



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

مقاله پژوهشی

## امکان سنجی گیاه پالایی ماده رنگزای مالاکیت سبز از محلول‌های آبی آلوده با کاربرد علف چشمه (*Nasturtium officinale*)

سمانه تربتی\*

\* (نویسنده مسئول): گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

### چکیده

زمینه و هدف: مالاکیت سبز در بسیاری از صنایع از جمله صنایع نساجی مصرف می‌شود. دفع پساب‌های حاوی این ماده رنگزا به محیط، می‌تواند به مشکلات زیست محیطی فراوانی منجر گردد. امروزه روش‌های فیزیکو-شیمیایی متعددی برای پالایش پساب‌ها استفاده می‌گردند. به دلیل محدودیت‌ها و مشکلات این روش‌ها، تصفیه زیستی به عنوان یک روش پالایش اقتصادی و موثر مورد توجه قرار دارد. هدف تحقیق حاضر امکان سنجی گیاه پالایی ماده رنگزای مالاکیت سبز با کاربرد علف چشمه و بررسی تاثیر برخی فاکتورهای محیطی در کارایی حذف است.

روش بررسی: گیاهان پس از جمع آوری و نگهداری در آزمایشگاه، با غلظت‌های مختلف از مالاکیت سبز تیمار گردیدند. در طول آزمایش، مقدار رنگزدایی توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis تعیین شد. ترکیبات حدواسط تولید شده در جریان تجزیه زیستی آلاینده با کاربرد روش GC-MS شناسایی گردیدند. یافته‌ها: پس از گذشت ۷ روز، توانایی علف چشمه در رنگزدایی و تجزیه زیستی  $10 \text{ mg/L}$  از محلول مالاکیت سبز بیش از ۹۰ درصد تعیین گردید. ۵ ترکیب حدواسط در مسیر تجزیه زیستی این آلاینده شناسایی گردید. همچنین مشخص شد که افزایش غلظت ماده رنگزا تا  $20 \text{ mg/L}$  باعث افزایش کمیت رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در گیاه می‌گردد. نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد علف چشمه توانایی بالایی در رنگزدایی مالاکیت سبز داراست. قابلیت استفاده مجدد از گیاه برای حذف مکرر رنگ، تایید کننده رخداد فرایند تجزیه زیستی است. همچنین افزایش در وزن توده گیاهی، دما و pH منجر به افزایش کارایی رنگزدایی گردید.

### اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۷/۱۶  
تاریخ ویرایش: ۹۵/۱۰/۱۳  
تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۸  
تاریخ انتشار: ۹۵/۱۲/۱۶

واژگان کلیدی: مالاکیت سبز، علف چشمه، رنگزدایی، تجزیه زیستی، آنزیم‌های آنتی اکسیدان

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

samaneh.torbati@yahoo.com;  
s.torbati@urmia.ac.ir

## مقدمه

امروزه با توجه به پیشرفت قابل ملاحظه صنایع مختلف در جهان مدرن، آلودگی محیط زیست به عنوان یکی از بزرگترین و مهم‌ترین مشکلات محسوب می‌شود و پالایش آلاینده‌های مختلف محیط در سال‌های اخیر به شدت مورد توجه بوده است. صنایع رنگرزی و نساجی از جمله صنایعی هستند که گستردگی وسیعی در ایران و جهان دارند. این صنایع از بزرگترین مصرف‌کنندگان آب به شمار می‌روند و ناگزیر مقادیر قابل توجهی پساب به محیط رها می‌کنند (۳-۱). پساب اغلب واحدهای رنگرزی و نساجی حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات آلی سمی از جمله مواد رنگزای سنتتیک هستند (۱). مواد رنگزای سنتتیک با ساختاری بسیار متنوع، در شاخه‌های مختلف صنعت نساجی، چرم‌سازی، تولید کاغذ، صنایع غذایی و تولیدات کشاورزی و ... به کار برده می‌شوند (۳، ۴). امروزه روش‌های فیزیکوشیمیایی متعددی از جمله جذب سطحی، ازوناسیون و الکترولیز برای تصفیه آلاینده‌ها از پساب‌ها، مورد استفاده قرار می‌گیرند که در اغلب موارد این روش‌ها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نیستند (۳).

روش‌های بیولوژیکی به دلیل هزینه کم و سازگاری با محیط زیست و تولید ترکیبات غیر سمی در جریان تصفیه پساب‌ها می‌توانند جایگزین مناسبی برای روش‌های فیزیکوشیمیایی شناخته شده باشند (۲، ۵، ۶). امروزه توانایی بالای تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌ها (۹-۷)، قارچ‌ها (۱۰، ۱۱) و جلبک‌ها (۱۴-۱۲) در حذف مواد رنگزا از محیط به اثبات رسیده است. همچنین مشخص شده است که گیاهان نیز می‌توانند به عنوان ابزار موثری در پالایش محیطی مورد استفاده واقع شوند (۱۱، ۱۵-۱۸). به طوری که امروزه توانایی پالایش سبز مواد آلاینده از جمله مواد رنگزای سنتتیک، گروه‌های مختلفی از آفت‌کش‌ها، ترکیبات آلاینده هیدروکربنی و فلزات سنگین توسط گونه‌های وسیعی از گیاهان از جمله *Spirodela*، *Portulaca grandiflora*، *polyrhiza* و *Lemna minor* به اثبات رسیده است (۲۳-۱۹).

ماده رنگزای مالاکیت سبز (MG) متعلق به گروه رنگ‌های تری آریل متان بوده و دارای مصرف بالایی در مقیاس صنعتی و به ویژه در صنایع نساجی و رنگرزی است. غلظت‌های بسیار

کم از این ماده رنگزا در محیط‌های آبی کاملاً قابل رویت است و امروزه به دلیل خطراتی که برای مصرف‌کنندگان موجودات آبی در بر دارد به عنوان یکی از جدال برانگیزترین ترکیبات تلقی می‌شود (۲۴، ۲۵). بنابراین به کارگیری اقدامات موثر در جهت تصفیه آب‌ها و پساب‌های آلوده به این ماده رنگزا ضروری به نظر می‌رسد.

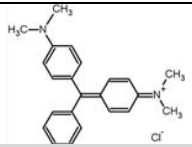
گیاه علف چشمه (*Nasturtium officinale* R. Br.) یک گیاه آبی و بن در خاک است. این گیاه دارای فراوانی و سازگاری بالا بوده و تقریباً در کنار بسیاری از رودها و جویبارها کوچک در جهان توانایی رویش دارد. برخی تحقیقات انجام گرفته در گذشته نشان دادند که این گیاه توانایی بالایی در جذب و انباشت فلزات سنگین از جمله *Cd*، *Zn*، *Cu*، *Ni* در پیکر خود و حذف آنها از آب‌های آلوده دارد (۲۹-۲۶). ولی تاکنون در مورد توانایی این گیاه در حذف آلاینده‌های آلی مانند مواد رنگزای سنتتیک بررسی‌های بسیار محدودی صورت گرفته است. به عنوان مثال در مطالعات گذشته توانایی این گیاه در حذف مواد رنگزای متعلق به گروه رنگ‌های آزو از جمله قرمز بازی ۴۶ و آبی اسیدی ۹۲ به اثبات رسیده است و این گیاه توانایی قابل قبولی را در حذف این گروه از مواد رنگزا از خود نشان داده است (۳۰، ۳۱). در پژوهش حاضر تلاش گردیده است که توانایی گیاه علف چشمه در پالایش ماده رنگزای مالاکیت سبز به عنوان نماینده گروه دیگری از مواد رنگزای سنتتیک یعنی گروه رنگ‌های تری آریل متان مورد ارزیابی و امکان سنجی قرار گیرد. با توجه به این که گیاه علف چشمه دارای رویش بالا در ایران و جهان بوده و مطالعات قبلی انجام گرفته تایید کننده نقش مثبت این گیاه در پالایش برخی از انواع آلاینده‌هاست. بنابراین نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر می‌تواند در راستای معرفی این گیاه به عنوان یکی از کاراترین و موثرترین جنس‌های گیاهی در پالایش سبز انواع مواد رنگزای سنتتیک از سری مواد آلاینده ارگانیک مورد استفاده قرار گیرد. در جریان فرایند پالایش سبز این ماده رنگزا با هدف افزایش کارایی رنگزایی، تاثیر پارامترهای زیستی و غیر زیستی از قبیل وزن توده گیاهی، غلظت اولیه ماده رنگزا، pH و دما مطالعه می‌گردد. همچنین در صورت تایید رخداد فرایند تجزیه زیستی و کارایی گیاه مورد

در شرایط کنترل شده و در داخل بشری به حجم ۵۰۰ mL به مدت ۷ روز تحت تیمار با محیط کشت حاوی ۱۰ mg/L MG قرار گرفت. این آزمایش در ۴ تکرار انجام و نمونه‌گیری از محلول‌های مورد آزمایش در فواصل زمانی مشخص (هر ۲۴ h) و توسط سرنگ صورت گرفت. به منظور اندازه‌گیری میزان حذف ماده رنگزا از محلول‌های تحت تیمار، از مشخصات جذبی آنها در ناحیه UV-Vis و اسپکتروفتومتر استفاده گردید. جذب نمونه‌ها در فواصل زمانی معین (هر ۲۴ h) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ماکزیمم ماده رنگزای MG (۶۱۹ nm)، تعیین گردید. در این آزمایشات درصد حذف ماده رنگزا به کمک معادله ۱ محاسبه گردید:

$$\text{Dye Removal (\%)} = [1 - (A/A_0)] \times 100 \quad (1)$$

در این معادله  $A_0$  بیانگر جذب اولیه محلول رنگی و  $A$  بیانگر جذب محلول در زمان اندازه‌گیری است.

جدول ۱- ساختار و ویژگی‌های ماده رنگزای مالاکیت سبز

ساختار شیمیایی	
	کلاس شیمیایی
	کاتیونی
	فرمول مولکولی
$C_{23}H_{25}ClN_2$	طول موج ماکزیمم (nm)
۶۱۹	جرم مولکولی (g/mol)
۳۶۴/۹۱	

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، pH، غلظت اولیه ماده رنگزا، وزن نمونه‌های گیاهی و زمان واکنش انجام گرفت. برای این منظور از وزن‌های مختلف گیاهی (۱، ۲، ۴، ۸ g)، چهار غلظت اولیه متفاوت ماده رنگزا (۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ mg/L)، pH های مختلف (۵-۹) و نیز سه دما مختلف (۵، ۱۵، ۲۵ °C) استفاده گردید. هر کدام از آزمایشات در ۴ تکرار انجام گرفت. در جریان آزمایشات برای تنظیم pH از محلول‌های رقیق شده KOH

مطالعه در حذف مکرر MG، شناسایی متابولیت‌های حدواسط تولید شده در مسیر تجزیه زیستی از اهداف دیگر این پژوهش است. در بسیاری از مطالعات انجام گرفته در زمینه گیاه پایایی و نیز بررسی‌های مرتبط با سم شناسی آلاینده‌های مختلف، پارامترهای فیزیولوژیک گیاهان از جمله تغییرات در محتوای رنگدانه‌های فتوسنتزی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت به منظور تعیین اثرات منفی این ترکیبات و نیز نحوه عمل آنها در گیاهان مورد ارزیابی قرار می‌گیرند (۳۲، ۳۳). در این مطالعه نیز با هدف ارزیابی تاثیرات مالاکیت سبز در فیزیولوژی گیاه، برخی از پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه شامل مقدار پیگمان‌های فتوسنتزی و فعالیت برخی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت مهم مانند پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) که می‌توانند در مقاومت این گیاه به ماده رنگزای مورد مطالعه و یا متابولیسم این ماده دخیل باشند، بررسی می‌گردند.

## مواد و روش‌ها

### الف) تهیه مواد شیمیایی و نمونه‌های گیاهی

تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از جمله ترکیبات مورد استفاده در محیط کشت گیاه و نیز ترکیبات لازم برای سنجش‌های بیوشیمیایی ساخت شرکت Merck (آلمان) بوده است.

نمونه‌های گیاهی علف چشمه از چشمه‌ای در ۳۵ کیلومتری جاده ارومیه-اشنویه جمع آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه و شستشو توسط آب شهری و آب مقطر به اکواریوم شیشه‌ای حاوی محیط کشت هوگلدن تغییر یافته ۱۰ درصد با دمای ۲۵ °C و دوره روشنایی-تاریکی ۸/۱۶ h به منظور سازگاری به شرایط آزمایشگاه انتقال داده شدند. پس از گذشت یک هفته از کشت گیاهان، آزمایشات لازم بر روی گیاهان مورد مطالعه آغاز گردیدند.

### ب) ماده رنگزا و آزمایشات رنگزدایی

ماده رنگزای MG از شرکت شیمی بویاخ ساز (ایران) خریداری گردید. جدول ۱ نمایش دهنده ویژگی‌های این ماده رنگزا است. به منظور بررسی توانایی گیاه مورد مطالعه در گیاه پایایی مالاکیت سبز، مقدار مشخصی از نمونه گیاهی (۴ g) از گیاهان سالم و مناسب که هر گیاه واجد تعداد تقریبی ۱۲ برگ بودند)

گیاهی شاداب و سالمی که هر کدام واجد تعداد تقریبی ۱۲ برگ بودند انتخاب و به مدت یک هفته در معرض غلظت‌های مختلف از MG قرار گرفت. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار در ۴ تکرار در طول یک هفته انجام و پس از این مدت سنجش فعالیت آنزیمی صورت گرفت. برای استخراج نمونه‌های گیاهی به منظور سنجش فعالیت هر آنزیم، از بافر فسفات ۰/۱ M با pH=۷ و حاوی پلی وینیل پیرولیدون ۰/۲ درصد (PVP) استفاده شد. هر بار مقدار مشخصی (۰/۵ g) از وزن تر بافت از هر دو اندام برگ و ریشه به صورت جداگانه توزین گردید و هر کدام از نمونه‌های گیاهی در حضور ۳ mL بافر استخراج و در هاون ساییده شد و به این ترتیب عصاره‌های گیاهی مورد نظر حاصل گردید. هر کدام از نمونه‌ها در ۴ تکرار و به صورت جداگانه برای بافت‌های گیاهی مربوط به اندام ریشه و برگ علف چشمه عصاره‌گیری گردیدند. تمام مراحل عصاره‌گیری نمونه‌های گیاهی در دمای پایین (تقریباً ۴ °C) انجام و مخلوط حاصل به مدت ۱۵ min با دور ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. روشناور برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها و سنجش میزان پروتئین کل به روش Bradford، به کار برده شد (۵). در این روش برای تهیه معرف برادفورد ۱۰۰ mg کوماسی برلیانت بلو در ۵۰ mL اتانول ۹۸ درصد حل شده و به آن ۱۰۰ mL اسید فسفریک ۸ درصد اضافه گردید. برای تهیه محلول برادفورد ۶ mL معرف برادفورد و ۳ mL اتانول و ۶ mL اسید فسفریک ۸۵ درصد را مخلوط و به حجم ۱۰۰ mL رسانده شد. در ادامه به منظور سنجش پروتئین کل ۱۰۰ µL از عصاره با ۱ mL از محلول برادفورد مخلوط و در تاریکی قرار داده شد. پس از ۲ min جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ nm اندازه‌گیری گردید. همزمان محلول‌های استاندارد پروتئین با استفاده از سرم آلبومین گاوی در محدوده صفر تا ۰/۲ mg/mL تهیه و منحنی استاندارد پروتئین با توجه به جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵nm ترسیم گردید و در نهایت غلظت پروتئین کل نمونه‌ها بر حسب mg g<sup>-1</sup> FW و با توجه به منحنی استاندارد ترسیم شده، محاسبه گردید.

فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) از طریق اندازه‌گیری ممانعت از احیای فتوشیمیایی نیتروبلوترازولیوم

و H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> بهره گرفته شد. همچنین دما در داخل انکوباتور ثابت نگه داشته شد. جذب نمونه‌ها در فواصل زمانی معین توسط اسپکتروفتومتر تعیین گردید و درصد حذف ماده رنگزا براساس معادله ۱ محاسبه شد.

به منظور ارزیابی قابلیت گیاه مورد مطالعه در حذف مداوم MG، مقدار ۴ g از نمونه‌های گیاهی در ۴ تکرار در معرض ۱۰ mg/L از ماده رنگزای مورد مطالعه قرار گرفتند. در فواصل زمانی معین (هر ۲۴ h) نمونه برداری از محلول‌های مورد آزمایش انجام و درصد حذف ماده رنگزا از هر محلول محاسبه گردید. پس از گذشت ۷ روز محلول ۱۰ mg/L دیگری آماده‌سازی شد و همان نمونه گیاهی در معرض محلول دوم قرار گرفت. این آزمایش ۴ بار و در طول ۴ هفته متوالی تکرار گردید.

### ج) تاثیر ماده رنگزا در کمیت رنگدانه‌های فتوسنتزی

برای اندازه‌گیری کلروفیل کل و کاروتنوئیدها از نمونه‌های گیاهی شاداب و سالم که هر کدام تقریباً واجد ۱۲ برگ بوده و به مدت ۷ روز در معرض غلظت‌های مختلف MG (۰، ۱۰، ۲۰، ۴۰ mg/L) قرار گرفته بودند، استفاده گردید. استخراج رنگدانه‌ها هر بار از مقدار ۰/۱ g از برگ‌های میانی گیاه مورد مطالعه (برگ‌های هفتم تا نهم) و با استون ۱۰۰ درصد و در ۴ تکرار برای هر کدام از تیمارها صورت گرفت و مقادیر کمی آنها با بهره‌گیری از معادلات (۲، ۳ و ۴) آورده شده در ذیل و پیشنهادی Lichenthaler محاسبه گردیدند (۳۴). در این روش کمیت رنگدانه‌ها به روش اسپکتروسکوپی و در طول موج‌های ۶۶۲، ۶۴۵، ۴۷۰ nm به ترتیب به عنوان جذب حداکثر (A) مربوط به کلروفیل (Chl a) a، کلروفیل (Chl b) b و کاروتنوئیدها تعیین و به صورت (mg/g) وزن تر برگ (Fresh Weight; FW) بیان گردیدند.

$$Chl a \text{ (mg g}^{-1} \text{ FW)} = 11/24 A_{662} - 2/0.4 A_{645} \quad (2)$$

$$Chl b \text{ (mg g}^{-1} \text{ FW)} = 20/13 A_{645} - 4/19 A_{662} \quad (3)$$

$$Carotenoids \text{ (mg g}^{-1} \text{ FW)} = \quad (4)$$

$$(A_{662} - 1/90 Chl a - 63/14 Chl b) / 214$$

### د) سنجش فعالیت آنزیم‌ها

به منظور سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان نمونه‌های

ه) استخراج و شناسایی مواد حاصل از تجزیه زیستی MG به منظور شناسایی مواد حاصل از تجزیه زیستی MG توسط علف چشمه، ابتدا محلولی به غلظت ۱۰ mg/L از MG تهیه گردید. این محلول سپس به وسیله مقدار مشخصی از نمونه گیاهی به مدت ۴ روز مورد رنگزدایی قرار گرفت. پس از گذشت ۴ روز از فرایند رنگزدایی، به دنبال حذف گیاهان از محلول مذکور، حد واسط‌های آلی تولید شده سه بار و هر بار توسط ۲۵ mL از حلال دی اتیل اتر از فاز آبی به فاز آلی استخراج شدند. پس از تبخیر تمام حلال استفاده شده، ماده جامد باقیمانده توسط ۱۰۰ μL N, O- بیس تری متیل سیلیل استامید به مدت ۱۵ min و در دمای ۶۰ °C درون حمام آب گرم مورد مشتق‌سازی قرار گرفت و سپس محصولات سیلیله شده مستقیماً وارد دستگاه GC-MS گردید. دستگاه GC-MS مورد استفاده، گاز کروماتوگراف مدل ۶۸۹۰ Agilent (ساخت کشور کانادا) با ستون کاپیلاری HP-5MS (طول ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۲۵ mm) و کوپل شده به اسپکترومتر جرمی ۵۹۷۳ Agilent بوده است. نرم‌افزار مورد استفاده در تکنیک GC-MS برای شناسایی متابولیت‌های حدواسط نرم‌افزار Wiley نسخه ۷ بوده است.

#### و) آنالیز آماری داده‌ها

کلیه آزمایشات در چهار تکرار انجام گردید و نتایج بر مبنای میانگین داده‌ها ارائه شده است. به منظور بررسی آماری نتایج از نرم افزار Graph Pad Instate3 بهره گرفته شد و به منظور تایید تفاوت معنی‌دار ما بین تیمارهای مختلف ماده رنگزا در مورد کمیت رنگدانه‌های فتوسنتزی و میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان، تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار و هر تیمار در ۴ تکرار در طول یک هفته انجام و داده‌ها مورد آنالیز واریانس (ANOVA) با آزمون Tukey در سطح احتمال  $P < 0/05$  قرار گرفتند.

#### یافته‌ها

##### الف) آزمایشات رنگزدایی

اثر فاکتورهای وزن گیاه، غلظت اولیه ماده رنگزا، pH و دما در کارایی رنگزدایی مالاکیت سبزی توسط گیاه علف چشمه به ترتیب در نمودار ۱ (الف-د) نشان داده شده است. مطابق

(NBT) توسط عصاره گیاهی سنجش گردید. در این آزمایش بافر واکنش شامل ۲/۶۵ mL از بافر فسفات ۶۷ mM (pH=۷/۸)، ۰/۱ mL NBT به غلظت ۱/۵ mM، ۵۰ μL ریپوفلاوین به غلظت ۰/۱۲ mM و میزان مناسبی از عصاره آنزیمی بود. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ min در شدت نور ۵۰۰۰ Lux قرار گرفت. سپس جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ nm توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. یک واحد فعالیت آنزیم براساس مقدار پروتئین آنزیمی لازم برای القا ۵۰ درصد ممانعت از احیای NBT، در مقایسه با نمونه‌های شاهد بدون عصاره آنزیمی، محاسبه شد و به صورت Unit/mg protein بیان گردید (۱۸).

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) از طریق تست گایاکول و تبدیل آن به تترآگایاکول و با بهره‌گیری از روش پیشنهادی Chance و Maehly سنجش گردید (۳۵). مطابق روش مذکور، بافر واکنش شامل ۰/۱ M بافر TS (سیترات-فسفات-بورات) دارای pH=۷/۵، ۱۵ mM گایاکول، ۳/۳ mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و مقدار مناسبی عصاره آنزیمی است. به این صورت که هر بار مقدار ۱/۵ mL از بافر TS برداشته و روی آن مقدار ۵۰ μL گایاکول و ۵۰ μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> افزوده شد. واکنش با افزودن مقدار مناسبی عصاره آنزیمی در ۲۵ °C آغاز گردید و فعالیت آنزیم در طی ۳ min با دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۶۰ nm اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری با افزایش جذب در طول موج مذکور همراه بود. در نهایت فعالیت آنزیم براساس ضریب خاموشی تترآگایاکول ( $26/6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) محاسبه شده و بر حسب Unit/mg protein بیان گردید.

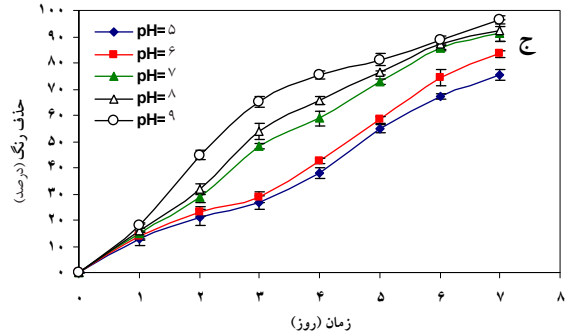
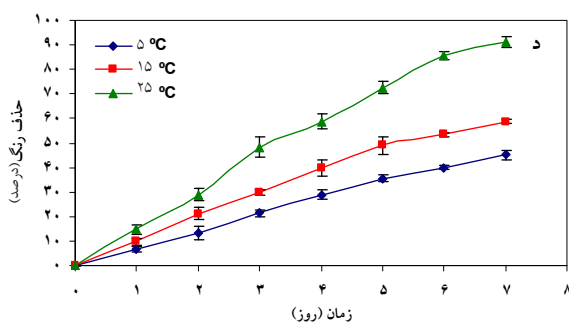
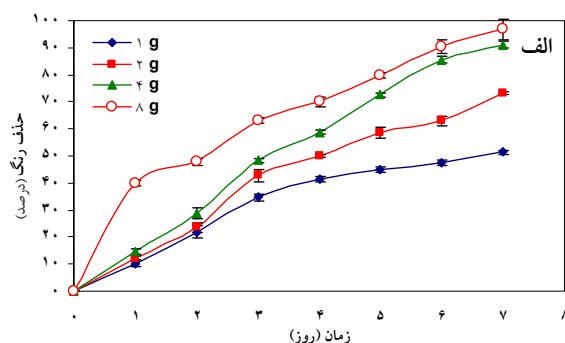
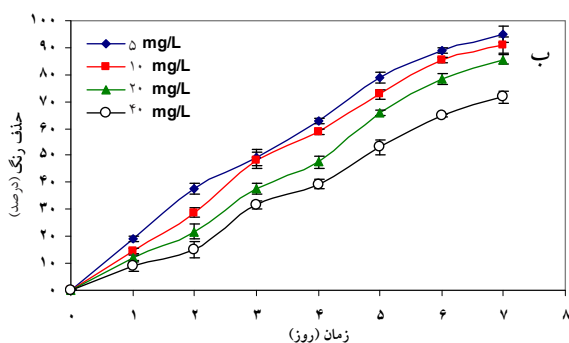
فعالیت کاتالاز (CAT) براساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ nm و به روش Obinger و همکاران اندازه‌گیری گردید (۳۶). مطابق این روش پیشنهادی، برای سنجش فعالیت آنزیم مقدار مناسبی از عصاره آنزیمی به محلول واکنش که شامل ۱/۵ mL از بافر TS با غلظت ۰/۱ M (pH=۷/۵) و ۱۳ μL از H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> به غلظت ۱۰ mM بود، اضافه و تغییرات جذب به مدت ۳ min توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری با کاهش جذب در طول موج ۲۴۰ nm همراه بود. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $39/4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) محاسبه گردید.

بنابراین هرچه غلظت اولیه ماده رنگزا بیشتر می شود، گیاه مورد مطالعه در واحد زمان مقدار بیشتری از این ماده را (mg/L) از محلول حذف می کند.

طبق یافته های حاصله، پس از تیمار نمونه های گیاهی با محلول هایی به غلظت 10 mg/L از MG و واجد pH های مختلف به مدت 7 روز، معلوم گردید که با افزایش pH محلول درصد حذف رنگ نیز افزایش می یابد (نمودار 1-ج). طوریکه درصد حذف رنگ از محلولی با pH=8 نسبت به محلولی با pH=5 حدود 19 درصد بیشتر است. همچنین مطابق نمودار 1-د با افزایش دما تا 25 °C، درصد حذف رنگ افزایش قابل ملاحظه ای نشان داد.

بنابراین در جمع بندی یافته های فوق، معلوم گردید که با افزایش پارامترهای نظیر وزن توده گیاهی مورد استفاده، pH محلول و دما تا 25 °C، درصد حذف ماده رنگزا و کارایی رنگزدایی افزایش می یابد. همچنین با افزایش غلظت اولیه ملاکیت سبز میزان ماده رنگزای حذف شده از محیط افزایش نشان می دهد.

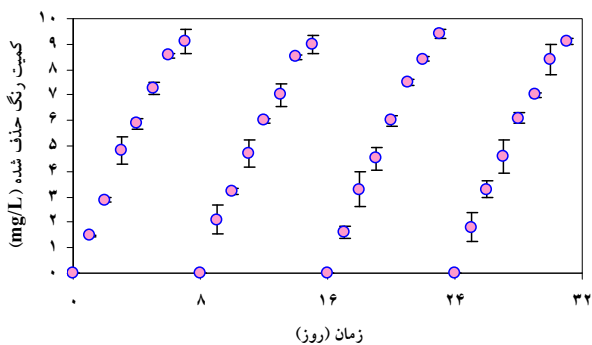
نمودار 1-الف با افزایش وزن نمونه های گیاهی مورد آزمایش درصد حذف ماده رنگزا و بنابراین کارایی فرایند رنگزدایی افزایش نشان می دهد. به طوری که به عنوان مثال میزان رنگزدایی محلولی به غلظت 10 mg/L با کاربرد 8 g از نمونه های گیاهی و پس از گذشت 7 روز از زمان آزمایش 98 درصد تعیین گردید. همچنین نتایج مربوط به بررسی تاثیر غلظت اولیه ماده رنگزا در راندمان حذف رنگ نشان دادند که با افزایش غلظت اولیه MG در محلول، میزان کارایی رنگزدایی کاهش نشان می دهد (نمودار 1-ب). برای مثال درصد حذف ماده رنگزا از محلول هایی با غلظت اولیه 5 mg/L و 20 mg/L از MG پس از 7 روز تیمار گیاه مورد مطالعه، به ترتیب 94/8 و 85/6 درصد تعیین گردید (نمودار 1-ب). این درحالی است که میزان ماده رنگزای حذف شده در واحد زمان با افزایش غلظت اولیه MG افزایش می یابد (جدول 2). به طوری که مثلاً پس از 5 روز تیمار گیاه علف چشمه با غلظت 5 mg/L و 20 mg/L از MG، میزان ماده رنگزای حذف شده توسط گیاه به ترتیب 3/9 mg/L و 13/16 mg/L است (جدول 2).



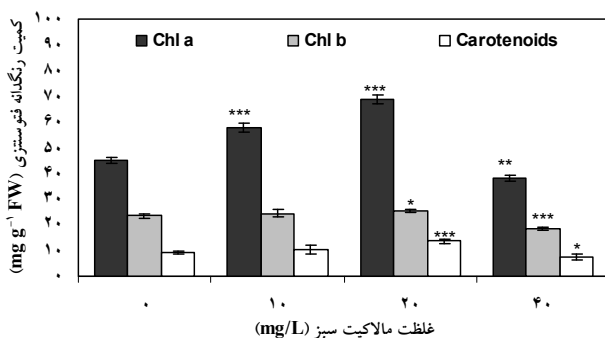
نمودار 1- اثر پارامتر الف) وزن گیاه (شرایط آزمایش: دما=25 °C، pH=7، غلظت MG = 10 mg/L)، ب) غلظت اولیه ماده رنگزا (شرایط آزمایش: دما=25 °C، pH=7، وزن گیاه=4 g)، ج) pH (شرایط آزمایش: دما=25 °C، وزن گیاه=4 g)، د) دما (شرایط آزمایش: pH=7، وزن گیاه=4 g، غلظت MG=10 mg/L) در کارایی رنگزدایی MG توسط علف چشمه (نقاط نماینده میانگین 4 تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف معیار است)

جدول ۲- مقدار ماده رنگزای حذف شده (بر حسب mg/L) از محلول هایی با غلظت اولیه ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ mg در طول ۷ روز از زمان آزمایش (نمونه گیری برای سنجش میزان جذب و نیز محاسبه مقدار ماده رنگزای حذف شده در هر ۲۴ h انجام گرفته است).

روز انجام آزمایش	غلظت اولیه ماده رنگزا			
	۴۰ mg/L	۲۰ mg/L	۱۰ mg/L	۵ mg/L
۱	۳/۵۳	۲/۴۳	۱/۴۶	۰/۹۵
۲	۶/۰۴	۴/۳۴	۲/۸۸	۱/۸۸
۳	۱۲/۶۸	۷/۵۴	۴/۸۳	۲/۴۵
۴	۱۵/۷۳	۹/۵۰	۵/۸۸	۳/۱۴
۵	۲۱/۲۷	۱۳/۱۶	۷/۲۶	۳/۹۵
۶	۲۵/۹۴	۱۵/۶۸	۸/۵۶	۴/۴۵
۷	۲۸/۶۷	۱۷/۱۳	۹/۱۰	۴/۷۴



نمودار ۲- توانایی علف چشمه در حذف مداوم MG در طول ۴ هفته متوالی (۳۲ روز) (نقاط نماینده میانگین ۴ تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف معیار است، شرایط آزمایش: دما=۲۵ °C، وزن گیاه= ۴ g، غلظت MG=۱۰ mg/L، pH=۷)



نمودار ۳- اثر غلظت های مختلف ماده رنگزا MG در مقدار رنگدانه های فتوسنتزی برگ های علف چشمه (ستون ها نماینده میانگین ۴ تکرار و بارهای عمودی نشانگر انحراف معیار بوده (SD) و میزان معنی داری تغییرات در گروه تجربی در مقایسه با شاهد براساس آزمون ANOVA است. \* تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.05$ ، \*\* تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.01$ ، \*\*\* تفاوت معنی دار در سطح  $P < 0.001$ .

صنایع نساجی و رنگرزی به عنوان مهم ترین صنایع تولید کننده پساب های آلوده به مواد رنگزا به طور مداوم این پساب ها را به محیط وارد می سازند. بنابراین در این بخش مطالعه اثرات افزایش مداوم ماده رنگزا در کارایی حذف علف چشمه مد نظر قرار گرفت و مطابق یافته حاصل از نمودار ۲، این گیاه توانایی قابل قبولی در حذف MG به صورت مکرر دارد که تایید کننده رخداد فرایند تجزیه زیستی و توانایی بالای آن در انجام این فرایند است. به طوری که در طی ۴ هفته متوالی استفاده از توده گیاهی واحد، برای حذف غلظت مشخصی از MG، گیاه توانایی بالایی را در حذف این ماده در پایان هر هفته نشان داد و توانست حتی در پایان هفته چهارم کارایی مشابه را در میزان ماده رنگزای حذف شده نسبت به هفته اول نشان دهد (نمودار ۲). اگر استراتژی گیاه در امر پالایش فرایندی غیر از تجزیه زیستی (مانند جذب سطحی) بود، مقدار ماده رنگزای حذف شده در پایان ۴ هفته متوالی نسبت به هفته اول به شدت دچار کاهش شده و میزان ماده رنگزای حذف شده در پایان هر هفته متوالی نسبت هفته قبل کاهش قابل ملاحظه ای نشان می داد.

### ب) آزمایشات فیزیولوژیک

تاثیر ماده رنگزای MG در مقدار رنگدانه های فتوسنتزی تاثیر غلظت های مختلف ماده رنگزای مورد مطالعه در کمیت رنگدانه های فتوسنتزی پس از ۷ روز تیمار با مالاکیت سبزی در نمودار ۳ نشان داده شده است. مطابق نمودار ۳، کمیت

شاهد افزایش می‌دهند. این افزایش در میزان فعالیت همانند الگوی فعالیت آنزیم SOD، در ریشه به شدت قابل توجه است. در نقطه مقابل تیمار غلظت 40 mg/L از MG پس از 7 روز باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم POD ریشه می‌گردد ( $P < 0.001$ ). ولی فعالیت این آنزیم در برگ‌های نمونه‌های گیاهی تحت تیمار با 40 mg/L از MG، تغییر معنی‌داری نشان نداد.

همچنین مطابق جدول 3 تیمار 20 mg/L از MG باعث القا معنی‌دار فعالیت آنزیم CAT در ریشه و برگ گیاه مورد مطالعه گردید. این در حالی است که تیمار غلظت پایین MG تغییر معنی‌داری را در فعالیت آنزیم CAT در دو بخش ریشه و برگ گیاه نسبت به نمونه شاهد اعمال نکرد.

### ج) آنالیز ترکیبات حاصل از تجزیه زیستی

گیاهان توانایی جذب آلاینده‌ها را از محیط دارا هستند و این مواد بسته به ساختار و ویژگی‌های خود می‌توانند توسط آنزیم‌های گیاهی به متابولیت‌های حدواسط فعال‌تر و نهایتاً به دی‌اکسید کربن و آب تبدیل شوند یا در قسمت‌های مختلف سلول کدبندی شوند (37). جدول 4 نشان‌دهنده متابولیت‌های حدواسط شناسایی شده در مسیر تجزیه زیستی MG توسط آنزیم‌های گیاهی است. براساس محصولات تولیدی مندرج در جدول 4، به نظر می‌رسد که شکست پیوند C-C و جدا شدن گروه دی‌متیل فنیل آمین از ساختار MG از مراحل اولیه تجزیه MG توسط گیاه باشد. در ادامه احتمالاً با جدایش گروه‌های بنزآلدهید و متیل ترکیب شماره 2 حاصل می‌شود و در ادامه این فرایند شکست پیوند N-C و نیز تشکیل چند پیوند C-C باعث ایجاد سایر ترکیبات مندرج در جدول 4 می‌گردد.

رنگدانه *Chl a* با افزایش غلظت ماده رنگزا تا 20 mg/L، افزایش معنی‌داری نشان داد. به طوری که تیمار دو غلظت 10 و 20 mg/L از این ماده رنگزا، کمیت رنگدانه *Chl a* را به ترتیب به میزان 27/3 و 52/2 درصد افزایش داد. همچنین تیمار غلظت 20 mg/L از این ماده رنگزا باعث افزایش معنی‌دار *Chl b* و کاروتنوئیدها به ترتیب به میزان 7/7 و 51/9 درصد نسبت به نمونه کنترل گردید. در نقطه مقابل تیمار غلظت بالای این ماده رنگزا (40 mg/L) باعث کاهش معنی‌دار تمام رنگدانه‌های فتوسنتزی مورد مطالعه شد (نمودار 3).

### بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت در گیاه تیمار شده با غلظت‌های مختلف MG

جدول 3 نشان دهنده تاثیر تیمار غلظت‌های متفاوت ملاکیت سبز در میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان SOD، POD و CAT پس از 7 روز تیمار در مقایسه با نمونه شاهد است. مطابق نتایج حاصله تیمار دو غلظت بالای MG (20 mg/L و 40 mg/L)، باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD، هم در ریشه و هم در برگ‌های گیاه نسبت به نمونه شاهد می‌شود. افزایش میزان این فعالیت در ریشه گیاه به شدت قابل توجه بوده به طوری که تیمار دو غلظت مذکور فعالیت آنزیم SOD را در ریشه به ترتیب به میزان 2/2 و 2/7 برابر القا نمود (جدول 3). تیمار غلظت‌های پایین از این ماده رنگزا تغییر معنی‌داری را در فعالیت SOD در دو بخش ریشه و برگ اعمال نکرد ( $P > 0.05$ ).

در مورد آنزیم POD مشخص شد که تیمار غلظت‌های 10 mg/L و 20 mg/L از MG فعالیت آنزیم POD گیاه علف چشمه را هم در ریشه و هم در برگ گیاه نسبت به نمونه

جدول 3- اثر غلظت‌های مختلف MG روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ و ریشه علف چشمه (مقادیر نماینده میانگین 4 تکرار  $\pm$  انحراف معیار بوده (SD) و میزان معنی‌داری تغییرات در هر ستون در مقایسه با شاهد و براساس آزمون ANOVA است، \* تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.05$ ، \*\* تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.01$ ، \*\*\* تفاوت معنی‌دار در سطح  $P < 0.001$ ).

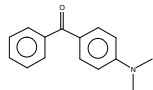
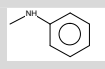

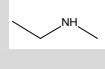

غلظت MG (mg/L)	فعالیت SOD (Unit/ mg protein)		فعالیت POD $\times 10^{-3}$ (Unit/ mg protein)		فعالیت CAT (Unit/ mg protein)	
	برگ	ریشه	برگ	ریشه	برگ	ریشه
0 (شاهد)	41/55 $\pm$ 3	23/38 $\pm$ 5/1	15/10 $\pm$ 2/5	33/09 $\pm$ 1/0	0/36 $\pm$ 0/07	0/59 $\pm$ 0/03
10	39/32 $\pm$ 2/6	45/77 $\pm$ 3/4	17/39 $\pm$ 1/9	46/35 $\pm$ 2/0***	0/29 $\pm$ 0/02	0/61 $\pm$ 0/01
20	48/17 $\pm$ 1/1*	97/56 $\pm$ 6/6***	27/68 $\pm$ 3/9**	87/15 $\pm$ 2/04***	0/95 $\pm$ 0/23**	2/73 $\pm$ 0/22***
40	51/08 $\pm$ 1/7**	117/6 $\pm$ 5/0***	13/81 $\pm$ 1/9	24/22 $\pm$ 0/95***	0/37 $\pm$ 0/07	0/43 $\pm$ 0/02



الکتروستاتیک مساعدتر است. همچنین احتمالا در pH های پایین به دلیل افزایش رقابت بین یونهای  $H^+$  و ماده رنگزای کاتیونی مورد مطالعه، میزان جذب این ماده رنگزا کاهش می یابد (۴۰). تاثیر القاکننده افزایش pH در کارایی رنگزدایی MG کاملا با نتایج مطالعات قبلی در مورد مواد رنگزای کاتیونی مطابقت دارد. به عنوان مثال در بررسی انجام گرفته بر روی گیاه *Hydrocotyle vulgaris* در حذف ماده رنگزای کاتیونی قرمز بازی ۴۶ مشخص شد که با افزایش pH محلول، کارایی حذف به طور قابل توجهی افزایش می یابد (۴۱). همانطور که اشاره گردید افزایش دما تا  $25^{\circ}C$  از جمله فاکتورهای مثبت تاثیرگذار در کارایی گیاه پالایی MG است. دمای بهینه برای اغلب فرایندهای بیوشیمیایی  $30^{\circ}C - 25^{\circ}C$  است. در دماهای پایین حرکت و جذب آب کم شده و به دنبال کاهش نفوذ پذیری غشاها در ریشه، جذب مولکولهای حلال در آب کاهش می یابد، بنابراین کارایی فرایند جذب کم می گردد (۴۲). برخلاف نتایج حاصل در مورد نقش فاکتورهای pH، دما و وزن توده گیاهی، کارایی فرایند رنگزدایی MG با افزایش غلظت ماده رنگزا کاهش نشان داد. این در حالی است که بر طبق محاسبات انجام گرفته، میزان ماده رنگزا حذف شده از محلول (mg/L) با افزایش غلظت اولیه آن افزایش یافت. این نتایج احتمالا بیانگر ارتباط پیچیده بین توانایی گیاه در تجزیه و میزان غلظت رنگ است. همچنین با توجه به منابع، با افزایش غلظت ماده رنگزا احتمال برخورد بین رنگ و سطح گیاه افزایش یافته و تعداد مولکولهای قابل دسترس ماده رنگزا نسبت به جایگاههای پیوندی بالا می رود و به این ترتیب میزان ماده رنگزای حذف شده از محیط بالا می رود (۴۳).

در مورد تاثیر تیمار غلظت های مختلف مالاکیت سبزر بر میزان رنگدانه های فتوسنتزی گیاه مورد مطالعه، مطابق یافته ها و نتایج، افزایش غلظت ماده رنگزا تا  $20 \text{ mg/L}$  منجر به افزایش معنی دار کمیت رنگدانه های فتوسنتزی گردید. احتمالا گیاه با افزایش کمیت رنگدانه های خود سعی در سازگاری و تحمل شرایط موجود دارد. ولی در ادامه با تیمار  $40 \text{ mg/L}$  از ماده رنگزا کمیت رنگدانه ها دچار کاهش معنی دار می گردد. احتمالا غلظت های بالای ماده رنگزا مورد مطالعه منجر به آسیب دستگاه فتوسنتزی و القا اثرات منفی شدید در میزان

جدول ۴ - ترکیبات حدواسط شناسایی شده در مسیر تجزیه MG توسط علف چشمه

ردیف	زمان بازداری (min)	ساختار	فراگمنت اصلی
۱	۱۹/۶		۱۰۵، ۷۷، ۵۱، ۴۲ ۲۲۵، ۱۴۸
۲	۱۳/۰۲		۱۰۷، ۷۹، ۷۷، ۵۱ ۱۰۶
۳	۷/۳۷		۱۰۵، ۹۱، ۷۷، ۳۹ ۱۳۴، ۱۱۹
۴	۴/۱۳		۵۸، ۴۳، ۴۱، ۲۸ ۵۹
۵	۳/۰۲		۵۶، ۴۴، ۴۲، ۳۰ ۵۹، ۵۸

## بحث

از آنجایی که اکوسیستم های مختلف محیط های دینامیک متاثر از فاکتورهای غیر زیستی مختلف از جمله pH، دما هستند، بهینه سازی و مطالعه اثر این فاکتورها می تواند در بهبود و افزایش کارایی فرایندهای پالایی زیستی کمک کننده باشد. نتایج ارائه شده در بخش یافته های مربوط به آزمایشات رنگزدایی نشان دادند که درصد حذف ماده رنگزا و بنابراین کارایی رنگزدایی MG با افزایش وزن نمونه های گیاهی، pH و دمای آزمایش افزایش می یابد. یکی از دلایل قابل بررسی در مورد نقش مثبت وزن نمونه های گیاهی در افزایش کارایی رنگزدایی، احتمالا فراهمی سطوح بیشتری برای جذب MG در وزن های بالای گیاه است. این افزایش در کارایی فرایند گیاه پالایی ماده رنگزا به دنبال افزایش وزن نمونه های گیاهی در مطالعات مشابه انجام گرفته بر روی گیاه پالایی مواد رنگزای مختلف تایید گردیده است (۳۸، ۳۹). همچنین در رابطه با نقش افزایش pH محلول در افزایش درصد حذف ماده رنگزا می توان عنوان کرد که گروه های کربوکسیلیک دیواره سلول های گیاهی در pH های بالاتر واجد بار منفی بوده و در این حالت شرایط برای جذب MG با بار مثبت از طریق نیروی جاذبه

رنگدانه‌های فتوستتزی و بنابراین نرخ فتوستتزی می‌گردد (۳۹). در بررسی‌های مربوط به گذشته نیز کاهش معنی‌دار در کمیت رنگدانه‌های فتوستتزی در گونه‌های گیاهی به دنبال تیمار با غلظت‌های بالای از مواد رنگزای مختلف گزارش گردیده است. به طوری که به عنوان مثال تیمار مواد رنگزای قرمز بازی ۴۶، آبی اسیدی ۹۲ و نیز مالاکیت سبز در غلظت‌های بالا منجر به کاهش معنی‌دار کمیت رنگدانه‌های فتوستتزی به ترتیب در گیاهان *Hydrocotyl vulgaris*، *Azolla filiculoides* و *Spirodela polyrhiza* گردیده است (۲۱، ۳۸، ۳۹).

همانطور که در بخش یافته‌ها اشاره گردید گیاه علف چشمه توانایی خود را در حذف MG در طی ۴ هفته متوالی تیمار با این ماده حفظ می‌کند. این نتیجه تاییدکننده انجام فرایند تجزیه زیستی MG از طریق دخالت آنزیم‌های علف چشمه است. طبق منابع، تجزیه زیستی آلاینده‌ها توسط گیاهان به وسیله فرایندهای زیستی کاتالیز شده توسط آنزیم‌های گیاهی به انجام می‌رسد (۴۴). آنزیم‌ها می‌توانند از طریق ترسیب آلاینده‌ها و یا تبدیل آنها به انواع تولیدات جدید، سمیت آنها را کاهش داده و یا منجر به حذف این آلاینده‌ها گردند (۴۵). حضور آلاینده‌هایی نظیر انواع علف‌کش‌ها، مواد ارگانیکی و فلزات سنگین در محیط، منجر به ایجاد شرایط استرسی برای گیاه و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاه می‌گردد (۴۶). بنابراین در چنین شرایطی حضور و فعالیت سیستمی در جهت سمیت‌زدایی ROS و نیز در جهت حذف و تجزیه آلاینده‌ها در گیاه ضروری است و القا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند به عنوان پاسخی نسبت به افزایش غلظت ROS سلولی و یا حتی به عنوان نشانه‌ای از درگیری این آنزیم‌ها در فرایند تجزیه آلاینده و یا اعمال تغییرات اولیه در ساختار آن تلقی گردند. همانطور که در بخش یافته اشاره شد، غلظت‌های بالای MG باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD، POD و CAT هم در ریشه و هم در برگ‌های گیاه نسبت به نمونه شاهد گردید. احتمالاً ماده رنگزای مورد مطالعه در غلظت‌های بالا با اعمال شرایط استرسی باعث القا تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن و افزایش شدید فعالیت این آنزیم‌ها مخصوصاً در ریشه گیاه می‌گردد. همچنین نقش و درگیری آنزیم‌های مذکور در متابولیسم و تجزیه مواد رنگزا در جریان

فرایندهای گیاه پالایی، توسط مطالعات انجام گرفته در گذشته، به اثبات رسیده است (۴۵، ۴۷-۴۹). به عنوان مثال، مطابق نتایج مطالعات گذشته فعالیت آنزیم‌های SOD، POD و CAT در جریان گیاه پالایی ماده رنگزای قرمز بازی ۴۶ توسط علف چشمه به ترتیب به میزان ۲/۹، ۳/۸ و ۸ برابر نسبت به گیاه کنترل افزایش نشان داده است (۳۱) و یا در بررسی دیگری در جریان گیاه پالایی از ماده رنگزای آبی اسیدی ۹۲ با غلظت ۲۰ mg/L توسط گیاه عدسک آبی میزان فعالیت آنزیم‌های SOD و POD به ترتیب به میزان ۲/۳ و ۱/۷ برابر نسبت به کنترل افزایش یافته است (۵۰). همچنین انواعی از اکسیدوردوکتازها از جمله POD به عنوان آنزیم‌های مهم درگیر در تجزیه مواد رنگزا و اکسید کننده قوی بازه وسیعی از مواد آلی و غیر آلی معرفی گردیده‌اند (۴، ۵۱). القا شدید فعالیت آنزیم‌های مذکور در ریشه گیاه علف چشمه به ویژه در غلظت‌های بالای MG نشان می‌دهد که شاید این آنزیم‌ها در ریشه نقش مهم‌تری را در تحمل شرایط استرسی ناشی از حضور ماده رنگزا عهده‌دار است. همچنین احتمالاً اندام ریشه گیاه به عنوان اولین بخش گیاهی متاثر از حضور آلاینده، نقش مهم‌تری را در سمیت‌زدایی رادیکال‌های آزاد تولید شده ایفا می‌کند.

در این کار پژوهشی تنها به برخی پارامترهای فیزیولوژیکی در شرایط حضور آلاینده در محیط پرداخته شده است. احتمالاً توجه به برخی از فاکتورها از جمله فاکتور رشد گیاه و سطوح رادیکال‌های آزاد تولید شده در جریان تیمار گیاه با مالاکیت سبز می‌تواند به نتیجه‌گیری کامل‌تری در توانایی گیاه پالایی مالاکیت سبز توسط علف چشمه و سطوح سمیت ایجاد شده در گیاه در جریان تیمار آلاینده منجر گردد. همچنین پرداختن به نقش علف چشمه در تصفیه پساب‌های حقیقی آلوده به مالاکیت سبز که در جریان فرایندهای مختلف در کارخانجات رنگرزی به محیط زیست رها می‌گردند، می‌تواند به نقش موثر این گیاه در فرایند گیاه پالایی صحه گذارد.

### نتیجه‌گیری

صنعت رنگرزی و نساجی یکی از صنایع مهم تولیدکننده پساب‌های آلوده حاوی مواد رنگزا است و روش تصفیه زیستی

رنگدانه‌های فتوستتزی و بنابراین نرخ فتوستتزی می‌گردد (۳۹). در بررسی‌های مربوط به گذشته نیز کاهش معنی‌دار در کمیت رنگدانه‌های فتوستتزی در گونه‌های گیاهی به دنبال تیمار با غلظت‌های بالای از مواد رنگزای مختلف گزارش گردیده است. به طوری که به عنوان مثال تیمار مواد رنگزای قرمز بازی ۴۶، آبی اسیدی ۹۲ و نیز مالاکیت سبز در غلظت‌های بالا منجر به کاهش معنی‌دار کمیت رنگدانه‌های فتوستتزی به ترتیب در گیاهان *Hydrocotyl vulgaris*، *Azolla filiculoides* و *Spirodela polyrhiza* گردیده است (۲۱، ۳۸، ۳۹).

همانطور که در بخش یافته‌ها اشاره گردید گیاه علف چشمه توانایی خود را در حذف MG در طی ۴ هفته متوالی تیمار با این ماده حفظ می‌کند. این نتیجه تاییدکننده انجام فرایند تجزیه زیستی MG از طریق دخالت آنزیم‌های علف چشمه است. طبق منابع، تجزیه زیستی آلاینده‌ها توسط گیاهان به وسیله فرایندهای زیستی کاتالیز شده توسط آنزیم‌های گیاهی به انجام می‌رسد (۴۴). آنزیم‌ها می‌توانند از طریق ترسیب آلاینده‌ها و یا تبدیل آنها به انواع تولیدات جدید، سمیت آنها را کاهش داده و یا منجر به حذف این آلاینده‌ها گردند (۴۵). حضور آلاینده‌هایی نظیر انواع علف‌کش‌ها، مواد ارگانیکی و فلزات سنگین در محیط، منجر به ایجاد شرایط استرسی برای گیاه و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در گیاه می‌گردد (۴۶). بنابراین در چنین شرایطی حضور و فعالیت سیستمی در جهت سمیت‌زدایی ROS و نیز در جهت حذف و تجزیه آلاینده‌ها در گیاه ضروری است و القا فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌تواند به عنوان پاسخی نسبت به افزایش غلظت ROS سلولی و یا حتی به عنوان نشانه‌ای از درگیری این آنزیم‌ها در فرایند تجزیه آلاینده و یا اعمال تغییرات اولیه در ساختار آن تلقی گردند. همانطور که در بخش یافته اشاره شد، غلظت‌های بالای MG باعث افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم SOD، POD و CAT هم در ریشه و هم در برگ‌های گیاه نسبت به نمونه شاهد گردید. احتمالاً ماده رنگزای مورد مطالعه در غلظت‌های بالا با اعمال شرایط استرسی باعث القا تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن و افزایش شدید فعالیت این آنزیم‌ها مخصوصاً در ریشه گیاه می‌گردد. همچنین نقش و درگیری آنزیم‌های مذکور در متابولیسم و تجزیه مواد رنگزا در جریان

فعالیت آنزیم SOD، POD و CAT هم در ریشه و هم در برگ‌های گیاه نسبت به نمونه شاهد می‌شود. این نتایج حاکی از نقش مهم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مذکور در سازگاری و تحمل گیاه به شرایط استرسی موجود و نیز درگیری احتمالی آنها در فرایند متابولیسم و تجزیه زیستی مالاکیت سبز در پیکر گیاه است.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش از حمایت‌های مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه برخوردار بوده است. لذا، شایسته است نهایت تشکر و قدردانی از مسئولین آن معاونت و به ویژه از همکاری‌های صمیمانه پژوهشکده زیست فناوری و گروه نانو فناوری دانشکده علوم دانشگاه ارومیه به عمل آید.

### منابع

1. Forgacs E, Cserháti T, Oros G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*. 2004;30(7):953-71.
2. Pilon-Smits E. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 2005;56:15-39.
3. Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 2001;77(3):247-55.
4. Ali H. Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2010;213(1-4):251-73.
5. Ioannou LA, Puma GL, Fatta-Kassinos D. Treatment of winery wastewater by physicochemical, biological and advanced processes: A review. *Journal of Hazardous Materials*. 2015;286:343-68.
6. Prasse C, Stalter D, Schulte-Oehlmann U, Oehlmann J, Ternes TA. Spoilt for choice: A critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. *Water Research*. 2015;87:237-70.
7. Manshouri M, Yazdanbakhsh A, Sardar M, Sheykh Mohammadi A. Survey of ability of activated sludge isolated bacteria in removal of RB-B dyestuff from aqueous medium. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2011;3(4):389-98 (in Persian).
8. Jadhav J, Phugare S, Dhanve R, Jadhav S. Rapid biodegradation and decolorization of Direct Orange 39 (Orange TGLL) by an isolated bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain BCH. *Biodegradation*. 2010;21(3):453-63.
9. Liao L, Chen S, Peng H, Yin H, Ye J, Liu Z, et al. Biosorption and biodegradation of pyrene by *Brevibacillus brevis* and cellular responses to pyrene treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;115:166-73.
10. Verma A, Raghukumar C, Verma P, Shouche YS, Naik CG. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. *Biodegradation*. 2010;21(2):217-33.
11. Singh RL, Singh PK, Singh RP. Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2015;104:21-31.
12. Khataee AR, Dehghan G, Ebadi A, Zarei M, Pourhassan M. Biological treatment of a dye solution by Macroalgae *Chara* sp.: Effect of operational parameters, intermediates identification and artificial neural network modeling. *Bioresource Technology*. 2010;101(7):2252-58.
13. Salima A, Benaouda B, Noureddine B, Duclaux L. Application of *Ulva lactuca* and *Systocera stricta* algae-based activated carbons to hazardous cationic dyes removal from industrial effluents. *Water Re-*

- search. 2013;47(10):3375-88.
14. Angelova R, Baldikova E, Pospiskova K, Madero-va Z, Safarikova M, Safarik I. Magnetically modified *Sargassum horneri* biomass as an adsorbent for organic dye removal. *Journal of Cleaner Production*. 2016;137:189-94.
  15. Tahir U, Yasmin A, Khan UH. Phytoremediation: Potential flora for synthetic dyestuff metabolism. *Journal of King Saud University - Science*. 2016;28(2):119-30.
  16. Khandare RV, Govindwar SP. Phytoremediation of textile dyes and effluents: Current scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*. 2015;33(8):1697-714.
  17. Szczygłowska M, Piekarska A, Konieczka P, Namieśnik J. Use of Brassica Plants in the Phytoremediation and Biofumigation Processes. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12(11):7760-71.
  18. Nikolić M, Stevović S. Family Asteraceae as a sustainable planning tool in phytoremediation and its relevance in urban areas. *Urban Forestry & Urban Greening*. 2015;14(4):782-89.
  19. Khandare RV, Kabra AN, Kurade MB, Govindwar SP. Phytoremediation potential of *Portulaca grandiflora* Hook. (Moss-Rose) in degrading a sulfonated diazo reactive dye Navy Blue HE2R (Reactive Blue 172). *Bioresource Technology*. 2011;102(12):6774-77.
  20. Alavi Bakhtiarvand SN, Ahmadimoghadam M, Parseh I, Jafarzadeh N, Chehrazi M, Chorom M. Assessment of Phytoremediation Efficiency on reducing oilhydrocarbons from clay-silt soil using *Aeluropus littoralis*. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2014;7(1):73-84 (in Persian).
  21. Torbati S. 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*. 2016;99:11-19.
  22. Dosnon Olette R, Couderchet M, Oturan MA, Oturan N, Eullaffroy P. Potential use of *Lemna minor* for the phytoremediation of isoproturon and glyphosate. *International Journal of Phytoremediation*. 2011;13(6):601-12.
  23. Padmavathiamma P, Li L. Phytoremediation technology: Hyper-accumulation metals in plants. *Water, Air, and Soil Pollution*. 2007;184(1-4):105-26.
  24. Du LN, Wang S, Li G, Wang B, Jia XM, Zhao YH, et al. Biodegradation of malachite green by *Pseudomonas* sp. strain DY1 under aerobic condition: Characteristics, degradation products, enzyme analysis and phytotoxicity. *Ecotoxicology*. 2011;20(2):438-46.
  25. Srivastava S, Sinha R, Roy D. Toxicological effects of malachite green. *Aquatic Toxicology*. 2004;66(3):319-29.
  26. Duman F, Ozturk F. Nickel accumulation and its effect on biomass, protein content and antioxidative enzymes in roots and leaves of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.). *Journal of Environmental Sciences*. 2010;22(4):526-32.
  27. Keser G, Saygideger S. Effects of lead on the activities of antioxidant enzymes in watercress, *Nasturtium officinale* R. Br. *Biological Trace Element Research*. 2010;137(2):235-43.
  28. Kara Y. Bioaccumulation of Cu, Zn and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2005;2:63-68.
  29. Aslan M, Ünlü MY, Türkmen N, Yılmaz YZ. Sorption of cadmium and effects on growth, protein content, and photosynthetic pigment composition of *Nasturtium officinale* R. Br. and *Mentha aquatica* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003;71(2):0323-29.
  30. Torbati S, Movafeghi A, Khataee AR. Biodegradation of C.I. Acid blue 92 by *Nasturtium officinale*: Study of some physiological responses and metabolic fate of dye. *International Journal of Phytoremediation*. 2015;17(4):322-29.
  31. Torbati S, Khataee AR, Movafeghi A. 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*. 2014;92(10):1934-41.
  32. Teisseire H, Guy V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). *Plant Science*. 2000;153(1):65-72.
  33. Geoffroy L, Frankart C, Eullaffroy P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. *Environmental Pollution*. 2004;131(2):233-41.
  34. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids:

- Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Lester Packer RD, editor. *Methods in Enzymology*. London: Academic Press; 1987. p. 350-82.
35. Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. In: Colwick SP, Kalplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1955. p. 764-75.
  36. Obinger C, Maj M, Nicholls P, Loewen P. Activity, peroxide compound formation, and heme d synthesis in *Escherichia coli* HPII catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997;342(1):58-67.
  37. Paterson S, Mackay D, Tam D, Shiu WY. Uptake of organic chemicals by plants: A review of processes, correlations and models. *Chemosphere*. 1990;21(3):297-331.
  38. Vafaei F, Movafeghi A, Khataee A. 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*. 2013;25(11):2214-22.
  39. Vafaei F, Khataee AR, Movafeghi A, Salehi Lisar SY, Zarei M. Bioremoval of an azo dye by *Azolla filiculoides*: Study of growth, photosynthetic pigments and antioxidant enzymes status. *International Biodegradation & Biodegradation*. 2012;75(0):194-200.
  40. Porkodi K, Vasanth Kumar K. Equilibrium, kinetics and mechanism modeling and simulation of basic and acid dyes sorption onto jute fiber carbon: Eosin yellow, malachite green and crystal violet single component systems. *Journal of Hazardous Materials*. 2007;143(1-2):311-27.
  41. Vafaei F, Movafeghi A, Khataee AR, Zarei M, Salehi Lisar SY. Potential of *Hydrocotyle vulgaris* for phytoremediation of a textile dye: Inducing antioxidant response in roots and leaves. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2013;93:128-34.
  42. Penner D. Effect of Temperature on Phytotoxicity and Root Uptake of Several Herbicides. *Weed Science*. 1971;19(5):571-76.
  43. Aravindhana R, Rao JR, Nair BU. Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*. *Journal of Hazardous Materials*. 2007;142(1-2):68-76.
  44. Aubert S, Schwitzguébel JP. Screening of plant species for the phytotreatment of wastewater containing sulphonated anthraquinones. *Water Research*. 2004;38(16):3569-75.
  45. Husain Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2010;9(2):117-40.
  46. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*. 2006;141(2):312-22.
  47. Carias CC, Novais JM, Martins-Dias S. Are *Phragmites australis* enzymes involved in the degradation of the textile azo dye acid orange 7? *Bioresource Technology*. 2008;99(2):243-51.
  48. Davies LC, Cabrita GJM, Ferreira RA, Carias CC, Novais JM, Martins-Dias S. Integrated study of the role of *Phragmites australis* in azo-dye treatment in a constructed wetland: From pilot to molecular scale. *Ecological Engineering*. 2009;35(6):961-70.
  49. Mohan SV, Prasad KK, Rao NC, Sarma PN. Acid azo dye degradation by free and immobilized horseradish peroxidase (HRP) catalyzed process. *Chemosphere*. 2005;58(8):1097-105.
  50. Khataee AR, Movafeghi A, Torbati S, Salehi Lisar SY, Zarei M. Phytoremediation potential of duckweed (*Lemna minor* L.) in degradation of C.I. Acid Blue 92: Artificial neural network modeling. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2012;80:291-98.
  51. Jamal F, Pandey PK, Qidwai T. Potential of peroxidase enzyme from *Trichosanthes dioica* to mediate disperse dye decolorization in conjunction with redox mediators. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2010;66(1-2):177-81.



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

Original Article



## Feasibility Study on Phytoremediation of Malachite Green Dye from Contaminated Aqueous Solutions Using Watercress (*Nasturtium Officinale*)

S Torbati\*

Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

### ARTICLE INFORMATIONS:

**Received:** 17 October 2016

**Revised:** 2 January 2017

**Accepted:** 7 January 2017

**Published:** 6 March 2017

**Key words:** Malachite green, Watercress, Decolorization, Biodegradation, Antioxidant enzymes

### \*Corresponding Author:

samaneh.torbati@yahoo.com;

s.torbati@urmia.ac.ir

### ABSTRACT

**Background and Objective:** Malachite green dye is used in many industries including textile industries. Disposal of wastewaters containing the dye to the environment, can lead to many environmental problems. Currently, many physico-chemical approaches are used for wastewater treatment. Because of limitations and difficulties of these methods, biological treatment is considered as an economic and effective treatment method. The aim of the present study was to study the feasibility of phytoremediation of malachite green dye using watercress and investigate the effect of some environmental factors in removal efficiency.

**Materials and Methods:** After collection, the plants were kept in the laboratory, and they were treated with different concentrations of malachite green. During the experiments, decolorization extent was determined by UV-Vis spectrophotometry. Intermediate compounds generated during the biodegradation of the pollutant were identified using GC-MS method.

**Results:** After 7 days, the ability of watercress in removal and biodegradation of 10 mg/L of malachite green solution was more than 90%. Five intermediate compounds were identified in the biodegradation pathway of the pollutant. It was also found that increasing dye concentration up to 20 mg/L led to the increase of the plant photosynthetic pigment contents and activities of antioxidant enzymes.

**Conclusion:** Our results showed that watercress has high ability in the dye removal of malachite green. The reusability of the plant for decolorization confirmed the biological degradation process. Moreover, an increase in the plant biomass, temperature and pH led to the increased decolorization efficiency.