

## تعیین LC50 و بررسی تغییرات سطوح پروتئین *Artemia urmiana* در غلظت‌های مختلف نیکل و کبالت

### چکیده

در این مطالعه اثر فلزات سنگین نیکل و بربادن *Artemia urmiana* در سال ۱۳۸۹ مورد بررسی قرار گرفت. ناپلیوس‌ها به مدت ۶ روز در غلظت‌های مورد نظر پرورش یافته‌ند. برای غذادهی از جلبک کلرلا و مخمر استفاده شد. درجه حرارت در طول پرورش ۲۰–۲۸ درجه سانتی‌گراد، شوری ۲۸ قسمت در هزار و نوادهی ۱۲:۱۲ (تاریکی: روشنابی) بود. پس از ۶ روز آرتمیاها برای سنجش پروتئین برداشته شدند. مقادیر پروتئین در مجاورت غلظت‌های مختلف کبالت و نیکل اختلاف معنی‌داری را نشان دادند ( $P \leq 0.05$ ). بیشترین میزان پروتئین در مجاورت کبالت متعلق به غلظت ۴۱ میلی‌گرم در لیتر و برابر با  $\frac{1}{13}$  درصد و در مجاورت نیکل در غلظت ۱۶۷ میلی‌گرم در لیتر و برابر با  $\frac{1}{90}$  درصد بود. میزان LC5024h آرتمیا در مجاورت فلز کبالت  $40.3 \pm 7$  میلی‌گرم در لیتر و در مجاورت فلز نیکل  $38.4 \pm 4$  میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد.

**واژگان کلیدی:** نیکل، کبالت، *Artemia urmiana*

فرنانز رفیعی<sup>۱</sup>

آریا اشجاع اردلان<sup>۲</sup>

\* زهرا کمالی<sup>۳</sup>

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، استادیار گروه بیولوژی دریا، تهران، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشیار گروه بیولوژی دریا، تهران، ایران
۳. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشآموخته کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، تهران، ایران

\*مسؤل مکاتبات:

kamali.za64@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۱/۱۵

### مقدمه

مانند استیل کوآنزیم A را فعال می‌کند که افزایش آن به دلیل ماندگاری و قابلیت تجمع زیستی مخاطره آمیز است. نیکل دارای مصارف متنوعی است که از طریق معدنکاری، صنایع ذوب نیکل، تصفیه و سوزاندن باطله‌های شهری وارد محیط شده و موجب بروز سرطان پوست، سرطان ریه، درماتیت و پوکی استخوان می‌گردد (ربانی و همکاران، ۱۳۸۷).

کبالت یکی از عناصر تشکیل دهنده ویتامین B<sub>12</sub> و برخی آنزیمهای دارای اثر تجمع پذیری است (ثنایی، ۱۳۷۵). کبالت از طریق سوختن ذغال و نفت، فاضلاب‌های صنعتی، صنایع ریخته‌گری و معدنکاری، کارخانجات فرآوری کبالت وارد سیستم‌های آبی شده و افزایش بیش از حد آن باعث بیماری‌های ریوی و قلبی، ناراحتی‌های پوستی و سرطان می‌گردد (ربانی و همکاران، ۱۳۸۷).

از میان غذاهای زنده‌ای که برای پرورش آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند، آرتمیا دارای گستره مصرف وسیعی است. از آرتمیا

افزایش فعالیت‌های توسعه انسانی به ویژه در جوامع صنعتی و فوق صنعتی با تولید و هدایت پساب‌های حاوی محصولات صنعتی به آبهای سطحی و تحت اراضی حیات آبزیان را به مخاطره انداخته است (Seebaugh *et al.*, 2004).

فلزات سنگین به عنوان یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی مطرح هستند که از طرق مختلف به محیط زیست وارد شده و منجر به افزایش میزان سطح فلزات سنگین در آبهای زیززمینی، جاری و خاک شده و به دنبال آن تجمع این فلزات را در فرآورده‌های دامی و گیاهان خواهیم داشت که علاوه بر آسیب‌های جدی بر سلامت و حیات این موجودات، آن‌ها را برای انسان مخاطره آمیز ساخته است. این فلزات توسط پیکر موجودات متابولیزه نشده، تجمع پیدا می‌کنند، جایگزین دیگر املاح معدنی مورد نیاز بدن شده و موجب بروز بیماری می‌گردد.

فلز سنگین نیکل به طور طبیعی در DNA و RNA وجود دارد، باعث تثیت ساختمان اسیدهای نوکلئیک می‌شود، مولکول‌هایی

عنوان عناصر ضروری در مقادیر آسیب رسان و کشنده روی مرگ (Artemia urmiana) و میر و میزان پروتئین آرتمیا اورمیانا (Artemia urmiana) بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

به منظور تخمه‌گشایی سیست آرتمیا، در شوری ۲۸ قسمت در هزار به میزان ۵/۰ گرم سیست در لیتر عملیات تخمه‌گشایی استفاده شد (Lavens and Sargeloos, 1996). سپس ناپلیوس‌ها از پوسته و سیست‌های هج نشده جدا شدند. در بشرطهای ۲۵ و ۲۰ سی سی از محلول مورد نظر ریخته و در هر بشرط ۲۰ عدد ناپلی قرار گرفت. بشرها برای ۲۴ ساعت در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. این آزمایش به غذادهی و هوادهی نیاز نداشت، بعد از ۲۴ ساعت تعداد ناپلیوس‌های زنده و مرده شمارش و درصد مرگ و میر آن ها محاسبه شد (اکبری حامد، ۱۳۸۳؛ تقی زاده انصاری، ۱۳۸۵؛ Hadjispyrou *et al.*, 1990؛ Gajbhiye Hirota, 1990).

با توجه به تحقیقات انجام شده بر روی اثر سمیت فلزات روی، کادمیوم و مس بر روی آرتمیا اورمیانا (تقی زاده انصاری، ۱۳۸۵؛ اکبری حامد، ۱۳۸۳)، بیشترین میزان Lc50 ۴۸۰ میلی‌گرم در لیتر در مورد فلز روی بدست آمده است. برای آزمایشات سمیت نیکل و کبالت در این پژوهش غلظت‌های ۰ تا ۴۸۰ میلی‌گرم در لیتر به فواصل مشخص در نظر گرفته شد. در تیمارهای ۴۸۰، ۴۵۹ و ۴۳۸ میلی‌گرم در لیتر (به فواصل ۲۱ میلی‌گرم در لیتر) در هر دو فلز ناپلی‌ها بالاصله از بین رفته. بنابراین غلظت‌های ۰ تا ۴۱۶ میلی‌گرم در لیتر برای ادامه کار در نظر گرفته شد.

غلظت‌های مورد استفاده برای فلز کبالت ۰ (شاهد)، ۴۱، ۱۶۶، ۱۰۴، ۳۵۳، ۲۹۱، ۲۲۸، ۳۷۴، ۳۹۵، ۴۱۶ میلی‌گرم در لیتر و برای فلز نیکل ۰ (شاهد)، ۴۱، ۱۰۴، ۲۲۹، ۳۵۴، ۲۹۲، ۳۷۵ و ۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر بود. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برای بدست آوردن میزان Lc5024h از روش probit استفاده شد. به این صورت که یک رابطه رگرسیون بین میزان پروتئین در بنای درصد مرگ و میر آرتمیاها در هر غلظت بدست می‌آید و لگاریتم غلظت فلزات بدست آمد. سپس با قرار

برای تعذیه دکاپودها، میگو و انواع ماهیانی مانند ماهیان خاویاری، قزل آلا، کپور و کفال استفاده می‌شود. به دلیل دسترسی این موجودات در پرورش آبزیان، روز به روز به اهمیت این جانوران افزوده می‌شود (اویسی، ۱۳۸۳). آرتمیا مانند سایر موجودات، عناصر کم مقدار را انباشته نموده و سپس آن را به سطوح بالاتر انتقال می‌دهد. بنابراین دانستن رابطه بین آرتمیا و دامنه تحمل آن در مورد فلزات سنگین مختلف و بررسی اثر آلودگی بر روی این گونه ضروری است تا بتوان آن را در برابر خطرات زیست محیطی حفاظت نمود (Gajbhiye and Hirota, 1990).

آرتمیا به عنوان یک جانور آبزی دارای مزیت‌های زیادی برای مطالعه میزان آلودگی‌های محیطی است. دسترسی آسان به سیست، تمایز بودن مراحل زندگی و کشت آن در محیط مصنوعی این امکان را به وجود می‌آورد تا بتوان میزان تاثیر فلزات سنگین را بر روی آرتمیا بررسی نمود. (تقی زاده انصاری، ۱۳۸۵). تحقیقاتی در زمینه تجمع فلزات سنگین روی، کادمیوم، نیکل و سرب در *A. urmiana* (حیدری، ۱۳۸۰)، جذب فلزات سنگین مس و روی توسط *A. fransiscana* و *A. urmiana* (اکبری حامد، ۱۳۸۳)، اثر روی و کادمیوم بر *A. urmiana* (تقی زاده انصاری، ۱۳۸۵)، تجمع و حذف زیستی کادمیوم توسط Rahimi and nejatkhan manavi, (A. urmiana) (A. salina) (Fichet and miramand, 2010)، اثر غلظت‌های جیوه روی رشد و بقا (Sarabia *et al.*, 1998) *A. parthenogenetica* وانادیوم روی (A. salina) (A. fransiscana) (1998) اثر آلودگی قلع، کادمیوم و کروم در *A. fransiscana* (Hadjispyrou *et al.*, 2001) و آلودگی آرسنیک بر روی (Brix *et al.*, 2003) *A. fransiscana* تا کنون اثر فلزات نیکل و کبالت روی میزان مرگ و میر و ترکیبات آلی *A. urmiana* انجام نشده است. واکنش‌های دفاعی موجودات در معرض فلزات سنگین افزایش پروتئین متالوتیونین است که فلزات سنگین را جذب کرده و اثر سمیت آن‌ها را کاهش می‌دهد. بنابراین مطالعه بر روی تغییرات میزان پروتئین در اثر فلزات مختلف از اهمیت خاصی برخوردار است. به همین دلیل، در این تحقیق اثر فلزات نیکل و کبالت به

آب به طور کامل تعویض گردید و فلزات با غلظت مورد نظر دوباره به محیط وارد شدند. برای تأمین غذای آرتمیا از جلبک سبز کلرلا به میزان ۱۵۰ سی سی در روز و از مخمر به عنوان مکمل غذایی استفاده شد (اکبری حامد، ۱۳۸۳). پس از ۶ روز ناپلیوس‌ها برای سنجش پروتئین برداشته شدند.

سنجهش پروتئین از روش Folin-Phenol Folin-Phenol در ۹۵ درجه سانتی‌گراد براساس روش Lowry و NaoH ۱M (Seixas *et al.*, 2009) انجام شد (همکاران ۱۹۵۱).

در این بررسی از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه جهت مشخص نمودن تفاوت معنی‌دار بین گروه‌های مختلف و از آزمون توکی (Tukey) جهت تعیین حد معنی‌دار بین تیمارهای مختلف از نرم افزار SPSS و برای ترسیم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده گردید.

## نتایج

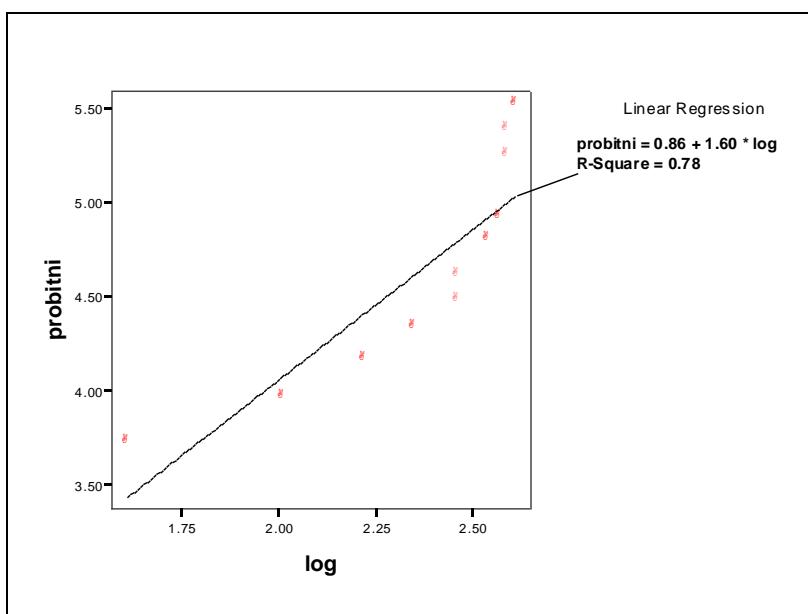
برای *Artemia urmiana* در مجاورت فلز کبالت LC5024h برابر با  $40.3/7$  و برای فلز نیکل برابر با ۳۸۴ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید (اشکال ۱ و ۲).

دادن عدد ۵ به جای پروبیت، لگاریتم غلظتی که در آن ۵۰ درصد موجودات از بین رفته اند محاسبه شده و آنتی لگاریتم آن نشان دهنده میزان غلظت بود.

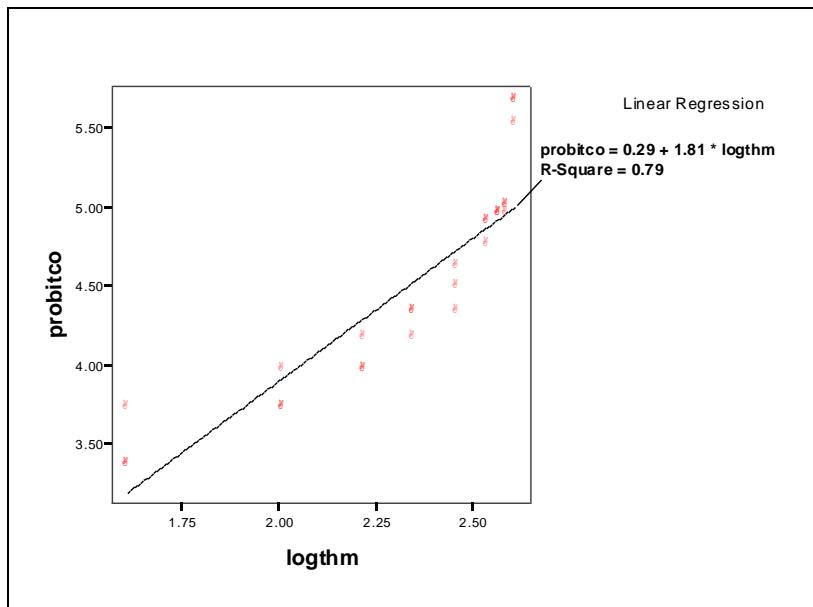
در آزمایش سنجش پروتئین بیشترین روزهای زنده ماندن ناپلی‌ها از تیمار ۴۱ تا ۲۹۱ میلی‌گرم در لیتر کبالت و ۲۹۲ میلی‌گرم در لیتر نیکل، ۷ روز بود و در غلظت‌های بالاتر در سه روز اول از بین رفتند. بنابراین تیمارهای این آزمایش ۴۱، ۲۹۱ و ۱۶۶ میلی‌گرم در لیتر برای کبالت و ۴۱، ۱۶۷ و ۲۹۲ میلی‌گرم در لیتر برای نیکل در نظر گرفته شد. برای هر غلظت و شاهد ۳ تکرار انجام شد.

برای هر تیمار ۱ گرم سیست در ۱ لیتر آب نمک ۲۸ قسمت در هزار ریخته شد و بعد از هج شدن، پوسته‌ها و سیستهای هج نشده جدا شده و ناپلیوس‌ها به محیط جدید حاوی غلظت مورد نظر انتقال یافتند (اکبری حامد، ۱۳۸۳).

ناپلیوس‌ها به مدت ۶ روز در محیط‌های حاوی غلظت‌های مورد نظر پرورش یافتند. درجه حرارت در طول پرورش ۲۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد و شوری ۲۸ قسمت در هزار بود. برای حفظ pH صورت نیاز  $\text{NaHCO}_3$  به محیط اضافه شد. در طی مدت پرورش هواده‌ی مداوم توسط پمپ هوا و به کمک پیپت و لوله‌های هواده‌ی انجمام شد. نوردهی ۱۲:۱۲ ساعته (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) بود و برای حفظ کیفیت آب هر ۲ روز یکبار



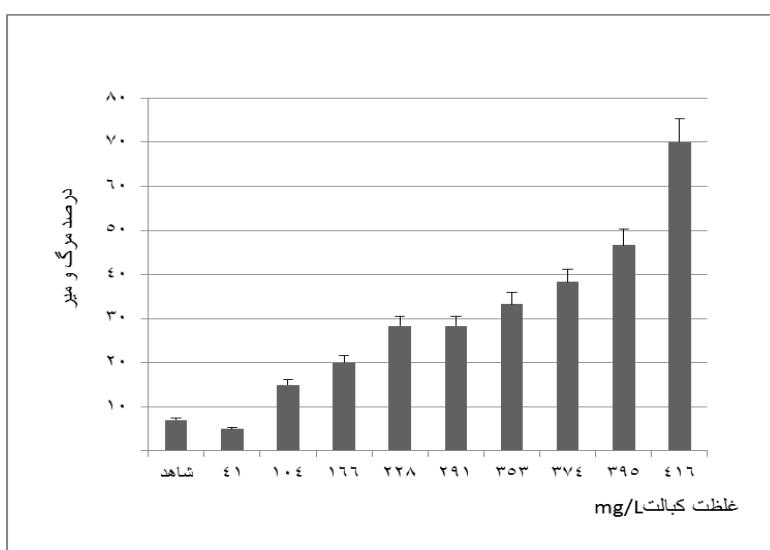
شکل ۱: پروبیت تعیین Lc50 ۲۴h اثر فلز نیکل بر روی آرتمیا اورمیانا (*Aurtemia urmiana*) در سال ۱۳۸۹



شکل ۲: پروبیت تعیین Lc50 24h اثر فلز کبالت بر روی آرتمیا اورمیانا (*Aurtemia urmiana*) در سال ۱۳۸۹

با افزایش غلظت از ۴۱ تا ۴۱۶ میلی گرم در لیتر درصد مرگ و میر نیز افزایش پیدا کرد. فلز کبالت در غلظت‌های ۴۱ تا ۳۵۳ میلی گرم در لیتر، مرگ و میر کمتر نشان داده و به ۳۳ درصد رسید و در غلظت‌های ۳۷۴ و ۳۹۵ میلی گرم در لیتر، مرگ و میر در حد متوسط (۳۸ درصد و ۴۶ درصد) و در غلظت ۴۱۶ میلی گرم در لیتر مرگ و میر افزایش پیدا کرده و به ۷۰ درصد رسید (شکل ۳).

اثر غلظت‌های مختلف کبالت بر روی درصد مرگ و میر آرتمیا نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ) این اختلاف فقط بین غلظت‌های ۴۱ و ۱۶۶ میلی گرم در لیتر معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). بررسی درصد مرگ و میر در غلظت‌های مختلف کبالت نشان داد که در غلظت شاهد ۱۰ درصد مرگ و میر مشاهده شد.



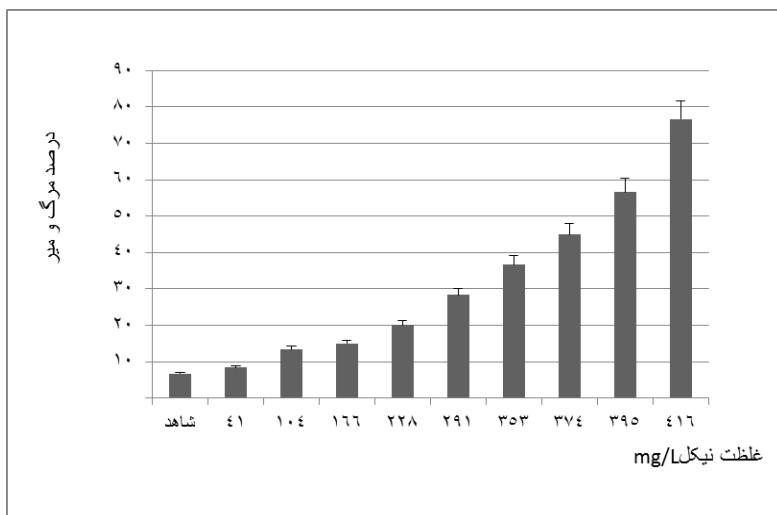
شکل ۳: درصد مرگ و میر آرتمیا اورمیانا (*Aurtemia urmiana*) در غلظت‌های مختلف کبالت در سال ۱۳۸۹  
(آنتک ها انحراف میانگین را نشان می دهند)

تا ۲۹۲ میلی‌گرم در لیتر مرگ و میر کمتر مشاهده شد. به طوری که در ۲۹۲ میلی‌گرم در لیتر به ۲۸ درصد رسید و از غلظت ۳۵۴ تا ۳۹۶ میلی‌گرم بر لیتر مرگ و میر در حد متوسط (۴۵، ۳۶ و ۵۶ درصد) و در غلظت ۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر مرگ و میر افزایش پیدا کرده و به ۷۶ درصد رسید (شکل ۴).

اثر غلظت‌های مختلف نیکل بر روی درصد مرگ و میر آرتمیا نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار بود ( $P \leq 0.05$ ). این اختلاف فقط در غلظت‌های ۴۱، ۱۰۴، ۱۶۶ و ۲۲۸ میلی‌گرم در لیتر معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ).

بررسی درصد مرگ و میر در غلظت‌های مختلف نیکل نشان داد که در غلظت شاهد ۱۰ درصد مرگ و میر مشاهده شد.

با افزایش غلظت از ۴۱ تا ۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر درصد مرگ و میر افزایش پیدا کرد. در غلظت‌های فلز نیکل از ۴۱ میلی‌گرم در لیتر



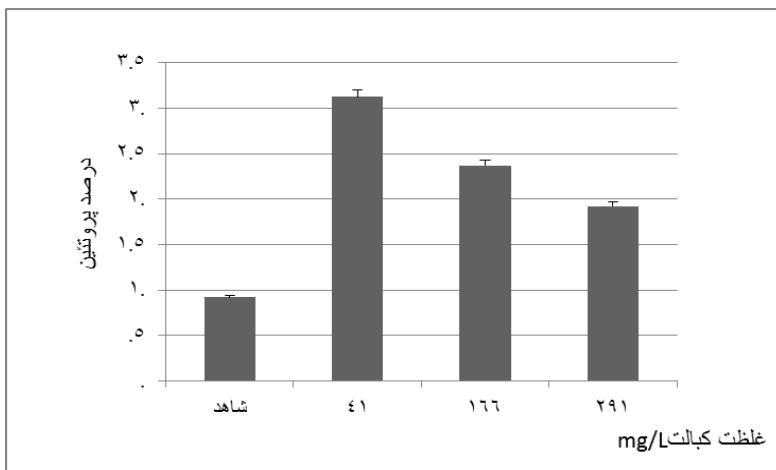
شکل ۴: درصد مرگ و میر آرتمیا اورمیانا (*Aurtemia urmiana*) در غلظت‌های مختلف نیکل در سال ۱۳۸۹  
(آنتک‌ها انحراف معیار را نشان می‌دهند)

در آزمایش اندازه‌گیری پروتئین آرتمیا در غلظت‌های مختلف نیکل اختلاف معنی‌داری در میزان پروتئین مشاهده شد ( $P \leq 0.05$ ). این اختلاف بین غلظت شاهد و ۴۱ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۴۱ و ۲۹۲ میلی‌گرم بر لیتر معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ).

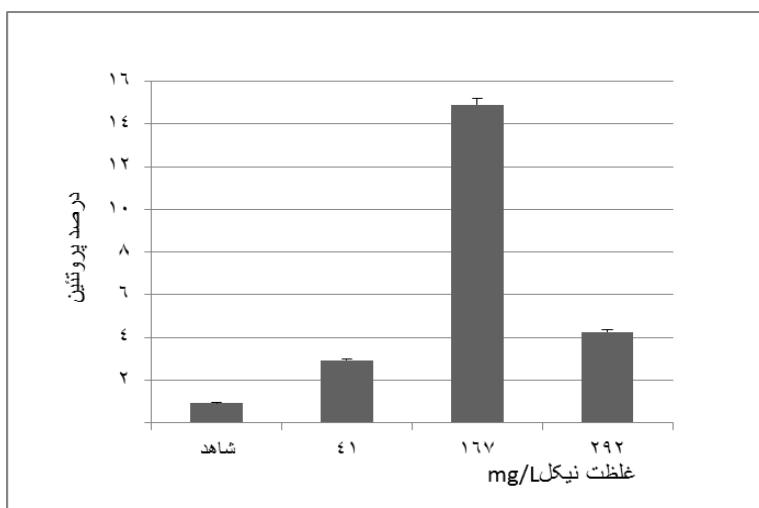
در غلظت شاهد میزان پروتئین ۰/۹۲ درصد، در غلظت ۴۱ میلی‌گرم در لیتر نیکل ۲/۹۳ درصد، در غلظت ۱۶۷ میلی‌گرم در لیتر نیکل ۱۴/۹۱ درصد و در غلظت ۲۹۲ میلی‌گرم در لیتر نیکل ۱۶۶ درصد بالاترین میزان پروتئین متعلق غلظت ۱۶۷ میلی‌گرم در لیتر نیکل بود، در غلظت‌های مختلف نیکل میزان پروتئین افزایش یافته است (شکل ۵).

در آزمایش اندازه‌گیری پروتئین آرتمیا در غلظت‌های مختلف کبالت اختلاف معنی‌داری در میزان پروتئین مشاهده شد ( $P \leq 0.05$ ). این اختلاف بین غلظت شاهد و غلظت‌های ۱۶۶ و ۲۹۱ میلی‌گرم در لیتر و غلظت‌های ۴۱ و ۲۹۱ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ۱۶۶ و ۲۹۱ میلی‌گرم در لیتر معنی‌دار نبود ( $P > 0.05$ ).

در غلظت شاهد میزان پروتئین ۰/۹۲ درصد بود، در غلظت‌های مختلف کبالت با مقادیر ۴۱ میلی‌گرم در لیتر، ۳/۱۳ درصد، در غلظت ۱۶۶ میلی‌گرم در لیتر، ۲/۳۷ درصد و در غلظت ۲۹ میلی‌گرم بر لیتر، ۱/۹۲ درصد محاسبه شد. بالاترین میزان پروتئین متعلق به ۴۱ میلی‌گرم در لیتر و در غلظت‌های مختلف کبالت میزان پروتئین افزایش یافته است (شکل ۵).



شکل ۵: درصد پروتئین آرتمیا اورمیانا (*Aurtemia urmiana*) در غلظت‌های مختلف فلز کربالت در سال ۱۳۸۹  
(آنتک‌ها انحراف معیار را نشان می‌دهند)



شکل ۶: درصد پروتئین آرتمیا اورمیانا (*Aurtemia urmiana*) در غلظت‌های مختلف فلز نیکل در سال ۱۳۸۹  
(آنتک‌ها انحراف معیار را نشان می‌دهند)

دارد. تحقیق حاضر اثرات واضح سمی بودن فلزات سنگین روی مرگ و میر و یک پارامتر بیوشیمیابی مهم یعنی پروتئین آرتمیا اورمیانا را نشان می‌دهد.

نتیجه این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت نیکل و کربالت بر میزان مرگ و میر آرتمیاها افزوده گردید و سمیت این فلزات وابسته به غلظت محیط بود، به طوری که در مورد نیکل از میانگین ۱۰ درصد در تیمار شاهد به ۷۶ درصد در تیمار ۴۱۰ میلی‌گرم در لیتر و در مورد فلز کربالت از ۱۰ درصد تیمار شاهد به ۷۰ درصد در تیمار ۴۱۶ میلی‌گرم در لیتر رسید. این مشاهده به مطالعات

## بحث و نتیجه گیری

به نظر برخی از محققین گونه‌های آرتمیا موجوداتی هستند که مواد سمی را در خود تجمع می‌دهند، بدون این‌که بر دوره زندگی آن‌ها تاثیری داشته باشد. طبق گفته Sarabia و همکاران در سال ۱۹۹۸، گونه‌های آرتمیا نسبت به کادمیوم بسیار تحمل پذیرند و آن  $LC_{50}$  آن  $\frac{۹۳}{۳}$  تا ۲۸۰ میلی گرم بر لیتر است. مطالعاتی که توسط Kokkali و همکاران در سال ۲۰۱۱ انجام شد نشان داد که تجمع فلزات سنگین اثرات حاد بر روی فعالیت‌های بیولوژیک مانند تحرک ناپلی‌ها پس از ۲۴ ساعت

Novakova و همکاران (۲۰۰۷). اثر روی و کادمیوم را روی آرتمیا فرانسیسکانا بررسی و نتیجه گرفتند که در غلظت‌های کم کادمیوم و غلظت‌های کم و متوسط روی، سنتز متالوتیونین‌ها افزایش پیدا می‌کند که باعث افزایش جایگاه اتصال فلز می‌شود. پس از پر شدن جایگاه‌های اتصال فلز به متالوتیونین، فلز به خون و بافت‌ها می‌رود و به عنوان یک یون آزاد اثرات سمی خود را اعمال می‌کند.

بالا رفتن غلظت فلزات می‌تواند سیستم آنزیمی را مختل کرده، باعث اثر مهار آنزیم‌های مسئول متابولیسم پروتئین شده و موجب کاهش میزان پروتئین شود (Sobha *et al.*, 2007). به این معنی که میزان سمیت بسیار بالا رفته و آرتمیا دیگر توان مقابله با آن را ندارد.

مکانیسم اثر نیکل و کبالت مشابه سایر فلزات است. این فلزات با ماکرومولکول‌های حیاتی بدن به طور برگشت ناپذیر اتصال ایجاد می‌نمایند و موجب وقفه در فعالیت‌های بیولوژیکی سلول‌ها می‌شوند (احمدی زاده، ۱۳۷۶).

همچنین در کپور معمولی پروتئین سرم خون در تیمار نیکل کاهش پیدا کرده است (Sreedevi *et al.*, 1992; Saxena *et al.*, 2009).

در یک نتیجه گیری کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که در مورد LC50، گونه آرتمیا اورمیانا نسبت به آرتمیا فرانسیسکانا مقاوم‌تر می‌باشد. این موجودات پس از یک هفته از بین می‌رونده و تغییراتی را در میزان ترکیبات خود نشان می‌دهند. استفاده از این ناپلی‌ها به عنوان غذا برای موجودات دیگر باعث انتقال فلزات به سطح بالاتر زنجیره غذایی از جمله انسان می‌گردد. از سوی دیگر و از دیدگاه زیست محیطی، تشخیص وجود ترکیبات سمی در محیط توسط اندازه گیری مرگ و میر و میزان پروتئین ناپلی‌ها در محیط سمی در مقایسه با مرگ و میر و میزان ترکیبات بیوشیمیابی این موجودات در محیط شاهد امکان پذیر است.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام این بررسی یاری نمودند، خصوصاً از سرکار خانم وکیلی صمیمانه تشکر و سپاسگزاری می‌گردد.

Hirota و Gajbhiye (۱۹۹۰) مشابهت دارد. به طوری که سمیت و درصد مرگ و میر ناپلی آرتمیا با زیاد شدن مقادیر سرب، کادمیوم، نیکل، مس، روی و آهن افزایش نشان داده است. همچنین krzyz Saliba در ۱۹۷۶ افزایش مرگ و میر را در اثر فزونی یافتن غلظت مس در *Artemia salina* نشان دادند.

LC50 بدست آمده در این تحقیق در تیمار با فلز نیکل ۳۸۴ و فلز کبالت ۴۰۳/۷ میلی‌گرم در لیتر بود. طبق تحقیقات انجام شده در مورد اثر فلزات دیگر روی مرگ و میر گونه *Artemia urmiana* LC50 فلز روی ۴۸۰ میلی‌گرم در لیتر و فلز کادمیوم ۲۳۵ میلی‌گرم در لیتر (تقی زاده انصاری، ۱۳۸۵) به دست آمده است. به طوری که می‌توان نتیجه گرفت ترتیب سمیت فلزات در این گونه به صورت: Cd > Ni > Co > Zn می‌باشد. در گونه *Artemia fransiscana* سمیت کادمیوم بیشتر از نیکل و روی بوده و ترتیب سمیت آن‌ها Cd > Ni > Zn بدست آمده است (Gajbhiye and Hirota, 1990).

سخت‌پوستان برای بی‌اثر کردن سمیت فلزات سنگین در بدن دارای دو استراتژی می‌باشند. برخی فلزات را تا آستانه‌ای مشخص، به همان میزان جذب، از بدن دفع می‌کنند و سایرین فلزات را تا غلظت مشخصی در محیط، توسط پروتئین‌های خاصی به نام متالوتیونین‌ها در بدن خود غیر سمی می‌نمایند (تقی زاده انصاری، ۱۳۸۵).

متالوتیونین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های سیتوپلاسمی با وزن مولکولی کم هستند. بر طبق تحقیقات مختلف، افزایش سطوح این پروتئین‌ها ناشی از جذب، ذخیره، انتقال و حذف فلزات سنگین است. Del Ramo و همکاران در سال ۱۹۹۵ نشان دادند که میزان متالوتیونین‌ها در آرتمیا با گذشت زمان افزایش می‌یابند. سنتز متالوتیونین‌ها در آرتمیا بسیار زیاد بوده که یکی از دلایل مقاومت بالای این موجود نسبت به آلاینده‌ها می‌باشد. Munshi و همکاران (۱۹۹۶) دریافتند که با افزایش غلظت کادمیوم و مس میزان پروتئین دو گونه میگو Penaeidae افزایش می‌یابد.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که با افزایش غلظت کبالت تا ۴۱ و نیکل تا ۱۶۷ میلی‌گرم در لیتر میزان پروتئین افزایش داشته و سپس کاهش پیدا می‌کند.

- Lavens, P. and Sargeloos, P., 1996.** Manual on the production and use of live food for aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, Ghent, Belgium.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J., 1951.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 193: 385-386.
- Munshi, A. B., Yong-quan, S., Shaojing, L. and Li-yu, H., 1996.** Effect of cu, cd and cu:cd mixture on the biochemical composition of two Penaeid shrimp postlarvae. *chin. j. oceanol. LIMNOL.*, 15:45-41.
- Novakova, J., Danova, D., Striskova, K., Hromada, R., Mickova, H. and Rabiskv, M., 2007.** Zinc and Cadmium toxicity using a Bioteat with *Artemia franciscana*. *ACTAVET.BRNO*, 76: 635-642.
- Rahimi, B. and Nejatkhan Manavi, P., 2010.** Availability, Accumulation and Elimination of cadmium by *Artemia Urmiana* Different Salinities. *J.BioL.ENVIRON.SCI.*, 12: 149-157.
- Saliba, L. J. and Krzyz, R. M., 1976.** Acclimation and tolerance of *Artemia salina* to copper salts. *marine biology*, 138: 231-238.
- Sarabia, R., Torreblanca, A., Del Ramo, J.J. and Diaz-Mayans, J., 1998.** Effect of low mercury concentration exposure on hatching, growth and survival in *Artemia* strain la mata parthenogenetic diploid. comparative biochemistry and physiology. part A, 120: 93-97.
- Saxena, M., Saxena, H. M., Sangha, G. K. and Kaur, K., 2009.** Effect of heavy metal pollution of water on total plasma proteins and serum protein profiles of Common Carp fish (*Cyprinus carpio*). *The Internet Journal of Veterinary Medicine*, 5.
- Seebaugh, D. R., Goto, D. and Wallace, W. G., 2004.** Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain. *Marine Environmental Research*, 59: 473-491.
- Seixas, P., Coutinho, P., Ferreira, M. and Otero, A., 2009.** Nutritional value of the Cryptophyte *Rhodomonas lens* for *artemia sp.* *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 381: 1-9.
- Sobha, K., Poornima, A., Harini, P. and Veeraiah, K., 2007.** A Study Biochemical changes in the fresh water fish, *Catla Catla*(HAMILTON) exposed to the heavy metal toxicant cadmium chloride. Kathmandu university journal of Science, Engineering and Technology, vol 1. no4.
- Sreedevi, P., Sivaramakrishna, B., Suresh, A. and Radhakrishnaiah, K., 1992.** Effect of nickel on some aspects of protein metabolism in the gill and kidney of the freshwater fish, *Cyprinus carpio L.* . *Environmental Pollution*, 77: 59-63.

## منابع

- احمدی زاده, م., ۱۳۷۶. سم شناسی فلزات سنگین. نشر هزاران.
- اکبری حامد, ن., ۱۳۸۳. بررسی اثر آلدگی فلزات سنگین روی و مس بر روی *Artemia urmiana* پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم و فنون دریایی.
- اویسی, ص., ۱۳۸۳. ارزش غذایی آرتمیا و نقش آن در تغذیه آبزیان. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشگاه علوم و فنون دریایی.
- تقی زاده انصاری, ا., ۱۳۸۵. بررسی اثر فلزات سنگین Zn و Cd بر روی رشد و بقا *Artemia urmiana* پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی.
- ثنایی, غ., ۱۳۷۵. سم شناسی صنعتی. جلد اول, انتشارات دانشگاه تهران.
- حیدری, ع., ۱۳۸۰. تعیین میزان تجمع برخی عناصر سنگین در مراحل مختلف زیست آرتمیای دریاچه ارومیه. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشگاه تربیت مدرس.
- ربانی, م., جعفرآبادی آشتینی, ا. و مهرداد شریف, ا., ۱۳۸۷. اندازه گیری میزان آلدگی ناشی از فلزات سنگین نیکل, سرب و جیوه در رسوبات خلیج فارس / منطقه عملیاتی عسلویه. اکتشاف و تولید, شماره ۵۱ صفحات ۵۳-۵۸.
- Brix, K.V., Cardwell, R. D. and Adams, W.J., 2003.** Chronic toxicity of arsenic to the great salt lake Brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 169-175.
- Del Ramo, J., Torreblanca, A., Martínez, M., Pastor, A. and Díaz-Mayans, J., 1995.** Quantification of cadmium-induced metallothionein in crustaceans by the silver-saturation method. *Marine Environmental Research*, 39 (1-4):121-125.
- Fichet, D. and Miramand, P., 1998.** Vanadium toxicity to three marine invertebrates Larvae: *Crassostrea gigas*, *paracentrotus lividus* and *Artemia salina*. *Chemosphere*, 37: 1363-1368.
- Gajbhiye, S. N. and Hirota, R., 1990.** Toxicity of heavy metals to Brine shrimp Artemia. *Journal of Indian Fisheries association*, 20: 43-50.
- Hadjispyrou, S., Kugolos, A. and Anagnostopoulos, A., 2001.** Toxicity, Bioaccumulation and inter active effects of organotin, cadmium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49: 179-186.
- Kokkali, V., Katramados, I. and Newman, J. D., 2011.** Monitoring the Effect of Metal Ions on the Mobility of *Artemia salina* Nauplii. *Biosensors*, 1: 36-45.

## Determination of LC50 and protein level fluctuations in *Artemia urmiana* in different concentrations of cobalt and nickel

the effects of Cobalt and Nickel on LC50<sub>24h</sub> and protein of *Artemia urmiana* was investigated in this research in 2010. Nauplii were reared for 6 days at different concentrations of Nickle and Cobalt. They were fed with *Chlorella* and yeast. During the culture temperature was 20-28<sup>°c</sup>, salinity was 28 ppt and photoperiod was 12:12(light:dark) cycle. Naplii were harvested after 6 days experiment for protein extraction. Lowry method for protein assay was used. Protein level in the vicinity of different Cobalt and Nickel concentrations showed significant differences ( $p<0.05$ ). The most amount of the protein in the vicinity of Cobalt was 3.13 percent that belonged to 41 mg.l<sup>-1</sup> treatment. In the vicinity of nickel, it was 14.90 percent and belonged to 167 mg.l<sup>-1</sup> treatment. The level of LC50<sub>24h</sub> for Artemia was estimated 403.7 mg.l<sup>-1</sup>in the vicinity of Cobalt and 384 mg.l<sup>-1</sup>in the vicinity of nickel.

**Key word:** LC50, Nickle, Cobalt, protein, *Artemia urmiana*