شناسایی گونه‌های فوزاریوم قابل رشد در خاک‌های آلوده به نفت در پالایشگاه نفت در استان کرمانشاه با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی

Identification of *Fusarium* Species Isolated from Crude Oil Contaminated Soils in Oil Refinery in Kermanshah Province

خسرو چهری[1*]، الهام حیدریان[2] و دوستمراد ظفری[3]

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۳/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۷/۱۱

چکیده

گونه‌های فوزاریوم ازجمله قارچ‌های تجزیه‌کننده ترکیبات نفتی در دنیا هستند. گونه‌های فوزاریوم در مناطق آلوده به نفت پایدار هستند. بنابراین هدف از انجام این تحقیق شناسایی گونه‌های فوزاریوم مرتبط با ترکیبات نفتی در پالایشگاه نفتی کرمانشاه با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی بود. نمونه‌ها از خاک‌های آغشته به ترکیبات نفتی موجود در محل خروج فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه جمع‌آوری شد. برای جداسازی گونه‌های فوزاریوم از خاک از محیط‌کشت پپتون پنتاکلرونیتروبنزن-آگار همراه با استرپتومایسین و نئومایسین استفاده شد. در این تحقیق ۳۰ جدایه قارچ جداسازی شد که بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی سه گونه قارچی شناسایی شد که شامل گونه‌های *Fusarium falciforme*، *F. petroliphilum* و *F. keratoplasticum* متعلق به کمپلکس گونه‌ای *F. solani* بودند. مطالعات مولکولی بر اساس مقایسه توالی نواحی آی تی اس ریبوزومی (*ITS rDNA*)، همه گونه‌های فوزاریوم شناسایی شده را در سه گروه فیلوژنتیکی قرار گرفتند و بدین ترتیب مطالعات ریخت‌شناسی نیز تایید شدند و گونه‌های نزدیک هم تشخیص داده شدند. در این تحقیق همه گونه‌ها برای اولین بار از ترکیبات نفتی در ایران گزارش می‌شوند. قارچها به‌ویژه گونه‌های فوزاریوم در محیط‌های حاوی ترکیبات هیدروکربنی به راحتی رشد می‌کنند. وجود گونه‌های فوزاریوم در خاک‌های نفتی احتمال تجزیه و مصرف هیدروکربن‌های نفتی توسط این قارچها را می‌رساند.

واژه‌های کلیدی: فوزاریوم، نفت خام، کرمانشاه

۱. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم دانشگاه رازی کرمانشاه، کرمانشاه
۲. دانشجوی کارشناسی‌ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات کردستان، سنندج، ایران
۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا، همدان
*: نویسنده مسوول Email: khchehri@gmail.com

مقدمه

نفت خام، کمپلکس پیچیده‌ای از مخلوط صدها نوع ترکیب مختلف شامل هیدروکربن‌ها، نیتروژن، گوگرد و وانادیوم است که قسمت هیدروکربنی شامل ترکیبات آروماتیک، آلیفاتیک و آسفالتن است (*گاد* و همکاران؛ *قایلان* و همکاران (Gadd *et al.*, 2007; Chaillan *et al.*, 2004). آلودگی‌های نفتی تقریباً یک پیامد اجتناب‌ناپذیر از افزایش سریع جمعیت و مصرف انرژی است که بر پایه تکنولوژی نفت قرار دارد (*گاد* و همکاران، 2007؛ *قایلان* و همکاران، 2004). خاک یکی از منابع مهم و ارزشمند طبیعت است. بدون داشتن خاک سالم حیات و زندگی روی زمین امکان‌پذیر نخواهد بود. ۹۵٪ غذای انسان از زمین حاصل می‌شود. برنامه‌ریزی برای داشتن خاکی سالم و تولیدکننده لازمه بقای انسان است (*آپریل* و همکاران؛ *آنیفاد* و *ابوبکر*؛ *داوودی* و همکاران (April *et al.*, 2000; Onifade and Abubakar, 2007; Dawoodi *et al.*, 2014). ورود مواد، ارگانیسم‌های زیستی یا انرژی به‌درون خاک سبب تغییر کیفیت خاک می‌شود. همین مسئله باعث می‌شود که خاک از حالت طبیعی خود خارج شود. ریختن مواد سمی مانند انواع حلال‌ها، مواد رنگی و شوینده‌ها، آلودگی زمین و خاک را گسترش می‌دهند. ازجمله آلاینده‌های نفتی دیگر که باعث آلودگی‌های خاک می‌شود می‌توان به پسماندهای صنایع فولاد و نیروگاه‌ها، پسماندهای صنایع شیمیایی پسماندهای صنایع ذوب آهن و فولادسازی، پسماندهای صنایع فلزکاری، پسماندهای صنایع نفت (استخراج و پالایش)، پسماندهای صنایع چوب، سلولز و کاغذ سازی، پسماندهای صنایع چرم سازی و پسماندهای صنایع مواد غذایی اشاره کرد *برجس* (Burgess, 1981). هرقدر این مواد نفتی به عمق بیشتری از خاک نفوذ کنند رفع آن آلودگی مشکل‌تر خواهد بود. تجزیه زیستی غالباً توسط باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها صورت می‌گیرد (*آپریل* و همکاران (April *et al.*, 2000). تجزیه زیستی یک روش پراهمیت و تکنیکی برای بهبود نواحی آلوده به ترکیبات نفتی و کمک به رفع آلودگی‌های خاک و آب‌های زیرزمینی است (*تاپا* و همکاران (Thapa *et al.*, 2012). این روش کاملاً اقتصادی و قابل استفاده در مساحت‌های زیاد است و سبب نابودی کامل آلاینده‌ها از محیط می‌شود و فرآورده نهایی از این تکنیک مواد بی‌ضرری چون دی‌اکسیدکربن، آب و زیست توده میکروبی (بیومس) است. حضور میکروارگانیزم‌های تجزیه‌کننده هیدرات‌های کربن در آب دریا و خاک‌ها سبب شده که تجزیه به‌عنوان یکی از موثرترین روش‌های حذف آلودگی‌های نفتی معرفی شود و پاکسازی زیستی (Bioremediation) کاربرد سیستم‌های بیولوژیک برای نابود کردن یا کم کردن غلظت مواد سمی نظیر هیدروکربورهای نفتی را تسریع می‌کند. این عمل در حضور اکسیژن و مواد غذایی به خصوص نیتروژن و فسفر تسریع می‌شود (*آپریل* و همکاران (April *et al.*, 2000). فرآورده‌های حاصل از تجزیه زیستی معمولاً دی‌اکسیدکربن (CO_2) و مواد آلی کوچک مولکول با سمیت بسیار کم است (*النسروی* Al-Nasrawi, 2012). لذا پیش‌بینی می‌شود در آینده نزدیک از این روش در پاکسازی مناطق آلوده به مواد نفتی در گستره عملیاتی این شرکت استفاده خواهد شد. میکروارگانیزم‌های متعددی در زیست پالایی نقش دارند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از: باکتری‌هایی نظیر بعضی از گونه‌های *سودوموناس* (*Pseudomonas* spp.)، *باسیلوس* (*Bacillus* spp.)، *استافیلوکوکوس* (*Staphylococcus* spp.)، *کلستریدیوم* (*Clostridium* spp.) و اکتینومیست‌ها و قارچ‌هایی نظیر *کریزیسپوریوم* (*Chrysosporium* spp.)، *آسپرژیلوس* (*Aspergillus* spp.)، *فوزاریوم* (*Fusarium* spp.) و گونه‌های مختلف مخمر *لموس* و همکاران؛ *ابیر* و *آنیانوو*؛ *داوری* و *ارزانلو* (Lemos *et al.*, 2002; Obire and Anyanwu, 2009; Davari and Arzanlou, 2011). گونه‌های فوزاریوم به علت تولید طیف وسیعی از آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی ترکیبات پیچیده هیدروکربنی می‌توانند در تجزیه این ترکیبات در محیط‌زیست نقش مهمی را ایفا کنند (*لزلی* و *سامرل* Leslie and Summerell, 2006). لذا در این تحقیق گونه‌های مختلف فوزاریوم مرتبط با ترکیبات نفتی خارج شده از پالایشگاه نفتی کرمانشاه مورد شناسایی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی گونه‌های فوزاریوم براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی

جمع‌آوری نمونه‌ها در فصول مختلف انجام‌گرفت. نمونه‌ها از خاک‌های آغشته به روغن، گازوییل و یا سایر مواد و ترکیبات نفتی موجود در محل خروج فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه جمع‌آوری شد. نمونه‌های خاک را از سطح تا عمق ۱۵ سانتی‌متری برداشته و با هم مخلوط کرده و سپس ۵۰۰ گرم از آن‌را در پلاستیک‌های یک‌بار مصرف ریخته و جهت جلوگیری از رشد باکتری‌ها بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شدند. سپس خاک‌ها را در تشتک‌های شیشه‌ای ریخته و در آون در دمای معمولی قرار داده شدند، وقتی‌که خاک‌ها خشک شدند عمل جداسازی انجام گرفت. برای جداسازی قارچ از خاک به‌طور عمده از محیط‌کشت‌های *ناش* و *اسنایدر* (Nash and Snyder, 1962) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا یک گرم خاک خشک را وزن کرده سپس آن را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب

مقطر سترون ریخته و ۲۰ دقیقه روی شیکر گذاشته تا خوب حل شود و سپس آن‌را رقیق‌کرده و روی هر تشتک‌پتری حاوی محیط‌کشت یک سی‌سی از سوسپانسیون خاک را با پیپت پاستور پخش‌کرده و سپس در انکوباتور نگهداری شد. پرگنه‌های رشد کرده تک اسپور گردیده و برای نگهداری کوتاه مدت و مشاهده مشخصات پرگنه نظیر میزان رشد و رنگ، به محیط‌کشت معمولی سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) انتقال داده شدند. جهت تحریک جدایه‌ها به تولید ماکروکنیدیوم از محیط‌کشت برگ میخک- آگار (CLA) دو درصد استفاده شد. از کلیدهای تاکسونومیکی معتبر *نلیم* و همکاران؛ *شورت* و همکاران؛ *سامرل* و *شروئر* (Summerbell and Schroers, 2002; Short *et al.*, 2013; Nalim *et al.*, 2011) برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم استفاده شد.

استخراج دی ان ای (DNA)، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و توالی‌یابی نواحی Internal Transcribed Spacer (ITS)

برای این منظور جدایه‌های مورد نظر روی محیط‌کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار کشت شدند و به‌مدت ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها مطابق روش اصلاح شده *موری* و *تامپسون* (Murray and Thompson, 1980) استخراج شد. توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S با استفاده از آغازگرهای (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') ITS1 و (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ITS4 *وایت* و همکاران (White *et al.*, 1990) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بهینه شده در این مطالعه، در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۰/۴ میکرولیتر DNA الگو، ۱۶/۳۵ میکرولیتر ddH_2O، ۸ میکرولیتر از هر آغازگر، ۱ میکرولیتر دی‌اکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTPs)، ۰/۲۵ میکرولیتر واحد آنزیم DNA پلی‌مراز (Promega)، ۸ میکرولیتر بافر واکنش 5X، و ۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ($MgCl_2$) انجام گرفت. واکنش مزبور در دستگاه ترموسایکلر (PTC-100®, MJ Research, Inc., USA) انجام شد. چرخه‌های دمایی به کار رفته برای تکثیر ژن شامل ۳۵ چرخه به شرح زیر بود: واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه.

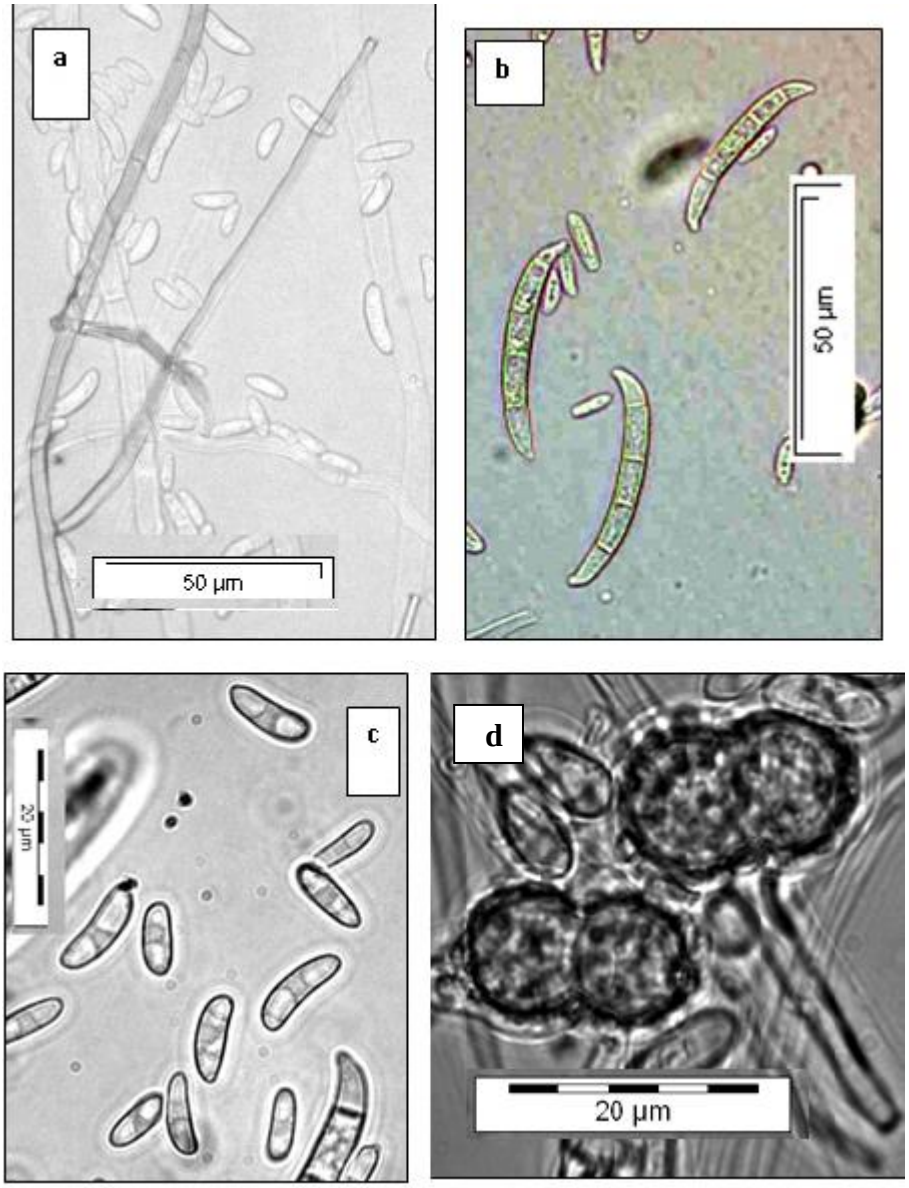
نواحی تکثیر یافته ITS1، ITS2 و ژن 5.8S را با استفاده از کیت خالص‌سازی (Quiagen)، مطابق دستورالعمل ارایه‌شده توسط شرکت سازنده خالص‌سازی شد. محصول به‌دست آمده به‌منظور تعیین توالی DNA، به شرکت FirstBase در سنگاپور فرستاده شد. اطلاعات توالی به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ویرایش شدند. توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در GenBank با استفاده از ابزار BLAST مقایسه شدند و در نهایت نتایج به‌دست‌آمده از شناسایی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

در این تحقیق ۳۰ جدایه قارچ جداسازی شد که براساس بررسی‌های ریخت‌شناسی سه گونه قارچی شناسایی شد که شامل گونه‌های *Fusarium falciforme*، *F. petroliphilum* و *F. keratoplasticum* متعلق به کمپلکس گونه‌ای *F. solani* بودند.

۱۵ جدایه *F. falciforme* از خاک‌های آغشته به ترکیبات نفتی موجود در محل خروج فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه جمع‌آوری شد. میزان رشد پرگنه روی محیط‌کشت این گونه پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برابر ۶/۱ سانتی‌متر بود. رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط‌کشت PDA از سفید، نخودی تا زرد متغیر بود. ریسه‌های هوایی روی محیط‌کشت PDA معمولاً فراوان بوده و رشد پنبه‌ای دارند. رنگ ریسه‌های هوایی زرد بود. روی محیط‌کشت PDA پس از گذشت سه روز یاخته‌های کنیدیومزا منوفیالید بلند بوجود می‌آیند که از آن‌ها میکروکنیدیوم تولید می‌گردد که طول آن‌ها تا ۲۰۰ (۵۰-۲۰۰µm) میکرون هم می‌رسد که به‌صورت سرهای دروغین هستند، ولی بعداً ماکروکنیدیوم نیز تولید می‌گردند. کنیدیوفورهای اولیه دارای یاخته‌های کنیدیومزای منوفیالیدی غیرمنشعب می‌باشند و بعد از ۳-۴ روز کنیدیوفورهای منشعب هم تعدادشان زیاد می‌شود. کنیدیوفورها به‌صورت جانبی و بلند روی ریسه‌های هوایی تولید می‌شوند (شکل ۱). میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی و به‌صورت سرهای دروغین تشکیل شده و تک یاخته‌ای و دو یاخته‌ای‌اند و به‌شکل‌های قلوه‌ای، بیضوی، تخم مرغی تا تقریباً سیلندری شکل دیده می‌شوند. ولی غالباً قلوه‌ای شکل هستند. ماکروکنیدیوم‌ها نسبتاً سیلندری و دو انتهای آن‌ها کمی خمیده شده است. یاخته انتهایی آن‌ها تقریباًکوتاه و کند می‌باشد و یاخته پایه‌ای آن‌ها کمی فرورفتگی دارد و در صورت ساقه دار بودن زیاد مشخص نیست. اغلب ماکروکنیدیوم‌ها ۵-۳ جداره‌ای می‌باشند (شکل ۱). اندازه میکروکنیدیوم‌های یک یاخته‌ای (۵-۲) ۳/۶ × (۵/۵-۱۲) ۸/۵ میکرومتر، میکروکنیدیوم‌های دو

یاختـــــــه‌ای (۲-۵) ۳/۶ × (۱۰-۱۸) ۱۲/۵ میکرومتـــــــر، ماکروکنیدیوم‌های چهـار یاختـه‌ای (۴/۵-۴/۵) ۴/۳ × (۳۰-۴۲) ۳۸ میکرومتر، ماکروکنیدیوم‌های پنج یاخته‌ای (۴/۵-۴/۵) ۵/۱ × (۳۸-۴۴) ۴۲ میکرومتر می‌باشد. کلامیدوسپورها به فراوانی و به‌صورت میانی و انتهایی تشکیل می‌شوند. در بیشـتر جدایـه‌ها سطحی صاف دارند ولی در برخی هم سطحی خشـن و ناصـاف دارند. به‌اشکال کروی، بیضوی تا نیمه‌کروی و به‌صـورت منفـرد، جفتی، زنجیره‌ای و توده‌ای تشکیل می‌شوند (شکل ۱).

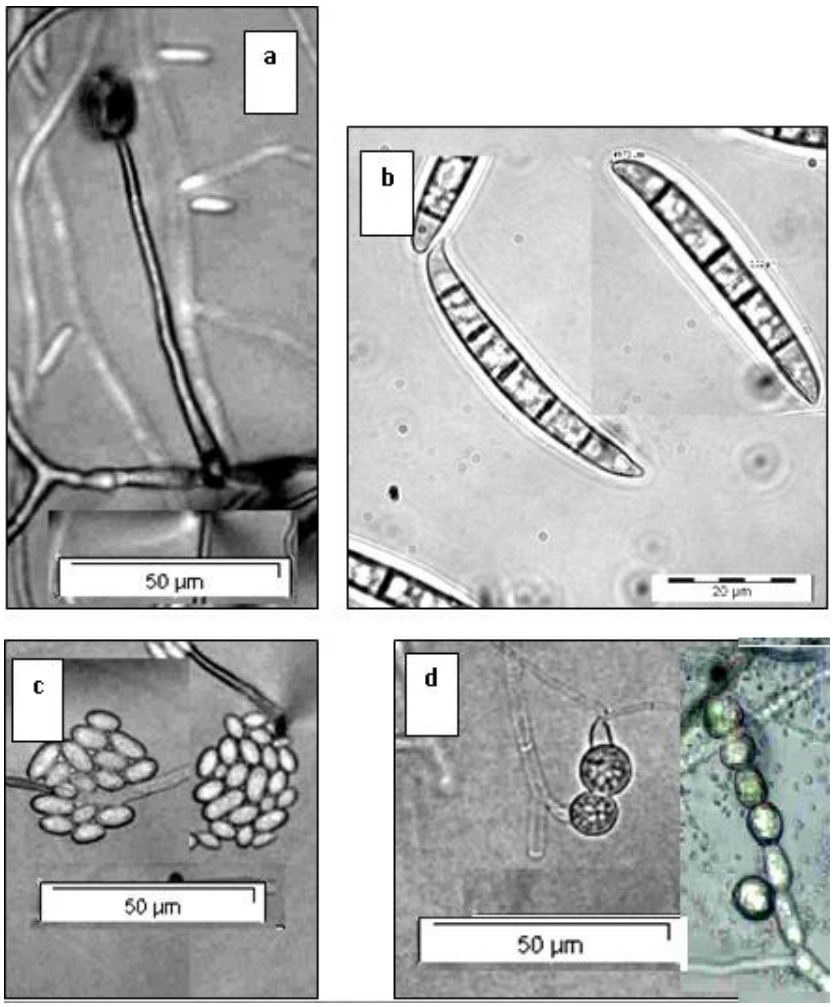


شکل ۱: *F. falciforme*: a) آرایش کنیدیوفورها با یاخته‌های کنیدیوم‌زای منوفیالید، b) ماکروکنیدیوم، c) میکروکنیدیوم،d) کلامیدوسپورها با سطح ناصاف. (خط مقیاس برای شکل‌های a-b برابر ۵۰ میکرومتر، برای شکل‌های c-d برابر ۲۰ میکرومتر است).

Fig. 1: *F. falciforme*. a) Monophialide, b) Macroconidia, c) Microconidia, d) Chlamydospores (Bar= 50 µm for a-b; Bar= 20 µm for c-d).

هشت جدایه *F. petroliphilum* از خاک‌های آغشته به ترکیبات نفتی موجود در محل خروج فاضلاب پالایشگاه نفـت کرمانشـاه جمع‌آوری شد. میزان رشد پرگنه روی محیط‌کشت PDA پـس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برابر ۳/۵ سـانتی‌متر بود. رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط‌کشت PDA از زرد تـا سبز متمایل به آبی متغیر بود. رنگ ریسه‌های هوایی از حاشـیه سفید و در مرکز صورتی بـود. روی محیط‌کشـت PDA پـس از گذشت سه روز یاخته‌های کنیدیوم‌زای منوفیالیـد بلنـد بوجـود می‌آیند که از آن‌ها میکروکنیدیوم تولیـد می‌گـردد (شـکل ۲). میکروکنیدیوم‌ها به فراوانی و به‌صورت سرهای دروغین تشـکیل شده و تک یاخته‌ای و دو یاخته‌ای و به‌شکل‌های قلـوه‌ای، تخـم مرغی تا گلابی شـکل دیـده می‌شـوند. ماکروکنیـدیوم‌ها نسـبتاً سیلندری و دو انتهای آن‌ها کمـی خمیـده شـده اسـت. یاختـه انتهایی آن‌ها تقریبـاً بلنـدتر از گونـه *F. falciforme* می‌باشـد و

یاخته پایه‌ای آن‌ها فرورفتگی دارد. اغلب ماکروکنیدیوم‌ها ۵-۳ یاخته‌ای می‌باشند (شکل ۲). اندازه میکروکنیدیوم‌های یک یاخته‌ای (۷/۹-۳/۵) ۴/۲ × (۵/۵-۱۱) ۷/۵ میکرومتر، میکروکنیدیوم‌های دو یاخته‌ای (۴/۷-۵) ۴/۶ × (۱۰-۲۳) ۱۳/۵ میکرومتر، ماکروکنیدیوم‌های سه یاخته‌ای (۵/۵-۴/۵) ۵/۰ × (۳۰-۴۴) ۴۰ میکرومتر، ماکروکنیدیوم‌های چهار یاخته‌ای (۴/۵-۴/۵) ۵/۱ × (۴۲-۴۹) ۴۶ میکرومتر و ماکروکنیدیوم‌های پنج یاخته‌ای (۴/۵-۴/۵) ۵/۱ × (۴۵-۵۳) ۵۰ می‌باشند. کلامیدوسپورها به‌فراوانی و به‌صورت میانی و انتهایی تشکیل می‌شوند. در بیشتر جدایه‌ها سطحی صاف دارند. به‌اشکال کروی، بیضوی تا نیمه‌کروی و به‌صورت منفرد، جفتی، زنجیره‌ای و توده‌ای تشکیل می‌شوند (شکل ۲). این گونه از نظر ریخت‌شناسی شبیه گونه *F. falciforme* می‌باشد ولی طول ماکروکنیدیوم‌ها بلندتر است. هم‌چنین وجود میکروکنیدیوم‌های تخم مرغی تا گلابی شکل از ویژگی‌های خاص این گونه است.



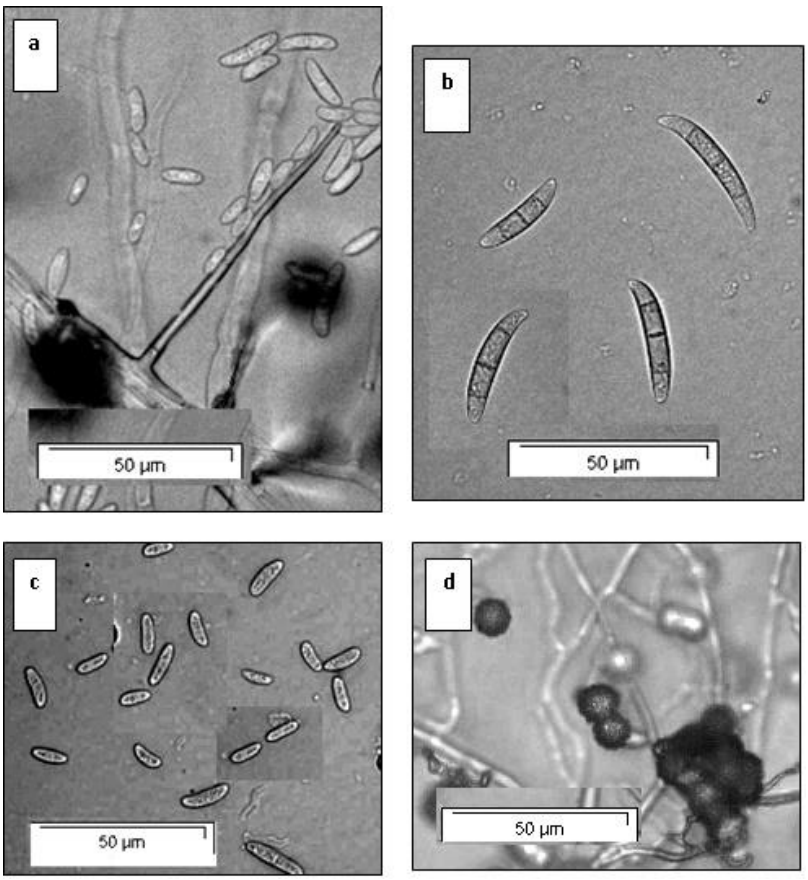
شکل ۲: *F. petroliphilum*. a) کنیدیوفورهای غیرمنشعب منوفیالید، b) ماکروکنیدیوم‌ها، c) میکروکنیدیوم‌ها، d) کلامیدوسپورها با سطح صاف. (خط مقیاس برای اشکال a, c, d برابر ۵۰ میکرومتر، برای شکل b برابر ۲۰ میکرومتراست).

Fig. 2: *F. petroliphilum*. a) Monophialide, b) Macroconidia, c) Microconidia, d) Chlamydospores (Bar= 50 µm for a, c, d; Bar= 20 µm for b)

هفت جدایه *F. keratoplasticum* از خاک‌های آغشته به ترکیبات نفتی موجود در محل خروج فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه جمع‌آوری شد. میزان رشد پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برابر ۶/۳ سانتی‌متر بود. رنگ سطح زیرین پرگنه روی محیط‌کشت PDA کرم تا زرد بود. ریسه‌های هوایی روی محیط‌کشت PDA معمولاً فراوان بوده و رشد پنبه‌ای دارند. رنگ ریسه‌های هوایی زرد بود. روی محیط‌کشت PDA پس از گذشت سه روز یاخته‌های کنیدیوم‌زای منوفیالید بلند بوجود می‌آیند که از آن‌ها میکروکنیدیوم تولید می‌گردد که طول آن‌ها تا ۱۰۰ میکرومتر (µm ۴۰-۱۰۰) هم می رسد. البته طول‌شان نسبت به گونه *F. falciforme* کوتاه‌تر است.کنیدیوم‌ها به‌صورت سرهای دروغین هستند، ولی بعداً ماکروکنیدیوم نیز تولید می‌نمایند. کنیدیوفورهای غالباً دارای یاخته‌های کنیدیزای منوفیالیدی غیرمنشعب می‌باشند (شکل ۳). میکروکنیدیوم‌ها به‌فراوانی و به‌صورت سرهای دروغین تشکیل شده و تک

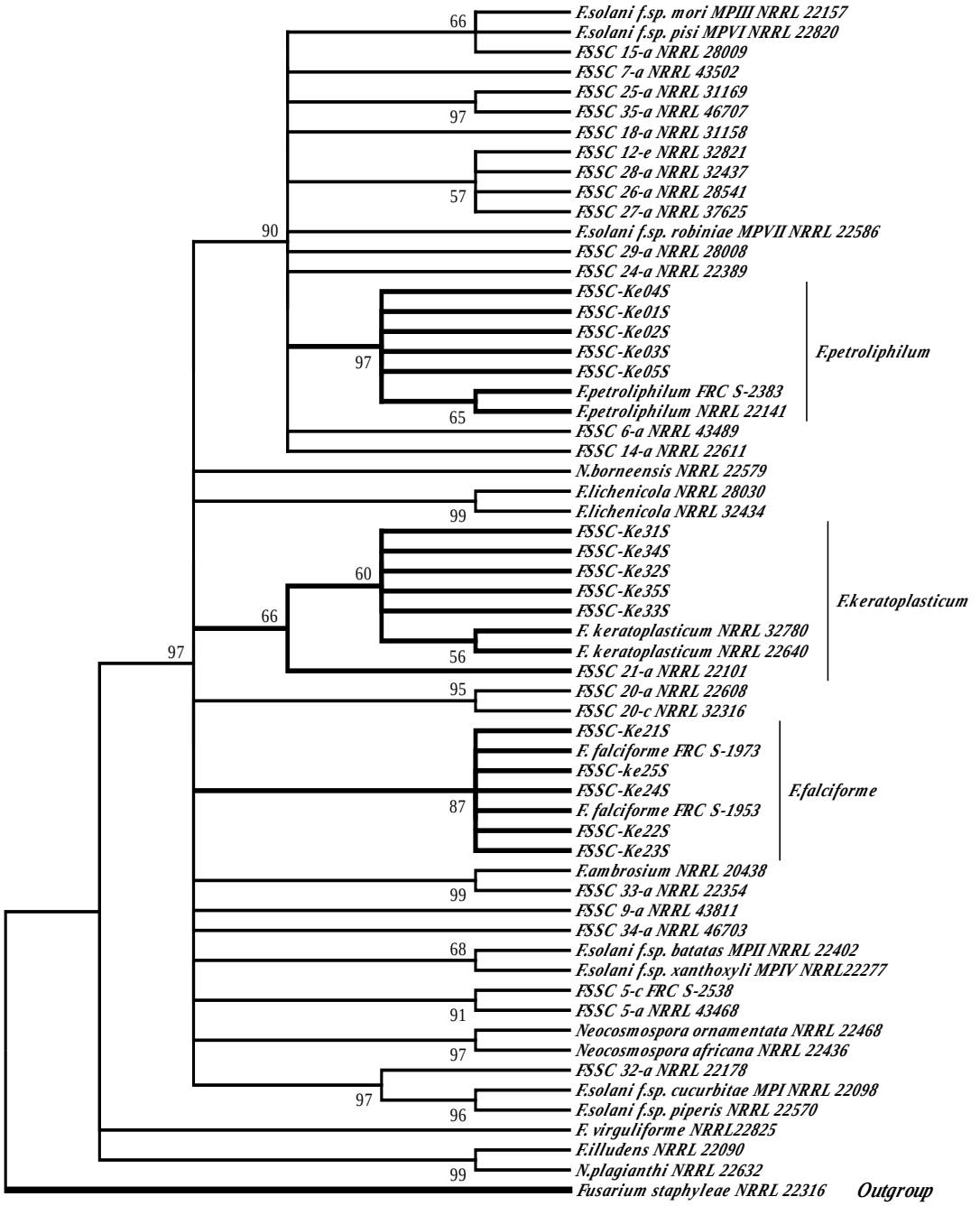
یاخته‌ای و دو یاخته‌ای‌اند. به‌شکل‌های بیضوی، تخم مرغی کشیده هستند. ماکروکنیدیوم‌ها نسبتاً کوتاه و دو انتهای آن‌ها تقریباً کوتاه و کند می‌باشد و یاخته پایه‌ای آن‌ها کمی فرورفتگی دارد. ماکروکنیدیوم‌ها سه یاخته‌ای می‌باشند (شکل ۳). اندازه میکروکنیدیوم‌های یک یاخته‌ای (۷-۳/۵) ۴/۸ × (۵/۵-۱۱) ۸/۵ میکرومتر، میکروکنیدیوم‌های دو یاخته‌ای (۶- ۴) ۵/۱ × (۱۰-۱۸) ۱۲/۵ میکرومتر، ماکروکنیدیوم‌های سه یاخته‌ای (۴/۰-۴/۶) ۵/۳ × (۳۰-۳۸) ۳۴ میکرومتر می‌باشد.

کلامیدوسپورها به‌فراوانی و به‌صورت میانی و انتهایی تشکیل می‌شوند. در بیشتر جدایه‌ها سطحی خشن و ناصاف دارند. به‌اشکال کروی، بیضوی تا نیمه‌کروی و به‌صورت منفرد، جفتی، زنجیره‌ای و توده‌ای تشکیل می‌شوند (شکل ۳). این گونه از نظر ریخت‌شناسی شبیه گونه *F. falciforme* می باشد ولی طول ماکروکنیدیوم‌ها و کنیدیوفورها کوتاه‌تر است.



شکل ۳: *F. keratoplasticum*: a) کنیدیوفورهای غیرمنشعب منوفیالید، b) ماکروکنیدیوم‌ها، c) میکروکنیدیوم‌ها، d) کلامیدوسپورها. (خط مقیاس برای همه اشکال برابر ۵۰ میکرومتراست).

Fig. 3: *F. keratoplasticum*. a) Monophialide, b) Macroconidia, c) Microconidia, d) Chlamydospores (Bar= 50 µm for a-d)



شکل ۴: درخت فیلوژنی بر اساس ترتیب تولی نواحی ITS با استفاده از روش ماکزیمم پارسیمونی اجرا شده با نرم‌افزار مگا ۴ برای جدایه‌های فوزاریوم جدا شده از خاک‌های آغشته به ترکیبات نفتی موجود در محل خروج فاضلاب پالایشگاه نفت کرمانشاه

Fig. 4: A maximum parsimony phylogeny for 60 taxa of the FSSC inferred from combined ITS sequences. Bootstrap tests were performed with 1000 replications. *Fusarium staphyleae* (NRRL22316) obtained from GenBank was treated as the outgroup

۱۵ جدایه از همه گونه‌ها به‌ترتیب زیر مورد مطالعه‌ی مولکولی قرار گرفتند (شکل ۴). درخت فیلوژنی براساس توالی نوکلوتیدهای نواحی ITS ثابت کرد جدایه‌های FSSCKe01S، FSSCKe02S، FSSCKe03S، FSSCKe04S و FSSCKe05S که بر اساس مطالعات ریخت‌شناسی به‌عنوان *F. petroliphilum* تشخیص داده شدند با ۹۷ درصد ماکزیمم پارسیمونی در کنار جدایه‌های *F. petroliphilum* (NRRL22141, FRCS2383) به‌دست آمده از بانک ژنی قرار گرفتند. هم‌چنین درخت فیلوژنی نشان داد جدایه‌های FSSCKe31S، FSSCKe32S، FSSCKe33S، FSSCKe34S و FSSCKe35S با ۶۰ درصد ماکزیمم پارسیمونی نسبتاً ضعیف در کنار گونه *F. keratoplasticum* (NRRL32780, NRRL22640) به‌دست آمده از بانک ژنی قرار گرفتند و نتایج به‌دست آمده از مطالعات ریخت‌شناسی را مورد تایید قرار داد. تک‌نیایی جدایه‌های FSSCKe21S، FSSCKe22S، FSSCKe23S، FSSCKe24S و FSSCKe25S و *F. falciforme*

(FRCS1963, FRCS1973) به‌دست آمده از بانک ژنی بر اساس توالی نوکلوتیدهای نواحی ITS با ۸۷ درصد ماکزیمم پارسیمونی نشان داده شد (شکل ۴).

گونه‌های کمپلکس *F. solani* از نظر ریخت‌شناسی بسیار به هم نزدیک هستند و به‌سختی می‌توان آن‌ها را از نظر مورفولوژی تفکیک کرد و لذا استفاده از روش مولکولی می‌تواند تاییدی بر شناسایی گونه‌ها باشد و با توجه به زمان‌بر بودن، عدم دقت کافی و طاقت فرسا بودن مطالعات ریخت‌شناسی می‌توان از نشانگرهای حساس و قوی نظیر خواندن ترتیب توالی نوکلوتیدهای ژن‌های مختلف و موثر در تفکیک گونه‌های مختلف استفاده کرد. قارچ‌ها دارای تحمل بالایی به مسمومیت ناشی از هیدروکربن‌های نفتی دارند که به خصوصیات فیزیولوژیکی و سازگاری آن‌ها به تغییرات محیط‌زیست مربوط می‌شود (*النسروی*، 2012). معمولاً قارچ‌های خاکزی به‌ویژه گونه‌های فوزاریوم به‌طور آرام و به مرور زمان از هیدروکربن‌های نفتی استفاده می‌کنند. انتشار وسیع گونه‌های فوزاریوم مربوط به توانایی رشد آن‌ها بر روی دامنه وسیع از مواد مختلف، داشتن مکانیزم‌های کافی برای انتشار و هم‌چنین قدرت دوام و بقای طولانی در شرایط نامناسب می‌باشد برجس (Burgess, 1981). محققین مختلف در تحقیقاتی قابلیت رشد گونه‌های فوزاریوم را در ترکیبات نفتی به اثبات رسانده‌اند (*اموس* و همکاران، 2002؛ *ابیر* و همکاران، 2008؛ *آپریل* و همکاران، 2000؛ *داوودی* و همکاران، 2014) لذا وجود گونه‌های فوزاریوم در پساب و خاک‌های آلوده به ترکیبات نفتی در پالایشگاه کرمانشاه در راستای این تحقیقات تایید شده است و وجود گونه‌های این جنس می‌تواند در بهبود مدیریت پاکسازی محیط زیست حایز اهمیت باشد.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۶-۱۷ متن انگلیسی مراجعه شود.