

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

- محمدحسین سیناکریمی: گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، کدپستی:

۶۵۸۶۳-۹۵۷۱۹

- 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: ۹۵۴۴۷-۴۷۴۱۶

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 کرم‌خاکی 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 caliginosa*، *Aporrectodea rosea*، *Dendrobaena hortensis* و *Eisenia fetida* کرم‌خاکی 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 دی‌آلدئید به‌ترتیب با روش‌های توان آنتی‌اکسیدانی احیای آهن و تیوباریوتوریک 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 سمنال، انقباض حلقه‌ها، پارگی کوتیکول و کوتاه شدن بدن اشاره کرد، به‌صورت $A. rosea < A. caliginosa < D. hortensis < E. fetida$ 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 با توجه به یافته‌های به‌دست آمده می‌توان پیشنهاد نمود که گونه *A. rosea* کرم‌خاکی می‌تواند به‌عنوان شاخص زیستی مناسب در مقابل آلودگی خاک به سرب مدنظر قرار گیرد.

کلمات کلیدی: کرم‌خاکی، ظرفیت آنتی‌اکسیدان‌های کل، پراکسیداسیون لیپیدی، مالون دی‌آلدئید، سرب



مقدمه

جدای از منابع طبیعی، می‌توان از معدن کاوی، فعالیت‌های صنعتی و کشاورزی (به‌خصوص کاربرد کودها و سموم شیمیایی)، کاربرد لجن فاضلاب و پسماندها به‌عنوان مهم‌ترین منابع انسانی واردکننده آلاینده‌های فلزی به خاک نام برد (Sodiene و Žaltauskaitė، 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 از جمله 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 سانتی‌متر مربع ۱-۱۰) قرار دارد. به‌طور کلی 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 (Sodiene و Žaltauskaitė، 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؛ Dsouza و Yasmin، ۲۰۰۷). آمادار 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. در صورتی‌که گونه‌های دیگری مانند

Aporrectodea caliginosa و *Aporrectodea rosea* در گستره خاک‌های معدنی و زمین‌های زراعی یافت می‌شوند و هر دوی آن‌ها نقش‌های اکولوژیکی مهمی در اکوسیستم‌های خشکی ایفاء می‌کنند (Bouché، ۱۹۹۲؛ Zicsi و Csuzdi، 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 (MDA=Malondialdehyde)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل یا (TAC=Total Antioxidant Capacity) 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* (۹۸۶±۱۷۶ میلی‌گرم)، *A. rosea* (۳۱۳±۳۴ میلی‌گرم)، *D. hortensis* (۵۰۲±۵۹ میلی‌گرم) و *E. fetida* (۶۰۰±۷ میلی‌گرم) که کلیتوم 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 Zicsi و Csuzdi (۲۰۰۳) در آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه مازندران انجام شد. کرم‌ها قبل از انجام آزمایش به مدت ۲۴ (*D. hortensis* و *E. fetida*) الی ۴۸ ساعت (*A. rosea* و *A. caliginosa*) 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، ۱۷۵۱۲-۱، ۲۰۰۸) و به‌کار رفتن در بسیاری از مطالعات، به‌منظور



۲۰٪ در آب و ۲۰۰ میکرولیتر محلول ۶۷ درصد در آب تیوباربتوریک اسید به ۱۰۰ میکرولیتر پلاسمای بافتی اضافه شد و در حمام آب گرم °C ۹۵ به مدت ۳۰ دقیقه اینکوبه گردید. اساس این روش، که یک روش مناسب برای اندازه گیری سطح مالون دی آلدئید می باشد، بر پایه واکنش مالون دی آلدئید تحت شرایط دمایی بالا (۱۰۰-۹۰) و اسیدی با معرف TBA است. ترکیب حاصل پس از خنک شدن در دمای اتاق، در ۱۰۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای °C ۴ 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 مالون دی آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی ۱۰۵×۱/۵۶ مول بر لیتر بر سانتی متر تعیین و بر حسب نانومول بر میلی لیتر محاسبه شد.

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی اکسیدانی

کل با استفاده از روش توان آنتی اکسیدانی احیای آهن (FRAP) ارائه شده توسط Benzie و Strain (۱۹۹۶) اندازه گیری شد. اساس این روش، احیای یون های آهن فریک (Fe+3) به فرو (Fe+2) توسط مولکول های احیاء کننده موجود در نمونه های بیولوژیک و ایجاد کمپلکس Fe+2 با مولکول TPTZ (2-pyridinyl)-1,3,5-triazine که ایجاد یک کمپلکس آبی رنگ می کند، می باشد، به گونه ای که شدت این تغییر رنگ نشانگر میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل است. برای ساخت محلول استاندارد از سولفات آهن با غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرو مولار استفاده شد. محلول کار از مخلوط نمودن ۱۰ حجم بافر استات ۳۰۰ میلی مولار با pH=۳/۶، یک حجم محلول TPTZ ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار و هم چنین یک حجم از فریک کلراید (FeCl3) ۲۰ میلی مولار تهیه و ۱/۵ میلی لیتر از آن به میکروتیوبها اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای °C ۳۷ در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از پلاسمای بافتی به دست آمده از تیمارهای مختلف به هر کدام از میکروتیوبها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۳۷ قرار داده شد و شدت تغییر رنگ در طول موج ۵۹۳ نانومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. کلیه مواد مورد استفاده در این پژوهش از شرکت Merck آلمان تهیه شدند.

تجزیه و تحلیل داده ها: برای محاسبه نرخ کاهش وزن نسبی،

وزن کرم های قرار داده شده در هر یک از تیمارها با استفاده از رابطه $WLn = (W0 - Wt) / W0 \times 100\%$ محاسبه شد. در این رابطه WLn نرخ کاهش وزن نسبی کرم های در معرض غلظت n قرار گرفته، W0 وزن کرم هادر شروع آزمایش، Wt وزن کرم هادر انتهای آزمایش می باشد. هم چنین از آزمون واریانس یک طرفه برای بررسی معنی داری اختلاف میزان MDA، TAC و کاهش وزن بین تیمارها و نیز گونه ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده شد.

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

تست سمیت: تست سمیت روی کرم های خاکی به روش تماسی

(Contact test) مطابق دستورالعمل ۲۰۷ تست مواد شیمیایی توصیه شده توسط سازمان همکاری اقتصادی و توسعه (Organization for Economic Cooperation and Development) انجام پذیرفت (OECD= Economic Cooperation and Development) (OECD، ۱۹۸۴). برای این منظور ابتدا غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ (بر حسب میلی گرم بر لیتر) در آب دیونیزه از نمک نترات سرب بدون آب (Pb(NO3)2) به عنوان محلول های ذخیره تهیه شدند. سپس برای انجام تست سمیت، یک لایه از کاغذهای صافی واتمن ۴۲ با ضخامت ۰/۲ میلی متر درون ظروف شیشه ای به ابعاد ۳×۹ سانتی متر، به گونه ای که کاغذ صافی تمام سطوح را بپوشاند و هم پوشانی نیز نداشته باشد، قرار گرفتند. هر یک از کاغذهای صافی به غلظت های: صفر (آب مقطر دیونیزه، به عنوان شاهد)، ۷/۱۴، ۱۴/۲۹، ۲۱/۴۳ و ۲۸/۵۷ بر حسب میکروگرم بر سانتی متر مربع از سرب آغشته شدند. پس از خشک شدن کاغذهای صافی آغشته شده به محلول های 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 آن ها طی مدت آزمایش، قرار داده شد. دهانه ظروف آزمایش به وسیله پارافیلیم پوشانیده و سوراخ های ریزی در آن، به منظور تامین هوای مورد نیاز، تعبیه گردید. تست سمیت برای هر یک از آزمایشات اعم از شاهد در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در تاریکی و دمای اینکوبه ۲۰±۱ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت.

تهیه پلاسمای بافتی کرم های خاکی: کرم های خاکی پس از

تیمارهای مختلف مورد مطالعه به همراه بافر سرد (50 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 به صورت مخلوط بافتی هموژن درآمدند. سپس بافت هموژن شده در ۱۰۰۰۰×g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. محلول رویی به دست آمده به نسبت یک به چهار به وسیله آب مقطر دیونیزه رقیق گردید و برای اندازه گیری میزان MDA و TAC مورد استفاده قرار گرفت (Liu، ۲۰۱۵؛ Chen، ۲۰۱۱).

اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید: میزان MDA به عنوان

شاخصی از آسیب اکسیداتیو غشای سلولی با استفاده از روش اسید تیوباربتوریک (TBA=Thiobarbituric acid) ارائه شده توسط Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) با اندکی تغییرات انجام پذیرفت. در این روش ۵۰۰ میکرولیتر محلول اسیدتری کلرواستیک (TCA=Trichloroacetic acid)



نتایج

تغییرات رفتاری و ظاهری: تمامی گونه‌ها پس از تماس اولیه

با کاغذهای صافی تلقیح شده به وسیله نیترات سرب سعی بر فرار از محیط داشتند، به طوری که ترتیب شدت این تلاش در واحد زمان به صورت $D. hortensis < A. caliginosa < A. rosea < E. fetida$ بود. هم‌چنین در دزهای بالاتر سرعت عمل گونه‌ها در پاسخ به محیط شدیدتر بود به طوری که 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 به صورت $A. rosea < A. caliginosa < D. hortensis < E. fetida$ بود، به طوری که می‌توان از علائم مشاهده شده در $A. rosea$ به کشیده شدن بدن، انقباض غده‌های جنسی (Glandular tumescence)، پارگی کوتیکول و کوتاه کردن بدن، در $A. rosea$ و $A. caliginosa$ انقباض حلقه‌ها و در $A. caliginosa$ و $D. hortensis$ به کشیده شدن بدن اشاره کرد (شکل ۱).



شکل ۱: تغییرات ظاهری اثرات سرب روی گونه‌های $E. fetida$ ، $D. hortensis$ ، $A. caliginosa$ ، $A. rosea$ کرم

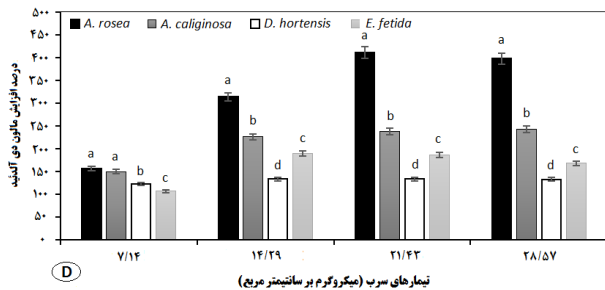
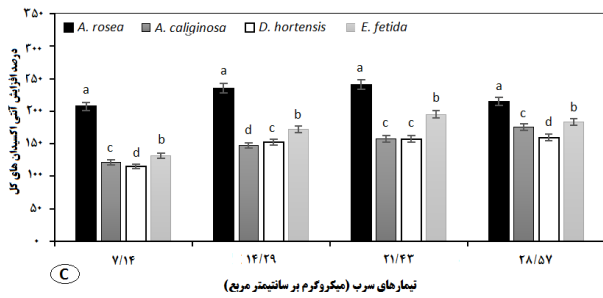
خاکی: کشیدگی بدن (A)، انقباض و برآمدگی حلقه‌ها (B)، کوتاه کردن بدن (C).

شکل‌های سمت راست و چپ به ترتیب شاهد و تیمار می‌باشند.

سانتی‌متر مربع در گونه $A. rosea$ ، در غلظت $۲۱/۴۳$ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع در گونه‌های $A. caliginosa$ و $A. rosea$ و در غلظت $۲۸/۵۷$ میکروگرم بر سانتی‌متر مربع در گونه $A. caliginosa$ به طور معنی‌داری بیش‌تر از گونه‌های دیگر مورد مطالعه بود ($p < 0.05$)، که نشان از حساسیت بیش‌تر گونه‌های $A. caliginosa$ و $A. rosea$ مقابل آلودگی‌های سرب دارد.

تأثیر بر وزن: کرم‌های خاکی قرار گرفته در معرض کاغذهای

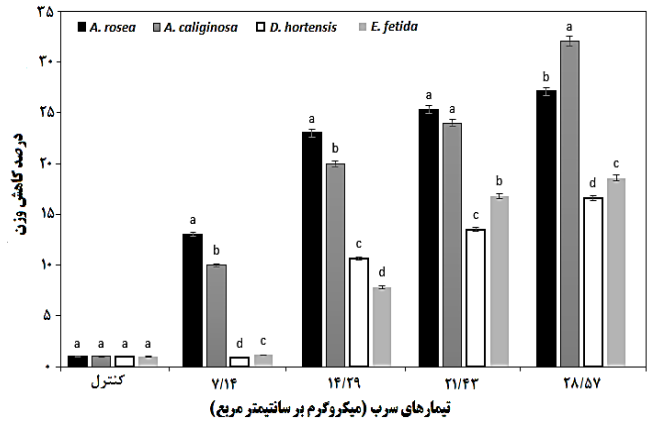
تلقیح شده به غلظت‌های $۷/۱۴$ ، $۱۴/۲۹$ ، $۲۱/۴۳$ و $۲۸/۵۷$ برحسب میکروگرم بر سانتی‌متر مربع از سرب در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش وزن را نشان دادند ($p < 0.05$; شکل ۲)، به طوری که کاهش مشاهده شده با افزایش غلظت سرب در محیط افزایش پیدا کرد و شدت این کاهش در غلظت‌های $۷/۱۴$ و $۱۴/۲۹$ میکروگرم بر



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 آنتی‌اکسیدانی 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 از جمله 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 کولوموسیت، انقباض کلیتوم 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

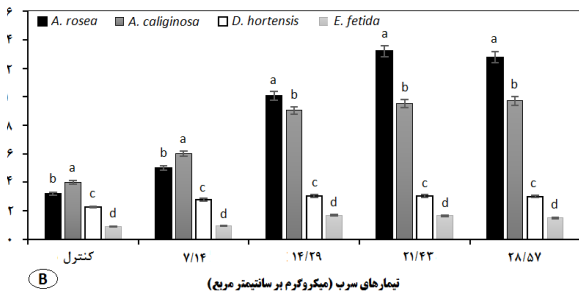
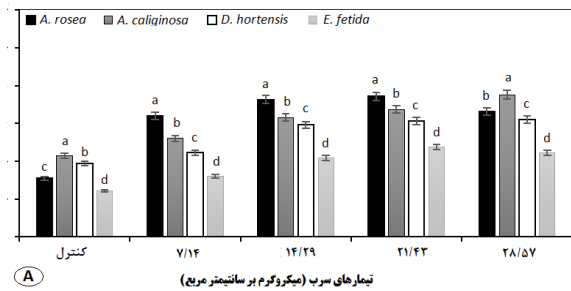


شکل ۲: اثر غلظت‌های مختلف سرب در کاهش وزن روی گونه‌های *A. rosea*، *A. caliginosa*، *D. hortensis* و *E. fetida* کرم خاکی

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 ($p < 0.05$)، به‌طوری‌که وابستگی تغییر میزان مالون دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به تیمارهای مختلف سرب در گونه‌های مورد بررسی به‌ترتیب به‌صورت $D. hortensis < E. fetida < A. caliginosa < A. rosea$ و $A. rosea < E. fetida < A. caliginosa < D. hortensis$ بود (شکل ۳).



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 (Klaassen و Rozman، ۲۰۰۱). بنابراین می‌توان 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. caliginosa*، *A. rosea* و *D. hortensis* و *E. fetida* کرم‌خاکی مورد 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 نشان دادند که قرارگیری کرم‌های خاکی در مقابل آلودگی‌های زئوبیوتیک موجب ایجاد استرس‌های اکسیداتیو و در نتیجه افزایش فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Xue و همکاران، ۲۰۰۹؛ Zhang و همکاران، ۲۰۰۷). به‌رحال 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)، سوپراکساید (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 بازدارندگی زئوبیوتیک‌ها 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 (Tal و Shalata، ۱۹۹۸). مالون دی‌آلدئید از محصولات نهایی آسیب‌های اکسیداتیو می‌باشد که میزان آن می‌تواند به‌طور غیرمستقیم نشان دهنده سطح رادیکال‌های آزاد و نیز منعکس‌کننده آسیب‌های درون سلولی باشد. پراکسیداسیون لیپیدهای دیواره سلولی موجب آسیب به نفوذپذیری دیواره سلول‌ها و در نتیجه آسیب به عملکرد

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

کرم‌های خاکی قرار گرفته در معرض کاغذهای تلخیص 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 خاکی را بیان کرده‌اند (Domínguez و Žaltauskaitė، ۲۰۱۴؛ Sodiene، ۲۰۱۲). Crespo و همکاران، ۲۰۱۲).

در مطالعه حاضر به‌منظور به‌دست آمدن نتایج قابل‌اتکاتر، میزان‌های به‌دست آمده مالون دی‌آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمارهای مختلف هر یک از گونه‌های مورد بررسی، بر میزان 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 نظر بیومارکرهای مورد بررسی حساس باشد. البته ذکر 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 محققین مختلف نشان داده است که حساسیت بیومارکرهای مختلف نسبت به هم و نیز نسبت به آلاینده‌های مختلف متفاوت می‌باشد (Fourie و همکاران، ۲۰۰۷؛ Coulson و Edwards، ۱۹۹۲). وجود حساسیت متفاوت به سرب در گونه‌های مختلف مورد مطالعه می‌تواند به‌دلیل وجود تفاوت در زمینه‌های فیزیولوژیکی آن‌ها باشد. Hopkin و Spurgeon (۱۹۹۶) نشان دادند که فیزیولوژی می‌تواند نقش بسیار مهمی در حساسیت گونه‌های مختلف کرم‌خاکی 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 روی دارند در گونه‌های 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 متالوتئین آن‌ها در اتصال به فلزات، که نقش بسیار مهمی در فرآیند سم‌زدایی دارند، باشد. Morgan و همکاران (۱۹۸۹) نشان دادند که گونه‌های مختلف کرم‌خاکی ایزومرهای مختلفی از پروتئین‌های متالوتئین را دارند که این تفاوت



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 Organization 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.

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

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نشانگرهای زیستی پراکسیداسیون لیپیدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و کاهش توده زیستی در گونه‌های *E. fetida* و *D. hortensis*، *A. caliginosa*، *A. rosea* معنی‌داری نسبت به وجود 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

بدین وسیله 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 exocyclic 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.



- 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 rannadana* (Michaelson). 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).
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 Mauriti* (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

