



زیست پالایش آلودگی های نفت توسط قارچ ها (دو گونه فوزاریوم) با استفاده از فعالیت

آنزیمی کاتالاز

*صفورا درویش

دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد، دانشکده تحصیلات تکمیلی

safura_darvish@yahoo.com

چکیده

آلودگی های نفتی محیط معضل رایج بسیاری از کشورها است. روش های مختلفی برای پاکسازی آلاینده های نفتی وجود دارد، اما اغلب آنها از یک طرف پرهزینه اند و از طرفی دیگر خود دارای مشکلات زیست محیطی جدی هستند یکی از روش های رایج برای پاکسازی محیط های آلوده به نفت زیست پالایش آن است. بخش عمده زیست پالایش محیط های آلوده به نفت، براساس فعال سازی اجتماعات قارچی تجزیه کننده هیدروکربن های نفتی استوار است این پژوهش یک مطالعه آزمایشگاهی، به منظور یافتن قارچ های مقاوم به آلودگی نفتی جهت استفاده در زیست پالایش محیط های آلوده به نفت با استفاده از فعالیت آنزیمی شان می باشد. در این پژوهش گونه های قارچی *F. fujikuroi*، *F. sambucinum* از مناطق آلوده به نفت پالایشگاه های کرمانشاه و اراک جدا سازی شدند و در محیط های کشت PDA با غلظت های ۰.۲٪، ۰.۴٪، ۰.۶٪، ۰.۸٪ و ۱.۰٪ نفت کشت داده شدند. نتایج نشان داد که قارچ ها در غلظت بالای نفت رشد کرده و نسبت به تمام غلظت های ذکر شده مقاوم می باشند. فعالیت آنزیم کاتالاز در گونه های قارچی رشد کرده در غلظت های مختلف اندازه گیری شد که نتایج حاصل نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیمی در محیط های حاوی نفت می باشد.

واژه گان کلیدی: آلودگی نفتی، زیست پالایش، سنجش آنزیم

مقدمه

کیفیت محیط زیست یکی از مهم ترین مسائل روز بشر است. روزی نیست که یکی از معضلات زیست محیطی از جمله آلودگی آب، هوا و خاک به انواع آلاینده های زیست محیطی همچون آلاینده های آلی، معدنی و بیولوژیکی از رسانه ها مطرح نگردد. مهمترین این مواد، نفت خام است که محتوی هزاران هیدروکربن آلی است که سرطان زائی بسیاری از آن ها به اثبات رسیده است. روش های ابداعی در زمینه حذف این آلاینده ها از منابع آب و خاک یا بسیار پرهزینه بوده و یا اجرای آن غیر عملی یا نمایشی است. با توجه به نفت خیز بودن کشورها و آلودگی روزافزون منابع آب و خاک ما با مواد خطرناک، توجه مسئولین و محققان به طراحی و بکارگیری یک روش مناسب جهت حذف این آلاینده ها از خاک معطوف گردیده است. امید است تحقیق حاضر که نتایج آن منجر به معرفی یک روش بسیار ارزان، ساده، مقبول و کاربردی جهت پاک سازی آلودگی های نفتی است، مورد توجه مسئولین محیط زیست و صنایع نفتی کشور واقع شود. توجه به استفاده از گیاهان و میکروارگانیسم های مقاوم به آلودگی نفتی کمتر از یک دهه است که توجه پژوهشگران محیط زیست را به خود معطوف داشته است و این رویکرد به دلایل ارزانی، سادگی، عدم تأثیر سوء بر خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک، افزایش پوشش گیاهی و پیامدهای مثبت آن، در سال های اخیر روز به روز به افزایش می باشد.



مواد و روش ها

مشخصات قارچ ها و تهیه آن ها

قارچ فوزاریوم به عنوان یکی از مهمترین قارچهای خاکی در مناطق مختلف دنیا پراکنده می باشد. با توجه به گونه های مختلف فوزاریوم و گسترش جهانی آن و همچنین نقش عمده ی آن در بخش کشاورزی و علوم پایه، این قارچ مورد توجه محققین مختلف دنیا قرار دارد، به لحاظ تنوع گونه ها، پراکنش گسترده و قابلیت دسترسی، کاربرد قارچ فوزاریوم برای مطالعات در تحقیقات نانو فناوری و علوم بیوتکنولوژی بسیار مفید می باشد (صارمی، ۱۳۸۴). قارچ های مورد استفاده در این تحقیق مربوط به جنس فوزاریوم است که دارای گونه های متعددی است. گونه های مورد مطالعه ما در این پژوهش شامل گونه های *F. sambucinum*, *F. fujikuroi* می باشند. این قارچ ها توسط پژوهشی به منظور کارایی زیست پالایش خاک های آلوده به نفت از رایزوسفر گیاهان بومی در یک منطقه آلوده به نفت در پالایشگاه کرمانشاه و اراک جمع اوری گردید پس از مراحل جداسازی و خالص سازی قارچ ها، گونه های قارچی به صورت کشت شده در محیط کشت های حاوی PDA کشت داده شدند و پس از رشد کامل گونه ها، فعالیت آنزیمی کاتالاز در آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

- آنزیم سنجی (بر حسب جذب در دقیقه)

۱- تهیه محلول عصاره گیری

مخلوط ۱/۲ گرم تریس، ۰/۱ گرم اسید آسکوربیک، ۱۷/۲ گرم ساکارز، ۰/۱ گرم سیستین کلراید و ۲۶/۸ میلی لیتر اسید کلرید ریک ۰/۲ نرمال را با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر با $\text{PH}=7/5$ رساندیم محلول فوق در یخچال نگهداری گردید.

۲- استخراج عصاره آنزیمی

۰/۵ گرم از بافت ریشه قارچی برای هر کدام از تیمار هارا وزن نمودیم با ۲/۵ میلی لیتر محلول عصاره گیری سائیده و به مدت نیم ساعت این عمل طول کشید تا عصاره همگن تهیه گردید. سپس آن را به مدت ۱۰ دقیقه در حالت سکون قرار دادیم و سپس به مدت نیم ساعت به مدت ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ شد، پس از پایان سانتریفیوژ محلول رویی مورد استفاده آنزیم سنجی قرار گرفت.

۳- سنجش آنزیم کاتالاز (chance, 1995)

به منظور سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز، از محلول های زیر استفاده می کنیم.

(۱) ۲/۵ میلی لیتر تامپون فسفات با $\text{PH}=7$

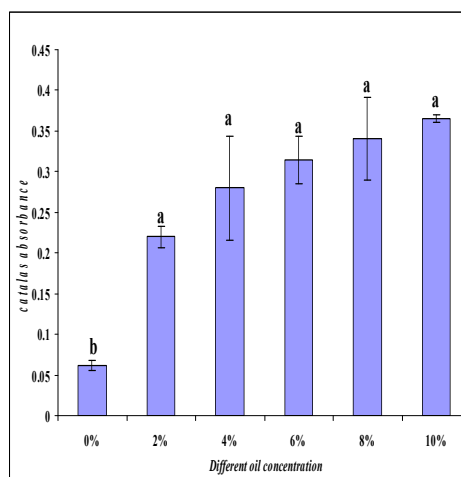
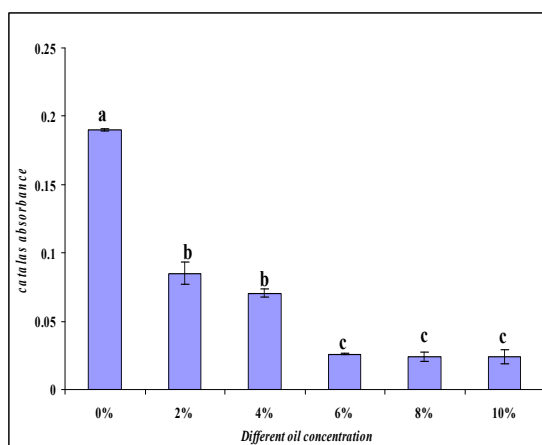
(۲) ۰/۳ میلی لیتر آب اکسیژنه ۳٪

محلول های فوق را به همراه ۰/۱ میلی لیتر از محلول عصاره قارچ با هم مخلوط می نماییم. و در دستگاه اسکپتر و فتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر، میزان جذب آن را می خوانیم.

نتیجه و بحث

تغییرات مقدار آنزیم کاتالاز در دو گونه قارچی: در گونه *F. sambucinum* میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به ترتیب از شاهد ۶۲٪ به ۲۰٪، ۲۸٪، ۳۱٪، ۳۴٪ و ۳۶٪ افزایش یافت که روند افزایش شاخص فوق الذکر معنا دار بود ($p < 0.05$). طبق آزمون مقایسه ای دانکن کمترین مقدار آن مربوط به نمونه شاهد بود (نمودار ۲).

در قارچ *F. fujikuroi* میزان فعالیت آنزیم کاتالاز تحت تیمارهای شاهد، ۲٪، ۴٪، ۶٪، ۸٪ و ۱۰٪ نفت خام به ترتیب از شاهد ۱۹۱٪ به ۸۵٪، ۷۰٪، ۲۶٪، ۲۴٪ کاهش پیدا کرد که روند کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز معنا دار بود ($p < 0.01$). طبق آزمون مقایسه ای دانکن بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در تیمار شاهد (محیط بدون نفت) بود (نمودار ۱). بیشترین فعالیت آنزیمی کاتالاز در گونه *F. sambucinum* مشاهده شد.



نمودار ۲- فعالیت آنزیم کاتالاز در گونه *F. sambucinum* تحت غلظت‌های مختلف نفت خام نمودار ۱- فعالیت آنزیم کاتالاز در گونه *fujikuroi*.

تحت غلظت‌های مختلف نفت خام

بررسی های آنزیم سنجی ما نشان داد که در هر دو قارچ مورد مطالعه فعالیت آنزیمی بالایی وجود دارد. در مورد آنزیم کاتالاز در بین قارچ های مورد مطالعه، بیشترین فعالیت آنزیمی مربوط به کلنی قارچ *F. sambucinum* (نمودار ۲) و کمترین فعالیت آنزیمی مربوط به کلنی قارچ *F. fujikuroi* است (نمودار ۱). آنزیم ها تاثیر بسزایی در حذف الودگی های نفتی دارند و فرایند تجزیه نفت را تحریک و تسریع می نمایند. هنگامی که میکروارگانیسم ها هیدروکربن های نفت خام را می شکنند، نخستین مرحله این پروسه، اضافه کردن گروه هیدروکسیل به انتهای زنجیره الکان و یا به حلقه غیراشباع هیدروکربن اروماتیک چند حلقه ای است که در نتیجه یک الکل شکل می گیرد. پس از این مرحله الکل به الدهید و بی درنگ الدهید را به اسید کربوکسیلیک تبدیل می کنند و سرانجام پس از طی یک زنجیره بلند از واکنش های احیا، محصولات نهایی یعنی اب، دی اکسید کربن و بیوماس تشکیل می شود. این واکنش ها به وسیله آنزیم های درون سلولی و برون سلولی که به وسیله میکروارگانیسم ها سنتز می شود، انجام می گیرد. در بین آنزیم های مورد مطالعه آنزیم کاتالاز رابطه بهتری با حذف نفت از خود نشان داد. کاتالاز به علت استفاده از ترکیبات نفتی توسط قارچ منجر به تولید H_2O_2



شده و برای خنثی کردن این ترکیب میزان آنزیم کاتالاز را افزایش می دهد. کاتالاز (CAT) یک آنزیم فراوان گیاهی و دارای گروه Heme بوده و در همه موجودات یوکاریوتی هوازی یافت می شود که فرآیند تبدیل H_2O_2 به آب و اکسیژن را کاتالیز می کند. این فرآیند به دلیل عدم نیاز به منع احیایی (مانند آسکوربات) یک مزیت محسوب می شود. براساس مطالعات مرجع شناختی ما مطالعات محدودی در خصوص فعالیت آنزیمی وابسته به زیست پالایش صورت گرفته است و آنزیم های فوق در این پژوهش برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مشابهی در این زمینه گزارش شده است. Kotik و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که در خاک های الوده به نفت فعالیت آنزیم ها از جمله آنزیم نوپدید هیدرولاز اپوکسید افزایش قابل توجهی را نشان دادند که با نتایج مطالعه ما همسویی دارد. Drita و همکاران در ۲۰۰۶ نشان دادند که در خاک های آلوده به پلی فنل قارچ ها قادر به بی رنگ کردن و حذف رنگ پلی آروماتیک پل R - 478 با استفاده از توان لیگنولیتیک آنزیم های عمده از جمله پروکسیداز لیگنین (Lip) پروکسیداز منگنز (Mnp) و Laccase (لاکاز) انجام می دهند.

منابع

- ۱- صارمی، ح.، ۱۳۸۴، فوزاریوم (بیولوژی، اکولوژی و تاکسونومی)، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.
- 2- Chance, B., & Maehly, C., 1955, Assay of catalase and peroxidase, Metod in enzymol, Plant Physiol, 11:764-775.

Study on bioremediation efficiency of petroleum –contamination by using fungi (two species of Fusarium) by activity catalase enzyme afura darvish*

Islamic Azad University, Borujerd Branch

Safura_darvish@yahoo.com

Abstract

Petroleum pollution is a common disaster in many countries. There are different methods for removal of petroleum pollution, but most of them are non-economic and cause undesirable changes in the environment. Bioremediation of oil contamination in soils is based on the stimulation of petroleum hydrocarbon – degrading fungal communities. This is a laboratory study to find the petroleum –resistant fungal strains for using in bioremediation of petroleum polluted environments. In this research the fungal strains including *Fusarium. Sambucinum*, *F. fujikuroi*, which were collected from oil contaminated sites of Kermanshah and Arak refineries and were cultured in PDA media containing 2%, 4%, 6%, 8% and 10% oil concentration. Result showed the fungi were able to grow in the high petroleum concentration, and they were resistant to above mentioned petroleum concentration. The activity of three enzymes, phenol catalase was determined in the fungal colonies which were grown on media with different concentration of petroleum and results showed that the enzyme activity was increased in the oil – contained media.

Keywords: Petroleum pollution, Bioremediation, Enzyme assay. *Fusarium*, *Sambucinum*. *Fusarium*, *fujikuroi*.