Journal of
Plant Environmental Physiology
Print ISSN: 2423-7671
Online ISSN: 2783-4689
PSI
Phycological Society of Iran

Effect of different levels of treated urban wastewater on growth and some physiological characteristics of *Althaea officinalis*

Forozan Ghasemi[1], Ahmad Mohtadi[*2], Athar Sadat Javanmard[3], Shokoofeh Hajihashemi[4]

[1] Department of Biology, Faculty of Sciences, Yasouj University, Yasouj, Iran, Email: forozan.ghasemi.5321@gmail.com
[2] Department of Biology, Faculty of Sciences, Yasouj University, , Yasouj, Iran, Email: a.mohtadi@yu.ac.ir
[3] Department of Biology, Faculty of Sciences, Yasouj University, , Yasouj, Iran, Emaill: a.javanmard@yu.ac.ir
[4] Department of Biology, Faculty of Sciences, Behbahan Khatam Alanbbia University of Thechnology, Behbahan, Iran, Email: hajihashemi@bkatu.ac.ir

Article type:
Research article

Article history
Received: 05.10.2022
Revised: 20.12.2022
Accepted: 25.12.2022
Published:22.12.2023

Keywords
Althaea officinalis
Growth parameters
Heavy metals
Physiological characteristics
Wastewater

Abstract

Using treated wastewater is important for plant irrigation in arid and semi-arid regions. *Althaea officinalis* belongs to the Malvaceae family and contains high levels of glazed compounds and mucilage. The aim of this study was to investigate the effect of different levels of urban wastewater on growth and some physiological characteristics of *Althaea officinalis*. To this aim, the seeds of *A. officinalis* were cultured in the pots containing perlite. The plants were treated with different levels of urbane wastewater of Yasouj (0, 25, 50, 75 and 100%) in three replications. The experiment was conducted in the form of randomized complete blocks design. The plants were harvested after three weeks of irrigation with different concentrations of wastewater for further analysis. The results showed that wastewater treatments increased the fresh and dry weights of shoots, the leaf area, and the height of plant and roots length. The highest growth rate was obtained in plants irrigated with un-diluted wastewater. In response to wastewater treatment, the amount of photosynthetic pigments including chlorophylls a, b, a+b, and carotenoids increased significantly and the highest level of increase was observed in the treatment with 100% of wastewater. Anthocyanins and flavonoids increased in response to wastewater irrigation while the amounts of proteins decreased. No cadmium and lead were detected in the leaves and roots of wastewater-irrigated plants. Overall, the results of this study showed a positive response of *A. officinalis* to urbane-wastewater-irrigation.

Cite this article as: Ghasemi, F., Mohtadi, A., Javanmard, A.S,. Hajihashemi, Sh. (2023). Effect of different levels of treated urban wastewater on growth and some physiological characteristics of *Althaea officinalis*. *Journal of Plant Environmental Physiology*, 18(4): 115-128.

©The author(s)
Publisher: Islamic Azad University, Gorgan branch

فیزیولوژی محیطی گیاهی
شاپا چاپی: ۲۴۲۳-۷۶۷۱
شاپا الکترونیکی: ۲۷۸۳-۴۶۸۹
PSI
انجمن جلبک شناسی ایران
Phycological Society of Iran
دانشگاه آزاد اسلامی
واحد گرگان

بررسی تاثیر فاضلاب تصفیه شده شهری بر رشد و فیزیولوژی گیاه ختمی (*Althaea officinalis*)

فروزان قاسمی[۱]، احمد مهتدی[۲*]، اطهرالسادات جوانمرد[۳]، شکوفه حاجی هاشمی[٤]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، رایانامه: forozan.ghasemi.5321@gmail.com
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، رایانامه: a.mohtadi@yu.ac.ir
[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران، رایانامه: a.javanmard@yu.ac.ir
[٤] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء بهبهان، بهبهان، ایران، رایانامه: hajihashemi@bkatu.ac.ir

نوع مقاله:
مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱/۰۷/۱۳
تاریخ بازنگری: ۱٤۰۱/۰۹/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۱۰/۰٤
تاریخ چاپ: ۱٤۰۲/۱۰/۰۱

واژه‌های کلیدی:
ختمی
شاخص رشد
عناصر سنگین
فاضلاب
ویژگی‌های فیزیولوژیک

چکیده

استفاده از فاضلاب تصفیه‌شده جهت آبیاری گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. ختمی (*Althaea officinalis*) گیاه دارویی از تیره پنیرکیان است و دارای ترکیبات لعاب‌دار و موسیلاژ فراوانی می‌باشد. این تحقیق با هدف بررسی اثر فاضلاب بر رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیک گیاه ختمی صورت گرفت. بدین‌منظور بذر گیاهان ختمی در گلدان‌های حاوی پرلیت کشت شدند. گیاهان در مرحله چهار برگی با غلظت‌های مختلف فاضلاب تصفیه شده شهری یاسوج (صفر، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد) در سه تکرار آبیاری شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. برداشت گیاهان سه هفته پس از اولین آبیاری با سطوح مختلف فاضلاب انجام شد و برخی از صفات رویشی و فیزیولوژیکی مورد سنجش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تیمار فاضلاب سبب افزایش طول گیاه، وزن تر و خشک اندام هوایی و سطح برگ گیاهان شد. بیشترین میزان رشد در تیمار گیاهان با فاضلاب رقیق نشده بدست آمد. در پاسخ به تیمار فاضلاب، میزان رنگیزه‌های فتوسنتزی از قبیل کلروفیل‌های a، b و کلروفیل کل و کاروتنوئیدها افزایش معنی‌دار یافت و بیشترین میزان افزایش در تیمار ۱۰۰ درصد فاضلاب مشاهده شد. آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها در پاسخ به فاضلاب افزایش یافتند در حالی که میزان پروتئین‌ها کاهش یافت. در پاسخ به آبیاری فاضلاب، عناصر سرب و کادمیوم در ریشه و برگ گیاهان یافت نشد. به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان‌دهنده واکنش مثبت گیاه ختمی، به آبیاری با فاضلاب تصفیه شده شهری بود.

استناد: قاسمی، فروزان؛ مهتدی، احمد؛ جوانمرد، اطهرالسادات، حاجی هاشمی، شکوفه. (۱٤۰۲). بررسی تاثیر فاضلاب تصفیه شده شهری بر رشد و فیزیولوژی گیاه ختمی (*Althaea officinalis*). *فیزیولوژی محیطی گیاهی*، ۱۸(٤)، ۱۲۸-۱۱۵.

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

کمبود آب یکی از مشکلات کشت و پرورش گیاهان در مناطق خشک و نیمه‌خشک مانند ایران است و کشاورزی به‌عنوان یکی از صنایع اصلی مصرف کننده آب در سرتاسر جهان مطرح است (Hajihashemi et al., 2019; 2020). امروزه مسئله خشکسالی و کمبود آب در بسیاری از نقاط جهان به حد بحرانی و خطرناک رسیده است، بنابراین استفاده از آب‌های غیرمتعارف در زمینه صنعت کشاورزی در بسیاری از مناطق رواج پیدا کرده است. در سال‌های اخیر طرح استفاده مجدد از پساب تصفیه شده به‌عنوان یک منبع ارزشمند آبی برای ایجاد پوشش‌های گیاهی مطرح می‌باشد (Shahriari et.al., 2011). افزایش شهرنشینی و صنعتی شدن سالیانه باعث تولید حجم وسیعی پساب می‌شود که استفاده مجدد از آن کمک شایانی به جبران کمبود آب در مناطق خشک و نیمه‌خشک و صرفه‌جویی در میزان مصرف منابع آب قابل شرب می‌کند (Ghazavi and Arast, 2016). فاضلاب‌های شهری و صنعتی یک ماده زائد غنی از مواد آلی و شیمیایی مفید و مضر فراوانی می‌باشند که می‌توانند پس از تصفیه مجددا مورد استفاده قرار گیرند. از آنجاییکه فاضلاب حاوی عناصر معدنی می‌باشد و تغذیه معدنی نقش به‌سزایی در تنظیم رشد، عملکردهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، و محصول‌دهی گیاهان دارد، مطالعه تاثیر آبیاری گیاهان زراعی و غیرزراعی با فاضلاب اهمیت به‌سزایی دارد (Shahriari et.al., 2011). پساب‌ها بر اساس منبع تولید آنها حاوی عناصر مفید نیتروژن، فسفر، گوگرد، کلسیم، پتاسیم، منیزیوم، آهن، مس، روی، منگنز، سیلیس و غیره و عناصر سنگین مضر کادمیوم، نقره، سرب، جیوه و غیره هستند (Hajihashemi et al., 2020). بنابراین یکی از مشکلات اساسی در استفاده از پساب تنش فلزات سنگین به گیاهان است و همچنین غلظت بالای عناصر مفید نیز می‌تواند به گیاهان تنش وارد نماید (Yazdani et al., 2018). در فرایند تصفیه فاضلاب مقادیر عناصر به سطح استاندارد کاهش می‌یابد که در این صورت قابلیت استفاده جهت آبیاری گیاهان را دارد (Rahmani et al., 2014).

تاکنون مطالعات متعددی بر روی استفاده از پساب‌ها جهت آبیاری گیاهان زراعی و غیر زراعی صورت گرفته است. نتایج مطالعات بر روی استفاده از فاضلاب تصفیه نشده بر روی گیاه گندم نشانگر اثرات مضر آن بر روی گیاه گندم است لذا استفاده از پساب تصفیه نشده به دلیل غلظت بالای عناصر توصیه نمی‌شود (Hajihashemi et al., 2020). با وجود آنکه برخی از عناصر موجود در فاضلاب‌ها مانند آهن، مس و روی در غلظت‌های مناسب برای رشد و عملکرد گیاهان ضروری هستند (Yazdani et al., 2018)، تجمع بیش از حد فلزات یکی از مشکلات استفاده از آن‌ها است که علاوه بر آلوده شدن خاک با این عناصر، باعث تجمع آن‌ها در گیاهان و ایجاد سمیّت در آنها می‌شود (Falahati Marvast et al., 2013). همچنین لازم به ذکر است که استفاده طولانی مدت فاضلاب باعث تجمع عناصر در خاک و آسیب به محیط زیست و گیاهان می‌شود (Lucho-Constantino et al., 2005).

گیاه پالایی یکی از روش‌های کاربردی در راستای حذف آلاینده‌های محیطی می‌باشد که ضمن سادگی، ارزان و مفید بودن باعث آسیب به محیط زیست نیز نمی‌شود. این روش با حذف عناصر سنگین از خاک‌های آلوده، باعث حذف فلزات سنگین از محیط زیست می‌باشد. مطالعات نشان داده‌اند که گیاه دارویی مانند ختمی مقاومت زیادی نسبت به فلزات سنگین دارند و به منظور گیاه‌پالایی قابل کاربرد هستند (Asgari et al., 2015). ختمی یک گیاه دارویی مهم از

تیره پنیرکیان، علفی، چندساله و خودرو است. گیاه ختمی لعاب و موسیلاژ زیادی دارد. ختمی دارای مواد نشاسته‌ای، چربی، اسانس، آنتوسیانین، آلتئین و سیانیدین است و خواص درمانی زیادی دارد (Kashefi and Ahmadian, 2018).

یکی از نگرانی‌های استفاده از فاضلاب‌ها، شور شدن زمین‌های کشاورزی و تجمع فلزات سنگین در محیط زیست است (Yazdani et al., 2018). زیاد بودن غلظت نمک در فاضلاب باعث کاهش آب گیاه، اثرات منفی بر خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و رشد گیاه می‌شود (Castro et al., 2011). بر همین اساس انتخاب گیاه مناسب جهت آبیاری با فاضلاب دارای اهمیت است. شهر نشینی سالیانه سبب تولید حجم زیاد پساب می‌شود که در صورت مدیریت صحیح و تصفیه مناسب قابلیت استفاده مجدد در صنعت کشاورزی دارد. در واقع فاضلاب شهری تصفیه شده یکی از منابع آبی غیر قابل شرب قابل استفاده در آبیاری گیاهان است که تحقیقات وسیعی بر روی آنها صورت گرفته است (Bolhasani et al., 2014; Sohrabi et al., 2017; Ghasemi et al., 2018). از آنجاییکه فاضلاب تصفیه شده حاوی عناصر مفید برای رشد گیاهان است، مطالعات نشان می‌دهد که آبیاری فاضلاب سبب افزایش زیست توده گیاهان شده است (Zare et al., 2015). در همین راستا، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثرات فاضلاب شهری تصفیه شده یاسوج در رقت‌های مختلف بر روی رشد و برخی از خصوصیات فیزیولوژیک گیاه ختمی صورت گرفته است. بدین منظور پاسخ‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی گیاه از وزن‌تر و خشک گیاه، طول گیاه و ریشه، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها، پروتئین‌ها و عناصر سرب و کادمیوم مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر فاضلاب بر رشد و برخی خصوصیات فیزیولوژیک گیاه ختمی، آزمایشی گلدانی در بهار ۱۳۹۸ در آزمایشگاه فیزیولوژی گیاهی دانشکده علوم پایه دانشگاه یاسوج انجام گرفت. فاضلاب تصفیه شده شهری از تصفیه‌خانه فاضلاب شهر یاسوج تهیه شد که بر اساس گزارش مرکز به‌ترتیب حاوی نیترات و فسفات در غلظت‌های ۹-۱۳ و ٤-٦ میلی‌گرم در لیتر و مقدار pH ۷,۵ بود. بذر گیاه ختمی (*Altahea officinalis*) از مؤسسه پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. ابتدا بذرها را چند بار با آب معمولی شسته شدند تا مواد زاید آن جدا شود. سپس بذرها به محلول ۵٪ حجمی/حجمی (هیپوکلریت سدیم) منتقل شده و به مدت ۱۵ دقیقه در آن محلول قرار گرفتند و بعد از آن ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شدند. پس از ضدعفونی کردن بذرها، ۳۰ عدد بذر در عمق دو سانتی‌متری در گلدان‌های با ارتفاع ۱۳ و قطر ١٤ سانتی‌متر و حاوی پرلیت شسته شده با آب مقطر و ضدعفونی شده در اتوکلاو کشت شدند. گلدان‌ها به اتاق کشت با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب و تناوب نوری ۱۳ ساعت نور و ۱۱ ساعت تاریکی منتقل شدند. آبیاری گلدان‌ها از مرحله کاشت بذر تا جوانه‌زنی با آب مقطر انجام گرفت. سپس آبیاری با ماده غذایی یک دهم هوگلند صورت گرفت. دو هفته بعد از جوانه زنی بذرها، گلدان‌ها به هشت گیاه دارای ظاهر تقریباً یکسان تنک شدند. در مرحله چهار برگی، تیمار فاضلاب در غلظت‌های صفر، (آب مقطر)، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد حجمی/حجمی در سه تکرار اعمال شد. آبیاری گیاهان هر سه روز یک بار و به مدت سه هفته به طول انجامید.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: پس از اتمام دوره

تیمار، گیاهان برداشت شدند و در ابتدا طول ریشه و بخش هوایی گیاه اندازه گیری شدند. وزن تر اندام هوایی بلافاصله پس از برداشت گیاه توسط ترازویی با دقت ۰/۰۰۰۱ میلی‌گرم توزین شد. سپس نمونه‌ها به‌مدت ٤٨ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند و مجدداً توسط ترازو وزن خشک اندازه‌گیری شد. اندازه گیری سطح برگ در جوان‌ترین برگ‌های کاملا توسعه یافته توسط دستگاه سطح سنج برگ مدل WiNAREA-ut-11 صورت گرفت.

برای بررسی وضعیت آب در گیاه معمولاً از دو معیار محتوای آب گیاه و مقدار انرژی آب در گیاه استفاده می‌کنیم محتوای آب معمولاً به صورت نسبی و به عنوان درصدی از آب در حال آماس کامل و با اصطلاح محتوای نسبی آب (RWC) بیان می‌شود. این شاخص را می‌توان با استفاده از رابطه زیر محاسبه کرد (Martinez et al., 2004).

RWC= [(وزن خشک شده در آون – وزن آماس) / (وزن خشک شده در آون – وزن تر)] × 100

سنجش رنگیزه‌های فتوسنتزی: مقدار ۰/۰۱ گرم از برگ تازه‌ی گیاهان در هاون چینی به خوبی ساییده شد و سپس مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر استون ۸۰٪ به آن اضافه شد و با دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس میزان جذب محلول روشناور در طول موج‌های ٦٦٣، ٦٤٥ و ٤٧٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Philler Scientific SU-6100 اندازه‌گیری شد. از استون ۸۰٪ به عنوان بلانک استفاده شد (Arnon et al., 1949). غلظت رنگیزه‌های کلروفیل های a، b، کل و کاروتنوئیدها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن‌تر محاسبه و ارائه شد.

سنجش آنتوسیانین: مقدار ۰/۵ بافت تر برگ توسط ۱۰ میلی‌لیتر متانول اسیدی (متانول و HCl به نسبت ۹۹ به ۱ حجمی/حجمی) به خوبی ساییده شد. نمونه‌ها به مدت ٢٤ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها با سرعت ٤٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از ضریب خاموشی $M^{-1} Cm^{-1}$ ۳۳۰۰۰ محاسبه شد (Wagner, 1979).

سنجش فلاونوئیدها: مقدار ۰/۵ از بافت برگ تازه در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول اسیدی (الکل اتیلیک و اسید استیک گلایسال به نسبت ۹۹ به ۱ حجمی/حجمی) ساییده شد و محلول به‌دست آمده با سرعت ٦٠٠٠ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس نیم میلی‌لیتر عصاره متانولی با ۱/۵ میلی‌لیتر متانول، ۰/۱ میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم (۱۰٪ متانولی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم (1M) و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب شد. نمونه در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و سپس جذب نمونه ها با دستگاه اسپکتروفتومتراندازه‌گیری شد و میزان فلاونوئیدها بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده با محلول‌های کوئرستین محاسبه شد (Chang et al., 2002).

سنجش پروتئین‌ها: استخراج پروتئین‌های بافت برگ با استفاده از بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH 6.8) انجام شد. عمل عصاره‌گیری ۰/۲ گرم بافت تر برگ با ۲ میلی لیتر بافر استخراج درون حمام یخ انجام شد. سپس نمونه‌ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتیگراد سانتریفوژ شدند. مقدار پروتئین نمونه ها با استفاده از روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). برای رسم منحنی استاندارد پروتئین‌ها از سرم آلبومین گاوی استفاده شد. غلظت پروتئین نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم در گرم وزن‌تر گزارش شد.

سنجش عناصر: جهت اندازه‌گیری میزان کادمیوم و سرب در بافت‌های گیاهی، نمونه‌های خشک بخش‌های هوایی و ریشه گیاهان در هاون کاملا

ساییده شدند. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ٦٥٪ به ۰/۰۵ گرم ماده گیاهی افزوده شد و نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در زیر هود قرار داده شدند. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت دو ساعت در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. پس از سرد شدن نمونه‌ها، یک میلی‌لیتر هیدروژن پراکسید به هرکدام از آنها اضافه گردید و مجدداً نمونه ها در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار گرفتند تا کاملا شفاف شوند. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه، حجم نمونه‌ها با افزودن آب مقطر دوبار تقطیر به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. در نهایت مقدار عناصر سرب و کادمیوم با استفاده از دستگاه طیف سنج جذب اتمی مدل (Hitach-770-8324) اندازه‌گیری شدند.

آنالیز آماری: تمام آزمایشات طبق طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد و برای هر تیمار ۳ گلدان و هرگلدان حاوی ۸ گیاه در نظر گرفته شد. پردازش داده‌ها بوسیله نرم افزار آماری SPSS version 23 و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ ≥P صورت گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد میانگین ارائه گردید.

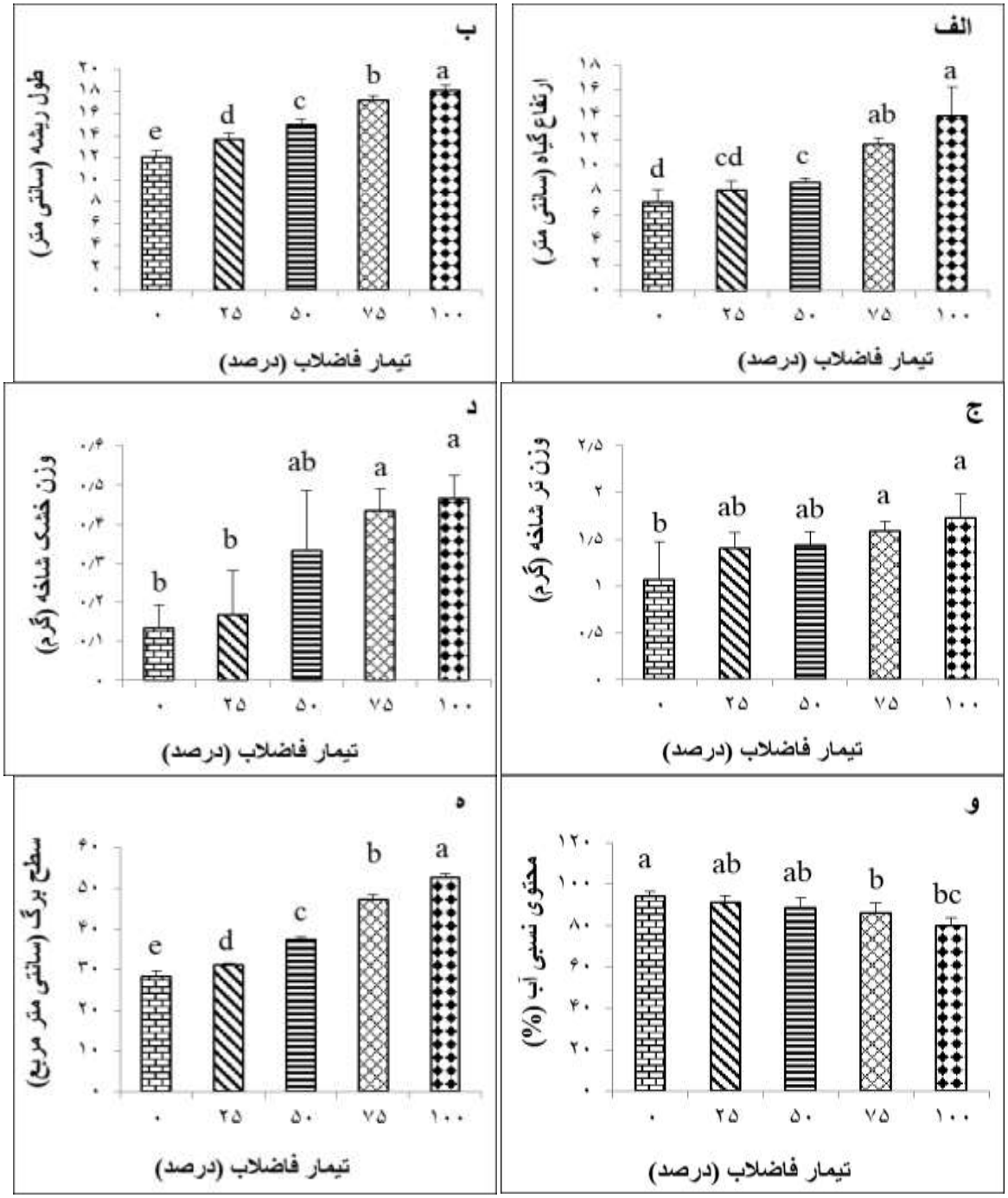
نتایج

نتایج آنالیز واریانس شاخص‌های مورفولوژیکی گیاه در پاسخ به تیمار فاضلاب در جدول ۱ نمایش داده شده است. نتایج آنالیز رشد گیاهان نشان داد که آبیاری گیاهان با غلظت های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد فاضلاب سبب افزایش معنی‌دار (P< ۰/۰۵) طول گیاه شد و بیشترین افزایش طول در تیمار گیاهان با فاضلاب رقیق نشده ۱۰۰٪ ملاحظه شد (شکل ۱ الف). طول ریشه گیاهان در پاسخ به تیمار فاضلاب افزایش معنی‌داری را در تمام غلظت‌ها نشان داد و بیشترین طول ریشه گیاهان در گیاهان آبیاری شده با فاضلاب رقیق نشده مشاهده شد (شکل ۱ ب). آبیاری گیاهان با غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ درصد فاضلاب باعث افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام هوایی گیاهان شد درحالیکه در غلظت های ۲۵ و ۵۰ درصد افزایش معنی‌دار نبود (شکل ۱ ج و د). بر اساس نتایج بدست آمده، میزان محتوای نسبی آب گیاهان در پاسخ به آبیاری با غلظت های ۷۵ و ۱۰۰ درصد فاضلاب در سطح معنی‌داری کمتر از گیاه شاهد بود ولی در غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ درصد کاهش ملاحظه شده معنی‌دار نبود (شکل ۱ و). آبیاری گیاهان با فاضلاب تاثیر معنی‌داری بر سطح برگ گیاهان داشت و بیشترین سطح برگی در آبیاری گیاهان با فاضلاب خالص بدست آمد (شکل ۱ هـ).

جدول۱: میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب بر شاخص‌های مورفولوژیکی گیاه ختمی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		طول اندام هوایی	طول ریشه	وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	سطح برگ	محتوای نسبی آب برگ
فاضلاب	٤	۱۸/۲۱*	۲٤/٦۳*	۸/۲۷٥*	۰/۱۸٥۷*	۳۲/۱۲*	۸۹/۱٥*
خطا	۱۰	۰/٤۰٦٥	۰/۹٦۳۲	۰/۹۰٦۸	۰/۱۹٦۹	۳/٦۸۰	۳/۲۸۲
ضریب‌تغییرات	درصد	۳/۲۹	۱۲/۳۸	۲۷/۱٤	٤۳/۹۳	۰/۷٥	۳۰/۷٦

* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب شهری تصفیه‌شده یاسوج بر طول گیاه (الف)، طول ریشه (ب)، وزن تر اندام هوایی (ج)، وزن خشک اندام هوایی (د)، محتوای نسبی آب برگ (و) و سطح برگ (ه). حروف متفاوت قرار داده شده در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف فاضلاب تصفیه‌شده می‌باشد.

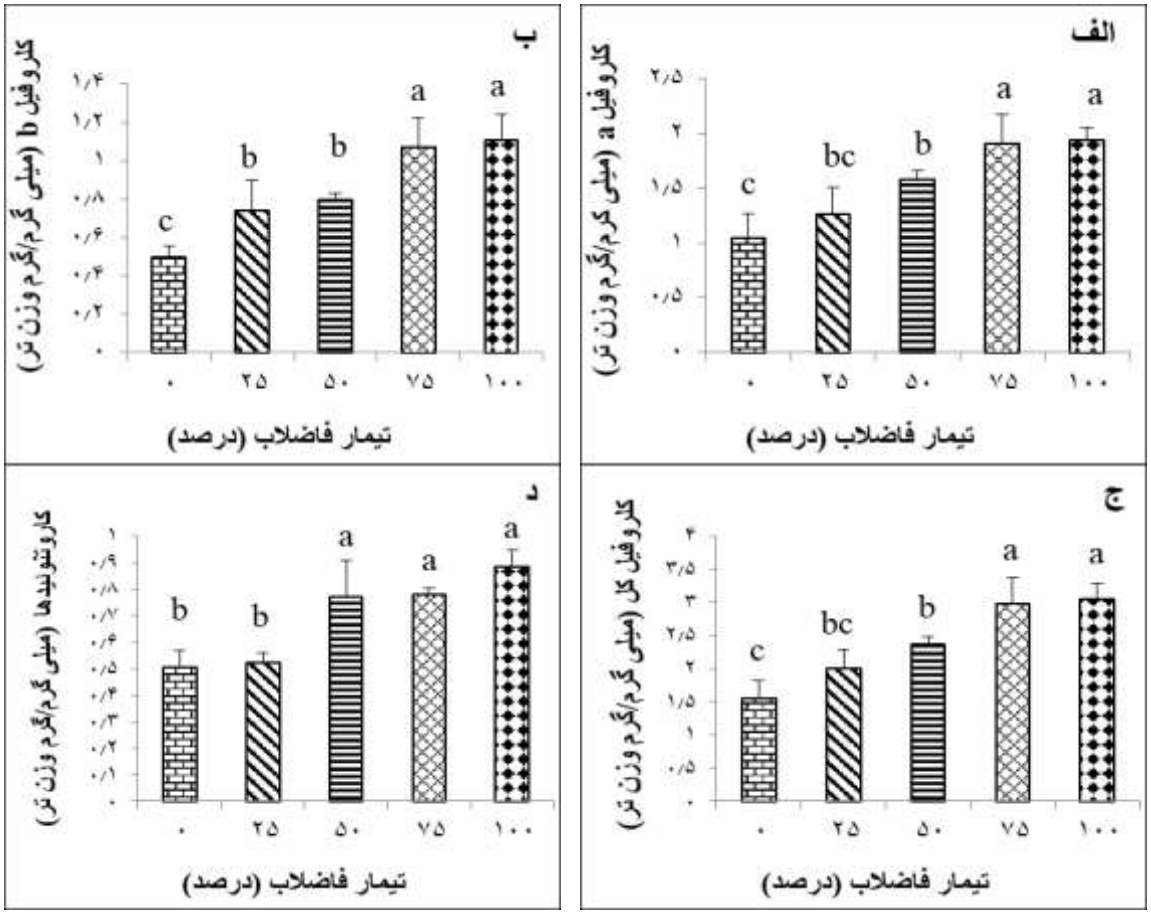
طبق نتایج جدول (۲)، مقدار رنگیزه های فتوسنتزی در پاسخ به تیمار فاضلاب در سطح معنی‌داری افزایش یافتند. تیمار فاضلاب در تمام سطوح به استثنای غلظت ۲۵ درصد سبب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل a شد و بیشترین میزان در تیمار ۱۰۰ درصد فاضلاب مشاهده شد (شکل ۲ الف). میزان کلروفیل b در پاسخ به آبیاری گیاه با غلظت های مختلف فاضلاب در سطح معنی‌داری

بیشتر از گیاه شاهد بود و بیشترین افزایش در تیمار گیاهان با فاضلاب خالص بدست آمد (شکل ۲ ب). مقدار کلروفیل کل در گیاهان تیمار شده با فاضلاب ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد افزایش معنی‌داری در مقایسه با گیاه شاهد نشان داد که بیشترین محتوی کلروفیل در تیمار ۱۰۰٪ ملاحظه گردید (شکل ۲ ج). همچنین میزان کاروتنوئیدها در پاسخ به آبیاری گیاهان با فاضلاب ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد افزایش معنی‌داری نشان داد درحالیکه در بین غلظت‌های مذکور تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲ د).

جدول ۲: میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب بر محتوی رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاه ختمی

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات			
		کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کارتنوئیدها
فاضلاب	٤	۰/٤٦۳۷*	۰/۱۸۸۹*	۱/۲۳۳*	۰/۰۸۵۹۷*
خطا	۱۰	۰/۱٦۳٤	۰/۰۹۷٦٥	۰/۲۲۹۱	۰/۰٦۳۳٦
ضریب تغییرات	درصد	۱۷/۷٦	۱٥/۹۱	۱۳/۷۷	۱٤/۹۰

* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.



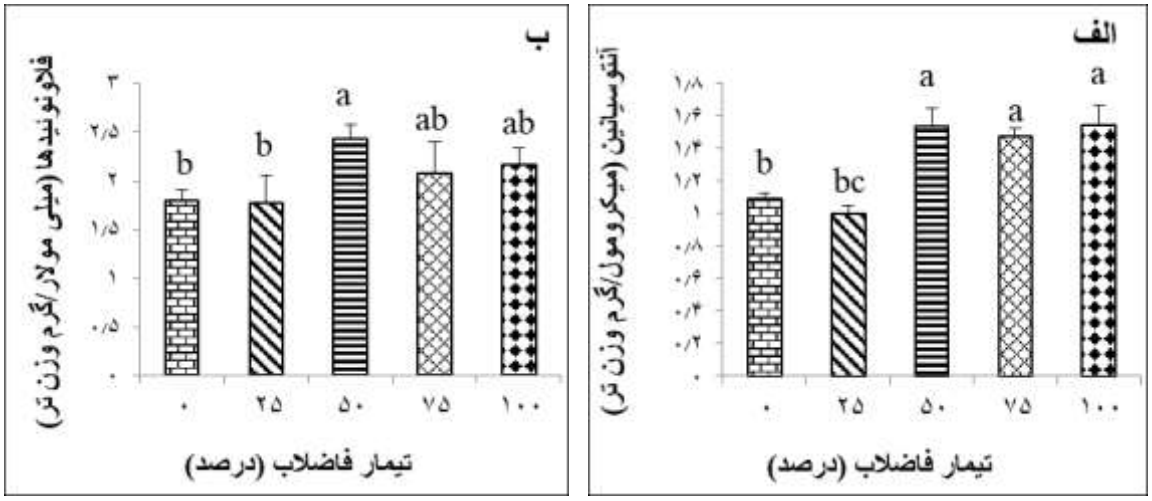
شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب شهری تصفیه شده یاسوج بر محتوای کلروفیل a (الف)، کلروفیل b (ب)، کلروفیل کل (ج) و کاروتنوئیدها (د). حروف متفاوت قرار داده شده در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف فاضلاب تصفیه‌شده می‌باشد.

نتایج تجزیه آنالیز واریانس شاخص‌های آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها و پروتئین‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که مقدار آنتوسیانین های گیاه ختمی تحت تأثیر فاضلاب با غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد افزایش معنی‌داری نشان داد درحالیکه در غلظت ۲۵ درصد فاضلاب تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۳ الف). مقدار آنتوسیانین‌ها در غلظت‌های ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشت. در پاسخ به آبیاری گیاهان با غلظت ۵۰ درصد فاضلاب میزان فلاونوئیدها در سطح معنی‌داری بیشتر از گیاه شاهد بود درحالیکه در سایر غلظت‌های فاضلاب تفاوت معنی‌داری با گیاه شاهد مشاهده نشد (شکل ۳ ب).

جدول۳: میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب بر مقادیر پروتئین‌ها، فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌های برگ‌های گیاه ختمی

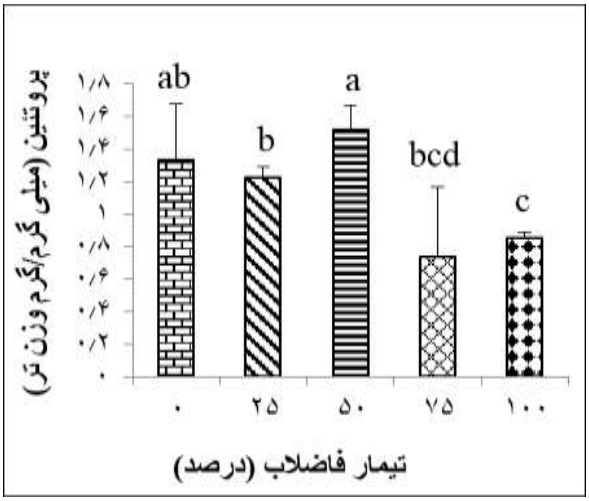
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		پروتئین‌ها	فلاونوئیدها	آنتوسیانین‌ها
فاضلاب	٤	۲۹۲/۰*	۰/۰۳۵۲۵*	۰/۱۱۵۹*
خطا	۱۰	٦/۲۷۳	۰/۰۷۳۱۳	۰/۰۵۰۷۹
ضریب تغییرات	درصد	۳۳/۵٦	۳٦/۲٦	۷/۷۰

* نشان‌دهنده معنی‌دار بودن تفاوت بین تیمارهای مختلف در سطح احتمال ۰/۰۵ می‌باشد.



شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب شهری تصفیه شده یاسوج بر آنتوسیانین‌ها (الف) و فلاونوئیدها (ب). حروف متفاوت قرار داده شده در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف فاضلاب تصفیه شده می‌باشد.

مقدار پروتئین برگ گیاه ختمی تحت تأثیر فاضلاب در غلظت ۷۵ و ۱۰۰ درصد کاهش نشان داد در حالی که در سایر غلظت‌ها تفاوت مشاهده شده معنی‌دار نبود (شکل ٤). در تحقیق حاضر مقدار هر دو عنصر سرب و کادمیوم در ریشه و برگ صفر بودند که نشان‌دهنده عدم وجود عناصر مذکور در فاضلاب می‌باشد.



شکل ٤: اثر غلظت‌های مختلف فاضلاب شهری تصفیه‌شده یاسوج بر پروتئین‌ها.حروف متفاوت قرار داده شده در بالای ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف فاضلاب تصفیه‌شده می‌باشد.

بحث

آبیاری گیاهان ختمی با فاضلاب سبب افزایش شاخص های رشد گیاه از قبیل طول ساقه و ریشه، وزن‌تر و خشک اندام هوایی و سطح برگ شد که بیشترین میزان افزایش در شاخص های مذکور در تیمار گیاهان با غلظت ۱۰۰ درصد فاضلاب مشاهده شد. مطابق گزارشات سایر محققان تیمار فاضلاب سبب افزایش رشد گیاهان زیتون (Zare et al., 2015)، رزماری (Ghasemi et al., 2018)، چمن (Paliwal et al., 1998)، گندم (Fathololomi et al., 2015)، کاهو (Sohrabi et al., 2017)، ذرت (Soleymani et. Al., 2007) و درخت ماهون (Ali et al., 2011) شده است که یکی از دلایل آن می‌تواند وجود مقادیر بالایی از مواد آلی و مواد مغذی ضروری مانند نیتروژن و فسفر باشد (Zare et al., 2015). در مرحله رشد رویشی، دریافت نیتروژن از محیط از طریق کنترل سوخت و ساز پروتئین‌ها، به تشکیل برگ‌های جدید، ساقه و ریشه کمک می‌کند. وجود یون نیترات در فاضلاب، همچنین می‌تواند بر ارتباط یون‌های کاتیون-آنیون در گیاهان تأثیرگذار باشد. چنانچه حدود ۷۰٪ کاتیون‌ها و آنیون‌های جذب شده همراه با یون‌های نیترات یا آمونیوم ارائه می‌شوند (Vanlauwe et al., 2002). براساس گزارشات محققان، گیاهانی که توسط یون آمونیوم تغذیه می‌شوند با نسبت جذب بالای کاتیون به آنیون شناخته می‌شوند و در مقابل مشخصه گیاهانی که توسط نیترات تغذیه می‌شوند، نسبت جذب بالای آنیون به کاتیون می‌باشد (Tak et al., 2013). فسفر عنصر ضروری دیگری است که در ساختار ماکرومولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد و برای رشد گیاهان ضروری است و در بسیاری از مناطق جهان محدودکننده تولید محصولات گیاهی است (Holford, 1997). فسفر نقش مهمی را در فرآیندهای سلولی بازی می‌کند، مانند حفظ ساختار غشاء، سنتز مولکول‌های زیستی و تشکیل مولکول‌های پرانرژی. این عنصر همچنین به تقسیم سلولی، فعال‌سازی/ غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها و سوخت و ساز کربوهیدرات-ها کمک می‌کند (Razaq et al., 2017). در مقیاس گیاه کامل، فسفر جوانه‌زنی بذر، نمو ریشه‌ها، استحکام ساقه‌ها، کمیت و کیفیت محصول گیاه را تحریک می-کند (Malhorta et al., 2018). با توجه به گزارشات ارائه شده توسط محققان مبنی بر نقش نیترات و فسفات بر بهبود رشد گیاهان و شناسایی آنها در

پساب به‌کار رفته در مطالعه حاضر، می‌توان پیشنهاد نمود که یکی از دلایل افزایش رشد گیاه ختمی در پاسخ به آبیاری گیاه با پساب نیترات (به عنوان منبع نیتروژن) و فسفات (به عنوان منبع فسفر) می‌باشد. یکی از عوامل اصلی محدود کننده رشد گیاهان کاهش محتوی آب گیاه است و استفاده از پساب می‌تواند سبب افزایش مقاومت گیاهان به تنش خشکی شود (Najafi et al., 2015). براساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، تیمار پساب سبب کاهش معنی‌دار محتوی آب گیاه در غلظت‌های بالای پساب شد که مطابق با گزارش صورت گرفته توسط Najafi و همکاران (۲۰۱۵) در گیاه یونجه است. کاهش محتوی آب گیاه در پاسخ به غلظت‌های بالای پساب می‌تواند به‌دلیل افزایش معنی‌دار وزن خشک گیاه در مقایسه به گیاه کنترل باشد (Najafi et al., 2015).

علاوه بر اهمیت تغذیه معدنی در بهبود رشد گیاهان، افزایش میزان فتوسنتز می تواند در گیاه سبب بهبود رشد گیاه گردد (Hajihashemi et al., 2020). آبیاری گیاهان ختمی با پساب سبب افزایش معنی‌دار میزان کلروفیل‌های a، b و کل شد که بیشترین افزایش در آبیاری گیاهان با فاضلاب خالص بدست آمد. گزارشات مشابهی مبنی بر افزایش کلروفیل ها در گیاهان زیتون، رزماری، کاهو، بامیه، مرزنجوش و کنگر فرنگی در پاسخ به آبیاری با فاضلاب وجود دارد (Bolhasani et al., 2014; Sohrabi et al., 2017; Ghasemi et al., 2018). براساس گزارش Najafi و همکاران (۲۰۱۵)، دلیل افزایش کلروفیل‌ها در پاسخ گیاه یونجه به کمپوست لجن فاضلاب، مواد مغذی موجود در فاضلاب به ویژه نیتروژن است، زیرا یک ارتباط مستقیم بین نیتروژن برگ و مقدار کلروفیل وجود دارد. همچنین نیتروژن موجود در فاضلاب با تاثیر بر تولید جیبرلین موجب افزایش کلروفیل گیاهان می‌شود (Bolhasani et al., 2014). میزان کاروتنوئیدهای گیاه ختمی در پاسخ به تیمار فاضلاب افزایش معنی‌داری نشان داد. وظیفه اصلی کاروتنوئیدها به عنوان یک رنگدانه کمکی در سیستم فتوسنتزی، انتقال انرژی نورانی جذب شده به کلروفیل است (Maltsev et al., 2021). بنابراین افزایش میزان کاروتنوئیدها در پاسخ به تیمار فاضلاب می‌تواند به بهبود عملکرد سیستم‌های فتوسنتزی کمک نماید. همچنین، کاروتنوئیدها جزئی از سیستم آنتی‌اکسیدانی گیاهان هستند که باعث محافظت کلروپلاست‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از ROS می‌شوند. کاروتنوئیدها با جاروب کردن اکسیژن یکتائی و واکنش با کلروفیل‌های سه‌تایی و تبدیل آن به کلروفیل یکتایی و عمل آنتی‌اکسیدانی می‌توانند فتوسیستم‌ها را در برابر رادیکالهای آزاد حفاظت کنند(Anjum et al., 2011) و به این ترتیب با افزایش میزان کاروتنوئیدها تحت تیمار فاضلاب از صدمات سیستم فتوسنتزی و رنگیزه‌های گیاه ختمی کاسته می‌شود.

در گیاهان ختمی آبیاری شده با فاضلاب میزان آنتوسیانین‌ها در غلظت های بالای فاضلاب افزایش معنی داری نشان داد درحالیکه تاثیر فاضلاب بر میزان فلاونوئیدها تنها در غلظت ۵۰ درصد مشاهده شد. در گیاهان آنتوسیانین‌ها دارای نقش‌های محافظتی و آنتی‌اکسیدانی هستند که در شرایط تنش افزایش پیدا می‌کنند (Ghorbanli and Kiapour, 2012). این ترکیبات با کاهش تولید گونه‌های فعال اکسیژن از آسیب‌های اکسیداتیو نوری بر گیاهان جلوگیری می‌کنند (Feild et al., 2001). فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه پلی‌فنولی با وزن مولکولی کم هستند که همانند آنتوسیانین‌ها دارای قدرت آنتی-اکسیدانی هستند و در تنش‌های زیستی و غیر زیستی میزان آنها افزایش می‌یابد (Buer et al., 2010). بر اساس گزارش Abeed و همکاران (۲۰۲۲)، آبیاری گیاه دارویی داتوره توسط فاضلاب سبب افزایش

معنی‌دار متابولیت‌های ثانویه از قبیل آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، فنل‌ها و آلکالوئیدها شد که دلیل آن می‌تواند افزایش سنتز ترکیبات نیتروژنی مذکور در پاسخ به وجود منبع نیتروژن در فاضلاب باشد. تیمار فاضلاب در غلظت‌های بالا سبب کاهش میزان پروتئین‌های برگ در گیاه ختمی شد که بر اساس گزارش Zeid و Abou El Ghate در سال ۲۰۰۷ می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت آنزیم پروتئاز باشد. مطابق با نتایج پژوهش حاضر، فاضلاب بر میزان سرب و کادمیوم ریشه و اندام هوایی ختمی تاثیر نداشت که با سایر گزارشات در گیاهان کنگرفرنگی (Bolhasani et al., 2014) و کلم بروکلی (Rajabisorkhani and Ghaemi, 2013) مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

بررسی نتایج این تحقیق نشان‌دهنده واکنش مثبت گیاه ختمی به آبیاری با فاضلاب شهری تصفیه‌شده یاسوج بود. آبیاری با فاضلاب موجب افزایش شاخص‌های رشد گیاه ختمی شد درحالیکه فلزات سنگین کادمیوم و سرب در گیاه یافت نشد. در بررسی صفات فیزیولوژیکی گیاه ختمی مشاهده شد که میزان کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و آنتوسیانین‌ها افزایش معنی‌داری نشان دادند. با مشاهد اثرات مطلوب فاضلاب بر شاخص‌های مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه ختمی، می‌توان با استفاده از فاضلاب شهری جهت آبیاری این گیاه دارویی در مصرف آب صرفه-جویی کرد.

References

Abeed, A. H., Ali, M., Eissa, M. A., and Tammam, S. A. (2022). Impact of sewage water irrigation on *Datura innoxia* grown in sandy loam soil. BMC Plant Biology. 22(1): 1-15.

Anjum, S.A., Xie, X., Wang, L., Saleem, M.F., Man, C. and Lei, W. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. African journal of agriculture science. 6: 2016-2032.

Asgari, H., Nagafi, N. Moghiseh, A. (2015). Cultivation of medicinal plants in soils contaminated with heavy metals: strategy for managing contaminated land. 3(2): 107-119.

Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology. 24: 1-10.

Bolhasani, N., Ghasemnezhad, A. and Baranimotlagh, M. (2014). Effects of sewage sludge and zeolite on the Artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf yield and leaf quality. Journal of Soil Management and Sustainable. 4(1): 165-181.

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(1-2): 248-254.

Buer, C.S., Imin, N. and Djordjevic, M.A. (2010). Flavonoids: New roles for old molecules. Journal of Integrative Plant Biology 52: 98–111.

Castro, E., Manas, M.P. and De Las Heras, J. (2011). Effects of wastewater irrigation on soil properties and turfgrass growth. Water Science and Technology 63:1678-88.

Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis 10(3): 178-182.

Falahati Marvast, A., Hosseinpur, A. and Tabatabaei, S.H. (2013). Effect of salinity and sewage sludge on heavy metal availability and uptake by barley plant. Journal of Water and Soil. 5(27): 985-997.

Fathololomi, S., Asghari, Sh. and Goli Kalanpal, E. (2015). Effects of municipal sewage sludge on the concentration of macronutrients in soil and plant and some agronomic traits of wheat. Journal of Soil Management and Sustainable. 5(2): 49-70.

Feild, T.S., Lee, D.W. and Holbrook, N.M. (2001). Why leaves turn red in autumn. The role of anthocyanins in senescing leaves of red-osier dogwood. Plant Physiology 127: 566–574.

Ghasemi, Z., Karimian, A.A., Azimzadeh, H. and Sodaeizadeh, H. (2018). Effect of irrigation with wastewater on some physiological and morphological characteristics of *Rosmarinus officinalis* (Case Study: Yazd City Wastewater). 3(3): 29-38.

Ghazavi, R. and Arast, M. (2016). Investigation the effect of irrigation with municipal wastewater on accumulation of some pollutants and chemicals elements in plant and its effect on their ecological characteristics (*Eucalyptus Globulus*). Journal of Plant Ecosystem Conservation. 4(8): 13-29.

Ghorbanli, M. and Kiapour, A. (2012). Copper-induced changes on pigments and activity of non-enzymatic and enzymatic defense systems in *Portulaca oleracea* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 28(2): 235-247.

Hajihashemi, S., Mbarki, S., Skalicky, M., Noedoost, F., Raeisi, M. and Brestic, M. (2020). Effect of Wastewater Irrigation on Photosynthesis, Growth, and Anatomical Features of Two Wheat Cultivars (Triticum aestivum L.). Water 12(2): 607.

Hajihashemi, S., Noedoost, F. and Hedayatzadeh, F. (2019). Characterization of Brassica napus responses to diluted and undiluted industrial wastewater. Physiology and Molecular Biology of Plants 25(6): 1469-1482.

Holford, I.C.R. (1997). Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. Australian Journal of Soil Research 35: 227–239.

Kashefi, B. and Ahmadian, E. (2018). Effect of Hexaconazole and Drought Stress in some Morpho- physiological and biochemical Traits on *Althaea Offisinalis*. Journal of Plant Process and Function. 7(24): 171-182.

Lucho-Constantino, C.A., Alvarez-Suarez, M., Beltran-Hernandez, R I., Prieto-Garcla, F. and Poggi-Varaldo, H.M. (2005). A multivariate analysis of the accumulation and fractinoation of major and trace elements in agricultural soils in Hidalgo State, Mexico irrigated with raw wastewater. Environment International 31: 313-323.

Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., and Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. Biology 10(10): 1060-1084.

Martìnez, J.P., Lutts, S., Schanck, A., Bajji, M. and Kinet, J.M. (2004). Is osmotic adjustment required for water stress resistance in the Mediterranean shrub Atriplex halimus L? Journal of plant physiology 161(9): 1041-1051.

Najafi, N., Mahmoudi, S. and Reyhanitabar, A. (2015). Effects of soil moisture and sewage sludge compost on leaf chlorophyll index and some growth traits of alfalfa in greenhouse conditions. Journal of Soil and Plant Interaction 5 (4): 205-218.

Rahmani, H.R., Moayyeri, M., Mazaheri Kouhanestani, Z., Khodabakhsh, N. and Sharifi, H. (2014). Studying some of the qualitative properties and concentration of heavy metals in dried sewage sludge from Shahin-Shahr WWTP in Isfahan. Journal of Environmental Science and Technology 16(2): 55-66.

Rajabisorkhani, M. and Ghaemi, A.A. (2013). Consequences of using treated wastewater and chemical fertilizers on Broccoli (*Brassica oleracea*) growth. Water and Irrigation Management. 2(2): 13-23.

Razaq, M., Zhang, P. and Shen H.L. (2017) Influence of nitrogen and phosphorus on the growth and root morphology of *Acer mono*. PLoS One 12: 1–13.

Shahriari, A.R., Noori. S., Abedi Koupai, J. and Asaleh, F. (2011). Effect of irrigation with treated municipal wastewater on yield of *Nitraria schoberi* under greenhouse conditions. Journal of Soil and Plant Interactions. 2011; 1(4):13-22

Sohrabi, N., Alinejadian Bidabadi, A., Feizian, M. and Maleki, A. (2017). A Comparative Study of the Effects of Sewage Sludge on Heavy Metals Concentrations and Some Morphological Characteristics of Lettuce. Iranian Journal of Soil Science 31(2): 291-303.

Soleymani, A., Najafi, P. and Laraei, H. (2007). Effects of Using Treated Municipal Wastewater on Physiological Growth Indices in Maize. Journal of Research in Agricultural Science. 2(1): 11-24.

Tak, H.I., Babalola, O.O., Huyser, M.H. and Inam, A. (2013). Urban wastewater irrigation and its effect on growth, photosynthesis and yield of chickpea under different doses of potassium. Soil Science and Plant nutrition, 59(2): 156-167.

Vanlauwe, B., Palm, C.A, Murwira, H.K. and Merckx, R. (2002). Organic resource management in sub-Saharan Africa: Validation of a residue quality-driven decision support system. Agronomie. 22: 839-846.

Wagner G.J. (1979). Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanins in protoplasts. Plant Physiology. 64, 88-93.

Yazdani, A.A., Saffari, M. and Ranjbar, Gh.H. (2018). Effects of irrigation with treated wastewater on yield and grain heavy metals content of barley (*Hordeum vulgare* L.) genotypes. Iranian Journal of Crop Sciences. 19(4): 284-296.

Zare, M., Chorom, M. and Moallemi, N. (2015). Effect of treated urban sewage sludge on soil essential nutrients, soil chemical properties and physiological properties of olive tree. Journal of Agricultural Engineering. 37(2):1-15.

Zeid, I.M. and H.M. Abou El Ghate. (2007). Effect of sewage water on growth, metabolism and yield of bean. Journal of Biological Sciences 7(1): 34-40.