerant phenol-degrading microorganisms isolated from Amazonian soil samples. *Archive in Microbiolology*. 2000; 174(5): 346–352.

(11) Dastgheib SM, Amozegar MA, Khaje K, Ventosa A. A halotolerant Alcanivorax sp. strain with potential application in saline soil remediation. *Appled Microbiology and Biotechnology*. 2011; 90(1): 305-312.

(12) McGenity TJ, Gramain A. *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Berlin Heidelberg: Springer; 2010.

(13) Santos VLCD, Monteiro ADS, Braga DBB, Santoro MM. Phenol degradation by *Aureobasidium pullulans* FE13 isolated from industrial effluents. *Journal of Hazardous Materials*. 2009; 161(2-3): 1413–1420.

(14) Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning:A Laboratory Manual*. 4rd ed; Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2012.

(15) Uribe-Alvarez C, Ayala M, Perezgasga L, Naranjo L, Urbina H, Vazquez-Duhalt R. First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of Neosartorya fischeri. *Microbial biotechnology*. 2011; 4(5): 663-7.

(16) Green MR, Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 4rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2012.

(17) Jua´rez-Ramı´rez C, Riuz-Ordaz N, Cristiani-Urbina E, Galı´ndez-Mayer J. Degradation kinetics of phenol by immobilized cells of Candida tropicalis in a fluidized bed reactor. *World Journal of Microbiology and. Biotechnology*. 2001; 17(7): 697–705.

(18) Fialova´ A, Boschke E, Bley T. Rapid monitoring of the biodegradation of phenol-like compounds by the yeast Candida maltosa using BOD measurements. *International Biodeterioration and Biodegredation*. 2004; 54(1): 69–76.

(19) Fonseca A, Scorzetti G, Fell JW. Diversity in the yeast *Cryptococcus albidus* and related species as revealed by ribosomal DNA sequence analysis. *Canadian Journal of Microbiolology*. 2000; 46(1): 7–27.

(20) Aleksieva Z, Ivanova D, Godjevargova T, Atanasov B. Degradation of some phenol derivates by Trichosporon cutaneum R57. *Process Biochemistry*. 2002: 37(11): 1215–1219.

(21) Middelhoven WJ, Scorzetti G, Fell JW. *Trichosporon porosum* comb. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast inhabiting soil, related to the loubieri/laibachii group of species that assimilate hemicelluloses and phenolic compounds. *FEMS Yeast Research*. 2001; 1(1): 15–22.

(22) Margesin R, Gander S, Zacke G, Gounot AM, Schinner F. Hydrocarbon degradation and enzyme activities of cold-adapted bacteria and yeasts. *Extremophiles* 2003; 7(6): 451–458.

(23) Hinteregger C and Streichsbier F. *Halomonas* sp, an moderately halophilic strain, for biotreatment of saline phenolic wastewater. *Biotechnology Letter* 1997; 19(11): 1099–1102.

(24) Mehrshad M, Amoozegar MA, Yakhchali B, Shahzedeh Fazeli A. Biodiversity of moderately halophilic and halotolerant bacteria in the western coastal line of Urmia lake. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1(2): 49-70

[1]- Glucose Peptone Yeast extract Agar (GPY)
[2]- Malt Agar
[3]- Chromas pro
[4]- BioEdit
[5]- MEGA6
[6]- Neighbor Joining
[7]- Bootstrap
[8]- Margesin
[9]- Alexieva
[10]- Bastos

Bioremediation of phenol by halotolerant yeast *Trichosporon cutaneum* in saline culture

Hoda Nouri
Ph.D student in Microbial Biotechnology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Iran, hoda.nouri@ut.ac.ir
Hamid Moghimi*
Assistant professor in Microbiology, School of Biology, College of Science, University of Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Phenol and its derivatives are environmental pollutants commonly found in many industrial influents. Despite being toxic, phenol can be utilized by some microorganisms as sole carbon and energy sources.

Materials and methods: In this research, halotolerant phenol biodegrading yeasts were isolated in GPY and MA media containing 250 ppm phenol and 5% NaCl. Among isolated strains, the best strain that was able to utilize phenol in presence of 5% NaCl was selected and identified by PCR of ITS gene. The resistance of the yeast isolate to different phenol concentrations and its toxicity besides phenol degradation at saline culture were investigated by spectroscopic measurement of residual phenol and cell dry weight.

Results: In this research, 15 strains were isolated. Based on their ability for growth in different concentration of phenol and salt, ADH8 was selected as best strain. An inhibitory effect of phenol was observed at concentrations higher than 1250 ppm in presence of 5% NaCl, resulting in significant reduction of growth rates and phenol degradation. At concentration 750 ppm and 1000 ppm of phenol, all of the phenol was consumed after 24 h. Our results revealed that at the concentration of 1250 ppm of phenol, because of phenol toxicity on *T. cutaneum*, growth rate and phenol degradation was different. Higher lag phase and incubation time were observed in this concentration and total removal was detected after 48 h.

Discussion and conclusion: The results indicate that the highly phenol-resistant halotolerant yeast represents a potentially promising means for biodegrading phenol pollution in wastewater treatment effluent and contaminated soil containing salt.

Keywords: Phenol, *Trichosporon cutaneum*, Halotolerant, Bioremediation

* Corresponding author
Received: July 11, 2015 / **Accepted:** December 30, 2015