Research Article

Nova Biologica Reperta 10(1): 47-61 (2023)

Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115

https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.10.1.47

مقاله پژوهشی

یافته‌های نوین در علوم زیستی

جلد ۱۰، شماره ۱، صفحات ۴۷ الی ۶۱ (۱۴۰۲)

انتشارات دانشگاه خوارزمی

تاثیر پساب صنعتی بر بعضی از خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیکی نخل‌مرداب (*Cyperus alternifolius*)، وتیور (*Chrysopogon zizanioides*) و آلوئه‌ورا (*Aloe vera*)

ساره ابراهیمی نوکنده[۱]، سید مهدی رضوی[۱] و منصور افشارمحمدیان[۲]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق‌اردبیلی، اردبیل، ایران؛[۲]گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

مسئول مکاتبات: سید مهدی رضوی، razavi694@gmail.com

چکیده. افزایش ورود پساب‌های صنعتی حاوی انواع فلزات سنگین در آب و خاک موجب گسترش روزافزون مشکلات محیط زیستی می‌شود. بنابراین پیدا کردن راه‌کارهایی کم‌هزینه‌تر برای کاهش این آلودگی‌ها ضروری است. در این راستا به منظور مقایسه پالایندگی عناصر سنگین و برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار به‌مدت ۱۴ ماه، در دانشگاه گیلان اجرا شد. نتایج نشان داد که تحت تیمار پساب صنعتی شاخص انباشت فلزات (MAI) روی، کروم، سرب، مس، منگنز، نیکل، منیزیم در وتیور و آلوئه ورا به‌ترتیب بیشتر از نخل مرداب بود. در هر سه گیاه مورد مطالعه شاخص های طول ریشه، طول اندام هوایی، زیست توده کل و شاخص تحمل (TI) نسبت به گیاه شاهد کاهش معنی داری داشتند و گیاه وتیور و آلوئه‌ورا کم‌ترین درصد کاهش را داشتند. علاوه بر این، مولفه‌های دیگر بررسی شده شامل شاخص جذب (UI)، قند محلول کل، محتوی فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل، تانن کل و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH تحت تیمار پساب صنعتی در هر سه گیاه افزایش یافتند. بالاترین درصد افزایش در تمام مولفه های بررسی شده به‌غیر از درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH، در گیاه وتیور مشاهده شد. به‌طورکلی می توان گفت که از نظر MAI و ویژگی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بررسی شده، گیاهان وتیور و آلوئه ورا موفق تر از گیاه نخل‌مرداب بودند. بنابراین توصیه می شود گیاهان مورد مطالعه به ترتیب اولویت (وتیور> آلوئه ورا> نخل‌مرداب) در خاک های آلوده به پساب های صنعتی، جهت پالایش خاک کاشته شوند.

واژه‌های کلیدی. بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH، شاخص انباشت فلزات، فلزات سنگین، فنل، گیاه‌پالایی

The impact of industrial wastewater on some of the morphological and physiologhical characteristics of *Cyperus alternifolius*, *Chrysopogon zizanioide* and *Aloe vera*

Sareh Ebrahimi Nokande[1], Seyed Mehdi Razavi[1] & Mansour Afshar Mohammadian[2]

[1]Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran; [2]Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht. Iran

Correspondent author: Seyed Mehdi Razavi, razavi694@gmail.com

Abstract. The increase of the entry of industrial effluents containing various types of heavy metals into water and soil leads to the ever-increasing spread of environmental problems. Therefore, it is necessary to find less expensive solutions to reduce the pollution. In this regard, in order to compare the effect of the removal of heavy elements on some of the morphological and physiological characteristics of *C. alternifolius*, *Ch. zizanioide*s and *Aloe vera* plants, an experiment was conducted in the form of a randomized complete block design with three replications for 14 months at the University of Guilan. The results showed that under the treatment of industrial wastewater, the metal accumulation indices (MAI) of zinc, chromium, lead, copper, manganese, nickel, magnesium were higher in *Ch. zizanioide*s and *Aloe vera* than those in *C. alternifolius*. In all three studied plants, the indices of root length, shoot length, total biomass and tolerance index (TI) had a significant decrease compared with those in the control plants, and *Ch. zizanioide*s and *A. vera* plants had the lowest percentage of decrease. In addition, other investigated components including absorption index (UI), total soluble sugar,

Received 24.09.2022/ Revised 25.11.2022/ Accepted 04.01.2023/ Published 20.06.2023

دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۰۲/ اصلاح: ۱۴۰۱/۰۹/۴/ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴/ انتشار: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

total phenol content, total flavonoid, total anthocyanin, total tannin, and DPPH free radical inhibition percentage increased in all three plants under industrial wastewater treatment. The highest percentage of increase in all investigated components, except DPPH free radical inhibition percentage, was observed in *Ch. zizanioide*s. In general, it can be said that in terms of MAI and morphological and physiological characteristics, *Ch. zizanioide*s and *A. vera* were more successful than the *C. alternifolius*. Therefore, it is recommended to plant the studied plants in the order of priority (*Ch. zizanioide*s > *A. vera* > *C. alternifolius*) in soils contaminated with industrial effluents, in order to remediate the soil.

Key words. DPPH free radical inhibition, metal accumulation index, heavy metals, phenol, phytoremediation

مقدمه

افزایش آلودگی آب و خاک باعث ایجاد مشکلات مختلف محیط‌زیستی می‌شود و از بین تمام آلاینده‌های محیط زیست، فلزات سنگین به‌عنوان آلاینده‌های مهم در تمام مناطق صنعتی جهان شناخته شده‌اند (Sarma, 2011). پسابی که از سایت‌های خروجی کارخانجات خارج می‌شود، در صورت داشتن فلزات سنگین، باعث آلودگی خاک، آب‌های سطحی و زیرزمینی می‌شود، به‌طوری‌که ورود حجم کمی از پساب به خاک و سفره آب زیرزمینی می‌تواند سطح وسیعی از این منابع را آلوده سازد (Wang et al., 2010).

هنگامی‌که فلزات سنگین بتوانند از خاک، هوا یا آب وارد گیاه شود، سمیت فلزات سنگین در گیاهان نیز اتفاق می‌افتد. البته گیاهان به برخی از فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار پایین (فلزات ضروری) مثل روی (Zn)، مس (Cu)، آهن (Fe)، منگنز (Mn)، منیزیم (Mg) و نیکل (Ni) نیاز دارند، اما زمانی که غلظت این فلزات یا فلزات غیرضروری مانند سرب (Pb)، کروم (Cr)، کادمیم (Cd)، آرسنیک (As)، مولیبدن (Mo)، جیوه (Hg)، نقره (Ag)، و... از حد معینی بالاتر رود، منجر به بروز اختلالات متابولیکی، رشد و نموی در اغلب گونه‌های گیاهی می‌شوند (Kabata-Pendias, 2000). عناصرسنگین به دلیل ثبات شیمیایی، تجزیه پذیری ضعیف و داشتن قدرت تجمع زیستی بالا می‌توانند در سطوح مختلف زنجیره غذایی، باعث ایجاد صدمات و خطرات اکولوژیکی برای موجودات زنده نیز بشوند (Ling et al., 2008; European Commission, 2013).

خاک‌های آلوده به فلزات سنگین را می‌توان با تکنیک‌های مهندسی، شیمیایی، فیزیکی و یا زیستی اصلاح کرد، اما این روش‌ها هزینه‌بر، وقت‌گیر و غالبا مخرب محیط زیست می‌باشند. از این رو، طی سال‌های اخیر، محققین درصدد یافتن روش‌های زیستی برآمدند که بتوانند مکان‌های آلوده به فلزات سنگین را بدون آن‌که بر حاصل‌خیزی و تنوع زیستی خاک اثرات سوئی داشته باشند، پاک‌سازی و تعدیل نمایند (Torresday et al., 2005). استفاده از گیاهان برای ذخیره‌سازی، انتقال و حذف آلاینده‌های محیط‌زیست از جمله فلزات سنگین، آلودگی‌های آلی و ترکیبات شیمیایی سمی، فرآیندی است که گیاه پالایی نامیده می شود. گیاه پالایی به عنوان یک فن‌آوری اصلاح شده مبتنی بر جذب و تصفیه پساب‌ها و فلزات سنگین، از جمله فن‌آوری‌های سبز و دوست‌دار محیط زیست است که از لحاظ اقتصادی مقرون به‌صرفه و از لحاظ انرژی کم‌هزینه می‌باشد و همچنین کم‌خطر بوده و امکان بهره برداری در سطح وسیع را داراست و برای مناطق دارای میزان آلودگی کم تا متوسط بسیار مناسب است. علاوه براین، به دلیل بهره‌گیری از گیاهان، این فن‌آوری از لحاظ زیبایی نیز بسیار جاذب است (Pilon Smits, 2005). روش‌های مختلف فن‌آوری گیاه پالایی شامل: تجزیه ریشه‌ایی، تجزیه گیاهی، استخراج گیاهی، تصفیه ریشه‌ای، تبخیرگیاهی، کنترل هیدرولیکی و تثبیت گیاهی می‌باشند (Yang et al., 2005; Gajic & Pavlovic, 2018).

محققان گزارش کرده‌اند که وجود فلزات سنگین در محیط زیست گیاهان، نوعی عامل تنش‌زا می‌باشد که باعث ایجاد تغییرات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی شده و می‌تواند موجب کاهش توان رشد گیاه و در حالت شدیدتر باعث از بین رفتن گیاه شود (Gajic & Pavlovic 2018). لذا در انتخاب و مقایسه گیاهان جهت پالایش پساب در مناطق مختلف، باید به خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهان نیز علاوه بر مسئله پالایش عناصر سنگین توجه کرد. گزارش‌ها نشان داده‌اند که هنگام انتخاب یک گونه گیاهی برای گیاه پالایی، باید فاکتورهای مختلفی از قبیل سازگاری اکولوژیک با اقلیم مورد نظر، رشد سریع، مورفولوژی مناسب و توانایی تحمل فلزات سنگین در نظر گرفته شود (Sharma & Dubey, 2005). بنابراین مطالعات جهت شناسایی و انتخاب گیاهان مناسب برای گیاه پالایی در هر منطقه جغرافیایی دارای اهمیت خاصی می‌باشد (Rahman et al., 2022). تاکنون تحقیقات زیادی در رابطه با اثر انواع پساب‌ها روی گیاهان و موضوع گیاه‌پالایی انجام شده است (Gajic et al., 2018; Jalali & Hemati Matin, 2019; Kouhi & Moudi 2020; Petoussi and Kalogerakis, 2022; Placido & Lee, 2022). ولی نکته مهم آن است که اطلاعات این تحقیقات برای همه کشورها کاملا مشابه و قابل استفاده نیست و محققان گیاه‌پالایی اعلام نموده اند

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

که در مورد پساب و گیاهان در هر منطقه بخصوص، باید مطالعات دقیق محلی انجام شود (Weinberg et al. 2004).

استان گیلان در شمال ایران دارای آب و هوای نیمه گرمسیری مرطوب و از نظر کشاورزی، استانی حاصل‌خیز است. رشد کارخانجات و صنعت در این استان روز به روز در حال افزایش است و برخی پساب‌های صنعتی جای مناسبی برای تخلیه ندارند. به‌طوری که پساب صنعتی مستقیما به رودخانه و سپس مزارع برنج و مناطق مسکونی سرازیر می‌شود. تجمع این آلودگی‌ها در خاک به ویژه در زمین‌های کشاورزی، امری تدریجی بوده و غلظت عناصر سنگین می‌تواند به سطحی برسد که امنیت غذایی را تهدید کند. در راستای حل این معضل، با توجه به این‌که کاشت گیاهان با قابلیت گیاه پالایی خوب، در نزدیکی محل خروجی پساب، به عنوان کمربند سبز، عملی‌ترین و کم هزینه‌ترین روش به‌سازی است و این روش می‌تواند علاوه بر زیبا سازی و تثبیت اراضی در برابر فرسایش‌های حاصل از باد و آب، منطقه آلوده را نیز پالایش کند، لذا در این مطالعه اثرات پساب صنعتی با تاکید بر برخی فلزات سنگین را بر سه گونه‌گیاهی شامل نخل‌مرداب (*Cyperus alternifolius*) از تیره جگنیان، وتیور (*Chrysopogon zizanioides*) از تیره گندمیان و آلوئه‌ورا (*Aloe vera*) از تیره سریشیان را به عنوان عامل گیاه پالایی مورد بررسی قرار دادیم.

علت انتخاب و مقایسه این گیاهان برای کاشت در مسیر خروجی پساب‌های صنعتی این بود که این سه گونه مورد بررسی همیشه سبز هستند و با اینکه بومی گیلان نیستند، به راحتی و به سرعت در آب و هوای گیلان رشد می‌کنند، زیست توده بالایی تولید می‌کنند، سیستم ریشه‌ایی وسیعی دارند، مورد تهاجم حیوانات قرار نمی‌گیرند و خطر ایجاد مسمومیت و یا تهاجم به مناطق دیگر را نیز ندارند و مقاوم به شرایط نامساعد محیطی هستند. همچنین در صورت برداشت، پس از کشت نیز از نظر اقتصادی مهم می‌باشند و از طرفی این سه گیاه تاکنون در منطقه آلوده مورد نظر در استان گیلان بررسی و مقایسه نشده بودند.

لذا در این مطالعه به بررسی پتانسیل جذب و توانایی زیستی سه گیاه نخل‌مرداب، وتیور، آلوئه‌ورا به عنوان گیاهان پالاینده برای حذف فلزات سنگین از خاک تحت تاثیر آلودگی پساب صنعتی در استان گیلان پرداخته شد و شاخص انباشت (هم‌زمان) کل فلزات شامل روی، کروم، سرب، مس، منگنز، نیکل، منیزیم و برخی ویژگی های رشد و نموی و فیزیولوژیکی آن‌ها ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه خاک و پساب

به منظور بررسی اثر پساب صنعتی بر برخی خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا، آزمایش گلدانی به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار، در محوطه دانشکده علوم دانشگاه گیلان و در شرایط دمای محیط اجرا شد. در مدت انجام آزمایش، میانگین دمای هوا ۱۸/۲۵ و میانگین رطوبت هوا ۷۷/۲۵ بود (اداره کل هواشناسی استان گیلان). خاک مورد استفاده از منطقه ای در حاشیه جنگل شفارود واقع در استان گیلان از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متر به‌طور تصادفی برداشت و الک شد. سپس خصوصیات فیزیکوشیمیایی (Walkley & Black, 1934; Richards 1954) (جدول ۱) و همچنین مقدار فلزات سنگین با استفاده از دستگاه Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer (ICP-OES) مدل (ARCOS, Spectro, Germany) در نمونه خاک اولیه و قبل از شروع آزمایش سنجش شد (Salt et al., 1998; AL-Oud Saud, 2003) (جدول ۲). تیمارهای آزمایشی شامل دو گروه بودند: آب شهری به عنوان تیمار اول (شاهد)، پساب صنعتی به عنوان تیمار دوم که از محل خروجی پساب کارخانه چوب و کاغذ در استان گیلان برداشت شد. پساب به صورت ماهانه جمع‌آوری و در ظرف‌های مخصوص در سایه نگهداری می‌شد.

آماده سازی گلدان‌ها

گیاهان سالم نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا از محل‌های رشد و نمو آن‌ها در حوالی شهر رشت جمع آوری و بوته‌های هم‌وزن پس از تقسیم بندی در گلدان‌های پلاستیکی به عرض ۴۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۵ سانتی‌متر با ۱۱ کیلوگرم خاک الک‌زده کاشته شدند. برای جلوگیری از تأثیر تنش بر گیاهان و سازگاری با شرایط جدید، تمامی گیاهان آزمایشی به مدت ۴ هفته با آب شهری (هفته‌ای دو بار و هر بار ۳۰۰ میلی‌لیتر) آبیاری شدند. پس از یک ماه از شروع کشت، گلدان‌های شاهد با ۳۰۰ میلی‌لیتر آب شهری و گلدان‌های تیمار با ۳۰۰ میلی‌لیتر پساب صنعتی ۲ بار در هفته به مدت ۱۴ ماه به طور جداگانه آبیاری شدند. در طول آزمایش، برگ‌هایی که در طی فصل رشد ریخته می‌شد نیز جمع‌آوری و خشک می‌شدند. به گیاهان اجازه داده شد در شرایط آب‌وهوای محیط زیر یک سقف شیشه‌ای رشد کنند. همچنین برای تعیین میزان کل عناصر اضافه شده از پساب به خاک، گلدان‌هایی با ۱۱ کیلوگرم خاک پر شده بدون گیاه در نظر گرفته و مانند گلدان‌های حاوی گیاهان آبیاری شدند.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی خاک اولیه (شاهد) (Nokande et al., 2022).

Table 1. Physicochemical properties of primary soil (control).

Soil	K (ppm)	P (ppm)	Clay%	Silt%	Sand%	Total N%	O.C%	pH	EC ds/m
sandy loamy	131	13.5	14	22	64	0.28	3.19	6.63	0.88

جدول ۲- مقادیر فلزات سنگین در خاک اولیه (شاهد) (Nokande et al., 2022).

Table 2. The amounts of heavy metals in primary soil (control).

Heavy metals	Zn	Cr	Pb	Cu	Mn	Ni	Mg
Ppm	16	14	8	20	240	9	2400

برداشت خاک و گیاه

پس از گذشت ۱۴ ماه از شروع کشت، هر گلدان به آرامی برگردانده و خالی شد. مقداری از خاک هر گلدان نیز (پس از مخلوط و همگن کردن کل خاک) برداشت و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد آون به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. همچنین pH و EC خاک نهایی (خاک گلدان‌های بدون‌گیاه) که به تفکیک تحت آبیاری آب شهری و پساب صنعتی قرار داشتند، اندازه گیری شد (Richards, 1954; Uba et al., 2009) که نتایج آن قبلا منتشر شده است (Nokande et al., 2020). مقادیر pH به ترتیب ۶/۵۷، ۶/۳۰ و برای EC ۰/۷۹ و ۲/۳۵ به ترتیب در تیمارهای آب شهری و پساب صنعتی بود.

ارزیابی طول ریشه، اندام‌هوایی و زیست توده کل

پس از برداشت کل گیاهان، اندازه‌گیری طول اندام ریشه و اندام‌هوایی انجام شد، سپس گیاهان ابتدا با آب شهری و سپس آب مقطر شستشو شدند. برای ارزیابی وزن خشک، اندام‌های گیاهان شاهد و تیمار در آون تحت دمای (میانگین) ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت (میانگین) ۹۶ ساعت خشک و سپس وزن شدند.

ارزیابی غلظت فلزات سنگین موجود در اندام‌های مختلف گیاهان

اندام‌های خشک شده گیاهان توسط دستگاه آسیاب برقی کاملا پودر شدند. سپس با استفاده از دستگاه ICP-OES، غلظت نهایی فلزات سنگین در بخش‌های مختلف گیاهان و همچنین خاک سنجش شد (Salt et al., 1998; AL-Oud Saud, 2003). میزان کل عناصر فلزی که از طریق پساب شهری به صورت تیمار به گلدان‌ها داده شده بود، در جدول ۳ آمده است. البته میزان کادمیم و جیوه بسیار کم بوده و در حد تشخیص دستگاه ICP-OES نبود. با توجه به مطالعه قبلی ما (Nokande et al, 2022) مقدار تمام فلزات اندازه‌گیری شده به غیر از عناصر کروم و نیکل، در گلدان‌های بدون گیاه (که جهت برآورد نهایی کل عناصر فلزی اضافه شده از پساب به خاک تعبیه شده بودند) از میزان استانداردهای جهانی بیشتر بودند (USEPA, 2005; WHO, 2000).

شاخص‌انباشت فلزات Metal accumulation index (MAI)

با توجه به اینکه اندام‌های گیاهی قادرند هم‌زمان چند نوع فلز را در ساختار خود جمع کنند، شاخص انباشت فلزات (MAI) برای بررسی مقدار تجمع هم‌زمان فلزات (Zn، Cr، Pb، Cu، Mn، Ni، Mg) در هر سه گیاه از طریق رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱

$$\mathrm{MAI} = \left[\frac{1}{N}\right]\sum_{j=1}^{N} I_j$$

در این رابطه N تعداد فلزات اندازه‌گیری شده که در این آزمایش برابر با ۷ بود، I_j برای هر فلز از تقسیم میانگین غلظت فلز در اندام گیاه شامل ریشه و برگ (X) به مقدار انحراف معیار آن (δx) به دست آمد (Liu et al., 2007).

شاخص جذب Uptake index

برای محاسبه UI، غلظت فلز در اندام هوایی گیاه ضرب‌در وزن خشک اندام هوایی گیاه شد (Bi et al., 2011; Zoufan et al., 2016).

شاخص تحمل Tolerance index

برای محاسبه TI، وزن خشک کل گیاه در خاک آلوده به فلز سنگین تقسیم بر وزن خشک کل گیاه در خاک شاهد شد (Kabata-Pendias , 2000; Ng et al., 2020).

قند محلول برگ

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

برای این منظور، ۰/۵ گرم بافت **خشک** اندام هوایی با ۱۰میلی‌لیتر محلول اتانول ۸۵ درصد و در حمام آب در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی جمع آوری شد. ۲ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۱ میلی‌لیتر محلول فنل ۵ درصد مخلوط شد. سپس ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸ درصد به محلول بالا اضافه شد و در نهایت پس از ۴۵ دقیقه، میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۸۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت (Schlegel, 1956) و با کمک منحنی استاندارد میزان قندهای محلول در گیاهان تیمار و شاهد مشخص شد.

سنجش فنل کل

ابتدا ۰/۱ گرم از پودر برگ در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ عصاره گیری شد. به محلول حاصل ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۰/۵ میلی‌لیتر فولین ۵ درصد و ۱ میلی‌لیترکربنات سدیم ۵ درصد اضافه شد. شدت جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر پس از یک ساعت نگهداری در تاریکی، خوانده شد (Ainsworth et al., 2007). از غلظت‌های مختلف گالیک اسید جهت رسم نمودار استاندارد استفاده شد و درنهایت میزان فنل کل براساس میلی گرم بر گرم وزن خشک (mg g-1 DW) بیان شد.

سنجش فلاونوئید کل

۰/۲ گرم از پودر برگ در ۱۰ میلی لیتر متانول عصاره گیری شد. به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد تا حجم ۵ میلی‌لیتر بدست آید. سپس ۰/۳ میلی‌لیتر $NaNO_2$ ۵ درصد و پس از ۵ دقیقه، ۰/۵ میلی‌لیتر از AlCl3 ۱۰ درصد اضافه شد. در نهایت ۲ میلی‌لیتر NaOH ۱ مولار و ۲ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شده و شدت جذب محلول در طول ۵۱۰ نانومتر اندازه گیری شد (Chang et al., 2002). در این سنجش با استفاده از غلظت‌های مختلف کاتچین نمودار استاندارد تهیه و در آخر میزان فلاونوئید کل براساس میلی‌گرم بر گرم وزن خشک (mg g-1 DW) بیان شد.

سنجش آنتوسیانین کل

ابتدا ۰/۵ گرم پودر برگ با متانول اسیدی (به نسبت ۱ به ۹۹) عصاره گیری شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و در یخچال نگهداری شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در رقیقه سانتریفیوژ شد و جذب محلول رویی در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای محاسبه غلظت آنتوسیانین از رابطه ۲ استفاده شد (Masukasu et al., 2003).

رابطه ۲: $A= \varepsilon BC$

در این رابطه A، جذب محلول، ε برابر با ضریب خاموشی $۳۳۰۰۰Cm^{-1}M^{-1}$، B مساوی با ۱ سانتی‌متر عرض کووت و c، غلظت محلول مورد نظر براساس میکروگرم بر گرم وزن خشک بود.

سنجش تانن کل

ابتدا ۱ میلی‌لیتر از عصاره متانولی با ۱۰۰ میلی‌گرم پلی‌وینیل‌پلی‌پیرولیدون (PVPP) مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی نگهداری شد. سپس مخلوط واکنش به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول رویی در ۷۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس میزان تانن کل از حاصل تفاضل میزان فنل کل و فنل فاقد تانن به دست آمد.

ارزیابی فعالیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH

در این روش، توانایی دادن الکترون یا اتم هیدروژن توسط عصاره سه گیاه، از روی میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش رنگ رادیکال ۲و-۲دی فنیل-۱پیکریل هیدرازیل (DPPH) در متانول، سنجیده شد. ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه برگ خشک توسط متانول استیک اسید (نسبت ۸۵ به ۱۵) عصاره‌گیری و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس سانتریفیوژ (۱۰ دقیقه و با سرعت۶۰۰۰) و بخش روشناور نمونه‌ها جداسازی شدند. مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره‌ها داخل لوله‌های فالکون کوچک ریخته شد و ۹۵۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی نرمال به آن‌ها اضافه شد. محلول حاصل به سرعت به هم زده شده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در یک محفظه تاریک در دمای اتاق نگهداری شد. نمونه بلانک و استاندارد به ترتیب شامل ۱ میلی‌لیتر حلال استخراج و ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ نرمال DPPH بود. سپس میزان جذب استاندارد و نمونه با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به صورت درصد بازدارندگی DPPH با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد (Hatano et al., 1988).

رابطه ۳ $\text{Antioxidant activity (DPPH\%)} = (A_{cont} - A_{samp})/A_{cont} \times 100$

%DPPH= درصد بازدارندگی رادیکال

A_{cont} DPPH = میزان جذب DPPH

A_{samp}= میزان جذب (نمونه + DPPH)

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز واریانس برای هر یک از شاخص‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS (24)، آزمون چند دامنه‌ایی دانکن و در سطح

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

احتمال P≤۰/۰۵ انجام شد. همچنین نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft excel 2019 رسم شدند.

جدول۳- مقادیر کل عناصر فلزی سنگین در خاک گلدان‌های شاهد (بدون گیاه) پس از پایان آزمایش و مقایسه با استاندارد خاک (USEPA, 2005; WHO, 2000).

Table 3. Total amount of heavy metals added to the soil, after 14 months under different treatments (water and urban wastewater) and the standard rate of heavy metals in the soil (USEPA,2005; WHO, 2000).

Heavy metal (ppm)							
Mg	Ni	Mn	Cu	Pb	Cr	Zn	Soil sampels
7566.67	24	633.33	79.67	52.33	42.67	117.67	Industrial Wastewater Soil
-	33.7	437	30	10	65	50	Standard in soil

نتایج

شاخص انباشت فلزات MAI

MAI عملکرد کلی گیاهان را برای تجمع هم‌زمان عناصر فلزی بر اساس انحراف معیار آن در جذب فلز نشان می‌دهد (Liu et al., 2007). با توجه به نتایج شاخص انباشت فلزات Zn، Cr، Pb، Cu، Mn، Ni، Mg در گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا در پژوهش حاضر، مشخص شد که MAI هر سه گیاه، تحت تیمارپساب صنعتی بالاتر از تیمار شاهد بود (شکل۱). بالاترین مقدار MAI در گیاه وتیور و در تیمار پساب صنعتی (۵۱/۰۶) مشاهده شد. مقادیر MAI به ترتیب در گیاه آلوئه‌ورا و گیاه نخل‌مرداب ۳۵/۷۴ و ۲۶/۱۰ بود. می‌توان گفت از نظر شاخص انباشت هم‌زمان همه فلزات بررسی شده، گیاه وتیور عملکرد بهتری نسبت به گیاه آلوئه‌ورا و گیاه آلوئه‌ورا عملکرد بهتری نسبت به گیاه نخل‌مرداب داشت. قابل ذکر است که گیاهان در برابر تنش فلزات سنگین ناشی از پساب های صنعتی، دارای حساسیت و استراتژی‌های متفاوتی می‌باشند. میزان سمیت فلزات سنگین در گیاهان مختلف، متناسب با عواملی مانند نوع گیاه، مقدار فلز در پساب، نوع خاک و اقلیم، قابلیت دسترسی زیستی فلزات، میزان جذب فلز توسط گیاه و مقدار جابجایی آن در اندام‌های گیاهی، تغییر می‌کند (Wang et al., 2006; Usman et al., 2005).

بررسی شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه در خاک بخصوصی که گیاه پالایی در آن صورت می‌گیرد، یکی از ضروریاتی است که در تحقیقات گیاه پالایی مورد تاکید می‌باشد (Ruilian et al., 2012). بر اساس نتایج آنالیز واریانس برخی شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک در این تحقیق (جدول ۴)، مشاهده شد که اثر تک تیمار بر همه شاخص‌های آزمایش شده در سطح اطمینان P ≤ ۰/۰۵ معنی دار بود. اثر تک گونه نیز بر همه شاخص‌های مورد بررسی به غیر از شاخص تحمل و محتوی فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل و تانن کل در سطح اطمینان ۵ درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل تیمار و گونه گیاهی نیز در سطح اطمینان ۵ درصد بر شاخص‌های زیست توده کل، شاخص جذب و محتوی فلاونوئید کل معنی‌دار بود.

طول ریشه و اندام‌هوایی

بر اساس نتایج بدست آمده از مقایسه میانگین آزمون دانکن، بعد از ۱۴ ماه تیماردهی گیاهان با پساب صنعتی، از طول ریشه (شکل ۲) و طول اندام هوایی (شکل۳) هر سه گیاه در مقایسه با گیاهان شاهد کاسته شد. بالاترین درصد کاهش (۱۷/۹۱ درصد) در طول ریشه و بالاترین درصد کاهش (۲۳/۲۵ درصد) در طول اندام هوایی مربوط به گیاه نخل‌مرداب بود. همچنین گیاه وتیور کم‌ترین درصد کاهش (۱۰/۹۱ درصد) در طول ریشه و کم‌ترین درصد کاهش (۱۰/۹۱ درصد) را در طول اندام هوایی خود نشان داد. گزارش شده است که ریشه‌ها به عنوان اولین اندام جذب کننده آب و مواد غذایی، تاثیر زیادی در جذب آب و املاح دارند و عوامل مختلف محیطی از طریق تاثیر بر ریشه می‌توانند بر رشد گیاه اثر بگذارند. تنش فلزات سنگین از جمله عوامل محدود کننده رشد ریشه است و کاهش رشد ریشه باعث تغییراتی در فعالیت‌های رشدی گیاه می‌شود. با توجه به نتایج این تحقیق، در هر دو گیاه نخل مرداب و آلوئه‌ورا، طول اندام‌هوایی درصد کاهش بیشتری نسبت به طول ریشه داشت. در این تحقیق آلودگی پساب صنعتی ممکن است سبب عدم طویل شدن و گسترش مناسب سیستم ریشه‌ای و باعث کاهش سطوح جذب کننده مواد غذایی یا تغییر در ساختار غشا سلولی و کاهش جذب و محتوای آب شده که این امر بر فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فتوسنتز اثر گذاشته و در نهایت موجب کاهش رشد قسمت‌های هوایی گیاه شد (Sharma & Dubey, 2005).

زیست توده کل

وزن خشک کل بوته، در هر سه گیاه کاهش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد خود داشت (شکل ۴). کاهش زیست توده گیاهان بعد از ۱۴ ماه تیماردهی، برای گیاه نخل‌مرداب ۲۳/۷۳ درصد، گیاه آلوئه‌ورا ۲۱/۵۱ درصد و برای گیاه وتیور ۱۹/۶۸ درصد بود که نشان می‌دهد گیاه نخل‌مرداب کاهش بیشتری در زیست توده

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

نسبت به گیاه شاهد خود داشته است و گیاه وتیور و آلوئه‌ورا عملکرد بهتری داشتند. گزارش شده است که سطوح بالای فلزات در خاک، بسیاری از عملکردهای متابولیک گیاه را مهار می‌کند و در نتیجه باعث تاخیر در رشد و در نهایت باعث محدود شدن رشد ریشه و اندام‌های هوایی می‌شود. احتمالا با افزایش تنش، میزان تولیدات گیاهی، اندازه سلول‌ها و در نتیجه وزن خشک اندام‌ها کاسته می‌شود (Malik et al., 2011; Yadollahi et al., 2016).

لازم به ذکر است که علاوه بر سمیت ناشی از فلزات سنگین و سایر ترکیبات موجود در پساب، مقادیر اضافی برخی عناصر غذایی نیز می‌تواند موجب کاهش تولید و تجمع زیست توده و در نتیجه کاهش وزن گیاهان شود (Taiz & Zeiger, 2014; Mohsenzadeh et al., 2016).

شاخص جذب (UI)

بررسی شاخص UI با توجه به وزن خشک کل گیاه نشان داد که مقدار این شاخص در هر دو گیاه وتیور و آلوئه ورا رشد یافته تحت تیمار پساب صنعتی در مقایسه با گیاه شاهد خود افزایش یافت (شکل ۵). طبق نتایج این تحقیق، تحت تیمار پساب صنعتی نسبت به آب شهری، گیاهان عناصر فلزی بیش‌تری جذب کردند، اما هم‌زمان وزن خشک اندام هوایی گیاه نیز دارای افزایش مناسبی بوده و به این ترتیب شاخص جذب (UI) هم عدد بالاتری را نسبت به گیاه شاهد نشان می‌دهد. بیش‌ترین درصد افزایش در این شاخص به ترتیب در گیاه وتیور و آلوئه‌ورا مشاهده شد (۴۱/۶۹ و ۲۷/۶۱ درصد). مطالعات گذشته نشان دادند که غلظت فلزات در اندام گیاهی و تولید زیست توده گیاهی از مهم‌ترین عوامل برای تعیین راندمان گیاه است که از طریق بررسی شاخص جذب می‌توان به آن دست یافت. البته در برخی مطالعات نیز از کاهش مقدار UI در تنش شدید فلز سنگین گزارش شده است (Zoufan et al., 2016 & 2018; Tahmasbian & Safari, 2016).

شاخص تحمل (TI)

نتایج نشان داد که با تیمار پساب صنعتی به‌طور معنی داری از میزان TI کاسته شد (شکل ۶). طبق نتایج تحقیق حاضر گیاهان نخل‌مرداب و آلوئه‌ورا بیشترین درصد کاهش (۲۳/۵و ۲۳) و گیاه وتیور پایین ترین درصد کاهش (۲۰) را نسبت به گیاهان شاهد خود داشتند که نشان می‌دهد بین سه گیاه مورد مطالعه، گیاه وتیور شاخص تحمل بهتری داشت. در مطالعات دیگر نیز از پارامتر TI برای ارزیابی حساسیت گیاه در تنش فلزات سنگین استفاده شده است (Moradi & Sadaghiani, 2019; Ng et al., 2020) و کاهش شاخص تحمل در تنش های شدید به‌خصوص تنش هم‌زمان چند فلز نسبت به تنش یک فلز گزارش شده است (Ng et al., 2020).

قند محلول کل

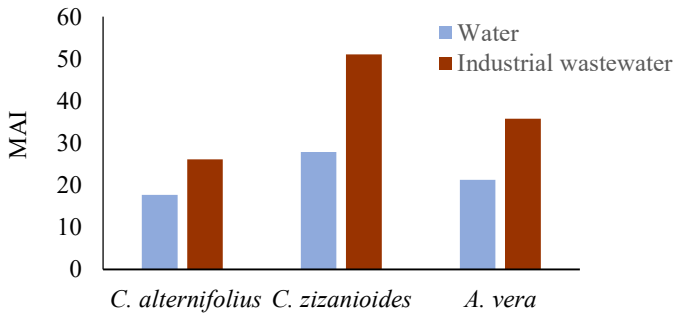
نتایج نشان داد که قند محلول کل در گیاهان وتیور، آلوئه‌ورا و نخل‌مرداب به ترتیب افزایش ۳۲/۶۱ و ۲۸/۴۹ و ۱۸/۸ درصدی نسبت به گیاه شاهد خود داشتند (شکل ۷). در گزارش‌ها از تجمع قند به‌عنوان پیامدی از تنش فلزات سنگین یاد شده است که می تواند به مقاومت گیاه در برابر تنش کمک کند (Turakainen et al., 2004; Hajiboland et al., 2014; Aghaei et al., 2019; Farjadi & Norastehnia, 2021). گیاهان در مقابله با تنش، سازوکارهای حفاظتی متفاوتی را در پیش می‌گیرند که از آن جمله می‌توان به تجمع اسمولیت‌هایی مثل قندهای محلول اشاره کرد. به نظر می‌رسد این افزایش احتمالا مکانیسم سازشی گیاه برای حفظ پتانسیل اسمزی در شرایط تنش فلزات سنگین است. از طرفی با افزایش قندهای محلول، گیاه می‌تواند ذخیره کربوهیدراتی خود را برای حفظ متابولیسم پایه سلول در شرایط تنش در حد مطلوب نگه دارد (Jeddi et al., 2021; Turakainen et al., 2004). البته مطالعاتی نیز از کاهش قند محلول گیاهان در تنش شدید و یا بلند مدت موجود است (Grace et al., 2008) بنابراین همه گیاهان در شرایط تنش، تجمع قند ندارند (zan et al., 2007). به نظر می‌رسد در این تحقیق نیز می‌توان افزایش بیشتر قند محلول، در دو گیاه وتیور و آلوئه‌ورا نسبت به نخل‌مرداب را، به بالا بودن MAI در گیاه وتیور و آلوئه‌ورا نسبت به نخل‌مرداب ربط داد.

محتوی فنل کل

تحت تیمار پساب صنعتی، محتوی فنل کل در هر سه گیاه افزایش معنی داری نسبت به گیاهان شاهد خود داشت (شکل ۸). بالاترین درصد افزایش (۶۱/۵۳ درصد) در مقدار فنل مربوط به گیاه وتیور بود و بعد از آن نخل‌مرداب و آلوئه‌ورا با درصد افزایش ۳۹/۲۸ و ۳۲/۳۵ قرار داشتند. در مطالعات متعددی افزایش سطوح ترکیبات فنلی در تنش های محیطی از جمله تنش فلزات سنگین گزارش شده است (Kumar et al., 2019; Mishra & Singh, 2019; Farjadi & Norastehnia, 2021; Mohammadi et al., 2022). افزایش ترکیبات فنلی در تیمار پساب احتمالا برای مقابله با رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده در تنش است. ترکیبات فنلی رایج ترین و وسیع ترین گروه از متابولیت های ثانویه و ترکیبات دفاعی بررسی شده در گیاهان هستند. گیاهان تحت تنش، مکانیسم های دفاعی خاصی را از قبیل افزایش غلظت فنل کل در برابر استرس اکسیداتیو به کار می گیرند. فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات فنلی عمدتا ناشی از ویژگی اکسیداسیون - احیای آن هاست که می تواند نقش مهمی در جذب و خنثی کردن رادیکال های آزاد داشته باشد و مانع پراکسیداسیون لیپیدها و در نتیجه سبب ثبات غشاهای سلولی شود (Joyce et al., 2005; Turumtay et al., 2014).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]



شکل ۱- شاخص انباشت فلزات (روی، کروم، سرب، مس، منگنز، نیکل، منیزیم) در گیاه نخل‌مرداب، وتیور، آلوئه‌ورا تحت تیمار آب شهری و پساب صنعتی.

Fig 1. Metal accumulation index (Zn, Cr, Pb, Cu, Mn, Ni, Mg) of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* under water and industrial wastewater treatments.

جدول۴- تجزیه واریانس تاثیر پساب صنعتی بر برخی خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی سه گیاه نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

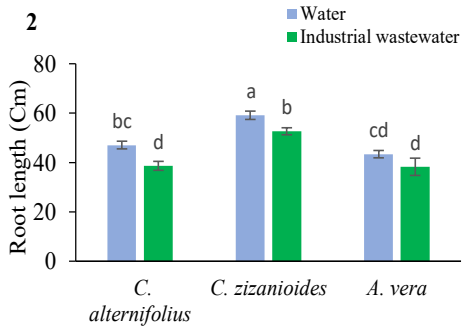
Table 4. The variance analysis of industrial wastewater effects on some morphological and physiological indices of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera.*

				Mean square		
Source of variances	df	Root length	Shoot length	Total biomass	Uptake index (UI)	Tolerance index (TI)
Treatment	1	200.00*	1327.84*	44963.51*	276074.75*	0.216*
Species	2	402.68*	13614.41*	380972.80*	3200796.71*	0.00 ns
Treatment× Species	2	4.212 ns	162.53 ns	4967.95 *	70547.97 *	0.00 ns
Error	12	12.675	45.06	344.45	16983.34	0.00

				Mean square			
Source of variances	df	Total soluble sugar	Total phenol	Total flavonoid	Total anthocyanin	Total tannin	DPPH radical-scavenging percentage
Treatment	1	3278.59*	0.29*	0.325*	0.00*	0.192*	898.45*
Species	2	1856.712*	0.02*	0.00 ns	0.00 ns	0.01 ns	78.30*
Treatment× Species	2	82.319 ns	0.01 ns	0.02 *	0.00 ns	0.01 ns	16.85 ns
Error	12	137.968	0.01	0.00	0.00	0.01	15.06

*Significant at 0.05 probability level

*معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد



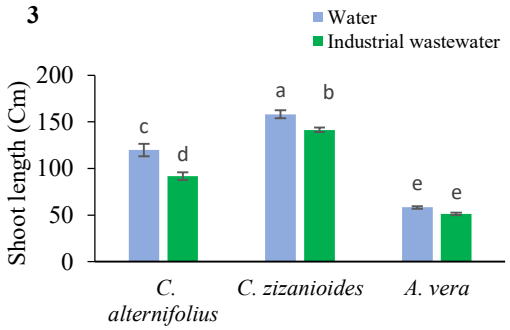
شکل ۲ - تاثیر پساب صنعتی بر طول ریشه گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 2. The effects of industrial wastewater on the root length of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera*. The means with the same letter in each column are not significantly different according to Duncan's test.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

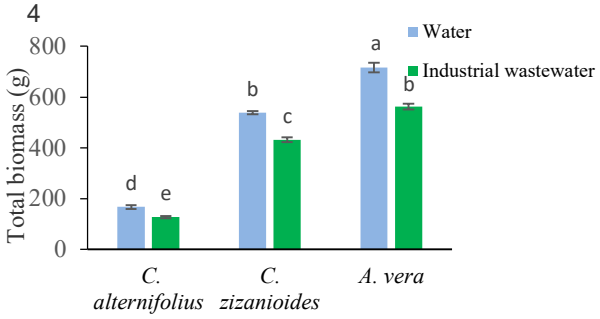
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]



شکل ۳- تاثیر پساب صنعتی بر طول شاخه گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.

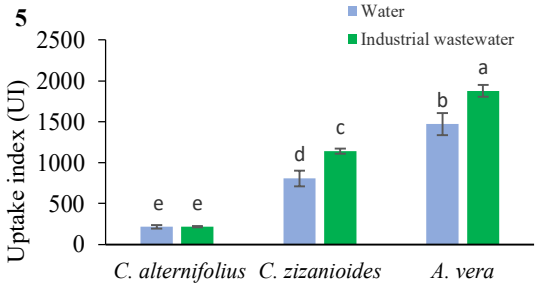
Figures 3. The effects of industrial wastewater on the shoot length of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera*. The means with the same letter in each column are not significantly different according to Duncan's test.



شکل ۴- تاثیر پساب صنعتی بر زیست توده کل گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن، اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 4. The effects of industrial wastewater on biomass of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera*. The means with the same letter in each column are not significantly different according to Duncan's test.

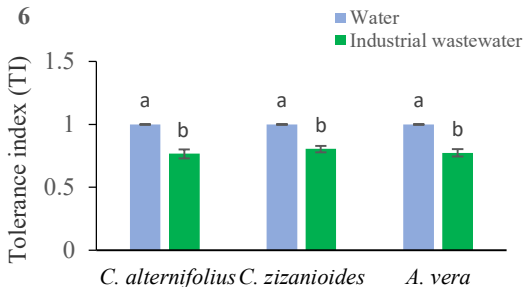


شکل ۵ - تاثیر پساب صنعتی بر شاخص جذب گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا. در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 5. The effects of industrial wastewater on the uptake index of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera*. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

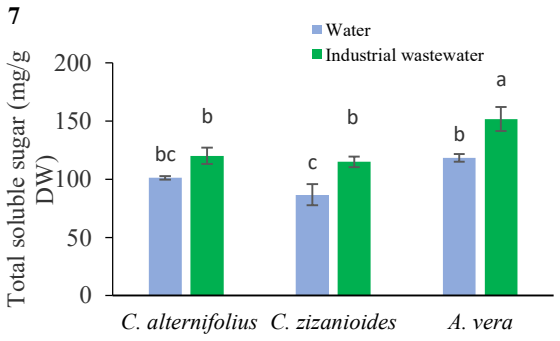
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]



شکل ۶ – تاثیر پساب صنعتی بر شاخص تحمل گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

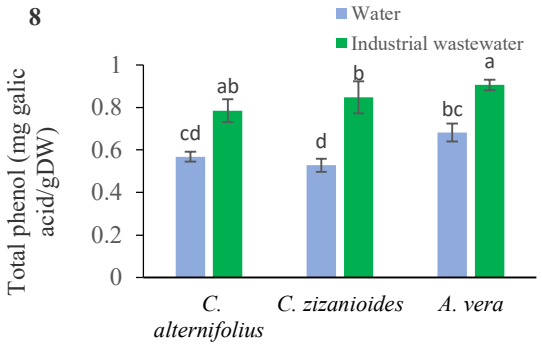
Figures 6. The effects of industrial wastewater on the tolerance index of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera*. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.



شکل ۷ – تاثیر پساب صنعتی بر قند کل محلول گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 7. The effects of industrial wastewater on the total soluble sugar of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* Leaf. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.



شکل ۸– تاثیر پساب صنعتی بر محتوی فنل کل گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 8. The effects of industrial wastewater on the total phenol contents of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* Leaf. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

فلاونوئید کل

بر اساس نتایج شکل ۹، هر سه گیاه مورد بررسی در تغییرات میزان فلاونوئید کل، افزایش معنی‌داری نسبت به گیاه شاهد خود داشتند. بالاترین درصد افزایش فلاونوئید کل در گیاه وتیور با ۱۴۶/۴۱ درصد مشاهده شد و کم‌ترین درصد افزایش در میزان فلاونوئید کل مربوط به گیاه نخل مرداب (۲۴/ ۴۴ درصد) بود. به نظر می‌رسد که هر سه گیاه مورد مطالعه در زمان تنش پساب صنعتی به علت ضعیف شدن سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی خود را افزایش دادند. در مطالعات گذشته نیز، افزایش فلاونوئید کل در تنش فلزات سنگین گزارش شده است (Farjadi & Norastehnia, 2021). فلاونوئیدها جزو ترکیبات فنلی می‌باشند که می‌توانند به عنوان آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی، خاموش کننده و حذف کننده رادیکال‌های آزاد اکسیژن در گیاهان عمل کنند. گزارش شده است گیاهان با تولید فلاونوئیدها و تجمع آن در لایه‌های اپیدرمی برگ و ساقه، می‌توانند باعث کاهش اثرهای تنش اکسیداتیو در پی تنش‌های محیطی شوند (Joyce et al., 2005).

آنتوسیانین کل

میزان آنتوسیانین کل نیز در گیاهان وتیور، نخل‌مرداب و آلوئه‌ورا تحت تیمار پساب صنعتی افزایش یافت. به‌طوری که به ترتیب افزایش ۴۰/۲۷، ۱۱/۳۶و ۹/۲۵ درصدی نسبت به شاهد خود داشتند (شکل ۱۰). گزارش شده است که آنتوسیانین‌ها به‌عنوان آنتی اکسیدان‌های قوی مانع از آزاد شدن رادیکال‌های آزاد می‌شوند (Kamei et al., 1995). متداول‌ترین گروه فلاونوئیدهای رنگیزه‌ای، آنتوسیانین‌ها هستند که نه تنها رادیکال‌های آزاد را از بین می‌برند، بلکه می‌توانند از تولید بیشتر آن‌ها در گیاه جلوگیری کنند. گیاهان با تولید و تجمع آنتوسیانین در لایه‌های اپیدرمی می‌توانند باعث کاهش اثرهای تنش اکسیداتیو شوند (Hare & Cress, 2007; Mishra & Singh, 2019). البته لازم به ذکر است که کاهش آنتوسیانین‌ها در تنش های شدید فلزات سنگین یا غلظت های زیاد پساب گزارش شده است (Mohsenzade et al., 2016).

تانن کل

میزان تانن کل به طور معنی‌داری تحت تیمار پساب صنعتی نسبت به گیاهان شاهد در هر سه گیاه مورد مطالعه افزایش یافت. بیش‌ترین درصد افزایش (۸۵/۷۱) در میزان تانن نسبت به گیاه شاهد در گیاه وتیور مشاهده شد و پس از آن، گیاه آلوئه‌ورا با ۴۷/۵ درصد افزایش در رتبه دوم قرار داشت (شکل ۱۱). گزارش شده است که تانن های موجود در گیاهان می توانند به عنوان جاذب رنگ‌ها، سورفکتانت‌ها و محصولات شیمیایی داخل پساب‌ها عمل کنند (Kavitha et al., 2020). تانن کل نیز همانند فنل کل، جاروب کننده رادیکال های آزاد اکسیژن می‌باشد که در سطوح بالای تنش‌های محیطی می‌تواند افزایش یابد و نقش آنتی اکسیدانی ایفا می‌کند. تانن‌های گیاهی در تنش فلزات سنگین و از نظر کلات شدن با فلزات سنگین مورد توجه محققین هستند (Lavid et al., 2001).

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

با توجه به شکل ۱۲، نتایج نشان داد که تیمار پساب صنعتی باعث ایجاد تغییرات معنی‌داری در درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH یا میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در هر سه گیاه مورد مطالعه شد. در گیاهان نخل مرداب و وتیور و آلوئه ورا به ترتیب افزایش ۲۶/۸۹، ۲۲/۵۷ و ۱۴/۲۱درصدی نسبت به گیاهان شاهد، در میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مشاهده شد. در تحقیقات دیگر نیز افزایش درصد بازدارندگی در تنش های محیطی از جمله فلزات سنگین گزارش شده است (Mishra & Singh, 2019; Arsenov et al., 2021; Jeddi et al., 2021). البته در برخی مطالعات نیز در تنش‌های شدید محیطی، کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شده است (Nokandeh et al., 2015). به طور کلی تنش‌های غیر زیستی مسیرهای درگیر در بیوسنتز سه گروه اصلی از متابولیت‌های ثانویه شامل ترپن‌ها، فنل‌ها و ترکیبات حاوی نیتروژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند و احتمالا از این طریق مقادیر آنتی اکسیدان‌ها را افزایش و یا کاهش می‌دهند (Erturk et al., 2007; Kabiri et al., 2017; Mishra & Singh, 2019). تغییرات ظرفیت آنتی اکسیدانی دیده شده در دو گیاه وتیور و نخل‌مرداب مشابه با تغییرات میزان فنل کل بود که در مطالعات گذشته نیز گزارش شده است که افزایش غلظت ترکیبات فنلی به طور مستقیم میزان توانایی عصاره‌های مختلف را در مهار رایکال آزاد افزایش می‌دهد (Klimczak et al., 2007; Nokandeh et al., 2015).

نتیجه‌گیری کلی

این تحقیق نشان داد که هر سه گیاه نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا، توانایی انباشت فلزات مورد مطالعه را داشتند، البته دو گیاه وتیور و آلوئه ورا از نظر شاخص انباشت هم‌زمان فلزات، عدد بالاتری نسبت به گیاه نخل مرداب داشتند و موفق‌تر عمل کردند. براساس نتایج، تحت تیمار پساب صنعتی، گیاه وتیور در خصوصیات طول ریشه، طول اندام هوایی، زیست توده کل و شاخص تحمل، کاهش کمتری در مقایسه با شاهد نشان داد. علاوه بر این، نتایج عوامل بررسی شده نشان داد که هر سه گیاه توانستند با بالا بردن قند محلول کل، فنل کل، فلاونوئید کل، آنتوسیانین کل، تانن کل و درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH، شرایط تنش پساب صنعتی را تحمل کنند. اما این افزایش در گیاه

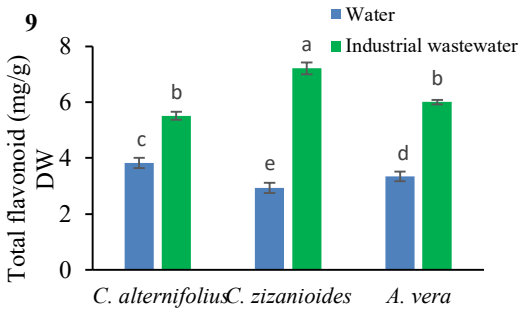
[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

وتیور بیشتر بود و به همین دلیل توانست در شرایط تحت تنش بهتر عمل کند. بنابراین پیشنهاد می‌شود در رتبه اول گیاه وتیور و سپس گیاه آلوئه‌ورا و بعد از آن گیاه نخل‌مرداب برای ایجاد کمربند سبز، در خاک اطراف مسیر خروجی پساب صنعتی کارخانه چوب و کاغذ جهت پالایش پساب کشت شوند.

سپاسگزاری

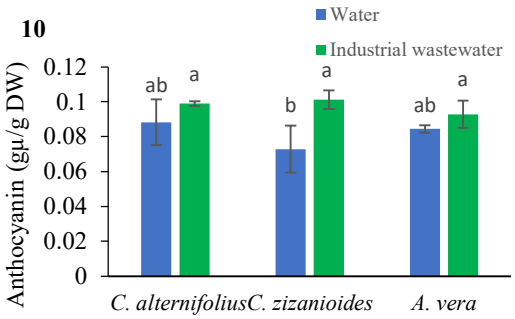
نویسندگان مقاله از زحمات کلیه افرادی که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند، نهایت قدردانی و تشکر را دارند.



شکل ۹ – تاثیر پساب صنعتی بر محتوی فلاونوئید کل در برگ گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

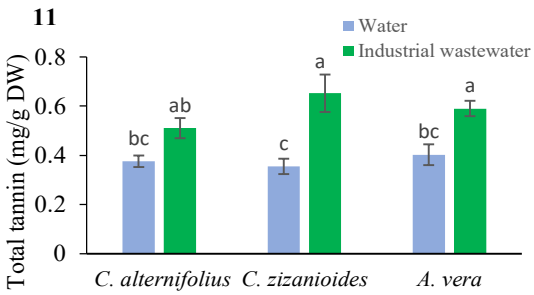
Figures 9. The effects of industrial wastewater on the total flavonoids of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* Leaf. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.



شکل ۱۰– تاثیر پساب صنعتی بر محتوی آنتوسیانین کل در برگ گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 10. The effects of industrial wastewater on the total anthocyanins of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* Leaf. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.

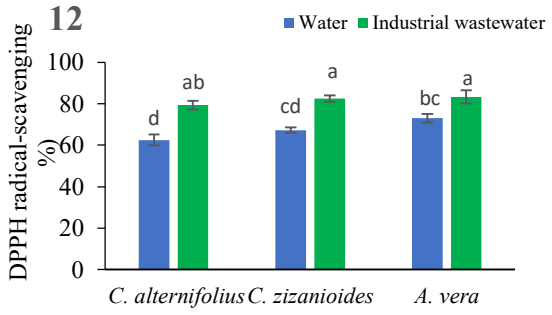


شکل ۱۱ – تاثیر پساب صنعتی بر تانن کل در برگ گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 11. The effects of industrial wastewater on the total tannins of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* Leaf. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]



شکل ۱۲- تاثیر پساب صنعتی بر درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH در برگ گیاهان نخل‌مرداب، وتیور و آلوئه‌ورا.

در هر ستون میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند.

Figures 12. The effects of industrial wastewater on the DPPH radical-scavenging percentage of *C. alternifolius, Ch. zizanioides* and *A. vera* Leaf. The means with the same letter in each column are not significantly differenct according to Duncan's test.

REFERENCES

Ainsworth, E.A. & Gillespie, K.M. 2007. Estimation of total phenolic content and otheroxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. Nature Protocols 2: 875-877.

Aghaei, K., Rahkhosravani, B., Moghanlu, L. & Ghotbi Ravandi, A.A. 2019. Study of the effect of cadmium accumulation on some physiological and biochemical characteristics of basil plants (*Ocimum basilicum* L.). Journal of Plant Process and Function 8: 107-122. (In Persian).

AL-Oud Saud, S. 2003. Heavy Metal Contents in Tea and Herb Leaves. Pakistan Journal of Biological Sciences 6: 208-221.

Arsenov, D., Zupunski, M., Pajević, S., Nemes, I., Simin, N., Alnuqaydan, A.M. & Mimica-Dukic, N. 2021. Roots of *Apium graveolens* and *Petroselinum crispum* Insight into phenolic status against toxicity level of trace elements. Plants 10: 1785.

Bi, R., Schlaak, M., Siefert, E., Lord, R. & Connolly, H. 2011. Influence of electrical fields (AC and DC) on phytoremediation of metal polluted soils with rapeseed (*Brassica napus*) and tobacco (*Nicotiana tabacum*). Chemosphere 83: 318-26.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10l: 178-182.

European Commission. 2013. Soil Contamination: Impacts on Human Health. Science for Environmental Policy. Report produced for the European Commission DG Environment. September. Science Communication Unit. University of the West of England. Bristol.

Erturk, U., Sivritepe, N., erlikaya, C.Y., Bor, M., Ozdemir, F. & Turkan, I. 2007. Responses of the cherry rootstock to salinity in vitro. Biologia Plantarum 51: 597-600.

Farjadi, M. & Norastehnia, A. 2021. The effects of heavy metal mercury on some physiological responsses in Nicotiana Tabacum. Nova Biologica Reperta 8: 118-129. (In Persian).

Gajic, G. & Pavlovic, P. 2018. The role of vascular plants in the phytoremediation of fly ash deposits. Phytoremediation: Methods, Management and Assessment 151-236.

Grace, O.M., Simmon, M.S.J., Smith, G.F. & Van Wyk, A. E. 2008. Therapeutic uses of Aloe L (Asphodelaceae) in Southern Africa. Journal Ethnopharmacology 119: 604-614.

Hajiboland, R., Keyvanfar, N., Joudmand, A., Rezaee, H. & Yousefnejad, M. 2014. Effect of selenium Treatment on Drought Tolerance of Canola Plants. Iranian Journal of Biology 27: 557-568. (In Persian).

Hare, P.D. & Cress, W.A. 2007. Metabolic implications of stress-induced accumulation in plants. Plant Growth Regulation 21: 79-103.

Hatano, H.K.T., Yasuhara, T. & Okuda, T. 1989. Two new flavonoids and other constituents in licorice root their relative astringency and radical scavenging effect. Chemistry and Pharmacology Bulletin 36: 1090-1097.

Jalali, M. & Hemati Matin, N. 2019. Nutritional status and risks of potentially toxic elements in some paddy soils and rice tissues. International Journal of Phytoremediation 18: 1-9.

Jeddi, K., Siddique, K.H., Chaieb, M. & Hessini, K. 2021. Physiological and biochemical responses of Lawsonia inermis L. to heavy metal pollution in arid environments. South African Journal of Botany 143: 7-16.

Joyce, C., Pennycooke, S. & Stushnoff, C. 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia. Environmental and Experimental Botany 53: 225-232.

Kabata-Pendias, A. 2000. Trace Elements in Soils and Plants. CRC, Boca Raton. **Kamei, H., Kojima, T. & Hasegawa, M.** 1995. Suppression of tumor cell growth by anthocyanin in vitro. Cancer Investigation 13: 590-594.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

Kavitha, V.U. & Kandasubramanian, B. 2020. Tannins for wastewater treatment. SN Applied Science 2: 1081.

Kibria, M.Gh. & Hoque, M.D. 2017. Antioxidant defense mechanisms of salinity tolerance in rice genotypes. Rice science 24: 155-162.

Klimczak, I., Maecka, M., Szlachta, M. & Gliszcyn, A. 2007. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. Journal of Food Composition and Analysis 20: 313-322.

Kouhi, S. M. M., & Moudi, M. 2020. Assessment of phytoremediation potential of native plant species naturally growing in a heavy metal-polluted saline–sodic soil. Environmental Science and Pollution Research 27: 10027-10038.

Kumar, V., Sharma, A., Kohli, S.K., Bali, S., Sharma, M., Kumar, R. & Thukral, A.K. 2019. Differential distribution of polyphenols in plants using multivariate techniques. Biotechnology Research and Innovation 3: 1-21.

Lavid, N., Schwartz & A., Yarden. 2001. The involvement of polyphenols and peroxidase activities in heavy - metal accumulation by epidermal glands of the waterlily (Nymphaeaceae). Planta 212: 323-331.

Ling, W., Shen, Q., Gao, Y., Gu, X. & Yang, Z. 2008. Use of bentonite to control the release of copper from contaminated soils. Soil Research 45: 618-623.

Liu, Y.J., Zhu, Y.G. & Ding, H. 2007. Lead and cadmium in leaves of deciduous trees in Beijing. China: development of a metal accumulation index (MAI). Environmental Pollution 145: 387-390.

Malik, N.J., Chamon, A.S., Mondal, M.D., Elahi, S. F. & Faiz, S. 2011. Effect of different levels of zinc on growth and yield of red amaranthus and rice. Journal of the Bangladesh Association of Young Researchers 1: 79-91.

Masukasu, H., Karin, O. & Kyoto, H. 2003. Enhancement of anthocyanin biosynthesis by sugar in radish (*Raphanus sativus*) hypocotyls. Plant Science 164: 259-265.

Mishra, B. & Singh Sangwan, N. 2019. Amelioration of cadmium stress in *Withania somnifera* by ROS management: active participation of primary and secondary metabolism. Plant Growth Regul 87: 403-412.

Mohammadi, S., Pourakbar, L., Moghaddam, S.S. & Popovic-Djordjevic, J. 2021. The effect of EDTA and citric acid on biochemical processes and changes in phenolic compounds profile of okra (*Abelmoschus esculentus* L.) under mercury stress. Ecotoxicology and Environmental Safety 208: 111607.

Mohsenzadeh, S., Naderi, N. & Nazari, M. 2016. Physiological responses of Vetiver zizanioides to municipal waste leachate. Plant Biology 8: 79-96.

Moradi, N. & Sadaghiani, M. 2019. The assessment of the potential of two rangeland plants for absorption and accumulationof lead (Pb) in a contaminated calcareous soil. Journal of Agricultural Engineering Soil Science and Agricultural Mechanization. Scientific Journal of Agriculture 42: 115-130.

Ng, C.C., Boyce, A.N., Abas, M.R., Mahmood, N.Z. & Han, F. 2020. Evaluation of vetiver grass uptake efficiency in single and mixed heavy metal contaminated soil. Environmental Processes 7: 207-226.

Nokandeh, S.E., Mohammadian, M.A., Damsi, B. & Jamalomidi, M. 2015. The effect of salinity on some morphological and physiological characteristics of three varieties of (*Arachis hypogaea* L.). International Journal of Advanced Biotechnology and Research 16: 498-507.

Nokande, S.E., Razavi, S.M. & Mohammadian, M.A. 2022. The capacity of heavy metal remediation by *Cyperus alternifolius*, *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty, and *Aloe vera* (L.) Burm.f. under industrial and urban wastewater treatment. Chiang Mai University Journal of Natural Sciences 21: e2022057.

Omidbaigi, R. 2008. Production and processing of medicinal plants. 1st Ed, Beh-Nashr publication. Mashhad. pp: 112.

Petoussi, M.A. & Kalogerakis, N. 2022. Olive mill wastewater phytoremediation employing economically important woody plants. Journal of Environmental Management 302: 114076.

Pilon Smits, E. 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology 56: 15-39.

Placido, D.F. & Lee, C.C. 2022. Potential of industrial hemp for phytoremediation of heavy metals. Plants 11: 595.

Rahman, R.A., Wintoko, J. & Prasetya, A. 2022. Comparison of different phytoremediation strategies for acid mine drainage (AMD). In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 963: 1.

Richards, L.A. 1954. Agriculture, Handbook, phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. Plant and Soil. US Department of Agriculture, Washington.

Ruilian, Y., Junfeng, J., Xuyin, Y., Yinxian, S. & Cheng, W. 2012. Accumulation and translocation of heavy metals in the canola (*Brassica napus* L.) soil system in Yangtze River Delta China. Plant Soil 353: 33-45.

Salt, D.E., Smith, R.D & Raskin, I. 1998. Phytoremediation: Annual Rev Plant Physiology. Plant Molecular Biology 49: 643-668.

Sarma, H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants A review focusing on phytoremediation technology. Journal Environment Science Technology 4: 118-138.

Schlegel, H.G. 1956. Die verwertung organischer sauren durch chlorella in lincht. Planta 47: 510-515.

Sharma, P. & Dubey, R.S. 2005. Lead toxicity in plants. Journal of Plant Physiology 17: 35-52.

Tahmasbian, I . & Safari Sinegani, A. A. 2016. Improving the efficiency of phytoremediation using electrically charged plant and chelating agents. Environmental Science and Pollution Research 23: 2479-2486.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2014. Plant physiology. Sinauer Associates, Massachusetts.

Torresday, J. L, Videa, J. R, Rosa, G. D. & Parsons, J. 2005. Phytoremediatoin of heavy metals and study of the metal coordination by X- ray absorption

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]

spectroscopy. Coordination Chemistry Reviews 249: 1797-1810.

Turakainen, M., Hartikainen, H. & Seppanen, M. M. 2004. Effects of selenium treatments on potato (*Solanum tuberosum* L.) growth and concentrations of soluble sugars and starch. Journal of Agriculture Food Chemistry 52: 5378-5382.

Turumtay, E.A., İslamoglu, F., Cavus, D., Sahin, H., Turumtay, H. & Vanholme, B. 2014. Correlation between phenolic compounds and antioxidant activity of Anzer tea (*Thymus praecox* Opiz subsp. *caucasicus var. caucasicus*). Industrial Crops and Products 52: 687-694.

Uba, S., Uzairu, A. & Okunola, O.J. 2009. Content of heavy metals in *Lumbricus Terrestris* and associated soils in dump sites. International Journal of Environmental Research 3: 353- 358.

United States Environmental Protection Agency (USEPA). 2005. United States of Environmental Protection Agency. Office of Water Regulations and Standards. EPA 440/5-86-001, p. 273.

Usman, A., Kuzyakov, Y. & Stahrk, L. A. 2005. Effect of immobilizing substances and salinity on heavy metals availability to wheat grown on sewage sludge-contaminated soil. Soil and Sediment Contamination 14: 329-344.

Walkley, A. & Black, I.A. 1934. An examination of the degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Science 37: 29-38.

Wang, L.J., Fan, L., Loescher, W., Duan, W., Liu, G.J., Cheng, J.S., Luo, H.B. & Li, S. H. 2010. Salicylic acid alleviates decreases in photosynthesis under heat stress and accelerates recovery in grapevine leaves. BMC Plant Biology 10: 34.

Wang, S., Angle, J., Chaney, L., Delorme, A. & Reeves, D. 2006. Soil pH effects on uptake of Cd and Zn by *Thlaspi caerulescens*. Plant and Soil 281: 325-337.

Weinberg, Z.G., Ashbell, G., Chen, Y., Gamburg, M. & Sela, S. 2004. The effect of sewage irrigation on safety and hygiene of forage crops and silage. Animal Feed Sience and Technology 116: 271-280.

WHO. 2000. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. International Programme on Chemical Safety. WHO Food Additive Series 52.

Yadollahi, P., Asgharipour & M., Golshani, F. 2016. Effect of Foliar Application of Humic Acid on *Aloe Vera*. In Cadmium Contaminated Soil. Journal of Plant Process and Function 4: 51-59. (In Persian).

Yang, X., Feng, Y., He, Z. & Stoffella, P.J. 2005. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology 18: 339-353.

Zoufan, P., Shiralipour, N. & Rastegharzadeh, S. 2016. Investigation of uptake and accumulation of zinc in *Malva parviflora*: a population collected from areas surrounding production industries of steel in Ahvaz. Journal of Plant Process and Function 5: 43-56. (In Persian).

Zoufan, P., Shiralipour, N. & Rastegharzadeh, S. 2018. Assessment of some growth indices and Cd accumulation in shoots and roots of *Malva parviflora* L. under hydroponic system. Iranian Journal of Biology 31: 316-331. (In Persian).

Zan, M.J., Chang, H.W., Zhao, P.L. & Wei, J.G. 2007. Physiological and ecological characters studies on *Aloe vera* under soil salinity and seawater irrigation. Process Biochemical 42: 710-714.

*****

How to cite this article:

Ebrahimi Nokande, S., Razavi, S.M. & Afshar Mohammadian, M. 2023. The impact of industrial wastewater on some morphological and physiological characteristics of *Cyperus alternifolius*, *Chrysopogon zizanioide* and *Aloe vera*. Nova Biologica Reperta 10: 47-61. (In Persian).

ابراهیمی نوکنده، س.، رضوی، س.م. و افشارمحمدیان، م. ۱۴۰۲. تاثیر پساب صنعتی بر بعضی از خصوصیات ریخت شناسی و فیزیولوژیکی نخل‌مرداب (*Cyperus alternifolius*)، وتیور (*Chrysopogon zizanioides*) و آلوئه‌ورا (*Aloe vera*). یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۶۱-۴۷.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1402.10.1.5.8]