مقاله پژوهشی
یافته‌های نوین در علوم زیستی
جلد ۱۰، شماره ۳، صفحات ۲۱۹ الی ۲۲۹ (۱۴۰۲)
انتشارات دانشگاه خوارزمی

Research Article
Nova Biologica Reperta 10(3): 219-229 (2023)
Print ISSN: 2423-6330/Online ISSN: 2476-7115
https://nbr.khu.ac.ir; Kharazmi University Press; DOI: 10.29252/nbr.10.3.219

کاهش اثرات سمی کروم در محیط رشد شاهسپرم توسط باکتری تصفیه‌کننده کروم

رعنا ولی زاده کامران[۱]، لمیا وجودی مهربانی[۲]، علی آریان[۱] و علیرضا تاری نژاد[۱]

[۱]گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران؛[۲]گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

مسئول مکاتبات: رعنا ولی زاده کامران، rana.valizadeh@gmail.com

چکیده. زیست پالایی یک استراتژی امیدوار کننده برای کاهش غلظت فلزات سنگینی است که با توسعه صنایع و کارخانه‌ها در خاک افزایش می‌یابند و تهدیدی برای محیط زیست و سلامتی انسان هستند. برای بررسی تاثیر فلز سنگین کروم وکاهش اثرات سمی آن توسط باکتری (در دو سطح بدون وجود باکتری و وجود باکتری در محلول هوگلند آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد و صفات ریخت شناسی، فیزیولوژیکی و عناصر گیاه درتیمارهای اعمال شده اندازه‌گیری شد. نتاج نشان داد صفات عملکرد گیاه، وزن تر، طول ساقه و طول برگ تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. عرض برگ، کلروفیل a، کلروفیل b و محتوی فسفر گیاه که تحت تنش کروم کاهش یافته بودند با تیمار باکتری، افزایش یافتند. هیدروژن پراکساید، مالون دی آلدیید، اسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پرولین، مواد محلول جامد، فنل، فلاونویید و آنتو سیانین و همچنین محتوای عناصر گیاه از قبیل کروم، ازت و پتاسیم در اثر تیمار کروم افزایش یافتند. با استفاده از باکتری در محیط کشت حاوی کروم، هیدروژن پراکساید و مالون دی آلدیید به طور معنی داری کاهش یافت که نشان از کاهش تنش اکسیداتیو بود. آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی و آنزیمی تیمارهای باکتری‌دار افزایش پیدا کردند که نشان از نقش باکتری در تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه داشت. محتوی کروم گیاه بعد از استفاده از باکتری کاهش پیدا کرد. نتایج حاصل نقش مثبت کاربرد باکتری تصفیه کننده کروم درمحیط کشت گیاه در کاهش اثرات منفی تنش فلز سنگین کروم را نشان داد.

واژه‌های کلیدی. آنزیم، زیست پالایی، عناصر، مالون دی‌آلدئید، مواد جامد محلول

Reducing the toxic effects of Chromium in the growing medium of costmary (*Tanacetum balsamita*) by means of chromium purifying bacteria

Rana Valizadeh Kamran[1], Lamia Vojodi Mehrabani[2], Ali Aryan[1] & Alireza Tarinejad[1]

[1]Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran; [2] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

Corresponding author: Rana Valizadeh Kamran, rana.valizadeh@gmail.com

Abstract. Bioremediation is a promising strategy to reduce the concentration of heavy metals that their increase in the soil was the result of the development of industries and factories in the area, threatening the environment and human health. To investigate the effect of the heavy metal chromium and the reduction of its toxic effects by bacteria (at two levels of the absence of bacteria and the presence of bacteria in Hoagland's solution), a factorial experiment was conducted as a completely randomized design with three replications and the morphological, physiological traits and plant elements were measured in the applied treatments. The results showed that the experimental treatments did not affect plant yield traits, fresh weight, stem length, and leaf length. Leaf width, chlorophyll a, b, and plant phosphorus content decreased under chromium stress and increased with bacterial treatment. Hydrogen peroxide, malondialdehyde, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, catalase, proline, solid soluble substances, phenol, flavonoid, and anthocyanin, as well as the content of plant elements such as chromium, nitrogen, and potassium, increased due to the chromium treatment. Using bacteria in the culture medium containing chromium, significantly decreased the hydrogen peroxide and malondialdehyde, indicating a reduction in the oxidative stress. The non-enzymatic and enzymatic antioxidants of plats in the bacterial treatments increased, indicating bacteria's role in strengthening the plant's

Received 20.04.2023/ Revised 22.06.2023/ Accepted 27.07.2023/ Published 20.11.2023

دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۳۱/ اصلاح: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱/ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶/ انتشار: ۱۴۰۲/۰۹/۲۹

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

antioxidant system. The chromium content of the plant decreased after the use of bacteria. The results showed the positive effect of using chromium-purifying bacteria in the environment of plant cultivation in reducing the harmful effects of chromium heavy metal stress.

Key words. Bioremediation, elemental content, enzyme, malondialdehyde, total soluble solid

مقدمه

شاهسپرم .*Tanacetum balsamita* L گیاهی چندساله از تیره آستراسه است. این گیاه حاوی متابولیت‌های ثانویه متعددی مانند اسانس‌ها، روغن‌های فرار، مشتقات فنیل پروپان، فلاونوئیدها، سزکوئی ترپن‌ها، لاکتون‌ها، تانن‌ها و الیگوالمنت‌ها است (Abad et al., 2006; Hassanpuor aghdam et al., 2022). شاهسپرم به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی و معطر بومی ایران به‌عنوان داروی مقوی قلب و ضد نفخ در طب سنتی استفاده می‌شود (Zargari, 1996).

استخراج معادن و توسعه صنایع مختلف (چرم‌سازی، آبکاری با کروم، ریخته‌گری استخراج معدن) موجب ورود انواع آلاینده‌ها مخصوصا فلزات سنگین به خاک و آب شده است. دوام بلند مدت بیولوژیکی فلزات سنگین در خاک موجب شده تا حضور آن‌ها در خاک به یکی از مشکلات عمده زیست محیطی تبدیل شود. وجود آلاینده‌های فلزی در خاک و ورود آنها به گیاه موجب شده تا فلزات سنگین وارد زنجیره غذای انسان شده و باعث بروز انواع مشکلات مرتبط با سلامتی انسان شوند. میزان ورود فلزات سنگین به داخل گیاه بستگی به گونه گیاهی، نقش این فلزات در تنظیم فعالیت‌های سوخت و سازی، ترشح اسیدهای آلی به محیط ریشه و تحرک عناصر غذایی در خاک دارد (Raklami et al., 2022). کروم عنصری غیر ضروری است که به دو شکل اکسید شده سه و شش ظرفیتی در محیط به‌صورت اکسی آنیون‌های کرومات یا دی‌کرومات وجود دارد. کروم شش ظرفیتی بسیار سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا است. کروم سه ظرفیتی در مقادیر بسیار اندک برای متابولیسم طبیعی کربوهیدرات، پروتئین و چربی لازم است و به عنوان بخشی از الیگوپپتیدی به نام کرومودولین موجب تسهیل اتصال انسولین به گیرنده‌هایش در سطح سلول می‌شود (Sreejayan et al., 2008). کروم شش ظرفیتی محلول در آب و بسیار سمی‌تر از کروم سه ظرفیتی است.کروم از طریق مهار انتقال سولفات از طریق غشای سلول و آسیب اکسیداتیو به بیومولکول‌ها و تولید گونه‌های فعال اکسیژن به موجودات زنده آسیب می‌رساند (GracePavithra et al., 2019; Stambulska et al., 2018). سطح بحرانی کروم در آب آبیاری ۰/۱ میکروگرم در لیتر، در خاک حدود ۵ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، در گیاه ۱۸-۰/۰۰۶ میلی‌گرم در کیلوگرم و در موجودات زنده ۱/۶-۰/۰۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم است (Shanker et al., 2005). استفاده گسترده از این فلز در صنایع مختلف موجب شده تا این فلز به یکی از آلاینده‌های اصلی محیط زیست تبدیل شود (Ojuederie & Babalola, 2017). یکی از چالش‌های اصلی در مدیریت محیط زیست حذف فلزات سنگین از محیط‌های آلوده به این عنصر است. متداول‌ترین تکنیک‌های پالاینده کروم شامل انعقاد معمولی، جذب با کربن فعال، جذب با مواد طبیعی، تعویض یونی و اسمز معکوس است (Ojuederie & Babalola, 2017). در سال‌های اخیر یکی از تکنیک‌های متداول در حذف فلزات سنگین استفاده از باکتری مقاوم به کروم است. از مقاوم‌ترین گونه‌های شناسایی شده باکتری می‌توان به ایشرشیا کولی سویه EC1704.2، ایکلای سویه O13، باسیلوس سرئوس سویه KRP007، کرونوباکتر ساکازاکی سویه M.D.E.NA5-10 اشاره کرد (Badri Gregari, 2017). میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در گیاه‌پالایی باید دارای توانایی زیست‌پالایی فلزات مانند پردازش فلز، جذب و خروج فلزات آلاینده، جذب زیستی، جذب داخل سلول و یا تشکیل کمپلکس و رسوب باشد تا باعث کاهش اثرات سمی فلز شوند (Stelting et al., 2010). باکتری‌ها از طریق سه مکانیسم در برابر فلزات سنگین مقاومت می‌کنند که عبارتند از تغییر در سیستم غشا و ایجاد پروتئین‌های انتقال‌دهنده برای بیرون راندن فلزات سمی، تجزیه فلزات سنگین در داخل یا خارج سلول با اتصال به برخی یون‌های معدنی و کاهش سمیت فلزات سنگین با استفاده از فعالیت آنزیمی (Cervantes & Silver, 1992). نتایج بررسی انجام شده در خصوص پالایش کروم توسط باکتری نشان داد که باکتری‌های استافیلوکوکوس آئروس سویه ۲۲، ایشرشیا کولی سویه MF179678.1 و کرونوباکتر ساکازاکی سویه B4A3 توانایی حذف یا کاهش کروم از محیط را دارند (Badri Gregari, 2017).

استفاده از باکتری به‌عنوان پالایشگر فلزات سنگین امروزه مورد توجه قرار گرفته است. افزایش جمعیت و تقاضا برای محصولات کشاورزی موجب شده تا کشاورزان درمناطقی که با محدودیت خاکی و آبی مواجهند اقدام به پرورش محصول کنند که این عمل باعث ایجاد تنش‌های غیرزیستی در گیاه شده و رشد و عملکرد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد. با توجه به افزایش تقاضا برای گیاهان دارویی و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها در بخش داروسازی لازم است تا نحوه تاثیر منابع خاکی و آبی آلوده به

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

فلزات سنگین بر رشد گیاهان بررسی شود. عدم توجه به مسائل زیست محیطی و جمع‌آوری گیاهان از منابع طبیعی موجب شده تا ایران سهم کمتری از صادرات گیاهان دارویی به دلیل تغییر در مواد موثره گیاهان دارویی را به خود اختصاص دهد. با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و فرآورده‌های حاصل از آن‌ها در اقتصاد کشور لازم است تا تدابیری در راستای کاهش این آلودگی‌ها از محیط زیست برداشته شود لذا هدف از بررسی حاضر ارزیابی حضور باکتری سویه ۶ (باکتری جدا سازی شده با توانایی پالایندگی کروم در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی) در محیط رشد ریشه شاهسپرم در محیط‌کشت آلوده به فلزات سنگین کروم است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش برای بررسی تاثیر باکتری پالاینده کروم سویه ۶ (در دو سطح بدون باکتری و با باکتری به میزان ۱۰ میلی لیتر باکتری با OD =۱,۵ در یک لیتر مایع هوگلند) و کروم موجود در محلول تغذیه (در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی در طی سال‌های ۱۴۰۰-۱۳۹۹ اجرا شد. گیاهان شاهسپرم مورد استفاده در بررسی حاضر بومی آذرشهر بود. ریزوم‌های یکنواخت گیاهی در گلدان‌های ۵ لیتری حاوی پرلیت دانه متوسط کشت شد. به‌منظور رشد گیاه، گیاهان به‌مدت یک ماه با محلول هوگلند تغذیه شدند.

تهیه باکتری

باکتری سویه ۶ پالاینده کروم از آزمایشگاه تحقیقاتی بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به صورت جامد تهیه و باکتری‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع کشت گردید. برای اطمینان از رشد باکتری در محلول هوگلند قبل از انجام تیمار، از محلول LB مایع که باکتری مورد نظر در آن رشد یافته بود به اندازه ۱۰ میلی‌لیتر با غلظت OD =۱,۵ به یک لیتر محلول هوگلند در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بدون شیک کردن اضافه شد و در ۳ بازه زمانی OD باکتری اندازه‌گیری شد بعد از سه ساعت OD=۰/۰۳، بعد از ۶ ساعت OD=۰/۰۴۵ و بعد از ۲۴ ساعت OD=۰/۱۷۸ شد و نشان داد که باکتری در محلول هوگلند رشد کرده است. بعد از حصول اطمینان از رشد باکتری در محلول هوگلند، در هر بار آبیاری، ۲۰ لیتر محلول هوگلند همراه با باکتری تازه رشد یافته تهیه و همراه با غلظت‌های مختلف کروم یا به تنهایی به بستر کشت اضافه شد.

اعمال تیمار و سطوح تیمار

آلودگی توسط کروم در سه سطح (صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر) انجام شد. ابتدا محلول ذخیره X ۱۰۰ کروم برای هر سطح تهیه و در گلخانه براساس تغذیه با محلول هوگلند به میزان محلول مصرفی، رقیق شده و در اختیار گیاه قرار گرفت.

در بررسی حاضر محلول هوگلند به دو صورت هوگلند خالص و هوگلند باکتری‌دار تهیه و در زمان تغذیه گیاه غلظت کروم مورد نظر اعمال شد (جدول ۱). گیاهان به مدت ۴ هفته تحت تاثیر تیمارها قرار گرفتند. تغذیه گیاهان هر سه روز یکبار انجام برای هر تیمار ۹ گلدان در سه تکرار در نظر گرفته شد. لازم به‌ذکر است که ابتدا تغذیه گیاه به مدت یک ماه تا سبز شدن جوانه‌های موجود روی ریزوم با محلول هوگلند خالص انجام و سپس تحت تاثیر تیمارها قرار گرفتند.

جدول ۱- تیمارهای اعمال شده.

Table 1. Treatments applied in the study.

Treatment	Number of Treatment
Pure Hoagland (Control)	T1
Pure Hoagland + 100mg per liter of chromium	T2
Pure Hoagland + 200mg per liter of chromium	T3
Bacterial Hoagland	T4
Bacterial Hoagland + 100mg per liter of chromium	T5
Bacterial Hoagland + 200mg per liter of chromium	T6

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

اندازه گیری صفات ریخت شناختی

برای هر تیمار ۳ گلدان در نظر گرفته شده بود. نمونه‌گیری از برگ‌های موجود در قسمت میانی گیاه انجام شد. از مهم‌ترین صفات رشدی اندازه‌گیری شده می‌توان به: طول ساقه، طول برگ، عرض برگ، وزن تر و عملکرد اندام هوایی اشاره نمود. برای اندازه‌گیری عملکرد اندام هوایی، گیاهان برداشت شده در آون در دمای ۳۵ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت چهار روز خشک شدند سپس وزن آن‌ها با ترازوی دیجیتال (BB141, Boero, Germany) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک نمونه‌ها بلافاصله بعد از برداشت در فویل آلومینیومی پیچیده شد و در نیتروژن مایع به آزمایشگاه منتقل شد.

محتوای مواد جامد محلول کل

محتوای مواد جامد محلول با استفاده از رفرکتومتر دستی (Erma, Tokyo, Japan) اندازه‌گیری شد.

محتوای کلروفیل

محتوای کلروفیل a در طول موج ۶۶۵ نانومتر و کلروفیل b در ۶۴۵ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر (T80+, Beijing, China) تعیین شد. بدین منظور ۰/۵ گرم بافت برگی در دی-متیل سولفوکساید (DMSO, Sigma Aldrich, Germany) به مدت ۴ ساعت در ۶۵ درجه‌سانتی‌گراد در تاریکی استخراج و نتایج بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر برگ بیان شد (Prochazkova et al., 2001).

محتوای هیدروژن پراکساید

ابتدا ۰/۵ گرم نمونه برگ شاهسپرم در نیتروژن مایع پودر و سپس با ۵ میلی‌لیتر TCA یک درصد حجمی (حجمی/ وزنی) مخلوط شد. روی ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول رویی، ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۱۰ میلی مولار با pH:۷/۵ اضافه و در مرحله بعد یک میلی‌لیتر پتاسیم یوداید یک مولار به محلول اضافه شد. میزان جذب نمونه‌ها در ۳۹۰ نانومتر به کمک اسپکتروفتومتر قرائت شد (Amaranathareddy et al., 2015).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم روی ۰/۵ گرم بافت برگی ۵۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH حدود ۷/۵ اضافه شد. ۰/۱ میلی‌مولار از محلول EDTA، ۷۵ میکرومولار نیتروبلوتترازولیوم، ۱۳ میکرومولار متیونین و ۴ میکرومولار ریبوفلاوین به بافر اضافه و محلول درتاریکی نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در ۵۶۰ نانومتر به‌کمک اسپکتروفتومتر قرائت شد (Giannopolitis & Ries, 1977). با استفاده از فرمول زیر میزان درصد فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز برای هر نمونه محاسبه شد. فعالیت سوپراکسیددیسموتاز مساوی است با OD نمونه منهایOD کنترل تقسیم بر OD کنترل ضربدر عدد ۱۰۰.

اندازه‌گیری محتوای کاتالاز

برای اندازه‌گیری فعالیت کاتالاز برگ شاهسپرم، ۰/۵ گرم از برگ در بافر فسفات پتاسیم سرد ۰/۱ مولار (pH:۷/۵) حاوی ۰/۵ میلی‌مولار EDTA هموژنیزه شد. ۰/۰۵ میلی لیتر از محلول رویی با ۱/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۱ میلی مولار (pH:۷) و ۱/۴۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط گردید. واکنش با افزودن ۰/۵ میلی‌لیتر هیدروژن پراکساید ۷۵ میلی-مولار آغاز شد. جذب نمونه‌ها در طیف ۲۴۰ نانومتر در مدت یک دقیقه توسط اسپکتروفتومتر ثبت گردید (Luhova et al., 2003). میزان فعالیت آنزیم با استفاده ازضریب خاموشی $۳۹,۴mM^{-1}\ cm^{-1}$ و با استفاده از فرمول زیر بر اساس سرعت مصرف هیدروژن پراکسید در دقیقه محاسبه گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز مساوی است با اختلاف جذب تقسیم بر عدد ۳۹/۵ ضرب در ۱۰۰.

فعالیت اسکوربات پراکسیداز

۰/۱ گرم از بافت برگ همراه ازت مایع در بافر Tris-HCL (۵۰ میلی‌مولار با اسیدیته برابر با ۷/۸) له و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از جداسازی فاز رویی، فعالیت آنزیمی در حضور ۵۰ میلی‌مولار بافر سدیم فسفات سرد (اسیدیته=۷)، ۰/۵ میلی‌مولار آسکوربات، ۰/۱ میلی‌مولار هیدروژن پراکساید و ۰/۱ میلی‌مولار EDTA در حجم نهایی ۰/۳ میلی‌لیتر ارزیابی شد. با افزودن هیدروژن پراکساید فعالیت آنزیمی آغاز شد. جذب نمونه در طول موج ۲۹۰ نانومتر در فاصله‌های زمانی ۴۰ ثانیه ثبت گردید (Braga et al., 2009). نتایج حاصل در ضریب خاموشی مولی ۲/۸ میلی‌مول بر سانتی‌متر ضرب شد تا فعالیت آنزیم محاسبه شود.

اندازه‌گیری محتوای مالون دی‌آلدئید

روی ۰/۲ گرم برگ شاهسپرم ۵ میلی‌لیتر TCA یک درصد اضافه شد. محلول حاصل در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۴ میلی‌لیتر از مخلوط TCA 20% + TBA0.5 % مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه گرم شد. جذب نمونه‌ها به کمک اسپکتروفتومتر (T80+, China) در طول موج‌های ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت گردید (Heath & Packer, 1968). در طول موج ۵۳۲ ماده مورد نظر کمپلکس قرمز TBA-MDA است. جذب بقیه رنگیزه‌های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین می‌شود و از این مقدار کسر گردید (Heath & Packer, 1968).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

اندازه‌گیری عناصر برگ

برای اندازه‌گیری عنصر پتاسیم برگ شاهسپرم از روش فلایم فتومتری (Corning, 410, England) استفاده و از دستگاه جذب اتمی (Corning, 410, England)، برای اندازه‌گیری محتوای کروم استفاده شد (AOAC, 1990). نیتروژن نمونه‌ها به روش کجلدال و محتوای فسفر به روش کالریمتری (رنگ زرد مولیبدات وانادات) تعیین شد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از عصاره حاصل از هضم اسیدی با ۵ میلی‌لیتر آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط و به حجم ۱۵ میلی‌لیتر رسید. جذب نمونه در ۴۷۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (T80+, China) قرائت شد (Chapman & Pratt, 1961).

تعیین میزان پرولین

روی ۰/۲ گرم از نمونه برگ شاهسپرم، ۵ میلی‌لیتر سولفوسالسیلیک اسید ۳ ٪ اضافه شد. یک میلی لیتر از محلول‌رویی با یک میلی‌لیتر نین هیدرین اسید و یک میلی‌لیتر استیک اسید مخلوط و سپس نمونه‌ها به‌مدت یک ساعت در حمام آب ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری غلظت پرولین، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتوفتومتر (T80,China) در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت و از تولوئن به عنوان شاهد برای قرائت نمونه‌ها استفاده شد (Bates et al., 1973).

محتوای فنل و فلاونوئید کل

برای اندازه‌گیری فنل کل ابتدا ۰/۵ گرم از بافت برگی توسط متانول عصاره‌گیری شد. میزان فنل‌کل نمونه‌ها با استفاده از معرف فولن سیکالتو به روش Kim و همکاران در ۷۵۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (T80+, China) اندازه‌گیری شد. از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد برای ارزیابی محتوای ترکیبات فنلی استفاده شد. محتوای فنل کل برحسب میلی گرم اکی والانهای گالیک اسید در ۱۰۰ گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید بیان گردید. برای اندازه‌گیری محتوای فلاونوئید کل از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم استفاده شد. در لوله آزمایش ۵۰ میکرولیتر عصاره با ۱ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید و سپس ۰/۰۷۵ میلی لیتر نیتریت سدیم (۵٪) به آن اضافه شد و بعد از ۵ دقیقه ۰/۱۵ میلی لیتر محلول AlCl3 (۱۰٪) اضافه شد و پس از گذشت ۶ دقیقه ۰/۵ میلی لیتر NaOH (۱ مولار) اضافه گردید و حجم نهایی محلول با آب مقطر به ۳ میلی لیتر رسانده شد. و شدت رنگ صورتی پدیدار شده در محلول در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر قرائت شد، محتوای فلاونوئیدی کل بر حسب میلی گرم اکی والانهای کوئرستین موجود در ۱۰۰ گرم عصاره با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین بیان گردید (Kim et al., 2006).

اندازه‌گیری آنتوسیانین کل

۰/۰۵ گرم از برگ شاهسپرم در ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول: هیدروکلرویک اسید ۹۹:۱ حجمی-حجمی) سائیده و به‌مدت ۲۴ ساعت در محیط تاریک در دمای اتاق قرار گرفت. عصاره حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب محلول رویی بعد از ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در طول موجهای ۵۳۰ و ۶۵۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و میزان آنتوسیانین کل از رابطه A=A530-(0.25×A657) محاسبه شد (Wagner, 1979). A530، A657 به ترتیب نشان دهنده میزان آنتوسیانین کل، جذب در طول موج ۵۳۰ و جذب در طول موج 657 نانومتر است.

طرح آزمایشی و آنالیز داده‌های آماری

بررسی حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار اجرا شد. برای تجزیه داده‌ها از برنامه‌های آماریMSTAT-C وSPSS نسخه ۱۹ استفاده و میانگین‌داده‌ها با استفاده ازآزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه شد.

نتایج و بحث

صفات رشدی و عملکرد

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که صفات وزن تر و عملکرد گیاه، طول ساقه و طول برگ تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت اما عرض برگ تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (P-value ≤ 5%). بالاترین میانگین عرض برگ در شرایط بدون تنش کروم و بدون کاربرد باکتری، و محلول هوگلند حاوی باکتری + ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم مشاهده شد (جدول ۲). برخلاف نتایج حاصل از بررسی حاضر که محتوای کروم و محلول تغذیه‌ای وزن تر و خشک گیاه را تحت تاثیر قرار نداد، در بررسی انجام شده در گیاه خرفه مشخص شد که تنش شوری و کاربرد کروم موجب کاهش وزن تر و خشک گیاه، محتوای کلروفیل و کارای فتوسیستم II شد در حالیکه نشت یونی سلول افزایش یافت (Talebzadeh et al., 2022). نتایج مشابهی در خصوص کاهش وزن‌خشک گیاه در اثر کاربرد کروم در گیاه گزارش شد (Joshi et al., 2019). کروم در غلظت‌های بسیار پایین اثر تحریک بر رشد را دارد (Samantaray et al., 1998) اما در غلظت‌های بالا اثر سمی بر گیاه دارد و از طریق مهار رشد گیاه موجب کاهش بیوماس گیاه می‌شود (Pirouz & Kalantari, 2013).

محتوای کلروفیل

محتوای کلروفیل a برگ تحت تاثیر تیمار بدون کاربرد کروم +محلول هوگلند حاوی باکتری قرار گرفت. کمترین مقدار کلروفیل

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

a در تنش کروم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بدون کاربرد باکتری در محلول هوگلند مشاهده شد. تیمارهای تغذیه با محلول هوگلند بدون باکتری و با باکتری در شرایط بدون تنش کروم موجب افزایش محتوای کلروفیل b گردد (جدول ۲). کاهش در محتوای کلروفیل در اثر تنش شوری و کاربرد کروم در گیاه خرفه گزارش شد (Talebzadeh et al., 2022). در تحقیقی دیگر کاهش در محتوای کلروفیل و کاروتنوئید در اثر تنش کروم در آفتابگردان (Pirouz & Kalantari, 2013) و خرفه (Rahbarian, 2019) گزارش شده است. نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده با نتایج حاصل از بررسی حاضر مطابقت دارد. شاید یکی از دلایل کاهش محتوای کلروفیل و سایر رنگیزه‌های فتوسنتزی در اثر تنش ناشی از کروم، مربوط به کاهش فعالیت آنزیم‌های درگیر در بیوسنتز کلروفیل، کاهش تثبیت کربن دی‌اکسید، کاهش فتوفسفوریلاسیون، اختلال در انتقال الکترون و جایگزینی فلز کروم شش ظرفیتی به جای کاتیون منیزیم در جایگاه فعال روبیسکو و سایر آنزیم‌ها باشد (Rahbarian, 2019). از دلایل دیگر کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در اثر تنش کروم می‌توان به کاهش سطح سیستئین، تیول غیرپروتئینی و کاروتنوئید در گیاه اشاره کرد (Rahbarian, 2019). رنگیزه‌های فتوسنتزی مخصوصا کاروتنوئیدها به عنوان محافظ اجزای فتوسنتزی در مقابل تنش‌های اکسیداتیو عمل می‌کنند و به این طریق به بقای گیاه تحت شرایط تنش کمک می‌کنند.

محتوی مالون دی‌آلدئید و هیدروژن پراکساید

تنش فلز کروم و نوع محلول هوگلند (با باکتری و بدون باکتری) محتوای مالون دی‌آلدئید برگ را تحت تاثیر قرار داد. براساس نتایج حاصل بالاترین محتوای مالون دی‌آلدئید در تغذیه با محلول هوگلند بدون باکتری + ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم مشاهده شد. براساس نتایج حاصل کاربرد باکتری در محلول غذایی تحت شرایط وجود کروم در محیط نقش مهمی در کاهش محتوای مالون دی‌آلدئید گیاه داشت (جدول ۲). بیشترین محتوای هیدروژن پراکساید در تیمار کروم ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر در محلول هوگلند بدون باکتری مشاهده شد. کاربرد باکتری در محلول تغذیه موجب کاهش اثرات منفی کروم در گیاه گردید (جدول ۲). ارتباط مستقیمی بین افزایش تنش اکسیداتیو (پراکسیداسیون لیپدها و تولید هیدروژن پراکساید) و غلظت فلزات سنگین در محیط وجود دارد. با افزایش پراکسیداسیون چربی‌های غشا شاخص آسیب اکسیداتیو افزایش یافته و عملکرد غشای پلاسمایی را تحت تاثیر قرار می‌دهد و در صورت ادامه شرایط تنش‌زا موجب مرگ سلول می‌شود (Chatterjee et al., 2015). نتایج بررسی انجام شده در آفتابگردان نشان داد که با افزایش کروم در محیط بر محتوای مالون دی‌آلدئید در گیاه افزوده شد (Rahbarian, 2019). سمیت کروم موجب آسیب به ماکرومولکول‌های موجود در سلول، فتوسیستم II و کاهش کارآیی آن می‌شود. افزایش انتقال الکترون در زنجیره انتقال الکترونی فتوسنتزی و کاهش کارآیی فتوسنتز می‌شود و انرژی زیاد تولید شده ناشی از انتقال الکترون بخشی به صورت فلورسانس هدر رفته و باعث کاهش کارآیی فتوسنتز می‌شود و بخش از الکترون تولید شده روی مولکول‌های اکسیژن انتقال یافته و موجب تولید گونه‌های اکسیژن فعال (هیدروژن پراکساید، اکسیژن منفرد و آنیون هیدروکسیل)، ایجاد تنش اکسیداتیو و بهم ریختگی کلروپلاست می‌شود (Rafiei, 2016; Maxwell & Johnson, 2000). از دیگر اثرات تنش کروم در گیاه می‌توان به آسیب به غشای سلول، تجزیه یا غیرفعال شدن مواد ژنتیکی سلول، تجزیه پروتئین جلوگیری از تقسیم و رشد سلول و اختلال در فعالیت آنزیمی گیاه اشاره نمود (Wakeel et al., 2020). محتوای مالون‌دی‌آلدئید تولید شده در اثر تنش کروم نشان‌دهنده آسیب وارده به غشای سلول است. نتایج حاصل از بررسی حاضر نشان داد که در غلظت کم کروم سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه قادر به کاهش اثرات تنش است اما با افزایش غلظت کروم اثرات تنش در گیاه مشاهده شد.

فعالیت آنزیم کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و آسکوربات پراکسیداز

فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و آسکوربات پراکسیداز تحت تاثیر اثر متقابل باکتری و کروم قرار گرفت (P- Value ≤ 5%). بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز در محلول هوگلند حاوی باکتری حاصل شد با افزایش کروم به محیط کشت گیاه از فعالیت آنزیم کاتالاز کاسته شد (جدول ۲). افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم به محیط کشت در شرایط تغذیه با محلول هوگلند بدون باکتری و با باکتری موجب افزایش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز شد (جدول ۲). ارزیابی مطالعات متعدد نشان داده است که در غلظت‌های کم فلزات سنگین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گیاه برای کاهش اثرات تنش در گیاه افزایش می‌یابد اما با افزایش غلظت فلزات سنگین در محیط از فعالیت آنزیم‌ها کاسته می‌شود (Kumar et al., 2016). گیاهان در پاسخ به محرک‌های تنش‌زا مانند فلزات سنگین سیستم آنزیمی پیچیده و سازمان یافته‌ای را تولید می‌کنند. رادیکال‌های سوپراکسید تولید شده در اثر تنش کادمیوم توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز تبدیل به هیدروژن پراکساید می‌شود و این ماده تولید شده توسط آنزیم‌های اسکوربات پراکسیداز و کاتالاز به آب تبدیل و به این طریق از سمیت کروم در گیاه کاسته می‌شود (Wakeel et al., 2020). نتایج مشابهی در خصوص کاهش اثرات منفی کروم در اثر پالایش با باکتری در صنایع چرم‌سازی و دباغی مشاهده شد (Yaktamanesh et al., 2021). باکتری‌های مقاوم به کروم حاوی آنزیم‌های کرومات رداکتاز هستند که با تبدیل کروم شش ظرفیتی به کروم سه

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

ظرفیتی موجب کاهش اثرات سمی کروم شش ظرفیتی بر محیط زیست می‌شود (Thatoi et al., 2014). از علائم سمیت کروم برای گیاهان می‌توان به کاهش رشد، نکروزه شدن برگ، کاهش فعالیت آنزیمی، اختلال در جذب و انتقال مواد غذایی در گیاه، آسیب به سیستم ریشه، کاهش فتوسنتز، اکسیداسیون غشای سلول و آسیب به DNA را اشاره نمود (Guo et al., 2021). وجود گروه‌های عاملی متعدد روی سطح باکتری، سطحی فعال را برای جذب عناصر سنگین از محیط‌های آلوده را فراهم می‌کند. این توانایی در جذب فلزات سنگین مسیر جدیدی را برای مبارزه با آلودگی‌های محیطی با هزینه کم را فراهم می‌کند (Ayele & Godeto, 2021).

محتوای فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین

محتوای فنل کل، فلاونوئید (P- Value ≤ 5%) و آنتوسیانین (P- Value ≤ 1%) تحت تاثیر اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی قرار گرفت. براساس نتایج حاصل بالاترین محتوای فنل کل در تیمار کاربرد ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم در شرایط بدون کاربرد باکتری و تیمار کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم با کاربرد باکتری حاصل شد. بالاترین محتوای فلاونوئید در تیمار کاربرد ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم با کاربرد باکتری حاصل شد. کاربرد ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم در شرایط با محلول هوگلند حاوی باکتری موجب افزایش محتوای آنتوسیانین گیاه شد. کمترین محتوای آنتوسیانین در تیمار بدون کاربرد کروم و باکتری در محلول غذایی حاصل شد (جدول ۳). در مواجه با شرایط تنش‌زا گیاهان از سیستم‌های دفاع آنزیمی و غیرآنزیمی استفاده می‌کنند که با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد موجب محافظت از گیاه در مقابل تنش می‌شود. سیستم دفاع غیرآنزیمی شامل تولید ترکیبات فنلی، پرولین، توکوفرول، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین است که با در اختیار قرار دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد آن‌ها را به فرم پایدار خود تبدیل می‌کنند (Tripathi et al., 1999). باکتری‌ها به‌دلیل نسبت بالای سطح به حجم و افزایش مکان‌های پذیرنده فلزات سنگین در سطح خود به دلیل وجود تیوشویک اسید (teichoic acid) قادرند مقادیر بالایی از فلزات سنگین را به‌خود جذب کرده و موجب کاهش اثرات سمی آن‌ها در محیط شوند. اندازه کوچک باکتری، امکان رشد آن‌ها در شرایط هوازی و غیرهوازی و مقاومت آن‌ها در برابر تنش‌های محیطی، آن‌ها را به یکی از بهترین میکروارگانیسم‌های پالاینده محیط زیست تبدیل کرده است (Ayele & Godeto, 2021).

محتوای پرولین کل و محتوای مواد جامد محلول

اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی محتوای پرولین کل و محتوای مواد جامد محلول را تحت تاثیر قرار داد (P- Value ≤ 5%) و بالاترین محتوای مواد جامد محلول در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم حاصل شد. کاربرد ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم در شرایط بدون کاربرد باکتری موجب افزایش محتوای پرولین گیاه شد. کمترین محتوای پرولین در تیمار بدون کاربرد کروم و باکتری در محلول غذایی حاصل شد (جدول ۳). تحت شرایط تنش تولید آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی مانند پرولین و مواد جامد محلول کل نقش مهمی در حفاظت از ماکرومولکول‌های گیاه در مقابل سمیت کروم را دارد. نتایج کاربرد هفت غلظت کروم در خاک مورد استفاده در رشد آفتابگردان نشان داد که با افزایش غلظت کروم به ۱۰ میلی-مولار غلظت پرولین افزایش یافت. به‌نظر می‌رسد افزایش اسمولیت‌ها در اثر تنش فلزات سنگین در گیاه موجب حفظ تعادل آبی، از بین بردن رادیکال‌های آزاد و حفظ پروتئین‌ها در گیاه می‌شود و به افزایش مقاومت گیاه در مقابل تنش کمک می‌کند (Pirouz & Kalantari, 2013).

محتوای عناصر موجود در برگ شاهسپرم (نیتروژن، پتاسیم، کروم و فسفر)

محتوای کروم و فسفر تحت تاثیر اثرات متقابل تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (P- Value ≤ 1%). براساس نتایج حاصل بیشترین محتوای کروم در تیمار ۲۰۰ میلی‌لیتر کروم بدون کاربرد باکتری مشاهده شد. تیمار بدون کروم و بدون باکتری موجب افزایش محتوای فسفر گیاه گردد (جدول ۴). محتوای ازت و پتاسیم فقط تحت تاثیر اثر مستقل تیمار فلز سنگین کروم قرار گرفت (P- Value ≤ 1%). بالاترین مقدار هر دو عنصر در تیمار بدون کروم و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کروم مشاهده شد با افزایش محتوای کروم به ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر از محتوای هر دو عنصر کاسته می‌شود (جدول ۵). وجود فلز سنگین کروم در هر دو محلول غذایی (با باکتری و عدم وجود آن) موجب کاهش فسفر گیاه شد (جدول ۴). در بررسی اثر هفت غلظت متفاوت کروم مورد استفاده در پرورش گیاه آفتابگردان مشخص شد که با افزایش غلظت کروم در محیط کشت گیاه بر غلظت این عنصر در برگ گیاه افزوده و بالاترین غلظت کروم در تیمار ۱۰ میلی‌مول کروم مشاهده شد که موجب تجمع حدود ۴۵ میلی‌گرم در کیلوگرم (وزن‌خشک گیاه)کروم در برگ می‌شود (Pirouz & Kalantari, 2013). با افزایش فعالیت‌های انسانی و صنایع مختلف میزان کروم وارد شده به خاک افزایش می‌یابد. عمده‌ترین فرم کروم در خاک CrO_4^{2-} و $Cr_2O_4^{2-}$ است که به راحتی جذب گیاه شده و همچنین به سرعت به اعماق خاک نفوذ و وارد آب‌های زیززمینی می‌شود و موجب آلودگی محیط زیست می-شود. گیاهان فاقد ناقل اختصاصی برای انتقال کروم است و این عنصر از طریق ناقل‌های سولفات، فسفر و آهن در گیاه انتقال می‌یابد که به این طریق موجب اختلال در جذب عناصر غذایی می‌شود (Kumar et al., 2016).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

جدول ۲- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محلول هوگلند (بدون باکتری و با باکتری) و فلز سنگین کروم بر عرض برگ و صفات فیزیولوژیک شاهسپرم.

Table 2. Mean Comparison for Interaction effects of Hoagland's solution type (without bacteria and with bacteria) and heavy metal chromium on leaf width and physiological traits of costmary.

Malondialdehyde content ($nmol^{-1}g$ FW)	Catalase activity ($units^{-1}$ mg protein)	Ascorbic acid content (mg $100g^{-1}$ FW)	Superoxide dismutase activity ($units^{-1}$ mg protein)	H_2O_2 Content ($\mu mol^{-1}g$ FW)	Chl b Content (mg g^{-1} FW)	Chl a Content (mg g^{-1} FW)	Leaf Width (Cm)	Treatments
41^{e}	42^{c}	0.67^{e}	2^{e}	0.2^{e}	1^{a}	1.67^{b}	3.467^{a}	T1
53^{c}	47^{b}	0.9^{cd}	4.34^{c}	1.1^{bc}	0.7^{b}	1.33^{c}	2.567^{b}	T2
67^{a}	44^{c}	1.267^{a}	8.67^{a}	1.567^{a}	0.5^{c}	1^{d}	2.167^{b}	T3
40^{e}	61^{a}	$0.8d^{e}$	3^{d}	0.5^{d}	1.1^{a}	2^{a}	3.23^{ab}	T4
49^{d}	48^{b}	1.033^{bc}	6^{b}	0.9^{c}	0.7^{b}	2^{a}	3.734^{a}	T5
60^{b}	50^{b}	1.1^{b}	8.34^{a}	1.2^{b}	$0.7\cdot^{b}$	1.33^{c}	2.65^{b}	T6

T1= هوگلند خالص (شاهد)
Pure Hoagland (Control)
T2= هوگلند خالص + ۱۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Pure Hoagland + 100mg per liter of chrom
T3= هوگلند خالص + ۲۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Pure Hoagland + 200mg per liter of chrom
T4= هوگلند باکتری دار
Bacterial Hoagland
T5=هوگلند باکتری‌دار + ۱۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Bacterial Hoagland + 100mg per liter of chromium
T6=هوگلند باکتری‌دار + ۲۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Bacterial Hoagland + 200mg per liter of chromium

اختلاف معنادار آماری بین تیمارها با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.
Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محلول هوگلند (بدون باکتری و با باکتری) و فلز سنگین کروم بر محتوای پرولین، فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین شاهسپرم.

Table 3. Mean Comparison for Interaction effects of Hoagland's solution type (without bacteria and with bacteria) and heavy metal chromium on the content of proline, phenol, flavonoid and anthocyanin in costmary.

Dissolved solids content (0 Brix)	Anthocyanin content (mg g^{-1} FW)	Flavonoids content (mg g^{-1} FW)	Total phenolics content (mg g^{-1} FW)	Proline Content ($\mu mol\ g^{-1}$ FW)	Treatments
0.57^{cd}	0.03^{c}	3.2^{c}	18^{d}	1.2^{d}	T1
2^{a}	0.07^{b}	5^{b}	25^{c}	4.2^{ab}	T2
0.7^{c}	0.05^{c}	4.6^{bc}	41^{a}	5.6^{a}	T3
1^{b}	0.08^{b}	1.4^{d}	27^{c}	1.9^{d}	T4
0.47^{d}	0.1^{a}	7.8^{a}	44^{a}	3.4^{b}	T5
0.57^{cd}	0.12^{a}	6.7^{ab}	38^{b}	2.8^{c}	T6

T1= هوگلند خالص (شاهد)
Pure Hoagland (Control)
T2= هوگلند خالص + ۱۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Pure Hoagland + 100mg per liter of chrom
T3= هوگلند خالص + ۲۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Pure Hoagland + 200mg per liter of chrom
T4= هوگلند باکتری دار
Bacterial Hoagland
T5=هوگلند باکتری‌دار + ۱۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Bacterial Hoagland + 100mg per liter of chromium
T6=هوگلند باکتری‌دار + ۲۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Bacterial Hoagland + 200mg per liter of chromium

کروم نقش بسیار مهمی در کاهش جذب عناصر غذایی از خاک را دارد و موجب کاهش رشد گیاه و اختلال در فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می‌شود (Elahi et al., 2020). بازداری از فعالیت H+ATPase متصل به غشا از دیگر اثرات سمیت کروم در گیاه است که موجب اختلال در جذب مواد غذایی می‌شود. کاهش در جذب مواد غذایی مانند ازت، فسفر و پتاسیم در نتیجه

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

کاهش رشد ریشه در اثر تنش اتفاق می‌افتد (Kumar et al., 2016). اثرات ناشی از سمیت کروم در گیاه به‌صورت کلروز و نکروز مشاهده می‌شود (Jobby et al., 2018). دخالت در جذب و انتقال عناصر غذایی، اختلال در فتوسنتز، کاهش عملکرد گیاه و جلوگیری از جوانه زنی بذر از دیگر اثرات وجود کروم در خاک است (Ayele & Godeto, 2021). نتایج حاصل از بررسی حاضر نیز در تایید نتایج ذکر شده فوق در خصوص کاهش جذب عناصر غذایی در گیاه در اثر وجود کروم در محیط است. با توجه به اینکه شاهسپرم گیاهی دارویی است که به‌صورت‌های مختلف مورد مصرف قرار می‌گیرد لذا ارزیابی تجمع فلز کروم در بخش هوایی گیاه حائز اهمیت است.

تجمع فلزات سنگین در بخش هوایی گیاه موجب ورود آن‌ها به زنجیره غذایی انسان شده و صدمات جبران‌ناپذیری را به سلامت انسان وارد می‌کند. نتایج مشابهی در خصوص کاهش محتوای کروم موجود در پساب کارخانه‌چرم سازی در اثر استفاده از باکتری H1D در خوزستان گزارش شد (Yaktamanesh et al., 2021). آلودگی منابع آبی به فلزات سنگین تهدیدی جدی برای سلامت بشر، مزارع کشاورزی، موجودات آبزی و گیاهان است که لزوم انجام تحقیقات بیشتر را برای حذف آلاینده‌ها از محیط زیست با هزینه کم و مقرون به صرفه را می‌طلبد (Ayele & Godeto, 2021).

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرات متقابل نوع محلول هوگلند (بدون باکتری و با باکتری) و فلز سنگین کروم بر محتوای عناصر شاهسپرم.

Table 4. Mean Comparison for Interaction effects of Hoagland's solution type (without bacteria and with bacteria) and heavy metal chromium on the elements content of costmary.

P content (mg Kg^{-1})	Chromium(mg Kg^{-1})	Treatment
63.77^{c}	0.2577^{cd}	T1
70.28^{bc}	0.4253^{c}	T2
71.86^{bc}	2.058^{a}	T3
91.46^{a}	0.178^{d}	T4
78.15^{b}	0.339^{cd}	T5
68.83^{c}	1.503^{b}	T6

T1= هوگلند خالص (شاهد)
Pure Hoagland (Control)
T2= هوگلند خالص + ۱۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Pure Hoagland + 100mg per liter of chrom
T3= هوگلند خالص + ۲۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Pure Hoagland + 200mg per liter of chrom
T4= هوگلند باکتری دار
Bacterial Hoagland
T5=هوگلند باکتری‌دار + ۱۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Bacterial Hoagland + 100mg per liter of chromium
T6=هوگلند باکتری‌دار + ۲۰۰میلی گرم در لیتر کروم
Bacterial Hoagland + 200mg per liter of chromium

اختلاف معنادار آماری بین تیمارها با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.
Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters

جدول ۵- مقایسه میانگین سطوح فلز سنگین کروم بر محتوای عناصر شاهسپرم.

Table 5. Mean Comparison for the heavy metal chromium levels on the content of costmary elements

N content (%DW)	K content (g Kg^{-1})	Treatment (Chromium levels)
2.888۲^{a}	964^{a}	0
2.920^{a}	971.7^{a}	100
2.347^{b}	717.2^{b}	200

اختلاف معنادار آماری بین تیمارها با حروف لاتین متفاوت نشان داده شده است.
Significant differences among treatments are indicated by the different Latin letters.

نتیجه‌گیری کلی

زیست‌پالایی با استفاده از میکروارگانیسم‌ها روشی کارآمد و ارزان برای حذف فلزات سنگین از محیط و گیاه است. نتایج حاصل نشان داد که افزودن کروم به محیط کشت به عنوان یک تنش باعث افزایش هیدروژن پراکساید و مالون دی آلدیید در گیاه شاهسپرم شد و گیاه با افزایش مقدار آنتی اکسیدانهای

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

آنزیمی و غیرآنزیمی خود از قبیل اسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، پرولین، مواد محلول جامد، فنل، فلاونویید و آنتو سیانین به مقابله با تنش پرداخت. همچنین محتوای عناصر گیاه از قبیل کروم، ازت و پتاسیم افزایش یافت. عرض برگ، مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و محتوی فسفر گیاه در اثر تنش کروم کاهش یافت. با افزودن باکتری تصفیه کننده به محیط حاوی کروم هیدروژن پراکساید و مالون دی آلدیید به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین مقدار پرولین و مواد جامد محلول نیز کاهش یافت. آنتی اکسیدان های آنزیمی سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز در هر دوسطح کروم ۱۰۰ و ۲۰۰ همراه با باکتری، افزایش یافت ولی اسکوربات پراکسید فقط در سطح کروم ۱۰۰ همراه باکتری افزایش یافت. آنتی اکسیدان های غیرآنزیمی مانند فنل، فلاونویید و آنتوسیانین نیز در تیمارهای باکتری‌دار افزایش پیدا کردند که نشان از نقش باکتری در تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاه داشت. تنش کروم باعث کاهش محتوی فسفر گیاه شده بود که استفاده از باکتری باعث افزایش آن شد. مهمترین مورد کاهش محتوی کروم گیاه بعد از استفاده از باکتری بود. در کل چنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که کاربرد باکتری در محلول‌غذایی تاثیر مثبت در کاهش اثرات منفی تنش کروم در گیاه را داشت.

سپاسگزاری

از دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر حمایت‌های اجرایی پژوهش حاضر کمال تشکر و قدردانی را داریم.

REFERENCES

Abad, M. J., Bermejo, P. & Villar, A. 2006. An approach to the genus *Tanacetum* L. (Compositae): phytochemical and pharmacological review. Phytotherapy Research 9: 79-92.

Jobby, R., Jha, P., Yadav, A.K. & Desai, N. 2018. Biosorption and biotransformation of hexavalent chromium [Cr(VI)]: a comprehensive review. Chemosphere 207: 255-266.

Amaranathareddy, V., Lokesh, U., Venkatesh, B. & Sudhakar, C. 2015. Pb-stress induced oxidative stress caused alterations in antioxidant efficacy in two ground nut (*Arachis hypogaea*, L.) cultivars. Agricultural Sciences 6: 1283-1297.

Ayele, A. & Godeto, Y.G. 2021. Bioremediation of chromium by microorganisms and its mechanisms related to functional groups. Journal of Chemistry 1-21.

Badri Gregari. 2017. Isolation and identification of bacteria with the ability to purify chromium from the environment. Master's thesis of the Faculty of Agriculture. Shahid Madani University of Azerbaijan. (In Persian).

Bates, L.S., Wardren, R.P. & Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil 39: 205-207.

Braga, L.F., Sousa, M.P., Ferreira, L.C., Delachiave, M.E.A, Cataneo, A.C. & Braga, J.F. 2009. Proline level and amylase and ascorbate peroxidase activity in germination of *Plantago ovata* forsk (Plantaginaceae) seeds. Asian Research Publishing Network (ARPN) Journal of Agricultural and Biological Science 4: 49-54.

Cervantes, C. & Silver, S.J.P. 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. Plasmid 27: 65-71.

Chapman, H.D. & Pratt, P.F. 1961. Method of analysis for soils, plants and waters. University of California. Division of Agricultural Sciences.

Chatterjee, J., Kumar, P., Nand, P., Kumar, R. & Tewari, T. 2015. Chromium toxicity induces oxidative stress in turnip. Indian Journal of Plant Physiology 20: 220-226.

Chemists, A.O.A., & DCAOAC, W. 1990. Official Methods of Analysis. Association of Official Agricultural Chemists, Washington, DC.

Elahi, A., Arooj, I., Bukhari, D.A. & Rehman, A. 2020. "Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater. Applied Microbiology and Biotechnology 104: 3729-3743.

Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. 1977. Superoxide dismutase II. Purification and quantitative relationship with water soluble protein in seedling. Plant Physiology 50: 315-318.

GracePavithra, K., Jaikumar, V., Kumar, P.S. & SundarRajan, P. 2019. A review on cleaner strategies for chromium industrial wastewater: present research and future perspective. Journal of Cleaner Production 228: 580-593.

Guo, S., Xiao, C., Zhou, N. & Chi, R. 2021. Speciation, toxicity, microbial remediation and phytoremediation of soil chromium contamination. Environmental Chemistry Letters 19: 1413-1431.

Hassanpour aghdam, M.B., Vojodi Mehrabani, L., Kheiri, M., Chrysargyris, A. & Tzortzakis, N. 2022. Salt-induced damage alleviation in *Tanacetum balsamita* L. by foliar application of Dobogen biostimulant, glucose and KNO_3. Scientific Reports, doi:10.21203/rs.3.rs-962027/v1.

Heath, R.L., & Packer, L. 1968. Photo peroxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics 125: 189-198.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]

Joshi, N., Menon, P. & Joshi, A. 2019. Effect of chromium on germination in some crops of India. Journal of Agricultural Science and Botany 3: 1-5.

Kim, K.H., Tsao, R., Yang, R. & Cui, S.W. 2006. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions. Food Chemistry 95: 466-473.

Kumar, V., Suryakant, M., Sharma, P.K., Kumar, S. & Kumar, N. 2016. Effect of chromium toxicity on plants: A review. Agriways 4: 107-120.

Luhova, L., Lebeda, A., Hederorva, D. & Pec, P. 2003. Activities of oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light conditions. Plant Soil Environment 49: 4. 151-157.

Maxwell, K. & Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence - a practical guide. Journal of Experimental Botany 51: 659-668.

Ojuederie, O.B. & Babalola, O.O. 2017. Microbial and plant–assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: a review. International Journal of Environmental Research Public Health 14: 1504. Doi: 10.3390/ijerph14121504.

Pirouz, P.S. & Manochehri Kalantari, K.h. 2013. The effect of heavy metal chromium on Weber accumulation rate, growth factors and induction of oxidative stress in aerial parts of sunflower plant. Plant Biology 13: 97-114. (In Persian).

Prochazkova, D., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. & Singh, D.V. 2001. Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. Plant Science 161: 765-771.

Rafiei, M., Madah Hosseini, S.h., Hamidpour, M. & MohammadiMirik, A. 2018. Interaction of sodium and cadmium chloride on some physiological traits and sodium and cadmium content of *Portulaca oleracea* root and shoots. Journal of Soil Management and Sustainable Production 8: 43-60.

Rahbarian, R., Azizi, A., Behdad, A. & Mirblok, A. 2020. *Portulaca oleracea* L. tolerance to chromium stress based on growth/ photosynthetic indices and antioxidant enzyme activity. Journal of Applied Biology 32: 161-172.

Raklami, A., Meddich, A., Oufdou, K. & Baslam M. 2022. Plants-microorganisms- based bioremediation for heavy metal cleanup: recent development, phytoremediation techniques, regulation mmechanisms, and molecular responses. International Journal of Molecular Science 23: 5031. Doi: 10.3390/ijms23095031.

Samantaray. S., Rout, G.R. & Das, P. 1998. Role of chromium on plant growth and metabolism. Acta Physiologiae Plantarum 20: 201-212.

Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H. & Avudainayagam, S. 2005. Chromium toxicity in plants. Environment International 31: 739-753.

Sreejayan, N., Dong, F., Kandadi, M. R., Yang, X. & Ren, J. 2008. Insulin resistance and hepatic ER stress in obese mice. Obesity 16: 1331-1337.

Stambulska, U.Y., Bayliak, M.M. & Lushchak, V.I. 2018. Chromium (VI) toxicity in legume plants: modulation effects of rhizobial symbiosis. BioMed Research International. 1-13.

Stelting, S., Burns, R., Sunna, A., Visnovsky, G. & Bunt, C. 2010. Characterization of stabilized formulations of the atrazine degrading bacterium Pseudomonas sp. strain ADP, In 37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society 2010, 203-204.

Talebzadeh, Z., Rahbarian, R., Nadaf, M. & Sobhanian, H. 2022. Evaluation of the interaction effect of salinity and chromium on photosynthetic pigments and photochemical performance of purslane (*Portulaca oleraceae* L.). Journal of Plant Environmental Physiology 65: 109-126. (In Persian).

Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B.P. & Das, N. 2014. Bacterial chromate reductase, apotential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. Environmental Management 146: 383-399.

Tripathi, A.K., Sadhna, T. & Tripathi, S. 1999 Changes in some physiological and biochemical characters in *Albizzia lebbek* as bio-indicators of heavy metal toxicity. Journal of Environmental Biology 20: 93- 98.

Wagner, G.J. 1979. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids and anthocyanin in protoplasts, Plant Physiology 64: 88-93.

Wakeel, A., Xu, M. & Gan, Y. 2020. Chromium –Induced reactive oxygen species accumulation by altering the enzymatic antioxidant system and associated cytotoxic, genotoxic, ultrastructural, and photosynthetic change in plants, International Journal of Molecular Science 21: 728-739.

Yaktamanesh, H., Dudi, M. & Imami, Z. 2021. Isolation, molecular identification and biological purification of chromium-resistant bacteria from tannery and tannery effluents in Khuzestan, Iran. Biology of Microorganisms 38: 71-84. (In Persian).

Zargari, A. 1996. Medicinal plants. Volume III. Tehran University Publications. (In Persian).

*****

How to cite this article:

Valizadeh Kamran, R., Mehrabani, V., Abdoulzadeh Fard, A. & Tarinejad, A. 2023. Reducing the toxic effects of Chromium in the growing medium of costmary (*Tanacetum balsamita*) by of chromium purifying bacteria. Nova Biologica Reperta 10: 219-229. (In Persian).

ولی زاده کامران، ر.، وجودی مهربانی، ل.، عبدلزاده فرد، ع. و تاری نژاد، ع. ۱۴۰۲. کاهش اثرات سمی کروم در محیط رشد شاهسپرم (*Tanacetum balsamita L.*) توسط باکتری تصفیه‌کننده کروم. یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۰: ۲۲۹-۲۱۹.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-04-30]