

## بررسی اثرات خاکهای آلوده به سیانید بر خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه *Sorghum bicolor*

اکرم شکوهیان قهفرخی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا زمانی<sup>۲</sup>، فاطمه حیدریان نائین<sup>۱</sup> و علیرضا منصوریان<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> ایران، اصفهان، مؤسسه آموزش عالی نور دانش میمه، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، گروه زیست‌فناوری مولکولی گیاهی

<sup>۳</sup> ایران، اصفهان، دانشگاه صنعتی مالک اشتر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۵/۲۸

### چکیده

آلودگی خاک به آلاینده‌های صنعتی خطرات روز افزونی را برای انسان، محیط زیست و سایر موجودات زنده به همراه دارد. سیانید یکی از آلاینده‌های بسیار سمی و خطرناک می‌باشد که برای استحصال طلا استفاده می‌شود. یکی از روشهای مقرون به صرفه برای از بین بردن سیانید در محیط زیست و خاک، گیاه پالایی است. در این تحقیق پاسخهای فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گیاه *Sorghum bicolor* به عنوان گیاه مقاوم، نسبت به تیمارهای مختلف سیانید مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، پساب حاصل از معدن طلای مته اصفهان تهیه و با خاک معمولی در غلظتهای مختلف مخلوط گردید. پس از کامل شدن فاز رویشی گیاه میزان تغییرات سیانید، پروتئین کل، پرولین و تغییرات مورفومتری طول ساقه، برگ، طول گیاه و قطر ساقه اندازه گیری شد. گیاه *Sorghum bicolor* قادر به جذب سیانید از خاکهای آلوده بود. میزان پروتئین کل و پرولین گیاه با افزایش غلظت سیانید افزایش یافت. میزان سیانید در خاک با جذب سیانید توسط گیاه کاهش یافت. گیاه سورگوم توانست غلظت ۱۲/۶۹ میلی گرم بر کیلوگرم سیانید را تحمل کند. کاهش سیانید خاک و نیز تجمع آن در گیاه و تغییرات مورفومتری نشان داد که گیاه پالایی روش مناسبی برای پالایش خاکهای آلوده به سیانید می‌باشد. بنابراین گیاه *Sorghum bicolor* می‌تواند یک گیاه پالاینده مناسب برای حذف سیانید از خاکهای آلوده به این نوع آلاینده‌ها باشد.

واژه های کلیدی: گیاه پالایی، سیانید، *Sorghum bicolor*، پروتئین، پرولین

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۶۲۳۸۲۳۴۹، پست الکترونیکی: a.shokouhian880@gmail.com

### مقدمه

تولید زغال سنگ می‌باشد که یکی از کاربردهای مهم آن در صنعت معدن جهت بازیابی فلزات طلا و نقره می‌باشد (۱۱ و ۱۲ و ۲۲ و ۳۰). روشهای مختلف شیمیایی و فیزیکی که برای درمان پسابهای صنایع سیانیدی استفاده می‌شود منجر به آلودگی و آسیبهای زیست محیطی فراوان شده و به دلیل هزینه های بالا به طور کامل تصفیه نمی‌گردد (۴). اخیراً استفاده از گیاه پالایی به علت هزینه های کمتر و سازگاری با محیط مورد توجه پژوهشگران واقع شده است و تجربه با ارزش و تکنولوژی نوین محسوب می‌شود و برای

سیانید ( $CN^-$ ) یک ترکیب شیمیایی مضر، خطرناک، بی‌رنگ، بویی متمایز از بادام تلخ دارد کربن آن از طریق پیوند سه‌گانه به نیتروژن متصل شده است. سیانید هیدروژن یک اسید ضعیف است که به آسانی یونیزه و یون  $CN^-$  تولید می‌کند. به صورت طبیعی و مصنوعی توسط بشر ساخته می‌شود. ترکیبات سیانید به اشکال گاز، مایع و جامد وجود دارد. از مواد اصلی مورد استفاده در صنایعی مانند، استخراج فلزات، آبکاری، تولید پلاستیک، چسب، رنگ، وسایل آرایشی، کارخانه تولید فیبرو تهیه نمکهای جاده،

سیانور صورت گرفته است. در مطالعه‌ای انتقال و متابولیسم سیانور پتاسیم و کمپلکس سیانور آهن توسط درختان بید، جذب و انتقال ترکیبات سیانور و متابولیزه شدن آن توسط گیاه صورت گرفته است و فقط مقدار اندکی از سیانور در گیاه جمع می‌شود (۲۶ و ۲۷).

سورگوم گیاهی است به دلیل دارا بودن سیستم ریشه ای افشان، سیستم فتوسنتزی  $C_4$  و نحوه فعالیت روزنه ها قادر است آب را بهتر جذب کند. از دیگر خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی مرتبط با تحمل خشکی می‌توان رشد و توسعه سیستم ریشه‌ای (۱۸)، افزایش نسبت ریشه به اندام هوایی و سطح برگ (۳ و ۹)، سطح ویژه برگ، فراوانی و اندازه روزنه (۲۷ و ۲۸)، تنظیم اسمزی و پایداری غشای سیتوپلاسمی، تجمع قندها و اسیدآمینه پرولین، کاهش جذب عناصر غذایی را نام برد (۷ و ۲۳).

هدف عمده این تحقیق تأثیر سیانید بر فرآیندهای بیوشیمیایی در غلظتهای مختلف و بررسی امکان استفاده از روش گیاه پالایی برای خاکهای آلوده به سیانید توسط گیاه *Sorghum bicolor* است.

### مواد و روشها

خاک آلوده به سیانید از معدن طلائی مته اصفهان و بذر گیاهی *Sorghum bicolor* از شرکت پاکان بذر اصفهان و مواد از شرکت سازنده MERK تهیه گردید. نمونه برداری از خاک آلوده به صورت تصادفی از چند منطقه صورت گرفت و به دلیل آلودگی خاک به سیانید، در پلاستیکهای ضخیم مشکی جمع آوری و به محل آزمایش انتقال داده شد.

آماده سازی تیمارهای مختلف و کاشت گیاه *Sorghum bicolor* در خاک حاوی مقادیر مختلف سیانیدی با توجه به شرایط آب و هوایی معدن و سازگاری گیاه با آب و هوای منطقه مورد نظر انتخاب گردید. در نهایت پساب معدن با نسبتهای یک پنجم (گروه B) ۲/۵۱، یک چهارم

کشورهای در حال توسعه مناسب است (۲۹). گیاه پالایی روشی است که با استفاده از گیاهان به حذف آلاینده ها از آب و خاک یا کاهش خطرات زیست محیطی مانند فلزات سنگین، عناصر کمیاب و مواد رادیو اکتیو و احیای مکان، حفاظت از ساختار شیمیایی، فیزیکی و بیولوژیکی می‌شود و جهت بهبود و اصلاح خاک، بدون حفاری استفاده می‌شود (۱۷ و ۲۰ و ۲۴). ترمیم خاکهای آلوده توسط این روش تخریب یا تغییر شکل مواد آلوده کننده، غیرمتحرک سازی آلاینده ها جهت کاهش تنش زیستی و جداسازی آلاینده ها از توده خاک می باشد (۱۴). گیاه مورد استفاده در گیاه پالایی بایستی دارای قدرت رشد و تولید زیست توده فراوان، تحمل سطح بالای غلظت فلزات در محیط ریشه، عمق مناسب و مقدار حجم ریشه بعنوان منبع ذخیره گیاهی باشد و امکان برداشت سه الی پنج بار در سال را داشته باشد (۲۵). از سوی دیگر، سیانید به عنوان محصول مشترک (Co-product) بیوسنتز اتیلن در پایان مسیر تولید می‌شود. بیوسنتز اتیلن در گیاهان عالی از مسیر ۱-آمینوسیکلوپروپان ۱-کربوکسیلیک اسید (ACC) صورت می‌گیرد و آنزیم ۱-آمینوسیکلوپروپان ۱-کربوسیلیک اسید اکسیداز (ACO) عضوی از خانواده اکسیدوردوکتازهای وابسته به آهن بوده و برای فعالیت خود به  $Fe^{2+}$  به عنوان کوفاکتور و آسکوربات به عنوان سوبسترای همراه نیاز دارد. این آنزیم، مرحله نهایی بیوسنتز این هورمون و سیانید به عنوان یک محصول فرعی را کاتالیز می‌کند (۳۱). سیانید خود از طریق *positive feedback* می‌تواند باعث افزایش سیانید در گیاه شود در نتیجه سیانید باعث افزایش بیان ژن آنزیم ACC سنتز می‌شود که باعث افزایش تولید اتیلن و سیانید می‌شود (۱۹). سیانید در گیاهان معمولاً به صورت ترکیبات گلیکوزیدی سیانورژنیکی برای دفاع پاتوژن وجود دارد و همچنین در گیاهانی مانند کاساوا، سورگوم، ذرت شیرین و.. نیز گزارش شده است (۵ و ۱۳). اخیراً مطالعات محدودی در مورد مزایا و محدودیتهای گیاه پالایی خاک و آب به



شکل ۱- دستگاه تقطیر مقدار پروتئین طبق روش برادفورد و با استفاده از منحنی استاندارد سرم آلبومین گاوی در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید (۱۶ و ۲۱).

حجم مشخصی از بافت برگ گیاه توسط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH برابر با ۷ ساییده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. حجم مشخصی از محلول رویی سانتریفیوژ شده با معرف رنگی برادفورد و بافر فسفات ترکیب و جذب نوری نمونه در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

**سنجش مقدار پرولین:** مقدار پرولین با استفاده از معرف نین هیدرین و منحنی استاندارد مربوطه در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (۶).

**بررسی خصوصیات مورفولوژیکی:** جهت بررسی تأثیر سیانید بر روی گیاه *Sorghum bicolor* طول ساقه، طول برگ و طول گیاه در ابتدا و انتهای آزمایش مورد بررسی قرار گرفت.

**آنالیز آماری داده‌ها:** تجزیه و تحلیل آماری نتایج به دست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS15 و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن و ANOVA در سطح معنی دار ۵ درصد صورت گرفت و نمودارها توسط نرم افزار Excel رسم گردید.

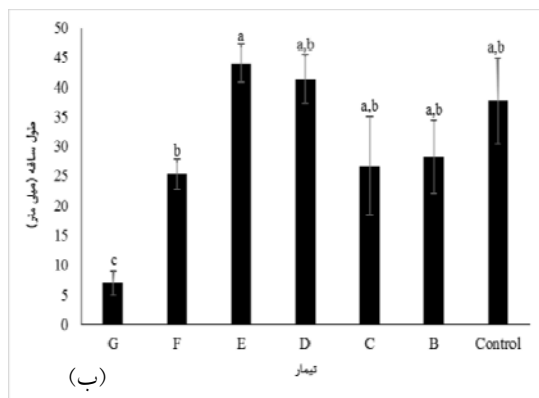
## نتایج

**طول ساقه و برگ:** نتایج حاصل از آزمون دانکن طول ساقه

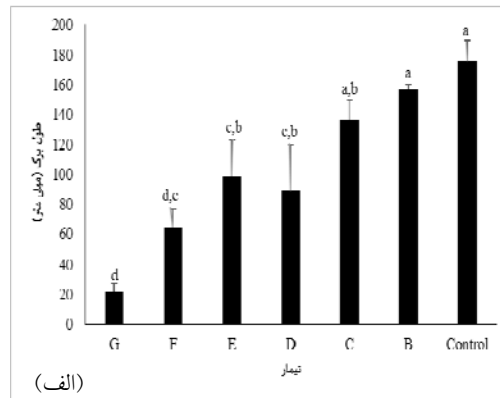
(گروه C) ۳/۳۱، یک سوم (گروه D) ۵/۹۴، یک دوم (گروه E) ۶/۹۹ و سه چهارم (گروه F) ۱۴/۳ میلی گرم بر کیلوگرم، با خاک فاقد سیانید مخلوط گردید و گروه تیمار A خاک فاقد سیانید (خاک معمولی) به عنوان کنترل و گروه G (۱۰۰ درصد پساب معدن) در نظر گرفته شد. از هر تیمار A, B, C, D, E, F, G سه گلدان و مقدار خاک به نسبت‌های مشخص شده به مقدار ۱/۵ کیلوگرم تهیه شد و در هر گلدان به تعداد مساوی بذر سورگوم کاشته و مراحل آب‌دهی در حجم کم و با شرایط یکسان صورت گرفت تا سیانید از گلدانها خارج نگردد. بعد از گذشت فاز رویشی گیاه (۴۵ روز) از گلدانها خارج نموده. خاک و گیاه برای مراحل بعدی آزمایش جمع آوری شد. پارامترهای مورفولوژیکی طول ساقه، طول برگ، طول گیاهان و قطر ساقه پس از خارج کردن از گلدانها و شستشو با آب مقطر توسط خط کش اندازه‌گیری شد.

**تعیین مقدار سیانید در خاکهای معدن طلا و گیاه:** مقدار سیانید در خاکهای آلوده و گیاه (به علت سیانوزنیک بودن *Sorghum bicolor*) با روش استاندارد ایزو 14403:2002 اندازه‌گیری شد. جهت انجام آزمایش دستگاه تقطیر اختصاصی طبق استانداردهای مربوطه طراحی شد (شکل ۱). فرآیند تقطیر با بازروانی ۴۰ تا ۵۰ قطره در یک دقیقه به مدت یک ساعت و نیم انجام شد و پس از جداسازی سیانید از کمپلکسها (جیوه، سرب، گوگرد) با استفاده از تقطیر ۱۰ میلی‌لیتر از محلول جاذب برداشته و وارد بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتر شد. سپس نیم گرم کربنات سدیم و ۵ میلی‌لیتر اسید پیکریک ۱ درصد به بالن ژوژه اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد جهت یکسان سازی قرار داده شد و سپس با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و جذب نوری محلول توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (Spectrophotometer UV-722-2100) در طول موج ۵۲۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید و با استفاده از منحنی واسنجی غلظت یون سیانید در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

ANOVA و  $P > 0.05$  نشان داد که طول برگ تیمارهای (G, F) و (E, D, F) و (C, B) تفاوت معنی‌داری ندارند. اما در تیمارهای (E, D, F, G) طول برگ نسبت به کنترل کمتر شده است ( $P < 0.05$ ) (شکل ۲ (ب)).



در گروه‌های تیماری (E, F, D, C, B) نسبت به کنترل (A) اختلاف معنی‌داری را نشان نداد اما تیمار G نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری را نشان داده است (شکل ۲ (الف)). نتایج به دست آمده از آزمون دانکن، خروجی

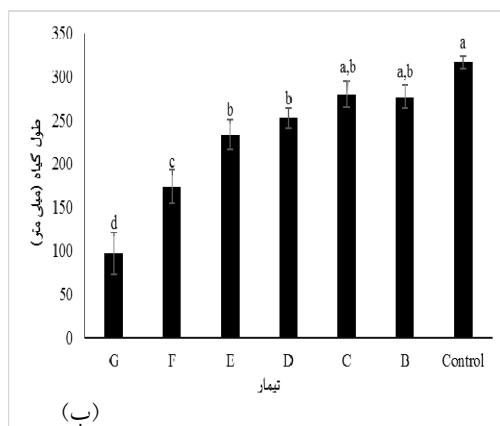


شکل ۲- (الف): مقایسه غلظت‌های تیمارسیانید بر طول ساقه، (ب): مقایسه غلظت‌های مختلف تیمارسیانید بر طول برگ

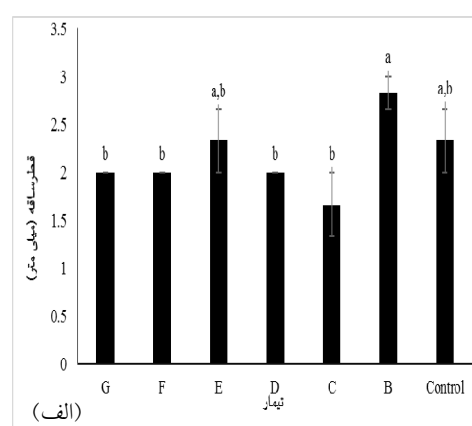
حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت میانگینها در سطح ۵ درصد است و حروف G, F, E, D, C, B به ترتیب از چپ به راست نسبت‌های 100%

خاک آلوده به سیانید و Control (خاک معمولی فاقد سیانید) را نشان می‌دهد.

کاهش یافته است (شکل ۳ (الف)). نتایج به دست آمده از آزمون دانکن و ANOVA قطر ساقه نشان داد که بین تیمارها با غلظت‌های مختلف نسبت به کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده نشده است ( $P > 0.05$ ) (شکل ۳ (ب)).



طول گیاه و قطرساقه: با توجه به نتایج به دست آمده از آزمون دانکن و ANOVA، طول گیاه بین تیمارهای (E, D, C, B) و همچنین تیمارهای (Control, C, B) اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). اما بین تیمارهای G, E, F, D با توجه به  $P < 0.05$  نسبت به کنترل طول گیاه



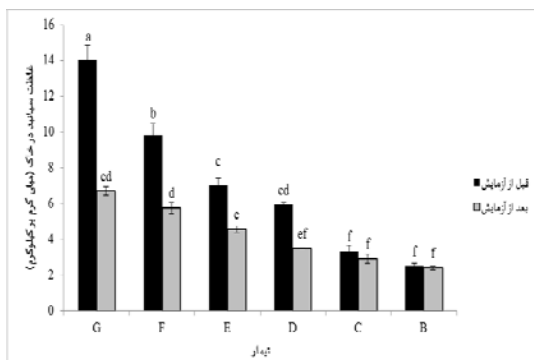
شکل ۳- (الف): میانگین اثرات متقابل تیمارسیانید بر طول گیاهان، (ب): میانگین اثرات متقابل تیمارسیانید بر قطرساقه

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت میانگینها در سطح ۵ درصد است و حروف G, F, E, D, C, B به ترتیب از چپ به راست نسبت‌های 100%

خاک آلوده به سیانید و Control (خاک معمولی فاقد سیانید) را نشان می‌دهد.

سیانید خاک گلدانها در ابتدا و انتهای دوره آزمایش مورد آزمون آماری قرار گرفت.

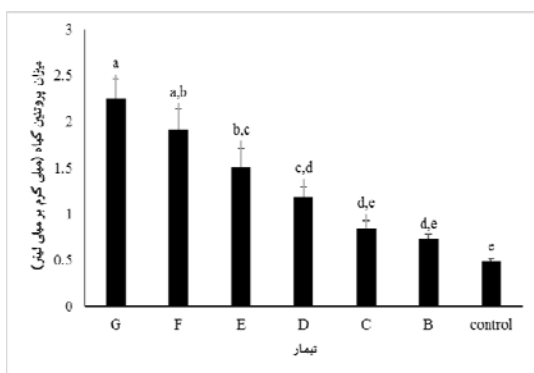
بررسی مقدار سیانید: مقدار سیانید در برگ گیاهان با غلظت‌های مختلف سیانید مورد بررسی و در نهایت مقدار



شکل ۵- مقدار سیانید خاکها در تیمارها با غلظت مختلف قبل و بعد از کاشت گیاهان

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت میانگینها در سطح ۵ درصد است و حروف B, C, D, E, F, G به ترتیب از چپ به راست نسبتهای  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{6}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{12}$ ,  $\frac{1}{15}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{30}$ ,  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{60}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{100}$ ، خاک آلوده به سیانید و Control (خاک معمولی فاقد سیانید) را نشان می‌دهد.

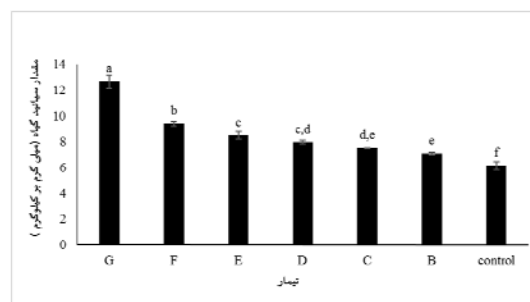
مقایسه مقدار پروتئین: با افزایش غلظت سیانید با توجه به خروجی آزمون دانکن مقدار پروتئین گیاه افزایش یافت. بین تیمارهای B و C نسبت به کنترل اختلاف معنی داری مشاهده نشد. بیشترین مقدار پروتئین در تیمار G مشاهده شد. در همه تیمارها به جز B و C نسبت به کنترل افزایش میزان پروتئین مشاهده شد (شکل ۶).



شکل ۶- مقایسه مقدار پروتئین در گیاهان تحت تیمار.

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت میانگینها در سطح ۵ درصد است و حروف B, C, D, E, F, G به ترتیب از چپ به راست نسبتهای  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{6}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{12}$ ,  $\frac{1}{15}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{30}$ ,  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{60}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{100}$ ، خاک آلوده به سیانید و Control (خاک معمولی فاقد سیانید) را نشان می‌دهد.

بررسی مقدار سیانید در برگ گیاهان در انتهای دوره آزمایش با توجه به نتایج حاصل از آزمون دانکن و آنالیز ANOVA و  $P < 0/05$  بیانگر یکسان نبودن مقدار سیانید در برگهاست و در مقایسه میانگین تیمارهای C, D, B و C و E, D با توجه به  $P > 0/05$  اختلاف معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. مقدار سیانید در برگ گیاهان گروههای تیمار B, C, D, E, F, G نسبت به کنترل افزایش معنی داری را نشان داد. کمترین مقدار سیانید جذب شده توسط گیاه در تیمار B و بیشترین مقدار سیانید در تیمار G است (شکل ۴).



شکل ۴- بررسی تغییرات مقدار سیانید در گیاهان *Sorghum bicolor* در مقابل غلظتهای مختلف سیانید.

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت میانگینها در سطح ۵ درصد است و حروف B, C, D, E, F, G به ترتیب از چپ به راست نسبتهای  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{5}$ ,  $\frac{1}{6}$ ,  $\frac{1}{8}$ ,  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{12}$ ,  $\frac{1}{15}$ ,  $\frac{1}{20}$ ,  $\frac{1}{25}$ ,  $\frac{1}{30}$ ,  $\frac{1}{40}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{60}$ ,  $\frac{1}{80}$ ,  $\frac{1}{100}$ ، خاک آلوده به سیانید و Control (خاک معمولی فاقد سیانید) را نشان می‌دهد.

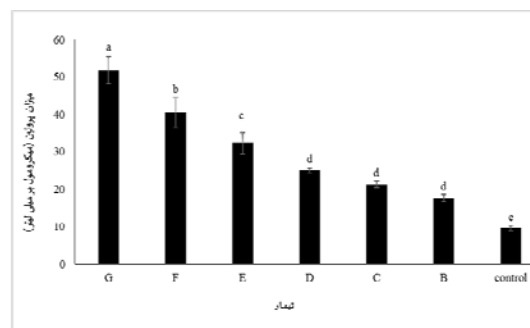
مقایسه تیمار سیانید در غلظتهای مختلف در قبل و بعد از کاشت *Sorghum bicolor*: جهت بررسی مقدار سیانید در خاک قبل و بعد از کاشت گیاهان از آزمون دانکن استفاده شد. در تیمارهای G, F, D میانگین داده‌ها به ترتیب (۷/۳۲۶، ۴/۰۱، ۰/۰۰۴) اختلاف معنی دار در مقدار سیانید در ابتدا و انتها مشاهده شد. این تفاوت اختلاف نشان دهنده کاهش مقدار سیانید در خاک و جذب آن توسط گیاه است ولی در تیمار گروه B, C, E با توجه به  $P > 0/05$  اختلاف معنی داری در قبل و بعد آزمایش مشاهده نشد. با افزایش مقدار سیانید، میانگین سیانید در خاک بعد از کاشت کاهش یافت (شکل ۵).

با ۷/۳۳ خاک F ۵/۲۲، خاک E ۲/۴۲، خاک D ۲/۴۵، خاک C ۰/۳۹ و خاک B ۰/۳ میلی گرم بر کیلوگرم است.

علاوه بر گیاه سورگوم مطالعاتی در خصوص گیاه پالایی سیانید از خاکهای آلوده بر روی گیاه بید و تیور انجام گرفته است. در مطالعه Wachira و همکارانش ۲۰۱۵ بررسی میزان کاهش سیانید محیط‌های آبی با گیاه پالایی و تیور صورت گرفته است که غلظت‌های مختلف سیانید به صورت مصنوعی به محیط کشت هیدروپونیک اضافه گردید و کاهش میزان سیانید در آب بررسی گردید که نشان داد استفاده از گیاه و تیور در محیط آبی در دوره ۴۵ روز ۵۰ درصد کاهش سیانید را به دنبال داشت (۳۰). سیانید در پسابهای معادن طلا و نقره به صورت کمپلکس با عناصر می باشد که این کمپلکسها اثرات مخرب را بر روی گیاه نشان می دهند اما خوشبختانه گیاه سورگوم در برابر این آثار مقاوم بوده است و همچنین نتایج به دست آمده از مطالعات بر روی گیاه و تیور بالاترین مقدار سیانید در برگ گیاه برابر با ۹/۶۹ و کمترین آن ۳/۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (۲۱).

گیاه آراییدوپسین با سیانید به صورت مشخص باعث کاهش ظرفیت کلروفیل و توقف رشد می شود. سیانید می تواند باعث ایجاد نقاط سیاه رنگ بر روی برگهای تنباکو شود. همچنین در برگهای گیاه نخود می تواند هسته سلولهای پوست و سلولهای محافظ پوست را تخریب کند. سیانید در هسته زردآلو، هلو، گیلان، بادام تلخ، شاخه های بامب، کاساوا، لوبیای لیما دیده می شود (۱۳، ۱۹، ۳۱) آزمایش دیگری توسط Dimitrova و همکاران ۲۰۱۵ در رابطه با گیاه پالایی فنل و سیانید توسط سنبل آبی در محیط هیدروپونیک انجام گرفت که نتایج بیانگر توانایی گیاه در کاهش سیانید از محیط آبی را نشان داد (۱۰). بانک و همکارانش عنوان کردند گیاه سورگوم از طریق افزایش فعالیتهای میکروبی اطراف ریشه توانایی برداشت و حذف آلاینده های صنعتی را دارد (۸). سیانید برای گیاه (گیاهان

سنجش مقدار پرولین: نتایج مربوط به آزمون مقایسه میانگین دانکن در غلظتهای مختلف سیانید در ارتباط با مقدار پرولین نشان داد با افزایش غلظت سیانید مقدار پرولین افزایش یافته است ( $P < 0/05$ ). در تیمار D، C، B اختلاف معنی داری با توجه به P Value بزرگتر از ۰/۰۵ مشاهده نشده است. در همه غلظتها نسبت به کنترل افزایش معنی داری مشاهده شده است (شکل ۷).



شکل ۷- مقایسه اثر غلظتهای مختلف سیانید در گیاهان تحت تیمار برابر میزان پرولین.

حروف مشابه نشان دهنده عدم تفاوت میانگینها در سطح ۵ درصد است و حروف G، F، E، D، C، B به ترتیب از چپ به راست نسبتهای  $\frac{3}{4}$ ،  $\frac{1}{2}$ ،  $\frac{1}{3}$ ،  $\frac{1}{4}$ ،  $\frac{1}{8}$ ،  $\frac{1}{16}$ ، 100%، خاک آلوده به سیانید و Control (خاک معمولی فاقد سیانید) را نشان می دهد.

## بحث

نتایج حاصل از بررسی ویژگیهای بیوشیمیایی و مورفولوژیکی نشان داد که با افزایش میزان سیانید گیاه سورگوم طول ساقه، طول برگ و طول گیاه کاهش و میزان پروتئین، پرولین در جهت مقاومت گیاه افزایش یافته است البته افزایش میزان سیانید در مقایسه قطر ساقه در بین گروههای G، F، E، D، C، B، A تفاوت معنی داری مشاهده نمی شود و افزایش میزان سیانید در قطر تأثیر چندانی ندارد.

گیاه سورگوم توانایی رشد در خاکهای آلوده به سیانید را دارد و می تواند به طور قابل ملاحظه ای میزان سیانید را کاهش دهد که میزان کاهش سیانید در خاک G که برابر

مقدار پرولین در تیمار G برابر با ۵۱/۶۹ میکرومول بر میلی لیتر است که تیمارها در غلظت‌های مختلف نسبت به کنترل اختلاف افزایش معنی داری را نشان داده است. پرولین در گیاهان در حفاظت اسمزی، تثبیت پروتئین و در حفظ تعادل ردوکس نقش دارد. این ترکیب در فرآیند های بیولوژیکی، تنظیم فعالیت آنزیم، تأثیر در عملکرد و ساختار غشاء نقش دارد. پرولین در گیاهانی که دارای محدودیت آب و تحت تنش هستند، تجمع پیدا می کند و نقش مهمی را در جذب و باز سازی، انتقال انرژی، تعامل با پاتوژن گیاهی و مرگ برنامه ریزی سلولی دارند (۱۵ و ۳۱). احتمالاً با افزایش مقدار سیانید پرولین و در نهایت پروتئین افزایش می یابد که با توجه به نتایج به دست آمده مطابقت دارد (شکل ۷). همچنین مقدار پرولین گیاه سورگوم تحت تنش سورگوم تاکنون مورد بررسی قرار نگرفته است اما در خصوص گیاه و تیوریا با افزایش مقدار سیانید مقدار پرولین هم افزایش یافته است که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد (۲۱). بر اساس مطالعه ای که بر دوگونه گراس (جو دوسر وحشی (*Avena fatua* L.) و جوززاعی (*Hordeum vulgare* L. variety Afzal)) بر اثر تنش آلودگی نفتی صورت گرفته است نشان داد که پرولین بر روی جوی دوسر افزایش یافت که ناشی از هیدرولیز پروتئین می باشد (۲).

#### نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده می توان نتیجه گرفت که گیاه پالایی یک روش بسیار مؤثر در پالایش فاضلابهای آلوده به سیانید است. پساب حاوی سیانید، قابل تصفیه با روشهای شیمیایی و فیزیکی است. اما این روشها به علت گران بودن، افزودن سایر آلایندها و عدم سازگاری با محیط زیست کمتر مورد استفاده قرار می گیرند. گیاه *Sorghum bicolor* مقاومت بالایی نشان داد. (مقاومت در ۱۴/۰۳ میلی گرم بر کیلو گرم) و غلظت بالای سیانور در گیاه نشان دهنده انتقال سیانور از خاک به گیاه و تجمع در گیاه است

سیانوزنیک) یک تنش محسوب می شود نتیجه این تنش تولید هورمون اتیلن در گیاه است در فرآیند تولید اتیلن، سیانید نیز ایجاد می گردد و در نتیجه میزان سیانید در گیاهان با افزایش تنش و تولید هورمون افزایش می یابد که این موضوع با آزمایشات انجام گرفته تأیید می شود. اتیلن علی رغم ساختار ساده کربنی تنظیم کننده رشد و نمو گیاهی نقش تنظیمی روی ژنهای مقاومت و واکنشهای دفاعی دارد و یک تنظیم گر دفاعی با القای تولید و بیان پروتئین می باشد (۳۰). طبق مطالعات انجام شده در دانشگاه اصفهان، مقدار سیانید در برگ گیاه در بالاترین غلظت سیانید برابر با ۱۴/۳۴ و کمترین آن برابر با ۰/۰۱ میلی گرم بر کیلوگرم گزارش شده است (۲۸). نتایج به دست آمده از این پژوهش که در غلظت‌های مختلفی از سیانید صورت گرفت بیشترین مقدار جذب سیانید با توجه به محدوده زمانی کوتاه نسبت به مطالعات انجام شده در دانشگاه اصفهان برابر ۶۹/۱۲ و کمترین آن ۶/۱۴ میلی گرم بر کیلوگرم است. روند افزایشی مقدار سیانید در گیاه و کاهش غلظت سیانید در خاک را نشان داد که توسط گیاه سورگوم بیکالر جذب شده است.

مطالعاتی توسط همکاران جهت حذف سیانید از خاک نیز توسط باکتری انتروباکتر صورت گرفته است که نسبت به باکتریهای دیگر با توجه به بهینه سازی شرایط کشت توانایی تجزیه سیانید بالاتری را دارد (۱).

با توجه به داده های به دست آمده نسبت به کنترل با افزایش مقدار سیانید مقدار پروتئین هم افزایش یافته است. افزایش مقدار پروتئین می تواند در اثر افزایش سنتز پروتئین توسط اسید آمینه، افزایش فعالیت آنزیمهای هیدرولیز کننده و افزایش آمینواسیدهای در دسترس باشد. مقدار پروتئین گیاه *Sorghum bicolor* در برابر تنش سیانید تاکنون اندازه گیری نشده است اما در گیاهان دیگر از جمله تیوریا مورد سنجش قرار گرفته که با افزایش مقدار سیانید، پروتئین هم افزایش یافته است (۲۱).

سیانید را دارا می باشد. ضمن گسترش دانش گیاه پالایی می تواند مورد استفاده صنایع به ویژه صنایع استحصال طلا جهت پاکسازی سایت‌های آلوده به سیانور استفاده شود.

که توانست مقدار قابل توجهی از سیانید که ماده ای سمی و خطر ناک است را پالایش کند. باتوجه به محدوده زمانی کم آزمایش به مدت ۴۵ روز، با افزایش مدت زمان در مرحله زایشی گیاه احتمالاً توانایی بالاتری جهت حذف

## منابع

- ۱- جواهری، ز؛ امین زاده، س؛ زمانی، م؛ (۱۳۹۵)؛ بهینه‌سازی شرایط کشت آنزیم خارج سلولی تجزیه‌کننده سیانید باکتری انتروباکتر ZS به روش سطح پاسخ. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی ۲۹(۳):۲۷۴-۲۸۱
- ۲- رجایی، س؛ سیدی، م؛ رئیسی، ر؛ شیری، ش؛ معظم جزی، م؛ (۱۳۹۵)؛ اثر آلودگی نفتی خاک بر برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی و مولکولی گیاه ۲۹ مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (۲)، ۱۸۱-۱۹۷
- 3- Abdulai, A.L., F. Asch, and N.Vande Giesen. 2008. Physiological and morphological responses of *Sorghum bicolor*
- 4- Alavi Bakhtiarvand S, Ahmadimoghadam M Parseh I, Jafarzadeh N, Chehrazi M, Chorom M.2014. Assessment of Phytoremediation Efficiency on reducing oilhydrocarbons from clay-silt soil using *Aeluropus littoralis*. Iranian Journal of Health and Environment.7(1):73-84 (in Persian).
- 5- Blumenthal's S.G. 1968. Cyanide metabolism in higher plant. III. The Biosynthesis of Cyanoalanine. Journal of Biochemistry, 243: 5302-5507.
- 6- Bates L, Waldren R, Teare I:1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil,39 (1) :205-207.
- 7- Blum, A. and A. Ebercon. 1976. Genotypic response in sorghum to drought stress . III. Free proline accumulation and drought resistance. Crop Sci. 16: 428-431. 108-106
- 8- Banks M, Kulakow P, Schwab A, Chen Z, Rathbone K: 2003. Degradation of crude oil in the rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation*, 5 (3) :225-234.
- 9- Bdukli, E., N. Celik, M. Turk, G. Bayram, and B. Tas. 2007. Effects of post anthesis drought stress on the stem- reserve mobilization supporting grain filling of two-rowed barley cultivars at different levels of nitrogen. J.Bio Sci.7(6):949-953
- 10- Dimitrova T, Repmann F, Raab T, Freese D:2015. Uptake of ferrocyanide in willow and poplar trees in a long term greenhouse experiment. Ecotoxicology, 24 (3) :497-510.
- 11- Eula, B.M., Barbara, C., and Charles, H. (2001). *Patty 's toxicology*, 3rd Ed., John Wiley and Sons Pub., New York.
- 12- Ezzi M.I., and Lynch J.M. 2002. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma spp*. Enzyme and Microbiology
- 13- Goudey J.S., Tittle F.L., and Spencer M.S. 1989. A role of ethylene in the metabolism of cyanide by higher plants. Journal of Plant Physiology, 89: 1306-1310.
- 14-Ghosh M, Singh S. A review .2005:on phytoremediation of heavy metals and utilization of it's by products. Applied Ecology and Environmental Res; 3(1): 1-18.
- 15- Groppa M, Benavides M:2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino acids* , 34 (1) :35.
- 16- Ghasemi R, Mokhtari R:2013. Resistance to cyanidby salicylate pretreatment in *Salix babylonica L*. Theoretical and Experimental Plant Physiology, 25 (4) :275-82.
- 17- Hong L, Banks M, Schwab A:2008.. Removal of cyanide contaminants from rhizosphere soil. *Bioremediation Journal*;12(4):210-15.
- 18- Lewis, R. B., E. A. Hiller, and W. R. Jordan. 1974. Susceptibility of grain sorghum to water deficit at three growth stages. *Agron. J.* 66:589.
- 19- Liang W.S. 2003. Drought stress increase both cyanogenesis and beta-cyanoalanine synthase activity in tobacco Journal of plant science, 165: 1109-1115.
- 20- Major D, Hamman W:1981. Comparison of sorghum with wheat and barley grown on dryland. *Canadian Journal of Plant Science* , 61 (1) :37-43.
- 21- Mansoorian A, Vaziri A, Zamani M, Heidaryan Naeini F: 2017. Phytoremediation of the soils



- contaminated with cyanide by *Vetiveria zizanioides*. *Iranian Journal of Health and Environment*, 10(3):411-420.
- 22- O'leary B, Preston GM, Sweetlove LJ. 2014: Increased  $\beta$ -cyanoalanine nitrilase activity improves cyanide tolerance and assimilation in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*;7(1):231-43.
- 23- Premachandra, G. S., H. Saneoka, K. Fujita, and S. Ogata. 1992. Leaf water potential osmotic adjustment cell membrane stability, epicuticular wax load and growth as affected by increasing water deficits in sorghum. *Journal of Experimental Botany*. 43: 1569-1576.
- 24- Rehman HM, Shah ZH, Nawaz MA, Ahmad MQ, Yang SH, Kho KH, et al. 2017: Retracted Article: Betacyanoalanine synthase pathway as a homeostatic mechanism for cyanide detoxification as well as growth and development in higher plants. *Planta*;245(1):235-35. 9. Yu X-Z, Gu J-D, Liu.
- 25- Stout, D. G., T. Kannangara, and G. M. Simpson. 1978. Drought resistance of sorghum bicolor. 2: Water stress effects on growth, *Can. J. plant. Sci.* 58:225.
- 26- T.W. Higss Association Ltd. 1992. Technical guide for the environmental management of cyanide in mining. British committee onreclamation, Canada.
- 27- Trapp S.A.J. and H. chistiansen. 2003. Phytoremediation of cyanide polluted soil pp. 829.862. In: S.C. McCutcheon and J.L.schnoor(Eds), *phytoremediation: Transformation and control of contaminant*. John Wiley&Sons, Hoboken, New Jersey.
- 28- Taebi A, Jeirani K, Mirlohi A, Zadeh Bafghi A: 2008. Phytoremediation of cyanide-polluted soils by non-woody plants. *JWSS-Isfahan University of Technolog*, 11 (42) :515-523.
- 29- Torbati S. 2017: Feasibility Study on Phytoremediation of Malachite Green Dye from Contaminated Aqueous Solutions Using Watercress (*Nasturtium Officinale*). *Iranian Journal of Health and Environment*.;9(4):503-16 (in Persian).
- 30- Wachira wongsakorn P, Jamnongkan T, Latif MT. 2015; Removal of cyanide-contaminated water by vetiver grasses. *Modern Applied Science*. 9(13):252-62.
- 31- Yip WK, Yang S-F: 1998. Ethylenebiosynthesis in relation to cyanide metabolism. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 39:1-70.

## Effects of cyanide contaminated soils on physiological and biochemical properties of *Sorghum bicolor*

Shokouhian Ghahfarokhi A.<sup>1</sup>, Zamani M.R.<sup>2</sup>, Heidarian-Naini F.<sup>1</sup>, Mansourian A.R.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Molecular Cell Biology, Biochemistry, Non-Profit Institute of Noor-e-Danesh of Meymeh, Meymeh, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Dept. of Plant Molecular Biotechnology, National Institute of Genetics Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup>Malek Ashtar University of Technology, Isfahan, I.R. of Iran

### Abstract

Soil contamination by industrial pollutants has associated with increasing risks for human, the environment and other living organisms. Cyanide is considered as one of the most toxic and dangerous pollutants used for the extraction of gold. One of the most cost-effective methods to eliminate cyanide from the environment and soil is "Phytoremediation". In this research, the Physiological and biochemical responses as well as remediation, and resistance of *Sorghum bicolor* to different cyanide treatments were investigated accordingly, the effluent from the gold mining was prepared from Mouteh gold mining of Isfahan and this soil was mixed with normal soil to prepare different concentrations of contaminated soil. Cyanide changes in soil, total protein content, proline and morphometric Stem length, leaf, plant length and stem diameter changes of the plants were measured after completing the vegetative phase of the plant. Plant could absorb cyanide of contaminated soils, Total protein and proline content of the plant were enhanced with increasing cyanide content. Raising the cyanide contaminated soil resulted in promoted protein and proline content in treated plants, reduced cyanide concentration in soil and increased cyanide absorption by plant *Sorghum*. Plant could tolerate 12.69 g/kg of cyanide. Reduction of soil cyanide as well as its accumulation in plant and morphometric changes showed that phytoremediation is an appropriate method for the remediation of cyanide contaminated soils. Therefore, *Sorghum bicolor* can be a useful phytoremediation plant for removing cyanide from soils contaminated with these type of pollutants.

**Key words:** phytoremediation, *Sorghum bicolor*, cyanide, Protein, proline