

CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

ISC : 00210 - 89644

SN : 22-8-21/761630

ISSUE DATE : August 22 , 2021

This is to certify that
Parria Hosseini
presented a poster titled:

**Metagenomic Survey of Fungi Community of
Tannery Effluent Contaminated Soil**

Authors:

Parria Hosseini, Ali Makhdomi*, Ali Naghuni, Ruhollah Siah sarvi

at the 12th National & 4th International Biotechnology Congress of the Islamic Republic of Iran

(Biotechnology for Food Safety and Health)

Organized by the Iranian Biotechnology Society

August 22nd-24th, 2021(online)

Tehran, Iran



Prof. Sirous Zeinali

Congress Head and Head of the Society

You can check the accuracy of this certificate at www.BiotechSociety.ir

Address: Iranian Biotechnology Society, Department of Technology, NIGEB, Pajhooesh Blvd., Tehran - Karaj Highway, Tehran, IR

شناسایی متازنومیک جمعیت های قارچی در خاک آلوده به پساب کارخانجات چرم سازی

پریا حسینی¹، علی مخدومی¹، علی ناغونی²، روح الله سیاه سروی¹

1- گروه زیست شناسی - دانشکده علوم - دانشگاه فردوسی مشهد - مشهد - ایران

2- واحد تحقیق و توسعه، شرکت فرادارو فن آور مهر، تهران، ایران

چکیده

پساب صنایع چرم هر ساله باعث ورود مقادیر قابل توجهی از فلزات سنگین با اثرات سمی به محیط اطراف می شود. قارچ ها بواسطه دارا بودن مسیرهای متابولیکی متنوع، توانایی رشد در شرایط سخت، و قدرت جذب سطحی بالا، از ابزارهای امید بخش در فرآیندهای زیست پالایی می باشند. از این رو شناسایی جمعیت های قارچی ساکن در این مناطق با کاربرد احتمالی در زیست پالایی دارای اهمیت است. در این پژوهش جمعیت قارچی ساکن در خاک های آلوده به پساب کارخانجات چرم سازی با روش غیروابسته به کشت شناسایی شده است. به این منظور DNA محیطی از خاک آلوده به پساب منطقه چرم شهر مشهد با استفاده از کیت استخراج DNA از خاک بدست آمد. تعیین توالی با توان عملیاتی بالای Illumina Miseq انجام گردید. کیفیت خوانش ها با استفاده از نرم افزار FastQC مورد ارزیابی قرار گرفتند. خوانش ها دارای کیفیت پایین و نامناسب توسط نرم افزار Trimmomatic اصلاح گردیدند. پروفایل های تاکسونومی خوانش های با کیفیت از طریق پایپلاین DADA2 بررسی شدند. بر اساس نتایج شاخه *Ascomycota* فراواترین شاخه شناسایی شده در این تحقیق بود. اعضای وابسته به جنس های *Aspergillus*، *Schizosaccharomyces*، *Candida*، *Saccharomyces*، *Zyoseptoria* و *Lachancea* به ترتیب بیشترین فراوانی را در بین جمعیت قارچی دارا بودند. بر اساس یافته های حاضر، خاک های آلوده به پساب صنایع چرم سازی تنوع قارچی بالایی داشته و می توانند به عنوان یک منبع جدید جهت جداسازی سویه های قارچی به منظور کاربرد در حذف فلزات سنگین مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی

زیست پالایی، متازنومیک، قارچ، روش تعیین توالی با توان عملیاتی بالا، فلزات سنگین

مقدمه

آلودگی محیط زیست یکی از چالش های مهم در جامعه بشری به دنبال صنعتی شدن است. از میان انواع آلاینده های محیط، فلزات سنگین از جمله انواع اصلی تهدید کننده سلامت محیط زیست می باشند. منابع طبیعی فلزات سنگین در محیط شامل هوازدگی سنگ های فلزی و فوران های آتشفشانی است. با این وجود نقش اصلی در ورود آنها به محیط را فعالیت های بشر زاد شامل انتشارات صنعتی، استخراج معادن، ذوب و فعالیت های کشاورزی دارد. فلزات سنگین در محیط پایدار هستند، زنجیره های مواد غذایی را آلوده می کنند و به دلیل سمی بودن مشکلات مختلف سلامتی ایجاد می کنند (Rai 2009). قرار گرفتن مزمن در معرض فلزات سنگین در محیط تهدیدی برای موجودات زنده است. برخی فلزات سنگین همچون جیوه؛ کادمیوم و سرب

سبب آسیب غشاسلولی؛ برهم زدن عملکرد های آنزیمی سلول؛ آسیب ساختاری DNA؛ تغییر ساختار پروتیین و جایگزینی عناصر اساسی می شوند. فلزات سنگین عناصر غیر قابل تجزیه زیست هستند از این روی روش های تجزیه زیستی در حذف آن ها کارایی ندارد. با این وجود روش جذب زیستی یک روش مقرون به صرفه و کارآمد برای حذف فلزات سنگین است. فرآیند جذب زیستی با انجام برهمکنش میان فلزات و ساختارهای پوشش سلولی میکروارگانیسم جاذب از جمله گروه های شیمیایی مانند -SH، -COOH، -OH، -NH₂، -PO₄H₂ انجام می گیرد. قارچ ها، در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها از ویژگی های بقایی بسیار قابل توجهی برخوردارند؛ چنانکه قادرند در محیط هایی با سطح پایین مواد مغذی، دما، pH و غلظت بالای فلزات سنگین زنده مانده و رشد کنند. قارچ ها توانایی سم زدایی فلزات سنگین از طریق مکانیسم های مختلفی همچون ته نشینی درون و برون سلولی و جذب بیولوژیکی آنها به دیواره سلولی را نشان داده اند (Mehra et al., 1994) آن ها قادر به تثبیت فلزات سنگین و جلوگیری از انتشار آنها در محیط از طریق قسمت های مختلف میسلیوم های شان هستند. همچنین هیف های قارچی با نفوذ در خاک و به دام انداختن مواد آلاینده می توانند امکان پالایش آن را افزایش دهد. از این روی قارچ ها امروزه نقش مهمی در فرآیند زیست پالایی فلزات سنگین بویژه با فرآیند های جذب زیستی¹ دارند. با این وجود و در مقایسه با باکتری ها (57%) قارچ ها تا کنون به میزان کمتری در مطالعات زیست پالایی بکار گرفته شده اند (در حدود 13%) (Quintella et al., 2019). تا کنون در حدود 120000 گونه قارچی از طبیعت جداسازی و شناسایی گردیده است. تخمین زده می شود در حدود 12000000 میلیون گونه قارچی در کره زمین وجود داشته باشد. بنابراین تاکنون در حدود 1 درصد از گونه های قارچی کره زمین شناسایی شده است. با توجه به اینکه شناسایی این جمعیت عظیم قارچی غیر ممکن به نظر می رسد و همین طور با توجه به محدودیت های روش کشت در پلیت²، امروزه توجه به جداسازی هدف دار میکروارگانیسم ها با روش هایی مانند ژنومیک معکوس جلب شده است. در این رویکرد با بکارگیری روش های غیر وابسته به کشت ابتدا میکروارگانیسم های یک زیست بوم شناسایی و سپس با هدف قرار دادن مولکول های آن مانند توالی های RNA ریبوزومی با ابزارهایی مانند جداسازی بر مبنای ویژگی فلورسانسی سویه هدف³ نسبت به جداسازی آن از محیط اقدام می گردد (Lewis et al., 2021). همین طور شناسایی سویه های موجود در یک زیست بوم امکان فراهم کردن شرایط کشت سنتی سویه ها بر اساس نیازمندی های گروه های تاکسونومی شناخته شده را فراهم می کند.

معرفی روش های تعیین توالی نسل بعد با بازده بالا⁴، جهش بزرگی در معرفی سویه های میکروبی موجود در زیست بوم های مختلف ایجاد کرده است. از میان روش های مختلف تعیین توالی DNA، تکنیک Illumina بدلیل کارایی بالاتر در مقایسه با سایر روش های موجود تعیین توالی DNA امروز به گزینه اول برای این هدف تبدیل گردیده است. این روش با مکانیسم ختم قابل بازگشت همانندسازی قادر به خوانش ده ها میلیون قطعه در یک زمان می باشد. تحلیل حجم بالای داده ها در این روش ها نیازمند ابزارهای مخصوص به خود مبتنی بر دانش بیوانفورماتیک است.

در مطالعه حاضر به منظور شناسایی تاکسون های قارچی با توانایی احتمالی در زیست پالایی، خاک آلوده به پساب صنایع چرم سازی، به عنوان یک منبع اصلی ورود فلزات سنگین به محیط، انتخاب گردید. DNA متاژنومی از خاک آلوده به پساب کارخانجات

1 Biosorption
2 Great plate count anomaly
3 Fluorescence- activated cell sorting
4 High-throughput Next generation sequencing

چرم سازی در منطقه چرم شهر مشهد استخراج و با استفاده از روش توالی یابی با بازده بالا، توسط دستگاه Illumina Miseq برای ناحیه ITS1 و ITS2 قارچ ها توالی یابی گردید. جمعیت قارچی موجود با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی معرفی گردیده است.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه

در این پژوهش از خاک آغشته به پساب کارخانجات چرم سازی در شهر مشهد نمونه برداری انجام گردیده است (شکل 1). نمونه از عمق 5cm خاک برداشت و در ظروف پلاستیکی استریل به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه ها تا زمان استخراج DNA (چند ساعت) در تاریکی و دمای محیط نگهداری شدند. بخشی از نمونه جهت تعیین انواع فلز سنگین با آنالیز اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی⁵ به آزمایشگاه مرکزی دانشگاه فردوسی مشهد ارسال شد.



شکل 1 - خاک آلوده به پساب ناحیه چرم شهر مشهد - منطقه نمونه برداری با فلش مشخص شده است.

استخراج DNA محیطی و توالی یابی

استخراج DNA از نمونه خاک آلوده به پساب کارخانجات چرم سازی مشهد انجام گردید. به این منظور 0/2 گرم خاک با استفاده از کیت استخراج DNA از خاک (Exgene Soil DNA mini kit) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید. کیفیت DNA محیطی حاصل با استفاده از نانوراپ و ژل الکتروفورز تایید گردید. توالی یابی با استفاده از پنج میکروگرم ماده ژنتیکی استخراج شده با پروتکل paired-end توسط دستگاه Illumina MiSeq و با استفاده از پرایمرهای ITS1 و ITS2 با متوسط خوانش 100 جفت باز (PE100) توسط شرکت BGI در هنگ کنگ انجام شد.

تحلیل و بررسی بیوانفورماتیکی

توالی های خوانش شده توسط شرکت BGI مورد تحلیل و بررسی قرار گرفتند. به این منظور ابتدا با استفاده از نرم افزار FastQC کیفیت توالی ها بررسی و با بکارگیری نرم افزار Trimmomatic بخش های دارای کیفیت پایین و ضعیف حذف شدند. سپس فایل

توالی های ویرایش شده با استفاده از پایپ لاین DADA2 و استفاده از پکیج های ShortRead، Biostrings، phyloseq و ggplot2 در نرم افزار R مورد آنالیز قرار گرفتند.

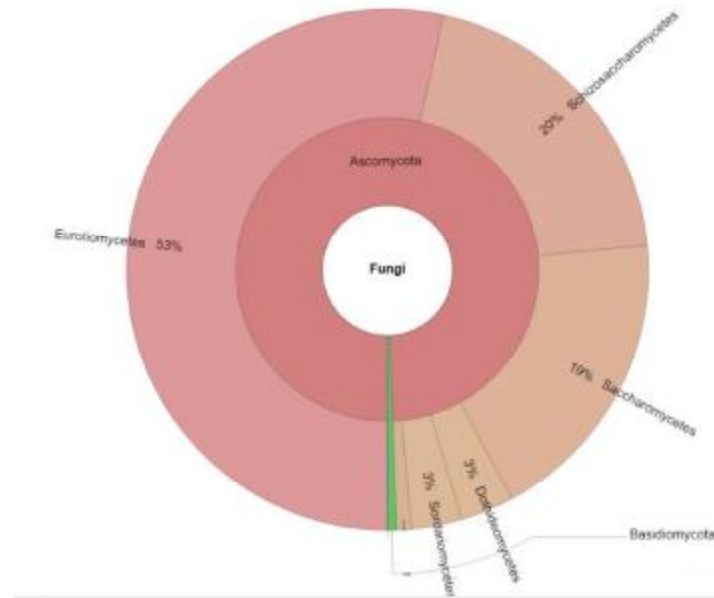
نتایج و بحث

پساب کارخانجات چرم سازی بدلیل بکارگیری فلزات سنگینی مانند کروم، مس و کادمیوم در فرآیند های دباغی پوست و ایجاد خواص مطلوب در چرم به میزان زیادی واجد این ترکیبات مضر برای سلامت محیط زیست است. این پساب معمولاً وارد محیط گردیده و یک زیست بوم انتخابی برای جمعیت های میکروبی مقاوم به فلزات سنگین ایجاد می کند. آنالیز اسپکترومتری نشری پلاسمای جفت شده القایی میزان بالای فلزات سنگین در این منطقه را نشان تایید کرد (جدول 1).

جدول 1- میزان عناصر مختلف در خاک آلوده به پساب کارخانجات چرم سازی

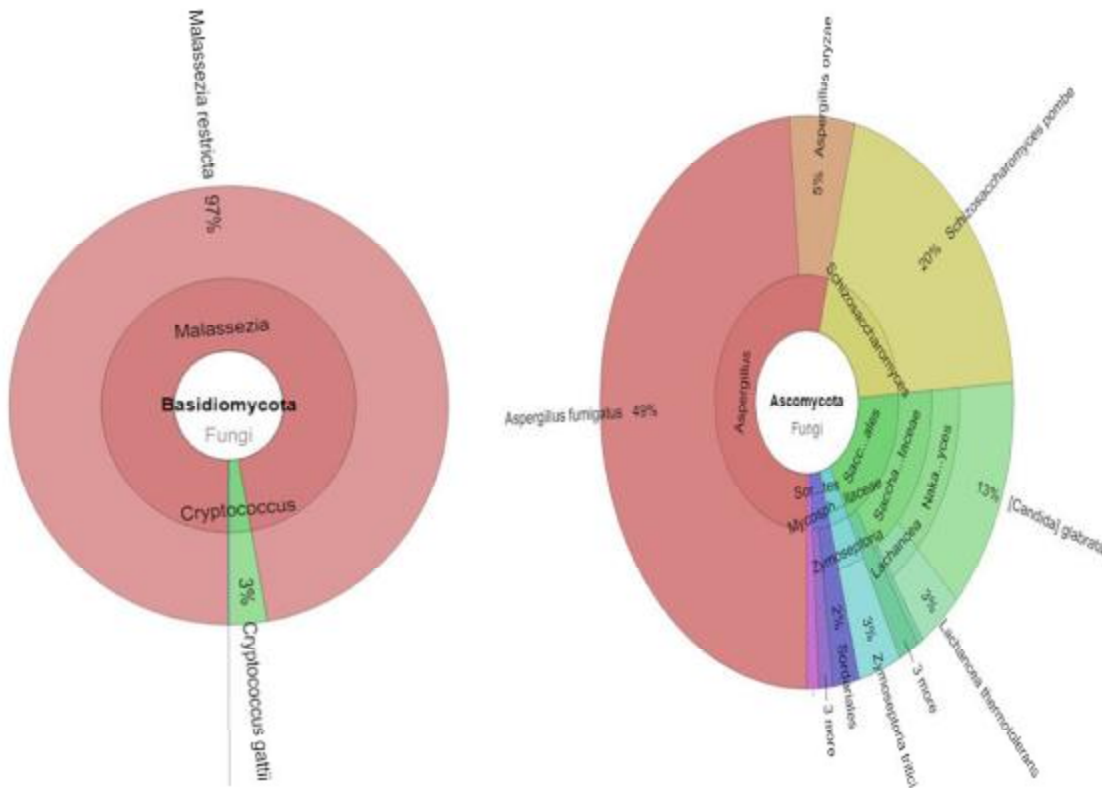
Pb	Fe	Al	Cd	As	Zn	Sr	Ni	Na	Mn	Mg	K	Cu	Cr	Ba	B	فلز
15	42600	12950	0.5	12	68	108	231	2413	359	5196	7487	89	207	197	35	غلظت (ppm)

با توجه به اهمیت قارچ ها در فرآیند زیست پالایی فلزات سنگین این پژوهش با هدف معرفی تاکسون های کارا زیست پالایی روش های غیر وابسته به کشت با بازده بالا، برای شناسایی سویه های قارچی ساکن در خاک آغشته به این پساب کارخانجات چرم سازی استفاده گردیده است. بر اساس نتایج خوانش های بدست آمده از دستگاه Illumina Miseq، شاخه *Ascomycota* جمعیت غالب قارچی را تشکیل داده است (99/5%). انواع متعلق به شاخه *Basidiomycota* بخش اندکی از توالی ها را به خود اختصاص دادند (0/5%).



شکل 2- توزیع توالی های بدست آمده در سطح شاخه و رده

در پژوهش های مختلفی در خاک های آلوده به فلزات سنگین حضور شاخه های آسکومیکوتا و بازیدیومیکوتا به عنوان جمعیت های رایج گزارش شده است (Li et al., 2014; Ye et al., 2020). در سطح رده، فراوان ترین رده های قارچی به ترتیب *Eurotiomycetes*، *Schizosaccharomycetes*، *Saccharomycetes*، *Dothideomycetes* و *Sordariomycetes* بوده است (شکل 2). در گزارش های مختلفی مقاومت به فلزات سنگین در اعضای رده *Eurotiomycetes* (Awasthi et al., 2021)، *Schizosaccharomycetes* (Wunderlich et al., 1995)، *Dothideomycetes* (Ye et al., 2020) و *Sordariomycetes* (Mohammadian et al., 2017) نشان داده شده است. شکل 3 ارزیابی توالی های بدست آمده از خاک آلوده به پساب کارخانجات چرم سازی برای شناسایی فراوان ترین جنس های قارچی در دو شاخه آسکومیکوتا و بازیدیومیکوتا را نشان می دهد. براساس نتایج در شاخه آسکومیکوتا بیشترین فراوانی به ترتیب متعلق به جنس های *Aspergillus*، *Schizosaccharomyces*، *Candida*، *Zygomycota*، *Saccharomyces*، *Lachancea*، *Thermothelomyces* و *Neurospora* بوده است. در گروه بازیدیومیکوتا جنس های *Malassezia* و *Cryptococcus* انواع رایج بوده است.



شکل 3 - فراوانی گونه ای در شاخه های آسکومیکوتا (راست) و بازیدیومیکوتا (چپ)

در این پژوهش فراوان ترین تاکسون بدست آمده متعلق به جنس *Aspergillus* بوده است. در یک پژوهش مروری در سال 2019 به معرفی توانمندی جنس *آسپرژیلوس* در حذف آلاینده های محیطی پرداخته شده است. در این مقاله بر توانمندی اعضای این جنس در حذف آلاینده ها بخصوص فلزات سنگین تاکید شده است (Mukharjee 2016). در گزارش های مختلفی به توانمندی تاکسون های شناسایی در این پژوهش در حذف فلزات سنگین اشاره شده است. به عنوان مثال توانایی حذف فلزات سنگین در قارچ های *Botrytis* (Kumar et al., 2019)، *Schizosaccharomyces* (Ow 1996)، *Candida* (Ezekoye et al., 2018)، *Lachancea* (Keshemina et al., 2005)، *Neurospora* (Li et al., 2014)، *Thermothelomyces* (Perigon et al., 2020) مشاهده شده است.

در نتیجه گیری؛ این پژوهش برای اولین بار در ایران جمعیت قارچی خاک آلوده به پساب کارخانجات چرم سازی را با استفاده از روش های غیروابسته به کشت و با بازده بالا تعیین کرده است. توانایی اکثر تاکسون های شناسایی شده در پژوهش حاضر در مقاومت به فلزات سنگین و فرایندهای زیست پالایی در مطالعات گذشته تایید شده است. از این رو، خاک های آلوده به پساب صنایع چرم به عنوان یک منبع جدید جهت جداسازی سویه های قارچی به منظور کاربرد در حذف فلزات سنگین پیشنهاد می شوند.

منابع

Awasthi, S.K., Duan, Y., Liu, T., Zhou, Y., Qin, S., Liu, H., Varjani, S., Awasthi, M.K., Zhang, Z., Pandey, A. and Taherzadeh, M.J., 2021. Sequential presence of heavy metal resistant fungal communities influenced by biochar amendment in the poultry manure composting process. *Journal of Cleaner Production*, 291, p.125947.

- Ezekoye, C.C., Chikere, C.B. and Okpokwasili, G.C., 2018.** Fungal diversity associated with crude oil-impacted soil undergoing in-situ bioremediation. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 10, pp.148-152.
- Ghosh, B., Mukhopadhyay, S., Morishita, T., Tamura, A., Arai, S., Bandyopadhyay, D., Chattopadhyaya, S. and Ovung, T.N., 2018.** Diversity and evolution of suboceanic mantle: constraints from Neotethyan ophiolites at the eastern margin of the Indian plate. *Journal of Asian Earth Sciences*, 160, pp.67-77.
- Ksheminska, H., Fedorovych, D., Babyak, L., Yanovych, D., Kaszycki, P. and Koloczek, H., 2005.** Chromium (III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochemistry*, 40(5), pp.1565-1572.
- Lewis, W.H., Tahon, G., Geesink, P., Sousa, D.Z. and Ettema, T.J., 2021.** Innovations to culturing the uncultured microbial majority. *Nature Reviews Microbiology*, 19(4), pp.225-240.
- Li, Q., Csetenyi, L. and Gadd, G.M., 2014.** Biomineralization of metal carbonates by *Neurospora crassa*. *Environmental science & technology*, 48(24), pp.14409-14416.
- Mohammadian, E., Ahari, A.B., Arzanlou, M., Oustan, S. and Khazaei, S.H., 2017.** Tolerance to heavy metals in filamentous fungi isolated from contaminated mining soils in the Zanjan Province, Iran. *Chemosphere*, 185, pp.290-296.
- Mukherjee, A., 2016.** Role of *Aspergillus* in Bioremediation Process . *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, pp.209-214.
- Ow, D.W., 1996.** Heavy metal tolerance genes: prospective tools for bioremediation. *Resources, conservation and recycling*, 18(1-4), pp.135-149.
- Yeh, G., Hoang, H.G., Lin, C., Bui, X.T., Tran, H.T., Shern, C.C. and Vu, C.T., 2020.** Assessment of heavy metal contamination and adverse biological effects of an industrially affected river. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(28), pp.34770-34780.
- Perigon, S., Massier, M., Germain, J., Binet, M.N., Legay, N. and Mouhamadou, B., 2019.** Metabolic adaptation of fungal strains in response to contamination by polychlorinated biphenyls. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(15), pp.14943-14950.
- Quintella, C.M., Mata, A.M. and Lima, L.C., 2019.** Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. *Journal of environmental management*, 241, pp.156-166.
- Rai, P.K., 2009.** Heavy metal phytoremediation from aquatic ecosystems with special reference to macrophytes. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 39(9), pp.697-753.
- Verma, S. and Kuila, A., 2019.** Bioremediation of heavy metals by microbial process. *Environmental Technology & Innovation*, 14, p.100369.
- Mehra, R.K. and Winge, D.R., 1991.** Metal ion resistance in fungi: molecular mechanisms and their regulated expression. *Journal of cellular biochemistry*, 45(1), pp.30-40.
- Wunderlich, C., Zhao, Q., Zimmermann, M. and Wolf, K., 1995.** Physiological characterization of a cadmium-resistant mutant in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiological research*, 150(3), pp.233-237.
- Ye, F., Gong, D., Pang, C., Luo, J., Zeng, X. and Shang, C., 2020.** Analysis of Fungal Composition in Mine-Contaminated Soils in Hechi City. *Current Microbiology*, 77, pp.2685-2693.

Metagenomic survey of fungi community of tannery effluent contaminated soil

Paria Hosseini¹, Ali Makhdoumi¹, Ali Naghoni², Roohollah Siahsharvie¹

1- Department of Biology- Faculty of Science- Ferdowsi University of Mashhad- Mashhad-Iran.

2- Research and Development Unit, Fara Daru Fanavar Mehr Pharmaceutical Co., Tehran, Iran.

Abstract

Tannery industry effluent discharges remarkable amounts of heavy metals to their surrounding environments. According to hazardous effects of these industrial wastes for the environmental health it is necessity to manage these effluents before discharging to the environments. Fungi bioremediation is a promising technology especially for biosorption based approaches due to their diverse metabolic activity, growth in harsh environmental conditions and high surface sorption capacity. In the current study the fungal resident in the tannery effluent contaminated soil, with the potentials in bioremediation, were identified by culture in-dependent high throughput DNA sequencing method. Environmental DNA was extracted from contaminated soil of charm-shahr, Mashhad. Illumina Miseq high throughput DNA sequencing was performed. The received sequences were analyzed by DADA2 pipelines after the quality control and trimmed with FastQC and Trimmomatic software, respectively. According to the results, dominant fungal taxa, in order of abundant, were as *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida glabrata*, *Lachancea thermotolerans*, *Debaryomycetaceae* sp., *Zymoseptoria* sp., *Thermotheelomyces* sp., *Neurospora* sp., *Colletotrichum* sp. and *Botrytis* sp. The results confirm that tannery-effluent contaminated soil has high fungal diversity that could be considered as new sources for the isolation of fungi with high potentials in heavy metals bioremediation.

Keywords: Bioremediation, Metagenomic, Fungi, High throughput DNA sequencing, Heavy metals