نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال دهم، شماره ۴۰، زمستان ۱۳۹۴ / صفحات: ۱۲-۱

مقایسه ویژگی‌های بیوشیمیایی دو گونه *Pinus nigra* و *P. eldarica* در خاک‌های آلوده اطراف مجتمع مس سرچشمه کرمان و خاک‌های کمتر آلوده منطقه کنتوئیه

حکیمه علومی*[۱]، فرخنده رضانژاد[۲]، بتول کرامت[۳]

[۱]استادیار، گروه اکولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

[۲]استاد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

[۳]استادیار، گروه، زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید باهنر کرمان

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۷

چکیده

در این پژوهش، از برگ دو گونه‌ی کاج تهران و کاج سیاه کاشته شده در اطراف کارخانه مس سرچشمه به عنوان گیاهان منطقه آلوده نمونه برداری شد. از گیاهان باغ کنتوئیه (به فاصله ۹ کیلومتری از کارخانه) نیز به عنوان منطقه شاهد نمونه برداری انجام شد. گیاهان دو منطقه از نظر میزان پارامترهای مختلفی نظیر رنگیزه‌های فتوسنتزی، ترکیبات فنلی کل، پروتئین‌ها و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز، گایاکول پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند. هر دو گونه مقدار کلروفیل و کاروتنوئیدهای کمتری در منطقه اطراف کارخانه در مقایسه با منطقه شاهد نشان دادند. فعالیت اغلب آنزیم‌های آنتی اکسیدان در هردو گونه مورد مطالعه نیز در منطقه اطراف کارخانه بیشتر بود. بنابراین نتایج نشان از وجود شرایط تنش برای گیاهان منطقه اطراف کارخانه داشت که هر دو گونه با استفاده از پاسخ‌های آنتی اکسیدان و افزایش میزان ترکیبات فنلی و نیز مقدار پروتئین در گیاه کاج سیاه قادر به تحمل شرایط آلودگی منطقه می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: کاج تهران، کاج سیاه، ویژگی‌های بیوشیمیایی، مجتمع مس سرچشمه کرمان

مقدمه

دود و آلاینده‌هایی که به شکل بخارهای سمی و گاز از دودکش‌های بزرگ کارخانه‌ها ساطع می‌شوند، علاوه بر آلودگی هوا و ایجاد مشکلات تنفسی برای انسان‌ها مسبب باران‌های اسیدی نیز هستند. آلاینده‌هایی که به طور معمول در نتیجه فعالیت کارخانه‌ها در هوا رها می‌شوند شامل SO_2، CO، NO_2 و فلزات سنگین هستند (Liu and Ding, 2008). خاک‌های نزدیک معادن و تأسیسات ذوب فلز، به شدت با فلزات سنگینی مانند کادمیوم (Cd)، کروم (Cr)، مس (Cu)، سرب (Pb)، نیکل (Ni) و روی (Zn) آلوده هستند (Boularbah et al., 2006).

تحقیقات نشان داده است فلزات از طریق ریشه از خاک جذب شده و به برگ منتقل می‌شوند. همچنین ممکن است به‌طور مستقیم از طریق برگ از هوا و یا بارش باران جذب گیاه شوند (Kord et al., 2010). انباشت فلزات سنگین در خاک و گیاه اثرات منفی بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و ساختاری گیاه گذاشته، سبب کاهش رشد، کلروز شدن، کاهش جذب مواد غذایی و نیز کاهش محصول، اختلال در

*نویسنده مسئول: oloumi.ha@gmail.com

متابولیسم گیاه و در گیاهان تثبیت کننده ازت، کاهش توانایی تثبیت نیتروژن مولکولی می‌شوند (Guala et al., 2010).

در دسترس بودن فلزات علاوه بر غلظت کل آن، به فاکتورهای زیستی (مانند ترشحات ریشه و میکروارگانیسم‌ها) و فیزیکو- شیمیایی خاک (مانند pH، رطوبت، ماده آلی و نوع خاک) وابسته است (Manara, 2012). نوع واریته گیاه و نیز سن آن از عوامل موثر در جذب فلز در گیاهان می‌باشند. اغلب فلزات سنگین خاک در سطوح pH خنثی در دسترس هستند که در آن امکان جذب فلزات سنگین توسط گیاهان در خاک‌های جنگلی و کشاورزی فراهم می‌گردد (Guala et al., 2010).

فتوسنتز یکی از مهمترین فرایندهای فیزیولوژیکی گیاه می‌باشد که تحت تاثیر تنش فلزات سنگین قرار می‌گیرد (Sawidis et al., 1995). تغییر در واکنش‌های فتوسنتز می‌تواند مربوط به تغییر در رفتار روزنه‌ای، اختلال در ساختار تیلاکوئید کلروپلاست، کاهش در میزان انتقال الکترون و یا تغییر در فعالیت فتوسیستم‌های I و II باشد (Stoeva and Bineva, 2003). آلاینده‌های محیطی همچنین بر میزان ترکیبات فنلی گیاه تاثیر می‌گذارند (Michalak, 2006). ترکیبات فنلی به‌عنوان سوبسترای آنزیم‌هایی مثل گایاکول‌پراکسیداز عمل می‌کنند. در این راستا گزارش شده است آنزیم گایاکول‌پراکسیداز از اکسیداسیون ترکیبات فنلی برای سم‌زدایی و تجزیه پراکسیدهیدروژن استفاده می‌کند و یا به‌طور مستقیم با رادیکال‌های پراکسیدهیدروژن وارد واکنش می‌شوند و به‌عنوان دهنده الکترون به پراکسیدهیدروژن عمل می‌کنند. در هر دو حالت ذکر شده رادیکال‌های فنوکسیل تولید می‌شود که با اکسیداسیون آسکوربات، احیا می‌شوند (Takahama and Oniki, 1997).

تحقیقات نشان داده است فلزات سنگین با ایجاد گونه های فعال اکسیژن موجب تنش اکسیداتیو و در نهایت تخریب لیپیدهای غشایی می‌گردند. سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی از جمله آنزیم‌های کاتالاز، گایاکول پراکسیداز ،آسکوربات پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، یکی از مکانیسم های اصلی سم زدایی فلزات سنگین در گیاهان می‌باشند (Liu et al., 2006).

گازهای خروجی از دهانه دودکش‌های مجتمع معدنی مس سرچشمه (شروع عملیات معدن‌کاری از سال ۱۳٤٥) حاوی مقدار زیادی ذرات ریز جامد به‌صورت معلق هستند که اغلب این ذرات حاوی ترکیبات فلز سنگین می‌باشند. تجمع فلزات آرسنیک و سلنیوم در خاک‌های اطراف مجتمع مس سرچشمه توسط شایسته فر و همکاران (۱۳۹۱) به اثبات رسیده است. قطبی راوندی و همکاران (۱۳۸۷) نیز تجمع فلزات مس، سرب و روی در گیاهان بومی منطقه اطراف مس سرچشمه را گزارش نموده‌اند (قطبی راوندی و همکاران، ۱۳۸۷).

کاج تهران و کاج سیاه دو گونه درختی کاشته شده در اطراف مجموعه معدنی مس سرچشمه می‌باشند که به‌صورت تزئینی کاشته شده‌اند. خانواده کاج بزرگ‌ترین و از نظر اقتصادی و بوم‌شناختی مهم‌ترین خانواده مخروطیان است. کاج سیاه (*Pinus nigra*) به‌علت دارا بودن واریته‌های مختلف با نیازهای اکولوژیکی متفاوت، رویشگاه‌های متعددی دارد و اغلب در جنگل‌های مدیترانه‌ای پراکنده است (Mozaffarian, 1991). کاج معمولی یا کاج تهران (*P. eldarica*) درختی همیشه سبز و معطر و در هنگام جوانی مخروطی شکل بوده و به‌تدریج و با افزایش سن گسترده می‌شود (Hüttermann et al., 1999). این گونه به‌عنوان یک گیاه انباشتگر، به‌عنوان شاخص آلودگی مناطق معرفی شده است (Kord et al., 2010). کاج تهران به‌دلیل تطابق سریع با شرایط

سخت محیطی مانند خشکی، یکی از مقاوم‌ترین گونه‌های جنس کاج محسوب می‌شود. بنابراین در بیشتر مناطق خشک و کم باران ایران جهت احداث بادشکن و فضای سبز حاشیه خیابان‌ها، پارک‌ها و بلوارهای شهری کاشته می‌شود.

در این پژوهش تاثیر آلایندگی فلزات سنگین در منطقه اطراف مجتمع مس سرچشمه بر گیاهان کاشته شده منطقه شامل کاج سیاه و کاج تهران در مقایسه با منطقه کنتوئیه به‌عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور بررسی محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی و برخی پاسخ‌های بیوشیمیایی شامل پروتئین‌ها، ترکیبات فنلی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان برگ از جمله اهداف پژوهش حاضر بود.

مواد و روش‌ها

منطقه نمونه‌برداری: معدن مس سرچشمه با مختصات "۲۰ '۵۲ °۵۵ طول شرقی و "۴۰ '۵۶ °۲۹ عرض شمالی در ۱۶۰ کیلومتری جنوب غربی کرمان و ۵۰ کیلومتری رفسنجان قرار دارد. در این پژوهش دو منطقه واجد گیاهان کاشته شده برای بررسی در نظر گرفته شد که شامل منطقه اطراف کارخانه و منطقه شاهد بنام کنتوئیه بود. منطقه‌ی کنتوئیه در فاصله ۹ کیلومتری کارخانه و در خلاف جهت مسیر باد قرار دارد و توسط تپه‌ها تا حدود زیادی از آلودگی کارخانه مصون است و بعنوان منطقه‌ای با آلودگی کمتر (شاهد) انتخاب گردید.

از برگ شاخه‌های پایینی درختان همسن (پانزده ساله) دو گونه غالب کاشته شده شامل کاج تهران (*Pinus eldarica*) و کاج سیاه (*P. nigra*) در مناطق ذکر شده در فصل بهار نمونه‌برداری انجام گرفت. به این منظور، نمونه‌گیری از درختان هر منطقه در ۳ پلات با مساحت ۸×۸ متر که بطور تصادفی انتخاب شده بودند انجام گرفت. جهت انجام سنجش‌ها، برگ های جمع آوری شده با ازت فریز و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای هر نمونه برداری سه تکرار به‌طور تصادفی انتخاب شدند.

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقدار ۰/۲ گرم برگ گیاه با ۱۵ میلی‌لیتر استن ۸۰ درصد عصاره‌گیری شد و جذب نمونه صاف شده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ٦٤٦/٨، ٦٦٣/٢٠ و ٤٧٠ نانومتر خوانده شد. غلظت رنگیزه‌ها با استفاده از رابطه‌های زیر و بر حسب میکروگرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

$$Chla = 12.25\ A_{663.2} - 2.79\ A_{646.8}$$
$$Chlb = 21.21\ A_{646.8} - 5.1\ A_{663.2}$$
$$Total\ Chl = Chla + Chlb$$
$$Car = (1000A_{470} - 1.8\ Chla - 85.02\ Chlb)/198$$

سنجش ترکیبات فنلی کل: مقدار ۰/۱ گرم برگ در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد سائیده و به‌مدت ۷۲-۲٤ ساعت در تاریکی نگهداری شد. به ۱ میلی‌لیتر محلول رویی ۱ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه و با آب مقطر دو بار تقطیر حجم محلول به ۵ میلی لیتر رسانده شد. ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین ۵۰ درصد و ۱ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۵ درصد به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل به‌مدت ۱ ساعت در تاریکی نگهداری شد و سپس جذب هر نمونه در طول موج ۷۲۵ نانومتر خوانده شد و غلظت ترکیبات فنلی کل با استفاده از منحنی استاندارد گالیک اسید و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید (Fletcher and Kott, 1999).

استخراج عصاره پروتئینی: یک گرم نمونه برگ در سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷/۲) حاوی اتیلن دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) ۱ میلی‌مولار و پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP) ۱ درصد

عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱٤۰۰۰g و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Eppendorf Centrifuge 5804R, Germany) گردید. از محلول رویی برای مطالعه فعالیت آنزیم‌ها و سنجش پروتئین کل استفاده گردید.

سنجش پروتئین کل: برای سنجش مقدار پروتئین کل از روش Bradford (۱۹۷٦) استفاده شد. به ۰/۱ میلی‌لیتر عصاره پروتئینی، ۵ میلی‌لیتر معرف بیوره اضافه و ورتکس شد. جذب نمونه‌ها پس از ۱۰-۵ دقیقه با دستگاه اسپکتروفتومتر Cary50 Varian (ساخت استرالیا) در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد و غلظت پروتئین با استفاده از منحنی استاندارد آلبومین گاوی محاسبه و بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه گردید.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

از عصاره پروتئینی برای سنجش فعالیت آنزیم‌ها استفاده گردید.

فعالیت کاتالاز: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از محاسبه کاهش جذب H_2O_2 (کاهش مقدار H_2O_2) در ۲٤۰ نانومتر انجام شد. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH ۷ و پراکسیدهیدروژن ۱۵ میلی‌مولار اضافه گردید. بلانک شامل مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی بود. تغییرات جذب (تفاضل جذب در زمان شروع واکنش از جذب پس از یک دقیقه)، محاسبه گردید. کاهش میزان H_2O_2 موجود در مخلوط واکنش پس از ۱ دقیقه محاسبه شد (Dhindsa et al., 1981). فعالیت آنزیم به صورت واحد آنزیمی بر حسب مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره در یک دقیقه محاسبه گردید. یک واحد آنزیمی کاتالاز مقدار آنزیمی است که ۱ میلی‌مول H_2O_2 را در یک دقیقه تجزیه می‌کند.

فعالیت آسکوربات پراکسیداز: مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مول با pH=۷، آسکوربات ۰/۵ میلی‌مولار، H_2O_2 ۰/۱۵ میلی‌مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. کاهش جذب در ۲۹۰ نانومتر، به مدت دو دقیقه پس از شروع واکنش نسبت به زمان شروع واکنش محاسبه شد. با استفاده از تغییرات جذب در طول موج ۲۹۰ نانومتر، ضریب خاموشی آسکوربات ($mM^{-1}cm^{-1}$ ۲/۸)، میزان آسکوربات برجای مانده پس از ۲ دقیقه محاسبه شد. یک واحد آنزیمی آسکوربات پراکسیداز مقدار آنزیمی است که یک میلی‌مول آسکوربات را در یک دقیقه اکسید می‌کند (Nakano and Asada, 1981). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۵۰ میکرولیتر عصاره، گزارش شد.

فعالیت گایاکول پراکسیداز: سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از گایاکول و اندازه گیری میزان جذب تتراگایاکول تشکیل شده در نتیجه فعالیت پراکسیداز، در ٤۷۰ نانومتر انجام گرفت. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار pH=۷، پراکسیدهیدروژن (۰/۳ درصد) و گایاکول (۱ درصد) و ۲۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. میزان جذب تتراگایاکول (حاصل از اکسید شدن گایاکول) در ٤۷۰ نانومتر در لحظه شروع واکنش پس از اضافه نمودن عصاره آنزیمی و پس از یک دقیقه خوانده شد. با استفاده از تغییرات جذب در ٤۷۰ نانومتر در مدت زمان یک دقیقه، ضریب خاموشی تتراگایاکول ($mM^{-1}cm^{-1}$ ۲۵/۵) مقدار تتراگایاکول تشکیل شده محاسبه شد. این مقدار از تتراگایاکول معادل فعالیت یک واحد آنزیم پراکسیداز می‌باشد (Plewa et al., 1991). فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین

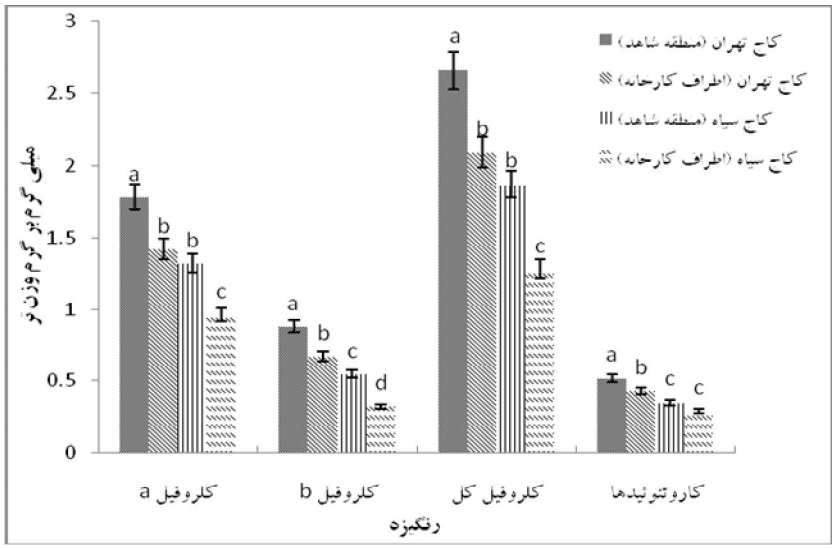
کل (میلی‌گرم) موجود در ۲۰ میکرولیتر عصاره گزارش شد.

فعالیت پلی فنل اکسیداز: مخلوط واکنش شامل بافر تریس ۰/۲ مولار با pH=۷/٦ و پیروگالول ۰/۰۲ مولار بود. واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی شروع شد. در حضور آنزیم پلی فنل اکسیداز، پیروگالول موجود در مخلوط واکنش، به پورپوروگالین تبدیل می‌شود. کاهش در جذب پیروگالول در ٤۲۰ نانومتر، پس از ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به زمان شروع واکنش، محاسبه گردید. تغییرات جذب در مدت ۱ دقیقه محاسبه شد. با استفاده از ضریب خاموشی پیروگالول (٦/۲ $mM^{-1}cm^{-1}$) مقدار برجای مانده پیروگالول در مخلوط واکنش به دست می‌آید. یک واحد آنزیمی پلی‌فنل‌اکسیداز شامل مقدار پیروگالولی است که در مدت ۱ دقیقه به پورپوروگالین تبدیل می‌شود (Kar and Mishra, 1976). فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) موجود در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره محاسبه گردید.

این تحقیق در قالب یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها با سه تکرار، در نرم‌افزار SPSS توسط تجزیه واریانس یک‌طرفه و با توجه به نزدیکی گونه‌های مورد مطالعه توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

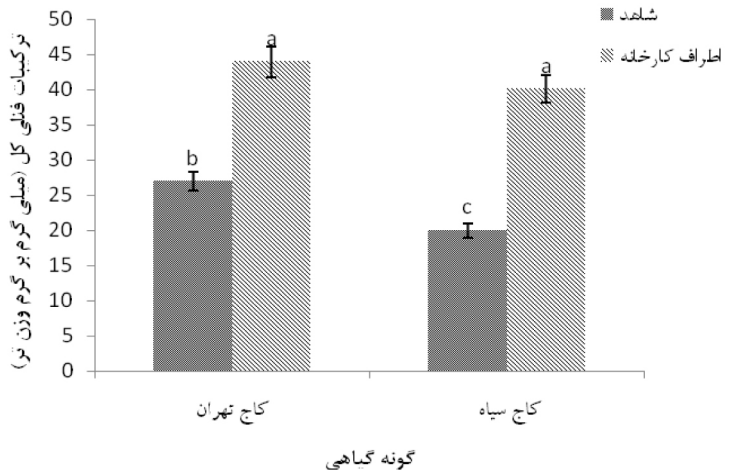
نتایج

رنگیزه‌های فتوسنتزی: طبق نتایج بدست آمده مقدار کلروفیل a و b و کل در گیاهان منطقه آلوده به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از منطقه شاهد بود. میزان کلروفیل a و b و کل در کاج تهران در هر دو منطقه به‌طور معنی‌داری بیشتر از کاج سیاه بود (جدول ۱). محتوای کاروتنوئیدها در کاج تهران در منطقه آلوده به طور معنی‌داری کمتر اما تفاوت معنی‌داری بین محتوای کاروتنوئیدهای کاج سیاه در منطقه آلوده و شاهد مشاهده نشد .کاج تهران مقدار کاروتنوئیدهای بیشتری در مقایسه با کاج سیاه نشان داد (شکل ۱).



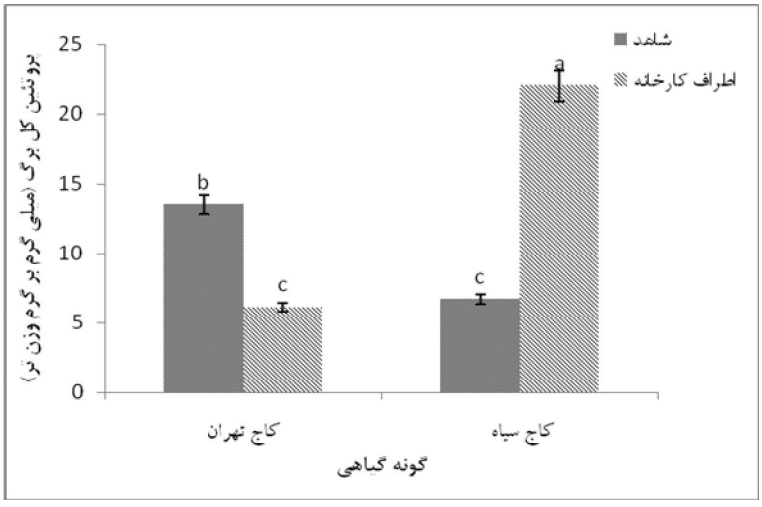
شکل ۱: محتوای کلروفیل a، b، و کاروتنوئیدها در برگ کاج تهران (*P. eldarica*) و کاج سیاه (*P. nigra*) در منطقه اطراف مجتمع مس سرچشمه و منطقه شاهد. داده‌ها شامل میانگین± خطای استاندارد با ۳ تکرار می‌باشند که با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. حروف متفاوت نشانه اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

محتوای ترکیبات فنلی: چنانچه در شکل ۲ ملاحظه می‌شود مقدار ترکیبات فنلی کل در گیاهان منطقه آلوده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان منطقه شاهد بود. تفاوت معنی‌داری در مقدار ترکیبات فنلی منطقه آلوده کل در دو گیاه مشاهده نشد. اما در منطقه کنتوئیه مقدار ترکیبات فنلی کل در گیاه کاج تهران به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (شکل ۲).



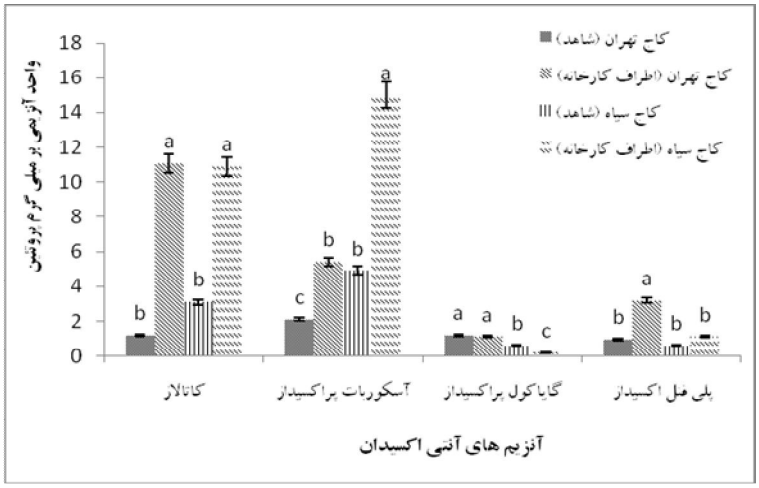
شکل ۲: محتوای ترکیبات فنلی کل در برگ کاج تهران (*P. eldarica*) و کاج سیاه (*P. nigra*) منطقه آلوده اطراف مجتمع مس سرچشمه و منطقه شاهد. داده‌ها شامل میانگین± خطای استاندارد با ۳ تکرار می‌باشند که با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. حروف متفاوت نشانه معنی‌داری می‌باشد.

محتوای پروتئین کل: طبق داده‌های به‌دست آمده محتوای پروتئین برگ کاج تهران، در منطقه اطراف مجتمع مس سرچشمه کمتر از شاهد بود در حالی که کاج سیاه در منطقه آلوده مقدار پروتئین بیشتری نسبت به منطقه شاهد داشت (شکل ۳).



شکل ۳: محتوای پروتئین کل در برگ کاج تهران (*P. eldarica*) و کاج سیاه (*P. nigra*) منطقه آلوده اطراف مجتمع مس سرچشمه و منطقه شاهد. داده‌ها شامل میانگین± خطای استاندارد با ۳ تکرار می‌باشند که با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. حروف متفاوت نشانه معنی‌داری می‌باشد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان: نتایج این تحقیق نشان داد در منطقه اطراف مجتمع مس فعالیت آنزیم کاتالاز به‌طور کاملاً معنی‌داری بیشتر از منطقه شاهد بود. تفاوت معنی داری بین دو گونه ی مورد مطالعه مشاهده نشد. آنزیم آسکوربات پراکسیداز در برگ کاج تهران، در منطقه اطراف مجتمع مس فعالیت بیشتری نسبت به منطقه کنتوئیه (شاهد) داشت. اما در کاج سیاه فعالیت این آنزیم در منطقه اطراف مجتمع مس نسبت به منطقه شاهد کمتر بود. فعالیت گایاکول پراکسیداز در کاج تهران و پلی فنل اکسیداز در کاج سیاه تفاوت معنی‌داری بین مناطق اطراف مجتمع مس و منطقه کنتوئیه نشان نداد. فعالیت گایاکول پراکسیداز در کاج سیاه در منطقه آلوده کمتر از منطقه شاهد بود. فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در کاج تهران به‌طور معنی‌داری بالاتر از منطقه شاهد بود. تفاوت معنی‌داری بین فعالیت این آنزیم دو گونه در منطقه کنتوئیه مشاهده نشد (شکل ٤).



شکل ٤: فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در برگ کاج تهران (*P. eldarica*) و کاج سیاه (*P. nigra*) منطقه آلوده اطراف مجتمع مس سرچشمه و منطقه شاهد. داده‌ها شامل میانگین± خطای استاندارد با ۳ تکرار می‌باشند که با ضریب اطمینان ۹۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفته‌اند. حروف متفاوت نشانه معنی‌داری می‌باشد.

بحث

در پژوهش حاضر مقدار کلروفیل a، b و کلروفیل کل در هردو درخت مورد مطالعه در منطقه آلوده کمتر بود. همچنین محتوای کاروتنوئیدها در کاج تهران در منطقه آلوده به‌طور معنی داری کمتر بود در حالیکه تفاوت معنی‌داری بین محتوای کاروتنوئیدهای کاج سیاه در منطقه آلوده و شاهد وجود نداشت. طبق گزارش رضا نژاد و همکاران (١٣٩٤) محتوای برخی فلزات سنگین به‌طور معنی‌داری در منطقه اطراف کارخانه مس سرچشمه بیشتر از مناطق با فاصله بیشتر از کارخانه بود. تجمع بیشتر فلزات سنگین در اندام‌های گیاهی این دو گونه کاج نیز توسط این محققان به اثبات رسیده است. همچنین غلظت این فلزات در خاک‌های منطقه معدنی مس سرچشمه به‌طور معنی‌داری بالاتر از خاک غیر آلوده بوده‌اند . بنابراین می‌توان کمتر بودن مقدار رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان را در مناطق اطراف کارخانه به تجمع فلزات سنگین نسبت داد. تاثیر فلزات سنگین بر عملکرد دستگاه فتوسنتزی و رنگیزه‌های فتوسنتزی ثابت شده است (Das et al., 2013). گزارش شده

است که تنش مس در برگ‌های جو تشکیل کلروفیل را متوقف کرده و موجب افزایش تخریب کاروتنوئیدها گردیده است (Luna et al., 1994). همچنین عنوان شده است محتوای کلروفیل در برگ‌های گیاهان نخودفرنگی تحت تنش سرب و کادمیم، کاهش یافت (Sandalio et al., 2001). در این راستا اعلام شده است کاهش کلروفیل در حضور فلزاتی مانند کادمیم و سرب می‌تواند به‌علت مهار آنزیم‌های سنتزکننده کلروفیل باشد (Seregin and Ivanov, 2001). در پژوهش حاضر کاهش میزان رنگیزه‌ها در گیاهان منطقه اطراف کارخانه را می‌توان به آلاینده‌های گازی بیشتر در محدوده اطراف کارخانه (امیرتیموری و همکاران، ۱۳۹۳) نسبت داد. تاثیر آلودگی مناطق صنعتی بر رنگیزه‌های گیاهی به اثبات رسیده است (Wani et al., 2008). کاهش کلروفیل به وسیله تنش SO_2 در صنوبر، اسفناج و جلبک‌ها گزارش شده است (Rao and LeBlanc, 1966). مطالعات Verma و همکاران (۲۰۰۶) نشان داد که رنگیزه‌های فتوسنتزی در گیاهان *Ipomea pes-tigridis* نزدیک‌تر به مناطق آلوده نیروگاه حرارتی بادارپور هند بعلت آلودگی هوای منطقه نسبت به گیاهان با فاصله بیشتر از نیروگاه کمتر بود (Verma et al., 2006). Nighat و Iqbal (۲۰۰۰) نیز با مطالعه روی گیاهان اطراف نیروگاه حرارتی کاظم پور هند گزارش دادند که در گیاهان مناطق با آلودگی هوای نزدیک نیروگاه محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی کاهش می‌یابد (Nighat and Iqbal, 2000). بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش و کاهش میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی، عملکرد سیستم فتوسنتزی هر دو گونه مورد مطالعه تحت تاثیر شرایط محیطی اطراف کارخانه و آلودگی ناشی از آن قرار گرفته‌اند.

در پژوهش حاضر، مقدار ترکیبات فنلی کل در گیاهان منطقه آلوده به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان منطقه شاهد بود. در منطقه آلوده مقدار ترکیبات فنلی کل در دو گیاه تفاوت معنی‌داری نداشت. اما در منطقه شاهد مقدار ترکیبات فنلی کل در گیاه کاج تهران به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. القای سنتز محصولات فنیل پروپانوئید در اثر تنش‌های غیرزیستی از جمله فلزات سنگین گزارش شده است (Solecka, 1997)، که ممکن است یکی از دلایل افزایش این ترکیبات در گیاهان مورد مطالعه باشد.

تحقیقات نشان داده است ترکیبات فنلی از طریق کاهش یا مهار اتواکسیداسیون لیپیدها، جاروب کردن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، اکسیژن یکتایی و یا تجزیه پراکسیدها، به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان ضروری برای حفاظت علیه تکثیر و پیشروی زنجیره اکسیداسیون و دفاع علیه گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌نمایند (Egert and Tevini, 2002).

تحقیقات نشان داده است متابولیت‌های فنلی توسط تنش القا و در بافت‌ها به علت تنش‌های زیستی و غیر زیستی تجمع می‌یابند. این متابولیت‌ها ممکن است در حذف ROS از طریق آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو شرکت کنند و یا به طور مستقیم فلزات را شلات کنند (Kováčik and Bačkor, 2007).

پروتئین‌ها به‌طورمستقیم یا غیرمستقیم در مقاومت در برابر عوامل استرس‌زا نقش دارند (Timperio et al., 2008). اثرات منفی آلودگی هوا (Rezanejad, 2009) افزایش فلزات (Demirevska-Kepova et al., 2004) بر متابولیسم نیتروژن و پروتئین قبلا گزارش شده است در این پژوهش محتوای پروتئین در برگ کاج تهران منطقه اطراف کارخانه پایین‌تر از همان گیاه در منطقه شاهد بود. اما کاج سیاه در منطقه آلوده مقدار پروتئین بیشتری نسبت به منطقه شاهد نشان داد. استرس‌های غیر زیستی معمولاً باعث اختلال در عملکرد پروتئین می‌شود. البته در مطالعات Gao و همکاران (۲۰۰۸) با افزایش غلظت مس تا ٤٠٠ میکرومولار محتوای پروتئین ریشه و برگ

در گیاه *Jatropha curcas* افزایش پیدا کرد که با نتایج این پژوهش در کاج سیاه مطابقت دارد. کاهش میزان نیتروژن در برگ‌های درختان *Pinus silvestris*، *Picea abies* و *Betula pendula* منطقه آلوده به فلزات سنگین و دی‌اکسیدگوگرد گزارش شده است (Balsberg-Påhlsson, 1989). Rabe و Kreeb (۱۹۷۹) دلیل کاهش میزان پروتئین‌های محلول در گونه‌های *Tulipa gesnerana*، *Hordeum distichon*، *Medicago sativa* و *Beta vulgaris*، تحت تنش آلاینده‌ها را از یک سو به کاهش سنتز از نو پروتئین‌ها و از سوی دیگر تجزیه و تبدیل به اسیدهای آمینه بیان کرده‌اند (Rabe and Kreeb, 1979).

گزارش شده است که فلزات سنگین تولید ROS را تحریک و از این طریق پراکسیداسیون پروتئین‌ها را القاء می‌کند (Hou et al., 2007). بنابراین با توجه به افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه احتمال می‌رود که یکی از دلایل کاهش پروتئین در کاج تهران منطقه آلوده در پژوهش حاضر نیز تاثیر شرایط بر تولید رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون آن‌ها باشد. از طرفی افزایش پروتئین‌های محلول در کاج سیاه را می‌توان به‌علت تولید متالوپروتئین نسبت داد. گزارش شده است در شرایط تنش فلزات سنگین، گیاهان متحمل قادر به تولید پروتئین‌های جمع کننده فلز از جمله متالوتیونین‌ها می‌باشند و از این طریق مقاومت بیشتری در شرایط تنش فلزات سنگین خواهند داشت (Kärenlampi et al., 2000).

طبق نتایج به‌دست آمده فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان مورد بررسی در این پژوهش، روند متغیری را نشان داد. فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، اسکوربات پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در کاج تهران در شرایط آلودگی (منطقه اطراف کارخانه) شدت بیشتری نشان داد. در کاج سیاه نیز افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و افزایش نسبی پلی‌فنل اکسیداز در شرایط آلودگی مشاهده می‌شود. به‌نظر می‌رسد شرایط تنش گیاه از جمله فلزات سنگین (با توجه به بالا بودن فلزات سنگین در منطقه آلوده اطراف کارخانه (رضانژاد و همکاران، ۱۳۹٤) بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان تاثیرگذار بوده است. مطالعات نتایج متفاوتی را در مورد تاثیر آلودگی بر فعالیت آنزیم‌ها گزارش نموده‌اند. مشابه با نتایج این پژوهش در مطالعه‌ای که روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز) در ریشه کاج اسکاتلندی تحت تنش کادمیم، انجام شد، مشاهده گردید که در ابتدا فعالیت این آنزیم‌ها به جز سوپراکسید دیسموتاز مهار و سپس با افزایش غلظت کادمیوم، فعالیت آن‌ها بعد از چند ساعت افزایش و پس از مدتی دوباره کاهش یافت. در این راستا بیان شده است این تغییرات می‌تواند بعلت اتصال فلز به گروه‌های تیول آنزیم‌های حاوی تیول (کاتالاز،گلوتاتیون ردوکتاز ،آسکوربات پراکسیداز) و درنتیجه غیر فعال شدن آنزیم و مهار سیستم‌های درگیر در حذف هیدروژن پراکسیداز باشد (Schützendübel et al., 2001). از سوی دیگر در برگ *Alternanthera philoxeroides* گزارش شده است که میزان فعالیت پراکسیداز در غلظت‌های پایین کادمیم افزایش یافته اما در غلظت‌های بالا، میزان فعالیت آن کاهش نشان داد. در پژوهش‌های Kubo و همکاران (۱۹۹۹) که در گیاه آرابیدوپسیس انجام گرفت در بسیاری از تنش‌های محیطی فعالیت کاتالاز تغییر معنی‌داری نداشت، اما فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در پاسخ به تعدادی از استرس‌های محیطی افزایش و تعدادی نیز کاهش نشان داد (Kubo et al., 1999). در بررسی اثر سمیت مس بر روی میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز در گیاه گوجه فرنگی، مشاهده شد که میزان فعالیت این آنزیم افزایش

چشمگیری می‌یابد که احتمالا به عنوان یک پاسخ اولیه در برابر تنش اکسیداتیو القا شده توسط مس می‌باشد (Martins and Mourato, 2006). همچنین عنوان شده است آنزیم پلی فنل اکسیداز نیز به‌طور گسترده‌ای در گیاه توزیع شده و در جاروب کردن انواع اکسیژن‌های واکنشگر و دفاع در مقابل تنش‌ها نقش دارد (Ali et al., 2006).

Kubo و همکاران (۱۹۹۹) علت تفاوت در میزان تغییرات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان را وابسته به آستانه فعالیت آنزیم، میزان تنش، و بافت مورد مطالعه می‌دانند. دلیل دیگر وابستگی میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، به‌سطحی از تنش می‌باشد که باعث ایجاد گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. همچنین به اندامی که در آن گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود نیز بستگی دارد (Kubo et al., 1999).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج حاصل از پژوهش، می‌توان بیان نمود شرایط منطقه اطراف کارخانه مس سرچشمه بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی گونه‌های کاج *P. nigra* و *P. elderica* تاثیر گذار می‌باشد. کاهش رنگیزه‌های فتوسنتزی در هر دو گونه نشان‌دهنده اثرات منفی شرایط اطراف کارخانه بر فرایندهای زیستی گیاه می‌باشد اما افزایش ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان هر دو گونه مورد مطالعه و نیز مقدار پروتئین بیشتر در کاج سیاه در منطقه اطراف کارخانه می‌تواند نشانگر سازش هر دو گونه به شرایط آلودگی منطقه باشد.

منابع

امیر تیموری، س.، خلیلیان، ص.، امیرنژاد، ح. و محبی، ع. (۱۳۹۳). برآورد میزان بهینهٔ اجتماعی گاز دی اکسید گوگرد منتشرشده از مجتمع مس سرچشمه و مالیات بهینه بر آن. تحقیقات اقتصادی. جلد چهارم. شماره ٤٩. صفحات ٩٧–٧٧.

رضانژاد، ف.، قلی‌پور، ز.، علومی، ح. و منوچهری کلانتری، خ. (١٣٩٤). واکنش ساختاری برگ دو گونه کاج (*Pinus nigra* و *P. eldarica*) به فلزات سنگین (مطالعه موردی: کارخانه مس سرچشمه). مجله پژوهش‌های گیاهی، پذیرش چاپ.

شایسته‌فر، م.، شفیعی، ن.، شیرانی، ح.، رضایی، ع. و کارگر دیانتی، م. (۱۳۹۱). توزیع عناصر آرسنیک و سلنیوم در خاک‌های اطراف معدن مس سرچشمه کرمان. نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی). جلد ٢٦. شماره سوم. صفحات ٥٤٤–٥٣٣.

قطبی‌راوندی، ع.، قادریان، م. و اسماعیل‌زاده، ع. (۱۳۸۷). بررسی امکان استفاده از گیاهان بومی جهت زدودن آلودگی‌های فلزات سنگین در ناحیه معدنی مس سرچشمه کرمان. دومین همایش تخصصی مهندسی محیط زیست، تهران. دانشگاه تهران، دانشکده محیط‌زیست.

Ali, M.B., Singh, N., Shohael, A.M., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2006). Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. Plant Science. 171 (1):147-154.

Balsberg-Påhlsson, A.M. (1989). Effects of heavy-metal and SO_2 pollution on the concentrations of carbohydrates and nitrogen in tree leaves. Canadian Journal of Botany. 67 (7):2106-2113.

Boularbah, A., Schwartz, C., Bitton, G., Aboudrar, W., Ouhammou A. and Morel J.L. (2006). Heavy metal contamination from mining sites in South Morocco: 2. Assessment of metal accumulation and toxicity in plants. Chemosphere. 63 (5):811-817.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72 (1):248-254.

Das, G.C., Kumar, K.B. and Mohanty, B. (2013). Effect of mercury and cadmium on the biochemical parameters of hydrilla plant. International Journal of Biological and Pharmaceutical Research. 7:58-67.

Demirevska-Kepova, K., Simova-Stoilova, L., Stoyanova, Z., Hölzer, R. and Feller, U. (2004). Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. Environmental and Experimental Botany. 52 (3):253-266.

Dhindsa, R.S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T.A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany. 32 (1):93-101.

Egert, M. and Tevini, M. (2002). Influence of drought on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress in leaves of chives (*Allium eschoenoprasum*). Environmental and Experimental Botany. 48 (1):43-49

Fletcher, R. and Kott, L.S. (1999). Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. Proc 10th Int Rapeseed Congress GCIRC, Canberra, Australia.

Gao, S., Ouyang, C., Wang, S., Xu, Y. ,Tang, L. and Chen, F. (2008). Effects of salt stress on growth, antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in Jatropha curcas L. seedlings. Plant Soil Environment. 54 (9):374-381.

Guala, S.D., Vega, F.A. and Covelo, E.F. (2010). The dynamics of heavy metals in plant–soil interactions. Ecological Modelling. 221 (8):1148-1152.

Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q. and Chang, C.C . (2007). Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiology and Biochemistry. 45 (1):62-69.

Hüttermann, A., Zommorodi, M. and Reise, K. (1999). Addition of hydrogels to soil for prolonging the survival of *Pinus halepensis* seedlings subjected to drought. Soil and Tillage Research. 50 (3):295-304.

Kar, M. and Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiology. 57 (2):315-319.

Kärenlampi, S., Schat, H., Vangronsveld, J., Verkleij, J., van der Lelie, D., Mergeay, M. and Tervahauta, A. (2000). Genetic engineering in the improvement of plants for phytoremediation of metal polluted soils. Environmental Pollution. 107 (2):225-231.

Kord, B., Mataji, A. and Babaie, S. (2010). Pine (*Pinus eldarica* Medw.) needles as indicator for heavy metals pollution. International Journal of Environmental Science and Technology. 7 (1):79-84.

Kováčik, J. and Bačkor, M. (2007). Phenylalanine ammonia-lyase and phenolic compounds in chamomile tolerance to cadmium and copper excess. Water, Air, and Soil Pollution. 185 (1-4):185-193.

Kubo, A., Aono, M., Nakajima, N., Saji, H., Tanaka, K. and Kondo, N. (1999). Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Research. 112(3):279-290.

Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148: 350-382.

Liu, J.H., Nad,a K., Honda, C., Kitashiba, H., Wen, X.P., Pang, X.M. and Moriguchi, T. (2006). Polyamine biosynthesis of apple callus under salt stress: importance of the arginine decarboxylase pathway in stress response. Journal of Experimental Botany. 57 (11):2589-2599.

Liu, Y.J. and Ding, H. (2008). Variation in air pollution tolerance index of plants near a steel factory: Implication for landscape-plant species selection for industrial areas. WSEAS Transactions on Environment and Development. 4 (1):24-32.

Luna, C.M .,González, C.A. and Trippi, V.S. (1994). Oxidative damage caused by an excess of copper in oat leaves. Plant and Cell Physiology. 35 (1):11-15.

Manara, A. (2012). Plant responses to heavy metal toxicity. In: Plants and heavy metals. Springer, pp 27-53.

Martins, L.L. and Mourato, M.P. (2006). Effect of excess copper on tomato plants: growth parameters, enzyme activities, chlorophyll, and mineral content. Journal of Plant Nutrition. 29 (12):2179-2198.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish Journal of Environmental Studies. 15 (4):523.

Mozaffarian, V. (1991). Plant Systmematics. Amir Kabir University Press

Nakano, Y. and Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology. 22 (5):867-880.

Nighat, F. and Iqbal, M. (2000). Stomatal conductance, photosynthetic rate, and pigment content in *Ruellia tuberosa* leaves as affected by coal-smoke pollution. Biologia Plantarum. 43 (2):263-267.

Plewa, M.J., Smith, S.R. and Wagner, E.D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 247 (1):57-64.

Rabe, R. and Kreeb, K. (1979). Enzyme activities and chlorophyll and protein content in plants as indicators of air pollution. Environmental Pollution. 19 (2):119-137

Rao, D. and LeBlanc, F. (1966). Effects of sulfur dioxide on the lichen alga, with special reference to chlorophyll. Bryologist.10:69-75.

Rezanejad, F. (2009). Air pollution effects on structure, proteins and flavonoids in pollen grains of *Thuja orientalis* L.(Cupressaceae). Grana. 48 (3):205-213.

Sandalio, L., Dalurzo, H., Gomez, M., Romero-Puertas, M. and Del Rio, L. (2001). Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. Journal of Experimental Botany. 52 (364):2115-2126.

S**awidis, T., Marnasidis, A., Zachariadis, G. and Stratis, J. (1995)**. A study of air pollution with heavy metals in Thessaloniki city (Greece) using trees as biological indicators. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 28 (1):118-124.

Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld-Heyser, R., Godbold, D.L. and Polle, A. (2001). Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. Plant Physiology. 127(3):887-898.

Seregin, I. and Ivanov, V. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology. 48 (4):523-544.

Solecka, D. (1997). Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. Acta Physiologiae Plantarum. 19 (3):257-268.

Stoeva, N. and Bineva, T. (2003). Oxidative changes and photosynthesis in oat plants grown in as-contaminated soil. Bulgarian Journal of Plant Physiology. 29 (1-2):87-95.

Takahama, U. and Oniki, T. (1997). A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. Physiologia Plantarum. 101 (4):845-852.

Timperio, A.M., Egidi, M.G. and Zolla, L. (2008). Proteomics applied on plant abiotic stresses: role of heat shock proteins (HSP). Journal of Proteomics. 71 (4):391-411.

Verma, R, Mahmooduzzafar, S.T. and Iqbal, M. (2006). Foliar response of Ipomea pes-tigridis L. to coal-smoke pollution. Turkish Journal Botany. 30:413-417.

Wani, P.A., Khan, M.S. and Zaidi, A. (2008). Effects of heavy metal toxicity on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake in pea grown in metal amended soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 81 (2):152-158.