علوم و تکنولوژی محیط زیست، دوره بیست و دوم، شماره دو، اردیبهشت ماه ۹۹

بررسی سمیت غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره بر برخی شاخص های هماتولوژی و ایمونولوژی ماهی قرمز *(Carassius auratus)*

صفورا ابرقویی [۱] *

Sabarghoei67@gmail.com

سید علی اکبر هدایتی [۲]

رسول قربانی [۳]

حامد پاک نژاد [٤]

طاهره باقری [٥]

تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۳ **تاریخ پذیرش:۹۴/۵/۵**

چکیده

زمینه و هدف: امروزه ترکیبات نقره به دلیل خواص ضد میکروبی در صنایع مختلف استفاده می‌گردند. اما اثرات غیرقابل بازگشت فلزات سنگین غیرضروری همانند نقره، در بدن آبزیان غیر قابل بازگشت می‌باشد. در مطالعه حاضر به بررسی اثرات تحت کشنده نیترات نقره بر پارامترهای خون شناسی و ایمنی شناسی ماهی قرمز *(Carassius auratus)* به عنوان گونه مدل کپور ماهیان پرداخته شد.

روش بررسی: تعداد ۱۰۵ قطعه ماهی قرمز، به صورت تصادفی در ۱۵ مخزن فایبرگلاس (۴۰۰ لیتری) قرار گرفتند (۱۲ مخزن برای غلظت‌های مختلف نیترات نقره و ۳ مخزن به عنوان گروه شاهد) و برای آزمون‌های بیوشیمیایی وخون شناسی تیمارها، ۹ ماهی به طور تصادفی از هر تیمار انتخاب شد که به طور جداگانه در معرض غلظت‌های موثر ppm ۰/۰۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ نیترات نقره قرارگرفتند.

یافته ها: نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر روی عوامل اریتروسیتی خون ماهی قرمز در سطح درصد معنی دار بودخ (کاهش معنی دار) ، اما بر روی اغلب عوامل لوکوسیتی خون تاثیر چندانی نداشت.

نتیجه گیری: این امر ممکن است به دلیل مقاوم بودن این ماهی نسبت به ماهیان دیگر باشد و در نهایت شاخص‌های اریتروسیتی خون می‌توانند به عنوان بیومارکرهای مناسب آلودگی نقره معرفی گردند.

واژه های کلیدی: آلودگی، ماهی قرمز، خون‌شناسی، نیترات نقره، سم شناسی

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد اکولوژی آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان* (مسوول مکاتبات)

۲- دانشیار، گروه تولید و بهره برداری آبزیان،دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استاد، گروه تولید و بهره برداری آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- دانشیار، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- استادیار، مرکز تحقیقات آب های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار

J. Env. Sci. Tech., Vol 22, No.2, April, 2020

Evaluation of Sub Lethal Concentration Toxicity of Silver Nitrate ($AgNO_3$) on Some of Hematology and Immunology Indices in Goldfish (*Carassius Auratus*)

Safoura Abarghouei [1]*
Sabarghoei67@gmail.com
Seyed Aliakbar Hedayati[2]
Rasoul Ghorbani[3]
Hamed Paknejad[4]
Tahere Bagheri[5]

Admission Date: July 27, 2015 Date Received: June 24, 2015

Abstract

Background and Objective: Todays, due to the antibacterial properties, silver compounds are used in various industries. The effects of non-essential heavy metals such as silver are irreversible in aquatics body. In the present study, the sub lethal effects of silver nitrate were investigated on hematological and immunological indices of goldfish (*Carassius auratus*) as a model in the Cyprinid fishes.

Method: 105 Fish were randomly assigned to in 15 fiberglass tanks (Per tanks 400 liters). 12 tank for different concentrations of silver nitrate and 3 tank for control groups. Each treatment was separately exposed to effective concentrations of silver nitrate 0.01, 0.025, 0.05 and 0.1 ppm and for hematological and biochemical test, 9 fish were randomly selected from each treatment.

Findings: The results showed that different concentrations of silver nitrate affected (reduce) blood erythrocyte ($P<0.05$) but did not affect blood leukocyte.

Discussion and Conclusion: These results may be due to the resistance of the Goldfish compared to others and blood erythrocyte indices can be used as a suitable biomarker of silver pollution.

Keywords: Pollution, *Carassius auratus*, Hematology, Silver nitrate, Toxicology.

1- Graduated in Aquatic Ecology-, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. *(Corresponding Author)

2- Associate Professor, Department of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Professor, Department of Fisheries and Aquatic Ecology, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Associate Professor, Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

5- Offshore Water Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Chabahar, Iran

مقدمه

میزان نقره در پوسته زمین در حدود ۰/۱ گرم در هر تن می-باشد (۱). در میان آلاینده های فلزی، یون نقره بسیار سمی است و بالاترین درجه سمیت را در رده بندی مواد سمی به خود اختصاص داده است. سمی بودن آن برای طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها و هم‌چنین سمیت کم آن برای انسان منجر به توسعه تعداد زیادی از محصولات بر پایه نقره شده است (۲). اثر باکتریایی یون نقره بر روی بسیاری از موارد مورد مطالعه قرار گرفته است (۳). در میان کاربردهای بسیار زیاد نقره، استفاده از خاصیت ضد عفونی کنندگی آن برای مقاصد بهداشتی و پزشکی قابل توجه و اهمیت می باشد که به طور گسترده ای برای زخم ها و سوختگی های شدید استفاده می شود (۴). نقره عمدتاً، به‌دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه‌ای که از خود نشان می‌دهد در مصارف الکترونیکی، نوری، دارویی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد (۵) نیترات نقره به عنوان عامل ایجاد کننده گروه های فعال اکسیژنی (ROS) شناخته شده و به وسیله مکانیسم‌های متنوع، شامل بر هم کنش با گروه‌های سولفیدریل پروتیین‌ها و آنزیم‌ها به سلول آسیب می‌رساند. در حالی که بخش وسیعی از نقره در آب‌های سطحی به صورت طبیعی وارد می‌گردد، فعالیت‌های بشری از قبیل معدن، ساخت جواهرات و عکاسی می‌توانند سطوح نقره را در آب‌های محیطی افزایش دهند (۱). تعدادی از مطالعات نشان دادند که نیترات نقره به شدت برای ماهیان آب شیرین سمی است (۶).

سیستم‌های آبی، پیوسته با مشکلات ناشی از آلاینده‌هایی مواجه هستند که از منابع مختلف مانند فاضلاب‌های صنعتی، پساب‌های کشاورزی و فاضلاب‌های شهری وارد آن‌ها می‌شوند. آلاینده‌ها (فلزات سنگین، سموم و فرآورده‌های نفتی) برای سیستم زیستی محیط‌های آبی زیان آور بوده و عمدتا بدون هیچ تصفیه‌ای به آب‌ها وارد می‌گردند (۷). اکوسیستم آبی در پایین‌ترین سطح از ارتفاع قرار دارد، در نتیجه مقصد نهایی تمام آلاینده‌های محیطی آب است. در نتیجه آلوده شدن آب با این مواد و نهایتا با تغذیه از آبزیان در طول زنجیره غذایی به انسان منتقل شده و در طول زمان در بدن موجودات و انسان انباشته می‌شود. وجود آن‌ها در بدن خطرات جبران ناپذیری را در سال-های طولانی به دنبال دارد (۲).

در محیط‌های آبی، ماهی به عنوان یک آبزی برای ارزیابی اثر آلاینده‌های محیطی در بوم سامانه‌های آبی در نظر گرفته می-شود. ماهی در بالاترین نقطه زنجیره غذایی آبی قرار گرفته است و توانایی بزرگ نمایی زیستی فلزات سنگین، حتی در غلظت-های پایین موجود در محیط را دارد (۸). ماهی قرمز از خانواده کپور ماهیان می‌باشد و از لحاظ شرایط زیستی و تغذیه‌ای شبیه کپور معمولی است. این ماهی در ایران در حوضه‌های دریای خزر، دریاچه ارومیه و هامون در سیستان و رودخانه کارون پراکنش یافته است. این گونه جهت مطالعات تولید مثلی، سلولی مولکولی، ایمنی شناسی، سم شناسی بسیار مناسب می-باشد، زیرا از اندازه مناسبی جهت تحقیقات آزمایشگاهی برخوردار است و هم‌چنین در محیط‌های آزمایشگاهی به راحتی قادر به بلوغ و تولیدمثل می‌باشد. در واقع از این گونه به عنوان مدل جهت بررسی کپورماهیان استفاده

می‌گردد (۹).

خون شاخص مهمی برای وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن در تشخیص سلامت یا بیماری و کنترل روند زیستی موجودات زنده ازجمله ماهی می‌باشد (۱۰). مطالعات خون شناسی روش ارزشمندی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده‌ها روی ماهیان می باشد (۱۱). شاخص‌های مربوط به خون مانند گلبول‌های قرمز و گلبول‌های سفید از جمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت-ها یکی از بخش‌های سیستم ایمنی غیر اختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (۱۲).

با توجه به استفاده‌های روزافزون ترکیبات نقره به دلیل خواص آنتی باکتریال در صنایع مختلف و اثرات غیرقابل بازگشت فلزات سنگین غیر ضروری همانند نقره در بدن آبزیان و نیز با توجه به این که مطالعات اندکی در رابطه با سمیت نیترات نقره وجود دارد، هدف از مطالعه حاضر افزایش اطلاعات در این زمینه و

ارزیابی خطر این ماده برای محیط زیست می‌باشد. در تحقیق حاضر جهت بررسی اثرات تحت کشنده نمک نیترات نقره بر شاخص‌های خون‌شناسی و ایمنی‌شناسی، ماهی قرمز به عنوان گونه مدل در بررسی خانواده کپور ماهیان انتخاب شد تا از این طریق شاخص خونی مناسبی برای سمیت نیترات نقره مشخص شود.

روش بررسی

تعداد ۱۰۵ قطعه ماهی قرمز، از مرکز فنی حرفه ای آق قلا، با میانگین وزنی ۱۲/۰۵ ±۵۶/۳۳ گرم تهیه و به مرکز تحقیقات آبزی پروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شد. ماهی‌ها برای انجام آزمایش به صورت تصادفی در ۱۵ مخزن فایبرگلاس (۴۰۰ لیتری) قرار گرفتند (۱۲ مخزن برای غلظت‌های مختلف نیترات نقره و سه مخزن به عنوان گروه شاهد) و برای سازگاری به مدت ۲ هفته در شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری و با غذای تجاری رایج در بازار، به میزان ۲ درصد وزن بدن غذادهی شدند. در دوره سازگاری و آزمایش، آب هوادهی و کلرزدایی شد و مشخصات فیزیکوشیمیایی آب به طور روزانه اندازه‌گیری گردید. در طول دوره سازگاری و آزمایش ماهیان تحت رژیم نورانی ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. نیترات نقره مورد استفاده از محصولات Merck آلمان در غلظت ppm۵۰۰۰ در ظرف شیشه ای در بسته تهیه شد.

جهت بررسی اثرات نیترات نقره بر پارامترهای خونی ماهی قرمز، ماهیان تحت تاثیر ۴ غلظت مختلف از محلول‌نیترات نقره قرار گرفتند و یک گروه به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. انتخاب غلظت‌ها، با توجه به مدت زمان آزمایش و پس از تعیین LC_{50}(سمیت کشندگی حاد) صورت گرفت. نیترات نقره مورد استفاده در مدت ۹۶ ساعت، ppm ۱۸۴/ اندازه‌گیری شد. غلظت‌های موثر نیترات نقره به ترتیب ppm ۰/۰۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵ و ۰/۱ بودند و مدت زمان آزمایش دو هفته بود. هر غلظت ذکر شده به یک مخزن ۵۰ لیتری اضافه شد و پیش از انجام آزمایش آب به مدت ۲ دقیقه به شدت هوادهی گردید. (در هر تیمار ۲۱ قطعه ماهی و برای هر تیمار ۳ تکرار ۷ تایی در نظر گرفته شد). آزمایش به طور پویا انجام شد و شرایط فیزیکو شیمیایی آب به طور روزانه کنترل گردید. غذادهی در حد سیری و تعویض آب به صورت یک روز در میان با سیفون کردن از کف به اندازه ۵۰ درصد حجم آب انجام شد. هیچ گونه مرگ و میری در طول آزمایش مشاهده نشد و پس از پایان دوره آزمایش، ماهیان به منظور خون‌گیری با پودر گل میخک به اندازه ۲ گرم در لیتر بیهوش شدند. به دلیل تغییر فعالیت متابولیسمی با تغییر اندازه ماهی و تأثیر بر پارامترهای بیوشیمیایی خون، سعی شد از ماهی با طول نسبتا مشابه استفاده شود (۱۳).

برای آزمایش‌های خون شناسی تیمارها و نمونه شاهد، ۹ ماهی به طور تصادفی از هر تیمار انتخاب شد که به طور جداگانه در معرض غلظت های موثر نیترات نقره قرارگرفته بودند. نمونه شاهد در معرض هیچ غلظتی از نیترات نقره قرار نگرفت. وقتی ماهیان به مرحله بیهوشی عمیق رسیدند، سطح بدن خشک و سپس خون‌گیری با قطع ورید ساقه دمی انجام شد. به دلیل این‌که خون ماهیان در معرض غلظت‌ها به شدت غلیظ شده بود امکان خون‌گیری از طریق سرنگ وجود نداشت. نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی EDTA به عنوان ماده ضد انعقاد قرار گرفتند. شاخص‌های مورد اندازه‌گیری شامل تعداد کل گلبول-های سفید (لوکوسیت)، لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل، تعداد کل گلبول‌های قرمز (اریتروسیت)، محتوای هموگلوبین، سطح هماتوکریت، حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) و درصد غلظت هموگلوبین داخل گلبولی بود (۱۴). شمارش گلبول‌های سفید وگلبول‌های قرمز به روش هموسیتومتری انجام گرفت (۱۵). مقدار هماتوکریت و غلظت هموگلوبین نیز به روش میکروهماتوکریت و سیانومت هموگلوبین سنجش گردید. به منظور شمارش افتراقی گلبول-های سفید، گسترش خونی بر روی لام تهیه و گسترش‌های تثبیت شده با استفاده از رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند.

برای اندازه گیری گلوکز ، گلبول‌های قرمز در لوله قرار داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق (۲۲ درجه سانتی‌گراد) فرصت داده شد تا لخته شود. سرم از لخته جدا شد و نمونه پس از سانتریفیوژ در مدت زمان ۵ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد تا زمانی که آنالیزها روی آن انجام شود.

گلوکز خون به وسیله روش اسپکتوفتومتری (WPAS2000-UV/VIS کمبریج انگلستان)، و با استفاده از کیت پارس آزمون اندازه‌گیری شد. اطلاعات حاصل از هر آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS 20 و با انجام آزمون ANOVA یک طرفه و تست توکی در سطح معناداری ۵ درصد (P<۰/۰۵) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همه نتایج به دست آمده به وسیله میانگین ± انحراف معیار محاسبه شدند.

یافته‌ها

طبق بررسی نتایج آماری هیچ گونه اختلاف معنی‌دار، در وزن کل و طول کل ماهیان تیمارهای مختلف با گروه شاهد مشاهده نشد (جدول۱) (p>۰/۰۵). از آن‌جایی که سعی بر آن بود ماهیان با طول و وزن تقریبی یکسان انتخاب گردند، عدم وجود اختلاف معنی داری در شاخص‌های رشد سوماتیک قابل پیش بینی بود. فاکتورهای فیزیکو شیمیایی آب به طور روزانه اندازه-گیری شد و مشخصات فیزیکو شیمیایی به صورت زیر بود: دما= ۱ ± ۱۹/۵ سانتی‌گراد، اکسیژن محلول= ۰۶/. ± ۸/۸۰ میلی گرم در لیتر، پی اچ= ۴۵/. ± ۷/۵۶، سختی کل= ۲/۳۵ ± ۲۹۳ میلی گرم در لیتر، آب به صورت روزانه تعویض و پارامترهای کیفی آب دوبار در هفته اندازه‌گیری شد (دستگاه اندازه‌گیری پی اچ، دما و اکسیژن متر و فتومتر ۷۱۰۰ انگلستان).

جدول۱- نتایج زیست سنجی ماهی قرمز در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره

Table 1. The Result of the biometrics of fishes exposed to sub-lethal concentrations of silver nitrate

زیست سنجی ماهیان	گروه شاهد	غلظت ۰/۱ (ppm)	غلظت ۰/۵ (ppm)	غلظت۱ (ppm)	غلظت ۵ (ppm)
طول کل (سانتی متر)	^{a}۰/۵۷±۱۶/۳۳	^{a}۱/۳۲±۱۵/۰۰	^{a}۲/۷۵±۱۴/۶۷	^{a}۱/۶۰±۱۳/۸۳	^{a}۰/۲۸±۱۴/۸۳
وزن کل (گرم)	^{a}۱۴/۵۷±۶۱/۶۶	^{a}۱۳/۳۱±۵۴/۳۳	^{a}۱۶/۱۶±۴۴/۶۷	^{a}۱۲/۸۹±۴۵/۳۳	^{a}۵/۲۹±۴۱/۰۰

*داده‌ها به وسیله میانگین± انحراف معیار محاسبه شدند. مقادیر به دست آمده برای هر ویژگی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

اثر غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر عوامل خونی ماهی قرمز در جدول(۲) ارایه شده است. تعداد گلبول‌های قرمز گروه شاهد نسبت به غلظت‌های مختلف نیترات نقره، کاهش معنی دار داشت (p<۰/۰۵). هم‌چنین میزان هماتوکریت، کاهش پیدا کرد و بین گروه شاهد با سایر تیمار ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت (p<۰/۰۵). هموگلوبین خون گروه شاهد با سایر غلظت-ها اختلاف معنی‌دار داشت و با افزایش غلظت محلول نیترات نقره، کاهش معنی دار پیدا کرد (p<۰/۰۵). گلوگز خون روند افزایشی داشت و بین گروه شاهد با غلظت ۰/۰۵ اختلاف معنی دار وجود داشت (p<۰/۰۵) و در این غلظت به بیشترین مقدار رسید، اما نسبت به سایر غلظت‌ها افزایش معنی‌دار نداشت (p>۰/۰۵). تعداد گلبول‌های سفید گروه شاهد با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت (p>۰/۰۵) اما در بیشترین غلظت‌ها (۰/۰۵ و ۰/۱) بیشترین افزایش را نشان داد. M.C.H.C خون گروه شاهد نسبت به سایر غلظت‌ها کاهش یافت (p<۰/۰۵). M.C.V گروه شاهد، نسبت به سایر غلظت‌ها، افزایش یافت (p<۰/۰۵)، اما بین غلظت‌های مختلف نسبت به هم اختلاف معناداری وجود نداشت (p>۰/۰۵). افزایش M.C.H گروه شاهد نسبت به سایر غلظت‌ها به طور معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). نوتروفیل گروه شاهد فقط در اولین غلظت اختلاف معنی دار داشت اما میزان آن با سایر غلظت‌ها اختلافی نداشت (p>۰/۰۵). ائوزینوفیل گروه شاهد با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی دار نداشت (p>۰/۰۵). میزان لنفوسیت گروه شاهد نسبت به غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۲۵ افزایش معنی دار داشت (p<۰/۰۵) و در دو غلظت ۰/۰۵ و۰/۱ کاهش پیدا کرد که این میزان کاهش فقط با غلظت ۰/۱ معنی دار بود (p<۰/۰۵) .

جدول ۲- میزان شاخص های خونی ماهی قرمز در مواجه با غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره

Table 2. The amount of of blood parameters of gold fish exposed to sub-lethal concentrations of silver nitrate

عوامل اندازه‌گیری شده	گروه شاهد	غلظت ۰/۰۱ (قسمت در میلیون)	غلظت ۰/۰۲۵ (قسمت در میلیون)	غلظت۰/۰۵ (قسمت در میلیون)	غلظت ۰/۱ (قسمت در میلیون)
گلبول قرمز ($\times 10^6$ میکرو لیتر)	^{a}۰/۰۵±۱/۱۵	^{b}۰/۰۲±۰/۹۶	^{b}۰/۰۰±۰/۹۷	^{b}۰/۰۰±۰/۹۷	^{b}۰/۰۱±۰/۹۷
هماتوکریت (درصد)	^{a}۰/۲۵±۲۲/۸۳	^{b}۰/۰۵±۲۲/۰۳	^{bc}۰/۰۵±۲۱/۷۳	^{cd}۰/۰۵±۲۱/۴۷	^{d}۰/۱۵±۲۱/۳۳
هموگلوبین (گرم بر دسی‌لیتر)	^{a}۰/۱۱±۷/۵۷	^{b}۰/۰۵±۷/۰۳	^{c}۰/۰۵±۶/۷۳	^{d}۰/۰۵±۶/۴۷	^{d}۰/۱۵±۶/۳۳
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	^{b}۱۰/۰۱±۲۲۰/۶۷	^{b}۴۹/۹۳±۲۵۲/۰۰	^{ab}۵۴/۹۳±۲۷۱/۷۳	^{a}۶۱±۴۱۰/۶۷	^{ab}۷۴/۱۹±۳۵۴/۳۳
M.C.H.C (گرم بر دسی لیتر)	^{a}۰/۰۵±۳۲/۲۳	^{b}۰/۱۷±۳۱/۹۰	^{c}۰/۱۷±۳۱/۰۰	^{d}۰/۱۷±۳۰/۱۰	^{d}۰/۵۰±۲۹/۶۷
M.C.V (فمتو لیتر)	^{b}۷/۵۴±۱۹۹/۳۶	^{a}۰/۳۲±۲۲۱/۵۱	^{a}۳/۹۹±۲۲۴/۵۷	^{a}۰/۵۶±۲۲۱/۲۴	^{a}۲/۹۷±۲۲۱/۵۴
M.C.H (پیکو گرم)	^{ab}۲/۱۴±۶۶/۰۳	^{a}۰/۴۹۱±۷۰/۷۱	^{a}۱/۰۳±۶۹/۶۳	^{b}۴/۲۶±۶۳/۰۳	^{b}۱/۳۴±۶۲/۶۹
گلبول سفید ($\times 10^3$ میکرو لیتر)	^{a}۱۱۵۴/۷۰±۶۵۶۶۶/۶۶	^{a}۲۵۱۶/±۶۲۶۶۶	^{a}۳۳۳۸۵/۵۲±۴۴۷۳۳/۳۳	^{a}۱۵۲۷/۵۲±۶۶۶۶۶/۶۷	^{a}۱۷۳۲/۱۵±۷۱۰۰۰/۰۰
لنفوسیت (درصد)	^{b}۰/۰۰±۹۲	^{a}۰/۵۷±۹۴/۶۷	^{a}۱/۰۰±۹۵/۰۰	^{b}۰/۵۷±۹۱/۶۷	^{c}۰/۵۷±۸۹/۶۷
ائوزینوفیل (درصد)	^{a}۰/۳۳±۰/۵۷	^{a}۰/۵۷±۱/۶۷	^{a}۰/۵۷±۲/۳۳	^{a}۰/۵۷±۱/۶۷	^{a}۰/۵۷±۴۱/۶۷

*داده‌ها به وسیله میانگین± انحراف معیار محاسبه شدند. مقادیر به دست آمده برای هر ویژگی که حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند، از نظر آماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

بحث و نتیجه گیری

نقره یونی، برای موجودات زنده بسیار سمی است (۱۶)، هر چند ممکن است اشکال دیگری از نقره وجود داشته باشد که فقط در دسترس موجودات زنده است (۱۷). خاصیت ضد میکروبی آنتی باکتریال این ماده، منجر به گسترش تعداد زیادی از محصولات بر پایه نقره شده است. نقره فلزی است که به دلیل کاربرد فراوان در اشکال مختلف نمک و نانو نقره، به طور گسترده ای در محیط پراکنده شده است. اما در منابع اطلاعاتی موجود، اطلاعات محدودی در رابطه با سمیت نیترات نقره وجود دارد (۱۸).

در مطالعه صورت گرفته روی جامعه پلانکتونی (۲) غلظت مورد استفاده نقره، ۵ میکروگرم بر لیتر به صورت $AgNO_3$ بود و غلظت های بالاتر از این مقدار موجب تغییر جامعه پلانکتونی شدند. هم‌چنین همه موجودات یوکاریوتی، پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر نقره از محلول $AgNO_3$ از بین رفتند. حتی در غلظت ۱۰ میکروگرم بر لیتر نقره از محلول $AgNO_3$ در مدت یک روز تاژکداران و داینوفلاژله های کمتری نسبت به گروه شاهد زنده ماندند (۱۹) که این امر نشان دهنده سمیت بالای این ماده در موجودات زنده است و با مطالعه ژائو و وانگ (۴) درسال ۲۰۱۱ هم‌خوانی دارد که بیان می‌کنند غلظت LC_{50} برای نیترات نقره، مقدار بسیار کمی یعنی (۲/۵۱) میکرو گرم بر لیتر می‌باشد.

در مطالعه دیگری بر روی سمیت یون نقره که توسط ناوارو و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گردید (۲۰)، گزارش شد که انتشار یون نقره در جلبک سبز کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) موجب مهار فتوسنتز خواهد شد. اما در هیچ کدام از مطالعات انجام شده سمیت یون

نقره در سطح سلولی بررسی نشده است. محیط زیست ماهیان و شرایط حاکم بر آن (نظیر آلودگی) بر مقادیر سلول‌های خونی و سایر عوامل خونی تاثیر می‌گذارد که این تغییرات می‌تواند به عنوان شاخص زیستی مد نظر قرار گیرد. با توجه به این‌که پارامترهای خونی شرایط نامطلوب محیطی را برای ماهیان سریع‌تر از پارامترهای دیگر نشان می‌دهند، تا حد زیادی برای تعیین وضعیت سلامت و نظارت بر پاسخ‌های استرسی ماهیان برای پیش بینی سازگاری‌های فیزیولوژیکی آن‌ها استفاده می‌شود (۱۱). زیست آزمونی (Bioassay) روشی است که عکس العمل‌های موجودات آبزی برای آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تأثیر یک یا چند ماده سمی یا عامل محیطی به تنهایی یا توأم با یک دیگر را مورد بررسی قرار می‌دهد (۲۱). با استفاده از در معرض قرار دادن ارگانیسم‌ها درغلظت‌های مختلف موادآلوده کننده، زیست آزمونی برای ارزیابی اثرات سمیت آن‌ها انجام می‌گیرد که به وسیله پایش خصوصیات و رفتارهای بیولوژیک این ارگانیسم‌ها و مقایسه آن با ارگانیسم‌هایی که هیچ گونه مواجه‌ای با مواد آلوده کننده نداشته اند امکان پذیر می‌باشد (۲۲). در زیست آزمونی از موجودات گوناگونی نظیر جلبک، ماهی، باکتری و انواع موجودات آب شیرین نظیر دافنی استفاده می‌شود (۱۴). بر این اساس ماهی برای ارزیابی خطر سمیت نیترات نقره انتخاب گردید.

در مطالعه حاضر، تعداد گلبول‌های قرمز گروه شاهد، کاهش معنی داری با تمام غلظت‌های مختلف نیترات نقره داشت ($p<۰/۰۵$). هم‌چنین میزان هماتوکریت، M.C.H.C و هموگلوبین خون کاهش پیدا کرد و بین گروه شاهد با سایر تیمار ها اختلاف معنی‌دار دیده شد ($p<۰/۰۵$).

تحت شرایط استرس زا گلبول‌های قرمز نابالغ از طحال آزاد شده و با افزایش متابولیک، اکسیژن رسانی به ارگان‌های مهم افزایش می‌یابد که به دنبال آن گلبول‌های قرمز، غلظت هموگلوبین و سطح هماتوکریت افزایش می‌یابد (۲۴ و ۲۳). کاسیلاس و همکاران (۲۵) در تحقیقی اثرات استرس بر ماهی قزل آلای رنگین کمان را مطالعه کرده و بیان نمودند که استرس به هر دلیلی سبب افزایش هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول های قرمز می‌شود. در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیان‌گر سرکوب ایمنی موجود و افزایش میزان آن‌ها نشان دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد (۲۶). در مطالعه حاضر غلظت گلوکز روند افزایش داشت، هرچند که این افزایش در همه غلظت‌ها معنی دار نبود و فقط بین گروه شاهد با غلظت ۰/۰۵ اختلاف معنی دار وجود داشت ($p<۰/۰۵$). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت غلظت‌های تحت کشنده نیترات نقره عامل ایجاد استرس در ماهی قرمز نیستند.

کاهش شاخص‌های اریتروسیتی خون به دلیل کم‌خونی رخ می‌دهد. در طی کم خونی، کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت مشاهده می‌شود که ممکن است به دلیل خونریزی، همولیز یا کاهش تولید گلبول‌های قرمز صورت پذیرد که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۲۷). شاخص‌های لوکوسیتی خون شامل گلبول‌های سفید از جمله لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها یکی از بخش‌های سیستم ایمنی غیر اختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن‌ها می‌تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (۲۴). در پاسخ به استرس‌های موجود در محیط آبی، کاهش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند بیان‌گر سرکوب ایمنی موجود و افزایش میزان آن‌ها نشان دهنده پاسخ به استرس یا عفونت باشد (۲۶). در مطالعه حاضر به جز لنفوسیت بین شاخص‌های لوکوسیتی خون ماهی شاهد و سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت. در این آزمایش ابتدا لنفوسیت در دو غلظت افزایش و سپس کاهش پیدا کرد ($p<۰/۰۵$). لنفوسیت‌ها نسبت به سایر لکوسیت‌ها طول عمر زیادتری دارند و اغلب در مواجهه باآلودگی کاهش پیدا می‌کنند. در تحریک یا سرکوب سیستم ایمنی، لنفوسیت‌ها بیومارکرهای کارآمدی محسوب می‌شوند (۲۷) اما در تعداد گلبول‌های سفید در بالاترین غلظت‌ها (۰/۰۵ و ۰/۱) افزایش مشاهده شد، هرچند این تغییرات معنی‌دار نبود اما با مطالعات زارچی (۲۸) مطابقت دارد که بیان می‌کند بدن، جهت مقابله با نانو ذرات نقره ورودی تولید گلبول‌های سفید را

افزایش‌می‌دهد. از آن‌جایی که افزایش غلظت نیترات نقره، می-تواند موجب تغییر در تعداد گلبول های سفید شود با افزایش غلظت از ۰/۰۱ تا ۰/۰۲۵ ppm گلبول‌های سفید کاهش پیدا کرد که با مطالعات چن و همکاران(۲۹) مطابقت دارد که بیان می‌کنند افزایش درگیری سلول‌ها در فرآیند ایمنی، موجب کاهش سلول‌های خونی می‌گردد .

به طور کلی نتایج تحقق حاضر نشان داد که غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر روی عوامل اریتروسیتی خون ماهی قرمز تاثیر گذار بود ($p<۰/۰۵$)؛ اما بر روی عوامل لوکوسیتی خون تاثیر چندانی نداشت که این امر ممکن است به دلیل مقاوم بودن این ماهی نسبت به ماهیان دیگر باشد علاوه بر این چون یون نقره به تنهایی خاصیت آنتی باکتریال دارد، عدم تاثیر بر اکثر عوامل لوکوسیتی تایید کننده این مطلب است که یون نقره سبب افزایش ایمنی سلولی خواهد شد. در مجموع با بررسی نتایج آنالیزهای آماری مشخص شد که ماهی قرمز در مواجهه با غلظت‌های مختلف نیترات نقره، در بیشتر شاخص‌های اریتروسیتی خون تغییرات معنی دار داشت ($p<۰/۰۵$)، بنابراین این شاخص‌های اریتروسیتی خون می‌توانند به عنوان بیومارکرهای مناسب آلودگی نقره معرفی گردند.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد صورت گرفت.

Reference

1. Tarbali, Bavar, et al."The effect of silver nitrate on the activity of horseradish peroxidase enzyme", Feyz Scientific Research Journal, Kashan University of Medical Sciences, (2012) .pp 713-714 (In persian).
2. Boenigk, Jens, et al. "Effects of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: general trends after short-term exposure." PloS one 9.4 (2014): e95340.
3. Chambers, Cecil W., Charles M. Proctor, and Paul W. Kabler. "Bactericidal effect of low concentrations of silver." Journal-American Water Works Association 54.2 (1962): 208-216.
4. Moyer, C.A., Brentano, L., Gravens, D.L., Margraf, H.W. and Monafo, W.W. " Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution." Arch Surg 90 (1965): 812–867.
5. Gong, Ping, et al. "Preparation and antibacterial activity of Fe3O4@ Ag nanoparticles." Nanotechnology 18.28 (2007): 285604.
6. Davies, P. H., J. P. Goettl Jr, and J. R. Sinley. "Toxicity of silver to rainbow trout (Salmo gairdneri)." Water Research 12.2 (1978): 113-117.
7. Shahsavani, Davar, et al. "The effect of anionic detergent (shampoo) on blood parameters of pond fish (Carassius auratus) "(2003). Research and construction (In Persian).
8. Bhagwant, S., and M. Bhikajee. "Induction of hypochromic macrocytic anaemia in Oreochromis hybrid (cichlidae) exposed to 100mg/l (sublethal dose) of aluminium." University of Mauritius Research Journal 5 (2000): 9-20.
9. Lee, L. E. J., S. J. Caldwell, and J. Gibbons. "Development of a cell line from skin of goldfish, Carassius auratus, and effects of ascorbic acid on collagen deposition." The Histochemical journal 29.1 (1997): 31-43.

10. Mojabi, A., "Veterinary clinical biochemistry". Noorbakhsh Press, Tehran, Iran, (2000). 477, 479. (In Persian).
11. Lusková, V., K. Halacka, and S. Lusk. "Dynamics of the haemogram in the nase, Chondrostoma nasus." Folia Zoologica 44 (1995): 69-74.
12. Stoskopf, M. K. "Clinical pathology." Fish medicine (1993): 113-131.
13. CiCiK, Bedii, and Kenan ENGiN. "The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of Cyprinus carpio (L., 1758)." Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences 29.1 (2005): 113-117.
14. US Environmental Protection Agency. "Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms." EPA-821-R-02-012 (2002).
15. Rabitto, I. S., et al. "Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, Hoplias malabaricus: histopathological and biochemical findings." Ecotoxicology and environmental safety 60.2 (2005): 147-156.
16. Hogstrand, Christer, and Chris M. Wood. "Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria."
17. Campbell, Peter GC, et al. "Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 133.1-2 (2002): 189-206.
18. Mueller, Nicole C., and Bernd Nowack. "Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment." Environmental science & technology 42.12 (2008): 4447-4453.
19. Boenigk, Jens, et al. "Effects of silver nitrate and silver nanoparticles on a planktonic community: general trends after short-term exposure." PloS one 9.4 (2014): e95340.
20. Navarro, Enrique, et al. "Toxicity of silver nanoparticles to Chlamydomonas reinhardtii." Environmental science & technology 42.23 (2008): 8959-8964.
21. Martins, J., L. Oliva Teles, and V. Vasconcelos. "Assays with Daphnia magna and Danio rerio as alert systems in aquatic toxicology." Environment International 33.3 (2007): 414-425.
22. Nadafi, K., et al. "Evaluation of toxicity of oxidized and titanium oxide nanoparticles using bioassay by Escherichia coli ATCC35218 and Staphylococcus aureus ATCC 25923. " Journal of Health and Environment, Scientific Research Quarterly of Iranian Scientific Association of Environmental Health. (2011) Volume 4, Number 2. 171 p.(In Persian)
23. Molinero, A., and J. Gonzalez. "Comparative effects of MS 222 and 2-phenoxyethanol on gilthead sea bream (Sparus aurata L.) during confinement." Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 111.3 (1995): 405-414.

24. Shaluei, Fardin, et al. "Physiological responses of great sturgeon (Huso huso) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic." Fish Physiology and Biochemistry 38.6 (2012): 1627-1634.
25. Casillas, Edmundo, and Lynwood S. Smith. "Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (Salmo gairdneri)." Journal of Fish Biology 10.5 (1977): 481-491.
26. Adams, S. Marshall. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society,(2002).
27. Hedatati A, et al. "Aquatic Toxicology", University of Gorgan, first edition (2013), pp. 70-76 (In Persian).
28. Rezaei Zarchi. S. "The effect of titanium oxide nanoparticles on the amount of blood cells and liver enzymes in the blood of Wistar rats", Scientific Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences,(2011) Yazd, pp. 626-618 (In persian).
29. Chen, Zhen, et al. "Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo." Toxicology letters 163.2 (2006): 109-120.