Archive of SID

تعیین تفاوت در حساسیت گونه‌های مختلف کرم‌خاکی به سرب با استفاده از سطوح پیش پراکسیداسیون لیپیدی و آنتی‌اکسیدانی کل

- **محمدحسین سینکاکریمی:** گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، کدپستی: ۶۵۷۱۹-۹۵۸۶۳
- **عیسی سلگی*** : گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، کدپستی: ۶۵۷۱۹-۹۵۸۶۳
- **اباصلت حسین‌زاده کلاگر:** گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، کدپستی: ٤٧٤١٦-٩٥٤٤٧

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۶ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

چکیده

کرم‌های خاکی به‌منظور ارزیابی ریسک آلاینده‌های محیطی توسط محققین مختلف به‌صورت گسترده‌ای به‌عنوان شاخص زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. از سویی دیگر گونه‌های کرم خاکی موجود در یک منطقه و نیز حساسیت آن‌ها به یک آلاینده خاص متفاوت می‌باشد. از این‌رو هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات فلز سرب بر ظاهر، توده زیستی، پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌عنوان نشانگرهای زیستی در گونه‌های *Aporrectodea rosea*، *Aporrectodea caliginosa*، *Dendrobaena hortensis* و *Eisenia fetida* کرم خاکی به‌منظور تعیین گونه ذاتاً حساس‌تر به سرب است. برای این منظور، تست سمیت روی کرم‌های خاکی به‌روش تماسی مطابق دستورالعمل ۲۰۷ سازمان همکاری و توسعه اقتصادی و اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های کل و پراکسیداسیون لیپیدی با مالون دی آلدئید به‌ترتیب با روش‌های توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن و تیوباربیوتوریک اسید انجام شدند. نتایج نشان داد که ترتیب شدت بروز علائم ظاهری و فیزیولوژیک مشاهده شده که از جمله آن‌ها می‌توان به کشیده شدن بدن، انقباض وزیکول سمینال، انقباض حلقه‌ها، پارگی کوتیکول و کوتاه شدن بدن اشاره کرد، به‌صورت *E. fetida<D. hortensis<A. caliginosa<A. rosea* بود. هم‌چنین گونه *A. rosea* قرار گرفته در معرض تیمارهای مختلف سرب، نسبت به کاهش توده زیستی و سطوح پراکسیداسیون لیپیدی و آنتی‌اکسیدانی کل حساسیت بیش‌تری را نشان داد. بنابراین باتوجه به یافته‌های به‌دست آمده می‌توان پیشنهاد نمود که گونه *A. rosea* کرم خاکی می‌تواند به‌عنوان شاخص زیستی مناسب در مقابل آلودگی خاک به سرب مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کرم خاکی، ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های کل، پراکسیداسیون لیپیدی، مالون دی آلدئید، سرب

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: e.solgi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

جدای از منابع طبیعی، می‌توان از معدن‌کاوی، فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی (به‌خصوص کاربرد کودها و سموم شیمیایی)، کاربرد لجن فاضلاب و پسماندها به‌عنوان مهم‌ترین منابع انسانی وارد کننده آلاینده‌های فلزی به خاک نام برد (Žaltauskaitė و Sodiene، ۲۰۱۴). فلزات به‌علت عدم تجزیه‌پذیری زیستی و توانایی ورود و تجمع در زنجیره‌های غذایی به‌عنوان تهدیدی برای سلامت موجودات زنده و مخرب ساختار اجتماعی موجودات خاک‌زی محسوب می‌شوند. در میان آلاینده‌های فلزی، سرب به‌علت استفاده گسترده، دارای پراکنش و اهمیت زیادی در بوم‌سازگان‌ها می‌باشد. سرب برای موجودات زنده غیرضروری و بسیار سمی می‌باشد به‌طوری‌که موجب آسیب‌های شدید فیزیولوژیک، بیولوژیک و تولیدمثلی می‌شود، که ازجمله آن‌ها می‌توان به استرس‌های اکسیداتیو، تغییر در بیان ژن، اختلال در عملکرد آنزیم‌ها و اختلال در جذب مواد غذایی اشاره کرد (Bierkens و همکاران، ۱۹۹۸؛ Stohs و Bagchi، ۱۹۹۵؛ Regoli و همکاران، ۲۰۰۶، Nursita و همکاران، ۲۰۰۵). از سوی دیگر مطابق طبقه‌بندی Roberts و Drough (۱۹۸۳)، میزان سمیت سرب برای کرم‌های خاکی در طبقه بسیار سمی (میکرو گرم بر سانتی‌مترمربع ۱-۱۰۰) قرار دارد. به‌طورکلی آلوده شدن خاک به فلزات می‌تواند موجب ایجاد تاثیرات مخرب در ساختار اجتماع جانداران خاک‌زی به‌خصوص در کرم‌های خاکی به‌عنوان گونه سنگ سرطاق (Keystone) که توده زیستی غالب گونه‌های جانوری خاک را تشکیل می‌دهند، شود. کرم‌های خاکی در زنجیره غذایی اکوسیستم‌های خشکی، چرخه‌های مواد و انرژی و هم‌چنین در ساختار اجتماع خاک و اعمال اکوسیستم‌ها نقش بسیار مهمی دارند (Žaltauskaitė و Sodiene، ۲۰۱۴). تاثیرات مضر روی گونه‌های کلیدی می‌تواند موجب تاثیر روی پایداری جامعه و هم‌چنین تاثیرات منفی جدی روی کل اکوسیستم خشکی شود. در میان گونه‌های مختلف کرم خاکی گونه *Eisenia fetida* به‌علت طول نسل کوتاه و نیز توانایی تولیدمثل در گستره زیادی از انواع مواد آلی، به‌عنوان شاخصی از اثر آلاینده‌ها روی کرم‌های خاکی در بسیاری از مطالعات سم‌شناسی به‌کار رفته و توسط سازمان‌های بین‌المللی نیز توصیه شده است (OECD، ۱۹۸۴؛ Yasmin و Dsouza، ۲۰۰۷). اما در استفاده گسترده از این گونه به‌عنوان شاخصی از اثرات آلاینده‌ها روی کرم‌های خاکی می‌توان به دو ایراد اساسی اشاره کرد: ۱) گونه *E. fetida* در خاک‌های معدنی یافت نمی‌شود (Lowe و Butt، ۲۰۰۷)، بنابراین این گونه در زمین‌های زراعی و به‌طور کلی خاک‌های عاری از مواد آلی بسیار غنی، که سطح بسیار زیادی از اکوسیستم‌های خشکی را تشکیل می‌دهند و آلاینده‌های آلی و معدنی را می‌پذیرند، حضور ندارد. درصورتی‌که گونه‌های دیگری مانند *Aporrectodea caliginosa* و *Aporrectodea rosea* در گستره خاک‌های معدنی و زمین‌های زراعی یافت می‌شوند و هردوی آن‌ها نقش‌های اکولوژیکی مهمی در اکوسیستم‌های خشکی ایفاء می‌کنند (Bouché، ۱۹۹۲؛ Csuzdi و Zicsi، ۲۰۰۳). برخی از مطالعات نشان دادند که گونه *E. fetida* در مقابل بعضی آلاینده‌ها نسبت به برخی دیگر از گونه‌های کرم‌خاکی مقاومت بیش‌تری دارد (Fitzgerald و همکاران، ۱۹۹۶؛ Roberts و Dorough، ۱۹۸۵؛ Kula، ۱۹۹۵). به‌عنوان مثال Stenersen (۱۹۷۹) نشان داد که گونه *A. caliginosa* نسبت به کولین استراز تا صد برابر حساسیت بیش‌تری نسبت به گونه *E. fetida* دارد. بنابراین در مطالعات سم‌شناسی تنها تمرکز روی گونه *E. fetida* می‌تواند موجب ایجاد برآورد غیرواقعی در رابطه با اثر آلاینده‌ها روی کرم‌های خاکی شود. از این‌رو هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات مخرب سرب بر گونه‌های *A. Caliginosa* و *A. Rosea* از گروه اکوفیزیولوژیک endogeic و گونه‌های *Dendrobaena hortensis* و *E. fetida* از گروه اکوفیزیولوژیک epigeic کرم خاکی به‌منظور تعیین گونه بومی ذاتاً حساس‌تر نسبت به سرب، با اندازه‌گیری پراکسیداسیون لیپیدی از طریق میزان مالون‌دی‌آلدئید (Malondialdehyde=MDA)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل یا Total Antioxidant Capacity) =TAC) کاهش وزن و ثبت تغییرات ظاهری و رفتاری آن‌ها است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد مطالعه: تعداد ۶۰ نخ کرم‌های خاکی بالغ (۱۵ نخ از هر گونه) از گونه‌های *A. caliginosa* (۱۷۶±۹۸۶ میلی‌گرم)، *A. rosea* (۳۴± ۳۱۳ میلی‌گرم)، *D. hortensis* (۵۹±۵۰۲ میلی‌گرم) و *E. fetida* (۷±۶۰۰ میلی‌گرم) که کلیتلوم آن‌ها به‌خوبی توسعه پیدا کرده بود، از یک منطقه پاک روستایی در شهرستان چالوس، کلنو (N ۳۶° ۳۰' ۳۳" E, ۵۱° ۱۴' ۴۹") نمونه‌برداری شد. شناسایی و جداسازی شده گونه‌ها مطابق کلید شناسایی ارائه شده توسط Csuzdi و Zicsi (۲۰۰۳) در آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه مازندران انجام شد. کرم‌ها قبل از انجام آزمایش به‌مدت ۲۴ (*D. hortensis* و *E. fetida*) الی ۴۸ ساعت (*A. caliginosa* و *A. rosea*) در کاغذ صافی مرطوب با هدف تخلیه محتویات شکمی نگه‌داشته شدند.

انتخاب گونه‌های *A. rosea*، *A. caliginosa* و *D. hortensis* مورد مطالعه براساس بررسی یک‌ساله پراکنش گونه‌های مختلف کرم خاکی در شهرستان چالوس به‌عنوان شاخصی از گونه‌های ناحیه هیرکانی (سینکاکریمی و همکاران، منتشر نشده) و نیز گونه *E. fetida* براساس توصیه سازمان‌های بین‌المللی (OECD، ۲۰۰۴؛ OECD، ۱۹۸۴؛ ISo ۱-۱۷۵۱۲، ۲۰۰۸) و به‌کار رفتن در بسیاری از مطالعات، به‌منظور

www.SID.ir

Archive of SID

معرفی نشانگرهای زیستی از یک شاخص زیستی ذاتاً حساس به آلودگی سرب خاک برای این ناحیه انتخاب شدند.

تست سمیت: تست سمیت روی کرم‌های خاکی به‌روش تماسی (Contact test) مطابق دستورالعمل ۲۰۷ تست مواد شیمیایی توصیه شده توسط سازمان همکاری اقتصادی و توسعه (Organization for Economic Cooperation and Development =OECD) انجام پذیرفت (OECD، ۱۹۸۴). برای این منظور ابتدا غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ (برحسب میلی‌گرم بر لیتر) در آب دیونیزه از نمک نیترات سرب بدون آب ($Pb(NO_3)_2$) به‌عنوان محلول‌های ذخیره تهیه شدند. سپس برای انجام تست سمیت، یک لایه از کاغذهای صافی واتمن ۴۲ با ضخامت ۰/۲ میلی‌متر درون ظروف شیشه‌ای به ابعاد ۳×۹×۱ سانتی‌متر، به‌گونه‌ای که کاغذ صافی تمام سطوح را بپوشاند و هم‌پوشانی نیز نداشته باشد، قرار گرفتند. هر یک از کاغذهای صافی به غلظت‌های: صفر (آب مقطر دیونیزه، به‌عنوان شاهد)، ۷/۱۴، ۱۴/۲۹، ۲۱/۴۳ و ۲۸/۵۷ برحسب میکروگرم بر سانتی‌متر مربع از سرب آغشته شدند. پس از خشک شدن کاغذهای صافی آغشته شده به محلول‌های نمکی ذکر شده به کمک جریان هوای گرم، درون هر کدام از ظرف‌ها تنها یک عدد کرم همراه با یک میلی لیتر آب دیونیزه، با هدف تامین رطوبت مورد نیاز برای آن‌ها طی مدت آزمایش، قرار داده شد. دهانه ظروف آزمایش به‌وسیله پارافیلم پوشانیده و سوراخ‌های ریزی در آن، به‌منظور تامین هوای مورد نیاز، تعبیه گردید. تست سمیت برای هریک از آزمایشات اعم از شاهد در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در تاریکی و دمای اینکوبه ۱±۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت.

تهیه پلاسمای بافتی کرم‌های خاکی: کرم‌های خاکی پس از تیمارهای مختلف مورد مطالعه به‌همراه بافر سرد (۵۰ mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.25 M Sucrose; 1mM EDTA, pH 7.5) با نسبت ۱ به ۴ (وزن به حجم بافر)، در درون هاون چینی سائیده و به‌صورت مخلوط بافتی هموژن درآمدند. سپس بافت هموژن شده در ۱۰۰۰۰× g به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی به‌دست آمده به نسبت یک به چهار به‌وسیله آب مقطر دیونیزه رقیق گردید و برای اندازه‌گیری میزان MDA و TAC مورد استفاده قرار گرفت (Liu، ۲۰۱۵؛ Chen، ۲۰۱۱).

اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید: میزان MDA به‌عنوان شاخصی از آسیب اکسیداتیو غشای سلولی با استفاده از روش اسید تیوباربیتوریک (TBA=Thiobarbituric acid) ارائه شده توسط Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) با اندکی تغییرات انجام پذیرفت. در این روش ۵۰۰ میکرولیتر محلول اسیدتری‌کلرواستیک (TCA=Trichloroacetic acid) ۲۰ ٪ در آب و ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۶۷ درصد در آب تیوباربیتوریک اسید به ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای بافتی اضافه شد و در حمام آب گرم ۹۵ °C به‌مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه گردید. اساس این روش، که یک روش مناسب برای اندازه‌گیری سطح مالون‌دی‌آلدئید می‌باشد، بر پایه واکنش مالون دی‌آلدئید تحت شرایط دمایی بالا (۹۰-۱۰۰ °C) و اسیدی با معرف TBA است. ترکیب حاصل پس از خنک شدن در دمای اتاق، در ۱۰۰۰۰×g به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ و تغییر رنگ آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل T80 plus UV/Vis (شرکت PG Instruments, UK) تعیین شد. سپس میزان مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی ۱۰۵×۱/۵۶ مول بر لیتر بر سانتی‌متر تعیین و بر حسب نانومول بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از روش توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن (FRAP) ارائه شده توسط Benzie و Strain (۱۹۹۶) اندازه‌گیری شد. اساس این روش، احیاء یون‌های آهن فریک (Fe+3) به فرو (Fe+2) توسط مولکول‌های احیاکننده موجود در نمونه‌های بیولوژیک و ایجاد کمپلکس Fe+2 با مولکول TPTZ (2,4,6-Tri (2-pyridinyl)-1,3,5-triazine) که ایجاد یک کمپلکس آبی رنگ می‌کند، می‌باشد، به‌گونه‌ای که شدت این تغییر رنگ نشانگر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل است. برای ساخت محلول استاندارد از سولفات آهن با غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو مولار استفاده شد. محلول کار از مخلوط نمودن ۱۰ حجم بافر استات ۳۰۰ میلی‌مولار با pH=۳/۶، یک حجم محلول TPTZ ۱۰ میلی‌مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی‌مولار و هم‌چنین یک حجم از فریک کلراید ($FeCl_3$) ۲۰ میلی‌مولار تهیه و ۱/۵ میلی‌لیتر از آن به میکروتیوب‌ها اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای بافتی به‌دست آمده از تیمارهای مختلف به هر کدام از میکروتیوب‌ها اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C قرار داده شد و شدت تغییر رنگ در طول موج ۵۹۳ نانومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. کلیه مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

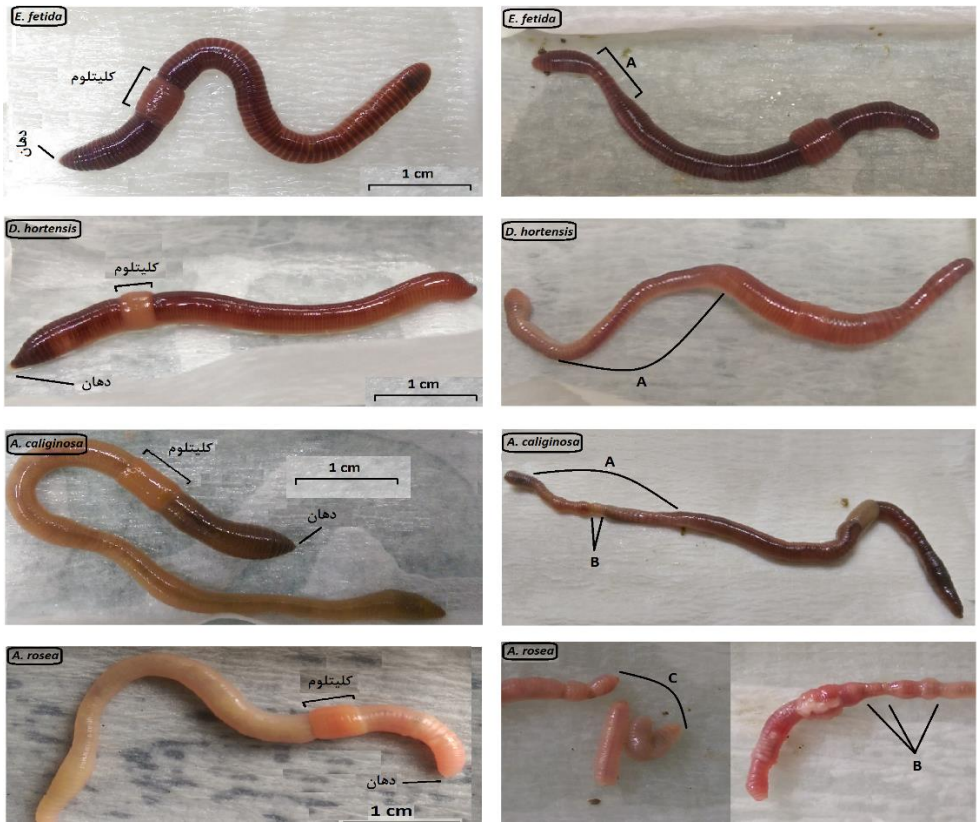
تجزیه و تحلیل داده‌ها: برای محاسبه نرخ کاهش وزن نسبی، وزن کرم‌های قرار داده شده در هریک از تیمارها با استفاده از رابطه [$WLn = (W0 - Wt) / W0 \times 100\%$] محاسبه شد. در این رابطه WLn نرخ کاهش وزن نسبی کرم‌های در معرض غلظت n قرار گرفته، W0 وزن کرم‌ها در شروع آزمایش، Wt وزن کرم‌ها در انتهای آزمایش می‌باشد. هم‌چنین از آزمون واریانس یک‌طرفه برای بررسی معنی‌داری اختلاف میزان MDA، TAC و کاهش وزن بین تیمارها و نیز گونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

تغییرات رفتاری و ظاهری: تمامی گونه‌ها پس از تماس اولیه با کاغذهای صافی تلقیح شده به‌وسیله نیترات سرب سعی بر فرار از محیط داشتند، به‌طوری‌که ترتیب شدت این تلاش در واحد زمان به صورت *D. hortensis* <*A. caliginosa* <*A. rosea* <*E. fetida* بود. هم‌چنین در دزهای بالاتر سرعت‌عمل گونه‌هادر پاسخ‌به‌محیط شدیدتر بود به‌طوری‌که فرار از محیط در غلظت‌های (میکروگرم بر سانتی‌متر مربع) ۲۱/۴۳ و ۲۸/۵۷ برای گونه *E. fetida* همراه با پیچ و تاب بدن و ترشح مایع سلومیک بود. ترتیب شدت بروز علائم ظاهری و فیزیولوژیک مشاهده شده بر اثر در معرض قرارگیری گونه‌های مورد مطالعه با سرب به‌صورت *D. hortensis* <*A. caliginosa* <*A. rosea* < *E. fetida* متفاوت بود، به‌طوری‌که می‌توان از علائم مشاهده شده در *A. rosea* به‌کشیده‌شدن بدن، انقباض غده‌های جنسی (Glandular tumescence)، پارگی کوتیکول و کوتاه کردن بدن، در *A. rosea* و *A. caliginosa* انقباض حلقه‌ها و در *A. caliginosa*، *D. hortensis* و *E. fetida* به کشیده شدن بدن اشاره کرد (شکل ۱).



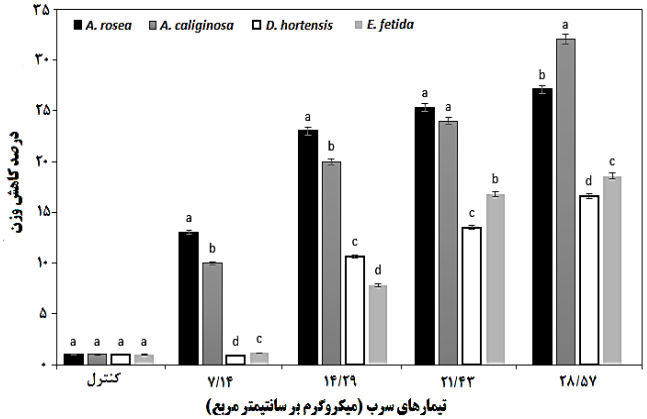
شکل ۱: تغییرات ظاهری اثرات سرب روی گونه‌های *A. caliginosa*، *A. rosea*، *D .hortensis* و *E. fetida* کرم خاکی: کشیدگی بدن (A)، انقباض و برآمدگی حلقه‌ها (B)، کوتاه کردن بدن (C).

شکل‌های سمت راست و چپ به‌ترتیب شاهد و تیمار می‌باشند.

تاثیر بر وزن: کرم‌های خاکی قرار گرفته در معرض کاغذهای تلقیح شده به غلظت‌های ۷/۱۴، ۱۴/۲۹، ۲۱/۴۳ و ۲۸/۵۷ برحسب میکروگرم بر سانتی‌متر مربع از سرب در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش وزن را نشان دادند ($p< ۰/۰۵$؛ شکل ۲)، به‌طوری‌که کاهش مشاهده شده با افزایش غلظت سرب در محیط افزایش پیدا کرد و شدت این کاهش در غلظت‌های ۷/۱۴ و ۱۴/۲۹ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع در گونه *A. rosea*، در غلظت ۲۱/۴۳ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع در گونه‌های *A. rosea* و *A. caliginosa* و در غلظت ۲۸/۵۷ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع در گونه *A. caliginosa* به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از گونه‌های دیگر مورد مطالعه بود ($p< ۰/۰۵$)، که نشان از حساسیت بیش‌تر گونه‌های *A. rosea* و *A. caliginosa* در مقابل آلودگی‌های سرب دارد.

www.SID.ir

Archive of SID

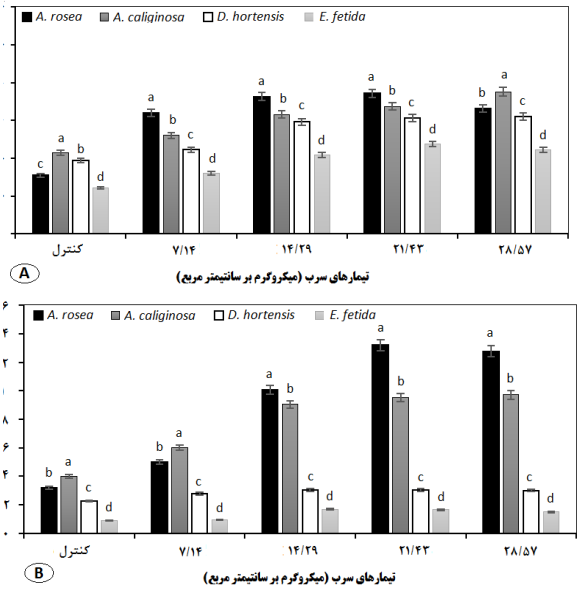


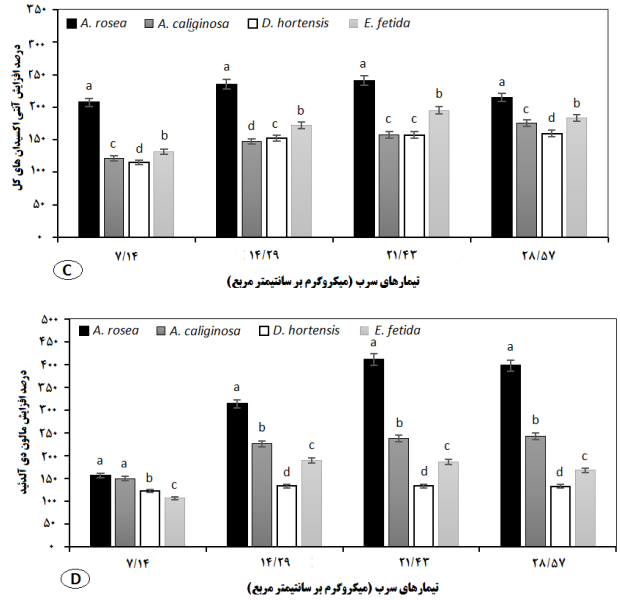
شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف سرب در کاهش وزن روی گونه‌های *A. rosea*، *A. caliginosa*، *D .hortensis* و *E. fetida* کرم خاکی

حروف **a**، **b**، **c** و **d** نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین گونه‌های مورد مطالعه در هر یک از تیمارهای سرب می‌باشد.

اثر بر پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل:

گونه‌های کرم خاکی قرار گرفته در معرض تیمارهای مختلف سرب نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری میزان مالون دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیش‌تری را در بافت‌های خود نشان دادند ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که وابستگی تغییر میزان مالون‌دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به تیمارهای مختلف سرب در گونه‌های مورد بررسی به‌ترتیب به‌صورت *D. hortensis*<*E. fetida* <*A. caliginosa*<*A.rosea* و *D. hortensis* <*A. caliginosa* <*E. fetida* <*A. rosea* بود (شکل ۳).





شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف سرب در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و پراکسیداسیون لیپیدی روی گونه‌های *A. rosea*، *A. caliginosa*، *D. hortensis* و *E. fetida* کرم خاکی: اثر غلظت‌های مختلف سرب در فعالیت آنتی اکسیدانی کل (A و C)؛ روی پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری میزان MDA (B و D)

بحث

با توجه به این‌که در تست تماسی، برخلاف تست با استفاده از خاک پیچیدگی وجود ندارد، می‌توان با اطمینان بیش‌تری نتایج آزمایشات مختلف را با یکدیگر مقایسه کرد (Miyazaki و همکاران، ۲۰۰۲). با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد گونه *A. rosea* از نظر تغییرات ظاهری گونه حساس‌تر و شاخص بسیار بهتری نسبت به سه گونه دیگر مورد مطالعه در آلودگی‌های سرب است. اگرچه تاکنون روش خاصی برای استانداردسازی پاسخ‌های ظاهری مشاهده شده، تدوین نشده است (Sivakumar، ۲۰۱۵)، اما مطالعات مختلفی به گزارش این تغییرات ظاهری ازجمله عدم توانایی در نقب زدن، پیچ و تاب بدن، ایجاد زخم، حرکات سریع و آرام، کوتاه کردن بدن، کشیده شدن بدن، خروج مایع دفاعی حاوی کوئلوموسیت، انقباض کلیتلوم و انقباض حلقه‌ها در گونه‌های متفاوت کرم خاکی قرار گرفته در معرض غلظت‌های مختلف آلاینده‌ها پرداخته‌اند (Gopal و همکاران، ۱۹۸۶؛ Veerabahu و همکاران، ۱۹۹۵؛ Kalaiselvan و همکاران، ۱۹۹۶؛ Subramaniam و همکاران، ۱۹۹۱؛ Sivakumar و همکاران، ۲۰۰۳؛ Gupta و Sundararaman، ۱۹۹۰). هم‌چنین در مطالعه حاضر وابستگی میان بروز علائم ظاهری و فیزیولوژیک به غلظت آلاینده و نوع گونه مشاهده شد که مطالعات

www.SID.ir

Archive of SID

دیگری نیز به آن اشاره کردند (Veerabahu و همکاران، ۱۹۹۵؛ Sivakumar، ۲۰۱۵؛ Sivakumar و Subbhuraam، ۲۰۰۵).

کرم‌های خاکی قرار گرفته در معرض کاغذهای تلقیح شده به غلظت‌های مختلف سرب کاهش وزن را نشان دادند. علت این کاهش می‌تواند عواملی مانند استرس شدید اکسیداتیو و اختلال در عملکرد فیزیولوژیک، تخلیه گلیکوژن، محتوای چربی و کاهش پروتئین‌ها باشد، که در مطالعات دیگر نیز به‌عنوان عوامل کاهش وزن برای بی‌مهرگان و کرم‌های خاکی در اثر قرارگیری در معرض آلاینده‌ها بیان شده است (Xu و همکاران، ۲۰۱۵؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۵). مطالعات دیگری نیز اثر بازدارندگی سرب روی رشد گونه‌های مختلف کرم‌های خاکی‌را بیان کرده‌اند(Žaltauskaitė و Sodiene، ۲۰۱۴؛ Domínguez Crespo و همکاران، ۲۰۱۲).

در مطالعه حاضر به‌منظور به‌دست آمدن نتایج قابل اتکاتر، میزان‌های به‌دست آمده مالون دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای مختلف هریک از گونه‌های موردبررسی، برمیزان به‌دست آمده آن در تیمار شاهد تقسیم شد. با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد گونه *A. rosea* بیش از سه گونه دیگر مورد مطالعه نسبت به سرب از نظربیومارکرهای موردبررسی حساس باشد.البته‌ذکر این نکته ضروری می‌باشد که مطالعه حاضر تنها بیومارکرهای سطح مالون دی‌آلدئید، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، تغییر توده‌زیستی و تغییرات ظاهری و رفتاری نسبت به یک آلاینده (سرب) را در نظر گرفته و نتایج حاصل از مطالعه حاضر به سایر بیومارکرها و آلاینده‌ها بسط داده نشود، زیرا مطالعه محققیق مختلف نشان داده است که حساسیت بیومارکرهای مختلف نسبت به‌هم و نیز نسبت به آلاینده‌های مختلف متفاوت می‌باشد (Fourie و همکاران، ۲۰۰۷؛ Edwards و Coulson، ۱۹۹۲). وجود حساسیت متفاوت به سرب در گونه‌های مختلف مورد مطالعه می‌تواند به‌دلیل وجود تفاوت در زمینه‌های فیزیولوژیکی آن‌ها باشد. Spurgeon و Hopkin (۱۹۹۶) نشان دادند که فیزیولوژی می‌تواند نقش بسیار مهمی در حساسیت گونه‌های مختلف کرم خاکی نسبت به فلزات سنگین داشته باشد، برای مثال نشان دادند که غدد کلسیمی که نقش بسیار مهمی را در جداسازی و سم‌زدایی فلزاتی مانند سرب و روی‌دارند درگونه‌های حساس‌تر ترشحات کم‌تری را نسبت گونه‌های مقاوم‌تر به فلزات دارد، بنابراین این گونه‌ها توانایی کم‌تری را در حذف و سم‌زدایی سرب در بدن خود از این طریق دارند. هم‌چنین این امکان وجود دارد که تفاوت در حساسیت گونه‌های مختلف مورد مطالعه به‌دلیل تفاوت در توانایی پروتئین‌های متالوتیونین آن‌ها در اتصال به فلزات،که نقش‌بسیار مهمی در فرآیند سم‌زدایی دارند، باشد. Morgan و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که گونه‌های مختلف کرم خاکی ایزومرهای مختلفی از پروتئین‌های متالوتیونین را دارند که این تفاوت می‌تواند منجر به توانایی متفاوت در حذف و سم‌زدایی فلزات مختلف و در نتیجه حساسیت متفاوت نسبت به فلزات مختلف شود. از سویی دیگر به‌خوبی اثبات شده است که گونه‌های کوچک‌تر به‌علت دارا بودن نسبت سطح به حجم بیش‌تر، نسبت به گونه‌های بزرگ‌تر از خود می‌توانند میزان بیش‌تری از فلزات سنگین را از طریق اپیدرم خود جذب کنند (Rozman و Klaassen، ۲۰۰۱). بنابراین می توان انتظار داشت در مطالعه حاضر گونه *A. rosea* که از نظر اندازه کوچک‌تر از سه گونه دیگر مورد بررسی بوده است میزان بیش‌تری از سرب را از طریق پوست خود جذب کرده و به‌همین علت آسیب بیش‌تری را متحمل شده است.

قرارگیری گونه‌های *A. rosea*، *A. caliginosa*، *D .hortensis* و *E. fetida* کرم‌خاکی‌مورد مطالعه در تیمارهای مختلف سرب و افزایش میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در آن‌ها به این معنی می‌باشد که سرب موجب القای تولید گونه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه به‌طور غیرمستقیم موجب تحریک تولید آنتی‌اکسیدان‌ها که نقش مهمی در سازگاری جاندار با شرایط استرس از طریق محافظت بهتر سلول‌ها در مقابل آسیب‌های اکسیداتیو بازی می‌کنند، شده است (Zelikoff و همکاران، ۱۹۹۶؛ Barata و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات دیگری نیز نشان‌دادند که‌قرارگیری کرم‌های‌خاکی‌در‌مقابل‌آلودگی‌های زنوبیوتیک موجب ایجاد استرس‌های اکسیداتیو و در نتیجه افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Xue و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۷). به‌هرحال تحت غلظت‌های نسبی بالای سرب (۲۸/۵۷ میکرو گرم بر سانتی‌متر مربع) میزان فعالیت کلی آنتی‌اکسیدان‌ها در گونه *A. rosea* نسبت به تیمارهای (برحسب میکروگرم بر سانتی‌متر مربع) ۱۴/۲۹ و ۲۱/۴۳ کاهش پیدا کرد که می‌توان این پدیده را به تولید بسیار زیاد گونه‌های فعال اکسیژن مانند هیدروژن اکساید (H2O2)، سوپر اکساید(-O2) و هیدروکسیل رادیکال (-OH) و اثرات بازدارندگی آن‌ها روی تولید آنتی‌اکسیدان‌ها مرتبط دانست (Sun و همکاران، ۲۰۰۷؛ Nordberg و Arner، ۲۰۰۱). مطالعات دیگری نیز اثرات بازدارنگی زنوبیوتیک‌ها را روی توان آنتی‌اکسیدانی کرم‌های خاکی نشان داده‌اند (Zhang و همکاران، ۲۰۱۵؛ Lin و همکاران، ۲۰۱۰).

یکی از مهم‌ترین آسیب‌های گونه‌های فعال اکسیژن و محصولات آن‌ها در سلول پراکسیداسیون لیپیدی‌های غشای سلولی می‌باشد، که می‌توان آن را از طریق اندازه‌گیری میزان مالون دی‌آلدئید تعیین کرد (Shalata و Tal، ۱۹۹۸). مالون‌دی‌آلدئیداز‌محصولات‌نهایی‌آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد که میزان آن می‌تواند به‌طور غیرمستقیم نشان دهنده سطح رادیکال‌های آزاد و نیز منعکس کننده آسیب‌های درون سلولی باشد. پراکسیداسیون لیپیدهای دیواره سلولی موجب آسیب به نفوذپذیری دیواره سلول‌ها و در نتیجه آسیب به عملکرد

www.SID.ir

Archive of SID

آن‌ها می‌شود (Wang و همکاران، ۲۰۱۶). (۳۷). هم‌چنین مالون دی آلدئید تولیدشده طی فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی می‌تواند با ترکیب‌های تشکیل‌دهنده DNA مانند دئوکسی آدنوزین و دئوکسی گوآنین واکنش داده و سبب ایجاد تاثیرات جهش‌زا و یا سرطان‌زا گردد (Liu و همکاران، ۲۰۱۵؛ Bartsch و Nair، ۲۰۰۰).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نشانگرهای زیستی پراکسیداسیون لیپیدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و کاهش توده‌زیستی در گونه‌های *A. rosea*، *A. caliginosa*، *D. hortensis* و *E. fetida* کرم خاکی به‌طور معنی‌داری نسبت به‌وجود و افزایش میزان سرب در محیط واکنش نشان دادند که حساسیت این واکنش در گونه *A. rosea* به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سایر گونه‌ها بود. بنابراین اندازه‌گیری TAC و MDA در گونه *A. rosea* می‌تواند به‌عنوان نشانگرهای زیستی مناسب در مقابل آلودگی سرب نسبت به گونه‌های *A. caliginosa*، *D. hortensis* و *E. fetida* کرم خاکی مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ملایر که حمایت مالی پژوهش حاضر را به‌عهده گرفتند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **Barata, C.; Varo, I.; Navarro, J.C.; Arun, S. and Porte, C., 2005.** Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. Vol. 140, No. 2, pp: 175-186.

۲. **Bartsch, H. and Nair, J., 2000.** Ultrasensitive and specific detection methods for exocylic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress. Toxicology. Vol. 153, No. 1, pp: 105-114.

۳. **Benzie, I.F. and Strain, J.J., 1996.** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Analytical biochemistry. Vol. 239, No. 1, pp: 70-76.

۴. **Bierkens, J.; Klein, G.; Corbisier, P.; Van Den Heuvel, R.; Verschaeve, L.; Weltens, R. and Schoeters, G., 1998.** Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. Chemosphere. Vol. 37, No. 14, pp: 2935-2947.

۵. **Bouché, M.B., 1992.** Earthworm species and ecotoxicological studies. In: Greig- Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.), Ecotoxicology of Earthworms. Intercept Press, Andover. pp. 20-35.

۶. **Chen, C.; Zhou, Q.; Liu, S. and Xiu, Z., 2011.** Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. Chemosphere. Vol. 83, No. 8, pp: 1147-1154.

۷. **Csuzdi, C. and Zicsi, A., 2003.** Earthworms of Hungary: Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae. Hungarian Natural History Museum. 272 p.

۸. **Domínguez-Crespo, M.A.; Sánchez-Hernández, Z.E.; Torres-Huerta, A.M.; Negrete, M.D.L.L.X.; Conde Barajas, E. and Flores-Vela, A., 2012.** Effect of the heavy metals Cu, Ni, Cd and Zn on the growth and reproduction of epigeic earthworms (*E. fetida*) during the vermistabilization of municipal sewage sludge. Water, Air & Soil Pollution. Vol. 223, No. 2, pp: 915-931.

۹. **Edwards, C.A. and Coulson, J.M., 1992.** Choice of earthworm species for laboratory tests. p 36-43. In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ, Heimbach F (eds). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept Ltd, Andover, UK.

۱۰. **Fitzgerald, D.G.; Warner, K.A.; Lanno, R.P. and Dixon, D.G., 1996.** Assessing the effects of modifying factors on pentachlorophenol toxicity to earthworms: applications of body residues. Environmental toxicology and chemistry. Vol. 15, No.12, pp: 2299-2304.

۱۱. **Fourie, F.; Reinecke, S.A. and Reinecke, A.J., 2007.** The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol. 67, No. 3, pp: 361-368.

۱۲. **Gopal, V.; Clement, T. and Nagarajan, K., 1998.** Potential of *Megascolex pumilio* in biomonitoring environmental pollution. Indian Journal of Environmental Health. Vol. 28, No. 3, pp: 194-199.

۱۳. **Gupta, S.K. and Sundararaman, V., 1990.** Biological response of earthworm *Pheretima posthuma* to inorganic cadmium. Indian journal of experimental biology. New Delhi. Vol. 28, No. 1, pp: 71-73.

۱۴. **ISO, 17512-1. 2008.** Soil Quality-Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour-Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*) Geneva, Switzerland: International Organiza tion for Standardization.

۱۵. **Kalaiselvan, K.; Prince, S.P.M. and Subburam, W.V., 1996.** Toxicity of lead to the earthworm *Drawida ramnadana* (Michaelsen). Pollution Research. Vol. 15, pp:15-18.

۱۶. **Kula, H., 1995.** Comparison of laboratory and field testing for the assessment of pesticide side effects on earthworms. Acta Zoologica Fennica. Vol. 196, pp: 338-341.

۱۷. **Lin, D.; Zhou, Q.; Xie, X. and Liu, Y., 2010.** Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). Chemosphere. Vol. 81, No. 10, pp:1328-1333.

۱۸. **Liu, J.; Xiong, K.; Ye, X.; Zhang, J.; Yang, Y. and Ji, L., 2015.** Toxicity and bioaccumulation of bromadiolone to earthworm *Eisenia fetida*. Chemosphere. Vol. 135, pp: 250-256.

۱۹. **Lowe, C.N. and Butt, K.R., 2005.** Culture techniques for soil dwelling earthworms: a review. Pedobiologia. Vol. 49, No. 5, pp: 401-413.

۲۰. **Miyazaki, A.; Amano, T.; Saito, H. and Nakano, Y., 2002.** Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms. Chemosphere. Vol. 47, pp: 65-69.

۲۱. **Morgan, J.E.; Norey, C.G.; Morgan, A.J. and Kay, J., 1989.** A comparison of the cadmium-binding proteins isolated from the posterior alimentary canal of the earthworms *Dendrodrilus rubidus* and *Lumbricus rubellus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology. Vol. 92, No. 1, pp: 15-21.

۲۲. **Nordberg, J. and Arner, E.S., 2001.** Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. Free radical biology and medicine. Vol. 31, No. 11, pp: 1287-1312.

www.SID.ir

Archive of SID

۲۳. **Nursita, A.I.; Singh, B. and Lees, E., 2005.** The effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta Tullberg* (Collembola). Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 60, No. 3, pp: 306-314.

۲۴. **OECD. 1984.** Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Vol. 1, pp: 1-9.

۲۵. **OECD. 2004.** Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*andrei*). OECD Guideline for Testing Chemicals. Vol. 1, pp: 1-18.

۲۶. **Ohkawa, H.; Ohishi, N. and Yagi, K., 1979.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal biochem. Vol. 95, No. 2, pp: 351-358.

۲۷. **Regoli, F.; Gorbi, S.; Fattorini, D.; Tedesco, S.; Notti, A.; Machella, N. and Piva, F., 2006.** Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. Environmental health perspectives. pp: 63-69.

۲۸. **Roberts, B.L. and Dorough, H.W., 1985.** Hazards of chemicals to earthworms. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 4, No. 3, pp: 307-323.

۲۹. **Roberts, B.L. and Wyman Dorough, H., 1984.** Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. Environmental Toxicology and Chemistry. Vol. 3, No. 1, pp: 67-78.

۳۰. **Rozman, K.K. and Klaassen, C.D., 2001.** Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Klaassen, K.D. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons. McGraw-Hill, New York. pp: 107-132.

۳۱. **Shalata, A. and Tal, M., 1998.** The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. Physiologia Plantarum. Vol. 104, No. 2, pp: 169-174.

۳۲. **Sivakumar, S., 2015.** Effects of metals on earthworm life cycles: a review. Environmental monitoring and assessment. Vol. 187, No. 8, pp:1-16.

۳۳. **Sivakumar, S. and Subbhuraam, C.V., 2005.** Toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 62, No. 1, pp: 93-98.

۳۴. **Sivakumar, S.; Kavitha, K.; Rejeshwari, S.; Prabha, D. and Subburam, V., 2003.** Effect of cadmium and mercury on the survival morphology and burrowing behaviour of the earthworm *Lambito Mauritii* (Kinberg). Indian Journal of Environmental Protection. Vol. 23, pp: 799-992.

۳۵. **Spurgeon, D.J. and Hopkin, S.P., 1996.** Effects of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. Pedobiologia. Vol. 40, No.1, pp: 80-96.

۳۶. **Stenersen, J., 1979.** Action of pesticides on earthworms.1. Toxicity of cholinesterase- inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. Journal of Pesticide Science. Vol. 10, pp: 66-74.

۳۷. **Stohs, S.J. and Bagchi, D., 1995.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. Free radical biology and medicine. Vol. 18, No. 2, pp: 321-336.

۳۸. **Subramaniam, S.; Thangavel, P. and Subburam, V., 1991.** Behavioral, morphological and toxic effects of Zn in the earthworm, *Lambito mauritii* (kinberg) in water and soil media. Indian Biologist. Vol. 24, pp: 1-7.

۳۹. **Sun, Y.; Yin, Y.; Zhang, J.; Yu, H. and Wang, X., 2007.** Bioaccumulation and ROS generation in liver of freshwater fish, goldfish *Carassius auratus* under HC Orange No. 1 exposure. Environmental toxicology. Vol. 22, No. 3, pp: 256-263.

۴۰. **Veerabahu, S.; Prince, S.P.M.W. and Subburam, V., 1995.** Toxicity of cadmium to the earthworm *Drawida ramnadana* (Michaelsen). Journal of Environmental Pollution. Vol. 2, pp: 55-58.

۴۱. **Wang, Z.; Cui, Z.; Liu, L.; Ma, Q. and Xu, X., 2016.** Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to contaminated soil: Effects of arsenic species. Chemosphere. Vol. 154, pp: 161-170.

۴۲. **Xu, X.B.; Shi, Y.J.; Lu, Y.L.; Zheng, X.Q. and Ritchie, R.J., 2015.** Growth inhibition and altered gene transcript levels in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to 2, 2′, 4, 4′-tetrabromodiphenyl ether. Archives of environmental contamination and toxicology. Vol. 69, No. 1, pp: 1-7.

۴۳. **Xue, Y.; Gu, X.; Wang, X.; Sun, C.; Xu, X.; Sun, J. and Zhang, B., 2009.** The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. Ecotoxicology. Vol. 18, No. 6, pp: 693-699.

۴۴. **Yasmin, S. and D'Souza, D., 2007.** Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. Bulletin of environmental contamination and toxicology. Vol. 79, No. 5, pp: 529-532.

۴۵. **Žaltauskaitė, J. and Sodienė, I., 2014.** Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 103, pp: 9-16.

۴۶. **Zelikoff, J.T.; Wang, W.; Islam, N. and Flescher, E., 1996.** Assays of reactive oxygen intermediates and antioxidant enzymes in medaka (*Oryzias latipes*): potential biomarkers for predicting the effects of environmental pollution. Techniques in Aquatic Toxicology. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp: 178-206.

۴۷. **Zhang, W.; Liu, K.; Li, J.; Chen, L. and Lin, K., 2015.** Uptake and depuration kinetics of lead (Pb) and biomarker responses in the earthworm *Eisenia fetida* after simultaneous exposure to decabromodiphenyl ether (BDE209). Ecotoxicology and environmental safety. Vol. 113, pp:45-51.

۴۸. **Zhang, W.; Song, Y.F.; Sun, T.H.; Song, X.Y.; Zhou, Q.X. and Zheng, S.L., 2007.** Effects of phenanthrene and pyrene on cytochrome P450 and antioxidant enzymes of earthworms (*Eisenia fetida*). Environmental Chemistry. Vol. 26, pp: 202-207 (in Chinese).

www.SID.ir