

شناسایی مولکولی قارچ‌های راستهٔ موکورال در مناطق آلوده به مواد

نفی

سمیه دولت آبادی*^۱؛ محمد جواد نجف زاده^۲؛ نعمت الله جعفر زاده حقیقی فرد^۳

- ۱ - استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران
 - ۲ - استاد گروه انگل شناسی و قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
 - ۳ - مرکز تحقیقات فناوری‌های محیط زیست، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران
- (تاریخ دریافت ۹۹/۰۹/۱۱ - تاریخ پذیرش ۱۰/۰۷/۰۰)

چکیده:

موکورال‌ها گروهی از قارچ‌های اولیه از خانوادهٔ زیگومیستاها هستند که در محیط‌های مختلف در سراسر جهان دیده می‌شوند. این قارچ‌ها در تولید مواد غذایی تخمیرشده، متابولیت‌های ثانویه و آنزیم‌ها و همچنین عفونت قارچی موکورمایکوزیس مؤثرند. با توجه به رشد سریع این قارچ‌ها، حضور آنها در اکوسیستم‌های مختلف و توانایی آنها در تولید آنزیم‌ها در پی شناخت اثر این قارچ‌ها در فرایندهای زیست‌پالایی محیط‌های آلوده به مواد نفتی هستیم. در این پژوهش جداسازی نمونه‌ها به روش شناورسازی در روغن از نمونه‌های آلوده به مواد نفتی انجام گرفت و شناسایی آنها براساس مشخصه‌های مورفولوژیکی و مولکولی از طریق توالی یابی ناحیهٔ ژنی ITS-rDNA و ترسیم درخت فیلوژنتیکی صورت پذیرفت. در مجموع ۱۳۱ جدایهٔ قارچی استحصال شد که از این میان ۲۷ نمونه متعلق به راستهٔ موکورال‌ها بود. این جدایه‌های بومی ایران با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی به‌طور دقیق و در حد گونه شناسایی شد و سپس در کلکسیون‌های قارچی هلند (Westerdijk Institute) و لهستان (Warsaw University) ذخیره و شمارهٔ مرجع کلکسیون برای آنها دریافت شد. جدایه‌های قارچی به‌دست‌آمده شامل گونه‌های *Rhizopus* (n=19), *Mucor* (n=4), *Actinomucor* (n=2), *Lichtheimia* (n=1), *Cunninghumella* (n=1) بود که با توجه به قابلیت بالقوهٔ رشد آنها در محیط‌های آلوده به مواد نفتی از توان زیست‌پالایی برخوردارند.

کلید واژگان: آلودگی نفتی، شناسایی مولکولی، مورفولوژی، موکورال‌ها

۱. مقدمه

نیز کاربرد دارند. در طی فرایند تخمیر، بافت، طعم و ارزش غذایی غلات و حبوبات بهبود می‌یابد و در نتیجه ماده غذایی هضم‌پذیرتر می‌شود (Hermet *et al.*, 2012). موکورال‌ها آنزیم‌های متنوعی (لیپاز، آمیلاز، تیروزیناز، سلولاز، پکتیناز، زیلاناز، فیتازها، پروتئازها و ...) تولید می‌کنند (Dolatabadi *et al.*, 2014a). مجموع این آنزیم‌ها به توانایی‌های تجزیه‌ای موکورال‌ها می‌افزاید. گونه‌های موکورال توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه، اسیدهای آلی (لاکتیک اسید و فوماریک اسید)، سوخت‌های زیستی، اتانول، اسیدهای چرب اشباع‌نشده و کاروتنوئیدها را نیز دارند (Dolatabadi *et al.*, 2014a & b, Abe *et al.*, 2007, Guimarães *et al.*, 2006). افزون بر این، زیست‌توده این قارچ‌ها به دلیل داشتن ارزش غذایی زیاد، به‌عنوان غذای جانور و ماهی استفاده می‌شود. با توجه به تولید آنزیم‌های متفاوت، رشد در دماهای زیاد، نیازهای تغذیه‌ای ساده و در نتیجه تولید سریع زیست‌توده، این قارچ‌ها جایگاه خاصی در صنایع وابسته دارند (Dolatabadi *et al.*, 2014a, b). سموم قارچی (مایکوتوکسین) در بین اعضای این گروه رایج نیستند و این امر بر امنیت زیستی آنها می‌افزاید (Dolatabadi *et al.*, 2016). از دیدگاه زیست‌پالایی (Bioremediation) این گروه از قارچ‌ها توانایی تجزیه ترکیبات نفتی و مواد زئوبیوتیکی مانند PAHs، فلزهای سنگین و ترکیبات آروماتیک مانند هیدروکربن‌های تک‌حلقه‌ای با وزن مولکولی کم (benzene, toluene, ethylbenzene, xylene= BTEX) را دارند (Leitão, 2009). ترکیبات BTEX آلاینده‌های محیطی رایج همراه با انتشار محصولات نفتی به محیط هستند و اثرهای

زیگومیست‌ها جزو گروه پایه‌ای قارچ‌ها در شجره حیات و از نظر تکاملی بنیادی‌تر از آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها هستند. پیشینه حضور آنها به ۸۰۰ تا ۱۴۰۰ میلیون سال پیش در عصر پرکامبرین می‌رسد (Hibbett *et al.*, 2007; Krings *et al.*, 2013). طبق یافته‌های گذشته، زیگومیست‌ها اصلی‌ترین و قدیمی‌ترین قارچ‌هایی هستند که زندگی در محیط‌های خشکی را آغاز کرده‌اند و توانایی‌های لازم برای رشد در این زیستگاه‌ها را به دست آورده‌اند. این قارچ‌های ساپروفیت، اغلب خاک‌زی و دارای اکلوزی متنوع‌اند و در محیط‌های مختلفی مانند خاک، آب و مواد در حال فساد مانند میوه و سبزی دیده می‌شوند (Battaglia *et al.*, 2016). براساس پژوهش‌های ژنی جدید، دسته‌بندی این گروه از قارچ‌ها تغییر کرده و نام زیگومیست دیگر کاربرد ندارد و زیرشاخه‌های *Mucoromycotina*, *Zoopagomycotina*, *Mortierellomycotina* و *Kickxellomycotina* جایگزین شده‌اند (Krings *et al.*, 2013).

براساس جدیدترین پژوهش‌های مولکولی *Mucoromycota* شامل ۵۵ جنس و ۲۶۱ گونه است که ۳۸ گونه عامل ایجاد عفونت موکورمایکوزیس در انسان شناخته شده‌اند (Walther *et al.*, 2019). در این میان راسته موکورال بزرگ‌ترین گروه در میان قارچ‌های پایه‌ای است (Walther *et al.*, 2013). با توجه به تولید اسپورهای معلق در هوا، جوانه‌زنی زیاد و نرخ رشد سریع، گونه‌های موکورال جزو موفق‌ترین و فراوان‌ترین قارچ‌های زیگوسپوریک در محیط‌های انسانی‌اند (Dolatabadi, 2015). موکورال‌ها در تولید مواد غذایی تخمیری برپایه دانه سویا و برنج

زیانباری برای سیستم اعصاب مرکزی انسان دارند. قرار گرفتن در معرض این ترکیبات طی دوره طولانی می‌تواند بر سیستم کبد، کلیه و خون تأثیر بگذارد و سبب ناتوانی یا حتی مرگ شود. تولوین موجب مشکلات سیستم اعصاب مرکزی (Lee et al., 2003)، ریه و سلول‌های خونی می‌شود (Adeli et al., 2016).

این ترکیبات ممکن است در حین تولید، انتقال و مصرف مواد نفتی موجب آلودگی محیط زیست شوند و سلامت عمومی را تهدید کنند. آلودگی محیط با نفت برای جانوران، گیاهان و انسان مضر و خطرناک است و سبب نابودی زیستگاه‌های پرندگان، پستانداران دریایی و ماهی‌ها می‌شود و بر اکوسیستم اقیانوس‌ها و زیستگاه‌های ساحلی تأثیرگذار است (Singh et al., 2019).

آلودگی نفتی به نشت نفت هنگام استخراج، پالایش و حمل نفت مربوط می‌شود که ممکن است به آلودگی خاک‌ها و آب‌های زیرزمینی بینجامد و مزارع کشاورزی و گیاهان مورد استفاده انسان را نیز تحت تأثیر قرار دهد (Lors et al., 2012). آلودگی نفتی موجود در میدان‌های نفتی، خاک‌های اطراف پالایشگاه‌ها، محل‌های اکتشاف و مسیر لوله‌های انتقال نفت از معضلات زیست‌محیطی کاملاً مشهود است. همچنین به‌واسطه جنگ هشت‌ساله ایران و عراق در مناطق غربی کشور بر انتشار مواد نفتی در محیط افزوده شده است. با توجه به افزایش روزافزون استفاده از نفت و فراورده‌های نفتی در بخش‌های مختلف صنعت، حل این معضل زیست‌محیطی نیازمند توجه بیشتری است.

روش پاکسازی زیستی که به‌طور معمول شامل تبدیل آلاینده‌ها به مواد غیرسمی با استفاده از

فعالیت میکروارگانیسم‌هاست، فرایند بسیار امیدبخشی برای حذف آلودگی‌های نفتی به‌شمار می‌رود. پاکسازی زیستی در مقایسه با روش‌های شیمیایی و فیزیکی از نظر اقتصادی به‌صرفه است، ساختار خاک را حفظ می‌کند و کمترین آثار منفی را بر سلامت انسان و اکوسیستم‌ها دارد. پاکسازی زیستی با استفاده از قارچ‌ها و مخمرهایی با نام مایکورمدییشن (Mycoremediation) به‌علت برخورداری از توانمندی‌های خاص قارچ‌ها و برتری آنها بر باکتری‌ها، توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Dolatabadi et al., 2019). قارچ‌ها می‌توانند در محیط‌های پرتنش با pH کم و محیط‌های غذایی فقیر رشد کنند و در رقابت با دیگر میکروارگانیسم‌های محیطی به‌خوبی بقا داشته باشند (Hölker et al., 2004). ایران کشوری نفت‌خیز با منابع و میدان‌های نفتی متعدد است. در نتیجه اکوسیستم آلوده به مواد نفتی به‌طور گسترده در کشور وجود دارد. بدیهی است که بررسی تنوع زیستی این مناطق و شناسایی قارچ‌های مؤثر اولین و مهم‌ترین گام در پاکسازی محیط زیست به‌شمار می‌رود.

با وجود گستردگی زیستگاه‌های مربوط به موکورال‌ها در طبیعت، تعداد کمی از این گونه‌های قارچی در کلکسیون جهانی هلند (Westerdijk Institute) از ایران گزارش شده‌اند. در پژوهش داودی و همکاران گونه‌های قارچی متفاوتی از مناطق نفتی مارون و هفتکل جداسازی شدند، ولی قارچ‌های موکورال در این بین نبودند (Davoodi et al., 2019). یکی از زیستگاه‌های این قارچ‌ها، خاک‌های نفتی و مناطق آلوده به این مواد در خاورمیانه و ایران است که جزو معضلات زیست‌محیطی در ایران و کشورهای

نفت خیز همسایه به شمار می‌آیند. از آنجا که موکورال‌ها به آسانی به روش‌های مولکولی شناسایی می‌شوند (Walther *et al.*, 2013)، پژوهش‌های مولکولی و شناسایی گونه‌های بومی از محیط‌های مختلف در ایران و معرفی این نمونه‌ها به کلکسیون‌های جهانی ضروری به نظر می‌رسد.

۲. مواد و روش‌ها

۲-۱. روش اجرای طرح

جمع‌آوری نمونه خاک: جداسازی قارچ‌ها براساس پروتکل‌های موجود در مقالات صورت پذیرفت. در ابتدا با بیلچه‌ای تمیز از عمق ده سانتی‌متری نمونه‌ای از خاک آلوده برداشته و در کیسه‌های پلاستیکی استریل قرار داده شد (Dolatabadi *et al.*, 2019). نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه تا زمان جداسازی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و در مدت یک ماه برای جداسازی استفاده شدند. مکان‌های تحت بررسی مناطق نفتی اهواز، بوشهر و جزیره خارک، پالایشگاه نفت اصفهان، شهرک صنعتی یزد، پمپ بنزین‌های قدیمی، معادن زغال سنگ (طبس، اسفراین)، ماشین‌های سنگین و مناطق آلوده به نشت مواد نفتی و جایگاه‌های تخلیه سوخت بودند. در مجموع ۵۳ نمونه خاک به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی قارچ‌های موکورال: جداسازی قارچ‌ها مطابق روش ایواتسو و همکاران (Iwatsu *et al.*, 1981) به طریق شناورسازی در روغن انجام گرفت. بدین ترتیب که حدود ۲۰ گرم از نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده در فلاسک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر،

استرپتومایسین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کلرامفنیکل ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، سیکلوهگزیمید ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) ریخته شد و پس از هموژنیزه کردن محلول، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر روغن معدنی به هر کدام از فلاسک‌های ارلن افزوده شده و به مدت پنج دقیقه با ورتکس به شدت تکان داده شد. پس از ساکن ماندن ارلن به مدت ۲۰ دقیقه، ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصل (از فاز میانی گازوییل | محلول) برداشته و در پتری حاوی محیط کشت (سابورود دکستروز آگار حاوی آنتی‌بیوتیک: استرپتومایسین ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، کلرامفنیکل ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، مزواریتریتول ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت داده شد.

تشتک‌های پتری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شد. طی این مدت، با مشاهده پرگنه‌ها در محیط کشت، از خارجی‌ترین قسمت پرگنه‌ها، مقداری از ریشه‌ها با سوزن سترون برداشته شد و به روش مخطط کردن به محیط کشت عصاره مالت آگار ۲ درصد یا سیب‌زمینی دکستروز آگار انتقال یافت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک هفته نگهداری شد. این عمل برای خالص‌سازی جدایه‌ها تکرار شد. در طول زمان انکوبه، نمونه‌ها به‌طور پیوسته بررسی شدند و هر نمونه جدید به محیط کشت جامد منتقل شد.

شناسایی جدایه‌ها بر مبنای ریخت‌شناختی و مشخصات رشدی در محیط کشت: جدایه‌های قارچی روی محیط عصاره مالت آگار (Difco) و سیب‌زمینی دکستروز آگار (Difco) کشت داده شده و به مدت هفت روز در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد

جدول ۱- فهرست نمونه‌های جداسازی شده در این پژوهش به همراه شمارهٔ مرجع

شمارهٔ بانک	محل	موقعیت جغرافیایی	مکان جداسازی	گونهٔ شناسایی شده	شمارهٔ کلکسیون
MZ407672	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus stolonifer</i>	WA0000067094
MZ407662	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	لامپ نفت‌سوز	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067095
MZ407670	اهواز	31°19'13"N 48°40'09"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067096
MZ407667	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Actinomucor elegans</i>	WA0000067097
MZ407679	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067098
MZ407674	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	تانکر نفت	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067101
MZ407663	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	حمام نفت‌سوز	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067105
MZ407665	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	پمپ بنزین	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067106
MZ407666	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067107
MZ407669	اهواز	31°19'13"N 48°40'09"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067108
MZ407671	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067109
MZ407664	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	تانکر نفت	<i>Mucor circinelloides</i>	WA0000067111
MZ407668	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	WA0000067115
MZ407654	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	تراکتور	<i>Rhizopus stolonifer</i>	DTO 422-A9
MZ407655	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	سیستم گرمایش مرکزی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	DTO 422-B1
MZ407656	اهواز	31°19'13"N 48°40'09"E	میدان نفتی	<i>Mucor circinelloides</i>	DTO 422-B2
MZ407657	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	خاک آلوده به مواد نفتی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	DTO 422-B3
MZ407658	اهواز	31°19'13"N 48°40'09"E	میدان نفتی	<i>Actinomucor elegans</i>	DTO 422-B5
MZ407659	طیلس	33°35'45"N 56°55'28"E	معدن زغال سنگ	<i>Rhizopus stolonifer</i>	DTO 422-B6
MZ407660	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	فاضلاب	<i>Rhizopus stolonifer</i>	DTO 422-B7
MZ407661	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	معدن زغال سنگ	<i>Rhizopus arrhizus</i>	DTO 422-B8
MZ407675	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	تانکر نفت	<i>Rhizopus arrhizus</i>	DTO 422-C1
MZ407676	اصفهان	41°38'32"N 51°40'03"E	پتروشیمی	<i>Rhizopus arrhizus</i>	DTO 422-C2
MZ407677	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	فاضلاب	<i>Cunninghamella echinulata</i>	DTO 422-C3
MZ407678	بندر امام خمینی	30°26'08"N 49°06'20"E	دریاچهٔ آلوده به مواد نفتی	<i>Lichtheimia corymbifera</i>	DTO 422-C4
MZ407679	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	تراکتور	<i>Mucor circinelloides</i>	DTO 423-B3
MZ407680	سبزوار	36°12'45"N 57°40'55"E	سیستم گرمایش مرکزی	<i>Mucor circinelloides</i>	DTO 423-B4

برای مشاهدهٔ ساختارهای این نوع قارچ‌ها کافی است. اسپورها با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مشاهده شد. مشخصه‌های میکروسکوپی نمونه‌ها برای شناسایی ظاهری با اطلس مرجع بررسی شد (de Hoog *et al.*, 2009).

شناسایی مولکولی نمونه‌های جداسازی شده: جدایه‌های قارچی که به روش مورفولوژیکی شناسایی شده‌اند، برای شناسایی نهایی و قطعی به روش مولکولی نیز شناسایی شدند. برای این منظور از ناحیهٔ

نگهداری شدند. ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ، نرخ رشد پرگنه، شکل پرگنه، تولید شدن یا تولید نشدن رنگدانه و دیگر خصوصیات مشاهده شده یادداشت شد. به منظور بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ و قطر ریشه، ساختارهای هاگ‌زایی قارچ و خصوصیات میکروسکوپی دیگر از روش کشت لام استفاده شد. مشخصات میکروسکوپی به وسیلهٔ میکروسکوپ Olympus BX41 مشاهده شد. بزرگنمایی ۴۰۰

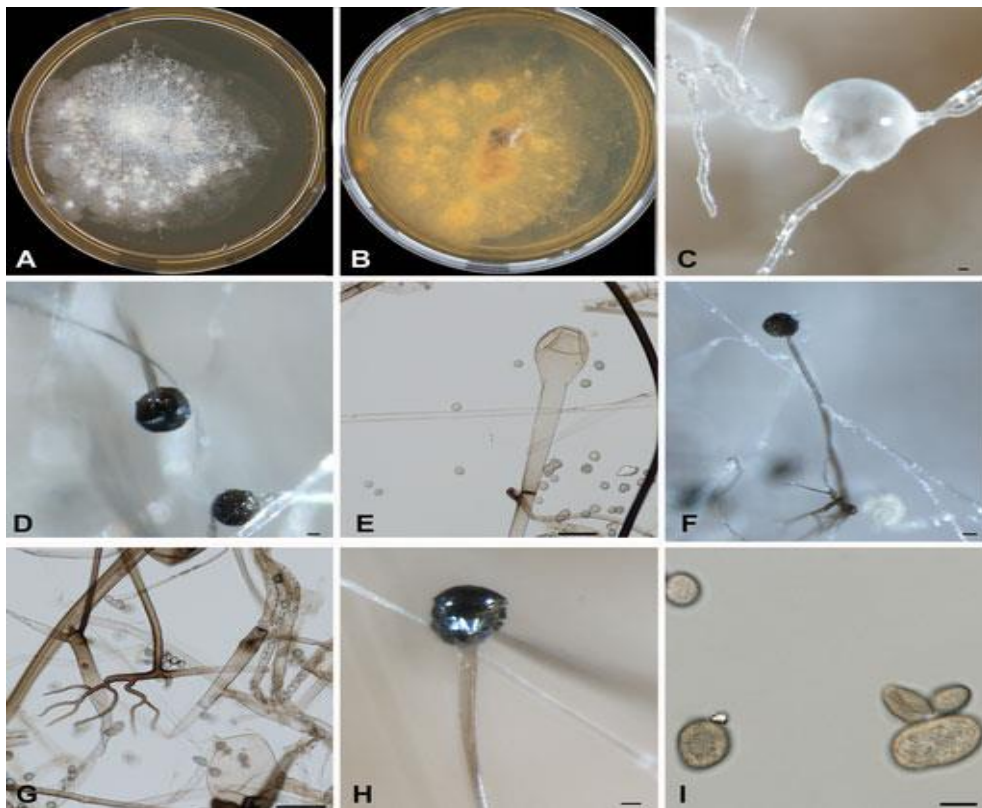


Fig 1- *Rhizopus stolonifer*. A, B: colony on MEA after 3d. C, young columella, D, H: mature collumella; E: collumella with collar; F, G: rhizoids; I: sporangia. Scale bar = 10 μ m, E, g= 50 μ m

پلیمره PCR چرخه به صورت زیر است: مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه به صورت: مرحله واسرشت‌سازی ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال ۴۵ ثانیه در ۵۵ درجه سانتی‌گراد، مرحله بسط ۷۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. مرحله بسط نهایی ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد. پرایمرهای فوق برای انجام گرفتن هر دو مرحله واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعیین توالی این نمونه‌ها استفاده شد. تعیین توالی در مؤسسه Westerdijk انجام پذیرفت.

آنالیز داده‌های اولیه و رسم شجره ژنی: توالی‌های به دست آمده، در بانک اطلاعاتی <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Nucleotides> با توالی‌های موجود مقایسه شد و توالی با شباهت بیشتر از ۹۹ درصد، شناسایی نهایی

بین ژن ریپوزومی Internal Transcribed Spacer (ITS) استفاده شد. روش استخراج DNA بر مبنای روش CTAB است (William *et al.*, 2012). کیفیت DNA به دست آمده، بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد محک زده شد. پرایمرهای استفاده شده برای PCR واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، VG9-LS266 هستند (de Hoog & Gerrits van den Ende, 1998, Masclaux *et al.*, 1995). شرایط انجام گرفتن واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به قرار زیر است: در حجم کل ۱۲/۵ میکرولیتر برای انجام PCR، ۷ میکرولیتر آب مقطر، ۰/۵ میکرولیتر، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرها با غلظت ۱۰ pmol، ۱/۲۵ میکرولیتر بافر، ۱/۲۵ میکرولیتر داکسی نوکلوتید فسفات، نیم میکرولیتر (25 mM) $MgCl_2$ ، یک میکرولیتر DNA، نیم میکرولیتر از 5 U bioTaq

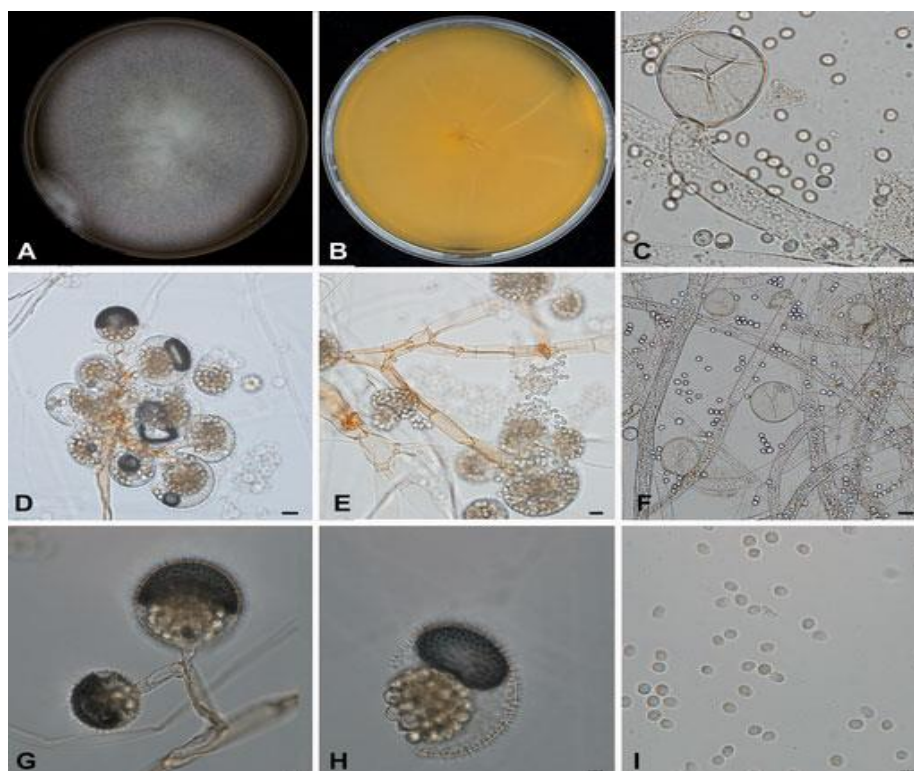


Fig 2- *Mucor circinelloides*. A, B: colony on MEA after 5d; C: Short, recurved sporangiophores; D, E: clusters of sporangia; F: columella and hyphae, G, H: sporangium, I: spores. Scale bar= 10 μ m.

در طول این تحقیقات، از ۵۳ نمونه برداری انجام گرفته از مناطق نفتی و مکان‌های آلوده به مواد نفتی و براساس روش‌های شناسایی مورفولوژیکی، ۱۳۱ نمونه جداسازی و شناسایی شدند. با روش شناسایی مورفولوژیکی فقط می‌توان نمونه‌ها را در حد جنس شناسایی کرد. قارچ‌های موکورال ریشه‌های هوایی ایجاد می‌کنند که در ابتدا سفیدند و پس از اسپورزایی تیره دیده می‌شوند. نمونه‌ها در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به رشد کامل می‌رسند و سطح یک پتری‌دیش ۸ سانتی‌متری را به‌طور کامل می‌پوشانند. با استفاده از میکروسکوپ نوری، تصاویر از این نمونه‌ها تهیه شد (تصویرهای ۱ تا ۵). این قارچ‌ها فاقد دیوارهٔ عرضی هستند. جنس ریزوپوس (تصویر ۱) دارای ریزوئید، استولن و اسپورانژیوم است که در آن هاگ‌های غیرجنسی تولید می‌شوند. هاگدان‌ها تعداد زیادی هاگ دارند که در مجموع رنگ تیرهٔ کلونی در زمان رشد کامل را سبب

نمونه در نظر گرفته شد. شناسایی نهایی نمونه‌های جمع‌آوری شده در جدول ۱ ذکر شده‌اند. سپس توالی‌های به‌دست‌آمده در نرم‌افزار MEGA7 ویرایش و با استفاده از ابزار Clustal W همتراز شده و برای رسم شجرهٔ ژنی استفاده شدند. درخت ژنی با الگوی maximum likelihood ایجاد شد. T92+G بهترین مدل رسم درخت ژنی در نظر گرفته شد. شش سویهٔ مرجع به مجموعهٔ توالی‌ها افزوده شد. از سویهٔ *Mortierella parvispora* CBS 311.52 به‌عنوان تاکسون خارجی استفاده شد.

ارائهٔ نمونه‌ها به کلکسیون‌های مرجع: نمونه‌های شناسایی شده در کلکسیون‌های مرجع قارچی هلند (Westerdijk Institute) و لهستان (Warsaw University) ثبت شد. شمارهٔ کلکسیون این نمونه‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

۳. نتایج

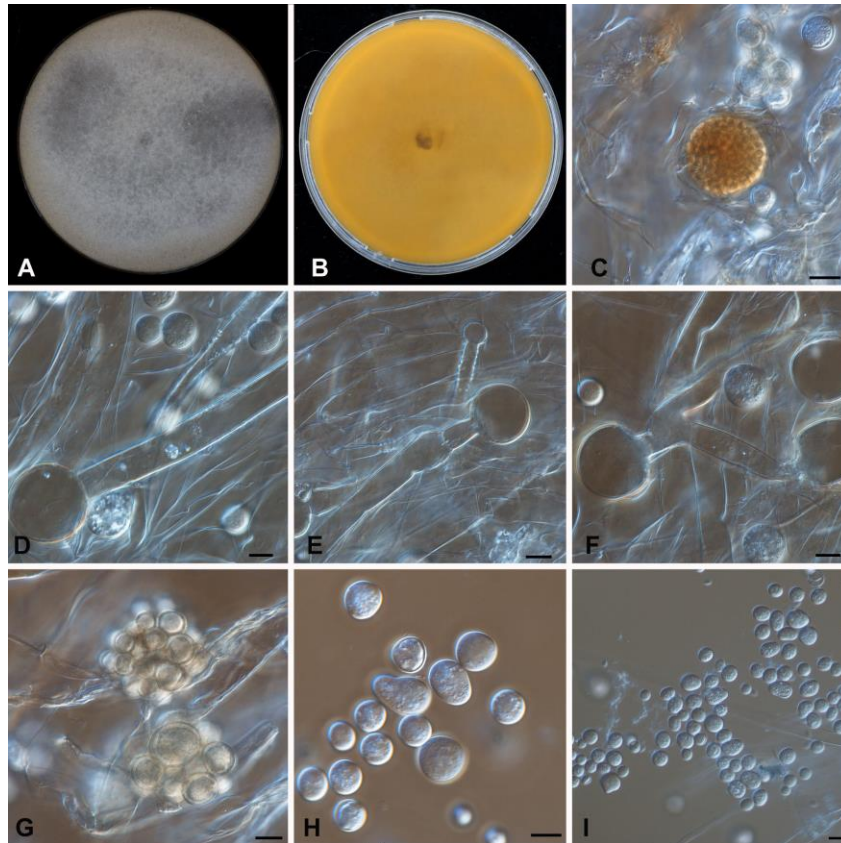


Fig 3- *Actinomucor elegans*. A, B: colony on MEA after 5d. C, G: sporangiophore, D, E: Collumela, F: Branched sporangiophore, H, I: spores. Scale bar = 10 μm.

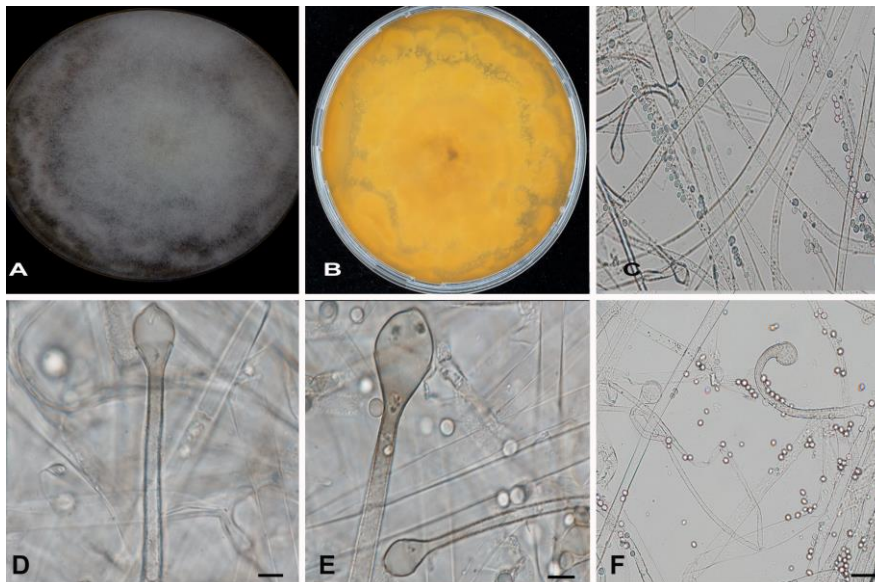


Fig 4- *Lichtheimia corymbifera*. A, B: colony on MEA after 5d. C, F: recurved sporangiophores, D, E: sporangiophores, Scale bar = 10 μm.

ریزوتید است. اتصالات زیگوسپور در دو سمت برابرند. اسپورانژیوفورها غیرمنشعب و طویل اند و قطر هر اسپورانژیوا به طور معمول به ۲۰۰ میکرومتر می رسد. در قارچ اکتینوموکور (تصویر ۳)، ریزوتید و استولن

می شوند. ساختار کلوملا دارای یقه است. همچنین apophysis حضور دارد و اتصالات زیگوسپور در هر دو سمت نابرابرند. در مقام مقایسه جنس موکور (تصویر ۲)، بدون یقه، استولن، apophysis و

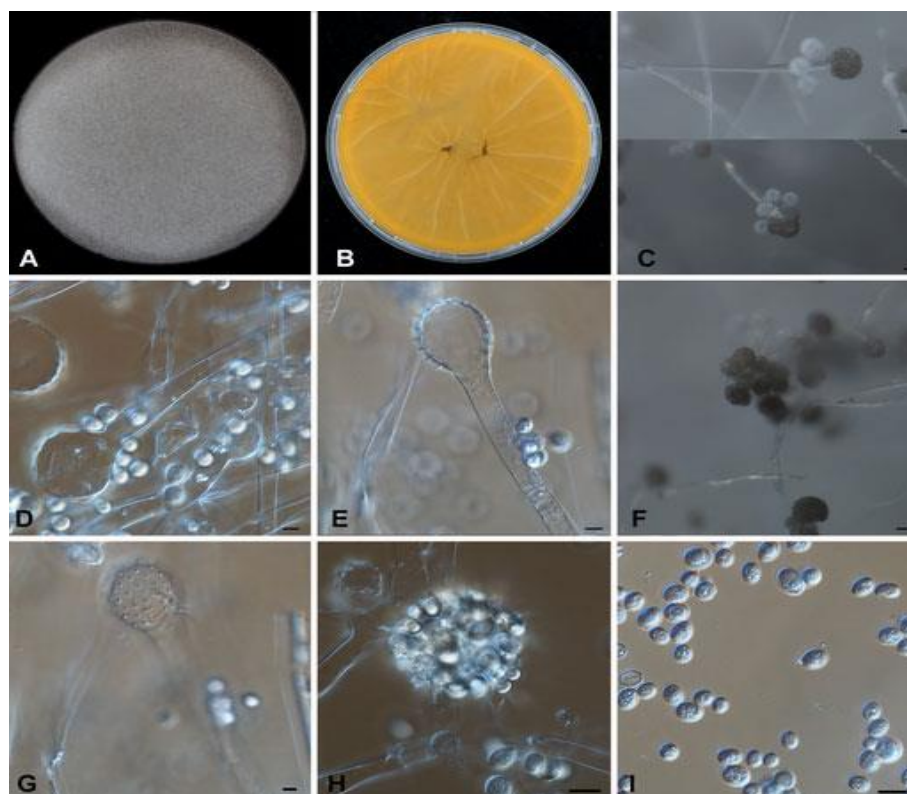


Fig 5: *Cunninghamella echinulata*. A, B: colony on MEA after 5d; C, F: spored sporangia, D, E, G: columella; H: sporangia; I: spores. Scale bar= 10 μ m.

درصد بین نمونهٔ مجهول و نمونه‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی به‌عنوان شناسایی نهایی در نظر گرفته شد. همچنین لازمهٔ شناسایی مولکولی ترسیم درخت فیلوژنتیکی است، از این رو شجرهٔ ژنی برای این نمونه‌ها رسم شد (تصویر ۶). بر این اساس گونه‌های مختلف به‌وضوح تفکیک‌پذیر بوده‌اند. طول توالی‌های ژنی به‌دست‌آمده در حدود ۶۵۰ جفت باز است. بر این اساس، در مجموع ۲۷ نمونه از راستهٔ موکورال‌ها جداسازی شده‌اند. در میان موکورال‌ها بیشترین نمونه‌ها مربوط به گونهٔ *Rhizopus* (n=19), *Mucor* (n=4), *Actinomucor* (n=2), *Lichtheimia* (n=1), *Cunninghamella* (n=1) است. میزان جداسازی نمونه‌های موکورال از میان جمع کل نمونه‌های قارچی، برابر با ۲۰/۶ درصد بوده است. در میان جنس *Rhizopus* دو گونهٔ *Stolonifer* (n=4) و *Arrhizus* (n=15) مشاهده می‌شوند. همچنین در مورد جنس *Mucor* گونهٔ

مشاهده می‌شود. اسپورانژیوفورها منشعب و اسپورانژیا شفاف‌اند. جنس لیختمیا (تصویر ۴)، دارای اسپورانژیوفورهای خمیده است. اسپورانژیا کوزه‌شکل است و در انتها نوک‌تیز می‌شود که مشخصهٔ این جنس است. اسپورانژیوفور شفاف، گاهی منشعب و دارای خمیدگی است. زیگوسپورها فاقد آرایش‌های سلولی‌اند. کانینگاملا (تصویر ۵)، دارای اسپورانژیولا است. این قارچ‌ها رشد سریع دارند و میسلیموم فاقد دیوارهٔ عرضی است. اسپورانژیول دارای اسپور قابل مشاهده است. اندازهٔ اسپورها ۲۰-۱۰ میکرومتر است. برای شناسایی دقیق‌تر و تعیین گونهٔ قارچی از روش مولکولی و تعیین توالی ناحیهٔ ژن ITS-rDNA استفاده شد. هر ۲۷ نمونه قارچ موکورال برای این مرحله مدنظر قرار گرفتند. توالی‌های ژنی به‌دست‌آمده با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی مرجع مقایسه شده و شباهت بیشتر از ۹۹

از این رو در این تحقیق از این ژن برای شناسایی نمونه‌ها استفاده شده است. براساس توالی‌های صورت گرفته، پنج گونه قارچی از میان راسته موکورال‌ها شناسایی شدند. در پژوهش‌های دیگر نیز قارچ‌های مختلفی از خانواده موکورال‌ها با قدرت زیست‌پالایی شناسایی شده‌اند. قدرت تجزیه Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) Purnomo *et al.*,) DDT, (Potin *et al.*, 2004) 2011)، آنتراسین (Krivibok *et al.*, 1998) از میان گونه‌های *Rhizopus arrhizus*, *Mucor* sp., *Actinomucor elegans*, *Pilaria caucasia* گزارش شده است. گونه *Mucor hiemalis* در تجزیه زنبوبیوتیک دارویی مانند استامینوفن دارای قابلیت بوده است (Esterhuizen-Londt *et al.*, 2016).

گونه *Cunninghamella echinulata* و *Rhizomucor variabilis* در تجزیه PAHs در مکان (*in situ*) به کار رفته است (Cutright 1995, Kim *et al.*, 2010) و گونه‌های *Mucor* در تجزیه نفت خام دخیل بوده‌اند (Li *et al.*, 2002). در میان دیگر خانواده‌های قارچی، قارچ‌های سیاه نیز از قابلیت زیست‌پالایی قدرتمندی برخوردارند. این قارچ‌ها می‌توانند هیدروکربن‌های آروماتیک فرار را تجزیه کنند (Isola *et al.*, 2013). جداسازی گونه‌های *Exophiala xenobiotica* از خاک‌های نفتی ایران و همچنین جداسازی گونه *E. dermatitidis* از خطوط ریلی آغشته به ماده کرزول در شمال ایران به‌تازگی گزارش شده است (Dolatabadi *et al.*, 2019). Yazdanparast *et al.*, 2017) توانایی قارچ *Mucor* در تجزیه این ماده نیز گزارش شده است (Atagana, 2003). گونه *E. xenobiotica* به‌وفور در خاک‌های غنی از

circinelloides (n=4) را در میان نمونه‌ها داریم. دیگر گونه‌های جداسازی شده *Actinomucor elegans*, *Lichtheimia corymbifera*. قارچ‌های به‌دست آمده در این مطالعه، به ترتیب مربوط به جنس *Alternaria* (n=24), *Aspergillus* (n=22), *Exophiala* (n=18), *Penicillium* (n=15), *Cladosporium* (n=9), *Fusarium* (n=4), *Rhodotorula* (n=4), *Aerobasidium* (n=1) بوده‌اند. گونه‌های بومی به‌دست آمده مرتبط با قارچ‌های موکورال تحت عنوان نام ایران در کلکسیون‌های هلند و لهستان ذخیره شده‌اند و شماره مرجع صادرشده در جدول ۱ مشاهده می‌شود.

۴. بحث

قارچ‌های موکورال را می‌توان از خاک‌های دارای آلودگی نفتی شدید جدا کرد که این ویژگی، نشان‌دهنده توان رشد این نمونه‌ها در محیط‌های دشوار، توان تولید آنزیم‌های ضروری برای بقا در این محیط‌ها، و قدرت زیست‌پالایی آنهاست. در پژوهش محققان لهستانی مشخص شده است که موکورال‌ها توانایی استفاده از ۹۵ منبع کربنی متفاوت را دارند (Pawlowska *et al.*, 2019). نمونه‌های جداسازی شده در این پژوهش به روش مورفولوژیکی و مولکولی از طریق تعیین توالی ناحیه ژن ITS و رسم شجره ژنی، به‌طور دقیق و در حد گونه شناسایی شدند. دسته‌بندی این قارچ‌ها براساس شاخصه‌های ظاهری سبب بی‌نظمی‌های زیادی در نامگذاری این قارچ‌ها بوده است، از این رو به‌منظور شناسایی دقیق باید از روش‌های مولکولی کمک گرفت. تعیین توالی این ژن قدرت شناسایی زیادی را برای گونه‌های موکورال‌ها ایجاد می‌کند (Walther *et al.*, 2013)؛

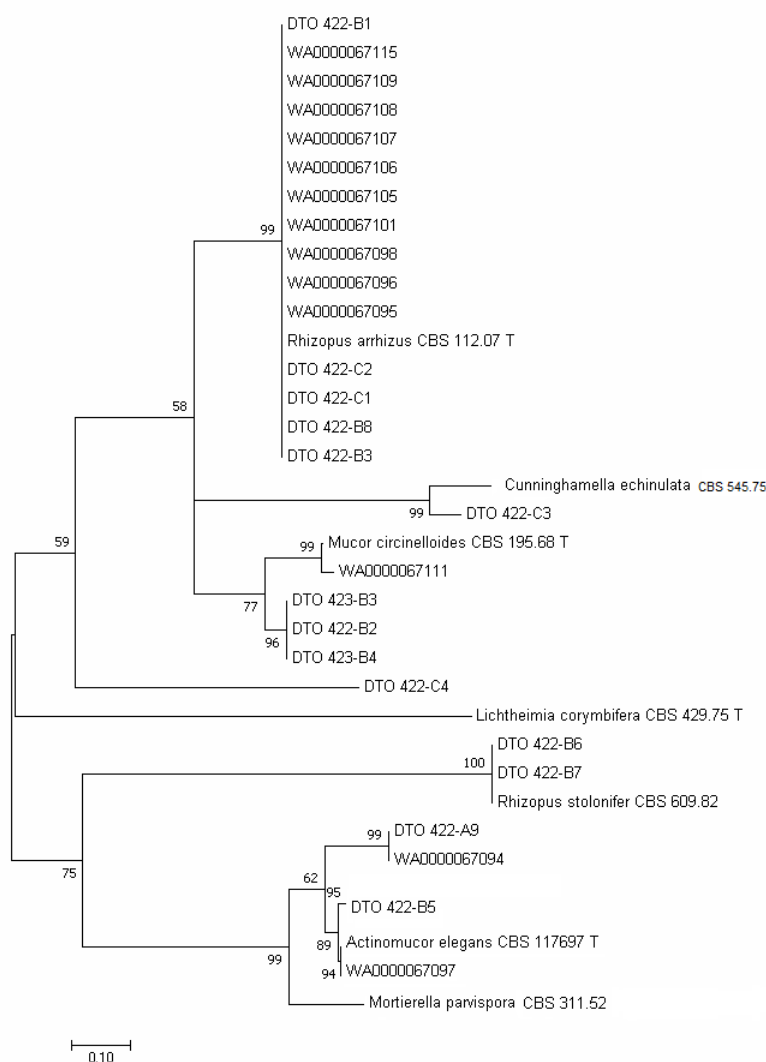


Fig 6- Maximum likelihood ITS phylogenetic tree. Bootstrap value higher than 70 are considered as supported branch.

نیکل و تولوین را دارد (Prenafeta Boldú *et al.*, 2006, Gadd, 2001). توانایی گونه‌های کلادیوفورا در تجزیهٔ تولوین و گونهٔ *Cladophialophora psammophila* در تجزیهٔ هیدروکربن‌های آروماتیک فرار (Badali *et al.*, 2011) گزارش شده است. از میان قارچ‌های رشته‌ای می‌توان به توان زیست‌پالایی گونه‌های فوزاریوم (*Fusarium* (*F. oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. incarnatum*) (Yanto, 2013)، پنی‌سیلیوم (*Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. pimizeouense*) (Alterna-
(*Alternaria*)

آلاینده‌های نفتی، هیدروکربن‌های حلقوی و آلکان‌ها حضور دار (Prenafeta Boldú *et al.*, 2006). دیگر گونه‌های اگزوفیالا که توانایی تجزیهٔ مواد زنبیوتیک را دارند، *E. heteromorpha*، *E. spinifera*، *E. jeanselmei* هستند (Gadd, 2001; de Hoog *et al.*, 2006) می‌تواند استیرن را تجزیه کند (Cox 1995). *Aurobasidium pullulans* به‌دلیل تولید مادهٔ پولولان (پلی‌ساکارید برون سلولی تجزیه‌پذیر) در صنعت حائز اهمیت است (de Hoog, 1994). *Cladosporium cladosporioides* توانایی رشد در مجاورت مس،

کار با این میکروارگانیسم‌ها در سطح صنعتی می‌افزاید. پژوهش‌های مختلفی در زمینه زیست‌پالایی قارچی در دیگر کشورها انجام گرفته است، اما پژوهش‌های مشابه درباره قارچ‌های موکورال در زمینه خاک‌های آلوده نفتی در ایران محدود است. جداسازی و شناسایی نمونه‌های بومی از مناطق آلوده، اولین گام در پاکسازی این محیط‌هاست. پس از شناسایی سویه‌های بومی می‌توان از ترکیب چند سویه به‌طور همزمان برای افزایش قدرت پالایش استفاده کرد (Qi, 2002). استفاده از قارچ‌ها در ساختار بیوفیلترها توسط دیگر محققان گزارش شده است (van Groenestijn et al., 2001). بیوفیلترهای استفاده‌شده برای حذف تولوین توسط de Mello (2010) گزارش شده است.

نتیجه‌گیری: گونه‌های جداشده از مناطق آلوده توانایی بالقوه در راستای حذف مواد آلوده را دارند. در این تحقیق به کاربرد قارچ‌های موکورال اشاره شده است. در مراحل بعدی می‌توان از روش‌های در مکان (*in situ*) و براساس طراحی بیوفیلترها از این نمونه‌ها استفاده کرد. از نتایج تحقیقات این‌چنینی می‌توان برای شناسایی گونه‌های بالقوه و طراحی بیوفیلترهای صنعتی توسط متخصصان داخلی و پاکسازی خاک‌های مناطق آلوده نفتی در ایران با استفاده از سویه‌های بومی استفاده کرد.

۵. تشکر و قدردانی

این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌الملل وزارت علوم، تحقیقات و فناوری انجام گرفته است.

malorum اشاره کرد. *P. chrysogenum* توانایی حذف یون‌ها از ضایعات چوبی (Leitão, 2009) و هیدروکربن‌های آلیفاتیک (Dos Santos et al., 2008) و نیز بخارات استیرن (Prenafeta Boldú et al., 2006) را دارد. *F. oxysporum* قادر به پاکسازی خاک آلوده به PAH است (Potin et al., 2004) از میان گونه‌های آسپرژیلوس، گونه *Aspergillus terreus* می‌تواند فلزات سنگین و اندوسولفان را حذف کند (Dias et al., 2002; Mukherjee, 2005).

در تحقیقات انجام‌گرفته در ایران، در پژوهش منطقه شازند اراک، گونه *Fusarium* به‌عنوان گونه توانمند در پاکسازی مواد نفتی معرفی شده است (Moghimi et al., 2017). حذف سیانید توسط پنی‌سیلیوم (Shahabi Nejad et al., 2019)، حذف نفت خام توسط *Aspergillus* (Mohsenzadeh et al., 2016) و حذف دینزوتیوفن توسط قارچ *E. spinifera* (Elmi et al., 2016) گزارش شده است.

از میان قارچ‌های موکورال گونه *Mucor circinelloides* به‌عنوان جدایه تحمل‌کننده نمک و قارچی توانمند در حذف زیستی خاک‌های شور آلوده به نفت گزارش شده است (Heidarytabar et al., 2017).

با توجه به رشد زیاد قارچ‌های موکورال و توان آنزیمی وسیع این گروه از قارچ‌ها در این پژوهش بر جداسازی این گروه از قارچ‌ها از نمونه خاک‌های آلوده به مواد نفتی تمرکز شده است. همچنین تولید سموم قارچی در میان این گروه رایج نیست و این امر بر سهولت

References

- Abe, A., Oda, Y., Asano, K., Sone, T., 2007. *Rhizopus delemar* is the proper name for *Rhizopus oryzae* fumaric-malic acid producers. *Mycologia* 99, 714-722.
- Adeli, H.R., Zare, K., Naimi, N., Alamdar, M., 2016. Changes in lung tissue and white blood cells due to toluene. *Journal of Jahrom University of Medical Sciences* 14, 1
- Atagana, H.I., 2003. Bioremediation of creosote-contaminated soil: a pilot-scale land farming evaluation. *World Journal of Microbiological Biotechnology* 19, 571-581
- Badali, H., Prenafeta-Boldu, F.X., Guarro, J., Klaassen, C.H., Meis, J.F., de Hoog, G.S., 2011. *Cladophialophora psammophila*, a novel species of Chaetothyriales with a potential use in the bioremediation of volatile aromatic hydrocarbons. *Fungal Biology* 115(10), 1019-29.
- Battaglia, P., Andaloro, F., Esposito, V., Granata, A., Guglielmo, L., Guglielmo, R., Musolino, S., Romeo, T., Zagami, G., 2016. Diet and trophic ecology of the lanternfish *Electrona risso* (Cocco 1829) in the Strait of Messina (central Mediterranean Sea) and potential resource utilization from the Deep Scattering Layer (DSL). *Journal of Marine Systems* 159:100-8.
- Cox, H.H.J., 1995. Styrene removal from waste gas by the fungus *Exophiala jeanselmei* in a biofilter. PhD Thesis, University of Groningen, Groningen, the Netherland
- Cutright, T.J., 1995. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and kinetics using *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 35, 397-408.
- de Hoog, G.S., Yurlova, N.A., 1994. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. *Antonie van Leeuwenhoek* 65(1), 41-54.
- de Hoog, G.S., van den Ende, A.G., 1998. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes: Molekulare Diagnostik klinischer Stämme filamentöser Basidiomyzeten. *Mycoses* 41(5- 6), 183-9.
- de Hoog, G.S., Zeng, J.S., Harrak, M.J., 2006. *Exophiala xenobiotica* sp. nov., an opportunistic black yeast inhabiting environments rich in hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek* 90, 257-268.
- de Hoog, G.S., Guarro, J., Gené J., Figueras, M.J., 2009. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1124 pp., Utrecht/Reus.
- de Mello, J.M.M., de Lima Brandão, H., de Souza, A.A.U., da Silva, A., Ulson, S.M., 2010. Biodegradation of BTEX compounds in a biofilm reactor-modeling and simulation. *Journal of Petroleum Science and Engineering* 70(1-2), 131-139.
- Dias, M.A., Lacerda, I.C., Pimentel, P.F., deCastro, H.F., Rosa, C.A. 2002. Removal of heavy metals by an *Aspergillus terreus* strain immobilized in polyurethane matrix. *Letters in Applied Microbiology* 34(1), 46-50.
- Dolatabadi, S., de Hoog, G. S., Meis, J. F., Walther, G., 2014a. Species boundaries and nomenclature of *Rhizopus arrhizus* (syn. *R. oryzae*). *Mycoses* 57(s3), 108-127.
- Dolatabadi, S., Walther, G., Gerrits, A.H.G., de Hoog, G.S., 2014b. Diversity and delimitation of *Rhizopus microsporus*. *Fungal Divers* 64: 145-163
- Dolatabadi, S., 2015. Mucorales between food and infection. Universiteit van Amsterdam
- Dolatabadi, S., Scherlach, K., Figge, M., Hertweck, C., Dijksterhuis, J., Menken, S.B., de Hoog, G.S. 2016. Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue?. *Fungal Biology* 120(3), 393-401.
- Dolatabadi, S., Rezaei-Matehkolaei, A., Pawlowska, J., Hosseini, S.A., Najafzadeh, M.J., Madrid, H., 2019. Chaetothyrialean fungi from aromatic hydrocarbon polluted environments of Iran. *Nova Hedwigia* 108(3-4), 405-26.

- Dos Santos, E.O., Da Rosa, C.F.C., Dos Passos, C.T., Sanzo, A.V.L., De Medeiros Burkert, J.F., Kalil, S.J., Burkert, C.A.V., 2008. Pre-screening of filamentous fungi isolated from a contaminated site in Southern Brazil for bioaugmentation purposes. *African Journal of Biotechnology* 7, 1314-1317.
- Esterhuizen-Londt, M., Schwartz, K., Pflugmacher, S., 2016. Using aquatic fungi for pharmaceutical bioremediation: uptake of acetaminophen by *Mucor hiemalis* does not result in an enzymatic oxidative stress response. *Fungal Biology* 120, 1249-1257
- Guimarães, L.H.S., Peixoto-Nogueira, S.C., Michelin, M., Rizzatti, A.C.S., Sandrim, V.C., Zanoelo, F.F., Aquino, A.C.M.M., Junior, A.B., Polizeli, M.L.T.M., 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology* 37, 474-480
- Hermet, A., Méheust, D., Mounier, J., Barbier, G., Jany, J.L. 2012. Molecular systematics within the genus *Mucor* with special regard to species encountered in cheese. *Fung Biol* 116: 692–705
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Lumbsch, H.T., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111(5), 509-547
- Hölker, U., Bend, J., Pracht, R., Müller, T., Tetsch, L. de Hoog, G.S., 2004. *Hortaea acidophila*, a new acidophilic black yeast from lignite. *Antonie van Leeuwenhoek* 86, 287-294
- Isola, D., Selbmann, L., de Hoog, G.S., Fenice, M., Onofri, S., Prenafeta-Boldú, F.X., 2013. Isolation and screening of black fungi as degraders of volatile aromatic hydrocarbons. *Mycopathologia* 175(5-6), 369-379.
- Iwatsu, T., Miyaji, M., Okamoto, S. 1981. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosi* from nature in Japan. *Mycopathologia* 75, 149-158
- Kim, M.J., Lee, H., Choi, Y.S., Kim, G.H., Huh, N.Y., Lee, S., Lim, Y.W., Lee, S.S., Kim, J.J., 2010. Diversity of fungi in creosote-treated cross-tie wastes and their resistance to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97(4), 377-87.
- Krings, M., Taylor, T.N., Dotzler, N., 2013. Fossil evidence of the zygomycetous fungi. *Persoonia* 30, 1-10.
- Krivibok, S., Miriouchkine, E., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J.L., 1998. Biodegradation of Anthracene by Soil Fungi. *Chemosphere* 31(3), 523-530
- Lee, Y.L., Pai, M.C., Chen, J.H., Guo, Y., 2003. Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occupational Medicine* 53(7), 479-82
- Leitão, A.L., 2009. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 6, 1393-1417
- Li, P., Sun, T., Stagnitti, F., Zhang, C., Zhang, H., Xiong, X., Allinson, G., Ma, X., Allinson, M., 2002. Field-scale bioremediation of soil contaminated with crude oil. *Environmental Engineering Science* 19(5), 277-289.
- Lors, C., Damidot, D., Ponge, J., Perie, F., 2012. Comparison of a bioremediation process of PAH in a PAH contaminated soil at field and laboratory scales. *Environmental Pollution* 165, 11-17
- Masclaux, F., Guého, E., de Hoog, G.S., Christen, R., 1995. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (*Xylohypha*) species inferred from partial LS rRNA sequences. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 33(5), 327-38.
- Moghimi, H., Hasani Zadeh, P., Hamed, J., Heidarytabar, R., Azin, E., 2017. Introduction of *Fusarium* sp. UTMC 5039 as a potent fungal strain for biosurfactant production and evaluation of its potential for crude oil bioremediation. *Biological Journal of Microorganism* 6(23), 19-33.
- Mukherjee, I., Mitta, A., 2005. Bioremediation of Endosulfan using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bulletin of*

- Environmental Contamination and Toxicology 75, 1034-1040
- Pawłowska, J., Okraśńska, A., Kisło, K., Aleksandrak-Piekarczyk, T., Szatraj, K., Dolatabadi, S., Muszewska, A. 2019. Carbon assimilation profiles of mucoralean fungi show their metabolic versatility. *Scientific Reports* 9(1), 1-8
- Potin, O., Rafin, C., Veignie, E., 2004. Biodegradation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 45-52
- Prenafeta Boldú, F.X., de Hoog, G.S., Summerbell, R.C., 2006. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard. *FEMS Microbiology Review* 30: 109-130
- Prenafeta-Boldú, F., Ballerstedt, H., Gerritse, J., Grotenhuis, J., 2004. Bioremediation of BTEX hydrocarbons: effect of soil inoculation with the toluene-growing fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Biodegradation* 15(1), 59-65
- Purnomo, A.S., Mori, T., Kamei, I., Kondo, R., 2011. Basic studies and applications on bioremediation of DDT: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(7), 921-930
- Qi, B., Moe, W., Kinney, K., 2002. Biodegradation of volatile organic compounds by five fungal species. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58(5), 684-689
- Singh, R., Majumdar, R.S.J.R. 2019. *Bioinformatics RAJo. Comparative Study on Bioremediation for Oil Spills Using Microbes* 4(1), 16-24
- Van Groenestijn, J.W., van Heiningen, W.N.M., Kraakman, N.J.R., 2001. Biofilters based on the action of fungi. *Water Science Technology* 44, 227-232.
- Walther, G., Pawłowska, J., Alastruey-Izquierdo, A., Wrzosek, M., Rodriguez-Tudela, J.L., Dolatabadi, S., Chakrabarti, A., de Hoog, G.S., 2013. DNA barcoding in Mucorales: an inventory of biodiversity. *Persoonia* 30, 11-47
- Walther, G., Wagner, L., Kurzai, O., 2019. Updates on the taxonomy of Mucorales with an emphasis on clinically important taxa. *Journal of Fungi* 5(4), 106.
- William, S., Feil, H., Copeland, A., 2012. Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. *Sigma* 50(6876).
- Yanto, D.H.Y., Tachibana, S. 2013. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by a newly isolated *Pestalotiopsis* sp. NG007. *International Biodeterioration & Biodegradation* 85, 438-450
- Yazdanparast, S.A., Mohseni, S., de Hoog, G.S., Aslani, N., Sadeh, A., Badali, H., 2017. Consistent high prevalence of *Exophiala dermatitidis*, a neurotropic opportunist, on railway sleepers. *Journal de Mycologie Médicale* 27(2), 180-187.