

## تعیین غلظت کشندگی میانی نیترات نقره و تاثیر آن بر پاسخ‌های رفتاری میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

عبدالرزاق سیاهویی<sup>۱</sup>، سراج بیتا<sup>۱\*</sup>، جواد قاسم‌زاده<sup>۱</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

### چکیده

امروزه رهاسازی مداوم آلاینده‌های زیست‌محیطی به بوم‌سازگان‌های آبی، این محیط‌ها را به شدت آسیب‌پذیر نموده و آن‌ها را به انباری برای این مواد سمی مبدل ساخته است، بنابراین بررسی اثرات این آلاینده‌ها بر آبزیان ضروری می‌باشد. مطالعه حاضر با هدف تعیین میزان سمیت نیترات نقره و مشاهده تغییرات رفتاری میگوی وانامی طی مواجهه با آن انجام شد. برای تعیین سمیت از روش استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی استفاده شد. در ابتدا توان زیستی و بقاء میگوی وانامی پس از دو هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاه بررسی شد، سپس با انجام آزمایشات مقدماتی، مقادیر واقعی حدکشندگی نیترات نقره بدست آمد. به منظور تعیین غلظت کشندگی میانی، میگوها به مدت ۹۶ ساعت در معرض غلظت‌های ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره قرار گرفتند و تلفات آن‌ها به صورت روزانه هر ۲۴ ساعت ثبت شد و میزان غلظت کشندگی میانی، غلظت بدون اثر بازدارنده، حداقل غلظت موثر و حداکثر غلظت مجاز بر اساس میزان تلفات محاسبه شد. طی آزمایش توان زیستی و بقاء هیچ گونه تلفاتی تا ۹۶ ساعت مشاهده نشد و مقدار بقاء میگوها ۱۰۰٪ بود. میزان غلظت کشندگی میانی، غلظت بدون اثر بازدارنده، حداقل غلظت موثر و حداکثر غلظت مجاز به ترتیب برابر با ۰/۰۸۴، ۰/۰۲، ۰/۰۲۵ و ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. در غلظت‌های مختلف نیترات نقره، میگوها رفتارهایی از قبیل شنای غیر طبیعی، حرکات سریع پاهای شنا، آمدن به سطح آب، پیچیدن بدن به دور خود و در نهایت از دست دادن تعادل نشان دادند.

**کلید واژه‌ها:** فلزات سنگین، سمیت، نیترات نقره، میگوی وانامی

### مقدمه

در محیط‌های دریایی، آلودگی با فلزات سنگین به دلیل ایجاد سمیت برای موجودات زنده، اثرات بالقوه بوم‌شناختی، منابع وسیع، پایداری، تجزیه ناپذیری، تجمع زیستی، نیمه عمر طولانی زیستی و ایمنی عمومی مواد غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۱]. در نتیجه‌ی پیشرفت سریع اقتصادی و توسعه صنعتی، آلودگی فلزات سنگین شدیدتر شده و به یکی از مشکلات زیست محیطی بزرگ در سطح جهانی تبدیل شده است [۲]. یون نقره پس از جیوه به عنوان یکی از سمی‌ترین اشکال فلزات سنگین محسوب می‌شود که به دلیل خواص ضدباکتریایی و ضد قارچی به‌طور گسترده‌ای در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد و رهاسازی آن در محیط‌های آبی تهدید بزرگی برای آبزیانی مانند ماهی، میگو و صدف‌ها به شمار می‌رود [۳]. نیترات نقره یکی از مهم‌ترین فرم‌های نقره برای آزمایش سمیت موجودات آبی می‌باشد [۴]. که برای این منظور از بی‌مهرگان آبی مانند صدف‌ها، میگو یا خرچنگ می‌توان برای تخمین آلودگی شیمیایی و بیولوژیکی دریایی استفاده کرد [۵]. آزمایش غلظت کشندگی برای اندازه‌گیری حساسیت و پتانسیل بقای حیوانات در برابر مواد سمی خاص مانند فلزات سنگین انجام می‌شود [۳]. مطالعات متعددی در زمینه تعیین غلظت کشندگی میانی فلزات سنگین در سخت پوستان انجام شده است، به طوری که غلظت کشندگی میانی روی طی ۹۶ ساعت

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۹/۱۰

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲

\*نویسنده مسول:

serajbita@yahoo.com

مواجهه در میگوی سفید (*Penaeus setiferus*)، به میزان ۴۳/۸۷ میلی‌گرم در لیتر [۶]، در میگوی وانامی ۱/۳۵ میلی‌گرم در لیتر [۷]، در میگوی صورتی (*Farfantepenaeus paulensis*) ۳/۳۱ میلی‌گرم در لیتر [۸]، غلظت کشندگی میانی جیوه در میگوی لکه صورتی (*Farfantepenaeus brasiliensis*) به میزان ۰/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر [۹]، غلظت کشندگی میانی نیترات سرب در خرچنگ منزوی (*Diogenes avarus*) به میزان ۱۸۴/۰۴۵ میلی‌گرم در لیتر [۱۰] و غلظت کشندگی نیترات نقره در گاماروس دریاچه خزر (*Pontogammarus maeoticus*) نیز به میزان ۵/۷۸ میلی‌گرم در لیتر [۱۱] گزارش شد. میگوی وانامی به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در جهان بوده و یکی از محصولات عمده صادراتی در کشورهای جنوب شرق آسیا و همچنین منبع تغذیه‌ای بسیار مهم برای انسان است، از این رو هرگونه اثر منفی این صنعت نه تنها بر اقتصاد کشور بلکه بر سلامت انسان نیز تأثیر می‌گذارد [۱۲، ۱۳]، از این رو مطالعه حاضر با هدف بررسی سمیت حاد نیترات نقره بر میگوی وانامی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### تهیه میگو و آماده‌سازی محیط آزمایشگاهی

تعداد ۵۰۰ قطعه پست لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannami*) با وزن متوسط  $3/28 \pm 0/45$  گرم در سال ۱۳۹۶ از مرکز تکثیر میگو ستندرف بندر جاسک تهیه و با استفاده از مخازن مخصوص حمل و نقل آبزیان و کپسول اکسیژن، همراه با هوادهی مداوم به بخش تکثیر و پرورش آبزیان مرکز تحقیقات شیلات چابهار منتقل شدند. جهت ذخیره‌سازی پست لارو میگوها و انجام آزمایشات سمیت کشنده از مخازن پلاستیکی مستطیلی شکل با حجم ۷۰ لیتری با حجم آب حدود ۶۰ لیتر در هر مخزن استفاده شد. هوادهی در طول مدت نگهداری به صورت مداوم انجام شد. در طول دوره آزمایش پارامترهای کیفی آب شامل pH، شوری و دمای آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شدند. این پارامترها طی اجرای آزمایشات سمیت کشنده و بقاء و نیز در مدت سازش‌پذیری ثابت در نظر گرفته شدند و مقدار آن‌ها به ترتیب برابر با  $7/54 \pm 0/20$ ،  $33/1 \pm 0/18$  و  $25 \pm 0/86$  ثبت شد.

### سازش‌پذیری میگوها با شرایط آزمایشگاه

میگوهای مورد استفاده در این تحقیق برای سازگاری با شرایط جدید به مدت دو هفته در مخازن پلاستیکی ۷۰ لیتری با تراکم ۵۰ قطعه میگو در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. در طی دوره سازش‌پذیری میگوها با غذای تجاری هوراش آغازی، ۲۰۰۱ به میزان ۳ درصد وزن بدن و سه بار در روز تغذیه شدند. هوادهی در مخازن برای تامین اکسیژن مورد نیاز میگوها بصورت ملایم و مداوم انجام می‌شد. درصد تعویض آب روزانه ۱۵٪ بود [۱۴].

### آزمایشات توان زیستی و بقاء پست لارو میگو

قبل از انجام آزمایشات سمیت، ابتدا وضعیت بقاء و توان زیستی میگوها در شرایط مشابه با شرایط آزمایشات سمیت (بدون افزودن نیترات نقره) بررسی شد. در این آزمایش هیچ گونه عامل متغیر مستقلی وجود نداشت، اما از نظر شرایط نگهداری و پرورشی مشابه شرایط آزمایشات تعیین LC<sub>50</sub> بود. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. بدین منظور ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش، تغذیه میگوها قطع شد و میگوها با تراکم ۱۰ عدد پست لارو در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. کلیه مخازن هر ۲۴ ساعت یکبار جهت تعیین درصد بقاء بررسی می‌شدند. مدت زمان این آزمایش ۹۶ ساعت و مشابه مدت زمان آزمایشات سمیت حاد و تعیین LC<sub>50</sub> بوده است [۱۵].

تعیین محدوده کشندگی (RFT)<sup>۱</sup>

پس از انجام آزمایش توان زیستی و بقاء در میگوها و اطمینان از سالم بودن آنها اقدام به انجام آزمایشات سمیت جهت محاسبه غلظت کشندگی میانی (LC<sub>50</sub>) شد، اما از آنجایی که تاکنون مقادیر دقیق غلظت حد کشندگی نیترات نقره در میگوی پا سفید غربی تعیین نشده و محدوده کشندگی آن بر این گونه میگو مشخص نبوده، بنابراین جهت تعیین غلظت کشندگی حاد نیترات نقره ابتدا تست تعیین محدوده کشندگی نیترات نقره بر میگوهای مورد مطالعه انجام شد و سپس آزمایشات بعدی جهت تعیین غلظت متوسط کشندگی (LC<sub>50</sub>) انجام شدند. محدوده کشندگی بر اساس اولین (کمترین) غلظتی که در مدت ۹۶ ساعت، تلفات در آن مشاهده می شود و اولین غلظتی که ۱۰۰٪ تلفات را در پی دارد، تعیین می گردد [۱۶]. برای تعیین محدوده کشندگی در هر مخزن پرورشی تعداد ۱۰ قطعه میگو ذخیره سازی شد و شرایط آزمایش همانند شرایط آزمایش بقاء فراهم گردید. سپس غلظت بالایی از نیترات نقره (۱ میلی گرم در لیتر) انتخاب و به اولین مخزن اضافه و در مخازن بعدی نیز به صورت صعودی اضافه شد. آزمایشات در سه تکرار برای هر غلظت انجام شد، سپس تلفات در طی ۴ روز در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مواجهه با نیترات نقره ثبت گردید [۱۷].

تعیین غلظت کشندگی میانی (LC<sub>50-96h</sub>)

غلظت کشندگی میانی نیترات نقره در میگوها طی مدت زمان ۹۶ ساعت مواجهه طبق روش استاندارد سازمان همکاری و توسعه اقتصادی (OECD)<sup>۲</sup> انجام شد [۱۷]. در این روش اجرای آزمایشات به صورت ساکن بوده و میزان مرگ و میر هر ۲۴ ساعت یکبار در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت می شود. برای تعیین LC<sub>50-96h</sub> تعداد ۱۰ قطعه میگو در هر مخزن ذخیره سازی شد. پس از انجام آزمایشات لازم برای تعیین محدوده کشندگی، محدوده بدست آمده مورد نظر به ۶ قسمت با غلظت های ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۰/۸ میلی گرم در لیتر نیترات نقره تقسیم گردیده و آزمایش تعیین غلظت کشندگی میانی یا LC<sub>50</sub> در سه تکرار با غلظت های به دست آمده انجام شد و میزان تلفات طی ۹۶ ساعت مواجهه هر ۲۴ ساعت یکبار ثبت شد. بعد از ثبت تلفات، میانگین غلظتی از نیترات نقره که در طول این دوره زمانی قادر به ایجاد ۵۰٪ تلفات در میگوهای مورد مطالعه بود محاسبه شده و میزان LC<sub>50</sub> طی ۹۶ ساعت مواجهه بدست آمد. پس از به دست آوردن میزان تلفات، میانگین هر سه تکرار با استفاده از آزمون پروبیت در نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ محاسبه و میزان LC<sub>10</sub>، LC<sub>50</sub> و LC<sub>90</sub> نیترات نقره در میگوها در زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با حدود اطمینان ۹۵٪ مشخص گردید. همچنین غلظت بدون اثر بازدارنده (NOEC) و حداقل غلظت موثر (LOEC) نیز تعیین گردیده و حداکثر غلظت مجاز نیز بعد از تعیین ۵۰٪ غلظت کشنده ۹۶ ساعته و تقسیم آن بر عدد ۱۰ محاسبه شد. در طول هر دو آزمایش مقدماتی و تعیین LC<sub>50</sub>، حرکات و پاسخ های رفتاری میگوها از جمله حرکات شنا، از دست دادن تعادل، آمدن به سطح آب و پرش از سطح، استراحت در کف و سایر حرکات و رفتارها، مورد بررسی قرار گرفتند.

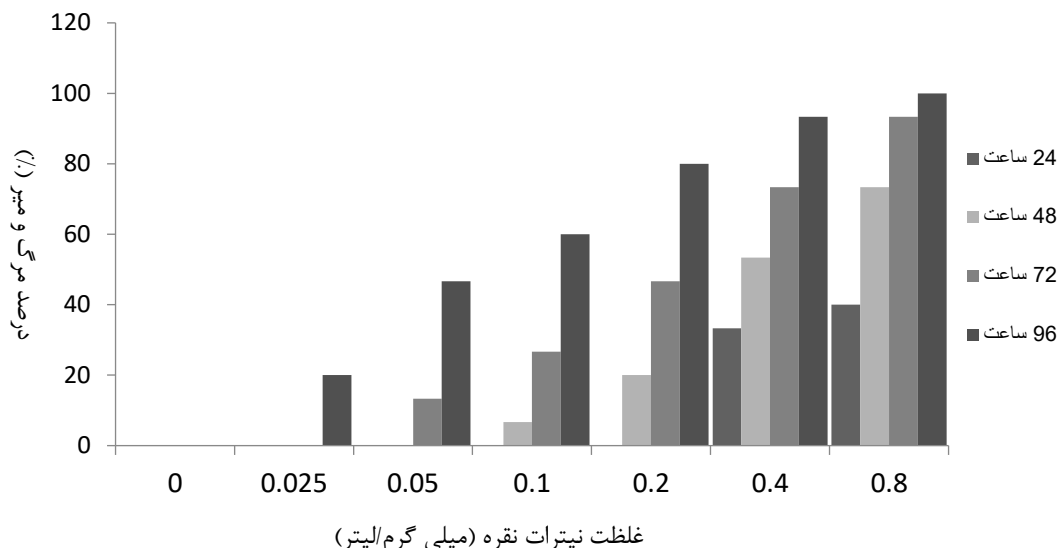
## نتایج

## یافته های حاصل از آزمایشات بقاء و سمیت حاد

آزمایشات بقاء به منظور اطمینان از سلامتی میگوها انجام شد و نشان داد که تا ۹۶ ساعت پس از نگهداری میگوها، هیچ گونه تلفاتی مشاهده نشد و مقدار بقاء ۱۰۰٪ بوده است. در طی آزمایشات تعیین محدوده کشندگی در میگوها، بلافاصله پس از افزودن نیترات نقره تلفات در غلظت های بالا آغاز شد و در بقیه غلظت ها نیز این تلفات به صورت تدریجی مشاهده شد. همان طوری که در شکل ۱ مشاهده می شود تلفات در تیمار شاهد تا زمان ۹۶ ساعت و در غلظت ۰/۰۲۵ میلی گرم در لیتر نیترات نقره تا زمان ۷۲ ساعت صفر بود. در غلظت ۰/۰۲۵ که کمترین غلظت انتخابی جهت تست سمیت انتخاب شد اولین تلفات میگوها در زمان ۹۶ ساعت اتفاق افتاد (شکل ۱). اولین تلفات در زمان ۲۴ ساعت مربوط به غلظت های ۰/۴ و ۰/۸ بوده است و در بقیه غلظت ها تلفات بعد از ۲۴ ساعت اتفاق افتاد. طبق شکل ۱، در غلظت ۰/۸ میلی گرم در لیتر نیترات نقره تلفات در تمام

<sup>1</sup>Range Finding Toxicity Test<sup>2</sup>Organisation for Economic Co-operation and Development

زمان‌ها نسبت به بقیه غلظت‌ها بالاتر بوده است به طوری که در زمان ۹۶ ساعت در همین غلظت ۱۰۰٪ تلفات مشاهده شد، هر چند که در بقیه غلظت‌ها نیز با گذشت زمان میزان تلفات افزایش داشته است اما به ۱۰۰٪ نرسید.



شکل ۱. میزان مرگ و میر میگوی پا سفید غربی طی مواجهه با غلظت‌های مختلف نیترات نقره

در جدول ۱، نتایج غلظت کشندگی نیترات نقره شامل  $LC_{10-99}$  به صورت خطای استاندارد  $\pm$  میانگین در زمان‌های مختلف بیان شده‌اند که در زمان ۹۶ ساعت میزان  $LC_{10}$ ،  $LC_{30}$ ،  $LC_{50}$  و  $LC_{99}$  محاسبه گردید. نتایج حاصل از تعیین  $LC_{50}$  در میگوی پا سفید غربی طی مواجهه با نیترات نقره نشان داد که میزان آن در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به ترتیب  $0.079 \pm 0.066$ ،  $0.052 \pm 0.066$ ،  $0.03 \pm 0.066$  و  $0.084 \pm 0.066$  میلی گرم در لیتر می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱. غلظت کشندگی ( $LC_{10-99}$ ) نیترات نقره در میگوی پا سفید غربی

غلظت کشنده	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته	۷۲ ساعته	۹۶ ساعته
$LC_{10}$	$0.034 \pm 0.066$	$0.1 \pm 0.055$	$0.08 \pm 0.067$	$0.03 \pm 0.017$
$LC_{30}$	$0.06 \pm 0.066$	$0.35 \pm 0.055$	$0.15 \pm 0.067$	$0.07 \pm 0.017$
$LC_{50}$	$0.079 \pm 0.066$	$0.52 \pm 0.055$	$0.3 \pm 0.067$	$0.084 \pm 0.017$
$LC_{70}$	$0.097 \pm 0.066$	$0.69 \pm 0.055$	$0.44 \pm 0.067$	$0.18 \pm 0.017$
$LC_{90}$	$0.124 \pm 0.066$	$0.93 \pm 0.055$	$0.65 \pm 0.067$	$0.32 \pm 0.017$
$LC_{99}$	$0.16 \pm 0.066$	$1.27 \pm 0.055$	$0.94 \pm 0.067$	$0.51 \pm 0.017$

در طی مرحله آزمایشات سمیت حاد مقادیر حداکثر غلظت مجاز (MATC) نیترات نقره، حداقل غلظت موثر (LOEC)<sup>۳</sup> و غلظت بی اثر نیترات نقره (NOEC)<sup>۴</sup> برای میگوی پا سفید غربی نیز محاسبه شد که طبق نتایج میزان هر کدام از آن‌ها در طی ۹۶ ساعت، به ترتیب  $0.0084$ ،  $0.025$ ،  $0.02$  میلی گرم در لیتر تعیین شد (جدول ۲).

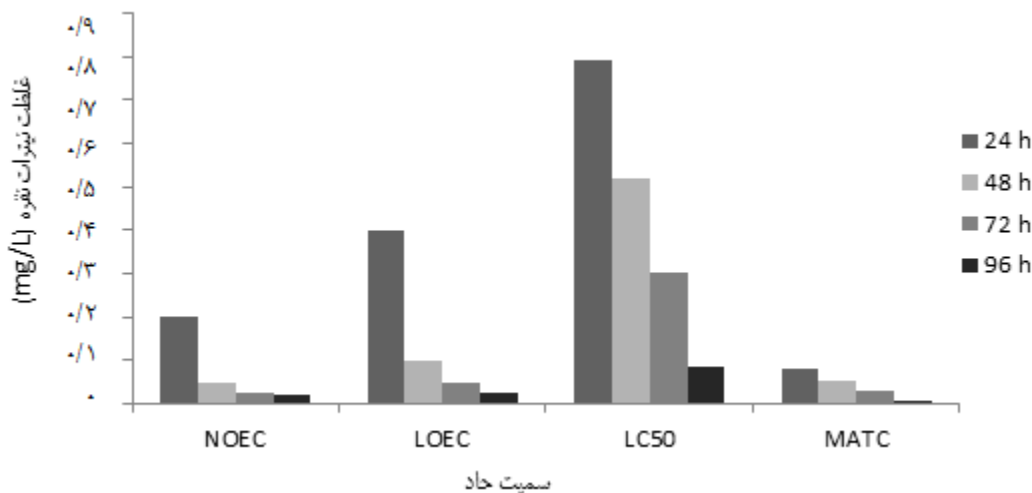
جدول ۲. مقادیر LOEC، NOEC و MACT میگوی پا سفید غربی طی ۹۶ ساعت مواجهه با نیترات نقره

LOEC (mg/L)	NOEC (mg/L)	MATC (mg/L)
$0.025$	$0.02$	$0.084$

<sup>۲</sup>Lowest Observed Effect Concentration

<sup>۳</sup>No-Observed Effect Concentration

همچنین مقادیر حداقل غلظت موثر و غلظت بی اثر نانوذرات نقره و حداکثر غلظت مجاز در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نیز محاسبه شده و مقایسه آنها با  $LC_{50}$  در شکل ۲ آمده است. طبق این شکل شاخص NOEC و LOEC با گذشت زمان مواجهه، کاهش داشته است اما میزان  $LC_{50}$  و MATC با گذشت زمان افزایش داشته است.



شکل ۲. مقایسه نتایج تست‌های مختلف مواجهه با نیترات نقره در میگوی پا سفید غربی طی زمان‌های مختلف

### مشاهدات پاسخ‌های رفتاری میگوها پس از مواجهه با نیترات نقره

از نظر مشاهدات رفتاری در تیمار شاهد، میگوها دارای پاسخ‌های رفتاری کاملاً طبیعی و یکسان بودند. اما در تیمارهای مختلف نیترات نقره پس از اضافه نمودن نیترات نقره برخی از پاسخ‌های رفتاری غیر طبیعی در میگوها مشاهده شد که بسته به غلظت نیترات این علائم و رفتارها از نظر شدت و میزان متفاوت بودند (جدول ۳). در غلظت‌های بالا، بیشتر این علائم و پاسخ‌های رفتاری غیرعادی معمولاً در همان ساعات اولیه و همچنین پس از گذشت ۲۴ ساعت و در غلظت‌های پایین پس از گذشت ۴۸ ساعت مشاهده شده‌اند. همچنین طبق این جدول با افزایش غلظت نیترات نقره، عملاً رفتار غیرعادی میگوها نیز افزایش یافته است.

جدول ۳. پاسخ رفتاری مشاهده شده در میگوی پا سفید غربی طی آزمایش تعیین غلظت کشندگی میانی

غلظت نیترات						پاسخ رفتاری
۰/۸	۰/۴	۰/۲	۰/۱	۰/۰۵	۰/۰۲۵	
خیلی زیاد	متوسط	کم	خیلی کم	-	-	شنای غیرطبیعی
زیاد	کم	خیلی کم	-	-	-	جهش ناگهانی
خیلی زیاد	زیاد	زیاد	خیلی کم	-	-	حرکات سریع پاهای شنا
خیلی زیاد	متوسط	متوسط	کم	کم	کم	آمدن به سطح آب
کم	-	-	-	-	-	پرش به خارج از آب
زیاد	متوسط	کم	خیلی کم	-	-	تجمع در اطراف سنگ هوا
زیاد	متوسط	متوسط	کم	-	-	سستی و بی حالی
متوسط	کم	کم	خیلی کم	خیلی کم	خیلی	تعداد میگوهای پوست
خیلی زیاد	زیاد	-	-	-	-	پیچیدن بدن به دور خود
زیاد	متوسط	خیلی کم	-	-	-	از دست دادن تعادل

علامت - (منفی) به معنای عدم مشاهده علائم و پاسخ رفتار غیرطبیعی است.

## بحث

### آزمایشات سمیت حاد

آزمایشات سمیت حاد نشان‌دهنده یک روش استاندارد برای کمی‌سازی و مقایسه سمیت نسبی آلاینده‌ها هستند [۱۸]. در تحقیق حاضر در میگوهای مواجهه شده با نیترات نقره، با افزایش غلظت نیترات نقره و افزایش زمان مواجهه درصد تلفات افزایش داشت. مطابق با نتایج مطالعه حاضر در مطالعه‌ای توسط Lam و همکاران [۱۶] در میگوی وانامی بیشترین میزان تلفات در مواجهه با بالاترین غلظت نانوذرات نقره (۱۲۵ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد. همان‌طور که در بخش نتایج عنوان شد، بالاترین میزان تلفات، در غلظت‌های بالا و همچنین مربوط به زمان ۹۶ ساعت بوده است و پایین‌ترین میزان تلفات نیز مربوط به زمان ۲۴ ساعت می‌باشد که نشان می‌دهد افزایش غلظت نیترات نقره و گذشت زمان سبب افزایش درصد مرگ و میر می‌شود، زیرا یکی از عوامل تأثیرگذار در مسمومیت آبزیان عامل زمان است. هنگامی که ماهی و یا سایر آبزیان در معرض غلظت ثابتی از سم باشند، به مرور زمان هم مقاومت موجود تحلیل می‌رود و هم سم فرصت بیشتری برای تأثیرگذاری روی آن دارد. علاوه بر این در مواردی تجمع سم در بافت‌های آبزیان نیز باعث افزایش تأثیر سوء آن بر بدن آبزی و در مدت ۹۶ ساعت انجام آزمایش‌ها موجب پایین آمدن میزان غلظت کشندگی میانی می‌شود [۱۹]. در مواجهه میگوی پا سفید غربی با نیترات نقره، غلظت کشندگی میانی (LC<sub>50</sub>) طی ۹۶ ساعت ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. بیشتر مطالعات انجام شده در زمینه غلظت کشندگی میانی بر روی فلزاتی از قبیل جیوه، سرب، مس، سایر فلزات سنگین و همچنین نانوذرات فلزی بر روی ماهی و برخی از گونه‌های میگو می‌باشد. خسروی کتولی و همکاران [۲۰] غلظت کشندگی میانی نیترات نقره در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) را ۰/۱۵ میلی‌گرم در لیتر گزارش نمودند. در مطالعه Doleželová و همکاران [۲۱]، غلظت کشندگی میانی (LC<sub>50</sub>) در ماهی زبرا (*Danio rerio*) و گویی (*Poecilia reticulata*) طی ۹۶ ساعت مواجهه با نیترات نقره به ترتیب ۱۵ و ۱۷/۱۴ میکروگرم در لیتر تعیین شد که نشان از سمیت بالای آن برای این دو گونه می‌باشد. مقایسه نتایج مطالعه حاضر با مطالعات سایر محققین از جمله Lam و همکاران [۱۶] که در آن غلظت کشندگی نانوذرات نقره در میگوی وانامی ۳۵/۵ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد، نشان می‌دهد که نیترات نقره برای میگوی وانامی در مقایسه با سایر آبزیان و همچنین نسبت به بقیه فرم‌های نقره به شدت سمی می‌باشد. زیرا سمیت نیترات نقره به دلیل حضور یون آزاد نقره یا Ag<sup>+</sup> است و سایر فرم‌های نقره کمتر سمی هستند [۲۲]. همچنین Hogstrand و Wood [۲۳] در مطالعه‌ای دریافتند که سمیت نیترات نقره برای ماهیان دریایی در مقایسه با آب شیرین بسیار کمتر است. در مطالعه آن‌ها میزان LC<sub>50</sub> در ماهیان دریایی در محدوده ۲۷۰۰-۳۳۰ میکروگرم در لیتر و برای ماهیان آب شیرین به میزان ۷۰-۵ میکروگرم در لیتر تعیین گردید. اختلاف در میزان LC<sub>50</sub> در مطالعات مختلف با مطالعه حاضر را می‌توان به دلیل تفاوت در نوع و گونه مورد بررسی، غلظت و زمان مواجهه، شرایط آزمایش، وضعیت فیزیولوژیکی گونه، سن دانست. همچنین میکروارگانسیم‌های مختلف حساسیت متفاوتی نسبت به سمیت نقره دارند [۲۴]. Davies و همکاران [۲۵] غلظت کشندگی میانی نیترات نقره در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) را در آب سخت و نرم به ترتیب ۱۳ و ۶/۵ میکروگرم در لیتر محاسبه کردند که نشان می‌دهد حتی شرایط فیزیوشیمیایی آب نیز می‌تواند بر روی سمیت این فلز اثرگذار باشد. در ماهی آبشش آبی (*Lepomis macrochirus*) میزان آن ۶۰ میکروگرم در لیتر [۲۶] و در ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*) ۶/۷ میکروگرم در لیتر [۲۷] و در مطالعه‌ای دیگر در همین گونه ۹/۷-۵/۶ میکروگرم در لیتر تعیین شد [۲۸]. نتایج بدست آمده از مقادیر حداکثر غلظت مجاز نیترات نقره، حداقل غلظت موثر (LOEC) و غلظت بی اثر نیترات نقره (NOEC) و همچنین غلظت کشندگی (LC<sub>50</sub>) نشان داد که میزان NOEC و LOEC با گذشت زمان مواجهه کاهش و میزان LC<sub>50</sub> و MATC با گذشت زمان افزایش داشته است که نشان می‌دهد غلظت کمتری از نیترات نقره برای تأثیرگذاری بر میگوها در زمان‌های بالاتر در مقایسه با زمان‌های کمتر مورد نیاز است. در مطالعه‌ای توسط نقشبندی و عسکری حسنی [۲۹] میزان LC<sub>50</sub> سم گلایفوزیت در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب ۳۶/۰۹، ۳۱/۴۶، ۲۱/۷۸ و ۲۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر و میزان NOEC، LOEC و MATC به ترتیب ۶/۶۶،

۴/۷۳ و ۲/۰۰۵ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد که مطابق با نتایج مطالعه حاضر در این مطالعه نیز مشاهده شد که با افزایش زمان مواجهه، به غلظت کمتری از سموم جهت تاثیرگذاری بر آبزیان مورد نیاز است.

### مشاهدات پاسخ‌های رفتاری

مطالعات متوالی زیادی در پایش و بررسی پاسخ‌های رفتاری ماهیان انجام شده که نشان داده بررسی این تغییرات رفتاری روش مناسبی جهت ارزیابی سلامت محیط، حضور آلاینده‌ها و مواد سمی در محیط زیست جانور است [۳۰، ۳۱، ۳۲]. در مطالعه حاضر علائم و پاسخ‌های رفتاری مشاهده شده در میگوها در غلظت‌های مختلف نیترات نقره و زمان‌های مختلف متفاوت بود. بر اساس مشاهدات در تیمار شاهد هیچ نوع پاسخ رفتاری غیرعادی در میگوها مشاهده نشد اما در بقیه تیمارها به‌خصوص در آزمایش تعیین محدوده کشندگی که در آن از غلظت‌های بالای نیترات نقره استفاده شد، پاسخ رفتاری غیرعادی در میگوها بلافاصله پس از اضافه نمودن نیترات نقره مشاهده شد که شامل حرکاتی از قبیل شنای سریع، آمدن به سطح آب و پرش به بیرون و عدم تعادل در شنا بود، که نشان می‌دهد در مقایسه با گروه شاهد تنها فاکتور تاثیرگذار بر میگوها که سبب بروز چنین رفتار غیرعادی شده است غلظت‌های مختلف نیترات نقره می‌باشد. در آزمایش تعیین  $LC_{50}$  نیز در غلظت‌های بالای نیترات نقره میگوها سریعاً عکس‌العمل نشان داده و با شنای سریع، حرکات جهشی و حرکات سریع پاهای شنا به‌طور مداوم در جنب و جوش بوده تا جایی که خسته شده و بی‌حال در کف آکواریوم تعادل خودشان را به‌طور کامل از دست می‌دادند. مشابه تحقیق حاضر در گونه‌های مختلف ماهیان در معرض آلاینده‌های مختلف پاسخ‌های رفتاری غیرعادی متعددی از قبیل شنای سریع و فعالیت زیاد، سختی تنفس، آمدن به سطح آب، سقوط در کف و از دست تعادل مشاهده شده است [۳۰، ۳۳، ۳۴، ۳۵] که دلیل این پاسخ‌های غیرطبیعی ناشی از تغییرات فیزیولوژیکی و محیطی در ماهیان ذکر شد. از علائم دیگر، افزایش دفعات پوست‌اندازی، قرار گرفتن در کف به‌صورت سر به پایین، پیچیدن بدن به دور خود، بی‌حالی و سقوط در کف بوده است که بروز چنین پاسخ رفتاری در میگوها احتمالاً نشان دهنده بروز تنش در مواجهه با نیترات نقره می‌باشد. با توجه به این‌که میگوها موجوداتی کف‌زی هستند از جمله تغییرات رفتاری میگوها در مطالعه حاضر، آمدن زیاد به سطح آب بود که احتمالاً علت آن کاهش اکسیژن و هیپوکسی است. بنابراین به نظر می‌رسد زمانی که میگو در شرایط آلودگی شدید قرار می‌گیرد اولین اندامی که در معرض آلاینده قرار می‌گیرد آبشش است که آلاینده‌ها بر روی آبشش قرار گرفته و باعث هیپوکسی و اختلالات تنفسی می‌شوند. همچنین دلایل شنای سریع و حرکات جهشی عصبی‌وار و در نهایت از دست تعادل در میگوها احتمالاً به دلیل اختلال در سیستم مغز و اعصاب به‌عنوان اساسی‌ترین اثر سموم می‌باشد. دلیل پرش به خارج از مخزن پرورشی در میگوها را می‌توان فرار از این وضعیت ذکر نمود [۳۶]. مطالعه خسروی‌زاده و همکاران [۳۷] در آزمون سمیت حاد ۹۶ ساعته نانوذرات مس بر میگوی پا سفید غربی، نشان داد که تیمارهای قرار گرفته در معرض نانوذرات مس در ۲۴ ساعت اولیه، علائم رفتاری طبیعی (شنای طبیعی و تغذیه طبیعی) داشتند، اما بعد از ۷۲ ساعت علائمی شامل افزایش دفعات پوست‌اندازی، کاهش اشتها، بی‌حالی، شنا در سطح آب و عدم تعادل در شنا در میگوها مشاهده می‌شود، که از نظر پاسخ رفتاری با مطالعه ما تا حدودی مشابه می‌باشد. در مطالعه‌ای توسط بدری و همکاران [۱۰] تغییرات رفتاری مشاهده شده در خرچنگ‌های منزوی در طی دوره مواجهه با نیترات سرب شامل عدم تعادل در راه رفتن، کاهش فعالیت و جنبش، حرکت آهسته، عدم تحریک پذیری و همچنین تغییر رنگ در ناحیه شکم بود. همچنین در توافق با مطالعه حاضر در مطالعه‌ای توسط Kakakhel و همکاران [۳۸] بر روی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) طی مواجهه با نانوذرات نقره بررسی پاسخ‌های رفتاری نشان داد که ماهیان در تیمار شاهد دارای رفتار طبیعی بودند اما در مواجهه با غلظت‌های بالای نانوذرات نقره دارای پاسخ‌های رفتاری غیرعادی از قبیل حرکات و شنای کند بوده و تعادل‌شان را از دست دادند که در این مطالعه، مشاهده چنین پاسخ‌های رفتاری به دلیل بروز تنش در اثر مواجهه با نانوذرات نقره ذکر شد.

### نتیجه‌گیری

طبق نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر با افزایش غلظت نیترات نقره و گذشت زمان مواجهه درصد تلفات میگوها افزایش یافت. میزان غلظت کشندگی میانی نیترات نقره در میگوی وانامی ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد که نشان از سمیت بالای آن برای این گونه است.

## تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری و زحمات کارشناسان محترم آزمایشگاه بخش تکثیر و پرورش آبزیان مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار جهت پیشبرد این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

## منابع

1. Suami RB, Al Salah DM, Kabala CD, Otamonga JP, Mulaji CK, Mpiana PT, Poté JW. Assessment of metal concentrations in oysters and shrimp from Atlantic Coast of the Democratic Republic of the Congo. *Heliyon*. 2019 Dec 1; 5(12): e03049.
2. Zhu G, Noman MA, Narale DD, Feng W, Pujari L, Sun J. Evaluation of ecosystem health and potential human health hazards in the Hangzhou Bay and Qiantang Estuary region through multiple assessment approaches. *Environmental Pollution*. 2020 Sep 1; 264:114791.
3. Ratte HT. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental toxicology and chemistry: an international journal*. 1999 Jan;18(1):89-108.
4. Moermond CT, van Herwijnen R. Environmental risk limits for silver: A proposal for water quality standards in accordance with the Water Framework Directive.
5. Olgunoğlu MP, Olgunoğlu İA, Bayhan YK. Heavy Metal Concentrations (Cd, Pb, Cu, Zn, Fe) in Giant Red Shrimp (*Aristaeomorpha foliacea* Risso 1827) from the Mediterranean Sea. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2015 Mar 1;24(2).
6. Vanegas C, Espina S, Botello AV, Villanueva S. Acute toxicity and synergism of cadmium and zinc in white shrimp, *Penaeus setiferus*, juveniles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1997 Jan 1;58(1).
7. Wu JP, Chen HC. Effects of cadmium and zinc on oxygen consumption, ammonium excretion, and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Chemosphere*. 2004 Dec 1;57(11):1591-8.
8. Barbieri E, Doi SA. The effects of different temperature and salinity levels on the acute toxicity of zinc in the Pink Shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*. 2011 Jul 1;44(4):251-63.
9. Barbieri E, Passos EA, Garcia CA. Use of metabolism to evaluate the sublethal toxicity of mercury on *Farfantepenaeus brasiliensis* larvae (Latreille 1817, Crustacean). *Journal of Shellfish Research*. 2005 Dec 24(4):1229-33.
10. Badri N, Amrollahi Biuki N, Ranjbar MS. Determination of Median lethal concentration lead nitrate and Behavioral responses of hermit crab, *Diogenes avarus*. *Journal of Marine Science and Technology*. 2018 Jan 4 (16):56-65.
11. Behnezhad A, Kardel F, Taghavi Jelodar H, Omidzahir S. Comparative study of lethal concentration 50 (LC<sub>50</sub>) of silver nanoparticles and silver nitrate in Caspian Sea gammarus (*Pontogammarus maeoticus*). *Journal of Oceanography*. 2021 Apr 15;12(45):76-85.
12. Wang Z, Qu Y, Zhuo X, Li J, Zou J, Fan L. Investigating the physiological responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to acute cold-stress. *PeerJ*. 2019 Jul 24;7:e7381.
13. Sultana S, Hossain MB, Choudhury TR, Yu J, Rana MS, Noman MA, Hosen MM, Paray BA, Arai T. Ecological and Human Health Risk Assessment of Heavy Metals in Cultured Shrimp and Aquaculture Sludge. *Toxics*. 2022 Apr 2;10(4):175.
14. Liu HL, Yang SP, Wang CG, Chan SM, Wang WX, Feng ZH, Sun CB. Effect of air exposure and resubmersion on the behavior and oxidative stress of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*. 2015 Jan 2;77(1):43-9.
15. Sharifpour A, Soltani M, Fethullahi B. Study of lethal and histopathological effects caused by endosulfan poison in common carp. *Journal of Natural Resources of Iran*. 2004; 58 (2): 373-382. [In Persian].



16. Lam PH, Le MT, Dang DM, Doan TC, Tu NP, Dang CM. Safe Concentration of Silver Nanoparticles in Solution for White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Farming. Biol. Chem. Res. 2020; 7:35-45.
17. OECD, (Organisation for Economic Co-operation and Development) .1992. Fish, acute toxicity test. OECD Guideline for testing chemicals, Paris. 146 pp.
18. Alves Neto I, Brandão H, Furtado PS, Wasielesky Jr W. Acute toxicity of nitrate in *Litopenaeus vannamei* juveniles at low salinity levels. Ciência Rural. 2019;49(1).
19. David M, Mushigeri SB, Shivakumar R, Philip GH. Response of *Cyprinus carpio* (Linn) to sublethal concentration of cypermethrin: alterations in protein metabolic profiles. Chemosphere. 2004 Jul 1;56(4):347-52.
20. Khosravi Katuli K, Shabani A, Kolangi Miyandareh H, Imanpour MR. Effect of sub lethal concentrations of silver nanoparticles and silver nitrate on HSP70 gene expression and gill, liver and intestinal damage in common carp (*Cyprinus carpio* L.). Journal of Animal Environment. 2018 Dec 22;10(4):339-50.
21. Doleželová P, Máčová S, Pištěková V, Svobodová Z, Bedáňová I, Voslářová E. Comparison of the sensitivity of *Danio rerio* and *Poecilia reticulata* to silver nitrate in short-term tests. Interdisciplinary Toxicology. 2008 Sep;1(2):200.
22. Leblanc GA, Mastone JD, Paradise AP, Wilson BF, Jr HB, Robillard KA. The influence of speciation on the toxicity of silver to fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. 1984 Jan;3(1):37-46.
23. Hogstrand C, Wood CM. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. 1998 Apr;17(4):547-61.
24. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. Archives of Toxicology. 2013 Jul;87(7):1181-200.
25. Davies PH, Goettl Jr JP, Sinley JR. Toxicity of silver to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Water Research. 1978 Jan 1;12(2):113-7.
26. Buccafusco RJ, Ells SJ, LeBlanc GA. Acute Toxicity of Priority Pollutants to Bluegill (*Lepomis macrochirus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1981 Jan 1;26(1):446-52.
27. Holcombe GW, Phipps GL, Fiandt JT. Toxicity of selected priority pollutants to various aquatic organisms. Ecotoxicology and Environmental Safety. 1983 Aug 1;7(4):400-9.
28. Nebeker AV, McAuliffe CK, Mshar R, Stevens DG. Toxicity of silver to steelhead and rainbow trout, fathead minnows and *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. 1983 Jan;2(1):95-104.
29. Naqshbandi N, Askari Hosni M. Studying the effect of agricultural poison glyphosate on some blood factors and behavioral changes of common carp. Journal of Health and Environment. 2016; 10 (2): 186-175. [In Persian].
30. Petrauskienė L. Changes in aggressive behaviour of rainbow trout after starvation and exposure to heavy metal mixture. Ekologija. 2002; 1:14-21.
31. Sloman KA, Scott GR, Diao Z, Rouleau C, Wood CM, McDonald DG. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquatic Toxicology. 2003 Oct 29;65(2):171-85.
32. Xu J, Liu Y, Cui S, Miao X. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. Aquacultural Engineering. 2006 Oct 1;35(3):207-17.
33. Jaensson A, Scott AP, Moore A, Kylin H, Olsén KH. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). Aquatic Toxicology. 2007 Feb 15;81(1):1-9.
34. Kienle C, Köhler HR, Filser J, Gerhardt A. Effects of nickel chloride and oxygen depletion on behaviour and vitality of zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) (Pisces, Cypriniformes) embryos and larvae. Environmental Pollution. 2008 Apr 1;152(3):612-20.

35. Halappa R, David M. Behavioral responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) following sublethal exposure to chlorpyrifos. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2009 Feb 1;9(2).
36. Lin YC, Chen JC. Acute toxicity of nitrite on *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles at different salinity levels. *Aquaculture*. 2003 Jun 30;224(1-4):193-201.
37. Khosravizadeh N, Sourinejad A, Johari SA, Ghasemi Elah Vej Siri Z. The effect of acute and chronic toxicity of copper nanoparticles on the survival and tissue damage of hepatopancreas and gills in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Iranian Journal of Comparative Pathobiology*. 2014; 12 (1): 1517-1525. [In Persian].
38. Kakakhel MA, Wu F, Sajjad W, Zhang Q, Khan I, Ullah K, Wang W. Long-term exposure to high-concentration silver nanoparticles induced toxicity, fatality, bioaccumulation, and histological alteration in fish (*Cyprinus carpio*). *Environmental Sciences Europe*. 2021; 33(1), 1-11.

## Determination of median lethal concentration of silver nitrate and its effect on the behavioral responses of *Litopenaeus vannamei*

Abdolrazaq Siyahooei<sup>1</sup>, Seraj Bita<sup>\*1</sup>, Javad Ghasemzadeh<sup>1</sup>

1- Department of Fisheries, Faculty of marine sciences, Chabahar maritime university, Chabahar, Iran

### ABSTRACT

Today, the continuous release of environmental pollutants into aquatic ecosystems has made these environments extremely vulnerable and turned them into a storage sites for these toxic substances, so it is necessary to investigate the effects of these pollutants on aquatic life. The present study was conducted with the aim of determining the toxicity of silver nitrate and observing the behavioral changes of *Litopenaeus vannamei* during its exposure. To determine the toxicity, the standard method of OECD was used. At first, the viability and survival of *Litopenaeus vannamei* were checked after two weeks of acclimatization to laboratory conditions, then by conducting preliminary tests, the actual lethality values of silver nitrate were obtained. In order to determine the median lethal concentration, shrimps were exposed to concentrations of 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mg/L of silver nitrate for 96 h and their mortality were recorded daily every 24 h. The LC<sub>50</sub>, LOEC, NOEC and MATC were calculated based on shrimp mortality. During the viability and survival test, no mortality were observed up to 96 hours, and the survival rate of shrimps was 100%. The value of LC<sub>50</sub>, NOEC, LOEC and MATC were determined as 0.084, 0.02, 0.025 and 0.0084 mg/liter, respectively. In different concentrations of silver nitrate, shrimps showed behaviors such as abnormal swimming, fast movements of swimming legs, coming to the surface of the water, twisting the body around itself and eventually losing balance.

**KEYWORDS:** Heavy metals, Toxicity, Silver nitrate, *Litopenaeus vannamei*

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 3 Oct. 2022

Accepted: 22 Nov. 2022

ePublished: 3 Mar. 2023

\* Corresponding Author:

Email address: serajbita@yahoo.com, bita@cmu.ac.ir

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513