مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

اثرات زیستی آب‌های آلوده به سورفاکتانت بر اکوسیستم‌های آبی: غلظت‌های مؤثر بر رنگیزه‌های فتوسنتزی و سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی در *Lemna minor*

زهرا مسعودیان[۱*]، سید یحیی صالحی لیسار[۱]، اکبر نورسته نیا[۲]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز

[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۷/۰۳/۱۹
اصلاح: ۹۷/۰۶/۰۹
پذیرش: ۹۷/۰۷/۱۵

کلمات کلیدی:
آلکیل بنزن
تنش اکسیداتیو
سورفاکتانت
سولفونات
Lemna minor

چکیده

سورفاکتانت‌های آنیونی با توجه به ویژگی‌های مطلوبی که دارند به‌طور گسترده در بسیاری از زمینه‌های تکنولوژی و پژوهشی مورد استفاده قرار می‌گیرند و یکی از عوامل مهم در آلودگی منابع آب به شمار می‌روند. حضور غلظت‌های بالای این ترکیبات در محیط‌های آبی باعث القا تنش اکسیداتیو و تغییرات فیزیولوژیک در آبزیان شده و حیات آنان را تهدید می‌کند. در پژوهش حاضر تأثیر غلظت‌های ۰، ۱۰ ، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر از سورفاکتانت آنیونی آلکیل بنزن سولفونات خطی به مدت ۷ روز بر پراکسیداسیون لیپیدها، فعالیت آنزیم کاتالاز، کاروتنوئید کل، محتوای فنلی، پرولین آزاد، غلظت کلروفیل کل و شاخص پایداری غشا در گیاه آبزی *Lemna minor* مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر کلروفیل کل و کارتنوئید با افزایش غلظت سورفاکتانت کاهش یافت. بیشترین مقدار فنل کل و پرولین آزاد به ترتیب در غلظت‌های ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر سورفاکتانت مشاهده گردید. همچنین با افزایش غلظت سورفاکتانت، شدت فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافت و کمینه شاخص پایداری غشا در گیاهان تیمار شده با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر سورفاکتانت مشاهده شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های بیش از ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سورفاکتانت به طور معنی‌داری باعث ایجاد سمیت در گیاه لمنا می‌شود.

مقدمــه

آلودگی یک پدیده ساخته دست بشر بوده که با افزایش غلظت مواد طبیعی یا با انتشار ترکیبات مصنوعی در محیط، اتفاق می‌افتد (Abdel-Raouf *et al*., 2012). آلاینده‌های شیمیایی موجود در آب ترکیبات متعددی از جمله مواد شوینده، مواد ضدعفونی کننده، پساب‌های صنایع غذایی، آفت کش‌ها، هیدروکربن‌های نفتی، ترکیبات آلی فرار، حلال‌های حاوی کلر، مواد دارویی و غیره را شامل می‌شود. سورفاکتانت‌ها به عنوان ترکیب اصلی و ماده مؤثره موجود در مواد شوینده در زندگی روزمره به مقدار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرند، به‌طوری‌که در غرب اروپا میزان مصرف سالانه محصولات مواد شوینده و نرم‌کننده‌ها

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zahramasoodian@yahoo.com

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

به ترتیب ۴۲۵۰ و ۱۱۹۰ هزار تن می‌باشد (Pettersson *et al.*, 2000). سورفاکتانت‌های آنیونی با توجه به ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی مطلوبی که دارند به‌طور گسترده در بسیاری از زمینه‌های تکنولوژی و پژوهشی از قبیل صنایع پتروشیمی، داروسازی، فرمولاسیون‌های کشاورزی، بیوتکنولوژی و مواد آرایش مورد استفاده قرار می‌گیرند و یکی از عوامل مهم در آلودگی منابع آب به شمار می‌روند. Mcavoy و همکاران (۱۹۹۳) برآورد کردند که ۵ درصد کل آلکیل بنزن سولفونات خطی (LAS) [1] تولید شده در ایالات متحده آمریکا به محیط‌های آبی راه می‌یابد. فاصله سیستم‌های آبی از مناطق مسکونی و تخلیه فاضلاب‌های خانگی و صنعتی حاوی این مواد به منابع آبی در میزان آلودگی آب به این آلاینده‌ها تأثیر بسزایی دارد. سورفاکتانت LAS ترکیبی آمفی‌پاتیک است که از یک بخش آب‌گریز و یک بخش آب‌دوست تشکیل شده است. بخش‌های آب‌گریز و آب‌دوست آن می‌تواند به آسانی با زیرساختارهای قطبی و غیرقطبی برخی ماکرومولکول‌ها برهمکنش دهند (Xiao *et al.*, 2000)، این ویژگی سورفاکتانت‌ها انباشت آن‌ها را در ارگانیسم‌های زنده تسهیل کرده و سبب ظهور اثرات سمی در آن‌ها می‌شود.

به دلیل موقعیت ماکروفیت‌ها به عنوان تولیدکننده در زنجیره غذایی اکوسیستم‌های آبی، آن‌ها اولین موجودات زنده‌ای هستند که آلودگی‌های محیط به آن‌ها منتقل می‌شود. گونه *Lemna minor* به دلیل توانایی تکثیر سریع و اندازه کوچک به عنوان گونه گیاهی مدل برای سنجش و ارزیابی سمیت در نظر گرفته شده است (Radić *et al.*, 2011). در مطالعات پیشین کاهش میزان رشد گیاه و تعداد فروندها در برخی گیاهان آبزی تیمارشده با انواع مختلف سورفاکتانت ارائه شده است (Dirilgen and Ince, 1995; Forni *et al.*, 2012; Pandey and Gopal, 2010). Chawla و همکاران (۱۹۸۹) تغییر در محتوای پروتئین، کلروفیل و ساختار سلولی در گیاهان آبزی از قبیل *Ceratophyllum demursum*، *Salvinia molesta*، *Lemna minor*، *Spirodella polyrhiza*، *Hydrilla verticillate* و *Pistia stratiotes* قرار داده شده در معرض LAS را بررسی کردند. یافته‌های Dirilgen و Ince (۱۹۹۵) نشان داده است که نوع محیط کشت و میزان سورفاکتانت سدیم دودسیل سولفات (SDS)[2] موجود در آن در پاسخ‌های رشدی و میزان انباشت سورفاکتانت SDS در گیاه آبزی *L. minor* اثر می‌گذارد. تغییر در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی پراکسیداز و کاتالاز در *Azolla imbricata* در معرض غلظت‌های مختلف سورفاکتانت LAS توسط Liu و همکاران (۲۰۰۴) و تغییر در فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز و فنیل آلانین آمونیالیاز در *L. minor* در حضور سورفاکتانت SDS توسط Forni و همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است. اگرچه گیاهان آبزی واجد مجموعه‌ای کامل از سیستم‌های سمیت‌زدای آنزیمی و غیرآنزیمی هستند، ولی اطلاعات کمی در مورد نحوه عملکرد آن‌ها در پاسخ به این گروه از آلاینده‌ها وجود دارد. در این مطالعه به منظور یافتن غلظت‌های بازدارنده رشد در گیاه لمنا، اثرات سمی غلظت‌های متفاوت سورفاکتانت آنیونی LAS را بر اساس میزان پراکسیداسیون لیپیدی، تغییرات رنگیزه‌های فتوسنتزی و شاخص پایداری غشا ارزیابی کرده و پاسخ‌های آنتی اکسیدانی این گیاه را با سنجش غلظت فنل تام، پرولین آزاد و فعالیت آنزیم کاتالاز مورد بررسی قرار داده‌ایم.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه

نمونه *Lemna minor* از بندر کیاشهر واقع در استان گیلان تهیه شد. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا با آب کاملاً شسته شده و به مدت ۲ دقیقه در محلول NaClO (۰/۵ درصد) قرار داده شدند تا ضدعفونی شده و در ادامه با آب شهری و آب مقطر شستشو شدند. سپس گیاهان به ظروف حاوی محیط کشت Steinberg (۵۰ درصد) منتقل شدند. گیاهان در اتاقک کشت با شرایط دمایی $25 \pm 2\ ^{\circ}C$ و دوره روشنایی- تاریکی ۸/۱۶ ساعت به مدت یک هفته در آزمایشگاه نگهداری شدند؛ پس از پایان یک هفته شرایط تیماردهی اعمال شد. از سورفاکتانت LAS با زنجیره الکیل ۱۲ کربنه به نام سدیم دودسیل بنزن

[1] Linear Alkyl benzene Sulphonate
[2] Sodium Dodecyl Sulfate

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

سولفونات[3] (SIGMA، آمریکا) به منظور تیماردهی استفاده شد. غلظت‌های مختلف ۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر از LAS با محیط کشت Steinberg در سه تکرار و هر تکرار حاوی ۴ گرم گیاه لمنا تهیه شد. در ادامه ظروف حاوی محیط کشت و گیاه لمنا برای یک دوره ۷ روزه به اتاقک کشت منتقل شدند (Chawla *et al*., 1989).

اندازه‌گیری مالون دی آلدئید (MDA)

برای این منظور ۰/۵ گرم از بافت برگ با ۵ ml تری کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد ساییده شد. عصاره حاصل، به مدت ۱۵ دقیقه، با دور ۱۴۰۰۰rpm سانتریفیوژ شده و سپس روشناور جدا شد. پس از آن به حجم مساوی از روشناور، محلول TCA ۲۰ درصد حاوی تیو باربیتوریک اسید (TBA) ۰/۵ درصد اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۱۰۰ قرار داده شد و بلافاصله سرد شد. سپس ۲۰۰۰ میکرولیتر از روشناور به مدت ۵ دقیقه در دور ۷۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. سپس جذب کمپلکس MDA+TBA در ۵۳۲ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (انگلستان، CamSpec M501 Single Beam UV/Visible;) خوانده شد. جذب بقیه رنگیزه های غیراختصاصی در ۶۰۰ نانومتر تعیین شد و از میزان جذب در ۵۳۲ نانومتر کسر گردید. برای محاسبه غلظت MDA از ضریب خاموشی $155\ mmol^{-}cm^{-1-}$ استفاده شد و در نهایت غلظت مالون دی آلدئید که محصول واکنش پراکسیداسیون لیپید است برحسب نانو مول در گرم وزن تر محاسبه گردید (Heath and Packer, 1968).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT)

به منظور استخراج و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز، ۰/۵ گرم بافت تر گیاه با نیتروژن مایع ساییده شد. سپس به آن ۳ ml میلی‌لیتر بافر استخراج که حاوی (K_2HPO_4/KH_2PO_4) ۱۰ میلی مولار (pH = ۷) و پلی ونیل پیرولیدین (PVP) ۰/۲[4] درصد بود افزوده شد (Chance and Maehly, 1955) و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ^{o}C ۴ سانتریفیوژ شد. در ادامه روشناور مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۴۰۰۰ rpm در دمای ^{o}C ۴ سانتریفیوژ شد. از روشناور برای سنجش آنزیم کاتالاز و محتوای پروتئین استفاده شد. سنجش مقدار پروتئین به روش برادفورد انجام شد (Bradford, 1976). سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Chance و Maehly (۱۹۵۵) و بر اساس کاهش جذب پراکسید هیدروژن در ۲۴۰ nm اندازه‌گیری شد. به منظور سنجش این آنزیم ۳۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به محلول واکنش که شامل ۷۲۰ میکرولیتر بافر فسفات (۵۰mM، pH =۷)، ۲۵۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (۱۰ mM) افزوده و تغییرات جذب نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه در طول موج ۲۴۰nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت فعالیت آنزیم بر اساس ضریب خاموشی ($\varepsilon = 39.4\ mM^{-}cm^{-1}$) محاسبه شده و بر حسب واحد آنزیمی بر میلی‌گرم پروتئین بیان گردید. یک واحد آنزیمی مقدار آنزیمی است که بتواند یک میکرومول پراکسید هیدروژن را در مدت زمان یک دقیقه احیا کند.

سنجش میزان فنل کل

به منظور استخراج و اندازه‌گیری فنل کل ۰/۱ گرم از هر نمونه تر گیاهی با متانول ۸۰ درصد هموژنیزه شد و سپس در ۱۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. روشناور حاصل برای سنجش فنل تام مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش میزان فنل کل روش Slinkard و Singleton (۱۹۷۷) مورد استفاده قرار گرفت. مخلوط واکنش حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر از عصاره‌ی متانولی هر نمونه، ۲۸۰۰ میکرو لیتر آب مقطر، ۲۰۰۰ میکرو لیتر کربنات سدیم ۲ درصد و ۱۰۰ میکرو لیتر فولین ۵۰ درصد بود. پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن در تاریکی جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۶۳ nm خوانده شد. هم‌زمان محلول‌های استاندار گالیک اسید در محدوده (۱۰۰ – ۰ میلی‌گرم بر لیتر) تهیه گردید. مقدار فنل کل نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم گالیک اسید در گرم وزن تر محاسبه شد.

سنجش پرولین

[3] Sodium dodecyl benzene sulphonat (SDBS)
[1] Polyvinyl pyrrolidone

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

جهت اندازه‌گیری پرولین ۰/۵ گرم ماده تر گیاهی در ۵ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید هموژنیزه شد. سپس به ۲ میلی‌لیتر از عصاره، ۲ میلی‌لیتر معرف اسیدی ناین هیدرین و ۲ میلی‌لیتر استیک اسید خالص افزوده شد. لوله‌ها به مدت یک ساعت در بن‌ماری دمای ^{o}C ۱۰۰ قرار گرفتند و سپس به حمام یخ منتقل شدند. آنگاه ۴ میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه شد و پس از تکان دادن لوله‌ها، ۲۰ ثانیه ثابت نگه داشته شدند تا دو لایه مجزا تشکیل شود. سرانجام جذب لایه فوقانی (حاوی تولوئن و پرولین) در طول موج nm ۵۲۰ ثبت شد (Bates *et al*., 1973). مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین (۰-۱۰ میکروگرم بر لیتر) تعیین و در نهایت غلظت پرولین بر حسب میکروگرم بر گرم وزن تر بیان گردید.

سنجش رنگیزه های فتوسنتزی

به منظور اندازه‌گیری محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی ۰/۱ گرم از زیست‌توده گیاه در استون ۸۰ درصد هموژنیزه شد و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی و دمای ^{o}C ۴ قرار گرفت. سپس در rpm ۲۰۰۰ و دمای ^{o}C ۴ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. جذب روشناور در طول‌موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. در نهایت غلظت رنگیزه‌ها تعیین و برحسب میکروگرم در گرم وزن تر گزارش شد (Lichtenthaler, 1987).

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا

شاخص پایداری غشا بر اساس میزان نشت الکترولیت از غشا اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۲ گرم از بافت تر گیاه به قطعات کوچک تقسیم شد. سپس نمونه‌ها به داخل لوله‌های آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه منتقل شد و لوله‌ها داخل حمام آب گرم در دمای ^{o}C ۳۲ به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. پس از گذشت ۲ ساعت هدایت الکتریکی اولیه (E1) با دستگاه EC متر (EC-400L, iSTEK, Korea) اندازه‌گیری شد. سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۱۲۰ قرار گرفتند تا تمام الکترولیت‌های داخل نمونه آزاد شوند در ادامه لوله‌ها تا دمای ^{o}C ۲۵ سرد شده و هدایت الکتریکی ثانویه (E2) اندازه‌گیری شد. در نهایت با استفاده از روابط زیر میزان نشت الکترولیت و شاخص پایداری غشا محاسبه گردید (Dionisio-Sese and Tobita, 1998).

نشت الکترولیت = $EC_1 / EC_2 \times 100$

شاخص پایداری غشا (درصد) = ۱۰۰ - نشت الکترولیت

آنالیز آماری

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از آزمون ANOVA استفاده شد. مقایسه میانگین داده‌ها در سطح احتمال ۵ درصد و با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم‌افزار SPSS (Version 21) و برای رسم نمودار از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایــج

تأثیر LAS بر غلظت مالون دی آلدئید

نتایج مربوط به مقدار مالون دی آلدئید (MDA) در غلظت‌های مختلف LAS نشان داد که تیمار LAS در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر سبب افزایش MDA در نمونه‌های تیمار یافته در مقایسه با نمونه شاهد گردید. این تغییر به ویژه در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر غلظت‌ها با اختلاف بیشتری دیده شد، به‌طوری‌که نسبت به نمونه شاهد ۳/۶۳ برابر افزایش یافت (شکل۱-a).

تأثیر LAS بر فعالیت آنزیم کاتالاز

نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز نشان می‌دهد با افزایش میزان سورفاکتانت در محیط، فعالیت آنزیم کاتالاز در

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

تمامی تیمارها در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش یافت (شکل۱- b).

تأثیر LAS بر غلظت کاروتنوئید کل

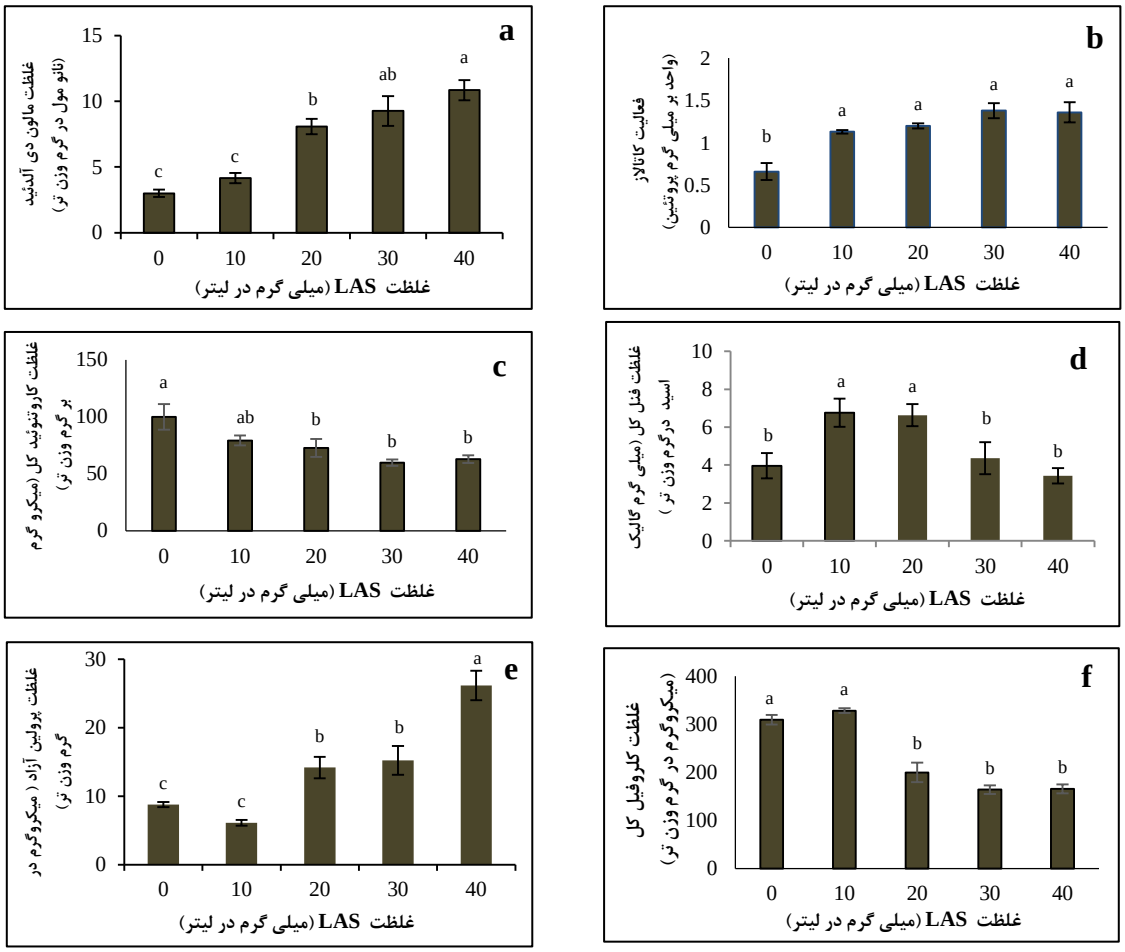
مطابق شکل ۱-c با افزایش غلظت LAS مقدار کاروتنوئید کل در تمامی گیاهان تیمار شده، در مقایسه با نمونه شاهد کاهش نشان داد ولی میزان کاهش در گیاهان تیمارشده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر سورفاکتانت نسبت به شاهد معنی‌دار نبود.

تأثیر LAS غلظت فنل کل

بر اساس نتایج شکل ۱-d میزان فنل کل در گیاهان تیمار شده با غلظت ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر سورفاکتانت نسبت به گیاهان شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد. در گیاهان تیمارشده با غلظت ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر LAS میزان فنل کل از مقادیری مشابه با گیاهان شاهد برخوردار بود.

تأثیر LAS بر پرولین آزاد

نتایج مربوط به غلظت پرولین آزاد در غلظت‌های مختلف LAS نشان داد که به غیر از غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش غلظت LAS سبب تغییر معنی‌دار در غلظت پرولین آزاد در مقایسه با نمونه شاهد گردید. این تغییر به ویژه در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به سایر غلظت‌ها اختلاف بیشتری داشت. مقدار پرولین آزاد در گیاهان تیمار شده با غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به نمونه شاهد ۲/۹۷ برابر افزایش نشان داد (شکل ۱-e).



شکل ۱. a) غلظت مالون دی آلدئید b) تغییرات فعالیت آنزیم کاتالاز c) تغییرات کاروتنوئید کل d) تغییرات فنل کل e) تغییرات پرولین آزاد f) تغییرات کلروفیل کل در گیاه *L. minor* تیمارشده با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۲۰،۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر LAS به مدت ۷ روز. (میانگین ± خطای استاندارد؛ n = ۳). حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p \leq 0.05$).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

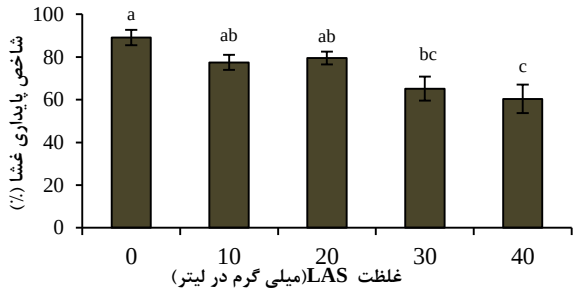
[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

تأثیر LAS بر میزان کلروفیل کل

بر اساس داده‌های شکل ۱-f به استثنای گیاهان تیمارشده با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر LAS، در سایر غلظت‌های به‌کار رفته میزان کلروفیل کل نسبت به نمونه شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد.

تأثیر LAS بر شاخص پایداری غشا

بر اساس نتایج شکل ۲ در تمامی گیاهان تیمار شده با غلظت‌های مختلف سورفاکتانت، شاخص پایداری غشا نسبت به گیاهان شاهد کاهش نشان داد ولی تنها در غلظت‌های ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر LAS میزان کاهش معنی‌دار بود. شاخص پایداری غشا در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به نمونه شاهد ۳۲ درصد کاهش نشان داد.



شکل ۲. شاخص پایداری غشا در گیاه *L. minor* تیمارشده با غلظت‌های۰، ۱۰، ۲۰،۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم در لیتر LAS به مدت ۷ روز. (میانگین ± خطای استاندارد؛۳ =n). حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p \leq 0.05$).

بحث

سورفاکتانت‌ها به علت مصارف بالای خانگی و صنعتی، یکی از آلاینده‌های مهم آب به‌حساب می‌آیند. تا کنون بیشتر مطالعات در زمینه اثرات سمی این ترکیبات بر جانوران آبزی و میکروراگانیسم‌های موجود در آب تمرکز داشته است (Pettersson *et al*., 2000; Susmi *et al*., 2010) و پژوهش‌ها در زمینه سمیت این آلاینده‌ها بر گیاهان آبزی محدود است. داشتن ویژگی آمفی‌پاتیک، انباشت سورفاکتانت‌ها آن‌ها را در یاخته‌های موجودات زنده تسهیل کرده و سبب تغییرات رشدی و فیزیولوژیکی در گیاه می‌گردد (Forni *et al*., 2008). یکی از این تغییرات، تولید متابولیت‌هایی است که حضور آن‌ها در گیاه نشانه نامطلوب بودن وضعیت رشدی گیاه است. MDA محصول تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع (PUFA) موجود در غشاهای سلولی است و افزایش آن نشان می‌دهد که گیاه تحت تنش اکسیداتیو قرار دارد (Gill and Tuteja, 2010). در مطالعه حاضر افزایش غلظت LAS موجب افزایش میزان MDA شد که حاکی از افزایش پراکسیداسیون لیپیدی می‌باشد. با وجود این، گیاه لمنا اثرات حضور LAS در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در لیتر را از طریق سیستم دفاع آنتی اکسیدانی مهار نموده و سطح تولید MDA را مشابه با نمونه‌های شاهد تنظیم می‌نماید ولی افزایش غلظت LAS به بیش از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر منجر به ایجاد سطحی از تنش اکسیداتیو می‌شود که حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[5] تولید شده ناشی از چنین تنشی خارج از توان گیاه می‌باشد. در زمینه تأثیر سورفاکتانت‌ها بر پراکسیداسیون لیپیدی غشا گیاهان آبزی تا کنون بررسی صورت نگرفته است. نتایج تنش ناشی از حضور فلزات سنگین مس و کادمیوم در محیط رشد لمنا نیز نتایج مشابهی برای افزایش MDA به دنبال داشت (Hou *et al*., 2007).

در این مطالعه القای فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز در پاسخ به غلظت‌های متفاوت LAS مشاهده شد. تغییرات مشاهده شده در فعالیت آنزیم کاتالاز هماهنگ با الگوی افزایش غلظت سورفاکتانت مورد استفاده بوده و همبستگی مناسبی را بین آن دو نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد شدت فعالیت ارتقاء یافته کاتالاز می‌تواند پاسخی به افزایش غلظت ROS سلول و یا حتی به عنوان نشانه‌ای از دخالت این آنزیم در تجزیه آلاینده و یا اعمال تغییرات اولیه در ساختار آن تلقی گردد. قرار دادن گیاهان *Lemna paucicostata* و *Azolla imbricate* در معرض سایر انواع سورفاکتانت‌ها نیز منجر به تشدید فعالیت آنزیم کاتالاز شد (Liu *et al*., 2004).

[1] Reactive Oxygen Species

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که تیمار LAS موجب کاهش میزان کاروتنوئید کل می‌گردد. احتمالاً غلظت‌های بالای LAS باعث القا تأثیرات منفی در بیوسنتز کاروتنوئیدها و یا افزایش میزان تجزیه آن‌ها می‌گردد. کاروتنوئیدها به عنوان رنگ‌دانه کمکی نقش عمده‌ای در انتقال انرژی جذب شده به کلروفیل در جریان فتوسنتز ایفا می‌کنند. همچنین این ترکیبات به علت داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی در حفاظت از ماشین فتوسنتزی علیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن نقش مؤثر دارند (Hegazy *et al*., 2017). بنابراین می‌توان اظهار داشت که احتمالاً یکی از عوامل کاهش کلروفیل کل در غلظت‌های بالای LAS، کاهش مقدار کاروتنوئید کل می‌باشد که باعث اختلال در کارایی فتوسنتزی و عملکرد حفاظتی گیاه گردیده است. نتایج مشابه در گیاه لمنا در معرض فلز سنگین سرب و نانوذره روی قبلاً گزارش شده است (Hegazy *et al*., 2017; Torbati *et al*., 2017).

در پژوهش حاضر میزان فنل کل در غلظت‌های کم سورفاکتانت نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد. افزایش ترکیبات فنلی در گیاهان تیمار شده با LAS ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را ارتقا می‌بخشد. ترکیبات فنلی گیاهان دهنده الکترون برای آنزیم گایاکول پراکسیداز به‌حساب می‌آیند و موجب سمیت زدایی H_2O_2 تولید شده در شرایط تنش می‌شوند. نتایجی مشابه در گیاه *Lemna* تیمار شده با سورفاکتانت SDS مشاهده شده است. نویسندگان علت افزایش یافتن فنل کل را به زیادشدن فعالیت فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و علت کاهش را به کم شدن فعالیت این آنزیم به دلیل سمیت ناشی از تجمع SDS در گیاه نسبت دادند (Forni *et al*., 2012). اما افزایش مقادیر فنل به عنوان بخشی از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی غیرآنزیمی خود تحت تأثیر غلظت‌های بالای سورفاکتانت قرار گرفته و در غلظت‌های ۳۰ میلی‌گرم در لیتر و بالاتر بازداری می‌شود و یا سطوح تخریب در این غلظت‌ها نسبت به شاهد افزایش می‌یابد.

در پاسخ به افزایش غلظت LAS در محیط، میزان پرولین گیاه افزایش یافت. شرایط نامساعد محیطی می‌تواند از طریق افزایش بیان آنزیم‌های بیوسنتز کننده پرولین و کاهش فعالیت آنزیم‌های تخریب پرولین باعث افزایش میزان پرولین در گیاه گردد (Serraj and Sinclair, 2002). پرولین به عنوان واسطه تنظیمات اسمزی، پایدارکننده ساختارهای زیرسلولی، پاک‌کننده رادیکال‌های آزاد، منبع انرژی و یک علامت مرتبط با تنش نقشی چندگانه در این شرایط ایفا می‌کند، همچنین تجمع پروتئین‌های غنی از پرولین بر عملکرد پروتئین اثر گذاشته و باعث حفاظت از آن‌ها در برابر تنش اکسیداتیو می‌شود (Jaleel *et al*., 2007). به نظر می‌رسد که گیاه لمنا با افزایش میزان پرولین سعی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تولید شده و تنظیم کردن فشار اسمزی برای مقابله با آسیب‌های وارد شده به غشا دارد. در زمینه تأثیر سورفاکتانت‌ها بر محتوای پرولین گیاهان آبزی تاکنون مطالعه‌ای انجام نشده است؛ ولی نتایج مشابهی در گیاه لمنا در معرض فلزات سنگین جیوه قبلاً گزارش شده است (Zhang *et al*., 2017).

محتوای کلروفیل کل در غلظت کم LAS نسبت به نمونه شاهد تغییر نیافت ولی در ادامه در غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، محتوای آن کاهش معنی‌داری نشان داد. این واقعیت می‌تواند نشانهٔ حساسیت رنگ‌دانه کلروفیل در گیاه آزولا، نسبت به آلودگی سورفاکتانت LAS باشد. نتایج مشابه در مورد سورفاکتانت سدیم دودسیل سولفانات (SDS) در گیاه *L. minor* (Forni *et al*., 2008) و سورفاکتانت سدیم لوریل سولفات (SLS) در گیاه *Azolla pinnata* قبلاً گزارش شده است (Pandey and Gopal, 2010). طی بررسی‌های انجام شده توسط Ghawla و همکاران (۱۹۸۷) نیز معلوم گردید که مهار بیوسنتز کلروفیل در حضور شوینده‌ها می‌تواند ناشی از اثرات منفی این ترکیبات بر سنتز پروتئین باشد.

حفظ تمامیت غشای سلولی یکی از مهم‌ترین اهداف در مواجه با بسیاری از تنش‌های محیطی به شمار می‌رود و پایداری غشا در شرایط تنش، یکی از نشانه‌های تحمل است. آسیب دیدن غشای سیتوپلاسمی، باعث می‌شود محتویات سلول از جمله الکترولیت‌ها به بیرون تراوش کنند که مقدار این خسارت با اندازه‌گیری میزان نشت یونی تعیین می‌شود (Jouyban, 2012). اندازه‌گیری میزان نشت یونی شاخص خوبی برای اندازه‌گیری میزان آسیب واردشده به غشا به‌حساب می‌آید (Bandeoğlu *et al*., 2004). افزایش نشت یونی در گیاه لمنا در معرض علف‌کش قبلاً گزارش شده است (Halim *et al*., 2018).

بر اساس نتایج این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً سازوکارهای دفاعی گیاه لمنا در مقابل تنش اکسیداتیو ناشی از غلظت‌های بالاتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر LAS از قدرت کافی برخوردار نبوده و این گیاه آبزی نسبت به وجود چنین غلظت‌هایی از سورفاکتانت LAS حساس است.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

تشکر و قدردانی

نگارندگان این مقاله ضمن سپاس فراوان از دانشگاه گیلان بابت تأمین امکانات آزمایشگاهی، از دانشگاه تبریز به خاطر حمایت مالی قدردانی می‌نمایند.

منابــع

Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A.A., Ibraheem, I.B.M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 19: 257-275.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil. 39: 205-207.

Bandeoğlu, E., Eyidoğan, F., Yücel, M. Öktem, H.A. 2004. Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. Plant Growth Regulation. 42(1): 69-77.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 72(1-2): 248-254.

Chance, B., Maehly, A.C. 1955. Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology. 2: 764-775.

Chawla, G., Viswanathan, P.N., Devi, S. 1987. Biochemical studies on the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate to *Scenedesmus quadricauda* in culture. Environmental and Experimental Botany. 27(3): 311-323.

Chawla, G., Misra, V., Viswanathan, P.N., Devi, S. 1989. Toxicity of linear alkyl benzene sulphonate on some aquatic plants. Water, Air, and Soil Pollution. 43(1-2): 41-51.

Dionisio-Sese, M.L., Tobita, S. 1998. Antioxidant responses of rice seedlings to salinity stress. Plant Science. 135(1): 1-9.

Dirilgen, N., Ince, N. 1995. Inhibition effect of the anionic surfactant SDS on duckweed, *Lemna minor* with considerations of growth and accumulation. Chemosphere. 31(9): 4185-4196.

Forni, C., Giordan, F., Pintore, M., Campanella, L. 2008. Effects of sodium dodecyl sulphate on the aquatic macrophytes *Azolla* and *Lemna*. Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology. 142(3): 665-668.

Forni, C., Bragliaa, R., Harrenb, F.J.M., Cristescu, S.M. 2012. Stress responses of duckweed (*Lemna minor* L.) and water velvet (*Azolla filiculoides* Lam.) to anionic surfactant sodium-dodecyl-sulphate (SDS). Aquatic Toxicology. 110: 107-113.

Gill, S.S., Tuteja, N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry. 48(12): 909-930.

Halim, N.A., Ma, N.L., Sahid, I., Chuah, T.S. 2018. Effects of 2, 4-Di-tert-butylphenol and Selected Herbicides which Induced Lipid Peroxidation on Quantum Yield and Membrane Integrity of Weedy Plants under Dark and Light Conditions. Sains Malaysiana. 47(2): 261-268.

Heath, R.L., Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 125(1): 189-198.

Hegazy, A.K., Emam, M.H., Lovett-Doust, L., Azab, E., El-Khatib, A.A. 2017. Response of duckweed to lead exposure: phytomining, bioindicators and bioremediation. Desalination and Water Treatment. 70: 227-234.

Hou, W., Chen, X., Song, G., Wang, Q., Chang, C.C. 2007. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). Plant Physiology and Biochemistry. 45(1): 62-69.

Jaleel, C.A., Gopi, R., Sankar, B., Manivannan, P., Kishorekumar, A., Sridharan, R., Panneerselvam, R. 2007. Studies on germination, seedling vigour, lipid peroxidation and proline metabolism in *Catharanthus roseus* seedlings under salt stress. South African Journal of Botany. 73(2): 190-195.

Jouyban, Z. 2012. The effect of salt stress on plant growth. Technical Journal of Engineering and Applied Science. 2(1): 7-10.

Lichtenthaler, H.K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. Methods in Enzymology. 148: 350-382

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]

Liu, H.Y., Liao, B.H., Zhou, P.H., Yu, P.Z. 2004. Toxicity of linear alkylbenzene sulfonate and alkylethoxylate to aquatic plants. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 72(4): 866-872.

Mcavoy, D.C., Eckhoff, W.S., Rapaport, R.A. 1993. Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the environment. Environmental Toxicology and Chemistry. 12: 977- 987.

Pandey, P., Gopal, B. 2010. Effect of Detergents on the Growth of Two Aquatic Plants: *Azolla pinnata* and *Hydrilla verticillata.* Environment & We an International Journal of Science & Technology. 5: 107-114.

Pettersson, A., Adamsson, M., Dave, G. 2000. Toxicity and detoxification of Swedish detergents and softener products. Chemosphere. 41: 1611-1620.

Radić, S., Stipaničev, D., Cvjetko, P., Rajčić, M.M., Širac, S., Pevalek-Kozlina, B., Pavlica, M. 2011. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. Ecotoxicology and Environmental Safety. 74(2): 182-187.

Serraj, R., Sinclair, T.R. 2002. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? Plant, Cell & Environment. 25(2): 333-341.

Slinkard, K., Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 28(1): 49-55.

Steinberg, R.A. 1946. Mineral requirements of *Lemna minor*. Plant Physiology. 21(1): 42-48.

Susmi, T.S., Rebello, S., Jisha, M.S., Sherief, P.M. 2010. Toxic effects of sodium dodecyl sulphate on grass carp *Ctenopharyngodon idella*. Fishery Technology. 47(2): 157-162.

Torbati, S., Khataee, A., Saadi, S. 2017. Comparative phytotoxicity of undoped and Er-doped ZnO nanoparticles on *Lemna minor* L.: changes in plant physiological responses. Turkish Journal of Biology. 41(4): 575-586.

Xiao, J.X., Sivars, U., Tjerneld, F. 2000. Phase behavior and protein partitioning in aqueous two-phase systems of cationic–anionic surfactant mixtures. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. 743(1-2): 327-338.

Zhang, T., Lu, Q., Su, C., Yang, Y., Hu, D., Xu, Q. 2017. Mercury induced oxidative stress, DNA damage, and activation of antioxidative system and Hsp70 induction in duckweed (*Lemna minor*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 143: 46-56.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.3.9.2]