محیط زیست طبیعی، منابع طبیعی ایران، دوره۷۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹
صفحات ۱ تا ۱۱

زیست‌پالایی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای توسط برخی گونه‌های قارچی

ساناز ثابتی محمدی[۱]؛ امیرحسین حمیدیان*[۲]؛ نعمت اله خراسانی[۳] ؛محمد جوان نیکخواه[۴] و امید اتقیا[۵]

۱- دانشجوی دکتری مهندسی محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲- دانشیار گروه مهندسی محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

۳- استاد گروه مهندسی محیط زیست دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران

۴- استاد گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

۵- دانشجوی دوره دکتری گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت ۹۷/۰۲/۲۶-تاریخ پذیرش ۹۷/۰۴/۲۹)

چکیده:

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) به‌دلیل حضور وسیع آن در محیط و خواص سمیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی بعنوان یکی از مهمترین آلاینده‌های محیط زیست محسوب می‌شوند. این ترکیبات از آلاینده‌های اصلی خاک محسوب می‌شوند. یکی از روش‌های مؤثر، دوستدار محیط زیست و دارای توجیه اقتصادی، زیست پالایی خاک‌های آلوده می‌باشد. قارچها از موفق‌ترین ریزسازواره‌ها در حذف این ترکیبات شاخته شده‌اند. هدف از این مطالعه شناسایی قارچ های بومی و سازگار با ترکیبات PAH است تا با استفاده از آن جدایه‌ها نسبت به زیست پالایی این ترکیبات در خاک اقدام نمود. خاک آلوده در محل تجمع لجن های اسیدی حاصل از بازیافت روغن های مستعمل در اطراف شهرک صنعتی اشتهارد، بعنوان منطقه مورد مطالعه انتخاب گردید. برخی قارچ های بومی از جمله *Aspergillus fumigatus* ، *Alternaria chlamydosporigena* و *Penicillium chrysogenum* در منطقه آلوده شناسایی شد. برای آزمایش اثر بخشی قارچ ها در زیست پالاییPAH ها، جدایه‌های شناسایی شده به خاک آلوده تلقیح گردید. پس از گذشت ۲۱ و ۵۰ روز از زمان تلقیح غلظت باقیمانده PAH ها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی جرمی اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار Excel و بررسی میانگین و انحراف معیار داده‌ها و آزمون Tukey HSD برای مقایسه میانگین داده‌ها، تفسیر گردید. نتایج نشان داد هر سه گونه قارچی شناسایی شده در این مطالعه بطور قابل ملاحظه‌ای در حذف زیستی PAH ها مؤثر بودند. بطوریکه بیشترین میزان حذف مربوط به نفتالن و اسنافتن بدلیل فرار بودن این ترکیبات بود. حذف بنزو [*a*] پایرن که سرطان‌زاترین PAH و در عین حال دارای بیشترین وزن مولکولی در این مطالعه است، توسط جدایه‌های *Aspergillus fumigatus*، *Alternaria chlamydosporigena* و *Penicillium chrysogenum* به ترتیب ۵۰٪، ۴۰ ٪و ۳۲٪ بوده است. علاوه بر این اختلاف معنی داری بین گونه های مختلف در کاهش غلظت انواع PAH در سطح α=.05 مشاهده گردید.

کلید واژگان: خاک آلوده، هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، گونه‌های قارچی، زیست‌پالایی

*نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۲۶۳۲۲۲۳۰۴۴ ایمیل: a.hamidian@ut.ac.ir

۱. مقدمه

خاک منبع عظیم و سرمایه گرانقدری است که بسیاری از مسائل حیاتی و نیازهای ضروری انسان و دیگر موجودات زنده به آن وابسته است. افزایش جمعیت و صنعتی شدن کشورها برای رفع نیازهای کنونی بشر حجم زیادی از آلاینده‌ها را به محیط وارد نموده است که در سال های اخیر زنگ خطر ناپایداری را به صدا در آورده است. پاکسازی خاک های آلوده در حال حاضر یکی از اولویت‌های جوامع محسوب می گردد که دلیل آن بالا رفتن استاندارد های حیات و آگاهی بیشتر با مسائل زیست‌محیطی است. از آلاینده‌های خاک که در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته‌است هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای می‌باشند. خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs[۲]) دارای پتانسیل ریسک برای سلامت انسان و محیط زیست محسوب می‌شود (Sanscartier, 2009). هیدرو کربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای ترکیباتی هستند که حداقل از دو یا تعداد بیشتری ازحلقه‌های پیوسته بنزن در یک خط یا خوشه تشکیل شده اند و معمولاً دارای تنها اتم‌های کربن و هیدروژن بوده با این وجود اتم های نیتروژن، گوگرد و اکسیژن ممکن است به راحتی در حلقه بنزنی جایگزین شده و ترکیبات آروماتیک هتروسیکلیک (ناجور حلقه) را تشکیل دهند. بیشتر تحقیقات صورت گرفته بر روی PAHهای کوچک تمرکز یافته است که بدلیل در دسترس بودن بیشتر این ترکیبات در محیط است (Haritash, 2009).

روش‌های متعارفی جهت حذف این ترکیبات ارائه شده است که از آن جمله می‌توان به سوزاندن، جابجایی یا محبوس نمودن محیط‌های آلاینده اشاره نمود. این فناوری‌ها علاوه بر اینکه از نظر اقتصادی توجیه ندارد عمدتا منجر به انتقال آلودگی از یک محیط به محیط دیگر خواهد شد. در این مطالعه روش زیست‌پالایی بعنوان روش دوستدار محیط زیست که دارای توجیه اقتصادی است برای پاکسازی خاک‌های آلوده به این ترکیبات انتخاب شده است. ریز سازواره‌های متعددی برای حذف این ترکیبات شناسایی شده اند که قارچ ها بدلیل توانایی ذاتی آنها در حذف این ترکیبات انتخاب شدند. در این مطالعه به بررسی میزان حذف انواعی از هیدروکربن‌های آروماتیک دو تا پنج حلقه‌ای توسط گونه های قارچ *Aspergillus fumigatus*، *Alternaria chlamydosporigena* و *Penicillium chrysogenum* که از خاک آلوده به این ترکیبات جداسازی شده، پرداخته خواهد شد.

۱-۱. هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه‌ای

بطور کلی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای جامد و بی رنگ، سفید و برخی زرد کم‌رنگ هستند، دارای نقطه ذوب و جوش بالا، فشار بخار پایین و حلالیت کمی در آب دارند(Bisht *et al*., 2015) و عمدتاً ناشی از سوخت ناقص و پیرولیز مواد آلی هستند و دارای هر دو منشأ طبیعی و انسانی می‌باشند که می توان از آتش سوزی جنگل‌ها، فعالیت‌های آتشفشان بعنوان مهمترین عوامل طبیعی و انتشار از وسایل نقلیه، سوزاندن چوب، سوزاندن سوخت‌های فسیلی در صنایع، گرم کن های خانگی، زباله‌سوزها و فرایند پالایش نفت خام و اغلب در اثر سوخت ناقص ترکیبات کربنی بعنوان مهمترین عوامل انتشار این آلاینده ها نام برد. PAH ها دارای بیشترین تنوع ساختاری در طبیعت در مقایسه با

2- Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

کلیه مولکول‌های غیر هالوژنه در زیست‌کره هستند. علاوه بر این با تولید و انتقال محصولات نفتی مقدار این هیدروکربن‌ها در آب و رسوبات افزایش می‌یابد (Kadri *et al*., 2017). چندین صد ترکیب مختلف از PAHs موجود است اما طبق گزارش آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (US EPA, 2015) تعداد ۱۶ ترکیب در فهرست آلاینده های اولویت‌دار ارائه شده است (جدول۱).

ترکیبات PAH به‌راحتی جذب بخش آلی ذرات جامد می‌شوند و در نتیجه بصورت ریزآلاینده‌های پایدار در محیط زیست باقی می‌مانند. هوا، خاک، آب و گیاهان بعنوان منابع پذیرنده PAH ها شناخته شده‌اند به‌طوریکه بیشترین میزان آن در خاک گزارش شده است(ATSDR, 2015). همچنین فرمول عمومی ترکیبات آروماتیک CnH2n-6 معرفی شده است (Alikhani & Eskandari, 2016).

جدول۱- هیدروکربن‌های حلقوی آروماتیک در فهرست مواد آلاینده اولویت‌دار(EPA, 2014)

ردیف	ترکیبات PAH	تعداد حلقه	فرمول شیمیایی	وزن مولکولی (گرم)	نقطه ذوب (درجه سانتی گراد)	حلالیت در آب در 25^0c (میلی گرم بر لیتر)
۱	Naphthalene	۲	$C_{10}H_8$	۱۲۸	۷۷	۳/۱
۲	Acenaphthene	۳	$C_{12}H_{10}$	۱۵۴	۹۵	۳/۸
۳	Acenaphthylene	۳	$C_{12}H_8$	۱۵۲	۹۴	۳/۹۳
۴	Anthracene	۳	$C_{14}H_{10}$	۱۷۸	۲۱۸	۰/۰۴۵
۵	Phenanthrene	۳	$C_{14}H_{10}$	۱۷۸	۹۹/۵	۱/۱
۶	Fluorene	۳	$C_{13}H_{10}$	۱۶۶	۱۱۶	۱/۹
۷	Fluoranthene	۳	$C_{16}H_{10}$	۲۰۳	۱۱۱	۰/۲۶
۸	Benzo(a)anthracene	۴	$C_{18}H_{12}$	۲۲۸	۱۵۸	۰/۰۱۱
۹	Chrysene	۴	$C_{18}H_{12}$	۲۲۸	۲۵۳	۰/۰۰۱۵
۱۰	Pyrene	۴	$C_{16}H_{10}$	۲۰۲	۱۴۵	۰/۱۳۲
۱۱	Benzo(a)pyrene	۵	$C_{20}H_{12}$	۲۵۲	۱۷۹	۰/۰۰۳۸
۱۲	Benzo(b) fluoranthene	۵	$C_{20}H_{12}$	۲۵۲	۱۶۸	۰/۰۰۱۵
۱۳	Benzo(k) fluoranthene	۵	$C_{20}H_{12}$	۲۵۲	۲۱۶	۰/۰۰۰۸
۱۴	Dibenzo(a,h) anthracene	۶	$C_{22}H_{14}$	۲۷۸	۲۶۶	۰/۰۰۰۵
۱۵	Benzo(g,h,i)perylene	۶	$C_{22}H_{12}$	۲۷۶	۲۷۷	۰/۰۰۰۲۶
۱۶	Indeno (1,2,3-cd)pyrene	۶	$C_{22}H_{12}$	۲۷۶	۱۶۲	۰/۰۶۲

۱-۲. حذف هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای توسط ریزسازواره‌ها(زیست پالایی[۴])

یکی از فناوری‌های مهم برای پاکسازی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک پالایش میکروبی است که در آن تجزیه زیستی دخیل بوده که عبارتست از شکستن مواد شیمیایی آلاینده توسط ریزسازواره به عنوان منبعی برای تأمین غذا یا انرژی. در واقع در این روش ریزسازواره‌ها از ترکیباتی همچون PAH ها بعنوان منبع کربن و انرژی استفاده می کنند و این عامل منجر به شکسته شدن ساختار مولکولی این ترکیبات و کاهش سمیتشان خواهد شد. این روش با استفاده از تکثیر و تلقیح ریزسازواره‌های مؤثر در تجزیه این آلاینده‌ها منجر به کاهش غلظت یا حذف آن خواهند شد که در این مسیر انتخاب زیرسازواره مناسب و استفاده بهینه از توان حذف آنها در روند اجرایی شدن فرایند زیست پالایی بسیار مؤثر خواهد بود.

۱-۳. قارچ ها

قارچ‌ها موجوداتی یوکاریوت و هوازی هستند با هسته مشخص که دارای اندام رویشی رشته‌ای (میسیلیومی) یا تک سلولی بوده، فاقد کلروفیل و دارای دیواره سلولی بسیار سختی هستند که با دیواره باکتری ها متفاوت است و بیشتر ترکیبات تشکیل دهنده آن را پلی ساکاریدهایی چون گلوکان (۳۰-۴۰ درصد) و منان (۳۰ درصد) می باشد، بقیه دیواره سلولی را کیتین و پروتئین و چربی تشکیل می دهد. ترکیب شیمیایی این دیواره در تمام قارچ ها یکسان نیست. قارچ‌ها ریز موجودات هتروتروف (خوراک گیر) هستند که به علت داشتن آنزیم‌های قوی قدرت تجزیه بسیاری از ترکیبات آلی را دارند (Khodaparast *et al*, 2011).

۱-۴. متابولیسم هیدروکربن های آروماتیک چندحلقه‌ای توسط قارچ ها

اگر چه ممکن است کشت باکتری‌ها آسان و سریع باشد، اما قارچ‌ها مزایای بیشتری از باکتری دارند که ممکن است در حذف زیستی آلاینده‌ها قابل استفاده باشند از جمله مقاومت بیشتر به pH پایین و توانایی تجزیه و ساختن گستره وسیعی از سوبستراهای طبیعی کمپلکس مانند سلولز، همی سلولز، لکتین و پکتین. توانایی تجزیه کمپلکس‌ها، مربوط به آنزیم های خارج سلولی با اختصاص نسبتاً پایین است که قارچ‌ها را قادر می‌سازد دامنه وسیعی از ترکیبات آلی پایدار در طبیعت از جمله بسیاری از ترکیبات آروماتیک که دارای کلر و کربن در زنجیره خود هستند همچون هالیدهای آلی مقاوم نظیر DDT، پنتا کلروفنل، بی فنیل های چند کلره، دی بنزو دیوکسین، لیندن و آلکان‌ها را تجزیه و معدنی نمایند(Shim *et al*., 2002).بسیاری از آلاینده هایی که غیر قابل حل بوده و یا حلالیت بسیار کمی دارند و بدلیل عدم حلالیتشان در برابر ورود به سلول های ریز سازواره هایی که دارای آنزیم های درون سلولی هستند مقاومت نشان می دهند. این در حالیست که ریز سازواره‌هایی نظیر قارچ ها که تولید آنزیم‌های برون سلولی می نمایند بدلیل موفقیتشان در تجزیه این آلاینده‌ها از جمله PAH ها بسیار مورد توجه قرار گرفته و دارای اهمیت زیادی هستند(Singh, 2006، Novotny, 1999).

تفاوت دیگر قارچ‌ها با باکتری‌ها در این است که قارچ ها به جای تقسیم شدن دوتایی به صورت گسترش هیفی رشد می‌کنند که این عامل نیز منجر به

4-Bioremediation

گسترش بیشتر آن‌ها در محیط و تماس بیشتر و در نتیجه جذب مطلوب تر آلاینده‌ها در فرایند زیست پالایی خواهد شد. بر خلاف سیستم باکتریایی، قارچ ها ترکیبات PAHs را به وسیله یک مکانیزم جانبی حذف نموده و متابولیت‌هایی بعنوان محصول نهایی تولید می کنند. در این فرایند متابولیت‌های تولیدی دارای سمیت و سرطان زایی بسیار کمتر بوده که این نشان‌دهنده سمیت‌زدایی از این آلاینده‌ها می باشد. درصد کل جمعیت ریزسازواره های خاک که توانایی تجزیه هیدروکربن ها را دارد از ۰/۱۳ درصد تا ۵۰ درصد کل باکتری ها و ۶ تا ۸۲ درصد کل قارچ‌های خاک را شامل می‌شود (Koul & Fulekar, 2013) که همین آمار نشان‌دهنده توانایی بیشتر قارچ‌ها در تجزیه این نوع ترکیبات است.

۲. مواد و روش ها

۲-۱. مکان نمونه برداری

خاک مورد استفاده در این تحقیق از اطراف محل دپو لجن های اسیدی حاصل از فرایند بازیافت روغن موتورهای کارکرده در شهرستان اشتهارد واقع در"۹/۶۹ '۱۷°۵۰ شرقی و "۴۳/۴۹ '۴۱°۳۵ شمالی استخراج گردید.

براساس آمار منتشر شده توسط سازمان صنایع کشور در حال حاضر بیش از ۲۰۰ کارخانه بازیافت روغن موتور کارکرده در سراسر کشور در حال فعالیت است که اکثراً به روش سنتی یعنی استفاده از اسید سولفوریک و خاک رس فعالیت می نمایند. در این فرایند پانزده درصد از حجم روغن کارکرده تبدیل به لجن اسیدی می شود و در مجموع سالانه حدود ۱۵۰ هزار تن از این پسماند در کشور تولید می گردد که تا کنون راهکار مناسبی جهت امحاء آن بعنوان یک پسماند خطرناک ارائه نشده است. ماده اصلی تشکیل دهنده لجن اسیدی ترکیبات غیراشباع قطبی و آسفالتین است که ترکیبی مشابه قیر حاصل از پالایش نفت خام دارد که شامل هیدروکربورهای آلی و ساختمان کلوئیدی متشکل از آسفالتین و مالتین است (Jafari *et al*., 2014).

۲-۲. آماده سازی خاک

سه نمونه خاک به روش تصادفی از ۶ نقطه اطراف حوضچه های آلوده از عمق ۳۰-۰ سانتی متر برداشت و در ظروف آلومینیومی در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.جهت فراهم نمودن خاک همگن دارای غلظت PAH مشخص که احتمال اثر تداخل سایر آلاینده ها در آن نزدیک به صفر است خاک عاری از آلودگی لازم بود که این خاک از منطقه روستایی حصار-وسیه کرج به تعداد ۳ نمونه از ۶ نقطه به صورت ترکیبی به روش تصادفی تهیه گردید که در مرحله بعد این خاک توسط غلظت مشخصی از PAH های منتخب آلوده شد. انواع PAH ها طوری انتخاب شدند که دارای تعداد حلقه های متفاوت بوده تا بتوان روند حذف آنها را در طی زمان بر اساس وزن مولکولی و حلالیت در آب تحلیل نمود که عبارتند از: نفتالن (N)، اسنافتن (Ace)، فنانترن (P)، پایرن (Pyr)، کرایزن (Chr) و بنزو [*a*] پایرن (B[*a*]Pyr). در انتها خاک آلوده به روش مصنوعی[5] جهت انجام مطالعات استفاده گردید.

۲-۳. جداسازی قارچ ها از نمونه های خاک آلوده

نمونه‌های خاک پس از خشک شدن از الک ۲ میلی متر رد شده و همگن شدند. ۱۰ گرم از خاک هموژن

5-Spike soil

شده به ۲۰۰ میلی لیتر آگار ٪۰/۰۵ اتوکلاو شده در ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری اضافه گردید و ۲۰ دقیقه در شیکر بصورت رفت و برگشتی با ۹۰ دور/دقیقه مخلوط گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در حالت سکون قرار گرفت تا بخش جامد در آن رسوب کند و سریال رقت از محلول رویی به میزان 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} تهیه گردید و ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت MYEA، MEA، PDA و YGC بدون PAH و حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل، سیپلکس، جنتامایسین و پنی سیلین در سه تکرار پخش گردید و در انکوباتور در دمای ۲۵°C تاریکی قرار داده شد. (برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها، در هر لیتر محیط آماده شده میزان ۱۰ قطره Ciplex، ۱۰ قطره جنتامایسین، ۱۰ قطره کلرامفنیکل و ۶۰۰µl پنی سیلین ۳-۳-۶ که با ۵ml آب مقطر مخلوط گردیده بود اضافه شد). بعد از گذشت چهار تا هفت روز، میزان رشد ریسه های قارچ ها مورد بررسی قرار گرفت و آنهایی که به رشد مناسب رسیده بودند برای خالص سازی به محیط WA و سپس به محیط غذایی PDA منتقل گردیدند. در این مرحله پس از تهیه اسلاید می توان با توجه به ویژگی‌های ریخت شناسی قارچ ها به شناسایی جنس اقدام نمود که البته در برخی موارد شناسایی تنها از طریق ریخت شناختی امکان‌پذیر نبود و شناسایی مولکولی برای تایید انجام گردید (Olivier Potin *et al*., 2004).

۲-۴. مطالعات مولکولی

استخراج دی ان ای[6] ژنومی قارچ با استفاده روش ژانگ و استفنسون (Zhong and Steffenson, 2001) با اعمال اندکی تغییرات انجام گرفت. جهت تعیین توالی[7] ژن‌ها محصولات تکثیر شده ، برای خالص‌سازی و تعیین‌توالی نوکلئوتیدی از طریق شرکت پیشگام تهران (www.pishgambc.com) به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی (Macrogen, South Korea) فرستاده شد. بعد از دریافت فایل قطعات تعیین توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نـرم‌افزار Chromas Pro نسـخه 1.7.6 و نـرم‌افزار Editseq نسخه 5.01 مشاهده، ویرایش و در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) بلاست یا مشابهت‌سازی شدند (Altschul *et al*, 1997).

۲-۵. آماده سازی تیمار

خاک آلوده کـه در معـرض هـوا خشـک شـده اسـت از الک ۰/۱۲ mm عبور داده شد. از لوله‌های آزمایش ۲۵ml استفاده و در هر یک از لوله هـا ۶ گـرم خـاک آلوده اضافه گردید.

بنابراین هر یک از لوله‌ها شامل ۶ گرم خاک آلوده و ۱۰۶ اسپور از هر یک از جدایه‌ها به ازای هر گرم خاک بود. در تیمار شاهد که شامل کلرید جیوه است میزان gl^{-1} ۰/۷از این ترکیب تهیه و به خاک اضافه شد که این تیمار با توجه به سمیت $HgCl_2$ برای قارچ‌ها که منجر به کشته شدن آنها می شود، میزان جذب زیستی آلاینده‌ها با استفاده از بیومس مرده قارچ‌ها را نشان خواهد داد. در نهایت برای هر تیمار ۲ تکرار تهیه و پس از ۲۱ روز و ۵۰ روز از زمان تلقیح، آنالیز میزان PAH صورت پذیرفت.

۲-۶. آنالیز PAH در خاک

دستگاه کروماتوگرافی گازی- جرمی ساخت شرکت Agilent (آمریکا) مدل ۷۸۹۰ مجهز به MS

6- DNA

7- Sequencing

ساخت شرکت Agilent مدل ۵۹۷۵ ورودی Split/Spitless که دارای طیف‌سنج جرمی از نوع چهار قطبی می باشد جهت اندازه‌گیری غلظت PAHs استفاده شد. جداسازی توسط یک ستون موئین از نوع پلی دی متیل سیلوکسان (HP-5 MS (5%phenl)-95%) با ابعاد .I.D mm ۰/۲۵ × m ۳۰ از جنس سیلیکا باضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. از هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹۹٪ و فلوی mL ۱min^{-1} به عنوان گاز حامل استفاده شد برای به دست آوردن بهترین جداسازی و تفکیک بین پیک‌های کروماتوگرام به‌دست‌آمده از برنامه‌ریزی‌های مختلف دمایی برای ستون و سرعت‌های جریان ورودی گاز حامل استفاده شد. مد استفاده در ورودی Splitless می‌باشد. نرم‌افزار دستگاه MSD ChemStation ورژن E.02.01.1177 می باشد. روش استاندارد MOOPAM برای آماده‌سازی نمونه ها برای آنالیز دستگاهی استفاده شد.

۲-۷. محاسبه غلظت PAH

غلظتPAH در تیمارهای مختلف پس از گذشت ۲۱ روز و ۵۰ روز از زمان تلقیح قرائت شد. با توجه به داده های به‌دست آمده در خصوص غلظت نفتالن و اسنافتیلن با توجه به فشار بخار و فراریت زیاد که در نمونه‌های شاهد با حضور $HgCl_2$ نیز مشاهده شده است به ذکر تنها مقدار قرائت شده اکتفا شد و درصد کاهش این ترکیبات با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید: (نفتالین و اسنافتن)

$$\text{میزان کاهش PAHs (\%)} = 100 - (\frac{Ce \times 100}{C0})$$

فرمول (۱)

و در مورد سایر ترکیبات PAH با توجه به اثر جذب این ترکیبات توسط جسم قارچ و حذف این عامل جهت سنجش تنها اثر متابولیسم قارچ و اثر نانو کودها بر کاهش غلظت PAHs از فرمول شماره ۲ استفاده گردید:

$$\text{میزان کاهش PAHs (\%)} = \frac{(CHgCl2 - Ce)}{C0} \times 100$$

فرمول (۲)

که در آن:

C_0: غلظت PAH در زمان صفر در خاک آلوده شده به روش مصنوعی

Ce: غلظت PAH در زمان ۲۱ و ۵۰ روز

C_{HgCl2}: غلظت PAH در تیمار شاهد حاوی $HgCl_2$

کلیه مشاهدات در ۲ تکرار بود که در نهایت با محاسبه میانگین و انحراف معیار میزان تغییرات غلظت PAHs در طول زمان در تیمارهای مختلف در بخش نتایج آورده شده است.

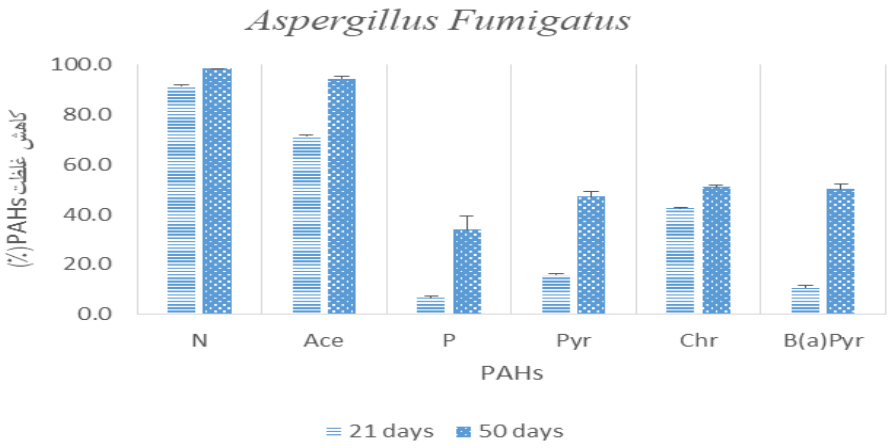
۳. نتایج

نتایج مرتبط با ریخت‌شناسی و تعیین توالی گونه‌های قارچی جداسازی شده از خاک آلوده مورد استفاده در این مطالعه منجربه معرفی سه گونه *Aspergillus fumigatus*، *Alternaria chlamydosporigena* و *Penicillium chrysogenum* گردید. بر این اساس در خاک آلوده به روش مصنوعی درصد حذف هر یک از ترکیبات PAH توسط هر یک از قارچها بررسی گردید.

۳-۱.حذف PAH ها توسط *Aspergillus fumigatus*

گونه *Aspergillus fumigatus* یک گونه بیمارگر انسانی محسوب می شود و در نتیجه برای پاکسازی مناطق آلوده که به طور خاص با انسان‌ها در تماس است پیشنهاد نمی‌گردد. با این وجود نتیجه آزمایشات نشان می دهد عملکرد این قارچ بر خلاف آنچه که میزان تجزیه‌پذیری و در زیست دسترس‌پذیری ترکیبات PAH انتظار می رود، موفق به حذف بنزو

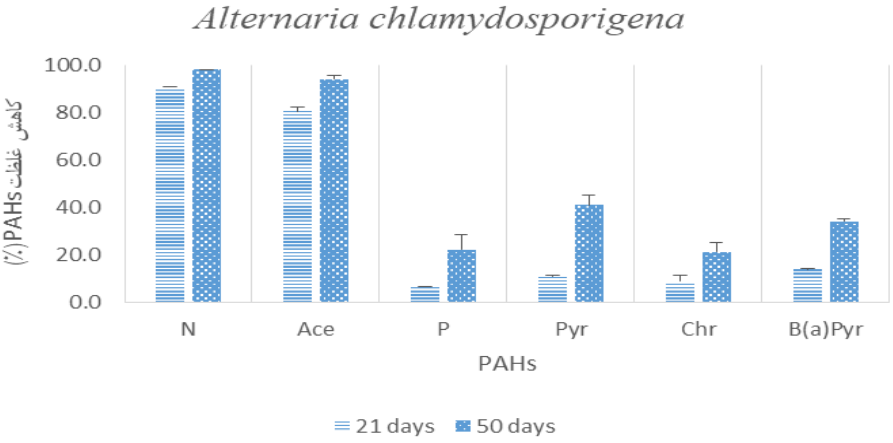
[a] پایرن تقریباً دو برابر بیش از فنانترن بوده‌است. این در حالیست که میزان حذف بنزو [a] پایرن در ۲۱ روز اول تنها ۱۱ درصد بوده است و پس از گذشت ۵۰ روز این مقدار به ۵۰ درصد افزایش یافته است (نمودار۱). جالب توجه است که پس از ۵۰ روز میزان حذف ترکیبات PAH توسط تیمارهای مختلف گونه *Aspergillus fumigatus*، با افزایش وزن مولکولی آنها افزایش یافته‌است.



نمودار ۱- میزان کاهش PAHs توسط *Aspergillus fumigatus*

۳-۲. حذف PAH ها توسط *Alternaria chlamydosporigena*

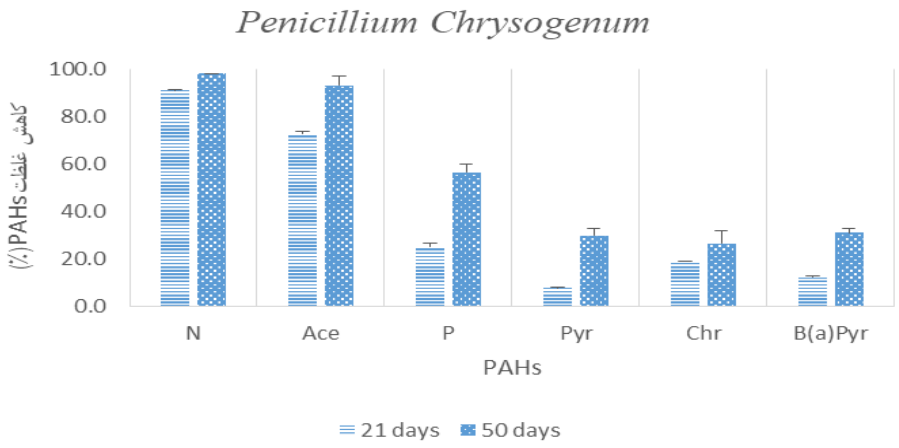
این قارچ دارای مترادف های زیادی است که از آن جمله میتوان به مهمترین آن یعنی *P. notatum* Westling اشاره نمود که اولین بار برای تولید پنی سیلین گزارش شده است. این قارچ پرگنه‌های وسیعی را تولید می کند. بطور کلی گونه *Alternaria chlamydosporigena* در حذف فنانترن و کرایزن با عملکرد مشابه کمترین تأثیر و در حذف پایرن و بنزو [a] پایرن با عملکرد مشابه بیشترین تأثیر را داشته است (نمودار ۲).



نمودار ۲- میزان کاهش PAHs توسط *Alternaria chlamydosporigena*

۳-۳. حذف PAH ها توسط *Penicillium chrysogenum*

گونه *Penicillium chrysogenum* که منبع طبیعی برای پنی‌سیلین بعنوان اولین آنتی‌بیوتیک شناخته شده است از دیگر گونه های شناخته شده در این مطالعه است که در حذف ترکیبات PAH مؤثر بوده است. این قارچ عملکرد مطلوب و یکسانی در حذف فنانترن مشاهده شده است و تا حدود ۵۵٪ این ترکیب حذف شده است. حذف کرایزن و بنزو [a] پایرن مقادیر و روند نسبتاً مشابهی را نشان می دهد بطوریکه پس از گذشت ۵۰ روز تا حدود ۳۰٪ از غلظت این ترکیبات کاسته شده است (نمودار ۳).



نمودار ۳- میزان کاهش PAHsتوسط *Penicillium chrysogenum*

۳-۴. مقایسه اثربخشی قارچ‌ها در حذف ترکیبات هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای

با استفاده از آزمون Tukey HSD به مقایسه میانگین میزان حذف ترکیبات PAH مورد مطالعه توسط قارچ های *Aspergillus fumigatus*، *Alternaria chlamydosporigena* و *Penicillium chrysogenum* پرداخته شد. نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین گونه های مختلف در کاهش غلظت انواع PAH ها در سطح α=.05 وجود دارد. همچنین *Penicillium chrysogenum* بهترین عملکرد در حذف نفتالن، *Alternaria chlamydosporigena* بهترین عملکرد در حذف اسنافتن و *Aspergillus fumigatus* بهترین عملکرد را در حذف فنانترن، پایرن، کرایزن و بنزو [a] پایرن داشته است.

۴. بحث و نتیجه گیری

بر اساس مطالعات قبلی با افزایش تعداد حلقه‌های هیدروکربن‌های آروماتیک تجزیه پذیری زیستی آن کاهش می‌یابد (Winquist *et al*, 2014، Bishnoi *et al.*, 2007). یکی از دلایل تجزیه کندتر هیدروکربن‌های آروماتیک که دارای حلقه‌های بیشتر هستند جذب بیشتر این مواد توسط ذرات خاک و انتقال آهسته تر جرم به سلول ریزسازواره در مقایسه با نیازهای متابولیکی آن است (Andres *et al.*, 2005). همچنین افزایش تعداد حلقه‌های بنزنی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای باعث پایداری بیشتر در محیط شده و تجزیه زیستی را دشوارتر می سازد. بنابراین در کلیه آزمایشات می توان کندتر

بودن تجزیه زیستی ترکیب بنزو [*a*] پایرن نسبت به هیدروکربن‌های آروماتیک سبک تر را به علت پایین بودن میزان حلالیت آن دانست.

بیشتر مطالعات صورت پذیرفته بر روی هیدروکربن های منفرد بوده است و این در حالیست که معمولاً ترکیبات PAH ها در خاک بصورت مخلوط حضور دارند و تجزیه زیستی یک ترکیب می تواند بر تجزیه زیستی ترکیب دیگر تأثیر گذارد. به همین دلیل در این تحقیق سعی شد تا از ترکیبی از هیدروکربن‌های آروماتیک با حلقه‌های سبک و سنگین انتخاب گردد تا نقش ریزسازواره‌های منتخب در پالایش آنها سنجیده شود (Willumsen, 1998).بررسی عملکرد قارچ ها از دیرباز مورد بررسی و مطالعه قرار گرفته است بطوریکه نتایجی که در تحقیقات Davis و همکاران در سال ۱۹۹۳ صورت گرفت به کارآمدی ذاتی قارچ ها در حذف PAH ها اشاره داشته است. در بین ریزسازواره‌های شناسایی شده قارچ‌ها در شکستن مولکول های PAH و بخصوص انواع PAH با وزن مولکولی بالاتر موفق‌تر بوده‌اند (Atagana.H.I., 2009). نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که گونه‌هایی از *Aspergillus* spp.، *Alternaria* spp. و *Penicillium* spp. از رایج ترین گونه‌ها با بیشترین فراوانی در مناطق آلوده به ترکیبات نفتی می‌باشند (Mohsenzadeh *et al*., 2012). همچنین Chaillan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ نیز اعلام کرده اند جنس‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم رایج ترین قارچ‌ها در مناطق گرمسیری هستند که می توانند هیدروکربن‌ها را تجزیه نمایند. با عنایت به این موضوع که سازگاری ریزسازواره‌هایی که در اماکن آلوده می باشند با شرایط آلودگی بیشتر است در نتیجه آنها می‌توانند نقش مهمی در پاکسازی محیط داشته باشند. به همین خاطر قارچ‌های منتخب از محلی که آلوده به PAH ها بود جداسازی شدند.

در نهایت با عنایت به نتایج بدست آمده از این مطالعه می‌توان روش زیست‌پالایی را بعنوان روشی کارآمد که کمترین اثرات مخرب زیست محیطی و بیشترین توجیه اقتصادی را دارد برای رفع آلایندگی خاک‌های آلوده به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای پیشنهاد نمود.

References

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 2015, http://www.atsdr.cdc.gov/csem

Alikhani, H., Eskandari, S., 2016. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, pollution and bioremediation in soil. Tehran University Press, 201 p.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Oxford University Press 3389–3402 Nucleic Acids Research, 1997, Vol. 25, No. 17.

Atagana, H.I., Haynes R.J. and Wallis F.M., 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. Biodegradation 14. P. 297–307.

Bishnoi, K., Rejender, K. and Bishnoi, N.R., 2007. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungi Phanerochaete chrysosporium in sterile and unsterile soil. Journal of Scientific & Industrial research. Vol. 67. P. 538-542.

Bisht, D., Pandey, P., Bhargav, B., Sharma, S., Kumar, V., D.Sharma, K., 2015. Bioremediation of

polyaromatic hydrocarbons (PAHs) using rhizosphere technology, Brazilian Journal of Microbiology 46, 1, 7-21.

Chaillan F, Flèche AL, Bury E, Phantavong Y, Grimont P, Saliot A, Oudot J (2004). Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. Res. Microbiol. 155: 587-595.

Davis, M.W., Glaser, J.A., Evans, J.W., Lamar, R.T., 1993. Field evaluation of the lignin-degrading fungus Phanerochaete sordida to treat creosote-contaminated soil. Journal of Environmental Science and Technology 27, 2572±2576.

]Haritash, A.K. and Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. Journal of Hazardous Materials. Volume 169, issue 1-3, P. 1-15.

Jafari, A.J., Hassanpour, M., Gholam, M., Farzadkia, M., 2014. A novel method for recovery of acidic sludge of used-motor oil reprocessing industries to bitumen using bentonite and SBS. Iranian Journal of Health, Safety & Environment, 2014, Vol. 1, No. 2, pp. 59-66.

Kadri, T., Rouissi, T., Kaur B.S., Cledon, M., Sarma, S., Verma, M., 2016. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review. Journal of Environmental Sciences, JES-00935.

United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2014, www.epa.gov/eg/toxic-and-priority-pollutants-under-clean-water-act

Khodaparast, S.A., Farhangi, S., Javan-Nikkhah, M., 2011. Fungi Kingdom. P. 820.

Koul, S., Fulekar, M.H., 2013. Petrochemical Industrial Waste: Bioremediation Techniques. International Journal of Advancements in Research & Technology, Volume 2, Issue 7. P. 211-257.

Mohsenzadeh, F., Chehregani, R. A., Akbari, M., 2012.Evaluation of oil removal efficiency and enzymatic activity in some fungal strains for bioremediation of petroleumpolluted soils. Iranian journal of environmental health science & engineering. 9(1); 26.

Novotný, Č., Erbanová, P., Šašek, V., Kubátová, A., Cajthaml, T., Lang, E., Krahl, J., Zadražil, J., 1999. Extracellular oxidative enzyme production and PAH removal in soil by exploratory mycelium of white rot fungi. Biodegradation Journal. Kluwer Academic Publishers. P. 159-168.

Olivier Potin, Catherine Rafin, Etienne Veignie., Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs)-contaminated soil by flamentous fungi isolated from the soil, International Biodeterioration & Biodegradation 54 (2004) 45 – 52.

Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Available online: http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?deid=49732 (accessed on 15 August 2015).

Sanscartier D.2009. Field, laboratory and life-cycle studies on the bioremediation of Hydrocarbon-contaminated soils in cold and remote locations: Holistic approaches to the management of these soils in Northern Canada. NR57743, Royal Military College of Canada.

Shim, S.S., Kawamnoto K., Enzyme production activity of Phanerochaete chrysporium and degradation of pentachlorophenol in a bioreactor. Water research., No.36, pp. 4445-4454, 2002.

Singh, H., 2006. Mycoremediation(Fungal Bioremediation). A John Wiley & Sons, INC., Publication. P. 628.

Willumsen, P.A., 1998, Surfactant-Enhanced Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PhD thesis, Department of Environmental Science and Engineering, Technical University of Denmark.

Winquist, E.,, Björklöf, k., Schultz,E., Räsänen, M., Salonen, K., Anasonye, F., Cajthaml, T., Steffen, K.T., Jørgensen, K.S., Tuomela, M., 2014. Bioremediation of PAH-contaminated soil with fungi e From lab9oratory to field scale, International Biodeterioration & Biodegradation 86. 238-247