مجله دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۳، شماره ۲، ۱۳۹۱ (۲۷۴-۲۶۱)

مطالعه اثرات غلظت های مختلف عناصر مس، منگنز و نیکل در رشد و اسپورزایی برخی از گونه های جنس *Trichoderma*

علی خدایی[1*]، اسداله بابای اهری[2] و مهدی ارزنلو[3]
۱، ۲، ۳، دانشجوی دوره دکتری ، استاد، استادیار، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱ – تاریخ تصویب: ۹۱/۷/۱۱)

چکیده

به منظور ارزیابی اثر غلظت های مختلف عناصر مس، منگنز و نیکل روی رشد و اسپورزایی گونه های *Trichoderma* شامل *T. harzianum*، *T. longibrachiatum* و *T. tomentosum* آزمایشی در دمای ۲±۲۵^{oC} روی محیط کشت عصاره خاک آگار با پنج تکرار در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت. نتایج آزمایش نشان داد که پس از ۷۲ ساعت تیمار شاهد در بین سه گونه فوق گونه *T. longibrachiatum* بیشترین مقدار رشد به میزان (٤٧/٧٨mm) را داشت. ۷۲ ساعت پس از کشت، عنصر نیکل در کمترین غلظت خود (۲۰ppm) نه تنها اثر بازدارندگی روی گونه *T. longibrachiatum* نداشت، بلکه سبب افزایش رشدی ۷٪ آن نیز شد. در این آزمایش غلظت بازدارندگی ۵۰٪ (IC_{50}) برای عناصر مس و نیکل در مورد گونه *T. tomentosum* پس از ۹٦ ساعت برابر ۳۲/۲۲ppm تعیین شد. بررسی تاثیر این عناصر بر اسپورزایی گونه های آزمایشی در روی محیط کشت عصاره خاک نشان داد که حضور مس، منگنز و نیکل در غلظت های مختلف باعث افزایش اسپورزایی گونه های *Trichoderma* می شود. همچنین مقایسه میزان جذب فلزات سنگین نشان داد که این پارامتر نه تنها به گونه قارچی بلکه به نوع فلز و حتی غلظت آن نیز بستگی دارد و بیشترین میزان جذب آنها در تیمار ۱۰۰۰ppm منگنز و بوسیله گونه *T. tomentosum* پس از ۷ روز صورت گرفت.

واژه های کلیدی: زیست توده قارچی، غلظت بازدارندگی ۵۰ درصدی، فلزات سنگین، میزان رشد

مقدمه

خاک از نظر بیولوژیکی یک محیط پیچیده است، محیطی که حجم عظیمی از میکروارگانیسم ها در آن وجود دارد و نمی توان از آن صرف نظر کرد. اهمیت میکروارگانیسم ها، وابسته به توانایی آنها در تبدیل بقایای گیاهی و حیوانی به ترکیبات ساده تر است که مجدداً به چرخه اکوسیستم وارد می شود. علاوه براین اساساً آنها مسئول فرایندهای تغییرشکل زیستی [1] و تجمع زیستی ریزمغذی ها[2] و یا آلاینده های فلزی موجود در خاک می باشند (Giovanna *et al*., 2002).

گونه‌های جنس *Trichoderma* آنتاگونیست های مهم قارچ‌های بیمارگر گیاهی هستند و برعلیه قارچ های بیمارگر و میکروارگانیسم های خاکزی مثل

1. Bio-transformation
2. Bio-accumulation of micronutrient

* نویسنده مسئول: علی خدایی تلفن: ۰۹۱۴۹۲۰۴۴۸۵ E-mail: khd_l@yahoo.com

Rhizoctonia solani Kühn که عامل پژمردگی گیاهچه در چندین گیاه می‌باشد، عمل می‌نمایند (Agrios, 2005; Apablaza, 2000). گونه های *Trichoderma* می‌توانند قارچ‌های بیمارگر گیاهی را از طریق رقابت برای فضا و غذا و یا از طریق آنتی بیوزیس و یا متابولیت های قابل انتشار که شرایط خاک را تغییر داده و باعث رشد و تحریک مکانیسم‌های دفاع گیاهی می شوند، کنترل نمایند. علاوه براین، آن‌ها حتی می‌توانند اثر تشدید کننده روی رشد گیاهان داشته باشند (Naseby *et al*., 2000). نتیجه حضور فلزات سنگین به عنوان فاکتور تنش روی گونه های *Trichoderma* مورد آزمایش قرار گرفته‌است (Kredics *et al*., 2001).

همانند اغلب عوامل کنترل بیولوژیکی (BCAs[1])، گونه های *Trichoderma* می‌توانند به صورت کنیدی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا اسپورهای این قارچ ها برعکس کلامیدوسپور و میسلیوم آن‌ها به عنوان پروپاگول های میکروبی در طی فرمولاسیون و بکارگیری در مزرعه در برابر شرایط مختلف محیطی از میزان تحمل بالاتری برخوردار هستند (Amsellem *et al*., 1999). همچنین گونه‌های *Trichoderma* به علت تولید متابولیت هایی که غنی از آنزیم‌های پراکسیداز و لاکاز هستند، در زیست پالایی ترجیح داده می‌شوند (Katamaya & Matsumura, 1991; Karam & Nicell, 1997). در حالت کلی تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که گونه‌های *Trichoderma* غالباً به عنوان عوامل قارچ کش های بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. اولین گزارش در این مورد توسط (Coley-Smith *et al*., 1974) بود که با استفاده از برش‌های میکروتومی نشان دادند که مدولای آلوده اسکلروت های *Sclerotium dolphin* Welch توسط کلامیدوسپور و هیف *T. hamatum* Rifai کاملاً جایگزین شده است. همچنین (Henis *et al*., 1982) مایکوپارازیت بودن (نفوذ و آلوده سازی) گونه‌های *Trichoderma* برعلیه *S. rolfsii* Sacc را گزارش کرده اند. گونه های *Trichoderma* در کنترل بیماری های خاکزاد به عنوان عوامل بیوکنترل موفق از اهمیت قابل توجهی برخوردارند و به دلیل اینکه در همه جا حضور دارند، به عنوان یک مدل خوب برای مطالعه کنترل بیولوژیکی مطرح بوده اند، جداسازی و کشت آن ها راحت تر بوده و سریعاً روی خیلی از بسترها رشد می کنند، همچنین روی طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی بعنوان مایکوپارازیت عمل می کنند، همچنین این قارچ ها بندرت روی گیاهان عالی ایجاد عارضه کرده و بخوبی برای غذا و فضا رقابت می کنند. این قارچ ها انواع آنتی بیوتیک ها را تولید نموده و دارای سیستم آنزیمی می باشند که قادرند روی طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی اثر نمایند (Islam *et al*., 2008).

بکارگیری قارچ ها برای زیست پالایی[2] خاک های آلوده با آلاینده ها یک روش نسبتاً قدیمی است. بعنوان مثال مدارک فراوانی از مشارکت گونه های مختلف *Trichoderma* در تجزیه هیدروکربن های آروماتیک حلقوی[3](PAHs) وجود دارد (Azcbn-Aguilar & Barea, 1997). آلودگی خاک ها به فلزات سنگین امروزه بسیار متداول شده است، این نوع آلودگی خاک ها عملکرد میکروارگانیسم ها را تحت تاثیر قرار داده و در ساختار جمعیتی آن ها جایگزین هایی را بوجود می آورد. برابر گزارشات موجود قارچ های رشته ای تحمل قابل ملاحظه تری را نسبت به سایر میکروارگانیسم ها در برابر فلزات سنگین نشان داده اند و حتی در بعضی از زیستگاه های آلوده به فلزات سنگین به ارگانیسم های رایج تبدیل گشته اند (Martino *et al*., 2000). همچنین از قارچ ها بعنوان تجمیع کنندگان سطوح بالای فلزات نام برده شده است (Morely & Gadd, 1995). این ویژگی که ارگانیسم ها بتوانند در زیستگاه های آلوده رشد نموده و پیوندهای احتمالی با فلزات سنگین در محیط های طبیعی برقرار نمایند و آنها را از فاضلاب ها و سایر بسترهای آبی خارج نمایند، اهمیت زیادی دارد (Gadd, 1989). در اکوسیستم های طبیعی میکروارگانیسم ها غالباً نه با یک نوع فلز بلکه با چندین فلز سنگین مواجه می شوند، بنابراین تحمل در برابر ترکیبی از فلزات برای بقای قارچ ها و نیز کاربرد آن درصنعت اهمیت زیادی دارد. توانایی میکروارگانیسم ها

1. Biological Control Agents

2. Bioremediation

3. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

مخصوصاً قارچ ها و باکتری ها در تعامل با فلزات از طریق پدیده جذب بخوبی شناخته شده است (Gadd, 1989 & 1993; Roggio *et al*., 1996; Sanna *et al*., 1997). حضور فلزات سنگین در طبیعت بسیار رایج است، به عنوان مثال نیکل در همه جای طبیعت حضور دارد (Byle & Robinson, 1988). این فلز بطور طبیعی در خاک، نمک های دریایی، خاکسترهای آتشفشانی و ذرات دود آتش سوزی های جنگل به شکل سولفیدها (Sulfides)، آرسنیدها (Arsenides)، آنتیمونیت ها (Antimonides) و اکسیدها (Oxides) دیده می شود (Tripathi & Srivastava, 2007). سطوح سمی نیکل از طریق کاهش سنتز پروتئین و RNA (Puckett *et al*., 1979) مانع رشد و اسپوردهی قارچ های رشته ای مختلف و مخمرها (Babich & Stotzky, 1982) می شود. با این حال بعضاً توانایی میکروارگانیسم ها برای جذب فلزات نیز ثابت شده است (Gadd, 1993 ; Preetha & Viruthagiri, 2005). ارگانیسم های مختلف نظیر قارچ ها (Kogei & Pavko, 2001) در برابر فلزات سنگین متحمل بوده و قادرند آنها را از محیط جذب و خارج نمایند. به عنوان مثال قارچ ها از طریق مکانیسم های مختلف مانند انتقال ظرفیتی، رسوب داخل یا خارج سلولی و جذب فعال بعنوان تجمع کنندگان این فلزات شناخته شده اند. این موجودات قادرند خاصیت سمی فلزات سنگین را از بین برده و یا خاصیت سم زدایی در خاک های آلوده داشته باشند (Birch & Bachofen, 1990; Joho *et al*., 1995). در چندین مطالعه قابلیت جذب فلزات سنگین توسط قارچ های مختلف از جمله *Mucor rouxii* Calm (Yan & Viraraghavan, 2000) و *Aspergillus niger* Tiegh (Tereshina *et al*., 1999) مورد تحقیق قرار گرفته است، اما متاسفانه هنوز داده های کافی و قابل دسترس در مورد ظرفیت جذب فلزات سنگین توسط *T. harzianum* وجود ندارد. افزودن فلزات سنگین به خاک در مطالعات سم شناسی اکولوژیکی[1] آزمایشگاهی باعث کاهش مقدار زیست توده میکروبی و تغییر ساختار جمعیتی می شود (Zelles *et al*., 1994). امروزه شواهد مستند قابل توجهی حاکی از کاهش زیست توده میکروبی خاک در اثر قرارگیری طولانی مدت در معرض آلودگی فلزات سنگین ناشی از بکارگیری لجن فاضلاب ها وجود دارد. تجزیه و تحلیل خاک های آلوده به فلزات سنگین ناشی از سایر منابع آلودگی نظیرکاربرد قارچکش های حاوی مس (Zelles *et al*., 1994) و خاکهای مجاور مکان هایی که تجهیزات نظامی آلوده به فلزات سنگین در آنها رها می گردد (Kuperman & Carreiro, 1997)، کاهش زیست توده میکروبی را حتی در غلظت های کم تر ثابت کرده است (Dahlin *et al*., 1997).

تکنیک های مرسومی که عموماً برای خارج کردن فلزات سنگین از پساب ها مورد استفاده قرار می گیرند، شامل روش های شیمیایی (رسوب دادن و خنثی کردن) و فیزیکی (تغییر یونی، تفکیک غشایی، الکترودیالیز و جذب کربن فعال) می باشند (Atkinson *et al*., 1998; Matheickal *et al*., 1987). این فرایندها عموماً در خارج کردن فلزات از محلول هایی با غلظت متوسط و بالا کارآ هستند. اما روشن است که بعضی از فرایندهای شیمیایی مقدار زیادی از رسوبات فلزی را تولید نموده و وارد محیط زیست می کنند که بازیافت آنها بسیار مشکل می باشد، به همین سبب نیز باعث افزایش آلودگی محیط زیست می گردند (Guibal *et al*., 1992). با توجه به افزایش روزافزون آلودگی به فلزات سنگین در اثر منابع مختلف و وارد شدن آنها در جیره غذایی انسان و نیز بعلت حضور گونه های *Trichoderma* در اکثر خاک ها و قابلیت آنها در جذب و خارج کردن این فلزات، در تحقیق حاضر تاثیر چهار غلظت مختلف از سه عنصر مس، منگنز و نیکل در روی رشد و اسپورزایی سه گونه از جنس *Trichoderma* مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

تهیه غلظت های مختلف عناصر

برای تعیین غلظت آزمایشی عناصر از جدول (۱) که نشان دهنده حداقل و حداکثر غلظت های عناصر مس، منگنز و نیکل در خاک است، استفاده شد و سپس چهار غلظت برای هر کدام از عناصر (غلظتی کمتر از حداقل، حداقل غلظت، حداکثر غلظت و غلظتی بیشتر از حداکثر) مشخص گردید. در نهایت غلظت های آزمایشی به صورت، عنصر مس ($CuCl_2$, $2H_2O$) (محصول

1. Ecotoxicological

شرکت Merck آلمان) و با غلظت های ۳۰، ۶۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ پی پی ام، عنصر منگنز ($MnCl_2$, $4H_2O$) (محصول شرکت J- HD چین) و با غلظت های ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۳۵۰۰ پی پی ام، عنصر نیکل ($NiCl_2$, $6H_2O$) (محصول شرکت Scharlau اسپانیا) و با غلظت های ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ پی پی ام در نظر گرفته شدند.

جدول ۱- غلظت های عناصر سنگین در خاک ها (Alloway, 1995)

عنصر	دامنه معمولی عنصر در خاک ها (mg/kg)	غلظت های بحرانی عناصر در خاک ها*(mg/kg)
مس	۲-۲۵۰	۶۰-۱۲۵
منگنز	۲۰-۱۰۰۰۰	۱۵۰۰-۳۰۰۰
نیکل	۲-۷۵۰	۱۰۰

*- غلظت های بحرانی عناصر در خاک مقادیری از عناصر هستند که بالاتر از آن مقادیر، امکان سمیت آنها وجود دارد.

تهیه گونه های قارچی مورد آزمایش

گونه های قارچی (*T. harzianum* Rafai, *T. longibrachiatum* Rafai, *T. tomentosum* Bissett) برای انجام این تحقیق از آزمایشگاه بیماری های گیاهی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه تهیه شدند. این گونه ها قبلاً از خاک های استان مازندران جداسازی شده بودند.

تهیه محیط کشت

در این آزمایش برای ایجاد حداکثر شباهت با شرایط حاکم بر محیط طبیعی از محیط کشت عصاره خاک آگار (SEA[1]) استفاده گردید. برای این منظور روی ۲۰۰ گرم از خاک زراعی یک لیتر آب مقطر اضافه شد و پس از مدت ۴۸ ساعت سوسپانسیون حاصل با استفاده از یک پارچه ململ عصاره گیری و حجم محلول با استفاده از آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و سپس روی آن ۱۵ گرم آگار اضافه گردید. محلول فوق بعد از افزودن غلظت های مورد نظر از سه عنصر مس، منگنز و نیکل در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی متر مربع درون اتوکلاو سترون شده و در تشتک های پلاستیکی یکبار مصرف سترون ریخته شد. لازم به یادآوری است که در بررسی اثر غلظت عناصر روی اسپورزایی از محیط کشت مایع عصاره خاک (SE) فاقد آگار استفاده شد.

طراحی آزمایش

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به صورت زیر اجرا گردید.

اثرغلظت فلزات سنگین بر رشد پرگنه گونه های قارچی

در این آزمایش هر یک از گونه های قارچی در تشتک های حاوی محیط کشت عصاره خاک آگار توام با غلظت های مختلف عناصر مورد آزمایش کشت شدند، بدین صورت که داخل هود سترون با استفاده از چوب پنبه سوراخ کن[2] سترون شده قرص های پنج میلی متری از کنار پرگنه های یک هفته ای از گونه های مورد آزمایش تهیه شد و قرص ها با استفاده از سوزن سترون در مرکز تشتک ها قرار داده شدند و در نهایت تشتک های تهیه شده درون انکوباتور با دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. این آزمایش با ۴۲ تیمار (شامل سه سطح قارچ *Trichoderma*، سه سطح عنصر، چهار سطح از هر عنصر، تیمار شاهد و یک سطح دارای هر سه عنصر (مس با غلظت ۱۲۵، منگنز با غلظت ۳۰۰۰ و نیکل با غلظت ۱۰۰ پی پی ام) و با پنج تکرار انجام شد. رشد شعاعی گونه های *Trichoderma* (گسترش هیفی) ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت بعد از تهیه با استفاده از خط کش اندازه گیری و ثبت گردید. میزان ممانعت از رشد شعاعی براساس قطر پرگنه و با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Sundar *et al.* (1995) مورد ارزیابی قرار گرفت.

$$PI = \left[\left(X - \left(\frac{Y}{X}\right)\right) * 100\right]$$ (درصد ممانعت از رشد)

که در آن X برابر میانگین رشد شعاعی (برحسب میلی متر) در تشتک شاهد و Y میانگین رشد شعاعی (برحسب میلی متر) در تیمارها می باشد. برای تعیین

1. Soil Extract Agar

2. Cork Borer

سرعت رشد گونه های جنس *Trichoderma* در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، تفاوت قطر کلنی در ۲۴ ساعت اول و دوم بر عدد ۲۴ تقسیم شد.

اثر غلظت فلزات سنگین روی اسپورزایی، جذب عناصر مس، منگنز و نیکل توسط گونه های *Trichoderma* و تاثیر فلزات سنگین برروی زیست توده قارچی

این آزمون بدین شکل انجام گرفت که بعد از تهیه محیط کشت مایع عصاره خاک(SE[1]) و افزودن غلظت های مورد نیاز از عناصر آزمایشی مقدار ۲۰ میلی لیتر از محیط فوق درون ظروف ارلن مایر ۵۰ میلی لیتری ریخته شده، سپس ارلن ها در دمای ۱۲۱°C و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی مترمربع به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند، بعد از سرد شدن محیط کشت از حاشیه پرگنه های یک هفته ای گونه های *Trichoderma* که روی PDA کشت شده بودند، قرص هایی به قطر۱۰ میلی متر برداشته شده و به ارلن مایرهای حاوی۲۰ میلی لیتر از محیط SE (هر ارلن مایر یک قرص) منتقل گردیدند. ارلن ها روی یک شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. اسپورزایی گونه های مختلف در معرض غلظت های متفاوت فلزات مورد آزمایش هشت روز پس از کشت با استفاده از لام هموسیتومتر بدین صورت مورد شمارش قرار گرفت که بعد از قرار دادن یک لامل روی قسمت مربوطه در لام هموسیتومتر بعد از بهم زدن محیط کشت مایع (برای یکنواخت شدن آن)، یک قطره از آن در محل مخصوص تزریق شده و سپس با استفاده از میکروسکوپ تعداد اسپورهای موجود در پنج مربع از ۲۵ مربع مرکز لام (مربع های چهار گوشه و مربع مرکزی) شمارش شده و در آخر مجموع اسپورهای شمارش شده در عدد ۵۰۰۰۰ ضرب گردید تا تعداد کلی اسپور موجود در هر میلی لیتر از محیط مایع بدست آید. شمارش تعداد اسپورها برای هر تیمار سه مرتبه انجام شد. برای محاسبه IC_{50} بدین صورت عمل شد که با توجه میزان بازدارندگی غلظت های مختلف هر عنصر، میزان بازدارندگی ۵۰٪ آن عنصر با کمک نسخه ۹/۱ نرم افزار SAS محاسبه گردید.

جذب عناصر آزمایشی با استفاده از روش جذب اتمی بصورت زیر اندازه گیری شد

بعد از استاندارد کردن دستگاه با تزریق محلول های حاوی غلظت های مشخص از فلزات در آن، محیط های کشت مایع حاوی قارچ، درون آن تزریق شده و سپس مقدار باقیمانده از فلز در محیط کشت مشخص شده و بعد کسر عدد بدست آمده از غلظت اولیه، مقدار جذب شده از عنصر بدست آمد.وزن زیست توده خشک قارچی هشت روز پس از کشت بعد از صاف کردن محیط کشت مایع با استفاده از کاغذ صافی و خشک کردن محتوای روی کاغذ صافی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سلسیوس تعیین گردید.در هر دو آزمایش میانگین داده ها با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) توسط آزمون حداقل تفاوت معنی دار (LSD[2]) در سطح احتمال پنج درصد به کمک نسخه ۹/۱ نرم افزار SAS مورد مقایسه قرار گرفت و ترسیم نمودارهای مربوطه با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

اثر غلظت فلزات سنگین در رشد پرگنه گونه های قارچی

نتایج آزمایش اثر غلظت فلزات سنگین روی رشد پرگنه گونه های قارچی در جداول (۴-۲) و نمودارهای (۴-۱) آمده است (لازم به ذکر است که فقط تیمارهای دارای رشد در نتایج آورده شده اند). براساس جدول (۲) گونه *T. longibrachiatum* در بین سه گونه مورد آزمایش دارای رشد سریع تری بوده و در ۷۲ ساعت اول پس ازکشت بیشترین قطر پرگنه (۴۸,۷۸ mm) در این گونه ثبت شد، در حالی که در همین مدت گونه *T. harzianum* در بین سه گونه مذکور از کمترین قطر پرگنه (۱۰,۰۶ mm) ثبت شده برخوردار بود. مطابق جدول فوق در ۷۲ ساعت اول پس از کشت، گونه های جنس *Trichoderma* فقط در هشت تیمار از ۴۲ تیمار آزمایشی، به غیر از تیمارهای شاهد، رشد کردند. در بین تیمارهایی که رشد قارچی مشاهده گردید، غلظت ۲۰ppm نیکل کمترین اثر بازدارندگی (قطر پرگنه mm

1. Soil Extract

2. Least Significant Difference

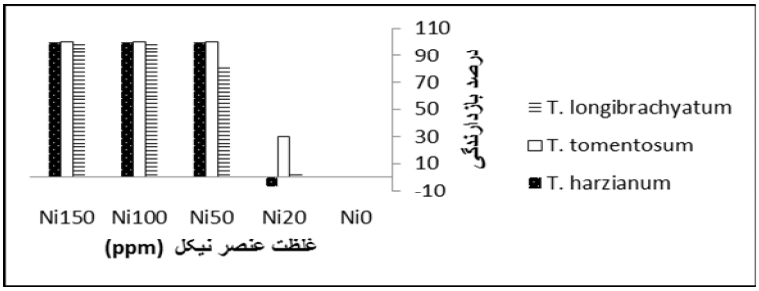
۴۵/۴۶) را در روی گونه *T. longibrachiatum* داشته و غلظت ۳۰ppm مس بیشترین بازدارندگی (قطر پرگنه ۵/۱۶ mm) را روی گونه *T. harzianum* داشت. همانطوری که در جدول (۲) مشاهده می شود در ۷۲ ساعت اول پس از کشت همه تیمارهای حاوی عنصر منگنز از رشد قارچی جلوگیری نموده و هیچکدام از گونه های مورد آزمایش در محیط های کشت حاوی عنصر منگنز رشدی را از خود نشان ندادند. برهمین اساس در مورد دو عنصر دیگر هم فقط پائین ترین غلظت آنها (۳۰ppm در مورد عنصر مس و ۲۰ppm در ارتباط با عنصر نیکل) به گونه های قارچی اجازه رشد دادند، به استثنای اینکه غلظت های ۶۰ppm مس و ۵۰ppm نیکل هم از رشد گونه *T. longibrachiatum* ممانعت بعمل نیاوردند.

جدول ۲- مقایسه اثر بازدارندگی سطوح مختلف مس، منگنز و نیکل روی رشد سه گونه از قارچ *Trichoderma* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۷۲ ساعت پس از کشت

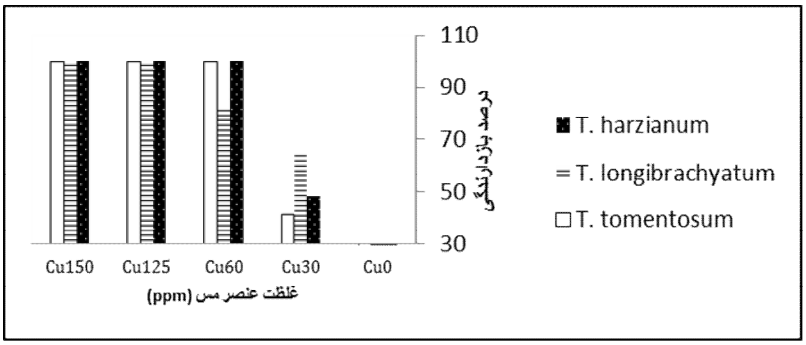
تیمار	میانگین قطر پرگنه (mm)	تیمار	میانگین قطر پرگنه (mm)
T. longibrachyatum	۴۸/۷۸[*a]	*T. har.* + Ni_{20}	۱۰/۶۰[f]
T. lon. +Ni_{20}	۴۶/۴۵[b**]	*T. harzianum*	۱۰/۰۶[fg]
T. tomentosum	۱۹/۲۲[c]	*T. lon.* + Ni_{50}	۸/۸۸[gh]
T. lon. + Cu_{30}	۱۶/۹۲[d]	*T. lon.* + Cu_{60}	۸/۶۴[h]
T. tom. + Ni_{20}	۱۳/۴۴[e]	*T. har.* + Cu_{30}	۵/۱۶[i]
T. tom. + Cu_{30}	۱۱/۱۹[f]		
LSD (0.05)		۱/۳۸	

*- میانگین ۵ تکرار **- اعداد دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند.

همانطوری که در نمودار (۱) مشاهده می شود در اولین اندازه گیری، غلظت ۲۰ppm نیکل نه تنها دارای اثر بازدارندگی روی گونه *T. harzianum* نبوده بلکه باعث افزایش هفت درصدی رشد آن نیز گردید و در بین تیمارهایی که امکان رشد قارچی در آنها فراهم شده بود، بیشترین درصد بازدارندگی (۸۲٪) و مربوط به غلظت ۶۰ppm مس روی گونه *T. longibrachiatum* بود (نمودار ۲)، در حالی که در تیمارهایی که رشد گونه ها در آن ها میسر نبود، میزان بازدارندگی ۱۰۰٪ برآورد شد (نمودارهای ۱ و ۲). در ۹۶ ساعت پس از کشت غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام منگنز نیز امکان رشد را برای گونه*T. tomentosum* فراهم نمودند (جدول۳ و نمودار ۳). در بین تیمارهای دارای رشد قارچی بیشترین سرعت رشد (۰/۶۶۴ میلی متر بر ساعت) برای گونه *T. tomentosum* در محیط حاوی ۱۰۰۰ppm از عنصر منگنز و کمترین آن (۰/۰۵۴ میلی متر بر ساعت) برای گونه *T. longybrachyatum* در تیمار حاوی ۶۰ppm از عنصر مس به ثبت رسید. مشابه یافته های این تحقیق جاورسکا و دلونیوسکا (۲۰۰۷) نشان دادند که تاثیر منگنز روی رشد خطی گونه های *Trichoderma* به غلظت عنصر و گونه قارچی بستگی دارد، بطوری که *T. harzianum* حساس ترین گونه ها بوده، در حالی که برعکس گونه اخیر، هیچکدام از غلظت های منگنز مورد آزمایش نتوانستند از رشد گونه *T. viridae* ممانعت نمایند، بطوری که حتی بالاترین غلظت منگنز (۸۰۰ppm) فقط باعث تضعیف جوانه زنی کنیدی های گونه های *T. viridae* و *T. harzianum* شد.



نمودار ۱- درصد بازدارندگی غلظت های مختلف عنصر نیکل روی رشد گونه های *s*، ۷۲ ساعت پس از کشت



نمودار ۲- درصد بازدارندگی غلظت های مختلف عنصر مس روی رشد گونه های *Trichoderma*، ۷۲ ساعت پس از کشت

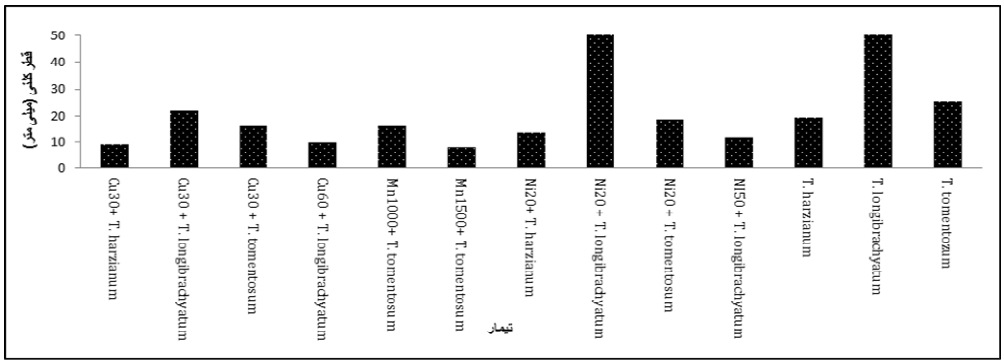
Kredics et al. (2001a & b) نیز دریافتند که یون های فلزی از جمله منگنز اثر بازدارندگی مهمی روی رشد میسلیومی گونه های *T. aureoviridae, T. harzianum* و *T. viridae* دارند. همانطوری که اشاره شد مطابق نمودار (۱) نیکل در کمترین غلظت مورد آزمایش (۲۰ppm) نه تنها اثر بازدارندگی روی گونه *T. harzianum* نداشته بلکه باعث افزایش هفت درصدی رشد آن نیز شده است. همچنین این عنصر با غلظت فوق دارای بیشترین اثر بازدارندگی روی گونه *T. tomentosum* بود. از نگاه دیگر عنصر نیکل در سایر غلظت های مورد آزمایش دارای اثر بازدارندگی ۱۰۰٪ روی هر سه گونه قارچی (به غیر از غلظت ۵۰ppm که در آن گونه *T. longibrachiatum* امکان رشد ۱۹ درصدی داشت.) بود. Sarkar et al. (2010) نیز نشان دادند که افزایش غلظت نیکل باعث کاهش رشد گونه *T. harzianum* شده و حتـــی غلظت ۲۰۰ppm آن از رشـد گونه فوق ممانعت بعمل می آورد. ایشان خاطر نشان کردند که گونه *T. harzianum* نسبت به نیکل نسبتاً متحمل است، همانطوری که در کمترین غلظت مورد آزمایش (۲۰ppm) در این تحقیق نیز مشاهده شد (نمودار۱). Levinskaite (2001) نشان داد که گونه *T. viridae 11S* متحمل ترین گونه قارچی در برابر نیکل، کادمیوم، کروم و مخلوط آنها بود. او همچنین نشان داد که در غلظت های ۲-۱ میلی مول K2Cr2O7 کاهش شدید رشد اتفاق افتاده و در سه میلی مول هیچ رشدی مشاهده نگردید و مخلوط یک میلی مول عناصر نیکل، کادمیوم و کروم از رشد *T. viridae 11S* ممانعت نمود، در حالیکه در بالاترین غلظت تک تک عناصر رشد قارچی قابل مشاهده بود.

بنابراین اثرات توام فلزات سنگین بر روی رشد قارچ ها از اثرات تک تک هرکدام از فلزات سنگین شدیدتر است.

جدول ۳- مقایسه اثر بازدارندگی سطوح مختلف مس، منگنز و نیکل روی سرعت رشد سه گونه از قارچ *Trichoderma* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، در ساعات بین ۷۲ تا ۹۶ پس از کشت

تیمار	میانگین سرعت رشد (mm/h)	تیمار	میانگین سرعت رشد (mm/h)
T. tom. + Mn1000	۰/۶۶۴*a	*T. tom. + Cu30*	۰/۱۷۴def
T. harzianum	۰/۳۸۶b**	*T. har. + Cu30*	۰/۱۶۰defg
T. tom. + Mn1500	۰/۳۳۰b	*T. lon. +Ni 20*	۰/۱۵۴efg
T. tomentosum	۰/۲۵۰c	*T. har. + Ni20*	۰/۱۲۲fg
T. lon. + Cu30	۰/۲۱۴cd	*T. lon. + Ni50*	۰/۱۰۴ gh
T. tom. + Ni20	۰/۲۱۰cde	*T. lon. + Cu60*	۰/۰۵۴ hi
T. longibrachyatum	۰/۱۹۸cde		
LSD (0.05)		۰/۰۵۹۵	

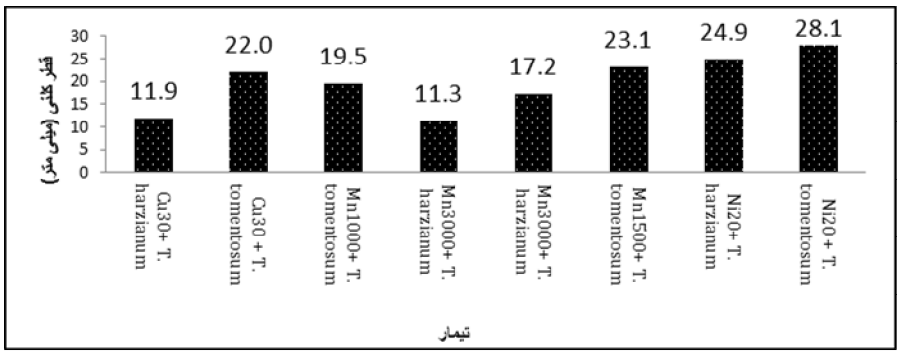
*- میانگین ۵ تکرار **- اعداد دارای حروف مشابه در سطح احتمال ۵٪ اختلاف معنی دار ندارند.



نمودار ۳- قطر پرگنه گونه های *Trichoderma* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۹۶ ساعت پس از کشت در تیمارهای مختلف

همانطوری که در نمودار (۲) مشاهده می شود، درصد بازدارندگی ترکیبات حاوی مس روی رشد گونه های *Trichoderma* نه تنها به غلظت عنصر مس در محیط کشت بلکه به گونه قارچی نیز بستگی دارد. بعنوان مثال مطابق نمودار فوق با مقایسه میزان بازدارندگی عنصر مس روی گونه های مورد آزمایش می توان دریافت که غلظت ۳۰ppm مس، دارای بیشترین بازدارندگی (۶۵/۰۶٪) روی گونه *T. longibrachiatum* بود، در حالیکه در غلظت ۶۰ppm دارای کمترین بازدارندگی (۲۳/۸۲٪) روی گونه مزبور در بین گونه های مورد آزمایش بود. Yap et al. (2011) گزارش کردند که در محیط کشت جامد دارای عنصر مس با غلظت بالاتر از ۶۰۰ppm ،گونه *T. atroviride* قادر به رشد بوده است، Anand et al. (2006) ثابت کردند که روی محیط کشت آگاردار، عنصر مس درغلظت های بین۱۰۰۰ تا ۵۰۰۰ پی پی ام روی *T. viridae* سمی بوده است.

همچنین Errasquin & Vazquez (2003) دریافتند که *T. atroviridae* قادر است در غلظت های صفر تا ۳۰۰ پی پی ام مس رشد نماید، در حالی که در غلظت ۳۵۰ppm کاهش شدیدی در رشد آن مشاهده شده و در غلظت ۴۰۰ppm از رشد قارچ ممانعت بعمل آمد. Hajieghrari (2010) نشان داد که عناصر روی، مس، منگنز، آهن و کبالت از رشد گونه های *Trichoderma* ممانعت بعمل آورده ولی ازت، منیزیوم و کلسیم دارای اثر سمی روی گونه های *Trichoderma* نبوده و مس دارای شدیدترین اثر بازدارندگی روی توسعه میسلیوم قارچی بوده است. در آزمایش حاضر در بین تیمارهای رشدی که امکان رشد آنها فراهم بوده است، غلظت ۳۰۰۰ppm منگنز بیشترین مقدار بازدارندگی را روی گونه *T. harzianum* نشان داد، زیرا ۱۲۰ ساعت پس از کشت کمترین قطر پرگنه (۱۱/۳ میلی متر) برای گونه مذکور به ثبت رسید (نمودار ۴).



نمودار ۴- قطر پرگنه گونه های *T. harzianum* و *T. tomentosum* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۱۲۰ساعت پس از کشت در تیمارهای مختلف

مطابق نمودار فوق در همین مدت کمترین اثر بازدارندگی با بیشترین قطر پرگنه (۲۸/۱ میلی متر) در تیمار ۲۰ppm نیکل روی گونه *T. tomentosum*مشاهده گردید.

مقایسه غلظت بازدارندگی ۵۰٪ (IC50) ترکیبات حاوی مس، منگنز و نیکل برای گونه های مورد آزمایش در این تحقیق (جدول۴) نشان می دهد که کمترین مقدار این پارامتر (۲۵/۶۳ppm) برای عنصر مس روی گونه *T. longibrachiatum* و بالاترین مقدار آن (۱۲۹۲/۶۳ppm) برای عنصر منگنز روی *T. tomentosum* بوده است. همچنین از جدول فوق استنباط می شود که در بین سه گونه مورد آزمایش کمترین تفاوت در مقدار IC50 برای عنصر نیکل و بیشترین آن برای عنصر مس بوده است، هرچند که در مورد IC50 عنصر منگنز روی دو گونه *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* بعلت اینکه حتی کمترین غلظت بکار رفته در این آزمایش دارای اثر بازدارندگی ۱۰۰٪ روی این دو گونه بوده است، نمی توان اظهار نظر نمود. یافته های مشابه این تحقیق توسط (Kredics et al., 2001a) گزارش شده است، آنها مشاهده کردند که کمترین تفاوت در مقدار IC50 در بین شش جدایه از *Trichoderma* برای عناصر نیکل و کبالت بوده است، در حالی که در مورد عنصر آهن تفاوت معنی دار بوده است. آنها همچنین کمترین مقدار IC50 را برای مس و بالاترین آن را برای آلومینیوم گزارش کردند.

جدول ۴- غلظت بازدارندگی ۵۰ درصدی ترکیبات حاوی مس، منگنز و نیکل برای گونه های *Trichoderma* (۹۶ ساعت پس از کشت)

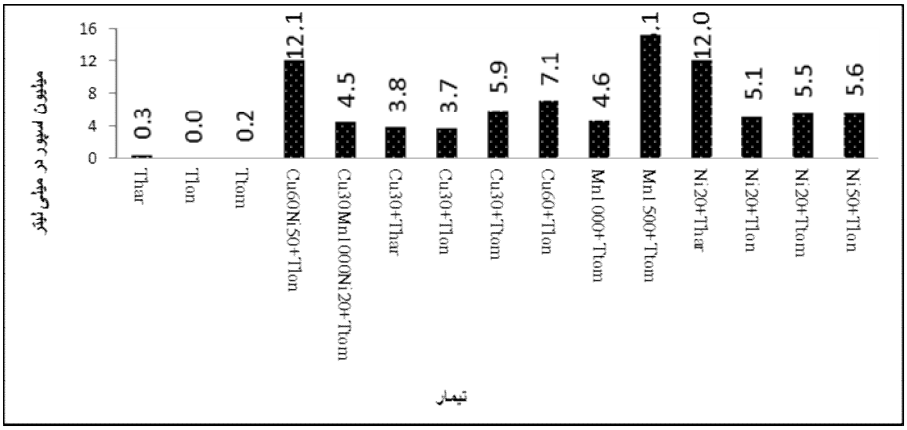
ترکیب	گونه	IC50 (پی پی ام)
	T. harzianum	۲۶/۹۴
CuCl2, 2H2O	*T. longibrachyatum*	۲۵/۶۳
	T. tomentosum	۳۲/۲۲
MnCl2, 4H2O	*T. tomentosum*	۱۲۹۲/۶۳
	T. harzianum	۳۱/۲۱
NiCl2, 6H2O	*T. longibrachyatum*	۲۷/۶۹
	T. tomentosum	۳۲/۲۲

اثر غلظت فلزات سنگین روی اسپورزایی، جذب عناصر مس، منگنز و نیکل توسط گونه های *Trichoderma* و تاثیر فلزات سنگین روی زیست توده قارچی

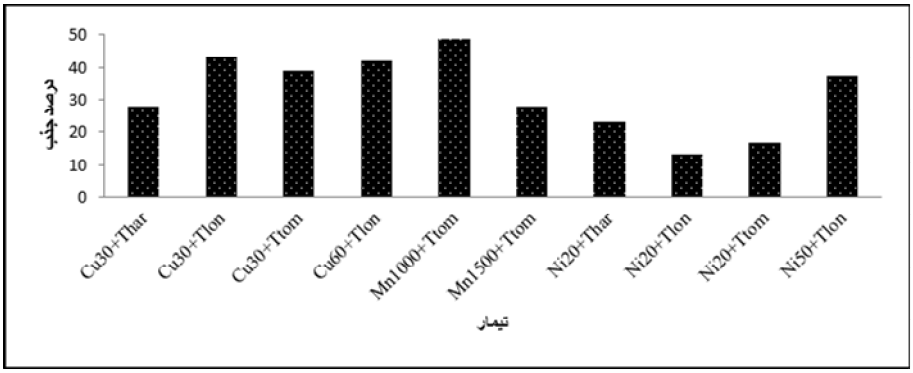
مقایسه اثر فلزات سنگین روی اسپورزایی گونه های *Trichoderma* هشت روز پس از کشت (نمودار ۵) نشان می دهد که حضور فلزات سنگین در خاک دارای اثر محرک روی اسپورزایی بوده است و این اثر نه تنها به گونه قارچی بلکه به نوع فلز و غلظت آن نیز بستگی دارد، بطوری که در تیمار شاهد گونه های *Trichoderma* اسپورزایی خیلی کمی داشته و حتی گونه *T. longibrachiatum* اسپورزایی نداشت. همچنین در تیمارهای حاوی فلزات سنگین بیشترین مقدار اسپورزایی (۱۵/۱۳×۱۰۶ اسپور در میلی لیتر محیط کشت) در غلظت ۱۵۰۰ppm منگنز در گونه *T. tomentosum* و کمترین آن (۳/۷۲×۱۰۶ اسپور در میلی لیتر محیط کشت) در غلظت ۳۰ppm مس در گونه *T. longibrachiatum* مشاهده گردید. از مقایسه نتایج حاصل از این آزمایش در ارتباط با تاثیر فلزات سنگین روی اسپورزایی و میزان جذب عناصر توسط گونه های قارچی (نمودارهای ۵ و ۶) همچنین استنباط می شود که در زمین های آلوده به منگنز (بدون در نظر گرفتن غلظت) گونه *T. tomentosum* می تواند کارآیی بهتری در مبارزه بیولوژیک و همچنین در کاهش میزان این عنصر در خاک داشته باشد، زیرا علاوه براینکه این عنصر باعث افزایش اسپورزایی گونه فوق گردیده، میزان جذب آن نیز بوسیله گونه مذکور در مقایسه با سایر گونه ها در بیشترین مقدار ثبت شده بود. همچنین در خاک های آلوده به نیکل، در غلظت های کمتر گونه *T. harzianum* و در غلظت های بیشتر گونه *T. longibrachiatum* کارآیی بهتری داشتند.

1. Inhibitory Concentration

از نمودار (۵) نتیجه دیگری نیز می توان گرفت و آن اینکه وارد کردن دو عنصر مس و نیکل در تیمار آزمایشی باعث شد که اثر این تیمار روی اسپورزایی گونه *T. longibrachiatum* از مجموع تاثیر جداگانه این دو عنصر بیشتر باشد (دارای اثر تشدید کنندگی)، هرچند وارد شدن منگنز در تیمار آزمایشی نتیجه بازدارنده ای را روی اسپورزایی *T. tomentosum* داشته است. در این تحقیق اثر فلزات سنگین بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته است. بنابراین تعمیم نتایج آزمایشگاهی به شرایط حاکم بر محیط خاک مشکل است. در اکوسیستم طبیعی گونه های قارچی ممکن است نه تنها با یک ترکیب محلول و یا غیرمحلول حاوی فلز بلکه با چند ترکیب دارای فلز مواجه بوده و ممکن است واکنش گونه ها یا جدایه ها در برابر چند ترکیب بعلت اثر آنتاگونیستی یا سینرژیستی آنها متفاوت باشد Kucuk et al., 2008; Errasquin & Vazquez, 2003). براین اساس Errasquin & Vazquez (2003) ثابت کردند که سمیت عنصر روی در ترکیب با کادمیوم روی *T. atroviridae* بیشتر از مجموع اثرات بازدارندگی هریک از این فلزات بود.



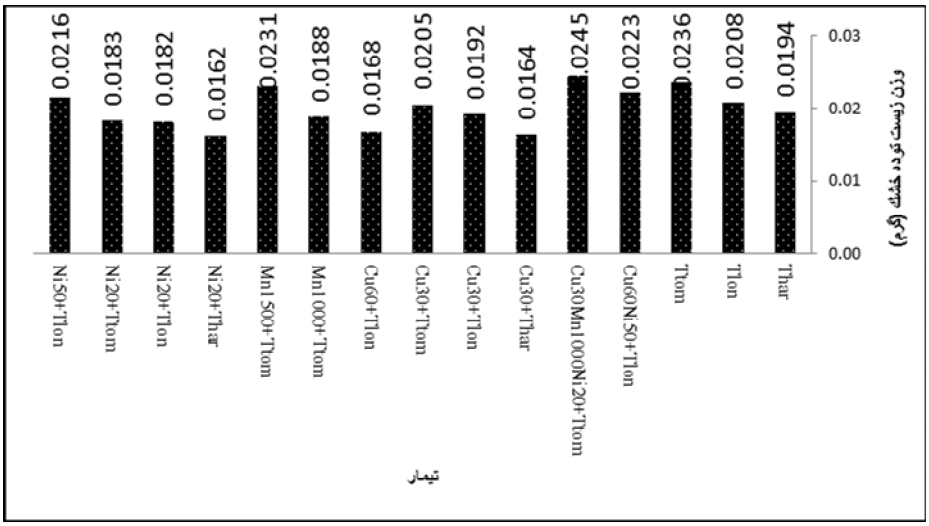
نمودار ۵- مقایسه اسپورزایی گونه های مختلف *Trichoderma* در محیط عصاره خاک آلوده به فلزات سنگین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس (هشت روز پس از کشت)



نمودار ۶- مقایسه درصد جذب فلزات سنگین بوسیله گونه های مختلف *Trichoderma* (هفت روز پس از کشت)

به منظور ارزیابی درصد جذب فلزات سنگین توسط گونه های *Trichoderma* مقدار عناصر موجود در محیط کشت مایع هفت روز پس از کشت اندازه گیری گردید. نتایج حاصل (نمودار ۶) نشان داد که میزان جذب فلزات سنگین توسط گونه های *Trichoderma* علاوه براینکه به گونه قارچی بستگی دارد، به نوع فلز و غلظت آن نیز بستگی دارد. بطوری که بیشترین میزان جذب (۴۸/۶۷٪) توسط گونه*T. tomentosum* و کمترین آن (۱۳/۳۳٪) بوسیله گونه *T. longibrachiatum* بوقوع پیوست.

نمودار (۷) میزان زیست توده خشک میسلیومی گونه های تریکودرما را هشت روز پس از کشت نشـان می دهد. از نمودار مزبور استنتاج می شود که بیشترین زیست توده خشک (۰/۰۲۳۶ گرم) در تیمارهای شاهد مربوط به گونه *T. tomentosum*، در تیمارهای حاوی مس مربوط به گونه *T. tomentosum* و در تیمارهای حاوی نیکل مربوط به گونه *T. longibrachiatum* بود. در اندازه گیری مقدار زیست توده نکته جالب توجه این که بیشترین مقدار زیست توده (۰/۰۲۴۵ گرم) در گونه *T. tomentosum* و در تیماری که در آن هر سه عنصر مس، منگنز و نیکل حضور داشتند، ثبت گردید. این افزایش شاید بدلیل تحریک اسپورزایی و افزایش تعداد اسپورهای تولید شده فراهم شده باشد، کمااینکه ارزیابی تعداد اسپورهای تولید شده در حضور سه عنصر فوق حاکی از افزایش تعداد اسپورها در واحد حجم بود (نمودار ۵).



نمودار ۷- مقایسه وزن زیست توده خشک گونه های مختلف *Trichoderma* در محیط عصاره خاک آلوده به فلزات سنگین در دمای درجه سلسیوس (هشت روز پس از کشت)

در سیستم های کشاورزی، آفتکش های حاوی فلزات و کودهای شیمیایی بطور فزاینده ای مورد استفاده قرار گرفته و نیز فاضلاب های صنعتی در خاک رها می شوند. بااین حال بعضی از مواد معدنی دارای نقش مهمی روی ارگانیسم ها و رشد و توسعه آنها بوده و ممکن است از طریق بلوکه کردن، تجزیه و غیرفعال سازی بعضی از مولکول های مهم بیولوژیکی مثل پروتئین ها و آنزیم ها مخصوصاً در مورد فلزاتی مثل جیوه که بدون عملکرد بیولوژیکی هستند، باعث سمیت در غلظت های بالاتر شوند (Ochia, 1987)، باتوجه به نقش فیزیولوژیکی و ساختاری فلزات در ثبات غشای سلولی (Errasquin & Vazquez, 2003) و نقش بعضی از مواد معدنی در غلظت های بهینه روی رشد و توسعه گیاهان و واکنش دفاعی آنها در برابر تنش های ناشی از عوامل زنده و غیرزنده و نیز افزایش روزافزون فلزات سنگین در خاک ها مخصوصاً در خاک های کشاورزی مناطق صنعتی، نیاز بشر به مطالعه در مورد جایگزین هایی مثل گونه های *Trichoderma* بعنوان عوامل بیوکنترل بیماری های گیاهی، کودهای زیستی۱ و نیز جذب کننده های زیستی۲ و تجمع کنندگان زیستی۳ مواد زائد، افزایش می یابد. بعبارت دیگر بکارگیری *Trichoderma* همراه با بعضی از آفتکش های حاوی فلزات و یا کودهای شیمیایی نیاز به مطالعات بیشتری دارد (Hajieghrari, 2010).

منابع موجود حاکی از عدم تاثیر فلزات سنگین (بجز جیوه) روی انواع آنزیم ها بویژه آن دسته از آنزیم هایی که در مایکوپارازیتیسم نقش دارند، می باشد (Kredics

1. Bio-fertilizer
2. Bio-sorbent
3. Bioaccumulation

(et al., 2001 & 2001a، به همین جهت استفاده از جدایه هایی از گونه های *Trichoderma* که مقاوم به فلزات سنگین هستند، در خاک های آلوده به فلزات سنگین میتواند برعلیه قارچ های بیمارگر گیاهی خاک زی موثر واقع شود (Kredics et al., 2003). با اینحال رشد عوامل بیوکنترل و ظرفیت بیوکنترلی آنها نه تنها به فاکتورهای شیمیایی بلکه به فاکتورهای دیگری مثل فاکتورهای فیزیکی و بیولوژیکی محیط نیز بستگی دارد، بنابراین آزمایشات آتی بایستی در جهت درک بهتر اثر فاکتورهای محیطی روی رشد و توسعه جدایه های بیوکنترلی در طبیعت متمرکز باشد، بویژه در مناطقی که در قالب مدیریت تلفیقی آفات، عوامل بیوکنترلی در ترکیب با آفتکش های حاوی فلزات و کودهای شیمیایی بکار برده می شوند.

سپاسگزاری

بر حسب وظیفه نگارندگان بر خود لازم می دانند از دکتر قره خانی، مهندس کریمی و آقایان جلیلی و سیفی به خاطر همکاری های شان در جهت انجام این آزمایش کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

REFERENCES

1. Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5rd Ed. México; Limusa, 838 p.
2. Alloway, B. J. (1995). Heavy metals in soils. Blackie Academic & Professional, London, UK, 368 pp.
3. Anand, P., Isar, J., Saran, S. and Saxena, R.K. (2006). Bioaccumulation of copper by *Trichoderma viride*. *Bioresource Technology.*, 97, 1018-1025.
4. Amsellem, Z., Zidack, N. K., Quimby Jr. P. C. and Gressel, J. (1999). Long-term dry preservation of viable mycelia of two mycoherbicidal organisms. *Crop Protection*, 18, 643–649.
5. Apablaza, G. E. (2000). *Patología de cultivos, epidemiología y control holístico*. Santiago, Ediciones Universidad Católica de Chile, 347 p.
6. Azcbn-Aguilar, C. & Barea. J. M. (1997). Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulturae*, 68, 1–24.
7. Atkinson, B. W., Bux, F. and Kasan, H. C. (1998). Consideration for application of biosorption technology to remediate metal contaminated industrial effluents. *Water SA*, 24: 129-135.
8. Babich, H. and Stotzky, G. (1982). Nickel toxicity to microbes: Effect of pH and implications for acid rain. *Environmental Research.*, 29, 335-350.
9. Birch, L. and Bachofen, R. (1990). Complexing agents from microorganisms. *Experientia*, 46, 827-834.
10. Boyle, R. W. and Robinson, H. A. (1988). Nickel in the natural environment. In H. Sigel and A. Sigel (Eds), *Nickel and its role in biology*. (pp. 123-164). vol. 23, Marcel Dekker, New York and Basel.
11. Coley-Smith, J. R., Ghaffar, A., and Javed, Z. U. R. (1974). The effect of dry conditions on subsequent leakage and rotting of fungal sclerotia. *Soil Biology. & Biochemistry.*, 6, 307–312.
12. Dahlin, S., Witter, E., Martensson, A. M., Turner, A. and Baath, E. (1997). Where is the limit? Changes in the microbiological properties of agricultural soils at low levels of metal contamination. *Soil Biology & Biochemistry*, 29,1405-1415.
13. Errasquin, E. L. and Vazquez, C. (2003). Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere.*, 50, 137-143.
14. Gadd, G. M. (1988). Accumulation of metals by microorganisms and algae. In H. J. Rehm (Ed), *Biotechnology, Special Microbian Processes.* (pp 401- 433). Vol**.** 6b, VCH V, Weinheim.
15. Gadd, G. M. (1989). Fungal responses towards heavy metals. In R. A. Herbert and G. A. Gadd (Eds). *Microbes in Extreme Environments*. (pp. 19-38). London.
16. Gadd, G. M. (1993). Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytologist*, 124, 25-60.
17. Giovanna S., Guido A., Paola C. and Pietro M. (2002). Determination of conditional stability constants of metal-*Trichoderma viride* complexes by the potentiometric titration method. *Fresenius Environ. Bulltein*, 11, 636-641
18. Guibal, E., Roulph, C. and Leclourec, P. 1992. Uranium biosorption by the filamentous fungus *Mucor miehei*, pH effect on mechanisms and performance of uptake. *Water Research.*, 26, 1139- 1145.
19. Hajieghrari, B. (2010). Effect of some metal-containing compounds and fertilizers on mycoparasite *Trichoderma* species mycelia growth response. *African Journal of. Biotechnology*, 9(26), 4025-4033.
20. Henis, Y., Adams, P. B., Papavizas, G. C. and Lewis, J. A. (1982). Penetration of sclerotia of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma* spp. *Phytophathol.*, 72, 70–74.
21. Islam, M. S., Saha, A. K., Mosaddeque, H. Q. M., Amin, M. R. and Islam, M. M. (2008). In vitro studies on the reaction of fungi *Trichoderma* to different herbicides used in tea plantation. Int. J. Sustain. Crop Production, 3(5), 27-30.

22. Jaworska, M and Dluzniewska, J. (2007). The effect of manganese ions on development and antagonism of *Trichoderma* isolates. *Polish Journals of Environmental. Studies*, 16(4), 549- 553.
23. Joho, M., Inouhe, M., Tohoyama, H. and Murayama, T. (1995). Nickel resistance mechanisms in yeast and other fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, 14, 164-168.
24. Karam, J. and Nicell, J. A. (1997). Potential applications of enzymes in waste treatment. *Journal of Chemmichal Technology & Biotechnology*, 69,141–153.
25. Katayama, A. and Matsumura, F. (1991). Photochemically enhanced microbial degradation of environmental pollutants. *Environment Science Technology*, 25, 1329–1333.
26. Kogej, A. and Pavko, A. (2001). Comparison of *Rhizopus nigricans* in a pelleted growth form with some other types of waste microbial biomass as biosorbents for metal ions. *World Journal of Microbiology & Biotechology*, 17, 677-685.
27. Kredics, L., Doczi, I., Antal, L. and Manczinger, L. (2001a). Effect of heavy metals on growth and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicolog*, 66, 249- 254.
28. Kredics, L., Doczi, I., Antal, L. and Manczinger, L. (2001b). Isolation and characterization of heavy metal resistant mutants from mycoparasitic *Trichoderma* strains. *IOBC/WPRS Bull.*, 24 (3), 233.
29. Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L. and Nagy, E. (2001). Breading of mycoparasitic *Trichoderma* strains for heavy metal resistance. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 112-116.
30. Kredics, L., Antal, Z., Manczinger, L., Skeres, A., Kevie, F. and Nagy, E. (2003). Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology & Biotechnology*, 41(1), 37-42.
31. Kucuk, C., Kivanc, M., Kinaci, E. and Kinaci, G. (2008). Determination of the growth and solubilization capability of *Trichoderma harzianum*. *Biologia*, 63(2), 167-170.
32. Kuperman, R. G. and Carreiro, M. M. (1997). Soil heavy metal concentrations, microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, 29,179-190.
33. Levinskaitė, L. (2001). Simultaneous effect of nickel, cadmium and chromium (II) on soil micromycetes. *Biologija*, 4, 13-15.
34. Martino, E., Turnau, K. Girlanda, M. Bonfante, P. and Perroto, S. (2000). Ericoid mycorrhizal fungi from heavy metal polluted soils: their identification and growth in the presence of zinc ions. *Mycological Research*, 104(3), 338-344.
35. Matheickal, J. T., Yu, Q. and Feltham, J. 1987. Cu (II) binding by *Ecklonia radiata* biomaterial. *Environmental Technology*, 18, 25-34.
36. Morley, R. F. and Gadd, G.M. (1995). Sorption of toxic metals by fungi and clay minerals. *Mycological Research*, 99 (12), 1429-32.
37. Naseby, D. C., Pascual, J. A. and Lynch, J. M. (2000). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (1), 161-169.
38. Ochia, E. I. (1987). General principles of biochemistry of the elements. New York, Plenum Press. 482p.
39. Preetha, B. and Viruthagiri, T. (2005). Biosorption of zinc (II) by *Rhizopus arrhizus*: equilibrium and kinetic modeling. *African Journal of Biotechnology*, 4, 506-508.
40. Puckett, K. J., Nieboer, E., Gorzynski, M. J. and Richardson, D. H. S. (1979). The uptake of metal ions by lichens: A modified ion-exchange process. *New Phytologist*, 72, 329-342.
41. Roggio, T., Farris, G. A., Melis, P. and Pilo, G. (1996). Interaction Between Soil-isolated *Lipomyces* Strains and some heavy metals. *Annali di microbiologia ed enzimologia*, 46, 311-317.
42. Sanna, G., Maddau, L., Franceschini, A. and Melis, P. (1997). Bioaccumulo e bioassorbimento di metallipesanti in *Trichoderma viride*. *Micologia italiana XXVI* (3), 63-72.
43. Sarkar, S. Satheshkumar, A., Jayanthi, R. and Premkumar, R. (2010). Biosorption of nickel by biomass of *Trichoderma harzianum*. *Research Journal of Agriculture Science*, 1(2), 69-74.
44. Sundar, A. R., Das, N. D. and Krishnaveni, D. (1995). In-vitro antagonism of *Trichoderma* sp. against two fungal pathogens of Castor. *Indian Journal of Plant Protection*, 23, 152-155.
45. Tereshina, V. M., Mar'in, A. P., Kosyakov, N. V., Kozlov, V. P. and Feofilova, E. P. (1999). Different metal sorption capacities of cell wall polysaccharides of *Aspergillus niger*. *Applied Biochemical & Microbiology*, 35, 389-392.
46. Tripathi, P. and Srivastava, S. (2007). Development and characterization of nickel accumulating mutant of *Aspergillus nidulans*. *Indian Journal of Microbiology*, 47, 241-250.
47. Yan, G. Y. and Viraraghavan, T. (2000). Effect of pretreatment on the biosorption of heavy metals on *Mucor rouxii*. *Water S. A.*, 26, 119-123.
48. Yap, C. K., Yazdani, M., Abdullah, F. and Tan, S. G. (2011). Is the High Cu Tolerance of *Trichoderma atroviride* isolated from the Cu-Polluted Sediment Due to Adaptation? An *in vitro* toxicological study.

Sains Malaysiana, 40(2), 119–124.
49. Zelles, L., Bai, Q. Y., Ma, R. X., Racwitz, R., Winte, K. and Beese, F. (1994). Microbial biomass, metabolic activity a nutritional status determined from fatty acid pattern and poly-hydroxybutyate in agriculturally-managed soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 26, 439-446.