

## مطالعه برخی پاسخ های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی *Hydrocotyle vulgaris* در جریان تیمار با نوعی آلاینده آلی: بررسی کارایی گیاه در پالایش سبز با تغییرات محیطی

سمانه تربتی<sup>۱</sup>

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۲/۰۶

تاریخ تصویب: ۹۵/۱۲/۲۱

چکیده

گیاه پالایی نوعی تکنولوژی موثر و کم هزینه می باشد که از طریق بکارگیری گیاهان، آلاینده ها از جمله پساب های رنگی را از محیط حذف می نماید. در این مطالعه توانایی گیاه آب بشقاب (*Hydrocotyle vulgaris*) در تجزیه زیستی ماده رنگزای مالاکیت سبز ارزیابی گردید. نتایج نشان دادند که قابلیت گیاه در رنگزدایی مالاکیت سبز بیش از ۹۰ درصد می باشد. همچنین توانایی بالای گیاه در حذف متوالی مالاکیت سبز در دوره طولانی از آزمایشات تکراری، فرایند تجزیه زیستی این آلاینده توسط گیاه را تایید کرد. برخی پاسخ های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه تیمار شده با غلظت های مختلف از آلاینده مطالعه گردید و نتایج نشان داد که افزایش در غلظت ماده رنگزا می تواند به افزایش قابل توجه فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز منجر گردد که تایید کننده نقش مهم این دو آنزیم در سازگاری گیاه به حضور مالاکیت سبز در محیط می باشد. بعلاوه مشخص گردید که افزایش در وزن توده گیاهی، دما و pH می تواند به افزایش کارایی رنگزدایی منجر گردد. در نقطه مقابل، افزایش در

۱. استادیار، گروه علوم محیط زیست، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه  
(نویسنده مسئول: s.torbati@urmia.ac.ir)

**غلظت اولیه ماده رنگزا منجر به افزایش نسبت C/C<sub>0</sub> گردید.****واژه های کلیدی: آنزیم های آنتی اکسیدان، رنگزدایی،****گیاه آب بشقاب، گیاه پالایی، مالاکیت سبز.****مقدمه**

در جهان صنعتی و مدرن امروزی آلودگی محیط زیست توسط انواع مختلفی از آلاینده ها از جمله مهم ترین مشکلات محیط زیست محسوب می شود. رهایش مقادیر قابل توجهی از پساب های واحد های صنعتی به ویژه صنایع رنگرزی و نساجی به محیط زیست، سلامتی و بقای موجودات آبی و حتی انسان را تهدید می کند (Forgacs et al., 2004; Pilon-Smits, 2005; Robinson et al., 2001). پساب اغلب این واحدهای صنعتی حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات آلی سمی از جمله مواد رنگزای سنتتیک می باشند (Forgacs et al., 2004; Slokar and Le Marechal, 1998) و اثرات سرطان-زایی و جهش زایی این ترکیبات در ارگانیسم های زنده به اثبات رسیده است (Robinson et al., 2001). با وجود اثرات مخرب این ترکیبات، مواد رنگزای سنتتیک در مقیاس وسیع و در شاخه های مختلف صنعت نساجی، چرم سازی، تولید کاغذ، صنایع غذایی و تولیدات کشاورزی به کار برده می شوند (Ali, 2010; Robinson et al., 2001). بنابراین بکارگیری روش های موثر در پالایش این ترکیبات در سال های اخیر به شدت مورد توجه بوده و روش های فیزیک و شیمیایی متعددی برای تصفیه آلاینده ها از پساب ها پیشنهاد گردیده است. در بیشتر موارد روش های مذکور به دلیل تولید و رهایش ترکیبات سمی در جریان پالایش و نیز به دلیل هزینه های بالا، مقرون به صرفه نمی باشند (Chin and Berube, 2005; Robinson et al., 2001). در نقطه مقابل روش های بیولوژیکی به دلیل هزینه کم و سازگاری با محیط زیست می توانند جایگزین مناسبی برای روش های فیزیکی و شیمیایی شناخته شده باشند (Pilon-Smits, 2005). امروزه توانایی تعداد زیادی از میکرو ارگانیسم ها مانند باکتری ها (Jadhav et al., 2010)، قارچ ها (Verma et al., 2010) و جلبک ها (Khataee et al., 2010) در حذف مواد رنگزا از محیط به اثبات رسیده است. همچنین مشخص شده است که گیاهان نیز می توانند به عنوان ابزار پالایش محیطی مورد استفاده واقع شوند. فرایند گیاه پالایی به معنی کاربرد گیاهان برای حذف یا جابجایی ترکیبات آلاینده خاک، آب های زیر زمینی، آب های سطحی و حتی اتمسفر می باشد (Pilon-Smits, 2005; Susarla et al., 2002). در سالهای اخیر این روش با استفاده از گونه های وسیعی از گیاهان به منظور حذف آلاینده های مختلفی مانند هیدروکربن های نفتی، علف کش ها، فلزات سنگین و مواد رنگزا به کار برده شده است (Kielak et al., 2011; Radic et al., 2010; Torbati, 2016).

ماده رنگزای مالاکیت سبز (Malachite Green (MG)) متعلق به گروه رنگ های تری آریل متان بوده و دارای مصرف بالایی در مقیاس صنعتی می باشد. این ماده به طور وسیع در صنایع رنگرزی کتان، چرم و ابریشم و در صنایع نساجی و کاغذ سازی مورد استفاده قرار می گیرد (Hamed and El-Khaiary, 2008). دفع پساب های حاوی مالاکیت سبز بدون تصفیه به محیط های آبی می تواند اثرات مخربی به همراه داشته باشد و بکارگیری اقدامات موثر و سازگار با محیط زیست در جهت تصفیه آب ها و پساب های آلوده به این ماده رنگزا، به دلیل خطراتی که برای مصرف کنندگان موجودات آبی در بر دارد، ضروری به نظر می رسد (Srivastava et al., 2004).

گیاه آب بشقاب (*Hydrocotyle vulgaris* L.) متعلق به تیره چتریان و جزو گیاهان علفی آبی شناور در سطح آب ها می باشد. تاکنون بررسی های محدودی در رابطه با مطالعه توانایی برخی گونه های آب بشقاب در حذف فلزات سنگین از پساب ها و حذف برخی مواد آلاینده آلی و بهبود کیفیت آب انجام گرفته است (Khilji and Baren, 2008; Sooknah and Wilkie, 2004; Vafaei et al., 2013a). پژوهش حاضر با هدف امکان سنجی و تعیین توانایی گیاه آب بشقاب در پالایش مکرر ماده رنگزای مالاکیت سبز (MG) انجام گردید. مطالعه برخی پاسخ های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گیاه، شامل تعیین مقدار پیگمان های فتوسنتزی و فعالیت برخی آنزیم های آنتی اکسیدانت مهم مانند پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) که می توانند در مقاومت این گیاه به ماده رنگزای مورد مطالعه و یا در متابولیسم این ماده دخیل باشند، از اهداف دیگر این کار پژوهشی بود. همچنین تاثیر پارامترهای زیستی و غیر زیستی از قبیل وزن توده گیاهی، غلظت اولیه ماده رنگزا، pH و دما در افزایش کارایی رنگزدایی بررسی گردید.

## مواد و روش ها

### تهیه نمونه های گیاهی

نمونه های گیاهی از تالاب انزلی جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو توسط آب شهری و آب مقطر و ضد عفونی با محلول ۳% (۷/۷) هیپوکلریت سدیم تجاری (وایتکس) به مدت ۲ دقیقه، به اکواریوم شیشه ای حاوی محیط کشت هوگلدن تغییر یافته ۲۰% با دمای ۲۵ °C و دوره روشنایی-تاریکی ۸/۱۶ ساعت انتقال داده شدند (Epstein, 1972). پس از گذشت دو هفته از کشت گیاهان در اکواریوم به منظور سازگاری گیاه به شرایط آزمایشگاهی، آزمایشات لازم بر روی گیاهان مورد مطالعه آغاز گردیدند. در بررسی های بیوشیمیایی هر بار مقدار مشخصی از نمونه های گیاهی سالم و مناسب در داخل بشری به حجم ۵۰۰ mL به مدت ۷ روز تحت تیمار با محیط کشت حاوی غلظت های مختلفی از ماده رنگزای مورد مطالعه (۱۰، ۲۰، ۴۰ mg/L) قرار گرفت و پس از ۷ روز سنجش های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی لازم بر روی آن ها انجام و با

نمونه کنترل مقایسه شدند. این آزمایشات برای هر غلظت در ۳ تکرار انجام گردیدند.

### تاثیر ماده رنگزا در کمیت رنگدانه های فتوسنتزی

به منظور استخراج کلروفیل و کاروتنوئید ها، مقدار ۱۰۰ mg از نمونه های گیاهی که به مدت ۷ روز در معرض غلظت های مختلف MG (۴۰ mg/L و ۲۰، ۱۰، ۰) قرار گرفته بودند با استون ۱۰۰% آسیاب گردید. مقادیر کمی رنگدانه های فتوسنتزی با بهره گیری از روش پیشنهادی Lichenthaler محاسبه گردید (Hartmut, 1987). در این روش کمیت رنگدانه های فتوسنتزی در طول موج های ۶۶۲، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر به عنوان حد اکثر جذب مربوط به کلروفیل a (Chl a)، کلروفیل b (Chl b) و کارتنوئید کل (Cx+c) به روش اسپکتروسکوپی تعیین و به صورت (mg g<sup>-1</sup>) وزن تر برگ (Fresh Weight (FW) بیان گردیدند.

### سنجش فعالیت آنزیم ها

نمونه های گیاهی مورد نظر به مدت یک هفته در معرض غلظت های مختلف از ۴۰ mg/L MG و ۲۰، ۱۰، ۰) قرار گرفت و پس از این مدت سنجش فعالیت آنزیمی انجام گرفت. برای استخراج نمونه های گیاهی به منظور سنجش فعالیت هر آنزیم، از ۳ mL بافر فسفات ۰/۱ مولار با PH= 7 و حاوی پلی وینیل پیرولیدون ۰/۲% (PVP) استفاده شد. تمام مراحل عصاره-گیری نمونه های گیاهی شامل استخراج و سانتریفیوژ در دمای پایین (تقریباً ۴ °C) با ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت و روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم ها و سنجش میزان پروتئین کل به روش Bradford، به کار برده شد (Bradford, 1976).

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از طریق اندازه گیری ممانعت از احیای فتوشیمیایی نیتروبلوتترازولیوم (NBT) توسط عصاره گیاهی سنجش گردید. بافر واکنش شامل ۶۷ mM بافر فسفات ۰/۱۲ mM NBT، pH= 7/8، ۱/۵ mM ریبولوفلاوین و میزان مناسبی از عصاره آنزیمی بود. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در شدت نور ۵۰۰۰ Lux قرار گرفت. جذب نمونه ها در ۵۶۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیم بر اساس مقدار پروتئین آنزیمی لازم برای القا ۵۰% ممانعت از احیای NBT در مقایسه با نمونه های شاهد بدون عصاره آنزیمی محاسبه شد و به صورت Unit/mg protein بیان گردید (Winterbourn et al., 1976). فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) از طریق تست گایاکول و تبدیل آن به تترایاکول و با بهره گیری از روش پیشنهادی Chance و Maehly سنجش گردید (Chance and Maehly, 1955). مطابق روش مذکور، بافر واکنش شامل ۰/۱ M بافر TS (سیترات- فسفات- بورات) دارای pH=7.5, 15mM گایاکول، ۳/۳ mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و مقدار مناسبی عصاره آنزیمی می باشد و واکنش با افزودن عصاره آنزیمی در ۲۵ °C آغاز می گردد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی تترایاکول

( $6/26 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) محاسبه شده و بر حسب Unit/mg protein بیان می گردد. فعالیت کاتالاز (CAT) بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در  $240 \text{ nm}$  و به روش Obinger و همکاران اندازه گیری گردید (Obinger et al., 1997). مطابق این روش پیشنهادی، برای سنجش فعالیت آنزیم مقدار مناسبی از عصاره آنزیمی به محلول واکنش که شامل  $0.1 \text{ M}$  بافر TS دارای  $\text{pH} = 7.5$  و  $10 \text{ mM}$  از  $\text{H}_2\text{O}_2$  بود، اضافه و تغییرات جذب به مدت ۳ دقیقه توسط اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ( $39/4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )  $\text{H}_2\text{O}_2$  محاسبه گردید.

### آزمایشات رنگزدایی

ماده رنگزای MG با فرمول مولکولی  $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{ClN}_2$  متعلق به گروه مواد رنگزای کاتیونی بوده که از یکی از شرکت های ایرانی خریداری گردید. به منظور اندازه گیری میزان حذف این ماده رنگزا از مشخصات جذبی آنها در ناحیه UV-Vis استفاده گردید. این ترکیب در طول موج  $619 \text{ nm}$  دارای جذب حداکثر می باشد (Torbati, 2016). برای تعیین اثرات عوامل زیستی و غیر زیستی بر کارایی حذف ماده رنگزای مورد مطالعه، آزمایشات مختلفی با تکیه بر تغییر عوامل مذکور از جمله دما،  $\text{pH}$ ، غلظت اولیه ماده رنگزا، وزن نمونه های گیاهی و زمان واکنش انجام گرفت. در این آزمایشات از وزن های مختلف گیاهی ( $2, 4, 6, 8, 10 \text{ g}$ )، چهار غلظت اولیه متفاوت ماده رنگزا ( $5, 10, 20, 40 \text{ mg/L}$ )  $\text{pH}$  های مختلف ( $5, 6, 7, 8, 9$ ) و نیز سه دما مختلف ( $5^\circ \text{C}, 15^\circ \text{C}, 25^\circ \text{C}$ ) استفاده گردید. در جریان آزمایشات برای تنظیم  $\text{pH}$  از محلول های رقیق شده  $\text{KOH}$  و  $\text{H}_2\text{SO}_4$  بهره گرفته شد. همچنین دما در داخل انکوباتور ثابت نگه داشته شد. جذب نمونه ها در فواصل زمانی معین (۲۴ ساعت) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم ماده رنگزای ( $619 \text{ nm}$ )، اندازه گیری گردید. در این آزمایشات درصد کارایی رنگزدایی با مقیاس  $\text{C}/\text{C}_0$  تعیین گردید که در آن  $\text{C}$  بیانگر غلظت نهایی  $\text{MG}$  و  $\text{C}_0$  بیانگر غلظت اولیه آن در محلول می باشد. مقادیر کمتر از این نسبت، نشان دهنده کارایی بالای فرایند رنگزدایی است (Vafaei et al., 2013a).

به منظور ارزیابی قابلیت گیاه مورد مطالعه در حذف مداوم  $\text{MG}$ ، مقدار  $6 \text{ g}$  از نمونه های گیاهی در ۳ تکرار در معرض  $10 \text{ mg/L}$  از ماده رنگزای مورد مطالعه قرار گرفتند. در فواصل زمانی معین (هر ۲۴ ساعت) نمونه برداری از محلول های مورد آزمایش انجام و درصد حذف ماده رنگزا از هر محلول محاسبه می گردید. پس از گذشت ۷ روز محلول دیگری با غلظت  $10 \text{ mg/L}$  از ماده رنگزا آماده سازی شد و همان نمونه گیاهی در معرض محلول دوم قرار گرفت. این آزمایش ۴ بار و در طول ۴ هفته متوالی تکرار گردید.

### آنالیز آماری داده ها

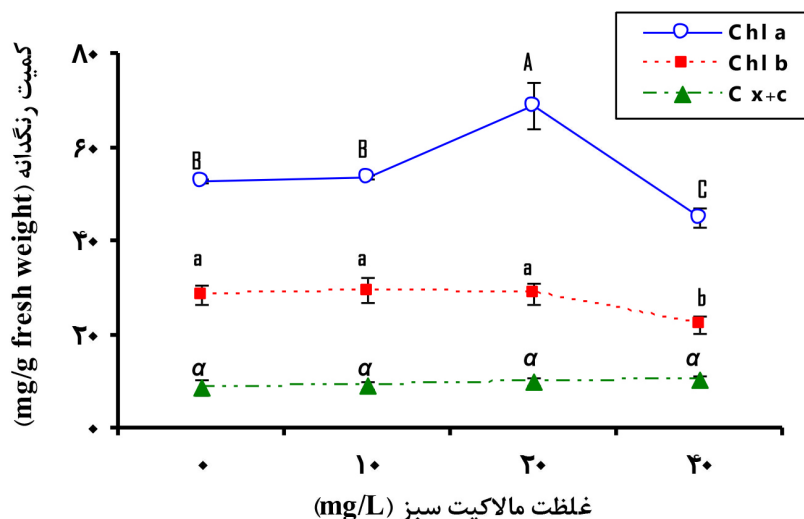
کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام گردید و نتایج بر مبنای میانگین داده ها ارائه داده شده است.

به منظور بررسی آماری نتایج از نرم افزار Graph Pad Instate3 بهره گرفته شد و به منظور تایید تفاوت معنی دار ما بین تیمار های مختلف ماده رنگزا در مورد کمیت رنگدانه های فتوسنتزی و میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، داده ها با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) تحلیل و گروه های تیمار با آزمون تعقیبی Tukey در سطح احتمال  $p < 0.05$  مقایسه شدند.

## نتایج و بحث

### تاثیر ماده رنگزای MG در مقدار رنگدانه های فتوسنتزی

تاثیر غلظت های مختلف MG در کمیت رنگدانه های فتوسنتزی پس از ۷ روز در شکل ۱ نشان داده شده است. مطابق شکل ۱، تیمار  $20 \text{ mg/L}$  از ماده رنگزا منجر به افزایش معنی دار مقدار رنگدانه کلروفیل a به میزان  $30/4\%$  گردید ( $p < 0.05$ ). اما غلظت  $40 \text{ mg/L}$  از این آلاینده، کمیت کلروفیل a را به میزان  $14/8\%$  کاهش داد. همچنین تیمار غلظت  $40 \text{ mg/L}$  از MG منجر به کاهش معنی دار کلروفیل b به میزان  $22/3\%$  نسبت به نمونه کنترل گردید. این در حالی است که تیمار غلظت های پایین تر از  $40 \text{ mg/L}$ ، تغییر معنی داری را در کمیت کلروفیل b اعمال نکرد. می توان چنین استنباط نمود که غلظت های بالای این ماده رنگزا منجر به ممانعت از سنتز رنگدانه هایی نظیر کلروفیل شده و باعث القا اثرات منفی شدیدی بر مقدار آن ها و بنابراین بر نرخ فتوسنتز می گردد. افزون بر این، کاهش در نرخ فتوسنتز می تواند به عنوان یک پاسخ حفاظتی و نیز محدود کننده تولید گونه های فعال اکسیژن در کلروپلاست، تلقی گردد (Vafaei et al., 2013b). نتایج مشابهی در روند تغییر کمیت رنگدانه های فتوسنتزی در جریان حذف زیستی گروه های مختلفی از آلاینده های آلی نظیر هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای و نیز انواع دیگری از مواد رنگزا در بررسی های گذشته گزارش گردیده است (Liu et al., 2009; Vafaei et al., 2013b). از طرف دیگر تیمار غلظت های مختلف ماده رنگزای MG تغییر معنی داری در کمیت کارتنوئیدها اعمال نکرد ( $p < 0.05$ ) (شکل ۱).



شکل ۱: اثر غلظت های مختلف ماده رنگزا MG در مقدار رنگدانه های فتوسنتزی گیاه آب بشقاب (نقاط نماینده میانگین سه تکرار و بار های عمودی نشانگر انحراف استاندارد (SE) است. برای غلظت های مختلف MG تیمار شده، میزان معنی داری تغییرات در مقدار هر رنگدانه بر اساس آزمون ANOVA و در سطح احتمال ۰/۰۵ می باشد. در هر نقطه ی مربوط به یک رنگدانه، میانگین های واجد حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار نسبت به هم هستند).

### بررسی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت

شکل ۲ نمایش دهنده تاثیر تیمار غلظت های متفاوت مالاکیت سبز در میزان فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان SOD، POD، CAT و در ریشه و برگ گیاه آب بشقاب پس از ۷ روز تیمار در مقایسه با نمونه شاهد می باشد. مطابق نتایج بدست آمده، افزایش در غلظت ماده رنگزای مورد مطالعه باعث افزایش شدید فعالیت آنزیم SOD به ویژه در غلظت های ۲۰ mg/L و ۴۰ mg/L گردید. به طوری که فعالیت این آنزیم در نتیجه تیمار با غلظت های مذکور، به ترتیب در ریشه به میزان ۲/۴ و ۳/۳ برابر و در برگ ها به میزان ۱/۵ و ۲/۲ برابر نسبت به نمونه شاهد افزایش نشان داد. این در حالی است که افزایش فعالیت SOD به دنبال تیمار گیاه با غلظت ۱۰ mg/L از MG چه در ریشه و چه در برگ معنی دار نبود ( $p < 0.05$ ) (شکل ۲a). آنزیم SOD اولین سد دفاعی در برابر رادیکال های سوپر اکسید تولید شده در شرایط تنشی می باشد و فعالیت این آنزیم منجر به تبدیل رادیکال های سوپر اکسید به پراکسید می شود (Halliwell, 2006). القا شدیدتر فعالیت SOD در ریشه گیاه مورد مطالعه، به عنوان اولین اندام گیاهی متاثر از حضور آلاینده، می تواند نشان دهنده تولید بالای رادیکال های سوپر اکسید در این اندام گیاهی و نیاز بالا برای سمیت زدایی این رادیکال ها در ریشه باشد (Torbati et al., 2014).

فعالیت آنزیم POD نیز به دنبال تیمار غلظت های مختلف MG از الگوی تغییر در فعالیت آنزیم



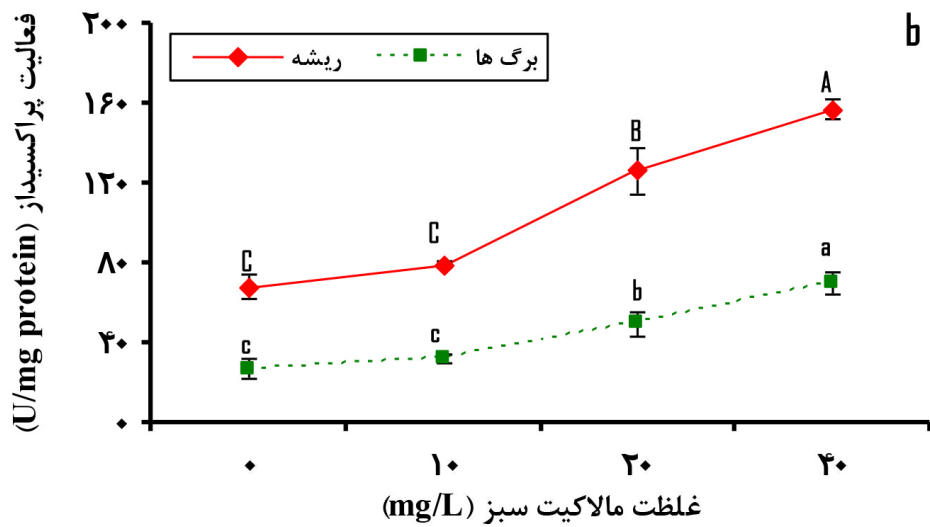
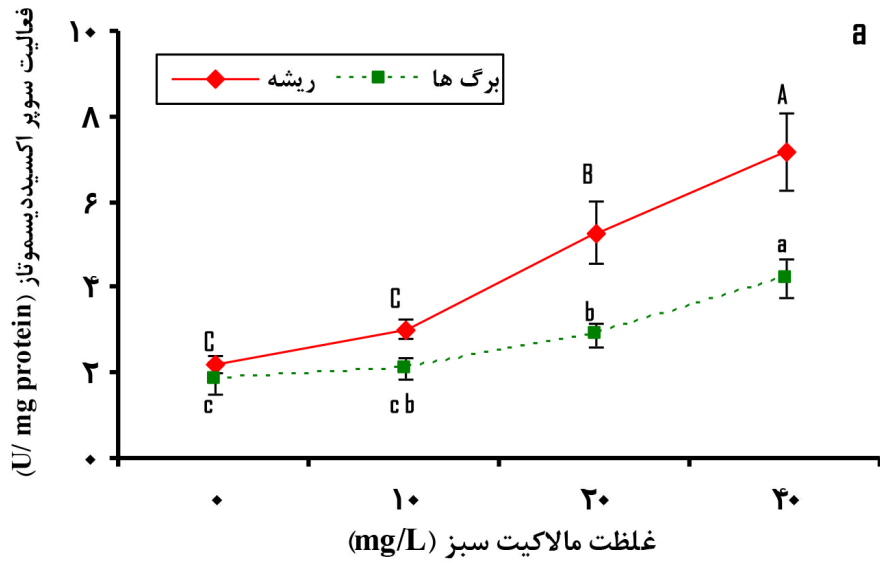
SOD تبعیت می کند. تیمار غلظت ۱۰ mg/L از MG باعث اعمال تغییرات معنی دار در فعالیت این آنزیم نگردید. این در حالی است که تیمار غلظت های بالاتر از MG منجر به افزایش معنی دار فعالیت POD هم در ریشه و هم در برگ ها شد (شکل ۲b). آنزیم POD نقش بسیار مهمی را در سمیت زدایی گروه های مختلفی از گزنوبیوتیک ها ایفا می نماید. این آنزیم با اکسیداسیون ترکیبات شیمیایی از جمله مواد رنگزای ارگانیک به عنوان سوبستراهای دهنده الکترون، باعث تبدیل H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به اکسیژن و آب می شود. در این بررسی بالاترین فعالیت آنزیم POD در ریشه گیاهان تحت تیمار با ۴۰ mg/L از MG تعیین گردید که می تواند نشان دهنده نیاز بالا به سمیت زدایی رادیکال های پراکسید هیدروژن در این اندام گیاهی به دنبال تیمار با غلظت بالایی از آلاینده باشد. طبق منابع، ریشه نه تنها اولین اندام گیاهی متاثر از حضور آلاینده ها است بلکه بیان آنزیم پراکسیداز نیز در ریشه در مقایسه با سایر اندام های گیاهی بالا می باشد (Dornates et al., 2012).

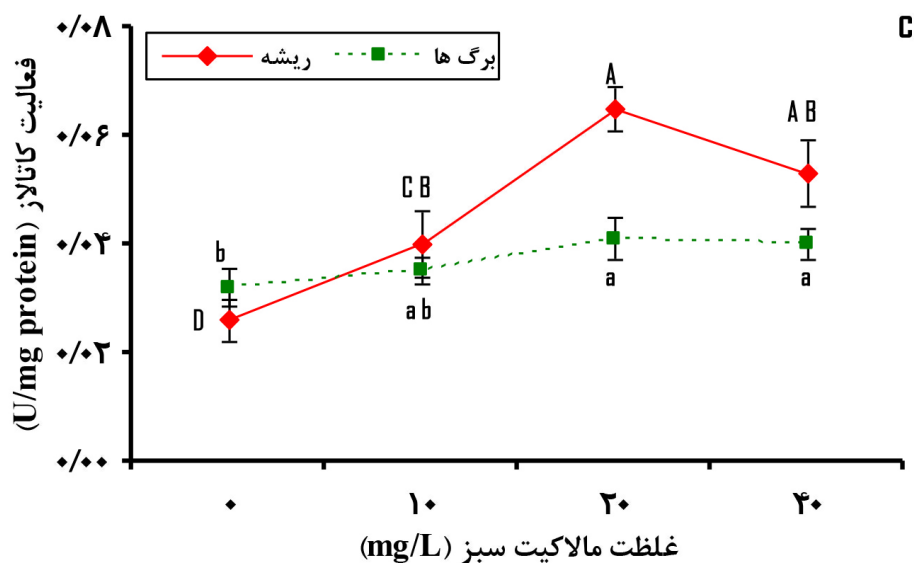
افزایش در فعالیت آنزیم های SOD و مخصوصا POD در جریان تیمار با مواد رنگزا در بررسی های گذشته نیز گزارش گردیده است که نشان دهنده دخالت این آنزیم ها در مسیر های تجزیه زیستی مواد رنگی و یا مسیرهای تبدیل آنها به مشتقاتی با اثرات سمی کمتر می باشد (Ali, 2010; Husain, 2010). به طور کلی، افزایش حضور کلاس های مختلف از آلاینده ها مانند انواع آلاینده های ارگانیک و یا فلزات سنگین در محیط باعث اعمال شرایط استرسی در گیاهان می گردد. درچنین شرایطی، تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) افزایش یافته و فعالیت سیستمی در جهت سمیت زدایی ROS و نیز به منظور حذف و تجزیه آلاینده ها در گیاه ضروری می باشد. بنابراین القا فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان می توانند به عنوان پاسخی نسبت به افزایش غلظت ROS سلولی و یا حتی به عنوان نشانه ای از درگیری این آنزیم ها در فرایند تجزیه آلاینده و یا اعمال تغییرات اولیه در ساختار آن تلقی گردند (Ali, 2010; Kvesitadze et al, 2001).

در رابطه با فعالیت آنزیم CAT، مطابق نتایج بدست آمده افزایش در غلظت ماده رنگزا تا ۲۰ mg/L منجر به افزایش معنی دار فعالیت این آنزیم در ریشه و برگ های گیاه آب بشقاب گردید. ولی تیمار غلظت ۴۰ mg/L از MG منجر به کاهش فعالیت این آنزیم گردید (شکل ۲c). احتمالاً تیمار غلظت های بالاتر از ۲۰ mg/L باعث القا اثرات منفی در سنتز یا فعالیت آنزیم CAT می شود. در مقایسه با آنزیم POD، آنزیم CAT دارای تمایل کمی به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> می باشد و معمولاً گیاهان کمتر از این آنزیم برای سمیت زدایی پراکسید هیدروژن تولید شده توسط SOD استفاده می نمایند (Halliwell and Gutteridge, 2015; Jha et al., 2015). همچنین طبق منابع گزارش شده، در شرایط استرسی شدید نظیر حضور درجات شوری یا دمای بالا و نیز حضور غلظت های بالایی از آلاینده های ارگانیک، درجاتی از غیرفعال شدن فعالیت آنزیم کاتالاز به چشم می خورد که می



تواند به دلیل ممانعت از سنتز آنزیم و یا تغییر در تجمیع زیر واحد های این آنزیم باشد (Irfan Dar et al., 2015; Schmidt et al., 2002; Streb et al., 1993).



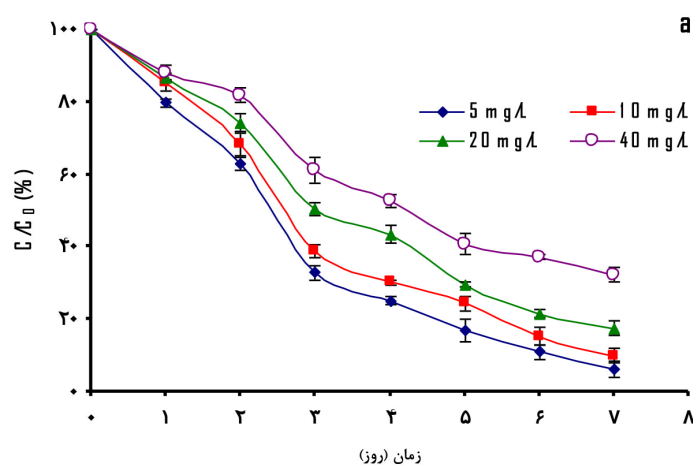


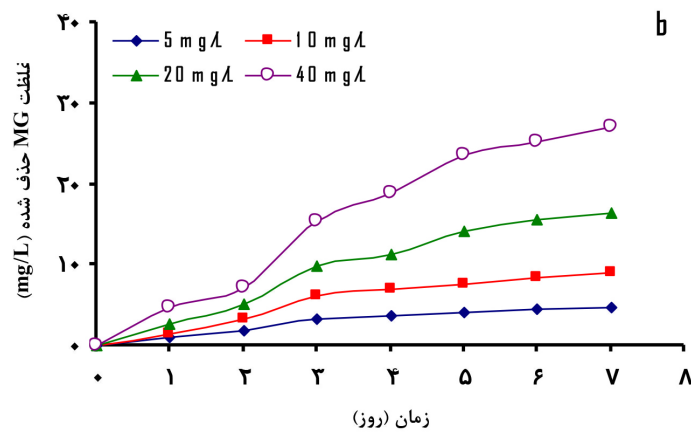
شکل ۲: اثر غلظت های مختلف MG روی فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان (a) سوپراکسیددیسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و c کاتالاز (CAT) در دو بخش برگ و ریشه گیاه آب بشقاب (نقاط نماینده میانگین سه تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف استاندارد (SE) است. برای غلظت های مختلف MG تیمار شده، میزان معنی داری تغییرات در فعالیت هر آنزیم در مورد هر یک از اندام های گیاهی مورد مطالعه (برگ ها و ریشه) بر اساس آزمون ANOVA و در سطح احتمال ۰/۰۵ می باشد. در هر نقطه ی مربوط به یک اندام گیاهی، میانگین های واجد حروف متفاوت دارای تفاوت معنی دار نسبت به هم هستند).

## آزمایشات رنگزایی

## اثر غلظت اولیه ماده رنگزا در کارایی رنگزایی

از آنجائیکه سمیت ایجاد شده توسط غلظت های بالای مواد رنگزا و توانایی آنزیم های تجزیه کننده گیاه در تشخیص غلظت های پایین مواد رنگزا می تواند در کارایی حذف تاثیر گذار باشد، غلظت اولیه ماده رنگزا می تواند نقش مهمی در کارایی رنگزایی اعمال نماید. مطابق شکل ۳a با افزایش غلظت اولیه ماده رنگزا نسبت  $C/C_0$  افزایش می یابد. این درحالی است که میزان ماده رنگزای حذف شده در واحد زمان با افزایش غلظت اولیه MG، افزایش می یابد (شکل ۳b). به طوریکه مثلاً پس از ۴ روز تیمار گیاه علف چشمه با غلظت ۱۰ mg/L و ۴۰ mg/L از MG میزان ماده رنگزای حذف شده توسط گیاه به ترتیب ۶/۹ mg/L و ۱۸/۹ mg/L می باشد (شکل ۳b). بنابراین اگرچه غلظت نهایی MG در محلول با افزایش غلظت اولیه ماده رنگزای تیمار شده، افزایش می یابد ولی این موضوع نشان دهنده کاهش مطلق کارایی رنگزایی نیست. چراکه با افزایش غلظت اولیه ماده رنگزا، میزان MG حذف شده از محیط نیز افزایش می یابد. این نتایج احتمالاً بیانگر ارتباط پیچیده بین توانایی گیاه در تجزیه و میزان غلظت رنگ می باشد. افزایش میزان ماده رنگزای حذف شده از محیط در نتیجه افزایش غلظت اولیه ماده رنگزا می تواند به دلیل افزایش شانس برخورد فیزیکی بین مولکول های رنگ و ریشه گیاه و نیز افزایش تعداد مولکول های قابل دسترس ماده رنگزا نسبت به جایگاه های پیوندی ریشه باشد. همچنین در غلظت های بالای MG، بر مقاومت های بین فاز مایع و جامد که از جذب ماده رنگزا جلوگیری می کند، غلبه می گردد (Arvindhan et al., 2007; Khataee et al., 2012). این نتایج در تطابق کامل با نتایج برخی مطالعات گذشته بر روی مواد رنگزای Reactive Black ۸ و مالاکیت سبز می باشد (Jha et al., 2015; Torbati, 2016).

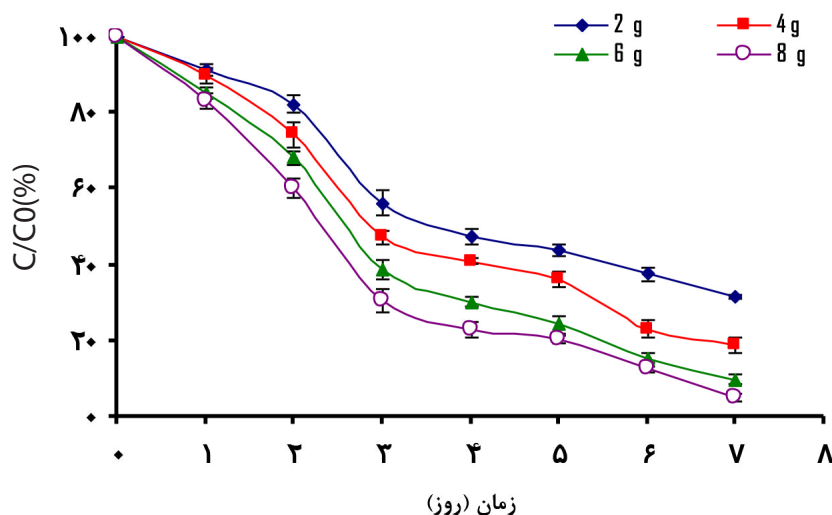




شکل ۳: (a) اثر غلظت اولیه ماده رنگزا در نسبت C/C0 در طی حذف زیستی با گیاه آب بشقاب ، (b) مقدار کمی MG حذف شده از محلول رنگی طی ۷ روز (شرایط آزمایش: دما= ۲۵ °C، pH=۷، وزن گیاه= ۶g).

#### اثر وزن گیاه در کارایی رنگزدایی

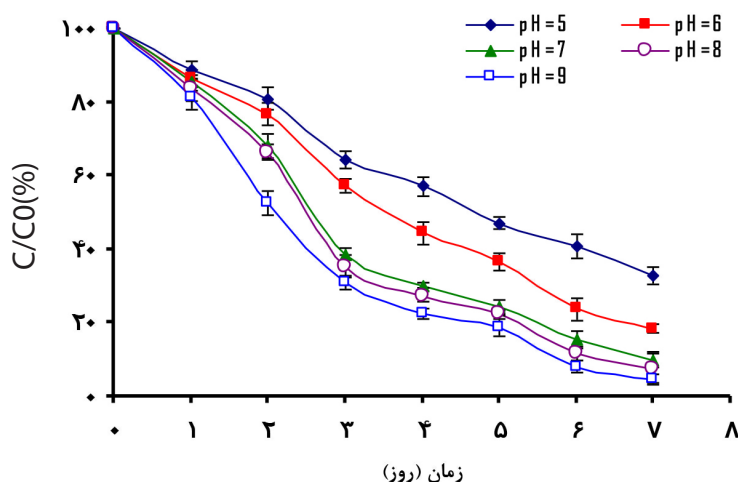
مطابق شکل ۴ با افزایش وزن توده گیاهی، نسبت غلظت نهایی ماده رنگزا به غلظت اولیه آن در شروع آزمایش (C/C0)، کاهش نشان می دهد. بنابراین افزایش توده گیاهی منجر به افزایش کارایی فرایند رنگزدایی می گردد. احتمالاً یکی از دلایل این افزایش، فراهمی سطوح بیشتری برای جذب ماده رنگزا در وزن های بالای گیاه و بنابراین افزایش کارایی حذف ماده رنگزا می باشد (Khataee et al., 2010).



شکل ۴: اثر وزن توده گیاهی در نسبت C/C0 ماده رنگزای MG در طی حذف زیستی با گیاه آب بشقاب (شرایط آزمایش: دما= ۱۰.۲۵ °C، [MG]<sup>0</sup>, mg/L= 10، pH=۷).

### اثر pH در کارایی رنگزدایی

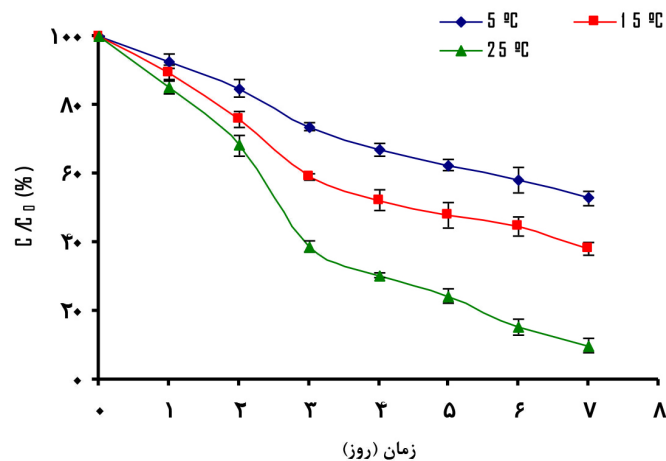
مطابق شکل ۵ با افزایش pH محیط نسبت C/C<sub>0</sub> کاهش نشان می دهد. بنابراین افزایش pH محلول منجر به افزایش کارایی رنگزدایی MG می شود. احتمالاً در pH های پایین به دلیل افزایش رقابت بین یون های H<sup>+</sup> و ماده رنگزای کاتیونی مورد مطالعه، میزان جذب این ماده رنگزا کاهش می یابد (Pan and Zhang, 2009). از طرف دیگر در گروه های کربوکسیلیک دیواره سلولهای گیاهی در pH های بالاتر واجد بار منفی بوده و در این حالت شرایط برای جذب MG با بار مثبت از طریق نیروی جاذبه الکتروستاتیک مساعدتر می باشد.



شکل ۵: اثر pH در نسبت C/C<sub>0</sub> ماده رنگزای MG در طی حذف زیستی با گیاه آب بشقاب (شرایط آزمایش: دما = ۲۵ °C، وزن گیاه = 6 g، [MG]<sub>0</sub> = 10 mg/L).

### اثر دما در کارایی رنگزدایی

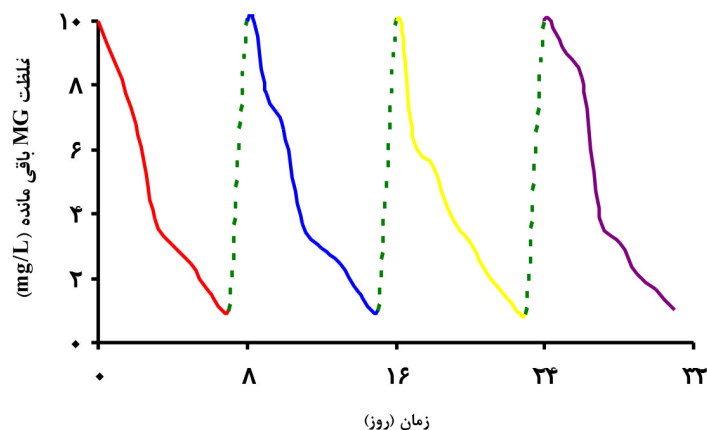
در مورد پارامتر دما همان طور که در شکل ۶ آورده شده است، نسبت C/C<sub>0</sub> با افزایش دما کاهش نشان داد. به طوری که درصد C/C<sub>0</sub> در پایان روز هفتم از آزمایش در مورد دمای ۱۵ °C و ۲۵ °C به ترتیب ۵۲/۸، ۳۸/۳ و ۹/۹ می باشد. بنابراین کارایی فرایند پالایش سبز با افزایش دما افزایش نشان می دهد. در دماهای پایین حرکت و جذب آب کم شده و به دنبال کاهش نفوذ پذیری غشاهای در ریشه، جذب مولکول های حلال در آب کاهش می یابد، بنابراین کارایی فرایند جذب کم می گردد (Jensen and Taylor, 1961; Ionenko et al., 2010; Ansari and Khan, 2008). همچنین دمای بهینه برای اغلب فرایندهای بیوشیمیایی ۳۰ °C - ۲۵ °C می باشد.



شکل ۶: اثر دما در نسبت C/C0 ماده رنگزای MG در طی حذف زیستی با گیاه آب بشقاب (شرایط آزمایش: وزن گیاه = 6 g،  $[MG]^0 = 10 \text{ mg/L}$ ،  $\text{pH} = 7$ ).

#### تکرار پذیری فرایند حذف رنگ در تیمار های متوالی

مطابق شکل ۷، گیاه آب بشقاب توانایی قابل قبولی برای استفاده مکرر در جهت حذف مواد رنگزای مورد مطالعه دارد که تایید کننده رخداد فرایند تجزیه زیستی و توانایی بالای گیاه در انجام این فرایند می باشد. در طی ۴ هفته متوالی استفاده از توده گیاهی واحد، برای حذف غلظت مشخصی از MG، گیاه توانایی قابل قبولی را در حذف این ماده در پایان هر هفته نشان داد و توانست حتی در پایان هفته چهارم کارایی مشابه و قابل قبولی را در مقدار ماده رنگزای حذف شده نسبت به هفته اول نشان دهد (شکل ۷). به طوری که در طی ۴ هفته متوالی استفاده از توده گیاهی واحد، برای حذف ۱۰ mg/L از MG، این توده گیاهی توانست عمل رنگزدایی را در پایان روز هفتم از هر ۴ هفته متوالی به ترتیب به میزان ۹۰/۰۷٪، ۸۷/۷٪، ۸۶/۶٪ و ۹۰/۹۷٪ انجام دهد.



شکل ۷: توانایی حذف مداوم MG در طول ۴ هفته متوالی (روز ۳۲) توسط گیاه آب بشقاب (شرایط آزمایش: وزن گیاه = 6 g،  $[MG] = 10 \text{ mg/L}$ ،  $\text{pH} = 7$ ، دما = 25 °C).

## نتیجه گیری

گیاه آب بشقاب مطابق نتایج بخش رنگزدایی توانایی بالایی (تقریباً بیش از ۹۰ درصد) را در رنگزدایی MG ارائه داد. قابلیت استفاده مجدد از گیاه برای حذف مکرر مالاکیت سبز تایید کننده رخداد فرایند تجزیه زیستی و توانایی بالای گیاه مورد مطالعه در فرایند رنگزدایی می باشد. تیمار غلظت ۴۰ mg/L از ماده رنگزا باعث کاهش معنی دار کمیت کلروفیل گردید. احتمالاً غلظت بالای MG باعث اعمال اثرات منفی در بیوسنتز کلروفیل و در کارایی فتوسنتز می گردد. فعالیت دو آنزیم SOD و POD با افزایش غلظت ماده رنگزای مورد مطالعه هم در ریشه و هم در برگ افزایش معنی داری نشان می دهد. نتایج مذکور نشان دهنده نقش مهم این دو آنزیم در تحمل گیاه به شرایط استرسی موجود و سمیت زدایی رادیکالهای آزاد تولید شده در جریان حضور MG در محیط می باشند.

همچنین مطابق نتایج بدست آمده افزایش در وزن توده گیاهی، دما و pH نقش مثبتی را در افزایش کارایی رنگزدایی توسط گونه گیاهی مورد مطالعه اعمال می کنند ولی افزایش در غلظت اولیه ماده رنگزا باعث افزایش نسبت C/C0 می گردد.

## سپاسگزاری

این پژوهش از حمایت های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه برخوردار بوده است. لذا، شایسته است نهایت تشکر و قدردانی از مسئولین آن معاونت و به ویژه از همکاری های صمیمانه پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه و پژوهشکده آرتیمیا و آبی پروری دانشکده علوم دانشگاه ارومیه به عمل آید.

## منابع

- Ali, H. (2010) Biodegradation of synthetic dyes-A review. *Water, Air & Soil Pollution* 213: 251-273.
- Ansari, A.A., Khan, F.A. (2008) Remediation of eutrophic water using *Lemna minor* in a controlled environment. *African Journal of Aquatic Sciences* 33: 275-278.
- Aravindhana, R., Rao, J.R., Nair, B.U. (2007) Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*. *Journal of Hazardous Materials* 142,68-76.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ana-*



- lytical biochemistry 72: 248-254.
- Chance, B. and Maehly, A.C. (1955) Assay of catalases and peroxidases. Pp. 764-775. in: S. P. Colwick and N. O. Kalplan (eds). *Methods in Enzymology*, vol. 2, Academic Press. New York.
- Chin, A. and Berube, P.R. (2005) Removal of disinfection by-product precursors with ozone-UV advanced oxidation process. *Water Research* 39: 2136-2144.
- Dornates, A.R., Angelica, L., Zuniga, G. (2012) Phenoloxidases activity in root system and their importance in the phytoremediation of organic contaminants. *Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology* 4: 35-40.
- Epstein, E. (1972) *Mineral Nutrition of Plants: Principles and perspectives*. John Wiley & Sons, Inc., 412 pp., New York.
- Forgacs, E., Cserháti, T. and Oros, G. (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International* 30: 953-971.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-22.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (2015) *Free radicals in biology and medicine*. 5th ed., Oxford University Press, 944 pp, Oxford, United Kingdom.
- Hamed, B.H. and El-Khaiary, M.I. (2008) Kinetics equilibrium studies of malachite green adsorption on rice straw-derived char. *Journal of Hazardous Materials* 153: 701-708.
- Hartmut, K.L. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Pp. 350-382. in: R.D. Lester Packer (eds). *Methods in Enzymology*, vol. 148. Academic Press. London.
- Husain, Q. (2010) Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Reviews in Environmental Sciences and Bio/Technology* 9: 117-140.
- Ionenko, I.F., Anisimov, A.V., Dautova, N.R. (2010) Effect of temperature on water transport through aquaporins. *Biologia Plantarum* 54: 488-494.
- Irfan Dar, M., Ahmad Khan, F., Rehman, F. (2015) Responses of antioxidative defense system and composition of photosynthetic pigments in *Brassica juncea* L.

- upon imidacloprid treatments. *Abiotic & Biotic Stress Journal* 1: 3-15.
- Jadhav, J., Phugare, S., Dhanve, R. and Jadhav, S. (2010) Rapid biodegradation and decolorization of Direct Orange 39 (Orange TGLL) by an isolated bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain BCH. *Biodegradation* 21: 453-463.
- Jensen, R.D. and Taylor S. A. (1961) Effect of temperature on water transport through plants. *Plant Physiology* 36: 639-642.
- Jha, P., Modi, N., Jobby, R., Desai, N. (2015) Differential expression of antioxidant enzymes during degradation of azo dye reactive black 8 in hairy roots of *Physalis minima* L. *International Journal of Phytoremediation* 17: 305-312.
- Khataee, A.R., Dehghan, G., Ebadi, A., Zarei, M. and Pourhassan, M. (2010) Biological treatment of a dye solution by macroalgae *Chara* sp.: Effect of operational parameters, intermediates identification and artificial neural network modeling. *Bioresource Technology* 101: 2252-2258.
- Khataee, A.R., Movafeghi, A., Torbati, S., Salehi Lisar, S.Y., Zarei, M. (2012) Phytoremediation potential of duckweed (*Lemna minor* L.) in degradation of C.I. Acid Blue 92: Artificial neural network modeling. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 291-298.
- Khilji, S. and Bureen, F. (2008) Rhizofiltration of heavy metals from the tannery sludge by the anchored hydrophyte, *Hydrocotyle umbellata* L. *African Journal of Biotechnology* 7: 3711-3717.
- Liu, H., Weisman, D., Ye, Y.B., Cui, B., Huang, Y.H., Colon-Carmona, A., Wang, Z.H. (2009) An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 176: 375-382.
- Obinger, C., Maj, M., Nicholls, P. and Loewen, P. (1997) Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in *Escherichia coli* HPII catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 342: 58-67.
- Pan, X. and Zang, D. (2009) Removal of malachite green from water by *Firmiana simplex* wood fiber. *Electronic Journal of Biotechnology* 12: 1-10.
- Paterson, S., Mackay, D., Tam, D. and Shiu, W.Y. (1990) Uptake of organic chemicals by plants: A review of processes, correlations and models. *Chemosphere* 21:

297-331.

- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology 56: 15-39.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. and Nigam, P. (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. Bioresource Technology 77: 247-255.
- Schmidt, M., Dehne, S., Feierabend, J. (2002) Post-transcriptional mechanisms control catalase synthesis during its light-induced turnover in rye leaves through the availability of the hemin cofactor and reversible changes of the translation efficiency of mRNA. Plant Journal 31: 601-613.
- Sooknah, R. and Wilkie, A. (2004) Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. Ecological Engineering 22: 27-42.
- Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. (2004) Toxicological effects of malachite green, Journal of Aquatic Toxicology 66: 319-329.
- Streb, P., Michael-Knauf, A., Feierabend, J. (1993) Preferential photoinactivation of catalase and photoinhibition of photosystem II are common early symptoms under various osmotic and chemical stress conditions. Physiologia Plantarum 88: 590-598.
- Torbati S. (2016) Artificial neural network modeling of biotreatment of malachite green by *Spirodela polyrhiza*: Study of plant physiological responses and the dye biodegradation pathway. Process Safety and Environmental Protection 99: 11-19.
- Torbati, S., Khataee, A.R., Movafeghi, A. (2014) Application of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) for biotreatment of a textile dye: Investigation of some physiological responses and effects of operational parameters. Chemical Engineering Research and Design 92: 1934-41.
- Vafaei, F., Movafeghi, A., Khataee, A.R., Zarei, M. and Salehi Lisar, S.Y. (2013a) Potential of *Hydrocotyle vulgaris* for phytoremediation of a textile dye: Inducing antioxidant response in roots and leaves. Ecotoxicology and Environmental Safety 93: 128-134.

- Vafaei, F., Movafeghi, A., Khataee, A. (2013b) Evaluation of antioxidant enzymes activities and identification of intermediate products during phytoremediation of an anionic dye (C.I. Acid Blue 92) by pennywort (*Hydrocotyle vulgaris*). Journal of Environmental Sciences 25: 2214-2222.
- Verma, A., Raghukumar, C., Verma, P., Shouche, Y. and Naik, C. (2010) Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. Biodegradation 21: 217-233.
- Winterbourn, C.C., McGrath, B. M. and Carrell, R.W. (1976) Reactions involving superoxide and normal and unstable haemoglobins. Biochemistry Journal 155: 493-502.