تعیین IC_{50} برخی قارچ‌های جداسازی شده از خاک‌های آلوده‌ی معدن انگوران زنجان

شیوا محمدپور[۱]، ناصر علی اصغرزاد[۲]، شاهین اوستان[۲] و مهدی ارزنلو[۳]

۱- دانشجوی ارشد رشته بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشگاه تبریز، ۲- استاد گروه علوم خاک دانشگاه تبریز

۳- دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز

چکیده

در پژوهش حاضر بعد از جمع‌آوری خاک‌های آلوده به فلزات سنگین از اطراف کارخانه‌ی سرب و روی زنجان تعدادی از قارچ-های ساپروفیت بومی از نظر سرعت رشد و غالبیت گونه جداسازی شدند. در ادامه با آزمایشات درون شیشه‌ای، تحمل برخی از این گونه‌های قارچی در برابر سطوح صفر، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از سرب بررسی شد. نتایج نشان داد رشد کلنی هفت ایزوله‌ی *Aspergillus sp.*، یک ایزوله‌ی *Muocor* و یک ایزوله‌ی *Trichoderma* از غلظت ۰ mg L^{-1} تا ۶۰۰ کاهش یافته یا تقریبا ثابت ماند و در غلظت‌های بالاتر قطر کلنی‌ها به شدت کاهش یافت. در دو ایزوله‌ی *Cladosporium* کلنی‌ها از غلظت‌های ۰ تا ۶۰۰ کمترین رشد را نسبت به غلظت‌های بالا داشتند که نشانگر تحمل زیاد آنها به سرب است. طبق نتایج بدست آمده، قارچ‌های دارای IC_{50} بالا، نشان‌دهنده‌ی تحمل بالای این قارچ‌ها به سمیت سرب می-باشد.

کلید واژه‌ها : قارچ‌های ساپروفیت، IC50، سرب

مقدمه:

همگام با افزایش جمعیت، رشد صنعتی، اقتصادی و تولید انواع مختلف ترکیبات و مواد شیمیایی و غیره که بشر برای رفاه و آسایش خود با استفاده از منابع طبیعی به دست آورده، به طور ناخواسته موادی چون انواع فلزات سنگین و سمّی را به طبیعت وارد می‌کند که هم برای محیط‌زیست و هم برای خود انسان مشکلات و خطرات جدی به همراه دارد (کرباسی و همکاران ۱۳۸۹). قرار گرفتن طولانی مدت و سمیّت بالای فلزات سنگین در این محیط‌ها، می‌تواند اثرات مخرّبی را بر سلامت انسان و سایر موجودات زنده داشته باشد (دیکسیت و همکاران ۲۰۱۵).

معضل اصلی مربوط به فلزات سنگین آن است که این آلاینده‌های معدنی برخلاف آلاینده‌های آلی تجزیه‌پذیر نمی‌باشند. این واقعیت، فلزات سنگین را به یکی از خطرناک‌ترین گروه آلاینده‌های زیست محیطی مبدّل ساخته است (نادری و همکاران ۱۳۹۱؛ کرباسی و همکاران ۱۳۸۹). طی ده سال اخیر، میزان انتشار سالانه فلزات سنگین در جهان به ۲۲۰۰۰ تن برای کادمیم، ۹۳۹۰۰۰ تن برای مس، ۷۸۳۰۰۰ تن برای سرب، ۱۳۵۰۰۰۰ تن برای روی، رسیده است (نادری و همکاران ۱۳۹۱). سرب یکی از مهمترین و پرکاربردترین فلزات سنگین می‌باشد که دامنه‌ی غلظت معمول آن در خاک بین ۳۰۰-۲ mg kg^{-1} و غلظت بحرانی آن در خاک بین ۴۰۰-۱۰۰ mg kg^{-1} می‌باشد که بسته به ویژگی‌های خاک تغییر می‌کنند (به نقل از اولزوی و همکاران ۱۹۹۵).

ریزجانداران نقش مهمی در حذف فلزات سنگین از خاک و آب دارند. البته حذف فلزات سنگین از محیط‌های آبی راحت‌تر از محیط‌های خاکی است. در این راستا گونه‌های میکروبی متعددی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. اما قارچ‌ها به دلیل ماهیت دیواره‌ی سلولی تمایل بیشتری به اتصال با یون‌های فلزات سنگین دارند و می‌توانند فلزات را توسط مکانیسم‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی انباشته نمایند (شازیا و همکاران ۲۰۱۳). همچنین به دلیل اینکه سهم زیست توده‌ی قارچ‌ها از کل زیست توده‌ی خاک بیشتر است، به نظر می‌رسد که استفاده از قارچ‌های ساپروفیت برای حذف یا نامتحرک کردن فلزات

سنگین بتواند راه‌حل مناسبی باشد. با توجه به زیست‌توده‌ی حداکثر، قارچها می‌توانند میزان بیشتری از فلزات را جذب نمایند و وقتی در معرض فلزات سنگین قرار می‌گیرند از بین نمی‌روند و در طول دوره‌ی رشد گیاه، به رشد خود ادامه می‌دهند. IC_{50} غلظتی از بازدارنده می‌باشد که در آن، رشد زیست‌توده‌ی قارچی به نصف حداکثر (شاهد بدون بازدارنده) رسیده باشد (ازهوری و همکاران ۲۰۰۹). با توجه خطر سرب در اکوسیستم خاک، در این مطالعه قارچهای مقاوم به سرب از خاکهای آلوده ی اطراف معدن انگوران زنجان جداسازی و IC_{50} آنها تعیین گردید.

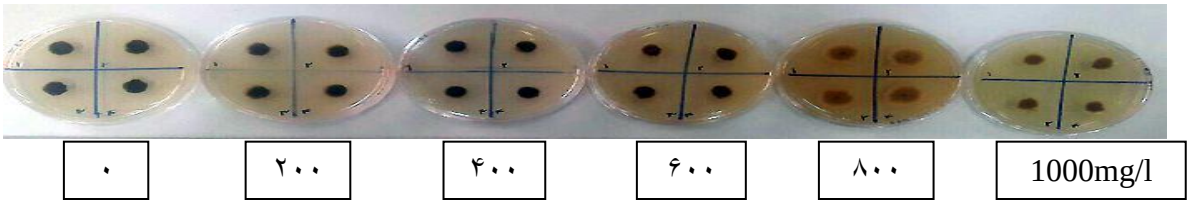
مواد و روش‌ها:

جمع‌آوری نمونه‌ها و جداسازی قارچها

نمونه‌های خاک از لایه‌ی سطحی (۳۰cm -۰) خاک‌های آلوده به فلزات سنگین، از اطراف کارخانه‌ی سرب و روی زنجان جمع‌آوری شد و تا زمان جداسازی قارچها، درون یخچال در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. سپس برای جداسازی گونه‌های قارچی از روش " سری رقت[1] "، در محیط کشت MEA[2] حاوی Malt extract ۲۰ گرم، Dextrose ۲۰ گرم، Agar ۱۵ گرم و Peptone ۶ گرم به ازای یک لیتر استفاده شد (وارکوپ و همکاران ۱۹۵۰).

سنجش تحمّل به سرب در گونه‌های قارچی (IC_{50})

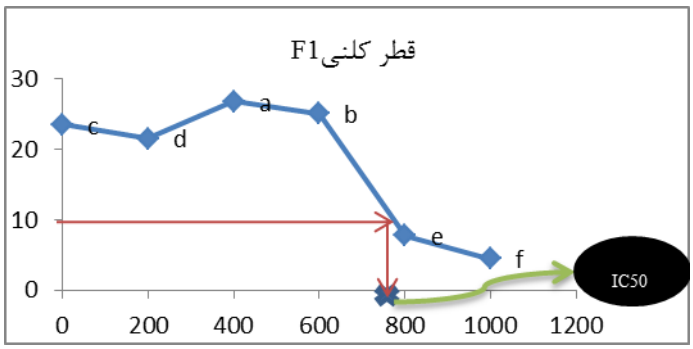
محیط‌کشت[3] SDA حاوی Dextrose ۴۰ گرم، Peptone ۱۰گرم،Agar ۱۵ گرم به ازای یک لیتر، با سطوح صفر، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سرب از منبع نیترات سرب، با چهار تکرار آماده گردید. یکسان‌سازی غلظت نیترات در تیمارها با استفاده از نیترات سدیم انجام گرفت. سپس جدایه‌های قارچی، با روش کشت نقطه‌ای در پلیت‌ها کشت شدند و در داخل انکوباتور در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. معیار برداشت، حداکثر رشد هر چهار کلنی کشت شده در داخل پتری شاهد (بدون سرب) بود. بعد از رسیدن به این مرحله از رشد که تقریبا چهار روز طول کشید، قطر هر چهار کلنی با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری و ثبت شد (شکل ۱) .



شکل۱ – روند رشد قطر کلنی *Cladosporium(F10)* تحت تاثیر سرب

برای تعیین IC50، بعد از برداشت کلنی‌ها، نمودار مربوط به تاثیر سطوح سرب بر روی قطر کلنی رسم می‌گردد. نصف طول قطر کلنی در شاهد را با متصل کردن به نمودار، به صورت عمود بر روی محور افقی متصل می‌نماییم. نقطه‌ی به دست آمده غلظت ۵۰ درصد بازدارندگی خواهد بود (مطابق نمودار۱- این نمودار تنها به عنوان یک مثال جهت نشان دادن نحوه تعیین این پارامتر است).

2-Serial dilution
3-Malt extract dextrose agar
4- Sabouraud dextrose agar



نمودار ۱- تعیین IC_{50} در قارچ ***Aspergillus sp.*** **(F1)**

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان میدهد که اثر ایزوله‌ی قارچ، اثر غلظت سرب و اثرات متقابل آن دو بر رشد قارچ در سطح احتمال یک درصد معنی دار است.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر ایزوله های قارچی و غلظت سرب بر رشد قارچ

منابع تغییرات	درجه‌ی آزادی	میانگین مربعات
قارچ	۱۰	**۱۱۴۸/۵۰۱
سطوح سرب	۵	**۲۹۳۱/۶۱۸
قارچ * سطوح سرب	۵۰	**۱۳۰/۲۱۵
خطا	۱۹۸	**۲/۳۷۷

**معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

جدول ۲- قطر کلنی قارچها در غلظت‌های مختلف سرب بر حسب mg/l و تعیین IC_{50}

غلظت سرب بر حسب mg/l	صفر	۲۰۰	۴۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰	IC_{50}
اسم قارچ	قطر کلنی (mm)						
Aspergillus sp.(F1)	۲۳/۵^{c}	۲۱/۵^{d}	۲۶/۷۵^{a}	۲۵^{b}	۷/۷۵^{e}	۴/۵^{f}	mgL^{-1} ۷۰۰-۸۰۰
Aspergillus sp.(F۲)	۳۸/۷۵^{a}	۳۶/۲۵^{b}	۳۶/۷۵^{b}	۳۴^{c}	13/25^{d}	۹/۵^{e}	mgL^{-1} ۷۰۰-۸۰۰
Aspergillus sp.(F۳)	۳۶/۲۵^{a}	۳۶/۲۵^{a}	37/25^{a}	۳۶/۲۵^{a}	۱۶^{b}	۱۰/۲۵^{c}	mgL^{-1} ۷۰۰-۸۰۰
Aspergillus sp.(F۴)	۳۷/۷۵^{a}	۳۷^{a}	۳۶/۲۵^{b}	۳۴/۲۵^{b}	۱۳/۵^{c}	۱۰^{d}	mgL^{-1} ۷۰۰-۸۰۰
Aspergillus sp.(F۵)	۳۹/۵^{a}	۳۷/۲۵^{b}	۳۸/۲۵^{b}	۳۶/۵^{b}	۱۴/۷۵^{c}	۱۱/۵^{d}	mgL^{-1} ۷۰۰-۸۰۰
Aspergillus sp.(F۶)	۳۵^{b}	۳۶/۵^{a}	۳۲/۵^{b}	۳۴/۷۵^{b}	۱۱/۵^{c}	۹^{c}	mgL^{-1} ۷۰۰-۸۰۰
Aspergillus sp.(F۷)	۳۳/۷۵^{c}	۳۰/۷۵^{c}	۳۵^{b}	۳۶/۲۵^{a}	۳۲/۷۵^{c}	۲۷^{d}	قابل محاسبه نبود.
Muocor (F8)	۲۹/۵^{a}	۲۷^{b}	۲۶^{c}	۲۵^{c}	۱۴/۷۵^{d}	۴/۵^{e}	mgL^{-1} ۸۰۰-۹۰۰
Trichoderma (F9)	۲۳/۷۵^{a}	۳۰/۵^{a}	۳۱/۵^{a}	۲۸/۷۵^{a}	۲۹/۲۵^{a}	۲۳/۱۲^{b}	قابل محاسبه نبود.
Cladosporium (F10)	۹/۵^{b}	۸^{c}	۹/۵^{b}	9/5^{b}	۱۷/۲۵^{a}	۷/۷۵^{c}	قابل محاسبه نبود.
Cladosporium (F11)	۱۸/۵^{b}	۱۹/۵^{a}	۱۹^{a}	۱۷^{b}	۲۰/۲۵^{a}	۵/۷۵^{c}	mgL^{-1} ۹۰۰-۱۰۰۰

مطابق جدول ۲ رشد قارچ‌هایF1، F2، F3، F4، F5، F6، F7، F8 و F9 ازغلظت $mg\ L^{-1}$ ۰ تا ۶۰۰ کاهش یافته یا افزایش قابل توجهی نداشته و تمامی کلنی‌ها در یک بازه‌ی معینی رشد کردند. در غلظت‌های$mg\ L^{-1}$ ۱۰۰۰ و ۸۰۰ به شدت قطر کلنی‌ها کاهش یافت. در قارچ‌های F10 و F11، کلنی‌ها از غلظت‌های ۰ تا ۶۰۰ کمترین رشد را نسبت به غلظت‌های بالا داشت که نشان‌دهنده‌ی تحمل آن‌ها در غلظت‌های بالای سرب و موثر بودن آنها در زیست‌پالایی می باشد. بالاتر بودن میزان IC_{50} در ایزوله های قارچی مورد مطالعه به علت توان رشد آنها در غلظت های بالا می باشد.

در زیست‌پالایی بایستی گونه‌ای از این قارچ‌ها مورد استفاده قرار گیرد که هم IC_{50} آن بالا باشد و هم توانایی جذب بالایی داشته باشد. ایزوله‌های قارچی بررسی شده در این مطالعه نشان می‌دهد که قارچ F11 با IC_{50} بالا بیشتر مدنظر هست. میزان IC_{50} قارچ‌های F10، F11 و F7 در این محدوده از سرب مشخص نشد(جدول ۲). در تحقیقات بعدی می‌توان با افزایش غلظت سرب، رشد کلنی آنها را تا حد ممکن کاهش داد تا IC_{50} قابل محاسبه شود.

منابع

کرباسی م، کرباسی ا، صارمی ع و قربانی‌زاده خرازی ح، ۱۳۸۹. بررسی غلظت عناصر سنگین در منابع تأمین کننده آب شرب شهرستان الشتر در سال ۱۳۸۸. فصلنامه علمی ـ پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان. جلد ۱۲، شماره ۱، صفحات ۶۵ تا ۶۹.

نادری م، دانش‌شهرکی ع و نادری ر، ۱۳۹۱. مروری بر گیاه‌پالایی خاک‌های آلوده به فلزات سنگین. فصلنامه انسان و محیط‌زیست، شماره ۲۳، صفحات۳۶ تا ۴۷.

Dixit R., Wasiullah M, Malaviya D., Pandiyan K., Singh U., Sahu A., Shukla R., Singh B., Rai J., Sharma P., Lade H. and Paul D., 2015. Bioremediation of heavy metals from soil and aquatic environment: An overview of principles and criteria of fundamental processes. Sustainability. 7: 2189-2212.

Ezzouhri L., Castro E., Moya M., Espinol F. and Lairini K., 2009. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African Journal of Microbiology. 3(2):035-048.

Olszowy H., Torr P. and Imary P. ,1995. Trace element concentration in soils from rural and urban areas of Australia. Concentration Sites Monograph Series 4. South Australian Health Commission , Adelaide.

Shazia I., Uzma, SadiaG. And Talat A., 2013. Bioremediation of heavy metals using isolates of filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* collected from polluted soil of Kasur, Pakistan. International Research Journal of Biological Sciences. 2(12):66-73.

Warcup J.H., 1950. The soil plate method for isolation of fungi from soil. Nature. 166: 117-118.

Determination of IC_{50} for Pb in some fungi isolated from polluted soils of Anguran mining of Zanjan

Sh. Mohammadpoor [1], N. Aliashgarzad [2],Sh. Oustan[2], and M. Arzanlou[3]

1and 2- M.Sc. Student and Professor of Soil Biology and Biotechnology, Department of Soil Science, University of Tabriz, 3- Associate professor of Plant Protection, University of Tabriz

Abstract

In this study, soil samples were taken from polluted soils of Anguran Pb and Zn mining, Zanjan. Some saprophytic fungi were isolated and selected according to their dominance and growth rate. The tolerance of isolates was evaluated against the Pb levels of 0, 200, 400, 600, 800, 1000 mg/l as lead nitrate, under in vitro conditions. The growth of seven isolates *Aspergillus sp.*، one isolate of *Muocor*، one isolate of *Trichoderma* did not affect significantly at Pb range of 0 to 600 $mg\ L^{-1}$. But a marked colony diameter decrease was seen at high concentration. Two isolates of *Cladosporium* had the lowest growth at 0 to 600 $mg\ L^{-1}$ than higher concentrations, indicating their higher tolerance to Pb. According to the results, fungal have high IC_{50} indicates the tolerance of this fungal is toxic lead.

Keyword: Saprophyte fungi, IC_{50}, pb.