

تأثیر سمیت مزمن نیترات نقره بر نشان‌گرهای زیستی استرس اکسیداتیو هیاتوپانکراس میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

بهنام آریان^۱، جواد قاسم‌زاده^۲ و سراج بیتا^{۳*}

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۲ استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

^۳ استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷

دریافت: ۱۴۰۰/۹/۲۷

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره بر تغییرات نشان‌گرهای زیستی استرس اکسیداتیو (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و مالون دی‌آلدئید) هیاتوپانکراس میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شد. ابتدا غلظت کشندگی میانی نیترات نقره طی ۹۶ محاسبه شد و میزان آن ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. سپس پست لاروهای میگوی پا سفید غربی طی ۲۱ روز با غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره در ۴ تیمار شامل تیمار ۱: (۱۰٪LC₅₀)، تیمار ۲: (۰/۰۰۸۴mg/L)، تیمار ۳: (۵۰٪LC₅₀) (۰/۰۴۲mg/L) و تیمار ۴: (۷۵٪LC₅₀) (۰/۰۶۳mg/L) و یک تیمار نیز به عنوان تیمار شاهد مواجهه شدند. طبق نتایج، در بافت هیاتوپانکراس فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار ۳ و ۴ در مقایسه تیمار شاهد کاهش معنی‌دار و مالون دی‌آلدئید افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج این مطالعه نشان داد که مواجهه با غلظت‌های ۰/۰۴۲mg/L و ۰/۰۶۳mg/L نیترات نقره سبب آسیب اکسیداتیو بافت هیاتوپانکراس میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) شده است.

کلمات کلیدی: سمیت، نیترات نقره، استرس اکسیداتیو، میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

مقدمه

گونه‌های اصلی پرورشی در جهان است که تولید آن در سال‌های اخیر به دلیل بازدهی اقتصادی بالا رشد چشم‌گیری داشته است (Macusi et al, 2022). معمولاً محیط‌های پرورشی میگو غیر از بیماری‌های عفونی، با اثرات طبیعی و انسانی مناطق شهری و برون شهری از جمله ورود آلاینده‌های فلزی مواجهه هستند که این فلزات می‌توانند از طریق

تولید جهانی آبی پروری همچنان در حال افزایش است و پرورش میگو یکی از صنایع اصلی آبی پروری است. میگو ۱۵ درصد از کل تجارت جهانی غذاهای دریایی در سال ۲۰۱۸ را به خود اختصاص داده است و میگوهای پرورشی بیش از ۸۰ درصد از حجم عرضه آبزیان را تشکیل می‌دهند (FAO 2020). میگوی پاسفید غربی یکی از

*نویسنده مسئول: سراج بیتا، استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

E-mail: serajbita@yahoo.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

سامانه دفاعی آنتی‌اکسیدانی میگوی پا سفید غربی انجام شد.

مواد و روش کار

جهت تهیه میگوی پا سفید غربی، پست لارو میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین وزنی $3/28 \pm 0/45$ گرم (انحراف معیار $\pm$ وزن) از جاسک خریداری شده و جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاهی در مدت زمان ۲ هفته در مخازن ۷۰ لیتری به تعداد ۶۰ قطعه میگو در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. در طی دوره آزمایش، میانگین میزان pH، شوری و دمای آب در مخازن به ترتیب $7/54 \pm 0/20$ ، $33/00 \pm 1/18$ و $25 \pm 0/86$ بود. دوره نوری نیز به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بوده است (Méndez-Martínez et al, 2018).

برای تیماربندی میگوها جهت تست سمیت مزمن نیترات نقره، در ابتدا غلظت کشندگی میانی نیترات نقره در میگوها بر اساس روش استاندارد تعیین سمیت مواد در آبریان (OECD guideline for testing of chemicals) انجام شد و میزان مرگ و میر در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت ثبت شد و بنابراین غلظت کشندگی میانی (LC_{50-96h}) نیترات نقره طی ۹۶ ساعت مواجهه میگوها $0/084$ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد، به منظور انجام تست سمیت تحت کشنده، پست لاروهای میگو در داخل مخازن با حجم آب ۶۰ لیتر به تعداد ۷۵ قطعه در هر تیمار، در ۵ تیمار (۴ تیمار با غلظت‌های مختلف نیترات نقره و یک تیمار به عنوان شاهد) ذخیره‌سازی شدند و تا پایان دوره به مدت ۲۱ روز نگهداری در معرض غلظت‌های مختلف نیترات نقره قرار گرفتند (Frías-Espericueta et al, 2008). بنابراین تیماربندی میگوها طی آزمایش سمیت مزمن بدین صورت بود (Table 1):

رواناب سطحی و یا از طریق تخلیه پساب حاصل از منابع متعدد انسانی از جمله صنعتی، کشاورزی و غیره وارد محیط‌های آبی و در نتیجه آب پرورش میگو شده و در نتیجه سبب خسارت‌های سنگین به پرورش دهندگان می‌شوند (Hidayati et al, 2020). نیترات نقره یک ماده شیمیایی معدنی با خواص ضد میکروبی است که در میان آلاینده‌های فلزی، یون‌های نقره یکی از سمی‌ترین اشکال فلزی هستند (Ho and Argáez, 2018) و بنابراین ورود این ترکیب به محیط‌های آبی می‌تواند اثرات سمی غیرقابل پیش‌بینی بر آبزیان داشته باشد، بنابراین شناخت مکانیسم سمیت احتمالی آن در آبزیان دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. مواجهه آبزیان به ویژه میگو با آلاینده‌های محیطی همچون فلزات سنگین مانند نقره، مس و کادمیوم (Xian et al, 2013) سبب تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل ($-OH$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود که اثرات مضر این رادیکال‌ها توسط مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی سلولی، از جمله سیستم‌های دفاعی آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و گلووتاتیون پراکسیداز (GPx) و غیرآنزیمی مانند گلووتاتیون کنترل می‌شود (Guo et al, 2022). سخت‌پوستان به دلیل حساس بودن به آلاینده‌های محیطی، از جمله فلزات کمیاب، به طور گسترده برای سنجش‌های زیستی سم‌شناسی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مطالعات متعددی در این زمینه توسط محققین مختلف انجام شده است (Frías-Espericueta et al, 2019; Zhang et al, 2017; Zhang et al, 2021)، اما تحقیقات در زمینه تأثیر سمیت مزمن این آلاینده‌ها به خصوص نیترات نقره بر روی این گونه توسعه چندانی نیافته است، بنابراین مطالعه حاضر با هدف بررسی مواجهه مزمن و طولانی مدت نیترات نقره بر تغییرات

Table 1: Different concentrations of silver nitrate treatment with control group for chronic toxicity testing in whiteleg shrimp

Control treatment	Treatment 1	Treatment 2	Treatment 3	Treatment 4
0	10% LC ₅₀ (0.0084 mg/L)	25% LC ₅₀ (0.021 mg/L)	50% LC ₅₀ (0.042 mg/L)	75% LC ₅₀ (0.063 mg/L)

نتایج

نتایج حاصل از تعیین LC₅₀ نیترات نقره در میگوی پا سفید غربی نشان داد که میزان آن در زمان‌های ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۵۲، ۰/۳ و ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر است (Table 2).

Table 2: Median lethal concentration (Mean±SD) of silver nitrate in *Litopenaeus vannamei*

Exposure time (h)	LC ₅₀ value (mg/ L)
24	0.79 ± 0.066
48	0.52 ± 0.055
72	0.3 ± 0.067
96	0.084 ± 0.017

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بافت هپاتوپانکراس در تیمارهای مختلف نیترات نقره به جز در تیمار ۱ در مقایسه تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0/05$). بر اساس نتایج به دست آمده بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم در بافت هپاتوپانکراس به ترتیب مربوط به تیمار ۱ و در روز هفتم نمونه‌برداری و تیمار ۴ در روز ۲۱ نمونه‌برداری بوده است (Table 3) که نسبت به بقیه روزهای نمونه‌برداری کاهش معنی‌داری داشته است ($P < 0/05$).

نمونه‌برداری از پست لارو میگوها جهت سنجش شاخص‌های استرس اکسیداتیو در بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز انجام شد. میگوها با پودر گل میخک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر بیهوش شده و هپاتوپانکراس آن‌ها جداسازی شدند. اندام جداسازی شده در بافر تریس HCl (Tris-HCl) با pH ۷/۴ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هموژن شد. نمونه‌های هموژن شده در دور ۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و سپس فاز رویی به منظور انجام آزمایشات اکسیدان/آنتی‌اکسیدان (کاتالاز (CAT)، گلوکاتیون (GSH)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) و مالون دی‌آلدئید (MDA) جداسازی شد (Yang et al, 2010). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر پایه قدرت سوپراکسید دیسموتاز در مهار احیاء نیتروبلوترازولیوم (NBT) به وسیله یون سوپراکسید با استفاده از روش Winterbourn در سال ۱۹۷۵، فعالیت کاتالاز بر اساس روش Korolyuk و همکاران در سال ۱۹۸۸، سنجش میزان گلوکاتیون بر اساس روش Tietze در سال ۱۹۹۴، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس روش Benzie و Strain در سال ۱۹۹۶ و برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید از کیت Cusabio که ساخت یک شرکت چینی آمریکایی است، استفاده شد. غلظت ایجاد کننده ۵۰ درصد تلفات با حدود اطمینان ۹۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۲۲ و آزمون استاندارد پروبیت، آنالیز شد. برای مقایسه تیمارها از آزمون آماری آنالیز واریانس دو طرفه (Two-Way ANOVA) و پس آزمون توکی استفاده شد. مقدار $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی‌دار آماری در نظر گرفته شد.

Table 3: Changes in superoxide dismutase activity (U/ml) of whiteleg shrimp hepatopancreas in different treatments (Mean±SD)

Sampling Days	Control	Treatments			
		1	2	3	4
7	50 ± 3.25 ^{Bb}	54.02 ± 5 ^{Bb}	23.69 ± 6.15 ^{Aa}	17.32 ± 0.89 ^{Aa}	20.68 ± 5.68 ^{Aa}
14	52.86 ± 5.8 ^{Bb}	52.66 ± 0.89 ^{Bb}	20 ± 0.99 ^{Aa}	16.01 ± 1 ^{Aa}	14.01 ± 5.12 ^{Ba}
21	53.05 ± 3.33 ^{Bb}	51 ± 2.79 ^{Bb}	20 ± 4 ^{Aa}	16 ± 2.1 ^{Aa}	8.93 ± 2.5 ^{Ca}

In all tables columns and lines not sharing the same letter (a or b) and (A or B, ...) are significantly different at $P < 0.05$.

بین میزان سطح گلوکاتایون بافت هپاتوپانکراس در تیمارهای ۳ و ۴ در مقایسه تیمار شاهد و نیز تیمار ۱ و ۲ کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0.05$). کم‌ترین و بیش‌ترین میزان گلوکاتایون در بین تیمارهای مختلف به ترتیب مربوط به تیمار ۴، در روز ۲۱ و تیمار ۱ در روز ۷ بوده است (Table 5).

فعالیت کاتالاز در بافت هپاتوپانکراس در تیمار ۳ و ۴ نسبت به تیمار شاهد در روز ۱۴ و ۲۱ نمونه‌برداری کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$), اما در تیمار ۱ و ۲ در مقایسه با تیمار شاهد فعالیت این آنزیم، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P > 0.05$). به جز در تیمار ۱ در بقیه تیمارها با گذشت زمان کاهش و در تیمار شاهد افزایش یافت (Table 4).

Table 4: Changes in catalase activity (u/mg pr) of whiteleg shrimp hepatopancreas in different treatments (Mean±SD)

Sampling Days	Control	Treatments			
		1	2	3	4
7	0.7 ± 0.02 ^{Bb}	0.58 ± 0.025 ^{Bb}	0.57 ± 0.023 ^{Bb}	0.4 ± 0.01 ^{Aa}	0.31 ± 0.016 ^{Da}
14	0.68 ± 0.016 ^{Bb}	0.57 ± 0.049 ^{Bb}	0.6 ± 0.013 ^{Bb}	0.25 ± 0.011 ^{Ca}	0.19 ± 0.009 ^{Ea}
21	0.65 ± 0.011 ^{Bb}	0.62 ± 0.017 ^{Bb}	0.56 ± 0.018 ^{Bb}	0.2 ± 0.015 ^{Ca}	0.19 ± 0.06 ^{Ea}

Table 5: Changes in glutathione activity (µg/ml) of whiteleg shrimp hepatopancreas in different treatments (Mean±SD)

Sampling Days	Control	Treatments			
		1	2	3	4
7	19.30 ± 1.11 ^{Bb}	20 ± 0.99 ^{Bb}	17.95 ± 1.09 ^{Bb}	9.09 ± 1.50 ^{Aa}	7 ± 2.15 ^{Aa}
14	18.88 ± 1.75 ^{Bb}	19.03 ± 2.85 ^{Bb}	16.15 ± 2.24 ^{Bb}	8.75 ± 0.96 ^{Aa}	5.96 ± 1.0 ^{Ca}
21	18.75 ± 3.15 ^{Bb}	18.75 ± 1.73 ^{Bb}	16.08 ± 3.20 ^{Bb}	6.25 ± 2.20 ^{Aa}	5.20 ± 1.03 ^{Ca}

تیمار مشاهده نشد ($P > 0.05$), همچنین بین تیمار ۲ با تیمار ۱ و شاهد نیز اختلاف معنی‌دار آماری وجود داشت ($P < 0.05$). در بین تیمارهای مختلف بیش‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت هپاتوپانکراس مربوط به تیمار ۱ و در روز ۲۱ بوده است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بافت هپاتوپانکراس در تیمار ۲، ۳ و ۴ در مقایسه تیمار شاهد و تیمار ۱ کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) و کم‌ترین میزان آن مربوط به تیمار و در روز ۲۱ نمونه‌برداری بوده است (Table 6), اما بین روزهای مختلف نمونه‌برداری تفاوت معنی‌داری در هر

Table 6: Changes in total antioxidant capacity (u/mg protein) of whiteleg shrimp hepatopancreas in different treatments (Mean±SD)

Sampling Days	Control	Treatments			
		1	2	3	4
7	4.75 ± 0.14 ^{Bb}	4.98 ± 0.088 ^{Bb}	3.60 ± 0.27 ^{Aa}	2.23 ± 0.26 ^{Aa}	2.00 ± 0.19 ^{Aa}
14	4.79 ± 0.20 ^{Bb}	4.69 ± 0.33 ^{Bb}	3.46 ± 0.27 ^{Aa}	2.13 ± 0.39 ^{Aa}	1.90 ± 0.45 ^{Aa}
21	4.91 ± 0.11 ^{Bb}	5.00 ± 0.5 ^{Bb}	3.21 ± 0.43 ^{Aa}	2.00 ± 0.17 ^{Aa}	1.75 ± 0.53 ^{Aa}

دی‌آلدئید در تیمار ۴ در روز ۲۱ به بالاترین میزان خود رسید و نسبت به روز ۷ نمونه‌برداری در همین تیمار تفاوت معنی‌داری نشان داد ($P < 0.05$)، اما در تیمار شاهد و در همین روز کم‌ترین میزان سطح فعالیت را داشت (Table 7).

میزان فعالیت مالون دی‌آلدئید هپاتوپانکراس در تیمار ۳ و ۴ با گذشت زمان روند افزایشی داشت که این افزایش در مقایسه بقیه تیمارها از تفاوت آماری معنی‌داری برخوردار بوده است ($P < 0.05$). تیمار ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند ($P > 0.05$). سطح فعالیت مالون

Table 7: Changes in malondialdehyde level (nmol/ml) of whiteleg shrimp hepatopancreas in different treatments (Mean±SD)

Sampling Days	Control	Treatments			
		1	2	3	4
7	10.32 ± 0.43 ^{Bb}	11.05 ± 2.06 ^{Bb}	9.65 ± 2.10 ^{Bb}	20.00 ± 0.99 ^{Aa}	19.66 ± 1.10 ^{Ca}
14	9.08 ± 1.09 ^{Bb}	11.00 ± 3.00 ^{Bb}	9.45 ± 0.43 ^{Bb}	21.70 ± 3.28 ^{Aa}	24.01 ± 0.90 ^{Aa}
21	8.97 ± 0.75 ^{Bb}	9.90 ± 0.84 ^{Bb}	10.32 ± 2.11 ^{Bb}	21.83 ± 5.60 ^{Aa}	27.00 ± 1.80 ^{Aa}

بحث

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بافت هپاتوپانکراس به جز در تیمار ۱، در بقیه تیمارها با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است و با افزایش غلظت نیترات نقره فعالیت این آنزیم به طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). در سخت پوستان، مطالعات اخیر در مورد سوپراکسید دیسموتاز، به نقش آن در سیستم ایمنی و تعدیل پاسخ‌های اکسیداتیو اشاره می‌کند که ممکن است فعالیت SOD را افزایش یا کاهش دهد. کاهش در فعالیت این آنزیم نشان دهنده کاهش توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی توسط رادیکال‌های آزاد تولید شده است (Huang et al, 2018). در مطالعه حاضر کاهش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بافت هپاتوپانکراس در غلظت‌های بالای نیترات نقره نشان می‌دهد که مواجهه میگوها با این غلظت‌ها سبب تولید

در مطالعه حاضر غلظت کشندگی میانی (LC_{50}) نیترات نقره در میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) طی ۹۶ ساعت مواجهه ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد. طبق نتایج Ardiansyah و همکاران (۲۰۱۲)، میزان LC_{50} کادمیوم در میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) به ترتیب در شوری ۲۷ ppt و ۱۵ طی ۹۶ ساعت مواجهه برابر با ۰/۹۶ و ۱/۰۲ میلی‌گرم بر لیتر تعیین شد. Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۱، میزان LC_{50} طی ۹۶ ساعت مواجهه با کادمیوم در میگوی *Palaemon macrrodactylus* را ۰/۳۷ میلی‌گرم بر لیتر گزارش نمودند. این یافته‌ها تأیید کرد که سمیت فلزات کمیاب برای سخت پوستان با عوامل زنده (مانند گونه و مرحله زندگی) و غیر زنده (مانند دما و شوری) متفاوت است (Zhang et al, 2021).

رادیکال‌های آزاد شده و بنابراین آنزیم سوپراکسید دیسموتاز به منظور حذف این رادیکال‌های آزاد شروع به فعالیت نموده و در نهایت سطح آن در غلظت‌های بالای نیترات نقره به کم‌ترین میزان خود رسیده است. مطابق با نتایج مطالعه حاضر Das و همکاران در سال ۲۰۱۹، نیز کاهش در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز میگوی گلی (*Austino gebia edulis*) را طی مواجهه با کادمیوم گزارش نمودند.

کاتالاز از آنزیم‌های تترامریک حاوی هم (haem) در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در رابطه با تبدیل رادیکال‌های آزاد H_2O_2 به آب و اکسیژن می‌باشد (Yap et al, 2021). فعالیت کاتالاز هیپاتوپانکراس در تیمار ۳ و ۴ نسبت به سایر تیمارها با گذشت زمان کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$) که نشان می‌دهد فعالیت بازدارندگی نیترات نقره بر بافت هیپاتوپانکراس زیاد بوده است، از آن جایی که هیپاتوپانکراس سخت پوستان نقش مهمی در چندین عملکرد متابولیک مانند هضم، جذب و ترشح دارد، بنابراین به عنوان یکی از اندام‌های مهم و هدف برای تجمع آلاینده‌ها می‌باشد (Lin et al, 2017). در مطالعه‌ای توسط Griffitt و همکاران در سال ۲۰۰۹ علت کاهش فعالیت کاتالاز آبزیان طی مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی، تجمع سنگین رادیکال‌های آزاد در بدن در مواجهه با آلاینده‌ها ذکر شد. در مطالعه ما نیز کاهش سطح فعالیت کاتالاز، می‌تواند یا به دلیل تجمع رادیکال‌های آزاد و یا این که به دلیل مصرف آن‌ها در جریان فرایند استرس اکسیداتیو باشد. Das و همکاران در سال ۲۰۱۹، کاهش در فعالیت کاتالاز میگوی گلی (*Austino gebia edulis*) را طی مواجهه با کادمیوم گزارش نمودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

در بافت هیپاتوپانکراس میزان گلوکوتاتیون در تمام تیمارهای نیترات نقره با افزایش غلظت نیترات نقره و نیز با گذشت زمان کاهش یافت که این کاهش در تیمارهای ۳ و ۴ نسبت به سایر تیمارها به صورت معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$) به خوبی شناخته شده که گلوکوتاتیون اس-ترانسفراز با مواد بیگانه یا سموم باند شده، که این فرایند به

کاهش غلظت سم در بدن کمک می‌کند، بنابراین کاهش در میزان گلوکوتاتیون، به دلیل تشکیل رادیکال‌های آزاد و غلبه کردن آن‌ها بر مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن می‌باشد و نشان می‌دهد که رادیکال‌های آزاد می‌توانند هم سبب کاهش گلوکوتاتیون و هم جلوگیری از سنتز آن بشوند (Arora et al, 2008). در مطالعه Xiong و همکاران در سال ۲۰۱۱، مواجهه ماهی زبرا با دزهای بالای تیتانیوم سبب کاهش فعالیت GSH کبد در مقایسه با تیمار شاهد شد، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد.

نتایج نشان داد که بین میانگین سطح ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل هیپاتوپانکراس به جز در تیمار ۱ در بقیه تیمارهای نیترات نقره با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). در مطالعه Liu و همکاران در سال ۲۰۱۵ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در هیپاتوپانکراس به طور معنی‌داری در میگوهای که به مدت ۲۰ دقیقه در معرض هوا و استرس سمیت نقره قرار گرفته‌اند کاهش یافت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. Zhang و همکاران در سال ۲۰۲۱ نیز کاهش در سطح ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل در میگوی *Palaemon macrodactylus* را طی مواجهه با کادمیوم گزارش نمودند، دلیل این کاهش تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد در اثر کادمیوم ذکر شد. مالون دی‌آلدئید محصول نهایی پراکسیداسیون لیپیدها است که با افزایش مقدار رادیکال‌های آزاد در داخل بدن میزان آن نیز افزایش می‌یابد و اغلب به عنوان پارامتری برای تعیین میزان آسیب یا سطح پراکسیداسیون لیپیدی و تجمع گونه‌های ROS در یک ارگانیسم استفاده می‌شود (Das et al, 2019). فعالیت مالون دی‌آلدئید بافت هیپاتوپانکراس با افزایش غلظت نانوذرات نقره افزایش داشت به طوری که در تیمار ۳ و ۴ این افزایش نسبت به تیمار شاهد و بقیه تیمارها معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). افزایش معنی‌دار در میزان مالون دی‌آلدئید می‌تواند بیان‌گر افزایش میزان رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدها در زمان مواجهه میگوها با نیترات نقره باشد در مطالعه‌ای بر روی خرچنگ *Eriocheir sinensis* و میگوی گلی (*Austino gebia*)

نتایج این مطالعه نشان داد که قرار گرفتن میگوها در معرض غلظت‌های ۰/۰۴۲ و ۰/۰۶۳ میلی گرم در لیتر نیترات نقره با کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد و مالون دی‌آلدئید و نیز کاهش غلظت گلووتاتیون و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل سبب استرس اکسیداتیو در بافت هپاتوپانکراس شده است.

edulis) و میگوی *Palaemon macrodactylus* افزایش در میزان فعالیت MDA طی مواجهه با کادمیوم گزارش شد (Lin et al, 2017; Das et al, 2019; Zhang et al, 2021)، دلیل این افزایش را ناشی از تجمع یون کادمیوم و القاء آسیب اکسیداتیو توسط این یون دانستند که با مطالعه حاضر مطابقت دارد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری کارشناسان محترم آزمایشگاه مرکزی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار و بخش تکثیر و پرورش آبزیان مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار جهت پیشبرد پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافی را در این پژوهش شناسایی نکردند.

منابع مالی

پژوهش حاضر در قالب پایان نامه با حمایت مالی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شد.

منابع

- Ardiansyah, S., Irawan, B., & Soegianto, A. (2012). Effect of cadmium and zinc in different salinity levels on survival and osmoregulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45(4), 291-302.
- Arora, S., Jain, J., Rajwade, J., & Paknikar, K. (2008). Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179(2), 93-100.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
- Das, S., Tseng, L.C., Chou, C., Wang, L., Souissi, S., & Hwang, J.S. (2019). Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinoergia edulis* (Crustacea: Decapoda). *Environmental Science and Pollution Research*, 26(8), 7752-7762.
- Food and Agriculture Organization. (2020). Sustainability in action. *State of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, 200.
- Frías-Espéricueta, M. G., Abad-Rosales, S., Nevárez-Velázquez, A. C., Osuna-López, P., Osuna, F., Lozano-Olvera, R., & Voltolina, D. (2008). Histological effects of a combination of heavy metals on Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Aquatic Toxicology*, 89(3), 152-157.
- Griffitt, R. J., Hyndman, K., Denslow, N. D., & Barber, D. S. (2009). Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicology Sciences*, 107(2), 404-415.
- Guo, H., Xian, J. A., Zheng, P. H., Lu, Y. P., Wang, L., Zhang, X. X., & Wang, A. L. (2022). Dietary copper affects antioxidant status of shrimp (*Penaeus monodon*) reared in low salinity water. *Aquaculture Reports*, 22, 100979.
- Hidayati, N. V., Prudent, P., Asia, L., Vassalo, L., Torre, F., Widowati, I., & Doumenq, P. (2020). Assessment of the ecological and human health risks from metals in shrimp aquaculture environments in Central Java, Indonesia. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(33), 41668-41687.

- Ho, C., & Argáez, C. (2018). Topical Silver Nitrate for the Management of Hemostasis: A Review of Clinical Effectiveness, Cost-Effectiveness, and Guidelines. *Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health Rapid Response Report*, 62-74.
- Huang, Y. J., Zhang, N. N., Fan, W. J., Cui, Y. Y., Limbu, S. M., Qiao, F., & Li, D. L. (2018). Soybean and cottonseed meals are good candidates for fishmeal replacement in the diet of juvenile *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture international*, 26(1), 309-324.
- Korolyuk, M. A., Ivanova, L. I., Maiorova, I. G., & Tokarev, V. E. (1988). A method for measuring catalase activity. *Laboratornoe delo*, (1), 16-19.
- Lin, Y; Huang, J.J; Dahms, H.U; Zhen, J.J. and Ying, X.P. (2017). Cell damage and apoptosis in the hepatopancreas of *Eriocheir sinensis* induced by cadmium. *Aquatic Toxicology*, 190, 190-198.
- Liu, H. L., Yang, S. P., Wang, C. G., Chan, S. M., Wang, W. X., Feng, Z. H., & Sun, C. B. (2015). Effect of air exposure and resubmersion on the behavior and oxidative stress of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *North American Journal of Aquaculture*, 77(1), 43-49.
- Macusi, E. D., Estor, D. E. P., Borazon, E. Q., Clapano, M. B., & Santos, M. D. (2022). Environmental and Socioeconomic Impacts of Shrimp Farming in the Philippines: A Critical Analysis Using PRISMA. *Sustainability*, 14(5), 2977.
- Méndez-Martínez, Y., García-Guerrero, M. U., Arcos-Ortega, F. G., Martínez-Córdova, L. R., Yamasaki-Granados, S., Pérez-Rodríguez, J. C., & Cortés-Jacinto, E. (2018). Effect of different ratios of dietary protein-energy on growth, body proximal composition, digestive enzyme activity, and hepatopancreas histology in *Macrobrachium americanum* (Bate, 1868) prawn juveniles. *Aquaculture*, 485, 1-11.
- Tietze, F. (1969). Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522.
- Winterbourn, C., Hawkins, R., Brian, M., & Carrell, R. W. (1975). The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 85(2): 337-4.
- Xian, J.A., Wang, A. L., Miao, Y. T., and Li, B. (2013). Flow cytometric analysis of In vitro cytotoxicity of cadmium in haemocytes from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 90(1): 46-50.
- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., & Zhu, W. (2011). Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. *Science of the Total Environment*, 409, 1444-1452.
- Yang, L.H., Huang, H., & Wang, J. J. (2010). Antioxidant responses of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari Tetranychidae), exposed to thermal stress. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1871-1876.
- Yap, C. K., Tan, W. S., Wong, K. W., Ong, G. H., Cheng, W. H; Nulit, R., & You, C. F. (2021). Antioxidant Enzyme Activities as Biomarkers of Cu and Pb Stress in *Centella asiatica*. *Stresses*, 1(4), 253-265.
- Zhang, C., Jin, Y., Yu, Y., Xiang, J., & Li, F. (2021). Cadmium-induced oxidative stress, metabolic dysfunction and metal bioaccumulation in adult palaemonid shrimp *Palaemon macrodactylus* (Rathbun, 1902). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111591.
- Zhang, C., Yu, K., Li, F., & Xiang, J. (2017). Acute toxic effects of zinc and mercury on survival, standard metabolism, and metal accumulation in juvenile ridgetail white prawn, *Exopalaemon carinicauda*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 145, 549-556.

Received: 18.12.2021

Accepted: 16.02.2022

Effect of chronic toxicity of silver nitrate on biomarkers of oxidative stress of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) hepatopancreas

Behnam Ariyaan¹, Javad Ghasemzadeh² and Seraj Bitar^{3*}

¹ MSc Graduated of Aquatic Breeding, Fisheries department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

² Assistance Professor of Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

³ Assistance Professor of Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran

Received: 18.12.2021

Accepted: 16.02.2022

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of sublethal concentrations of silver nitrate on changes in biomarkers of oxidative stress (superoxide dismutase, catalase, glutathione, total antioxidant capacity and malondialdehyde), in the hepatopancreas of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). For this purpose, whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) post larvae shrimp were exposed to sublethal silver nitrate concentrations (equivalent to 10 % (treatment 1), 25 % (treatment 2), 50 % (treatment 3) and 75 % (treatment 4) LC_{50} $AgNO_3$) for 21 days. Catalase, glutathione and total antioxidant capacity in treatments 3 and 4 compared to control treatment had a significant decrease while malondialdehyde increased significantly. Also, superoxide dismutase activity in both treatments 3 and 4, total antioxidant capacity decreased significantly only in treatment 4 compared to the control group, but malondialdehyde activity in treatment 4 increased significantly. The results of this study showed that exposure to concentrations of 0.042 and 0.063 mg/L of silver nitrate caused oxidative damage to hepatopancreas tissue of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Key words: Toxicity, Silver nitrate, Oxidative stress, Whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

* **Corresponding Author:** Seraj Bitar, Assistance Professor of Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
E-mail: serajbitar@yahoo.com



© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).