اختبار قابلية بعض الأنواع الفطرية على النمو في أوساط ملوثة بالنفط الخام.

مروان سالم حميد

قسم علوم الحياة ، كلية التربية للعلوم الصرفة ، جامعة تكريت ، تكريت العراق

الملخص:

استهدف البحث دراسة قابلية بعض الأنواع الفطرية على النمو تحت تأثير تراكيز مختلفة من النفط الخام ,عزلت الفطريات المدروسة في هذا البحث من ترب ملوثة بالمخلفات النفطية ومصاحبة للمجموع الجذري(Rhizosphere) لبعض النباتات المتواجدة في هذه الترب. انتخب خمسة أنواع فطرية اعتمادا على ترددها ونسبة ظهورها العاليين في المواقع الملوثة المدروسة لاختبارها على النمو في وسط ملوث بتراكيز مختلفة(1% و2% حجم/حجم) من النفط الخام, والتعرف على كفاءتها في تحمل الملوث . أظهرت الفطريات المختبرة(*Aspergillus terreus* و *Aspergillus flavus* و *Fusarium konzum* و *Penicillium italicum* و *Trichoderma harzianum*) درجات تحمل مختلفة لتراكيز مختلفة من النفط الخام(1% و2%) على أن النوع *T.harzianum* كان الأعلى في قابليته على النمو في الوسط الملوث وبالتركيزين(1% و2% نفط خام) مقارنة ببقية الأنواع الفطرية المختبرة , إذ سجل هذا النوع أعلى قطر مستعمره 9 سم بعد سبعة أيام من الحضن في حين لم يتجاوز أعلى قطر مستعمره لبقية الأنواع المدروسة خلال نفس الفترة الزمنية 4.5 سم, كما أظهر الفطر *T.harzianum* فروقاً معنوية في متوسط قطر المستعمرة بينه وبين جميع الفطريات المختبرة بعد 10 أيام من الحضن أذ سجل 8.5 سم يليه الفطر *F.konzum* الذي سجل متوسط قطر للمستعمرة بلغ 4.3 سم وأظهر فرقا معنويا مع كافة الفطريات المختبرة ماعدا الفطر *A.flavus* إذ بلغ متوسط القطر له 3.7 سم وسجل بدوره فرقا معنويا في متوسط القطر مع جميع الفطريات, ثم الفطرين *P.italicum* و *A.terreus* إذ بلغ متوسط قطر المستعمرة 2.9 و2.7 سم على التوالي فأظهرا بذلك فروقا معنوية مع جميع الفطريات ولم يظهرا فروقا معنويا في قطر المستعمرة بينهما.

الكلمات المفتاحية: الفطريات المختبرة, قابلية نمو الفطريات, الوسط الملوث بالنفط , محيط جذري.

المقدمة

نال موضوع التلوث النفطي في وقتنا الحاضر اهتماما عالميا واسعا إذ يعد من العوامل الرئيسة لتدهور البيئة [1] و تقدر كمية النفط الخام التي تطلق الى المياه العالمية بحوالي 2–8 مليون طن متري سنويا وحوالي 90% من هذه الكمية تطرح الى البيئة بفعل انشطة الانسان[2] وتعتبر الهيدروكربونات النفطية لاسيما الاروماتيه منها(Aromatic hydrocarbons) من الملوثات البيئية الخطيرة لما لها من دور مهم في التكبير الحيوي Biomagnification من خلال انتقالها في السلسلة الغذائية , فضلا عن سميتها للأحياء وفعلها المطفر Mutagenic والمسرطن(Kanaly) [3] وصفاتها الكيمياوية والفيزياوية المعقدة التي تجعل منها مواد صعبة التحليل بفعل الاحياء المجهرية [4] وتتوافر حاليا طرائق عدة لإزالة أو معالجة الملوثات النفطية مثل الطرائق الفيزياوية (الحجز Booming والقشط Skimmingوالشفط بالماء Water flushing) والكيمياوية (مثل استخدام المشتتات dispersing agent والمستحلباتemulsifiers) والأحيائية (مثل استخدام النباتات والاحياء المجهرية). ومن بين هذه الطرائق تحظى المعالجة البيولوجية Bioremediation لاسيما نوعها المعروف بالمعالجة الفطريةMycoremediation باهتمام المؤسسات العلمية والفنية المعنية بهذا الشأن بوصفها طريقة صديقه للبيئة وعواملها (الفطريات) هي جزء من النظام البيئي وغير مكلفة اقتصاديا فضلا عن كونها تزيل الملوثات دون ان تخلف بقايا منها وتفككها الى نواتجها النهائية الطبيعية في البيئة [5]. وعلى الرغم من الدراسات الكثيرة على دور الاحياء المجهرية في تحليل المركبات النفطية الا أنها على الأغلب تركزت على الهيدروكربونات النقية وعلى القدرات الأنزيمية للأحياء المجهرية والجانب الوراثي الهادف الى تحسين هذه القدرات[6].

طرق العمل

1- موقع البحث.

شمل البحث عزل الفطريات المختبرة من مواقع ملوثة بالمخلفات النفطية لشركة مصافي نفط الشمال, موزعة على طول قناة نوري (وهي القناة التي تنقل الفضلات الملوثة بالمخلفات النفطية الخارجة من الشركة بطول 10 كلم من المنبع وحتى مصبها في نهر دجلة الى الجنوب من الشركة) وهو عبارة عن حوض لتجمع المياه العادمة المحتوية على المخلفات النفطية الخارجة من الشركة بعرض 20 م وعمق 2 م وتسود في هذا الموقع نباتات القصب والبردي والأسل بشكل كثيف ودائم .

2- جمع العينات.

جمعت العينات من المواقع الملوثة المدروسة, إذ تم جمع التربة من المحيط الجذري Rhizosphere لنباتات البردي والقصب الموجودة على جانبي القناة الملوثة كما تم جمع عينات من الترب (الخالية من النبات)Bar area ولكل موقع ملوث مدروس, واخذت العينات بوساطة مجرفة صغيرة معقمة بكحول أثيلي 70% بعد تنظيف وجه التربة على عمق يصل الى15 سم تقريبا من سطح التربة وبواقع أربع عينات لكل نبات وتربة خالية ووضعت في اكياس بلاستيكية معقمة بكمية (500 غم لكل عينة) تم غلقها بأحكام وسجل عليها موقع

وتاريخ الجمع وأسم النبات ونقلت الى المختبر وحفظت في الثلاجة بدرجة 5مْ لحين إجراء الفحوصات المختبرية عليها [7] .

3- الاوساط الزرعية المستخدمة.

1_ وسط اكار البطاطا والدكستروز Potato dextrose (PDA agar):

حضر اللتر الواحد من هذا الوسط بإذابة 39غم من مسحوقه الجاهز من انتاج شركه Hamidia الهندية في لتر واحد من الماء المقطر وسخن حتى الذوبان ثم عقم الوسط بجهاز المؤصدة Autoclave بدرجة حرارة121 م وضغط 15 باوند/انج لمدة 15 دقيقه واضيف له 250 ملغم/لتر من المضاد الحيوي كلورا مفينيكول Chloramphenicol قبل تصلبه لمنع وتثبيط نمو البكتريا[8].

2- وسط أكار البطاطا والدكستروز الملوث بالنفط الخام.

يشابه الوسط السابق مع أضافة تراكيز محددة من النفط الخام عليه.

4- طرائق عزل الفطريات:

4-1 طريقة التخفيف Dilution plate method .

استخدمت طريقة التخافيف المتسلسلة لعزل الفطريات من التربة , أخذ10 غم تربة جافة ووضعت في دورق سعة 250 مل يحتوي على 90 مل ماء مقطر معقم . رجت جيداً بوساطة هزاز Shaker لمدة 3 دقائق. وحضر منها تخافيف متسلسلة لغاية التخفيف(10^{-4})الذي تم تنقية العزلات الفطرية منه على وسطMEA و PDA . اخذ1مل من كل تخفيف بوساطة ماصة دقيقة معقمة ونشر على الاطباق الحاوية على الوسط الزرعي المعقم بعدها حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة حرارة2±25 (استخدمت لكل عينة ثلاث مكررات) [9].

4-2 طريقة الزرع المباشر (Direct plate method).

تم نثر 1غم من كل عينه من التربة بعد تجفيفها وطحنها بواسطة ملعقة صغيرة معقمه في طبق بتري معقم بقطر 9سم حاوي على الوسط الزرعي PDA و MEA المعقم بعدها حضنت الاطباق المزروعة تحت درجة حراره 25±2 م (استخدمت لكل عينه ثلاث مكررات)[10].

5- فحص وتشخيص الفطريات المعزولة.

فحصت العينات المزروعة بعد3_5 ايام من التحضين لغرض حساب عدد المستعمرات الفطرية النامية على الاوساط الزرعية وتم الفحص الاولي للأطباق المزروعة باستخدام مجهر التشريح Dissecting microscope نوع wild للتعرف على الصفات المظهرية للفطريات النامية والتي تعد من احدى الوسائل المهمة للتعرف على الفطريات , التي تشمل عدة امور منها , فترة الحضانة , شكل المستعمرة (غائرة ,بارزة) ولون نسجتها (مسحوقية , قطنية , زغبية) كما تم قياس قطر المستعمرة بعد توقف النمو ثم عزلت الفطريات في مزارع نقية لغرض تشخيصها بشكل دقيق .

5-1 الفحص المجهري بطريقة التحميل الرطب.

اجري هذا الفحص بتحضير شرائح زجاجيه باستعمال مادة اللاكتوفينول Lactophenol المحتوية على صبغة القطن الزرقاء المستخدمة لقتل وتثبيت الفطريات لفحصها والمحضرة (بأذابة 20غم بلورات الفينول في 20 مل حامض اللاكتيك و40 مل من الكليسيرين و20 مل ماء مقطر معقم المضاف اليها 0.5غم من صبغة القطن الزرقاء) وذلك بنقل جزء من الخيوط الفطرية من المستعمرة الفطرية النقية الى الشريحة الزجاجية بوساطة ابرة التلقيح المعقمة ومزجها مع الصبغة ثم وضع عليها غطاء الشريحة وضغطت بلطف لغرض فرش العينة, فحصت تحت المجهر الضوئي المركب Compound light microscope نوع Olympus لغرض دراسة صفات الفطريات المعزولة وتشخيصها بشكل دقيق [11].

5-2 الفحص بطريقة الشريط اللاصق :

تم اجراء هذا الفحص باستخدام شريط لاصق شفاف بطول 2سم وذلك بملامسة وضغط الجهة اللاصقة للشريط مع سطح المستعمرة الفطرية النامية على الوسط الصلب وتحت ظروف معقمة ثم رفع ولصق الشريط على شريحه زجاجيه نظيفة حاويه على قطره من صبغة القطن الزرقاء ثم فحصت الشريحة تحت المجهر الضوئي المركب لملاحظة الخصائص المميزة للكونيدات من حيث الشكل والترتيب والحجم [12].

تم تشخيص جميع الفطريات المعزولة وبضمنها المختبرة في هذا البحث استنادا الى المفاتيح التصنيفية المذكورة في المصادر الاتية [13و14و15و16] .

6 – حفظ العزلات الفطرية النقية

حفظت العزلات الفطرية التي تم الحصول عليها بعد تنميتها على وسط PDA المائل Slant الحاوي على المضاد الحيوي الكلورومفينكول في درجة حرارة 25مْ لمدة 7 ايام في الثلاجة بدرجة 5م مع مراعاة تجديدها شهريا وبواقع مكررين لكل عزله لحين اجراء الدراسات اللاحقة عليها [17].

7- تجربة اختبار قابلية الفطريات على النمو في وسط ملوث بالنفط الخام

صممت هذه التجربة لقياس مدى قدرة بعض الفطريات المعزولة من الترب الملوثة المدروسة على النمو في أوساط ملوثة النفط الخام بتركيز 1% و2% حجم/حجم ومقارنة ايهما أكثر كفاءة على النمو والتحمل بوحدة الزمن إذ تم اختيار خمس عزلات فطرية اعتمادا على سيادتها وترددها العالي في منطقة الدراسة .إذ اعتمد الاختبار على مقارنة الاختلافات بين نسبة نمو الفطريات على الوسط الملوث والوسط النقي (السيطرة) .كالاتي:-

1- نشطت العزلات الفطرية المختارة وذلك بزراعتها على وسطPDA لمدة7 ايام.

2- حضر وسط التجربة بإضافة تركيزان من النفط الخام (1% و2% حجم/حجم) الى محلولPDA الدافئ ذو درجة حرارة 45 مْ.

3- خلط المحلول باستخدام المحرك المغناطيسي المعقم Magnetic stirrer قبل صب الوسط في الاطباق للحصول على تراكيز متماثلة في كل الاطباق.

4–لقحت جميع الاطباق بقطع من الخيط الفطري بواسطة ثاقب فليني معقم ذو قطر5ملم المأخوذ من المستعمرات النامية على وسطPDA بعمر أسبوع بالزمن نفسه.

5–حضنت الاطباق في الحاضنة بدرجة 25 ± 2 درجة مئوية .

6–قيست اقطار المستعمرات الفطرية النامية لثلاث فترات زمنية 10,7,3 يوم من التنمية باستخدام measuring tape وقورنت بأطباق السيطرة [18].

8- التحليل الإحصائي

حللت نتائج تجربة اختبار الفطريات على الوسط الملوث بالنفط إحصائياً بأتباع اختبار تحليل التباين وقورنت الفروقات بين المتوسطات الحسابية باستخدام اختبار دنكن متعدد الحدود عند مستوى احتمالية 0.05% [19] .

النتائج والمناقشة

نمو العزلات الفطرية على النفط الخام

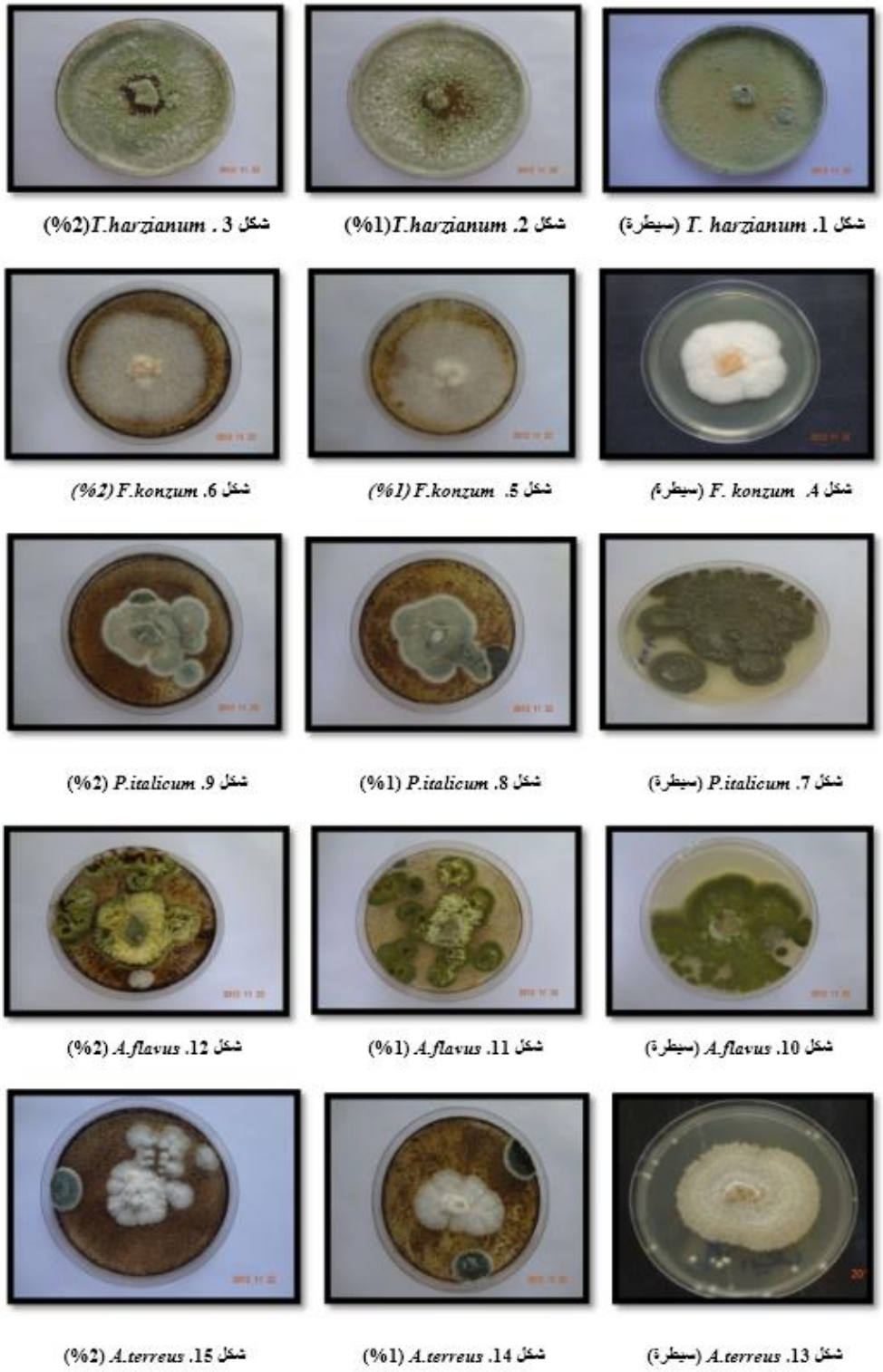
يبين الجدول1 والأشكال 1–15 نمو بعض الأنواع الفطرية المعزولة من الترب الملوثة المدروسة تحت تأثير تراكيز مختلفة(1% و2% حجم/حجم) من النفط الخام , ويلاحظ في هذا الجدول أن نمو الأنواع *Fusarium konzum* و *Aspergillus terreus* و *Penicillium italicum* لم يظهر اختلافات معنوية في قطر المستعمرة الفطرية عن السيطرة تحت تأثير النفط الخام خلال الفترة الاولى من الاختبار (أي بعد مرور 3 يوم من التنمية) في حين أظهر النوع *Aspergillus flavus* انخفاضا معنويا في قطر المستعمرة عن السيطرة تحت تأثير النفط الخام بالتركيزين المختبرين , اما النوع *Trichoderma harzianum* فقد أظهر انخفاضا معنويا في قطر المستعمرة عند التركيز 2% عن السيطرة . كما يلاحظ من هذا الجدول و بعد مرور 7يوم من التنمية (الفترة الثانية) أن مستعمرات الفطريات المدروسة كافة (منها السيطرة) حققت زيادة معنوية في اقطارها خلال هذه الفترة مقارنة بالفترة الاولى , وأن الفطر *T.harzianum* اظهر تماثلا في نموه عند تركيزي النفط المدروسين من جهة ومع السيطرة من جهة أخرى على أن هذا النمو كان هو الاعلى استنادا الى قطر المستعمرة مقارنة بنمو بقية الفطريات اذ بلغ معدل قطر مستعمراته عند التركيزين المذكورين والسيطرة 9سم وهو ما يفرق معنويا عن اقطار مستعمرات بقية الفطريات (ومنها معاملة السيطرة لكل منها) وذلك خلال الفترة الثانية من النمو , على أن النوعين *A.flavus* و *F.konzum* سجلا أفضل نمو لهما خلال هذه الفترة عند التركيز 1%(معدل قطر المستعمرة 3.0 و5.5 سم على التوالي) مقارنة بنموهما عند التركيز 2% (معدل قطر المستعمرة 2.5 و 4.8 سم على التوالي) , اما النوعين *A.terreus* و *P.italicum* فلم يظهرا فروقات معنوية في قطر المستعمرة خلال هذه الفترة من النمو عند التركيزين 1%و2% من الملوث الا أن الفطر الاول اظهر انخفاضا معنويا في قطر المستعمرة عن السيطرة عند التركيزين المذكورين على أن هذا الفرق عن السيطرة لم يظهره الفطر *P.italicum*.

الجدول – 1 .قابلية نمو بعض الفطريات على الوسط الملوث بتركيزين من النفط الخام.

نوع الفطر	تركيز النفط %	قطر المستعمرة الفطرية (سم) الفترة بالأيام 3	7	10	متوسط التركيز	متوسط قطر المستعمرة الفطرية
Trichoderma harzianum	%1	7.4 **b c	9 A	9 A	8.5 *A	8.5 *A
	%2	7.0 c	9 A	9 A	8.3 A	
	سيطرة	7.9 b	9 A	9 A	8.6 A	
متوسط الفترة		7.4 b	9.0 A	9.0 a		
Fusarium konzum	%1	2.7 e	5.5 B	6.4 A	4.9 B	4.3 B
	%2	2.0 f	4.8 C	5.9 B	4.2 C	
	سيطرة	2.5 e f	3.9 D	5.3 b c	3.9 C	
متوسط الفترة		2.4 c	4.7 b	5.9 a		
Aspergillus flavus	%1	2.4 f	3.0 E	4.0 C	3.1 D	3.7 B
	%2	1.9 g	2.5 f	3.3 d e	2.6 C	
	سيطرة	3.5 d	5.1 B	7.2 A	5.3 B	
متوسط الفترة		2.6 c	3.5 b	4.8 a		
Aspergillus terreus	%1	2.0 e	2.6 c d	3.4 B	2.7 D	2.7 C
	%2	1.9 e	2.2 d e	2.9 C	2.3 E	
	سيطرة	2.4 d e	3.1 b c	3.9 A	3.1 D	
متوسط الفترة		2.1 c	2.6 b	3.4 A		
Penicillium italicum	%1	2.0 c d	2.7 B	4.1 A	2.9 D	2.9 C
	%2	1.7 c	2.8 B	3.9 A	2.8 D	
	سيطرة	2.2 c	2.9 B	4.3 A	3.1 D	
متوسط الفترة		2.0 c	2.8 b	4.1 a		
المتوسط العام للفترة		3.3 c	4.5 B	5.4 a		

*الحروف الكبيرة المتشابهة عمودياً تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها بمستوى أحتمالية $P \leq 0.05$.

*الحروف الصغيرة المتشابهة افقياً تعني عدم وجود فروقات معنوية بينها بمستوى أحتمالية $P \leq 0.05$.



الأشكال 1– 15 . مظهر مستعمرات *T.harzianum* و *F.konzum* و *P.italicum* و *A.flavus* و *A.terreus* النامية على الوسط الملوث بتركيزين من النفط الخام

ويلاحظ ايضاً من الجدول1 وبعيدا عن الفطر *T.harzianum* الذي استمر بأفضلية نموه خلال الفترة الثالثة (بعد10يوم من التنمية) على بقية الفطريات المختبرة عند التركيزين سالفي الذكر ومرة اخرى فقد اظهرت الفطريات المدروسة (بما في ذلك معاملة السيطرة) زيادة معنوية في اقطارها خلال هذه الفترة على اقطارها في الفترة الثانية من التنمية , على أن هذه الفطريات سلكت السلوك نفسه عند التركيز 1% و2% الذي سلكته في الفترة الثانية من التنمية اذ كان أفضل نمو لها عند التركيز 1% مقارنة بنموها عند التركيز 2% , ومع ذلك فقد

أظهرت هذه الفطريات (عدا النوع *P.italicum*) فروقات معنوية في قطر المستعمرة عن السيطرة أذ سجل الفطر *F.konzum* زيادة معنوية في قطر المستعمرة خلال الفترة الثالثة من النمو ولكلا التركيزين سالفي الذكر عن المقارنة في حين أظهر النوعين *A.flavus* و *A.terreus* انخفاضا معنويا في قطر المستعمرة ولكلا التركيزين المدروسين عن المقارنة.

ويتضح من جدول 1 كذلك أن متوسط قطر المستعمرة وبصرف النظر عن الفترة وتركيز الملوث يتدرج من الأعلى الى الأدنى بدءاً بالفطر *T.harzianum*(8.5 سم) الذي أظهر فرقا معنويا بالنسبة لمتوسط قطر المستعمرة بينه وبين جميع الفطريات المختبرة , ثم الفطر *F.konzum* (4.3 سم) و *A.flavus*(3.7 سم) وانتهاءاً بالفطرين *P.italicum* و *A.terreus* اللذان أظهرا أدنى متوسط لقطر المستعمرة بلغ (2.9 و 2.7 سم) على التوالي وبالوقت نفسه لم يظهرا فرقا معنويا بينهما في هذا الخصوص.

وتفسيرا لما تقدم من نتائج معروضة في الجدول1 فأن العلاقة الطردية بين نمو الفطر والزمن ولكلا تركيزي الملوث تشير الى تكيف أو تطبع أو تحمل الفطريات المختبرة لهذه البيئة مع الزمن على ان هذه الفطريات تختلف بسرعة تكيفها أو تطبعها لوسط النمو وهو ما أظهره الفطر *T.harzianum* خلال الفترة الاولى من التنمية إذ سجل هذا الفطر أعلى معدل لقطر المستعمرة سواءاً بوجود الملوث من عدمه (السيطرة) مقارنة ببقية الفطريات المختبرة التي أظهرت خلال هذه الفترة نموا منخفضا على الوسط الملوث وغير الملوث قياسا بالفطر *T.harzianum* .

مما يشير الى القابلية العالية للفطر *T.harzianum* في استغلال مواد عضوية مختلفة التعقيد(البسيط في حال السيطرة والبسيط والمعقد في بقية المعاملات) وبذلك انعكاس لقابليته الأنزيمية العالية كما ونوعا ولسرعة التعبير الجيني في مواجهة الإجهادات (منها الإجهاد النفطي) بالمقارنة مع بقية الفطريات المدروسة على أن هذا الفطر أظهر مع الزمن تزايدا مهما في نموه (والقابلية الأنزيمية) تحت تأثير الملوث ليصل في نموه خلال الفترة الثانية من التنمية الى درجة التشابه مع معاملة السيطرة مما يشير الى السيطرة التامة للفطر على الملوث وهو مالم تظهره بقية الفطريات المختبرة وبذلك فأن الدراسة الحالية ترشح الفطر *T.harzianum* كعامل مهم في المعالجة الحيوية للملوثات النفطية, وفي هذا الخصوص أشار[20] في دراسته لتحديد أفضل المعايير لإنتاج الكتلة الحيوية لفطر *T.harzianum* النامي في الوسط الذي يحوي على تركيز 3% حجم/حجم من النفط الخام والمعزول سابقا من مياه الصرف الملوثة بالمخلفات النفطية إلى ان المستعمرة اظهرت اقصى نمو لها في الوسط الملوث في اليوم السادس من الحضن وان معدل التحليل الحيوي للنفط بلغ 40%من مجموع الهيدروكربونات الكلية TPH بعد 9 أيام من الحضن بدرجة حرارة 30 م(كأفضل درجة حرارة) وأس هيدروجيني pH5.5 (كأفضل pH) إذ أظهر الفطر عند هذين العاملين أكبر كتلة حيوية وأسرع وأكثف نمو للخيوط الفطرية.

ويبدو أن لزيادة المساحة السطحية للخيوط الفطرية دورا مهما في زيادة الاتصال بين جزيئات النفط الخام وخلايا الفطر أو أنزيماته خاصة وان هذه الزيادة في نمو الخيوط الفطرية يرافقها زيادة في إفراز الأنزيمات المحللة مما يسرع من عمليات تحليل المواد العضوية وأخذها من قبل الفطر[18 و 21 و 22]. وتجدر الإشارة الى أن النمو السريع للخيوط الفطرية في الوسط الملوث بالنفط يشير الى أن هذه الفطريات تمتلك تطبعا كبيرا للمركبات النفطية وتستطيع تحليل أو تفكيك مدى واسع منها وهذا ما توصل الية [18 و 23].

وبين[24] في دراسة لتقييم تحمل التلوث النفطي وتحقيق النمو والقدرة على تحليل النفط الخام لأحدى عشر سلالة من الفطر *Trichoderma* في أوساط الأملاح المعدنية المضاف اليها سبعة تراكيز مختلفة من النفط الخام ومقارنتها مع السيطرة إن العزلات الفطرية كافة أظهرت تحملا متباينا لتراكيز الملوث المختبرة خلال 4 أيام من الحضن على أن التراكيز العالية من النفط الخام ثبطت نمو بعض العزلات المدروسة,

هذا إذا ما علمنا أن للفطر *T.harzianum* أدواراً بيئية اخرى مثل تشجيعه لمقاومة النبات ضد الممرضات وفعله التضادي لفطريات ممرضة أخرى (مثل الفطر *Fusarium*) وهو ما يجعله من الفطريات المهمة والمفيدة من الناحيتين البيئية والاقتصادية [25] كما أن الترددات العالية لهذا الجنس بأنواعه المسجلة في الترب الملوثة بالنفط في هذه الدراسة تتفق والنتائج المتحصل عليها في دراسات سابقة سجلت وجوده في الترب الملوثة بالمخلفات النفطية[21]. وبالنسبة للفطر *F.konzum* الذي لم تتناوله دراسات أخرى بالعلاقة مع التلوث النفطي والذي جاء بعد الفطر *T.harzianum* في القابلية العالية على النمو في الوسط الملوث نفطيا في هذه الدراسة فأن هناك دراسات تشير الى قابلية انواع مختلفة (من غير *F.konzum*) من الجنس *Fusarium*على تكسير المخلفات النفطية ,

أذ لاحظ [21] انه من بين 21 نوع فطري معزول من ترب رايزوسفيرية ملوثة بالنفط أظهرت أنواع جنس *Fusarium sp* فقط مقاومة عالية للتلوث وقابلية كبيرة على النمو بوسط ملوث بتركيز 10%(حجم/حجم) من النفط الخام .وتتفق هذه النتائج مع كل من [26 و 27] على أن ترشيح النوع *F.konzum* وغيره من أنواع الجنس *Fusarium sp.* في المعالجة الحيوية للتلوث النفطي يتطلب مزيدا من البحث والتقصي لاسيما تداخلاته مع الاحياء الاخرى (مثل الفطر *T.harzianum*) .

وعلى الرغم من تدني نمو الانواع *A.terreus* و *A.flavus* و *P.italicum* نسبيا في الوسط الملوث نفطيا في هذه الدراسة الا ان تحملها لهذا التلوث في هذه الدراسة والذي يتفق مع دراسات اخرى [21 و 28 و 29 و 30] بحاجة هو الاخر لمزيد من البحث والتقصي فيما يخص علاقتها مع رواشح الجذور من جهة وقابليتها على التحليل

الحيوي للنفط من جهة أخرى وأن هذه الفطريات أظهرت في الدراسة الحالية سيادة مهمة في الترب الرايزوسفيرية المحيطة بالجذور اذ قد تعمل رواشح الجذور على زيادة قابليتها في مواجهة معالجة التلوث النفطي .

وفي هذا الخصوص أشار [31] الى القابلية العالية للنوعين *P.italicum* و *A.niger* المعزولين من تربة ملوثة بالنفط الخام في نيجيريا بتردد عالي على تحليل النفط بصورة متداخلة مع بعضهما.

كما بين [32] الى أن نسبة تحمل وتطبع الفطريات للنفط الخام تختلف باختلاف أنواعها وسلالاتها وبالتالي سوف تظهر اختلافاً في قابليتها على النمو والتحليل الحيوي في الوسط الملوث, لذا فطبيعة النفط الخام العراقي المستخدم في هذه الدراسة والذي يعتبر من أنواع النفوط المتوسطة Medium crude oils ربما يكون له تأثير على قابلية التحليل الحيوي للفطريات المدروسة, لاسيما وأن الفطريات التي تمكنت من إستغلال مكوناته قد نمت بصورة جيدة بينما فطريات أُخرى لم تتمكن من التطبع والنمو بصورة جيدة بوجود هذا النفط الخام وانخفضت قابليتها على النمو , وهذا يتفق مع دراسات أُخرى وجد فيها تأثير مباشر لنوعية النفط الخام على نمو الفطريات وعملية التحليل الحيوي [33].

ومن النتائج المتحصلة يتضح لنا بأن رواشح الجذور تعمل على زيادة كم ونوع الاحياء المجهرية (مثل المختبرة في هذه دراسة) التي تعمل على تفكيك أو تحليل المركبات النفطية الى مركبات أبسط يأخذها النبات ويعالجها بآليات مختلفة , علية فان الانواع الفطرية التي أظهرت تدنيا في نموها (مثل *A.terreus* و *P.italicum*) على الوسط الملوث نفطيا قد تزداد قابلياتها في تحمل الاجهاد النفطي بوجود رواشح الجذور إذ أن هذه الرواشح تطلق مواد عضوية مختلفة في التربة تستطيع الفطريات أن تستغلها كمغذيات تزيد من كفاءة جهازها الانزيمي وقابليتها على إفراز انزيمات مختلفة تعمل على تحليل وتفكيك المركبات الهيدروكربونية المعقدة للنفط وهذا ما يسمى بالتحفيز الحيوي Bio stimulation [21 و 34].

المصادر

1. Ozaki, F., C.M. Pannuti, A.V. Imbronito, W. Pessotti and L. Saraiva et al., (2006). Efficacy of a herbal toothpaste on patients with established gingivitis: A randomized controlled trial. Braz. Oral Res., 20: 172-177.

2. Zhu, X; Venosa, A. D; Suidan, M. T. and Lee, K. (2004). Guidelines for the Bioremedation of oil–contaminated salt marshes. National risk management research laboratory. Office of Research and Development U. S. Environmental protection Agency, Cincinnati.EPA/600/R-04/074.

3. Kanaly, R. A. and Harayama, S. (2000). Biodegradation of high – Molecular – Weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. American society for microbiology. Journal of Bacteriology. Vol. 182, No. 8. PP: 2059 – 2067 .

4. Bennett, J. W. ; Wunch, K. G. And Faison, B .D. (2002). Use Of Fungi In Biodegradation. In: J. Hurst (Ed.) Manual Of Environmental Microbiolo-Gy 2nd Edition, Asm Press Washington. Pp: 960-971.

5. Thapa, B. and Ghimire, A. (2012). Areview on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. asian institute of technology, pathumthani Bangkok, Thailand. kathmandu university journal of science,. vol. 8, pp 164-170.

6. Baldi, F.; Pepi, M.; Capone, A.; Giovampaola, C.M.; Milanesi, C.; Fani, R. And Focarelli, R. (2003). Envelope Glycosylation Determined By Lectins In Microscopy Sections Of Acinetobacter Venetianus Induced By Diesel Fuel. Research In Microbiology 154: Pp: 417 – 424.

7. Johnson, L.F. and E.A. Curl (1972). Methods for Research on The Ecology of Soil – Borne Plant Pathogens .Burgess Publishing Company. 247 pp.

8. Pitt, J. I. and Hocking, A. D. (1997). Fungal and Food Spoilage 2nd ed. London, U.K.: Professional.pp.511 .

9. Johnson, L. E., Curl, E. A., Bond, J. H. and Fribourgh, H. A. (1959). Methods for studying soil microflora- plant disease relationships. Burgess Pub. Co. Minneapolis, Mn. USA.

10. Warcup, J. H. (1960). Methods For Isolation And Estimation Of Activity Of Fungi In Soil. In: The Ecology Of Soil Fungi (Eds.) Parkinson D. P J. S. Liverpool University Press Pp.3- 21.

11. Kwon-Chung , K.J. and Bennett , J.E. (1992). Medical Mycology . Lea and Febiger , Philadelphia .

12. Baron , E.J ; Peterson, L . R. and Finegold. S.M. (1994). Bailey and Scotts diaghostic microbiology . 9th ed , Mosby Baltimor ,.

13. Ellis ,M.B.(1971).Dematiaceous Hyphomycetes .Common Wealth Mycological Institute , Kew ,Surrey , England .603 pp.

14. Ranasingh, N.; A. Saurabb and M. Nedunchezhiyan (2006) . Use of *Trichoderma* in Disease Management . Orissa Review .

15. Leslie ,J.f. and B.A. Summerell (2006) .the *Fusarium* Laboratory Manual . Black well Publishing . 388 pp.

16. Barnett, H.l. and Hunter, B.B. (2006). Illustrated Genera of Imperfect Fungi . Burgess Publishing Company . 241 pp.

17. Jong, S.C .(1981) . Isolation ,Cultivation and mai and tenance of candidial fungi , In biology of candidial fungi . Vol.2. Edited by Cole, G. T. and Kendrick , B. acad. Press.

18. Mohsenzade, F., Nasseri, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D. and Chehregani, A.(2009) 'Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheral

fungi', Toxicological and Environmental Chemistry, 91: 8, 1443 — 1453.

19. 27.الـراوي, خاشـع محمـود وخلـف الله ,عبـد العزيـز محمـد (2000) . تصميم وتحليل التجارب ط2. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي, جامعة الموصل , العراق.

20. Hamzah,A; Abu Zarin, M; Abdulhami, D,A; Omar, O; Senaf, S.(2012). Optimal Physical and Nutrient Parameters for Growth of *Trichoderma virens* UKMP-1M for Heavy Crude Oil Degradation', School of Biosciences and Biotechnology Faculty of Science and Technology University Kebangsaan Malaysia43600 UKM Bangi, Selangor Malaysia, 41(1): 71–79.

21. Romero, C,M; Urrutia, M,L; Reinoso, H,E; Kiernan, M,M (2010)." Benzo[a]pyrene degradation by soil filamentous fungi" Universidad Nacional de La Plata, 1900 La Plata, Argentina.

22. Steliga,T.(2012).Role of fungi in biodegradation of Petroleum hydrocarbons in Drill West. oil and gas institute, Krakow, Poland. Pol. J. Environ. stud. Vol. 21 No (2) :471_479.

23. Orji1, F. A; Ibiene2, A. A.; Uzomba3, P. C.; Itoandon1, E. E. and Nwachukwu4, N. C.(2012). Cow dung and water hyacinth nutrient powder : good sources of limiting nutrients for bioremediation of hydrocarbon polluter mangrove seamips in the niger delta , Nigeria .Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment, 8(2):52-58.

24. Argumedo_Delira, R; Alarcón, A; Cerrato, R.F; Almaraz, J.J; Cabriales, J.J.P. (2012). Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene' de Biotecnología Bioquímica. Centro de Investigación y Estudios Avanzados ,Unidad Irapuato, Guanajuato, México. Journal of Environmental Management. 95: S291eS299.

25. رمضان , 25.Trichoderma herzianum فعالية الفطر . نـديم احمـد ,(2007) فـي المقاومـة الحيويـة لنـوعين مـن الفطر Fusarium المعزولة من بذور القرنفل . مجلة التربية والعلم ,جامعة الموصل. مجلد 19, العدد 5.الصفحات 68_76.

26. Embar, K.; Forgacs, C. And Sivan, A. (2006). The Role Of Indigenous England. 608pp.

27. Chaudhry, S.; Luhach, J. Sharma, V. and Sharma, C. (2012). Assessment of diesel degrading potential of fungal isolates from sludge contaminated soil of petroleum refinery, Haryana. Institute of environmental studies, Kurukshetra University , Kurukshetra, Haryana, India . Research journal of microbiology 7(3) :182-190.

28. Obire, O.,E. C. Anyanwu and R.N. Okigbo. (2008). Saprophytic and crude oil-degrading fungi from cow dung and poultry droppings as bioremediating agents. International Journal of Agricultural Technology. 4(2): 81-89.

29. Thanaboripat, D; Thawai, C; Jindaporn, N; Mathurot, O; Kongniam, O (2011). Growth Inhibition of Aspergillus flavus IMI 242684 by Crude Extract of Penicillium sp"Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand.vol.2,pp155_164.

30. Maruthi, Y,A; Hossain, K; Thakre, S(2013). Aspergillus flavus: A potential Bioremediator for oil contaminated soils' Rome, Italy, European Journal of Sustainable Development (2013), 2, 1, 57-66, ISSN: 2239-5938.

31. 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. Department of Microbiology, Federal University of Technology, Nigeria. Malaysian Journal of Microbiology. Vol 8(1) pp. 42-46.

32. Atagana, H.I. (2006). Biodegradation Of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons In Contaminated Soil By Biostimulation And Bioaulation And Bioaugmentation In The Presence Of Copper (Ii)Ions..Worl. Microbiol. Biotechnol., 22:1145-1153.

33. Okerentugba, P. and Ezeronye, O. (2003). Petroleum Degrading Potentials of Single And Mixed Microbial Cultures Isolated From Rivers And Refinery Effluent In Nigeria. Afri. J. Biotechnol., 2: 288-292.

34. Garapati, V.K. and Mishra, S. (2012). Hydrocarbon Degradation using Fungal Isolate: Nutrients Optimized by Combined Grey Relational Analysis. (IJERA). vol.2,pp.390_399.

Growth ability of some fungal species on media with crude oil residue

Marwan S. Hameed

Department of Biology, College of Education for Pure Science , University of Tikrit, Tikrit, Iraq

Abstract:

This research aimed to investigate growth ability of some fungal species on media with crude oil residue. The isolated the fungi were in this research of soil contaminated with oil residues and accompanying to rhizosphere for some existing plants in these soils , Five fungal species were selected depending on the frequency and ratio appearance highs in contaminated sites studied for testing on growth in the media of contaminated with different concentrations of crude oil(1%,2% vol/vol) , and to identify the efficiency in carrying contaminated .

Concerning growth ability on crude oil, all tested fungi (Aspergillus terreus, Aspergillus flavus, Fusarium konzum, Penicillium italicum and Trichoderma harzianum) were found to have this ability but significant difference in this respect were observed between these species. However, Trichoderma. harzianum showed better and faster growth on different concentrations of crude oil in comparison with other fungi studies.

Keywords : Tested fungi, Growth ability of fungi ,meadia crude oil residue, Rhizosphere.