

سازش پذیری برخی از گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma*) به آلودگی نفتیفریبا محسن زاده^{۱*}، دوستمراد ظفری^۱ و بهاره نوری صفا^۲^۱ همدان، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی^۲ همدان، سازمان حفاظت از محیط زیست همدان

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۶

چکیده

امروزه با توجه به افزایش استفاده از نفت و فرآورده‌های نفتی، آلودگی نفتی از بزرگترین آلودگی‌های زیست محیطی است. میکروارگانیسم‌های موجود در خاک مهم‌ترین موجوداتی هستند که در نخستین مراحل بروز آلودگی، تحت تأثیر قرار می‌گیرند و در عین حال می‌توانند در حذف و تجزیه آن مؤثر باشند. هدف از این پژوهش بررسی اثر حضور آلاینده‌های نفتی بر رشد قارچهای خاکهای زراعی همچون قارچهای *Trichoderma* می‌باشد. در این پژوهش ده گونه مختلف از این قارچ انتخاب و برای رشد در حضور نفت سازش داده شدند. این قارچها ابتدا در محیطهای کشت PDA با غلظت ۱ درصد، نفت خام کشت داده شدند و سپس به صورت مرحله ای به محیطهای با غلظت ۲، ۴ و ۶ درصد نفت خام انتقال داده شدند تا به تدریج به نفت خام سازش یابند. توان رشد قارچها بر اساس قطر پرگنه در روز یازدهم اندازه گیری و با قطر پرگنه در نمونه های شاهد (بدون نفت) مقایسه شد. نتایج نشان داد همه قارچهای مورد مطالعه، توان رشد در حضور نفت خام را به دست آورده اند، اما میزان آن در مورد تمامی قارچها کمتر از محیط شاهد بود. بیشترین میانگین قطر پرگنه در گونه *T. citrinoviride* و کمترین آن در گونه *T. koningiopsi* مشاهده شد. این نتایج بیانگر این هستند که توان رشد قارچ *T. citrinoviride* در محیط کشت آلوده به نفت بیش از سایر قارچهای مورد مطالعه است؛ بنابراین برای زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت مناسب تر است.

واژه های کلیدی: آلودگی نفتی، زیست پالایی، قارچ *Trichoderma*، نفت خام

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۳۸۳۸۱۰۵۸، پست الکترونیکی: fmohsenzade@gmail.com

مقدمه

فرآورده‌های نفتی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن امروز محسوب می‌شوند. پراکندگی نسبی در کره زمین، قیمت مناسب و سهولت به کارگیری، عوامل مهمی در استقبال از این منبع عظیم انرژی به شمار می‌روند. آلودگی نفتی یک معضل جهانی است که در کشورهای تولید کننده نفت و کشورهای صنعتی رایج است (۲۵). آلودگی محیط با نفت برای گیاهان، جانوران و انسان مضر و خطرناک است (۳۰ و ۳۴). ایران به عنوان کشوری با منابع نفتی فراوان، دارای مناطق متعددی است که آلوده به نفت خام هستند. در ایران، آلودگی خاکهای اطراف پالایشگاهها، محلهای اکتشاف و مسیر لوله های انتقال نفت کاملاً مشهود است (۲۹).

روشهای متعددی برای پاکسازی آلودگیهای نفتی وجود دارد که می‌توان به سوزاندن، شستشو، تیمارهای شیمیایی و زیست پالایی اشاره نمود (۱۸). زیست پالایی استفاده از گیاهان و میکروارگانیسم‌ها برای حذف یا سم زدایی آلاینده های زیست محیطی است. زیست پالایی در دو دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده است که علت آن ارزانی، سازگاری با محیط و سهولت کاربرد آن جهت آلودگی زدایی نسبت به سایر روشها است (۱۰، ۱۱ و ۲۵). تاکنون از زیست پالایش جهت حذف نفت خام (۲۴، ۲۶، ۳۱ و ۳۷)، روغن موتور

(۱۲) و گازوئیل (۸) استفاده شده است، اما کارایی حذف بسیار متنوع بوده است (۴).

زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت، به طور عمده بر تجزیه زیستی مبتنی بر قارچها و باکتریهای همزیست با ریشه گیاهان استوار است (۱۷). گزارشهای چندی نشان داده که میکروارگانیسم هایی همچون باکتریها و قارچها می توانند نفت خام را به عنوان منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار دهند و یا آنها را تجزیه و به مواد مفید و مورد نیاز میکروارگانیسم ها یا ارگانیسم هایی دیگر تبدیل نمایند. پژوهشها نشان داده که برخی از قارچها نسبت به آلودگی نفتی مقاوم هستند و قادر به حذف نفت از محیط می باشند. Ulfig و همکاران (۹) نشان دادند که قارچهای تجزیه کننده کراتینین به ویژه *Trichophyton ajelloi* توانایی حذف نفت را دارند و می توانند در پاکسازی آلودگیهای نفتی به کار روند. قارچهای *Aspergillus Alternaria alternate* *Mucor Fusarium solani*, *Curvularia lunata flavus Ulocladium* و *Penicillium notatum racemosum atrum* از خاکهای آلوده به نفت عربستان سعودی جداسازی و گزارش شده اند (۱۹). قارچهای *Alternaria alternate Fusarium Curvularia lunata Aspergillus flavus Penicillium notatum Mucor racemosum solani* و *Ulocladium atrum* از مناطق آلوده به نفت ایران جداسازی و به عنوان سویه های مقاوم به آلودگی نفتی گزارش شده اند (۲۷).

برخی مطالعات صورت گرفته در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی نشان داده که انواع مختلف میکروارگانیسم ها از جمله قارچها، قادرند در مناطق آلوده رشد کنند (۲۳). تعدادی از پژوهشگران نیز با انجام تحقیقات محیطی اعلام کرده اند که سوشهای مختلف قارچهای ریشه سفید قادر به رشد در حضور آلودگی خاک به هیدروکربنها می باشند (۶). قارچهای تجزیه کننده کراتین نیز در خاکهای آلوده به مواد نفتی در یک پالایشگاه نفت در لهستان مورد مطالعه قرار

گرفتند. نتایج نشان داد که میزان رشد این قارچها به غلظت هیدروکربنهای نفتی و مشتقات قطبی آنها بستگی داشته و قارچها پتانسیل استفاده از آنها را جهت زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت دارند (۳۵). پژوهشگران نشان داده اند که در مناطق آلوده به نفت، تراکم جمعیت باکتریها به مراتب بیشتر از خاکهای غیرآلوده است. آنها همچنین ثابت کردند که در خاکهای آلوده به نفت فعالیت آنزیمی به ویژه آنزیم دی اکسیژناز بیشتر از خاکهای غیر آلوده است (۲۱) و (۲۲). در مطالعه دیگری مشخص شد که جنسهای *Rhodococcus*, *Nocardia* قادر به تجزیه آلکانها هستند. همچنین از گروه مخمرها و قارچها و میکرومایست ها، جنسهای *Candida*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula* قادر به زیست در مناطق حاوی آلاینده های نفتی و نیز تجزیه آلکانها می باشند (۳۲).

گونه های قارچ تریکودرما عموماً در انواع خاکها به ویژه خاکهای زراعی به عنوان فلور طبیعی میکروارگانیسم های کودرست به وفور یافت می شوند. فراوانی این قارچها در مکانهای با گسترش زیاد ریشه بیشتر است. برخی از این قارچها از گونه های فعال موجود ریزوسفر گیاهان هستند. از کاربرد های مهم این قارچها استفاده از آنها در مبارزه بیولوژیک با عوامل بیماری زای خاک زی از جمله فوزاریوم ها می باشد (۷). بعضی از گونه های این قارچ توانایی پاکسازی محیط آلوده را دارند و می توانند به عنوان یکی از منابع میکروارگانیسمی جهت تجزیه زیستی آلاینده های موجود در محیط به کار روند (۳۶). بنابراین هدف از پژوهش حاضر، سازش دادن برخی از گونه های این جنس برای رشد در حضور نفت خام و بررسی توان رویش این گروه از قارچها در حضور آلودگی نفتی به عنوان یک آلودگی رایج خاک، جهت امکان سنجی کاربرد آن در زیست پالایش این آلودگیها می باشد.

مواد و روشها

نمونه های قارچ: در این پژوهش ۱۰ گونه قارچی متعلق به جنس *Trichoderma* مورد استفاده قرار گرفت. جنس *Trichoderma* متعلق به راسته *Trichosphaeriales*، رده *Sordariomycetes*، زیر شاخه *Peizomycotina* و شاخه *Ascomyvota* است (۲۰). این قارچها از نظر تولید آنزیمهای هیدرولیتیک به ویژه سلولاز و همچنین تولید آنتی بیوتیک اهمیت دارند (۱۳، ۱۶ و ۳۳). پرگنه این قارچها معمولاً دارای رشد سریع و به رنگ سبز می باشد، ریشه ها در آنها بی رنگ، دارای سطح صاف و واجد بند هستند. کیندیوفورها درختچه ای و دارای انشعابات فراوان می باشند. یاخته های کندیوم زا (فیالیدها) معمولاً آمپولی شکل هستند. کندیوم ها (فیالوسپورها) تک حجره ای، سبز متمایل به زرد تا سبز تیره یا بی رنگ و دیواره آنها صاف یا زیر است (۳۹). گونه های مورد بررسی در این پژوهش از گروه بیماریهای گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا تهیه شد که عبارتند از:

T. viridescens, *T. orientals*, *T. atroviride*,
T. citrinoviride, *T. asperellum*, *T. harzianum*,
T. brevicompactum, *T. koningii*, *T. koningiopsis*,
T. viride

کشت قارچها در محیط کشت PDA: نمونه های تهیه شده قارچ *Trichoderma* جهت استفاده در محیط آزمایشگاهی به محیط کشت استریل جامد PDA (Merck Germany) انتقال داده شد. برای تهیه محیط کشت ۳۹ گرم از پودر آماده محیط کشت در یک لیتر آب مقطر ریخته و با استفاده از هیتر مگنت حرارت داده شد، تا محلولی کاملاً شفاف به دست آید. سپس درب ظرف با پنبه بسته و با فویل پوشانده شد و ظرف جهت سترون سازی، به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو ۱۲۱ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محیط کشت در پلیتهای سترون توزیع شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت، با اطمینان از عدم آلودگی محیط کشت، قارچهای مورد نظر در پلیتهای مذکور کشت داده شدند. پس از اینکه پرگنه های قارچ سطح پلیت را پرکردند، پلیتها به یخچال منتقل و در دمای ۳ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. این محیطهای

کشت تا ۳ ماه جهت تلقیح مناسبند و پس از آن باید مجدداً به کشت آنها مبادرت گردد.

سازگار کردن گونه های قارچی به نفت خام: در هر پلیت، حدود ۲۰ میلی لیتر محیط کشت PDA سترون ذوب شده ریخته و با استفاده از سمپلر مقادیر مختلف نفت خام (که قبلاً با عبور از صافیهای نیتروسولوزی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر سترون گردید) قبل از انجماد محیطهای کشت، به پلیتها افزوده با آن مخلوط شد، تا محیطهای کشت با غلظتهای ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد نفت خام تهیه گردند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و اطمینان از عدم آلودگی محیطهای کشت، گونه های قارچی موجود در پلیتهای حاوی ۱ درصد نفت خام تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، گرماگذاری گردید. بعد از رشد کامل قارچها در پلیت، قارچها به محیط حاوی ۲ درصد نفت خام و پس از آن به ترتیب در محیطهای کشت حاوی ۴ و ۶ درصد نفت خام تلقیح گردیدند. به این ترتیب از وارد شدن شوک آلودگی به جدایه های قارچی ممانعت گردید و آنها با غلظتهای مختلف نفت خام سازگار گردیدند.

بررسی میزان رشد گونه های قارچی مورد مطالعه در غلظتهای مختلف نفت خام: به کمک قالبهای استریل، مقدار مساوی از جدایه های سازگار شده هر یک از گونه های قارچی مورد مطالعه که قادر به تحمل بالاترین غلظت نفت بود، در محیطهای کشت حاوی غلظتهای مختلف نفت خام (۱، ۲، ۴ و ۶ درصد)، در پنج تکرار، تلقیح و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، گرماگذاری گردیدند. پلیتهای کنترل (حاوی قارچ و فاقد نفت) نیز با پنج تکرار همزمان و در شرایط مشابه گرماگذاری شدند و میزان رشد جدایه های قارچی براساس قطر پرگنه قارچ در هر یک از پلیتها در روز یازدهم پس از کشت، بررسی و اندازه گیری شد.

آنالیزهای آماری: نتایج حاصله از این پژوهش با استفاده از نرم افزار SPSS (ویرایش ۱/۹) و با روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد ($P \leq 0.05$) مورد آنالیز قرار گرفت.

هر داده معرف میانگین حداقل سه تا پنج تکرار (همراه با انحراف معیار مربوطه) است. نمودارهای مربوطه با نرم افزار Excell (ویرایش ۲۰۱۳) رسم شده است.

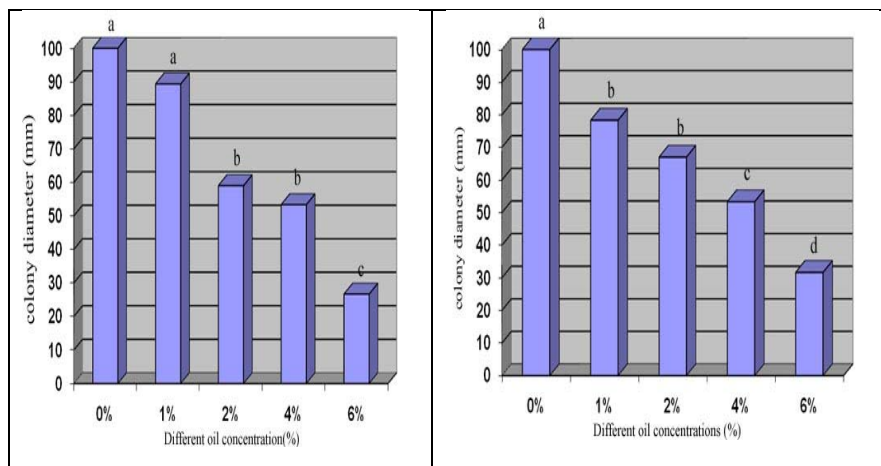
نتایج

از نتایج آزمایشات صورت گرفته مشخص شد که همه قارچهای مورد مطالعه قدرت سازگاری با آلودگی نفتی را دارند و می توانند درجاتی از آلودگی نفتی را تحمل کنند و در محیطهای کشت محتوی نفت رشد نمایند. بررسی توانایی رشد قارچهای سازگار شده به آلودگی نفتی در حضور غلظتهای مختلف نفت نشان داد که هر ۱۰ گونه قارچی قادر به رشد در محیطهای حاوی غلظتهای مختلف نفت خام بودند، اما میزان رشد آنها (قطر پرگنه ایجاد شده در یک مدت مشخص) متفاوت بود. نتایج اندازه گیری میزان رشد یازده روزه قارچهای *T. viride* و *T. koningiopsis* نشان داد که با افزایش میزان نفت در محیط کشت، مقدار رشد قطری پرگنه ها کاهش یافت؛ به

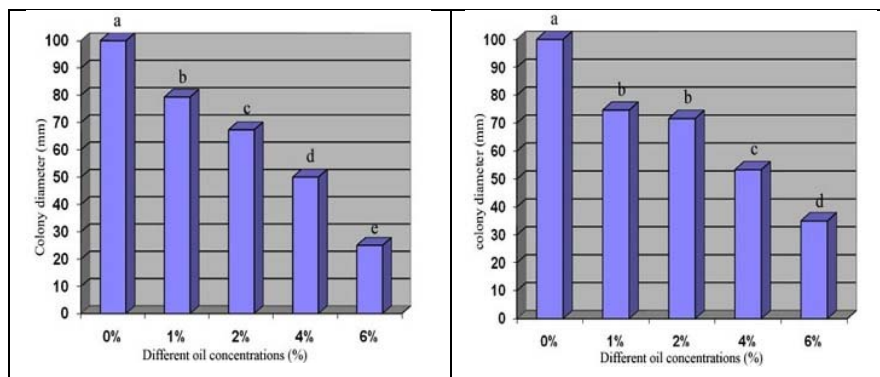
طوری که بیشترین میزان رشد پرگنه مربوط به گروه شاهد و کمترین میزان رشد پرگنه مربوط به محیط کشت دارای آلودگی نفتی با غلظت ۶ درصد بود (شکل‌های ۱ و ۲).

نتایج اندازه گیری میزان رشد در روز یازدهم پس از کشت جدایه های قارچهای *T. brevicompactum* و *T. koningii* نیز نشان داد که با افزایش میزان نفت در محیط کشت، مقدار رشد قطری پرگنه ها کاهش می یابد. بیشترین میزان رشد پرگنه ها مربوط به گروه شاهد و کمترین میزان رشد پرگنه مربوط به محیطهای کشت محتوی نفت خام با غلظت ۶ درصد می باشد (شکل‌های ۳ و ۴).

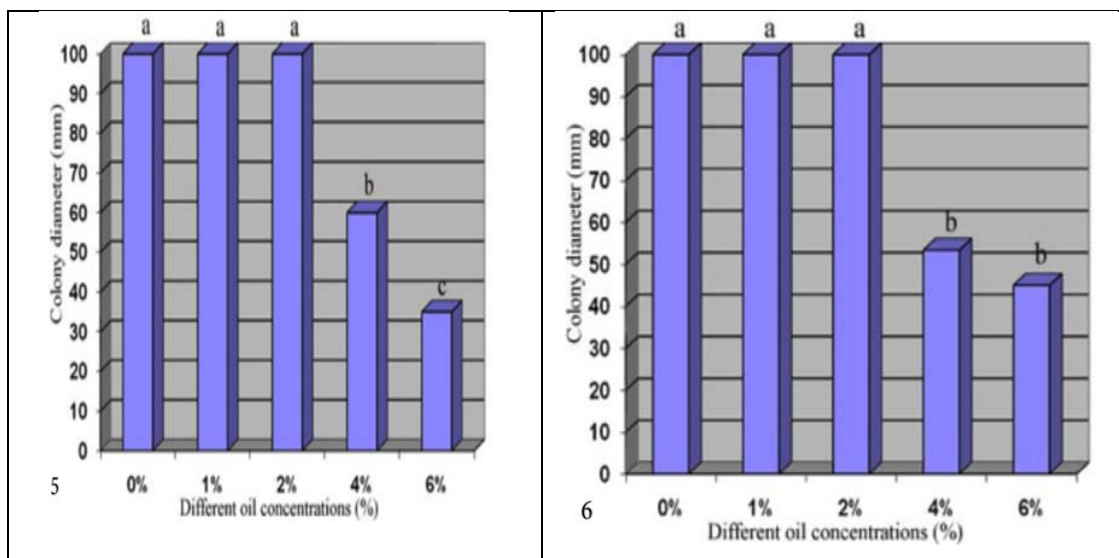
رفتار جدایه های قارچی *T. atroviride*، *T. orientalis* و *T. viridescens* نسبت به آلودگی نفتی متفاوت بود. نتایج نشان داد که با افزایش میزان نفت در محیط کشت، مقدار رشد پرگنه این قارچها تا غلظت ۲ درصد ثابت ماند، ولی با افزایش غلظت آلودگی نفتی، میزان رشد پرگنه کاهش می یابد (شکل‌های ۵-۶).



شکل‌های ۱-۲- شکل‌های ۱ (چپ) و ۲ (راست) به ترتیب میزان رشد قطری پرگنه های قارچهای *T. viride* و *T. koningiopsis* در محیط کشت PDA حاوی غلظتهای مختلف نفت خام در روز یازدهم کشت را نشان می دهند. بر اساس نتایج با افزایش غلظت نفت، میزان رشد پرگنه کاهش می یابد. تفاوت بین تیمارهای با حروف متفاوت معنی دار است ($P \leq 0.05$).



شکل‌های ۳-۴- شکل‌های ۳ (چپ) و ۴ (راست) به ترتیب میزان رشد قطری پرگنه های قارچهای *T. koningii* و *T. brevicompactum* را در محیط کشت PDA حاوی غلظتهای مختلف خام در روز یازدهم کشت نشان می دهد. بر اساس نتایج با افزایش غلظت نفت، میزان رشد پرگنه کاهش می یابد. تفاوت بین تیمارهای با حروف متفاوت معنی دار است ($P \leq 0.05$).

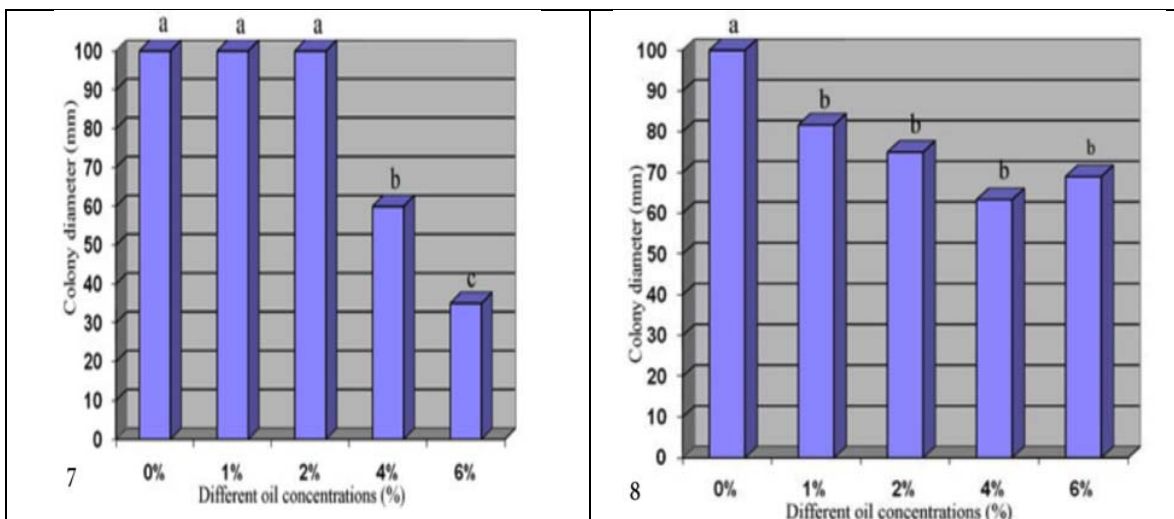


شکل‌های ۵-۶- مقایسه میزان رشد برخی از قارچهای مورد مطالعه در حضور غلظتهای مختلف نفت: *T. atroviride* (شکل سمت چپ) و *T. viridescens* (شکل سمت راست). حروف متفاوت نشان دهنده گروههای تیماری با تفاوت معنی دار در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) است.

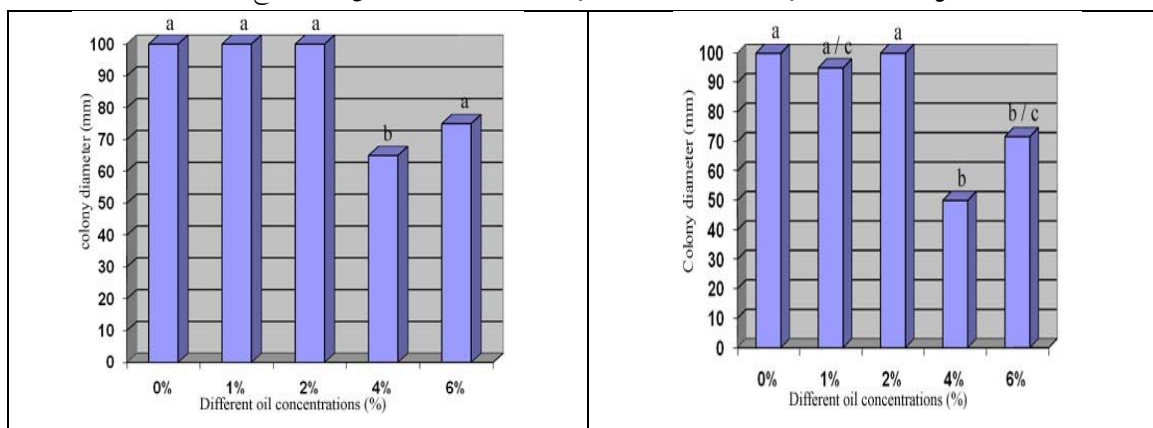
قارچ، از الگوی خاصی پیروی نمی کند، اما بیشترین میزان رشد قارچ مربوط به محیط شاهد و غلظتهای ۱ و ۲ درصد و کمترین میزان رشد در غلظت ۴ درصد است (شکل‌های ۹-۱۰). تجزیه و تحلیل‌های آماری مشخص کرد که بیشترین توان رشد پرگنه مربوط به گونه *T. citrinoviride* با میانگین قطر پرگنه ۱۰۰ میلی متر در غلظتهای ۱ و ۲ درصد، و ۷۶ میلی متر در غلظت ۶ درصد و کمترین توان رشد مربوط به گونه *T. koningiopsi* با میانگین قطر پرگنه ۷۵، ۶۳، ۵۱ و ۲۹ میلی متر به ترتیب در غلظتهای ۱، ۲، ۴ و ۶ درصد است.

نتایج اندازه گیری میزان رشد یازده روز پس از کشت جدایه قارچی *T. asperellum* نشان داد که رشد قطری پرگنه ها با افزایش غلظت نفت در محیط کشت تا ۴ درصد کاهش یافته و در غلظت ۶ درصد مجدداً افزایش یافته می یابد؛ اما همچنان بیشترین میزان رشد مربوط به محیط شاهد می باشد (شکل‌های ۷-۸).

بررسی میزان رشد قارچهای *T. citrinoviride* و *T. harzianum* در حضور غلظتهای مختلف نفت نشان داد که با افزایش میزان نفت در محیط کشت، میزان رشد قطری



شکل‌های ۷-۸- مقایسه میزان رشد برخی از قارچ‌های مورد مطالعه در حضور غلظت‌های مختلف در *T. orientalis* (شکل سمت چپ) و *T. asperillum* (شکل سمت راست). حروف متفاوت نشان دهنده گروه‌های تیماری با تفاوت معنی دار در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) است.



شکل‌های ۹-۱۰-۹ (چپ) و ۱۰ (راست) به ترتیب مقایسه میزان رشد قارچ *T. citrinoviride* و قارچ *T. harzianum* در محیط کشت PDA حاوی غلظت‌های مختلف نفت خام در روز یازدهم کشت را نشان می‌دهد. تفاوت بین تیمارهای با حروف متفاوت معنی دار است ($P \leq 0.05$).

رشد در حضور آلودگی با هیدروکربنها می‌باشد (۶ و ۳۵). پژوهشگران نشان داده‌اند که در مناطق آلوده به نفت تراکم جمعیت باکتریها به مراتب بیشتر از خاکهای غیرآلوده است. آنها همچنین ثابت کرده‌اند که در خاکهای آلوده به نفت، فعالیت آنزیمی به ویژه آنزیم دی اکسیژناز بیش از خاکهای غیر آلوده است (۲۱ و ۲۲).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که همه قارچ‌های مورد مطالعه در طی فرآیند سازش پذیر شدن به آلودگی نفتی، موفق عمل کردند و کم و بیش نسبت به آلودگی نفتی مقاوم شدند، به طوری که قادر به رشد و تشکیل کلنی در این

بحث

گزارش‌های متعددی نشان داده که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند نفت خام را به عنوان منبع کربن و انرژی مورد استفاده قرار دهند و یا آنها را تجزیه و به مواد مفید و مورد نیاز میکروارگانیسم یا ارگانیسم‌های دیگر تبدیل نمایند. برخی مطالعات صورت گرفته در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی نشان داده که انواع مختلف میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها قادر به زیست در مناطق آلوده می‌باشند (۲۳). تعدادی از پژوهشگران نیز با انجام تحقیقات محیطی اعلام کرده‌اند که سوش‌های مختلف قارچ‌های ریشه سفید قادر به

آلودگی هستند (شکل‌های ۱۰-۱). در برخی از قارچها (گونه های *T. koningii* ، *T. koningiopsis* ، *T. viride* و *T. brevicompactum* ، *T. atroviride* ، *T. viridescens* و *T. orientalis*) توان رشد و تشکیل کلنی در محیطی با درصد بالای آلودگی نفتی، کاهش یافت. در مقابل نمونه های قارچی نیز وجود داشتند (گونه های *T. asperellum* ، *T. citrinoviride* و *T. harzianum*) که نسبت به آلودگی نفتی با درصد بالا (تا ۶ درصد در این آزمایش) مقاوم بوده و توان رشد و تشکیل کلنی آنها نسبت به شاهد، کاهش کمتری نشان داد. در مورد این گروه خاص از قارچها به نظر می رسد که نفت و مواد تشکیل دهنده آن نه تنها ضرری برای آنها ندارند، بلکه فراهم کننده مواد غذایی لازم برای رشد آنها نیز هستند. می توان نتیجه گیری کرد که این گروه از قارچها در تجزیه و مصرف مواد نفتی نسبت به سایر قارچهای مورد مطالعه در این پژوهش کارایی و عملکرد بهتری داشتند. در هر سه گونه فوق اگر چه در غلظت ۴ درصد آلودگی نفتی رشد پرگنه کاهش پیدا کرد اما در غلظت ۶ درصد مجدد رشد پرگنه افزایش پیدا کرد (شکل‌های ۱۰-۸)، دلیل این پدیده را می توان این مسئله دانست که احتمالاً بالا رفتن غلظت آلودگی نفتی از ۴ درصد موجب به راه افتادن سیستم بیان ژن و آنزیمی جدیدی شده که باعث افزایش مصرف ترکیبات نفتی می شود. بیوسنتز آنزیمهای جدید و افزایش فعالیت آنزیمی در میکروارگانیسم ها در حضور نفت خام توسط برخی از پژوهشگران قبلی نیز گزارش شده است (۳).

تجزیه و تحلیل‌های آماری مشخص کرد که بیشترین توان رشد پرگنه مربوط به گونه *T. citrinoviride* با میانگین قطر پرگنه ۱۰۰ میلی متر و کمترین توان رشد مربوط به گونه *T. koningiopsis* است. این نتایج بیانگر این هستند که توان رشد قارچ *T. citrinoviride* در محیط کشت آلوده به نفت خام بیش از سایر قارچهای مورد مطالعه است و می توان آن را برای استفاده در زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت به سایر قارچهای مورد مطالعه، ترجیح داد.

درخصوص گونه هایی که در مواجهه با آلودگی نفتی دچار کاهش رشد پرگنه شدند این نکته قابل ذکر است که علی رغم کاهش قطر پرگنه، به هر حال به رشد خود ادامه می دهند و بنابراین آسیب وارده به قارچ از سوی مواد نفتی، در حدی نبوده که به طور کلی حیات این میکروارگانیسم را مختل نماید. بدین ترتیب کشت این قارچ در محیطهای آلوده به ترکیبات نفتی درمقیاس وسیع می تواند بدون وارد آوردن آسیب جدی به قارچ، در رفع آلودگی مؤثر باشد.

اگرچه یافته های مشابهی توسط سایر پژوهشگران در مورد قارچهای دیگر در دسترس است (۲، ۱۴، ۱۵، ۲۸ و ۳۸) و حتی برخی پژوهشها نقش گیاهان را در زیست پالایی آلودگیهای نفتی نشان داده است (۱، ۲۶ و ۲۷)، اما بر اساس مطالعات مرجع شناختی در این تحقیق فقط یک گزارش در خصوص مقاومت قارچهای کودرست *Trichoderma* به آلودگی نفتی در دسترس است (۵) و با توجه به اینکه این قارچها فلور طبیعی مزارع، مراتع و خاکهای زراعی را تشکیل می دهند، به نظر می رسد آنها می توانند در زیست پالایی خاکهای آلوده به نفت یک ابزار سودمند باشند.

نتیجه گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قارچهای کودرست و غیر بیماریزای *Trichoderma* که فلور طبیعی خاکهای زراعی را تشکیل می دهند قادر به سازگاری به آلودگی نفتی هستند و در حضور این آلاینده به خوبی رشد می کنند. اگر چه در برخی گونه ها (*T. koningii* ، *T. koningiopsis* ، *T. viride* ، *T. brevicompactum* ، *T. atroviride* ، *T. viridescens* و *T. orientalis*) توان رشد و تشکیل کلنی در محیطی با درصد بالای آلودگی نفتی، کاهش یافت. در مقابل نمونه های قارچی نیز وجود داشتند که نسبت به آلودگی نفتی با درصد بالا (تا ۶ درصد در این آزمایش) مقاوم بوده و توان رشد و تشکیل کلنی آنها نسبت به شاهد، کاهش کمتری نشان داد (گونه های *T. asperellum* ، *T. citrinoviride* و *T. harzianum*). به نظر می رسد گونه های اخیر توان و

آزاد اسلامی واحد بروجرد و سازمان حفاظت محیط زیست
همدان انجام شده است و مؤلفان از مساعدتهای آنان تقدیر
می نمایند.

استعداد حذف نفت از محیطهای آلوده را داشته باشند و
می توان از آنها در زیست پالایی آلودگی نفتی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه

منابع

- ۱- محسن زاده، ف، عشقی ملایری، ب، شیرخانی، ز. امکان سنتزی
حذف غلظتهای مختلف نفت خام توسط قارچهای ریزوسفری جدا
شده از منطقه ی پالایشگاه تهران. مجله سلول و بافت. ۱۳۹۳؛ ۲:
۱۸۵-۱۹۴.
- ۲- محسن زاده، ف. بررسی راندمان زیست پالایی آلودگیهای نفتی
توسط سویه های باکتریایی بومی جدا شده از خاکهای آلوده مناطق
سردسیری (مطالعه موردی: پالایشگاه تبریز) مجله پژوهشهای
سلولی و مولکولی. ۱۳۹۳؛ ۳ (۲۷): ۴۰۶-۴۱۷.
- 3- Akubugwo EI, Ogbuji GC, Chinyere CG, Ugbogu
EA. Physicochemical properties and enzymes
activity studies in a refined oil contaminated soil
in isikwuato, abia state. Nigeria. Biokemistri.
2009; 21: 79-84.
- 4- Angehrn D, Gälli R, Zeyer J. Physicochemical
characterization of residual mineral oil
contaminants in bioremediated soil. Toxicol
Environl Chem. 1998; 17: 268-276.
- 5- Argumedo-Delira R, Alarcón A, Ferrera-Cerrato
R, Almaraz JJ, Peña-Cabriaes JJ. Tolerance and
growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil,
naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. J
Environmental Management. 2012; 95: 291-299.
- 6- Baheri H, Meysami P. Feasibility of fungi
bioaugmentation in composting a flare pit soil. J
Hazardous Material. 2002; 89: 279-286.
- 7- Bahramsari N, Zamani MR, Motallebi M. β -1,3-
glucanase production in *Trichoderma* isolates.
Iranian J Biology. 2005; 18: 261-271.
- 8- Chaîneau CH, More JL, Oudot J. Biodegradation
of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of
maize. J Environ Quality. 2000; 29: 568-578.
- 9- Chehregani Rad A, Akbari M, Mohsenzadeh F.
Evaluation of some fungal nano-particles for
removing of oil pollution, International
conference on Nanotechnology, and Biosensors.
2011. Singapore.
- 10- Chehregani A, Malayeri B. Removal of heavy
metals by native accumulator plants. Inter J Agr
Biol Sci. 2007; 9: 462-465.
- 11- Chehregani A, Noori M, Lari Yazdi H.
Phytoremediation of heavy metal polluted soils:
screening for new accumulator plants and
evaluation of removal ability. Ecotoxicol Environ
Safety. 2009; 72: 1349-1353.
- 12- Dominguez-Rosado E, Pichtel J.
Phytoremediation of soil contaminated with used
motor oil: II. Greenhouse studies. Environ Engin
Science. 2004; 21: 169-180.
- 13- Domsch KH, Gams W, Anderson T.
Compendium of Soil Fungi. Academic Press,
London. Inter Biodeter Biodegr. 1980; 41, 111-
117.
- 14- Dritsa V, Rigas F, Natsis K, Marchant R.
Characterization of a fungal strain isolated from a
polyphenol polluted site. Bioresour Technol.
2007; 98: 1741-1747.
- 15- Eggen T, Majcherczykb A. Removal of
polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in
contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus
ostreatus*. Int. Biodeter Biodegr. 1998; 4: 111-
117.
- 16- Eveleigh DE. *Trichoderma*, In: Demain AL &
Solomon NA. (eds). Biology of industrial
microorganisms. 1985. pp 487-509, Menlo Park,
C.A, Butterworths.
- 17- Frick CM, Farrell RE, Germida JJ. Assessment of
phytoremediation as an In-situ technique for
cleaning oil-contaminated sites. 1999. Calgary:
Petroleum Technology Alliance Canada.
- 18- Gallegos-Martinez MG, Gomez-Santos AG,
Gonzalez-Cruz LG, Montes-De Oca Garcia MA,
et al. Diagnostic and resulting approaches to
restore petroleum-contaminated soil in a Mexican
tropical swamp. Water Sci Technol. 2000; 42:
377-384.
- 19- Hashem AR. Bioremediation of petroleum
contaminated soils in the Persian Gulf region: a
review. J Kuwait Science. 2007; 19: 81-91.
- 20- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, Blackwell M.
et al. A higher-level phylogenetic classification
of the Fungi. Mycological Research. 2007; 111:

- 509-547.
- 21- Liste HH, Prutz I. Plant performance, dioxygenase expressing rhizosphere bacteria, and biodegradation of weathered hydrocarbons in contaminated soil. *Chemosphere*. 2006; 62: 1411-1420.
 - 22- Marja RT, Palmroth T, Perttu, EP, Koskinen P, et al. Metabolic and phylogenetic analysis of microbial communities during phytoremediation of soil contaminated with weathered hydrocarbons and heavy metals. *Biodegradation*. 2007; 18: 769-782.
 - 23- Mancera-Lopez ME, Esparza-Garcia F, Chavez-Gomez B, Rodriguez-Vazquez R, et al. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation – bioaugmentation with filamentous fungi. *Intern Biodeter Biodeg*. 2008; 61: 151-160.
 - 24- Merkel N, Schultze-Kraft R, Infante C. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution*. 2005; 165: 235-242.
 - 25- Merkel N, Schultze-Kraft R, Infante C. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics- preselection of plant species from eastern Venezuela. *J App Bot Food Quality*. 2004; 78: 185-192.
 - 26- Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, et al. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicology Environ Safety*. 2010; 73: 613–619.
 - 27- Mohsenzadeh F, Nasser S, Mesdaghinia A, Nabizadeh R, et al. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheric fungi. *J Toxicol Environ Chem*. 2009; 91: 1443-1453.
 - 28- 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. *Intern Biodeter Biodegr*. 2005; 56: 197-205.
 - 29- Petroleum Ministry Data Center. 2012. Petroleum accidents in Iran: Available at: www.khabaronline.ir.
 - 30- Prasad MS, Kumari K. Toxicity of crude oil to the survival of the fresh water fish *Puntius sophore* (HAM.). *Acta hydrochimica et hydrobiologica*. 2006; 15: 26-36.
 - 31- Radwan SS, Al-Awadhi H, Sorkhoh NA, El-Nemer IM. Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwait desert. *Microbiology Research*. 1998; 153: 247-251.
 - 32- Ravelet C, Krivobok S, Sage L, Steiman R. Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere*. 2000; 40: 557-563.
 - 33- Ryu DO, Mandels M. Cellulases: Biosynthesis and applications. *Enzyme Microb Technol*. 1980; 2: 91-102.
 - 34- Santodonato J, Howard P, Basu D. Health and ecological assessment of polynuclear aromatic hydrocarbons. *J Environ Pathol Toxicol*. 1981; 5: 351-364.
 - 35- Ulfing K, Plaza G, Worsztynowicz A, Manko T, et al. Keratinolytic fungi as indicators of hydrocarbon contamination and bioremediation progress in a petroleum refinery. *Polish J Environ Studies*. 2003; 12: 245-250.
 - 36- Watanabe T. Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphology and key to species. Second edition. 2002. India: CRC Press.
 - 37- Wiltse CC, Rooney WL, Chen Z, Schwab AP, et al. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J Environ Quality*. 1998; 27: 169-173.
 - 38- Yateem A, Balba MT, Al-Awadhi N. White root-fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. *Inter J Environment*. 1997; 24: 181-187.
 - 39- Zafari D, Ershad J, Zare R, Alizadeh A. Determination of *Trichoderma* species in Iran. *Iranian J Plant Pathol*. 2002; 38: 9-15.

Adaptation of some fungal species of *Trichoderma* to petroleum pollution

Mohsenzadeh F.¹, Zafari D.¹ and Noorisafa B.²

¹ Biology Dept., Bu-Ali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

² Environmental Protection Organization of Hamedan, Hamedan, I.R. of Iran

Abstract

Petroleum pollution is the most important environmental pollution due to increasing usage of oil and oil dependent products. Soil microorganisms are the most important organisms that are affected at the early stage of pollution and also are effective for removing and degradation of the oil. In this research, fungi in agricultural soils were adapted for growing in petroleum-polluted media. *Trichoderma* fungal species are saprophytes that are living in agricultural soils. The aim of this research was to elucidate the effect of petroleum pollution on the growth of soil fungal species including *Trichoderma* species. Ten species of *Trichoderma* were selected and adapted for growing in the presence of oil. The fungi were cultured in the PDA containing of 1% crude oil and then were transferred to the media containing 2, 4 and 6% crude oil, step by step. Growth ability of the fungi was studied in the media containing different crude oil after 11 days based on colony diameter. Results showed that the all fungi were able to adapt to petroleum pollution and are growing in the presence of crude oil but it was less than control media. The highest colony diameter was observed in *T. citrinoviride* and the lowest one was in *T. koningiopsi*. These results indicated that the growth ability of *T. citrinoviride* in the petroleum-polluted media is more than other fungal species and so is more suitable for bioremediation of petroleum-polluted soils.

Key words: Petroleum Pollution, Bioremediation, *Trichoderma* species, Crude oil