

## تأثیر سطوح مختلف روی در لجن فاضلاب بر کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از سمیت کادمیم در کاهو

علی اکبر زارع<sup>۱</sup>، امیرحسین خوشگفتارمنش<sup>۱\*</sup>، محمد جعفر ملکوتی<sup>۲</sup>، حسینعلی بهرامی<sup>۲</sup>، فرهاد مشیری<sup>۳</sup>، مجید

افیونی<sup>۱</sup> و علیرضا عسکری کلستانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup>گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، کد پستی ۸۴۱۵۶-۸۳۱۱۱

<sup>۲</sup>گروه خاکشناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

<sup>۳</sup>عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، کرج

<sup>۴</sup>دانش آموخته مقطع دکتری اصلاح نباتات و کشاورزی هسته‌ای، دانشگاه گرگان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۶، تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۱۲/۱۵)

### چکیده

یکی از نگرانی‌های مربوط به کاربرد لجن فاضلاب در اراضی کشاورزی، غلظت به نسبت بالای کادمیم در این پسماند است که حتی در غلظت‌های پایین نیز برای گیاه سمی بوده و سبب ایجاد خسارت اکسیداتیو می‌شود. به نظر می‌رسد با توجه به غلظت بسیار بالاتر روی در مقایسه با کادمیم در لجن فاضلاب، خسارت اکسیداتیو ناشی از کادمیم می‌تواند تحت تأثیر قرار گیرد. این مطالعه با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف روی (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) بر خسارت اکسیداتیو ناشی از سطوح مختلف کادمیم (۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک) در لجن فاضلاب اضافه شده به خاک در گیاه کاهو انجام گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیم علاوه بر افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA)، فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز به طور کلی افزایش یافت. کاهش غلظت مالون دی‌آلدئید با افزایش غلظت روی در لجن نشان‌دهنده نقش این عنصر در کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از سمیت کادمیم در گیاه بود. به طور کلی با افزایش غلظت روی، فعالیت آنزیم‌های سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز کاهش یافت. با توجه به نتایج آزمایش حاضر به نظر می‌رسد کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان در غلظت بالای روی در لجن فاضلاب به دلیل کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از کادمیم در گیاه باشد.

کلمات کلیدی: آنزیم آنتی‌اکسیدانت، پراکسیداسیون چربی، گروه‌های فعال اکسیژن، فلز سنگین

### مقدمه

ورود به بدن مصرف‌کننده سبب آسیب به کلیه‌ها، فشار بالا، اختلال در متابولیسم کلسیم، ناباروری و تغییرات سرطان‌زایی می‌شود. به‌طور کلی توصیه شده است غلظت این فلز در خاک‌های کشاورزی کمتر از ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم باشد (Lux et al., 2011).

کادمیم فلزی غیر ضروری برای گیاه است که حتی در غلظت‌های پایین نیز برای گیاه سمی بوده و به راحتی توسط گیاه جذب می‌شود. به طوریکه کادمیم پس از جذب توسط گیاه و

کاهو به شدت کاهش می‌یابد (Zare et al., 2018). با توجه به دامنه بحرانی (میلی گرم بر کیلوگرم) روی در خاک (۳۰۰-۱۰) و گیاه (۴۰۰-۸) در مقایسه با کادمیم برای خاک (۷-۰/۰۱) و گیاه (۲/۰ - ۰/۰۸) (Ross et al., 1994)، بنابراین این فرضیه می‌تواند مطرح شود که آیا نسبت بالای روی به کادمیم در لجن فاضلاب تأثیری در کاهش اثرهای منفی کادمیم (خسارت اکسیداتیو) بر گیاه دارد؟ از جمله گیاهانی که بیشترین پتانسیل جذب برای کادمیم در مقایسه با سایر گیاهان را دارد کاهو می‌باشد به طوریکه گزارش گردیده است که شیب جذب کادمیم توسط این گیاه ۱/۷۹ درصد می‌باشد که می‌تواند نشان دهنده حداکثر جذب باشد. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف روی موجود در لجن فاضلاب بر کاهش خسارت اکسیداتیو ناشی از سمیت کادمیم در کاهو اجرا شد.

#### مواد و روش‌ها

این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با یک رقم کاهو (*Lactuca sativa L. cv. Grizzly*) و لجن فاضلاب غنی شده با غلظت‌های مختلف کادمیم و روی در سه تکرار در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران اجرا شد. ابتدا بذره‌های ارقام کاهو در سدیم هیپوکلریت یک درصد برای ۳۰ ثانیه استریل شده و سپس به طور کامل با آب دیونیزه شسته و جوانه‌زنی در بستر شنی که از قبل با اسید کلریدریک رقیق و آب مقطر شسته شده بودند، انجام شد. جوانه‌ها با ارتفاع ۴-۲ سانتی‌متری به گلدان‌های حاوی تیمارهای آزمایشی منتقل شدند.

#### اعمال تیمارها و تهیه گلدان‌های کشت: لجن فاضلاب

شهری (تهیه شده از تصفیه‌خانه شاهین شهر اصفهان)، هوا خشک شده و با سه غلظت کادمیم (۰/۷۵، ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم از منبع سولفات کادمیم) و پنج غلظت روی (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم روی از منبع سولفات روی) تیمار شد. منظور از غلظت‌های مورد مطالعه غلظت نهایی آنها در خاک پس از افزودن لجن به خاک است. هدف از انتخاب این سطوح مطالعات پیشین (Chaney et al., 2000) و

این فلز در گیاه میل ترکیبی شدیدی با گروه‌های سولفیدریل، هیدروکسیل و لیگاند‌های حاوی نیتروژن دارد که در نهایت سبب کاهش مقدار فتوستنز در گیاه می‌شود (Harada et al., 2001). یکی از آسیب‌های مهم بافتی که در اثر قرار گرفتن گیاهان در معرض کادمیم رخ می‌دهد، افزایش تولید گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مانند سوپر اکسید، پراکسید هیدروژن و رادیکال هیدروژن می‌باشد (Choudhary et al., 2007; Zhang et al., 2010). این اکسیژن‌های فعال با حمله به ترکیبات مهم گیاه از جمله اسیدهای چرب غیر اشباع، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک سبب کاهش سیالیت غشاء و کاهش سنتز پروتئین و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (Zhang et al., 2003). به طور کلی مطالعات متعددی درباره خسارت اکسیداتیو ناشی از سمیت کادمیم در گیاه صورت گرفته است (Angeli et al., 2013; Boudjema et al., 2014; Kar et al., 2015) و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که استفاده از نمک کلرید کادمیم سبب افزایش گروه‌های فعال اکسیژن و در نتیجه تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت گیاه نخود شد. Monteiro و همکاران (۲۰۱۲) نیز گزارش کردند که در شرایط سمیت کادمیم، غلظت مالون دی‌آلدئید افزایش و عملکرد گیاه کاهو به شدت کاهش یافت. استفاده بیش از حد کودهای فسفره، پسماندهای صنعتی و مصرف لجن فاضلاب از منابع وارد کننده کادمیم به خاک هستند (ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۷، John et al., 2008). از بین این منابع، لجن فاضلاب از نظر زیست محیطی اهمیت زیادی دارد. غلظت به نسبت بالای کادمیم در لجن فاضلاب (به طور میانگین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تأثیر معنی‌داری بر کاهش رشد و عملکرد گیاه دارد (هوشیاری و بقایی، ۱۳۹۶). لجن فاضلاب علاوه بر کادمیم، دارای عناصر غذایی مفید برای گیاه از جمله روی نیز می‌باشد که غلظت روی تا ۱۹۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (حدود ۴۰۰ برابر کادمیم) نیز گزارش شده است. چنی و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که استفاده از غلظت‌های بالا و در حد سمیت روی در لجن سبب کاهش قابل توجه غلظت کادمیم در گیاه کاهو می‌شود. اخیراً در مطالعه دیگری نشان داده شد که در حضور روی غلظت کادمیم شاخساره گیاه

مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، آخرین مرحله چهار مرتبه تکرار شد. سپس به آن مقدار ۳ میلی‌لیتر اسید فسفریک یک درصد و یک میلی‌لیتر اسید تیوباری تیوریک ۰/۶ درصد افزوده و محلول برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش با سرد کردن سریع لوله‌ها در داخل یخ متوقف شد و مقدار جذب نور توسط محلول حاصل در طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج اندازه‌گیری گردید.

**ارزیابی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی:** ابتدا ۲/۴۲۳ گرم تریس در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با HCl غلیظ pH به ۷/۸ رسانده شد. محلول به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری و مجدداً pH آن بررسی گردید. سپس ۲۰ میلی‌لیتر گلیسرول اضافه و با آب مقطر به حجم ۲۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. به منظور استخراج عصاره آنزیمی ۰/۵ گرم نمونه ریشه و برگ پودر شده با ۵ میلی‌لیتر بافر استخراج مخلوط شد. مخلوط بدست آمده ورتکس و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و در نهایت فاز بالایی عصاره (سوپرناتانت) به عنوان عصاره آنزیمی جدا و برای سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز مورد استفاده قرار گرفت.

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) به شرح زیر اندازه‌گیری شد. مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره ریشه و برگ به سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷/۸)، ریبولافلین ۱/۳ میکرومولار، EDTA ۷۵ نانومولار، متیونین ۱۳ میلی‌مولار و نیترو بلوترازولیوم ۶۳ میکرومولار (NBT) اضافه گردید. مخلوط در شرایط نوری ۵۰۰۰ لوکس به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد و شدت جذب نور در طول موج ۵۶۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج قرائت شد (یک واحد استاندارد فعالیت SOD به عنوان مقداری از آنزیم که برای مهار ۵۰ درصد کاهش NBT نیاز است تعریف می‌شود).

**اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز:** برای سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از روش Scceba و همکاران (۱۹۹۸) استفاده شد.

همچنین شرایط مشابه خاک‌های کشاورزی بود. قبل از پرکردن گلدان‌های ۵ کیلوگرمی با خاک، مقدار ۱۰۰ تن در هکتار لجن با خاک به خوبی مخلوط شد. برای آماده کردن گلدان‌ها، ابتدا غلظت‌های مختلف کادمیم و روی به خوبی با لجن مخلوط و به مدت دو هفته در شرایط رطوبت و دمای مشخص قرار داده شدند. سپس معادل ۱۰۰ تن در هکتار لجن با خاک (تهیه شده از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری مزرعه کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهران) گلدان بخوبی مخلوط شدند. جهت مقایسه بهتر نتایج، سه گلدان بدون لجن فاضلاب و صرفاً با استفاده از خاک اولیه مورد استفاده در سایر گلدان‌ها تهیه و در آنها گیاه کاهو کشت شد. هدف از کشت این گلدان‌های بدون آلودگی کادمیم صرفاً مقایسه بهتر نتایج بود و نتایج آن در تجزیه آماری استفاده نشد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک (جدول ۱) و همچنین لجن فاضلاب (جدول ۲) مورد استفاده نیز توسط روش‌های مرسوم (Lindsay et al., 1978; Benton et al., 1990) اندازه‌گیری شد. همچنین با توجه به حد بحرانی عناصر غذایی خاک (ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۷) عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم به مقدار ۳۰۰، ۲۵۰ و ۱۸۰ کیلوگرم در هکتار استفاده شدند. آبیاری نیز هر سه روز یک مرتبه انجام شد سپس نشاهای کاهو در گلدان‌ها کشت شد. پس از گذشت ۹۰ روز ریشه و اندام‌های هوایی جدا و برای انجام آزمایش به آزمایشگاه منتقل شدند.

**وزن خشک اندام هوایی:** برای اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی پس از برداشت، گیاه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و وزن خشک اندام هوایی تعیین شد.

**غلظت مالون دی‌آلدئید (شاخص سنجش پراکسیداسیون لیپیدها):** برای اندازه‌گیری از روش Hagege و همکاران (۱۹۹۰) غلظت مالون دی‌آلدئید ریشه کاهو استفاده گردید. به طوریکه یک میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید به ۰/۵ گرم ریشه منجمد هموژنیزه اضافه و پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر استون به شدت مخلوط و با دور ۴۷۵۰ در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب کوچک حاصل از سانتریفیوژ با ۵ میلی‌لیتر استون شستشو و پس از ورتکس مجدداً با همان دور به

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک (۰-۳۰ cm) منطقه مورد آزمایش قبل از کشت

ویژگی	ویژگی
رسانایی الکتریکی (EC) ( $ds\ m^{-1}$ )	۳/۶
روی قابل جذب ( $mg\ kg^{-1}$ )	۰/۴۵
pH	۷/۲
کربنات کلسیم (%)	۵۳/۰
نیترژن کل (درصد)	۰/۲
کربن آلی ( $g\ kg^{-1}$ )	۷/۶
فسفر ( $mg\ kg^{-1}$ )	۱۴/۰
پتاسیم ( $mg\ kg^{-1}$ )	۳۱۰/۰
سیلتی لوم	بافت
روی (میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۷
آهن (میلی گرم بر کیلوگرم)	۲/۰
منگنز (میلی گرم بر کیلوگرم)	۸/۰
مس (میلی گرم بر کیلوگرم)	۰/۵
کادمیم (میلی گرم بر کیلوگرم)	< ۰/۰۲

جدول ۲- برخی ویژگی‌های شیمیایی لجن مورد استفاده در آزمایش

ویژگی	ویژگی
رسانایی الکتریکی (EC) ( $ds\ m^{-1}$ )	۱۸/۰
pH	۷/۳
ماده آلی (%)	۳۱/۰
نیترژن کل (%)	۸/۰
آهن ( $mg\ kg^{-1}$ )	۹۰۰۰/۰
روی ( $mg\ kg^{-1}$ )	۸۸۲/۰
منگنز ( $mg\ kg^{-1}$ )	۱۳۵/۰
کادمیم ( $mg\ kg^{-1}$ )	۰/۰۱
مس ( $mg\ kg^{-1}$ )	۷۴/۰۰

هیدروژن و توسط آنزیم آسکوربات پراکسیداز انجام می‌شود. **اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز:** برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز از روش Maethly (۱۹۵۴) استفاده شد. کوت شاهد دارای سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH= ۷) و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ و سه میکرولیتر محلول گایوکل ۰/۲ مولار و کوت نمونه دارای سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH= ۷) و ۱۰ میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪، سه میکرو لیتر محلول گایوکل ۰/۲ مولار و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. شدت جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج تعیین شد.

**اندازه‌گیری غلظت کادمیم در برگ کاهو:** به منظور اندازه گیری غلظت کادمیم، پس از خشک و آسیاب کردن برگ‌ها، یک گرم از پودر آن در لوله هضم ریخته و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۱:۱ به آن اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۹۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس ۵ میلی لیتر اسید نیتریک ۱:۱ به آن اضافه نموده و مجدداً به مدت ۳۰

کوت شاهد دارای سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار (pH= ۷) و پنج میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ و کوت نمونه دارای سه میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۰۵ مولار، پنج میکرولیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ و ۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی بود. مقدار فعالیت در طول موج ۲۴۰ نانومتر توسط دستگاه طیف سنج تعیین شد. **اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز:** آنزیم آسکوربات پراکسیداز به روش Asada و Nakano (۱۹۸۷) اندازه‌گیری شد. سه میلی‌لیتر مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH= ۷) شامل EDTA ۰/۱ میلی مولار و آسکوربات سدیم ۰/۱ میلی‌مولار، ۲۰۰ میکرولیتر آب اکسیژنه و ۱۰۰ میکرولیتر عصاره حاوی آنزیم بود. پس از اضافه کردن عصاره آنزیمی مخلوط واکنش تکان داده و بلافاصله شدت کاهش جذب نوری مخلوط واکنش در طول موج ۲۹۰ نانومتر به مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه طیف‌سنج قرائت شد. لازم به ذکر است نحوه فعالیت آنزیم براساس تبدیل آسکوربات به منو هیدرو آسکوربات در حضور پراکسید

مقدار عملکرد خشک شاخساره کاهش یافت (شکل ۱).

**غلظت کادمیم شاخساره:** با توجه به نتایج، با افزایش غلظت کادمیم محیط از ۰/۷۵ به ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، غلظت کادمیم شاخساره افزایش یافت (جدول ۴). به‌طوریکه در سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم کادمیم بر کیلوگرم لجن، غلظت کادمیم شاخساره در مقایسه با سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور متوسط ۷۴ درصد افزایش یافت (جدول ۴). در هر سطح کادمیم نیز با افزایش غلظت روی از ۳۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، غلظت کادمیم شاخساره کاهش یافت. به‌طوریکه در سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم که از نظر زیست محیطی اهمیت بیشتری دارد، با افزایش غلظت روی به ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، غلظت کادمیم ۵۸ درصد کاهش یافت (شکل ۲).

**غلظت مالون دی‌آلدئید ریشه:** غلظت مالون دی‌آلدئید با افزایش سطوح کادمیم به میزان ۹۲ درصد افزایش یافت که این افزایش معنی دار بود (جدول ۴). همچنین تأثیر سطوح مختلف روی بر غلظت مالون دی‌آلدئید به گونه‌ای بود که با افزایش غلظت روی در هر سطح کادمیم، غلظت مالون دی‌آلدئید کاهش یافت. به عنوان مثال در سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم افزایش غلظت روی از ۳۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سبب کاهش معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدئید شد (شکل ۳).

**فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز:** نتایج نشان داد با افزایش غلظت کادمیم محیط از ۰/۷۵ به ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ریشه و شاخساره افزایش یافت (جدول ۴). تأثیر کادمیم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز ریشه در مقایسه با شاخساره بیشتر بود. به‌طوریکه با افزایش غلظت کادمیم از ۰/۷۵ تا ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در ریشه ۴۵ واحد استاندارد در میلی‌گرم پروتئین افزایش یافت و این افزایش در شاخساره ۲۸ واحد استاندارد در میلی‌گرم پروتئین بود. با افزایش غلظت روی در هر سطح کادمیم به جز سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت این آنزیم هم در ریشه و هم در شاخساره کاهش یافت. به عنوان مثال در سطح ۱/۵

دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس حرارت داده شد تا حجم محلول حاصل به ۵ میلی‌لیتر کاهش یابد. سپس ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳۰٪ به آن اضافه شد. پس از پایان مراحل هضم، ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک غلیظ به آن اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه بدون جوشش حرارت داده شد. با سرد شدن بالن، عصاره حاصل را از کاغذ صافی واتمن ۴۲ عبور داده و غلظت کادمیم در عصاره صاف شده توسط دستگاه جذب اتمی مدل پریکل المر قرائت گردید (Soon and Abbud, 1993).

**تجزیه آماری:** داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS (Ver. 9.0) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون LSD و در سطح ۵ درصد انجام و نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

## نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۳) نشان داد که اثرهای اصلی کادمیم و روی و اثر متقابل این دو در صفت مربوط به غلظت کادمیم شاخساره در سطح یک درصد معنی دار بود. همچنین در صفات مربوط به آنزیم‌های آنتی اکسیداتی نیز اثرهای اصلی کادمیم و روی از نظر آماری معنی‌دار بودند و اثر متقابل آنها تنها در صفت مربوط به آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شاخساره و پراکسیداز در ریشه در سطح یک درصد معنی دار بود و در سایر صفات معنی دار نبود.

**وزن خشک شاخساره:** نتایج نشان داد که با افزایش غلظت کادمیم محیط وزن خشک شاخساره کاهش یافت (جدول ۴). به‌طوریکه با افزایش غلظت کادمیم محیط از ۰/۷۵ تا ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به طور متوسط (صرف نظر از غلظت روی)، وزن خشک شاخساره ۲۴ درصد کاهش یافت. نتایج همچنین نشان داد که با افزایش غلظت روی در هر سطح کادمیم وزن خشک شاخساره به طور کلی افزایش یافت هر چند در سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم با افزایش غلظت روی از ۳۰ تا ۱۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن خشک شاخساره افزایش و با رسیدن غلظت روی محیط به ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم

جدول ۳- تجزیه واریانس سطوح مختلف کادمیم و روی بر صفات مورد مطالعه

سوپراکسیددیسموتاز		مالون دی آلدئید		وزن خشک شاخساره		غلظت کادمیم	
شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	کادمیم
۱۸۹۰**	۷۴۹۴**	۲۰۸**	۲۰۸**	۵/۹۷**	۵/۹۷**	۶۹۳**	کادمیم
۵۴۶**	۲۶۷**	۱۶/۲**	۱۶/۲**	۱/۸۲**	۱/۸۲**	۶۰**	روی
۱۷۹**	۸۶ <sup>ns</sup>	۳/۲ <sup>ns</sup>	۳/۲ <sup>ns</sup>	۲/۶۷**	۲/۶۷**	۲۱**	کادمیم * روی
۱۵	۵۱	۱/۹	۱/۹	۰/۲۵	۰/۲۵	۶/۳	خطا
۱۸	۱۹	۹	۹	۱۱	۱۱	۲۰	ضریب تغییرات

ns - غیرمعنی دار، \*\* معنی دار در سطح ۱ درصد و \* معنی دار در سطح ۵ درصد

ادامه جدول ۳-

پراکسیداز		آسکوربات پراکسیداز		کاتالاز		کادمیم	
شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	کادمیم
۱۵۳**	۱۰۶۶۷**	۱۰۰**	۱۳۴**	۷۷۹**	۱۰۸۸**	۷۷۹**	کادمیم
۱/۱*	۴۶۴**	۲۷**	۶/۴*	۲۲/۱۴*	۱۲۹**	۲۲/۱۴*	روی
۰/۳۱ <sup>ns</sup>	۲۰۳**	۲/۹*	۰/۵۳ <sup>ns</sup>	۱۱ <sup>ns</sup>	۲۳ <sup>ns</sup>	۱۱ <sup>ns</sup>	کادمیم * روی
۰/۴	۳۸	۱/۳	۱/۶	۵/۸	۱۴	۵/۸	خطا
۱۸	۱۷	۱۸	۱۷	۱۹/۸	۲۷	۱۹/۸	ضریب تغییرات

ns - غیرمعنی دار، \*\* معنی دار در سطح ۱ درصد و \* معنی دار در سطح ۵ درصد

کیلوگرم، فعالیت این آنزیم به طور متوسط ۷۲ درصد افزایش یافت در حالیکه برخلاف انتظار با افزایش غلظت کادمیم از ۱/۵ تا ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت این آنزیم ۴۷ درصد کاهش یافت (شکل ۵).

**فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز:** با توجه به نتایج، با افزایش غلظت کادمیم محیط، فعالیت آنزیم آسکوربیک پراکسیداز ریشه و شاخساره افزایش یافت (جدول ۴). به طوریکه بیشترین فعالیت آنزیم در سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم بدست آمد. افزایش غلظت روی در سطوح مختلف کادمیم لجن به جز سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، سبب کاهش فعالیت این آنزیم در ریشه و شاخساره شد. به عنوان مثال با افزایش غلظت روی تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم در سطح ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت آنزیم در ریشه و شاخساره به ترتیب ۲۷ و ۳۳ درصد کاهش یافت (شکل ۶).

میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم، با افزایش غلظت روی از ۳۰ تا ۱۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت این آنزیم در ریشه و شاخساره به ترتیب ۴۰ و ۶۶ درصد کاهش یافت (شکل ۴).

**فعالیت آنزیم کاتالاز:** با توجه به نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم کاتالاز هم در ریشه و هم در شاخساره تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیم قرار گرفت (جدول ۴). به طوریکه با افزایش غلظت کادمیم محیط از ۰/۷۵ به ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم، فعالیت این آنزیم در ریشه افزایش معنی‌داری داشت. در سطح ۱/۵ و ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم، با افزایش غلظت روی، فعالیت آنزیم کاهش یافت. همچنین در سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم افزایش غلظت روی تأثیری بر فعالیت آنزیم کاتالاز نداشت. تأثیر سطوح مختلف کادمیم بر فعالیت کاتالاز شاخساره متفاوت از ریشه بود. به‌طوریکه با افزایش غلظت کادمیم محیط از ۰/۷۵ تا ۱/۵ میلی‌گرم بر

جدول ۴- اثر ساده کادمیم و روی بر غلظت کادمیم شاخساره و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیداتیو

سوپراکسیددیسموتاز U <sub>SOD</sub> mg <sup>-1</sup> Protien		مالون دی آلدئید nmol g <sup>-1</sup> FW	وزن خشک شاخساره g	غلظت کادمیم mg kg <sup>-1</sup>	کادمیم
شاخساره	ریشه	ریشه		شاخساره	
۷/۸ <sup>a</sup>	۳۸ <sup>a</sup>	۱۰/۳ <sup>c</sup>	۴/۸۸ <sup>a</sup>	۴/۸ <sup>c</sup>	۰/۷۵
۲۰ <sup>b</sup>	۳۹ <sup>a</sup>	۱۲/۵ <sup>b</sup>	۴/۷ <sup>a</sup>	۹/۸ <sup>b</sup>	۱/۵
۳۶ <sup>c</sup>	۳۵ <sup>a</sup>	۲۰ <sup>a</sup>	۳/۷ <sup>b</sup>	۱۸/۳ <sup>a</sup>	۳
روی					
۲۸/۳ <sup>a</sup>	۳۷ <sup>ab</sup>	۱۵/۵ <sup>a</sup>	۴/۱ <sup>c</sup>	۱۴/۴۳ <sup>a</sup>	۳۰
۲۵ <sup>a</sup>	۳۹/۱ <sup>ab</sup>	۱۵/۳ <sup>a</sup>	۴/۳۴ <sup>bc</sup>	۱۰/۹ <sup>b</sup>	۶۰
۲۱ <sup>b</sup>	۴۲ <sup>a</sup>	۱۴/۱ <sup>ab</sup>	۴/۱ <sup>c</sup>	۱۰/۹ <sup>b</sup>	۹۰
۱۸ <sup>b</sup>	۳۴ <sup>b</sup>	۱۳/۵ <sup>bc</sup>	۴/۷ <sup>ab</sup>	۱۱/۳ <sup>b</sup>	۱۲۰
۱۴ <sup>c</sup>	۳۶ <sup>ab</sup>	۱۲/۳ <sup>c</sup>	۵/۲ <sup>a</sup>	۷/۱ <sup>c</sup>	۱۵۰

\* در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد و آزمون LSD می‌باشد.

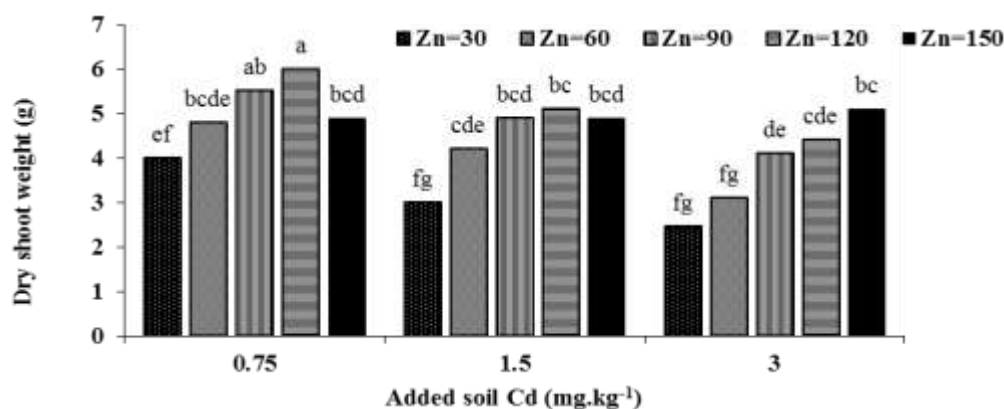
ادامه جدول ۴ -

پراکسیداز nmol S <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Protein		آسکوربات پراکسیداز nmol S <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Protein		کاتالاز nmol S <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> Protein		کادمیم
شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	شاخساره	ریشه	
۰/۹۴ <sup>c</sup>	۹/۵ <sup>c</sup>	۳/۵ <sup>c</sup>	۴/۴ <sup>c</sup>	۵/۷ <sup>c</sup>	۴/۸ <sup>c</sup>	۰/۷۵
۲/۶ <sup>b</sup>	۳۷ <sup>b</sup>	۶/۵ <sup>b</sup>	۷/۷ <sup>b</sup>	۱۹/۹ <sup>a</sup>	۱۳/۵ <sup>b</sup>	۱/۵
۷/۱ <sup>a</sup>	۶۳ <sup>a</sup>	۸/۷ <sup>a</sup>	۱۰/۴ <sup>a</sup>	۱۰/۷ <sup>b</sup>	۲۲ <sup>a</sup>	۳
روی						
۳/۲ <sup>b</sup>	۴۳ <sup>a</sup>	۸/۸ <sup>a</sup>	۸/۵ <sup>a</sup>	۱۳/۶ <sup>a</sup>	۱۸/۲ <sup>a</sup>	۳۰
۳/۳ <sup>b</sup>	۴۱/۷ <sup>a</sup>	۶/۸ <sup>b</sup>	۸ <sup>ab</sup>	۱۳ <sup>a</sup>	۱۶/۱ <sup>ab</sup>	۶۰
۳/۲۷ <sup>b</sup>	۳۹/۸ <sup>a</sup>	۶/۱ <sup>bc</sup>	۷/۶ <sup>abc</sup>	۱۱/۷ <sup>ab</sup>	۱۳/۱ <sup>bc</sup>	۹۰
۳/۹ <sup>a</sup>	۳۱/۱ <sup>b</sup>	۵/۴ <sup>c</sup>	۶/۸ <sup>bc</sup>	۱۲/۷ <sup>a</sup>	۱۰/۵ <sup>cd</sup>	۱۲۰
۳/۹ <sup>a</sup>	۲۷ <sup>b</sup>	۴/۱ <sup>d</sup>	۶/۴ <sup>c</sup>	۹/۶ <sup>b</sup>	۹/۱ <sup>d</sup>	۱۵۰

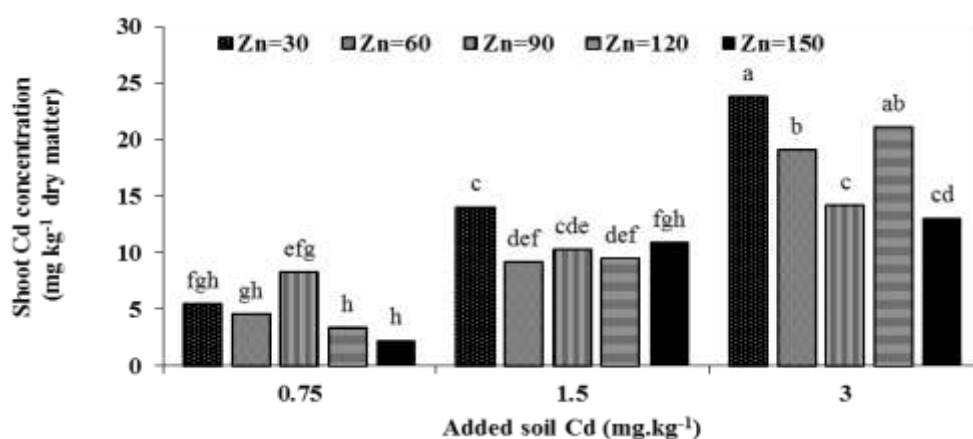
\* در هر ستون حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد و آزمون LSD می‌باشد

سبب تغییر فعالیت این آنزیم شد که در ریشه این تغییر تنها در سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم معنی‌دار بود. در شاخساره نیز روند تغییرات فعالیت آنزیم مشابه ریشه بود و افزایش غلظت روی تنها در سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم سبب کاهش معنی‌دار (۲۴ درصد) فعالیت این آنزیم شد (شکل ۷).

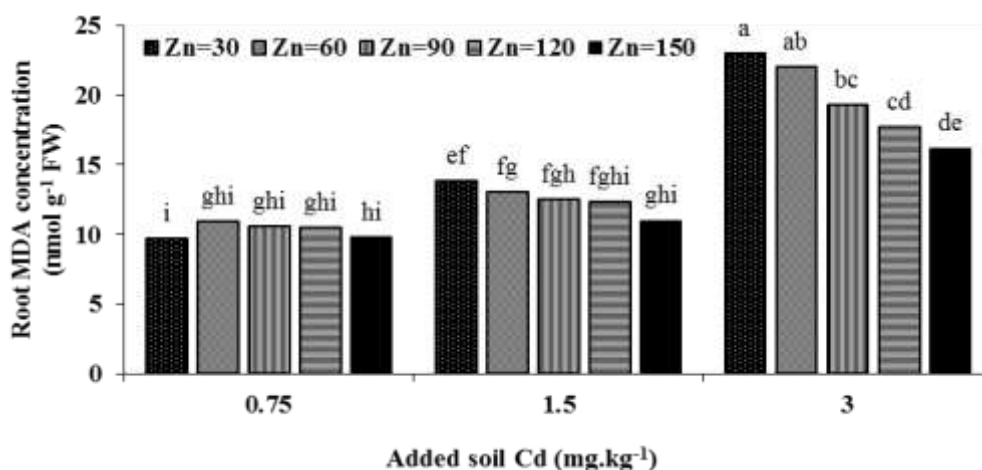
فعالیت آنزیم پراکسیداز: با افزایش غلظت کادمیم محیط از ۰/۷۵ تا ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت این آنزیم در ریشه و شاخساره افزایش یافت (جدول ۴). بیشترین فعالیت این آنزیم در ریشه و شاخساره در غلظت ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم مشاهده شد. افزایش غلظت روی در سطوح مختلف کادمیم



شکل ۱- برهمکنش روی و کادمیم بر وزن خشک شاخساره. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.



شکل ۲- برهمکنش روی و کادمیم بر غلظت کادمیم در برگ. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.



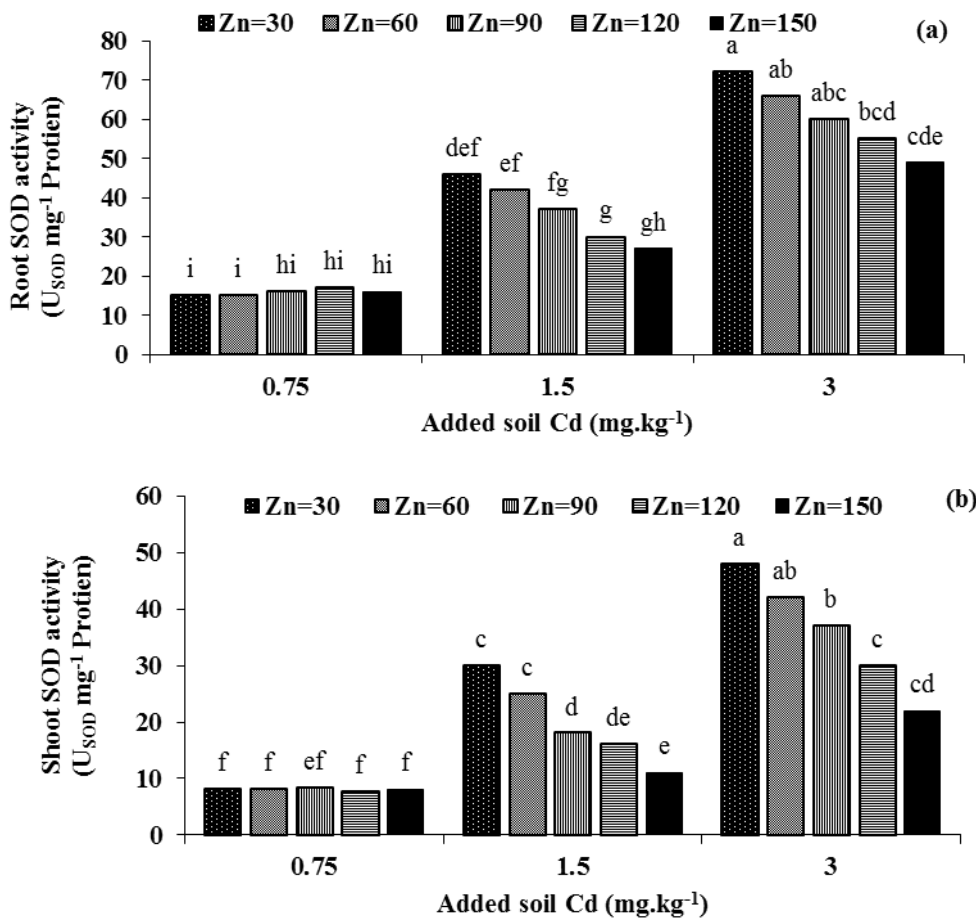
شکل ۳- برهمکنش روی و کادمیم بر غلظت مالون دی‌آلدئید در ریشه. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.

کشاورزی آلوده به غلظت بالای این فلز به‌ویژه در خاک‌هایی که از لجن فاضلاب حاوی غلظت بالای کادمیم استفاده شده

بحث  
خطر انباشتگی کادمیم در گیاهان خوراکی رشد کرده در اراضی

بحث

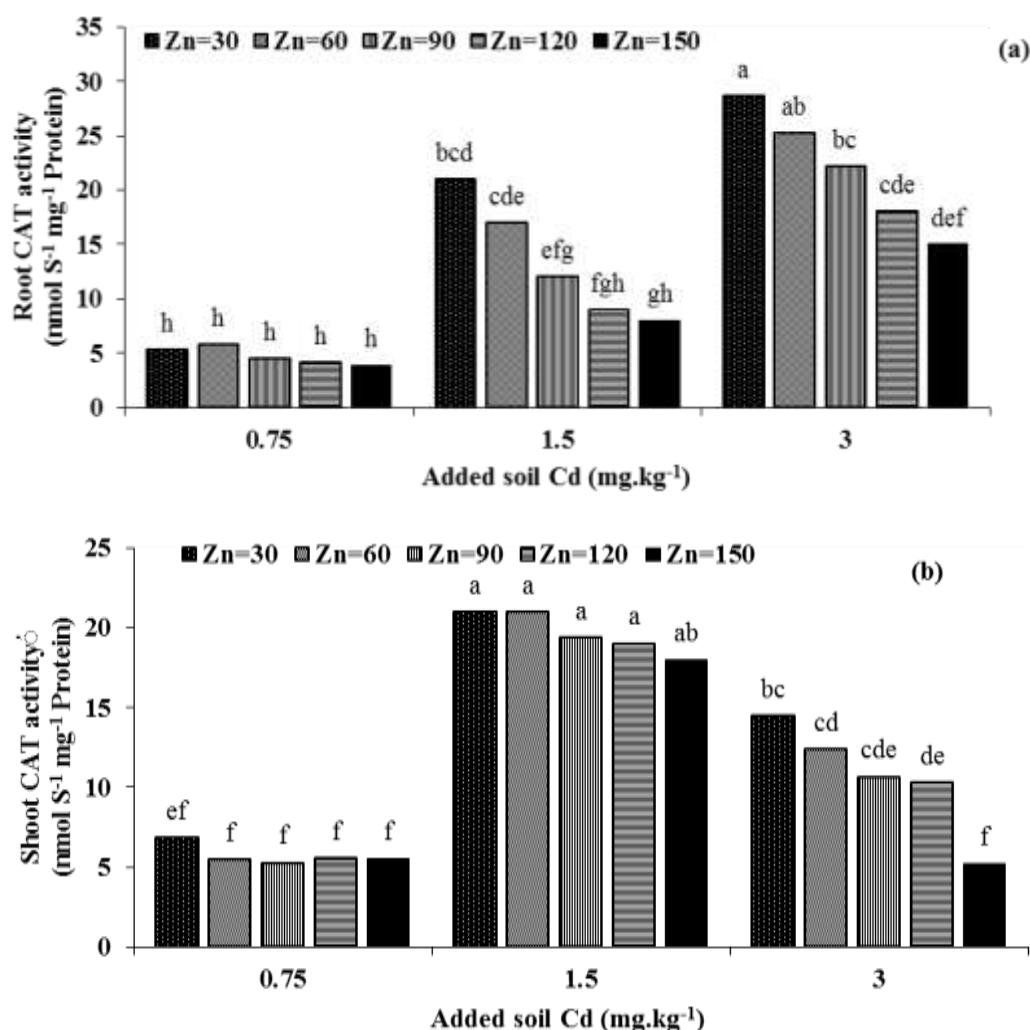




شکل ۴- برهمکنش روی و کادمیم بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در (a) ریشه و (b) برگ. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.

باشد، از اهمیت بالایی برخوردار است. به طوریکه کادمیم به دلیل اختلالات فیزیولوژیکی از قبیل کاهش میزان کلروفیل و نرخ فتوسنتز می‌تواند سبب کاهش عملکرد گیاه نیز شود که به نظر می‌رسد کاهش عملکرد خشک گیاه با افزایش غلظت کادمیم در مطالعه حاضر به این دلایل باشد. غلظت بالای کادمیم در گیاه علاوه بر خطر برای مصرف کننده، با تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن سبب ایجاد تنش اکسیداتیو در گیاه می‌شود که به دنبال آن رشد گیاه تحت تاثیر قرار می‌گیرد. یکی از مهمترین عوامل مؤثر در کاهش جذب کادمیم و در نتیجه کاهش اثرهای زیان‌بار آن در گیاه، فلز روی می‌باشد (Chaney *et al.*, 2001). در غلظت‌های بالای روی (نزدیک سمیت)، کادمیم جذب شده توسط گیاه به کمتر از حد توصیه شده توسط مؤسسات بین المللی (CODEX) کاهش یافته است این دو یون در جذب و انتقال با یکدیگر رقابت کرده و به

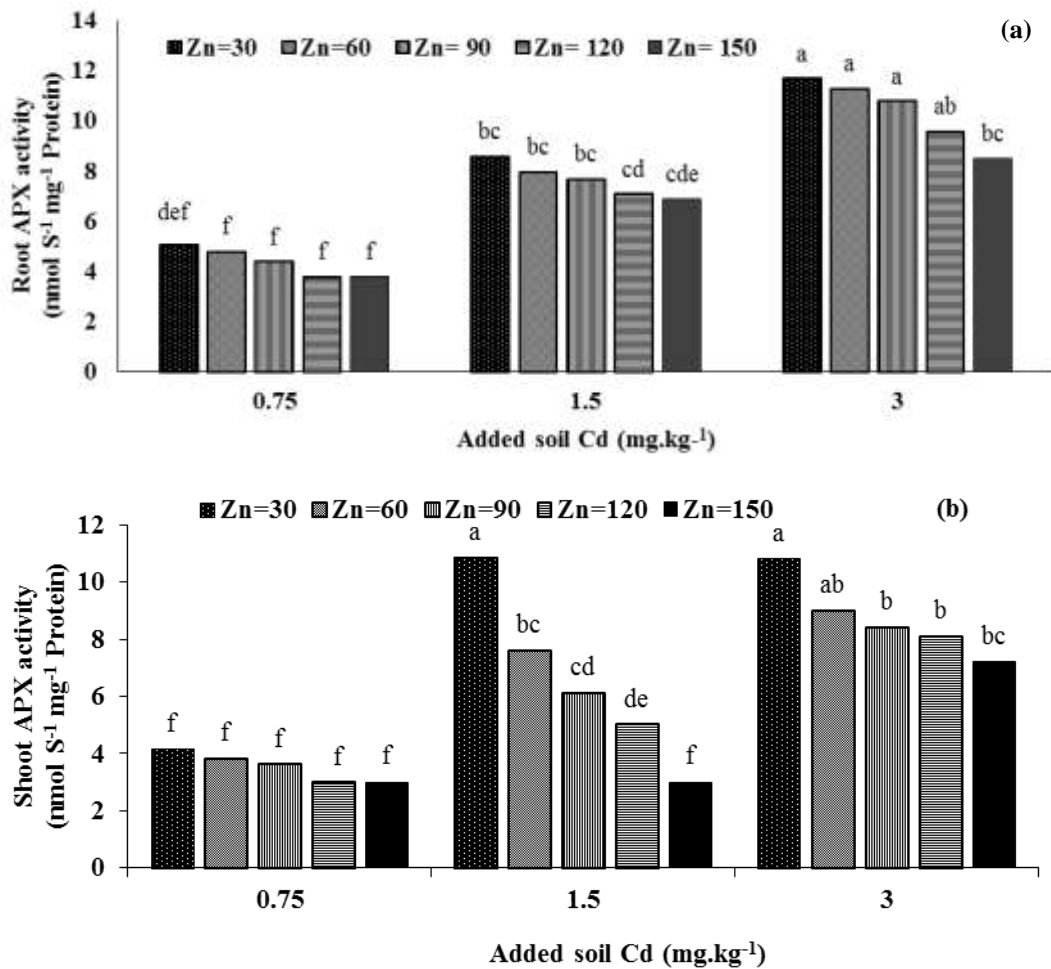
نشان داد که افزایش غلظت روی در لجن با کاهش انباشت کادمیم در شاخساره کاهو همراه بود. مطالعات مختلفی درباره تاثیر مثبت روی در کاهش غلظت کادمیم گیاه انجام شده است. گرین و همکاران (۲۰۰۳) گزارش کردند که با افزایش غلظت روی، انتقال و انباشتگی کادمیم در اندام هوایی گندم کاهش یافت. نتایج مطالعات دیگر با ذرت (Sadana *et al.*, 1989)، جو (Wu and Zhang, 2002) و گوجه فرنگی (Cherif *et al.*, 2011) نیز نشان دادند که افزودن روی به خاک، جذب و انتقال کادمیم به اندام هوایی و در نتیجه غلظت آن در بخش خوراکی گیاه را کاهش می‌دهد. با توجه به شباهت شیمیایی روی و کادمیم در جذب توسط ریشه گیاه (Moustakas *et al.*, 2011)، این دو یون در جذب و انتقال با یکدیگر رقابت کرده و به



شکل ۵- برهمکنش روی و کادمیم بر فعالیت آنزیم کاتالاز در (a) ریشه و (b) برگ. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.

غلظت ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم در لجن، تاثیر معنی‌داری بر غلظت مالون دی‌آلدئید نداشت. با توجه به نقش کلیدی غشاهای زیستی در ریشه بعنوان اولین جزء سلول در تماس با کادمیم و همچنین نقش مهم آنها در تنظیم متابولیسم سلول و اندامک‌ها، شدت آسیب به غشاهای زیستی در شرایط سمیت کادمیم اهمیت بالایی دارد (Monteiro *et al.*, 2012). عدم تغییر معنی‌دار غلظت مالون دی‌آلدئید در سطح ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم و سطوح مختلف روی مورد مطالعه که از نظر زیست محیطی اهمیت دارد، نشان‌دهنده عدم ایجاد خسارت به غشاهای زیستی در حضور کادمیم در این غلظت از کادمیم است. در حالیکه افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید ریشه در سطوح بالاتر کادمیم لجن بیانگر این است که

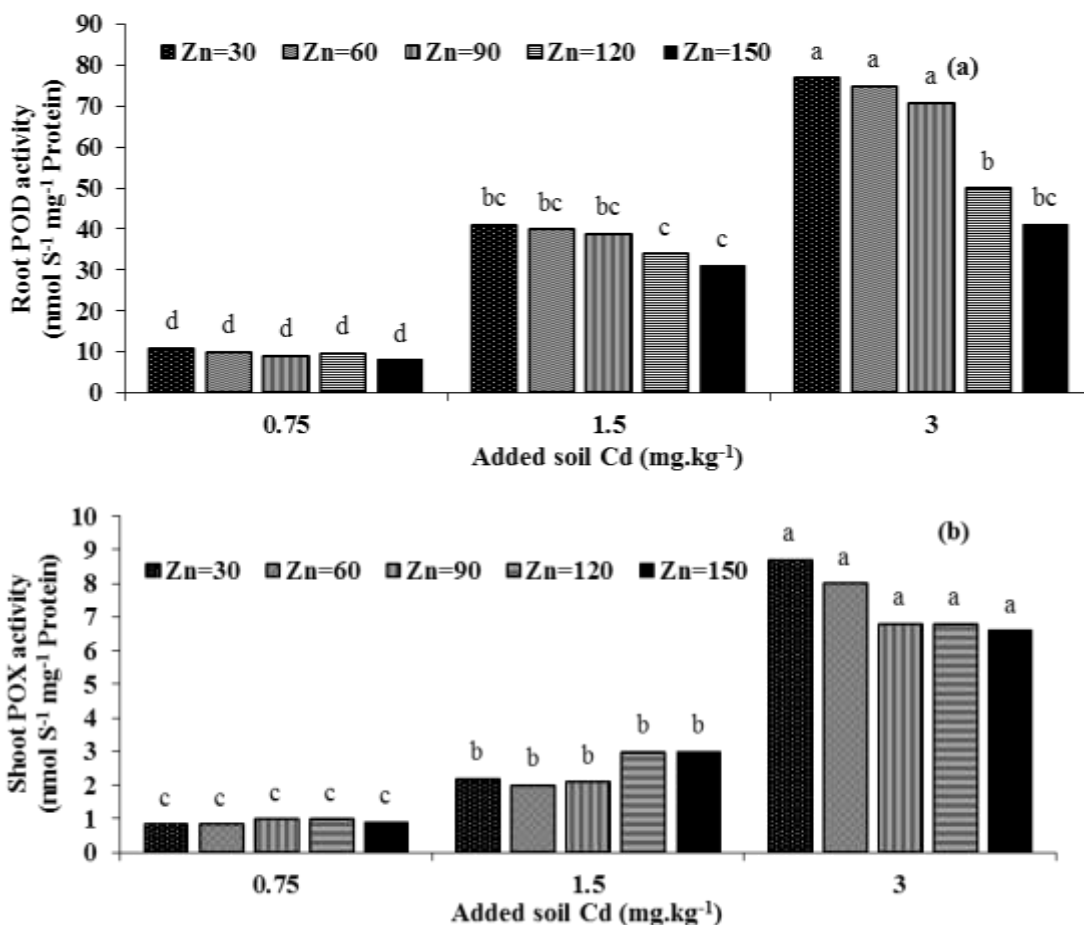
دنبال آن، روی سبب کاهش غلظت کادمیم در گیاه شده است. کادمیم در گیاه با ایجاد سوپر اکسیدها ( $O_2^{\cdot-}$ )، هیدروژن پراکسید ( $H_2O_2$ )، رادیکال هیدروژن ( $HO^{\cdot}$ ) و اکسیژن منفرد ( $O^{\cdot-}$ ) سبب ایجاد خسارت اکسیداتیو در گیاه می‌گردد (Luis *et al.*, 1992). این گروه‌های فعال از طریق حمله سریع به مولکول‌های زیستی نظیر نوکلئیک اسید، پروتئین‌ها، لیپیدها و آمینواسیدها سبب اختلال در فعالیت‌های متابولیکی و در نهایت مرگ سلولی می‌شوند (Rayburn *et al.*, 2002). با توجه به نتایج بدست آمده، از مطالعه حاضر به طور کلی با افزایش غلظت کادمیم در محیط به بالاتر از ۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم، شدت پراکسیداسیون چربی در ریشه به عنوان مهمترین اندام گیاه که در تماس با کادمیم است، افزایش یافت. به‌طوریکه



شکل ۶- برهمکنش روی و کادمیم بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در (a) ریشه و (b) برگ. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.

پروتئین‌ها موجب تخریب کانال‌های یونی و افزایش نشت یونی می‌گردد (Chen *et al.*, 2007). مطالعات متعدد گزارش کردند که با افزایش پراکسیداسیون چربی در ریشه، نشت یونی نیز افزایش یافته است (Monteiro *et al.*, 2012). به نظر می‌رسد با توجه به تمایل روی به لیگاندهای حاوی گوگرد و همچنین نقش روی در افزایش سنتز فیتوکلاتین‌ها در سلول، کادمیم به مکان غیرفعال ریشه منتقل شده و به دنبال آن شدت خسارت به غشاهای سلولی کاهش می‌یابد. Hassn و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند که در حضور روی مقدار مالون دی‌آلدئید به شدت کاهش یافت که نشان از تأثیر مثبت روی در محافظت از گیاه در مقابل گونه‌های فعال اکسیژن دارد. فعال شدن بیش از ۷۰ نوع آنزیم آنتی‌اکسیدانت در حضور روی و

کادمیم در گیاه تنش اکسیداتیو را القا کرده است. کادمیم به دلیل خصوصیات شیمیایی، نمی‌تواند به صورت مستقیم با اکسیژن واکنش دهد. بنابراین، کادمیم با تأثیر بر واکنش‌های متابولیکی گیاه می‌تواند به صورت غیرمستقیم سبب ایجاد تنش اکسیداتیو شود. مطالعات مختلف نیز نتایج مشابهی درباره افزایش غلظت مالون دی‌آلدئید با افزایش غلظت کادمیم گزارش کردند (Tkalec *et al.*, 2014). افزایش مالون دی‌آلدئید با افزودن کادمیم نشان‌دهنده آسیب‌رسانی این فلز به غشای سلولی است. مالون دی‌آلدئید می‌تواند با اتصال به پروتئین‌های غشا و آنزیم‌ها منجر به آسیب به ساختار و عملکرد غشا شود. از طرفی، کادمیم تمایل بالایی برای اتصال به لیگاندهای حاوی گوگرد مانند پروتئین‌ها دارد. کادمیم با تشکیل پیوند با



شکل ۷- برهمکنش روی و کادمیم بر فعالیت آنزیم پراکسیداز در (a) ریشه و (b) برگ. ستون‌های با حروف مشترک اختلاف معنی‌داری از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد ندارند.

فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه نداشت که می‌تواند ناشی عدم ایجاد تنش در این سطح از کادمیم در گیاه باشد. با توجه به نتایج بدست آمده، فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با افزایش غلظت کادمیم در ریشه و شاخساره افزایش یافت که این افزایش تحت تأثیر غلظت روی در محیط قرار گرفت. به طور کلی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانت بسته به مدت و نوع تنش، گونه گیاهی و اندام گیاه متفاوت است (Dinakar *et al.*, 2009). مطالعات نشان داده است که در شرایط تنش کادمیم، تغذیه روی، گیاه را در برابر تنش کادمیم مقاوم می‌کند. از طرفی گزارش شده است که در حضور روی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش کاهش می‌یابد (Chaoui *et al.*, 1997). به نظر می‌رسد یکی از دلایل کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در گیاه با افزایش غلظت روی، نقش مفید این عنصر در کاهش جذب و انتقال کادمیم به

همچنین نقش مستقیم آن در کاهش غلظت کادمیم می‌تواند یکی از مهمترین دلایل کاهش یافتن شدت پراکسیداسیون چربی در حضور روی باشد (ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۷).

در پاسخ به تنش اکسیداتیو ایجاد شده در نتیجه سمیت کادمیم، گیاهان سیستم‌های دفاعی را جهت کاهش رادیکال‌های آزاد و جلوگیری از واکنش‌های اکسیداتیو مخرب‌زا بکار می‌برند. یکی از مهمترین مکانیسم‌ها به منظور کاهش سمیت کادمیم، تحریک آنزیم‌های مؤثر در کاهش تنش ناشی از کادمیم شامل سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و پراکسیدازها است (Kovacik *et al.*, 2008). البته پاسخ این آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی به کادمیم در بین گونه‌ها و حتی اندام‌های مختلف یک گیاه متفاوت است. نتایج این مطالعه نشان داد که در سطح پایین کادمیم در خاک (۰/۷۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، افزایش غلظت روی، تغییر قابل ملاحظه‌ای در

مختلافی دربارۀ تأثیر کادمیم بر فعالیت کاتالاز بیان کردند (Ferreira *et al.*, 2002; Fornazier *et al.*, 2002). در برخی مطالعات با افزایش غلظت کادمیم فعالیت این آنزیم افزایش یافت (Mittler, 2002) و در برخی نیز کاهش (Vitora *et al.*, 2001) یافت. با توجه به نقش مهم آنزیم کاتالاز در شکستن پراکسید هیدروژن ناشی از فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، در شرایط تنش کادمیم، بالا رفتن فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز به‌تنهایی نمی‌تواند از گیاه در برابر سمیت رادیکال‌های اکسیژن حفاظت کند و افزایش فعالیت دیگر آنزیم‌ها در سمیت‌زدایی پراکسید هیدروژن نیاز است. آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز به‌عنوان یک آنزیم جارو کننده پراکسید هیدروژن مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت کادمیم در محیط، به‌طور کلی فعالیت این آنزیم‌ها افزایش یافت هر چند شدت افزایش فعالیت این آنزیم‌ها به اندازه سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز نبود. افزایش فعالیت کاتالاز در گیاهان تیمار شده با کادمیم در واقع نقش کلیدی در پاسخ به افزایش غلظت پراکسید هیدروژن است. این آنزیم‌ها عمدتاً در کلروپلاست، سیتوزول و دیگر اندامک‌های داخل سلول تولید می‌شود و برای حفظ حالت رداکس سلول‌ها مورد نیاز است (بارنده و کاوسی، ۱۳۹۵). آنزیم آسکوربات پراکسیداز از آسکوربات به‌عنوان عامل احیا کننده استفاده می‌کند و پراکسید هیدروژن را از طریق چرخه‌ی آسکوربات- گلوکاتینون تجزیه می‌نماید. در این چرخه با فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، آسکوربات به مونودیهیدروآسکوربات اکسید می‌شود و برای ادامه چرخه تولید دوباره آسکوربات لازم است. به همین منظور در این چرخه آنزیم‌های مونودیهیدروآسکوربات ردوکتاز، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و گلوکاتینون ردوکتاز فعالیت می‌کنند و با استفاده از NAD(P)H و گلوکاتینون، آسکوربات را احیا می‌کنند (Mittler, 2002). افزایش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز و پراکسیداز در سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم در شاخساره، قابل انتظار است تا افزایش تولید پراکسید هیدروژن توسط آنزیم سوپراکسید دیسموتاز کم و

اندام هوایی باشد. بنابراین می‌توان گفت که در حضور روی سطح تنش توسط کادمیم کاهش می‌یابد. با توجه به نتایج بدست آمده، تغییرات در فعالیت آنزیم کاتالاز در ریشه و شاخساره تا حدودی متفاوت بود. به‌طوریکه در ریشه با افزایش غلظت کادمیم محیط، مقدار فعالیت آنزیم افزایش یافت در حالیکه در شاخساره با افزایش غلظت کادمیم از ۰/۷۵ به ۱/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، فعالیت این آنزیم افزایش و با رسیدن غلظت کادمیم محیط به ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم فعالیت آن کاهش یافت، که این کاهش فعالیت قابل انتظار نبود. همچنین با افزایش غلظت روی در هر سطح کادمیم، فعالیت این آنزیم کاهش یافت. افزایش بیش از حد سطح پراکسید هیدروژن و در نتیجه خسارت اکسیداتیو در پروتئین‌ها و چربی می‌تواند از جمله دلایل کاهش فعالیت کاتالاز در سطح ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم کادمیم باشد. همچنین با واکنش شدید پراکسید هیدروژن با چربی‌ها و سیستمین، علاوه بر پراکسید هیدروژن، دیگر گونه‌های فعال اکسیژن که با لیپید و DNA واکنش می‌دهند، نیز ممکن است افزایش یابد. در این شرایط ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی گیاه برای مقابله با تنش کاهش می‌یابد. همچنین گزارش شده است که در شرایط تنش طبق تئوری "self-amplifying feedback loop" پراکسید هیدروژن سبب تولید بیشتر سالیسیلیک اسید می‌گردد. سالیسیلیک اسید با متصل شدن به آنزیم کاتالاز فعالیت آن را کاهش می‌دهد (Rao *et al.*, 1997). لذا به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌های مشابهی در این مطالعه سبب کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظت بالای کادمیم شده باشند. در مقابل، در ریشه‌ها فعالیت آنزیم کاتالاز بر خلاف برگ‌ها افزایش یافت که علیرغم ارتباط مستقیم ریشه‌ها با کادمیم می‌توان گفت که ریشه‌ها دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانتی کارتری در مقایسه با شاخساره هستند. با توجه به سیستم‌های دفاعی ریشه در مقابله با فلزات سنگین نظیر نگهداری بیشتر این فلزات در دیواره سلولی، انتقال آنها به درون اندامک‌های غیر فعال نظیر واکوئل‌ها و همچنین دفع این فلزات به خارج از ریشه، شدت اکسایش مولکول‌های زیستی در ریشه می‌تواند تا حدی تعدیل گردد. به‌طور کلی مطالعات مختلف نتایج

ارزیابی خطر ناشی از کادمیم برای گیاه نیست و غلظت روی در لجن تعیین کننده است. نتایج این مطالعه بخوبی نشان داد که غلظت بالای روی در لجن فاضلاب می تواند تنش ناشی از کادمیم در گیاه را کاهش دهد. با توجه به نتایج بدست آمده با افزایش غلظت کادمیم لجن، فعالیت آنزیم ها به طور کلی افزایش یافت اما افزایش غلظت روی در هر سطح کادمیم سبب کاهش فعالیت آنزیم ها شد. همچنین در سطح ۰/۷۵ میلی گرم بر کیلوگرم کادمیم که به شرایط خاک های طبیعی آلوده به کادمیم نزدیک تر است تغییری در فعالیت آنزیم های مورد بررسی و همچنین پراکسیداسیون لیپید ایجاد نشد که نشان دهنده تنش زنا نبودن کادمیم در این غلظت است.

وضعیت رد اکس سلولی حفظ شود. به طور کلی حضور روی در خاک با ایجاد رقابت در جذب با کادمیم، سبب کاهش غلظت کادمیم در گیاه شده و به دنبال آن فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت را نیز تحت تأثیر خود قرار می دهد. همچنان که روی کوفاکتور بسیاری از آنزیم ها نظیر سوپراکسید دیسموتاز نیز می باشد که چنانچه گیاه در شرایط تنش کادمیم قرار گیرد و عنصر روی به مقدار کافی در گیاه نباشد این آنزیم فعال نشده و خسارت اکسیداتیو در گیاه و در نتیجه تنش افزایش می یابد (ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۷).

### نتیجه گیری کلی

غلظت کادمیم در لجن فاضلاب به تنهایی معیار مناسبی برای

### منابع

- بارنده، ف. و کاوسی، ح. ر. (۱۳۹۵) اثر کادمیم بر تغییرات برخی اجزاء سیستم دفاع آنتی اکسیدان آنزیمی و غیر آنزیمی در گیاهچه های عدس. نشریه پژوهش های حبوبات ایران. جلد ۷، ۱۳۷-۱۲۵.
- ملکوتی، م. ج.، کشاورز، پ. و کریمیان، ن. (۱۳۸۷) روش جامع تشخیص و توصیه بهینه کود برای کشاورزی پایدار. انتشارات دانشگاه تربیت مدرس تهران. ۶۸۰ صفحه.
- هوشیار، پ. و بقائی، ا. ح. (۱۳۹۶) اثر بخشی کلات DTPA بر قابلیت دسترسی کادمیم در یک خاک تیمار شده با لجن فاضلاب. مجله آب و فاضلاب. جلد ۴، ۱۱۱-۱۰۳.
- Angeli, J. K., Pereira, C. A. C., de Oliveira Faria, T., Stefanon, I., Padilha, A. S. and Vassallo, D. V. (2013) Cadmium exposure induces vascular injury due to endothelial oxidative stress: the role of local angiotensin II and COX-2. *Free Radical Biology and Medicine* 65: 838-848.
- Boudjema, K., Kourdali, S., Bounakous, N., Meknachi, A. and Badis, A. (2014) Catalase activity in brown mussels (*Perna perna*) under acute cadmium, lead, and copper expouser and depuration tests. *Journal of Marine Biology* 2014: 1-9.
- Chaney, R. L., Ryan, J. A., Li, Y. M. and Angle, J. S. (2001) Transfer of cadmium through plants to the food chain. In: *Proceedings of the Scope Workshop on Environmental Cadmium in the Food Chain: Sources, Pathways, and Risks* (eds. Syers, J. K., Gochfeld, M. ) Pp. 76-81. Belgian Academy of Sciences, Brussels, Belgium.
- Chaoui, A., Mazhoudi, S., Ghorbal, M. H. and El Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139-147.
- Chen, J., Zhu, C., Lin, D. and Sun, Z. X. (2007) The effects of Cd on lipid peroxidation, hydrogen peroxide content and antioxidant enzyme activities in Cd-sensitive mutant rice seedlings. *Canadian Journal of Plant Science* 87: 49-57.
- Choudhary, M., Jetley, U. K., Khan, M. A., Zutshi, S. and Fatma, T. (2007) Effect of heavy metal stress on proline, malondialdehyde, and superoxide dismutase activity in the cyanobacterium *Spirulina platensis*-S5. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 204-209.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. and Thorpe, T. A. (1981) Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental Botany* 32: 93-101.
- Dinakar, N., Nagajyothi, P., Suresh, S., Damodharam, T. and Suresh, C. (2009) Cadmium induced changes on proline, antioxidant enzymes, nitrate and nitrite reductases in *Arachis hypogaea* L. *Journal of Environmental Biology* 30: 289-294.
- Ferreira, R. R., Fornazier, R. F., Vitoria, A. P., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2002) Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* 25: 327-342.

- Fornazier, R. F., Ferreira, R. R., Pereira, G. J., Molina, S. M., Smith, R. J., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2002) Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 125-131.
- Green, C., Chaney, R. and Bouwkamp, J. (2003) Interactions between cadmium uptake and phytotoxic levels of zinc in hard red spring wheat. *Journal of Plant Nutrition* 26: 417-430.
- Hagege, D., Nouvelot, A., Boucaud, J. and Gaspar, T. (1990) Malondialdehyde titration with thiobarbiturate in plant extracts: avoidance of pigment interference. *Phytochemical Analysis* 1: 86-89.
- Harada, E., Choi, Y. E., Tsuchisaka, A., Obata, H. and Sano, H. (2001) Transgenic tobacco plants expressing a rice cysteine synthase gene are tolerant to toxic levels of cadmium. *Journal of Plant Physiology* 158: 655-661.
- Hassan, M. J., Zhang, G., Wu, F., Wei, K. and Chen, Z. (2005) Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168: 255-261.
- Hussain, T., Murtaza, G. and Cheema, A. G. M. A. (2016) The Cd: Zn ratio in a soil affects Cd toxicity in spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Pakistan Journal of Agricultural Science* 53: 419-424.
- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K. and Sharma, S. (2008) Effect of cadmium and lead on growth, biochemical parameters and uptake in *Lemna polyrrhiza* L. *Plant Soil and Environment* 54: 262- 270.
- Kar, R., Garg, S., Halder, S., Galav, V., Chandra, N. and Mehndiratta, M. (2015) Cadmium exposure induces oxidative stress by decreasing expression of antioxidant enzymes in mice liver. *International Journal of Clinical Biochemistry and Research* 2: 89-96.
- Kovacik, J. and Backor, M. (2008) Oxidative status of *Matricaria chamomilla* plants related to cadmium and copper uptake. *Ecotoxicology* 17: 471-479.
- Lindsay, W. L. and Norvell, W. A. (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42: 421-428.
- Luck, H. (1974) *Methods in enzymatic analysis*. 2<sup>nd</sup> Ed. Academic Press. New York.
- Luis, A., Sandalio, L. M., Palma, J., Bueno, P. and Corpas, F. J. (1992) Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine* 13: 557-580.
- Lux, A., Martinka, M., Vaculik, M. and White, P. J. (2010) Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany* 62: 21-37.
- Maehly, A. C. (1954) the Assay of Catalases and Peroxidases. In: *Methods of Biochemical Analysis* (ed. Glick, D. ) P 358. Inter sciences Publishers, New York .
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Monteiro, C., Santos, C. A. O., Pinho, S. N., Oliveira, H., Pedrosa, T. and Dias, M. C. (2012) Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chemical Research in Toxicology* 25: 1423-1434.
- Nakano, Y. and Asada, K. (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts; its inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. *Plant and Cell Physiology* 28: 131-140.
- Rao, M. V., Paliyath, G., Ormrod, D. P., Murr, D. P. and Watkins, C. B. (1997) Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes (salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Plant Physiology* 115: 137-149.
- Rayburn, A. L. and Wetzel, J. (2002) Flow cytometric analyses of intraplant nuclear DNA content variation induced by sticky chromosomes. *Cytometry* 49: 36-41.
- Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gomez, M., Romero-Puertas, M. C. and Rio, D. (2001) Cadmium- induced change in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2115- 2126.
- Scebba, F., Sebastiani, L. and Vitagliano, C. (1998) Changes in activity of antioxidative enzymes in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings under cold acclimation. *Physiologia Plantarum* 104: 747-752.
- Soon, Y. K. and Abbud, S. (1993) Cadmium, chromium, lead and nickel. In: *Soil Sampling and Methods of Analysis*. (ed. Carter, M. R.) Pp. 103-107. Lewis Publishers.
- Tkalec, M., Prebeg, T., Roje, V., Pevalek-Kozlina, B. and Ljubecic, N. (2008) Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor* L. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 881-890.
- Vitoria, A. P., Lea, P. J. and Azevedo, R. A. (2001) Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701-710.
- Zare, A. A., Khoshgofarmanesh, A. H., Malakouti, M. J., Bahrami, H. A. and Chaney, R. L. (2018) Root uptake and shoot accumulation of cadmium by lettuce at various Cd: Zn ratios in nutrient solution. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. *In press*.
- Zhang, X., Fan, X., Li, C., and Nan, Z. (2010 ) Effects of cadmium stress on seed germination, seedling growth and antioxidative enzymes in *Achnatherum inebrians* plants infected with a *Neotyphodium endophyte*. *Plant Growth Regulation* 60: 91-97.