فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

اثرات مواجهه با نیترات نقره بر سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و شاخص‌های متابولیکی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

بهنام آریان[۱]، جواد قاسم‌زاده[۲]، سراج بیتا[۲]*

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۴۰۰

چکیده

قرارگیری آبزیان در معرض نقره همانند فلزات سنگین دیگر به دلیل تولید رادیکال‌های آزاد سبب ایجاد آسیب اکسیداتیو و تغییرات بیوشیمیایی در موجودات می‌شود. بنابراین، در مطالعه حاضر تغییرات سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) طی ۲۱ روز مواجهه با نیترات نقره بررسی شد. بدین منظور میگوها با غلظت‌های مختلف نیترات نقره شامل تیمار ۱: ۱۰٪LC_{50} (۰/۰۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر)، تیمار ۲: ۲۵٪LC_{50} (۰/۰۲۱ میلی‌گرم در لیتر)، تیمار ۳: ۵۰٪LC_{50} (۰/۰۴۲ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار ۴: ۷۵٪LC_{50} (۰/۰۶۳ میلی‌گرم در لیتر) و تیمار شاهد مواجه شدند. طبق نتایج، فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای ۳ و ۴ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار ۴ به طوری معنی‌داری کاهش یافت ($P<0/05$). اما فعالیت مالون دی‌آلدئید در تیمار ۴ افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). فعالیت کاتالاز و گلوتاتیون در هیچ یک از تیمارها با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). از بین شاخص‌های متابولیکی، فقط در تیمار۴ پروتئین کاهش معنی‌دار و گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید افزایش معنی‌دار داشتند ($P<0/05$). اما میزان فسفر و کلسیم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد ($P>0/05$). در مجموع مواجهه با غلظت ۷۵٪LC_{50} نیترات نقره با کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش مالون دی‌آلدئید سبب آسیب اکسیداتیو و اختلال در برخی شاخص‌های متابولیکی میگوی وانامی شد.

واژگان کلیدی: *سمیت مزمن، نقره، استرس اکسیداتیو، شاخص‌های بیوشیمیایی، میگوی وانامی.*

۱- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، 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.

* نویسنده مسئول: serajbita@yahoo.com

DOI: 10.22124/japb.2022.21372.1452

مقدمه

به دلیل افزایش استقرار صنایع مختلف در سواحل و رشد و توسعه شهرهای ساحلی، اکوسیستم‌های آبی و آبزیان از فاضلاب‌ها و آلاینده‌های تخلیه شده به آب‌ها از صنایع و کشتی‌ها تاثیر می‌پذیرند. تاثیر تجمع فلزات سنگین بر زنجیره‌های غذایی موجودات آبزی، با به همراه داشتن آسیب‌های اکولوژیکی، رفتاری، فیزیولوژیکی، متابولیکی و در معرض خطر انداختن سلامت انسان‌ها، در سال‌های اخیر بیشترین توجه را به دنبال داشته است (Palaniappan and Karthikeyan, 2009).

نیترات نقره ترکیبی بی‌رنگ، بسیار محلول و اساسا سمی است که به سادگی به نقره فلزی احیا می‌شود و به عنوان یک ماده پیش‌ساز ترکیبات شیمیایی دیگر نقره است. از سوی دیگر، در بین فلزات، فلز نقره با توجه به اثرات ضدباکتریایی بالا در مبارزه با عوامل بیماری‌زا، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (Baker et al., 2005). تمام این عوامل سبب شده تا حجم گسترده‌ای از این آلاینده‌ها به محیط زیست تخلیه شده و باعث ورود آنها به منابع آبی پرورش آبزیان شود.

پرورش میگو به صورت متراکم و نیمه‌متراکم در جهان به دلیل ارزش تجاری بالا و تقاضای فزاینده، به طور گسترده‌ای افزایش یافته است. میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) عضو خانواده Penaeidae است که یکی از گونه‌های مهم در صنعت آبزی‌پروری به شمار می‌آید و بیشترین میزان تولیدات را در بین گونه‌های مختلف میگو از طریق آبزی‌پروری دارد (FAO, 2020). همولنف میگو به عنوان یک شاخص مهم، وضعیت فیزیولوژیک اندام‌های بدن را نشان می‌دهد. ورود آلاینده‌های محیطی و فلزات سنگین در اکوسیستم‌های آبی بویژه منابع آب پرورش میگو، سبب تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و در نتیجه سبب آسیب اکسیداتیو در بافت‌های مختلف میگو می‌شود (Zhang et al., 2021). تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی از طریق آسیب به DNA و دیگر ماکرومولکول‌های زیستی، منجر به اختلال عملکرد سلولی می‌شود. برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو، سلول‌ها یک سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی پیچیده ایجاد کرده‌اند که شامل آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و غیره) و غیرآنزیمی (مانند گلوتاتیون، تیوردوکسین) است (Dong et al., 2021). مطالعات نشان داده است که میگوی

وانامی به عنوان یک آبزی آزمایشی خوب برای مطالعات آزمایشگاهی در زمینه اثرات فلزات سنگین است (Frias-Espericueta et al., 2009) و در همین ارتباط مطالعات متعددی در زمینه ارزیابی خطر و اثرات مواجهه با فلزات سنگین و نیز تغییرات ترکیبات بیوشیمیایی و متابولیکی همولنف میگو توسط برخی پژوهشگران انجام شده است (Sanchez et al., 2001; Song et al., 2003; Juarez-Moreno et al., 2017; Wang et al., 2021; Zhang et al., 2021). با توجه به سمیت نیترات نقره برای آبزیان، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر سمیت مزمن نیترات نقره بر تغییرات آنزیم‌های دخیل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و سطح پراکسیداسیون لیپیدی بافت عضله و نیز تغییرات شاخص‌های متابولیتی همولنف میگوی وانامی است.

مواد و روش‌ها

تهیه میگو و شرایط پرورش

برای انجام پژوهش حاضر از پست‌لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین وزنی ۳/۲۸±۰/۴۵ گرم استفاده شد. پست‌لاروهای میگوی وانامی از یکی از مراکز تکثیر بندر جاسک تهیه و پس از بسته‌بندی در داخل کیسه‌های پلاستیکی حاوی یک‌سوم آب و دوسوم اکسیژن به بخش تکثیر و پرورش آبزیان مرکز تحقیقات شیلاتی آب‌های دور چابهار منتقل و در فضای بسته پرورشی در داخل سالن پرورش نگهداری شدند. برای آبگیری سیستم پرورشی از آب دریای عمان استفاده شد. آب تهیه شده قبل از استفاده به مدت ۴۸ ساعت با کلر به میزان ۲۰ گرم در هر لیتر ضدعفونی شد و سپس به منظور حذف کلر به مدت حداقل ۲۴ ساعت هوادهی شدید در مخازن انجام شد. میگوها برای سازگاری با شرایط کنترل شده آزمایشگاهی به مدت زمان ۲ هفته در مخازن ۷۰ لیتری به تعداد ۶۰ قطعه میگو در هر مخزن ذخیره‌سازی شدند. در طول دوره سازش‌پذیری، تغذیه به میزان ۳ درصد وزن بدن و سه بار در روز با استفاده از غذای هووراش آغازی، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ در ساعت‌های ۸:۰۰، ۱۳:۰۰ و ۱۷:۰۰ در حد سیری انجام شد. برای تامین اکسیژن مورد نیاز مخازن، از دو عدد پمپ هوای متصل به شیلنگ‌های هوادهی استفاده شد و در داخل هر مخزن یک شیلنگ هوادهی به همراه سنگ هوا به منظور هوادهی مطلوب قرار داده شد. در طی دوره آزمایش، میانگین میزان pH، شوری و دمای آب در مخازن به ترتیب ۷/۵۴±۰/۲۰، ۳۳/۰۰±۱/۱۸ گرم در لیتر و ۲۵±۰/۸۶ درجه سانتی‌گراد بود. دوره نوری

نیز به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود.

آزمایش سمیت

پس از اتمام دوره سازش‌پذیری، به منظور کاهش استرس وارد شده و جلوگیری از تجمع مدفوع میگوها در مخازن، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش‌های سمیت، غذادهی قطع شد تا از این طریق از جذب ماده شیمیایی مورد آزمایش به مواد غذایی و مدفوع میگوها جلوگیری به عمل آید (Afifi et al., 2016). از آنجایی که تاکنون میزان LC_{50} نیترات نقره در میگوی وانامی تعیین نشده بود، در ابتدا آزمایش مقدماتی برای تعیین میزان LC_{50} نیترات نقره برای این گونه انجام شد که بر اساس نتایج آزمایش‌های مقدماتی میزان LC_{50} برای میگوی وانامی طی ۹۶ ساعت مواجهه با نیترات نقره برابر با ۰/۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. برای انجام آزمایش سمیت، پست‌لاروهای میگو در داخل مخازن با حجم آب ۶۰ لیتر به تعداد ۲۵ قطعه در هر مخزن، در ۵ تیمار شامل تیمار ۱ با غلظت ۱۰٪LC_{50} (۰/۰۰۸۴ میلی‌گرم در لیتر)، تیمار ۲ با غلظت ۲۵٪LC_{50} (۰/۰۲۱ میلی‌گرم در لیتر)، تیمار ۳ با غلظت ۵۰٪LC_{50} (۰/۰۴۲ میلی‌گرم در لیتر)، تیمار ۴ با غلظت ۷۵٪LC_{50} (۰/۰۶۳ میلی‌گرم در لیتر) نیترات نقره و تیمار شاهد (بدون نیترات نقره) هر کدام با سه تکرار، ذخیره‌سازی شدند و به مدت ۲۱ روز در معرض غلظت‌های مختلف نیترات نقره قرار گرفتند.

سیستم آنتی‌اکسیدانی و متابولیتی

نمونه‌برداری از پست‌لارو میگوها برای سنجش شاخص‌های دخیل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی در بازه زمانی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز (در هر بازه زمانی از هر تیمار ۱۲ نمونه) و نمونه‌برداری از همولنف برای سنجش شاخص‌های متابولیکی فقط در روز پایانی (روز ۲۱) انجام شد. در زمان نمونه‌برداری میگوها با پودر گل میخک به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بیهوش شده و عضلات آن‌ها جداسازی شدند. عضلات جداسازی شده در بافر تریس HCl (Tris-HCl) با pH ۷/۴ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد هموژن شدند. نمونه‌های هموژن شده در دور ۴۰۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Eppendorf، آلمان) شدند و فاز رویی برای سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون (GSH)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) و مالون دی‌آلدئید (MDA) جداسازی

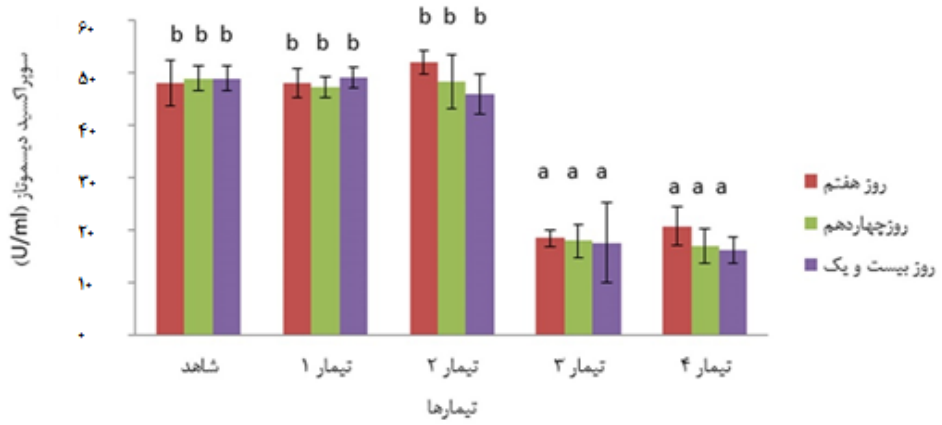
شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بر پایه قدرت سوپراکسید دیسموتاز در مهار احیای نیتروبلوتترازولیوم (NBT) به وسیله یون سوپراکسید با استفاده از روش Winterbourn و همکاران (۱۹۷۵)، فعالیت کاتالاز بر اساس روش Korolyuk و همکاران (۱۹۸۸)، سنجش میزان گلوتاتیون بر اساس روش Tietze (۱۹۶۹)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس روش Benzie و Strain (۱۹۹۶) و برای اندازه‌گیری مالون دی‌آلدئید از کیت تشخیصی الیزا (Cusabio، آمریکا) استفاده شد. برای همولنف‌گیری از سرنگ انسولین یک میلی‌لیتری با سرسوزن شماره ۲۶ استفاده شد. به منظور جلوگیری از انعقاد همولنف میگوها از محلول EDTA ۱۰ درصد به عنوان ضدانعقاد استفاده شد (Fatima et al., 2013). همولنف استخراجی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و از محلول رویی آن برای سنجش شاخص‌های متابولیکی شامل پروتئین کل، گلوکز، کلسترول، تری‌گلیسیرید، کلسیم و فسفر توسط کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده از شاخص‌های سیستم آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی میگو با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS نسخه ۲۲ و آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و پس‌آزمون توکی با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

نتایج

نتایج به دست آمده از تعیین LC_{50} نیترات نقره در میگوی وانامی 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 بود. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بافت عضله در تیمارهای ۳ و ۴ در مقایسه با دیگر تیمارهای نیترات نقره و نیز تیمار شاهد کاهش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). بیشترین و کمترین میزان فعالیت سوپراکسید دیسموتاز عضله به ترتیب در تیمارهای ۱ و ۴ و در روز ۲۱ مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: تغییرات فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بافت عضله میگوی وانامی در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در هر دوره است (P<۰/۰۵).

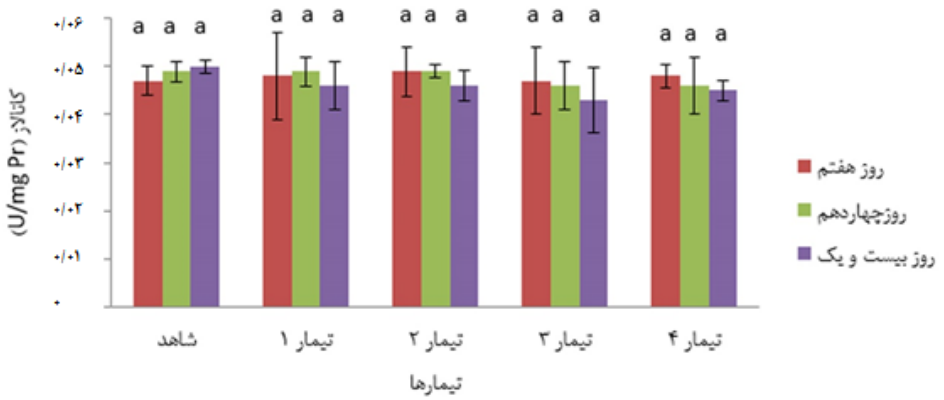
فعالیت کاتالاز در بافت عضله به جز در تیمار ۱ در بقیه تیمارها با گذشت زمان کاهش و در تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۲)، اما تغییرات فعالیت آن در تمام تیمارهای نیترات نقره در مقایسه با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (P>۰/۰۵).

سطح گلوتاتیون بافت عضله در تیمارهای ۱ و ۲ با گذشت زمان افزایش یافت و در تیمارهای شاهد، ۳ و ۴ نیز با گذشت زمان میزان آن کاهش یافت (شکل ۳) که این افزایش و کاهش از نظر آماری در بین تیمارهای مختلف با یکدیگر معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در بین تیمارهای مختلف بیشترین میزان گلوتاتیون در تیمار شاهد در روز ۷ و کمترین میزان آن در تیمار ۴ در روز ۲۱ نمونه‌برداری بود.

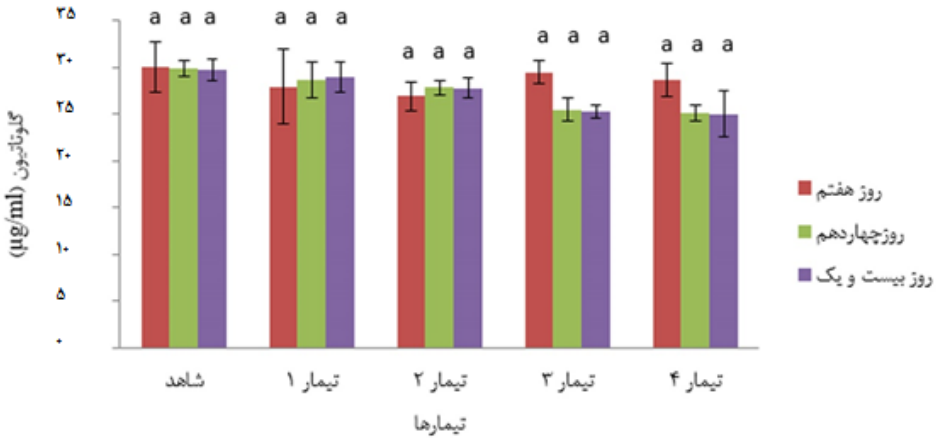
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بافت عضله در تیمار ۴ نسبت به تیمارهای دیگر کاهش معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵)، اما بین تیمارهای دیگر نیترات نقره با تیمار شاهد اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). کمترین و بیشترین سطح فعالیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در عضله به ترتیب مربوط به تیمار ۴ در روز ۲۱ و تیمار ۲ نیز در همین روز بود (شکل ۴).

طبق نتایج، فعالیت مالون دی‌آلدئید عضله در تیمار ۴ نسبت به تیمار شاهد و نیز بقیه

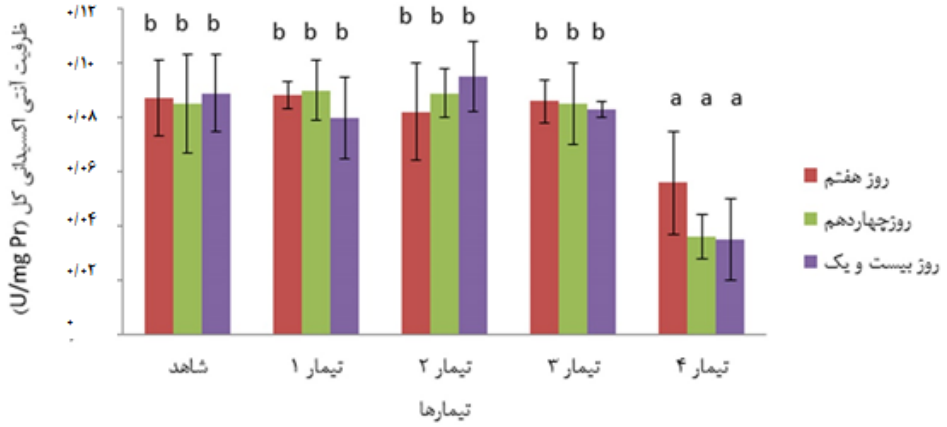
تیمارها به طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) و در روز ۲۱ نمونه‌برداری به بالاترین سطح خود رسید. در بافت عضله کمترین سطح فعالیت مالون دی‌آلدئید در تیمار ۱ و روز چهاردهم نمونه‌برداری به دست آمد (شکل ۵).



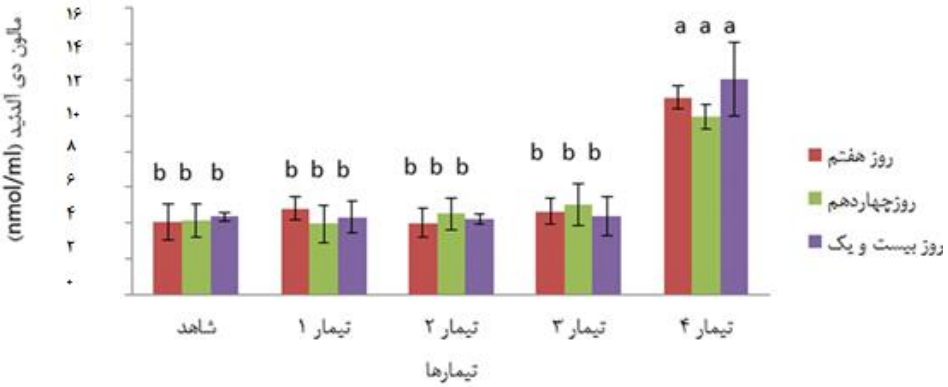
شکل ۲: تغییرات فعالیت کاتالاز بافت عضله میگوی وانامی در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار). تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۳: تغییرات سطح گلوتاتیون بافت عضله میگوی وانامی در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار). تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



شکل ۴: تغییرات سطح ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت عضله میگوی وانامی در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در هر دوره است (P<۰/۰۵).



شکل ۵: تغییرات فعالیت مالون دی‌آلدئید بافت عضله میگوی وانامی در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار). حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف در هر دوره است (P<۰/۰۵).

از بین شاخص‌های متابولیکی، کلسیم و فسفر در هیچ یک از تیمارها با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵)، اما کمترین میزان آنها در تیمار ۳ مشاهده شد (جدول ۱). میزان پروتئین کل در تیمار ۴ در مقایسه با دیگر تیمارها کاهش معنی‌داری را

نشان داد (P<۰/۰۵). میزان گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید همولنف میگوها در تیمار ۴ در مقایسه با تیمارهای دیگر افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵).

بحث

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) یک آنزیم بسیار رایج است که به واسطه استرس در تمام اندامک‌های سلولی به دلیل تولید رادیکال اکسیژن فعال تولید می‌شود و سبب تجزیه رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعال به O_2 و H_2O_2 می‌شود (Tanwir et al., 2021). در مطالعه حاضر فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در بافت عضله با افزایش غلظت نیترات نقره کاهش یافت و کمترین میزان آن در تیمار ۴ و در روز ۲۱ به دست آمد، اما در بین تیمارهای مختلف نیترات نقره فقط تیمارهای ۳ و ۴ با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند (P<۰/۰۵). از آنجایی که

جدول ۱: روند تغییرات شاخص‌های متابولیکی همولنف میگوی وانامی در تیمارهای مختلف (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص متابولیتی	شاهد	۱	۲	۳	۴
پروتئین کل (mg/ml)	۱۰۸/۱۶ ± ۷/۱۰^{a}	۱۰۷ ± ۳/۴۵^{a}	۱۱۰ ± ۵/۰۲^{a}	۹۹/۹۷ ± ۳/۱۴^{a}	۶۲/۹۴ ± ۷/۲۳^{b}
گلوکز (mg/dL)	۲۶/۷۳ ± ۳/۴۵^{a}	۲۷/۳۷ ± ۱/۸۰^{a}	۲۷ ± ۲/۰۶^{a}	۳۱/۲۵ ± ۰/۹۸^{a}	۴۵/۶۰ ± ۲/۱۶^{b}
کلسترول (mg/dL)	۶۸/۶۰ ± ۴/۱۵^{a}	۶۸/۲۴ ± ۱/۱۷^{a}	۷۲/۰۴ ± ۳/۱۷^{a}	۶۵/۹ ± ۴/۰۷^{a}	۹۱/۱۸ ± ۷/۱۰^{b}
تری‌گلیسیرید (mg/dL)	۱۲۴/۹۳ ± ۲/۶۵^{a}	۱۳۰ ± ۷/۰۳^{a}	۱۲۷/۰۲ ± ۲/۳۵^{a}	۱۲۶/۴۴ ± ۵/۷۷^{a}	۲۰۱/۱۵ ± ۹/۸۷^{b}
کلسیم (mg/dL)	۳۵ ± ۲/۹۴^{a}	۳۲/۹۹ ± ۵/۰۱^{a}	۳۴/۲۹ ± ۳/۷۵^{a}	۲۹ /۹۵ ± ۲/۱۶^{a}	۳۱/۸۰ ± ۱/۴۸^{a}
فسفر (mg/dL)	۴/۸۰ ± ۰/۵۸^{a}	۵/۱۲ ± ۰/۷۳^{a}	۴/۹۲ ± ۰/۶۹^{a}	۳/۹۹ ± ۰/۵۸^{a}	۴/۸۵ ± ۰/۴۹^{a}

حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

سوپراکسید دیسموتاز به طور مستقیم در تجزیه رادیکال‌های آزد اکسیژن فعال به پراکسید هیدروژن نقش دارد، کاهش در فعالیت سوپراکسید دیسموتاز نشان می‌دهد که این آنزیم توانایی جلوگیری از آسیب سلولی ناشی از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن فعال را نداشت (Neves et al., 2000). در مطالعه Neves و همکاران (۲۰۰۰) نیز فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در میگوی *Palaemonetes argentinus* طی استرس به طور معناداری کاهش یافت. بر خلاف مطالعه حاضر در مطالعه‌ای توسط Campa-Cordova و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بافت عضله در میگوی وانامی طی مواجهه با بتاگلوکان و پلی‌ساکارید سولفاته افزایش یافت.

کاتالاز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است که نقش آن حذف رادیکال‌های پراکسید هیدروژن و تبدیل به آب و اکسیژن است (Wang et al., 2012). فعالیت کاتالاز بافت عضله با افزایش غلظت نیترات نقره کاهش یافت، اما این کاهش معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵) و بیشترین میزان آن در تیمار شاهد و در روز ۲۱ به دست آمد. علت کاهش فعالیت کاتالاز در آبزیان طی مواجهه با آلاینده‌های شیمیایی می‌تواند ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد طی مواجهه با آلاینده‌ها باشد، زیرا مشخص شده است که آلاینده‌های فلزی مانند سرب، کادمیوم و جیوه ممکن است باعث افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال هیدروکسیل، رادیکال سوپراکسید یا پراکسید هیدروژن شوند. افزایش تولید ROS می‌تواند منجر به کاهش توان دفاعی آنتی‌اکسیدانی بدن موجودات زنده و در نتیجه استرس اکسیداتیو شود (Mohamed et al., 2014). مطابق با نتایج مطالعه حاضر، Wang و همکاران (۲۰۱۲) نیز کاهش در فعالیت کاتالاز میگوی وانامی را طی مواجهه با استرس pH گزارش کردند. Goncalves-Soares و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که فعالیت کاتالاز در میگوی وانامی طی مواجهه با سموم سیانوباکتری *Microcystis aeruginosa* به طور معناداری افزایش یافت که با مطالعه حاضر مطابقت ندارد.

گلوتاتیون فراوان‌ترین تیول غیرپروتئینی است که در حد میلی‌مولار در بیشتر سلول‌ها یافت می‌شود (Goncalves-Soares et al., 2012). برخلاف آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی، فعالیت گلوتاتیون بافت عضله در تیمار شاهد و نیز تیمارهای ۱ و ۲ با گذشت زمان افزایش و در تیمارهای ۳ و ۴ با گذشت زمان کاهش یافت که

از نظر آماری بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). افزایش اولیه گلوتاتیون داخل سلولی احتمالا به دلیل کونژوگه شدن آن با سموم توسط گلوتاتیون اس- ترانسفراز است، که باعث تولید گلوتاتیون (GSH) می‌شود و به دنبال آن، کاهش در میزان GSH نشان‌دهنده نارسایی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد تولید شده است (Foldbjerg and Autrup, 2013). چندین مطالعه تغییر در غلظت GSH بافت‌های موجودات زنده را به دلیل قرار گرفتن در معرض آلاینده‌ها نشان داده‌اند که برخی از آنها افزایش و برخی دیگر کاهش در میزان فعالیت آن را گزارش کرده‌اند (Ding et al., 2000; Li et al., 2003).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) اثر تجمعی همه آنتی‌اکسیدان‌های موجود در خون، مایعات و بافت‌های مختلف موجودات را شامل می‌شود (Suresh et al., 2009). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در بافت عضله به جز تیمار ۴ در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت (P>۰/۰۵)، که نشان دهنده این است که غلظت‌های بالای نیترات نقره حتی در بافت عضله نیز با افزایش فرایند اکسیداتیو و آسیب سلولی به این بافت، سبب کاهش توانایی در دفاع آنتی‌اکسیدانی کل در عضله میگوی وانامی شده است. کاهش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت موجودات نشان دهنده اختلال در مکانیسم‌های دفاعی ایمنی است. تحت چنین شرایطی، تولید گونه‌های فعال اکسیژن (رادیکال‌های آزاد) سبب کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانی در موجود می‌شود (Huang et al., 2018). همچنین برای جلوگیری از تخریب بافت میزبان، رادیکال‌های آزاد ناشی از آلاینده‌ها توسط آنتی‌اکسیدان‌ها خنثی می‌شوند، که ممکن است منجر به کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل شود. مطابق با مطالعه حاضر در مطالعه‌ای که توسط Parrilla-Taylor و Zenteno-Savin (۲۰۱۱)، با بررسی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در میگوی وانامی در پاسخ به شرایط هیپوکسیا (کمبود اکسیژن) انجام شد، سطح فعالیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بافت عضله با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشت.

مالون دی‌آلدئید (MDA)، یک آلدئید سه کربنه با وزن مولکولی کم است که می‌تواند در اثر حمله رادیکال‌های آزاد به اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFA) در غشاهای زیستی تولید شود (Suresh et al., 2009). تغییرات فعالیت مالون دی‌آلدئید بافت عضله در تیمار ۴ در مقایسه با تمام تیمارها افزایش معنی‌داری

نشان داد (P<۰/۰۵) و بیشترین میزان آن در همین تیمار و در روز ۲۱ مشاهده شد. مطابق با نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای بر روی میگوی گلی (*Austinogebia edulis*) و میگوی *Palaemon macrodactylus* افزایش در میزان فعالیت MDA طی مواجهه با کادمیوم گزارش شد که دلیل این افزایش را ناشی از تجمع یون کادمیوم و القای آسیب اکسیداتیو توسط این یون دانستند (Das et al., 2019; Zhang et al., 2021).

نتایج به دست آمده از بررسی شاخص‌های متابولیکی نشان داد که با افزایش غلظت نیترات نقره، میزان پروتئین کل کاهش معنی‌دار و گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). به طوری که کمترین میزان پروتئین کل و بالاترین میزان گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید در بالاترین غلظت نیترات نقره به دست آمد. تغییرات کلسیم و فسفر در تیمارهای مختلف با همدیگر معنی‌دار نبود (P<۰/۰۵). بر اساس مطالعات صورت گرفته، تا کنون گزارشی مبنی بر تاثیر نیترات نقره و دیگر آلاینده‌ها بر میزان شاخص‌های متابولیکی همولنف در میگو منتشر نشده است، از این رو، امکان مقایسه دقیق این نتایج با مطالعات دیگر وجود ندارد، اما به نظر می‌رسد که پاسخ فیزیولوژیکی افزایش یا کاهش این شاخص‌ها در مواجهه با آلاینده‌ها متاثر از دوره در معرض‌گذاری و شدت (غلظت) آلاینده باشد. در دراز مدت ممکن است به دلیل تاثیر نامطلوب آلاینده‌ها بر بافت‌های مختلف، میزان برخی از این شاخص‌ها افزایش و برخی کاهش یابد. Acedo-Valdez و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که نانوذرات نقره بیوسنتز شده تاثیری بر شاخص‌های متابولیکی میگوی وانامی نداشت و از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در میزان پروتئین کل، گلوکز و گلیکوژن در تیمارهای مختلف نانوذرات نقره در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نشد که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد.

با توجه به نتایج LC_{50} می‌توان گفت که نیترات نقره برای میگوی وانامی سمی است و در غلظت ۰/۰۶۳ میلی‌گرم در لیتر (تیمار ۴) با کاهش قابل توجه فعالیت آنزیم‌های دخیل در سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و متابولیکی و نیز افزایش قابل توجه فعالیت مالون دی‌آلدئید و تولید رادیکال‌های آزاد سبب اختلال در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و متابولیکی و در نتیجه آسیب اکسیداتیو بافت عضله در میگوی وانامی شد. بنابراین سنجش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و مالون دی‌آلدئید می‌تواند به

عنوان نشانگر زیستی مناسب در مواجهه با نیترات نقره در میگو باشد.

منابع

Acedo-Valdez M.R., Grijalva-Chon J.M., Larios-Rodriguez E., Maldonado-Arce A.D., Mendoza-Cano F., Sanchez-Paz J.A. and Castro-Longoria R. 2017. Antibacterial effect of biosynthesized silver nanoparticles in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) infected with necrotizing hepatopancreatitis bacterium (NHP-B). Latin American Journal of Aquatic Research, 45(2): 421–430.

Afifi M., Saddick S. and Zinada O.A.A. 2016. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. Saudi Journal of Biological Sciences, 23(6): 754–760.

Baker C., Pradhan A., Pakstis L., Pochan D.J. and Shah S.I. 2005. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 5(2): 244–249.

Benzie I.F. and 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.

Campa-Cordova A.I., Hernandez-Saavedra N.Y. and Ascencio F. 2002. Superoxide dismutase as modulator of immune function in American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Comparative Biochemistry and Physiology (C), 133(4): 557–565.

Das S., Tseng L.C., Chou C., Wang L., Souissi S. and Hwang J.S. 2019. Effects of cadmium exposure on antioxidant enzymes and histological changes in the mud shrimp *Austinogebia edulis* (Crustacea: Decapoda). Environmental Science and Pollution Research, 26(8): 7752–7762.

Ding W.X., Shen H.M. and Ong C.N. 2000. Microcystic cyanobacteria extract induces cytoskeletal disruption and intracellular glutathione alteration in hepatocytes. Environmental Health Perspectives, 108(7): 605–609.

Dong X., Liu Q., Zhao W., Ou J., Jiang F., Guo H. and Lv L. 2021. Effects of ammonia-N stress on the antioxidant enzymes, heat shock proteins, and apoptosis-related genes of *Macrobrachium rosenbergii*. Italian Journal of Animal Science, 20(1): 453–464.

FAO. 2020. Sustainability in Action. State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization, Rome. 244P.

Fatima H., Ayub Z., Ali S.A. and Siddiqui G. 2013. Biochemical composition of the hemolymph, hepatopancreas, ovary, and muscle

during ovarian maturation in the penaeid shrimps *Fenneropenaeus merguiensis* and *F. penicillatus* (Crustacea: Decapoda). Turkish Journal of Zoology, 37(3): 334–347.

Foldbjerg R. and Autrup H. 2013. Mechanisms of silver nanoparticle toxicity. Archives of Basic and Applied Medicine, 1(1): 5–15.

Frias-Espericueta M.G., Voltolina D., Osuna-Lopez I. and Izaguirre-Fierro G. 2009. Toxicity of metal mixtures to the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Marine Environmental Research, 68(5): 223–226.

Goncalves-Soares D., Zanette J., Yunes J.S., Yepiz-Plascencia G.M. and Bainy A.C. 2012. Expression and activity of glutathione S-transferases and catalase in the shrimp *Litopenaeus vannamei* inoculated with a toxic *Microcystis aeruginosa* strain. Marine Environmental Research, 75: 54–61.

Huang Y.J., Zhang N.N., Fan W.J., Cui Y.Y., Limbu S.M., Qiao F., Zhao Y.L., Chen L.Q., Du Z.Y. and 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.

Juarez-Moreno K., Mejia-Ruiz C.H., Diaz F., Reyna-Verdugo H., Re A.D., Vazquez-Felix E.F. and Bogdanchikova N. 2017. Effect of silver nanoparticles on the metabolic rate, hematological response, and survival of juvenile white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Chemosphere, 169: 716–724.

Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G. and Tokarev V.E. 1988. A method for measuring catalase activity. Laboratornoe Delo, (1): 16–19.

Li X., Liu Y., Song L. and Liu J. 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. Toxicon, 42(1): 85–89.

Mohamed A.H., Sheir S.K., Osman G.Y. and Abd-El Azeem H.H. 2014. Toxic effects of heavy metals pollution on biochemical activities of the adult brine shrimp, *Artemia salina*. Canadian Journal of Pure and Applied Sciences, 8: 3019–3028.

Neves C.A., Santos E.A. and Bainy A.C.D. 2000. Reduced superoxide dismutase activity in *Palaemonetes argentinus* (Decapoda, Palemonidae) infected by *Probopyrus ringueleti* (Isopoda, Bopyridae). Diseases of Aquatic Organisms, 39(2): 155–158.

Palaniappan P.R. and Karthikeyan S. 2009. Bioaccumulation and depuration of chromium in the selected organs and whole body tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala* individually and in binary solutions with nickel. Journal of Environmental Sciences, 21(2): 229–236.

Parrilla-Taylor D.P. and Zenteno-Savin T. 2011. Antioxidant enzyme activities in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in response to environmental hypoxia and reoxygenation. Aquaculture, 318(3-4): 379–383.

Sanchez A., Pascual C., Sanchez A., Vargas-Albores F., Le Moullac G. and Rosas C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: The effect of acclimation. Aquaculture, 198(1-2): 13–28.

Song Y.L., Yu C.I., Lien T.W., Huang C.C. and Lin M.N. 2003. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 14(4): 317–331.

Suresh D.R., Annam V., Pratibha K. and Prasad B.M. 2009. Total antioxidant capacity- a novel early bio-chemical marker of oxidative stress in HIV infected individuals. Journal of Biomedical Science, 16(1): 1–4.

Tanwir K., Javed M.T., Shahid M., Akram M.S. and Ali Q. 2021. Antioxidant defense systems in bioremediation of organic pollutants. P: 505–521. In: Hasanuzzaman M. and Vara Prasad M.N. (Eds.). Handbook of Bioremediation. Mika Haley, India.

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.

Wang L., Feng J., Wang G., Guan T., Zhu C., Li J. and Wang H. 2021. Effects of cadmium on antioxidant and non-specific immunity of *Macrobrachium nipponense*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 224: 1–12 (112651).

Wang W.N., Li B.S., Liu J.J., Shi L., Alam M.J., Su S.J., Wu J., Wang L. and Wang A.L. 2012. The respiratory burst activity and expression of catalase in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, during long-term exposure to pH stress. Ecotoxicology, 21(6): 1609–1616.

Winterbourn C.C., Hawkins R.E., Brian M. and Carrell R.W. 1975. The estimation of red cell superoxide dismutase activity. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 85(2): 337–341.

Zhang C., Jin Y., Yu Y., Xiang J. and 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: 1–9 (111591).

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 4, Winter 2023

Research Paper

Effects of exposure to silver nitrate on the antioxidant defense system and metabolic indices of Vannamei shrimp *(Litopenaeus vannamei)*

Behnam Ariyaan[1], Javad Ghasemzadeh[2], Seraj Bita[2]*

Received: January 2022 Accepted: March 2022

Abstract

Exposure of aquatic animals to silver, due to production of free radicals, causes oxidative damage and biochemical changes in organisms. Therefore, in present study, changes in the antioxidant defense system and metabolic indices of *Litopenaeus vannamei* were evaluated during 21 days of exposure to silver nitrate. Shrimps exposed to different concentrations of silver nitrate, including treatment 1: 10% LC_{50} (0.0084 mg/L), treatment 2: 25% LC_{50} (0.021 mg/L), treatment 3: 50% LC_{50} (0.042 mg/L) and treatment 4: 75% LC_{50} (0.063 mg/L) and one treatment as control treatment. Superoxide dismutase activity in treatments 3 and 4 and total antioxidant capacity in treatment 4 was significantly reduced ($P<0.05$). But malondialdehyde activity was significantly increased in treatment 4 ($P<0.05$). Catalase and glutathione activity in all treatments did not show a significant difference ($P>0.05$). Among metabolic indices, only in treatment 4 protein changes were significantly reduced, and glucose, cholesterol and triglyceride were significantly increased ($P<0.05$). But the amount of phosphorus and calcium did not show a statistically significant difference ($P>0.05$). In general, exposure to 75% LC_{50} of silver nitrate with a significant decrease in the activity of antioxidant enzymes and an increase in malondialdehyde caused oxidative damage and disruption of some metabolic parameters of *Litopenaeus vannamei*.

Key words: *Chronic Toxicity, Silver, Oxidative Stress, Biochemical Indicators,* Litopenaeus vannamei.

1- M.Sc. in Aquatic Breeding, Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
2- Assistance Professor in Fisheries Department, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
*Corresponding Author: serajbita@yahoo.com
DOI: 10.22124/japb.2022.21372.1452