

ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم

Evaluation Ability of Some Crop Species for Remediation of Heavy Metal Cadmium (Cd) In Contaminated Soils

افشین مظفری^۱، داود حبیبی^۲، عباس ملکی^۱، فرزاد بابایی^۱

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی چند گونه زراعی در کاهش آلودگی فلز سنگین کادمیوم در خاکهای آلوده، در شرایط گلخانه‌ای در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج در سال ۸۹-۱۳۸۸ به اجرا در آمد. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار اجرا شد. فاکتورهای آزمایش شامل میزان کادمیوم خاک در سه سطح (صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در کیلو گرم) و گونه‌های زراعی در سه سطح (یونجه یکساله (*Medicago rigidula*)، ماشک گل خوشه‌ای (*Vicia villosa*) و کلزا (*Barassica napus*)) بود. نتایج آزمایش نشان داد میزان کادمیوم خاک بر روی کلیه صفات مورد مطالعه اثر معنی داری داشته است. در حالیکه گونه‌های زراعی فقط روی میزان کادمیوم در اندام‌های هوایی، بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید و کلروفیل a تاثیر گذار بوده است. در بین گونه‌های زراعی مختلف، کلزا با ۳۴/۱۹ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک و ماشک با ۱۹/۲۳ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک به ترتیب بالاترین و کمترین میزان غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی را بخود اختصاص دادند. ماشک با ۴/۰۲ میلی گرم در گرم وزن تازه و یونجه با ۳/۷۶ میلی گرم در گرم وزن تازه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلروفیل a را بخود اختصاص دادند. همچنین، کلزا با ۳۷/۱۳ میکرو مول در گرم وزن تازه و یونجه با ۳۳/۷۰ میکرو مول در گرم وزن تازه به ترتیب بیشترین و کمترین میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید را بخود اختصاص دادند. نتایج آزمایش نشان داد دوز ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلو گرم وزن خشک خاک، بیشترین میزان کادمیوم در اندام‌های هوایی و مالون دی آلدهید را به ترتیب با ۵۵/۵۱ میلی گرم در کیلو گرم وزن خشک و ۳۸/۷۲ میکرو مول در گرم وزن تازه بخود اختصاص داد و کمترین این صفات متعلق به تیمار شاهد بود. با افزایش میزان کادمیوم در خاک، میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و محتوی کلروفیل a, b و a+b کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: گیاه پالایی، فلز سنگین، کادمیوم، گونه‌های زراعی، محتوی کلروفیل، سوپر اکسید دیسموتاز و بیومارکر مالون دی آلدهید.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ایلام، گروه زراعت و اصلاح نباتات، ایلام، ایران

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، گروه زراعت، کرج، البرز، ایران

مقدمه

مواد رادیواکتیو در خاک و آب استفاده می‌کند. این گیاهان قادرند فلزات سنگین را از خاک جذب، انتقال و تثبیت کرده و در اندام‌های خود تجزیه کنند (Kling, 1997). در این میان تحقیقات قبلی موید آنست که برخی از گونه‌های زراعی همچون جو، یونجه، خردل، تربچه، آفتابگردان، بادام زمینی، کرچک اصلاح کننده خاکهای آلوده می‌باشند بطوریکه که این گیاهان در برابر فلزات سنگین از تحمل بالایی برخوردار بوده و تحت شرایط تنش‌های غیر زنده فلزات سنگین می‌توانند بیوماس مناسبی تولید کنند و همچنین توانایی بالایی برای جذب فلزات سنگین از خاک را دارا می‌باشند. پاکسازی گیاهی در مقایسه با سایر روشهای اصلاح خاک از هزینه بسیار پایین‌تری برخوردار می‌باشد و خطرات آلوده شدن آبهای زیرزمینی برای این روش مطرح نمی‌باشد و همچنین روشی پایدار و منطبق با محیط زیست می‌باشد. لذا شناخت و گزینش گونه‌های زراعی با توانایی پاکسازی مستلزم بررسی پاسخ‌های این گیاهان در برابر تنش غیر زنده فلزات سنگین می‌باشد و مطالعه ترکیبی از صفات کل گیاهی و سلولی تحت این شرایط می‌تواند ما را در دستیابی به این مهم یاری نماید و همچنین زمینه را برای تحقیقات بعدی مهندسی ژنتیک به منظور اصلاح گیاهان متحمل در برابر فلزات سنگین مساعد نماید.

در ارتباط با گیاه پالایی آزمایش‌های زیادی در مقیاس گلخانه‌ای و مزرعه‌ای در کشور آمریکا و کشورهای اروپایی صورت گرفته است (Baker و همکاران، ۱۹۹۴). محل‌های آلوده شده به فلزات سنگین اغلب توسط گونه‌های گیاهی خاصی حمایت می‌شوند که برخی از این گیاهان مقادیر بالایی از این فلزات را در بافت‌های خود تجمع می‌دهند (Baker و Hegde، 1989، Brooks، 1989 و Fletcher، 1996). در حال حاضر بطور تقریبی ۴۰۰ گونه گیاهی بیش انباشتگر (Hyperaccumulator) شناسایی شده است که بخش عمده‌ای از این گونه‌ها در نواحی آلوده شده اروپا، ایالات متحده آمریکا، نیوزلند و استرالیا یافت می‌شوند (Kramer، 1997). نمونه‌هایی از گیاهان بیش انباشتگر در

تنش‌های محیطی از قبیل (خاک، آب و فلزات سنگین) یکی از موانع اصلی در تولید محصولات زراعی و باغی در بسیاری از نقاط دنیا به ویژه مناطق خشک و نیمه خشک مانند ایران محسوب می‌شوند. نظر به صنعتی شدن جوامع در دهه‌های اخیر و تولید مقادیر قابل توجهی پسابهای صنعتی توسط کارخانجات و رها سازی آنها در اکوسیستم‌های طبیعی و روان آبها و از سوی دیگر افزایش استفاده از سوخت‌های فسیلی و احتمال بازگشت ترکیبات احتراق یافته به محیط، استفاده از آفت کشها در مزارع، خطر وقوع تنش غیر زنده تجمع فلزات سنگین در خاک را افزایش می‌دهد، از سوی دیگر مشکلات عدیده کم آبی در برخی از نقاط و از جمله آبهای با کیفیت پایین کشاورزان را بر آن داشته تا از تمامی منابع آبی استفاده نمایند، مشروط بر آنکه گیاهان کشت شده در برابر عناصر سنگین موجود در آب آبیاری متحمل باشند و همچنین بتوانند از تجمع این عناصر در خاک ممانعت بعمل آورند. عناصر سنگین عناصری هستند که وزن اتمی آنها بین ۶۳/۵۴۶ تا ۲۰۰/۵۹۰ باشد و جرم مخصوص آنها بزرگتر از ۵ گرم بر سانتیمتر مکعب باشد (Benton Jones، 1997 و Pais). به این ترتیب عناصری از قبیل روی، کروم، کادمیوم، سرب، نیکل و نقره جزء فلزات سنگین محسوب می‌شوند. عناصر سنگین اغلب به فرم اکسید، هیدرواکسید، سیلیکات و سولفات و یا بصورت جذب شده بر روی رس، سیلیکات و ماده آلی یافت می‌شوند.

خاک‌های آلوده به فلزات سنگین می‌توانند به روشهای شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی پالایش شوند (McEldowney و همکاران، ۱۹۹۳). یکی از روشهایی که در سالهای اخیر مورد توجه قرار گرفته است روش گیاه پالایی (Phytoremediation) است. گیاه پالایی یک تکنولوژی با هزینه کم و ساده که از گیاهانی نظیر گیاهان علوفه‌ای، گونه‌های چوبی و بوته‌ها به منظور خروج، نگهداری و بی اثر کردن آلاینده‌های زیست محیطی نظیر فلزات سنگین، عناصر کمیاب، ترکیبات آلی نفتی و

ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم

آنها (Schutzendubel و Polle، 2002). واکنش‌های خود اکسیداسیون (Autoxidation) و فنتون (Fenton) ممکن است باعث تضعیف سیستم دفاع آنزیمی شود. بعنوان مثال فعالیت آنزیم کاتالاز بطور مستقیم توسط رادیکال سوپر اکسید O_2^- متوقف می‌شود (Kono و Fridovich, 1982). رادیکال‌های هیدروکسیل HO^\cdot باعث توقف فعالیت آنزیم Zn-Cu-سوپراکسید دیسموتاز می‌شوند (Casano و همکاران، ۱۹۹۷). بر اساس خصوصیات فیزیکی و شیمیایی سه مکانیزم مولکولی مختلف برای سمیت فلزات سنگین را می‌توان بیان کرد: الف) تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) توسط واکنش‌های خود اکسیداسیون و فنتون ب) بلوکه کردن گروه‌های کارکرد ضروری بیومولکول‌ها (ج) جایگزینی یون‌های فلزات ضروری در بیومولکول‌ها کادمیوم و دیگر فلزات سنگین باعث تخلیه GSH (گلوکوتایون سولفور دار) و جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانته بویژه گلوکوتایون ریدکتاز (GR) می‌شود (Polle, 2002 و Schutzendubel). ۵۳ عنصر از ۹۰ عنصر طبیعی جزو فلزات سنگین محسوب می‌شوند، اما تمامی آنها اهمیت بیولوژیکی ندارند. بر اساس حلالیت این فلزات در محیط فیزیکی، ۱۷ عنصر سنگین ممکن است در دسترس سلول‌های زنده بوده و برای موجودات زنده و اکوسیستم‌ها اهمیت داشته باشند (Weast, 1984). از میان این فلزات آهن (Fe)، مولیبدن (Mo)، منگنز (Mn) بعنوان ریزمغذی مهم هستند. روی (Zn)، نیکل (Ni)، مس (Cu)، و نادیوم (V)، کبالت (W)، Co و کروم (Cr) فلزات سمی هستند با اهمیت بالا و پایین بعنوان Trace elements. آرسنیت (As)، جیوه (Hg)، نقره (Ag، Sb)، کادمیوم (Cd)، سرب (Pb) و اورانیوم (U) هیچ نوع نقشی از نظر غذایی نداشته و به نظر برای گیاهان و میکرو ارگانیسم‌ها از سمیت بالا یا پایینی برخوردار است. غلظت کادمیوم در خاک‌های غیر آلوده ۱/۵-۱ میلی گرم در کیلوگرم است، اما در خاک‌های آلوده انگلیس بیش از ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم می‌باشد (Polle و Schutzendubel 2002).

گزارشات Chaudhry و همکاران (۱۹۹۸) و Bonaventura و Johnson (۱۹۹۷) فهرست شده است. گیاه پالایی یک داروی کلی برای درمان خاک‌های آلوده شده به فلزات سنگین نیست (Khan و همکاران، ۲۰۰۰). برای طراحی پروژه گیاه پالایی فاکتورهایی مانند مناسب بودن شرایط رشدی گیاه و امکان استفاده از گیاهان بومی اهمیت زیادی دارد.

مالون دی آلدئید (MDA) یک محصول سمی سلولی (Cytotoxic product) ناشی از پروکسیداسیون چربی‌ها (Lipid peroxidation) و نشان دهنده میزان تولید رادیکال‌های آزاد و بافت‌های تخریب شده است (Ohkawa و همکاران، ۱۹۷۹). میزان بیومارکر مالون دی آلدئید (MDA) در بافت گیاهی معیاری برای تعیین وضعیت پرو اکسیداسیون چربی‌ها است. پرو اکسیداسیون چربی‌ها در ارتباط با تولید سوپر اکسید (O_2^-) می‌باشد. وجود مقادیر بالای فلزات سنگین نظیر مس (Cu) و آهن (Fe) در گیاه باعث افزایش تولید سوپر اکسید O_2^- می‌شود. بنا براین، افزایش میزان بیومارکر مالون دی آلدئید (MDA) نشان دهنده آن است که یون‌های فلزی توانسته‌اند باعث تحریک ظرفیت تولید رادیکال‌های آزاد در گیاهان عالی بشوند (Luna و همکاران، ۱۹۹۴).

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) یک آنزیم فلز دار (Metalloenzyme) است که آنیون‌های سوپر اکسید (O_2^-) موجود در اکسیژن و پرواکسید هیدروژن (H_2O_2) را کاتالیز می‌کند. آنزیم‌هایی نظیر آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) سیستم دفاعی برای بقای موجودات زنده هوازی را مهیا می‌سازد (Beyer و همکاران، ۱۹۹۱). شواهد زیادی وجود دارد که بیان می‌کند گیاهان در معرض غلظت‌های بالای فلزات سنگین نظیر آهن و مس باعث آسیب‌های اکسیداتیو در گیاه می‌شود (Yamamoto و همکاران، ۱۹۹۷). توانایی گیاهان در افزایش حفاظت آنتی اکسیدانته در برابر تنش فلزات سنگین محدود می‌باشد تعداد، زیادی از مطالعات نشان داده که غلظت‌های بالای فلزات سنگین بیشتر باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانته می‌شود تا افزایش فعالیت

مورد مطالعه را از الک ۲ میلیمتری عبور داده و ۳ گونه گیاه زراعی در شرایط گلخانه‌ای در گلدانها کشت شدند و خاک گلدانها بطور مساوی و حداقل به مقدار ۵ کیلوگرم در نظر گرفته شد. بر اساس وضعیت حاصلخیزی خاک ازت، فسفر و پتاسیم مورد نیاز گیاهان زراعی قبل از کشت و در طول دوره رشد به آنها داده شد. در زمان کاشت ۵ بذر با قوه نامیه بالا با فواصل یکنواخت در هر گلدان کشت و گلدانها در همان روز آبیاری شدند. آبیاری‌های بعدی در زمان مورد نیاز با آبیاری انجام گردید. بسته به دوز فلز سنگین کادمیوم در خاک بعد از سبز شدن گیاهان در گلدانها، آلوده‌سازی خاک گلدانها به فلز سنگین کادمیوم صورت گرفت. یک ماه پس از رویش گیاهان، اندامهای هوایی از سطح خاک کف بر شده و بمنظور بررسی میزان برداشت عنصر سنگین کادمیوم، میزان کلروفیل a و b، میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) به آزمایشگاه تحویل داده شد. از خاک هر یک از گلدانها نیز نمونه تهیه و میزان باقیمانده فلز سنگین کادمیوم در آنها بوسیله روشهای آزمایشگاهی متداول تعیین شد.

جهت اندازه‌گیری فلز سنگین کادمیوم در اندامهای هوایی، کل گیاه پس از برداشت از سطح خاک بصورت کامل توسط آب دیونیزه شده شستشو شده و در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. جهت هضم پس از آسیاب نمودن نمونه‌ها، به یک گرم از آن ۵ میلی‌لیتر اسید دوتایی (پرکلریک اسید $HClO_4$ و اسید نیتریک HNO_3) با نسبت‌های ۲:۳ در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۸ ساعت اضافه شد. سپس با اضافه کردن آب مقطر حجم آن به ۵۰ میلی‌لیتر رسانده و این محلول از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده شد و نهایتاً میزان عنصر کادمیوم نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر جذب اتمی (Atomic absorption spectrophotometer) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. پس از برداشت گیاهان، از خاک نیز نمونه‌برداری بعمل آمده و میزان کادمیوم آنها تعیین گردید. جهت اندازه‌گیری آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)،

در این آزمایش اهداف زیر مورد بررسی قرار گرفت: بررسی توانایی گونه‌های زراعی یونجه یکساله، کلزا و ماشک گل خوشه‌ای در پالایش خاکهای آلوده به فلز سنگین کادمیوم، بررسی تاثیر گونه‌های زراعی مختلف بر میزان جذب عنصر سنگین کادمیوم از خاک، شناسایی و کاشت گیاهان زراعی بیش انباشتگر در اراضی آلوده به فلز سنگین کادمیوم از بین گونه‌های زراعی مختلف، بررسی اثر متقابل خاک و گیاه در برداشت عناصر سنگین خاک، مقایسه غلظت فلزات سنگین در اندامهای هوایی گیاه زراعی یونجه یکساله، کلزا و ماشک گل خوشه‌ای، ارائه راهکار مناسب و با صرفه برای کاهش آلودگی خاک، بررسی تغییرات میزان آنزیم آنتی‌اکسیدانسی سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) در گونه‌های زراعی مختلف و استفاده از آن جهت شناسایی گونه یا گونه‌های زراعی مقاوم به تنش فلز سنگین کادمیوم، بررسی تغییرات میزان کلروفیل a، b و a+b ارتباط آن با تنش فلزات سنگین.

مواد و روش‌ها

این آزمایش به منظور ارزیابی چند گونه زراعی در کاهش آلودگی فلز سنگین کادمیوم در خاکهای آلوده بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۳ تکرار و در شرایط گلخانه‌ای اجرا گردید. فاکتورهای آزمایشی شامل فلز سنگین کادمیوم بصورت خالص (از منبع کلرید کادمیوم) در سه سطح صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم در کیلو گرم وزن خشک خاک و سه گونه گیاه زراعی شامل یونجه یکساله (*Medicago rigidula*)، کلزا (*Barassica napus*) رقم Okapi و ماشک (*Vicia villosa*) بودند. آزمایش بصورت گلخانه‌ای در گلدانهای پلاستیکی با ارتفاع ۱۵ و قطر ۲۰ سانتی‌متر که حاوی ۵ کیلو خاک خشک لومی رسی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی کرج انجام گردید. میزان غلظت اولیه فلز کادمیوم Cd خاک گلدانها توسط آزمایشگاه تعیین گردید، پس از آن خاک‌های

ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم

پس از نمونه گیری از گلدان‌ها دو برگ با آب مقطر شستشو داده شده و بلافاصله در بافر فسفات - تریس ۰/۱۶ مولار با pH=۷/۵ خرد و هموژن گردید. آنگاه حجم مشابه از همان بافر دیجیتونین و آنزیم هضم کننده دیواره دیواره گردیده و اجاز داده شد تا فرآیند هضم غشا و دیواره سلول انجام گیرد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش Lowry (۱۹۵۱) برداشته شد و مقدار پروتئین آب بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. سپس در باقیمانده محلول استخراجی مقدار آنزیم سوپراکسید دیسموتاز اندازه گیری شد. بدین منظور از روش Misra (۱۹۷۹) استفاده خواهد شد. محلول زمینه بافر تریس / Tris (base) حاوی فسفات دی سدیک با pH = ۷/۲ به همراه ۱/۳ میلی مول EDTA به همراه ۰/۱ مول کربنات منو سدیک تهیه و از اپی نفرین با غلظت ۰/۲۵ میلی مول بعنوان سوبسترا استفاده شد و سپس مجموعه عصاره به آنها اضافه و تغییرات جذب نوری حاصل از اکسیداسیون اپی نفرین اندازه گیری و بعنوان فعالیت آنزیمی ارزیابی شد. از آنزیم استاندارد و خالص برای استاندارد شدن نتایج استفاده شد که واحد آن قادر به اکسیداسیون ۰/۵ میلی مول اپی نفرین در یک دقیقه بود.

جهت اندازه گیری مالون دی آلدئید (MDA)، دو برگ از گیاه جدا و با آب مقطر شستشو داده شد و بلافاصله در بافر فسفات تریس ۰/۱۶ مولار با pH=۷/۵ وارد، خرد و هموژن گردید. آنگاه اجازه داده شد تا حجم مشابه از همان بافر حاوی دیجیتونین و آنزیم هضم کننده دیواره فرآیند هضم غشا و دیواره سلول را انجام دهد. در پایان مقدار ۰/۵ میلی لیتر از محلول هموژن برای سنجش پروتئین توسط روش Steven (۱۹۸۷) برداشته شد و مقدار پروتئین آن بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر تعیین گردید. پس از آن در باقیمانده محلول استخراجی مقدار مالون دی آلدئید و دی تیروزین بر اساس روش Steven (۱۹۸۷) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش میزان فعالیت بر اساس واکنش به مایع کروماتوگرافی ارزیابی شد. بافر زمینه برای کار حاوی تریس اسید کلریدریک با

pH=۷/۲ ۰/۲ میلی مول بر لیتر سدیم دی سدیک و ۰/۲ میلی مول بر لیتر آسکوربات می باشد. یک واحد فعالیت مالون دی آلدئید معادل مقدار آنزیمی که بتواند یک میکرومول از سوبسترا را در یک دقیقه کاتالیز کند، در نظر گرفته شد. جهت اندازه گیری محتوی کلروفیل (a) و (b) از روش Arnon (۱۹۴۹) و دستگاه اسپکترو فوتومتر ماورای بنفش استفاده شد. بدین منظور ابتدا ۰/۵ گرم برگ از هر گلدان انتخاب و درون یک هاون چینی ریخته و به آن یک گرمسولفات منیزیم و ۱۰ میلی لیتر استون ۱۰۰ درصد اضافه کرده و آنقدر در هاون ساییده شد تا خمیری شل حاصل گردید. هاون مربوطه رادر داخل ظرف آب و یخ قرار داده و آزمایشگاه حتی الامکان تاریک شد تا فعل و انفعالات شیمیایی به حداقل برسد. سپس خمیر شل حاصله را برداشته و در داخل سانتریفیوژ با ۲۵۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد، سپس مقدار ۱ میلی لیتر از این عصاره هموژن (سوپرناتانت) را با ۹ میلی لیتر استن داخل سل‌های دستگاه اسپکترو فوتومتر ریخته و در طول موجهای ۶۴۷ نانومتری برای کلروفیل (a) و ۶۶۳ نانومتر برای کلروفیل (b) میزان جذب نور قرائت شد و از فرمولهای زیر کلروفیل (a) و (b) بدست آمد، (دستگاه قبل از آزمایش با استون خالص کالیبره گردید):

$$Chl.a(mg l^{-1}) = (12.25 \times A663 - 2.79 \times A647) \times D$$

$$Chl.b(mg l^{-1}) = (21.5 \times A647 - 5.1 \times A663) \times D$$

$$D = \text{ضخامت سل‌های دستگاه اسپکترو فوتومتر}$$

نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس، اختلاف بسیار معنی داری بین گونه‌های زراعی و دوز کادمیوم در خاک از نظر میزان غلظت فلز سنگین کادمیوم در اندام‌های هوایی مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین گونه‌های زراعی از نظر میزان غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی، گونه زراعی

می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۴/۲۲، ۳/۸۸ و ۳/۶۷ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل b بخود اختصاص دادند (نمودار ۵).

در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل a+b مشاهده نشد (جدول ۱). اما نتایج مقایسه میانگین‌ها بر اساس روش دانکن (جدول ۲) نشان داد که ماشک با ۷/۹۸ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه گیاه و یونجه با ۷/۷۲ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه گیاه به ترتیب بالاترین و کمترین میزان کلروفیل a+b را بخود اختصاص دادند (نمودار ۶). با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان کلروفیل a+b مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۸/۳۷، ۷/۵۵ و ۳/۶۷ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل a+b بخود اختصاص دادند (نمودار ۷).

اغلب محققین اشاره دارند به اینکه کاهش میزان کلروفیل گیاهان در معرض تنش فلز سنگین کادمیوم، بخاطر عدم سنتز کلروفیل است. این موضوع در ارتباط با گیاه گندم به اثبات رسیده است (Malik و همکاران، ۱۹۹۲). علت این امر این است که کادمیوم با فلز آهن در رقابت بوده باعث می‌شود ریشه بجای آهن فلز کادمیوم را جذب کند و نهایتاً کادمیوم جای فلز منیزیم (Mg) را در مولکول کلروفیل اشغال کند و باعث عدم سنتز کلروفیل شود (Küpper و همکاران، ۱۹۹۸). با توجه به نتایج واریانس (جدول ۳) در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) دیده نشد. اما در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان

کلزا با ۳۴/۱۹ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک گیاه و ماشک با ۱۹/۲۳ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک گیاه به ترتیب بیشترین و کمترین مقدار تجمع کادمیوم در اندام‌های هوایی را بخود اختصاص دادند (نمودار ۱).

با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک از نظر میزان غلظت کادمیوم در اندام‌های هوایی، دوز ۸۰، ۴۰ و صفر میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۵۲/۵۱، ۳۱/۶۳ و ۰/۰۳ میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک گیاه رتبه‌های اول تا سوم را بخود اختصاص دادند (نمودار ۲). در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل a مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین گونه‌های زراعی، ماشک با ۴/۰۲، کلزا با ۳/۹۸ و یونجه با ۳/۷۶ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه گیاه به ترتیب رتبه اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل a بخود اختصاص دادند (نمودار ۳).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان کلروفیل a مشاهده شد (جدول ۱). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۴/۲۲، ۳/۸۸ و ۳/۶۷ میلی گرم در کیلوگرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان کلروفیل a بخود اختصاص دادند (نمودار ۴). این نتیجه مطابق بود با نتایج Abdel-Aal و Maysa (۲۰۰۸).

با توجه به نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱)، در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان کلروفیل b مشاهده شد، اما در بین گونه‌های زراعی اختلاف معنی داری از نظر میزان کلروفیل b دیده نشد. با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۲)،

ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم

جهت مقابله با تنش فلز سنگین، باشد. در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) مشاهده شد (جدول ۳). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۴)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز ۸۰، ۴۰ و صفر میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۳۸/۷۲، ۳۷/۴۴ و ۲۸/۹۷ میکرومول/گرم وزن تازه گیاه رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) بخود اختصاص دادند (نمودار ۱۰). این مطابق بود با نتایج Abdel-Aal و Maysa (۲۰۰۸). کادمیوم باعث تولید رادیکال هیدروکسیل (OH⁻) شده و بدنال آن پراکسیداسیون چربی که اولین علامت تنش اکسیداتیو است رخ می‌دهد بنابراین با افزایش پرواکسیداسیون چربی غشای سلول تخریب شده و نشت غشاء اتفاق می‌افتد، و میزان مالون دی آلدئید بالا می‌رود (Abdel-Aal و Maysa، ۲۰۰۸).

آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) مشاهده شد (جدول ۳). با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۳)، می‌توان اظهار داشت که در بین دوزهای مصرفی کادمیوم در خاک، دوز صفر، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم کادمیوم در کیلوگرم وزن خشک خاک به ترتیب با ۷۹/۹۳، ۶۶/۷۶ و ۶۵/۱۱ واحد/میلی گرم پروتئین رتبه‌های اول تا سوم را از نظر میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) بخود اختصاص دادند (نمودار ۸). این مطابق بود با نتایج Abdel-Aal و Maysa (۲۰۰۸). با توجه به نتایج واریانس (جدول ۳) در بین گونه‌های زراعی اختلاف بسیار معنی داری از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) مشاهده شد. با توجه به جدول مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن (جدول ۴)، می‌توان اظهار داشت که در بین گونه‌های زراعی، کلزا با ۳۷/۱۳، ماشک با ۳۴/۳۰ و یونجه با ۳۳/۷۰ میکرو مول در گرم وزن تازه گیاه به ترتیب رتبه اول تا سوم را از نظر میزان بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) بخود اختصاص دادند (نمودار ۹). این امر می‌تواند به واسطه تفاوت ژنتیکی گونه‌های زراعی

جدول ۱- میانگین مربعات و سطوح معنی دار بودن میزان کادمیوم (Cd)، کلروفیل a، b و a+b در بخش اندام‌های هوایی تحت تاثیر کادمیوم.
Table 1. Mean Squares and Significant Levels for Cd, Chlorophyll a, b and a+b content into Shoot Parts Influence of Cd.

Mean Squares		میانگین مربعات			
کلروفیل a+b Chlorophyll a+b	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل a Chlorophyll a	کادمیوم (Cd)	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (S.O.V)
0.02 ^{ns}	0.004 ^{ns}	0.03 ^{ns}	7.12 ^{ns}	2	تکرار Replication
0.18 ^{ns}	3.333 ^{ns}	0.17 [*]	552.45 ^{**}	2	گونه زراعی (C)
1.69 ^{**}	0.262 ^{**}	0.69 ^{**}	6284.64 ^{**}	2	دوز کادمیوم (Cd)
0.08 ^{ns}	0.004 ^{ns}	0.11 ^{ns}	254.84 ^{**}	4	اثر متقابل (C × D)
0.06	0.006	0.04	9.73	16	اشتباه آزمایشی (Error)
3.11	1.96	5.1	11.12		ضریب تغییرات (CV)

ns، * و **: به ترتیب عدم تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح ۵٪، ۱٪

* ns, and **: Non significant, Significant at the 5% and 1% Levels of Probability Respectively.

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان کادمیوم (Cd)، کلروفیل a, b و a+b سطوح مختلف گونه‌های زراعی و دوزهای فلز سنگین کادمیوم.
Table 2. Mean Comparison of Cd, Chlorophyll a, b and a+b Content in Different Levels of Crop Species and Cd Doses.

کلروفیل a+b Chlorophyll a+b (mg/g.Fw)	کلروفیل b Chlorophyll b (mg/g.Fw)	کلروفیل a Chlorophyll a (mg/g.Fw)	میزان کادمیوم Cd Content (mg/kg.dw)	تیمارهای آزمایشی (Exp. Treatments)
گونه زراعی (Crop Specie)				
7.98 ^a	3.96 ^a	4.02 ^a	19.23 ^{c*}	C ₁ ماشک (Hairy vetch)
7.72 ^b	3.96 ^a	3.76 ^b	30.75 ^b	C ₂ یونجه (Alfalfa)
7.94 ^{ab}	3.96 ^a	3.98 ^a	34.19 ^a	C ₃ کلزا (Canola)
دوز کادمیوم (Cd Doses)				
8.37 ^a	4.15 ^a	4.22 ^a	0.03 ^c	D ₁ ۰ (mg/kg.dw soil)
7.72 ^b	3.84 ^b	3.88 ^b	31.63 ^b	D ₂ ۴۰ (mg/kg.dw soil)
7.55 ^b	3.88 ^b	3.67 ^c	52.51 ^a	D ₃ ۸۰ (mg/kg.dw soil)

* اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن معنی دار نمی باشد.
* Difference Means followed by Similar Letters in Each Column are not Significant at the 5% Level of Probability, According to Duncan's Multiple Range Test

جدول ۳- میانگین مربعات و سطوح معنی دار بودن آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدئید (MDA) تحت تاثیر فلز سنگین کادمیوم.

Table 3. Mean Squares and Significant Levels for Antioxidant Enzyme Superoxide dismutase (SOD) and Biochemical Bio-marker Malondialdehyde (MDA) Influence of Cd Heavy Metal.

Mean Squares	میانگین مربعات		
مالون دی آلدئید (MDA)	سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)	درجه آزادی (df)	منابع تغییرات (S.O.V)
3.12 ^{ns}	5.24 ^{ns}	2	تکرار
30.26 ^{**}	21.57 ^{ns}	2	گونه زراعی (C)
253.01 ^{**}	594.08 ^{**}	2	دوز کادمیوم (D)
5.72 [*]	55.30 [*]	4	اثر متقابل (C × D)
291.29	18.26	16	اشتباه آزمایشی (Error)
3.24	6.05		ضریب تغییرات (CV)

ns, **, * به ترتیب عدم تفاوت معنی دار، تفاوت معنی دار در سطح ۵٪، ۱٪، * ns, and **: Non significant, Significant at the 5% and 1% Levels of Probability Respectively.

ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم

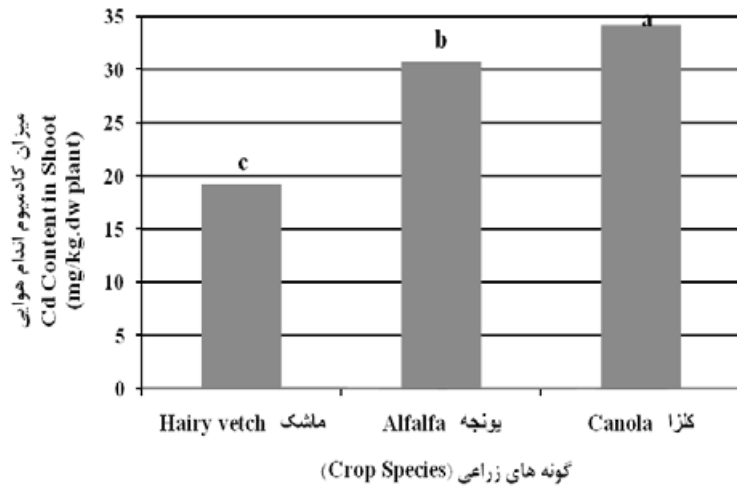
جدول ۴- مقایسه میانگین میزان آنزیم آنتی اکسیدانت سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و بیومارکر بیوشیمیایی مالون دی آلدهید (MDA) سطوح مختلف گونه‌های زراعی و دوزهای فلز سنگین کادمیوم.

Table 4. Mean Comparison of Antioxidant Enzymes superoxide dismutase (SOD) and Biochemical Biomarker Malondialdehyde (MDA) Rate in Different Levels of Crop Species and Cd Heavy Metal Doses.

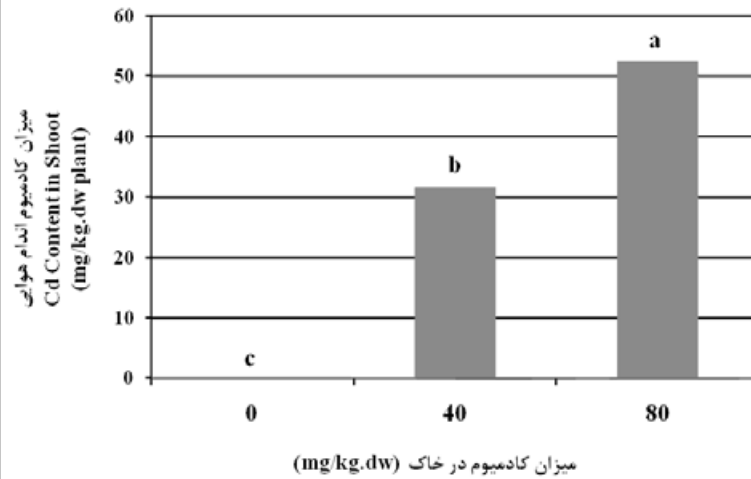
مالون دی آلدهید ($\mu\text{mol/kg.fw}$) (MDA)	سوپر اکسید دیسموتاز (U/mg.protein) (SOD)	تیمارهای آزمایشی (Exp. Treatments)
		گونه زراعی (Crop Specie)
34.30 ^b	70.07 ^{a*}	C ₁ ماشک (Hairy vetch)
33.70 ^b	72.34 ^a	C ₂ یونجه (Alfalfa)
37.13 ^a	69.39 ^a	C ₃ کلزا (Canola)
		دوز کادمیوم (Cd Doses)
28.97 ^c	79.93 ^a	D ₁ ۰ (mg/kg.dw soil)
37.44 ^b	66.74 ^b	D ₂ ۴۰ (mg/kg.dw soil)
38.72 ^a	65.11 ^b	D ₃ ۸۰ (mg/kg.dw soil)

* اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای حروف مشترک هستند از نظر آماری در سطح ۵٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن معنی دار نمی باشد.

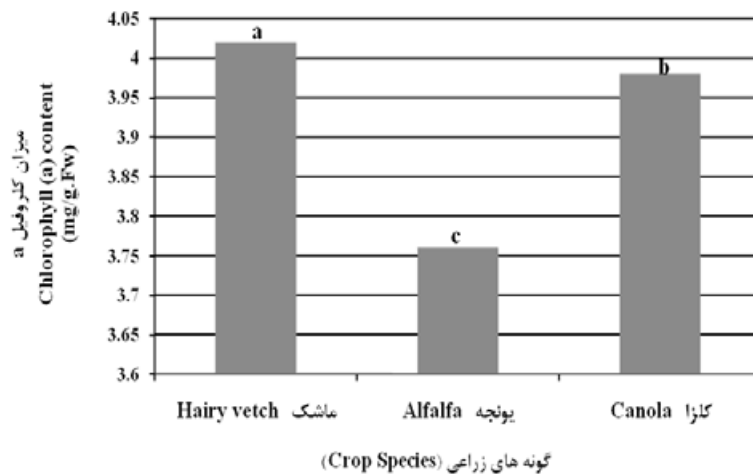
* Difference Means followed by Similar Letters in Each Column are not Significant at the 5% Level of Probability, According to Duncan's Multiple Range Test.



نمودار (۱) تاثیر گونه های زراعی بر روی غلظت کادمیوم در اندام های هوایی
Fig.1. Effect of Crop Species on Cd Concentration into shoot Parts

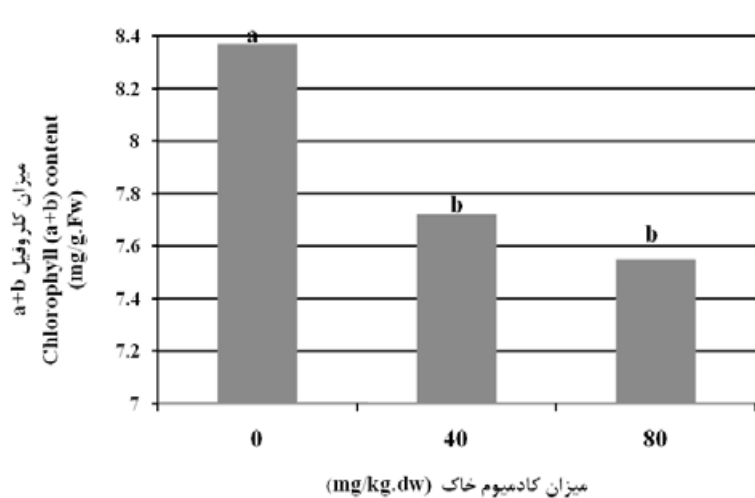


نمودار (۲) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان کادمیوم در اندام های هوایی
Fig.2. Effect of Cd Doses into Soil on Cd Content in Shoot Parts

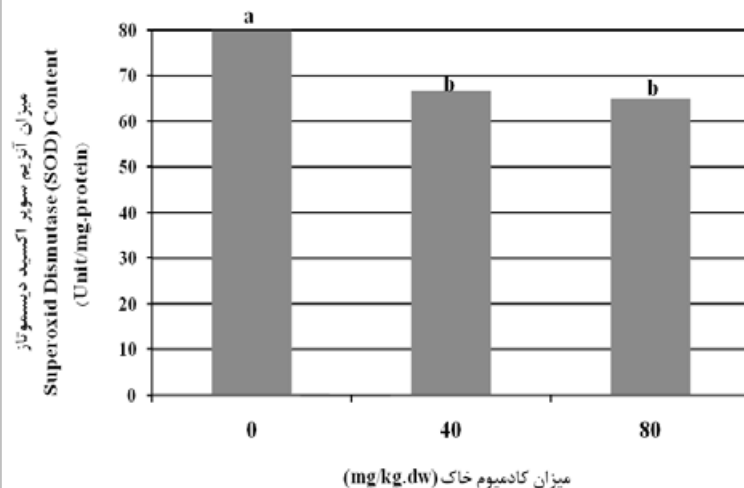


نمودار (۳) میزان کلروفیل a گونه های زراعی تحت تاثیر فلز کادمیوم
Fig.3. Chlorophyll (a) Content of Crop Species affected with Cd Metal

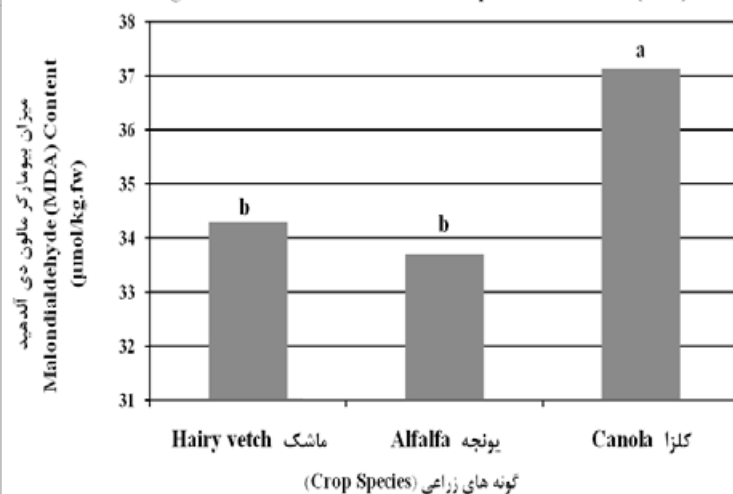
ارزیابی توان چند گونه زراعی در کاهش آلودگی خاک به فلز سنگین کادمیوم



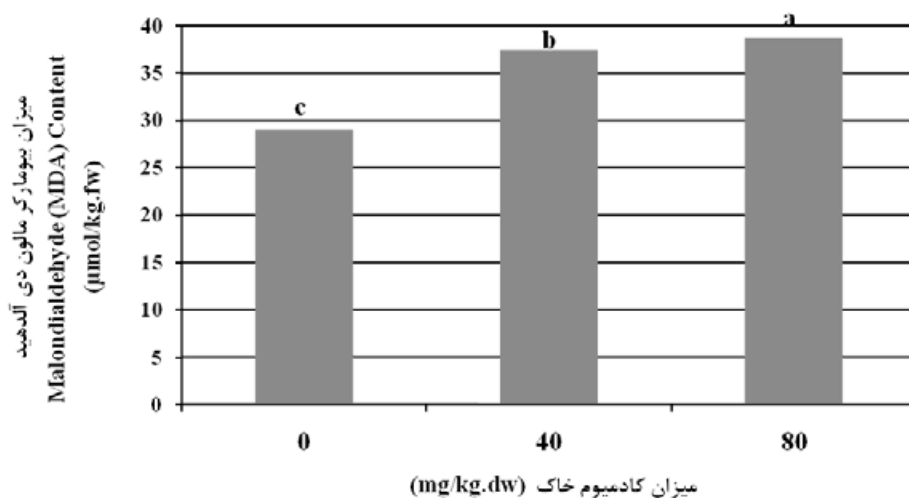
نمودار (۷) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان کلروفیل a+b
 Fig.7. Effect of Cd Doses into Soil on Chlorophyll (a+b) Content



نمودار (۸) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)
 Fig.8. Effect of Cd Doses into Soil on Superoxid Dismutase (SOD) Content



نمودار (۹) میزان مالون دی آلدیهد (MDA) گونه های زراعی تحت تاثیر فلز کادمیوم
 ... Fig.9. Malondialdehyde (MDA) Content of Crop Species affected with Cd



نمودار (۱۰) تاثیر دوز کادمیوم خاک بر روی میزان مالون دی آلدیهد (MDA)
 Fig.10. Effect of Cd Doses into Soil on Malondialdehyde (MDA) Content

اکسید دیسموتاز (Kozłowska, 1997 و Stroinski). نوسان در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی در شرایط تنش فلزات سنگین بستگی به گونه‌های گیاهی (وضعیت فیزیولوژیکی و پتانسیل ژنتیکی گیاه)، زمان اعمال تیمار و میزان غلظت فلز سنگین دارد (Polle, 2002, Tamàs و Schutzendubel و همکاران، ۲۰۰۸).

کادمیوم ابتدا با تخلیه گلوکاتیون در گیاه باعث جلوگیری از فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتهی نظیر کاتالاز (CAT)، آسکوربیت پروکسیداز (APX) و گلوکاتیون پروکسیداز (GR) می‌شود (Polle, 2001). احتمالاً کاهش در میزان فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانتهی سوپر اکسید دیسموتاز در غلظت‌های بالای فلزات سنگین از جمله کادمیوم بر می‌گردد به غیر فعال شدن این آنزیم توسط تولید بیش از حد گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و تجزیه یا تخریب غیر تخصصی آنزیم (Filek و همکاران، ۲۰۰۸) یا پیوند خوردن فلزات سنگین غیر ضروری به جایگاه یا مرکز عمل آنزیم سوپر

Reference

منابع

- Arnon, D.I. 1949.** Copper enzyme in isolated chloroplasts, polyphenol oxidase in betavulgaris. *Plant Physiology*. 24: 1-15.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R. 1989.** Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements. A review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*. 1: 81-126.
- Baker, A.J.M., McGrath, S.P., Sidoli, C.D.M. and Reeves, R.D. 1994.** The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. *Resour. Conserv. Recyc.* 11: 41-49.
- Bonaventure, C. and Johnson, F.M. 1997.** Healthy environments for healthy people. *Bioremediation today and tomorrow. Environ. Health Perspect.* 105: 5-20.
- Bowler, C., Van Montagu, M., Inze, D. 1992.** Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43:83-116.
- Casano, L.M., Gomez, L.D., Lascano, H.R., Gonzales, C.A. and Trippi, V.S. 1997.** Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photo-oxidative stress. *Plant Cell Physiology*. 38: 433-440.
- Chaudhry, T.M., Hayes, W. J., Khan, A.G. and Khoo, C.S. 1998.** Phytoremediation focusing on accumulator plants that remediate metal contaminated soils. *Australasian J. Ecotoxicol.* (in press).
- Filek, M., Keskinen, R., Hartikainen, H., Szarejko, I., Janiak, A., Miszalski, Z. and Golda A. 2008.** The protective role of selenium in rape seedlings subjected to cadmium stress. *Plant Physiol.* 165: 833-844.
- Halliwell, B. and Cutleridge, J.M.C. 1990.** Free radicals and Catalytic metalion. *Method Enzymes*. 189:1-16.
- Hegde, R.S. and Fletcher, J.S. 1996.** Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*. 32: 2471-2479.
- Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M., Khoo, C.S. and Hay, W.J. 2000.** Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy contaminated land remediation. *Chemosphere*. 21:197-207.
- Kling, J. 1997.** Phytoremediation of organics moving rapidly into field trials. *Environ. Sci. Technol.* 31, A129.
- Kono, Y. and Fridovich, I. 1982.** Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biological Chemistry*. 257: 5751-5754.
- Kramer, U., Smith, R.D., Wenzel, W.W., Raskin, I. and Salt, D.E. 1997.** The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thelapsi geosingense* Halacsy. *Plant Physiol.* 115: 1641-1650.
- Küpper, H., Küpper, F. and Spiller, M. 1998.** In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. *Photosynthesis Res.* 58: 123-133.
- Lowry, O.H., N.J., Rosebrough, A.L. Farr and Randall, R.J. 1951.** Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.*:193 265-275.
- Malik, D., Sheoran, I.S. and Singh, R. 1992.** Carbon metabolism in leaves of cadmium treated wheat seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 30: 223-229.

- Maysa, M. Hatata and E. Adel Abdel-Aal. 2008.** Oxidative Stress and Antioxidant Defense Mechanisms in Response to Cadmium Treatments. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 4: 655-669.
- McEldowney, S., Hardman, D.J. and Waite, S. 1993.** Treatment Technologies. In *Pollution Ecology and Bioremediation Technologies* (Edited by S. McEldowney J. Hardman, and S. Waite). Longman Singapore Publishers, Singapore.
- Misra, H.P. and Fridovich, I. 1972** The generation of superoxide radical during auto oxidation. *J. Biol. Chem.* 247: 6960-6966
- Pais, I.J. and Benton Jones, J.R. 1997.** The hand book of trace elements. Publishing by: St. Lucie Press Boca Raton Florida.
- Polle, A. 2001.** Dissection of the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway by metabolic modeling: computer analysis as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 126: 445-462.
- Schutzendubel, A. and Polle, A. 2002.** Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J. Exp. Botany.* 53: 1351-1365.
- Stroinski A. and Kozłowska, M. 1997.** Cadmium induced oxidative stress in potato tuber. *Acta. Soc. Bot. Pol.* 66: 189-195.
- Tamàs, L., Dudíková, J., Ďurčėková, K., Huttová, J., Mistrík, I. and Zelinová, V. 2008.** The impact of heavy metals on the activity of some enzymes along the barley root. *Environ. Exp. Bot.* 62: 86- 91.
- Timothy, P. 2001.** Glutathione-related enzymes and Selenium Status: Implications for Oxidative Stress. *Biochem. Pharm.* 62: 237-281.
- Weast, R.C. 1984.** CRC Handbook of chemistry and physics, 64th edn. Boca Raton, CRC Press.
- Yamamoto, Y. , Hachia, A. and Matsumoto, H. 1997.** Oxidative damage to membranes by a combination of aluminum and iron in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiology.* 38: 1333-1339.