Introduction of *Fusarium* sp. UTMC 5039 as a potent fungal strain for biosurfactant production and evaluation of its potential for crude oil bioremediation

Hamid Moghimi *
Assistant professor in Microbial Biotechnology, Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, hmoghimi@ut.ac.ir
Parvin Hasani Zadeh
M.Sc in Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, parvin.h.z@gmail.com
Javad Hamedi
Associate professor in Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, jhamedi@ut.ac.ir
Rezvan Heidarytabar
Msc in Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, rezvan_heidary@ut.ac.ir
Ehsan Azin
Msc student in Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran, ehsanazin@ut.ac.ir

Abstract

Introduction: Biosurfactants are biological surface active agents which are used in many applications such as oil bioremediation of contaminated soils.

Materials and methods: In this study, first soil samples were collected from crude oil contaminated regions of Iran. Fungal isolates were enriched in MSM medium supplemented with crude oil and purified and then all isolates were screened for biosurfactant activity. Then, the capacity of crude oil degradation in the selected isolate was measured using Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) assay by spectrophotometry and FT-IR analysis. Finally, morphological and molecular identification was carried out by sequencing amplification of beta-tubuline beta-tubulin and ITS gene.

Results: Among 40 purified fungal isolated, the isolate SH-02 was selected as the best strain according to the oil spreading and parafilm M test., This isolate was purified from petroleum contaminated soil of Arak refinery. Morphological and molecular identification revealed that this isolate has 99% similarity to *Fusarium redolens* in ITS gene and was deposited in the University of Tehran Microorganisms Collection under the accession number, UTMC 5039. Measurement of surface tension reduction by Du Nouy Ring method showed that *Fusarium* sp. UTMC 5039 can reduce surface tension to 26.6 mN/m and this reduction amount is significant compared with the previous reports. According to the obtained results from TPH and FTIR assays, 60 % of crude oil was degraded biodegradation was measured for by *Fusarium* sp. UTMC 5039.

Discussion and conclusion: The current study results indicate that *Fusarium* sp. UTMC 5039 has a high capacity in biosurfactant production and introduced as a potent fungal strain for crude oil bioremediation.

Key words: Biosurfactant, *Fusarium sp.* UTMC 5039, bioremediation, crude oil contaminated soils

* Corresponding author
Received: May 24, 2015 / **Accepted:** December 30, 2015

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۳، پاییز ۱۳۹۶، صفحه ۳۳- ۱۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۳/۰۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

معرفی قارچ *Fusarium* sp. UTMC 5039 به‌عنوان گونهٔ قارچی توانمند در تولید بیوسورفاکتانت و ارزیابی توان آن در حذف زیستی نفت خام

حمقد مقیمی *: استادیار میکروبیولوژی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، hmoghimi@ut.ac.ir
پروین حسنی زاده: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، parvin.h.z@gmail.com
جواد حامدی: دانشیار میکروبیولوژی، بخش زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، jhamedi@ut.ac.ir
رضوان حیدری تبار: کارشناس ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، rezvan_heidary@ut.ac.ir
احسان آذین: دانشجوی کارشناسی ارشد زیست‌فناوری میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و قطب تبارزایی موجودات زنده، دانشگاه تهران، ایران، ehsanazin@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات زیستی فعال در سطح هستند که در بسیاری از حوزه‌ها ازجمله پاک‌سازی زیستی آلودگی‌های نفتی استفاده می‌شوند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ابتدا نمونه‌برداری از مناطق آلوده به نفت ایران انجام پذیرفت. جدایه‌های قارچی در محیط MSM دارای نفت غنی‌سازی و خالص‌سازی‌شده و تمامی جدایه‌های حاصل برای توانایی تولید بیوسورفاکتانت غربالگری شدند. در ادامه توانایی حذف نفت خام جدایهٔ منتخب با استفاده از آزمون‌های سنجش کل محتوای هیدروکربنی با روش اسپکتروفتومتری و طیف‌سنجی مادون‌قرمز (FT-IR) بررسی گردید. درنهایت شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی با تکثیر ژن *ITS* و *بتاتوبولین* انجام شد.

نتایج: براساس روش‌های گسترش روغن و پارافیلم "M"، از میان ۴۰ جدایهٔ قارچی خالص‌سازی‌شده، جدایهٔ SH-02 به‌عنوان قارچ منتخب تولیدکنندهٔ بیوسورفاکتانت از خاک‌های آلوده به نفت پالایشگاه شازنداراک انتخاب شد. شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی مشخص کرد که این جدایه به‌میزان ۹۹درصد با *Fusarim* sp. شباهت دارد و با کد UTMC 5032 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت شد. اندازه‌گیری کاهش کشش سطحی با روش تنسیومتری نشان داد که این سویه قادر است کشش سطحی را به‌میزان ۲۶/۶ میلی‌نیوتن‌برمتر کاهش دهد که این میزان کاهش کشش سطحی در مقایسه با مقادیر گزارش‌شده قابل‌توجه است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از سنجش TPH و آزمایش FTIR میزان حذف نفت توسط این سویه ۶۰درصد تعیین شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که این سویه توانمندی بالایی در تولید بیوسورفکتانت دارد و می‌تواند به‌عنوان سویهٔ قارچی توانمند در حذف هیدروکربن‌های نفتی معرفی شود.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، *Fusarium* sp.UTMC 5032، پاک‌سازی زیستی، خاک آلوده به نفت

* 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

در سال‌های اخیر آلودگی‌های هیدروکربنی ناشی از فعالیت‌های مربوط به صنعت نفت، یکی از مشکلات زیست‌محیطی مهم است. رهاسازی تصادفی محصولات نفتی در محیط به یک نگرانی جهانی تبدیل شده است. ترکیبات هیدروکربنی ازجمله آلاینده‌های آلی و سرطان‌زا هستند. روش‌های مکانیکی و شیمیایی که به‌طور عمومی برای پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی به کار می‌روند هزینه‌بر هستند و کارایی کمی دارند. پاک‌سازی زیستی از روش‌های نویدبخش در تیمار این مکان های آلوده به شمار می‌رود؛ چرا که این روش به انرژی کمی نیازمند است، به‌صرفه و اقتصادی است و منجر به معدنی‌سازی کامل آلاینده می‌شود (۱). رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی هیدروکربن‌های نفتی به‌طور غالب با توانایی تولید پلیمرهایی با خصوصیات کاهش کشش سطحی محیط توسط آنها مرتبط است که به‌طور رایج تحت عنوان بیوسورفکتانت از آنها نامبرده می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها ترکیبات دوگانه‌دوستی هستند که توسط بسیاری از میکروارگانیسم‌ها تولید می‌شوند. وجود گروه‌های آب‌دوست و آب‌گریز در ساختار چنین ترکیباتی سبب می‌شود این مولکول‌ها توانمندی قرارگیری میان دو فاز امتزاج‌ناپذیر و تغییر ویژگی‌های سطحی را دارا باشند (۲). یکی از کاربردهای مهم بیوسورفکتانت‌ها در پاک‌سازی زیستی هیدروکربن‌های نفتی است. بیوسورفاکتانت‌ها می‌توانند هیدروکربن ها را امولسیفیه کنند و با کاهش کشش سطحی حلالیت آنها را در آب افزایش دهند و به این ترتیب باعث افزایش جابجایی مواد نفتی از ذرات خاک شوند و دسترسی زیستی میکروارگانیسم‌ها به این ترکیبات را افزایش دهند (۲ و ۳). حوزهٔ جداسازی و معرفی باکتری‌های مولد بیوسورفاکتانت به‌میزان زیادی مورد مطالعه دانشمندان بوده است؛ ولی تاکنون تعداد کمی از قارچ‌های مولد بیوسورفاکتانت شناسایی و معرفی شده‌اند. قارچ‌ها در مقایسه با باکتری‌ها از بازده بالایی در تولید این ترکیبات برخوردار هستند که علت آن را می‌توان وجود دیوارهٔ سخت و محکم در باکتری‌ها و همچنین سیستم‌های ترشحی کارآمدتر در قارچ‌ها دانست (۴). این بازده تولید بالا می‌تواند استفاده از بیوسورفاکتانت‌های قارچی در صنعت و جایگزینی سورفاکتانت‌های با پایهٔ شیمیایی را ممکن سازد (۴). میکروارگانیسم‌ها بیوسورفکتانت‌ها را به‌عنوان متابولیت ثانویه، در انتهای فاز لگاریتمی و در طول فاز سکون تولید می‌کنند. این ترکیبات بعد از تولید، به خارج از سلول ترشح و یا به بخشی از سلول متصل می‌مانند. تولید این ترکیبات توسط میکروارگانیسم‌ها امکان رشد آنها بر روی سوبستراهای نامحلول را فراهم می‌سازد (۲). بیوسورفکتانت‌ها نسبت به سورفکتانت‌های شیمیایی زیست‌تخریب‌پذیر و سازگار با محیط زیست هستند و دارای سمیت کمتر، کارایی و پایداری بیشتر در شرایط سخت ازجمله دما، شوری و اسیدیته بالا هستند؛ به این دلیل می‌توانند در بسیاری از زمینه‌ها از جمله حذف آلاینده‌های نفتی به‌روش زیستی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای سورفکتانت‌های شیمیایی به کار برده شوند (۵). هدف این پژوهش، مطالعه و دستیابی به جدایه‌های قارچی بومی و توانمند در جهت تولید ترکیبات فعال سطحی و همچنین ارزیابی آن در حذف زیستی نفت خام است. برای این منظور بعد از نمونه‌برداری و جداسازی ایزوله‌های قارچی از محیط‌های آلوده با روش‌های استاندارد میزان تولید ترکیبات فعال درسطح در آنها بررسی می‌شود و فعالیت نفت‌خواری در بهترین جدایه بررسی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: به‌منظور جداسازی قارچ‌های مولد بیوسورفاکتانت، ۱۵ نمونه خاک آلوده به نفت از نقاط مختلف پالایشگاه قم، شازند اراک، خارک، بی‌بی حکیمه 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. در ادامه pH و هدایت الکتریکی خاک‌ها به‌منظور بررسی شوری خاک اندازه‌گیری و جهت جداسازی جدایه‌ها استفاده شد.

جداسازی قارچ‌های تولیدکنندهٔ بیوسورفاکتانت: جداسازی قارچ‌ها از نمونه‌های جمع‌آوری‌شده به‌روش غنی‌سازی با نفت صورت گرفت. محیط کشت مورداستفاده در فرایند غنی‌سازی، محیط تغییریافتهٔ پایهٔ نمکی[1] همراه با یک‌درصد نفت خام سبک جزیرهٔ سیری به‌عنوان منبع کربن و ۵۰ میلی‌گرم‌برلیتر کلرامفنیکل به‌منظور مهار رشد باکتریایی بود. 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) درصد در یک لیتر آب 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. تمامی نمک‌های به‌کاربرده‌شده در محیط کشت مربوط به شرکت مرک آلمان است. pH اولیه پیش از اتوکلاو ۰٫۲±۶/۸ تنظیم شد (۶). ۰/۵ گرم از هر نمونه خاک درون فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت تلقیح شد. سپس فلاسک‌ها به‌مدت دو هفته در شیکر با دور ۱۸۰ و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار گرفت. درنهایت رقت‌های 10^{-2}، 10^{-3} و 10^{-4} از هر فلاسک تهیه و بر روی پلیت PDA[2] حاوی نفت خام به‌روش کشت گسترده[3] پخش شد و پلیت‌ها به‌مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گرماگذاری گردید. کلنی‌های رشدکرده درون هر پلیت، خالص شد و جدایه‌های قارچی خالص‌شده در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

غربالگری جدایه‌های توانمند در تولید بیوسورفکتانت: محیط کشت مورداستفاده به‌منظور غربالگری جدایه‌های به‌دست‌آمده حاوی: (۳درصد) $NaNO_3$، (۰/۲۵درصد) KH_2PO_4، (۰/۲۵درصد) $MgSO_4(7H_2O)$، ۱درصد عصارهٔ مخمر و ۵درصد روغن آفتابگردان بود و pH آن در ۷ تنظیم شد (۷). بدین منظور درون هر فلاسک ۲۵۰ حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت یک قطعه یک سانتی‌متر مربع از کشت تازهٔ قارچی تلقیح شد. فلاسک‌های تلقیح‌شده به شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سانتیگراد منتقل شدند. بعد از ۷ روز محتویات هرکدام از فلاسک‌ها سانتریفوژ و مایع رویی از کاغذ صافی عبور داده شد. در ادامه روغن باقیمانده با دکانتور جدا شد. درنهایت حضور بیوسورفکتانت در سوپرناتانت مربوط به هر جدایه با استفاده از روش گسترش روغن[4]، روش پارافیلم[5] و تنسیومتری[6] بررسی و اندازه گیری شد (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱).

روش گسترش روغن: در این روش ابتدا ۴۰ml آب‌مقطر درون یک پلیت شیشه‌ای با قطر ۱۵ cm ریخته و ۲۰ µl نفت خام در مرکز این پلیت اضافه شد. سپس ۱۰ µl از نمونهٔ موردبررسی در مرکز لایهٔ نفت حاصله ریخته شد و قطر هالهٔ شفاف ایجادشده به‌عنوان معیاری از تولید بیوسورفاکتانت اندازه‌گیری شد (۸).

آزمون پارافیلم M: در این روش، ۲۵ میکرولیتر از صاف‌شدهٔ کشت تخمیر مایع هفت‌روزه از ایزوله‌های قارچی، بر روی پارافیلم به‌عنوان یک سطح آب‌گریز آزمایشگاهی قرار داده شد و قطر قطرهٔ حاصله به‌عنوان معیاری از تولید بیوسورفاکتانت در مقایسه با نمونهٔ شاهد بررسی شد (۹، ۱۰).

تأیید تولید بیوسورفاکتانت با تنسیومتری: این کار به‌روش حلقه دونوی[۷] انجام شده که اساس آن 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. به این منظور کشش سطحی سوپرناتانت کشت مایع قارچی با استفاده از دستگاه تنسیومتر دیجیتال مدل اتنشن ۷۰۱[۸] سنجش شد (۱۱).

شناسایی مورفولوژیک و مولکولی جدایهٔ منتخب: جدایهٔ قارچی با بیشترین توانمندی در تولید ترکیبات فعال سطحی برای شناسایی انتخاب شد. مورفولوژی ماکروسکوپی (ظاهر، اندازه، شکل و رنگ کلنی) با مشاهده پلیت PDA حاوی میسلیوم‌های این جدایه تعیین شد. ویژگی‌های میکروسکوپی جدایهٔ منتخب نیز با تهیهٔ کشت روی لام و رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن‌بلو تعیین شد (۱۲). به‌منظور شناسایی مولکولی، ابتدا جدایهٔ قارچی در محیط PDB به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد گرماگذاری شد. سپس میسلیوم قارچی با سانتریفیوژ از محیط کشت جدا شد و بعد از شستشو با سرم فیزیولوژی در هاون ریخته شد. در ادامه ازطریق شکستن فیزیکی با کمک روش کوبیدن زیست‌تودهٔ منجمدشده با استفاده از ازت مایع، سلول‌ها شکسته و DNA حاصل به‌روش استخراج با فنل-کلروفرم جداسازی شد (۱۳). 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 (به‌نسبت 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 شده 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 ۱۳۰۰۰ rpm 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. واکنش PCR جهت شناسایی مولکولی با دو پرایمر ITS و بتاتوبولین انجام شد. در ابتدا با پرایمرهای اختصاصی قارچی ITS1 و ITS4 (ITS1: 5′-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3′ و ITS4: 5′-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3′) و سپس جهت تأیید نتایج و شناسایی گونهٔ قارچی با پرایمرهای بتاتوبولین (Btsa: 5′-GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC-3′ و BT1b: 5′-GAC GAG ATC GTT GAA CTC-3′) انجام پذیرفت (۱۴). برای اضافه‌کردن مواد جهت 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 آماده شرکت آمپلیکون دانمارک[۹] اضافه شد و حجم نهایی ویال با آب مقطر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانیده شد. برنامهٔ PCR به‌صورت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد تقلیب اولیه انجام شد و در ادامه ۳۰ سیکل دمایی به‌صورت 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. محصول به‌دست‌آمده بعد از خالص‌سازی از روی ژل جهت تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی[۱۰] ارسال شد. نتایج تعیین ترادف، ازطریق هم‌ردیفی توالی با بانک ژنی NCBI ارزیابی شد. درنهایت سویهٔ منتخب در بانک میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران[۱۱] ثبت و نگهداری شد. در رسم درخت‌های فیلوژنی، از الگوریتم اتصال- همسایگی[۱۲] برای هم‌ردیفی و تعیین فاصلهٔ توالی‌ها استفاده شد. برای اطمینان از تکرارپذیربودن درخت فیلوژنی، میزان بوت استرپ[۱۳] پس از ۵۰۰ بار تکرار تعیین شد.

بررسی توانمندی جدایهٔ منتخب در تخریب نفت خام: جهت تعیین توانمندی حذف و میزان رشد جدایهٔ به‌دست‌آمده در نفت خام، در ابتدا جدایهٔ قارچی با استفاده از روش سنجش کل محتوای هیدروکربنی ازطریق اسپکتروفتومتری[۱۴] براساس روش رحمان و همکاران (۱۵) و نیز اندازه‌گیری میزان رشد قارچی (سنجش زیست‌توده خشک) ارزیابی شد. در ادامه نیز با استفاده از روش طیف‌سنجی FTIR جهت تأیید میزان حذف ترکیبات نفتی موردسنجش قرار گرفت (۱۶).

در این راستا، جدایهٔ منتخب در محیط کشت پایهٔ نمکی MSM (نفت به‌عنوان تنها منبع کربن) و نیز PDB (نفت خام به‌عنوان مکمل منبع کربن) دارای ۱ و ۲درصد نفت خام کشت داده شد. سپس قطعه‌ای با قطر یک سانتیمتر از کشت تازه قارچی هفت‌روزه، پانچ شد و به فلاسک‌های ارلن مایر ۵۰ میلی‌لیتر حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت استریل دارای ۱درصد نفت خام تلقیح شد. نمونهٔ شاهد نیز بدون تلقیح قارچی برای تأیید میزان حذف نفت در نظر گرفته شد. فلاسک‌های تلقیح‌شده در سه تکرار به‌مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد در شیکر انکوباتور با ۱۸۰ دور در دقیقه برای رشد و استفاده قارچ از هیدروکربن‌های نفتی گرماگذاری شد. پس از گذشت دو هفته، فلاسک‌ها جهت استخراج کل محتوای هیدروکربنی و تعیین میزان نفت باقیمانده بررسی شد و میزان جذب نمونه‌های حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر شیماتزو UV160[۱۵] در طول‌موج ۴۲۰ نانومتر تعیین گشت. نهایتاً برای تعیین میزان حذف نفت، جذب نمونه‌های تیمار با نمونهٔ شاهد مقایسه شد و میزان حذف گزارش گردید (۱۷).

اندازه‌گیری کل محتوای هیدروکربنی: برای آنالیز میزان کلی هیدروکربن‌ها از روش جذب پرتو مادون‌قرمز IR استفاده شد. عدد حاصل از این آنالیز با تعداد پیوندهای کربن-هیدروژن موجود در نمونه رابطهٔ مستقیم دارد و متناسب با کشش گروه‌های CH_2 باندهای آلیفاتیکی است (۱۸)؛ به این منظور، در انتهای روز ۱۵ محتوای هیدروکربنی باقیمانده در محیط کشت با حلال تتراکلرید کربن استخراج شد و با استفاده از سل مایع، طیف جذبی نمونه‌ها در باند بین $2000 cm^{-1}$ تا $3000 cm^{-1}$ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مادون‌قرمز مدل پرکینلمر[۱۶] آنالیز شد. درنهایت میزان حذف نفت با توجه به نمونهٔ شاهد تعیین شد (۱۶).

اندازه‌گیری میزان زیست‌توده: به‌منظور سنجش میزان زیست‌توده، وزن خشک میسلیوم‌های قارچی اندازه‌گیری شد. برای این منظور زیست‌تودهٔ قارچی حاصل در محیط پایهٔ نمکی و دارای ۱درصد نفت خام کشت و بعد از اندازه‌گیری میزان حذف نفت، از محیط کشت با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ جدا شد و به‌مدت یک شبانه‌روز در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. سپس وزن خشک به‌دست‌آمده براساس گرم‌درلیتر گزارش شد (۱۶).

نتایج

جداسازی قارچ‌های تولیدکننده بیوسورفاکتانت: ویژگی نمونه‌های مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. از ۱۵ نمونهٔ خاک آلوده به نفت جمع‌آوری‌شده با انجام عمل غنی‌سازی ۴۰ جدایهٔ قارچی مختلف با ویژگی‌های مورفولوژیکی متفاوت جداسازی و خالص‌سازی شد و کلونی‌های مشابه جداسازی‌شده از محیط‌های یکسان حذف شدند.

براساس نتایج آزمون پارافیلم M و گسترش روغن از بین ۴۰ جدایهٔ حاصل، ۵ جدایهٔ برتر به‌عنوان قارچ‌های منتخب برای مراحل بعدی انتخاب شد (جدول ۲).

جدول ۱- نتایج آزمایش‌های مربوط به ۵ جدایهٔ برتر در آزمون‌های بیوسورفکتانت با روش پارافیلم M آزمایشگاهی و گسترش روغن؛ ++ نشان‌دهندهٔ پخش گستردهٔ قطره (بالای ۱۰ میلی‌متر) و + نشان‌دهندهٔ پخش محدودتر (کمتر از ۱۰ میلی‌متر) قطره نسبت به شاهد روی سطح پارافیلم

جدایه	قطر هاله (cm) در روش گسترش روغن	تست پارافیلم M
SH-1	۵/۵	++
SH-12	۴	+
SH-50	۴/۵	+
SH-53	۳	+
SH-02	۸/۵	++
شاهد	۰	-

جدول ۲- خاک‌های نمونه‌گیری‌شده از مناطق آلوده به نفت و بررسی برخی از خصوصیات خاک‌ها

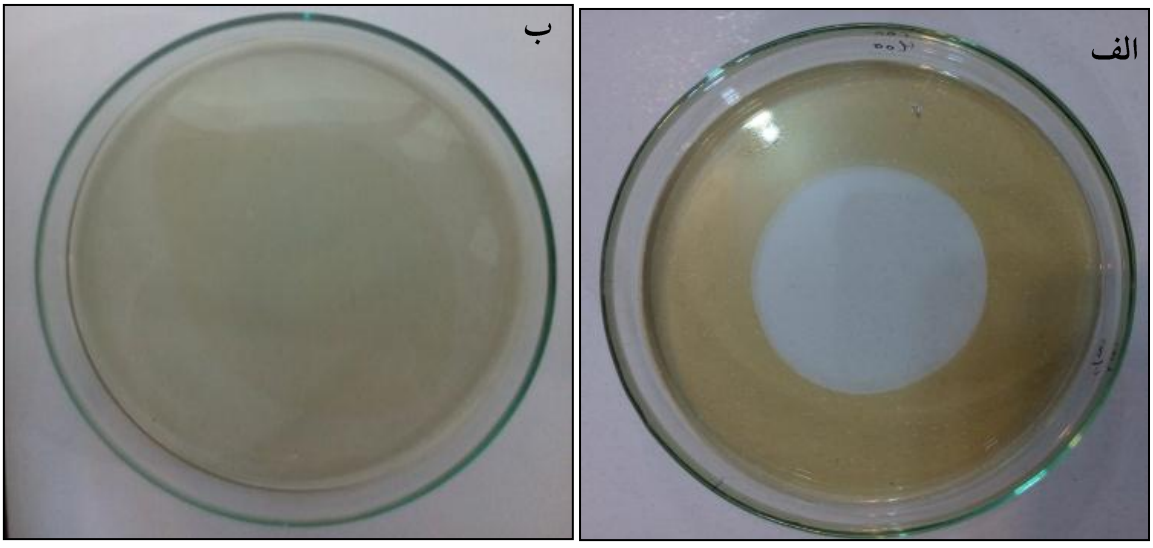
محل نمونه‌برداری	موقعیت جغرافیایی (ثانیه-دقیقه-درجه)	علت آلودگی	EC (ds/m)	pH
خارک	N: ۲۹ ۱۳ ۴۰/۹ E: ۵۰ ۱۸ ۱۱/۵	مناطق ذخیرهٔ نفت	۶	۶/۵
سیری	N:۲۵ ۵۴ ۵۱ E :۵۴ ۳۱ ۳۸	پایان/ اصلی صادرات نفت کشور	۵/۸	۷/۳
شازند اراک	N :۳۴ ۵ ۸ E :۴۹ ۴۱ ۲	پالایشگاه نفت	۳/۲۱	۷/۲
بی‌بی حکیمه	N :۳۰ ۱۴ ۰ E :۵۰ ۱۱ ۱۵,۲	شکستگی در خطوط انتقال نفت	۷/۲	۸

انتخاب جدایهٔ برتر براساس کاهش میزان کشش سطحی: کشش سطحی یکی از معیارهای اصلی نشان‌دهندهٔ تولید مواد فعال در سطح است. جهت انتخاب برترین جدایه در تولید بیوسورفاکتانت، کشش سطحی کشت جدایه‌های منتخب انتخابی سنجش شد. جدول ۳ کشش سطحی جدایه‌های ذکرشده و محیط شاهد را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه کاهش کشش سطحی تا زیر ۴۰ میلی‌نیوتن‌برمتر شاخص تولید بیوسورفاکتانت در نظر گرفته می‌شود (۱۹)، بررسی تولید بیوسورفاکتانت نشان داد که جدایهٔ SH-02 با کاهش قابل‌توجهی در کشش سطحی مایع تخمیر قارچی نسبت به سایر جدایه‌ها، در تولید ترکیبات زیستی فعال در سطح، توانمندتر است و کشش سطحی در محیط را به‌میزان ۲۶/۶ میلی‌نیوتن‌برمتر در مقایسه با آب مقطر ۶۹/۶۶ میلی‌نیوتن‌برمتر و محیط کشت ۴۵/۶ میلی‌نیوتن‌برمتر کاهش می‌دهد (جدول ۳).

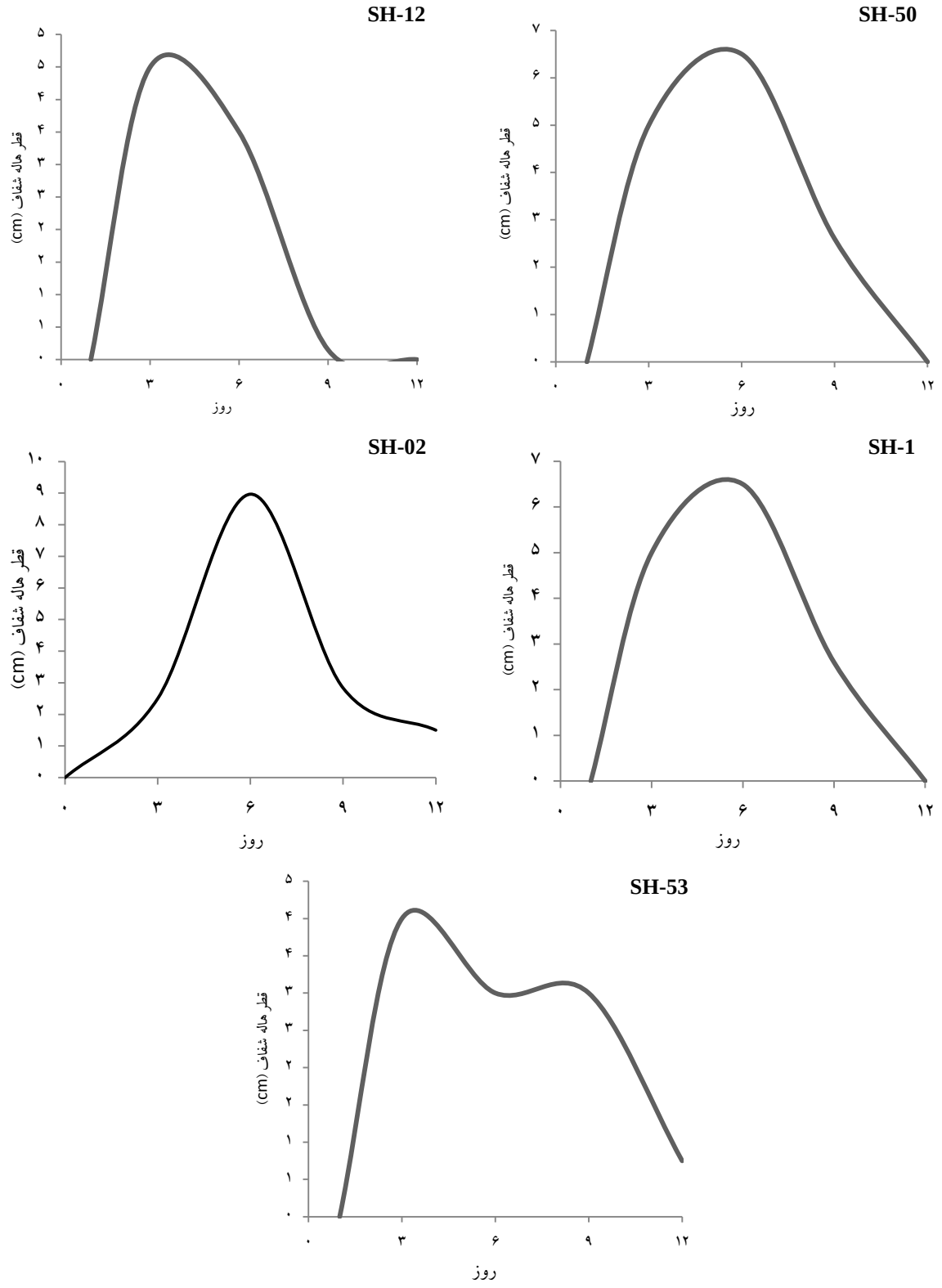
جدول ۳- کشش سطحی حاصل از ۵ جدایهٔ انتخابی

نام جدایه	کشش سطحی (میلی‌نیوتن‌برمتر)
SH-1	۳۴/۰±۰ /۳
SH-12	۳۸/۱±۰/۰۵
SH-50	۳۹/۰± /۳
SH-53	۴۱±۰/۵
SH-02	۲۶/۶±۰/۰۱
آب	۶۹/۶۶±۰/۲۳
محیط کشت بدون تلقیح (شاهد)	۴۴/۵۷±۰/۰۳

برای تعیین زمان حداکثر تولید بیوسورفاکتانت توسط این سویه، میزان تولید بیوسورفکتانت در طی ۱۲ روز ارزیابی شد؛ در این راستا، هالهٔ شفاف تولیدی در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲ اندازه‌گیری شد (شکل۱). به این ترتیب با رسم نمودار حاصل، مشخص شد که SH-02 بیشترین تولید بیوسورفکتانت را در روز ۶ با قطر هالهٔ ۹ سانت‌متر دارد (شکل۲).

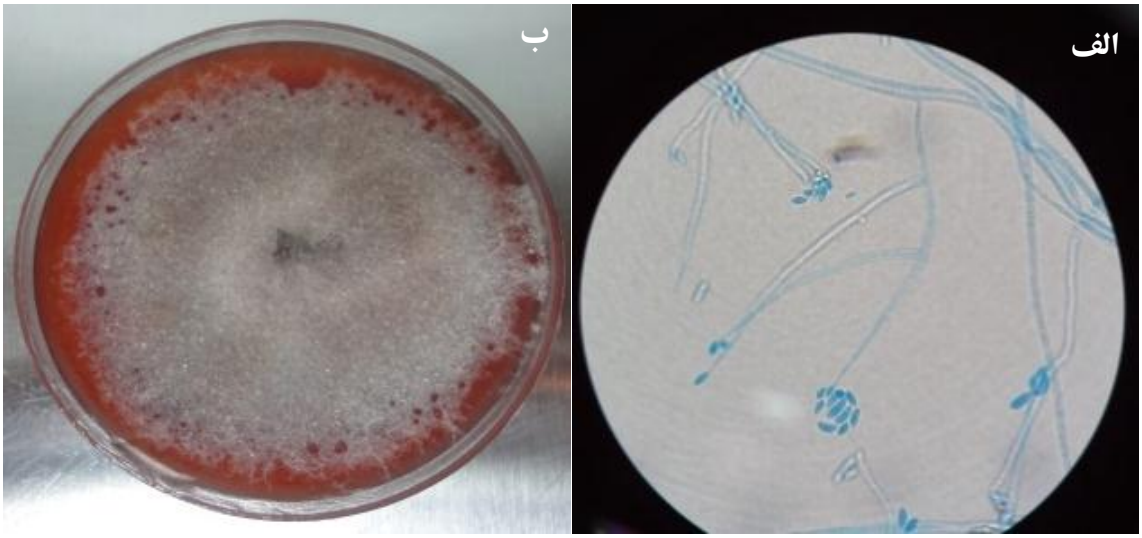


شکل ۱- آزمون گسترش روغن، تولید هالهٔ شفاف به قطر ۸/۵ سانتیمتر با اضافه‌کردن سوپرناتانت کشت SH-02 در روز ۷ تخمیر



شکل ۲- نمودار تولید بیوسورفکتانت در روزهای مختلف با استفاده از روش گسترش روغن توسط جدایهٔ SH-02، SH-53 SH-1، SH-50و SH-12

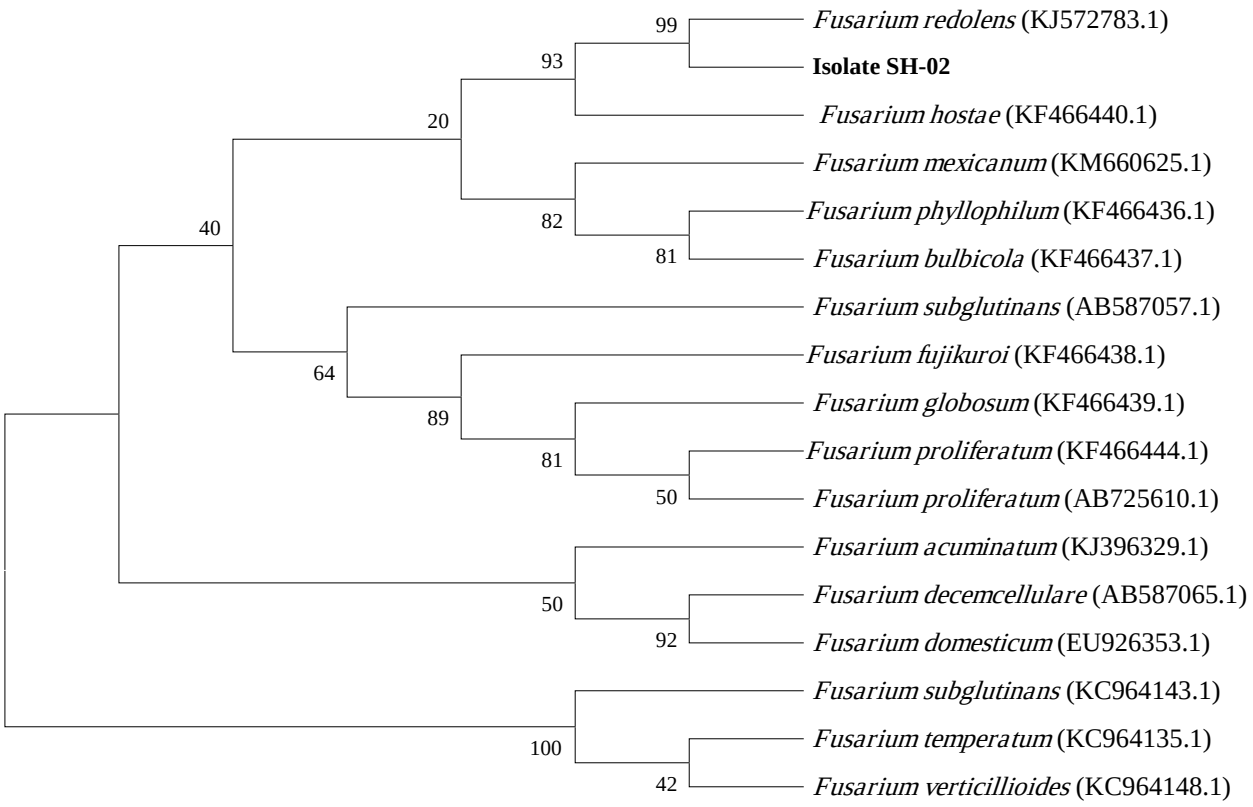
شناسایی مورفولوژیک و مولکولی جدایهٔ منتخب: بررسی‌های ریخت‌شناسی کلنی و کشت روی لام تهیه‌شده از قارچ منتخب و آرایش و حالت میکروکنیدی‌های داسی شکل مشاهده شده در جدایهٔ SH-02 نشان‌دهندهٔ این است که این جدایه به جنس *Fusarium* شباهت نزدیکی دارد (شکل ۳). نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی مولکولی و تعیین ترادف ژن‌های *ITS* و *بتاتوبولین* و مقایسهٔ توالی به‌دست‌آمده در بانک ژنی NCBI نشان داد که جدایهٔ SH-02 با میزان شباهت ۹۹ درصد متعلق به *Fusarium* sp. است. این جدایه در بانک ژنی با کد دستیابی KT881548 ثبت شد و با کد *Fusarium* sp. UTMC 5039 در کلکسیون میکروارگانیسم‌های دانشگاه تهران ثبت و نگهداری شد.



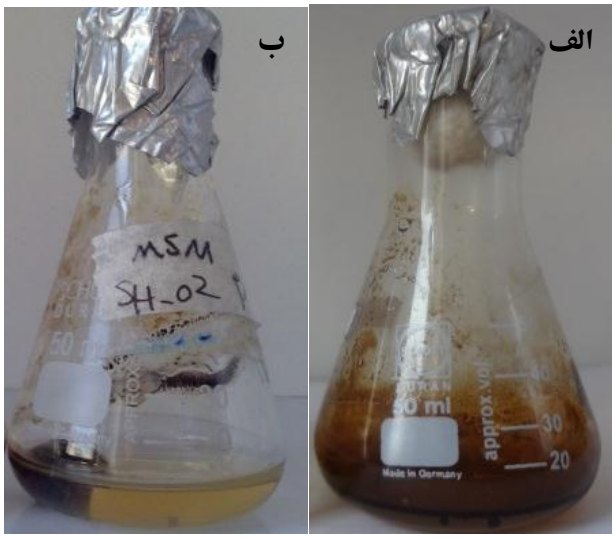
شکل ۳- الف) شمای میکروسکوپی، ب) مورفولوژی کلنی *Fusarium* sp. UTMC 5039

توالی ژن *بتاتوبولین* قارچ‌های مشابه و جدایهٔ SH-02 به‌کمک نرم‌افزار کلاستال X [17]، هم‌ردیف‌سازی شد و درخت فیلوژنی آن با الگوریتم اتصال- همسایگی و با استفاده از نرم‌افزار مگا ۵ رسم شد. موقعیت فیلوژنی جدایه SH-02 با *Fusarium* sp. در شکل ۴ نشان داده شده است.

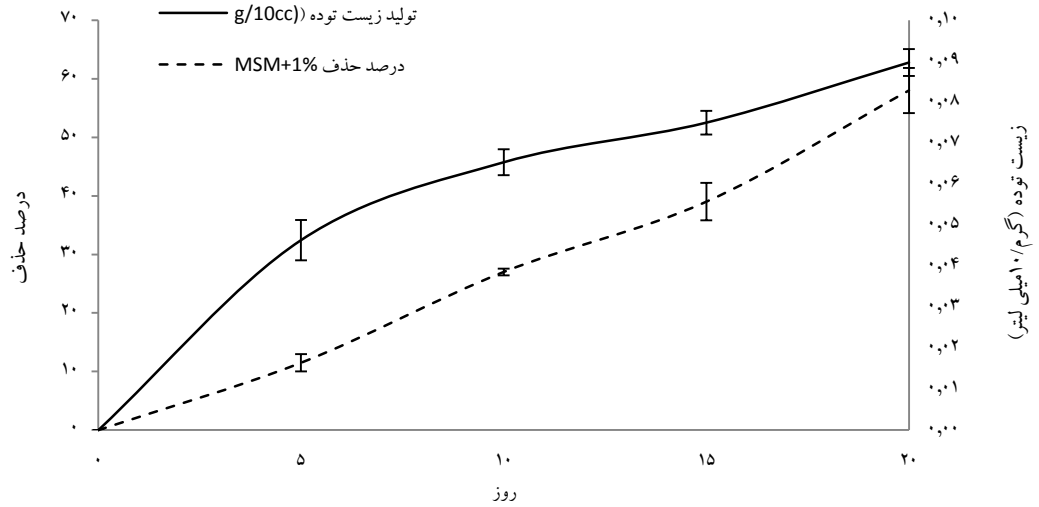
سنجش توانایی تخریب نفت خام توسط *Fusarium* sp. UTMC 5039: به‌منظور بررسی توانایی حذف *Fusarium* sp. UTMC 5039 در محیط‌های کشت ساده و پیچیده نمودار تولید زیست‌توده و حذف ترکیبات نفتی در محیط کشت پایهٔ نمکی و محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز براث دارای یک‌درصد نفت خام، در طی روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ بعد از انکوباسیون مورد سنجش کل محتوای هیدروکربنی باقیمانده قرار گرفت. این سویه در هر دو محیط قادر به حذف نفت خام بود (شکل۵). نتایج حاصل از این مرحله در شکل ۶ و ۷ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، این سویه در حذف نفت خام توانمند است و در محیط پایهٔ نمکی به‌میزان ۶۰درصد و در محیط کمپلکس PDB حدود ۹۰درصد ترکیبات نفتی را در طی مدت ۲۰ روز استفاده می‌شود (شکل ۶ و ۷).



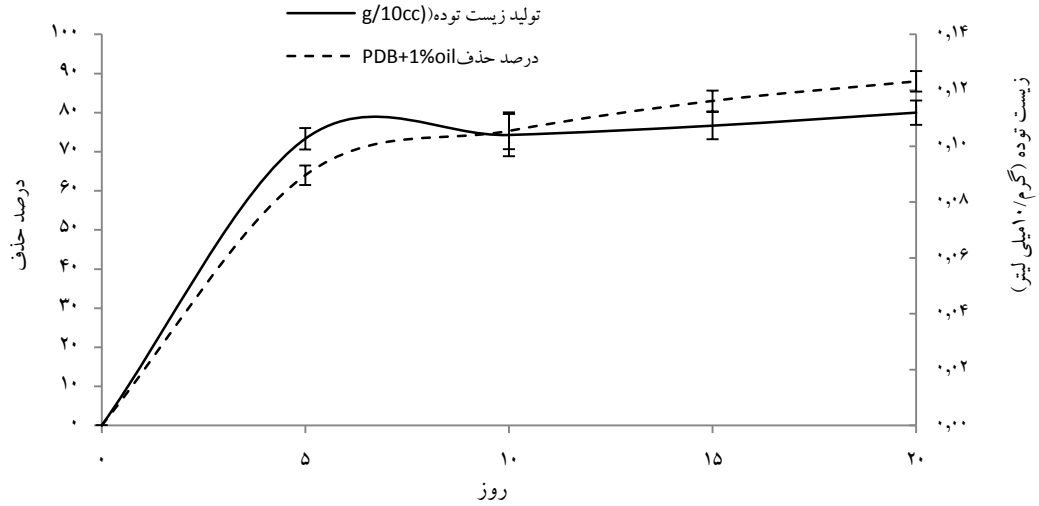
شکل ۴- درخت فیلوژنی جدایهٔ منتخب SH-02 با استفاده از پرایمرهای *بتاتوبولین*، با الگوریتم اتصال- همسایگی برای هم‌ردیفی و تعیین فاصلهٔ توالی‌ها و نیز نرم‌افزارهای مگا۵، این جدایه بیشترین نزدیکی را به سویهٔ *Fusarium* sp. UTMC 5039 نشان داد.



شکل ۵- حذف زیستی نفت خام *Fusarium* sp. UTMC5039 در محیط کشت MSM الف) شاهد، ب) تلقیح‌شده با قارچ



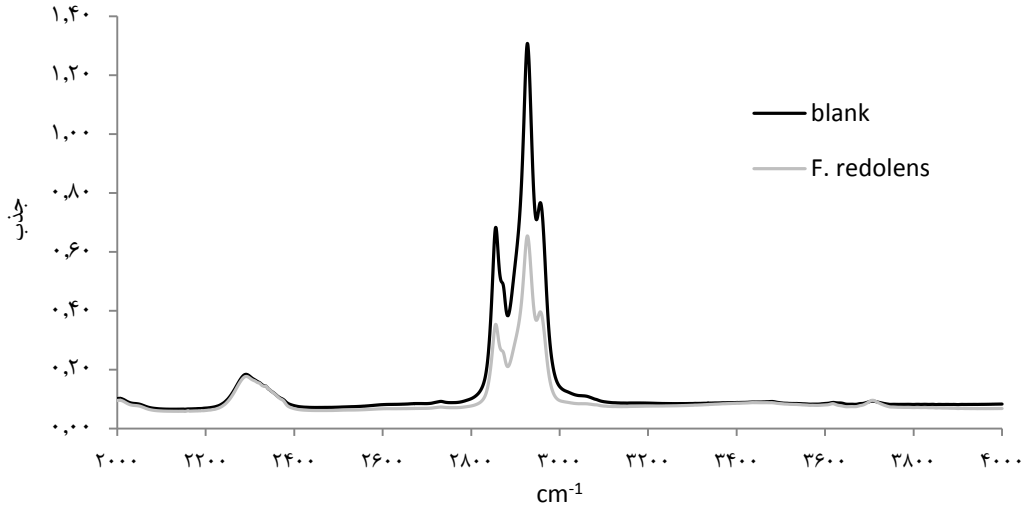
شکل ۶- مقایسهٔ درصد حذف و تولید زیست‌توده در محیط پایهٔ نمکی دارای یک‌درصد نفت خام توسط سویهٔ *Fusarium* sp. UTMC5039



شکل ۷- مقایسهٔ درصد حذف و تولید زیست‌توده در محیط PDB دارای یک‌درصد نفت خام توسط سویهٔ *Fusarium* sp. UTMC 5039

نتایج بررسی تعیین توان تحمل شرایط سمی نفت خام توسط *Fusarium* sp. UTMC 5039، در حضور ۲درصد نفت خام در دو محیط پایهٔ نمکی و کمپلکس در انتهای روز ۲۰ نشان می‌دهد که افزایش میزان نفت، حذف را به ۲۵درصد در محیط پایهٔ نمکی و ۴۳درصد در محیط PDB کاهش می‌دهد. افزایش سمیت و کاهش سطح دسترسی میکروارگانیسم به هوا را می‌توان دلیل این نتیجه عنوان کرد.

در ادامه به‌منظور تخمین دقیق میزان حذف ترکیبات آلیفاتیک موجود در نفت توسط گونهٔ *Fusarium* sp. UTMC 5039 بعد از ۲۰ روز کشت سویهٔ موردنظر در محیط پایهٔ نمکی حاوی ۱درصد نفت خام، طیف‌سنجی فروسرخ انجام شد و میزان حذف با توجه به نمونهٔ شاهد بدون تلقیح تعیین گردید. نمودار به‌دست‌آمده نشان داد که این گونه بیشتر از ۵۰درصد ترکیبات آلیفاتیک را در مقایسه با نمونهٔ شاهد حذف کرده است (شکل ۸).



شکل ۸- طیف FTIR مربوط به *Fusarium* sp. UTMC5039 در مقایسه با نمونهٔ شاهد

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به اهمیت فوق‌العادهٔ بیوسورفکتانت در صنعت در حال حاضر، دستیابی به سویه‌ای توانمند با بازده بالا از اهمیت زیادی برخوردار است. میکروارگانیسم‌های متنوعی شامل باکتری‌ها، کپک‌ها و مخمرها قادر به تولید بیوسورفکتانت هستند؛ ولی اکثر مطالعات صورت گرفته در این حوزه مربوط به باکتری‌ها است (۲۰). اکثر باکتری‌های تولیدکنندهٔ بیوسورفاکتانت گزارش‌شده در مقالات به جنس‌هایی از *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Acinetobacter* و *Arthrobacter* تعلق دارند که به‌علت بیماری‌زابودن بسیاری از این باکتری‌ها، کاربرد آنها به‌خصوص در صنایع غذایی و دارویی محدود شده است (۲۱)؛ در این راستا با وجود اینکه قارچ‌ها توانایی زیادی در تولید ترکیبات فعال سطحی دارند، کمتر بررسی شده‌اند و تاکنون تعداد کمی قارچ مورد مطالعه قرار گرفته است. سویه‌های معرفی‌شده در این زمینه غالباً مخمرند و متعلق به سه جنس *Candida*، *Pseudozyma* و *Yarrowia* هستند. البته اخیراً نیز گزارش‌هایی از تولید بیوسورفکتانت توسط گونه‌های کپکی *Cunninghamella echinulata* و جنس *Aspergillus* منتشر شده است (۴). براساس یافته‌های بودور[18] و همکاران خاک‌های آلوده به نفت بازده بیشتری در جداسازی میکروارگانیسم‌های مولد بیوسورفکتانت دارند (۲۲). به این منظور جداسازی و غنی‌سازی از خاک‌های آلوده به نفت صورت گرفت تا احتمال دستیابی به سویهٔ مولد افزایش یابد. براساس نتایج رادوان[19] و همکاران تولید بیوسورفکتانت توسط یک میکروارگانیسم وابسته به جذب سوبستراهای آب‌گریز توسط آن میکروارگانیسم است. در این پژوهش علاوه بر نمونه‌گیری از مناطق آلوده به نفت به‌منظور افزایش شانس جداسازی ایزوله‌های توانمند، مشاهده شد که در حضور سوبسترای آب‌گریز مانند روغن و نفت این سویه قادر به تولید بیوسورفکتانت است (۲۳).

با مقایسهٔ نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش با مقادیر گزارش‌شده در مقالات، قارچ منتخب *Fusarium* sp. UTMC 5039 با تولید هالهٔ شفاف در آزمون گسترش روغن به‌میزان ۹ سانتیمتر مولد بیوسورفکتانت است و کشش سطحی محیط را به‌میزان ۲۶/۶ میلی‌نیوتن‌برمتر کاهش می‌دهد که این میزان کاهش کشش سطحی در مقایسه با مقادیر گزارش‌شده قابل‌توجه است. به‌عنوان مثال

در پژوهشی که سیلوا[۲۰] و همکاران انجام داده‌اند، قارچ *Cunninghamella echinulata* به‌عنوان مولد بیوسورفکتانت کشش سطحی محیط کشت را به‌میزان ۳۶ میلی‌نیوتون‌برمتر کاهش داد و قطر هالهٔ حاصل از آزمون گسترش روغن، ۴/۷ سانتیمتر گزارش شد (۲۴). همچنین مطالعهٔ عادلی و همکارنش در سال ۱۳۹۲ بر دو گونه از باکتری *Shewanella* نشان داد که بیشترین قطر هالهٔ به‌دست‌آمده در تست گسترش روغن تنها ۱/۴ سانتیمتر است (۲۵). نتایج محمدی و همکارانش در سال ۱۳۹۰ جهت جداسازی سویهٔ توانمند در تولید بیوسورفکتانت از حوضچه‌های نفتی نهایتاً منجر به دستیابی به گونه‌ای از جنس *Bacillus* شد که کشش سطحی را به‌میزان ۳۰ میلی‌نیوتن‌برمتر کاهش می‌دهد (۲۶). در پژوهشی که مصطفی پور رمی و همکارانش در سال ۱۳۹۳ جهت جداسازی و شناسایی گونه‌های تولیدکنندهٔ بیوسورفکتانت از جنس *Acinetobacter* انجام دادند، توانمندترین جدایهٔ به‌دست‌آمده تنها قادر به کاهش کشش سطی تا ۳۶ میلی‌نیوتن‌برمتر است (۲۷). بررسی‌های انجام‌شده در زمینهٔ نقش بیوسورفکتانت‌ها در حذف آلودگی‌های نفتی، ارتباط میان تولید برخی از انواع بیوسورفکتانت توسط یک میکروارگانیسم و توانایی آن در حذف آلودگی‌های نفتی را تأیید می‌کنند. درواقع بیوسورفکتانت‌ها می‌توانند با کاهش کشش سطحی، سوبسترای آب‌گریز نفتی را برای استفاده در دسترس میکروارگانیسم قرار دهند. به نظر می‌رسد توانایی حذف نفت سویهٔ *Fusarium* sp. UTMC 5039 ارتباط تنگاتنگی با تولید ترکیبات فعال در سطح دارد. درواقع بیوسورفکتانت تولیدشده با خاصیت امولسیفه‌کنندگی باعث حل‌شدن نفت خام در محیط کشت می‌شود و به این ترتیب نفت خام به‌عنوان سوبسترا برای این سویه در دسترس قرار می‌گیرد. چنان‌که در این پژوهش نیز مشاهده شد، در مرحلهٔ سنجش توانایی تخریب توسط *Fusarium* sp. UTMC 5039، نفت موجود در فلاسک دارای این سویه نسبت به شاهد و فلاسک‌های فاقد سویهٔ مولد در روز ۷ به‌صورت محلول در محیط کشت درآمد و سویه تا روز ۲۰ قادر به حذف و استفاده ۶۰درصدی نفت خام موجود در محیط به‌عنوان تنها منبع کربن بود. این نتیجه با یافته‌های سایر پژوهشگران دربارهٔ اثبات تولید بیوسورفاکتانت و تأثیر آن در افزایش حذف زیستی هم‌راستا است؛ به‌عنوان مثال Gnanamani و همکاران با بررسی پاک‌سازی زیستی آلودگی‌های نفت خام با استفاده از جداسازی میکروارگانیزم‌های تولیدکنندهٔ ترکیبات فعال زیستی نشان دادند که تولید بیوسورفاکتانت ارتباط مستقیمی با جذب سوبستراهای هیدروکربنی موجود در محیط دارد و باعث انجام موفق پاک‌سازی زیستی زمین‌های آلوده می‌شود (۲۰). نتایج پژوهش‌های محمدی و همکارانش در سال ۱۳۹۰ گونه‌ای از جنس *Bacillus* است که با تولید بیوسورفکتانت قادر به کاهش کشش سطحی و قادر به حذف ۸۱/۵درصد نفت در غلظت ۱درصد نفت است (۲۶). براساس مطالعات انجام‌شده در مقالات، تاکنون گزارشی از فعالیت توأمان تولید بیوسورفکتانت و حذف زیستی نفت توسط این گونه منتشر نشده است؛ همچنین فعالیت نفت‌خواری این گونه در این پژوهش در مقایسه با گزارش‌هایی که راجع به نفت‌خواری جنس *Fusarium* منتشر شده‌اند حدود ۱/۵ برابر بیشتر است؛ بنابراین با توجه نتایج حاصل، *Fusarium* sp. UTMC 5039 می‌تواند به‌عنوان یک سویهٔ ارزشمند و مناسب برای تولید بیوسورفاکتانت و پاک‌سازی آلودگی‌های نفتی مورد توجه قرار گیرد. شناسایی و خالص‌سازی ترکیب فعال سطحی تولیدشده و همچنین بررسی ارتباط میزان تولید بیوسورفکتانت با میزان حذف نفت و مطالعهٔ فعالیت ایزوله در نمونه خاک‌های آلوده می‌تواند در ادامه مورد توجه قرار گیرد.

References

(1) Banat IM., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti MG., Fracchia L., et al. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2010; 87(2): 427-44.

(2) Fakruddin M. Biosurfactant: production and application. *Journal of Petroleum & Environmental Biotechnology* 2012; 3(124):1-5.

(3) 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.

(4) Bhardwaj G., Cameotra SS., Chopra HK. Biosurfactants from Fungi: A Review. *Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology* 2013; 4(6): 160-6.

(5) Sepahi AA., Golpasha ID., Emami M., Nakhoda AM. Isolatin and characterization of crude oil degrading Bacillus spp. *Iranian Journal of Environmental Health Science & Engineering* 2008; 5(3): 149-54.

(6) Konishi M., Morita T., Fukuoka T., Imura T., Kakugawa K., Kitamoto D. Production of different types of mannosylerythritol lipids as biosurfactants by the newly isolated yeast strains belonging to the genus Pseudozyma. *Applied microbiology and biotechnology* 2007; 75(3): 521-31.

(7) Chandran P., Das N. Biosurfactant production and diesel oil degradation by yeast species Trichosporon asahii isolated from petroleum hydrocarbon contaminated soil. *International Journal Of Enginieering Science and Technology* 2010; 2(12): 6942-53.

(8) Kuiper I., Lagendijk EL., Pickford R., Derrick JP., Lamers GE., Thomas-Oates JE., et al. Characterization of two Pseudomonas putida lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Molecular microbiology* 2004; 51(1): 97-113.

(9) Techaoei S., Leelapornpisid P., Santiarwarn D., Lumyong S. Preliminary screening of biosurfactant producing microorganisms isolated from hot spring and garages in northern Thailand. *KMITL science and technology journal* 2007; 7(S1): 38-43.

(10) Watanabe T. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis; 2011.

(11) Sambrook J., Russell DW., Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual (3-volume set): Cold spring harbor laboratory press Cold Spring Harbor*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

(12) 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): 663-72.

(13) Rahman KS., Thahira-Rahman J., Lakshmanaperumalsamy P., Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresource Technology* 2002; 85(3): 257-61.

(14) 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; 20(4): 1879-1885.

(15) Hassanshahian M., Emtiazi G. Isolation, and molecular detection of Alcanivorax dieselolei in the Persian Gulf and the study of biodegradation ability for remediation of oil pollution. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1(1): 31-40.

(16) Weisman W., Group TPHCW. *Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media*. vol1. Massachusetts: Amherst Scientific Publishers; 1998.

(17) Youssef NH., Duncan KE., Nagle DP., Savage KN., Knapp RM., McInerney MJ. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 2004; 56(3): 339-47.

(18) Gnanamani A., Kavitha V., Radhakrishnan N., Mandal AB. Bioremediation of crude oil contamination using microbial surface active agents: isolation, production and characterization. *Journal of Bioremediation and Biodegradation* 2010; 1(2): 1-8.

(19) Makkar RS, Cameotra SS, Banat IM. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. AMB express. 2011;1(5):1-19.

(20) Bodour AA., Miller-Maier RM. Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 1998; 32(3): 273-80.

(21) Radwan SS., Sorkhoh NA. Lipids of n-alkane-utilizing microorganisms and their application potential. *Advances in applied microbiology* 1993; 39: 29-90.

(22) Andrade Silva NR., Luna MA., Santiago AL., Franco LO., Silva GK., de Souza PM., et al. Biosurfactant-and-Bioemulsifier Produced by a Promising Cunninghamella echinulata Isolated from Caatinga Soil in the Northeast of Brazil. *International journal of molecular sciences* 2014; 15(9): 15377-95.

(23) Adeli M., Hassanshahian M., Kariminik A. Isolation, identification and characterization of biosurfactant-producing *Shewanella* species from the Persian Gulf. *Journal of Microbial World* 2013; 6(1): 53-61.

(24) Mohammadi F., AkhavanSepahi A., Mohammadi F., Amini M. Bioremedation of water contaminated with crude oil per isolatin *Bacillus* from oily pound. *Journal of Toloo-e-behdasht* 2012; 11(2) :107-118.

(25) Mostafapour M., Ahmady- Abchin S., Saffari M. Isolation and identification of biosurfactant-producing strains from the genus *Acinetobacter sp* and antibacterial effects of biosurfactant produced on some of the negative and gram-positive bacteria in vitro . *NCMBJ* 2014; 4 (14) :79-91.

[1]- Mineral Salt Medium (MSM)
[2]- Potato Dextrose Agar
[3]- Spread plate technique
[4]- Oil spreading
[5]- Parafilm M method
[6]- Surface tension measurement
[7]- Du_Nouy ring method
[8]- Attensian 701
[9]- Ampliqon master mix, Denmark
[10]- Macrogene, South Korea
[11]- UTMC
[12]- Neighbor Joining
[13]- Bootstrap
[14]- Total petroleum hydrocarbons
[15]- Shimadzu uv-160
[16]- Perkinelmer
[17]- Clustal X
[18]- Bodour et al
[19]- Radwan et al
[20] Silva et al