

## مقاله علمی - پژوهشی:

## آثار سمیت مزمن فلز سنگین کادمیوم بر رشد، زنده‌مانی، آنزیم‌های گوارشی و برخی شاخص‌های تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*)

شیوا محمدی<sup>۱</sup>، کوروش سروی مغانلو<sup>۱\*</sup>، رامین مناف‌فر<sup>۱</sup>، بهروز آتشبار کنگرلویی<sup>۲</sup>، جیوانی لیبرلاتو<sup>۳</sup>

\*k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

- ۱- گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران  
 ۲- گروه اکولوژی و مدیریت ذخایر آبی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران  
 ۳- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه ناپل فدریکو دوم، ایتالیا

تاریخ دریافت: تیر ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۳

### چکیده

آلودگی محیطی فلزات سنگین تهدیدی جدی برای اکوسیستم‌های آبی محسوب می‌شود که افزایش روزافزون آنها می‌تواند چرخه زندگی و ذخایر زیستی بسیاری از گونه‌های زئوپلانکتونی (آرتمیا) را تحت تأثیر قرار دهد. لذا، در مطالعه حاضر اثر سمیت فلز سنگین کادمیوم بر رشد، زنده‌مانی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی خصوصیات تولید مثلی *Artemia urmiana* مورد بررسی قرار گرفت. غلظت کشندگی متوسط ( $LC_{50}$ ) برای مرحله‌های ناپلی و بلوغ و در ساعت‌های ۲۴ و ۷۲، با استفاده از تجزیه و تحلیل آماری پروبیت تعیین گردید. به منظور بررسی اثر سمیت مزمن میانگین غلظت‌های  $LC_{50}$  ۷۲ ساعته استفاده شد و ناپلی‌ها در قالب ۳ تیمار شامل گروه شاهد، ۱۰ درصد  $LC_{50}$  و ۲۰ درصد  $LC_{50}$  به مدت ۲۱ روز پرورش داده شدند. نتایج نشان داد، غلظت‌های مختلف کادمیوم کلراید باعث کاهش رشد آرتمیای دریاچه ارومیه در روزهای ۱۷ و ۲۱ پرورش شد ( $p < 0.05$ ). همچنین کاهش درصد زنده‌مانی در تمامی روزهای پرورش مشاهده شد و بیشترین کاهش زنده‌مانی (۲۸/۹ درصد) در *A. urmiana* در غلظت ۲۰ درصد  $LC_{50}$  مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت تأثیر کادمیوم کلراید قرار نگرفتند ( $p > 0.05$ )، اما با وجود این، فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز و آلفا آمیلاز با افزایش غلظت کادمیوم کلراید افزایش و فعالیت آنزیم لیپاز کاهش یافت ( $p > 0.05$ ). همچنین شاخص‌های تولید مثلی شامل درصد سیست‌زایی و تعداد زاده‌های هر تولید مثل تحت تأثیر کادمیوم کلراید قرار نگرفت ( $p > 0.05$ )، اما تعداد دفعات تولید مثلی و تعداد کل زاده‌ها در مواجهه با کادمیوم کلراید کاهش و تعداد زاده‌های روزانه افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). بر اساس نتیجه‌گیری نهایی می‌توان بیان کرد که کادمیوم کلراید منجر به کاهش رشد و زنده‌مانی و تغییر در فعالیت آنزیم‌های گوارشی و خصوصیات تولید مثلی در *A. urmiana* گردید. بنابراین، بایستی در ارتباط با چگونگی مدیریت در دفع پساب‌های آلوده توجه بیشتری صورت پذیرد.

**کلمات کلیدی:** کادمیوم کلراید، رشد، زنده‌مانی، آنزیم‌های گوارشی، *Artemia urmiana*

\*نویسنده مسئول



## مقدمه

با پیشرفت فناوری و افزایش فعالیت‌های صنعتی، ورود مواد سمی مانند فلزات سنگین از پوسته زمین به محیط زیست افزایش یافته است. این موضوع سبب رویارویی انسان‌ها و سایر موجودات زنده با این مواد سمی شده است (Novakova *et al.*, 2007). در نهایت بخشی از این آلاینده‌ها وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند و اثرات مضر بر ارگانسیم‌های زنده و زنجیره‌های غذایی می‌گذارند. بالارفتن میزان این آلودگی‌ها، سمت و سوی مطالعه بعضی از محققان را به بررسی عواقب فلزات سنگین بر موجودات زنده سوق داده است (Jakimska *et al.*, 2011; Mohiseni *et al.*, 2016). این مواد گروهی از فلزات و متالوئیدها هستند که تجزیه نمی‌شوند و نیمه‌عمر طولانی دارند. فلزات سنگین به حالت ذرات سوسپانسیون وارد منابع آبی شده و به صورت کلوئیدی همراه با سایر ذرات کلوئیدی تجمع در بدن موجودات زنده و به صورت یون در آب دیده می‌شوند (Novakova *et al.*, 2007). اثرات فلزات سنگین در موجودات آبی معمولاً بعد از چند سال ظاهر می‌شود. البته بعضی مواقع با وجود مدت زمان کم، تاثیرگذاری آنها در موجودات زیاد و آنی است. این مواد ممکن است به صورت زیستی در بافت جانوران نیز تجمع پیدا کنند. گروهی از فلزات سنگین (آهن و مس)، عناصر ضروری تلقی می‌شوند و در بهبود رشد و چرخه زندگی موجودات مؤثرند. اما زمانی که غلظت آنها بالا می‌رود، باعث بروز مشکلاتی می‌شوند. در مقابل فلزاتی مانند سرب، جیوه و کادمیوم که در تن کرد شناسی بدن کارایی ندارند، حتی در غلظت‌های پایین نیز سمی تلقی می‌شوند (Jakimska *et al.*, 2011). فلزات سنگین حداقل دو پیوند با پروتئین‌ها ایجاد می‌کنند. اولین پیوند به صورت گروه‌های کربوکسیلی، ایمیدازول و سولفوهیدریدی و دومین پیوند با آمینواسیدهای مهم در واکنش‌های آنزیمی ایجاد می‌شود. به همین دلیل این مواد می‌توانند برای آنزیم‌ها که ساختار پروتئینی دارند، مضر باشند. همچنین بر غشاء سلولی که کانال‌های پروتئینی دارند، تأثیر منفی دارند و مانع عمل‌کرد طبیعی غشای سلولی می‌شوند (Gebhardt, 1976).

کادمیوم جزو فلزات سنگینی است که به صورت گسترده در

محیط وجود دارد. این فلز در فعالیت‌های آبکاری، الکترونیکی و باتری‌های قلیایی به کار برده می‌شود. مقدار زیادی نیز در کودهای فسفاته وجود دارد که میزان کادمیوم خاک را بالا می‌برد. کادمیوم یک ماده بسیار سمی برای موجودات آبی است و ظرفیت بالایی برای سمی شدن دارد. حتی در بعضی از موارد به عنوان سمیت غذایی نیز گزارش شده است. سازمان بهداشت جهانی حداکثر میزان کادمیوم را در آب دریاها ۴۵۰ میکروگرم بر لیتر، اقیانوس‌ها ۰/۱۱ میکروگرم بر لیتر و در رودخانه ۰/۰۳ میکروگرم بر لیتر گزارش کرده است. کادمیوم در آب دریا به صورت‌های  $CdCl^+$ ،  $Cd^{2+}$  و  $CdC_2$  دیده می‌شود. غلظت آن در ارتباط با شوری و دما کمتر بوده است و بیشتر به ذرات ارگانیکی بستگی دارد. بیشتر کادمیومی که در آب شور و آب دریا وجود دارد، به شکل کادمیوم کلراید است و مقدار کمی نیز به صورت یون آزاد وجود دارد (Gebhardt, 1976; Novakova *et al.*, 2007).

نتایج مطالعات مختلفی نشان‌دهنده تأثیر فلزات سنگین بر شاخص‌های خون‌شناسی، کاهش زنده‌مانی و رشد، کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و افزایش بیان ژن‌های استرسی در آبزیان هستند (Woo *et al.*, 2009; Gambardella *et al.*, 2014; Mohiseni *et al.*, 2016; Somasundaram *et al.*, 2019). با این‌که اثرات کادمیوم در آبزیان به صورت کامل بررسی نشده است، اما برخی از مطالعات متوسط غلظت کشنده ( $LC_{50}$ )<sup>۱</sup> کادمیوم کلراید را در خرچنگ گرد (*Eurypanopeus depressus*) برای ۷۲ ساعت، ۴/۹ و برای آرتمیای (*Artemia salina*) طی ۷ روز، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۸ روز، ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۱۱ روز، ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر، ۱۳ روز، ۵ میلی‌گرم بر لیتر و برای ۱۶ روز، ۱ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند (Brown and Gebhardt, 1976; Ahsanullah, 1971). این فلز در آبزیان از طریق آبشش، پوست و دستگاه گوارش وارد بدن می‌شود و در آبشش‌ها، کلیه‌ها و استخوان‌ها تجمع پیدا می‌کند (Mohiseni *et al.*, 2016). زمانی که کادمیوم وارد بدن موجودات می‌شود، در سنتز متالوسیانین‌ها (پپتیدهایی

<sup>1</sup> 50% Lethal Concentration

شناخت تاثیرگذاری این مواد در محیط زیست به خصوص در اکوسیستم‌های آبی یک ضرورت به نظر می‌رسد و نتایج آن می‌تواند در برنامه‌ریزی‌های حفاظت از منابع طبیعی مورد استفاده قرار گیرد. همچنین مشخص شده است که کادمیوم از راه‌های مختلفی مانند فعالیت‌های معدن، صنایع فلزی، کودهای شیمیایی و آفت‌کش‌ها وارد دریاچه ارومیه می‌شود (Rahimi and Nejatkhah Manavi, 2011)، لذا، مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سمیت فلز سنگین کادمیوم بر رشد، زنده‌مانی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و برخی خصوصیات تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه انجام گرفت.

## مواد و روش کار

### سیست‌گشایی و پرورش آرتمیا

سیست‌های آرتمیای دریاچه ارومیه تهیه شده از پژوهشکده آرتمیا و آبی‌پروری دانشگاه ارومیه در آب با شوری ۳۳ گرم در لیتر، دمای ۲۸-۲۷ درجه سانتی‌گراد، حداقل اکسیژن محلول ۲ میلی‌گرم در لیتر به همراه نور و هوادهی مناسب به مدت ۲۴ ساعت در ظروف ته مخروطی تخم‌گشایی شدند. در ادامه جهت تهیه آرتمیا با سنین مختلف برای تعیین دوز متوسط کشنده (LC<sub>50</sub>)، تعداد ۵۰۰ عدد ناپلی اینستار I شمارش شده و به ظروف ته مخروطی حاوی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دریاچه با شوری ۸۰ گرم در لیتر منتقل شد. برای هوادهی از ظروف ته مخروطی به کمک پیپت پلاستیکی استفاده شد (Ates et al., 2013a). در طول مدت پرورش (۲۱ روز)، آرتمیایا با جلبک *Dunaliella* بر اساس روش Coutteu (۱۹۹۶) تغذیه شدند.

### تعیین دوز متوسط کشنده (LC<sub>50</sub>) فلز سنگین

#### کادمیوم در مراحل مختلف رشد *A. urmiana*

در این پژوهش از کادمیوم کلراید (CdCl<sub>2</sub>) به عنوان منبع فلز سنگین استفاده شد. برای به دست آوردن غلظت LC<sub>50</sub> ابتدا آزمایش بر ناپلیوس اینستار I آرتمیای دریاچه ارومیه جهت تعیین محدوده سمیت این فلز انجام پذیرفت. در ادامه تعداد ۵۰ عدد ناپلی و آرتمیای بالغ به مدت ۲۴ ساعت و بدون غذادهی در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. در ادامه تعداد آرتمیای تلف شده شمارش شدند.

با وزن مولکولی کم و غنی شده با آمینو اسید سیستئین (Libralato et al., 2016). موجودات آبی تبادل آب و یون‌ها را از طریق نفوذپذیری غشایی آبشش‌ها و اپیتلیوم روده کنترل می‌کنند. میزان ورود کادمیوم به بدن در آبهای با فشار اسمزی و شوری کمتر، افزایش می‌یابد (Rahimi and Nejatkhah Manavi, 2011).

برای بررسی اثر فلزات سنگین در محیط زیست و آبریان نیاز به مطالعات گسترده‌ای است. تغییرات شرایط محیطی در منابع آبی به وسیله آلاینده‌هایی مانند فلزات سنگین باعث تغییرات فیزیولوژیک آبریان می‌شود تا بتوانند در محیط جدید رفتار بهینه داشته باشند. این تغییرات در سطح سلولی و مولکولی نیز بروز پیدا می‌کند (Pierre et al., 2011). در سال‌های اخیر، تأثیر برخی از این مواد سمی بر آرتمیا بررسی شده است. فلزات سنگین در بدن آرتمیا نیز مانند سایر موجودات زنده، تجمع پیدا می‌کنند و ممکن است که به سطوح بالای زنجیره غذایی انتقال یابند (Gajbhiye and Hirota, 1990). آرتمیا در آبی‌پروری به عنوان غذای زنده و در محیط‌های طبیعی نیز نقش مهمی در انتقال زنجیره انرژی ایفاء می‌کنند (Ates et al., 2013a; Ates et al., 2013b; Gambardella et al., 2014). آرتمیا به دلیل طول عمر کوتاه، جثه کوچک و در دسترس بودن سیست‌های خشک آن، از مهم‌ترین موجودات آبی جهت مطالعات سم‌شناسی به حساب می‌آید. یکی دیگر از مزیت‌های مطالعات سم‌شناسی بر آرتمیا این است که آبریان سریع‌تر به نسل دوم می‌رسند و می‌توان اثرات سمیت را در نسل‌های بعدی نیز بررسی کرد (Novakova et al., 2007). با توجه به نامناسب بودن محل زیست این آبریان، تنوع زیستی اکوسیستم‌هایی که آرتمیا در آن زندگی می‌کند، پایین است. دریاچه‌های آب شور طبیعی دارای سطوح خطرناکی از فلزات سنگین هستند و آرتمیا می‌تواند این فلز را جذب کند و سایر مصرف‌کننده‌ها نیز آرتمیا را به عنوان منبع غذایی استفاده کنند (Sarabia et al., 2006). با توجه به این که آلوده شدن محیط زیست با فلزات سنگین چرخه زندگی زئوپلانکتون‌هایی مانند آرتمیا را تحت تأثیر قرار می‌دهد و ذخائر این گونه‌ها را تهدید می‌کند، لذا

شد (Rahimi and Nejatkhah Manavi, 2011). همچنین میزان رشد در این روزها، پس از تثبیت آرتمیایها با محلول لوگول ۱٪ و با استفاده از میکروسکوپ مجهز به میکرومتر چشمی و لام مدرج با اندازه‌گیری طول بدن از سر تا انتهای بند شکمی تعیین شد. در صورت محدودیت استفاده از میکروسکوپ برای اندازه‌گیری طول آرتمیا در مراحل پایانی رشد، از دستگاه استریومیکروسکوپ ترسیم و دستگاه دیجیتالیزر استفاده شد (Agh et al., 2008).

جدول ۱: گروه‌های آزمایشی

Table 1: Experimental groups

Treatment	Nomenclature	Heavy metal concentration
1	Control	Without cadmium chloride
2	10% CdCl <sub>2</sub>	10% LC <sub>50</sub> 72 hours cadmium chloride
3	20% CdCl <sub>2</sub>	20% LC <sub>50</sub> 72 hours cadmium chloride

### فعالیت آنزیم‌های گوارشی

نمونه برداری از آرتمیایها در انتهای دوره (روز ۲۱) انجام شده و برای تهیه عصاره خام آنزیمی، آرتمیایها در بافر ترپس-کلریدریک و با استفاده از هموژنایزر همگن شدند (Qu et al., 2014). به منظور تهیه عصاره‌های خام آنزیمی جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی بدن آرتمیایها، از محلول نمک فیزیولوژیک استفاده شد (Rungrangsak-Torrissen, 2007). پس از سانتریفیوژ هموزن‌ها از مایع رویی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی آلکالین پروتئاز بر اساس روش Garcia-Carreno و Haard (۱۹۹۳)، لیپاز بر اساس روش Iijima و همکاران (۱۹۹۸) و آلفا آمیلاز بر اساس روش Bernfeld (۱۹۹۵) استفاده شد.

### بررسی خصوصیات تولید مثلی

در روز ۲۱ پرورش از هر تیمار ۳۰ جفت آرتمیای بالغ (۳۰ نر و ۳۰ ماده) جداسازی و هر جفت به طور جداگانه به ظرف ۵۰ میلی‌لیتری جهت بررسی خصوصیات تولید مثلی انتقال یافتند. تا روز ۲۱ دمای محیط پرورش ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود و آب به صورت روزانه تعویض می‌شد. تغذیه مولدین نیز با جلبک *Dunaliella salina* انجام گرفت. در این مرحله سیست و ناپلیوس‌های تولیدی با استفاده از لوپ شمارش

هر آزمایش این مرحله در ۳ تکرار انجام گرفت (Lan and Lin, 2005). بر اساس نتایج این آزمایش در مرحله بعد، ۸ غلظت از فلز سنگین کادمیوم در بازه به‌دست آمده (۹۹۰-۱۰ میکروگرم بر لیتر) و بر اساس تصاعد هندسی انتخاب شد (Barahona and Sanchez-Fortun, 1999). در ادامه تعداد ۵۰ عدد از گروه‌های سنی مختلف آرتمیا (ناپلی و بالغین) در قالب ۵ تکرار برای غلظت‌های مختلف از کادمیوم کلراید به ظروف ۱۰۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد. شرایط نگهداری آرتمیایها در این مرحله شامل دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، دوره روشنایی ۱۶ و دوره تاریکی ۸ ساعت همراه با هوادهی بود. سپس در زمان‌های ۲۴ و ۷۲ ساعت تعداد تلفات شمارش و ثبت شد (Hadjispyrou et al., 2001). در نهایت غلظت LC<sub>50</sub> فلز سنگین کادمیوم کلراید با استفاده از آزمون پروبیت به‌دست آمد (Mohiseni et al., 2008).

### بررسی اثر سمیت مزمن فلز سنگین کادمیوم بر شاخص‌های زیستی آرتمیا

برای تعیین سمیت، با استفاده از نتایج مرحله قبلی، ۳ تیمار آزمایشی (جدول ۱) جهت مطالعه اثر وجود غلظت‌های تحت‌کشنده کادمیوم کلراید در محیط پرورش آرتمیا ارومیانا تا مرحله بلوغ مورد استفاده قرار گرفت. تعویض آب طی دوره پرورش در روزهای ۱، ۸، ۱۱، ۱۷ و ۲۰ انجام شد و بعد از تعویض آب غلظت‌های فلز سنگین بر اساس میزان آب تعویض شده و غلظت مزمن کادمیوم هر تیمار اصلاح شدند. در طول این مدت آرتمیایها با جلبک *Dunaliella salina* با میزان ۰/۴۱۸ میلی‌لیتر در روز ۱ تا میزان ۱۰ میلی‌لیتر در روز ۲۱ با غلظت ۱۸×۱۰<sup>۶</sup> سلول در میلی‌لیتر تغذیه شدند (Coutteu, 1996).

### بررسی رشد و زنده‌مانی

در روزهای ۱، ۸، ۱۱، ۱۷ و ۲۱ پرورش و بلوغ، تعداد آرتمیایها در هر تیمار به صورت جداگانه شمارش گردید و با توجه به تعداد آرتمیایهای زنده مانده نسبت به کل آرتمیایهای روز اول، درصد بازماندگی تعیین شد. در طول دوره پرورش تعویض آب انجام گرفت و دوباره غلظت فلز سنگین تأمین

به ترتیب ۲۸۸/۲۱۸، ۳۳۸/۷۸۴ و ۳۱۳/۳۷۴ میکروگرم بر لیتر به دست آمد.

فلز کادمیوم ۷۲ ساعته در آرتمیای LC<sub>50</sub> جدول ۲: غلظت دریاچه ارومیه

Table 2: 72-hour LC<sub>50</sub> of cadmium in *Artemia urmiana*

Stage	Minimum dose (µg/l)	Maximum dose (µg/l)	Average dose (µg/l)
Nauplii	142.847	536.904	236.984
Adult	288.218	338.784	313.374

### رشد و زنده‌مانی

مقایسه میانگین‌های شاخص رشد (جدول ۳) در روز ۸ پرورش نشان داد که این شاخص تحت تأثیر کادمیوم کلراید قرار گرفت ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین رشد این مرحله در تیمار ۱ (کنترل) و بیشترین آن در تیمارهای ۲ (10% CdCl<sub>2</sub>) و ۳ (20% CdCl<sub>2</sub>) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). همچنین نتایج نشان داد، در روز ۱۱ پرورش، تیمار ۱ با تیمارهای ۲ و ۳ و تیمار ۲ با تیمار ۳ دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p < 0.05$ ). کمترین و بیشترین میزان رشد در این مرحله به ترتیب در تیمارهای ۱ و ۲ مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). شاخص رشد در روز ۱۷ پرورش نیز در تمامی تیمارها تحت تأثیر فلز کادمیوم کاهش یافت ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین و بیشترین رشد در این روز به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۱ مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). برای روز ۲۱، تیمار ۲ با تیمارهای ۱ و ۳ اختلاف معنی‌داری نشان داد ( $p < 0.05$ ). کمترین و بیشترین میزان رشد در این مرحله به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۱ به ثبت رسید ( $p < 0.05$ ).

جدول ۳: عملکرد رشد آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*) بر حسب میلی‌متر برای روزها و تیمارهای مختلف پرورشی (میانگین ± انحراف معیار، n=۳)

Treatment	Nomenclature	Day1	Day8	Day11	Day17	Day21
1	Control	0.01 <sup>a</sup> ±0.45	0.19 <sup>a</sup> ±3.38	0.26 <sup>a</sup> ±5.06	0.39 <sup>c</sup> ±7.45	0.31 <sup>b</sup> ±7.55
2	10% CdCl <sub>2</sub>	0.01 <sup>a</sup> ±0.45	0.24 <sup>b</sup> ±4.91	0.42 <sup>c</sup> ±7.12	0.4 <sup>a</sup> ±6	0.27 <sup>a</sup> ±6.97
3	20% CdCl <sub>2</sub>	0.01 <sup>a</sup> ±0.45	0.24 <sup>b</sup> ±4.95	0.27 <sup>b</sup> ±5.95	0.41 <sup>b</sup> ±6.35	0.31 <sup>b</sup> ±7.54

حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بود.

Data (Mean ± SE) with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ )

شدند. همچنین شاخص‌های درصد سیست‌زایی، تعداد دفعات تولید مثلی، تعداد زاده‌های هر تولید مثل، تعداد زاده‌های هر روز و تعداد کل زاده‌ها مشخص شدند (Mohammadi et al., 2016).

### روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

غلظت LC<sub>50</sub> فلز سنگین کادمیوم کلراید با استفاده از آزمون پروبیت به دست آمد. همچنین داده‌های حاصل با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد بررسی قرار گرفتند. البته پیش از انجام تجزیه و تحلیل، نرمال بودن داده‌ها و یک‌نواختی واریانس‌ها به ترتیب با استفاده از آزمون‌های Shapiro-Wilk و Levene صورت گرفت. تمام تجزیه و تحلیل‌ها در محیط نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام پذیرفت و سطح خطای نوع اول در آزمون‌ها ۰/۰۵ انتخاب شد. همچنین نتایج به صورت Mean±SD گزارش شدند.

### نتایج

#### دوز متوسط کشنده (LC<sub>50</sub>) فلز سنگین کادمیوم در مراحل مختلف رشد

متوسط غلظت کشنده (LC<sub>50</sub>) فلز سنگین کادمیوم در مراحل مختلف زندگی آرتمیای دریاچه ارومیه (ناپلی و بالغ) بر اساس آزمون پروبیت در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس این نتایج دز حداقل، دز حداکثر و دز میانگین متوسط کشنده کادمیوم کلراید برای مرحله ناپلی به ترتیب ۱۴۲/۸۴۷، ۵۳۶/۹۰۴ و ۲۳۶/۹۸۴ و برای مرحله بالغ

بیشترین درصد زنده‌مانی در این روزها به ترتیب در تیمارهای ۳ (۳۲/۳) درصد برای روز ۱۱ و ۲۸/۹ درصد برای روز ۲۱ پرورش) و ۱ (۶۵) درصد برای روز ۱۱ و ۵۵/۹ درصد برای روز ۲۱ پرورش) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). درصد زنده‌مانی در روز ۱۷ پرورش نیز تحت تأثیر کادمیوم کلراید قرار گرفت و کاهش یافت ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین و بیشترین درصد زنده‌مانی در این روز به ترتیب در تیمارهای ۳ و ۱ مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

مقایسه آزمون میانگین‌های شاخص درصد زنده‌مانی (جدول ۴) در روز ۸ پرورش نشان داد که این شاخص تحت تأثیر کادمیوم کلراید قرار گرفت و کاهش یافت ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین درصد زنده‌مانی این مرحله در تیمارهای ۲ (۱۰% CdCl<sub>2</sub>) با ۴۹/۸ درصد و ۳ (۲۰% CdCl<sub>2</sub>) با ۳۵/۹ درصد و بیشترین آن در تیمار ۱ (شاهد) با ۷۵/۳ درصد مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). همچنین این نتایج نشان داد، در روزهای ۱۱ و ۲۱ پرورش، تیمار ۱ با تیمارهای ۲ و ۳ دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $p < 0.05$ ) کمترین و

جدول ۴: درصد زنده‌مانی آرتمیای دریچه ارومیه (*Artemia urmiana*) برای روزها و تیمارهای مختلف پرورشی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار، n=۳)

Treatment	Nomenclature	Day1	Day8	Day11	Day17	Day21
1	Control	0.0 <sup>a</sup> $\pm$ 100	6.6 <sup>b</sup> $\pm$ 75.9	3.9 <sup>c</sup> $\pm$ 65	2.7 <sup>b</sup> $\pm$ 58.5	3.6 <sup>c</sup> $\pm$ 55.9
2	10% CdCl <sub>2</sub>	0.0 <sup>a</sup> $\pm$ 100	0.2 <sup>a</sup> $\pm$ 49.8	0.2 <sup>ab</sup> $\pm$ 45.3	0.9 <sup>a</sup> $\pm$ 41.3	0.5 <sup>ab</sup> $\pm$ 39.5
3	20% CdCl <sub>2</sub>	0.0 <sup>a</sup> $\pm$ 100	0.3 <sup>a</sup> $\pm$ 35.3	0.6 <sup>a</sup> $\pm$ 32.3	0.4 <sup>a</sup> $\pm$ 30.3	0.6 <sup>a</sup> $\pm$ 28.9

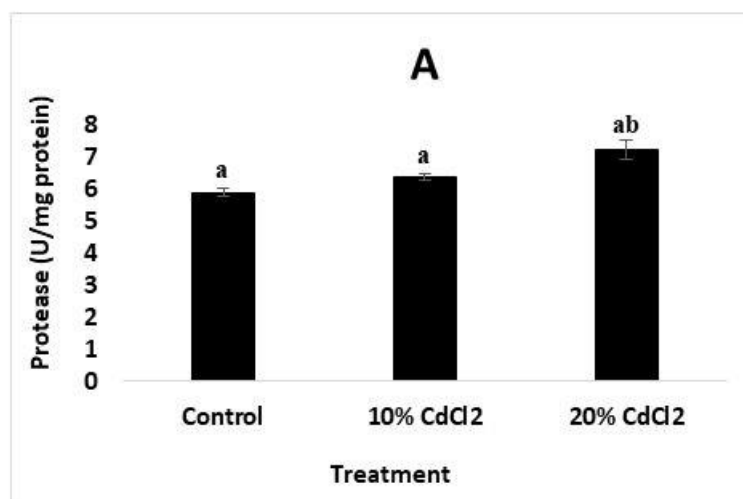
حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بود.

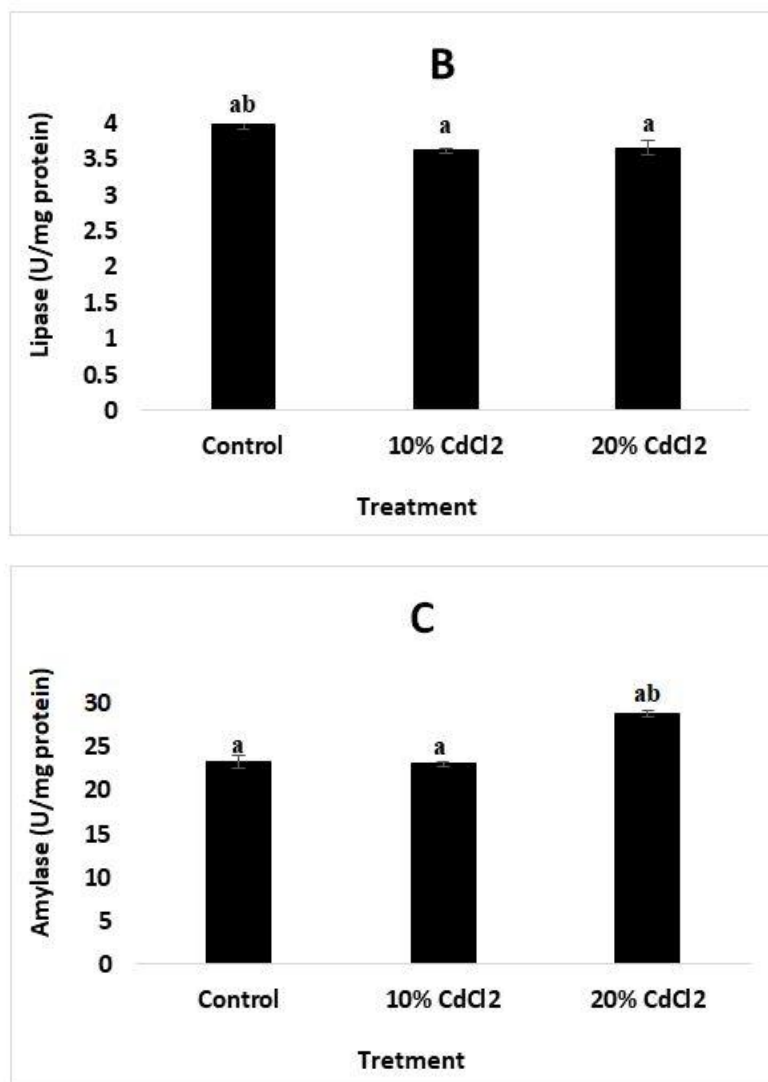
Data (Mean  $\pm$  SE) with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

کنترل) و ۳ (۲۰% CdCl<sub>2</sub>)، کمترین و بیشترین سطح فعالیت آنزیم لیپاز به ترتیب در تیمارهای ۲ (۱۰% CdCl<sub>2</sub>) و ۳ و کمترین و بیشترین سطح فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۳ مشاهده شد ( $p > 0.05$ ).

#### فعالیت آنزیم‌های گوارشی

نتایج مربوط به سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی کل بدن (شکل ۱) اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد ( $p > 0.05$ ). با این حال، کمترین و بیشترین سطح فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز به ترتیب در تیمارهای ۱





شکل ۱: فعالیت آنزیم‌های گوارشی آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*) در تیمارهای مختلف پرورشی. آلکالین پروتئاز: (A) پروتئاز، (B) آلفا آمیلاز، (C) لیپاز. ۱: Control (محیط پرورش فاقد کلرید کادمیوم)، ۲: 10% CdCl<sub>2</sub> (محیط پرورش حاوی ۱۰ درصد LC<sub>50</sub> ۷۲ ساعت کلرید کادمیوم)، ۳: 20% CdCl<sub>2</sub> (محیط پرورش حاوی ۲۰ درصد LC<sub>50</sub> ۷۲ ساعت کلرید کادمیوم). حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بود (میانگین  $\pm$  انحراف معیار، n=۳).

Figure 1: The activity of digestive enzymes of *Artemia urmiana* in different treatments. Alkalin protease (A), Amylase (B), Lipase (C). 1: Control (Without cadmium chloride), 10% CdCl<sub>2</sub> (10% LC<sub>50</sub> 72 hours cadmium chloride), 20% CdCl<sub>2</sub> (20% LC<sub>50</sub> 72 hours cadmium chloride). Data (Mean $\pm$ SE) with different superscripts were significantly different (P<0.05).

زاده‌ها نشان نداد ( $p > 0.05$ ). اما شاخص تعداد دفعات تولید مثلی تحت تأثیر کادمیوم کلراید کاهش یافت ( $p < 0.05$ ) به طوری که کمترین و بیشترین تعداد دفعات تولید مثلی به ترتیب در تیمارهای ۲ (10% CdCl<sub>2</sub>) و ۱ (کنترل) مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

#### خصوصیات تولید مثلی

نتایج مربوط به خصوصیات تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه (جدول ۵) اختلاف معنی‌داری را بین تیمارهای آزمایشی برای شاخص‌های درصد سیست‌زایی، تعداد زاده‌های هر تولید مثل، تعداد زاده‌های روزانه و تعداد کل

جدول ۵: خصوصیات تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*) برای تیمارهای مختلف پرورشی (میانگین  $\pm$  انحراف

معیار،  $n=3$ )

Table 5: The reproductive characteristics of *Artemia urmiana* in different treatments (Mean  $\pm$  SD,  $n=3$ )

Treatment	Nomenclature	Cystogenesis (%)	Reproductive times (N)	Number of offspring (N)	Daily births (N)	All born (N)
1	Control	6 <sup>a</sup> $\pm$ 49.8	0.5 <sup>c</sup> $\pm$ 7.4	1.6 <sup>a</sup> $\pm$ 18.8	0.6 <sup>a</sup> $\pm$ 6.6	15.9 <sup>b</sup> $\pm$ 145.4
2	10% CdCl <sub>2</sub>	6.3 <sup>a</sup> $\pm$ 46.5	0.5 <sup>a</sup> $\pm$ 4.7	1.5 <sup>a</sup> $\pm$ 18.5	0.8 <sup>b</sup> $\pm$ 8.8	14.1 <sup>a</sup> $\pm$ 93.3
3	20% CdCl <sub>2</sub>	5.9 <sup>a</sup> $\pm$ 43	0.6 <sup>ab</sup> $\pm$ 5.2	1.7 <sup>ab</sup> $\pm$ 19.4	1.9 <sup>c</sup> $\pm$ 10.7	17.1 <sup>ab</sup> $\pm$ 116.8

حروف غیر یکسان نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار در سطح  $p < 0.05$  بود.

Data (Mean  $\pm$  SE) with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## بحث

مختلف در برابر آلاینده‌های محیطی در ارتباط با سن موجود بیان شد (Chiarelli *et al.*, 2019). متابولیسم پایین در بالغ‌ها و به دنبال آن فیلتراسیون کمتر نسبت به ناپلی‌ها از دلایل مقاومت بیشتر عنوان شد. تصور بر این است که بالا بودن نرخ متابولیسم ناپلی‌ها در مقایسه با بالغین منجر به افزایش شدت فیلتراسیون جهت جذب بیشتر مواد غذایی می‌شود و به دنبال آن جذب آلاینده‌های محیطی افزایش می‌یابد (Mohiseni *et al.*, 2008).

نتایج مربوط به رشد آرتمیایا نشان‌دهنده تأثیر غلظت‌های مختلف کادمیوم کلراید بر کاهش این شاخص در روز ۱۷ و تأثیر غلظت ۱۰ درصد دوز مزمن کادمیوم کلراید در روز ۲۱ پرورش بود. مطالعات متعددی از اثرات آلاینده‌های مختلف بر تغییرات شاخص رشد در انواع گونه‌های آرتمیا گزارش شده است که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی دارند. بررسی تأثیر سمیت فلزات نیکل و وانادیوم بر رشد گونه‌های *Artemia urmiana* و *Artemia franciscana* نشان داد که میانگین رشد در روزهای ۵، ۷ و ۱۱ پرورش با افزایش غلظت کاهش داشت (Asadpour *et al.*, 2012). نتایج مطالعات Bakhtiyari و همکاران (۲۰۲۳) بررسی اثر سمیت مزمن حشره‌کش سایپرمتترین و Ghamarshenas و همکاران (۲۰۲۳) بررسی اثر حشره‌کش دیازینون بر آرتمیای دریاچه ارومیه نیز نشان‌دهنده کاهش رشد بود. استرس محیطی در کوتاه‌ترین زمان ممکن موجودات را وادار به پاسخ و تغییر در رفتار تغذیه‌ای می‌کند و در ادامه سبب کاهش نرخ تغذیه و کاهش رشد می‌شود (Kasumyan, 2000). همچنین ممکن است سموم از طریق جذب سلولی و آسیب‌رسانی به اندامک‌ها و اعمال تغییرات در سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی باعث کاهش رشد شوند (Cong *et al.*, 2009).

منابع آبی همواره در معرض انواع آلودگی‌های محیطی همانند فلز سنگین کادمیوم کلراید قرار دارند. سازمان بهداشت جهانی میزان این فلز سنگین را در آب دریاها ۴۵۰ میکروگرم بر لیتر، اقیانوس‌ها ۰/۱۱ میکروگرم بر لیتر و در رودخانه ۰/۰۳ میکروگرم بر لیتر گزارش کرده است (Novakova *et al.*, 2007). این آلودگی‌ها از طریق اثر بر میزان فیلتراسیون و جذب مواد غذایی باعث آسیب‌های فیزیولوژیک آبزیان ساکن در این اکوسیستم‌ها می‌شوند (Kardavani, 2005). تغییرات شرایط محیطی در منابع آبی به‌وسیله آلاینده‌هایی مانند فلزات سنگین باعث تغییرات فیزیولوژیک آبزیان می‌شود تا بتوانند در محیط جدید دارای رفتار بهینه باشند (Pierre *et al.*, 2011).

نتایج به‌دست آمده از غلظت LC<sub>50</sub> کادمیوم کلراید بر مراحل ناپلی و بالغ آرتمیای دریاچه ارومیه نشان داد که ناپلی‌ها حساسیت بیشتری در مقایسه با بالغین در برابر این فلز سنگین دارند. به عبارت دیگر، بالغ‌ها مقاومت بالاتری به نسبت ناپلی‌ها در برابر کادمیوم کلراید دارند. حساسیت بالای ناپلی آرتمیا در برابر آلاینده‌ها در مقایسه با بالغین در مطالعات مختلفی گزارش شد که با تحقیق حاضر هم‌خوانی دارند. در مطالعه Rahimi و Nejatkhah Manavi (۲۰۱۱) بررسی تعیین LC<sub>50</sub> کادمیوم بر آرتمیای دریاچه ارومیه، در مطالعه Bakhtiyari و همکاران (۲۰۲۳) بررسی اثر سمیت مزمن حشره‌کش سایپرمتترین و در مطالعات Mohiseni و همکاران (۲۰۰۸) و Ghamarshenas و همکاران (۲۰۲۳) بررسی اثر حشره‌کش دیازینون بر آرتمیای دریاچه ارومیه نیز نشان داد که ناپلی‌ها حساسیت بالایی به نسبت بالغین داشتند. پیش‌تر رفتار و میزان حساسیت زئوپلانکتون‌های



مس و جیوه، کاهش آنزیم آلکالین پروتئاز ماهی مرکب (*Sepia officinalis*) در رویارویی با نقره و اثر نیکل بر کاهش فعالیت آلفا آمیلاز صدف سبز (*Perna viridis*) گزارش شدند (Sabapathy and Teo, 1992; Zambare and Mahajan, 2001; Le Bihan et al., 2004). سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی کل بدن آرتمیای دریاچه ارومیه در مطالعات Bakhtiyari و همکاران (۲۰۲۳) در مواجهه با حشره‌کش سایپرمتترین و Ghamarshenas و همکاران (۲۰۲۳) در مواجهه با حشره‌کش دیازینون نیز مشابه نتایج مطالعه حاضر بود. با افزایش ایجاد تنش آلاینده‌ها در محیط پرورش آبزیان، میزان اشتهای آبزیان دچار تغییر می‌شود و سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی تغییر می‌یابد. همچنین حضور این ترکیبات سمی باعث تغییرات کمی و کیفی مواد غذایی در دسترس شده و موجب تغییر الگوی فعالیت‌های آنزیمی می‌شوند (Suzer et al., 2006). تفاوت در گونه آبی و نوع آلاینده، دز و نحوه استفاده، مدت زمان تأثیر سموم و رفتار آنزیم‌ها در برابر سموم مختلف از دلایل چنین تفاوت‌هایی است (Ramesh et al., 2017).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد، شاخص‌های تولید مثلی آرتمیای دریاچه ارومیه تحت تأثیر کادمیوم کلراید قرار گرفتند به طوری که دفعات تولید مثلی در تمامی غلظت‌ها و تعداد کل زاده‌ها در غلظت ۱۰ درصد دوز مزمن کادمیوم به طور معنی‌داری کاهش یافتند. درصد سیست‌زایی نیز با افزایش غلظت کادمیوم کلراید کاهش یافت. البته این روند کاهش معنی‌دار نبود. رویارویی آبزیان در معرض آلاینده‌ها می‌تواند عملکرد تولید مثلی آبزیان را تحت تأثیر قرار دهد (Manfra et al., 2012). نتایج مطالعات بررسی نانوذرات نقره بر عروس دریایی (*Paracenerotus lividus*) و نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر *Daphnia magna* نیز نشان‌دهنده تأثیر آلاینده‌ها بر عملکرد تولید مثلی آبزیان بود (Falugi et al., 2012; Seitz et al., 2013). طی پژوهش‌های متعدد، اثرات آلاینده‌ها بر تولید مثل آرتمیاها بررسی گردید و نتایج نشان داد که شاخص‌های تولید مثلی در مواجهه با آلاینده‌ها کاهش یافتند. در مطالعه Brix و همکاران (۲۰۰۳) اثر آرسنیک بر *A. franciscana* در مطالعه Sabria و همکاران (۲۰۰۳) اثر عنصر روی بر

(Rudnicki et al., 2009; Aggarwal et al., 2013) البته نتایج مطالعه حاضر نشان داد، در روزهای ۸ و ۱۱ پرورش، مواجهه با کادمیوم کلراید منجر به افزایش رشد شد. بر اثر افزایش تلفات به دلیل حضور آلاینده در محیط و به دنبال آن کاهش تراکم و بهبود شرایط پرورشی در کوتاه‌مدت، افزایش رشد رخ می‌دهد. پیش‌تر این رفتار در دافنی‌های پرورش یافته در معرض روی و مس نیز گزارش شد (Muyssen and Jenssen, 2007).

بررسی تأثیر غلظت کادمیوم کلراید در روزهای مختلف پرورش نشان داد که مواجهه آرتمیا با غلظت‌های مختلف این فلز سنگین در تمامی روزهای پرورشی باعث کاهش زنده‌مانی شد. نتایج مشابهی از تأثیر آلاینده‌های مختلف بر آرتمیا به دست آمده است که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارند. در مطالعه Alishahi و Dezfuli (۲۰۱۹) بررسی نتایج شاخص زنده‌مانی *Artemia salina* نشان داد که افزایش غلظت و مدت زمان مواجهه با آفت‌کش‌های مختلف منجر به افزایش تلفات و کاهش درصد زنده‌مانی شد. نتایج مطالعات Mohammadi و همکاران (۲۰۱۶) بر بررسی تأثیر نانوذرات نقره، تأثیر سایپرمتترین در مطالعه Bakhtiyari و همکاران (۲۰۲۳) و تأثیر دیازینون در مطالعه Ghamarshenas و همکاران (۲۰۲۳) بر آرتمیای دریاچه ارومیه نیز نشان‌دهنده کاهش درصد زنده‌مانی بود. حضور آلاینده‌ها در محیط پرورشی آبزیان با آسیب رساندن بر اندام‌های حیاتی و ایجاد اختلال در وظایف آنها منجر به تلفات می‌شوند (Aggarwal et al., 2013).

در مطالعه حاضر تغییری در سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی مشاهده نشد، اما آنزیم‌های آلکالین پروتئاز و آلفا آمیلاز در مواجهه با کادمیوم کلراید به صورت غیرمعنی‌دار افزایش یافت. لیپاز نیز در مواجهه با کادمیوم کلراید کاهش غیرمعنی‌داری داشت. نتایج مطالعات متعددی نشان‌دهنده تأثیر آلاینده‌ها بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی آبزیان بود. فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز دو گونه از شکم‌پایان *Sulculus diversicolor* و *Haliotis sieboldii* در رویارویی با محیط پرورشی آلوده به مس، کادمیوم و روی کاهش یافت (Hsieh et al., 2008). کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی صدف آب شیرین (*Corbicula striatella*) در مواجهه با

- nauplii of *Artemia franciscana* as an ecotoxicity bioindicator. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 18(4): 716-726. DOI:10.22092/ijfs.2019.118284
- Asadpour, Y.A., Nejatkhah Manavi, P. and Baniamam, M., 2012.** Evaluating the Bioaccumulation of Nickel and Vanadium and their effects on the growth of *Artemia urmiana* and *A. franciscana*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1):183-192. DOI:20.1001.1.15622916.2013.12.1.15.8
- Ates, M., Daniels, J., Arsalan, Z. and Farah, I.O., 2013a.** Comparative evaluation of impact of Zn and ZnO on brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: effects of particle size and solubility on toxicity. *The Royal Society of Chemistry*, 15:225-233. DOI:10.1039/c2em30540b
- Ates, M., Daniels, J., Arsalan, Z., Farah, I.O. and Rivera, H.F., 2013b.** Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina* assessment of nanoparticle aggregation, accumulation and toxicity. *Environmental Monitoring and Assessment*, 85:3339-3348. DOI:10.1007/s10661-012-2794-7
- Bakhtiyari, R., Sarvi Moghanlou, K., Atashbar Kangarloei, B., Imani, A., Pourahad Anzabi, M., 2023.** Changes in growth, survival, and some physiological indices of Urmia Lake *Artemia (Artemia urmiana)* under chronic toxicity of Cypermethrin insecticide. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 32(1):95-108. DOI:10.22092/ISFJ.2023.129148 (In Persian).
- آرتمیای تک جنس (*Artemia parthenogenetica*) و در مطالعه Mohammadi و همکاران (۲۰۱۶) اثر نانوذرات نقره بر آرتمیای دریاچه ارومیه، نشان دهنده اختلال در روند تولید مثلی آرتمیایها بود. شاخص تعداد زاده‌های روزانه در مطالعه حاضر در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد دوز مزمن کادمیوم افزایش معنی‌داری را نشان داد. پیش‌تر نیز تعدادی مطالعات از افزایش برخی شاخص‌های تولید مثلی آرتمیایها در مواجهه با تنش نتایجی ارائه کردند (Dana and Lenz, 1986; Triantaphyllidis et al., 1995). به طور کلی، اختلال در عملکرد تولید مثلی آرتمیا (کاهش یا افزایش شاخص‌ها) در رویارویی با آلاینده‌ها به شرایط نامناسب زیستی و بلوغ زودرس ارتباط داده شد (Mohammadi et al., 2016). با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان بیان کرد که کادمیوم کلراید در غلظت‌های مختلف منجر به کاهش درصد زنده‌مانی، رشد و باعث اختلال در اعمال حیاتی و فیزیولوژیک آرتمیای دریاچه ارومیه (*A. urmiana*) به‌ویژه شاخص‌های تولیدمثلی شد. بنابراین، بایستی در ارتباط با چگونگی مدیریت در دفع پساب‌های آلوده توجه و جدیت بیشتری صورت پذیرد.

## منابع

- Aggarwal, V., Deng, X., Tuli, A. and Goh, K.S., 2013.** Diazinon- chemistry and environmental fate: A California perspective. In: Whitacre, D.M. (eds) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, pp. 107-140. DOI:10.1007/978-1-4614-5577-6\_5
- Agh, N., Van Stappen, G., Razavi Rouhani, S.M. and Sorgeloos, P., 2008.** Life cycle characteristics of *Artemia* populations from Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 11(6):854-61. DOI:10.3923/pjbs.2008.854.861
- Alishahi, M. and Dezfuly, T.Z., 2019.** Comparative toxicities of five herbicides on

- Barahona, M.V. and Sanchez-Fortun, S., 1999.** Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*, 104(3):469-476. DOI:10.1016/S0269-7491(98)00152-3
- Bernfeld, P., 1955.** Amylase. In: Colowick, S.P. and Kaplan, N.O. (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, pp. 149-158. DOI:10.1016/0076-6879(55)01021-5
- Brix, K.V., Cardewell, R.D. and Adans, J.V., 2003.** Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54:169-175. DOI:10.1016/S0147-6513(02)00054-4
- Brown, B. and Ahsanullah, M., 1971.** Effect of heavy metals on mortality and growth. *Marine Pollution Bulletin*, 2(12):182-187. DOI:10.1016/0025-326X(71)90087-7
- Chiarelli, R.; Martino, C. and Rocheri, M.C., 2019.** Cadmium stress effects indicating marine pollution in different species of sea urchin employed as environmental bioindicators. *Cell Stress Chaperones*, 24(4):675-687. DOI:10.1007/s12192-019-01010-1
- Cong, N.V., Phuong, N.T. and Bayley, M., 2009.** Effects of repeated exposure of diazinon on cholinesterase activity and growth in snakehead fish (*Channa striata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(3):699-703. DOI:10.1016/j.ecoenv.2008.10.007
- Coutteu, P., 1996.** Micro- algae. In: Lavens, P. and Sorgeloos, P. (eds) *Manual on the production and use of the live food for aquaculture*. FAO, Rome, pp. 9-60.
- Dana, G.L. and Lenz, P.H., 1986.** Effects of increasing salinity on an *Artemia* population from Mono Lake, California. *Oecologia*, 68:428-436. DOI:10.1007/BF01036751
- Falugi, C., Aluigi, M.G., Ferrando, S., Gambardella, C., Gatti, A.M. and Ramino, P., 2012.** Dose dependent effects of silver nanoparticles on reproduction of different biological models. *Environmental Quality*, 8:61-65. DOI:10.6092/issn.2281-4485/3828
- Gajbhiye, S.N. and Hirota, R., 1990.** Toxicity of heavy metals to brine shrimp *Artemia*. *Journal of the Indian Fisheries Association*, 20:43-50
- Gambardella, C., Mesaric, T., Milivojevic, T., Sepcic, K., Gallus, L., Cabone, S., Ferrando, S. and Fammali, M., 2014.** Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae evaluation of mortality and behavioral and biochemical responses. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(7):4249-4259. DOI:10.1007/s10661-014-3695-8
- Garcia-Carreno, F.L., Haard, N.F., 1993.** Characterization of proteinase classes in Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and Crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *Journal of Food Biochemistry*, 17(2):97-113.

- Gebhardt, K.A., 1976.** Effects of heavy metals (Cadmium, Copper, and Mercury) on reproduction, growth, and survival of brine shrimp (*Artemia salina*) from the Great Salt Lake. Utah State University, USA. 115 P. DOI:10.26076/52e0-6cfe
- Ghamarshenas, S., Atashbar Kangarloei, B., Sarvi Moghanlou, K., Imani, A., Pourahad Anzabi, M., 2023.** Effect of chronic toxicity of diazinon insecticide on growth, survival and physiological activities of Urmia Lake Artemia (*Artemia urmiana*). *Journal of Fisheries*, 76(2):237-249. DOI:10.22059/JFISHERIES.2023.351498.1353 (In persian).
- Hadjispyrou, S., Kungolos, A., Anagnostopoulos, A., 2001.** Toxicity, bioaccumulation, and interactive effects of organotin, cadmium, and chromium on *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49(2):179-186. DOI:10.1006/eesa.2001.2059
- Hsieh, M.S., Yin, L.J. and Jiang, S.T., 2008.** Purification and characterization of the amylase from a small abalone *Haliotis sieboldii*. *Fisheries Science*, 74(2):425-432. DOI:10.1111/j.1444-2906.2008.01540.x
- Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y., 1998.** Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream *Pagrus major*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 18:59-69. DOI:10.1023/A:1007725513389
- Jakimska, A., Konieczka, P., Skora, K. and Namieśnik, J., 2011.** Bioaccumulation of Metals in Tissues of Marine Animals, Part I: The Role and Impact of Heavy Metals on Organisms. *Polish Journal of Environmental Studies*, 20(5):1117-1125
- Kardavani, P., 2005.** Geohydrology. *Tehran University*, 3, 1-367. (In Persian)
- Kasumyan, A.O., 2000.** Effects of chemical pollutants on foraging behavior and sensitivity of fish to food stimuli. *Journal of Ichthyology*, 41(1):76-87
- Lan, C.H. and Lin, T.S., 2005.** Acute toxicity of trivalent thallium compounds to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61(3):432-435. DOI:10.1016/j.ecoenv.2004.12.021
- Le Bihan, E., Perrin, A. and Koueta, N., 2004.** Development of a bioassay from isolated digestive gland cells of the Cuttlefish *Sepia officinalis* L. (Mollusca, Cephalopoda): Effect of Cu, Zn and Ag on enzyme activities and cell viability. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 309(1): 47-66. DOI:10.1016/j.jembe.2004.03.007
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A.M. and Manfra, L., 2016.** A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological indicators*, 69: 35-49. DOI:10.1016/j.ecolind.2016.04.017
- Manfra, L., Savorelli, F., Pisapia, M., Magaletti, E. and Cicero, A.M., 2012.** Long-term Lethal Toxicity Test with the Crustacean *Artemia franciscana*. *Journal of Visualize Experiments*, 62:3790- 3795. DOI:10.3791/3790
- Mohammadi, S., Sarvi Moghanlou, K., Atashbar, B., Imani, A., 2016.** Studying the chronic effects of silver nanoparticles on the

- growth, survival and reproductive characteristics of Urmia Lake Artemia (*Artemia urmiana*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 25(4):63-75. DOI:10.22092/ISFJ.2017.110299 (in Persian).
- Mohiseni, M., Farhanghi, M., Mahiseni, A.A., Mirvaghefi, A., Shokouh, S.Z., 2008.** The effect of age on the sensitivity of *Artemia urmiana* nauplius to different concentrations of diazinon insecticide. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 16(3):77-85. (In Persian)
- Mohiseni, M., Asayesh, S., Shafiee Bazarroie, S., Mohseni, F., Moradi, N., Matouri, M. and Mirzaee, N., 2016.** Biochemical alteration induced by cadmium and lead in common carp via an experimental food chain. *Iranian Journal of Toxicology*, 10(4):25-32. DOI:10.32598/IJT.10.4.345.1
- Muysen, B.T.A., Janssen, C.R., 2007.** Age and exposure duration as a factor influencing Cu and Zn toxicity toward *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68, 436-442. DOI:10.1016/j.ecoenv.2006.12.003
- Novakova, J., Danova, D., Striskova, K., Hromada, R., Mickova, H. and Rabiskova, M., 2007.** Zinc and cadmium toxicity using a biotest with *Artemia franciscana*. *Acta Veterinaria Brno*, 76(4): 635-642. DOI:10.2754/avb200776040635
- Pierre, S., Tarnowska, K., Hachfi, L., Coupe, S., Simide, R., Couvray, S., Garnier, C., Grimaldi, M., Richard, S., Gaillard, S. and Grillasca, J.P., 2011.** Effects of water temperature increase and heavy metals contamination on WAP65 gene expression in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Cellular and Molecular Biology*, 57(2):1614-1622. DOI:10.1170/205
- Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wan, C., Wang, Z. and Wang, L., 2014.** Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquatic Toxicology*, 150(2):9-16. DOI:10.1016/j.aquatox.2014.02.008
- Rahimi, B. and Nejatkhah Manavi, P., 2011.** LC<sub>50</sub> and bioaccumulation of Cd in different life stages of *Artemia urmiana*. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 20(1):53-64. DOI:10.22092/ISFJ.2017.109975 (in persian).
- Ramesh, R., Dube, K., Reddy, A.K., Rangacharyulu, P.V., Venkateshwarlu, G. and Jayasankar, P., 2017.** Effect of varying protein levels on growth and digestive enzyme activities of *pengba Osteobrama belangeri* (Valenciennes, 1844). *Indian Journal of Fisheries*, 64:206–213
- Rudnicki, C.A.M., Melo, G.C., Donatti, L., Kawall, H.G. and Fanta, E., 2009.** Gills of juvenile fish *piaractus mesopotamicus* as histological biomarkers for experimental sublethal contamination with the Organophosphorus Azodrin® 400. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(6):1431-1441. DOI:10.1590/S1516-89132009000600015
- Rungrangsak-Torrissen, K., 2007.** Digestive

- efficiency, growth and qualities of muscle and oocyte in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) fed with krill meal as an alternative protein source. *Journal of Food Biochemistry*, 31: 509–540.  
DOI:10.1111/J.1745-4514.2007.00127.X
- Sabapathy, U. and Teo, L.H., 1992.** A kinetic study of the  $\alpha$ -amylase from the digestive gland of *Perna viridis L.* *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101:73-7.  
DOI:10.1016/0305-0491(92)90160-S
- Sabria, R., Delramo, J., Diaz-Mayans, J. and Toreblanca, A., 2003.** Developmental and reproductive effects of low Cadmium concentration on *Artemia parthenogenetica*. *Journal of Environmental science and health*, 38(6):1065-1071.  
DOI:10.1081/ESE120019864
- Sarabia, R., Varo, I., Amat, F., Pastor, A., Del Ramo, J., Diaz-Mayans, J. and Torreblanca, A., 2006.** Comparative toxicokinetics of cadmium in *Artemia*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(1):111-120. DOI:10.1007/s00244-005-7026-5
- Seitz, F., Bundschuh, M., Rosenfeldt, R.R. and Schulz, R., 2013.** Nanoparticle toxicity in *Daphnia magna* reproduction studies: the importance of test design. *Aquatic Toxicology*, 126:163-168.  
DOI:10.1016/j.aquatox.2012.10.015
- Somasundaram, S., Abraham, J.S., Maurya, S., Toteja, R., Gupta, R. and Makhija, S., 2019.** Expression and molecular characterization of stress-responsive genes (*hsp70* and *Mn-sod*) and evaluation of antioxidant enzymes (CAT and GPx) in heavy metal exposed freshwater ciliate, *Tetmemena sp.*, *Molecular Biology Reports*, 46, 4921-4931.  
DOI:10.1007/s11033-019-04942-0
- Suzer, C., Saka, S. and Firat, K., 2006.** Effects of illumination on early life development and digestive enzyme activities in common pandora *Pagellus erythrinus L.* larvae. *Aquaculture*, 260(1):86-93.  
DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.06.025
- Triantaphyllidis, G.V., Pouloupoulou, K., Abatzopoulos, T.J., Pérez, C.A.P. and Sorgeloos, P., 1995.** International study on *Artemia* XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. *Hydrobiologia*, 302(3):215-227.  
DOI:10.1007/BF00032111
- Woo, S., Yum, S., Park, H.S., Lee, T.K. and Ryu, J.C., 2009.** Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149(3):289-299.  
DOI:10.1016/j.cbpc.2008.08.002
- Zambare, S.P. and Mahajan, A.Y., 2001.** Heavy metal (copper and mercury) induced alterations in the enzyme secretory activity of hepatopancreas of a freshwater bivalve *Corbicula striatella*. *Pollution Research*, 20(1):143-146

## Effects of chronic toxicity of the heavy metal Cadmium on the growth, survival, digestive enzymes, and some reproductive indices of *Artemia urmiana*

Mohammadi S.<sup>1</sup>; Sarvi Moghanlou K.<sup>1\*</sup>; Manaffar R.<sup>1</sup>; Atashbar Kangarloe B.<sup>2</sup>; Libralato G.<sup>3</sup>

\*k.sarvimoghanlou@urmia.ac.ir

1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Urmia, Urmia, Iran

2- Department of Ecology and Resources Management, Artemia and Aquatic animals Institute, University of Urmia, Urmia, Iran

3- Department of Biology, University of Naples Federico II, Naples, Italy

### Abstract

Environmental pollution by heavy metals is considered a serious threat to aquatic ecosystems, and their increase can affect the life cycle and biological reserves of many zooplankton species such as *Artemia*. Therefore, in the present study, the effects of heavy metal cadmium on the growth, survival, digestive enzymes activity, and some reproductive characteristics of *Artemia urmiana* were evaluated. For this purpose, the LC<sub>50</sub> of cadmium chloride was determined for 24 and 72 hours in the nauplii and adult stages using probit statistical analysis. The average LC<sub>50</sub> of 72 hours was used to investigate the chronic toxicity and nauplii was cultured in 3 treatments including the control group, 10% LC<sub>50</sub> and 20% LC<sub>50</sub> for 21 days. The results showed that different concentrations of cadmium chloride decreased the growth of *A. urmiana* on 17 and 21 days ( $p < 0.05$ ). Also, a decrease in survival rate was observed on all rearing days and the highest decrease (28.9%) was observed in the 20% LC<sub>50</sub> group ( $p < 0.05$ ). The activity of digestive enzymes was not affected by cadmium chloride ( $p > 0.05$ ), however, the activity of alkaline protease and alpha-amylase increased and the activity of lipase decreased with an increase in cadmium chloride concentration. Also, reproductive indices including, the percentage of cyst formation and the number of offspring per reproduction were not affected by the concentration of cadmium chloride ( $p > 0.05$ ). However, the frequency of reproduction and the total number of births decreased and the number of daily births increased ( $p < 0.05$ ). In conclusion, cadmium chloride led to a decrease in growth and survival and changes in the digestive enzyme activity and reproductive indices of *A. urmiana*. Therefore, more attention should be paid in relation to how to manage the disposal of polluted wastes.

**Keywords:** Cadmium chloride, Growth, Survival, Digestive enzymes, *Artemia urmiana*

---

\*Corresponding author