

Isolation and Identification of *Trichoderma* Isolates from Soils Contaminated with Cd, Pb and Zn and Evaluation of Their Characteristics and Pollutants Bioaccumulation

Intisar Marzoog Hussein¹, MirHassan Rasouli-Sadaghiani^{1*}, Mohsen Barin¹, Muhsen Abed Ali Almousawy², Salar Rezapour¹

(Received: February, 2025

Accepted: June 2023)

Abstract

The contamination of agricultural soils with heavy metals, caused by excessive use of chemical fertilizers and polluted water sources, poses a significant challenge to environmental sustainability and agricultural productivity. Heavy metals such as lead, cadmium, and zinc not only reduce the quality of agricultural products but also present a serious threat to ecosystems and biodiversity. In this context, the fungus *Trichoderma* has been identified as an effective microorganism for absorbing heavy metals and mitigating their toxicity. This study aims to isolate and molecularly characterize *Trichoderma* isolates and evaluate their effectiveness in the bioremediation of heavy metals in contaminated soils, using advanced molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) to analyze the genetic structure and biological performance of these isolates. The results showed that 45%, 38%, 12%, and 8% of the isolates belonged to the species *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, and *T. brevicompactum*, respectively. For fungal species, Zn and Cd showed the highest and lowest toxicity, respectively. The Maximum inhibitory concentration (MIC) was observed at a concentration of 500 mg L⁻¹ for the species *T. longibrachiatum*. This research confirms the significant impact of *T. longibrachiatum* in absorbing and reducing cadmium, lead, and zinc concentrations in media. The highest percentage accumulation was observed at contamination levels of 50 mg L⁻¹, with the greatest biosorption at a concentration of 500 mg l⁻¹, where cadmium showed the highest percentage of biological absorption. Therefore, *Trichoderma* spp. fungal isolates could play a crucial role in improving the bioremediation of heavy metal pollutants.

Keywords: Soil contamination, Bioaccumulation, PCR, *Trichoderma*

Marzoog Hussein I., Rasouli-Sadaghiani M.H., Barin M., Abed Ali Almousawy M., Rezapour S. 2026. Isolation and identification of *Trichoderma* isolates from soils contaminated with Cd, Pb and Zn and evaluation of their characteristics and pollutants bioaccumulation. *Applied Soil Research*, 13(4): 1-20.

1. Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University.

2. Department of Plant protection Science, Faculty of Agriculture ,Karbala University, Karbala

* Corresponding Author Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

جداسازی و شناسایی جدایه‌های تریکودرما از خاکهای آلوده و ارزیابی تجمع زیستی عناصر سنگین Zn و Pb، Cd توسط آنها

انتصار مرزوک حسین^۱، میرحسن رسولی صدقیانی^{۱*}، محسن برین^۱، محسن عابد علی موسوی^۲، سالار رضاپور^۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۲۵

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۴

چکیده

آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین، ناشی از استفاده بی‌رویه کودهای شیمیایی و منابع آبی آلوده، به عنوان یک چالش جدی برای محیط زیست و کشاورزی مطرح است. این عناصر مانند سرب (Pb)، کادمیوم (Cd) و روی (Zn)، نه تنها کیفیت محصولات کشاورزی را کاهش می‌دهند، بلکه یک تهدید جدی برای اکوسیستم و تنوع زیستی محسوب می‌شوند. در این زمینه، قارچ تریکودرما به عنوان یک میکروارگانیسم مؤثر در جذب فلزات سنگین و کاهش اثر سمیت آنها شناخته شده است. پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچ تریکودرما و ارزیابی کارایی آنها در زیست‌پالایی سرب، کادمیوم و روی در خاک‌های آلوده انجام گردید. شناسایی جدایه‌ها از طریق بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و تحلیل فیلوژنتیکی توالی ناحیه ITS انجام گرفت. تجمع زیستی آلاینده‌های مورد مطالعه و تاثیر جدایه‌های قارچی در کاهش اثرات سمی عناصر سنگین در غلظتهای ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر ارزیابی گردید. نتایج نشان داد ۴۵، ۳۸، ۱۲ و ۸ درصد از جدایه‌ها به ترتیب متعلق به گونه‌های *T. longibrachiatum*، *T. harzianum*، *T. virens* و *T. brevicompactum* بودند. برای گونه‌های قارچی، Zn و Cd بترتیب بالاترین و پایین‌ترین سمیت را نشان دادند. بالاترین غلظت بازدارنده (MIC) در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر و برای گونه *T. longibrachiatum* مشاهده گردید. طبق نتایج این تحقیق گونه *T. longibrachiatum* در تجمع زیستی و کاهش غلظت Pb، Cd و Zn در محیط آلوده نقش چشمگیری داشت. بیشترین درصد تجمع زیستی عناصر سنگین در سطوح آلودگی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و بالاترین تجمع زیستی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد و کادمیوم بیشترین درصد تجمع زیستی را به خود اختصاص داد. بنابراین، جدایه‌های قارچی *Trichoderma spp* می‌توانند نقش مهمی در تجمع زیستی آلودگی‌های ناشی از Zn، Cd، Pb و Zn ایفا نمایند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی خاک، تجمع زیستی، PCR، تریکودرما

مرزوک حسین^۱، رسولی صدقیانی م.ح.، برین م.، عابد علی موسوی م.، رضاپور س. ۱۴۰۴. جداسازی و شناسایی جدایه‌های تریکودرما از خاکهای آلوده و ارزیابی تجمع زیستی عناصر سنگین Zn و Pb، Cd توسط آنها. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۱۳، شماره ۴. صفحه ۱-۲۰.

۱- گروه علوم خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۲- گروه حفظ نباتات، دانشگاه کرمان، کرمان، کرمان، کرمان

* پست الکترونیک: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir

مقدمه

آلودگی خاک‌های کشاورزی به فلزات سنگین یکی از مسائل بحرانی و چالش‌برانگیز در حوزه محیط زیست و کشاورزی مدرن است. این پدیده به ویژه در مناطق صنعتی و کشاورزی، ناشی از استفاده مفرط از کودهای شیمیایی و آبیاری با منابع آب آلوده است (Tudi, et al, 2021). فلزات سنگین مانند سرب، کادمیوم و روی به دلیل پایداری بالا در محیط زیست، به راحتی در خاک تجمع یافته و از طریق زنجیره غذایی وارد چرخه غذایی انسان می‌شوند. مطالعات نشان می‌دهند غلظت بالای فلزات سنگین در خاک، نه تنها کیفیت محصولات کشاورزی را کاهش می‌دهد، بلکه به طور مستقیم بر سلامت اکوسیستم‌ها و تنوع زیستی موجودات زنده نیز تاثیر مخرب دارد. از این رو این عامل یک تهدیدی جدی برای پایداری محیط زیست و سلامت موجودات زنده به شمار می‌آید (Vardhan et al, 2019). در راستای مقابله با این چالش، روش‌های مختلفی برای کاهش آلودگی خاک توسط عناصر سنگین مورد بررسی قرار گرفته‌اند. انتخاب روش‌های کارآمد، مقرون به صرفه، سریع و سازگار با محیط زیست برای کاهش غلظت و تحرک فلزات سنگین در خاک‌ها، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. یکی از رویکردهای نوین و مؤثر، استفاده از تکنیک‌های زیست‌پالایی، شامل کاربرد میکروارگانیسم‌ها و گیاهان برای حذف یا تثبیت فلزات سنگین از خاک می‌باشد (Ojha et al., 2023). این روش‌ها به دلیل سازگاری با محیط زیست و هزینه‌های کمتر نسبت به روش‌های فیزیکی و شیمیایی، مورد توجه قرار گرفته است. زیست‌پالایی با استفاده از میکروارگانیسم‌های خاک نظیر قارچ‌ها، باکتری‌ها و جلبک‌ها، به عنوان یکی از موثرترین روش‌های حذف آلاینده‌های محیطی مورد توجه قرار گرفته است (Sharma et al., 2024). قارچ تریکودرما به عنوان یک میکروارگانیسم کارآمد خاکی، توانایی‌های ویژه‌ای در تجزیه مواد آلی پیچیده و فلزات سنگین دارد. تریکودرما سرده‌ای از قارچ‌های رشته‌ای خاک‌زی و تله مورف دار متعلق به راسته *Hypocreales* از بخش *Ascomycota* است. جنس *Trichoderma* از نظر ژنتیکی بسیار متنوع است و دارای قابلیت‌های زیاد در بین سویه‌های مختلف با اهمیت کشاورزی و صنعتی است (Azevedo et al. 2000; Chulalaksananukul 2008; Ahamed & Vermette 2009; Lorito et al. 2010). این قارچ غیر بیماری‌زا و

همزیست با ریشه گیاهان است که به وفور در بسیاری از خاک‌های کشاورزی یافت می‌شود (Kaewchai et al., 2009). تریکودرما از طریق تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک و اکسیدورداکتاز، قادر به تجزیه و معدنی‌سازی مواد آلی و همچنین جذب و رسوب‌گذاری فلزات سنگین است و می‌تواند به عنوان یک روش زیستی مؤثر برای کاهش آلودگی خاک‌ها به فلزات سنگین استفاده شود (Gautam & Naraian., 2020). قارچ تریکودرما یکی از میکروارگانیسم‌های مؤثر در بهبود ساختار خاک و ارتقای کیفیت آن است. نقش آن در تحکیم خاکدانه‌ها و افزایش پایداری ساختاری خاک، به‌ویژه زمانی که در ترکیب با بقایای آلی مانند کود گاوی یا کاه و کلش گندم استفاده شود، برجسته‌تر می‌شود. این ترکیب نه تنها موجب بهبود تجمع ذرات خاک و افزایش پایداری آنها در برابر فرسایش می‌شود، بلکه فعالیت میکروبی و مقدار کربن آلی را نیز بهبود می‌بخشد. تحقیقات نشان داده‌اند که مایه‌زنی خاک با تریکودرما می‌تواند تاثیر مثبتی بر پویایی ماده آلی و افزایش حاصلخیزی خاک داشته باشد، اما شدت این تاثیر بسته به بافت خاک و نوع بقایای آلی مورد استفاده متغیر است (Nasiri et al., 2025). این قارچ همچنین توانایی قابل توجهی در حل فسفات‌های معدنی و کاهش pH محیط دارد. این فرآیند از طریق ترشح اسیدهای آلی و ایجاد تغییرات شیمیایی در خاک صورت می‌گیرد (Ebrahimi et al., 2016). Li و همکاران (Li et al., 2016) نشان داد، استفاده از برخی قارچ‌ها می‌تواند سمیت فلزات را کاهش دهد و باعث افزایش رشد گیاهان شود. همچنین، مظلومی و همکاران (Mazlumi et al., 2015) نشان دادند، بهره‌گیری از گونه‌های مختلف قارچ‌های تریکودرما می‌تواند به عنوان یک عامل مهم در کاهش اثرات سمی فلزات محسوب شود. همچنین کاپور و ویراگاو (Kapoor & Viraraghavan., 1995) جذب زیستی فلزات سنگین توسط قارچ‌ها را به عنوان یک گزینه تصفیه جایگزین برای فاضلاب حاوی فلزات سنگین گزارش کرده‌اند. برخی از گونه‌های این قارچ توانایی بقا در غلظت‌های بالای فلزات سنگین را دارند و بنابراین می‌توان از آنها برای پاکسازی خاک‌های آلوده به این عناصر استفاده کرد (Anand et al., 2006). از این رو پژوهش حاضر در جهت جداسازی و شناسایی مولکولی جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما از خاک‌های آلوده به فلزات سنگین کادمیوم

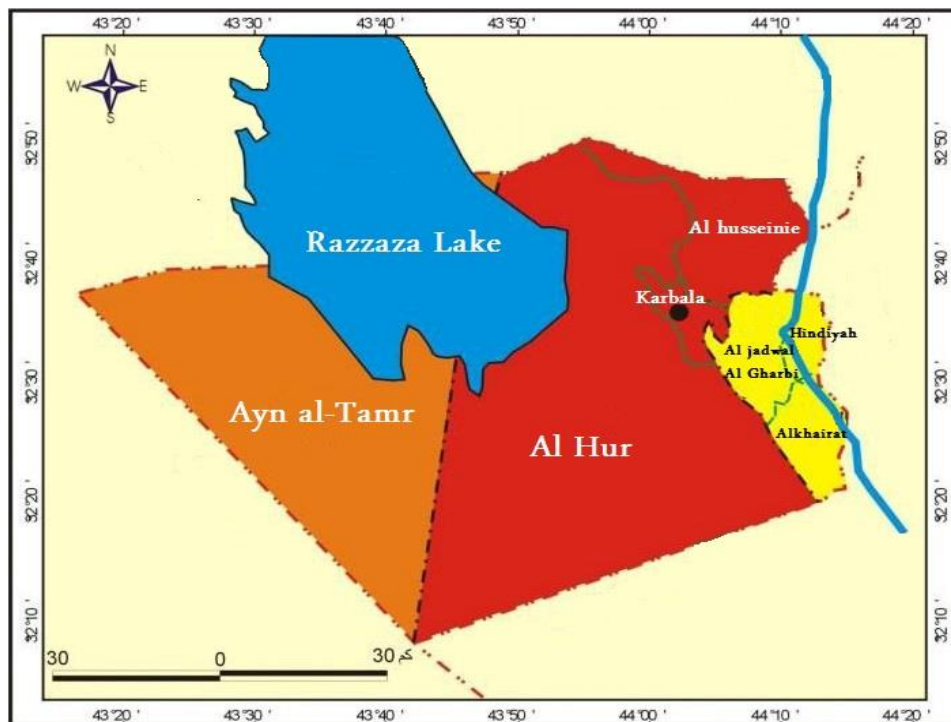
کربلا در عراق انجام شد. تعداد ۷۰ نمونه خاک به صورت تصادفی تا عمق ۱۵ سانتی‌متری خاک نمونه‌برداری شد (شکل ۱ و جدول ۱). نمونه‌های خاک پس از وارد کردن تاریخ، محل جمع‌آوری و کد نمونه، داخل کیسه‌های پلی اتیلنی برای مطالعات بیشتر به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش و نیز میزان عناصر سنگین موجود در خاک به ترتیب در جدول ۲ نشان داده شده است.

(Cd)، سرب (Pb) و روی (Zn) و ارزیابی قابلیت تجمع زیستی در قارچ تریکودرما با بهره‌گیری از روش‌های مولکولی پیشرفته نظیر PCR، به تحلیل ساختار ژنتیکی و عملکرد زیستی این جدایه‌ها طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری خاک

به منظور دستیابی به جدایه‌های قارچ تریکودرما، نمونه‌برداری از مناطق آلوده به فلزات سنگین در استان



شکل ۱- محل نمونه برداری خاک مورد مطالعه در کشور عراق
Figure 1. The soil sampling location used in the experiment in Iraq.

جدول ۱- اطلاعات مربوط به منطقه نمونه‌برداری خاک مورد استفاده در آزمایش
Table 1. Information on the Soil Sampling Area Used in the Experiment

sample	The name of the region	Number of soil samples	Distance from the road (meter)	Distance from each sample (meter)
1	Western Table Area	6	50	5 km
2	Al-Khairat Area	6	50	5 km
3	Al-Hussainiya Area	6	50	5 km
4	Al-Hur Area	6	50	5 km
5	Al-Najaf Road Area	6	50	5 km
	Total	30		

جدول ۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش

Table 2. Some Physical and Chemical Properties of Soil Used in the Experiment

Soil Property	unit	Number of			Domain	Min	Max
		samples	average				
pH							
EC	-	30	8.25	0.87	7.90	8.77	
CaCO ₃	dS m ⁻¹	30	3.36	18.68	0.21	18.90	
Organic carbon	%	30	41.93	35	22.50	57.50	
Organic matter	%	30	0.86	1.94	0.13	2.07	
Clay	%	30	1.48	3.34	0.22	3.56	
Silt	%	30	29.98	44.59	10.83	55.42	
Sand	%	30	37.83	40	17.50	57.50	
Lead	(mg kg ⁻¹)	30	32.18	58.33	9.17	67.50	
Cadmium	(mg kg ⁻¹)	30	47.16	29.02	32.96	62	
Zinc	(mg kg ⁻¹)	30	2.26	2.05	1.47	3.52	
			57.35	21.60	48.02	69.63	

نگهداری و رشد پرگنه قارچ، مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که برای بررسی‌های آزمایشگاهی مختلف، از جمله مطالعات ریخت‌شناسی تشخیصی و کنترل بیولوژیکی، خلوص ژنتیکی جدایه‌ها ضروری است، تمامی جدایه‌ها به روش نوک ریشه و سپس تک‌هاگ (single spore) خالص‌سازی شده و جدایه‌های خالص‌شده به لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA (Potato dextrose agar) منتقل و پس از رشد، برای مطالعات بیشتر در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به این ترتیب، ۷۰ جدایه از ۷۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از پنج منطقه مختلف عراق جداسازی و خالص‌سازی گردید (Liu et al., 2020).

جداسازی، خالص‌سازی و تکثیر قارچ

جدایه‌های قارچ *Trichoderma* از طریق تهیه رقت‌های مکرر یا Serial Dilution و با استفاده از محیط کشت انتخابی داوه (Davet) جدا شدند (Davet & Rouxel, 2000). بدین منظور، ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شده و سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد. با افزودن یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون ۱۰^{-۱} به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، رقت ۱۰^{-۲} سوسپانسیون خاک حاصل و سپس ۰/۳ میلی‌لیتر از هر رقت به طور یک‌نواخت روی سطوح محیط کشت داوه منتقل شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد

جدول ۳- اجزای محیط کشت‌های مورد استفاده در این تحقیق

Table 3. Components of culture media used in this study

Constituents	(g L ⁻¹)	Constituents	Constituents	(g L ⁻¹)	(g L ⁻¹)
Potato	300	Ca(NO ₃) ₂	KH ₂ PO ₄	1	0.125
C ₆ H ₁₂ O ₆	20	CaCl ₂	C ₆ H ₈ O ₇	1	0.05
Agar	16	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	Agar	2	25
NPX	0.1	KNO ₃		0.25	
Ampicillin	0.5	MgSO ₄		0.25	

شدند و DNA از میسلیم‌های برداشت‌شده، با روش CTAB استخراج گردید (Murray, et al 1980). تکثیر ناحیه ITS با استفاده از پرایمرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') در واکنش‌های PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix 2X، ۰/۴ میکرومولار از هر

شناسایی مولکولی

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچ تریکودرما شامل مراحل کشت قارچ، استخراج DNA، تکثیر ناحیه ITS (Internal transcribed spacers) از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، الکتروفورز محصولات PCR، خالص‌سازی، تعیین توالی و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی بود. ابتدا، جدایه‌ها در محیط کشت PDA (Potato dextrose agar) رشد داده

شرایط مختلف مورد بررسی بیشتری قرار گیرد (Kapoor & Viraraghavan., 1997).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

حداقل غلظت بازدارنده رشد جدایه‌های قارچی، به عنوان پایین‌ترین غلظتی از فلزات سنگین تعریف می‌شود که مانع رشد جدایه‌ها می‌گردد. در این آزمایش، ابتدا محیط کشت جامد PDA تهیه و غلظت‌های مختلفی از فلزات سنگین (۵ تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به آن افزوده شد. سپس، جدایه‌های قارچی با جمعیتی مشخص از هاگ‌ها (6×10^6 هاگ در هر میلی‌لیتر) در محیط کشت تلقیح شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴ تا ۷ روز در انکوباتور نگهداری شدند. این مطالعه با سه تکرار انجام گرفت و حداقل غلظت بازدارنده رشد، بر اساس مشاهده رشد جدایه‌ها در محیط‌های کشت حاوی فلزات سنگین تعیین گردید (Iream et al., 2009).

ارزیابی جذب و تجمع زیستی

برای تهیه تلقیح از قارچ‌های انتخابی، ابتدا این قارچ‌ها در محیط کشت جامد PDA کشت شدند. پس از رشد، قارچ‌ها به صورت سوسپانسیون همگن تهیه شدند و ۱ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت فلزات سنگین شامل روی، کادمیوم و سرب با غلظت‌های (Zn (0, 100, 500, 750, 1500 ppm) و Cd (0, 50, 100, 300, 500, 800 ppm) و (0, 50, 100,) و Pb (300, 500, 800 ppm) این ارلن‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در شیکر-انکوباتور نگهداری شدند. پس از پایان دوره انکوباسیون، غلظت فلزات با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. مقدار جذب فلزات روی، کادمیوم و سرب در حالت تعادل با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید (Sharma et al., 2020)

$$Q = \frac{v(C_0 - C_f)}{M}$$

وزن خشک بر حسب (mg/kg) جذب عنصر Q (زیست‌توده قارچ)

(mg/l) غلظت اولیه و ثانویه فلز = C_0 و C_f

(g) وزن زیست‌توده خشک قارچ = M

پرایمر، حدود ۲۰ نانوگرم DNA و مقدار مناسب آب مقطر سترون بود. برنامه دمایی PCR شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۳۶ چرخه (هر چرخه شامل ۱ دقیقه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه بود. بررسی تکثیر یا عدم تکثیر محصولات PCR و کیفیت آنها از طریق الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در بافر TBE (-Tris borate-EDTA) انجام گرفت. خالص‌سازی و توالی‌یابی قطعات DNA تکثیر شده، با استفاده از پرایمرهای مورد استفاده در PCR و توسط شرکت Macrogen (کره جنوبی) انجام شد. برای شناسایی اولیه جدایه‌ها، توالی‌ها از طریق جستجوی (Basic Local Alignment Search) BLAST (National Centre for Biotechnology Information) در پایگاه اطلاعاتی (NCBI) در پایگاه اطلاعاتی (Biotechnology Information) مقایسه شدند و توالی‌های مرجع گونه‌های *Trichoderma* از همان پایگاه دریافت گردید. سپس توالی‌های جدایه‌ها به همراه توالی‌های مرجع با استفاده از نرم‌افزار BLAST هم‌ردیف (Align) شدند. روابط فیلوژنتیکی جدایه‌ها از طریق ترسیم درخت فیلوژنتیک با روش Neigh-joining و با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap، مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی تحمل و تجمع فلزات سنگین در جدایه‌های تریکودرما

جهت بررسی تحمل و تجمع فلزات سنگین در جدایه‌های تریکودرما، آزمایش‌هایی بر روی جدایه‌های انتخابی قارچ تریکودرما انجام شد. در این مطالعه، هر یک از جدایه‌ها به صورت مجزا در معرض غلظت‌های مختلف فلزات سنگین شامل کادمیوم (Cd)، سرب (Pb) و روی (Zn) قرار گرفتند. ابتدا، میزان رشد قارچ‌ها بر روی محیط جامد PDA با غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر مورد ارزیابی قرار گرفت و یا رشد زیست‌توده قارچی سنجیده شد. پس از این مرحله، میزان جذب فلز توسط هر یک از جدایه‌ها و همچنین غلظت آستانه تحمل آن‌ها با استفاده از دستگاه جذب اتمی اندازه‌گیری شد. در نهایت، جدایه‌هایی که بیشترین مقاومت را در برابر فلزات سنگین نشان دادند، برای انجام آزمایش‌های تکمیلی انتخاب شدند تا قابلیت آن‌ها در

در مجموع، ۷۰ جدایه تریکودرما از ۷۰ نمونه خاک جمع‌آوری شده از استان کرمان، جداسازی و خالص‌سازی گردید. پس از بررسی اولیه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، ۵۰ جدایه برای توالی‌یابی انتخاب شدند که از این تعداد، به دلیل کیفیت نامناسب توالی‌های دو جدایه، در نهایت توالی‌های ناحیه ITS مربوط به ۴۸ جدایه به‌دست آمد. نتایج حاصل از جستجوی BLAST و تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که این جدایه‌ها به چهار گونه از سه بخش (Clade) مختلف تعلق دارند: *T. harzianum* و *T. virens* از بخش *Longibrachiatum*، و *T. brevicompactum* از بخش *Brevicomactum*. بر اساس ارزیابی‌های ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی، توزیع گونه‌ای جدایه‌ها به این صورت بود: ۴۵٪ *T. harzianum*، ۳۵٪ *T. longibrachiatum*، ۱۲٪ *T. virens* و ۸٪ *T. brevicompactum* (شکل ۲ و ۳).

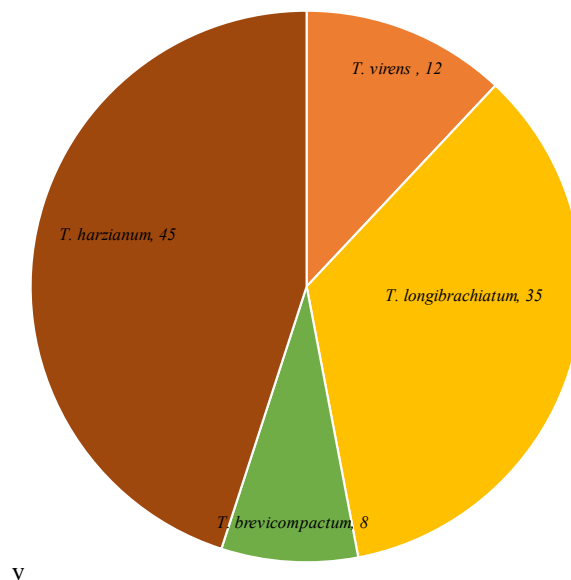
این روش به طور دقیق میزان تجمع زیستی و توانایی جذب فلزات سنگین توسط قارچ‌ها را مشخص می‌کند و می‌تواند به عنوان یک معیار مهم برای ارزیابی کارایی زیست‌پالایی قارچ‌ها مورد استفاده قرار گیرد. درصد نیتروژن کل خاک و فسفر نمونه‌ها به ترتیب از روش کجدال (Kjeldahl, 1883) و روش اولسن (Olsen., 1954) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

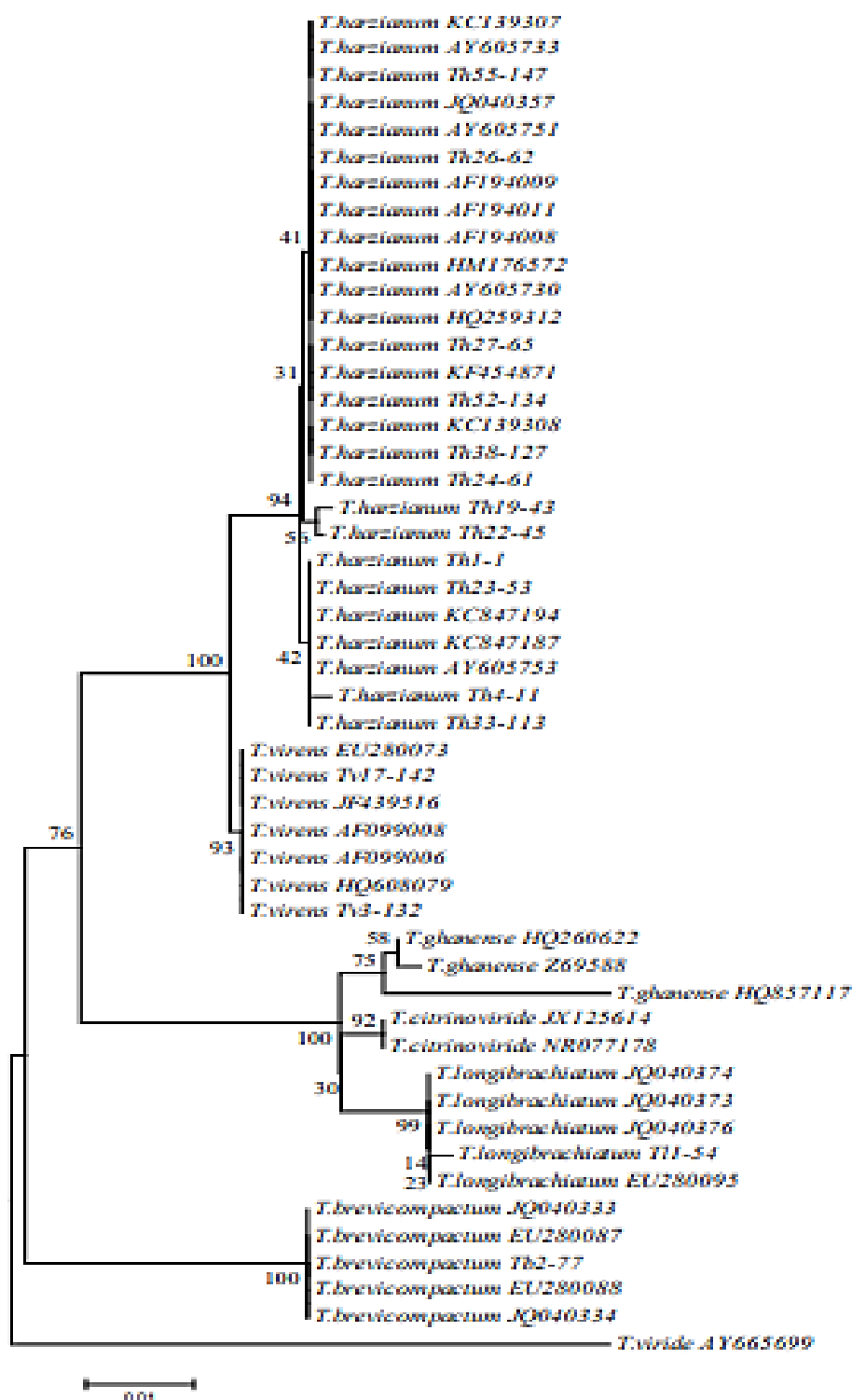
این پژوهش به صورت فاکتوریل و با استفاده از طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام شد. متغیرهای آزمایشی شامل تلقیح میکروبی (تلقیح قارچ و عدم تلقیح) و آلودگی به فلزات سنگین کادمیوم، سرب و روی بودند. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS استفاده گردید که شامل تحلیل واریانس و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ بود. همچنین نمودارها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel ترسیم شدند.

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی قارچ‌ها



شکل ۲- فراوانی گونه‌های *Trichoderma* جداسازی شده در این مطالعه
Figure 2. Frequency of *Trichoderma* species isolated in this stud



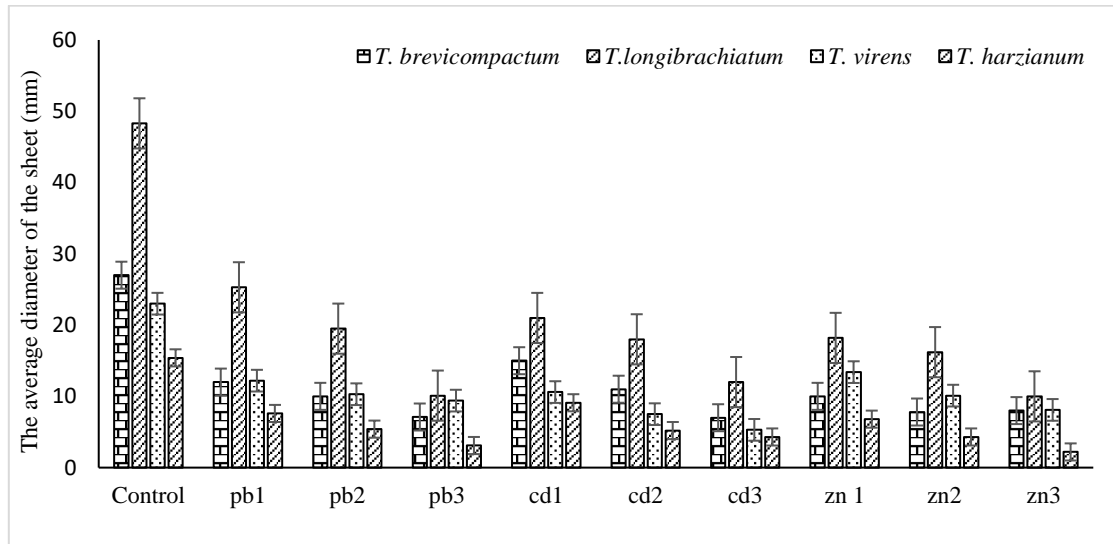
شکل ۳- روابط فیلوژنتیکی بین تعدادی از جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق و با جدایه‌های مرجع تعدادی از گونه‌های *Trichoderma* از بخش‌های *Harzianum*، *Brevicompectum* و *Longibrachiatum* به روش Neighbor-joining. جدایه‌های این تحقیق با کدهای Th (جدایه‌های گونه *Trichoderma harzianum*)، Tl (جدایه‌های گونه *Trichoderma longibrachiatum*)، Tv (جدایه‌های گونه *Trichoderma virens*) و Tb (جدایه‌های گونه *Trichoderma brevicompectum*) مشخص شده‌اند. گونه *T. viride* از بخش *Trichoderma* به عنوان گروه خارجی استفاده شده است.

Figure 3. Phylogenetic relationships between selected isolates obtained in this study and reference isolates of *Trichoderma* species from the *Harzianum*, *Brevicompectum* and *Longibrachiatum* clades, constructed using the Neighbor-joining method. The isolates from this study are coded as follows: Th (*T. harzianum* isolates), Tl (*T. longibrachiatum* isolates), Tv (*T. virens* isolates), and Tb (*T. brevicompectum* isolates). *T. viride* from the *Trichoderma* clade was used as the outgroup.

تأثیر غلظت فلزات سنگین بر رشد گونه‌های قارچی

نتایج آزمایش اثر غلظت فلزات سنگین بر رشد گونه‌های قارچی در شکل ۶ نشان داده شده است (لازم به ذکر است که تنها تیمارهای دارای رشد در نتایج آورده شده است). بر اساس نمودار، گونه *T. longibrachiatum* سریعترین رشد را در بین سه گونه مورد آزمایش داشت و در ۷۲ ساعت اول پس از کاشت بیشترین قطر (۳/۴۸) در این گونه ثبت شد،

در حالی که در همان دوره گونه *T. harzianum* در بین سه گونه مورد آزمایش قرار گرفت. سه گونه مذکور کمترین قطر پارگانا (۴/۱۵) را داشتند. در بین تیمارهایی که رشد قارچ مشاهده شد، غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر سرب کمترین اثر بازدارندگی (۲۵/۳ میلی متر) را بر روی گونه *T. longibrachiatum* و غلظت ۶۰ میلی گرم در لیتر روی بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی گونه *T. harzianum* داشت.



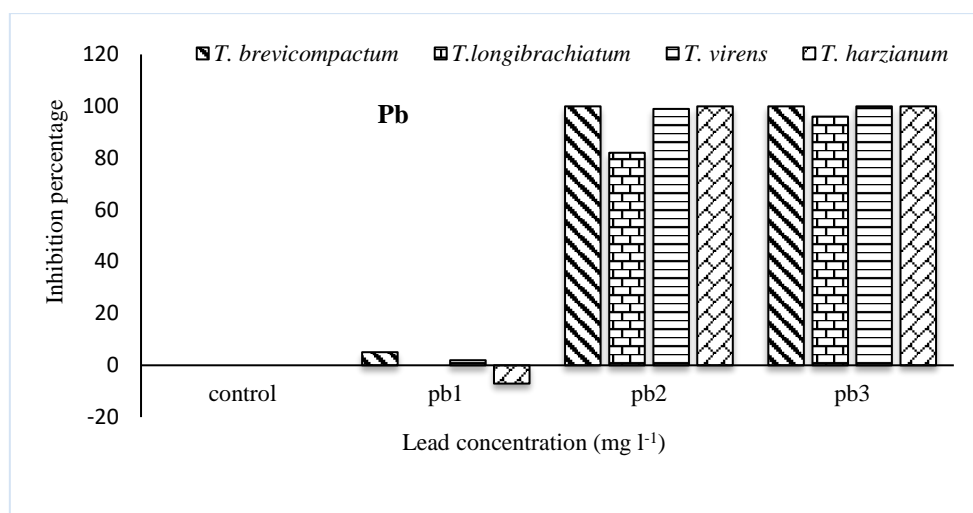
شکل ۴- مقایسه تأثیر سطوح مختلف مس، منگنز و نیکل بر رشد چهار گونه قارچ تریکودرما در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۷۲ ساعت پس از کشت Zn1:50, Zn2:100, Zn3: 500 ppm; Pb1: 50 ppm, Pb2: 100 ppm, Pb3: 500 ppm; Cd1: ppm50, Cd2: ppm100, Cd3: 500ppm

Figure 4. Comparison of the effects of different levels of copper, manganese and nickel on the growth of four species of Trichoderma fungus at 25 degrees Celsius, 72 hours after cultivation Pb1: 50 ppm, Pb2: 100 ppm, Pb3: 500 ppm; cd1: 50 ppm, cd2: 100 ppm, cd3: 500 ppm, Zn1:50, Zn2:100, Zn3: 500 ppm

گونه *T. brevicompactum* داشت. از منظر دیگر، عنصر سرب در سایر غلظت‌های آزمایش شده دارای ۱۰۰٪ اثر بازدارندگی بر روی هر سه گونه قارچی است (به جز غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر که در آن گونه *T. longibrachiatum* امکان رشد ۱۸ درصدی را دارد).

سرب

همانطور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر سرب نه تنها اثر مهاری بر *T. harzianum* نداشت، بلکه رشد آن را هفت درصد افزایش داد. همچنین این عنصر با غلظت فوق بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی



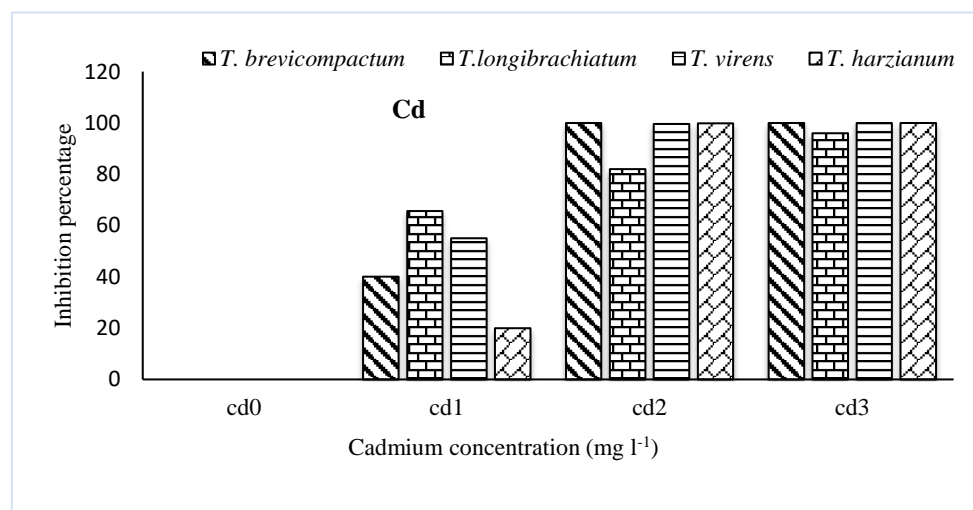
شکل ۵- درصد مهار غلظت‌های مختلف عنصر سرب (Pb3: 500 ppm ,Pb2: 100 ppm ,Pb1: 50 ppm) بر رشد چهار گونه قارچ تریکودرما در ۷۲ ساعت پس از کشت

Figure 5. Inhibition percentage of different concentrations of lead element (Pb1: 50 ppm, Pb2: 100 ppm, Pb3: 500 ppm) on the growth of four Trichoderma species 72 hours after cultivation

بازدارندگی (۰/۶۵/۶) را در *T. longibrachiatum* داشت، در حالی که غلظت ۴۰ میلی گرم در لیتر در بین گونه‌های مورد آزمایش با مقدار ۸۲٪ کمترین میزان بازدارندگی را داشت.

کادمیوم

با توجه به شکل ۸ با مقایسه میزان بازدارندگی عنصر کادمیوم بر روی گونه‌های مورد آزمایش، مشاهده می‌شود که غلظت ۲۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم بیشترین درصد

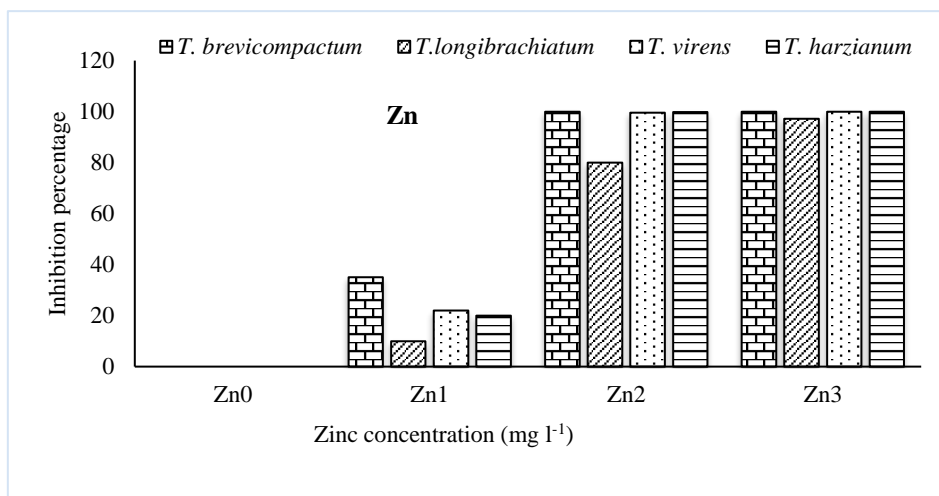


شکل ۶- درصد مهار غلظت‌های مختلف عنصر کادمیوم (Cd3: 500 ppm ,Cd2: 100 ppm , Cd1: 50 ,Cd0: 0 ppm) روی رشد چهار گونه قارچ تریکودرما ۷۲ ساعت پس از کشت.

Figure 6. Graph of inhibition percentage at different concentrations of cadmium element (Cd0: 0 ppm, Cd1: 50 ppm, Cd2: 100 ppm, Cd3: 500 ppm) on the growth of four Trichoderma species 72 hours after cultivation.

در لیتر که در آن *T. longibrachiatum* امکان رشد ۲۱٪ را داشت.

همانطور که در شکل ۹ مشاهده می‌شود، عنصر روی در سایر غلظت‌های آزمایش شده دارای ۱۰۰٪ اثر بازدارندگی بر روی هر سه گونه قارچی است به جز غلظت ۴۰ میلی‌گرم



شکل ۷. درصد مهار غلظت‌های مختلف عنصر روی (Zn3: 500 ppm, Zn2: 100 ppm, Zn1: 50 ppm) بر رشد چهار گونه قارچ تریکودرما در ۷۲ ساعت پس از کشت.

Figure 7. The inhibition percentage of different concentrations of zinc element (Zn1: 50 ppm, Zn2: 100 ppm, Zn3: 500 ppm) on the growth of four species of Trichoderma fungus in 72 hours after cultivation.

در *T. longibrachiatum* و بیشترین مقدار (۲۲/۱۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) برای عنصر روی در *T. harzianum* بوده است. همچنین از جدول زیر می‌توان نتیجه گرفت که در بین سه گونه مورد آزمایش کمترین اختلاف مقدار IC50 مربوط به عنصر کادمیوم و بیشترین اختلاف برای عنصر روی بوده است.

مقایسه غلظت بازدارندگی ۵۰ درصد (IC50) ترکیبات حاوی سرب، روی و کادمیوم برای گونه‌های مورد آزمایش

در این تحقیق (جدول ۴) نشان می‌دهد که کمترین مقدار این پارامتر (۲۵/۶۵ میلی‌گرم در لیتر) برای عنصر کادمیوم

جدول ۴- جدول غلظت ۵۰ درصد بازدارندگی سرب، روی و کادمیوم برای گونه‌های تریکودرما (۹۶ ساعت پس از کشت)

Table 4. Table of 50% inhibition concentrations of lead, zinc, and cadmium for Trichoderma species (96 hours after cultivation)

Metal	Fungi species	IC50
Cadmium	<i>T. longibrachiatum</i>	25/65
	<i>T. harzianum</i>	28/34
	<i>T. brevicompactum</i>	32/22
	<i>T. virens</i>	30/21
Lead	<i>T. longibrachiatum</i>	31/24
	<i>T. harzianum</i>	32
	<i>T. brevicompactum</i>	30/2
	<i>T. virens</i>	29/3
Zinc	<i>T. longibrachiatum</i>	26/69
	<i>T. harzianum</i>	1100/21
	<i>T. brevicompactum</i>	34/25
	<i>T. virens</i>	34/33

تعیین حداقل غلظت بازدارنده (MIC)

MIC در غلظت ۶۰۰ میلی گرم در لیتر و برای گونه *T. longibrachiatum* مشاهده شد. دو سویه *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* به یک اندازه به سرب و روی حساس بودند (جدول ۵).

حداقل غلظت بازدارنده (MIC) در جدول ۵ ارائه شده است. برای گونه‌های قارچی، روی سمیت بالاتری را نشان داد که نشان دهنده مهار رشد در کمترین غلظت آزمایش شده ۲۰۰ میلی گرم در لیتر برای سه گونه قارچی است. بالاترین

جدول ۵- حداقل غلظت بازدارنده گونه‌های قارچی برای کادمیوم، سرب و روی

Table 5. Minimum inhibitory concentration of fungal species for cadmium, lead, and zinc

Contaminant	Isolates	MIC
Cadmium	<i>T. longibrachiatum</i>	500
	<i>T. harzianum</i>	400
	<i>T. brevicompactum</i>	300
	<i>T. virens</i>	500
Lead	<i>T. longibrachiatum</i>	200
	<i>T. harzianum</i>	400
	<i>T. brevicompactum</i>	500
	<i>T. virens</i>	400
Zinc	<i>T. longibrachiatum</i>	200
	<i>T. harzianum</i>	400
	<i>T. brevicompactum</i>	200
	<i>T. virens</i>	300

اثرات متقابل بین آنها بر شاخص تجمع زیستی و جذب زیستی در سطح ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۶).

ارزیابی جذب و تجمع زیستی

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات ساده باکتری‌ها، سطوح مختلف کادمیوم، سرب و روی و همچنین

جدول ۶- تجزیه واریانس تجمع زیستی و جذب زیستی فلزات سنگین توسط قارچ‌ها

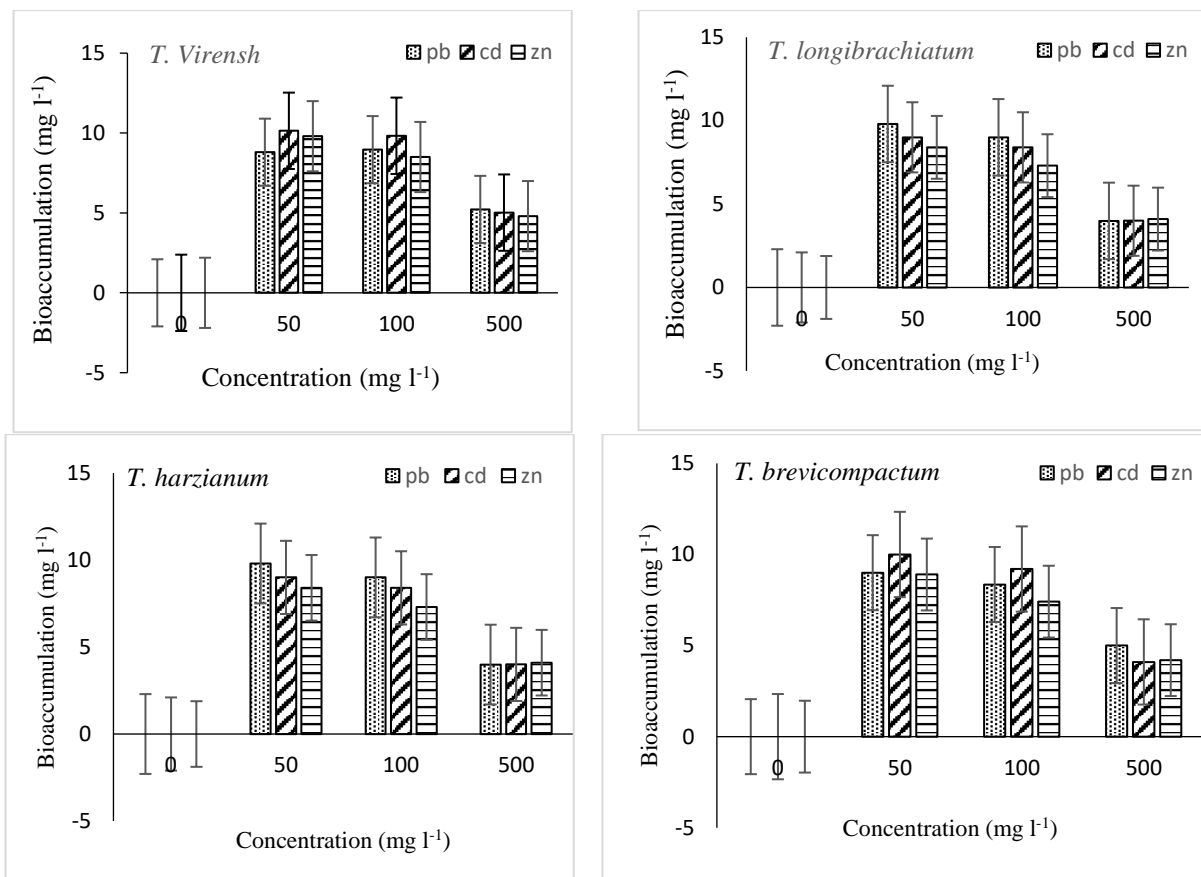
Table 6- Variance analysis of bioaccumulation and bioabsorption of heavy metals by fungi

	df	Mean square	
		bio absorption	bioaccumulation
Fungi	3	0.001**	0.1*
Replication	2	0.001	0.051
Metal	2	42.546**	34.5**
Pollution levels	4	2091.735**	206.421**
Fungus × contamination levels	12	0.004**	0.341*
Metal × pollution levels	8	3.751**	4.054**
Fungi × Metal	6	0.004**	0.09*
Metal × contamination levels × fungi	24	0.0021**	0.412**
Experimental error		0.0049	0.0021

** Significance at 1% level, * Significance at 5% level

روی دارد. تجمع زیستی فلزات سنگین مانند سرب، کادمیوم و روی در قارچ‌ها از کمترین تا بیشترین به ترتیب *T. brevicompactum*، *T. virens*، *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* است. بیشترین درصد تجمع کادمیوم، سرب و روی در هر چهار نوع قارچ در سطح آلودگی میلی‌گرم در میلی‌لیتر رخ داد، به طوری که با افزایش غلظت عناصر، علیرغم افزایش میزان تجمع زیستی، درصد تجمع زیستی با کاهش همراه بود (شکل ۸).

نتایج نشان داد که در تمامی تیمارهای قارچی با افزایش غلظت فلزات سنگین، میزان تجمع زیستی نیز افزایش یافت. کمترین و بیشترین درصد تجمع زیستی هر سه عنصر در هر چهار قارچ به ترتیب در سطوح آلودگی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر و ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر مشاهده شد. بررسی درصد تجمع زیستی سرب، کادمیوم و روی توسط این قارچ‌ها نشان می‌دهد که *T. longibrachiatum* نسبت به سه قارچ دیگر توانایی بیشتری در تجمع سرب، کادمیوم و

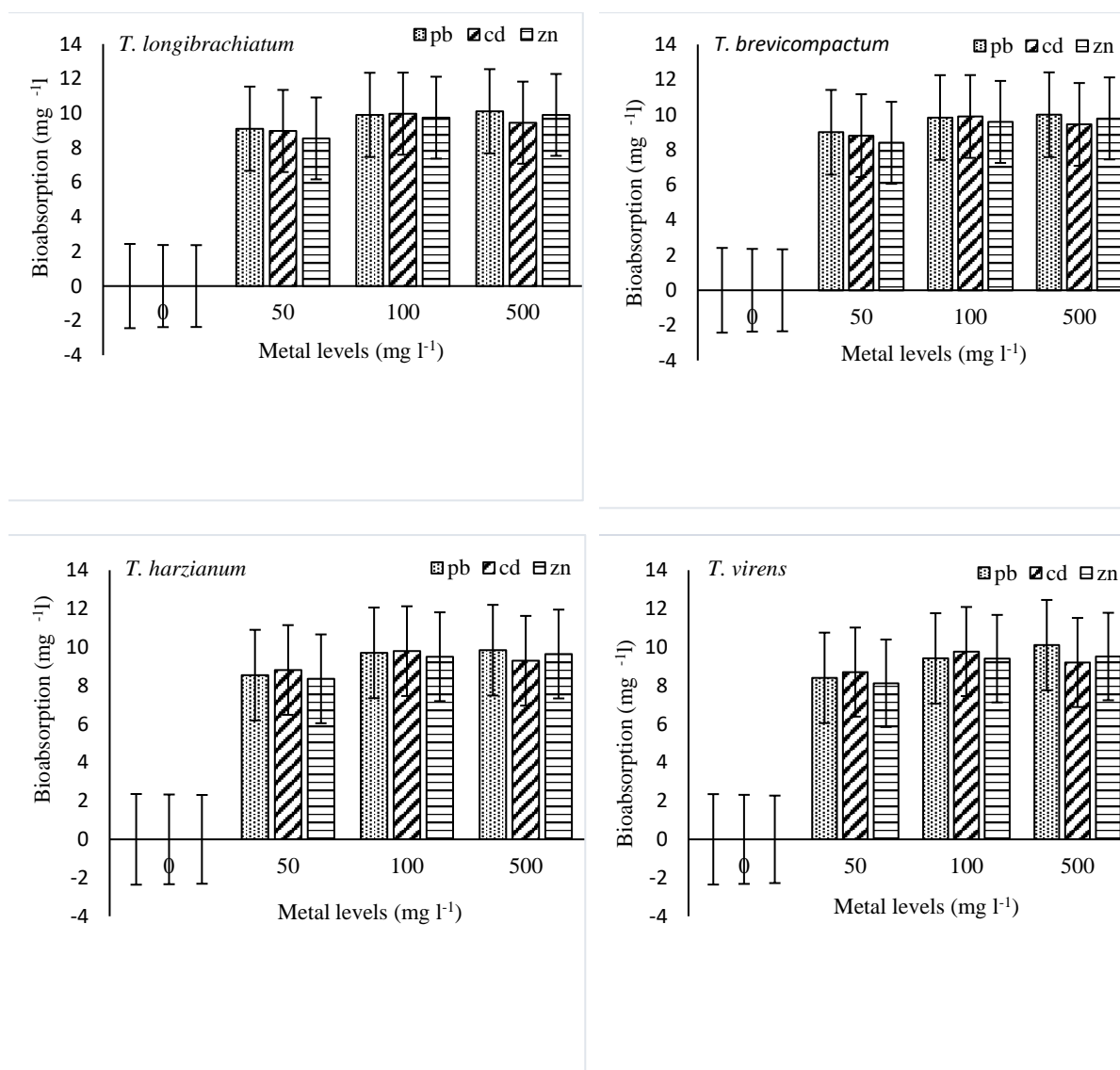


شکل ۸- درصد تجمع زیستی روی، کادمیوم و سرب در چهار سطح آلودگی قارچی

Figure 8. Bioaccumulation percentages of zinc, cadmium, and lead at four contamination levels by fungi

گونه قارچی *T. longibrachiatum* مشاهده شد و بیشترین درصد جذب بیولوژیکی مربوط به عنصر کادمیوم بود (شکل ۹).

نتایج مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که درصد جذب زیستی با افزایش سطوح آلودگی افزایش می‌یابد، به طوری که بیشترین جذب زیستی در سطوح ۸۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین جذب زیستی در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان جذب زیستی در



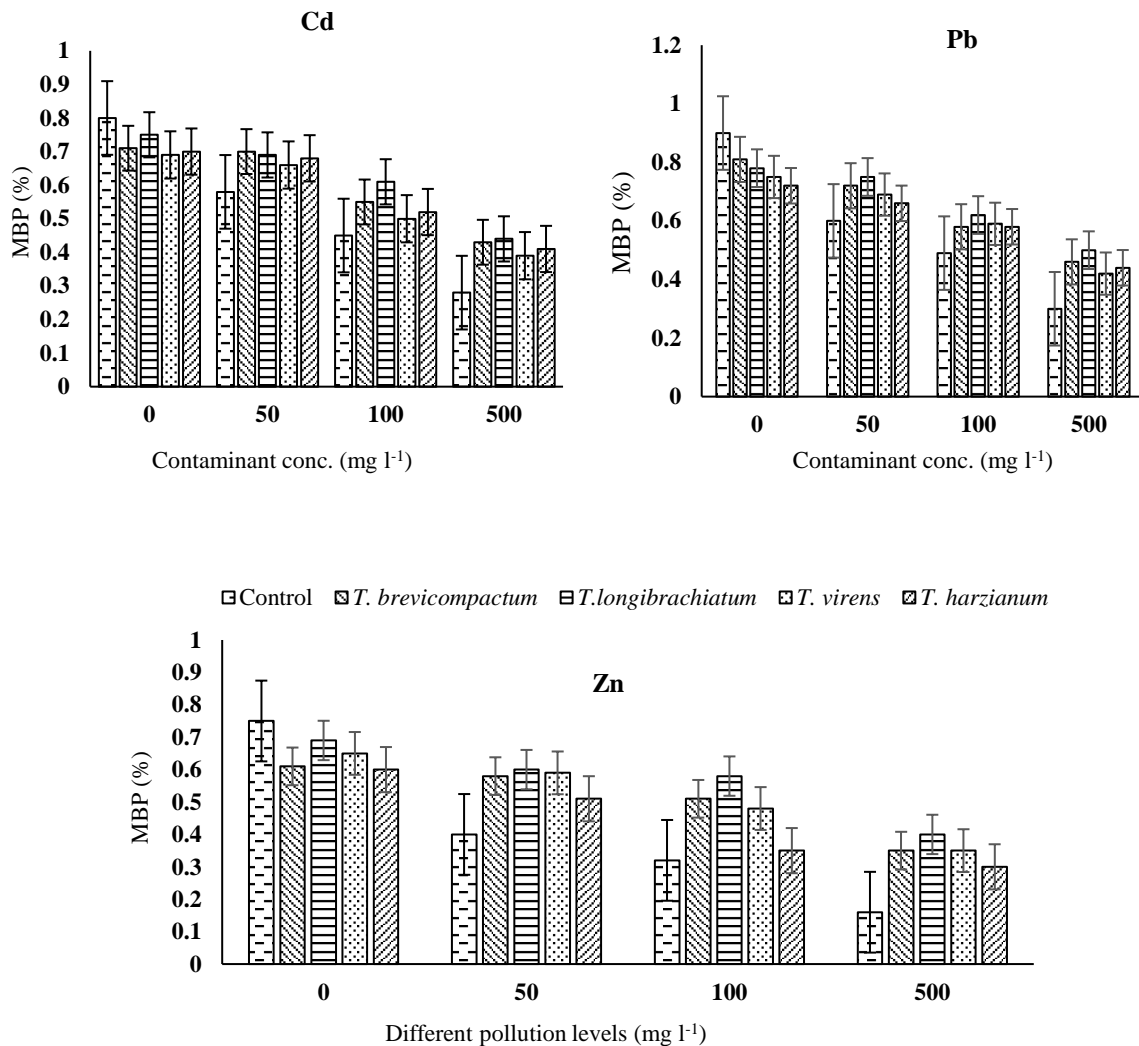
شکل ۹- درصد جذب زیستی روی، کادمیوم و سرب در چهار سطح آلودگی توسط قارچ‌ها، تأثیر قارچ‌های منتخب تریکودرما در تصفیه زیستی عناصر سنگین کادمیوم، سرب و روی

Figure 9. The percentage of bioabsorption of zinc, cadmium, and lead at four pollution levels by fungi; the effects of selected *Trichoderma* fungi in the bioremediation of the heavy metals cadmium, lead, and zinc.

کاهش می‌یابد. همچنین نتایج نشان می‌دهد که بیشترین و کمترین میزان جذب فسفر به ترتیب متعلق به عناصر سرب و روی است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین مقدار فسفر توده قارچی مربوط به *T. longibrachiatum* و به دنبال آن *T. brevicompactum* است (شکل ۱۰).

فسفر بیومس میکروبی

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف آلودگی با عناصر کادمیوم، سرب و روی بر درصد فسفر بیومس میکروبی به دست آمده تفاوت معنی داری وجود دارد، به طوری که با افزایش سطوح آلودگی، درصد فسفر



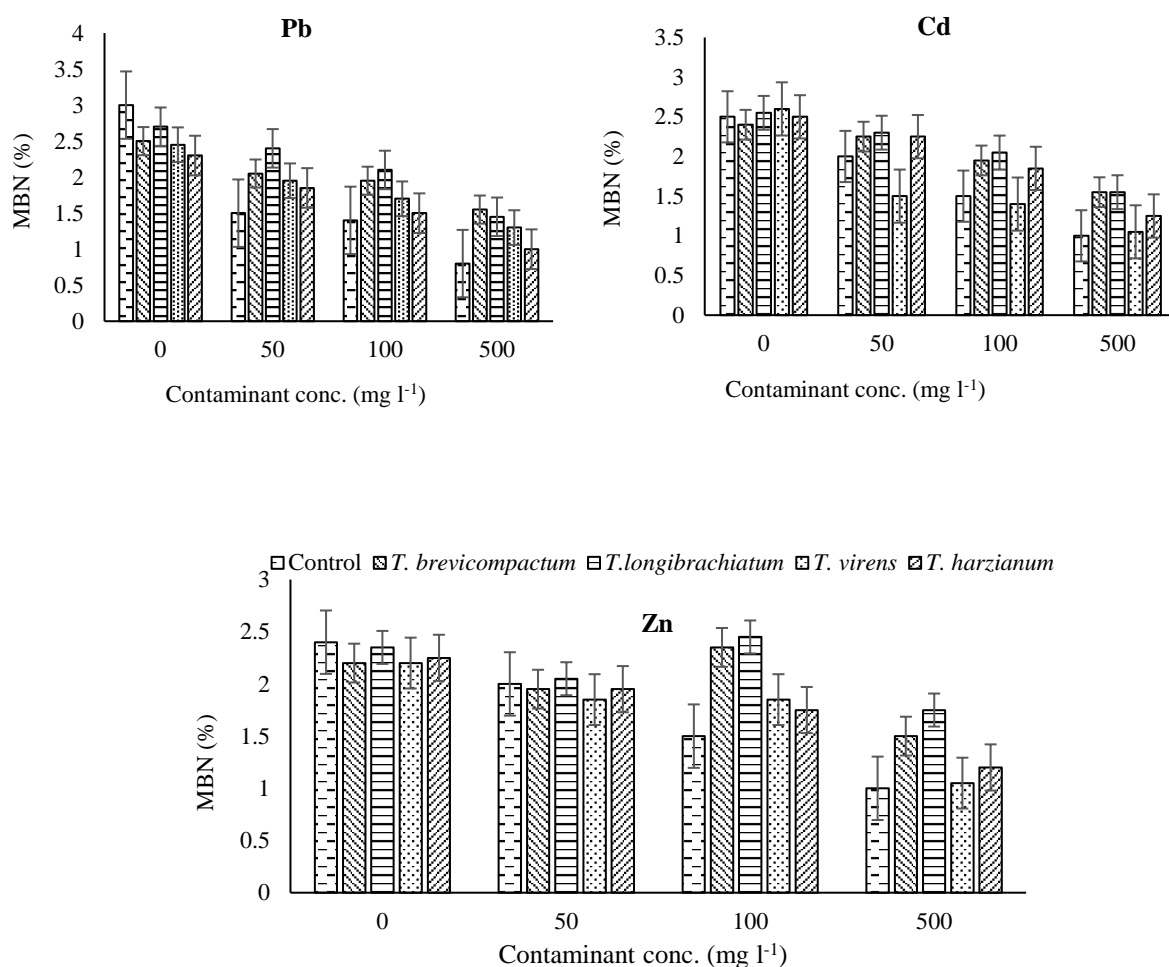
شکل ۱۰- فسفر بیوماس میکروبی (MBP) تحت سطوح مختلف آلودگی در گونه‌های قارچی.

Figure 10. Microbial biomass phosphorus (MBP) at different contamination levels in fungal species.

نیترژن کاهش می‌یابد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین میزان جذب نیترژن به ترتیب مربوط به کادمیوم و روی بود. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین مقدار نیترژن مربوط به *T. longibrachiatum* و به دنبال آن *T. harzianum* است (شکل ۱۱).

نیترژن بیومس میکروبی

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین سطوح مختلف آلودگی با عناصر کادمیوم، سرب و روی بر درصد نیترژن بیومس میکروبی به دست آمده تفاوت معنی داری وجود دارد، به طوری که با افزایش سطوح آلودگی، میزان درصد



شکل ۱۱- نیتروژن بیوماس میکروبی (MBN) تحت سطوح مختلف آلودگی در گونه‌های قارچی.

Figure 11. Microbial biomass nitrogen (MBN) percentage under different contamination levels in fungal species.

ویژگی‌های موجودات قارچی مشاهده شده در مطالعات میکرو و ماکروسکوپی با جنس *Trichoderma* مطابقت داشت. پژوهشگران مختلف نیز ویژگی‌های مشابهی را مشاهده کردند (Andrade-Hoyos *et al.*, 2019; Chaverri *et al.*, 2015; du Plessis *et al.*, 2018; Jang *et al.*, 2018; Nawaz *et al.*, 2018). تغییرات بین جدایه‌های تریکودرما ممکن است تحت تأثیر تغییرات منطقه جغرافیایی و نوع خاک باشد. محققان روی شناسایی گونه‌های تریکودرما کار کردند و جدایه‌ها را بر اساس الگوی انشعاب کونیدیوفورها، فیالیدهای کوتاه اکستراواگانت با صفحه و هاگ‌های کوچک (کنیدی) به گروه‌های مختلف توزیع کردند. *T. asperellum* دارای کندیوفورهایی است که به ۲ یا چند فیالید ختم می‌شوند و شاخه‌های اولیه در حدود ۹۰ درجه نسبت به

بحث

نتایج پژوهش‌های موجود در این زمینه نشان می‌دهند که گونه‌های *Trichoderma* در بسیاری از انواع محیط‌ها در سراسر جهان یافت می‌شوند (Rivera-Méndez *et al.*, 2018). گونه‌های تریکودرما از مکانیسم‌های مختلفی برای کنترل توسعه و گسترش پاتوژن‌های مضر مانند انگلی، رقابت و آنتی بیوز استفاده می‌کنند. مطالعه حاضر به منظور جداسازی و شناسایی ایزوله‌های مولکولی گونه‌های *Trichoderma* طراحی شد. گونه‌های تریکودرما بر اساس رنگ کلنی، رشد، میسلیم، بو، کونیدیوم، کونیدیوفور و فیالیدها متفاوت هستند و به بخش‌های ریخت‌شناسی مختلف طبقه بندی می‌شوند (Shah *et al.*, 2012).

سنگین در خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌تواند در برابر قارچ‌های بیماری زا خاک موثر باشد (Kredics *et al.*, 2003). یکی از معیارهایی که در فرآیند جذب بیولوژیکی بسیار مهم است، شاخص جذب است. این شاخص بیانگر فرآیند استخراج گیاه و بیانگر انتقال کادمیوم از خاک به ریشه و اندام هوایی است و به عنوان کارآمدترین و مناسب ترین روش در تصفیه خاک از فلزات سنگین شناخته می‌شود (Babaeian *et al.*, 2012; Mohammadi *et al.*, 2011). نتایج این مطالعه نشان داد که شاخص جذب کادمیوم با افزایش سطح آلودگی روند افزایشی داشته است. بیشترین شاخص جذب در حضور *T. longibrachiatum* با غلظت ۵۰ میلی گرم در لیتر کادمیوم مشاهده شد که نسبت به تیمار بدون استفاده از قارچ ۵۳ درصد افزایش داشت. اسیدهای آلی با وزن مولکولی کم طبیعی (NLMWOA) مانند اسید سیتریک، اسید اگزالیک یا اسید مالیک و مواد هیومیک (HS) متعلق به عوامل کلات‌کننده طبیعی هستند. این ترکیبات به طور غیرمستقیم از طریق تاثیر بر فعالیت میکروبی، خواص فیزیکی ریزوسفر و پویایی رشد ریشه و مستقیماً از طریق واکنش‌های اسیدی، کلات‌کنندگی، رسوب و کاهش اکسیداسیون در ریزوسفر، نقش مهمی در حلالیت فلز دارند (Evangelou *et al.*, 2007). همچنین بسیاری از گونه‌های قارچ خاک از جمله تریکودرما نیز قادر به حل شدن از طریق انتشار ترکیبات کلات اسیدهای آلی هستند. اسیدهای آلی آزاد شده توسط قارچ باعث اسیدی شدن محیط می‌شود که به افزایش تحرک فلزات سنگین کمک می‌کند (Barea *et al.*, 2005). همچنین، هر سه گونه *Trichoderma* در ابتدای فرآیند موجب تحرک کادمیوم، سرب و روی شدند و در نهایت باعث افزایش آبشویی فلزات سنگین به محلول خاک گردیدند. فلزات سنگین از آلاینده‌های مهمی هستند که به دلیل تجمع زیاد در قسمت‌های سطحی خاک در دسترس گیاهان قرار می‌گیرند و با جذب از طریق ریشه باعث ایجاد تغییراتی در برخی فرآیندهای متابولیکی گیاه می‌شوند و جذب عناصر ضروری و رشد و نمو آنها را مختل می‌کنند. فسفر یکی از اجزای ضروری متابولیسم انرژی، بخشی از اسیدهای نوکلئیک و غشاهای بیولوژیکی است. فرآیندهای بیوشیمیایی اصلی مانند فتوسنتز و تنفس توسط فسفات معدنی (Pi) یا مشتقات آلی آن فعال می‌شوند. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با افزایش سطح آلودگی کادمیوم و

محور اصلی رشد می‌کنند. *T. longibrachiatu* کنیدیوفورهای پیچیده و به تدریج طولانی تر، اغلب جفت، شاخه ثانویه دارند. فیالیدها مستقیماً از شاخه‌های ثانویه به وجود می‌آیند و معمولاً در حلقه‌ها نیستند. مطالعات قبلی وجود *T. harzianum*، *T. hamatum* و *T. viride* در این مناطق را نشان داد. گزارش محققان متعدد حاکی از این است که ویژگی‌های ریخت‌شناسی غالباً متغیر هستند و این امر شناسایی گونه‌ها را با دشواری مواجه می‌سازد. مفهوم گونه‌های فیلوژنتیکی بر اساس تطابق چندین تبارشناسی ژنی، طبقه‌بندی قارچ‌ها را متحول کرده و ضعف‌هایی را در شناسایی سنتی مبتنی بر ریخت‌شناسی آشکار کرده است. گونه‌های تریکودرما که از نظر ریخت‌شناسی شناسایی شده بودند، با استفاده از ناحیه رونویسی داخلی (ITS) که منجر به تولید محصول ۶۰۰ جفت باز در تمامی جدایه‌ها شد، دقیقاً شناسایی و تایید شدند. ITS یک توالی rDNA حفظ شده است که به طور گسترده‌ای برای توصیف و انجام آنالیز فیلوژنتیک جدایه‌های قارچی استفاده شده است (Skouboe *et al.*, 1999). در سیستم‌های کشاورزی، آفت کش‌های حاوی فلزات و کودهای شیمیایی به طور فزاینده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند و پساب‌های صنعتی در خاک رها می‌شوند. اما برخی از مواد معدنی نقش مهمی بر روی موجودات و رشد و نمو آنها دارند و این امر از طریق مسدود کردن، تجزیه و غیرفعال کردن برخی مولکول‌های مهم زیستی مانند پروتئین‌ها و آنزیم‌ها به‌ویژه در مورد فلزاتی مانند کادمیوم و جیوه امکان‌پذیر است، که فاقد عملکرد بیولوژیکی هستند و در غلظت‌های بالاتر سبب ایجاد سمیت می‌شوند (Ochia, 1987). با پیشرفت تکنولوژی، محیط زیست از اثرات مضر آلودگی‌های صنعتی از جمله فلزات سنگین رنج می‌برد. امروزه روش‌های بیولوژیکی کاهش یا حذف آلاینده‌ها به دلیل ارزان بودن، سازگاری با محیط زیست و کارایی بالا، مورد توجه روزافزون قرار گرفته است. جاذب‌های بیولوژیکی از جمله قارچ‌های رشته‌ای، جلبک‌ها، باکتری‌ها و مخمرها قادر به جذب فلزات سنگین حتی در محیط‌های بسیار رقیق هستند. گونه‌های تریکودرما قارچ‌های آزاد زیستی هستند که در خاک و فیوسفر گیاهی وجود دارند و با تولید مواد مختلف با خاصیت آنتی بیوتیکی از رشد قارچ‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده و نقش مفیدی در کشاورزی و مدیریت اکوسیستم ایفا می‌کنند. بنابراین استفاده از جدایه‌های گونه‌های تریکودرما مقاوم به فلزات

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش نشان داد که در بین گونه‌های جمع‌آوری شده، *T. harzianum* بیشترین فراوانی (۸۰٪) را نشان داد، در حالی که *T. longibrachiatum*، *T. virens* و *T. brevicompactum* به ترتیب ۴۵٪، ۳۵٪ و ۱۲٪ گونه‌ها را شامل می‌شدند. برای تأیید هویت گونه‌ها، تجزیه و تحلیل توالی‌های rDNA انجام شد و نتایج نشان داد که ناحیه ITS-rDNA با استفاده از پرایمرهای عمومی ITS4/ITS1F با موفقیت تکثیر شد. بیشترین تفاوت‌ها در منطقه ITS1 مشاهده شد. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که *T. longibrachiatum* سریع‌ترین رشد را داشت و غلظت ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سرب باعث افزایش رشد ۷ درصدی *T. harzianum* شد. در مقابل، سایر غلظت‌های سرب و روی اثر بازدارندگی بر روی رشد قارچ‌ها داشتند. کمترین مقدار IC50 برای کادمیوم در *T. longibrachiatum* (۲۵/۶۵) میلی‌گرم در لیتر) و بیشترین مقدار برای روی در *T. harzianum* (۱۱۰۰/۲۲) میلی‌گرم در لیتر) بود. نتایج نشان داد که تجمع زیستی با افزایش غلظت فلزات سنگین افزایش یافت و *T. longibrachiatum* بیشترین توانایی در جذب فلزات را داشت. همچنین، با افزایش سطوح آلودگی، درصد جذب فسفر و نیتروژن کاهش یافت و گونه *T. longibrachiatum* بیشترین جذب را نشان داد.

سرب، درصد فسفر و نیتروژن کاهش یافت. نتایج تحقیقات نشان داده است که کادمیوم به دلیل اختلالات تغذیه‌ای عامل موثری در کاهش جذب فسفر توسط گیاهان است. سمیت کادمیوم ممکن است باعث کمبود فسفر یا مشکلات مربوط به انتقال فسفر در گیاه شود (Ciećko et al., 2004). همچنین گزارش شده است که استفاده از تریکودرما باعث افزایش کارایی استفاده از نیتروژن در گیاهان می‌شود (Shoresh et al., 2010). مطالعات نشان داد که گیاهان تیمار شده با تریکودرما نیاز نیتروژن خود را ۳۰ تا ۵۰ درصد کاهش دادند. در یک تحقیق، استفاده از *T. harzianum* به طور قابل توجهی باعث افزایش نیتروژن، فسفر، پتاسیم، آهن، کلسیم، منیزیم و منگنز در دانه نخود شد (Mohammadi et al., 2010). با توجه به پتانسیل بالای این قارچ‌ها در تولید آنزیم‌های هیدرولاز مانند پروتاز، کیناز، سلولاز و ... می‌توان گفت که اثر تریکودرما در افزایش جذب نیتروژن به طور مستقیم از طریق تخریب کیتین و ترکیبات پروتئینی در محیط ریزوسفر و در نتیجه افزایش قابلیت دسترسی آن به گیاه، به طور مستقیم باعث افزایش لذت آن به گیاه شده است. در دسترس بودن سایر میکروارگانیسم‌های هتروتروف تثبیت‌کننده نیتروژن از طریق تخریب و شکستن ترکیبات پیچیده و تبدیل آنها به ترکیبات ساده‌تر. بنابراین به این ترتیب جذب نیتروژن در گیاه افزایش می‌یابد (Elad et al., 1985).

References

- Ahamed A. and Vermette P., 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, 100(23): 5979-5987.
- Anand P., Isar J., Saran, S. and Saxena R.K. 2006. Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology*, 97(8):1018-1025.
- Andrade-Hoyos P., Luna-Cruz A., Osorio-Hernández E., Molina-Gayosso E., Landero-Valenzuela N. and Barrales-Cureño H.J. 2019. Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs *Hongos asociados* a la marchitez de Chile. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(6):1259-1272.
- Babaeian E., Homae M. and Rahnemaie R. 2012. Enhancing phytoextraction of lead contaminated soils by carrot (*Daucus carota*) using synthetic and natural chelates. *Water and Soil*, 26(3):607-618.
- Barea J.M., Pozo M.J., Azcon R. and Azcon-Aguilar C. 2005. Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56(417): 1761-1778.
- Chaverri P., Branco-Rocha F., Jaklitsch W., Gazis R., Degenkolb T. and Samuels G.J. 2015. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains. *Mycologia*, 107(3): 558-590.
- Chulalaksananukul, W. 2008. Construction of cellulase hyperproducers of *Trichoderma reesei* by genetic techniques. In: *Sci Forum*, 100p.
- Ciecko Z., Kalembsa S., Wyszowski M. and Rolka E. 2004. The effect of soil contamination with cadmium on the phosphorus content in plants. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Environmental Development*, 7(1).
- Davet P., and Rouxel F. 2000. *Detection and Isolation of Soil Fungi: By Pierre Davet and Francis Rouxel*. Plymouth: Science Publishers, 188p.
- du Plessis I.L., Druzhinina I.S., Atanasova L., Yarden O. and Jacobs K. 2018. The diversity of *Trichoderma* species from soil in South Africa, with five new additions. *Mycologia*, 110: 559-583.
- Ebrahimi R., Rasouli-Sadaghiani M.H., Barin M. 2016. Isolation of phosphate-solubilizing microorganisms from wheat rhizosphere and evaluation of their solubilizing potential in presence of two insoluble phosphate sources, *Applied Soil Research*, 3(2): 29-41.
- Elad Y, Lifshitz R and Baker R. 1985. Enzymatic activity of the mycoparasite *Pythium nunn* during interaction with host and non-host fungi. *Physiological Plant Pathology*, 27: 131-148.
- Evangelou M.W., Ebel M. and Schaeffer A. 2007. Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68(6): 989-1003.
- Jang S., Kwon S.L., Lee H., Jang Y., Park M.S., Lim Y.W., Kim C. and Kim J.J. 2018. New report of three unrecorded species in *Trichoderma harzianum* species complex in Korea. *Mycobiology*, 46(3): 177-184.
- Kaewchai S., Wang H.K., Lin F.C., Hyde K.D. and Soyong K. 2009. Genetic variation among isolates of *Rigidoporus microporus* causing white root disease of rubber trees in southern Thailand revealed by ISSR markers and pathogenicity. *African Journal of Microbiology Research*, 3(10): 641-648.
- Kapoor A. and Viraraghavan T. 1995. Fungal biosorption—an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology*, 53(3): 195-206.
- Kapoor A. and Viraraghavan T. 1997. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 61(3): 221-227.
- Kredics L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Kevei F. and Nagy E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1): 37-42.
- Li Y., Sun R., Yu J., Saravanakumar K. and Chen J., 2016. Antagonistic and biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 against the maize stalk rot pathogen *Fusarium graminearum*. *Indian Journal of Microbiology*, 56: 318-327.
- Lorito M., Woo S.L., Harman G.E. and Monte E. 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1): 395-417.
- Mazlumi Lyli, A., Alizadeh H., Broumand N. and Azami Sardooei Z. 2015. Evaluation of *Trichoderma* stability in different soils and its effects on the growth performance of cucumber. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 4(2): 99-108.
- Mohammadi K., Khalesro S., Sohrabi Y. and Heidari G., 2011. A review: beneficial effects of the mycorrhizal fungi for plant growth. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1(9): 310-319.

- Mohammadi S.Z., Karimi M.A., Afzali D. and Mansouri F. 2010. Removal of Pb (II) from aqueous solutions using activated carbon from Sea-buckthorn stones by chemical activation. *Desalination*, 262(1-3): 86-93.
- Murray M.G. and Thompson W., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8(19); 4321-4326.
- Nasiri Tuli, R., Shabanpour Shahrestani M., Farhangi M. B. 2025. Effect of Organic Residues, *Bacillus* and *Trichoderma* on Soil Structural Stability in two Soils with Different Textural Class, *Applied Soil Research*, 12(4): 92-109. doi: 10.30466/asr.2025.54974.1831
- Nawaz K., Shahid A.A., Bengyella L., Subhani M.N., Ali M., Anwar W., Iftikhar S. and Ali S.W. 2018. Diversity of *Trichoderma* species in chili rhizosphere that promote vigor and antagonism against virulent *Phytophthora capsici*. *Scientia Horticulturae*, 239: 242-252.
- Ochia Y., Katsuragi T. and Hashimoto K. 1987. Proteins in three seaweeds, "Aosa" *Ulva lactuca*, "Arame" *Eisenia bicyclis*, and "Makusa" *Gelidium amansii*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 1051-1055.
- Ojha A., Jaiswal S., Thakur P. and Mishra S.K. 2023. Bioremediation techniques for heavy metal and metalloid removal from polluted lands: a review. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 20(9): 10591-10612.
- Olsen S.R., 1954. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. US Department of Agriculture. No. 939.
- Rivera-Méndez W., Brenes-Madriz J. and Zúñiga-Vega C. 2018. Effects of the application of *Trichoderma asperellum* and its culture filtrate on the growth of onion seedlings. *Revista Tecnología en Marcha*, 31(2): 98-105.
- Shah S.P., Roth A., Goya R., Oloumi A., Ha G., Zhao Y., Turashvili G., Ding J., Tse K., Haffari G. and Bashashati A. 2012. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*, 486: 395-399.
- Sharma I.P. and Sharma A.K. 2020. *Trichoderma*–*Fusarium* interactions: a biocontrol strategy to manage wilt. *Trichoderma: Host Pathogen Interactions and Applications*, PP.167-185.
- Shoresh M., Harman G.E. and Mastouri F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annual Review of Phytopathology*, 48(1): 21-43.
- Skouboe P., J. C. Frisvad J. W. Taylor D. Lauritsen M. Boysen and L. Rossen. 1999. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences from the ITS region of terverticillate *Penicillium* species. *Mycological Research*, 103: 873-81. <https://doi.org/10.1017/S0953756298007904>
- Tudi M., Daniel Ruan H., Wang L.; Lyu J., Sadler R., Connell D., Chu C., Phung D.T. 2021. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18: 1112.
- Vardhan K.H., Kumar P.S. and Panda R.C. 2019. A review on heavy metal pollution, toxicity and remedial measures: Current trends and future perspectives. *Journal of Molecular Liquids*, 290: 111197.