

Bioremediation of contaminated soil with Phenanthrene and Anthracene using poultry manure as co-substrate

Mohammad Mehdi Amin^{1,2},
Tayebe Kalteh^{2,3},
Mohsen Rezaei⁴,
Nezamaddin Mengelizadeh^{2,3},
Pegah Salehi^{2,3},
Ali Fatehizadeh^{1,2}

¹ Environment Research Center, Research, Institute for Primordial Prevention of Non-communicable disease, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran;

² Department of Environmental Health Engineering, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran;

³ Student Research Committee, School of Health, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran;

⁴ Master of Medical Mycology Science, Microbiological Department, Iranian Biological Research Center (IBRC), Tehran, Iran.

(Received September 16, 2016 Accepted February 12, 2017)

Abstract

Background and purpose: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a group of environmental pollutants in soils and sediments that causes concern because of their toxic, mutagenic and carcinogenic effects. The purpose of this study was to determine the feasibility of utilizing poultry manure as a co-substrate to enhance the bioremediation of phenanthrene and anthracene in contaminated soil.

Materials and methods: The soil samples were homogenized and filtered using a 2.0 mm sieve. The soil samples were added into nine aluminum buckets. Then, phenanthrene and anthracene solution were added into buckets. Finally the inoculum was mixed with buckets' contents. The treatment was performed with or without poultry manure. In all treatments, tap water was added during the bioremediation to adjust the moisture content (15 - 20%) according to the recommended values for the bioremediation process. All of the bioremediation experiments were carried out in duplicate during 45 days of incubation.

Results: The biodegradation data of anthracene and phenanthrene indicates about 92.65% and 95.62% (samples without co-substrate), 96.07% and 95.91% (samples contain co- substrate) degradation at the concentration of 12.5 mg/kg. Also, the experimental data revealed that the PAHs removal percentage increases due to increase in incubation time. Moreover, the results of the changes COD showed that highest rate COD removal in sample containing co-substrate occurred.

Conclusion: According to this result, the presence of poultry manure as a co-substrate can enhance the anthracene and phenanthrene removal comparing to the control sample and the sample contain co-substrate.

Keywords: Bioremediation, Phenanthrene, Anthracene, Fungi

J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26 (146): 139-147 (Persian).

احیای بیولوژیکی خاک های آلوده به فناترن و آنتراسن با استفاده از کود مرغی به عنوان کمک سوبستره

محمد مهدی امین^{۲،۱}طیبه کلتنه^{۳،۲}محسن رضایی^۴نظام الدین منگلی زاده^{۳،۲}پگاه صالحی^{۳،۲}علی فاتحی زاده^{۲،۱}

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای (PAHs) یک گروه از آلاینده های محیطی در خاک و رسوبات هستند که به دلیل سمیت، اثرات موتاژن و کارسینوژن باعث نگرانی شده اند. هدف از این مطالعه بررسی تعیین استفاده از کود مرغی به عنوان یک کمک سوبستره برای افزایش احیای بیولوژیکی فناترن و آنتراسن در خاک آلوده شده می باشد.

مواد و روش ها: ابتدا نمونه خاک یکنواخت شده و با استفاده از الک دارای منافذ ۲mm غربال شده و به ۹ ظرف پایلوت آلومینیومی اضافه گردید. سپس فناترن و آنتراسن در داخل ظروف حاوی خاک مخلوط و در نهایت قارچ ریشه سفید نیز به خاک اضافه گردید. آزمایش ها در دو حالت با افزایش و بدون افزودن کود مرغی انجام شد. در همه پایلوت ها، طی احیای بیولوژیکی، برای تنظیم رطوبت (۲۰-۱۵ درصد)، آب به خاک اضافه شده و دوره انکوباسیون تا ۴۵ روز ادامه یافت. **یافته ها:** نتایج حاصل از احیای بیولوژیکی کاهش ۹۲/۶۵ درصد و ۹۵/۶۲ درصد (پایلوت های بدون کمک سوبستره)، ۹۶/۰۷ درصد و ۹۵/۹۱ درصد (پایلوت های حاوی کمک سوبستره) در غلظت ۱۲/۵ mg/kg را نشان داد. همچنین داده های آزمایش نشان داد که میزان حذف PAHs به دلیل افزایش زمان انکوباسیون افزایش می یابد. علاوه بر این، نتایج تغییرات غلظت COD نشان داد که حداکثر میزان حذف COD در نمونه حاوی کمک سوبستره اتفاق می افتد. **استنتاج:** بر اساس یافته های این مطالعه کاربرد کود مرغی به عنوان یک سوبستره می تواند حذف آنتراسن و فناترن را از خاک های آلوده را بهبود دهد.

واژه های کلیدی: احیای بیولوژیکی، فناترن، آنتراسن، قارچ

مقدمه

کشاورزی، باعث نگرانی زیادی شده است (۱). از میان آلاینده های خاک، هیدروکربن های PAHs در محیط

در سال های اخیر آلودگی زیست محیطی به خصوص خاک های آلوده شده از طریق فعالیت های صنعتی و

E-mail: t.kalte90@yahoo.com

مؤلف مسئول: طیبه کلتنه - اصفهان: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده بهداشت

۱. مرکز تحقیقات محیط زیست، پژوهشکده پیشگیری اولیه از بیماری های غیرواگیر، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲. گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳. کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴. کارشناس ارشد قارچ شناسی پزشکی، آزمایشگاه قارچ شناسی، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۷/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۱/۲۴

اغلب به صورت مخلوط‌های پیچیده‌ای حضور دارند و به صورت منفرد دیده نمی‌شوند. این آلاینده‌ها دسته آروماتیک چند حلقه‌ای (PAHs) از جمله‌های آلاینده‌های پایدار تولید شده از طریق فرآیندهای سوزاندن طبیعی و فعالیت‌های انسانی می‌باشد (۲).

این آلاینده‌ها دسته بزرگی از سرطان‌زاهای محیطی می‌باشند که در همه جا از جمله آب، هوا و خاک به عنوان آلاینده‌های محیطی دیده می‌شوند (۳). PAHs ترکیبات آلی متشکل از دو یا چند حلقه بنزنی بوده و به دلیل آبگریزی، حلالیت کم در آب و وزن مولکولی بالا در محیط بسیار پایدار می‌باشند (۴). خواص سمی و سرطان‌زای مواد حاوی PAHs قبل از این که این ترکیبات کشف شوند، گزارش شده است. به طور مثال در سال ۱۸۸۰ نرخ بالای سرطان پوست در کارگران صنایع پالایشگاهی و قطران زغال سنگ پارافین انگلستان، مشاهده شد (۵). علاوه بر این، ترکیبات موتاژن و کارسینوژن، ویژگی‌های نیمه فرار بعضی از PAHs باعث نگرانی سازمان حفاظت زیست محیطی آمریکا (USEPA) شده است (۶، ۷). از این رو سازمان حفاظت زیست محیطی آمریکا شانزده نوع از ترکیبات PAHs را برای اصلاح یا حذف به عنوان آلاینده‌های اولویت دار لیست کرده است (۸).

روش‌های مختلفی همچون فرارسازی، فتواکسیداسیون، تجمع بیولوژیکی و جذب روی ذرات خاک برای حذف PAHs از محیط مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). روش‌های معمول فیزیکی و شیمیایی به دلیل داشتن هزینه اپراتوری بالا و تولید آلاینده ثانویه دارای معایب قابل توجهی می‌باشد. امروزه بیش تر کشورها از احیای بیولوژیکی به وسیله میکروارگانیسم‌ها استفاده می‌کنند که یک روش مناسب برای تخریب PAHs به دلیل تجزیه کامل آلاینده‌ها می‌باشد (۹).

احیای بیولوژیکی یک روش کنترل آلاینده با استفاده از سیستم بیولوژیکی است که برای کاتالیز تجزیه یا تغییر شکل انواع آلاینده‌های شیمیایی سمی به فرم سمیت کم تر یا بی‌ضرر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰).

همچنین بعنوان یک فرآیند طبیعی بر پایه باکتری، قارچ و گیاهان که برای تغییر آلاینده و استفاده به عنوان انرژی و منبع کربن برای رشد سلول‌ها می‌باشد (۱۱، ۱۲) از جمله مزایای کاربرد کود مرغی می‌توان به افزایش آلی خاک، اصلاح فعالیت بیولوژیکی خاک، افزایش چسبندگی خاک‌های شنی، کاهش چسبندگی خاک‌های رسی، افزایش میکروارگانیسم‌های مفید خاک، تیره کردن رنگ خاک و جذب انرژی بیش تر، بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و حاصلخیزی خاک، کم کردن جرم حجمی ظاهری و افزایش تخلخل و نفوذ پذیری خاک اشاره نمود. در سال‌های اخیر از میان این ارگانیسم‌ها استفاده از قارچ ریشه سفید به عنوان تجزیه کننده PAH بیش تر مورد توجه قرار گرفته است. این قارچ‌ها آنزیم‌های خارج سلولی همچون لاکاز، منگنز پراکسیداز (MnP)، لیگنین پراکسیداز (LiP) و دی اکسیژناز با مشخصات سوبستره بسیار کم تولید می‌کنند که برای تغییر شکل بیش تر آلاینده‌های زیست محیطی همچون PAHs مناسب می‌باشد (۱۳، ۱۴). علاوه بر این قارچ‌های ریشه سفید توانایی رشد در محیط‌های با غلظت کم مواد مغذی، رطوبت کم و اسیدیته را دارا می‌باشند (۱۳).

مطالعات انجام شده چندان به نحوه اصلاح یا حذف PAHs از محیط خاکی اشاره نشده است و در کشور ایران نیز مانند سایر کشورهای در حال توسعه به طور گسترده مطالعه‌ای انجام نشده است. با توجه به مطالب فوق هدف از این مطالعه بررسی بازدهی احیای بیولوژیکی هوازی روی حذف فناترن و آنتراسن از خاک‌های آلوده شده بوسیله قارچ با کمک سوبستره می‌باشد. همچنین در این مطالعه تاثیر غلظت اولیه PAHs و زمان انکوباسیون در سیستم احیای بیولوژیکی و تغییرات pH و COD در طی دوره احیای بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: کلیه مواد مورد استفاده در این مطالعه خالص و بدون هیچ خالص سازی اضافی از شرکت

سیگما آلد ریچ آمریکا خریداری شد. فناترن و آنتراسن از شرکت سیگما آلد ریچ آمریکا به عنوان منبع آلوده کننده خاک مورد مطالعه مورد استفاده قرار گرفت.

خاک و کود مرغی: خاک مورد استفاده در این مطالعه، از اطراف شهر اصفهان جمع آوری شد. نمونه خاک ابتدا در هوای آزاد خشک شده و سپس برای حذف زائده آن، با استفاده از الک استاندارد مش ۱۰ با اندازه منافذ ۲ میلی متر غربال شده و در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگه داری شد. نمونه اولیه خاک بر اساس کتاب روش های استاندارد و با استفاده از دستگاه HPLC مورد آنالیز قرار گرفت و نتایج نشان داد که نمونه خاک غیر آلوده بوده و هیچ نوع PAHs در آن شناسایی نشد. شاخص های دیگر خاک توسط شرکت خصوصی در شهر اصفهان مورد آنالیز و تجزیه تحلیل قرار گرفته که به طور نمونه برخی از شاخص های ویژه خاک در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول شماره ۱: مشخصات خاک مورد استفاده در این مطالعه

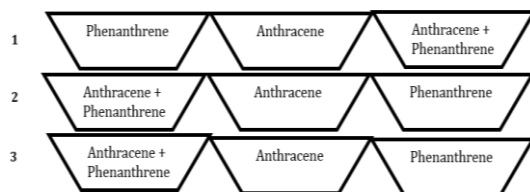
EC, ds/m	pH	N, %	P, ppm	Soil physical feature		
				S, %	Si, %	C, %
۱۴/۱	۸/۱	۰/۳۳	۲۲۴	۴۷	۲۹	۲۴

کود مرغی به دست آمده از مزرعه مرغداری اصفهان خشک شده و برای حذف زائده اضافی کود با استفاده از الک استاندارد مش ۱۰ با اندازه منافذ ۲ میلی متر غربال شده و به عنوان کمک سوبستره برای احیای بیولوژیکی خاک آلوده شده با PAHs آماده سازی گردید.

میکروارگانیزم: از سوسپانسیون های قارچی شامل سویه های *Phanerochaete chrysosporium*، *Mucor racemosus*، *Trichoderma harzianum* استفاده شد. تمامی فرآیندهای اسپورگیری و تهیه این سوسپانسیون ها در مرکز ملی ذخایر زیستی و ژنتیکی ایران انجام شد.

فرآیند احیای بیولوژیکی: ابتدا نمونه های خاک یکنواخت شده و با استفاده از الک دارای روزه ۱۰ غربال شد و در آزمایشگاه توزین گردید. ۴ کیلوگرم نمونه خاک به ۹ نمونه پایلوت آلوده میومی اضافه گردید.

سپس برای افزودن PAHs انتخاب شده به داخل ظروف حاوی خاک، ابتدا فناترن و آنتراسن در استون به عنوان حلال حل شده و سپس با خاک مخلوط شد و به منظور اطمینان تبخیر استون، ۷ روز ذخیره شد. غلظت مورد بررسی در این مطالعه ۵۰ mg/l می باشد که در ۴ کیلوگرم خاک برابر ۱۲/۵ mg/kg خواهد بود در نهایت قارچ ریشه سفید و کمک سوبستره به خاک اضافه گردید. در همه نمونه پایلوت ها، آب خام در طی احیای بیولوژیکی برای تنظیم رطوبت خاک (۲۰-۱۵ درصد) اضافه شده و سپس آزمایشات احیای بیولوژیکی برای ۴۵ روز انجام شد (تصویر شماره ۱).



تصویر شماره ۱: پایلوت های مورد مطالعه: ۱- ظروف پایلوت کنترل؛ ۲- ظروف پایلوت حاوی قارچ ریشه سفید؛ ۳- ظروف پایلوت حاوی قارچ ریشه سفید و سوبستره کمکی

آنالیز فناترن و آنتراسن: برای تعیین غلظت فناترن و آنتراسن، ۲ گرم خاک آلوده شده خشک گردید و در ۱۰ میلی لیتر استونیتریل حل شد. سپس سوسپانسیون حاصله در حمام اولتراسونیک در دمای ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس قرار داده و بعد از ۲ دقیقه استخراج گردید. محلول استخراج شده سپس بر روی همزن با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. نمونه استخراج شده با فیلتر کاغذ (Whatman)، فیلتر شده و توسط دستگاه HPLC با مشخصات ذکر شده در جدول شماره ۲ شناسایی شد.

جدول شماره ۲: مشخصات دستگاه HPLC

مشخصات	عنوان
HPLC Waters	مدل دستگاه
C18 ultra sep ES PAH QC specia 60x2mm ID	نوع و مشخصات ستون آنالیز
Acetonitrile-water ratio: 80% to 20%	نوع حلال فاز متحرک
۰/۳ mL/min	نرخ جریان حلال فاز متحرک
۲۰ µl	حجم نمونه
۲۳۰ nm	طول موج آشکارساز UV

یافته ها

احیای بیولوژیکی آنتراسن و فنانترن

میزان کارایی روش احیای بیولوژیکی در حذف آنتراسن و فنانترن از خاک با استفاده از حضور قارچ بدون وجود سوبستره کمکی یا وجود آن در محیط، بررسی شد. نتایج حاصل در جدول شماره ۳ نشان می‌دهد که برای غلظت اولیه $12/5 \text{ mg/kg}$ آنتراسن و فنانترن به ترتیب میزان حذف در پایلوت‌های گروه شاهد، همراه با قارچ و پایلوت‌های حاوی قارچ و سوبستره کمکی در زمان انکوباسیون ۲۹ روز $13/5$ درصد و $13/86$ درصد (گروه شاهد)، $93/76$ درصد و $91/5$ درصد (پایلوت حاوی قارچ)، $95/1$ درصد و $95/26$ درصد (پایلوت حاوی قارچ به همراه سوبستره کمکی) می‌باشد.

جدول شماره ۳: مشخصات درصد احیای بیولوژیکی آنتراسن و فنانترن

به وسیله جمعیت قارچی

غلظت اولیه انکوباسیون (mg/kg)	زمان (day)	پایلوت شاهد (درصد)	پایلوت خاک بدون سوبستره کمکی (درصد)	پایلوت خاک همراه با سوبستره کمکی (درصد)
		آنتراسن	فنانترن	آنتراسن
۱۴	۷/۸۲	۹/۷۶	۷۶/۲	۸۰/۴
۱۲/۵	۲۹	۱۳/۵	۱۳/۸۶	۹۱/۵
۹۵/۱	۴۲	۱۵/۷۲	۱۷/۵	۹۸/۸

تعیین تاثیر زمان انکوباسیون در احیای بیولوژیکی

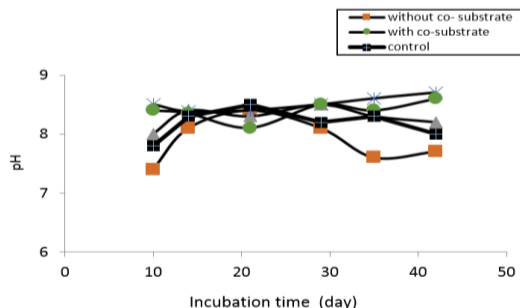
تاثیر زمان انکوباسیون در مقدار احیای بیولوژیکی آنتراسن و فنانترن با غلظت اولیه $12/5 \text{ mg/kg}$ مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج جدول شماره ۳ بیانگر آن است که در زمان انکوباسیون ۴۲ روز بیشترین درصد احیای بیولوژیکی فنانترن مربوط به پایلوت خاک همراه با سوبسترای بیولوژیکی می‌باشد. همچنین در همین مدت انکوباسیون بیشترین درصد احیای بیولوژیکی آنتراسن مربوط به پایلوت خاک بدون سوبسترای کمکی می‌باشد. زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول شماره ۳ آورده شده است.

تغییرات pH در طی احیای بیولوژیکی

نتایج حاصل از بررسی تغییرات pH در نمودار

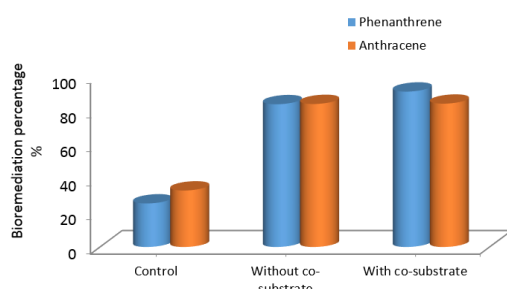
شماره ۱ نشان می‌دهد که تغییرات pH در زمان انکوباسیون در هر سه نمونه پایلوت‌های شاهد، حاوی قارچ و پایلوت حاوی قارچ و سوبستره کمکی بین $7/5$ تا $8/5$ است.



نمودار شماره ۱: تغییرات pH در طی فرآیند احیای بیولوژیکی آنتراسن و فنانترن با غلظت‌های اولیه مختلف ($12/5 \text{ mg/kg}$)

تغییرات COD در طی احیای بیولوژیکی

در طی احیای بیولوژیکی آنتراسن و فنانترن اکسیژن مورد نیاز شیمیایی (COD) به عنوان اندیکاتور برای میزان احیای بیولوژیکی و رشد میکروبی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نمودار شماره ۲، کاهش میزان COD طی زمان انکوباسیون برای هر سه پایلوت و برای غلظت اولیه $12/5 \text{ mg/kg}$ را نشان می‌دهد. این نتایج بیانگر این است که در گروه بدون سوبسترای کمکی آنتراسن و فنانترن بیشترین کاهش میزان COD مشاهده شد.



نمودار شماره ۲: تغییرات COD در طی فرآیند احیای بیولوژیکی آنتراسن و فنانترن با غلظت اولیه $12/5 \text{ mg/kg}$

بحث

در غلظت اولیه آنتراسن و فنانترن مطالعه شده، میزان حذف در پایلوت حاوی قارچ و پایلوت حاوی قارچ

بهمراه سوبستره کمکی بسیار بالاتر از پایلوت شاهد بود. این نتایج نشان می دهد که وجود میکروارگانیسم قارچ و سوبستره کمکی باعث افزایش حذف آلاینده های آنتراسن و فناترن شد. افزایش تجزیه مشاهده شده در پایلوت حاوی سوبستره کمکی بیانگر آن است که کود مرغی حاوی مقادیر بالای کربن و نیتروژن و سایر مواد معدنی جهت تامین رشد میکروارگانیسم در خاک آلوده بوده و همچنین می تواند در احیای بیولوژیکی آنتراسن و فناترن ممکن است همانند یک عامل کاتالیست عمل نماید. این نتایج با یافته های مطالعات پیشین هم خوانی دارد (۱۱، ۱۵). علاوه بر این، مطالعه انجام شده توسط امین و همکاران نشان داد که کود مرغی حاوی جمعیت زیاد و متنوع از میکروارگانیسم ها است. غلظت های میکروبی در کود مرغی می تواند تا حد 10^{10} CFU/g و باکتری های گرم مثبت نظیر اکتینومیسیت ها، کلستریدیها، باسیلوس ها و لاکتوباسیلوس تقریباً ۹۰ درصد تنوع میکروبی کود را تشکیل می دهند (۱۶). وجود این دامنه گسترده میکروارگانیسم ها به همراه قارچ های دارای ریشه سفید همانند *Phanerochaete chrysosporium* باعث افزایش تجزیه بیولوژیکی آنتراسن و فناترن در خاک آلوده در این پژوهش شده است. Sayara و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی زیست پالایی خاک آلوده به PAHs از طریق کمپوست به این نتیجه رسیدند که کمپوست به عنوان سوبستره کمکی باعث افزایش حذف PAHs از خاک آلوده در مقایسه با گروه شاهد شد (۱۳). همچنین Atagana در مطالعه خود گزارش نموده که کود مرغی حاوی املاح معدنی، کربن و نیتروژن بوده و ضمن رشد باکتری های موجود در خاک، باعث افزودن دیگر میکروارگانیسم ها در جهت تجزیه PAHs می گردد (۱۵). وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۱ با بررسی کود خوک به عنوان سوبستره کمکی به این نتیجه رسیدند که افزایش مقدار کود خوک در خاک آلوده باعث افزایش تجزیه PAHs سه حلقه ای شده و همچنین گزارش نمودند که کود خوکی حاوی میکروارگانیسم های بومی

موثر در تجزیه PAHs و نوترینت است (۱۷). مطالعه Haritash و Kaushik نشان داد که قارچ های ریشه سفید توانایی بالایی در حذف آلاینده های پایدار و همچنین PAHs به دلیل سیستم تجزیه لیگنین موجود در این نوع قارچ ها دارا هستند (۱۳). امین و همکاران با بررسی احیای بیولوژیکی بی هوازی پرکلرات با استفاده از سه نوع سوبستره کمکی (کود گاوی، کود مرغی و اتانول) نشان دادند که کود مرغی نسبت به دو سوبستره کمکی دیگر دارای بازدهی بالایی (۹۹/۷ درصد) در افزایش احیای بیولوژیکی پرکلرات بوده است (۱۶).

نتایج تاثیر زمان انکوباسیون در مقدار احیای بیولوژیکی آنتراسن و فناترن با غلظت اولیه (mg/kg) (۱۲/۵) در این مطالعه نشان داد که با افزایش زمان انکوباسیون میزان حذف آنتراسن و فناترن به صورت جداگانه و همزمان در محیط خاک برای هر ۳ نمونه پایلوت (شاهد، حاوی قارچ و قارچ به همراه سوبستره کمکی) به طور قابل توجهی افزایش یافت. افزایش میزان احیای بیولوژیکی می تواند ناشی از تولید بالای آنزیم ها توسط قارچ های تلقیح شده طی زمان انکوباسیون بود. علاوه بر این، در ابتدای انکوباسیون، میکروارگانیسم ها از املاح موجود در خاک و سوبستره کمکی به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده کرده و سپس با کاهش میزان املاح و سوبستره کمکی با گذشت زمان، میکروارگانیسم ها از آنتراسن و فناترن به عنوان منبع کربن و انرژی برای رشد استفاده نموده و باعث کاهش آلاینده ها شد. اربابی و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بررسی احیای بیولوژیکی هیدروکربن های آروماتیک چند حلقوی (PAHs) در خاک های آلوده به نفت به این نتیجه رسیدند که با افزایش زمان انکوباسیون میزان احیای بیولوژیکی فناترن به طور قابل توجهی کاهش یافته و بیشترین میزان حذف در غلظت های مختلف در غلظت های پایین مشاهده شد (۱۸). در مطالعه Hadibarata و همکاران گزارش شد که قارچ *Armillaria sp. F022* در ابتدای انکوباسیون از

گلوکز به عنوان منبع کربن استفاده می‌کند. سپس با گذشت زمان در حدود ۳۵ روز و با کاهش مقدار گلوکز، از آنتراسن به عنوان منبع کربن و انرژی جهت رشد استفاده نموده و از اینرو باعث کاهش آن در زمان طولانی شده است. همچنین *Armillaria sp. F022* از طریق آنزیم‌های منگنز پراکسیداز، لیگنین پراکسیداز و لاکاز باعث تجزیه انواع ترکیبات می‌شود (۱۹).

برخلاف بیشتر اکوسیستم‌های آبی، pH خاک می‌تواند بسیار متغیر بوده و از ۲/۵ در خاک معدن تا ۱۱ در بیابان‌های قلیایی متفاوت باشد. اکثر باکتری‌های هتروتروف و قارچ‌ها در pH نزدیک به خنثی فعالیت داشته و کار احیای بیولوژیکی در این محدوده انجام می‌دهند. Adams و همکاران در سال ۲۰۱۴ با بررسی احیای بیولوژیکی خاک آلوده به نفت به وسیله کود مرغی به این نتیجه رسیده‌اند که بیش‌ترین میزان احیای بیولوژیکی در محدوده pH ۸ تا ۸/۵ بوده است. در برخی از خاک‌ها، مقادیر pH بالا تأثیر منفی بر توانایی جمعیت میکروبی در کاهش هیدروکربن‌های آروماتیک دارد. بر این اساس، pH بهینه برای احیای بیولوژیکی مواد نفتی همچون PAHs در خاک بین ۶ تا ۸ است (۲۰). در سال ۲۰۰۰، Boonchan گزارش نمود که pH بهینه برای احیای بیولوژیکی بین ۶ تا ۸/۹ بوده و تغییر سطوح اولیه pH در این محدوده در حین احیای بیولوژیکی ممکن است به عنوان نتیجه انتشار ترکیبات واسطه اسیدی و قلیایی و محصولات نهایی در طول تخریب هیدروکربن است (۲۱). وانگ و همکاران در مطالعه خود گزارش نمودند که pH کلیه پایلوت‌های مورد تصفیه در محدوده ۶/۵ تا ۸ بوده که این تغییرات pH در حین تصفیه آلاینده دستخوش تأثیر فاکتورهای مختلف همچون حلالیت، تحرک و فرم‌های مختلف آلاینده و همچنین جمعیت میکروبی و سوبسترا کمکی است (۱۷). در سال ۲۰۱۱، Simarro و همکاران گزارش نمودند که pH بهینه برای احیای بیولوژیکی آنتراسن، فنانترون و نفتالین به وسیله باکتری‌ها در حدود ۷ می‌باشد (۷). Pawar

(۲۰۱۵) با بررسی تأثیر pH خاک بر احیای بیولوژیکی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای به این نتیجه رسیدند که pH برابر ۷/۵ برای احیای بیولوژیکی کلیه ترکیبات PAHs مناسب است (۱۰).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات COD در حین احیای بیولوژیکی نشان داد که بیشترین میزان کاهش COD، در پایلوت حاوی قارچ و سوبسترا کمکی مشاهده شد. این کاهش میزان COD نشان‌دهنده فعالیت قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های موجود در سوبسترا کمکی و خاک مورد مطالعه در مصرف آنتراسن و فنانترون می‌باشد. Janbandhu و Fulekar گزارش نمودند که با افزایش زمان انکوباسیون میزان حذف COD توسط میکروارگانیسم‌ها افزایش یافت (۹) که این نتایج با مطالعه حاضر همخوانی دارد. Gallego و همکاران (۲۰۰۳) با بررسی تجزیه و سم‌زدایی مخلوطی از آلاینده‌های پایدار (۲- کلروفل و فل) به وسیله احیای بیولوژیکی هوازی به این نتیجه رسیدند که در زمان انکوباسیون ۳۶ ساعت ۹۹/۸ درصد فل و ۹۲/۵ درصد COD حذف شد (۲۲). در سال ۲۰۰۷، Alcocer و همکاران گزارش نمودند که توده میکروبی دارای بازدهی در دامنه ۹۵ درصد تا ۹۹/۸ درصد برای آلاینده‌های مونو، دی و تری کلروفل و همچنین ۸۵ درصد تا ۹۷/۸ درصد برای حذف COD است (۲۳).

با توجه به مطالعه تصفیه‌پذیری انجام شده برای خاک آلوده شده با آنتراسن و فنانترون نتایج این مطالعه نشان داد که وجود سوبسترا کمکی کود مرغی باعث افزایش حذف آنتراسن و فنانترون در مقایسه با پایلوت‌های شاهد و حاوی قارچ می‌باشد. این افزایش احیای بیولوژیکی می‌تواند به دلیل مقادیر بالای کربن و نیتروژن و دیگر موادمعدنی در کود مرغی جهت تأمین رشد میکروارگانیسم باشد.

سپاسگزاری

یافته‌های این مقاله حاصل از انجام پایان‌نامه

محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می باشد. بدینوسیله از حامی مالی طرح قدردانی بعمل می آید.

کارشناسی ارشد مهندسی بهداشت محیط خانم طیبیه کلتی، طرح تحقیقاتی شماره ۳۹۴۳۶۹، با حمایت مالی معاونت

References

1. Chen M, Xu P ZG, Yang C, Huang D. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. *Biotechnology Advances* 2015; 33(6): 745-755.
2. Tam N, Guo C, Yau W WY. Preliminary study on biodegradation of phenanthrene by bacteria isolated from mangrove sediments in Hong Kong. *Mar Pollut Bull* 2004; 45(1-12): 316-324.
3. Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment* 2008; 42(13): 2895-2921.
4. Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J Chem Technol Biot* 2005; 80(7): 723-736.
5. Forsgren AJ. Wastewater Treatment: Occurrence and Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): CRC Press; 2015.
6. Hadibarata T, Yusoff ARM, Aris A, Kristanti RA. Identification of naphthalene metabolism by white rot fungus *Armillaria* sp. F022. *J Environ Sci* 2012; 24(4): 728-732.
7. Simarro R, González N, Bautista LF, Sanz R, Molina MC. Optimisation of key abiotic factors of PAH (naphthalene, phenanthrene and anthracene) biodegradation process by a bacterial consortium. *Water Air Soil Poll* 2011; 217(1-4): 365-374.
8. Chauhan A, Oakeshott JG, Jain RK. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian J Microbiol* 2008; 48(1): 95-113.
9. Janbandhu A, Fulekar M. Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *J Hazard Mater* 2011; 187(1): 333-340.
10. Pawar RM. The Effect of Soil pH on Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHS). *Journal of Bioremediation & Biodegradation* 2015; 2015.
11. Gurjeet P, Kothiyal N, Kothial NC, Kumar Vaneet. Bioremediation of some polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) from soil using *Sphingobium indicum*, *Sphingobium japonicum* and *Stenotrophomonas maltophilia* bacterial strains under aerobic conditions. *J Environ Res Develop* 2014; 8(3): 395-405.
12. Kaizar H, Norli I. Bioremediation and detoxification of pulp and paper mill effluent: A review. *Research Journal of Environmental Toxicology* 2015; 9(3): 113-134.
13. Sayara T, Borràs E, Caminal G, Sarrà M, Sánchez A. Bioremediation of PAHs-contaminated soil through composting: Influence of bioaugmentation and biostimulation on contaminant biodegradation. *Int Biodeter Biodegr* 2011; 65(6): 859-865.
14. Wirasmita R, Hadibarata T. Potential of the white-rot fungus *Pleurotus pulmonarius* F043 for degradation and transformation of fluoranthene. *Pedosphere* 2016; 26(1): 49-54.

15. Atagana HI. Co-composting of PAH-contaminated soil with poultry manure. *Lett Appl Microbiol* 2004; 39(2): 163-168.
16. Amin MM, Giahi M, Mansourian M. Assessment of the feasibility of anaerobic composting for treatment of perchlorate-contaminated soils in a war zone. *Int J Environ Health Engin* 2015; 4(1): 16.
17. Wong JW, Wan CK, Fang M. Pig manure as a co-composting material for biodegradation of PAH-contaminated soil. *Environ Technol* 2002; 23(1): 15-26.
18. Arbabi M, Nasser S, Chimezie A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in petroleum contaminated soils. *Iran J Chem Chem Eng (IJCCE)* 2009; 28(3): 53-59.
19. Hadibarata T, Zubir MMFA, Chuang TZ, Yusoff ARM, Salim MR, Fulazzaky MA, et al. Degradation and transformation of anthracene by white-rot fungus *Armillaria* sp. F022. *Folia Microb* 2013; 58(5): 385-391.
20. Adams G, Tawari-Fufeyin P, Ehinomen I, Coli E, Heterotrophic CT. Bioremediation of spent oil contaminated soils using poultry litter. *Res J Eng Appl Sci* 2014; 3(2): 124-130.
21. Boonchan S, Britz ML, Stanley GA. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl Environ Microb* 2000; 66(3): 1007-1019.
22. Gallego A, Fortunato M, Foglia J, Rossi S, Gemini V, Gomez L, et al. Biodegradation and detoxification of phenolic compounds by pure and mixed indigenous cultures in aerobic reactors. *Int Biodet Biodeg* 2003; 52(4): 261-267.
23. Salmerón-Alcocer A, Ruiz-Ordaz N, Juárez-Ramírez C, Galíndez-Mayer J. Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed microbial culture constituted by *Burkholderia* sp., *Microbacterium phyllosphaerae*, and *Candida tropicalis*. *Biochem Eng J* 2007; 37(2): 201-211.