فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال سوم، شماره ۱۰، تابستان ۱۳۹۳، صفحه ۸۷- ۹۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۰۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۹/۱۹

فلور قارچ‌های خاکزی مناطق نفتی استان خوزستان

ویدا داودی*: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، vdawoodi@yahoo.com
محبوبه مدنی: استادیار قارچ شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان، ایران، mmadani66@gmail.com
آرزو طهمورث‌پور: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان، ایران، a.tahmoures.p@gmail.com

چکیده

مقدمه: تا کنون بسیاری ازگونه های قارچی با توانایی هیدرولیز هیدروکربن‌های نفتی شناخته شده اند. این قارچ‌ها در مناطق آلوده به نفت پایدار هستند. اهداف این تحقیق شامل بررسی جمعیت، تنوع، جداسازی و شناسایی فلور قارچ‌های بومی در خاک‌های آلوده نفتی استان خوزستان است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک آلوده به نشت نفت از مناطق مختلف استان خوزستان جمع‌آوری شد. به منظور جداسازی و شمارش قارچ‌های هتروتروف از محیط سیب زمینی دکستروز آگار همراه با استرپتومایسین استفاده شد. قارچ‌های جداسازی شده، از طریق مطالعات ریخت‌شناسی، رنگ آمیزی توسط لاکتوفنول کاتن بلو، مشاهده توسط میکروسکوپ نوری و مقایسه با مراجع تشریحی و توصیفی، شناسایی شدند.

نتایج: شمارش کل قارچ‌ها از $۱۰^{۲}$× ۰/۴۱ تا $۱۰^{۲}$× ۳۳۳۳/۳۳ واحد تشکیل کلونی بر گرم خاک محاسبه شد. قارچ‌های جداسازی شده شامل: جنس‌های *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم*، *فوزاریوم*، *کاندیدا*، *رودوتورولا*، *آئروبازیدیوم*، *موکور*، *رایزوپوس* و *آکرومونیوم* بودند. در این بررسی، جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* غالب بودند.

بحث و نتیجه‌گیری: شناسایی قارچ‌ها در محیط‌های حاوی نفت نشان داد که به طور در خور توجهی تنوع و فراوانی قارچ‌ها در مکان‌های مختلف نسبت به هم متفاوت بودند. افزایش تعداد قارچ‌ها در خاک‌های نفتی احتمال تجزیه و مصرف هیدروکربن‌های نفتی توسط قارچ‌ها را نشان می‌دهد. توزیع جمعیت و تنوع میکروبی خاک توسط تعدادی از عوامل محیطی مانند اسیدیته، هدایت الکتریکی، ماده آلی خاک و غیره تعیین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های خاکزی، نفت خام، خوزستان

* نویسنده مسؤول مکاتبات

مقدمه

قارچ‌ها اهمیت زیادی در محیط زیست زمینی دارند و می‌توانند بزرگ ترین زیست توده را در خاک تشکیل دهند. همچنین، با توجه به رشد رشته ای خود و تولید پلیمرهای خارجی نقش مهمی در نگهداری ساختار خاک دارند (۱). تنوع زیستی قارچ‌ها ۱/۵ میلیون گونه تخمین زده شده است (۲). برای نخستین بار جداسازی قارچ‌ها از خاک توسط امونس[1] در سال ۱۹۵۱ انجام شد. قارچ‌ها نقش مهمی در اکوسیستم خاک به عنوان تجزیه کنندگان اصلی بازی می‌کنند (۳). فرآورده‌های نفتی از پرمصرف‌ترین مواد شیمیایی در دنیای مدرن امروز محسوب می شوند و به عنوان منبع اصلی انرژی استفاده می‌شوند. با این حال، با وجود کاربرد مهم آن‌ها، هیدروکربن‌های نفتی به عنوان یک آلاینده زیست محیطی در سطح جهانی عمل می‌کنند (۴). میزان نشت نفت خام طبیعی ۶۰۰,۰۰۰ تن در سال تخمین زده شده است (۵). مسمومیت میکروارگانیسم‌ها، گیاهان، حیوانات و انسان‌ها با هیدروکربن‌های نفتی به خوبی اثبات شده است (۶).

اثر نفت روی جمعیت میکروبی به ترکیب شیمیایی نفت و گونه‌های میکروارگانیسم‌های موجود بستگی دارد. نفت، جمعیت برخی از میکروب‌ها را افزایش می‌دهد. برخی از میکروب‌ها هیدروکربن‌های نفت را به عنوان مواد مغذی مصرف می‌کنند (۷). بسیاری از گونه‌های قارچی که در محیط‌های آلوده به نفت شناخته شده‌اند، توانایی تجزیه هیدروکربن‌های نفتی را دارند. بیش از ۲۰۰ گونه از باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی جلبک‌ها می‌توانند هیدروکربن‌ها را تجزیه کنند (۸). قارچ‌ها به علت ترشح طیف زیادی از آنزیم‌های موثر در محیط زیست، که به آن‌ها در تغذیه کمک می‌کند، مسئول تجزیه چندین فرآورده طبیعی هستند (۹). به تازگی، بسیاری از پژوهشگران نقش قارچ‌ها را در فرآیند تجزیه زیستی فرآورده‌های نفتی مطالعه کرده‌اند و شایع‌ترین قارچ‌هایی که از مکان‌های آلوده به نفت جداسازی شده‌اند، به جنس‌های زیر متعلق هستند: *آلترناریا، آسپرژیلوس، کاندیدا، سفالوسپوریوم، فوزاریوم، ژئوتریکوم، موکور، کلادوسپوریوم، پسیلومایسس، پنی سیلیوم، پلئوروتوس، پلیپوروس، رایزوپوس، رودوتورولا، ساکارومایسس، تالارومایسس، گرافیوم، تریکودرما، آمورفوتکا، نئوسارتوریا و تورولوپسیس* (۱۰- ۱۳).

با وجود پژوهش‌های انجام شده در جداسازی میکروارگانیسم‌ها در مناطق نفتی، هیچ گونه پژوهشی بر روی قارچ‌های بومی در استان خوزستان انجام نشده است. بنابراین، هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی فلور قارچ‌های بومی در خاک‌های آلوده به نفت خام در مناطق نفتی استان خوزستان است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های خاک آلوده به مواد نفتی

نمونه‌های خاک از یک افق صفر تا ۱۰ سانتی‌متری از سطح خاک آلوده شده به مواد نفتی از مناطق کوپال اهواز (نمونه خاک ۱)، گودال آتش کوپال اهواز (نمونه خاک ۲)، هفتکل (نمونه خاک ۳)، مارون (نمونه خاک ۴)، امیدیه (نمونه خاک ۵)، تمبی مسجد سلیمان (نمونه خاک ۶)، مسجد سلیمان (نمونه خاک ۷) و یک خاک غیر آلوده از مسجد سلیمان (نمونه خاک ۸) در فروردین و اردیبهشت سال ۱۳۹۱ جمع‌آوری شدند. نمونه‌برداری از خاک‌های آلوده به مواد نفتی در شرایط کاملا سترون، توسط یک بیلچه استریل انجام شد و به شکل تصادفی از هر منطقه ۲ تا ۳

نمونه که خود ترکیبی از چند نمونه مخلوط شده در محل نمونه‌برداری بودند جمع‌آوری و درون کیسه‌های پلاستیکی سفید استفاده نشده نگهداری شدند. نمونه‌ها در مدت ۴۸ ساعت به آزمایشگاه منتقل شدند. سپس، در مدت یک ماه برای شمارش، جداسازی و تحلیل خاک (شمارش جمعیت بلافاصله پس از انتقال خاک‌ها به آزمایشگاه انجام شد) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال (به منظور زنده نگهداشتن ارگانیسم‌ها و جلوگیری از هر گونه آلودگی) قبل از تجزیه و تحلیل نگهداری شدند.

تحلیل اولیه خاک

آزمایش‌های تجزیه خاک با روش‌های استاندارد انجام شد. کربن آلی خاک با روش والکی و بلاک[۲] تعیین شد(۱۴). هدایت الکتریکی[۳] با استفاده از دستگاه هدایت سنج در عصاره اشباع تعیین و اسیدیته خاک نیز اندازه‌گیری شد (۱۵).

کشت، شمارش و جداسازی قارچ‌های بومی

نمونه‌های جمع‌آوری شده به شکل همگن مخلوط شدند. با دقت سنگ‌ها و سایر بقایای ناخواسته خاک با استفاده از الک ۲ میلی‌متری حذف شد. جداسازی و شمارش کل قارچ‌ها با استفاده از روش شمارش روی پلیت به همراه رقیق‌سازی[۴] انجام شد. زمانی که مواد حاوی میکروارگانیسم کشت داده می‌شوند، هر میکروارگانیسم زنده یک کلونی را ایجاد خواهد کرد. از این رو، کلونی‌های ظاهر شده بر روی پلیت‌ها ارگانیسم‌های زنده موجود در نمونه را نشان می‌دهند. برای جداسازی و شمارش گونه‌های قارچی موجود در نمونه‌های خاک از محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار[۵] (PDA) (شارلو) استفاده شد.

به این محیط، آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (زیگما) به مقدار 10^{3} میلی‌گرم در لیتر برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها اضافه شد. از نرمال سالین استریل ۰/۸۵ درصد به عنوان رقیق کننده برای آماده‌سازی مایه تلقیح استفاده شد. از هر نمونه خاک، ۱۰ گرم نمونه الک و هموژن شده به شکل سترون - با استفاده از یک قاشقک استیل استریل شده توسط شعله- درون یک فلاسک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۹۰ سی سی محلول رقیق کننده استریل منتقل شد (رقت 10^{-1}). سپس، نمونه‌ها به مدت ۶۰ دقیقه روی تکان دهنده مکانیکی با دور rpm ۱۲۰، برای جداسازی میکروارگانیسم‌ها از ذرات خاک، شیک شدند. به ترتیب ۳ سری رقت محلول‌های استریل از رقت 10^{-1} تا 10^{-4} آماده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر هر رقت از هر نمونه خاک به شکل کاملاً آسپتیک با پیپت استریل برداشته شد و به طور جداگانه به شکل کشت سطحی با پخش کننده شیشه‌ای (میله شیشه ای سر کج[۶]) استریل شده توسط شعله بر روی پلیت‌های PDA کشت داده شد. پلیت‌های تلقیح شده حاوی محیط PDA به مدت ۳ تا ۴ روز در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کلونی‌های ظاهر شده بر روی پلیت‌های PDA به عنوان تعداد کل قارچ‌های هتروتروف و به شکل تعداد واحد تشکیل دهنده کلونی[۷] (CFU) بر هر گرم خاک بیان شدند. ۱۰ تکرار انجام شد (۱۱، ۱۳، ۱۶ و ۱۷).

در رقت‌سازی این موارد در نظر گرفته شد: ۱- چرخاندن لوله‌ها در دست تا محتویات کاملاً یکنواخت شوند. ۲- از سر سمپلر استریل برای برداشتن نمونه‌ها استفاده شد.

شناسایی قارچ‌های بومی

برای به دست آوردن کشت‌های خالص از قارچ‌های جداسازی شده، کشت‌های رشد کرده از قارچ‌ها در شرایط استریل روی محیط کشت PDA کشت مجدد شدند. در مرحله اول، برای شناسایی قارچ‌ها صفات ریخت‌شناسی شامل: شکل، رنگ، تشکیل اسپور و تعداد روزهایی که طول می‌کشد تا قارچ‌ها به حداکثر قطر (۸ سانتی‌متر) پتری دیش برسند تعیین شد. پس از ۲ تا ۴ روز از رشد قارچ، میسیلیوم تولید کننده اسپور با دقت برش داده و رنگ آمیزی توسط لاکتو فنل کاتن بلو[۸] (LCB) انجام شد. سپس، نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. قارچ‌های جداسازی شده با مراجعه به منابع معتبر علمی شناسایی شدند (۱۸- ۲۱).

روش آماری

این تحقیق بیشتر ماهیت توصیفی تحلیلی داشته ولی برای مقایسه میانگین‌ها و رسم نمودارها از نرم افزار آماری اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

تحلیل خاک و جمعیت قارچ‌های خاکزی

جدول ۱، نتایج حاصل از تحلیل خاک و جمعیت کل قارچ‌های خاکزی را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج حاصل از شمارش قارچ‌های بومی، متوسط تعداد کل قارچ‌های هتروتروف روی محیط PDA به شکل واحد تشکیل دهنده کلونی بر گرم خاک ($\times 10^2$ CFU/g soil) بیان شده است. شمارش کل قارچ‌های هتروتروف از $0/41 \times 10^2$ تا $3333/33 \times 10^2$ واحد تشکیل دهنده کلونی بر گرم خاک محاسبه شد. بیش‌ترین جمعیت، مربوط به نمونه خاک هفتکل ($3333/33 \times 10^2$) با میزان ۲۰/۵۱ درصد کربن آلی بود و کمترین جمعیت کل قارچ‌ها مربوط به نمونه خاک امیدیه ($0/41 \times 10^2$) با ۱۲/۲۲ درصد کربن آلی بود.

شناسایی قارچ‌ها

قارچ‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده به جنس‌های *آسپرژیلوس*، *پنی سیلیوم*، *فوزاریوم*، *کاندیدا*، *رودوتورولا*، *موکور*، *رایزوپوس*، *آکرومونیوم* و *آئروبازیدیوم* متعلق بودند. در جدول ۲ ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جنس‌های قارچی جداشده آورده شده است.

همان‌طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، در نمونه‌های خاک ۱، ۲، ۴ و ۶ جنس *پنی سیلیوم*، در نمونه‌های خاک ۳ و ۷ جنس *آسپرژیلوس*، در نمونه خاک ۵ مخمر *رودوتورولا* و قارچ *پنی سیلیوم* و در نمونه خاک ۸ قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *اکرومونیوم* جمعیت غالب قارچ‌های خاک بودند.

جدول۱- تحلیل شیمیایی، مکانیکی و جمعیت قارچ‌ها در خاک‌های آلوده نفتی

	اسیدیته	هدایت الکتریکی (میلی‌زیمنس بر سانتی‌متر)	کربن آلی (درصد)	تعداد کل قارچ‌های هتروتروف ($\times 10^2$ واحد تشکیل دهنده کلونی بر گرم خاک)
خاک ۱	۸/۲۵	۱۲/۲۲	۱۱/۸۶	۳۷۸/۳۳
خاک ۲	۷/۱۴	۸/۶۰	۸/۳۱	۵/۶۵
خاک ۳	۶/۶۰	۳/۲۱	۲۰/۵۱	۳۳۳۳/۳۳
خاک ۴	۷/۹۹	۱۵/۳۲	۱۸/۳۵	۳۷/۱۴
خاک ۵	۷/۰۱	۳۰/۲۰	۱۲/۲۲	۰/۴۱
خاک ۶	۷/۲۱	۰/۶۰	۲/۱۸	۳/۲۲
خاک ۷	۷/۹۷	۲/۳۳	۵/۱۳	۳/۶۰
خاک ۸	۷/۲۶	۲/۲۸	۲/۳۸	۰/۵۰

جدول ۲- ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی جنس‌های قارچی جداسازی شده

قارچ‌ها	شکل کنیدی	ترتیب قرارگیری کنیدی	شکل کنیدیوفور و ترتیب قرارگیری کنیدیوفور	ریخت‌شناسی کلونی	میزان رشد	ویژگی‌های کمکی دیگر
آسپرژیلوس	گرد	زنجیره‌های شعاعی	صاف یا خاردار با دیواره‌های موازی، منفرد	پودری گاهی دانه ای، سطح رنگی	سریع	ریسه شفاف با دیواره عرضی، انتهای کنیدیوفور به وزیکول ختم می‌شود
پنی سیلیوم	گرد	زنجیره ای	پنی سیلوس، مفرد و عمودی	مخملی یا پودری رنگی و صاف	سریع	فیالیدها کمابیش کوتاه با راس‌های ضخیم
فوزاریوم	میکروکنیدی بیضی کشیده، ماکروکنیدی هلالی	میکروکنیدی منفرد، ماکروکنیدی مارپیچی	فیالیدهای مخروطی، منفرد و گاهی اوقات مارپیچی	پنبه ای رنگی، عموماً صورتی تا بنفش	سریع	پیگمان محلول در آب
آکرومونیوم	بیضی در راس کنیدیوفور	به شکل توپ‌های لزج در راس کنیدیوفور	کوتاه، مستقیم و درفشی، منفرد	بافت پنبه ای، صاف نمدی و سطح رنگی	کمی سریع	فاقد ماکروکنیدی
آئروبازیدیوم	تک سلولی و تخم مرغی تا استوانه ای	منفرد	ندارد	قهوه ای تیره یا سیاه براق با حاشیه‌های کم رنگ	متوسط	ریسه‌های قهوه ای روشن
موکور	تخم مرغی یا بیضی	متغیر	منفرد، کوتاه، مستقیم و بیشتر منشعب	خاکستری کرکی	سریع	اسپورانژیوم گرد، خاکستری تا سیاه رنگ، فاقد استولون، ریزوئید و زائده
رایزوپوس	متنوع	نیم کره	تکی یا گروهی به رنگ قهوه ای واقع در نزدیک گره، طویل و غیر منشعب	کرکی، خاکستری یاقهوه ای، پشت بی رنگ	سریع	ریزوئیدهای توسعه یافته، کلوملا پس از آزاد شدن اسپورها فرو می‌ریزد

جدول ۳- درصد فراوانی قارچ‌های جداسازی شده در نمونه‌های خاک

	آسپرژیلوس نایجر	*آ. ترئوس*	*آ. فومیگاتوس*	*آ. فلاووس*	سایر *آسپرژیلوس‌ها*	*پنی سیلیوم*	*فوزاریوم*	*رودوتورولا*	*کاندیدا*	*آئروبازیدیوم*	*موکور*	*رایزوپوس*	*آکرومونیوم*
خاک ۱	–	–	–	–	–	۵۸/۵۲	۱۰/۷۰	۲۱/۷۴	۴/۷۰	۴/۳۵	–	–	–
خاک ۲	۱۴/۸۱	۴۱/۹۸	۲۸/۴۰			۱۴/۸۱	–	–	–	–	–	–	–
خاک ۳	–	۱/۷۲	–			۹۶/۵۵	۱/۷۲	–	–	–	–	–	–
خاک ۴	–	–	–	––	–	۹۷/۶۰	۲/۴۰	–	–	–	–	–	–
خاک ۵	–	–	–	۵/۵۶	۸/۳۳	۳۸/۸۹	–	۴۷/۲۲	–	–	–	–	–
خاک ۶	–	–	۹/۵۷	–	۳/۸۶	۸۶/۵۷	–	–	–	–	–	–	–
خاک ۷	–	–	۹۷/۱۴			۲/۸۶	–	–	–	–	–	–	–
خاک ۸	–	–	۴۰/۵۱	–	–	۱۴/۶۴	۳/۲۳	–	۹/۴۳	–	۲/۲۰	۲/۲۰	۲۷/۹۶

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، تعداد کل قارچ‌های هتروتروف به طور در خور توجهی در مکان‌های مختلف، نسبت به هم با توجه به میزان آلودگی نفتی و قدمت آلودگی متفاوت بودند. بیش‌ترین جمعیت مربوط به نمونه خاک ۳ و پس از آن نمونه خاک ۱ بود. آلودگی نفتی این دو منطقه طولانی مدت بوده و شاید دلیل بیشتر بودن جمعیت خاک ۳ این است که میزان کربن آلی آن بیشتر بوده است (جدول ۱). همچنین این مطلب، نشان دهنده سازگاری پرگنه‌های قارچی بومی در این محیط است. میزان کربن آلی این خاک ۲۰/۵۱ درصد و میزان کربن آلی خاک۱، ۱۱/۸۶ درصد بود. بنابراین، افزایش میزان ورودی نفت خام به محیط، میزان کربن آلی خاک را افزایش داده و با توجه به میزان اسیدیته در محدوده خنثی، جمعیت قارچ‌ها افزایش می‌یابد. در حالی که خاک ۱ نسبت به خاک ۳، اسیدیته در حد قلیایی داشت که همین امر توانسته باعث کاهش جمعیت نسبت به خاک ۳ شود.

وستلیک[۹] و همکاران گزارش داده‌اند که جمعیت میکروارگانیسم‌های خاص به علت استفاده از هیدروکربن‌های نفتی به عنوان مواد مغذی افزایش می‌یابد (۲۲).

خاک ۴ و ۵ با این که میزان کربن آلی آن‌ها به ترتیب ۱۸/۳۵ و ۱۲/۲۲ درصد بود و اسیدیته در حد خنثی داشتند، جمعیت قارچ‌های آن‌ها بسیار اندک بود. آلودگی نفتی این دو نمونه خاک چندان طولانی نبوده و مدت زمان زیادی نیست که در معرض آلودگی نفتی قرار داشتند. همچنین، علت دیگر محدودیت رشد قارچ‌ها در این نمونه‌ها می‌تواند هدایت الکتریکی بالا باشد. هدایت الکتریکی یک محلول شاخصی از کل املاح محلول آن است. بطوری‌که هر چه غلظت کاتیون‌ها و آنیون‌های یک محلول افزایش یابد هدایت الکتریکی آن نیز افزایش می‌یابد (۱۵) و این موضوع، عامل محدود کننده رشد قارچ‌ها به حساب آمد.

متاسفانه در کشور ما تاکنون به معضل آلودگی‌های ناشی از نفت و فرآورده‌های آن پرداخته نشده است. نبود مراقبت فعال کنترل آلودگی‌های ناشی از نفت خام، عدم سیستم‌های گزارش دهی و عدم آگاهی از اثرات زیست محیطی در ارتباط با تولید، استفاده و دفع مواد خطرناک باعث شده تا آمار دقیقی از میزان آلودگی نفتی به ویژه استان خوزستان در دست نباشد. طبق گزارش‌های دی ماه ۱۳۸۸ نشت یک چاه نفت در منطقه مارون خوزستان منجر به آلودگی حدود ۱۰۰ هزار هکتار زمین توسط ۲۰ هزار بشکه نفت شد (۲۳). در اثر ورود ناگهانی مقادیر بالای نفت به این نواحی اکثر میکروارگانیسم‌ها تحت تاثیر قرار گرفته و جمعیت میکروبی آن‌ها کاهش یافته بود. از آن‌جایی که از آن واقعه مدت زمان طولانی نگذشته هنوز میکروارگانیسم‌های باقی مانده فرصت تطابق و سازگاری با محیط را نیافته‌اند.

در نمونه‌های خاک ۶، ۷ و ۸ به علت این‌که میزان کربن آلی آن‌ها ناچیز بود جمعیت قارچی نیز در آن‌ها بسیار اندک بود. درصد مصرف کنندگان هیدروکربن‌های نفتی به ویژه درمحیط زیست، به نظر می‌رسد شاخصی از حضور هیدروکربن‌ها در آن محیط و در معرض قرار گرفتن محیط زیست در برابر هیدروکربن‌های نفتی باشد (۱۲).

کم بودن جمعیت در نمونه خاک ۴ و ۵ را می‌توانیم بر اساس گزارش‌های زیر توجیه کنیم. کاهش اولیه در جمعیت قارچ‌ها همیشه زمانی که نفت خام به محیط اضافه می‌شود، رخ می‌دهد. این پدیده به سمیت نفت نسبت داده می‌شود. برخی از میکروارگانیسم‌ها توسط اجزاء سمی نفت کشته یا مهار می‌شوند، در حالی که دیگر ارگانیسم‌های هتروتروف تجزیه کننده نفت افزایش می‌یابند. سمیت نفت خام و یا فرآورده‌های نفتی به طور گسترده ای متفاوت است و به ترکیب و غلظت آن بستگی دارد. مقیاس آلودگی به مقدار نفت و آسیب‌های وارد شده به محیط زیست بستگی دارد (۲۴). در مناطق به شدت آلوده، اثرات زیان‌آور فوری در شکل‌های زیستی وجود خواهد داشت (۱۲). این یافته‌ها مشابه نتایج پژوهش ابیر[۱۰] و انیانوو[۱۱] است. آن‌ها خاک را با غلظت‌های متفاوت نفت خام تیمار و جمعیت قارچ‌ها در طی هجده هفته شمارش کردند. جمعیت قارچ‌ها در خاک کنترل - به آن نفت اضافه نشد- کاهش یافت اما در غلظت‌های بالای نفت خام ابتدا کاهش جمعیت و پس از آن افزایش چشمگیری مشاهده شد. میکروارگانیسم‌ها به ویژه قارچ‌ها، تحمل بالایی نسبت به مسمومیت با هیدروکربن‌ها دارند که به فیزیولوژی و سازگاری آنان با تغییرات محیط زیست، مربوط می‌شود. همچنین،آن‌ها مکانیسمی برای حذف نفت از محیط زیست دارند (۷). در منابع مختلف گزارش شده است که تعداد در خور توجهی از قارچ‌های خاک، هیدروکربن‌های نفتی را به طور موثر، هر چند به آرامی استفاده می‌کنند (۲۵). در نمونه خاک ۳ با وجود بیش‌ترین جمعیت و میزان در صد کربن آلی (۲۰/۵۱) تنوع قارچی کمی وجود داشت که شامل: یک گونه *پنی سیلیوم* (جمعیت غالب خاک)، دو گونه *فوزاریوم* و *آسپرژیلوس ترئوس* بود. بیش‌ترین تنوع قارچی به نمونه خاک ۸ با کم‌ترین میزان کربن آلی متعلق بود (جدول ۳). ابیر و انیانوو بیان کردند که کاهش در تنوع گونه‌ها (جنس قارچی) با افزایش غلظت نفت خام، شاخصی از استرس‌های محیطی هیدروکربن‌های نفتی است. کلیسلوی[۱۲] و پانیرسلوان[۱۳]، گزارش کردند که توزیع و تنوع موجودات مختلف در محیط زیست توسط ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی محیط تحت تاثیر قرارمی‌گیرند.

در این بررسی، ۲۷ پرگنه قارچی (نه جنس) از خاک‌های آلوده شامل: جنس‌های *آسپرژیلوس*، *پنی‌سیلیوم*، *فوزاریوم*، *آکرومونیوم*، *کاندیدا*، *رودوترولا*، *موکور*، *آئروبازیدیوم* و *رایزوپوس* جدا شدند. جنس‌های *پنی سیلیوم* و *آسپرژیلوس* غالب بودند. به عقیده چیلان[۱۴]و همکاران، جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* رایج‌ترین قارچ‌های موجود در خاک‌های مناطق گرمسیری هستند، که می‌توانند هیدروکربن‌ها را تجزیه کنند (۱۰). در مطالعه حاضر، *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* جنس‌های غالب قارچی بودند که از خاک‌های آلوده به نفت جدا شدند. کانسیسائو[۱۵]و همکاران اشاره کردند که این جنس‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که قطعاً مکانیسم‌هایی برای مقاومت در شرایط نامطلوب زیست محیطی دارند و برخی از آن‌ها توانایی تجزیه باقیمانده‌های نفت را دارند (۲۶). همچنین، ابیر و همکاران در مطالعه دیگری قارچ‌های قادر به رشد در

مکان‌های آلوده نفتی را به قرار زیر معرفی کردند: گونه‌هایی از جنس های *آسپرژیلوس*، *کاندیدا*، *سفالوسپوریوم*، *کلادوسپوریوم*، *فوزاریوم*، *ژئوتریکوم*، *موکور*، *پنی سیلیوم*، *رودوتورولا* و *تریکودرما*. قارچ‌های رشته ای می‌توانند بر روی هیدروکربن‌ها رشد کنند، جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی‌سیلیوم* به تکرار گزارش شده‌اند (۱۰ و ۲۷)..

لموس[۱۶] و همکاران از برزیل، از نمونه‌های خاک گوارارما برزیل که خاکی از جنس رسی- ماسه ای بود و در دسامبر ۱۹۹۸ به طور تصادفی به علت نشت، به نفت خام آلوده شد، ۹ گونه (۴ جنس) از قارچ‌های رشته ای شامل:، *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس نیووس*، *آسپرژیلوس ترئوس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس ورسیکالر*، *پنی سیلیوم کوریلوفیلوم*، *پسیلومایسس واروئیتی*، *پسیلوماسیس نیووس* و گونه ای از جنس *فوزاریوم* را جداسازی کردند (۲۸).

در این بررسی، *پنی سیلیوم* و *آسپرژیلوس* شایع‌ترین جنس‌های موجود در خاک آلوده به نفت خام بودند. بر اساس ساختمان و ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی مختلف خاک، قارچ‌های متفاوتی در خاک یافت می‌شود، حتی در دو مکان نزدیک به هم در خاک نیز ممکن است شباهت‌های زیادی از نظر نوع قارچ‌ها وجود نداشته باشد.

وجود گونه‌هایی که در حضور نفت رشد می‌کنند به طرح‌ریزی تحقیقات گسترده‌تر برای درک مراحل و مکانیسم تجزیه و حتی استفاده از پتانسیل این میکروارگانیسم‌ها در پاک‌سازی زیستی و تیمار محیط زیست، منجر می‌شود.

References

(1) Gadd G. M, Watkinson S. C, Dyer P. S. *Fungi in the environment*, New York: Cambridge University; 2007.

(2) Jaber M. B, Al-Silawi R, Al-Najjar T. Isolation and molecular identification of Ascomycetes in sediments and waters of the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Natural Sci* 2012; 4(8): 555- 61.

(3) Rubinstein H, Marticorena B, Masih D, Borletto N, Vega R, Varengo H, et al. Isolation of human fungi from soil and identification of endemic areas of *Cryptococcus neoformans* and *Coccidioides immitis*. *Rev Inst Med* 1989; 31(1): 1- 6.

(4) Benson N. U, Essien J. P, Williams A. B, Ebong G. A. Petroleum hydrocarbons accumulation potential of shellfishes from littoral waters of the bight of bonny, Niger Delta, Nigeria. *Res J Environ Sci* 2007; 1(1): 9- 11

(5) Kvenvolden K. A, Cooper C. K. Natural seepage of crude oil in to the marine environment. *Geo-Marine Letters* 2003; 23(3-4): 140- 6.

(6) Thapa B, Kumar K. C. A, Ghimire A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *J Sci Eng Technol* 2012; 8(1): 164- 70.

(7) Al-Nasrawi H. A. Biodegradation of crude oil by fungi isolated from Gulf of Mexico. *J Bioremed Biodegrad* 2012; 3(4): 147- 52.

(8) Onifade A. K, Abubakar F. A. Characterization of hydrocarbon-degrading microorganisms isolated from crude oil contaminated soil and remediation of the soil by enhanced natural attenuation. *Res Microbiol* 2007; 2(2): 149- 55.

(9) Johnsen A. R, Wick L. Y, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Poll* 2005; 133(1): 71- 84.

(10) Chaillan F, Fleche A. L, Bury E, Phantavong Y, Crimount P, Saliot A, et al. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degradading microorganisms. *Res Microbiol* 2004; 155(7): 587- 95.

(11) Chaudhry S, Luhach J, Sharma V, Sharma Ch. Assessment of diesel degrading potential of fungal isolates from sludge contaminated soil of petroleum refinery, Haryana. *Res Microbiol* 2012; 7(3): 182- 90.

(12) Obire O, Anyanwu E. C, Okigbo R. N. Saprophytic and crude oil-degrading fungi from cow dung and poultry droppings as bioremediating agents. *J Agric Technol* 2008; 4(2): 81- 9.

(13) Obire O, Anyanwu E. C. Impact of various concentrations of crude oil on fungal populations of soil. *Int J Environ Sci Technol* 2009; 6(2): 211- 8.

(14) Walkley A, Black I. A. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 1934; 37(1): 29-38.

(15) Schoeneberger P. J, Wysoki D. A, Boenhm E. C, Broderson W. D. *Field book for describing and sampling soils*. 2rd ed. Lincoln: Natural Resource Conservation Service, National Soil Survey Center; 2002 .

(16) Waksman S. A. A method for counting the number of fungi in the soil. *J Bacteriol* 1921; 7(3): 339- 41.

(17) Kalaiselvi S, Panneerselvam A. Ecology of soil fungi in paddy field of Tamilnadu-Thanjavur District. *Der Chemical Sinica* 2011; 2(2): 9- 19.

(18) Thom C, Raper K. B. *A manual of Aspergilli*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1945.

(19) Raper K. B, Thom C. *A manual of Penicillia*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1949.

(20) Fisher F, Cook N. B. *Fundamentals of diagnostic mycology*. Philadelphial: WB Saunders; 1998.

(21) Adekunle A. A, Adebambo O. A. Petroleum hydrocarbon utilization by fungi isolated from Detarium senegalense (J. F Gmelin) seeds. *J American Sci* 2007; 3(1): 69- 76.

(22) Westlake D. W, Jobson A, Phillippe R, Cook F. D. Biodegradability and crude oil composition. *Can J Microbiol* 1974; 20(7): 915- 28.

(23) Rah peima sarvestani N. Technology of bioremediation for elimination of oil contaminations in soil and water using of procedures of triple. *naftepars monthly magazine* 1389; 82(7): 12- 9.

(24) Colwell R. R, Walker J. D, Cooney J. J. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit Rev Microbiol* 1977; 5(4): 423- 45.

(25) Cerniglia C. E, Gibson D. T. Fungal oxidation of (+/-)-9,10-dihydroxy-9,10-dihydrobenzo[a]pyrene: formation of diastereomeric benzo [a]pyrene 9,10-diol 7,8-epoxides. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 77(8): 4554- 8.

(26) Conceição D. M, de Angelis D. A, Bidoia E. D, de Angelis D. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arq Inst Biol* 2005; 72(1): 99- 106.

(27) April T. M, Fought J. M, Currah R. S. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* 2000; 46(1): 38- 49.

(28) Lemos J. L. S, Rizzo A. C, Millioli V. S, Soriano A. U, Sarquis M. I, Santos S. Petroleum degradation by filamentous fungi. Proceeding of 9th Annual International Petroleum Environmental Conference; 2002 Oct 21-25; Albuquerque NM, EUA. P: 738-47.

[1]- Emmons
[2]- Walky and Black
[3]- Electrical Conductivity
[4]- Dilution Plate Count Method
[5]- Dextrose Agar Potato
[6]- Glass bar
[7]- Colony Forming Unit
[8]- Lactophenol cotton blue
[9]- Westlake
[10]- Obire
[11]- Anyanwu
[12]- Kalaiselvi
[13]- Panneerselvam
[14]- Chaillan
[15]- Conceição
[16]- Lemos

Flora of soil fungi in Khuzestan province's oil regions

Vida Dawoodi *
M.Sc. student of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, vdawoodi@yahoo.com
Mahbobeh Madani
Assistant Professor of Medical Mycology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, mmadani66@gmail.com
Arezoo Tahmourespour
Assistant Professor of Microbiology, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran, a.tahmoures.p@gmail.com

Abstract

Introduction: Many Species of fungi with ability to metabolize of petroleum hydrocarbons are known so far. These fungi are resistant in oil contaminated sites.This investigation aims at studying fungal population diversity in oil contaminated soils of Khuzestan province and identifying fungal flora in these regions.

Materials and methods: Crude oil contaminated soil samples were collected from different regions of Khuzestan province. For isolation and enumeration of total heterotrophic fungi, Potato Dextrose Agar medium supplemented with streptomycine was used. The isolated fungi were identified via morphological studies, staining by lactophenol cotton blue, observation with a light microscope and comparing with descriptive and canonizative refereces.

Results: Total fungal counts ranged from 0.41×10^2 to 3333.33×10^2 CFU/g. Isolated fungi belong to *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Candida, Rhodotorula, Aureobasidium, Mucor, Rhizopus* and *Acremonium*. Most dominant genera were *Aspergillus* and *Penicillium*.

Discussion and conclusion: Studies on isolation of fungi in oil containing environments showed that, abundance and fungal diversity in different stations significantly were different. The increase in the number of fungi in crude oil soils showes the probability of degradation and consumption of oil contaminated by fungi. Diversity and distribution of soil microbial population are determined by a number of environmental factors such as pH, electrical conductivity and soil organic matter.

Key words: Soil fungi, Crude oil, Khuzestan

* Corresponding author
Received: September 30, 2013 / **Accepted:** December 10, 2013