

## ***Cadmium and Lead Effects on Viability, Lipid Peroxidation and Total Antioxidant Capacity Levels in Eisenia fetida***

Mohammad Hosein Sinkakarimi<sup>1</sup>,  
Eisa Solgi<sup>2</sup>,  
Abasalt Hosseinzadeh Colagar<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran  
<sup>2</sup> Assistant Professor, Department of Environmental Sciences, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Iran  
<sup>3</sup> Professor, Department of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

(Received November 22, 2016 Accepted April 10, 2017)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Increasing entry of heavy metals into the environment and its effects on social structure of soil organisms disturbs the soil ecosystem. Study of molecular and cellular soil invertebrate responses as biomarkers of environmental health can provide useful information in relation to the effect of pollutants on them. Accordingly the aim of this research was to study the effects of cadmium and lead on Biomass, lipid peroxidation (LPo) and total antioxidant capacity (TAC), as cell physiology markers, in *Eisenia fetida* earthworm.

**Materials and methods:** In this study, acute toxicity test was carried out according to the Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD) guidelines (NO 207). TAC and LPo levels were assayed by ferric reducing antioxidant power and thiobarbituric acid methods, respectively.

**Results:** LC<sub>50</sub> as a viability marker, for Cd and Pb ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) were 54.84 and 14.18 in 24h, and 34.1 and 8.4 in 48h, respectively. By increase in concentrations of lead and cadmium the rate of mortality, weight loss, LPo and TAC increased. *E. fetida* was found to be more sensitive to Cd than Pb ( $P<0.05$ ).

**Conclusion:** According to the results, in presence of lead and cadmium LPo and TAC increase significantly in *E. fetida* earthworm. Therefore, measurement of MDA and TAC as cell physiology markers could be used to evaluate the sensitivity of *E. fetida* earthworm to Cd and Pb in management of pollution resources and environmental health.

**Keywords:** cadmium, earthworm, lead, lipid peroxidation, Malondialdehyde, total antioxidant capacity

## اثرات سرب و کادمیوم بر بقاء، پیش پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در کرم خاکی *Eisenia fetida* فتیدا

محمدحسین سیناکریمی<sup>۱</sup>

عیسی سلگی<sup>۲</sup>

اباصلت حسین زاده کلاگر<sup>۳</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** گسترش روز افزون ورود فلزات سنگین به محیط و تاثیر آنها روی ساختار اجتماع جانداران خاکری موجب برهم زدن اکوسیستم خاک می شود. از سویی دیگر مطالعه پاسخهای مولکولی و سلولی بی مهرگان خاکری به عنوان بیومارکرهایی از سلامت محیط می تواند اطلاعات مفیدتری در رابطه با اثرات استرس آلایندهها بر آنها ارائه دهد. از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات سرب و کادمیوم روی بقاء، توده زیستی و نیز پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی سلول، از گونه *Eisenia fetida* کرم خاکی بوده است.

**مواد و روشها:** در این مطالعه تجربی تست سمیت روی کرم خاکی به روش Filter paper مطابق دستورالعمل ۲۰۷ سازمان همکاری اقتصادی و توسعه جهانی (OECD) انجام شد. سطح فعالیت آنتی اکسیدانهای کل (TAC) و پراکسیداسیون لیپیدی به ترتیب با روش های توان آنتی اکسیدانی احیای آهن (FRAP) و تیو باربیوتوریک اسید (TBA) اندازه گیری شدند.

**یافتهها:** این مطالعه نشان داد میزان LC<sub>50</sub> به عنوان نشانگر بقاء برای سرب و کادمیوم به ترتیب بر حسب  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  در بازه زمانی ۲۴ ساعته ۵۴/۸۴ و ۱۴/۱۸ و در بازه ۴۸ ساعته ۳۴/۱ و ۸/۴ است. هم چنین به طور کلی با افزایش غلظت سرب و کادمیوم، میزان مرگ، کاهش وزن، پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافت. این در حالی است که حساسیت کرمها به کادمیوم نسبت به سرب بیشتر بود ( $P < 0/05$ ).

**استنتاج:** براساس یافتهها در گونه *E. fetida* کرم خاکی در حضور سرب و کادمیوم TAC و MDA به طور معنی داری افزایش پیدا می کند. لذا اندازه گیری TAC و MDA می تواند به عنوان نشانگرهای فیزیولوژیکی سلول در حساسیت گونه *E. fetida* کرم خاکی به آلایندههای سرب و کادمیوم در مدیریت منابع آلاینده و سلامت محیط زیست مورد توجه محققین قرار گیرد.

**واژه های کلیدی:** کرم خاکی، ظرفیت آنتی اکسیدانهای کل (TAC)، پراکسیداسیون لیپیدی، مالون دی آلدئید (MDA)، سرب، کادمیوم

### مقدمه

فلزات آلایندههایی هستند که از راههای مختلف از قبیل فعالیت های کشاورزی و یا صنعتی به خاک اضافه می شوند و می توانند تهدیدی برای سلامت موجودات زنده باشند (۱).

Email: acolagar@yahoo.com

**مؤلف مسئول:** اباصلت حسین زاده کلاگر - بابلسر، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

۱. دانشجوی دکتری دانشگاه ملایر، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران

۲. استادیار دانشگاه ملایر، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه ملایر، ملایر، ایران.

۳. استاد دانشگاه مازندران، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۹/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۶/۱/۲۱

به همین منظور عوارض ناشی از فلزات در میان ده نگرانی عمده آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا و کشورهای توسعه یافته قرار دارد (۲). از بین فلزات آلاینده سرب و کادمیوم از مهم ترین فلزاتی هستند که به محیط وارد می شوند و دارای منابع آلاینده و پراکنش زیاد در محیط می باشند و می توانند اثرات مخربی را روی سلامتی انسان و دیگر موجودات در اکوسیستم ها داشته باشند (۳). جدای از منابع طبیعی، یکی از موارد بسیار مهم وارد شدن سرب و کادمیوم به محیط، کودها و سموم شیمیایی هستند. به عنوان مثال گزارشات قبلی نشان داد که کودهای شیمیایی پرمصرف در کشاورزی همانند سولفات پتاسیم، سوپر فسفات تریپل و پتاس که با هدف بالا بردن راندمان تولید استفاده می شوند، از جمله آلاینده های سرب و کادمیوم به محیط می باشند (۷-۴). در حالی که وجود سرب و کادمیوم در خاک بر عوامل متعددی مانند تعداد و بیوماس میکروارگانیزم ها، تجزیه کنندگان و نرخ تجزیه آن ها (۸)، وجود گونه های مختلف تجزیه کننده و تنوع گونه ای آن ها (۹)، پایداری و سازگاری آن ها (۱۰) و فعالیت آنزیمی میکروارگانیزم ها (۱۱) تاثیر مؤثری دارد. هم چنین این فلزات موجب کاهش رشد، کاهش زنده مانی نوزادان، کاهش تولید تخم (۱۲)، تخریب و قطعه قطعه شدن DNA، تغییر فعالیت آنزیم هایی مانند سلولاز، سوپر اکسید دیسموتاز و استیل کولین استراز در موجودات خاکی از جمله کرم های خاکی می شوند (۱۳، ۱۴).

از آن جایی که محیط پیرامون ما از اجزاء زنده (از قبیل میکروارگانیزم ها، گیاهان و جانوران) و غیر زنده (شامل آب، خاک و هوا) تشکیل شده که این اجزاء از طریق برهمکنش های پیچیده ای در ثبات قرار دارند، و سلامت انسان نیز به طور مستقیم و یا غیر مستقیم به سلامت، توان و سرزندگی محیط پیرامون او وابسته است، لذا اگر تغییری در هر کدام از این عوامل زنده و غیر زنده رخ دهد موجب تغییر محیط و بالطبع تغییر در سلامت و زندگی انسان ها می شود (۱۵). بنابراین مطالعه

عوامل برهم زننده این تعادل و برهمکنش برای محققین بسیار ضروری، حائز اهمیت و از مباحث مورد توجه است. به طوری که محققین راه کارها و روش های متعددی را برای اندازه گیری سمیت محیط معرفی نمودند. یکی از این روش های مورد توجه استفاده از بیواندیکاتورها از جمله موجودات بی مهره خاکزی هم چون کرم های خاکی به عنوان شاخص اندازه گیری آلاینده های فلزی خاک است که به وسیله بسیاری از سازمان های محیط زیستی بین المللی به رسمیت شناخته شده است (۱۹-۱۶). با توجه به وجود کنش های متقابل خاص بین کرم های خاکی با خاک به طوری که به طور قابل ملاحظه ای تحت تاثیر آلاینده های خاک قرار می گیرند، نقش آن ها در تجزیه مواد آلی و باز چرخش مواد غذایی در خاک، سادگی به کار برده شدن آن ها به طوری که این سادگی منجر به سهولت اندازه گیری پارامترهای چرخه زندگی آن ها از جمله تولید مثل، رشد، تجمع و دفع مواد آلاینده و پاسخ های بیوشیمیایی می شود و نفوذ پذیری بسیار زیاد بدن آن ها در مقابل آب که منجر به ورود آسان آلاینده های محلول در آب حفره های خاک می شود، از عواملی هستند که آن ها را بیواندیکاتورهای مناسبی برای مطالعات سم شناسی نموده است (۲۰، ۲۱). از بین گونه های مختلف کرم خاکی، *E. fetida* توسط سازمان های مختلف بین المللی به علت داشتن طول نسل کوتاه و پرورش ساده به عنوان گونه استاندارد برای مطالعات سم شناسی معرفی شده است (۱۹-۱۶) که توجه محققین زیادی را به خود جلب نموده است (۲۲، ۲۳). در سال های اخیر در برنامه های پایش محیط، مطالعه پاسخ های مولکولی و سلولی کرم های خاکی در مقابل آلاینده ها با هدف شناسایی بیومارکرها، افزایش پیدا کرده است. یافتن این بیومارکرها می تواند اطلاعات بیش تر و مفیدتری در رابطه با اثر استرس آلاینده ها ارائه دهند (۲۴). از این رو هدف مطالعه حاضر بررسی اثرات مخرب سرب و کادمیوم روی گونه *E. fetida* کرم خاکی، با

اندازه گیری دز کشنده یا همان سمیت حاد ( $LC_{50}$ )، پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، کاهش وزن و ثبت تغییرات ظاهری و رفتاری آن‌ها در بازه زمانی ۴۸ ساعته است.

مطالعه حاضر به روش تجربی انجام شده است

نمونه های کرم خاکی

تعداد ۱۸۷ نخ کرم‌های خاکی بالغ از گونه  $E. fetida$ ، شناسایی و جدا سازی شده در آزمایشگاه تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه مازندران، که کلیتوم آن‌ها به خوبی توسعه پیدا کرده بودند، با وزن  $50 \pm 650$  میلی گرم، قطر  $3 \pm 4$  میلی متر و طول  $5 \pm 10$  میلی متر، با تعداد  $8 \pm 100$  حلقه که به مدت ۲۴ ساعت در گرسنگی با هدف تخلیه محتویات شکمی نگهداشته شدند، انتخاب گردید.

تست سمیت حاد

تست سمیت روی کرم‌های خاکی مطابق دستورالعمل ۲۰۷ تست مواد شیمیایی توصیه شده توسط سازمان همکاری اقتصادی و توسعه یا همان OECD (Organization for Economic Cooperation and ) Development) که به تست Filter paper یا Contact test نیز معروف است، انجام پذیرفت (۱۶).

برای این منظور ابتدا غلظت های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۸۰۰۰ (برحسب mg/l) در آب دیونیزه از نمک نیترات سرب بدون آب  $(Pb(NO_3)_2)$  و غلظت‌های ۱۸۷/۵، ۳۷۵، ۷۵۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۶۰۰۰ (برحسب mg/l) در آب دیونیزه از نمک نیترات کادمیوم ۴ آبه  $(Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O)$ ، به‌عنوان محلول‌های ذخیره تهیه شدند. سپس برای انجام تست سمیت، یک لایه از کاغذهای صافی واتمن ۴۲ با ضخامت ۰/۲ میلی متر درون ظروف شیشه‌ای به ابعاد

۱×۹×۳ سانتی متر، به گونه‌ای 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، به عنوان شاهد)، ۱۱۴/۲۸، ۵۷/۱۴، ۲۸/۵۷، ۱۴/۲۸، ۷/۱۴ و ۳/۵۷ برحسب  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  از سرب و غلظت های صفر، ۸۵/۷۱، ۴۲/۸۵، ۲۱/۴۲، ۱۰/۷۱، ۵/۲۳ و ۲/۶۷ برحسب  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  از کادمیوم، آغشته شدند. کاغذهای آغشته شده به محلول‌های نمکی فوق به کمک جریان هوای گرم خشک شدند. به دلیل این که در این نوع آزمایش، مرگ یک کرم می‌تواند روی بقای دیگری تاثیر بگذارد، در داخل هر کدام از ظرف‌ها تنها یک عدد کرم همراه با یک میلی لیتر آب دیونیزه، با هدف تامین رطوبت مورد نیاز برای آن‌ها در طی مدت آزمایش، قرار داده شد. دهانه ظروف آزمایش به وسیله پارافیلیم پوشانیده و سوراخ‌هایی در آن، به منظور تامین هوای مورد نیاز، تعبیه گردید. تست سمیت برای هر یک از آزمایشات اعم از شاهد در ۱۰ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش در تاریکی و دمای اینکوبه  $1 \pm 20$  درجه سانتی گراد انجام گرفت. پس از انجام تست سمیت حاد ( $LC_{50}$ ) سرب و کادمیوم، از میزان‌های یک چهارم، یک دوم، برابر و دو برابر  $LC_{50}$  در سه تکرار برای انجام تست اثرات استرس سرب (غلظت‌های صفر، ۲/۱، ۴/۲، ۸/۴ و ۱۶/۸ برحسب mg/l) و کادمیوم (غلظت‌های صفر، ۸/۵۳، ۱۷/۰۵، ۳۴/۱ و ۶۸/۲ برحسب mg/l) بر میزان کاهش وزن، پراکسیداسیون لیپیدی (با اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل استفاده شد. هم چنین به منظور تعیین دامنه غلظت کشنده یک تست مقدماتی با غلظت‌های ۰/۰۷، ۰/۷، ۷، ۷۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۴۰۰۰ در آب دیونیزه از هر یک از نمک های فلزی فوق برحسب mg/l، در سه تکرار انجام پذیرفته بود.

تهیه پلاسمای بافتی کرم‌های خاکی

قرائت شد. سپس میزان مالون دی آلدئید با استفاده از ضریب خاموشی  $1.56 \times 10^5$  مول بر لیتر بر سانتی متر تعیین و بر حسب nmol/ml محاسبه شد.

#### اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با استفاده از روش توان آنتی اکسیدانی احیای آهن (FRAP) ارائه شده توسط Benzie and Strain (1996) انجام پذیرفت (۲۸). اساس این روش، احیاء یون های آهن فریک  $(Fe^{+3})$  به فرو  $(Fe^{+2})$  توسط مولکول های احیا کننده موجود در نمونه های بیولوژیک و ایجاد کمپلکس  $Fe^{+2}$  با مولکول 2,4,6-Tri (2-) TPTZ که ایجاد یک کمپلکس آبی رنگ می کند می باشد و 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  $pH=3/6$ ، یک حجم محلول TPTZ ۱۰ میلی مولار در اسید کلریدریک ۴۰ میلی مولار و هم چنین یک حجم از فریک کلراید  $(FeCl_3)$  ۲۰ میلی مولار تهیه و ۱/۵ میلی لیتر از آن به میکروتیوب ها اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای  $37^{\circ}C$  در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از پلاسمای بافتی به دست آمده از تیمارهای مختلف به هر کدام از میکروتیوب ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $37^{\circ}C$  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 مرک آلمان تهیه شدند.

#### تجزیه و تحلیل داده ها

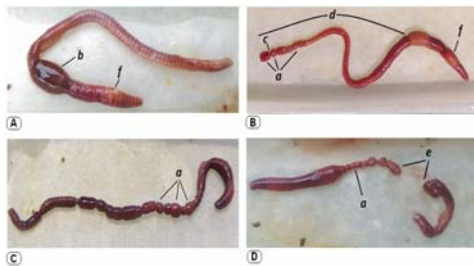
برای محاسبه نرخ کاهش وزن نسبی، وزن کرم های قرار داده شده در هر یک از تیمارها با استفاده از رابطه

هریک از گروه های کرم های خاکساز پس از تیمارهای مختلف، در بافر سرد (50 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.25 M Sucrose; 1mM EDTA, pH 7.5) با نسبت ۱ (وزن) به ۴ (حجم بافر)، در درون هاون چینی ساینده و به صورت مخلوط بافتی هموزن در آمدند. این مخلوط بافتی در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی با ۴ حجم آب مقطر دوبار تقطیر رقیق گردید. پلاسمای بافتی حاصل برای اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

#### اندازه گیری میزان مالون دی آلدئید

میزان مالون دی آلدئید به عنوان شاخصی از آسیب اکسیداتیو غشای سلولی با استفاده از روش تیوباریتوریک اسید (TBA) ارائه شده توسط Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) با اندکی تغییرات انجام پذیرفت (۲۶). در این روش ۵۰۰ میکرو لیتر محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد در آب و ۲۰۰ میکرو لیتر محلول ۶۷ درصد در آب تیوباریتوریک اسید (TBA) به ۱۰۰ میکرو لیتر پلاسمای بافتی اضافه شد و در حمام آب گرم  $95^{\circ}C$  به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه 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 ( $90-100^{\circ}C$ ) و اسیدی با معرف TBA است. در اثر این واکنش دو مولکول  $H_2O$  و یک مولکول MDA-TBA تولید می شود. کمپلکس حاصل از MDA-TBA ایجاد رنگ صورتی کم رنگی می کند که با چشم غیر مسلح قابل مشاهده است (۲۷). ترکیب حاصل پس از خنک شدن در دمای اتاق در ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $4^{\circ}C$  سانتریفیوژ و تغییر رنگ آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل T80 plus UV/Vis (شرکت PG Instruments, UK)

واکنش کرم‌های قرارگرفته در معرض کاغذهای آغشته شده به غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم، وابستگی نسبت به غلظت و زمان از خود نشان داد. اولین علائم رفتاری مواجهه با کاغذهای صافی آغشته به فلزات سرب و کادمیوم از غلظت‌های ۳/۵۷ و ۲/۶۷ بر حسب  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  به ترتیب برای سرب و کادمیوم به صورت فرار از محیط آغاز شد. تماس کرم‌ها با کاغذهای آغشته به سرب از غلظت  $28/57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  و بالاتر از آن به صورت فرار از محیط همراه با پیچ و تاب بدن و ترشح مایع دفاعی حاوی کوئلوموسیت بود و شدت آن با افزایش غلظت افزایش پیدا کرد در صورتی که این نوع پاسخ از غلظت  $2/67 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  و بالاتر از آن برای کادمیوم مشاهده شد. از علائم ظاهری مشاهده شده بر اثر در معرض قرارگیری *E. fetida* با سرب و کادمیوم می‌توان به انقباض و برآمدگی حلقه‌ها، منبسط شدن و ترکیدن کلیتوم، پارگی کوتیکول، کشیده شدن بدن، کوتاه کردن بدن، انقباض وزیکول سمينال اشاره کرد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: تغییرات ظاهری اثرات سرب و کادمیوم روی گونه *E. fetida*، کرم خاکی: انقباض و برآمدگی حلقه‌ها (a)، انبساط و ترکیدگی کلیتوم (b)، پارگی کوتیکول (c)، کشیدگی بدن (d)، کوتاه کردن بدن (e)، انبساط و ترکیدگی وزیکول سمينال (f)

همانطوریکه در این تصویر نشان داده شد، تمامی کرم‌ها پس از مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تماس با غلظت  $114/28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  سرب و ۲۴ و ۴۸ ساعت تماس با غلظت‌های به ترتیب بالاتر از  $42/85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  و  $21/42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  کادمیوم از بین رفتند. هم‌چنین تمامی

در این رابطه  $WL_n = (W_0 - W_t) / W_0 \times 100\%$  محاسبه شد. در این رابطه  $WL_n$  نرخ کاهش وزن نسبی کرم‌های در معرض غلظت n قرار گرفته،  $W_0$  وزن کرم‌ها در شروع آزمایش،  $W_t$  وزن کرم‌ها در انتهای آزمایش می‌باشد. هم‌چنین به منظور بررسی غلظت کشنده ( $LC_{50}$ ) از نرم افزار Probit ver. 7.0 و برای بررسی معنی‌داری اختلاف بین تیمارها از آزمون تعقیبی توکی و نیز همبستگی بین غلظت مالون دی آلدئید و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل از آزمون همبستگی پیرسون (نرم افزار SPSS ver. 22.0) استفاده شد.

## یافته ها

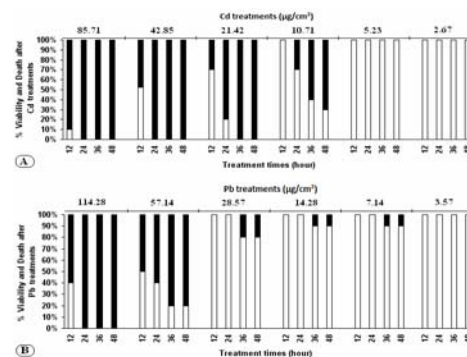
### سمیت حاد

نتایج حاصل از تاثیرات حاد سرب و کادمیوم روی گونه *E. fetida* در جدول شماره ۱ و نیز به صورت درصد مرگ و زنده مانی در هر غلظت مورد بررسی در تصویر شماره ۱ نشان داده شد.

جدول شماره ۱: دزهای حاد کشنده ( $LC_{50}$ ) سرب و کادمیوم برای

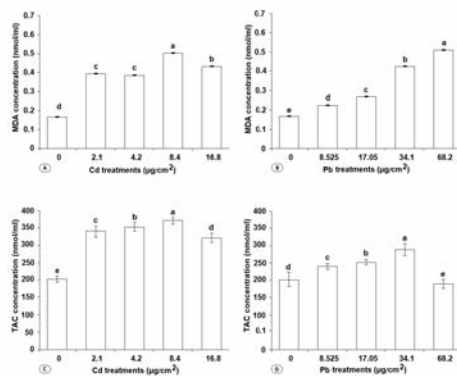
*E. fetida* در تست Filter Paper

نام فلز	دوره زمانی ۲۴ ساعته	دوره زمانی ۴۸ ساعته	منبع
کادمیوم	-	$24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	(۲۹)
کادمیوم	-	$10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	(۳۰)
کادمیوم	$14/18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$7/4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	مطالعه حاضر
سرب	-	$264 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	(۲۹)
سرب	$264/42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$234/1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	مطالعه حاضر



تصویر شماره ۱: اثر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم در زمان‌های مختلف روی گونه *E. fetida* کرم خاکی: درصد مرگ و حیات کرم خاکی هنگامی که در مجاورت غلظت‌های مختلف کادمیوم (A) و سرب (B) قرار گرفت؛ درصد مرگ ■؛ درصد حیات □.

۹۵ درصد، نشان دادند. به طوری که وابستگی تغییر میزان مالون دی آلدئید به غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم در مطالعه همبستگی پیرسون به ترتیب برابر با ۰/۹۷ و ۰/۷۲ می‌باشد. از سوی دیگر با افزایش غلظت سرب و کادمیوم در محیط میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در کرم‌های حاکی به جز در غلظت‌های  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ۶۸/۲ و  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ۱۶/۸ کادمیوم که کاهش نشان داده بود، در آزمون تعقیبی توکی در سطح ۹۵ درصد، افزایش یافت. به طوری که بیشترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ۳۴/۱ سرب و  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ۸/۴ کادمیوم مشاهده شد (تصویر شماره ۳). هم‌چنین وابستگی تغییر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم در مطالعه همبستگی پیرسون در سطح ۹۵ درصد، به ترتیب برابر با ۰/۶۴ و ۰/۶۵ می‌باشد.



تصویر شماره ۴: اثر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و پراکسیداسیون لیپیدی روی گونه *E. fetida* کرم خاک: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم (A) و سرب (B) در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل؛ اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم (C) و سرب (D) روی پراکسیداسیون لیپیدی با اندازه‌گیری میزان MDA

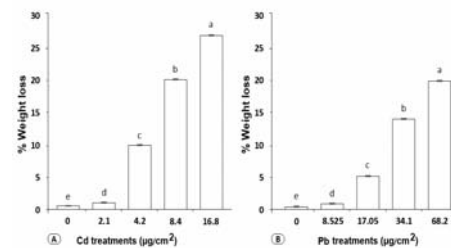
## بحث

در این مطالعه علائم ظاهری مشاهده شده روی کرم‌های حاکی *E. fetida* تیمار شده با رقت‌های مختلف سرب و کادمیوم بررسی شد. نتایج نشان داد که

کرم‌ها پس از مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تماس با غلظت‌های به ترتیب پایین‌تر از  $21/57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  و  $28/57 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  سرب و پس از مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تماس با غلظت‌های پایین‌تر از  $5/35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  کادمیوم زنده ماندند.

## تغییر وزن

کرم‌های حاکی قرار گرفته در معرض غلظت‌های  $8/525$ ،  $17/05$ ،  $34/1$  و  $68/2$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  سرب و  $2/1$ ،  $4/2$ ،  $8/4$  و  $16/8$   $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  سرب کادمیوم در مقایسه با گروه شاهد به‌طور معنی‌داری کاهش وزن را در آزمون تعقیبی توکی در سطح ۹۵ درصد نشان دادند (تصویر شماره ۳). به طوری که کاهش مشاهده شده با افزایش غلظت سرب و کادمیوم در محیط افزایش پیدا کرد و شدت این کاهش برای کادمیوم به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از سرب بود ( $p < 0/01$ ).



تصویر شماره ۳: اثر غلظت‌های مختلف سرب و کادمیوم در کاهش وزن روی گونه *E. fetida* کرم خاک: اثر غلظت‌های مختلف کادمیوم (A) و سرب (B)

اثر بر پراکسیداسیون لیپیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

همان‌طور که تصویر شماره ۴ نشان می‌دهد کرم‌های حاکی *E. fetida* قرار گرفته در معرض تیمارهای مختلف سرب و کادمیوم در بافت‌های خود نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری میزان مالون دی آلدئید بیش‌تری را در آزمون تعقیبی توکی در سطح

سرب و کادمیوم برای *E. fetida* در این مطالعه در طبقه بسیار سمی ( $1-100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) قرار گرفت. مطالعه حاضر نشان داد فلزات سرب و کادمیوم اثرات بازدارندگی روی رشد گونه *E. fetida* داشته و میزان بازدارندگی با غلظت و همچنین نوع فلز رابطه مستقیم دارد به طوری که اثرات بازدارندگی کادمیوم شدیدتر از سرب بود. البته برخی از محققین اثر بازدارندگی کادمیوم روی رشد *E. fetida* را نیز گزارش کرده‌اند (۳۱) و برخی دیگر افزایش میزان استرس اکسیداتیو، اختلال در عملکرد فیزیولوژیک، تخلیه گلیکوژن، محتوای چربی و نیز کاهش پروتئین‌ها را به‌عنوان دلایل احتمالی کاهش وزن بی‌مهرگان و کرم‌های خاکی هنگامی که در معرض آلاینده‌ها قرار گیرند، بیان داشته‌اند (۳۸) که می‌توانند دلایل کاهش وزن کرم‌های خاکی هنگامی که در معرض سرب و کادمیوم قرار می‌گیرند، باشد. این احتمال را تقویت می‌کند که، در معرض قرارگیری و ورود آلاینده‌ها به بدن کرم‌های خاکی موجب تحریک تولید گونه‌های فعال اکسیژن شود به طوری که میزان کل آنتی‌اکسیدان‌های بدن با میزان گونه‌های فعال اکسیژن در تعادل قرار می‌گیرند (۳۹). در صورت افزایش میزان زنوبیوتیک‌هایی مانند سرب و کادمیوم در محیط و افزایش جذب آن‌ها توسط کرم‌های خاکی میزان گونه‌های فعال اکسیژن در بدن افزایش می‌یابد. در پاسخ به این افزایش، سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نیز افزایش می‌یابد تا جایی که میزان گونه‌های فعال اکسیژن از توان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بدن برای مهار آن‌ها بالاتر می‌رود. در این صورت گونه‌های فعال اکسیژن می‌توانند آسیب‌های شدید سلولی مانند پراکسیداسیون لیپیدی، از دست دادن یون و تخریب DNA ایجاد کنند (۴۰، ۴۱). پراکسیداسیون لیپیدهای دیواره سلولی موجب آسیب به نفوذپذیری دیواره سلول‌ها و در نتیجه آسیب به عملکرد آن‌ها می‌شود (۴۲). هم‌چنین مالون دی‌آلدئید تولید شده طی فرآیند پراکسیداسیون لیپیدی می‌تواند با ترکیب‌های

این اثرات وابسته به نوع فلز و غلظت آن‌ها است. به عنوان مثال کرم‌های قرار گرفته در معرض کادمیوم تورم در ناحیه وزیکول سمینال از خود نشان دادند (تصویر شماره ۲) اما این علائم در کرم‌های قرار گرفته شده در معرض غلظت‌های مختلف سرب مشاهده نشد. البته برخی از محققین قبلی، اثر مخرب کادمیوم روی اندام‌های جنسی و وجود میزان پایینی از پروتئین‌های متالوتیونین در وزیکول سمینال را که می‌تواند دلیل مهمی برای آسیب آن باشد، گزارش نمودند (۳۱، ۳۲). هم‌چنین کشیده شدن بدن پاسخی بود که در اثر تماس طولانی‌تر با غلظت‌های پایین‌تر سرب و کادمیوم مشاهده شد در صورتی که انبساط و ترکیدن کلیتلوم پاسخ متداول‌تر به غلظت‌های بالاتر سرب و کادمیوم بود. مطالعات دیگری نیز به بیان وابستگی بروز این علائم ظاهری به نوع فلز و غلظت آن اشاره کرده‌اند (۳۳، ۳۴). همان‌طور که در جدول شماره ۱ نشان داده شد، میزان  $LC_{50}$  برای سرب پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت بالاتر از کادمیوم بود که نشان دهنده حساسیت بیش‌تر گونه *E. fetida* به کادمیوم نسبت به سرب است که تأییدی بر گزارشات قبلی است (۳، ۲۹، ۳۵). از سوی دیگر این مطالعه که به روش تست Filter paper انجام شد، برخلاف مطالعات قبلی که مستقیماً در خاک صورت گرفت (۳۶). از اطمینان بیش‌تر نتایج حاصل برخوردار است. بطوریکه می‌توان اثر ترکیبات مختلف را با یکدیگر مقایسه کرد. چراکه در مطالعه مستقیم اثر این ترکیبات در خاک، اجزای خاک در تعیین میزان سمیت این ترکیبات ممکن است نقش داشته باشند. لذا ممکن است به همین دلیل میزان  $LC_{50}$  به دست آمده برای نترات سرب و کادمیوم در مطالعه حاضر پایین‌تر از میزان گزارش شده در مطالعه Neuhauser و همکاران (۲۹) و برای کادمیوم مشابه نتیجه مطالعه Fitzpatrick و همکاران بود (۳۰). هم‌چنین مطابق طبقه‌بندی میزان سمیت به روش تست Filter paper، که توسط Roberts و همکاران انجام شد (۳۷)، میزان سمیت



در محیط واکنش نشان می‌دهد که این واکنش با اندازه‌گیری میزان افزایش هر دو نشانگر زیستی پراکسیداسیون لیپیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل قابل تعیین است و این واکنش نسبت به کادمیوم بیش تر است. لذا نه تنها اندازه‌گیری میزان TAC و MDA می‌تواند به عنوان نشانگرهای زیستی در حساسیت گونه *E. fetida* کرم خاکی به عنوان یک شاخص زیستی در مقابل سرب و کادمیوم مورد توجه محققین قرار گیرد بلکه می‌تواند در مدیریت منابع آلاینده و سلامت محیط زیست اعم از پایش‌ها و اجرای استراتژی‌های مداخله‌ای به منظور جلوگیری و یا کاهش اثرات مضر این آلاینده‌ها مورد توجه قرار گیرد.

### سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ملایر که حمایت مالی پژوهش حاضر را به عهده گرفتند و از آقای مهندس اسفندیار تقوی، (دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس) که وقت خود را در اختیار این پژوهش قرار دادند، تقدیر و تشکر می‌گردد.

تشکیل دهنده DNA مانند دئوکسی آدنوزین و دئوکسی گوانین واکنش داده و سبب ایجاد تاثیرات جهش‌زا و یا سرطان‌زا گردد (۴۲).

مطالعات قبلی از جمله گزارش Chen و همکاران، Liu و همکاران، Zhou و همکاران، Panzarino و همکاران که به ترتیب اثر کادمیوم، برومادیولون، گلایفوسیت و کادمیوم روی گونه *E. fetida* را بررسی نمودند، نشان داد که افزایش میزان زنبوبوتیک‌ها موجب افزایش میزان پراکسیداسیون لیپیدی و میزان برخی از آنتی‌اکسیدان‌ها از جمله کاتالاز و سوپراکساید دیسموتاز می‌گردد (۴۳-۴۶). یا در گزارش دیگر این گونه کرم خاکی در معرض هم زمان دو آلاینده سرب و دکابرمودی‌فینیل‌اثر قرار گرفت که کاهش سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را نشان داد (۳۹). اما این مطالعه نشان داد در معرض قرار گیری گونه *E. fetida* در مجاورت هریک از آلاینده‌های سرب و کادمیوم به تنهایی سبب افزایش سطح آنتی‌اکسیدان کل و میزان پراکسیداسیون لیپیدی در این گونه می‌شود.

در پایان می‌توان نتیجه‌گیری کرد که گونه *E. fetida* نسبت به حضور و افزایش میزان سرب و کادمیوم

### References

1. Wu B, Liu Z, Xu Y, Li D, Li M. Combined Toxicity of Cadmium and Lead on the Earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Ecotoxicol Environ Safe* 2012; 81: 122-126.
2. Environmental Protection Agency (EPA). Innovative remediation technologies: field scale demonstration projects in North America. 2<sup>th</sup>ed. Georgia: Environmental Management Support, Inc. 2000.
3. Zaltauskaite J, Sodiene. I. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Safe* 2014; 103: 9-16.
4. Atafar Z, Mesdaghinia A, Nouri J, Homae M, Yunesian M, Ahmadimoghaddam M, et al. Effect of fertilizer application on soil heavy metal concentration. *Environ Monitor Asses* 2010; 160(1): 83-89.
5. Cheraghi M, Lorestani B, Merrikhpour H. Investigation of the effects of phosphate fertilizer application on the heavy metal content in agricultural soils with different cultivation patterns. *Biol Trace Elem Res* 2012; 145(1): 87-92.

6. Boudaghi Malidareh H, Mahvi AH, Yunesian M, Alimohammadi M, Nazmara Sh. Effect of Fertilizer Application on Paddy Soil Heavy Metals Concentration and Groundwater in North of Iran. Middle East J Sci Res .2014; 20(12): 1721-1727.
7. Zhou D, Ning Y, Wang B, Wang G, Su Y, Li L, et al. Study on the influential factors of Cd<sup>2+</sup> on the earthworm *Eisenia fetida* in oxidative stress based on factor analysis approach. Chemosphere. 2016; 157: 181-189.
8. Strojan CL. Forest leaf litter decomposition in the vicinity of a zinc smelter. Oecologia 1978; 32(2): 203-212.
9. Nordgren A, Baath E, Soderstrom B. Soil microfungi in an area polluted by heavy metals. Can J Bot .1985; 63: 448-455.
10. Ausrnus BS, Dodson GJ, Jackson DR. Behavior of heavy metals in forest microcosms. Water Air Soil Pollut 1978; 10(1): 19-26.
11. Tyler G. The impact of heavy metal pollution on forests: a case study of Gusum, Sweden. Ambio 1984; 13(1): 18-24.
12. Mirmonsef H, Hornum HD, Jensen J, Holmstrup M. Effects of an aged copper contamination on distribution of earthworms, reproduction and cocoon hatchability. Ecotoxicol Environ Saf .2017; 135: 267-275.
13. Zheng K, Liu ZT, Li Y, Chi Y, Li M. Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. Environ Sci Pollut Res Int.2013; 20(12): 8382-8390.
14. Ciğerci İH, Ali MM, Kaygısız ŞY, Liman R. Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test. Chemosphere. 2016 144: 754-757.
15. Jha EN. Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview. Mutat Res 2004; 552(1-2): 1-17.
16. OECD. Earthworm, Acute Toxicity Tests. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 1984; 1: 1-9.
17. ISO, 17512-1. 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. 2008.
18. OECD. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/andrei*). OECD Guideline for Testing Chemicals. 2004; 1: 1-18.
19. Scaps P, Grelle C, Decamps M. Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzymes. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 1997; 116: 233-238.
20. Morgan AJ, Stürzenbaum SR, Winters C, Grime GW, Aziz NA, Kille P. Differential metallothionein expression in earthworm (*Lumbricus rubellus*) tissues. Ecotoxicol Environ Saf.2004; 57(1): 11-19.
21. Jager T, Fleuren RH, Hogendoorn EA, De Korte G. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ Sci Technol 2003; 37(15): 3399-3404.
22. Hosseini Panah E, Takdastan A. Feasibility of Total Petroleum Hydrocarbon Removal from Drill Cutting with Digested Sludge Using Earth Worm. J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 25(133): 319-324.

23. Zazouli M A, Asgharnia H, Yazdani Cherati J, Ziaee Hezarjeribi H, Ahmadnezhad A. Evaluation of Cow Manure Effect as Bulking Agent on Concentration of Heavy Metals in Municipal Sewage Sludge Vermicomposting. *J Mazandaran Univ Med Sci* .2015; 25(124): 152-169.
24. Lionetto MG, Calisi A, Schettino T. Earthworm biomarkers as tools for soil pollution assessment. Rijeka, Croatia In-Tech Open Access Publisher. 2012
25. Chen C, Zhou, Liu S, Xiu Z. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere* 2011; 83(8): 1147-1154.
26. Gholinezhad Chari M, Hosseinzadeh Colagar A. Seminal plasma lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and cigarette smoking in asthenoteratospermic men. *J Men's Health* 2011; 8(1): 43-49.
27. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal biochem* 1979; 95(2): 351-358.
28. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239(1): 70-76.
29. Neuhauser EF, Loehr RC, Miligan DL, Malecki MR. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biol Fert Soils* .1985; 1(3):149-152.
30. Fitzpatrick LC, Muratti-Ortiz JF, Venables BJ, Goven AJ. Comparative toxicity in earthworms *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to cadmium nitrate using artificial soil and filter paper protocols. *Bull Environ Contamin Toxicol* 1996; 57(1): 63-68.
31. Hirano T, Tamae K. Heavy metal-induced oxidative DNA damage in earthworms: a review. *App Environ Soil Sci* 2010: 2010.
32. Nakashima T, Okada T, Asahi J, Yamashita A, Kawai K, Kasai H, etal. 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutat Res* 2008; 654(2): 138-144.
33. Sivakumar S. Effects of metals on earthworm life cycles: a review. *Environ Monit Assess* 2015; 187(3): 530.
34. Sivakumar S, Subbhuraam CV. Toxicity of chromium (III) and chromium (VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Chem* 2005; 62(1): 93-98.
35. Spurgeon DJ, Hopkin, SP, Jones DT. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ Pollut* 1994; 84(2): 123-130.
36. Miyazaki A, Amano T, Saito H, Nakano Y. Acute toxicity of chlorophenols to earthworms using a simple paper contact method and comparison with toxicities to fresh water organisms. *Chemosphere* 2002; 47(1): 65-69.
37. Roberts LB, Dorough HW. Relative toxicities of chemicals to the earthworm *Eisenia foetida*. *Environ Toxicol Chem* 1984; 3(1): 67-78.
38. Xu XB, Shi YJ, Lu YL, Zheng XQ, Ritchie RJ. Growth inhibition and altered gene transcript levels in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to 2, 20, 4, 40-

- tetrabromodiphenyl ether. Arch Environ Contam Toxicol 2015; 69(1): 1-7.
39. Zhang W, Liu K, Li J, Chenc L, Lin K. Uptake and depuration kinetics of lead (Pb) and biomarker responses in the earthworm *Eisenia fetida* after simultaneous exposure to deca-bromodiphenyl ether (BDE209). Ecotoxicol Environ Safe 2015; 113: 45-51.
40. Xu DM, Li CD, Wen YZ, Liu WP. Antioxidant defense system responses and DNA damage of earthworms exposed to Perfluorooctane sulfonate (PFOS). Environ Pollut 2013; 174: 121-127.
41. Wang Z, Cui Z, Liu L, Ma Q, Xu X. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to contaminated soil: Effects of arsenic species. Chemosphere 2016; 154: 161-170.
42. Bartsch H, Nair J. Ultrasensitive and specific detection methods for exocyclic DNA adducts: markers for lipid peroxidation and oxidative stress. Toxicology 2000; 153(1-3): 105-114.
43. Chen X, Wang X, Gu X, Jiang Y, Ji R. Oxidative stress responses and insights into the sensitivity of the earthworms *Metaphire guillelmi* and *Eisenia fetida* to soil cadmium. Sci Total Environ 2017; 574: 300-306.
44. Liu J, Xiong K, Ye X, Zhang J, Yang Y, Ji L. Toxicity and bioaccumulation of bromadiolone to earthworm *Eisenia fetida*. Chemosphere 2015; 135: 250-256.
45. Panzarino O, Hyrsl P, Dobe P, Vojtek L, Vernile P, Bari G, et al. Rank-based biomarker index to assess cadmium ecotoxicity on the earthworm *Eisenia andrei*. Chemosphere 2016; 145: 480-486.
46. Zhou CF, Wang YJ, Li CC, Sun RJ, Yu YC, Zhou DM. Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). Environ Pollut 2013; 180: 71-77.