

شناسایی قارچ‌های بومی خاک‌های آلوده حوزه نفتی مارون اهواز

فرزانه دهداری، مهدی مهربانی کوشکی¹ و جمشید حیاتی

دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز؛ farzanehdehdari25@gmail.com

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز؛ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی،

دانشگاه شهید چمران اهواز؛ mhdmhrb@scu.ac.ir

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز؛ Hayati_jir@yahoo.com

دریافت: 97/8/6 و پذیرش: 97/12/20

چکیده

در طی این پژوهش، 16 نمونه خاک آلوده به مواد نفتی از چهار میدان در حوزه نفتی مارون اهواز جمع‌آوری شد. با کشت نمونه‌های خاک، 33 جدایه قارچی جداسازی و با استفاده از روش تک‌اسپور و نوک‌هیف خالص‌سازی شدند. بر اساس خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌ها و مشاهده انواع ساختارهای رویشی و تولیدمثلی، 23 جدایه قارچی جهت شناسایی مبتنی بر ریخت‌شناسی و مولکولی انتخاب شدند. از جدایه‌های خالص شده در محیط کشت مایع سیب زمینی - دکستروز - بروت زیست‌توده (توده میسیلیومی) قارچی تهیه شد. پس از استخراج DNA از میسیلیوم‌های خشک - انجمادی شده، نواحی ژنی ITS و Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) فقط برای *Curvularia* با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر شدند. قطعات تکثیری با استفاده از دو روش رسوب با اتانول و استخراج از ژل خالص‌سازی و سپس توسط شرکت ماکروژن توالی‌یابی گردیدند. توالی‌های بدست آمده ویراستاری و مونتاژ شدند و با انجام عملیات جستجوی بلاست و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه، جدایه‌ها شناسایی شدند. بر اساس بررسی‌های مولکولی و ریخت‌شناسی، جدایه‌های این تحقیق گونه‌های *Acremonium* *Fusarium Curvularia* sp. *Cladosporium puyae* *Aspergillus* sp. *Alternaria destruens* *sclerotigenum* *Paramyothecium terrestris* *P. chrysogenum* *Penicillium oxalicum* *Mucor circinelloides* sp. *Rhizopus oryzae* و جدایه‌هایی از دو جنس *Allophoma* و *Neodidymelliopsis* از خانواده *Didymellaceae* را شامل شدند. دو گونه‌ی *Cladosporium puyae* و *Paramyothecium terrestris* برای میکوبیوتای ایران جدید می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: ناحیه ITS، BLASTn، آنالیز فیلوژنتیکی

¹ نویسنده مسئول، آدرس: اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

مقدمه

امروزه تولید، استفاده و ورود سوخت‌های فسیلی به اکوسیستم به دلیل سمیت فراوان و سرطان‌زا بودن این ترکیبات به یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های حامیان محیط زیست تبدیل شده است (کوپرژ و همکاران، 2002؛ خان، 2005؛ مرکل و همکاران، 2005). این مشکل در کشورهای تولیدکننده نفت از جمله ایران و به شکل وسیع در اطراف تأسیسات اکتشاف و پالایش و در مسیرهای انتقال این مواد مشاهده شده است. میکروارگانیسم‌های قارچی توانایی تبدیل مواد شیمیایی خطرناک به مواد بی‌خطر را دارا می‌باشند و نقش مهمی در تجزیه‌ی مواد آلی در محیط زیست (زیست‌پالائی) دارند (راگوکومار و همکاران، 2006). در بیشتر تحقیقاتی که به نقش قارچ‌ها در زیست‌پالایی پرداخته است (سینگ، 2006؛ آذنی‌پکن و لاول، 2012؛ بارسا و اطلس، 1977؛ بوگوسلاوسکاواز و دابروسکی، 2001؛ چایلن و همکاران، 2004؛ ساراسواتی و هالبرگ، 2002؛ آدیکانلی، 2007؛ جیزایند و همکاران، 2008؛ اوبایر و انیانوو، 2009؛ محسن‌زاده و همکاران، 2009؛ اکاندایو و همکاران، 2012؛ محمدمو و همکاران، 2013؛ بهنود و همکاران، 2013)، جنس‌ها و گونه‌های قارچی ذیل از خاک‌های آلوده جداسازی و در آزمون‌های مقاومت به نفت خام و تجزیه نفت خام مورد استفاده قرار گرفته است:

Aspergillus *Amorphoteca* *Alternaria*
Candida lipolytica *Candida Bjerkandera adusta*
Cladosporium *Cladosporium* *Cephalosporium*
Graphium *Geotrichum* *Fusarium resinae*
Lentinula edodes *Irpex lacteus* *Gliocladium*
Pencilium *Paecilomyces* *Neosartorya* *Mucor*
Phanerochaete chrysosporium *Phanerochaete*
Polyporus *Pleurotus ostreatus* *Pleurotus* *Pichia*
Rhodotorula *Rhodotolura* *Rhizopus*
Spirobolomyces *Saccharomyces mucilaginosus*
Trametes *Trametes* *Torulopsis* *Talaromyces*
Torulopsis *Trichosporon mucoides* *versicolor*
Yarrowia

استان خوزستان با ذخایر عظیم نفت و گاز از مهمترین مناطق ایران به شمار می‌آید و فرآیند اکتشاف و استخراج نفت روزانه صورت می‌گیرد و آلودگی‌های نفتی در خاک حوزه‌های برداشت نفت امری طبیعی است. لذا این تحقیق سعی دارد که تنوع قارچ‌های موجود در خاک‌های آلوده حوزه نفتی مارون را شناسایی کند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خاک

نمونه‌های خاک آلوده به مواد نفتی در آذرماه سال 96 از خاک‌های آلوده از عمق 0-30 سانتی‌متری خاک حوزه نفتی مارون اهواز تهیه شد. نمونه‌های خاک از اطراف حوضچه‌های نفت از عمق زراعی در چهار جهت مختلف برداشت و مخلوط شد و نهایتاً یک نمونه تصادفی به آزمایشگاه منتقل شد. بافت نمونه‌های خاک در هر چهار منطقه نمونه‌برداری لوم ماسه‌ای (loam sandy) بود. میزان آلودگی به هیدروکربن‌های نفتی در نمونه‌های تصادفی مورد آزمایش بطور متوسط ده درصد بود. نمونه‌های خاک پس از خشک کردن از الک دو میلی‌متری عبور داده و پس از جمع‌آوری در کیسه‌های سترون تا انجام مراحل جداسازی در شرایط یخچال نگهداری شد.

جداسازی قارچ از خاک‌های آلوده به مواد نفتی

سه گرم از هر نمونه خاک به نه میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی 0/1 درصد توین 80 اضافه و به شدت تکان داده شد. از سوسپانسیون خاک پایه، رقت‌های مختلف با استفاده از آب مقطر حاوی توین تهیه و سپس به روش چمنی کشت شدند. از سوسپانسیون‌های ترقیق شده، 100 میکرولیتر به ظروف پتری حاوی سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) محتوی رزبنگال (100 mg/l) و سولفات استرپتومایسین (30 mg/l) اضافه و با استفاده از پخش‌کننده L- شکل به خوبی در سطح محیط کشت پخش شد. سپس ظروف پتری در دمای 28 °C تا ده روز نگهداری شدند. با مشاهده پرگنه‌های ظاهر شده روی محیط کشت، از هر تیپ پرگنه مربوط به هر نمونه یک جدایه انتخاب و به محیط جدید مستقل مایه‌زنی شد (بالاجی و همکاران، 2014). شاخص انتخاب جدایه در این مرحله تنها بر اساس ظاهر پرگنه و مشاهده سطحی ساختارهای قارچی (کنیدیفورها، کنیدیوم‌ها، اسپورانژیوفورها و اسپورانژیوم‌ها) روی اسلاید میکروسکوپی بود.

خالص‌سازی و بررسی‌های ریخت‌شناسی

مراحل خالص‌سازی جدایه‌ها و بررسی‌های ریخت‌شناسی بر اساس روش‌های مورد استفاده توسط بابااحمدی و همکاران (2018) و حیدری و همکاران (2018) انجام شد. جدایه‌های انتخابی به تشنک‌های پتری حاوی PDA مایه‌زنی و برای اسپوردهی در اتاقک رشد با دمای 28 درجه سلسیوس و در شرایط تناوب نوری (12:12) به مدت یک تا دو هفته قرار داده شدند. پس از اسپوردهی، سوسپانسیون اسپور با استفاده از آب مقطر استریل محتوی 0/1 درصد توین 80 تهیه شد.

حجم 20 میکرولیتر تهیه شد. تکثیر در دستگاه ترموسیکلر (مدل MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler) با برنامه زیر انجام شد: ذوب اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه، 35 چرخه‌ی سه مرحله‌ای (شامل واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 56-51 و 56 درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای نواحی ITS و GPDH و بسط آغازگرها در دمای 72 درجه سانتی‌گراد) و بسط نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه.

قطعات تکثیری برای تخلیص و توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره‌جنوبی ارسال شد. از نرم‌افزارهای DNABaserver3.5.0 (هال، 1999)، MEGA ver 6.0 (www.DnaBaser.com) و نرم‌افزار (تامورا و همکاران، 2013) برای تجزیه و تحلیل توالی، تلفیق خوانش‌های پیشرو و معکوس و بررسی‌های فیلورنی استفاده گردید. توالی‌های هر جدایه با سویه‌های شناخته شده در بانک ژن با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn مورد مقایسه قرار گرفت. ارتباط فیلوژنتیکی این جدایه‌ها با سویه‌های شناخته شده از گونه‌های نزدیک، با ترسیم درخت فیلوژنتیکی بوسیله الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (maximum likelihood) با کمک نرم‌افزار MEGA ver 6.0 انجام شد.

نتایج

با انجام عملیات جستجوی بلاست، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و بررسی ریخت‌شناسی، جدایه‌ها شناسایی و گونه‌های ذیل را شامل شدند: *Acremonium Aspergillus Alternaria destruens sclerotigenum Fusarium Curvularia sp. Cladosporium puyae sp. P. Penicillium oxalicum Mucor circinelloides sp. Paramyothecium terrestris chrysogenum Rhizopus oryzae* و جنس *Allophoma* و *Neodidymelliopsis* از خانواده *Didymellaceae*.

بررسی مولکولی جدایه‌های مورد مطالعه

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای تعداد 23 جدایه انتخاب شده با جفت آغازگر عمومی ITS1-F و NL4-R برای تکثیر نواحی ITS و بخش‌هایی از 28S منجر به ایجاد قطعات تکثیری حدود 1200 جفت باز شد. طول باند هدف ایجاد شده با استفاده از جفت آغازگر GPD1/GPD2 برای جدایه‌ی *Curvularia* حدود 700bp مشاهده شد. توالی‌های بدست آمده در بانک ژن تحت شماره‌های دسترسی که در جدول 1 آورده شده است، ثبت گردیدند. توالی‌های ITS مربوط به جدایه‌های مورد

خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور روی محیط کشت آب-آگار (WA) انجام شد (آنیزورت، 1971). تمام بررسی‌های ریخت‌شناسی روی پرگنه‌های رشدیافته روی محیط PDA انجام گرفت. مشخصات و اندازه‌ی ساختارهای اسپورزائی (کنیدیوم‌ها، کنیدیوفورها، اسپورانژیوفورها و اسپورانژیوم‌ها) با استفاده از عدسی شیئی 40x و 100x یک میکروسکوپ نوری (Leitz (wetzlar, SM-LUX) تعیین شد. ساختارهای فارچی با استفاده از میکروسکوپ نوری (OLYMPUS BX51) متصل به یک دوربین دیجیتال (OLYMPUS DP12) تصویربرداری شد.

تهیه زیست‌توده قارچی، استخراج DNA و بررسی‌های مولکولی

تهیه زیست‌توده، استخراج DNA، تکثیر نواحی ژنی، آغازگرهای مورد استفاده، خالص‌سازی تولیدات PCR، توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل آن‌ها بر اساس روش‌های مورد استفاده توسط بابااحمدی و همکاران (2018) و حیدری و همکاران (2018) انجام شد. چهار دیسک از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های جوان به ظروف حاوی محیط کشت PDB اضافه شده و به مدت یک تا دو هفته در شرایط دمائی 28 درجه سلسیوس و با سرعت 120 دور در دقیقه شیک شدند. با استفاده از قیف، کاغذ صافی و پمپ خلاء، زیست‌توده میسلیومی جمع‌آوری و در دستگاه فریزدرایر (Freeze-Dryer, Alpha 1-2LD Plus, Christ) خشک‌انجمادی شدند. زیست‌توده قارچی با استفاده از دسته هاون در درون ازت مایع پودر و پس از جمع‌آوری در لوله‌های فالتون (پارافیلیم شده) در فریزر -20 درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA ذخیره شد. جداسازی DNA به روش ریدر و برودا (1985) با اندکی تغییر (احمدپور و همکاران، 2017) انجام گرفت. برای تکثیر حدود 1200 bp از ناحیه ITS و 28S-D1/D2، از جفت آغازگر عمومی ITS1 و NL4 استفاده شد (وایت و همکاران، 1990). همچنین جهت تکثیر حدود 600 bp از ژن GPDH برای جدایه *Curvularia*، از جفت آغازگر اختصاصی *gpd1* و *gpd2* (بربی و همکاران، 1999) استفاده شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از دو میکرولیتر بافر 10x Taq buffer، 1/6 میکرولیتر $MgCl_2$ (25mM)، 0/8 میکرولیتر آغازگر مستقیم (10 μ m)، 0/8 میکرولیتر آغازگر معکوس (10 μ m)، 0/25 میکرولیتر از مخلوط dNTP (2.5 μ m each)، 5 μ l Taq DNA Polymerase (5u/ μ l) (GenBio)، 1 میکرولیتر DNA الگو (حدود 200 نانوگرم) و آب مقطر دوبار تقطیر شده میلی‌کیو تا

دیواره ظریف و بیضی شکل می‌باشند. کنیدیوم‌ها دارای دیواره عرضی و چند سلولی بوده، اندازه طول و عرض کنیدیوم‌ها $15/6-37/7(-54/6) \times 3-13$ میکرومتر (میانگین طول و عرض اندازه‌گیری شده برای 50 عدد کنیدی) می‌باشند. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه‌های مورد بررسی نشان داد که توالی ITS این جدایه‌ها با سویه‌های شناخته شده *A. destruens* (از جمله ATCC 204363) 100% شباهت نوکلئوتیدی دارد. همچنین جدایه‌های مورد بررسی با سویه شناخته شده *A. destruens* ATCC 204363 و سویه‌هایی از گونه‌های خویشاوند این گونه خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استراپ 90% ایجاد کردند (شکل 1).

Acremonium sclerotigenum (Moreau & R. Moreau ex Valenta) W. Gams, *Cephalosporium-artige Schimmelpilze*: 45 (1971) (شکل 4)

یک جدایه از این گونه با نام *A. sclerotigenum* SCUA-Deh-33 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. ریشه‌ها منشعب و به صورت هوایی در محیط غذایی رشد می‌کنند. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. قطر ریشه در پرگنه‌های 14 روزه $1/01-2/02(-0/9)$ میکرومتر است. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ و شفاف، استوانه‌ای شکل که به سمت نوک باریک، دوکی شکل، دارای دیواره صاف می‌باشد. اسکروت‌ها، نیز کروی و دارای دیواره صاف می‌باشد. اندازه طول و عرض کنیدیوم‌ها $2/02 \times 3/03-7/07(-2/5)$ میکرومتر (میانگین طول و عرض اندازه‌گیری شده برای 50 عدد کنیدی) می‌باشد.

مطالعه با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn با استرین‌های شناخته شده مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول 1). یک درخت تک‌زنی مبتنی بر ناحیه ITS برای تمام جدایه‌های مورد بررسی بغیر از *Curvularia* با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه ترسیم شد (شکل 1) و جداسازی فیلوژنتیکی جدایه‌ها با نزدیک‌ترین گونه‌های خویشاوند تجزیه و تحلیل شد. برای *Curvularia*، یک درخت دوژنی مبتنی بر دو ناحیه ITS و GPDH با نزدیک‌ترین گونه‌های خویشاوند با جدایه‌ی مورد بررسی ترسیم شد (شکل 2). توالی‌های مربوط به ناحیه -28S D1/D2 با توجه به حفاظت‌شوندگی بالا کمکی به تشخیص گونه‌ها نکرد و به همین خاطر نتایج BLASTn این ناحیه آورده نشده است. تجزیه و تحلیل ریخت‌شناسی و مولکولی برای هر گونه به تفکیک در ذیل آورده شده است.

بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های بررسی شده

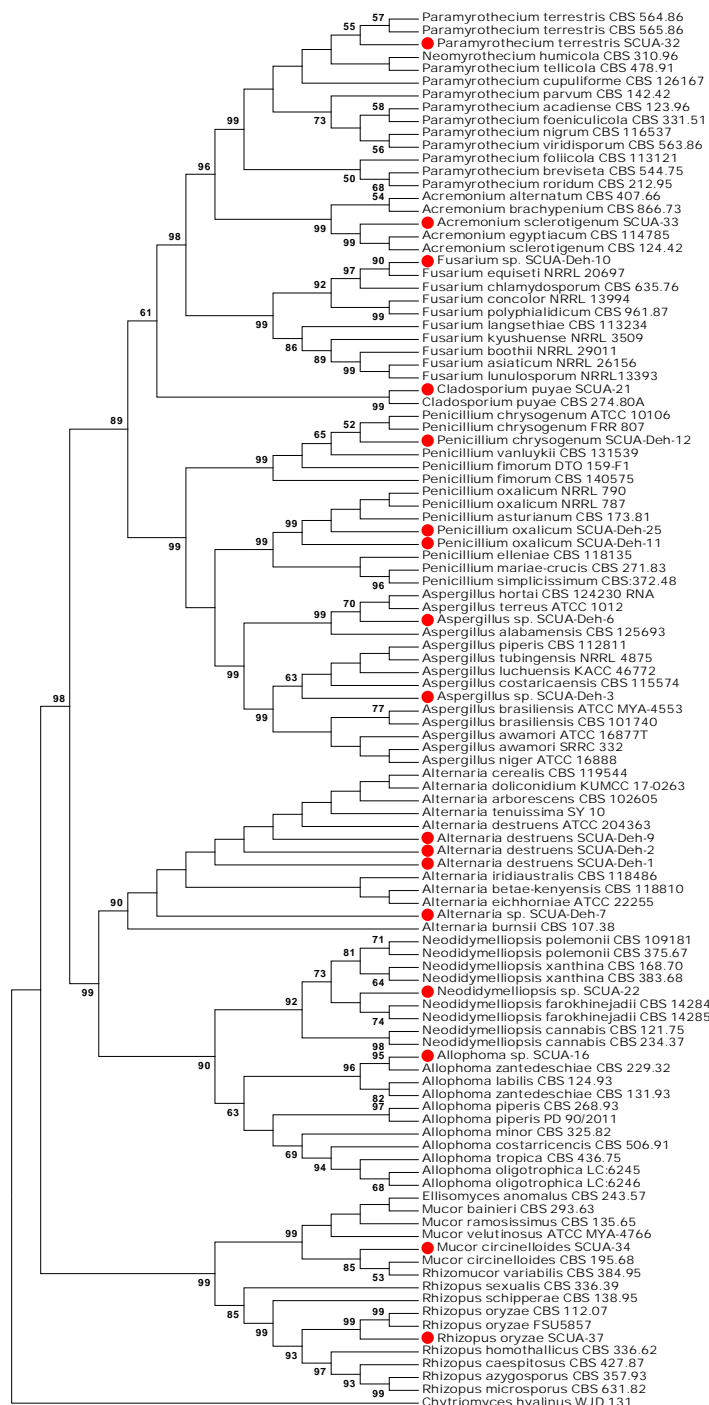
Alternaria destruens E.G. Simmons, *Mycotaxon* 68: 419 (1998) (شکل 3)

تعداد پنج جدایه از این گونه با نام‌های SCUA-Deh-1، SCUA-Deh-2، SCUA-Deh-4، SCUA-Deh-5 و SCUA-Deh-9 از خاک‌های آلوده به مواد نفتی مارون اهواز جداسازی شد. کنیدیوفورهای نسبتاً کوتاه با زنجیره‌ی کنیدیومی اغلب فاقد نوک که دارای طول متوسط می‌باشد و رشد ریشه‌ها بصورت فرو رفته در محیط می‌باشد. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است.

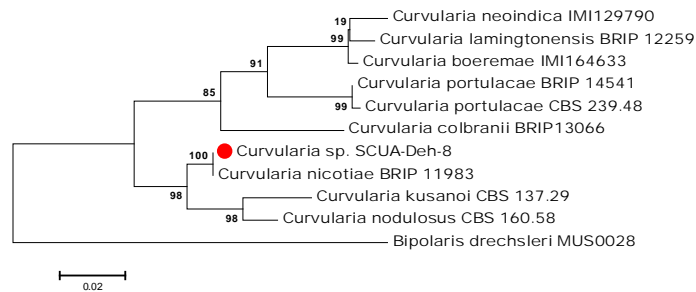
قطر ریشه در پرگنه‌های نه روزه $5/2(-6/4)$ میکرومتر است. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دارای

جدول 1- مشخصات مربوط به توالی‌های ثبت‌شده‌ی جدایه‌های مورد مطالعه، شماره دسترسی در بانک ژن و نتایج جستجوی BLASTn.

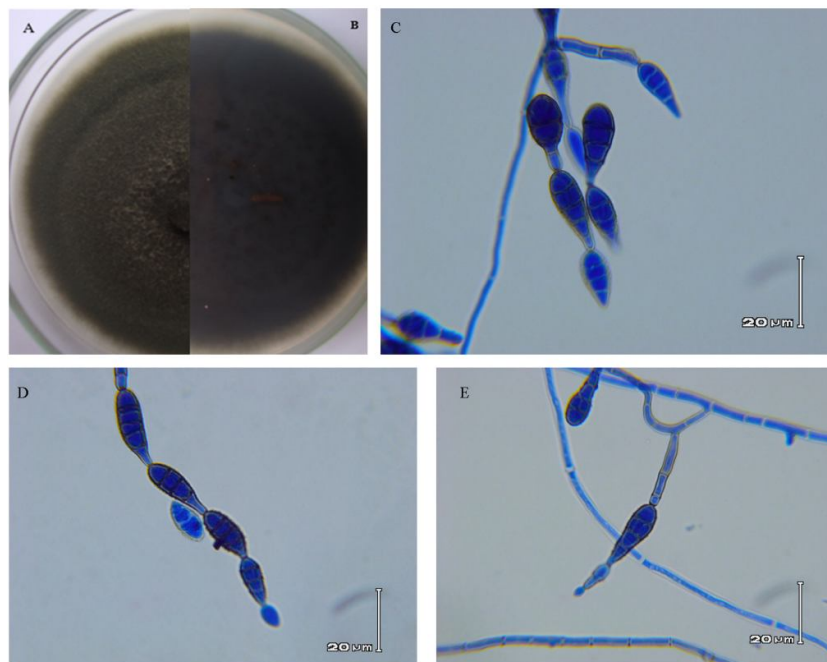
نام گونه‌ی شناسائی شده	نام جدایه	شماره دسترسی توالی‌ها در بانک ژن			BLASTn	اصلی‌ترین نتیجه جستجوی	درصد شباهت
		ITS	28S	GPDH			
<i>Alternaria destruens</i>	SCUA-Deh-1	MH795177	MH795293	-	<i>Alternaria destruens</i> ATCC 204363	%100	
<i>A. destruens</i>	SCUA-Deh-2	MH795182	MH795298	-	<i>A. destruens</i> ATCC 204363	%100	
<i>A. destruens</i>	SCUA-Deh-9	MH795192	MH795306	-	<i>A. destruens</i> ATCC 204363	%100	
<i>Aspergillus</i> sp.	SCUA-Deh-3	MH795186	MH795302	-	<i>A. tubingensis</i> NRRL 4875	%100	
<i>Aspergillus</i> sp.	SCUA-Deh-6	MH795191	MH795305	-	<i>Aspergillus terreus</i> ATCC 1012	%99	
<i>Curvularia</i> sp.	SCUA-Deh-8	MH550084	--	MH550083	<i>Curvularia nicotiae</i> CBS 655.74	%100	
<i>Fusarium</i> sp.	SCUA-Deh-10	MH795178	MH795294	-	<i>Fusarium chlamydosporum</i> var. <i>fuscum</i> CBS 635.76	%99	
<i>Penicillium oxalicum</i>	SCUA-Deh-11	MH795179	MH795295	-	<i>Penicillium oxalicum</i> NRRL 787	%100	
<i>P. oxalicum</i>	SCUA-Deh-25	MH795185	MH795301	-	<i>P. oxalicum</i> NRRL 787	%100	
<i>P. chrysogenum</i>	SCUA-Deh-12	MH795180	MH795296	-	<i>P. chrysogenum</i> FRR 807	%100	
<i>Allophoma</i> sp.	SCUA-Deh-16	MH795181	MH795297	-	<i>Allophoma zantedeschiae</i> CBS 229.32	100%	
<i>Neodidymelliopsis</i> sp.	SCUA-Deh-22	MH795184	MH795300	-	<i>Neodidymelliopsis achtydis</i> CBS 256.77	%99	
<i>Cladosporium puyae</i>	SCUA-Deh-21	MH795183	MH795299	-	<i>Cladosporium puyae</i> CBS 274.80A	%100	
<i>Paramyrothecium terrestris</i>	SCUA-Deh-32	MH795187	MH795303	-	<i>Paramyrothecium terrestris</i> CBS 564.86	%100	
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	SCUA-Deh-33	MH795188	MH795304	-	<i>Acremonium sclerotigenum</i> CBS 12442	%100	
<i>Mucor circinelloides</i>	SCUA-Deh-34	MH795189	-	-	<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i> CBS 195.68	98%	
<i>Rhizopus oryzae</i>	SCUA-Deh-37	MH795190	-	-	<i>Rhizopus oryzae</i> FSU5857	97%	



شکل 1- درخت تک‌زنی بدون مقیاس گونه‌های مورد بررسی که در آنالیز درست‌نمایی بیشینه بر اساس توالی ITS با استفاده از مدل K2+G+I بدست آمد. اعداد اعتبارسنجی بالای 50% نشان داده شده است. آرایه‌های مورد بررسی با دایره قرمز نشان داده شده است



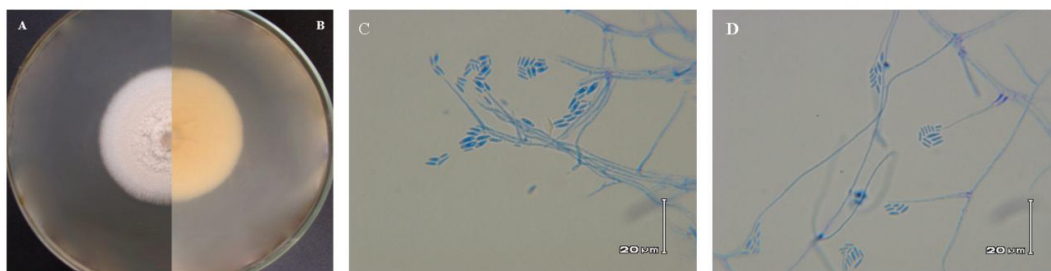
شکل 2- درخت دوژنی جدایه‌ی *Curvularia* که در آنالیز درست‌نمائی بیشینه بر اساس ترکیب توالی ITS و GPDH با استفاده از مدل K2+G بدست آمد. اعداد اعتبارسنجی بالای 50% نشان داده شده است. آرایه مورد بررسی با دایره توپر قرمز نشان داده شده است.



شکل 3- خصوصیات میکروسکوپی جدایه *A. destruens* SCUA-Deh-2، A: روی و پشت پرگنه. C-E: کنیدی، کنیدیوفور و ریشه‌های قارچ

sclerotigenum CBS 12442 و یک سویه از گونه‌ی *Acremonium egyptiacum* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 99 درصد ایجاد کردند.

نتایج حاصل از جستجوی BLASTn، بر اساس ناحیه ITS، نشان داد که جدایه‌ی *A. sclerotigenum* SCUA-Deh-33 با سویه CBS 12442 *A. sclerotigenum*، 100% شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با سویه شناخته شده‌ی *A.*

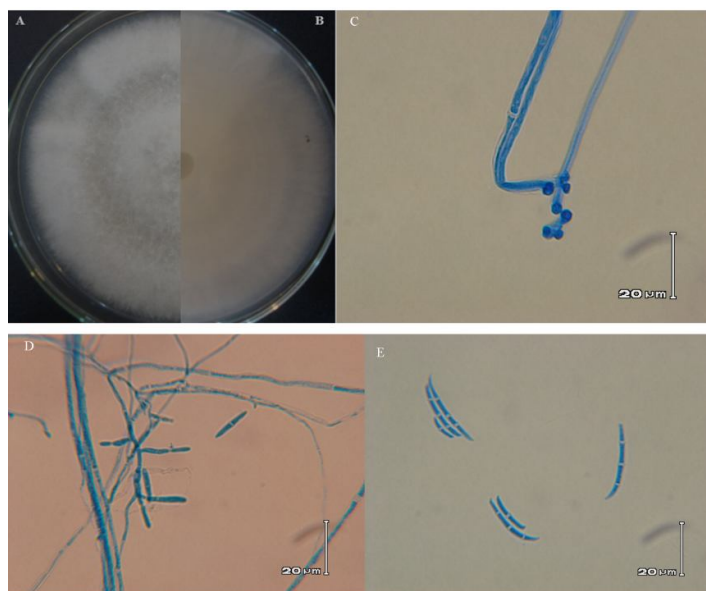


شکل 4- خصوصیات میکروسکوپی جدایه *A. sclerotigenum* SCUA-Deh-33، A: روی و پشت پرگنه. C-D: کنیدی و ریشه‌های قارچ

میکرومتر (میانگین طول و عرض اندازه‌گیری شده برای 50 عدد کنیدی) می‌باشد. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه SCUA-Deh-10 *Fusarium sp.* نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *F. chlamydosporum* از جمله سویه CBS 635.76 var. *fuscum* 99 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه مورد بررسی با سویه شناخته شده *F. chlamydosporum* CBS 635.76 و یک سویه از گونه خویشاوند *F. equiseti* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 97 درصد ایجاد کردند.

(شکل 5) *Fusarium sp.*

یک جدایه از این گونه با نام *Fusarium sp.* SCUA-Deh-10 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. ریشه‌ها منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی رشد می‌کنند. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. قطر ریشه در پرگنه‌ها (5/8-2/8(-1/2)-5/05) میکرومتر است. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره ظریف و صاف، داسی شکل می‌باشند. کنیدیوم‌ها تک سلولی و چند سلولی بوده، اندازه طول و عرض میکروکنیدی‌ها $10/1-13/5(-20/2) \times 2/5(-3)$ و $2(-1/6)$ میکرومتر و طول و عرض ماکروکنیدی‌ها $19/19(-15/3)-23(-26/2) \times 2/5(-2/9)-2/02(-1/9)$

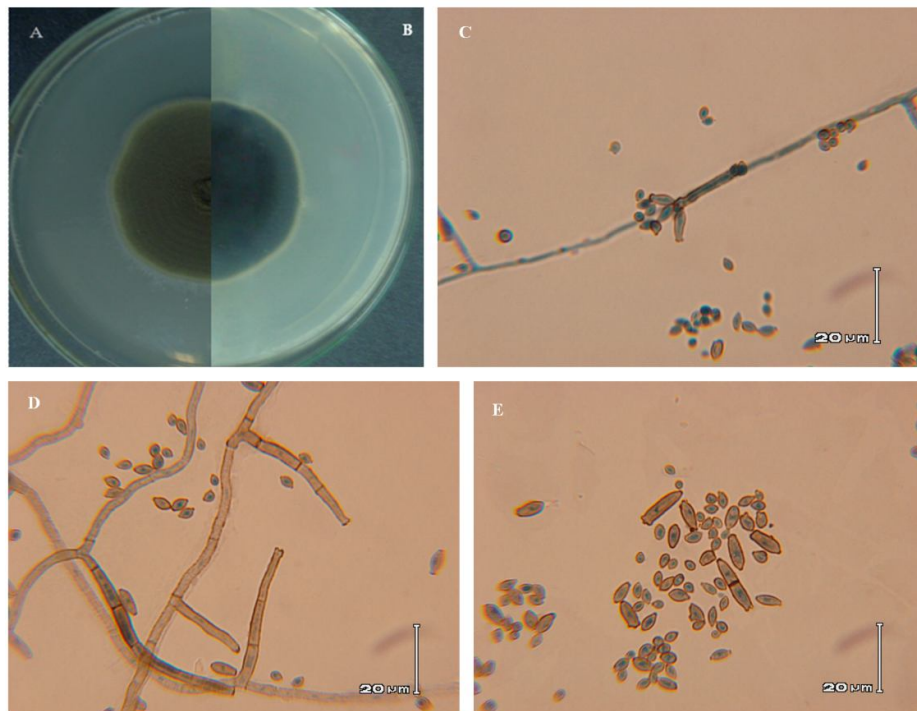


شکل 5- خصوصیات میکروسکوپی جدایه *F. chlamydosporum* SCUA-Deh-10: A-B: روی و پشت پرگنه. C: کلایدوسپور. D-E: ریشه، کنیدیوفور، میکروکنیدی و ماکروکنیدی.

50 عدد کنیدی) می‌باشد. ریشه‌های این قارچ نیز دارای دیواره عرضی با فواصل کوتاه می‌باشد. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه SCUA-Deh-21 *C. puyae* نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *C. puyae* از جمله سویه CBS 274.80A، 100 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه مورد بررسی با سویه شناخته شده *Cladosporium puyae* CBS 274.80A خوشه‌بندی شد و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 99 درصد ایجاد کرد.

Cladosporium puyae Bensch, Crous & U. Braun, Studies in Mycology 82: 59 (2015) (شکل 6)

یک جدایه از این گونه با نام *C. puyae* SCUA-Deh-21 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. کنیدیوفورها اغلب کوتاه، ساده و در بعضی موارد منشعب شده، دارای دیواره عرضی و به رنگ قهوه‌ای می‌باشند. کنیدیوم‌ها بصورت ساده قرار دارند و به اشکال مختلف استوانه‌ای، بیضوی، دوکی و نیمه کروی و به رنگ قهوه‌ای است و دارای ابعاد $5/5-8 \times 3-4/02$ میکرومتر (میانگین طول و عرض اندازه‌گیری شده برای

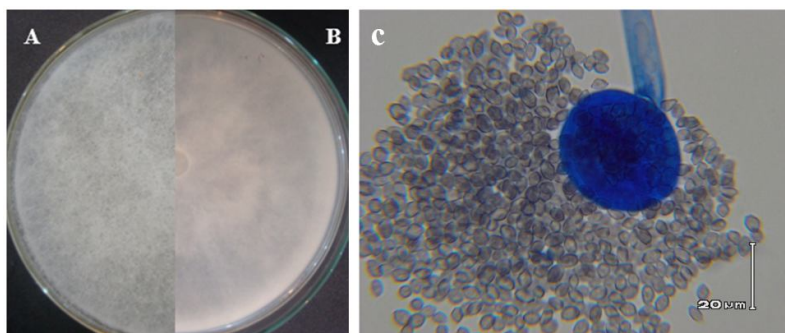


شکل 6- خصوصیات میکروسکوپی *R. oryzae* SCUA-Deh-21، C، A-B: روی و پشت پرگنه. C-E: ریشه‌ها، کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها.

می‌باشد. کلوملا دایره‌ای تا بیضوی و به ابعاد 39/3 - 14/4 × 14/1(-11/1)-34/3(-45) میکرومتر است. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه *R. oryzae* SCUA-Deh-37 نشان داد که توالی ITS این جدایه با *R. oryzae* FSU5857 97 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با سویه‌های شناخته شده‌ی *R. oryzae* CBS 112.07 و *R. oryzae* FSU5857 خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 99 درصد ایجاد کردند.

Rhizopus oryzae Went & Prins. Geerl., Verhandelingen Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Afdeling Natuurkunde 4: 16 (1895) (شکل 7)

یک جدایه از این گونه با نام *R. oryzae* SCUA-Deh-37 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. ریشه‌ها منشعب و فرورفته در محیط غذایی رشد می‌کنند. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. قطر ریشه در پرگنه‌های دو روزه 7/8(-4/04)-16/4(-33/3) میکرومتر است. اسپورانژیوفور به صورت تکی و غیر منشعب و طول اسپورانژیوم 58/4 (31/3)-64/4(-97/9) میکرومتر حاوی اسپورهای فراوان تخم‌مرغی شکل می‌باشد

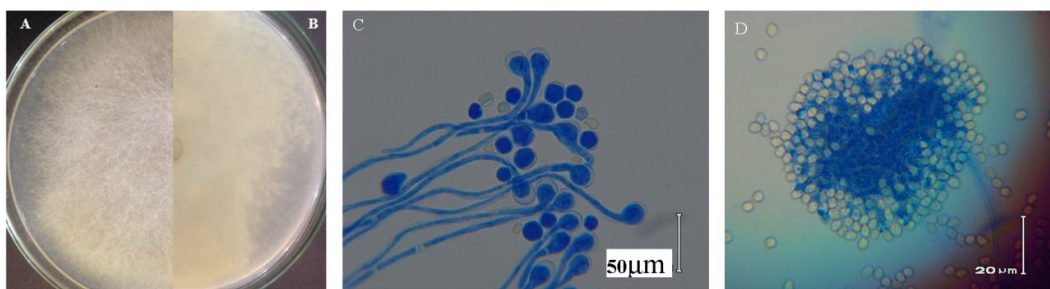


شکل 7- خصوصیات میکروسکوپی *R. oryzae* SCUA-Deh-37، A-B: روی و پشت پرگنه. C: اسپورانژیوفور، اسپورانژیوم و اسپورانژیوسپورها

ITS توالی SCUA-Deh-34 *circinelloides* نشان داد که توالی *M. circinelloides* این جدایه با سویه‌های شناخته شده *M. circinelloides f. circinelloides* CBS 195.68، 98 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با سویه شناخته شده *M. circinelloides* CBS 195.68 و یک سویه از گونه‌ی *Rhizomucor variabilis* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 85 درصد ایجاد کردند.

Mucor circinelloides Tiegh., Annales des Sciences Naturelles Botanique sér. 6, 1: 94 (1875) (شکل 8)

یک جدایه از این گونه با نام SCUA-Deh-34 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. ریشه‌ها به صورت هوایی رشد کرده و بی‌رنگ بوده، قطر آن‌ها (18-)-10/3(-3/1)-6/06 میکرومتر بود. اسپورها بصورت چندضلعی مشاهده شد. ابعاد کلوملا (38/3(-19/1)-12/1(-7/3) × (29/9)-17/1(-7/07)-9/7 میکرومتر و به شکل گرد تا بیضوی بود. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه *M.*



شکل 8- خصوصیات میکروسکوپی *M. circinelloides* SCUA-Deh-34: A-B: روی و پشت پرگنه. C-D: اسپورانژیوفور، اسپورانژیوم و اسپورانژیوسپورها.

توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *P. oxalicum* NRRL 787 از جمله سویه 100 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌های مورد بررسی با سویه‌های شناخته شده گونه‌ی *P. oxalicum* (NRRL 787 و NRRL 790) و یک سویه از گونه‌ی *Penicillium asturianum* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 99 درصد ایجاد کردند.

Penicillium oxalicum Currie & Thom, Journal of Biological Chemistry 22: 289 (1915) (شکل 9)

دو جدایه از این گونه با نام‌های SCUA-Deh-11 و SCUA-Deh-25 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه‌های نفتی مارون اهواز جداسازی شد. کنیدیوفورها روشن، بدون دیواره عرضی و بسیار بلند بوده و حدوداً 200 تا 420 میکرومتر می‌باشد. فیالیدها به طول (14/03)-9/09-12/12 میکرومتر و طول متولا 15 تا 22 میکرومتر است. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه‌ی *Penicillium oxalicum* SCUA-Deh-11 نشان داد که

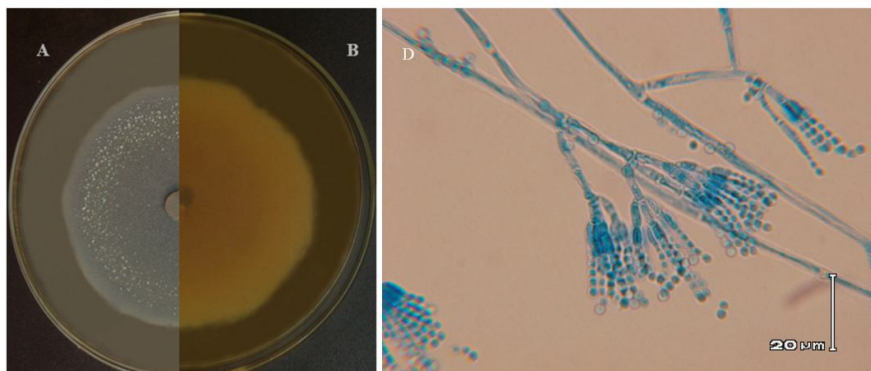


شکل 9- خصوصیات میکروسکوپی *P. oxalicum* SCUA-Deh-11: A-B: روی و پشت پرگنه. C-D: کنیدیوفورها، کنیدیوم و فیالیدهای قارچ.

8/08 میکرومتر است. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه SCUA-*Penicillium chrysogenum* Deh-12 نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *P. chrysogenum* از جمله سویه *P. chrysogenum* CBS 306.48، 100 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با سویه‌های شناخته شده‌ی گونه‌های *P. chrysogenum*، *P. vanluykii* و *P. fimum* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استراپ 99 درصد ایجاد کردند.

Penicillium chrysogenum Thom, U.S.D.A. Bureau of Animal Industry Bulletin 118: 58 (1910) (شکل 10)

پنج جدایه از این گونه ز خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. ریشه‌ها منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی رشد می‌کنند. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. رشد ریشه در پرگنه‌های 12 روزه، 3/03-4/04 میکرومتر است. کنیدیوفورها منشعب به طول (51/5(-74/7) - 12/1)- 38/3(میکرومتر، طول فیالید 8/08- 6/06(-5/05)- میکرومتر و متولا نیز به طول 10/1(-12/1) - 6/5(-) میکرومتر است.

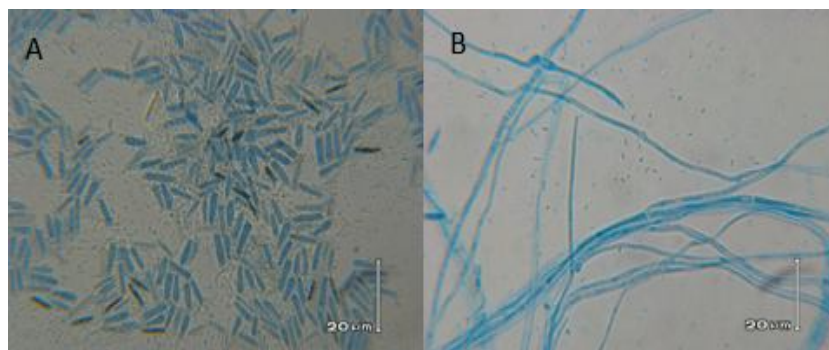


شکل 10 - خصوصیات میکروسکوپی *P. chrysogenum* SCUA-Deh-12: A-B: روی و پشت پرگنه. D: کنیدیوم، کنیدیوفور و فیالیدهای قارچ.

حاصل از جستجوی BLASTn جدایه *P. terrestris* SCUA-Deh-32 نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *P. terrestris* از جمله سویه *P. terrestris* CBS 564.86، 100 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با دو سویه شناخته شده از گونه‌ی *P. terrestris* (CBS 564.86 و CBS 565.86) خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استراپ 55 درصد ایجاد کردند.

Paramyrothecium terrestris L. Lombard & Crous, Persoonia 36: 213 (2016) (شکل 11)

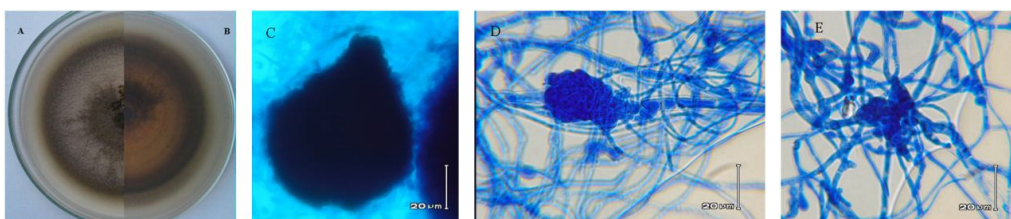
یک جدایه از این گونه با نام *P. terrestris* SCUA-Deh-32 از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. ریشه‌ها دارای دیواره، منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی رشد کردند. کنیدی‌ها بیضی شکل، کشیده و روشن مشاهده شد و همچنین دارای طول و عرض (11/11) (1/7-2/02×7/07-10/8) میکرومتر مشاهده شد. نتایج



شکل 11 - خصوصیات میکروسکوپی جدایه *P. terrestris* SCUA-Deh-32، ریشه، کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها

247 × (-442) -262/6 (-52) -176 میکرومتر است. اندازه طول و عرض گردن در پیکنیدها (-208) -109 -33/8 (-23/4) × 33/8 (-13) -70/2 (13) -31/2 میکرومتر می‌باشد. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه‌ی *Neodidymelliopsis* sp. SCUA-Deh-22 نشان داد که توالی ITS این جدایه با برخی جنس‌های شناخته شده در خانواده Didymellaceae از جمله گونه‌های جنس *Neodidymelliopsis* 99 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با گونه‌های شناخته شده‌ی جنس *Neodidymelliopsis* خوشه‌بندی شد و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 92 درصد ایجاد کرد.

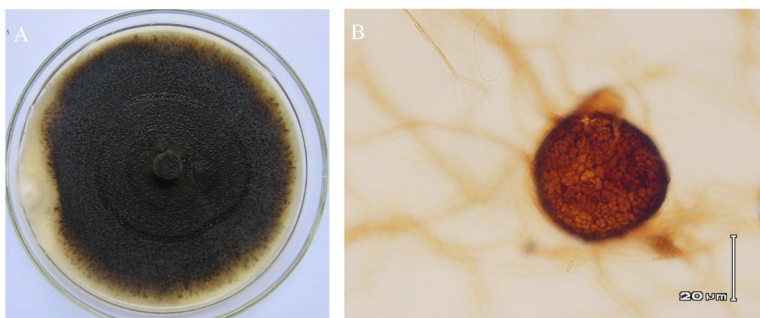
(شکل 12) *Neodidymelliopsis* sp. SCUA-Deh-22 این جدایه از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شدند. ریشه‌ها منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی رشد می‌کنند. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. کنیدیوماتا از نوع پیکنید و پیکنیدها عمدتاً به صورت انفرادی یا تجمع‌های زنجیره مانند در سطح یا به صورت فرورفته در محیط تشکیل می‌شوند. رنگ آن‌ها با افزایش سن تیره می‌شود. پیکنیدهای بدون کرک در اشکال و اندازه‌های متفاوتی ایجاد می‌شوند و عمدتاً تخم مرغی شکل هستند اما کروی یا طویل نیز در بین آن‌ها دیده می‌شود. اندازه طول و عرض پیکنیدهای اندازه گیری شده (-390) -338 (-78)



شکل 12- خصوصیات میکروسکوپی قارچ *Neodidymelliopsis* sp. SCUA-Deh-22: A-B: روی و پشت پرگنه. C: پیکنیدیوم. D-E: کلامیدوسپورهای منفرد و چندسلولی

149/5 (-124/5) -244 (-299) × 158/6 (-137/8) میکرومتر است. اندازه طول و عرض گردن در پیکنیدها -78 -20/8 (-13) -46/8 (-62/5) × 33/8 (-13) -33/8 میکرومتر می‌باشد. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه *Allophoma* sp. SCUA-Deh-16 نشان داد که توالی ITS این جدایه با برخی جنس‌های شناخته شده در خانواده Didymellaceae از جمله گونه‌های *Allophoma* 100-98 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌ی مورد بررسی با سویه‌هایی از دو گونه‌ی شناخته شده‌ی *A. labilis* و *A. zantedeschiae* خوشه‌بندی شد و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 96 درصد ایجاد کرد.

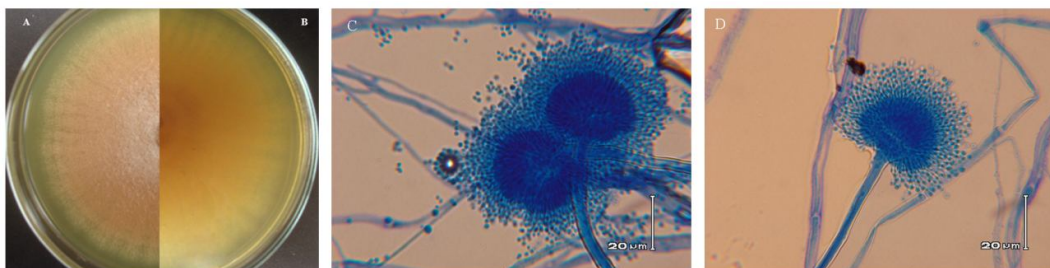
(شکل 13) *Allophoma* sp. SCUA-Deh-16 این جدایه از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شدند. ریشه‌ها منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی رشد می‌کنند. رنگ ریشه‌ها بی‌رنگ است. کنیدیوماتا از نوع پیکنید و پیکنیدها عمدتاً به صورت انفرادی یا تجمع‌های زنجیره مانند در سطح یا به صورت فرورفته در محیط تشکیل می‌شوند. رنگ آن‌ها با افزایش سن تیره می‌شود. پیکنیدهای بدون کرک در اشکال و اندازه‌های متفاوتی ایجاد می‌شوند و عمدتاً تخم مرغی شکل هستند اما کروی یا طویل نیز در بین آن‌ها دیده می‌شود. اندازه طول و عرض پیکنیدهای اندازه گیری شده (-369/2) -330/2



شکل 13- خصوصیات میکروسکوپی قارچ *Allophoma* sp. SCUA-Deh-16: A: روی پرگنه. B: پیکنیدیوم

جستجوی BLASTn جدایه‌ی *Aspergillus* sp. SCUA-Deh-6 نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *A. terreus* از جمله سویه *A. terreus* ATCC 1012، 99 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌های مورد بررسی با سویه‌های شناخته شده از سه گونه‌ی *A. alabamensis*، *A. hortai* و *A. terreus* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 99 درصد ایجاد کردند.

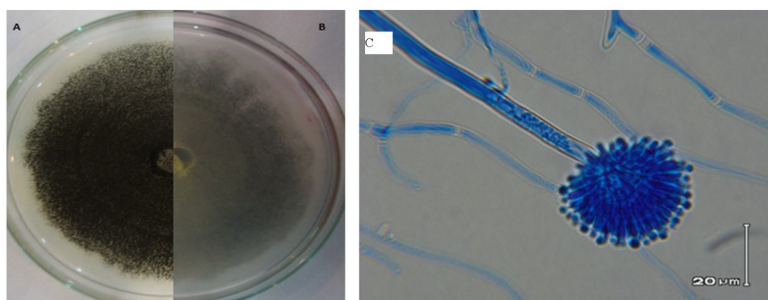
(شکل 14) *Aspergillus* sp. morphologic type 1 پنج جدایه از این تیپ مورفولوژیک (مانند جدایه‌ی *Aspergillus* sp. SCUA-Deh-6) از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شد. ریشه‌ها منشعب و فرورفته در محیط غذایی رشد کرده و بی رنگ می‌باشند. رشد ریشه‌ها در پرگنه‌های 10 روزه، 6/06-2/02 میکرومتر است. کنیدیوفورها روشن، بدون دیواره عرضی و وزیکول‌ها کروی شکل با قطر 11-15 میکرومتر هستند. متولا تقریباً به بلندی فیالید می‌باشد و طول فیالید 7/07-6/06 مشاهده می‌شود. نتایج حاصل از



شکل 14 - خصوصیات میکروسکوپی جدایه‌ی *Aspergillus* sp. SCUA-Deh-6: A-B: روی و پشت پرگنه. C-D: ریشه‌ها، اسپورانژیوفورها و اسپورانژیوسپورها

BLASTn جدایه *Aspergillus* sp. SCUA-Deh-3 نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده‌ی گونه‌های *A. tubingensis*، *A. costaricensis* و *A. luchuensis* 100 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی درست‌نمائی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل 1)، جدایه‌های مورد بررسی با سویه‌های شناخته شده از گونه‌های *A. tubingensis*، *A. costaricensis*، *A. pipiperis* و *A. luchuensis* خوشه‌بندی شدند و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 63 درصد ایجاد کردند.

(شکل 15) *Aspergillus* sp. morphologic type 2 هفت جدایه از این تیپ مورفولوژیک (مانند جدایه‌ی *Aspergillus* sp. SCUA-Deh-3) از خاک آلوده به مواد نفتی در حوزه نفتی مارون اهواز جداسازی شدند. ریشه‌ها منشعب و بصورت هوایی در محیط غذایی رشد کرده و بی رنگ مشاهده می‌شود. رشد ریشه‌ها در پرگنه‌های هفت روزه (68/18-7/07) 3/03 میکرومتر است. طول و عرض کنیدیوفور (2/6-5/4×4/42(5/2) میکرومتر و ابعاد کنیدی نیز (6/54)37/7-15/6(10/4)×3(2/5) میکرومتر است. متولا به بلندی 12/12-5/05 میکرومتر و فیالید نیز به طول 10/1-5/05 میکرومتر می‌باشد. نتایج حاصل از جستجوی



شکل 15 - خصوصیات میکروسکوپی جدایه *Aspergillus* sp. SCUA-Deh-3: A-B: روی و پشت پرگنه. C: اسپورانژیوم، اسپورانژیوفور و ریشه‌های قارچ

به سمت متورم می‌باشد. کندی‌ها دارای دیواره صاف، بیضوی تا نیمه استوانه‌ای یا گاهی بشک‌های شکل هستند و بیشترین قطر در سلول (حجره) سوم از قسمت پایه دیده می‌شود. کندی‌ها راست یا گاهی به مقدار خیلی کم خمیده هستند. سه حجره‌ای (3-4) (-1) هستند. کندی‌ها در انتهای پایه گرد یا زائده‌دار هستند و با آرامی در قسمت رأسی مسطح می‌شوند. ابعاد کندی‌ها 11-18/2-100) × (-39) 25-36/7 میکرومتر، با بازه‌ی اطمینان 95 درصد 29/1-30/3 × 14/6-15/4 میکرومتر و میانگین آن‌ها 29/7 ± 3/6 × 15 ± 2/1m میکرومتر است. ناف غیر برجسته، سیاه و ضخیم است. کلامیدوسپور و شکل جنسی جنسی مشاهده نشده است. تجزیه و تحلیل توالی DNA نشان داد که دو ناحیه ITS و *gpd* این جدایه با گونه‌ی توصیف شده‌ی قبلی *Curvularia nicotiae* یکسان هستند. در درخت فیلوژنتیکی مبتنی بر دو ناحیه ژنی (شکل 2)، این قارچ در یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ 100% با یک سویه شناخته شده از گونه‌ی *Curvularia nicotiae* خوشه‌بندی شد. اما از لحاظ ریخت‌شناسی از این گونه بسیار متفاوت بود.

شکل 16) *Curvularia* sp. SCUA-Deh-8

ریسه‌ها نیمه روشن تا قهوه‌ای، منشعب، دیواره‌دار، با دیواره‌های نازک و صاف هستند و قطر آن‌ها 2/6-7/8 میکرومتر می‌باشد ($\bar{x} \pm 5/1 \pm 1/4 \mu\text{m}$, n=100) SD =). کندیوفورها به صورت منفرد ظاهر می‌شوند، دیواره‌دار هستند و در قسمت‌های بالایی عریض‌تر می‌شوند و به شکل‌های راست یا مارپیچ قابل مشاهده هستند. در قسمت‌های رأسی انواع کندیوفورهای بلند و متوسط خمیدگی زانویی شکل دیده می‌شود. غیر منشعب هستند، و دیواره‌های سلولی کندیوفورها ضخیم‌تر از هیف‌های رویشی است. کندیوفورها در پایه دارای دیواره‌های صاف و به آرامی به سمت قسمت‌های رأسی گره‌دار می‌شوند. ابعاد کندیوفورها 3/4-5/2 (-2/6) × 31/2-119(-260) میکرومتر، بازه‌ی اطمینان 95 درصد 56/1-82 × 4/5- 4/9 میکرومتر و میانگین آن‌ها 69 ± 45/5 × 4/7 ± 0/7 می‌باشد. سلول‌های کندی‌زایی غالباً به صورت مجتمع و اکثراً همراه با نقاط گره‌دار، انتهایی یا به صورت زائده‌ای دیده می‌شوند. تکثیر (کندی‌زایی) به صورت زیگزاک (سیمپودیال) همراه با زخم‌های ضخیم، حلقوی شکل، قهوه‌ای، نیمه استوانه‌ای



شکل 16- *Curvularia* sp. (IRAN 3133C = SCUA-Deh-8) A: روی پرگنه. B-C: کندیوفورها و کندیوم‌های جوان و بالغ

بحث

Curvularia *Acremonium sclerotigenum* و *Allophoma Paramyothecium terrestris* و *Neodidymelliopsis* برای اولین بار از خاک‌های آلوده به نفت خام گزارش می‌شود. دو گونه‌ی *Cladosporium puyae* و *Paramyothecium terrestris* برای میکوبیوتای ایران جدید می‌باشد.

در این مطالعه بیشتر جدایه‌های مورد بررسی به ترتیب مربوط به جنس‌های *Penicillium* *Aspergillus* و *Alternaria* بود. در مطالعات قبلی نیز این سه جنس از جمله فراوان‌ترین قارچ‌های جداسازی شده از خاک‌ها و آب‌های آلوده به ترکیبات نفتی بوده است (اوست، 1990؛ آل‌نصراوی، 2012). در بررسی قارچ‌شناسی خاک‌های آلوده ثابت شده است که قارچ‌های *Alternaria*

در این مطالعه 13 گونه از 12 جنس قارچی از خاک‌های آلوده به مواد نفتی جداسازی و شناسایی شدند. در بین این قارچ‌ها، جنس‌های *Alternaria* *Aspergillus* *Fusarium* *Mucor* *Penicillium* قبلاً نیز از خاک‌ها و آب‌های آلوده به مواد نفتی جداسازی شده است و بعنوان قارچ‌های موثر در زیست‌پالائی مطرح شده‌اند. (ساراسواتی و هالبرگ، 2002؛ آدیکانلی، 2007؛ جیزایند و همکاران، 2008؛ اوبایر و اینانوو، 2009). از بین این جنس‌های قارچی، تاکنون گونه‌های *Cladosporium* *Alternaria destruens* *Penicillium oxalicum* *Mucor circinelloides puyae* *Rhizopus oryzae* و *P. chrysogenum* از خاک‌های آلوده به نفت خام گزارش نشده است. همچنین، قارچ‌های

تجزیه‌ی مواد آلی در محیط زیست، خاک و آب دارند و توانایی تبدیل مواد شیمیایی خطرناک به مواد بی‌خطر را در طی فرآیند زیست‌پالایی دارند و این قابلیت بواسطه‌ی ترشح زیاد آنزیم‌های قوی خارج سلولی بوسیله آن‌هاست (راگوکومار و همکاران، 2006). پتانسیل بالای قارچ‌ها در زیست‌پالایی بدلیل رشد زیاد، تولید زیست‌توده بزرگ و هیف گسترده می‌باشد (آدیکانلی و آدبامبو، 2007).

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به جهت پوشش مالی این تحقیق قدردانی می‌شود.

Ulocladium و *Penicillium Aspergillus* قادر به رشد در غلظت‌های بالای نفت خام هستند و به نظر می‌رسد بتوان از آنها برای تجزیه نفتی در مدت طولانی استفاده کرد (نیکولاتی و اگلی، 1998؛ ایگن و ماژرک، 1998؛ یتیم و همکاران، 1997؛ دریتسا و همکاران، 2007؛ محسن زاده و همکاران، 2009؛ محسن زاده و همکاران، 2010). شناسایی فلور قارچی متحمل به ترکیبات نفتی در هر منطقه‌ای می‌تواند به امکان استفاده بالقوه از آن‌ها در زیست‌پالایی خاک‌های آلوده کمک کند. در زیست‌پالایی با کمک میکروارگانیسم‌ها، با تلقیح و تکثیر موجودات زنده ذره‌بینی مؤثر در تجزیه یک نوع آلاینده ویژه، خاک‌های آلوده را پاکسازی می‌کنند (وگل و همکاران، 1996؛ مارگزین و همکاران، 2000). قارچ‌ها نقش مهمی در

فهرست منابع:

1. Adekunle, AA. and Adebambo, OA. 2007. Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from detarium senegalense (J. F Gmelin) seeds. *Journal of American Science*, 3: 69–76.
2. Adenipekun, C.O. and Lawal, R. 2012. Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 7(3): 62–68.
3. Ahmadpour, S.A., Mehrabi-Koushki, M. and Farokhinejad, R. 2017. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia*, 69: 171–182.
4. Al-Nasrawi, H. 2012. Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 3:147.
5. Ainsworth, G.C. 1971. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 6th ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 663 pp.
6. Aust, S.D. 1990. Degradation of environmental pollutants by *Phanerochaete chrysosporium* *Microbial Ecology*, 20: 197–209.
7. Babaahmadi, G., Mehrabi-Koushki, M. and Hayati, J. 2018. *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress*, 17(3): 365–379.
8. Balaji, V., Arulazhagan, P. and Ebenezer P. 2014. Enzymatic bioremediation of polyaromatic hydrocarbons by fungal consortia enriched from petroleum contaminated soil and oil seeds. *Journal of Environmental Biology*, 35(3): 521–9.
9. Bartha, R. and Atlas, R.M. 1977. The microbiology of aquatic oil spills. *Advances in Applied Microbiology*, 22: 225–266.
10. Behnood, M., Nasernejad, B. and Nikazar, M. 2013. Biodegradation of crude oil from saline waste water using white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 30(4).
11. Berbee, M., Pirseyedi, M. and Hubbard, S. 1999. Cochliobolus phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia*, 91: 964–977.
12. Bogusławska-Wąs, E. and Dąbrowski, W. 2001. The seasonal variability of yeasts and yeast-like organisms in water and bottom sediment of the Szczecin Lagoon. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203(5–6): 451–458.

13. Chaillan, F., Le Flèche, A., Bury, E., Phantavong, Y.H., Grimont, P., Saliot, A. and Oudot, J. 2004. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. *Research in Microbiology*, 155(7): 587–595.
14. Cupers, C., Pancras, T., Grotenhuis, T. and Rulkens, W. 2002. The estimation of PAH bioavailability in contaminated sediments using hydroxypropyl-B-cyclodextrin and triton x-100 extraction techniques. *Chemosphere*, 46: 1235–1245.
15. Dritsa, V., Rigas, F., Natsis, K. and Marchant, R. 2007. Characterization of a fungal strain isolated from a polyphenol polluted site. *Bioresource Technology*, 98: 1741–1747.
16. Eggen, T. and Majcherczyk, A. 1998. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in contaminated soil by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 4: 111–117.
17. Ekundayo, F.O., Olukunle, O.F. and Ekundayo, E.A. 2012. Biodegradation of bonnylight crude oil by locally isolated fungi from oil contaminated soils in Akure, Ondo state. *Malaysian Journal of Microbiology*, 8(1): 42–46.
18. Gesinde, A.F., Agbo, E.B., Agho, M.O. and Dike, E.F.C. 2008. Bioremediation of some nigerian and arabian crude oils by fungal isolates. *International Journal of Pure and Applied Sciences*, 2(3): 37–44.
19. Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95–98.
20. Heidari, K., Mehrabi-Koushki, M. and Farokhinejad, R. 2018. *Curvularia mosaddeghii* sp. nov., a novel species from the family Pleosporaceae. *Mycosphere*, 9: 635–646.
21. Khan, A.G. 2005. Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 18(4): 355–364.
22. Margesin, R., Zimmerbauer, A. and Schinner, F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, 40(4): 339–346.
23. Merkl, N., Schultze-Kraft, R. and Infante, C. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum contaminated soils. *Water, air, and soil pollution*, 165: 195–209.
24. Mohsenzadeh, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Chehregani, A. and Zafari, D., 2009. Identification of petroleum resistant plants and rhizospheric fungi for phytoremediation petroleum contaminated soils. *Journal Japan Petroleum Institute*, 52:198–20.
25. Mohsenzadeh, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D., Khodakaramian, G.H. and Chehregani, A. 2010. Phytoremediation of petroleum-polluted soils: Application of *Polygonum aviculare* and its root-associated (penetrated) fungal strains for bioremediation of petroleum-polluted soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 613–619.
26. Mouhamadou, B., Faure, M., Sage, L., Marçais, J., Souard, F. and Geremia RA. 2013. Potential of autochthonous fungal strains isolated from contaminated soils for degradation of polychlorinated biphenyls. *Fungal Biology*, 117(4): 268–274.
27. Nicolotti, G. and Egli, S. 1998. Soil contamination by crude oil: impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees. *Environmental Pollution*, 99: 37–43.
28. Obire, O. and Anyanwu, E.C. 2009. Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 6(2): 211–218.
29. Raghukumar, C., Shailaja, M.S., Parameswaran, P.S. and Singh, S.K. 2006. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous media by the marine fungus NIOCC 312:

- Involvement of lignin-degrading enzymes and exopolysaccharides. *Indian Journal of Microbiology*, 35(4): 373-379.
30. Raeder, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
31. Saraswathy, A. and Hallberg, R. 2002. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters*, 210(2): 227-232.
32. Singh, H. 2006. Fungal metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Singh H (ed) *Mycoremediation, fungal bioremediation*. Wiley, Hoboken, NJ, 283-356.
33. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipitski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
34. Vogel, T.M. 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Current Opinion in Biotechnology*, 7: 311-316.
35. White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315-322.
36. Yateem, A., Balba, M.T. and Al-Awadhi, N. 1997. White rot fungi and their role in remediating oil-contaminated soil. *Environment International*, 24: 181-187.

Identification of native fungi in contaminated soils of Marun oil field of Ahwaz

F. Dehdari, M. Mehrabi-Koushki¹ and J. Hayati

MSc Student, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz; E-mail: farzanehdehdari25@gmail.com
Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz; Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz; E-mail: mhdmhrb@gmail.com
Associate Professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz; E-mail: Hayati_jir@yahoo.com

Received: October, 2018 & Accepted: March, 2019

Abstract

In this study, 16 contaminated soil samples (with petroleum products) were collected from four different sites at Marun oil field of Ahwaz. Thirty three fungal isolates were isolated and purified using single-spore and hyphal-tip methods. 23 fungal isolates were selected for morphological and molecular identification. The mycelial biomass of the purified fungal isolates was produced into potato-dextrose-broth medium. DNA samples were extracted from freeze-dried mycelia and ITS and Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH, only for *Curvularia*) regions were amplified using appropriate primers. Amplified products were purified using ethanol precipitation and gel extraction, and sequenced by Macrogen Company. The obtained sequences were edited and assembled and then used in BLASTn search and ML phylogenetic analysis. Fungal isolates were identified using morphological and molecular studies as follow: *Acremonium sclerotigenum*, *Alternaria destruens*, *Aspergillus* sp., *Cladosporium puyae*, *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Mucor circinelloides*, *Penicillium oxalicum*, *P. chrysogenum*, *Paramyrothecium terrestris*, *Rhizopus oryzae* and the isolates of both *Allophoma* and *Neodidymelliopsis* genera from the family Didymellaceae. Both the *Cladosporium puyae* and *Paramyrothecium terrestris* are new records in IRAN Mycobiota

Keywords: ITS region, BLASTn, Phylogenetic analysis

¹ Corresponding author: Plant Protection Department, Agriculture Faculty, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz.