

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

صفورا ابرقویی^{۱*}

Sabarghoei67@gmail.com

سید علی اکبر هدایتی^۲

رسول قربانی^۳

حامد کلنگی میاندره^۴

طاهره باقری^۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۰۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: در میان آلاینده‌های فلزی، یون نقره بسیار سمی است و بالاترین درجه سمیت را در رده بندی مواد سمی به خود اختصاص داده است. 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 و خون 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 قرار گرفتند. شاخص‌های مورد اندازه‌گیری شامل: تعداد کل گلبول‌های سفید (لوکوسیت)، لنفوسیت، نوتروفیل، ائوزینوفیل، تعداد کل گلبول‌های قرمز (اریتروسیت)، محتوای هموگلوبین، سطح همتوکریت، حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH)، درصد غلظت هموگلوبین داخل گلوبولی و گلوکز سرم بود.

۱-*(مسئول مکاتبات): دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

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

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

۴- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۵- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد، ایران.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج آزمایش نشان داد که غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر روی فاکتورهای اریتروسیتهی خون ماهی قرمز در سطح ۰/۵ معنی دار بود اما بر روی اغلب فاکتورهای لوکوسیتهی خون تاثیر چندانی نداشت که امر ممکن است به دلیل مقاوم بودن این ماهی نسبت به ماهیان دیگر باشد. در نهایت شاخص‌های اریتروسیتهی خون می‌توانند به عنوان بیومارکرهای مناسب آلودگی نقره معرفی گردند.

واژه‌های کلیدی: آلودگی، ماهی قرمز، خون‌شناسی، نیترات نقره، سم شناسی.

Evaluation of the sub-lethal effects of silver nitrate (AgNO₃) concentration toxicity on some hematology and immunology indices in goldfish (*Carassius auratus*)

Safoura Abarghouei ^{1*}

Sabarghoei67@gmail.com

Seyed Ali Akbar Hedayati ²

Rasoul Ghorbani ³

Hamed Kolangi Miyandareh ⁴

Tahereh Bagheri ⁵

Abstract

Background and Objective: Among metal pollutants silver ions are the most toxic forms, and have been assigned to the highest toxicity class. Today, due to the antibacterial properties of silver compounds they are used in various industries. The effects of non-essential heavy metals such as silver are irreversible on aquatic animals' body. In the present study, the sub-ethal effects of silver nitrate on hematology and Immunology parameters of goldfish (*Carassius auratus*) as a model species in Cyprinidae family were investigated.

Method: 105 fish werer randomly placed in 15 fiberglass tanks (400 liters); 12 tanks were used for different concentrations of silver nitrate and 3 tanks were used for control groups. The fishe of each treatment were separately exposed to effective silver nitrate concentrations of 0.01, 0.025, 0.05 and 0.1 ppm, and for hematological and biochemical test, nine fish were randomly selected from each treatment. Measured indices were total number of white blood cells (leukocytes), lymphocytes, neutrophils, eosinophil, total number of red blood cells (erythrocytes), hemoglobin content, hematocrit level, mean corpuscular volume (MCV), hemoglobin the corpuscular (MCH), hemoglobin concentration and serum glucoses.

Conclusion: The results showed that different concentrations of silver nitrate influenced blood erythrocyte ($P<0.05$) but did not affect blood leukocyte, which may be due to the resistance of the gold fish compared to others. Blood could be introduced as a suitable biomarker of silver pollution.

Keywords: Pollution, *Carassius auratus*, hematology, silver nitrate, Toxicology.

1- MSc Graduate of Fishery, Faculty of Fishery and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. * (Corresponding Author)

2- Assistant Professor of Fishery and Environment, Department of Production and Exploitation of Aquatic Animals, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3- Associate Professor of Fishery and Environment, Department of Production and Exploitation of Aquatic Animals, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

4- Assistant Professor of Fishery and Environment, Department of Fishery, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

5- Assistant Professor of Fishery, Gonbad kavooos, Gonbad, 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). یون نقره به طور گسترده در مراقبت های بهداشتی برای کنترل میکروارگانیسم ها به ویژه در سیستم تأمین آب مورد استفاده قرار می گیرد و به دلیل این که هیچ گونه تاثیر نامطلوب بر رنگ، بو و طعم آب ندارد بسیار مورد توجه است (۴).

نقره عمدتاً، به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی ویژه ای که از خود نشان می دهد در مصارف الکترونیکی، نوری، دارویی و بهداشتی کاربرد فراوان دارد (۵) نیترا ت نقره به عنوان عامل ایجاد کننده گروه های فعال اکسیژنی (ROS) شناخته شده و به وسیله مکانیسم های متنوع، شامل بر هم کنش با گروه های سولفیدریل پروتئین ها و آنزیم ها به سلول آسیب می رساند. در حالی که بخش وسیعی از نقره در آب های سطحی به صورت طبیعی وارد می گردد، فعالیت های بشری از قبیل معدن، ساخت جواهرات و عکاسی می توانند سطوح نقره را در آب های محیطی افزایش دهند (۱). تعدادی از مطالعات نشان دادند که نیترا ت نقره به شدت برای ماهیان آب شیرین سمی است (۶). سیستم های آبی، پیوسته با مشکلات ناشی از آلاینده هایی مواجه هستند که از منابع مختلف مانند فاضلاب های صنعتی، پساب های کشاورزی و فاضلاب های شهری وارد آن ها می شوند. آلاینده ها (فلزات سنگین، سموم و فرآورده های نفتی) برای سیستم زیستی محیط های آبی زیان آور بوده و عمدتاً بدون هیچ تصفیه ای به آب ها وارد می گردند (۷). اکوسیستم آبی در پایین ترین سطح از ارتفاع قرار دارد در نتیجه مقصد نهایی تمام آلاینده های محیطی آب است. در نتیجه آلوده شدن آب با این مواد و نهایتاً با تغذیه از آبزیان در طول زنجیره غذایی به انسان منتقل شده و در طول زمان در بدن موجودات و انسان انباشته می شود. وجود آن ها در بدن خطرات جبران ناپذیری را در سال های طولانی به دنبال دارد (۲).

در محیط های آبی، ماهی به عنوان یک آبرزی برای ارزیابی اثر آلاینده های محیطی در بوم سامانه های آبی در نظر گرفته می-شود. ماهی در بالاترین نقطه زنجیره غذایی آبی قرار گرفته است و توانایی بزرگنمایی زیستی فلزات سنگین، حتی در غلظت های پایین موجود در محیط را دارد (۸). ماهی قرمز از خانواده کپور ماهیان می باشد و به لحاظ شرایط زیستی و تغذیه ای شبیه کپور معمولی است. این ماهی در ایران در حوضه های 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 محیط های آزمایشگاهی به راحتی قادر به بلوغ و تولیدمثل می باشد. در واقع از این گونه به عنوان مدل جهت بررسی کپور ماهیان استفاده می شود (۹).

خون شاخص مهمی برای وضعیت فیزیولوژیک اندام های بدن در تشخیص سلامت یا بیماری و کنترل روند زیستی موجودات زنده از جمله ماهی می باشد (۱۰). مطالعات خون شناسی روش ارزشمندی برای ارزیابی آثار محیطی آلاینده ها روی ماهیان می باشد (۱۱). شاخص های مربوط به خون مانند گلبول های قرمز و گلبول های سفید از جمله لنفوسیت ها، نوتروفیل ها و مونوسیت ها یکی از بخش های سیستم ایمنی غیر اختصاصی سلولی هستند که نوسان در تعداد آن ها می تواند به عنوان یک شاخص مناسب در ارتباط با پاسخ ماهیان به عوامل استرس مطرح باشد (۱۲).

با توجه به استفاده های 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 نیترا ت نقره وجود دارد هدف از مطالعه حاضر افزایش اطلاعات در این زمینه و ارزیابی خطر این ماده برای محیط زیست می باشد. در تحقیق حاضر جهت بررسی اثرات تحت کشنده نمک نیترا ت نقره بر شاخص های خون شناسی و ایمنی شناسی، ماهی قرمز به عنوان گونه مدل در بررسی خانواده کپور ماهیان انتخاب شد تا از این طریق مارکر خونی مناسبی برای سمیت نیترا ت نقره مشخص شود.

روش بررسی

در پاییز سال ۱۳۹۲ تعداد ۱۰۵ قطعه ماهی قرمز، از مرکز فنی حرفه ای آق قلا، با میانگین وزنی $12/05 \pm 56/33$ گرم تهیه و به مرکز تحقیقات آبی 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 ۳ مخزن به عنوان گروه شاهد) و برای سازگاری به مدت ۲ هفته در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شد 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 شد. 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 ۵۰۰ ppm 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 محلول نیترات 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، 184 ppm / اندازه‌گیری شد. غلظت‌های موثر نیترات نقره به ترتیب 1 ppm ، $0/01$ ، $0/025$ ، $0/05$ و $0/1$ 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 شد. (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 فیزیکی و شیمیایی آب به طور روزانه کنترل شد. 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 نسبتاً 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 غلظت‌های موثر نیترات نقره قرار گرفته 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 گلبول‌های 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 و گلبول‌های قرمز به روش هموسیتمتری انجام گرفت (۱۵). مقدار هماتوکریت و غلظت هموگلوبین نیز به روش میکروهماتوکریت و سیانومت هموگلوبین سنجش گردید. به منظور شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، گسترش خونی بر روی لام تهیه و گسترش‌های تثبیت شده با استفاده از رنگ گیمسا رنگ آمیزی شدند. برای اندازه‌گیری 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 حاصله 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 ($P < 0/05$) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. همه نتایج به دست آمده به وسیله میانگین $\pm$ 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 (جدول ۱) ($p > 0/05$). از آنجایی که سعی بر آن بود ماهیان

با طول و وزن تقریبی یکسان انتخاب کردند، عدم وجود اختلاف معنی داری در شاخص‌های رشد سوماتیک قابل پیش بینی بود. فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب به طور روزانه اندازه‌گیری شد و مشخصات فیزیکی شیمیایی به صورت زیر بود: دما = 19.5 ± 1 سانتی‌گراد، اکسیژن محلول = 8.0 ± 0.6 میلی گرم در لیتر،

پی‌اچ = 7.45 ± 0.56 ، سختی کل = $293 \pm 2/35$ میلی گرم در لیتر، آب به صورت روزانه تعویض و پارامترهای کیفی آب دوبار در هفته اندازه‌گیری شد (دستگاه اندازه‌گیری پی‌اچ، دما و اکسیژن متر و فتومتر ۷۱۰۰ انگلستان).

جدول ۱- نتایج زیست‌سنجی ماهی قرمز در مواجهه با غلظت‌های تحت کشنده نترات نقره

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

زیست‌سنجی ماهیان	گروه شاهد	غلظت ۰/۱ (ppm)	غلظت ۰/۵ (ppm)	غلظت ۱ (ppm)	غلظت ۵ (ppm)
طول کل (سانتی متر)	57.16 ± 3.3^a	32.15 ± 1.0^a	75.14 ± 6.7^a	60.13 ± 8.3^a	28.14 ± 8.3^a
وزن کل (گرم)	14.57 ± 6.1^a	13.31 ± 4.3^a	16.16 ± 4.6^a	12.89 ± 5.3^a	29.41 ± 1.0^a

* داده‌ها به وسیله میانگین $\pm$ 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 نترات نقره بر فاکتورهای خونی ماهی قرمز در جدول‌های ۲ ارائه شده است. تعداد گلبول‌های قرمز گروه شاهد نسبت به غلظت‌های مختلف نترات نقره، کاهش معنی‌دار داشت ($p < 0.05$). هم‌چنین میزان هماتوکریت، کاهش پیدا کرد و بین گروه شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p < 0.05$). هموگلوبین خون گروه شاهد با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار داشت و با افزایش غلظت محلول نترات نقره، کاهش معنی‌دار پیدا کرد ($p < 0.05$). گلوکز خون روند افزایشی داشت و بین گروه شاهد با غلظت ۰/۰۵ اختلاف معنی‌دار داشت ($p < 0.05$) و در این غلظت به بیشترین مقدار رسید، اما نسبت به سایر غلظت‌ها افزایش معنی‌دار نداشت ($p > 0.05$). تعداد گلبول‌های سفید گروه شاهد با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0.05$) اما در بیشترین غلظت‌ها (۰/۰۵ و ۰/۱) بیشترین افزایش را داشت.

MCHC خون گروه شاهد نسبت به سایر غلظت‌ها کاهش یافت ($p < 0.05$) MCV گروه شاهد، نسبت به سایر غلظت‌ها، افزایش یافت ($p < 0.05$)، اما بین غلظت‌های مختلف نسبت به هم اختلافی معناداری وجود نداشت ($p > 0.05$). افزایش MCH گروه شاهد نسبت به سایر غلظت‌ها به طور معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). نوتروفیل گروه شاهد فقط در اولین غلظت اختلاف معنی‌دار داشت اما میزان آن با سایر غلظت‌ها اختلافی نداشت ($p > 0.05$). ائوزینوفیل گروه شاهد با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0.05$). میزان لنفوسیت گروه شاهد نسبت به غلظت‌های ۰/۰۱ و ۰/۰۲۵ افزایش معنی‌دار داشت ($p < 0.05$) و در دو غلظت ۰/۰۵ و ۰/۱ کاهش پیدا کرد که این میزان کاهش فقط با غلظت ۰/۱ معنی‌دار بود ($p < 0.05$).

جدول ۲- میزان پارامترهای خونی ماهی کاراس طلایی 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

غلظت ۰/۱ (قسمت در میلیون)	غلظت ۰/۰۵ (قسمت در میلیون)	غلظت ۰/۰۲۵ (قسمت در میلیون)	غلظت ۰/۰۱ (قسمت در میلیون)	گروه شاهد	عوامل اندازه‌گیری شده
b. / ۰.۱ ± ۰.۹۷	b. / ۰.۰۵ ± ۰.۹۷	b. / ۰.۰۲۵ ± ۰.۹۷	b. / ۰.۰۱ ± ۰.۹۶	a. / ۰.۵ ± ۱.۱۵	گلبول قرمز ($\times 10^6$ میکرو لیتر)
d. / ۰.۱۵ ± ۲۱.۳۳	cd. / ۰.۵ ± ۲۱.۴۷	bc. / ۰.۵ ± ۲۱.۷۳	b. / ۰.۵ ± ۲۲.۰۳	a. / ۲۵ ± ۲۲.۸۳	هماتوکریت (درصد)
d. / ۰.۱۵ ± ۶.۳۳	d. / ۰.۵ ± ۶.۴۷	c. / ۰.۵ ± ۶.۷۳	b. / ۰.۵ ± ۷.۰۳	a. / ۱۱ ± ۷.۵۷	هموگلوبین (گرم بر دسی لیتر)
ab ۷۴/۱۹ ± ۳۵۴/۳۳	a ۶۱ ± ۴۱۰/۶۷	ab ۵۴/۹۳ ± ۲۷۱/۷۳	b ۴۹/۹۳ ± ۲۵۲/۰۰	/ ۰.۱ ± ۲۲۰/۶۷ b _{۱۰}	گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)
d. / ۰.۵۰ ± ۲۹/۶۷	d. / ۰.۱۷ ± ۳۰/۱۰	c. / ۰.۱۷ ± ۳۱/۰۰	b. / ۰.۱۷ ± ۳۱/۹۰	a. / ۰.۵ ± ۳۲/۲۳	M.C.H.C (گرم بر دسی لیتر)
a ۲/۹۷ ± ۲۲۱/۵۴	a. / ۰.۵۶ ± ۲۲۱/۲۴	a ۳/۹۹ ± ۲۲۴/۵۷	a. / ۰.۳۲ ± ۲۲۱/۵۱	۷/۵۴ ± ۱۹۹/۳۶ b	M.C.V (فمتو لیتر)
b _۱ / ۳۴ ± ۶۲/۶۹	b ۴/۲۶ ± ۶۳/۰۳	a _۱ / ۰.۳ ± ۶۹/۶۳	a. / ۰.۴۹ ± ۷۰/۷۱	۲/۱۴ ± ۶۶/۰۳ ab	M.C.H (پیکو گرم)
a _۱ ۷۳۲/۱۵ ± ۷۱۰۰۰/۰۰	a _۱ ۵۲۷/۵۲ ± ۶۶۶۶۶/۶۷	/ ۵۲ ± ۴۴۷۳۳/۳۳ a _۳ ۳۳۸۵	a _۲ ۵۱۶/۱۶ ± ۶۲۶۶۶	۷۰ ± ۶۵۶۶۶/۶۶ a _۱ ۱۵۴/	گلبول سفید ($\times 10^3$ میکرو لیتر)
c. / ۰.۵۷ ± ۸۹/۶۷	b. / ۰.۵۷ ± ۹۱/۶۷	a _۱ / ۰.۰ ± ۹۵/۰۰	a. / ۰.۵۷ ± ۹۴/۶۷	b. / ۰.۰ ± ۹۲	لنفوسیت (درصد)
a. / ۰.۵۷ ± ۴۱/۶۷	a. / ۰.۵۷ ± ۱/۶۷	a. / ۰.۵۷ ± ۲/۳۳	a. / ۰.۵۷ ± ۱/۶۷	۰/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a	اُتوزینوفیل (درصد)

* داده‌ها به وسیله میانگین $\pm$ 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. هم چنین 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 امر نشان دهنده سمیت بالای این ماده در موجودات زنده است و با مطالعه ژائو و وانگ (۴) در سال ۲۰۱۱ هم خوانی دارد که بیان می کنند غلظت LC_{50} برای نیترات نقره، مقدار بسیار کمی است (۲/۵۱) میکرو گرم بر لیتر.

در مطالعه دیگری بر روی سمیت یون نقره که توسط ناوارو و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام شد (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 فاکتورهای 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 آبی برای آشکارسازی، اندازه‌گیری یا تأثیر یک یا چند ماده سمی یا عامل محیطی به تنهایی یا توأم با یکدیگر را مورد بررسی قرار می‌دهد (۲۱) با استفاده از در معرض قرار دادن ارگانیسم‌ها در غلظت‌های دوزهای مختلف آلوده کننده، زیست آزمونی برای ارزیابی اثرات سمیت آن‌ها انجام می‌گیرد که به وسیله پایش خصوصیات و رفتارهای بیولوژیک این ارگانیسم‌ها و مقایسه آن با ارگانیسم‌های که هیچ گونه مواجهه ای 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 ($p < 0.05$). هم‌چنین میزان هماتوکریت، M.C.H.C و هموگلوبین خون کاهش پیدا کرد و بین گروه شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p < 0.05$).

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 (۲۳ و ۲۴).

کاسیلاس و همکاران (۲۵) در تحقیقی اثرات استرس بر ماهی قزل آلا رنگین کمان مطالعه کرده و بیان نمودند که استرس به هر دلیلی سبب افزایش هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد گلبول‌های 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 و بین گروه شاهد با غلظت ۰/۰۵ اختلاف معنی دار وجود داشت ($p < 0.05$). 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 کم‌خونی، کاهش در 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 ($p < 0.05$). لنفوسیت‌ها نسبت به سایر لوکوسیت‌ها طول عمر زیادتری دارند و اغلب در مواجهه با آلودگی 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 افزایش می‌دهد. از آنجایی که افزایش غلظت نیترات نقره، می‌تواند موجب تغییر در تعداد گلبول‌های 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.

- Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄@ Ag nanoparticles. Nanotechnology, 18(28), 285604.
- 6- Davies, P.H., Goettl, Jr., J.P. And Sinley, J.R., 1978. Toxicity of silver to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Water Res., 12: 113-117.
- ۷- شاهسونی، داور، مهری، مهرداد، نظری. کوروش ۱۳۸۲. بررسی تأثیر ماده شوینده آنیونی (شامپو) بر پارامترهای خونی ماهی حوض (*Carassius auratus*) پرورش و سازندگی.
- 8- Bhagwant, S. and Bhikagee, M. 2000. Induction of hypochromic Macrocytic Anemia in *Oreochromis hybrid* (Cichlidae) exposed to 100mg/L (sub lethal dose) of Aluminum. Science and Technology- Research Journal.
- 9- Lee, L.E., Caldwell, S.J. and Gibbons, J. 1997. Development of a cell line from skin of goldfish (*Carassius auratus*), and effects of ascorbic acid on collagen deposition. Histochemistry and Cell Biology. 29: 31-43.
- 10- Mojabi, A. (2000). Veterinary clinical biochemistry. Noorbakhsh Press, Tehran, Iran, 477, 479. (In Persian).
- 11- Luskova, V., Halacka, K., & Lusk, S. 1995. Dynamics of the haemogram in the nase, *Chondrostoma nasus*. Folia Zoologica, 44, 69-74.
- 12- Stoskopf, M.A. 1993. Fish medicine. Saunders Company, U.S.A, 882p.
- 13- Cicik, B. and Engin, K. 2005. The effects of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758). Turk J Vet Anim Sci. 29:113-117.
- 14- U.S.Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh water and marine organisms [Online]. 2002; Available from: URL: www.water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/disk2_index.cfm/
- به طور کلی نتایج آزمایش حاصل نشان داد که غلظت‌های مختلف نیترات نقره بر روی فاکتورهای اریتروسیتی خون ماهی قرمز تأثیر گذار بود ($p < 0.05$)؛ اما بر روی فاکتورهای لوکوسیته خون تأثیر 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 تأثیر بر اکثر فاکتورهای لوکوسیته تأیید کننده این مطلب است که یون نقره سبب افزایش ایمنی سلولی خواهد شد.
- در مجموع با بررسی نتایج آنالیزهای آماری مشخص شد که ماهی کاراس طلایی در مواجهه با غلظت‌های مختلف نیترات نقره، در بیشتر شاخص‌های اریتروسیتی خون تغییرات معنی دار داشت ($p < 0.05$)؛ بنابراین این شاخص‌های اریتروسیتی خون می‌توانند به عنوان بیومارکرهای مناسب آلودگی نقره معرفی گردند.
- ### تشکر و قدردانی
- این تحقیق با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد صورت گرفت.
- ### منابع
- ۱- ترپالی. ندا، بهاور، مائده، عین‌اللهی. ناهید، نباتچیان. فریبا، بررسی اثر نیترات نقره بر فعالیت آنزیم پراکسیداز ترب کوهی، ۱۳۹۱، مجله علمی پژوهشی فیض، دانشگاه علوم پزشکی کاشان، صص ۷۱۳-۷۱۴.
- 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, C.W., Proctor, C.M., Kabler, P.W., 1962. Bactericidal effect of low concentrations of silver. American Water Works Association 54, 208-216.
- 4- Yahya, M.T., Straub, T.M., Gerba, C.P., 1992. Inactivation of coliphage MS-2 and poliovirus by copper, silver, and chlorine. Canadian Journal of Microbiology 38, 430-435.
- 5- Gong, P., Li, H., He, X., Wang, K., Hu, J., Tan, W. ... & Yang, X. 2007.

- toxicology. Environ Int 2007; 33(3): 414-25
- 22- Nadeef K. Bioassay with micro organism, review article. J Shaheed Sadoughi Univ Med Sci 1995.
- 23- Molinero, A., & Gonzalez, J. 1995. 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), 405-414
- 24- Shaluei, F., Hedayati, A., Jahanbakhshi, A., & Baghfalaki, M. 2012. Physiological responses of great sturgeon (*Huso huso*) to different concentrations of 2-phenoxyethanol as an anesthetic. Fish physiology and biochemistry, 38(6), 1627-1634
- 25- Casillas, E., Smith, L.S., 1974. Effects of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout exposed to hypoxia, J.Fish Biol. 6, 379-380.
- 26- Adams, S. M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society.
- ۲۷- هدایتی. ع، جهانبخشی. ع، قادری رمازی. ف، ۱۳۹۲، سم شناسی آبزیان، جلد اول، چاپ اول، صص ۷۰-۷۶.
- ۲۸- رضایی زارچی. س، ۱۳۹۰، اثر نانو ذرات اکسید تیتانیوم روی میزان سلول های خونی و آنزیم های کبدی در خون رت نژاد ویستار، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، صص ۶۲۶-۶۱۸.
- 29- Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G, Wan, L. 2006. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicology letters, 163(2), 109-120.
- 15- Rabitto, I. S., Alves Costa, J. R. M., Silva de Assis, H. C., Pelletier, E., Akaishi, F. M., Anjos, A., ... & Oliveira Ribeiro, C. A. (2005). Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on Neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. Ecotoxicology and environmental safety, 60(2), 147-156.
- 16- Hogstrand C, Wood C. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. Environ Toxicol Chem 1998; 17:547-61.
- 17- Campbell PGC, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP, Vigneault B. Metal bioavailability to phytoplankton — applicability of the biotic ligand model. Comparative biochemistry and physiology. Toxicol Pharmacol CBP CBP 2002;133:189-206
- 18- Mueller, N. C., & Nowack, B. (2008). Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Environmental Science & Technology, 42(12), 4447-4453.
- 19- Hund-Rinke, K., Marscheider-Weidemann, F., Kemper, M., & Simon, M. (2008). Beurteilung der Gesamtumweltexposition von Silberionen aus Biozid-Produkten. UBA Texte, 43(08).
- 20- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, et al. Toxicity of silver Nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ Sci Technol 2008b; 42:8959-64.
- 21- Martins J, Oliva TL, Vasconcelos V. Assays with *Daphnia magna* and *Danio rerio* as alert systems in aquatic