اثر کمپوست و هومیک اسید بر محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتازدر گیاه ذرت تحت آلودگی کروم و کادمیوم

علی چَعَب [۱]، عبدالامیر معزی [۲]، غلامعباس صیاد [۳]، مصطفی چرم [۲]
۱- دانشجوی دکتری خاکشناسی گروه مهندسی علوم خاک دانشکده کشاورزی شهید چمران اهواز، ۲- دانشیار گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی شهید چمران اهواز، ۳- استادیار گروه مهندسی علوم خاک دانشکده کشاورزی شهید چمران اهواز

چکیده
به منظور بررسی تاثیر کاربرد کودهای آلی کمپوست و هومیک اسید بر محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسیددسموتاز در گیاه ذرت تحت آلودگی کروم و کادمیوم، آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه سطح کادمیوم(۰، ۲۵و ۵۰ $mg\ kg^{-1}$) کروم(۰، ۱۰۰و ۲۰۰ $mg\ kg^{-1}$) و دو ماده آلی کمپوست و اسید هومیک در سه تکرار انجام گرفت. نتایج نشان داد که افزایش غلظت عناصر سنگین در هر سه تیمار ماده آلی باعث کاهش محتوی پروتئین در گیاه شد. بیشترین مقدار پروتئین در تیمار کاربرد هومیک اسید و بدون کاربرد عنصر سنگین بود. عناصر سنگین مورد مطالعه سببافزایشفعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتازشدند،بهطوریکهبیشترینفعالیت اینآنزیمدر غظت زیاد عناصر سنگین مشاهدهشد.فعالیت آنزیم کاتالاز در غلظتهای پایین کادمیوم و کروم افزایش و در غلظتهای بالاکاهش معنی داری نشان داد.

کلمات کلیدی: کمپوست، هومیک اسید، محتوی پروتئین، سوپر اکسید دسموتاز، کاتالاز

مقدمه
آلودگی خا کها با فلزات سنگین پدیده ای است که به طور گسترده در نتیجه فعالیتهای بشر، کشاورزی و صنعت اتفاق می افتد. وجود این عناصر در اتمسفر، خاک و آب حتی در مقادیر بسیار کم می تواند مشکلاتی را برای موجودات به وجود آورد. کادمیوم و کروم از مهم ترین این فلزات سنگین بوده و از دیر باز به عنوان یکی از آلاینده های محیطی به شمار میروند(شرما و همکاران، ۲۰۰۵). خاکهای آلوده به کادمیوم و کروم سبب کاهش شدید محصول شده و به این ترتیب باعث بروز مشکلات جدی در امر کشاورزی می شوند. کادمیوم و کروم ایجاد گونه های فعال اکسیژن را در گیاه افزایش داده و منجر به ایجاد تنش اکسیدی در آنها می شوند، بنابراین افزایش فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانی خاصی در چنین گیاهانی دیده می شود(علی و همکاران، ۲۰۰۹). محققان در سالهای اخیر بیشتر بر تجمع فلزات سنگین در محصولات گیاهی، گیاهان آبزی و علفهای طبیعی تمرکز داشته اند. این گونه گیاهان جهت مقابله با آسیب های اکسیدی که ناشی از عملکرد یون های فلزی (فلزات سنگین) است، سیستم های حفاظتی خاصی دارند که از آنزیمها و مواد آنتی اکسیدانی تشکیل شده اند. این سیستم از آنزیمهای آنتی اکسیدانی گلوتاتیون ردوکتاز،آسکوربات پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز تشکیل شده است. اهمیت آنزیمهای آنتی اکسیدان به توانایی آنها در از بین بردن گونه های اکسیژن واکنشگر (ROS - دارای توانایی نامحدود در اکسیداسیون اجزای سلولی مختلف بوده و می تواند منجر به تخریب اکسیداتیو سلول گردد) و در نهایت جلوگیری در بروز آسیب های اکسیدی می باشد (گروپا و همکاران، ۲۰۰۷). مواد آلی ممکن است از طریق تبادل یونی، کمپلکس شدن، جذب سطحی و رهاسازی، رسوب و انحلال، با یون‌های فلزی واکنش دهند و بر خواص فیزیکی و شیمیایی یون‌ها از قبیل شکل شیمیایی، حالت اکسایش، حلالیت و توزیع آنها در فازهای مختلف تأثیر گذارند. این فرایند به نوبه خود بر تحرک، انتقال عناصر سنگین، غیر متحرک شدن، تجمع در خاک، قابلیت استفاده و سمیت برای موجودات زنده اثر می‌گذارند (داورنچ و همکاران، ۲۰۰۰). با توجه به مطالب گفته شده مطالعه حاضر با هدف بررسی تاثیر کمپوست و هومیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز که مهمترین آنزیم های مقابله کننده با تنشهای اکسیداتیو ناشی از فلز های سنگین است در گیاه ذرت صورت پذیرفت، تا کاربرد این گیاه در مناطق آلوده ی کشاورزی و یا صنعتی مشخص گردد.

مواد و روش‌ها
به منظور بررسی تاثیر کاربرد کودهای آلی کمپوست و هومیک اسید بر محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در گیاه ذرت تحت آلودگی کروم و کادمیوم، آزمایشی فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه سطح کادمیوم (۰، ۲۵ و ۵۰ $mg\ kg^{-1}$) -کروم(۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ $mg\ kg^{-1}$) و دو ماده آلی کمپوست (۴۰گرم کمپوست به هر کیلو گرم خاک)و اسید هومیک

(مقدار ۲ گرم در لیتر به همراه آب آبیاری) در سه تکرار در گلخانه انجام گرفت. در این تحقیق از بذر ذرت ضدعفونی شده رقم سینگل کراس ۷۰۴ استفاده شد. قبل از کشت، بذرها در دستگاه جرمیناتور جهت جوانه زنی قرار داده شدند. ازگلدان هایی که ظرفیت ۱۴ کیلو گرم خاک داشتند استفاده شد. سپس با استفاده از برچسب هایی تیمارهای مورد نظر بروی گلدانها مشخص شد. عناصر کادمیوم و کروم در سطوح مورد نظر به صورت اسپری به خاک اضافه گردید. برای مخلوط شدن هر چه بهتر، خاک در یک نایلون قرار داده و به خوبی تکان داده شد. به منظور به تعادل رسیدن غلظتهای مختلف عناصر سنگین با خاک، به مدت ۲ ماه خاک در انکوباسیون نگهداری شد. گلدان ها در حد ظرفیت مزرعه آبیاری شده و وقتی رطوبت مناسب جهت کشت فراهم گردید. در هر گلدان ۴ بذر در عمق ۲.۵ برابر قطر بذر کاشته شد.سپس گلدان ها را براساس الگوی طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار آرایش یافتند. خصوصیات خاک مورد آزمایش نیز اندازه‌گیری شد. pH (با روش گل اشباع و توسط دستگاه pH متر)، هدایت الکتریکی (با روش تهیه گل اشباع و توسط دستگاه هدایت سنج اکتریکی)، ماده آلی (با روش والکلی و بلاک)، نیتروژن کل (با روش هضم، تقطیر و تیتراسیون و توسط دستگاه کجلدال)، فسفر قابل دسترس (با روش اولسن و توسط دستگاه اسپکتو فتومتر) پتاسیم قابل استخراج (با روش عصاره‌گیری با استات آمونیوم و توسط فلیم فتو متر) و آهن، منگنز، مس و روی قابل جذب (با روش عصاره‌گیری با محلول DTPA و توسط دستگاه جذب اتمی) اندازه گیری شدند (احیائی و همکاران، ۱۳۷۰). کوددهی براساس آزمون خاک و از منابع کودهای اوره،سوپر فسفات تریپل، سولفات پتاسیم ، سولفات منگنز، کلات آهن، سولفات مس استفاده شد. کود اوره را به صورت تقسیط در سه مرحله قبل از کشت و دو مرحله بعد از رشد گیاهان استفاده شد و بقیه کودها قبل از کشت به خاک اضافه شدند. دو هفته بعد از رشد گیاهان تعداد آنها به ۲ بوته درهرگلدان کاهش یافت. اندازه گیری صفات مورد نظر به این صورت بود که بعداز رشد گیاه به مدت ۹ هفته (ظهور گل آذین) نمونه برداری صورت گرفت. جهت محاسبه و ارزیابی فعالیت دو آنزیم سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ۳ عدد برگچه از هر برگ فرعی در هنگام صبح برداشت شد. سعی بر آن بود که بر گها کاملاً جوان و گسترده باشند. بر گها داخل پاکت پلاستیکی قرار گرفتند و در ظروف عایق که کف آن از یخ پوشیده شده بود قرار داده شدند و سپس نمونه ها به آزمایشگاه منتقل گردید. میزان تغییرات آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مطابق با روش سایرام (میتلر، ۲۰۰۲) و میزان تغییرات آنزیم کاتالاز به روش چانس و همکاران(۱۹۵۵) تعیین گردید. برای سنجش پروتئین از روش بردفورد (۱۹۷۶) استفاده شد. داده‌های بدست آمده توسط نرم افزارهای SAS و SPSS۱۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. مقایسات میانگین با آزمون LSD در سطح احتمال ۵% صورت گرفت. رسم نمودارها و جداول با نرم افزار EXCEL انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه خاک و تعیین برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در کشت گلخانه‌ای در جدول شماره یک ارائه شده است (۱).

جدول۱-خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورداستفاده

بافت	pH	هدایت الکتریکی	کربن آلی	نیتروژن کل	فسفر	پتاسیم	روی	آهن	کادمیوم	کروم
		dS/m	٪		mg.kg $^{-1}$					
لوم شنی	۷/۸	۲/۲	۰/۶۸	۰/۰۶	۱۲	۱۰۵	۱/۸	۱/۹	۰/۰۴۳	۰/۰۲۳

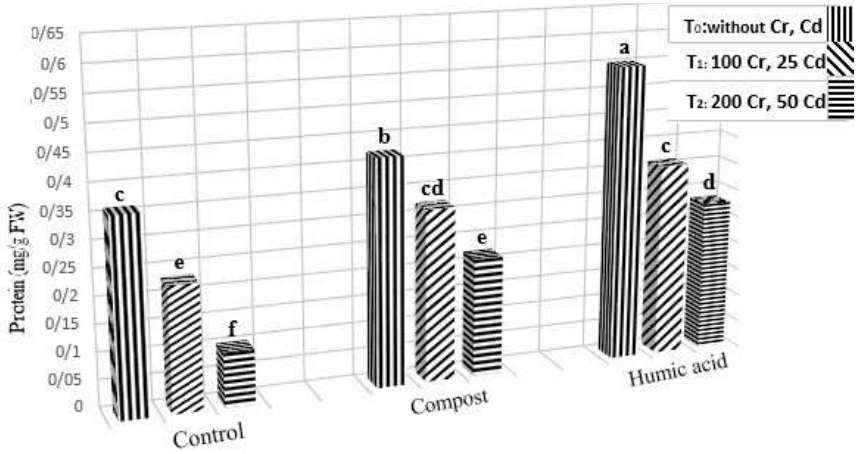
در بررسی تاثیر تیمارها بر مقدار محتوی پروتئین و فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دسموتاز و کاتالازبا توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۲) مشاهده می‌شود که تفاوت معنی داری در محتوی پروتئین برگ گیاه حاصل از سطوح مختلف کادمیوم و کروم و ماده آلی وجود داشت. تفاوت معنی داری در محتوی پروتئین در اثر برهمکنش کادمیوم-کروم و ماده آلی وجود داشت. کاربرد تیمارها و برهمکنش آنها بر فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دسموتاز و کاتالاز تفاوت معنی داری در سطح یک درصد داشت.

جدول ۲ - جدول تجزیه واریانس محتوی پروتئین، فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز و آنزیم کاتالاز

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کاتالاز	محتوی پروتئین	سوپراکسید دسموتاز
ماده آلی	۲	۳/٦۲۳**	۲۰۷۳٦**	۳/۸۰*
عنصر (کادمیوم- کروم)	۲	٥/٤٥٦۰**	۱۳٤۸۳۲**	۱۲٥۳**
ماده آلی* عنصر سنگین	٤	٤/۱۹۲*	٥/٥۸٥۹**	۲/٤۸۱**

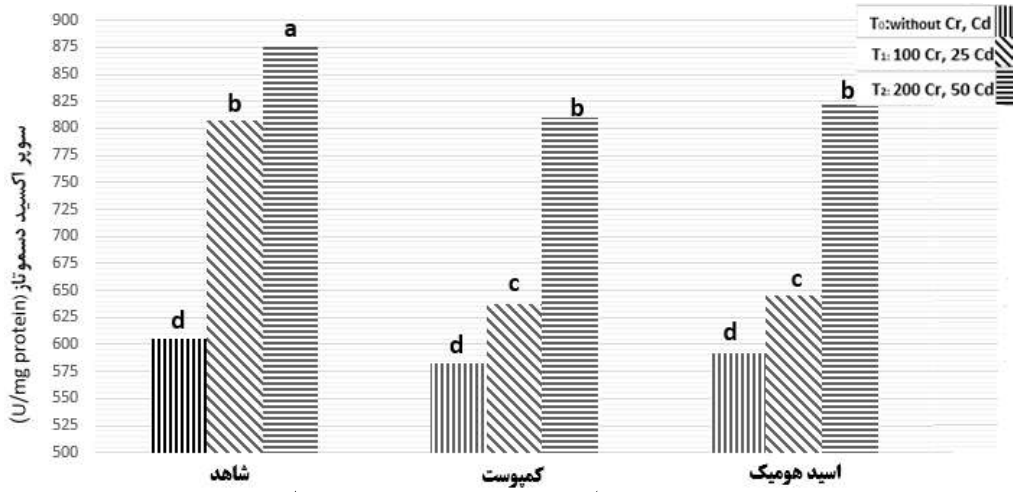
**، * و ns به ترتیب معنی داری در سطح ۱% و ۵% وغیر معنی داری

بررسی اثر متقابل ماده آلی و کادمیوم-کروم بر محتوی پروتئین (شکل ۱) نشان داد که افزایش غلظت عناصر سنگین در هر سه تیمار ماده آلی باعث کاهش محتوی پروتئین در گیاه شد. کاهش محتوی پروتئین در تیمار بدون کاربرد ماده آلی بیشتر بود. بیشترین مقدار محتوی پروتئین در تیمار کاربرد هومیک اسید و بدون کاربرد عنصر سنگین مشاهده شد. میزان کاهش در محتوی پروتئین بین سطوح مختلف کروم و کادمیوم در تیمار کنترل، کاربرد کمپوست و کاربرد هومیک اسید به ترتیب ۷۴، ۴۸ و ۵۰ درصد بود.. به طور کلی با افزایش غلظت کروم و کادمیوم محتوی پروتئین در هر سه حالت شاهد، کاربرد کمپوست و کاربرد هومیک اسید به صورت معنی داری کاهش نشان داد. کاهش محتوی پروتئین تحت اثر غلظت های بالای عناصر سنگین می‌تواند به دلیل افزایش سنتز بعضی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت، سنتز آنزیم پروتئاز وپلی‌پپتیدهای درگیر در سیستم دفاعی و کاهش فتوسنتز باشد. شاو و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که تنش عناصر سنگین باعث افزایش اکسیژن فعال شده و این ترکیب از طریق فرآیندهای اکسید کنندگی محتویات سلول، اثرات مخرب جدی بر گیاه می گذارد که نتیجه آن پیری زودرس، تخریب کلروفیل و کاهش فتوسنتز، پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء، اکسیداسیون پروتئین است.



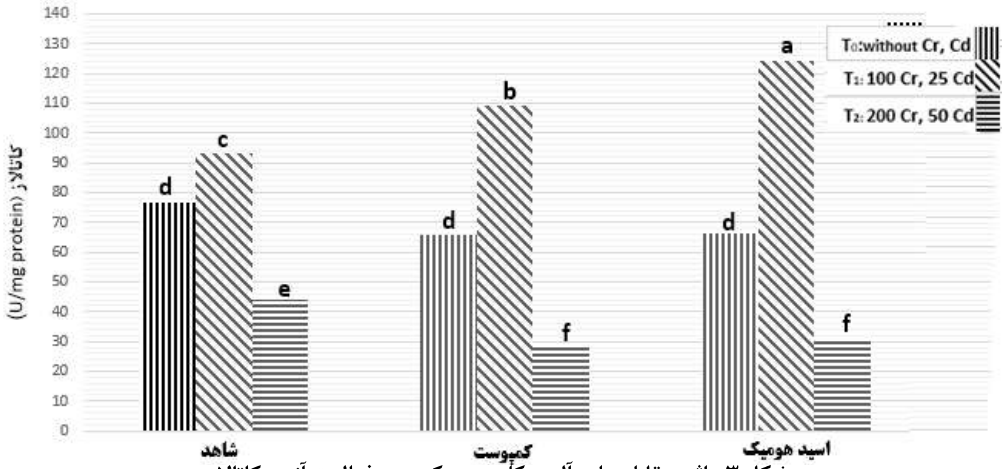
شکل ۱- اثر متقابل ماده آلی و کادمیوم-کروم بر محتوی پروتئین در گیاه ذرت

آنزیم سوپراکسید دیسموتاز حمایت کننده ی گیاهان در شرایط تنش فلزات سنگین، برای مقابله با گونه های فعال اکسیژن (ROS) تولیدی در شرایط تنش می باشد. با توجه به شکل ۲ که نشان دهنده ی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) است، با افزایش غلظت کادمیوم و کروم در خاك میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش یافت. عناصر سنگین سبب القاء فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانت مذکور در گونه مورد مطالعه بسته به میزان غلظت فلز شده است، به طوری که بیشترین فعالیت این آنزیم در بالاترین سطح سمیت کادمیوم و کروم در تیمار شاهد مشاهده شد. کاربرد مواد آلی اثر سمیت عناصر سنگین را کاهش داد اما اختلاف معنی دار بین کاربرد کمپوست و هومیک اسید مشاهده نشد. در حالت عدم سمیت با عناصر سنگین در هر سه تیمار شاهد، کاربرد کمپوست و کاربرد هومیک اسید اختلاف معنی داری در میزان فعالیت SOD دیده نشد. به نظر می رسد که فعال شدن آنزیم های دسموتاز و کاتالاز در پاسخ به اثرات مخرب اکسیژن های تولید شده ناشی ازتنش عناصر سنگین می باشد. کنترل سطح اکسیژن های مخرب توسط این آنزیم ها در شرایط ماندگار مکانیزم حفاظتی مهمی در مقابل تنش اکسیدی در سلول می باشد زیرا ترکیبات به عنوان پیشگامی برای مشتقات سمی تر یا فعال تر عمل می کنند (خاتون و همکاران، ۲۰۰۸).



شکل ۲- اثر متقابل ماده آلی و کادمیوم-کروم بر بر فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز

کاتالاز آنزیمی مهم در قبال تنش اکسیداتیو است. این آنزیم یک نماینده عمومی برای اکسیدورودکتاز است که H_2O_2 را به آب و مولکول های اکسیژن تجزیه می کند. در تحقیق حاضر فعالیت کاتالاز در غلظت های پایین کادمیوم (۲۵ میلیگرم در کیلوگرم) و کروم (۱۰۰ میلیگرم در کیلوگرم) به طور معنی داری افزایش نشان داد (شکل ۳) که احتمالا نشان دهنده تجزیه H_2O_2 و پراکسیدهای سمی به وسیله کاتالاز می باشد. با افزایش غلظت عناصر کروم و کادمیوم کاهش معنی داری در فعالیت کاتالاز مشاهده شد و شاید نشان دهنده آن باشد که در غلظتهای بالای عناصر سنگین کاتالاز قادر به حفاظت کردن از سلول در برابر گونه اکسیژن آزاد نباشد. در غلظت بالای کادمیوم و کروم تفاوت معنی داری بین کاربرد کمپوست و هومیک اسید در فعالیت کاتالاز مشاهده نشد. ورما و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که کاتالاز نسبت به کادمیوم حساس تر از سوپر اکسید دسموتاز است. کاهش در فعالیت کاتالاز نشان دهنده ی محدودیت توانایی این آنزیم در کاهش و حذف اکسیژن فعال است. در غظت بالای عناصر سنگین سنتز کاتالاز کاهش می یابد.



شکل ۳- اثر متقابل ماده آلی و کادمیوم-کروم بر فعالیت آنزیم کاتالاز

منابع

احیائی،م.، ع. اصغرزاده. ۱۳۷۰ . شرحروشهایتجزیهشیمیاییخاك . نشریهفنیشماره ۹۸۳.موسسهتحقیقاتخاکوآب.تهران. ایران.
امامی، ع. ۱۳۷۵. روشهای تجزیه گیاه. جلد اول. نشریه فنی شماره ۹۸۲. موسسه تحقیقات خاک و آب.
Ali, B. M. P. Vajpayee, R. D. Tripathi, U. N. Rai, S. N. Singht, S. P. Singhg.۲۰۰۹. Phytoremediation of lead, nickel and copper by salix acmophylla boiss: Role of Antioxidant Enzymes and Antioxidant substances. Bull. Environ Contam. Toxicol.۷۰:۴۶۲-۴۶۹.

Bradford, M.۱۹۷۶. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. ۷۲ : ۲۴۸-۲۵۴.
Chance. b. and a. c. maehly. ۱۹۵۵. assay of catalase and peroxidases. Methods enzymol. ۲ : ۷۶۴-۷۷۵.
Davranche, M. and Bollinger, J. C. ۲۰۰۰. Heavy Metals desorption from synthesized and natural iron and manganese oxyhdroxides, Effect of reducing condition. Journal of.colloid and Interface science, ۲۲۷: ۵۳۱-۵۳۹.
Groppa, M.D., M.L. Tomaro., M.P. Benarides. ۲۰۰۷. Polyamines and heavy metal stress : the antioxidant behavior of spermine in cadmium and copper treated wheat leaves. Biometals, ۲۰ :۱۸۵-۱۹۵.
Khatun, S., M. Babar Ali, E.J. Hahn, K.Y. Paek. ۲۰۰۸. Copper toxicity in withania somnifera: Growth and antioxidant enzymes response of in vitro grown plants. Environmental and Experimental Botany, ۶۴ : ۲۷۹-۲۸۵. Prasad. Heavy metal in plants. ۲th edition. Narosa publishing house. India. Pp. ۸۵-۱۲.
Mittler, R., ۲۰۰۲. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science, ۷ : ۴۰۵-۴۱۰.
Sharma, A., B. n. Johri, A. K. Sharma and B. R. Glick. ۲۰۰۵. Plant growth promoting bacterium Pseudomonos sp. Strain GRP۳ influences iron acquisition in mungbean. Soil Biol. ۳۵ : ۸۸۷-۸۹۴.
Shaw, B.P., S.K. Sahu, and R.K. Mishra. ۲۰۱۰. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: M.N.V.
Verma S, Dubey RS (۲۰۰۳) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci ۱۶۴ : ۶۴۵-۶۵۵.

Abstract

The effect of Compost and Humic acid on soluble protein content and activity of superoxide dismutase and catalase enzymes in Zea maize in contaminated soil with cadmium (۰, ۵۰ and ۱۰۰ppm) and Chromium (۰, ۱۰۰ and ۲۰۰ppm) were investigated. The study was laid out in a randomized complete block design with ۳ replicates. Results indicated that increasing of heavy metals concentration decreased protein content in three treatment of organic matter. Heavy metals (Cd and Cr) increased SOD activity so that Highest among of SOD activity observed in high level of heavy metals. CAT activity increased in low concentration of Cr and Cd which shows a significant reaction but in high concentration of this elements CAT activity decreased.