



Original Research Paper

Investigating the performance and biochemical composition of (*Pleurotus eryngii*) in Mycoremediation of Cadmium (Cd) and Lead (Pb) from the liquid growth medium

Nasim Goligar, Sara Saadatmand *, Ramazan Ali Khavari Nejad

Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Key Words

Edible Mushroom
Heavy metal
Mycoremediation
Pollution

Abstract

Introduction: Considering human activities, especially industrial development, pollution with heavy metals such as Cadmium (Cd) and Lead (Pb) is becoming a critical challenge for the environment, which may endanger human life. Nowadays, Mycoremediation is mentioned as a useful, economic and efficient way to reduce heavy metal pollution. In this study, the efficiency of *Pleurotus eryngii* in refining heavy metals Lead (Pb) and Cadmium (Cd) in a liquid growth medium was investigated.

Materials & Methods: In order to evaluate the performance of the above fungus, the amount of heavy metals uptake, protein concentration, the amount of catalase enzyme, and the amount of phenolic and flavonoid compounds in the presence of heavy metals (Lead and Cadmium) in four experimental groups with dilution levels of 0, 150, 250 and 350 ppm was measured.

Result: The highest absorption rates of heavy metals for lead and cadmium were 52.33 ± 0.57 and 50.00 ± 1.20 , respectively. Also, the results increased the concentrations of phenols, flavonoids, proteins, and catalase by increasing the concentrations of the mentioned metals respectively (3.23 ± 0.50 , 3.50 ± 0.08) and (27.26 ± 0.12 , 28.76 ± 0.08) mg g^{-1} , (0.65 ± 0.01 , 0.65 ± 0.01) mg ml^{-1} , (0.20 ± 0.05 , 0.50 ± 0.05) protein unit $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ showed that the results. According to the results, a significant difference was observed between the control group and the experimental groups ($P < 0.001$).

Conclusion: In general, according to the obtained results, it seems that *P. eryngii* can be used as a suitable candidate for mycoremediation.

* Corresponding Author's email: sadatmandsara@gmail.com

Received: 18 June 2021; Reviewed: 23 July 2021; Revised: 25 September 2021; Accepted: 26 October 2021

(DOI): [10.22034/AEJ.2021.306467.2646](https://doi.org/10.22034/AEJ.2021.306467.2646)

مقاله پژوهشی

بررسی عملکرد و ترکیبات بیوشیمیایی قارچ خوراکی شاه صدف (*Pleurotus eryngii*) در پالایش زیستی کادمیوم (Cd) و سرب (Pb) از محیط کشت مایع

نسیم گلیگر، سارا سعادت‌مند*، رمضانعلی خاوری‌نژاد

گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

قارچ خوراکی
فلز سنگین
قارچ پالایی
آلودگی

چکیده

مقدمه: با توجه به توسعه روزافزون فعالیت‌های بشر بویژه پیشرفت صنعت، آلودگی با فلزات سنگین از قبیل کادمیوم (Cd) و سرب (Pb) در حال تبدیل شدن به یک مسئله بسیار جدی برای محیط زیست است، که حیات زیست‌مندان آن را با مخاطره مواجه می‌کند. امروزه از قارچ پالایی (Mycoremediation) به عنوان روشی سودمند، ارزان قیمت و کارا برای کاهش آلودگی‌های فلزات سنگین یاد می‌شود. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه میزان کارایی قارچ *Pleurotus eryngii* در پالایش فلزات سنگین سرب و کادمیوم در محیط کشت مایع مورد بررسی قرار گرفت. در همین راستا به جهت بررسی عملکرد قارچ فوق، میزان جذب فلزات سنگین، غلظت پروتئین، میزان آنزیم کاتالاز و میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی در مواجهه با فلزات سنگین سرب و کادمیوم در چهار گروه آزمایشی با رقت‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ ppm سنجیده شد.

نتایج: بالاترین میزان جذب فلزات سنگین برای سرب و کادمیوم به ترتیب $(0.57 \pm 0.23/0.05)$ و $(0.20 \pm 0.01/0.00)$ میکروگرم بر گرم بوده است. هم‌چنین نتایج با افزایش غلظت فلزات ذکر شده میزان فنل، فلاونوئید، پروتئین، کاتالاز را به ترتیب برای سرب و کادمیوم $(0.50 \pm 0.23/0.00)$ و $(0.08 \pm 0.03/0.00)$ و $(0.12 \pm 0.27/0.08)$ میلی گرم در گرم، $(0.01 \pm 0.65/0.01)$ و $(0.01 \pm 0.65/0.01)$ میلی گرم در میلی لیتر و $(0.05 \pm 0.50/0.00)$ و $(0.05 \pm 0.20/0.00)$ $\text{unit min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{ protein}$ نشان داد. با توجه به نتایج به دست آمده اختلاف معنی دار میان گروه شاهد و گروه‌های آزمایشی مشاهده شد ($P < 0.01$).

بحث و نتیجه گیری: در مجموع با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد قارچ شاه صدف *P. eryngii* می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسب جهت قارچ پالایی مورد استفاده قرار گیرد.

مقدمه

به طور طبیعی فلزات سنگین اجزای طبیعی پوسته زمین هستند، اما توسعه روزافزون و فعالیت‌های بی‌رویه از قبیل: رهاسازی پساب‌های فاضلاب شهری و صنعتی به رودخانه، دفن غیراصولی پسماندهای شهری، صنعتی و معدنی در مکان‌های نامناسب، حمل و نقل و فعالیت‌های شهری در مناطق شهری و مصرف غیراصولی کودشیمیایی در زمین‌های کشاورزی به دلیل وجود فلزات سنگین در ساختار شیمیایی کودهای اوره، فسفات و پتاس باعث افزایش غلظت این فلزات در خاک می‌گردد (۱). بشر چرخه‌های ژئوشیمیایی و تعادل بیوشیمیایی این گروه را به شدت تغییر داده است. عناصر سمی مانند فلزات سنگین از مهم‌ترین آلاینده‌های زیستی می‌باشند (۲، ۳) و به طور معمول به عنوان عناصر با خواص فلزی (انعطاف‌پذیری، هدایت الکتریکی، پایداری به عنوان کاتد، خصوصیات لیگاند، و غیره) و عدد اتمی < 20 تعریف شده‌اند (۴). فلزات سنگین از قبیل کادمیوم، مس، سرب، نیکل و... در غلظت‌های پائین هم به دلیل تجزیه نشدن در بدن باعث اختلال در متابولیسم می‌گردند به همین دلیل به تدریج در بافت‌های چربی، عضلات، استخوان‌ها و مفاصل انسان رسوب نموده و انباشته می‌گردند. انواع سرطان، مشکلات باروری/ ناباروری، ضعف عمومی در عضلات، کاهش اشتها، تهوع، التهاب غشاهای مخاطی چشم، بینی و حنجره، ضایعات پوستی، اختلالات روانی و عصبی، بیماری‌های قلبی، تخریب کلیه، شکستگی استخوان و آسیب احتمالی به DNA از جمله عوارض و بیماری‌های برشمرده شده در مواجهه با فلزات سنگین هستند (۵)، ۶، ۷، ۸، ۹. از جمله پرکاربردترین فلزات سنگین، دو فلز کادمیم (Cd) و سرب (Pb) هستند (۱۰). کادمیم و ترکیبات آن به میزان بسیار کم نیز سمی هستند. استنشاق هوای آلوده به کادمیم به سرعت دستگاه تنفس و کلیه‌ها را با مشکل مواجه می‌کند و در برخی موارد کشنده است (۱۱). هم‌چنین بلع مقدار غیرمجاز کادمیم موجب مسمومیت‌های شدید کبد و کلیه‌ها می‌گردد. کادمیم به طور گسترده در ساختمان باتری‌های نیکل-کادمیوم، رنگدانه‌ها، آبکاری الکترونیکی، تثبیت ساختمان پلاستیک، آلیاژهای فلزهای زود ذوب و ... به کار می‌رود. سرب نیز همانند کادمیم از نظر زیست‌شناختی فلزی غیرضروری برای بدن انسان است (۱۲). در مطالعات مختلف همواره از این فلز به عنوان یکی از آلاینده‌های اصلی محیط زیست نام برده شده است. سرب در دوزهای پایین باعث اختلال رشد جنین، نوزادان و کودکان خردسال، آسیب مغزی، مشکلات تنفسی، مسمومیت با سیستم عصبی مرکزی و ناباروری مردان می‌شود. سرب نیز مانند کادمیم کاربردهای بسیاری در صنعت دارد از جمله این کاربردها می‌توان به ساخت لوله و مخازن آب، ساختمانی نیروگاه‌های هسته‌ای و... اشاره نمود (۱۳)،

۱۴، ۱۵). به دلیل رشد روز افزون فعالیت‌های صنعتی تولید فلزات سمی و پرکاربرد مانند سرب و کادمیوم در چند دهه گذشته به سرعت افزایش یافته است. غلظت فلزات به طور طبیعی در خاک معمولاً از کم‌تر از ۱ تا حداکثر ۱۰۰,۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم متغیر است (۱۶). آلودگی با فلزات سنگین یک مساله نامحسوس و جدی است که ایمنی محیط‌زیست و سلامت انسان را تهدید می‌کند (۱۷). سطوح بیش از حد بسیاری از این فلزات می‌تواند منجر به تخریب کیفیت خاک، کاهش عملکرد/ کیفیت پایین محصولات کشاورزی شود که متعاقباً خطرات قابل توجهی برای سلامت انسان، حیوانات و اکوسیستم ایجاد می‌کند. مشخص شده است که تنش سمی ناشی از فلزات سنگین/ فلزها می‌تواند بر فراوانی و ساختار جوامع میکروبی خاک و تنوع آن تأثیر جدی بگذارد (۱۸) و عملکرد اکوسیستم را تغییر دهد (۱۹). بنابراین، حذف فلزات انباشته شده ضروری است. یکی از فرآیندهای بسیار مهم و کاربردی جهت کاهش فلزات از محیط‌زیست پالایی (Bioremediation) است (۲۰). همواره از این روش به عنوان یک فناوری کاربردی یاد شده که نتایج بسیار مفیدی را در حذف فلزات سنگین از خود نشان داده است (۲۱). زیست پالایی استفاده از سیستم‌های زیستی برای حذف یا کاهش غلظت مواد زائد خطرناک از محیط‌های آلوده و پاکسازی آلودگی‌های آلی و معدنی، با بهره‌جویی از ارگانیسم‌هایی نظیر: باکتری‌ها، جلبک‌ها و قارچ‌ها است. نوع ویژه از زیست پالایی که در آن پالایند قارچ است، قارچ پالایی یا Mycoremediation نامیده می‌شود (۲۲). قارچ‌ها دارای یک دستگاه آنزیمی، سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی، ناقل‌های فلزی (۲۳) هستند که آن‌ها را قادر می‌سازد فلزات سنگین را تخریب و یا به انواع دیگر زباله‌ها با استفاده از فرآیندهایی نظیر جذب بیولوژیکی و تبدیل بیولوژیکی بدل نمایند و در نتیجه، فرایند حذف را موثرتر، سریع‌تر و بسیار ارزان‌تر از روش‌های دیگر انجام دهند (۲۲). در میان گروه‌های قارچی، قارچ‌های چتری (Basidiomycota) از مفیدترین قارچ‌ها برای قارچ پالایی هستند. زیرا میسلیم این قارچ‌ها جاذب یون‌های فلزی بوده، به راحتی کشت شده، عملکرد بالایی دارند و به طور کلی ایمن قلمداد می‌شوند. لذا جاذب‌های زیستی ساخته شده از این قارچ‌ها، در صورت استفاده عملی، توسط انسان قابل قبول هستند (۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷). قارچ‌های چتری با دارا بودن توانایی در تجمع فلزات و هم‌چنین به دلیل خواص مکانیکی عالی‌شان، فرصتی برای جذب انتخابی یون‌های فلزات سنگین صنعتی از آب‌های آلوده فراهم می‌کند (۲۸). قارچ شاه صدف پلوروتوس ارینجی متعلق به خانواده پلوروتاسه و شاخه بازیدیومایکوتا است (۲۹). این قارچ ماندگاری خوبی دارد و به طور گسترده کشت می‌شود. وقتی خام است طعم و عطر کمی دارد اما وقتی پخته می‌شود، بافت گوشتی دارد (۲۲). تاکنون از قارچ شاه صدف بیش‌تر برای اهداف

عصاره گیری از نمونه: برای تهیه عصاره ۰/۰۵ گرم بافت تر از میسلیم قارچ، در هاون چینی و محیط سرد توسط ۲ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH ۶/۸ ساییده شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. در ادامه فاز بالایی به یک ویال ۲ میلی لیتری منتقل و در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۳۲، ۳۳).

سنجش ترکیبات بیوشیمیایی قارچ

الف- سنجش غلظت عناصر جذب شده: برای اندازه گیری غلظت دو فلز سنگین سرب و کادمیوم، میسلیم های جدا شده در داخل ظروف تفلون به ابعاد ۳×۳ سانتی متر که از قبل استریل شده بود قرار گرفت. سپس به مدت ۲۴ ساعت هضم اسیدی کامل به وسیله اسید نیتریک صورت گرفت. پس از تصفیه عصاره به وسیله صافی توسط دستگاه جذب اتمی (Atomic Absorption) مدل Shimadzu AAS 80 و با سیستم کوره بر حسب $\mu\text{g g}^{-1}$ وزن خشک اندازه گیری شدند (۳۴). حد دقت تشخیص دستگاه ۰/۱ ppb بود.

ب- سنجش غلظت پروتئین: برای سنجش غلظت پروتئین از روش Bradford استفاده شد (۳۵). این روش بر اساس اتصال رنگ کوماسی بریلیانت بلو در معرف برادفورد به پروتئین استوار است.

- تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد: برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا محلول اولیه پروتئین تهیه شد. ۵ میلی گرم از پروتئین استاندارد در ۵ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با pH ۷ حل شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. پروتئین استاندارد در این آزمایش آلومین سرم گاوی (BSA) بوده است.

- تهیه منحنی پروتئین استاندارد: محلول های پروتئین استاندارد با سرم آلومین گاوی (BSA) در غلظت های ۴۰۰، ۸۰، ۱۲۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شدند. در همین راستا به منظور سنجش محتوای پروتئین به لوله آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر از هر یک از محلول های استاندارد یا عصاره پروتئینی (میسلیم قارچ) و ۱ میلی لیتر معرف برادفورد (کوماسی بریلیانت بلو) اضافه گردید. پس از هم زدن محتویات لوله ها، نمونه ها به مدت یک دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند و بعد میزان جذب نور آن ها با دستگاه اسپکتوفتومتر فرابنفش مرئی مدل LAMBDA 265 محصول شرکت Perkin Elmer آمریکادر طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. لوله های حاوی صفر میکرولیتر پروتئین استاندارد جهت صفر کردن دستگاه استفاده گردید و هر کدام از نمونه ها با سه تکرار انجام شد و میانگین آن ها جهت تهیه منحنی استاندارد استفاده گردید (۳۶) (شکل ۱). سپس غلظت پروتئین هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد آلومین و بر حسب میلی گرم بر

تغذیه ای استفاده شده است (۳۰) و جنبه های مصرفی دیگر آن نظیر توانایی زیست پالایش کمتر مورد بررسی قرار گرفته است بنابراین با توجه به این که قارچ ها یکی از مفیدترین ارگانیسم ها در حذف آلودگی ها به ویژه پالایش فلزات سنگین از محیط هستند. در این مطالعه میزان زیست پالایی قارچ *P. eryngii* و کارایی آن در کاهش مقادیر فلزات سنگین سرب و کادمیوم مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش ها

تهیه قارچ: میسلیم های قارچ *P. eryngii* مورد استفاده در این مطالعه از آزمایشگاه کشت قارچ و جلبک دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران تهیه شد.

تهیه محیط کشت: برای کشت قارچ *P. eryngii* مورد مطالعه از محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth) که حاوی دکستروز و سیب زمینی و مواد مغذی مورد نیاز را برای رشد مطلوب قارچ ها فراهم می کند استفاده شد. برای تهیه محیط کشت مذکور ۲۴ گرم از آن به ۱ لیتر آب مقطر اضافه گردید، سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه جهت استریل اتوکلاو شد.

استوک سرب و کادمیوم: برای تهیه استوک سرب ۱/۶۱ گرم پودر سفید نیترات سرب (II) $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ در یک لیتر آب مقطر حل شد. هم چنین برای تهیه استوک کادمیوم ۲/۳۷ گرم از پودر CdSO_4 در یک لیتر آب مقطر حل شد. مواد شیمیایی مورد استفاده برای این مطالعه از شرکت سیگما بوده است. سپس استوک های به دست آمده برای از بین بردن آلودگی میکروبی در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل و اتوکلاو شدند (۳۱).

تیمار قارچ با کادمیوم و سرب: ۸ میلی لیتر محیط کشت حاوی غلظت های ۱۵۰، ۲۵۰، ۳۵۰ میلی گرم در لیتر (ppm) سرب و کادمیوم با استفاده از استوک ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر (ppm) از نمک های نیترات سرب و سولفات کادمیوم در و بال های ۵۰ میلی لیتری آماده سازی شد. محیط PDB بدون فلز سنگین به عنوان کنترل استفاده شد. سوسپانسیونی از کشت تازه قارچ *Pleurotus eryngii* در محیط PDB تهیه و به میزان برابر به محیط های مایع افزوده شد. کشت ها به مدت ۳۰ روز در شیکر اینکوباتور با دور هم زنی ۱۵۰ rpm و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. به منظور تعیین میزان بهینه غلظت قارچ در جذب فلزهای سنگین کادمیم و سرب، سه گروه آزمایشی علاوه بر گروه شاهد با سه تکرار انجام شد.

شرکت Perkin Elmer آمریکا اندازه‌گیری شد. برای تنظیم کردن صفر دستگاه از ترکیب آب مقطر، فولین-سیوکالتیو و کربنات سدیم بدون افزودن عصاره استفاده شد برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار و میانگین آن‌ها گزارش شد. تهیه استوک اسیدگالیک: برای تهیه اسیدگالیک از شرکت sigma ۲۵ میلی‌گرم از این ماده را وزن کردیم و در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نمودیم سپس غلظت‌های مختلف از اسیدگالیک را با استفاده از فرمول $N_1V_1=N_2V_2$ تهیه کردیم.

- تهیه استاندارد اسید گالیک: جهت تهیه استاندارد از روش Pandjaitan و همکاران (۴۰) و Leong و Shui (۴۱) استفاده گردید. برای تهیه منحنی کالیبراسیون جهت اندازه‌گیری ترکیبات فنلی به یک میلی‌لیتر محلول‌های اسید گالیک در دامنه ۰-۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۵ میلی‌لیتر معرف فولین-سیوکالتیو و ۱ میلی‌لیتر محلول کربنات سدیم یک مولار اضافه گردید و جذب محلول‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و در ادامه میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره‌ها با کمک منحنی استاندارد اسیدگالیک محاسبه و بر حسب معادل میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم وزن خشک قارچ تعیین گردید. معادله به‌دست آمده $Y=0.0002x+0.0142$ بوده است (شکل ۲).

۵- **سنجش کل محتوای فلاونوئیدی:** از معرف کلرید آلومینیوم Merck آلمان جهت سنجش میزان فلاونوئید به روش رنگ‌سنجی استفاده شد (۴۲). محتوای فلاونوئیدی براساس روش Beketov و همکاران، سنجیده شد (۴۳). به ۰/۲ میلی‌لیتر از هر عصاره مخلوط ۴/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۰٪ و ۰/۲ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲٪ و ۰/۱ میلی‌لیتر اسید استیک ۳۳٪ اضافه و به خوبی مخلوط گردید و جذب آن بعد از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق و تاریکی در ۴۱۴ نانومتر با دستگاه اسپکتوفتومتر فرابنفش مرئی خوانده شد. منحنی کالیبراسیون محلول‌های کوئرستین شرکت Sigma در دامنه ۸۰-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اتانول تهیه گردید. سپس محتوای ترکیبات فلاونوئیدی کل عصاره‌ها بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن خشک محاسبه شد. آزمایشات با ۳ بار تکرار انجام شد و میانگین آن‌ها گزارش گردید (شکل ۳).

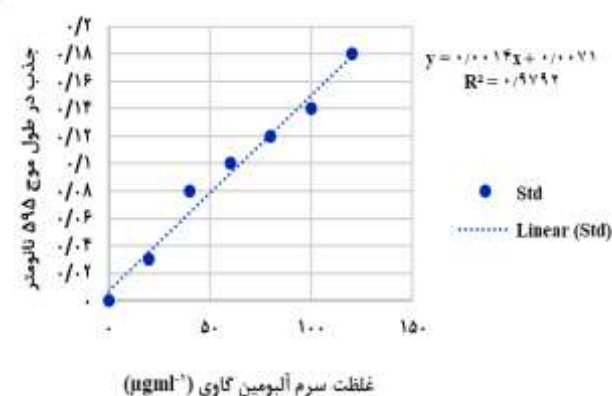
تجزیه و تحلیل داده‌ها: جهت تعیین اختلاف بین گروه‌های آزمایشی در این مطالعه، از آزمون واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از تست دانکن (Duncan) با نرم‌افزار Graphpad ۷.۸ در سطح ۰/۰۱ استفاده شد.

گرم وزن تر محاسبه گردید. معادله به‌دست آمده از منحنی استاندارد معرف برادفورد:

$$Y=0.0014x+0.0071$$

$$R^2=0.9792$$

Y: میزان جذب نوری محلول پروتئینی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر، X: میزان غلظت پروتئین محلول در نمونه، R^2 : ضریب همبستگی



شکل ۱: نمودار منحنی استاندارد معرف برادفورد

ج- **سنجش آنزیم کاتالاز:** برای سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتالاز، ۳ میلی‌لیتر مخلوط واکنش متشکل از: ۲/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار با pH ۶/۸، ۰/۱ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۱۵ میلی‌مولار، ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی تهیه شد. با اضافه کردن عصاره به محیط واکنش تجزیه H_2O_2 توسط آنزیم شروع و میزان تغییرات جذب با بررسی کاهش مقدار هیدروژن در طول موج ۲۴۰ نانومتر به مدت یک دقیقه در دستگاه اسپکتوفتومتر فرابنفش مرئی سپس فعالیت آنزیمی به صورت تغییرات جذب به ازای گرم وزن تر در دقیقه سنجیده شد (۳۷).

د- **سنجش ترکیبات فنلی:** محتوای فنلی موجود در میسلیم قارچ با استفاده از تغییر رنگ‌سنجی معرف Folin-Ciocalteu به روش Swain اندازه‌گیری شد (۳۸) و اسیدگالیک به عنوان استاندارد تعیین شد. - تهیه محلول فولین سیوکالتیو: برای سنجش ترکیبات فنلی از معرف فولین سیوکالتیو استفاده شد. معرف فولین سیوکالتیو به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق گردید (۳۹).

- روش سنجش: در این روش ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره اتانولی با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر ۲/۵ فولین-سیوکالتیو ۱۰ بار رقیق شده و ۲ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ اضافه گردید پس از مدت زمان ۹۰ دقیقه در تاریکی و در دمای اتاق جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با اسپکتوفتومتر فرابنفش مرئی مدل LAMBDA 265 محصول

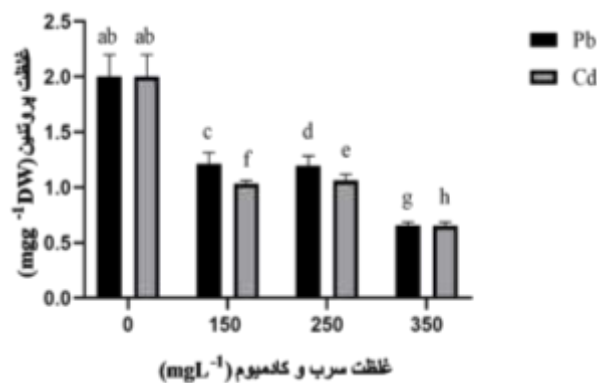
جدول ۱: غلظت‌های متفاوت استوک اسیدگالیک

۱۰۰	۹۰	۸۰	۷۰	۶۰	۵۰	۴۰	۳۰	۲۰	۱۰	۰	محلول (/)
۰	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	آب مقطر (میلی‌لیتر)
۱۰	۹	۸	۷	۶	۵	۴	۳	۲	۱	۰	استوک اسیدگالیک (میلی‌لیتر)

جدول ۲: میزان انباشت فلزات سنگین در میسلیم قارچ‌های گروه

شاهد و گروه‌های آزمایشی		گروه آزمایشی (ppm)
کادمیوم	سرب	
انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	
۰/۰ $\pm$ ۰/۰ gh	۰/۰ $\pm$ ۰/۰ gh	شاهد
۷/۶۶ $\pm$ ۰/۸۸ f	۱۵/۶۶ $\pm$ ۰/۸۸ e	۱۵۰
۲۱/۰۰ $\pm$ ۰/۸۸ d	۳۵/۶۶ $\pm$ ۰/۱۵ c	۲۵۰
۵۰/۰۰ $\pm$ ۰/۲۰ b	۵۲/۳۳ $\pm$ ۰/۵۷ a	۳۵۰

میزان پروتئین: با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان پروتئین سنجش شده در بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). بیش‌ترین میزان پروتئین در گروه شاهد و کم‌ترین آن در غلظت ۳۵۰ ppm به‌دست آمد (شکل ۵، جدول ۳).



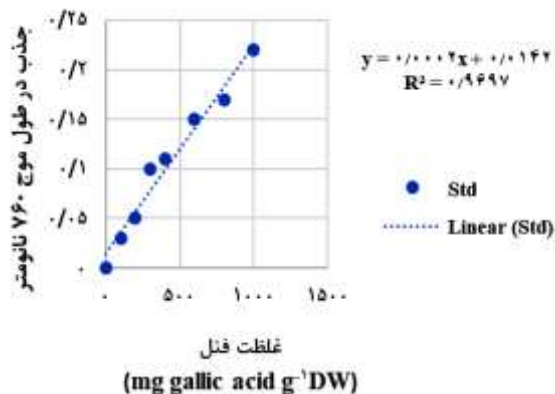
شکل ۵: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم بر میزان پروتئین

جدول ۳: سنجش میزان پروتئین در میسلیم قارچ‌های گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی

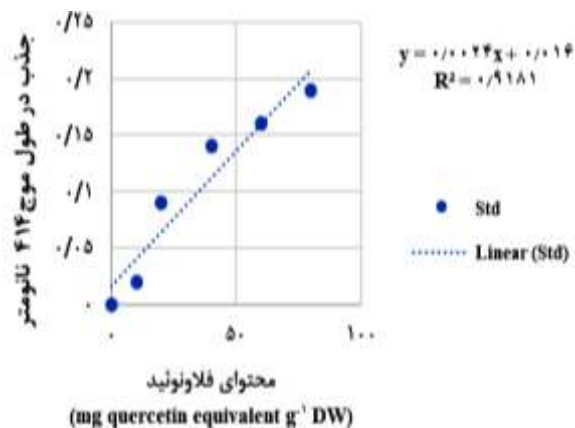
گروه آزمایشی (ppm)		گروه آزمایشی (ppm)
کادمیوم	سرب	
انحراف معیار $\pm$ میانگین	انحراف معیار $\pm$ میانگین	
۲/۰۰ $\pm$ ۰/۱۱ ab	۲/۰۰ $\pm$ ۰/۱۱ ab	شاهد
۱/۰۳ $\pm$ ۰/۰۱ f	۱/۲۱ $\pm$ ۰/۰۵ c	۱۵۰
۱/۰۶ $\pm$ ۰/۰۳ e	۱/۱۹ $\pm$ ۰/۰۵ d	۲۵۰
۰/۶۵ $\pm$ ۰/۰۱ h	۰/۶۵ $\pm$ ۰/۰۱ g	۳۵۰

آنزیم کاتالاز: با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان آنزیم کاتالاز سنجش شده در بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). بیش‌ترین میزان پروتئین در گروه شاهد و کم‌ترین آن در غلظت ۳۵۰ ppm به‌دست آمد (شکل ۶، جدول ۴).

میزان فنل: با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان فنل سنجش شده در بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($P < ۰/۰۰۱$). میزان فنل در تمامی گروه‌های آزمایشی بیش‌تر از گروه شاهد بود. در بین گروه‌های آزمایشی غلظت ۳۵۰ ppm نیز



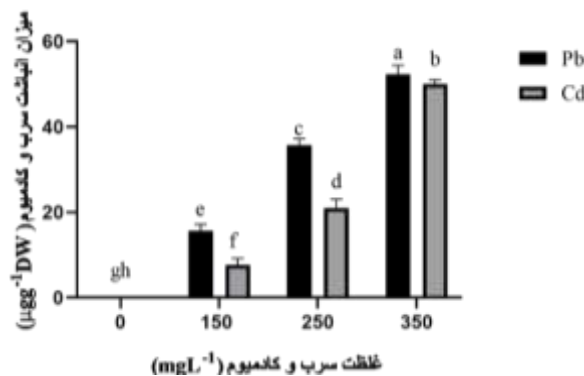
شکل ۲: نمودار منحنی استاندارد اسید گالیک (محاسبه فنل)



شکل ۳: نمودار منحنی استاندارد کوئرستین (محاسبه فلاونوئید)

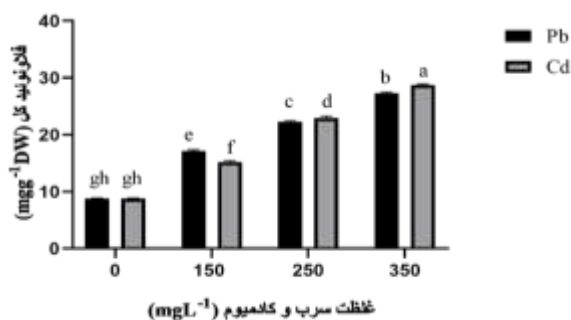
نتایج

میزان انباشت کادمیوم و سرب: با توجه به نتایج به‌دست آمده از مقایسه غلظت‌های مختلف فلزات سنگین در بین گروه‌های آزمایشی میانگین انباشت در قارچ‌های تیمار شده با غلظت ۳۵۰ ppm سرب و کادمیوم، به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر گروه‌ها در سطح $P < ۰/۰۰۱$ دارای اختلاف بود (شکل ۴، جدول ۲).



شکل ۴: انباشت غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم در میسلیم

معنی‌دار بود ($P < 0.01$). میزان فلاونوئید سنجش شده در تمامی گروه‌های آزمایشی بیش‌تر از گروه شاهد بود. در بین گروه‌های آزمایشی غلظت ۳۵۰ ppm بیش‌ترین میزان فلاونوئید و غلظت ۱۵۰ ppm کم‌ترین میزان را در بین گروه‌ها دارا بود (شکل ۸، جدول ۶).



شکل ۸: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم بر میزان فلاونوئید

جدول ۶: سنجش میزان فنل در میسلیم قارچ‌های گروه شاهد و

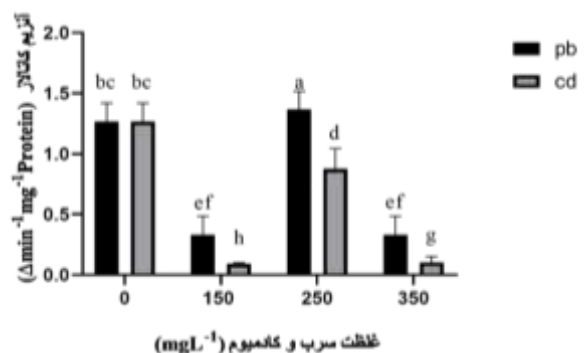
دیگر گروه‌های آزمایشی

گروه آزمایشی (ppm)	سرب		کادمیوم
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	
شاهد	۸/۸۰ ± ۰/۰۵ ^{gh}	۸/۸۰ ± ۰/۰۵ ^{gh}	
۱۵۰	۱۷/۱۳ ± ۰/۱۴ ^e	۱۵/۲۰ ± ۰/۱۵ ^f	
۲۵۰	۲۲/۲۳ ± ۰/۱۲ ^c	۲۲/۹۰ ± ۰/۲۰ ^d	
۳۵۰	۲۷/۲۶ ± ۰/۱۲ ^b	۲۸/۷۶ ± ۰/۰۸ ^a	

بحث

امروزه آلودگی با فلزات سنگین یکی از معضلات محیط زیست است که نه تنها اثرات منفی گسترده‌ای بر کیفیت و عملکرد محصولات کشاورزی دارد (۴۴)، بلکه سلامت و رفاه حیوانات و مردم را نیز تهدید می‌کند (۴۵) فاضلاب‌ها و نحوه دفع آن یکی از چالش‌های عصر کنونی است. مدفوع انسانی و حیوانی، ضایعات کشتارگاهی و... دارای مقادیر قابل توجهی نیتروژن و فسفر هستند که منجر به غنی شدن محیط می‌گردد. بنابراین پیدا کردن راهکار برای حذف فلزات سنگین یکی از اولویت‌های دانشمندان در عصر حاضر است (۴۶). با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، فلز سرب انباشت بیش‌تری نسبت به کادمیوم را در میسلیم قارچ از خود نشان داد. در مجموع جذب یون‌های فلزات سنگین در قارچ‌ها بیش‌تر از گیاهان زراعی، میوه‌جات و سبزیجات است (۴۷، ۴۸) اما این میزان جذب متأثر از عوامل مختلفی از قبیل اکوسیستم، جنس خاک، اسیدیته، فاصله از منبع آلودگی، فصل برداشت، میسلیم و نوع قارچ است (۴۹). جذب بیولوژیکی یک فرآیند منفعل است و فلزات سنگین بر روی سطح جاذب‌های زیستی جذب

بیش‌ترین میزان فنل را در بین گروه‌ها دارا بود (شکل ۷، جدول ۵).

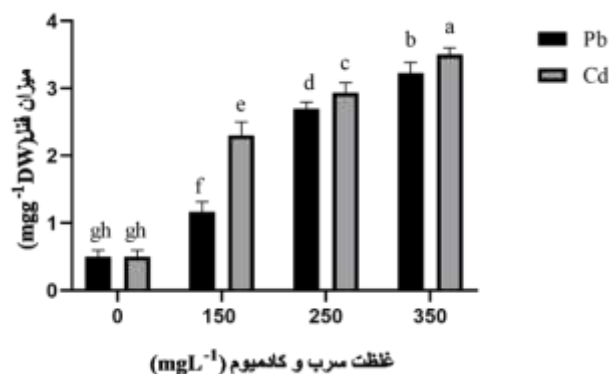


شکل ۶: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم بر میزان آنزیم کاتالاز

جدول ۴: سنجش میزان آنزیم کاتالاز در میسلیم قارچ‌های گروه

شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی

گروه آزمایشی (ppm)	سرب		کادمیوم
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	
شاهد	۱/۰۰ ± ۰/۱۱ ^{cd}	۱/۰۰ ± ۰/۱۱ ^{cd}	
۱۵۰	۰/۹۴ ± ۰/۰۰ ^e	۰/۳۰ ± ۰/۰۵ ^g	
۲۵۰	۱/۶۶ ± ۰/۰۸ ^a	۱/۲۰ ± ۰/۰۵ ^b	
۳۵۰	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^f	۰/۲۰ ± ۰/۰۵ ^h	



شکل ۷: تاثیر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم بر میزان فنل

جدول ۵: سنجش میزان فنل در میسلیم قارچ‌های گروه شاهد و

دیگر گروه‌های آزمایشی

گروه آزمایشی (ppm)	سرب		کادمیوم
	انحراف معیار ± میانگین	انحراف معیار ± میانگین	
شاهد	۰/۵۰ ± ۰/۰۵ ^{gh}	۰/۵۰ ± ۰/۱۱ ^{gh}	
۱۵۰	۱/۱۶ ± ۰/۱۱ ^f	۲/۳۰ ± ۰/۰۸ ^e	
۲۵۰	۲/۷۰ ± ۰/۰۸ ^d	۲/۹۳ ± ۰/۰۵ ^c	
۳۵۰	۳/۲۳ ± ۰/۰۵ ^b	۳/۵۰ ± ۰/۰۸ ^a	

میزان فلاونوئید: با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان فلاونوئید

سنجش شده در بین گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد دارای اختلاف

سرب باعث کاهش معنی‌دار پروتئین میسلیم قارچ *P. tuberregium* (به‌میزان ۳۶ درصد) و جیوه باعث کاهش حداکثر (به‌میزان ۳۰ درصد) در اسپوروکارپ‌ها شد. هم‌چنین علاوه بر کاهش پروتئین سرب باعث کاهش راندمان بیولوژیکی تولید اسپوروکارپ نیز شد (۶۳). در بسیاری از گونه‌های گیاهی تنش فلزات سنگین منجر به ایجاد تنش اکسیداتیو و تولید انواع فعال اکسیژن می‌گردد. انواع فعال اکسیژن طریق پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی سبب آسیب‌غشاشده و هم‌چنین می‌توانند سبب آسیب به پروتئین‌ها، مولکول DNA و کلروفیل شوند (۶۴، ۶۵). Guelfi و همکاران، نشان دادند که غلظت‌های بالاتر Cd (II) باعث اتولیز میسلیم *A. nidulans* می‌شود که منجر به تجزیه پروتئولیتیک و کاهش محتوای پروتئین می‌گردد (۶۶).

کاتالاز: با توجه به نتایج سنجش آنزیم کاتالاز میزان سرب در غلظت ۲۵۰ ppm افزایش و در غلظت‌های ۱۵۰ و ۳۵۰ ppm مقدار آن کاهش پیدا کرد. این یافته‌ها با یافته‌های Ulusu و همکاران (۶۷) مطابقت دارد، که دریافتند فعالیت کاتالاز در گیاه جعفری تحت استرس کادمیوم به‌دلیل کاهش جذب مواد مغذی مانند آهن، منگنز و روی کاهش می‌یابد. کاهش فعالیت کاتالاز به‌دلیل کادمیوم باعث می‌شود که آهن در محل فعال کاتالاز، جذب ناکافی آهن، جذب و تعامل با گروه‌های تیول در ساختار آن‌ها که باعث کاهش فعالیت آنزیم می‌شود جایگزین شود. علاوه بر این، کاهش فعالیت آنزیم‌ها (SOD، POD و CAT) در نهال‌های *Helianthus annuus* در معرض تنش سرب و در گیاهان ذرت در معرض تنش کادمیوم مشاهده شد (۶۸، ۶۹). به‌نظر می‌رسد علت این امر به‌دلیل تفاوت در پاسخ آنتی‌اکسیدان‌ها به منابع مختلف رادیکال یا اکسیدان باشد. با توجه به مطالعات Verma و همکاران، آنزیم کاتالاز در غلظت‌های بالای سرب و یا طولانی بودن مواجهه با آن تولید H_2O_2 و رادیکال‌های آزاد دیگر را در سطح سلول به‌شدت زیاد می‌کند، لذا موجب بازدارندگی در متابولیسم شده و فعالیت آنزیم کاتالاز کاهش می‌یابد (۷۰). هم‌چنین کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت‌های بالا، احتمالاً به‌دلیل غیرفعال شدن آنزیم توسط ROS (Reactive oxygen species)، شامل واسطه‌های اکسیژن رادیکال آزاد و غیررادیکال آزاد (پراکسیدها)، مانند رادیکال‌های سوپراکسید ($O_2^{\cdot-}$)، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال‌های هیدروکسیل ($OH^{\cdot}$) و اکسیژن تک (1O_2) می‌باشد (۷۱). این مولکول‌ها توسط پروتئین‌های غشای پلاسمایی، مانند: خانواده گسترده NADPH اکسیدازها (۷۲)، متابولیسم لیپیدها در پراکسیزوم‌ها (۷۳) و فعالیت آنزیم‌های مختلف سیتوزولی مانند سیکلوآکسیژنازها (۷۴) ایجاد می‌شوند. اکثریت قریب به اتفاق ROS سلولی (تقریباً ۹۰٪) از میتوکندری ناشی از فسفوریلاسیون اکسیداتیو ناشی می‌شود (۷۵). کاهش سنتز آنزیم و یا تغییر در تجمع زیر واحدهای آنزیم می‌باشد.

می‌شوند (۵۰). فرآیندهای خارج سلولی (چسبندگی و اتصال دیوار سلولی) و درون سلولی (اتصال به ترکیبات مانند: پروتئین‌ها) عملکردهایی هستند که به‌عنوان مکانیسم‌های تحمل فلزات سنگین در قارچ‌ها ارائه شده است (۵۱). با توجه به نتایج جذب دو فلز سنگین سرب و کادمیوم به‌وسیله میسلیم قارچ (جدول ۱، شکل ۴) با افزایش غلظت افزایش می‌یابد. بنابراین به‌نظر می‌رسد برای تهیه جاذب‌های زیستی می‌توان از قارچ *P. eryngii* استفاده کرد. عواملی مانند حضور جمعیت میکروبی، غلظت یون فلز، دما، pH و حضور مواد مغذی بر فرآیند جذب بیولوژیک تاثیر می‌گذارد (۵۲). با توجه به نتایج این مطالعه قارچ *P. eryngii* توانایی جذب بالاتر سرب را نسبت به کادمیوم داشت. پیش از این نیز نتایج مطالعات مختلف نشان داد در بین ۳۲ گونه قارچ وحشی آزمایش شده، سویه‌های *P. eryngii* یکی از بالاترین سطوح جذب سرب را در بین Basidiomycota دارند (۵۳). مشخص شده است که گونه‌های پلوروتوس پتانسیل جذب زیستی بسیار موثری را برای طیف وسیعی از آلاینده‌های محیطی از جمله فلزات سنگین نشان می‌دهند (۵۴). برطبق مطالعات انجام شده بیش از ۹۰٪ فلزات سنگین توسط *p. ostreatus* پاکسازی شدند. افزایش قابل توجهی از فلزات سنگین در پیلوس قارچ پس از فرایند برداشت از پیکر قارچ وجود داشته است (۵۵). پتانسیل تجمع زیستی *P. ostreatus* از محل‌های ضایعات فلزی نیز برای مس، آهن، روی و منگنز مورد ارزیابی قرار گرفته است (۵۶). گزارش شده است که الویت جذب به ترتیب برای آهن، آلومینیوم، روی و منگنز و پس از آن سرب و جیوه بوده است (۵۷). نشان داده شده است که گونه‌های پلوروتوس در برابر غلظت بالای کادمیوم مقاومت نشان می‌دهند (۵۸). در مطالعه جذب سطحی توسط Adhikari و همکاران، مشخص شده است که پروتئوس فلوریدانسیبت به *Fusarium oxysporum*، گونه‌های *Penicillium* و *Aspergillus awamorii* فلزات سنگین $Cr > Cd$ به‌ترتیب ۱/۲-۲/۵٪ بیش‌تر جذب می‌کند (۵۹).

پروتئین: با توجه به نتایج به‌دست آمده با افزایش میزان فلزات سنگین سرب و کادمیوم میزان پروتئین در میسلیم‌های قارچ کاهش معنی‌داری پیدا می‌نماید (جدول ۲، شکل ۵). فلزات سنگین و متالوئیدها می‌توانند به پروتئین‌های اصلی متصل شده و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها را مهار کنند (۶۰). فلزات سنگین نظیر کادمیوم، جیوه، سرب و آرسنیک به‌طور موثری در باز شدن شیمیایی و تخریب پروتئین‌ها دخالت دارند (۶۱، ۶۲)، بنابراین به‌نظر می‌رسد افزایش غلظت فلزات سنگین سرب و کادمیوم با تغییر در مکانیسم‌های درون سلولی باعث تخریب پروتئین‌های میسلیم قارچ و در نتیجه کاهش میزان آن شده باشد. پیش از این کاهش میزان پروتئین در حضور فلزات سنگین نیز به اثبات رسیده بود. به‌عنوان مثال با توجه به نتایج Akpaja و همکاران،

جدول ۷: مشارکت‌های قبلی جذب زیستی فلزات سنگین با استفاده از اشکال مختلف گونه پلوروتوس (۷۶)

منابع	فلزات سنگین	گونه پلوروتوس	نوع جذب
۲۴	Cd	<i>P. florida</i>	Oven- and freeze-dried, autoclaved mycelia
۷۸، ۷۷	Cr		
۸۰، ۷۹	Pb	<i>P. ostreatus</i>	Oven-dried mycelia
۸۱	Cd	<i>P. eryngii</i>	
۸۲	Cu, Cr, Ni, Zn		
۸۳	Se		
۸۴	Pb	<i>P. florida</i>	
۸۶، ۸۵	Cd	<i>P. ostreatus</i>	
۸۷	Hg	<i>P. ostreatus</i> ,	
۸۸	Cu, Cr, Ni, Zn	<i>P. florida</i> ,	Live mycelia
۸۹	Cu, Cr, Fe, Zn	<i>P. djamour</i>	
۹۰	Cr	<i>P. salmoneostramineus</i> ,	
۹۱	Pb	<i>P. cystidiosus</i>	
۹۲	Mn	<i>P. eryngii</i>	
۹۳	Cu, Cd, Fe, Ni, Pb, Zn	<i>P. floridianus</i> , <i>P. sajor-caju</i>	
۹۴	Pb	<i>P. ostreatus</i>	
۹۵	Co		
۹۶	Cu, Pb		
۹۷	Cd, Hg	<i>P. sapidus</i>	Biomass immobilized on calcium alginate
۹۹، ۹۸	Pb	<i>P. sajor-caju</i> and sunflower waste biomass hybrid	
۱۰۰	Cu, Cr, Cd	<i>P. ostreatus</i>	Biomass immobilized on XAD-4
۱۰۱	Cd, Co	<i>P. eryngii</i>	
۱۰۲	Cu		
۱۰۳	Cr	<i>P. ostreatus</i>	SMS
۱۰۵، ۱۰۴	Cu, Ni		
۱۰۶	Cd, Pb, Cu		
۸۶، ۸۵	Cd	<i>P. ostreatus</i>	Fruit body accumulation
۱۰۷	Hg		
۱۰۸	Cu		
۱۰۹	Cr	<i>P. cornucopiae</i>	
۱۱۰	Cd	<i>P. platypus</i>	
۵۷	Hg	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. tuber-regium</i> .	
		<i>P. ferulae</i>	
۱۱۱	Pb	<i>P. ostreatus</i> , <i>P. florida</i> , <i>P. djamour</i> ,	
۹۱	Pb	<i>P. salmoneostramineus</i> , <i>P. cystidiosus</i>	
		<i>P. eryngii</i>	
		<i>P. ostreatus</i>	
۱۱۲	Pb	<i>P. ostreatus</i>	
۱۱۳	Pb		
۱۱۴	Pb	<i>P. ostreatus</i>	
			Sun-dried fruit
۱۱۵	Cu	<i>P. platypus</i>	
۵۵	Cu, Pb, Zn, Mn	<i>P. eous</i>	
۱۱۶	Cd		
۱۱۷	Cr, Ni, Pb	<i>P. eryngii</i>	Oven-dried fruit
۱۱۸	Cd, Pb		Freeze-dried fruit

2. Singh, R., Gautam, N., Mishra, A. and Gupta, R., 2011. Heavy metals and living systems: An overview. Indian journal of pharmacology. 43(3): 246-253.
3. Velayatzadeh, M. and Abdollahi, S., 2010. Study and comparison of Hg, Cd and Pb accumulation in the muscle and liver tissues of *Aspius vorax* in Karoon River, in winter season. Journal of Animal Environment. 2(4): 65-72. (In Persian)
4. Valko, M., Morris, H. and Cronin, M.T., 2005. Metals, toxicity, and oxidative stress. Current Medical Chemistry. 12: 1161-1208.
5. Hon, K.L.E., Wang, S.S., Hung, E.C., Lam, H.S., Lui, H.H., Chow, C.M., Ching, G.K., Fok, T.F. and Leung, T.F., 2010. Serum levels of heavy metals in childhood eczema and skin diseases: friends or foes. Pediatric allergy and immunology. 21(5): 831-836.
6. Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J. and Márquez, J., 2010. Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. Free Radical Biology and Medicine. 49(9): 1328-1341.
7. Woimant, F. and Troceno, J.M., 2014. Disorders of heavy metals. Handbook of clinical neurology. 120: 851-864.
8. Bortey-Sam, N., Ikenaka, Y., Akoto, O., Nakayama S.M., Asante, K.A., Baidoo, E., Obirikorang, C., Mizukawa, H. and Ishizuka, M., 2018. Association between human exposure to heavy metals/metalloids and occurrences of respiratory diseases, lipid peroxidation, and DNA damage in Kumasi, Ghana. Environmental pollution. 235: 163-170.
9. Yang, A.M., Lo, K., Zheng, T.Z., Yang, J.L., Bai, Y.N., Feng, Y.Q., Cheng, N. and Liu, S.M., 2020. Environmental heavy metals and cardiovascular diseases: Status and future direction. Chronic diseases and translational medicine.
10. Emsley, J., 2011. Nature's building blocks: an AZ guide to the elements. Oxford University Press.
11. Verougstraete, V., Lison, D. and Hotz, P., 2003. Cadmium, lung and prostate cancer: a systematic review of recent epidemiological data. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 6(3): 227-256.
12. FDAU. 2011. United States Food and Drug Administration (2009). Regulations of bottled water. Accessed December.
13. Fewtrell, L., Kaufman, R. and Prüss-Üstün, A., 2003. Lead: assessing the environmental burden of diseases at national and local levels. Geneva.
14. Nwaka, S. and Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nature Reviews Drug Discovery. 5(11): 941-955.
15. Katsuno, K., Burrows, J.N., Duncan, K., Van Huijsdijnen, R.H., Kaneko, T., Kita, K., Mowbray, C.E., Schmatz, D., Warner, P. and Slingsby, B.T., 2015. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. Nature Reviews drug discovery. 14(1): 751-758.
16. Long, X.X., Yang, X.E. and Ni, W.Z., 2002. Current status and perspective on phytoremediation of heavy metal polluted soils. Journal of Applied Ecology. 13: 757-762.
17. Mishra, S., Bhargava, R.N., More, N., Yadav, A., Zenith, S. and Mani, S., 2019. Heavy Metal Contamination: An Alarming Threat to Environment and Human Health. In Environmental Biotechnology: For Sustainable Future; Sobota, R.C., Arora, N.K. and Kothari, R., Eds.; Springer: Singapore. 103-125.
18. Zhao, X., Huang, J., Lu, J. and Sun, Y., 2019. Study on the influence of soil microbial community on the long-term heavy metal pollution of different land-use types and depth layers in mine. Ecotoxicol. Environ. Saf. 170: 218-226.
19. Bai, X.T., Wang, J., Dong, H., Chen, J.M. and Ge, Y., 2020. The relative importance of soil properties and heavy metals/metalloids to modulate microbial community and activity at a smelting site. J. Soils Sediment. 21: 1-12.

علاوه بر این ممکن است فعال شدن پروتئازهای پراکسی‌زومی دلیل دیگری برای کاهش فعالیت کاتالاز باشد (۱۱۹). آنزیم کاتالاز در ساختمان خود دارای آهن است، وجود سرب بر سنتز آن اثر منفی گذاشته و عملکرد آن را با اختلال مواجه می‌نماید. پیش از این کاهش سنتز Heme و کاتالاز در مواجهه با سرب گزارش شده بود (۱۲۰).

فنل و فلاونوئید: با توجه به نتایج ارائه شده در جداول و اشکال ۷-۸، با افزایش غلظت فلزهای سنگین سرب و کادمیوم در گروه‌های آزمایشی، فلاونوئید و فنل افزایش معنی‌داری داشتند. این یافته‌ها با نتایج قبلی Marquez-Garcia و همکاران (۱۲۱) موافق است که اظهار داشت محتوای فنولیک در *Erica andevalensis* افزایش یافته است. ترکیبات فنلی آنتی‌اکسیدان‌های قارچ‌ها هستند، این ترکیبات پاک‌کننده و مهارکننده‌های رادیکال‌های آزاد در ارگانسیم‌ها هستند (۵۶، ۱۲۲). پاسخ آنتی‌اکسیدان‌ها به توجه به منابع مختلف رادیکال‌های آزاد ممکن است متفاوت باشد. ویژگی مشترک این گروه متابولیت‌های بسیار متنوع از جمله فلاونوئیدها، اسیدهای فنلیک، استیلبن‌ها، لیگنین و تانن‌ها داشتن یک یا چند حلقه معطر با گروه‌های هیدروکسیل در ساختار است (۵۶، ۱۲۳). بنابراین، هیچ‌یک از آزمایش‌ها، مکانیسم عملکرد همه منابع رادیکال یا تمام آنتی‌اکسیدان‌ها را در یک سیستم پیچیده منعکس نمی‌کند (۱۲۴). فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی به قارچ کمک می‌کند تا بر استرس رادیکال‌های آزاد ناشی از این فلزات سنگین غلبه کنند (۱۲۵). به‌طور کلی در تحقیق مورد مطالعه قارچ خوراکی پروتئوس ارینجی با جذب سرب و کادمیوم در غلظت‌های مختلف نشان داد که می‌تواند به‌عنوان یک جاذب موثر برای حذف فلزات از محیط‌زیست استفاده گردد. سلامتی خاک منجر به سلامتی اکوسیستم به‌عنوان نگهدارنده رشد و توسعه‌دهنده موجودات بسیار مهم است و چون اکوسیستم خاک از طریق کشت بی‌رویه و عوامل محیطی نامناسب مورد تهدید قرار می‌گیرد زیست‌پالایی برای احیا آن امری ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه کسانی که در انجام این تحقیق یاری رسانند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

1. Rahmani, M., Azari, T. and Mollaaghajanzadeh, S., 2020. Effects of Heavy Metal Contamination Caused by Residual Leachate on Forest Soil in Babol Anjilsi Region, Iran. Geographical Research. 35(1): 31-42. (In Persian)

39. McDonald, S., Prenzler, P.D., Antolovich, M., Robards, K. and Stadtman, E.R., 2001. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food Chem.* 73: 73-84.
40. Pandjaitan, N., Howard, L.R., Morelock, T. and Gil, M.I., 2005. Antioxidant capacity and phenolic content of spinach as affected by genetics and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 53(861): 8-23.
41. Shui, G. and Leong, L.P., 2002. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 977: 89-96.
42. Chang, C., Yang, M., Wen, H. and Chern, J., 2003. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis.* 10(3): 178-182.
43. Beketov, E.V., Pakhomov, V.P. and Nesterova, O.V., 2005. An improved method of flavonoid extraction from bird cherry fruits. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 39(6): 316-318.
44. Sing, A. and Gauba, p., 2014. Mycoremediation: A treatment for heavy metal pollution of Soil. *Journal of Civil Engineering and Environmental Technology.* 1: 59-61.
45. Zhang, T., Gao, X., Luo, X., Li, L., Ma, M., Zhu, Y. and Li, R., 2019. The effects of long-term exposure to low doses of cadmium on the health of the next generation of mice. *Chemico-Biological Interactions.* 1(1): 12-21.
46. Azarm, I., Javadzadeh, N. and Jalilzadeh, R., 2020. Investigation of *Chlorella vulgaris* capacity in absorption of Nitrate and Phosphate from wastewater of fish farming pool in Khuzestan Province. *Journal of Animal Environment.* 12(2): 291-298. (In Persian)
47. Seeger, R., 1982. Toxische Schwermetalle in Pilzen. *Deutsche Apotheker Zeitung.* 122: 1835-1844.
48. Manzi, P., Aguzzi, A. and Pizzoferrato, L., 2001. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem.* 73: 321-325.
49. Isildak, O., Turkekul, I., Elmastas, M. and Tuzen, M., 2004. Analysis of heavy metals in some wild-grown edible mushrooms from the middle black sea region, Turkey. *Food Chem.* 86(4): 547-52.
50. Velásquez, L. and Dussan, J., 2009. Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *J Hazard Mater.* 167(1-3): 713-716.
51. Fawzy, E.M., Abdel-Motaal, F.F. and El-Zayat, S.A., 2017. Biosorption of heavy metals onto different eco-friendly substrates. *Academic Journal.* 9(5): 35-44.
52. Prakash, V., 2017. Mycoremediation of environmental pollutants. *Int J Chem Tech Res.* 10(3): 149-155.
53. Dogan, H.H., Sanda, M.A., Uyanoz, R., Oztuk, C. and Cetin, U., 2006. Contents of metals in some wild mushrooms: its impact on human health. *Biol. Trace Element Res.* 110: 79-94.
54. Ogbo, E.M. and Okhuoya, J.A., 2011. Bio-absorption of some heavy metals by *Pleurotus tuber-regium* Fr. Singer (an edible mushroom) from crude oil polluted soils amended with fertilizers and cellulosic wastes. *Int J Soil Sci.* 6: 34-44.
55. Oyetayo, V.O., Adebayo, A.O. and Ibileye, A., 2012. Assessment of the biosorption potential of heavy metals by *Pleurotus tuber-regium*. *Int J Adv Biol Res.* 2: 293-297.
56. Boaponsem, G.A., Obeng, A.K., Osei-Kwateng, M. and Badu, A.O., 2013. Accumulation of heavy metals by *Pleurotus ostreatus* from metal scrap sites. *Int. J. Curr. Res. Rev.* 5: 1-9.
57. Nnorom, I.C., Jarzyńska, G., Falandysz, J., Drewnowska, M., Okoye, I. and Oji-Nnorom, C.G., 2012. Occurrence and accumulation of mercury in two species of wild-grown *Pleurotus* mushrooms from southeastern Nigeria. *Ecotoxicol Environ Safe.* 84: 78-83.
20. Reavill, G., 2007. Aftermath, Inc: Cleaning Up After CSI Goes Home. Penguin.
21. Girma, G., 2015. Microbial bioremediation of some heavy metals in soils: an updated review. *Indian Journal of Scientific Research.* 6(1): 147.
22. Kulshreshtha, S., Mathur, N. and Bhatnagar, P., 2014. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB express.* 4(1): 1-7.
23. Kumar, V. and Dwivedi, S.K., 2021. Mycoremediation of heavy metals: Processes, mechanisms, and affecting factors. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28: 10375-10412.
24. Das, N., Charumathi, D. and Vimala, R., 2007. Effect of pretreatment on Cd²⁺ biosorption by mycelia biomass of *Pleurotus Florida*. *Afr J Biotechnol.* 6: 2555-2558.
25. Veit, M.T., Tavares, C.R.G., Gomes-da-Costa, S.M. and Guedes, T.A., 2005. Adsorption isotherms of copper (II) for two species of dead fungi biomasses. *Proc. Biochem.* 40: 3303-3308.
26. Jarosz-Wilkolazka, A.M., Graz, S., Braha, D., Menge D. and Krauss, G.J., 2006. Species-specific Cd-stress response in the white-rot basidiomycetes *Abortiporus biennis* and *Cerrena unicolor*. *Biomaterials.* 19: 39-49.
27. Gonen, T.F., Yamac, M., Cabuk, A. and Yildiz, Z., 2008. Selection of newly isolated mushroom strains for tolerance and biosorption of zinc in vitro. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 483-489.
28. Bayramoglu, G., Celik, G., Yalcin, E., Yilmaz, M. and Arica, M.Y., 2005. Modification of surface properties of *Lentinus Sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr⁶⁺ removal efficiencies from aqueous medium. *Journal of Hazardous Materials.* 119: 219-229.
29. Kang, W.S., 2004. What is an oyster mushroom, Mushroom Growers Handbook 1? Accessed on 08/06/2014 from <http://www.fungifun.org/mushworld/Oyster.Mushroom.Cultivation/mushroom-growers-handbook-1-mushworld-com-chapter-3.pdf>.
30. Chang, S.T., 2005. Witnessing the development of the mushroom industry in China. In: Tan, et al. (eds.) *Proceedings of the Fifth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products.* Shanghai, China. 3-19.
31. Jin, H.J., Khalid, A., Hussein A. and Sedky, H.A., 2011. Hassan Biosorptive capacity of Cd (II) and Pb (II) by lyophilized cells of *Pleurotus eryngii* Korean J. Soil Sci. Fert. 44(4): 615- 624.
32. Negro, C., Tommasi, L. and Miceli, A., 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology.* 87(1): 41-44.
33. Snyder, L.R., 1978. Classification of solvent properties of common liquids. *J Chromatographic Sci.* 16: 223-234.
34. Bempah, C.K., Ewusi, A., Obiri-Yeboah, S., Asabere, S.B., Mensah, F., Boateng, J. and Voigt, H.J., 2013. distribution of arsenic and heavy metals from mine tailings dams at Obuasi municipality of Ghana. *American Journal of Engineering Research.* 2(5): 61-70.
35. Bradford, M.M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry.* 254: 72-248.
36. Gong, M., Li, Y., Dai, X. and Tian, M., 1997. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of HS induced thermotolerance in maize seedling. *Journal of Plant Physiology.* 150: 615-621.
37. Aebi, H., 1974. *Methods of Enzymatic Analysis.* New York: Academic Press.
38. Swain, T. and Hillis, W.E., 1959. The Phenolic Constituents of *Prunus domestica*. I. The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 10: 63-68.

77. Javaid, A. and Bajwa, R., 2007. Biosorption of Cr (III) ions from tannery wastewater by *Pleurotus ostreatus*. Mycopathologia. 5: 71-79.
78. Puentes-Cárdenas, I.J., Pedroza-Rodríguez, A.M., Navarrete-López, M., Villegas-Garrido, T.L. and Cristiani-Urbina, E., 2012. Biosorption of trivalent chromium from aqueous solutions by *Pleurotus ostreatus* biomass. Environ Eng Manag J. 11(10): 1741-1752.
79. Tay, C.C., Liew, H.H., Yong, S.K., Surif, S. and Abdul-Talib, S., 2009. Biosorption of lead (II) from aqueous solutions by *Pleurotus* as a toxicity biosorbent. In: Environmental science and technology conference (ESTEC2009), Kuala Terengganu Malaysia. Dec 7-8.
80. Liew, H.H., Tay, C.C., Yong, S.K., Surif, S. and Abdul Talib, S., 2010. Biosorption characteristics of lead [Pb (II)] by *Pleurotus ostreatus* biomass. In: Abstracts of the proceedings of the international conference on science and social research (CSSR), Kuala Lumpur.
81. Tay, C.C., Liew, H.H., Yin, C.Y., Abdul-Talib, S., Surif, S., Abdullah, A. and Yong, S.K., 2011. Biosorption of cadmium ions using *Pleurotus ostreatus*: growth kinetics, isotherm study, and biosorption mechanism. Kor J Chem Eng. 28(3): 825-830.
82. Javaid, A., Bajwa, R., Shafique, U. and Anwar, J., 2011. Removal of heavy metals by adsorption on *Pleurotus ostreatus*. Biomass Bioenergy. 35: 1675-1682.
83. Piotr, Z., Katarzyna, K., Anna, W., Agnieszka, S., Edward, K., Agnieszka, S. and Bozena, M., 2020. Selenium and Zinc Biofortification of *Pleurotus eryngii* Mycelium and Fruiting Bodies as a Tool for Controlling Their Biological Activity. molecules. 25: 889.
84. Prasad, A.S.A., Varatharaju, G., Anushri, C. and Dhivyaasree, S., 2013. Biosorption of lead by *Pleurotus florida* and *Trichoderma viride*. Br Biotechnol J. 3(1): 66-78.
85. Favero, N., Bressa, G. and Costa, P., 1990. Response of *Pleurotus ostreatus* to cadmium exposure. Ecotoxicol Environ Safe. 20(1): 1-6.
86. Favero, N., Costa, P. and Paolo Rocco, G., 1990. Role of copper in cadmium metabolism in the basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*. Comp Biochem Physiol Part C Comp Pharmacol. 97(2): 297-303.
87. Mandal, T.K., Baldrian, P., Gabriel, J., Nerud, F. and Zadrazil, F., 1998. Effect of mercury on the growth of wood-rotting basidiomycetes *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, and *Serpula lacrymans*. Chemosphere. 36(3): 435-440.
88. Javaid, A. and Bajwa, R., 2008. Biosorption of electroplating heavy metals by some basidiomycetes. Mycopathologia. 6: 1-6.
89. Arbanah, M., Miradatul Najwa, M.R. and Ku Halim, K.H., 2012. Biosorption of Cr(III), Fe(II), Cu(II), Zn(II) ions from liquid laboratory chemical waste by *Pleurotus ostreatus*. Int J Biotechnol Wellness Ind. 1: 152-162.
90. Arbanah, M., Miradatul Najwa, M.R. and Ku Halim, K.H., 2013. Utilization of *Pleurotus ostreatus* in the removal of Cr(VI) from chemical laboratory waste. Int Refereed J Eng Sci. 2(4): 29-39.
91. Dulay, R.M.R., De Castro, M.A.E.G., Coloma, N.B., Bernardo, A.P., Cruz, A.G.D., Tiniola, R.C., Kalaw, S.P. and Reyes, R.G., 2015. Effects and mycoremediation of lead (Pb) in five *Pleurotus* mushrooms. Int J Biol Pharm Allied Sci. 4(3): 1664-1677.
92. Wu, M., Xu, Y., Ding, W., Li, Y. and Xu, H., 2016. Mycoremediation of manganese and phenanthrene by *Pleurotus eryngii* mycelium enhanced by tween 80 and saponin. Appl Microbiol Biotechnol. 100: 7249-7261.
93. Lamrood, P.Y. and Ralegankar, S.D., 2013. Biosorption of Cu, Zn, Fe, Cd, Pb, and Ni by non-treated biomass of some edible mushrooms. Asian J Exp Biol. 4(2): 190-195.
58. Gabriel, J., Vosáhlo, J. and Baldrian, P., 1996. Biosorption of cadmium to mycelial pellets of wood-rotting fungi. Biotechnol Tech. 10:345-348.
59. Adhikari, T., Tel-Or, E., Libal, Y. and Shenker, M., 2006. Effect of cadmium and iron on rice (*Oryza sativa* L.) plant in chelator-buffered nutrient solution. J. Plant Nutr. 29: 1919-1940.
60. Naganuma, A., Miura, N., Kaneko, S., Mishina, T., Hosoya, S., Miyairi, S., Furuchi, T. and Kuge, S., 2000. GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. FASEB J. 14: 968-972.
61. Sharma, S.K., Goloubinoff, P. and Christen, P., 2011. Non-Native Proteins as Newly Identified Targets of Heavy Metals and Metalloids. In Cellular Effects of Heavy Metals; Bánfalvi, G., Ed.; Springer: Heidelberg, Germany. 263-274.
62. Jacobson, T., Navarrete, C., Sharma, S.K., Sideri, T.C., Ibsedt, S., Priya, S., Grant, C.M., Christen, P., Goloubinoff, P. and Tamás, M.J., 2012. Arsenite interferes with protein folding and triggers the formation of protein aggregates in yeast. J. Cell Sci. 125: 5073-5083.
63. Akpaja, E.O., Nwogu, N.A. and Odibo, E.A., 2012. Effect of some heavy metals on the growth and development of *Pleurotus tuber-regium*. Mycosphere. 3: 57-60.
64. Bali, R., Siegle, R. and Harris, A., 2010. Phytoextraction of Au: Uptake, accumulation and cellular distribution in *Medicago sativa* and *Brassica juncea*. Chemical Engineering Journal. 156: 286-297.
65. Michalak, A., 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in growing under heavy metal stress. Pol J Environ Stud. 15: 523-553.
66. Guelfi, A., Azevedo, R.A., Lea, P.J. and Molina, S.M.G., 2003. Growth inhibition of the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* by cadmium: an antioxidant enzyme approach. J Gen Appl Microbiol. 49: 63-73.
67. Ulusua, Y., Öztürk, L. and Elmastaş, M., 2017. Antioxidant capacity and cadmium accumulation in parsley seedlings exposed to cadmium stress. Russ J Plant Physiol. 64(6): 883-888.
68. Devi, S.S., Sreenivasulu, Y. and Rao, K.V.B., 2017. Protective role of *Trichoderma logibrachiatum* (WT2) on Lead-induced oxidative stress in *Helianthus annuus* L. Indian J Exp Biol. 55: 235-241.
69. Wang, J., Li, T., Liu, G., Smith, J.M. and Zhao, Z., 2016. Unraveling the role of dark septate endophyte (DSE) colonizing maize (*Zea mays*) under cadmium stress: Physiological, cytological and genic aspect. scientific reports. 6: 22028.
70. Verma, S. and Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidants in growing rice plants. Plant Sci. 164: 1489-1498.
71. Pizzino, G., Irrera, N. and Cucinotta, M., 2017. Oxidative stress: harms and benefits for human health. Oxid Med Cell Longev. 8416-8763.
72. Buvelot, H., Jaquet, V. and Krause, K.H., 2019. Mammalian NADPH oxidases. Methods Mol Biol. 1982: 17-36.
73. Del-Río, L.A. and López-Huertas, E., 2016. ROS generation in peroxisomes and its role in cell signaling. Plant Cell Physiol. 5: 1364-1376.
74. Martínez-Revelles, S., Avendaño, M.S. and García Redondo, A.B., 2013. The reciprocal relationship between reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 and vascular dysfunction in hypertension. Antioxidants Redox Signal. 18: 51-65.
75. Lambert, A.J. and Brand, M.D., 2009. Reactive oxygen species production by mitochondria. Methods Mol Biol. 554: 165-181.
76. Kapahi, M. and Sachdeva, S., 2017. Mycoremediation potential of *Pleurotus* species for heavy metals: a review Bioprocess. 4-32.

- macrofungi: a comparative study. *Can J Microbiol.* 62(4): 329-337.
113. Jiang, Y., Has, R. and Yang, S., 2017. Natural bioaccumulation of heavy metals onto common edible macrofungi and equilibrium and kinetic studies on biosorption of Pb (II) to them. *Acta Nat Univ Pekin.* 53(1): 125-134.
 114. Osman, M.S. and Bandyopadhyay, M., 1999. Bioseparation of lead ions from wastewater by using a fungus *P. ostreatus*. *J Civil Eng.* 27: 183-196.
 115. Huo, C.L., Shang, Y.Y., Zheng, J.J., He, R.X. and He, X.S., 2011. The adsorption effect of three mushroom powders on Cu²⁺ of low concentration. In: International symposium on water resource and environmental protection. May 20-22.
 116. Vimala, R. and Das, N., 2009. Biosorption of cadmium (II) and lead (II) from aqueous solutions using mushrooms: A comparative study. *J. Hazard. Mater.* 168: 376-382.
 117. Suseem, S.R. and Mary Saral, A., 2014. Biosorption of heavy metals using *Pleurotuseous*. *J Chem Pharm Res.* 6(7): 2163-2168.
 118. Joo, J.H., Hussein, K.A. and Hassan, S.H.A., 2011. Biosorption capacity of Cd (II) and Pb (II) by lyophilized cells of *Pleurotus eryngii*. *Korean J Soil Sci Fert.* 44: 615-624.
 119. Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Kumar, R., Seth, C.S. and Gupta, D.K., 2006. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere.* 65(6): 1027-1039.
 120. Frcal, N., Gurcr-Orthán, H. and Aykin- Burns, A., 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part1: Mechanisms Involved in Metal Induced Oxidative Damage. *Med. Chem.* 1(6): 529-539.
 121. Marquez-Garcia, B., Fernandez-Recamales, M.A. and Cordoba, F., 2012. Effects of cadmium on phenolic composition and antioxidant activities of *Erica andevalensis*. *Aust J Bot.* 936-950.
 122. Newell, A.M., Yousef, G.G., Lila, M.A., Ramirez-Mares, M.V. and de Mejia, E.G., 2010. Comparative in vitro bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. *J Ethnopharmacol.* 130: 536-544.
 123. Côté, J., Caillet, S., Doyon, G., Sylvain, J.F. and Lacroix, M., 2010. Bioactive compounds and their biological properties. *Crit Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 50: 666-679.
 124. Prior, R.L., Wu, X. and Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4290-4302.
 125. Vaseem, H., Singh, V.K. and Singh, M.P., 2017. Heavy metal pollution due to coal washery effluent and its decontamination using a macro fungus, *Pleurotus ostreatus*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 145: 42-49.
 94. Xiangliang, P., Jianlong, W. and Daoyong, Z., 2005. Biosorption of Pb(II) by *Pleurotus ostreatus* immobilized in calcium alginate gel. *Process Bio Chem.* 40: 2799-2803.
 95. Xiangliang, P., Jianlong, W. and Daoyong, Z., 2009. Biosorption of Co(II) by immobilized *Pleurotus ostreatus*. *Int J Environ Pollut.* 37: 289-298.
 96. de Almeida, L.K. and Burgess, J.E., 2013. Biosorption and bioaccumulation of copper and lead by *Phanerochaete* and *Pleurotus streatus*. <http://www.ewisa.co.za/literature/files/182-133%20Burgess.pdf>. Accessed 20 June 2016.
 97. Yalçinkaya, Y., Arica, M.Y., Soysal, L. and Bektaş, S., 2002. Cadmium and mercury uptake by immobilized *Pleurotus sapidus*. *Turk J Chem.* 26(3): 441-452.
 98. Majeed, A., Jilani, M.I., Nadeem, R., Hanif, M.A. and Ansari, T.M., 2012. Novel studies for the development of hybrid biosorbent. *Int J Chem Biochem Sci.* 2: 78-82.
 99. Majeed, A., Jilani, M.I., Nadeem, R., Hanif, M.A. and Ansari, T.M., 2014. Adsorption of Pb(II) using novel *Pleurotus Sajor-caju* and sunflower hybrid biosorbent. *Environ Prot Eng.* 40(2): 5-15.
 100. Kooba, S. and Arisoy, M., 2011. The use of a white-rot fungus (*Pleurotus ostreatus*) immobilized on Amberlite XAD-4 as a new biosorbent in trace metal determination. *Bioresour Technol.* 102: 8035-8039.
 101. Özdemir, S., Okumuş, V., Kılınç, E., Bilgetekinc, H., Dündara, A. and Ziyadanog'ulları, B., 2012. *Pleurotus eryngii* immobilized Amberlite XAD-16 as a solid-phase biosorbent for preconcentrations of Cd²⁺ and Co²⁺ and their determination by ICP-OES. *Talanta.* 99: 502-506.
 102. Tay, C.C., Redzwan, G., Liew, H.H., Yong, S.K., Surif, S. and Abdul-Talib, S., 2010. Copper (II) Biosorption characteristic of *Pleurotus* spent mushroom compost. In: International conference on science and social research (CSSR 2010), Kuala Lumpur, Malaysia. Dec 5-7.
 103. Carol, D., Kingsley, S.J. and Vincent, S., 2012. Hexavalent chromium removal from aqueous solutions by *Pleurotus ostreatus* spent biomass. *Int J Eng Sci Technol.* 4(1): 7-22.
 104. Tay, C.C., Redzwan, G., Liew, H.H., Yong, S.K., Surif, S. and Abdul-Talib, S., 2012. Fundamental behavior for biosorption of divalence cations by *Pleurotus* mushroom spent-substrate. *Malays J Sci.* 31: 40-44.
 105. Tay, C.C., Liew, H.H., Abdul-Talib, S. and Redzwan, G., 2016. Bi-metal biosorption using *Pleurotus ostreatus* spent mushroom substrate (PSMS) as a biosorbent: isotherm, kinetic, thermodynamic studies and mechanism. *Desalination Water Treat.* 57(20).
 106. Frutos, I., García-Delgado, C., Gárate A. and Eymar, E., 2016. Biosorption of heavy metals by organic carbon from spent mushroom substrates and their raw materials. *Int J Environ Sci Technol.* 13(11): 2713-2720.
 107. Bressa, G., Coma, L. and Costa, P., 1988. Bioaccumulation of Hg in the mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Ecotoxicol Environ Safe.* 16: 85-89.
 108. Daniş, Ü., 2010. Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by *Pleurotus cornucopiae*. *BALWOIS 2010*, Ohrid, Republic of Macedonia. 25-29.
 109. Xu, F., Liu, X., Chen, Y., Zhang, K. and Xu, H., 2016. Self-assembly modified-mushroom nanocomposite for rapid removal of hexavalent chromium from aqueous solution with bubbling fluidized bed. *Sci Rep.* 6: 26201.
 110. Vimala, R. and Das, N., 2011. Mechanism of Cd (II) adsorption by macrofungus *Pleurotus platypus*. *J Environ Sci Vol.* 23: 288-293.
 111. Adebayo, A.O., 2013. Investigation on *Pleurotus ferulae* potential for the sorption of Pb(II) from aqueous solution. *Bull Chem Soc Ethiop.* 27: 25-34.
 112. Jiang, Y., Hao, R. and Yang, S., 2016. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Pb (II) by common edible