



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

بررسی تنوع قارچ‌ها در گرد و غبار و شناسایی منشأ آنها در استان خوزستان

فروغ تاجیکی^۱، حسین محمد عسگری^{۱*}، اسحاق زمانی^۲، فرشید قنبری^۳

- ۱- گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- ۲- گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
- ۳- گروه بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، آبادان، ایران

اطلاعات مقاله: چکیده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۶
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۴
تاریخ انتشار: ۱۴۰۰/۰۳/۳۱

زمینه و هدف: این پژوهش با توجه به قرار گرفتن کشور ایران در اقلیم نیمه‌خشک و اثرات زیانبار توفان‌های گردوغبار بر روی اکوسیستم‌های مختلف، با هدف شناسایی و منشأیابی توفان‌های گردوغبار با استفاده از بیواترول‌های قارچی (اسپورها) و با مدل HYSPLIT در منطقه جنوب‌غربی ایران انجام شد.

روش بررسی: از تصاویر ماهواره‌ای مادیس و مدل HYSPLIT برای بررسی تغییرات زمانی توده‌های گردوغبار استان خوزستان استفاده شد. نمونه‌برداری از ریزگردهای شهرهای آبادان و خرمشهر و از خاک قسمت‌های خشک شده تالاب‌های هورالعظیم و شادگان در یک دوره دوماهه (از اردیبهشت تا تیر سال ۱۳۹۸) انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از مدلسازی عددی نشان می‌دهد شهرهای آبادان و خرمشهر تحت تاثیر توفان‌های گردوغبار با منشأ داخلی (از سمت تالاب هورالعظیم) بوده است. پس از جداسازی بیواترول‌ها از نمونه‌های هوا و خاک، با روش PCR-Sequencing مجموعاً ۶ جنس قارچ در نمونه‌های خاک و ۶ جنس در نمونه‌های گردوغبار با منشأ داخلی شناسایی شد. چهار جنس *Aspergillus*، *Penicillium*، *Alternaria*، *Talaromyces* و *Aspergillus* قارچ‌های مشترک در خاک و هوا هستند.

نتیجه‌گیری: با شباهت ۷۰ درصدی قارچ‌های یافت شده در نمونه‌های خاک و هوا، شاید بتوان گفت منشأ اصلی قارچ‌ها در آبادان و خرمشهر تالاب هورالعظیم است.

واژگان کلیدی: توفان گردوغبار، ماهواره مادیس، هوابردهای زیستی، قارچ، خوزستان

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

h.masgari@kmsu.ac.ir

Please cite this article as: Tajiki F, Mohammad Asgari H, Zamani I, Ghanbari F. Investigation of fungi diversity in airborne dust and their sources identification in Khuzestan province. Iranian Journal of Health and Environment. 2021;14(1):51-66.

مقدمه

در سال‌های اخیر توفان‌های گردوغبار به عنوان یکی از مهمترین منابع آلاینده هوا که می‌تواند اثرات نامطلوب بهداشتی و زیست محیطی بر جوامع انسانی تحمیل کند، مورد توجه قرار گرفته است. در مقیاس جهانی منشأ اصلی گردوغبار، مناطق خشک با بارندگی سالانه کمتر از ۲۰۰ mm هستند. کمربند گردوغبار در سواحل شمال و غرب آفریقا، خاورمیانه، آسیای مرکزی و آسیای جنوب شرقی (چین) گسترش یافته است (۱). شتاب روند بیابان‌زایی در مناطق خشک به علت تغییرات آب و هوایی نیز می‌تواند موجب افزایش شیوع گردوغبار شود (۲). برای مثال تالاب‌ها اکوسیستم‌های طبیعی مهمی هستند که یکی از نقش‌های کلیدی آنها کاهش اثرات منفی توفان‌های گردوغبار است؛ اما در حال حاضر به دلیل خشکسالی و تغییرات آب و هوایی، باعث تولید و تشدید گردوغبار می‌شوند (۳).

توفان‌های گردوغبار تا مسافت‌های زیادی انتقال می‌یابند و می‌توانند میکروارگانیسم‌های بسیاری را در سطح جهان پراکنده کنند. پراکندگی آئروسول‌ها در هوا با منشأ زیستی را با عنوان بیوآئروسول‌ها می‌شناسند (۴) و شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، اسپوره‌های قارچی، گرده، باقیمانده‌های اجزای گیاهی و جانوری، ترکیبات آلرژیک، میوتوکسین‌ها و اندوتوکسین‌ها هستند (۵-۷). غلظت و ترکیب بیوآئروسول‌ها براساس موقعیت جغرافیایی، شرایط آب و هوایی (دما، رطوبت)، تراکم و فعالیت‌های انسانی، عوامل وابسته به پوشش گیاهی و محیط‌زیست متفاوت است و غلظت آنها می‌تواند متأثر از آلودگی هوا نیز باشد (۴). این ذرات به همراه ذرات گردوغبار پراکنده شده و به طور طبیعی بر روی آب و هوا، تشکیل ابر و چرخه هیدرولوژی تأثیر دارند (۸). از سوی دیگر قرارگرفتن در معرض بیوآئروسول‌ها، اثرات نامطلوبی بر روی سلامت عمومی دارند (۹) و می‌توانند بیماری‌های عفونی، آلرژی، آسم و بیماری‌های عصبی را در بین جمعیت‌های آسیب‌پذیر افزایش دهند (۱۰).

توفان‌های گردوغبار شامل فرایندهای انتشار از منطقه منبع، انتشار هوایی گردوغبار در حالت‌های مختلف جوی و سپس

نشست و رسوب در هر دو منبع (مبدأ و مناطق پایین دست) است. هنگامی که ذرات گردوغبار به سطح زمین می‌رسند، منابع فعالی از بیوآئروسول‌ها هستند که می‌توانند توزیع مکانی مشابه با منابع مناطق خشک بیابانی داشته باشند و امکان ارزیابی و بررسی منابع توفان‌های گردوغبار را فراهم کنند. شباهت کلی در بین بیوآئروسول‌ها در نمونه‌های گردوغبار نشان‌دهنده ارتباط مشترک با منبع گردوغبار منطقه است (۱۱). اگرچه احتمالاً مناطق خشک نسبت به مناطق بیولوژیکی فعال نقش کمتری به عنوان منبع بیوآئروسول‌ها دارند، اما زمان ماندگاری بیوآئروسول‌ها در ذرات گردوغبار به علت خشکی بالا و بارندگی بسیار کم در این مناطق بسیار طولانی است. به همین دلیل بیوآئروسول‌ها در منشأیابی توفان‌های گردوغبار از اهمیت بالایی برخوردارند (۱۲).

تکنیک‌های مختلفی برای شناسایی نقاط و مسیرهای انتقال گردوغبار وجود دارد. از تکنیک ردیابی داده‌های مکانی و تصاویر ماهواره‌ای بهترین نتایج برای پیش‌بینی پدیده‌های ناشی از گردوغبار به دست می‌آید و می‌توان جهت نظارت، تجزیه و تحلیل و ردیابی توفان‌های گردوغبار از آنها استفاده کرد. از آنجا که اولین قدم برای برنامه‌ریزی جهت مهار توفان‌های گردوغبار، شناسایی کانون‌های تولید آن است و با توجه به اینکه کانون توفان‌های گردوغبار در زمان و مکان فعال می‌شوند؛ بررسی تصاویر در بازه زمانی طولانی مدت از اهمیت بالایی برخوردار است. به همین دلیل پایش طولانی مدت آنها می‌تواند در دستیابی به یک الگوی جامع برای تجزیه و تحلیل توفان‌ها کمک کند (۲، ۱۳، ۱۴). در مطالعه‌ای Azizi و همکاران (۱۵) با ترکیب روش‌های بررسی مدلی و سنجش از راه دور توانستند منشأ و مسیر اصلی ورود گردوغبار به نیمه غربی کشور را به صورت منطقه مرزی بین سوریه و عراق و مسیر شمال غرب - جنوب شرق شناسایی کنند. همچنین Ashrafi و همکاران (۱۶) رخداد توفان گردوغبار در خرداد ماه ۱۳۹۰ را با استفاده از مدل‌سازی عددی HYSPLIT.4 و تصاویر ماهواره‌ای مطالعه نمودند. Mofidi و همکاران (۱۷) برای تعیین منابع اصلی گردوغبار نیز از روش لاگراژیتهی HYSPLIT.4 استفاده

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع توصیفی - تحلیلی و از نوع مقطعی (Cross-sectional) است که به دو بخش میکروبی (آزمایشگاهی) و سنجش از دور (تصاویر ماهواره‌ای و مدل‌سازی) تقسیم می‌شود.

– تعیین روزهای رخداد گردوغبار با استفاده از تصاویر ماهواره MODIS

در این پژوهش به منظور تعیین روزهای رخداد گردوغبار در شهرهای آبادان و خرمشهر از اطلاعات ماهواره MODIS داده‌های هواشناسی اداره کل محیط‌زیست خوزستان استفاده شد. بدین منظور از شاخص AOD این ماهواره که به صورت ماهیانه تغییرات غلظت آئروسول‌های موجود در جو را نشان می‌دهد، استفاده شد. پس از فراخوانی ساختار Shapefile خوزستان در نرم افزار Google Earth و وارد کردن کدها در گوگل جهت تثبیت در نقشه، فراخوانی تصاویر شاخص آئروسول به صورت ماهیانه از سال ۱۳۷۹ تا ۱۳۹۹ با ضریب ۰/۰۰۱ انجام شد و نمودار تغییرات آئروسول‌ها ترسیم و پس از دانلود آنها تغییرات مورد نظر بر روی نمودار مشاهده گردید.

– تعیین مناطق مورد مطالعه

براساس استانداردهای محیط زیست آمریکا (Environmental Protection Agency (EPA)) (۲۲) و پارامترهای هواشناسی منطقه (۱۱) مانند: سرعت و جهت باد و پوشش حداکثر توفان‌های گردوغبار و همچنین متناسب با کاربری‌های منطقه مورد مطالعه، پنج ایستگاه با پراکنش متناسب در شهرهای آبادان و خرمشهر به عنوان مکان‌های نمونه‌برداری از ریزگردها انتخاب شدند (دانشکده علوم پزشکی آبادان، آتش‌نشانی خرمشهر، اداره شیلات خرمشهر، دبیرستان دخترانه تیزهوشان آبادان و منطقه مسکونی واقع در ایستگاه هشت آبادان). همزمان با نمونه‌برداری از ریزگردها، مقدار متغیرهای هواشناسی دمای بیشینه، رطوبت نسبی، اشعه فرابنفش، میزان بارندگی، سرعت و جهت باد به دلیل داشتن بیشترین نقش در ایجاد توفان‌های گردوغبار در ایستگاه‌های تعیین شده ثبت گردید. روند سالیانه و فصلی بین تعداد

کردند و دریافتند زبانه کم فشار زاگرس و پرفشار عربستان بیش از هر مؤلفه گردشی دیگری در شکل‌گیری توفان‌هایی با مقیاس منطقه‌ای در منطقه خلیج فارس و جنوب غربی ایران نقش دارند.

زیست‌شناسان با استفاده از تکنیک کشت در آزمایشگاه، گروه‌های متنوعی از بیوآئروسول‌ها را شناسایی کرده‌اند. Nourmoradi و همکاران (۱۸) در مطالعه‌ای با هدف تعیین ارتباط بین ذرات معلق با میکروارگانیسم‌های موجود در هوای معمولی و روزهای گردوغبار در شهر سنجندج و با استفاده از روش‌های کشت میکروارگانیسم‌های معلق در ذرات هوا برد ضمن معرفی جنس‌های غالب باکتری و قارچ موجود در این ذرات، نشان دادند که غلظت این میکروارگانیسم‌ها در طی روزهای گردوغبار به گونه‌ای افزایش یافته که می‌تواند اثرات مضر بر سلامتی افراد بگذارد.

همچنین روش‌های دقیق‌تر و جدیدتری مانند: استفاده از آزمایش‌های مولکولی و سنجش‌های طولانی مدت در اتمسفر می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری از منطقه به ما می‌دهد (۱۴). از روش‌های مختلف این مطالعات می‌توان به شناسایی مستقیم نمونه‌های محیطی با استفاده از روش PCR اشاره کرد که در این روش می‌توان قارچ‌ها را تا سطح گونه شناسایی کرد (۱۹). در مطالعه Maki و همکاران (۲۰) با استفاده از روش توالی‌یابی ژنتیکی و روش PCR به همراه تصاویر ماهواره‌ای، ارزیابی تنوع باکتریایی و مقاومت آن در برابر تنش‌های محیطی ارزیابی گردید و نتایج نشان داد که باکتری‌ها تا ۶۰۰ m بالاتر از جو زنده مانده و به وسیله آئروسول‌ها جابه‌جا شده‌اند.

با توجه به افزایش رخداد توفان‌های گردوغبار در سال‌های اخیر و بالتبع آلودگی هوا و اثرات نامطلوب آن بر سلامت و بهداشت عمومی ساکنان شهرهای آبادان و خرمشهر، تعیین منشأ اصلی توفان‌های گردوغبار رخ داده در منطقه به منظور انجام اقدامات مدیریتی زیست محیطی اهمیت و ضرورت بسیاری دارد. بدین منظور در پژوهش حاضر از کاربرد همزمان مدل HYSPLIT و توالی‌یابی ژنتیکی بیوآئروسول‌های قارچی برای درک نحوه پخش، پراکنش و منشأیابی گردوغبارهای جنوب‌خوزستان استفاده شد (۲، ۲۱).

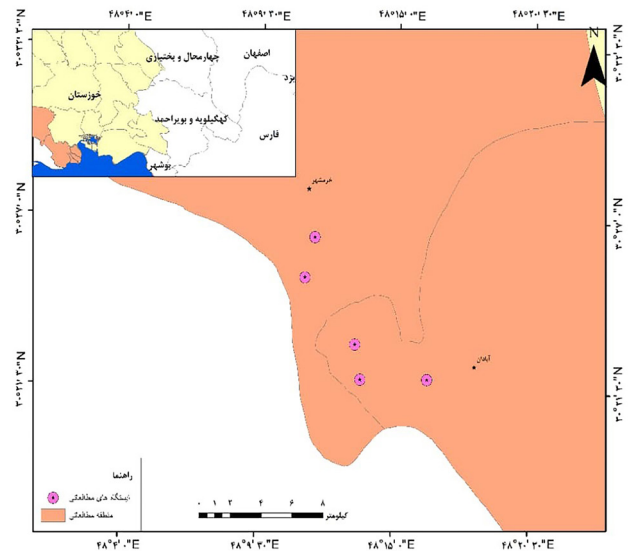
براساس پروتکل EPA نمونه‌برداری از هوا به روش Air trapping و با استفاده از دستگاه Quick take 30 انجام شد. این دستگاه از يك کاست نمونه‌برداری تشکیل شده است که دارای ۴۰۰ روزنه است. هوای برداشت شده به داخل پلیت‌هایی حاوی محیط کشت آماده PDA به قطر ۸ cm که در دستگاه و در فاصله ۲ - ۱/۵ m از سطح زمین قرار داشتند، وارد گردید. میزان جریان نمونه‌برداری از هوا در این دستگاه در بازه زمانی ۱۰ - ۳۰ min قابل تنظیم است که در پژوهش حاضر در فواصل ۱۵ min، ۱۰ min و ۵ min تنظیم گردید. کاست‌های مورد استفاده قبل از هر نمونه‌برداری با استفاده از اتوکلاو و پس از هر برداشت با الکل استریل شدند. جهت سنجش غلظت ذرات معلق PM_{10} و $PM_{2.5}$ از دستگاه غلظت سنج ذرات AEROCET 531S استفاده شد. پارامترهای محیطی دما و رطوبت نسبی نیز با فواصل ۱۵ min در فاصله ۱/۵ m از زمین و از طریق نرم‌افزار Air Visual قرائت و ثبت شد. شاخص UV با استفاده از دستگاه UV.A EC۱ اندازه‌گیری گردید.

روزهای به همراه گردوغبار و پارامترهای هواشناسی فوق الذکر نشان می‌دهد که مستعدترین شرایط برای بلند شدن ذرات گردوغبار زمانی است که خاک به دلیل کاهش بارندگی و به دنبال آن کاهش رطوبت و افزایش دما خشک می‌شود و سرعت باد به حد آستانه می‌رسد (۱۳). لازم به ذکر است که براساس استانداردهای EPA به ترتیب مقادیر بیشتر از $150 \mu g/m^3$ و $35 \mu g/m^3$ برای ذرات PM_{10} و $PM_{2.5}$ نشان دهنده روزهای گردوغباری است (۲۲). نمونه‌برداری در ۱۰ روز مختلف (در یک بازه متوالی دوماهه از می تا جولای سال ۲۰۱۹) انجام گرفت. در همین بازه زمانی نمونه‌های خاک نیز از تالاب‌های هورالعظیم ($31^{\circ} 50'$ شمالی و $47^{\circ} 30'$ شرقی) و شادگان ($30^{\circ} 38'$ شمالی و $48^{\circ} 39'$ شرقی) به عنوان مناطق احتمالی منشأ گردوغبار و با توجه به معنی‌دار نبودن تفاوت بین نقاط نمونه‌برداری، از ۱۵ نقطه برداشت گردید. شکل ۱ موقعیت ایستگاه‌های نمونه‌برداری را نشان می‌دهد.

نحوه نمونه‌برداری از خاک و ریزگردها، کشت و جداسازی قارچ‌ها



A



B

شکل ۱- ایستگاه‌های نمونه‌برداری (A ایستگاه‌های نمونه‌برداری هوا - B ایستگاه‌های نمونه‌برداری خاک)

– مدل HYSPLIT

مدل HYSPLIT مدلی دوگانه برای محاسبات خط سیر حرکت گردوغبار، پراکندگی و شبیه سازی فرو نشست آن با استفاده از رویکردهای PUFF و ذرات است (۲۳). در این مدل محاسبه مسیر و غلظت ریزگردها با استفاده از حداقل پارامترهای هواشناسی انجام می‌گیرد (۲۴). روش محاسبه مدل، ترکیبی میان دیدگاه‌های اوپلری (تعیین مجموع غلظت ذرات برای هر شبکه در طول مسیر حرکت) و لاگرانژی (تعیین مجموع غلظت ذرات برای هر شبکه با استفاده از حرکات پخش و انتقال ذرات) است. این مدل می‌تواند با توجه به پیش‌بینی وضع هوا و حرکت توده‌های هوا؛ پیش‌بینی کند که آلودگی هوا در طی زمان از یک مکان به کجا می‌رسد و یا آلودگی موجود در یک مکان از کجا منشأ می‌گیرد. وظیفه ماژول اصلی منشأیابی HYSPLIT، تجزیه و تحلیل میدان باد برای تعیین مسیر حرکت آلودگی است که به دو بخش حرکت رو به عقب پسگرد (Backward) و حرکت رو به جلوپیشرو (Forward) تقسیم می‌شود. با استفاده از حرکت رو به عقب (حرکت معکوس در زمان) منبع و منشأ آلودگی مشخص می‌شود. منشأیابی در سه ارتفاع ۱۰ m، ۵۰۰ m، ۱۰۰۰ m تجزیه و تحلیل می‌شود (۲۵).

در این مدل به صورت پیش فرض مناطقی که دارای کاربری بیابانی هستند، به عنوان منابع انتشار تعریف شده‌اند که با توجه به نوع خاک سطحی (ماسه‌ای، شنی، سیلت و رس و ...) دارای حساسیت خاصی به فرسایش بادی هستند. دقت مدل در هر مطالعه تا حدود زیادی به داده‌های هواشناسی بستگی دارد و هر چه دقت و تفکیک داده‌های هواشناسی بالاتر باشد، نتایج دقیق‌تر خواهد بود (۱). به همین دلیل در پژوهش حاضر از داده‌های هواشناسی تایید شده که از ایستگاه هواشناسی شهرستان آبادان دریافت گردید، استفاده شد. پارامترهای دیگری نیز در مدل وارد می‌شوند، مانند: زمان شروع، تعداد و مختصات نقاط آغاز (طول و عرض و ارتفاع)، زمان کل اجرا، جهت حرکت (حرکت رو به عقب پسگرد (Backward) و حرکت رو به جلوپیشرو (Forward))، تراز بالای مدل (ترازی که بالاتر از آن، ارتفاع در محاسبات حذف شده و به طور

با توجه به اینکه سطح فرسایشی خاک تالاب‌های شادگان و هورالعظیم مناطق مستعد تولید گردوغبار هستند، نمونه‌برداری از خاک براساس پروتکل EPA با استفاده از بیلچه استریل شده و از خاک‌های سطحی انجام گردید. نمونه‌های برداشت شده به کیسه‌های استریل انتقال داده شدند. پس از هر نمونه برداری پلیت‌های PDA و کیسه‌های حاوی نمونه‌های خاک جهت کشت و جداسازی قارچ‌ها به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر منتقل شدند. پلیت‌های PDA حاوی نمونه‌ها، به مدت ۷۲-۹۶ h در دمای محیط قرار گرفته و کلنی‌های رشد یافته به روش مستقیم شمارش شدند. به منظور خالص‌سازی، کلنی‌های منتخب در شرایط استریل برداشت شده و مجدداً بر روی پلیت‌های جدید حاوی PDA کشت داده شدند. سپس برای فراهم شدن شرایط بهینه رشد به مدت ۵h در انکوباتور و در دمای ۲۸°C قرار گرفتند (۲۲).

– استخراج DNA و شناسایی مولکولی قارچ‌ها

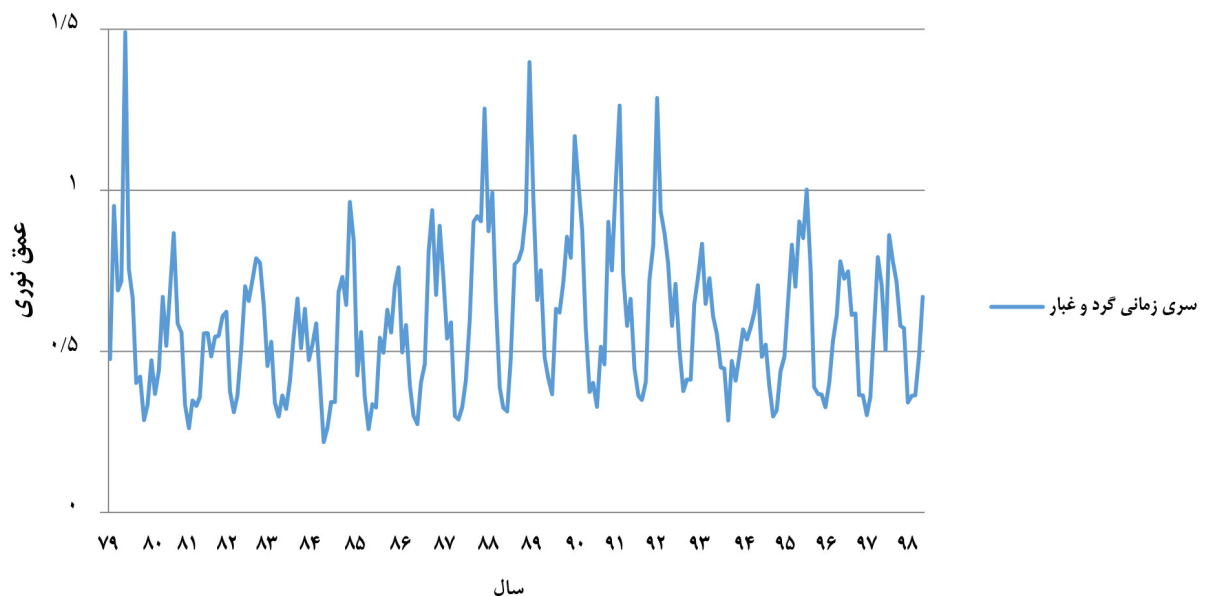
برای استخراج DNA از قارچ‌های جداسازی شده از هوای شهرهای آبادان و خرمشهر و خاک تالاب‌های هورالعظیم و شادگان از روش فنل کلروفرم و یک جفت پرایمر ITS1F و ITS2 استفاده شد (۱۳). نمونه‌ها جهت توالی‌یابی ارسال و بعد از دریافت نتایج، داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار BLAST تفسیر شده و درخت فیلوژنی با استفاده از نرم‌افزار Mega ترسیم شد.

– آنالیزهای آماری

از آزمون کولموگروف - اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov) برای بررسی نرمال بودن داده‌ها استفاده شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و پس آزمون دانکن (DUNCAN) برای بررسی معنی‌داری اختلاف بین میانگین داده‌های مورد بررسی و مقایسه داده‌های هواشناسی و غلظت قارچ‌های رشد یافته در نمونه‌های برداشت شده از ایستگاه‌ها در زمان‌های مختلف استفاده گردید. جهت بررسی ارتباط بین داده‌های هواشناسی و غلظت قارچ‌های رشد یافته در گردوغبار، از ضریب همبستگی اسپیرمن (Spearman's rho) استفاده شد. همچنین برای رسم نمودارها و انجام آزمون‌های آماری به ترتیب از EXCEL2016 و SPSS25 استفاده شد.

یافته‌ها

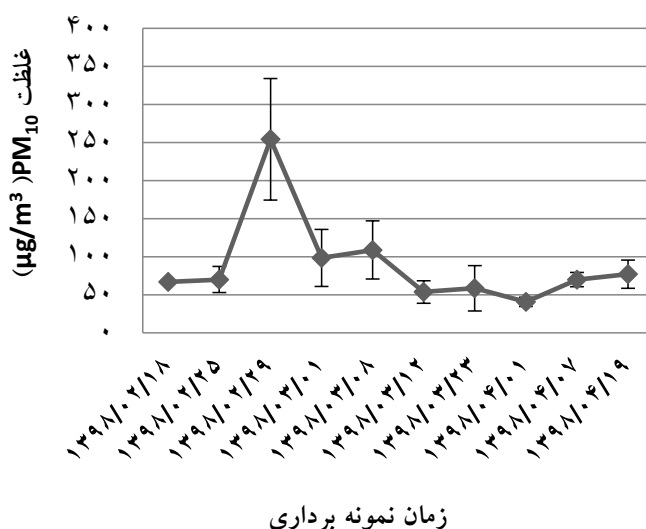
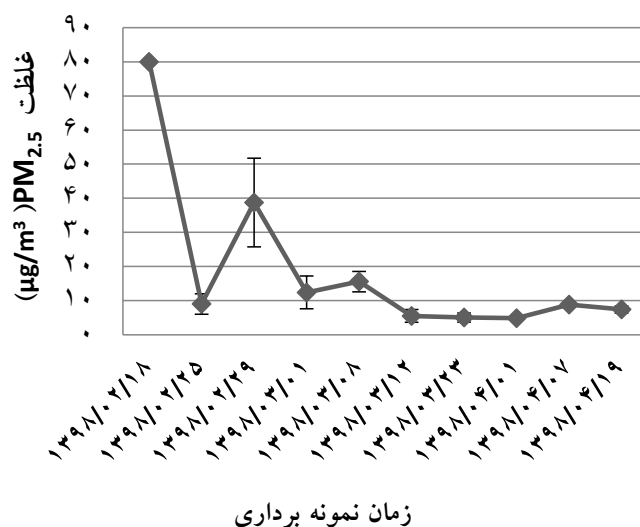
– بررسی تغییرات زمانی گردوغبار در ماهواره MODIS از آنجا که افزایش شاخص AOD نشان‌دهنده افزایش غلظت آئروسول‌هاست؛ $AOD \leq 0.1$ شاخص آسمان صاف و بدون گردوغبار (هوای عادی) و AOD بالاتر از ۱ نشان دهنده کاهش شدید دید و کیفیت هوا و بروز پدیده گردوغبار است. حد فاصل این دو مقدار نیز با شاخص AOD متوسط مشخص می‌شود. چنانچه در نمودار ۱ نشان داده شده است، تغییرات ماهیانه غلظت آئروسول‌ها در استان خوزستان در سال‌های ۱۳۷۹ تا ۱۳۹۹ دارای روند صعودی با شیب ملایم و همراه با افزایش و کاهش‌های متوالی است.



نمودار ۱- تغییرات ماهیانه غلظت شاخص AOD (غلظت آئروسول‌ها) در سال‌های ۱۳۹۹-۱۳۷۹ در استان خوزستان

مقدار به میزان $4/0 \pm 88/48 \mu\text{g}/\text{m}^3$ در تاریخ ۱۳۹۸/۰۶/۲۲ اندازه گیری شده است (نمودار ۲). همچنین نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای مقادیر مختلف غلظت ذرات PM_{10} و $PM_{2.5}$ نشان می‌دهد که میزان غلظت این ذرات بین ایستگاه‌های مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نمی‌دهد ولی میانگین غلظت این ذرات در روزهای مختلف نمونه‌برداری دارای اختلاف معنی‌دار است ($p \leq 0.05$).

– بررسی تغییرات میانگین غلظت ذرات PM_{10} و $PM_{2.5}$ در طی زمان نمونه‌برداری بالاترین میزان غلظت ذرات PM_{10} در تاریخ ۱۳۹۸/۲/۲۹ به میزان $254/79 \pm 2/82 \mu\text{g}/\text{m}^3$ و کمترین غلظت این ذره در تاریخ ۱۳۹۸/۰۴/۰۱ به میزان $4/6 \pm 71/05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ثبت گردید. بالاترین مقادیر $PM_{2.5}$ نیز به ترتیب در روز ۱۳۹۸/۰۲/۱۸ به میزان $8/6 \pm 52/05 \mu\text{g}/\text{m}^3$ و کمترین



نمودار ۲- میزان غلظت ذرات PM_{2.5} و PM₁₀ را بر حسب µg/m³ در طی زمان نمونه برداری

سازمان بهداشت جهانی (WHO) است، در این دو روز پدیده توفان گردوغبار رخ داده است. همچنین داده‌های هواشناسی اخذ شده از اداره کل محیط‌زیست خوزستان نیز این یافته‌ها را تایید می‌کند (جدول ۱).

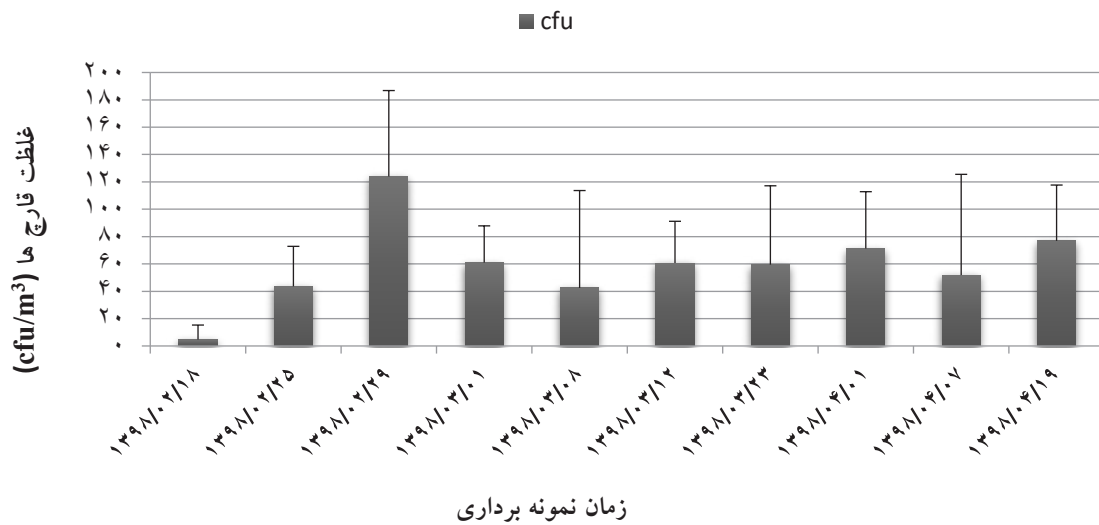
تعیین روزهای رخداد غبار در منطقه مورد مطالعه با توجه به اینکه مقادیر ثبت شده برای غلظت ذرات PM₁₀ و PM_{2.5} فقط در روزهای ۱۳۹۸/۰۲/۱۸ و ۱۳۹۸/۰۲/۲۹ دارای مقادیر بالاتری از حد مجاز تعیین شده توسط سازمان EPA و

جدول ۱- وضعیت کیفیت هوا در ایستگاه‌های تعیین شده در شهرستان‌های آبادان و خرمشهر در زمان مورد مطالعه

ردیف	تاریخ نمونه برداری	کیفیت هوا
۱	۱۳۹۸/۰۲/۱۸	توفان گردوغبار
۲	۱۳۹۸/۰۲/۲۵	هوای عادی
۳	۱۳۹۸/۰۲/۲۹	توفان گردوغبار
۴	۱۳۹۸/۰۳/۰۱	هوای عادی
۵	۱۳۹۸/۰۳/۰۸	هوای عادی
۶	۱۳۹۸/۰۳/۱۲	هوای عادی
۷	۱۳۹۸/۰۳/۲۳	هوای عادی
۸	۱۳۹۸/۰۴/۰۱	هوای عادی
۹	۱۳۹۸/۰۴/۰۷	هوای عادی
۱۰	۱۳۹۸/۰۴/۱۹	هوای عادی

تاریخ ۱۳۹۸/۰۲/۲۹ به میزان $123/62 \pm 97/82 \text{ cfu/m}^3$ و کمترین میزان غلظت به مقدار $4/10 \pm 71/58 \text{ cfu/m}^3$ در تاریخ ۱۳۹۸/۰۲/۱۸ ثبت گردید. البته توزیع غلظت قارچ‌ها در طی دوره نمونه برداری نشان داد که سطح غلظت قارچ‌ها در روز توفان گردوغبار (۱۳۹۸/۰۲/۲۹) به طور قابل توجهی بالاتر از روزهایی با هوای عادی (بدون توفان گردوغبار) است (نمودار ۳).

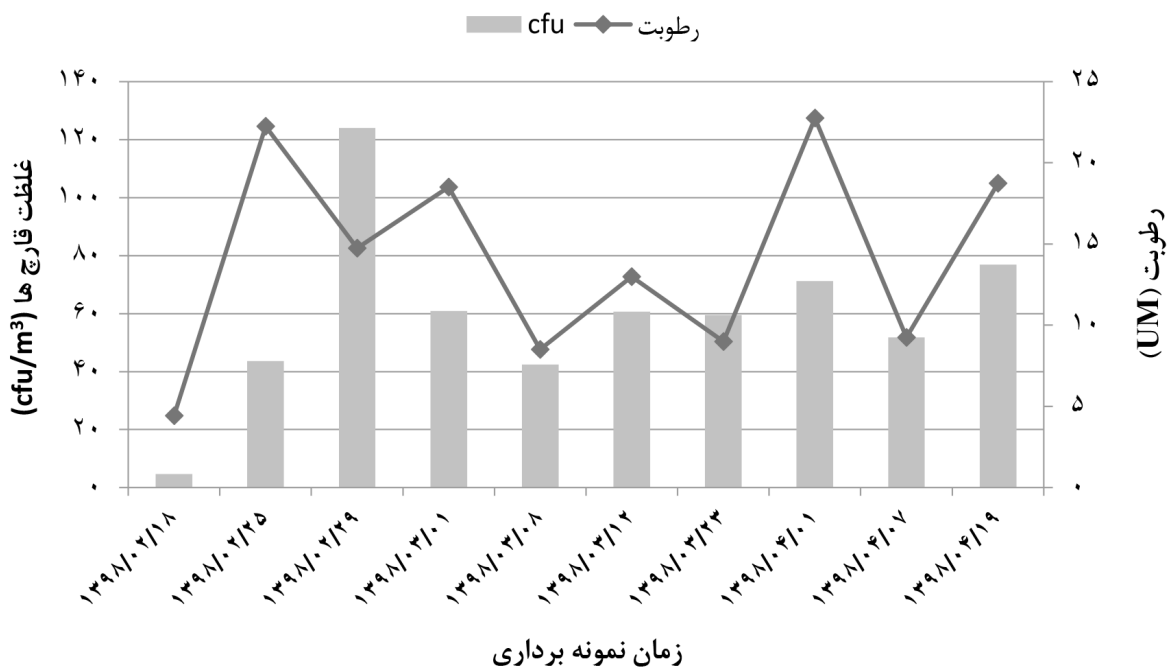
– بررسی تغییرات میزان غلظت قارچ‌ها در طول دوره نمونه برداری
بررسی روند تغییرات غلظت قارچ‌ها در ایستگاه‌های مورد بررسی نشان می‌دهد که از این نظر بین ایستگاه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی داری وجود ندارد ولی اختلاف میزان غلظت قارچ‌ها در روزهای مختلف نمونه برداری معنی دار است ($p \leq 0/05$). به گونه‌ای که بیشترین میزان غلظت قارچ‌ها در



نمودار ۳- میزان غلظت قارچها بر حسب cfu/m³ در طول دوره نمونه برداری

ندارد ولی چنانچه در نمودار ۴ نیز نشان داده شده است، غلظت قارچها با تغییرات میانگین رطوبت نسبی و غلظت قارچها در سطح خطای ۰/۰۱ $p \leq$ برابر با ۰/۳۵ است ($\text{sig} = ۰/۰$ و $t = ۰/۳۵$) که بدین معنی است که با افزایش میزان رطوبت نسبی، غلظت قارچها افزایش می یابد.

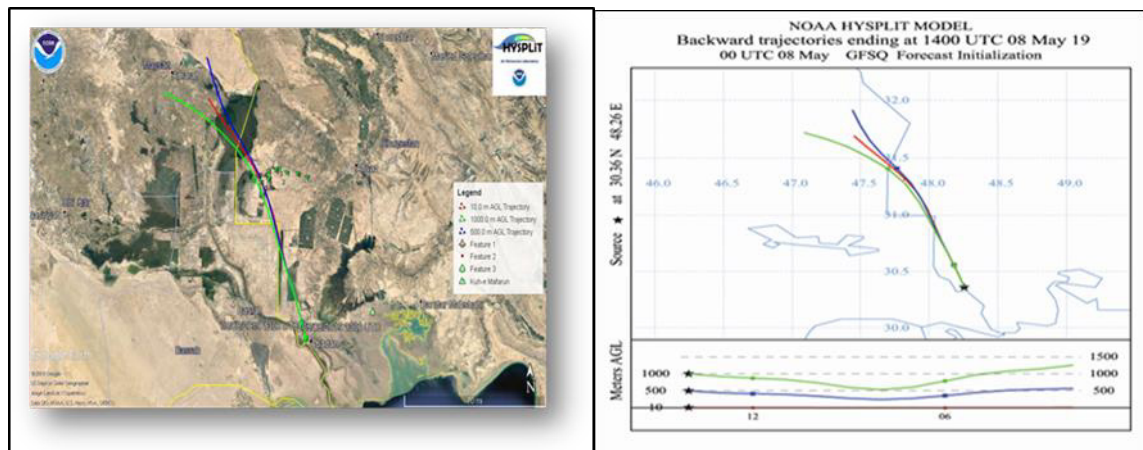
بررسی ضریب همبستگی بین غلظت قارچها و داده های هواشناسی در طول دوره نمونه برداری نتایج حاصل از محاسبه ضریب اسپیرمن بیانگر آن است که در سطح خطای ۰/۰۵ درصد، بین متغیرهای دما و میزان اشعه فرابنفش با غلظت قارچهای هوا برود همبستگی معنی داری وجود



نمودار ۴- روند تغییرات میانگین غلظت قارچها و رطوبت نسبی در طی دوره نمونه برداری

خوزستان در کشور ایران تحت تاثیر آن دسته از توده‌های هوایی قرار گرفته‌اند که در زمان مذکور از تالاب هورالعظیم منشأ گرفته‌اند (۱۰). نماد ستاره در شکل ۲، که از پیاده‌سازی مدل HYSPLIT در Google Earth به‌دست آمده است، نشان می‌دهد که توده‌های هوایی از ایستگاه‌های نمونه‌برداری خاک عبور کرده‌اند. جهت باد با رنگ‌های سبز، آبی و قرمز به ترتیب ارتفاع‌های ۱۰۰۰ m، ۵۰۰ m، ۱۰ m را نشان می‌دهد و ارتفاع نمایش داده شده در پایین هر نقشه نشان‌دهنده ارتفاع مسیر از سطح زمین است.

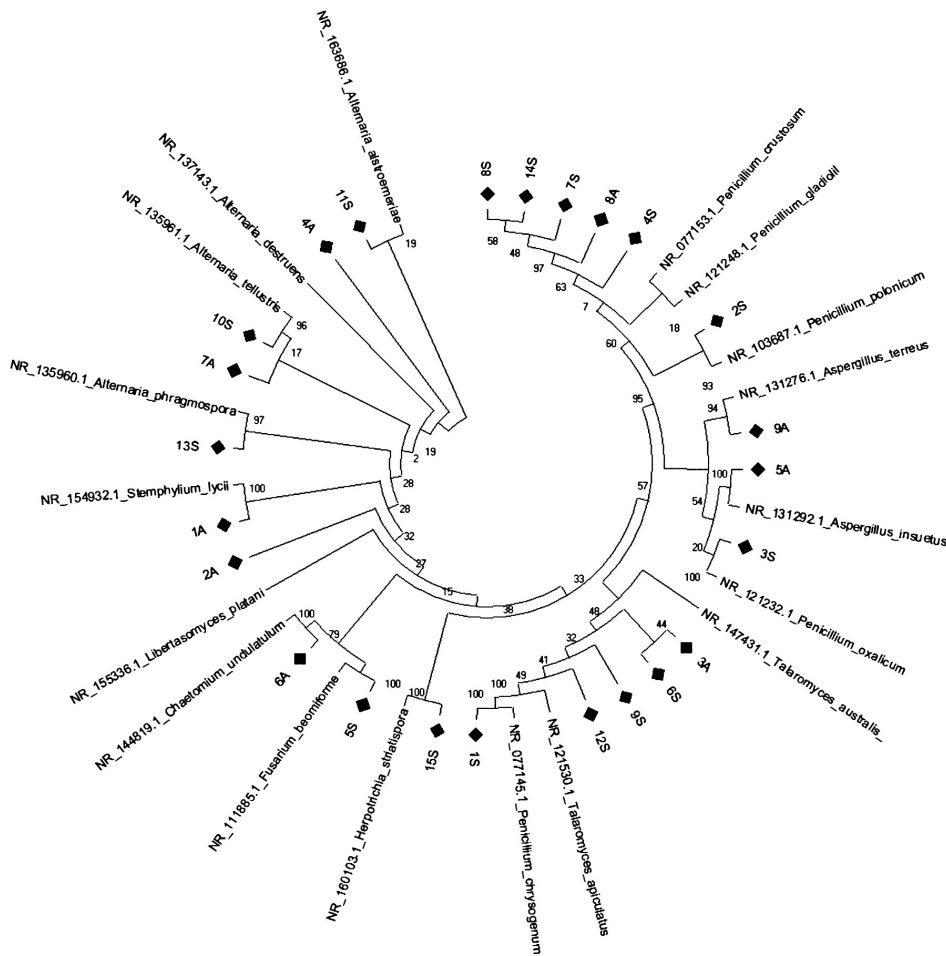
منشأیابی توفان گردوغبار به کمک مدل HYSPLIT نتایج حاصل از بررسی منطقه مورد مطالعه در بازه زمانی ۱۳۹۸/۰۲/۱۸ تا ۱۳۹۸/۰۴/۱۹، حاکی از آن است که با توجه به کاهش دید در روز هجده اردیبهشت ۱۳۹۸، توفان گردوغبار در منطقه رخ داده است. همان‌طور که در شکل ۲ نیز مشاهده می‌شود، نتایج به‌دست آمده از مدل HYSPLIT نشان داد که به احتمال قوی منشأ این توفان داخلی و از سمت تالاب هورالعظیم بوده و عبور آن از مناطق مورد مطالعه کاملاً محسوس بوده است. همچنین بیشتر مناطق جنوب غربی



شکل ۲- منشأیابی توفان گردوغبار رخ داده در ۹۸/۰۲/۱۸ (برابر با ۲۰۱۹/۰۵/۰۸) در منطقه نمونه‌برداری با استفاده از مدل HYSPLIT

ساختارهای جامعه قارچی نمونه‌های برداشت شده از هوا با نمونه‌های خاک، نشان دهنده تشابه ۷۰ درصدی بین آنهاست. در سطح جنس بیشترین فراوانی قارچی برای گونه‌های *Aspergillus* و *Penicillium* است و در سطح گونه نمونه‌های (*Talaromyces australis*)، (*Alternaria destruens*)، (*Aspergillus terreus*) و (*Penicillium polonicum*) به طور مشترک در نمونه‌های هوا و خاک وجود داشته‌اند.

ساختار قارچ‌های شناسایی شده در نمونه‌های هوا و خاک با توالی‌یابی قطعات تکثیرشده و با استفاده از نرم‌افزارها و اطلاعات موجود در بانک ژن، قارچ‌های موجود در نمونه‌های برداشت شده شناسایی گردید و درخت فیلوژنی به روش neighbor-joining با bootstrap ۱۰۰۰ رسم شد (شکل ۳). قارچ‌های شناسایی شده شامل گونه‌های متنوعی هستند که همگی از نوع قارچ‌های ناقص هستند. بررسی



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی براساس توالی ژن ITS (۲۴ سویه جداسازی شده نمونه‌های هوا و خاک با علامت ◆ مشخص شده است).

بحث

اگر بسته‌های هوایی از مناطق تولیدکننده توده‌های گردوغبار عبور کنند، می‌توان آنها را به عنوان منبع تولید گردوغبار شناسایی کرد. با توجه به نتایج حاصل از بررسی نقشه‌های HYSPLIT در یک سال اخیر، اکثر توفان‌های گردوغبار داخلی شهرهای آبادان و خرمشهر از جمله توفان گردوغبار ۱۳۹۸/۰۲/۱۸ از سمت تالاب هورالعظیم بوده است. مسیر این رخداد از شمال غربی به جنوب شرقی و از سمت تالاب هورالعظیم به جنوب شرق استان خوزستان و در امتداد به خلیج فارس است و می‌تواند بر روی اکوسیستم آبی نیز تاثیرگذار باشد (شکل ۲). همچنین بررسی الگوهای آب‌وهوایی و مدل

HYSPLIT در روز توفان گردوغبار نشان می‌دهد که بادهای شمال و شمال غربی می‌توانند سیستم گردوغبار در منطقه ایجاد کنند. رخدادهای گردوغبار انتشار یافته از مسیر شمال غربی به جنوب شرقی به طور عمده در دوره‌های گرم سال رخ می‌دهند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۲۶). در مطالعه Hafezi (۲۷) پیش‌بینی شده است که بیشتر پدیده‌های توفان گردوغبار در منطقه خاورمیانه که در اواخر بهار و اوایل تابستان رخ می‌دهد، نشان‌دهنده تاثیر باد شمال است. وزش باد شدید از شمال غربی که در بهار غالب است (۱) نیز به اثبات این موضوع کمک می‌کند. همچنین ثبت بیشترین غلظت ذرات

PM₁₀ و PM_{2.5} در روزهای رخداد توفان گردوغبار در اواخر بهار و اوایل تابستان، بیانگر نقشی است که باد شمال در وقوع توفان گردوغبار منطقه ایفا کرده است. به نظر می‌رسد تغییرات آب و هوایی و تغییر مقادیر آب موجود در رودخانه‌های اصلی، می‌تواند باعث شود که این مناطق خشک و بی‌ثمر گردند. همچنین درجه حرارت بالا و خشکسالی باعث تجزیه لایه سطحی خاک و عدم وجود پوشش گیاهی می‌شود. عوامل فوق منجر به بروز بیشتر توفان‌های شن و ماسه و گردوغبار می‌شوند (۲۶). در سایر مطالعات نیز عمدتاً گستره کانون‌های داخلی اصلی در تولید گردوغبار استان خوزستان، شرق و جنوب شرق اهواز تا هندیجان در بخش جنوب‌شرقی استان و بخش‌های خشک شده تالاب هورالعظیم در غرب هویزه در غرب استان معرفی شده است (۲۷).

با افزایش غلظت ذرات PM₁₀ و PM_{2.5} در روزهای رخداد توفان گردوغبار به چندین برابر بیشتر از حد مجاز تعیین شده (توسط WHO و EPA) و نیز افزایش معنی‌دار غلظت قارچ‌های موجود در هوا در روزهای گردوغبار نسبت به روزهای عادی، می‌توان گفت؛ با افزایش این ذرات، تعداد میکروارگانیسم‌های قارچی نیز افزایش می‌یابد. این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی از جمله Fan و همکاران (۸) نیز مطابقت دارد. در پژوهش حاضر بالاترین میزان غلظت قارچ‌ها در تاریخ ۱۳۹۸/۰۲/۲۹ به میزان $123/62 \pm 97/82$ cfu/m³ در زمان توفان گردوغبار مشاهده شده و کمترین میزان غلظت آن $4/10 \pm 71/58$ cfu/m³ در تاریخ ۲۰۱۹/۰۵/۸ در زمان توفان گردوغبار داخلی ثبت گردیده است، البته در این روز میزان رطوبت نسبی کمتر از روزهای دیگر بوده که احتمالاً از عوامل کاهش‌دهنده تعداد قارچ‌ها است (نمودار ۴). همبستگی مشاهده شده بین غلظت قارچ‌ها و PM_s در روزهای توفان گردوغبار در این مطالعه نشان می‌دهد که ذرات کویری ممکن است منبع قارچ‌ها در هوا در روزهای توفان گردوغبار باشند. مطالعه Nourmoradi و همکاران (۱۸) در شهر سنج، نیز ارتباط معنی‌داری بین PM₁₀ و قارچ‌های قابل کشت در روزهای گردوغباری نشان می‌دهد.

با پایش بیوآئروسول‌ها در نقاط نمونه‌برداری می‌توان به بررسی منشأ ذرات بیولوژیکی درون گردوغبار پرداخت که از فواصل دور به همراه گردوغبار جابجا می‌شوند (۸، ۲۸، ۲۹). در پژوهش حاضر با بررسی ذرات بیولوژیکی (قارچ‌ها) در روز توفان گردوغبار داخلی در روز ۱۳۹۸/۰۲/۱۸ مجموعاً شش جنس قارچ هوآبرد در نمونه‌های گردوغبار شناسایی گردید. قارچ‌های اصلی شناسایی شده عبارتند از: *Aspergillus*، *Penicillium* و *Alternaria* که مشابه قارچ‌هایی هستند که در دیگر مطالعات توفان‌های گردوغبار بیابانی مشاهده شده‌اند (۳۰، ۳۱). از طریق توالی‌یابی ژنتیکی مجموعاً شش جنس در خاک و شش جنس در گردوغبار توفان شناسایی شد. از این تعداد، چهار جنس *Aspergillus*، *Talaromyces*، *Penicillium* و *Fusarium* مشابه هستند. سایر نمونه‌ها به جنس‌های *Herpotrichia* و *Chaetomium*، *Libertasomyces* و *Stemphylium* در هوا تعلق دارند. لازم به ذکر است که همه جنس‌های یافت شده از نوع قارچ‌های ناقص (Deuteromyeota) هستند. شایع‌ترین گونه‌های قارچ شناسایی شده در حوادث گردوغبار خاورمیانه در غرب ایران در مطالعه Mazloomi (۳۰) در مطالعه موردی: شهر ایلام، به ترتیب کلادوسپوریوم، پنی‌سلیوم، اسپریژیلوس، آلترناریا و رایزپوس گزارش شدند. همچنین در مطالعه Yeo (۳۱) تمام جنس‌های قارچ‌های رشد یافته موجود در گردوغبار آسیایی از جنس *Penicillium*، *Aspergillus*، *Fusarium* بوده که از دسته قارچ‌های ناقص و از بیابان‌های مغولستان و چین منشأ می‌گیرند.

نتیجه‌گیری

در این مقاله با توجه به شباهت ۷۰ درصدی جنس‌های قارچ‌های یافت شده در تالاب هورالعظیم و هوای ایستگاه‌های مورد مطالعه در زمان توفان گردوغبار (که از آن منطقه منشأ گرفته) و یافت شدن قارچ *Talaromyces* در هر دو منطقه مورد مطالعه؛ که برخلاف قارچ‌های رایج در مطالعه کیفیت

منابع صورت گیرد تا درک بهتری از کیفیت بیولوژیک منطقه حاصل گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل (بخشی از) پایان‌نامه با عنوان "منشأیابی غبار با استفاده از بیوآئروسول‌ها (اسپورهای قارچی) در منطقه جنوب غربی خوزستان" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۸ است که با حمایت دانشکاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهرستان آبادان اجرا شده است.

References

1. Ashrafi K, Aslemant A, Ghader S. Dust storm simulation over Iran using HYSPLIT. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014;12(1):9.
2. Oduber F, Blanco-Alegre C, Castro A, Nunes T, Alves C, et al. Unusual winter Saharan dust intrusions at Northwest Spain: Air quality, radiative and health impacts. *Science of the Total Environment*. 2019;669:213-28.
3. Xu T, Weng B, Yan D, Wang K, Li X, Bi W, Li M, Cheng X, Liu Y. Wetlands of international importance: Status, threats, and future protection. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2019;16(10):1818.
4. Xie Z, Lu R, Li W, Fan C, Liu P, Wang W. Characteristics of total airborne microbes at various air quality levels. *Journal of Aerosol Science*. 2017;116:57-65.
5. Ju T, Li X, Zhang H, Cai X, Song Y. Comparison of two different dust emission mechanisms over the Horqin Sandy Land area: Aerosols contribution and size distributions. *Atmospheric Environment*. 2018;176:82-90.
6. Kopanakis I, Pentari D, Glytsos T, Lazaridis M. Ambient particulate matter concentration levels and their origin during dust event episodes in the eastern Mediterranean. *Aerosol Science and Engineering*. 2018;2(2):61-73.
7. Mu F, Lu R, Qi Y, Xie W, Bai W. Source identification of airborne bacteria in the mountainous area and the urban areas. *Atmospheric Research*. 2020;231:104676.
8. Fan XY, Pan KL, Li DC, Dai HH, Li X. More obvious air pollution impacts on variations in bacteria than fungi and their co-occurrences with ammonia-oxidizing microorganisms in PM2.5. *Environmental Pollution*. 2019;251:668-80.
9. Prospero JM, Mathison G, Naidu R. Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust. *Aerobiologia*. 2005;21(1):1-19.
10. Soleimani Z, Goudarzi G, Sorooshnia A, Marzouni M, Maleki H. Impact of Middle Eastern dust storms on indoor and outdoor composition of bioaerosol.

- Atmospheric Environment. 2016;138:135-43.
11. Yadav S, Sharma A. Characterisation of bio-aerosols during dust storm period in N-NW India. *Atmospheric Environment*. 2007;41(28):6063-73.
 12. Meng L, Yang X, Zhao T, He Q, Mamtimin A, Wang M, et al. Simulated regional transport structures and budgets of dust aerosols during a typical springtime dust storm in the Tarim Basin, Northwest China. *Atmospheric Research*. 2020;238:104892.
 13. Broomandi P, Dabir B, Bonakdarpour B, Rashidi Y. Identification of the sources of dust storms in the City of Ahvaz by HYSPLIT. *Pollution*. 2017;3(2):341-48.
 14. Liu CN, Chiao S, Ryoo JM. Asian long-range transport in relation to atmospheric rivers in Northern California. *Atmosphere*. 2019;10(6):313.
 15. Azizi G, Miri M, Nabavi A. Tracking the phenomenon of dust in the western half of Iran. *Arid Regions Geographic Studies*. 2012;7(2):63-81 (in Persian).
 16. Ashrafi K, Shafiepour-Motlagh M, Aslemand A, Ghader S. Dust storm simulation over Iran using HYSPLIT. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014;12(1):9.
 17. Mofidi A, Jafari S. The role of regional atmospheric circulation over the middle east on the occurrence of summer dust-storms in Southwest Iran. *Arid Regions Geographic Studies*. 2011;2(5):17-46 (in Persian).
 18. Nourmoradi H, Moradnejadi K, Moghadam FM, Khosravi B, Hemati L, Khoshniyat R, et al. The effect of dust storm on the microbial quality of ambient air in Sanandaj: a city located in the west of Iran. *Global Journal of Health Science*. 2015;7(7):114-19.
 19. O'Brien HE, Jackson JA, Moncalvo JM, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(9):5544-50.
 20. Maki T, Asahi Y, Lee K, Watanabe K, Aoki K, Murakami M, et al. Long-range transported bioaerosols captured in snow cover on Mount Tateyama, Japan: Impacts of Asian-dust events on airborne bacterial dynamics relating to ice-nucleation activities. *Journal of Atmospheric Chemistry and Physics*. 2018;408:4556-62.
 21. Khamooshi S, Vali A, Mousavi S.H. Dust storm monitoring using HYSPLIT model and NDDI (Case study: Southern cities of Shiraz, Bushehr and Fasa, Iran). *Ecopersia*. 2019;4(4):1603-16.
 22. Environmental Protection Agency. SLAMS/ NAMS/ PAMS network review guidance. Washington DC: Office of Air Quality Planning and standards Research; 1998. Report No: 454/R-98-003.
 23. Draxler R, Rolph, G, Stein, A, Taylor A. HYSPLIT4 user's guide, Version 4.9. Maryland: National Oceanic and Atmospheric Administration; 2009.
 24. Escudero M, Draxler R.R, Querol X, Alastuey A, Castillo S, et al. Determination of the contribution of northern Africa dust source areas to PM10 concentrations over the central Iberian Peninsula using the Hybrid Single-Particle Lagrangian Integrated Trajectory model (HYSPLIT) model. *Journal of Geophysical Research*. 2006;111:D06210. doi:10.1029/2005JD006395.
 25. Shan W, Lu H, Liang S. A meteorological analysis of ozone episodes using HYSPLIT model and surface data. *Atmospheric Research*. 2009;93:767-76.
 26. Bolorani A.D, Bahrami H.A, Mirzapour F, Kavosi M, Abasi E, et al. Investigation of dust storms entering Western Iran using remotely sensed data and synoptic analysis. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014;12(1):124.
 27. Hafezi H. Investigation of the relationship between vegetation parameters and soil moisture with the phenomenon of fine dust in the critical centers of southwestern Iran by remote sensing data [dissertation]. Zabol: Zabol University; 2017 (in Persian).
 28. Grantham NS, Pacifici K, Laber EB, Menninger HL, Henley JB, et al. Fungi identify the geographic origin of dust samples. *PLoS ONE*. 2015;10(4):e0122605.
 29. Pace L, Casilli M, Fattorini S. Temporal variations in the diversity of airborne fungal spores in a Mediterranean high altitude site. *Atmospheric Environment*. 2019;210:166-70.
 30. Mazloomi S, Sarpa F, Ozada N. Investigating

the distribution of fungal species concentration associated with dust storms in Ilam, Iran: A case study. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*. 2017; 27(147):371-85 (in Persian).

31. Yeo H-G, Kim J-H. SPM and fungal spores in the ambient air of west Korea during the Asian dust (Yellow sand) period. *Atmospheric Environment*. 2002;36(35):5437-42.



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Investigation of fungi diversity in airborne dust and their sources identification in Khuzestan province

Forough Tajiki¹, Hossein Mohammad Asgari^{1,*}, Isaac Zamani², Farshid Ghanbari³

1- Department of Environment, Faculty of Natural Resources, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Khorramshahr, Iran

2- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Khorramshahr, Iran

3- Department of Environmental Health, Faculty of Health, Abadan University of Medical Sciences, Abadan, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 24 February 2020

Revised: 19 May 2021

Accepted: 25 May 2021

Published: 21 June 2021

ABSTRACT

Background and Objective: Considering the fact that Iran is located in semi-arid climate and the harmful effects of dust storms on different ecosystems, this study aimed to identify and locate dust storms using fungal bio-aerosols (spores) and HYSPLIT model in southwestern region of Iran.

Materials and Methods: MODIS satellite images and HYSPLIT model were used to investigate the temporal changes of dust masses entering the Khuzestan province. Sampling was carried out from dust storms in Abadan and Khorramshahr cities and from the soil of the dried parts of Hur al-Azim and Shadegan wetlands in a two-month period (from May to July 2019).

Results: The results of numerical modeling show that Abadan and Khorramshahr cities were affected by dust storms of internal origin (from Hur-al-Azim wetland). After isolation of bioaerosols from air and soil samples, a total of 6 fungal genera were identified in soil samples and 6 genera in dust samples of internal origin by PCR-Sequencing method. Talaromyces, Alternaria, Penicillium and Aspergillus were identified as the predominant genera fungi in soil and air samples.

Conclusion: With 70% similarity of fungi found in soil and air samples, it can be concluded that the main source of fungi in Abadan and Khorramshahr is Hur al-Azim wetland.

Keywords: Dust storms, MODIS satellite, Biological aerosol, Fungus, Khuzestan

*Corresponding Author:

h.masgari@kmsu.ac.ire

Please cite this article as: Tajiki F, Mohammad Asgari H, Zamani I, Ghanbari F. Investigation of fungi diversity in airborne dust and their sources identification in Khuzestan province. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2021;14(1):51-66.

