

ارزیابی سمیت حاد مس و نیکل بر بقای دافنی ماگنا (*Daphnia magna*)

چکیده

مس و نیکل از جمله عناصر کمیاب ضروری برای گیاهان و جانوران هستند که به دلیل کاربردهای فراوان در صنایع و کشاورزی از طرق مختلف وارد اکوسیستم‌های آبی می‌گردند. مقادیر حاد این فلزات سبب مرگ‌ومیر آبزیان و حتی از بین رفتن جامعه پلانکتونی اکوسیستم‌های آبی می‌گردد. این امر به نوبه خود تهدیدی جدی برای سایر موجودات زنده از طریق حذف سطوح اولیه تغذیه‌ای محسوب می‌شود. در مطالعه حاضر به بررسی سمیت یون مس ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) و یون نیکل ($\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) بر نئون‌های دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) به عنوان یک مدل در سم‌شناسی اکولوژیکی در سال ۱۳۹۵ پرداخته شد. در این آزمایش، ۶۰ قطعه نئون در معرض ۶ غلظت مختلف از مس (صفر یا شاهد، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۹، ۱/۳۵ و ۲/۲۵ میکروگرم بر لیتر) و ۶ غلظت مختلف از نیکل (صفر یا شاهد، ۱۸، ۳۲/۴۰، ۵۸/۳۲، ۱۰۴/۹۸، ۱۸۸/۹۶ میکروگرم بر لیتر) به صورت جداگانه طی ۴۸ ساعت قرار گرفتند. براساس پروتکل OECD ۲۰۲، عدم تحرک (Immobilization) در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت مورد-بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، میزان EC_{50} ۲۴ و ۴۸ ساعته مس برای نئون‌های دافنی به ترتیب برابر با ۰/۹۳۱ و ۰/۶۶۷ میکروگرم بر لیتر و EC_{50} ۲۴ و ۴۸ ساعته نیکل به ترتیب برابر با ۱۶۳/۲۴ و ۵۰/۰۶ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. در مجموع، نتایج به دست آمده نشان دهنده سمیت بیشتر مس در مقایسه با نیکل برای نئون‌های دافنی است؛ بنابراین با توجه به کاربرد وسیع تر مس -حتی به- عنوان یک ماده آنتی سبتیک -در مزارع پرورش آبزیان می‌بایست توجه بیشتری نسبت به غلظت مصرفی آن اعمال داشت تا سبب از بین رفتن جامعه زئوپلانکتونی استخرهای پرورشی و اکوسیستم‌های آبی نگردد.

واژگان کلیدی: مس، نیکل، نئون، دافنی ماگنا، EC_{50} .

نگین خروشی^۱

پدرام ملک پوری^{۲*}

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، اصفهان، ایران
۲. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

*مسئول مکاتبات:

p.malekpouri@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۷۰۲۰۶۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۴

این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

مقدمه

با رشد جوامع بشری و افزایش فعالیت‌های انسانی، ورود آلاینده‌ها به منابع آبی به طرز چشمگیری افزایش یافته است (Singh and Agrawal, 2007). به همین جهت بررسی آلاینده‌های موجود در منابع آبی و تاثیر آن بر حیات آبزیان ساکن در آن اکوسیستم‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (Rainbow, 2002). فلزات سنگین از جمله مهم‌ترین آلاینده‌های محیطی هستند که آلودگی اکوسیستم‌ها در اثر این فلزات سبب بروز خطرات جدی برای حیات آبزیان و حتی انسان گردیده است (Malekpouri et al., 2016). فلزات سنگین عمدتاً شامل سرب، جیوه، کادمیم، کروم، مس، نیکل و غیره است که در بسیاری از موارد، سمی محسوب می‌شوند و اثرات نامطلوبی از خود بر جای می‌گذارند (Govind and Madhuri, 2014). مطالعات نشان می‌دهد که بسیاری از رودخانه‌ها و رسوبات سطحی به فلزاتی چون نیکل، مس، روی، نقره و سایر موارد مشابه آلوده هستند (Ezeonyejiaku et al., 2011).

نیکل از جمله فلزات سنگینی است که در صنایع مختلف کاربرد وسیعی دارد و این امر سبب شده است تا ترکیبات این فلز، به عنوان آلاینده-های پایدار محیطی محسوب شوند (Pane et al., 2003). فعالیت‌های انسانی مانند معدن کاری، ذوب مواد گوناگون و سوزاندن زباله‌ها منجر

به افزایش نیکل در اکوسیستم‌های آبی شده است (Du et al., 2016). مس نیز به‌عنوان یک عنصر ضروری به‌صورت طبیعی در محیط وجود دارد. علاوه بر این، فاضلاب‌های شهری، پساب صنایع و معادن، رواناب‌های کشاورزی (Miner et al., 2012) و حتی مصرف ترکیبات مختلف این عنصر به‌عنوان ماده آنتی‌سپتیک سبب افزایش بی‌رویه این عنصر در اکوسیستم‌های آبی و بالطبع جانداران ساکن در این اکوسیستم‌ها شده است (Guo et al., 2012).

مس در محیط‌های آبی نسبت به سایر فلزات سمی‌تر است و در موارد بسیاری سبب بروز ناهنجاری‌های رفتاری (پاسخ حرکتی) در ماهیان و حتی بی‌مهرگان ساکن در آب‌های شیرین شده است (Ezeonyejiaku et al., 2011). قرار گرفتن در معرض غلظت‌های تحت‌کشنده مس سبب تغییر در فعالیت‌های طبیعی موجود زنده و در پاره‌ای از موارد سبب تغییر رنگ بدن و تغییر در الگوی مصرف اکسیژن مورد نیاز آبزیان می‌شود (Kumar et al., 2015). علاوه بر این، در مطالعه‌ای که روی جنس *Ceriodaphnia* sp. برای سنجش سمیت مس، روی و کادمیم صورت گرفت؛ مشخص شد که غلظت بالای این فلزات می‌تواند بر جمعیت گونه‌ی ذکرشده تأثیر نامطلوب بر جای گذارد (Mano et al., 2011).

دافنی ماگنا (*Daphnia magna*) از جمله شاخص‌های زیستی به‌منظور ارزیابی میزان سمیت فلزات در محیط‌های آبی محسوب می‌شود چراکه برخی ویژگی‌های این گونه مانند رشد سریع و نرخ باروری بالا، استفاده از این گونه را به‌عنوان یک شاخص مناسب جهت سنجیدن تغییرات محیط‌های آبی در پی داشته است (Baird et al., 1989). در مطالعات سم‌شناسی، دافنی ماگنا در پاسخ به سموم آلی، معدنی و آلاینده‌های ترکیبی مانند عوامل مخرب اندوکرینی و داروها، تغییرات نامطلوب در فرآیند رشد و تولید مثل، عدم تحرک و حتی مرگ و میر را به وضوح نشان می‌دهد (Siciliano et al., 2015). این گونه در اکثر زیستگاه‌های آب شیرین وجود دارد و به‌عنوان یک منبع غذایی مهم برای سطوح بالاتر تغذیه‌ای نیز مطرح است (Das et al., 2013). دافنی ماگنا به‌عنوان یک زئوپلانکتون از جلبک‌ها تغذیه می‌کند و با توجه به این‌که توسط سطوح بالاتر زنجیره غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد نقش مهمی در انتقال ماده، انرژی و حتی آلاینده‌ها از طریق شبکه‌ی غذایی دارد (Piscia et al., 2015). به همین جهت هر گونه تغییر در جمعیت آن می‌تواند مبین تغییرات ایجاد شده در وضعیت آب و به دنبال آن تغییر در سطوح بالای زنجیره‌ی غذایی و سایر مصرف‌کنندگان باشد (Das et al., 2013). مطالعات پیشین نشان دهنده تأثیر نامطلوب مس و نیکل بر بقا زئوپلانکتون‌ها از جمله دافنی ماگنا است. در این خصوص، Dave در سال ۱۹۸۴، تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر بقا، رشد و تولید مثل دافنی ماگنا را مورد مطالعه قرار داد. Arambašić و همکاران (۱۹۹۵) تأثیر تعدادی از فلزات از جمله مس بر بقا دافنی ماگنا را سنجیدند. در مطالعه دیگری، میزان بقا و رشد دافنی ماگنا در پاسخ به مس و نیکل به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت (Biesinger and Christensen, 1972). مطالعات مشابهی نیز در خصوص تأثیر مس و نیکل بر بقا و رشد سایر گونه‌های دافنی نیز صورت پذیرفته است (Martins et al., 2017; Kim, et al., 2017). از این‌رو مشاهده پاسخ‌های حرکتی و میزان بقا در جمعیت دافنی ماگنا از منظر اکولوژیکی حائز اهمیت است (Prosnier et al., 2015) چراکه متعاقب تغییر در هر یک از فرآیندهای زیست محیطی، جمعیت دافنی‌ها دچار سازگاری‌های مختلفی از جمله تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و رفتاری می‌شوند (Miner et al., 2012). بنابراین بررسی سمیت فلزات سنگین نقش مهمی در ارزیابی اثرات بالقوه آلاینده‌های زیست محیطی در محیط‌های مختلف و تأثیر آن بر آبزیان و زنجیره‌های غذایی موجود در آن اکوسیستم خواهد داشت (Vandenbrouck et al., 2009). حضور فلزاتی نظیر مس و نیکل در اکثر اکوسیستم‌های آبی کاملاً مشخص شده است چراکه این فلزات از طریق صنایع مختلف و کشاورزی به‌وفور وارد اکوسیستم‌های آبی می‌شوند و بالطبع سبب ایجاد تغییرات مهمی بر آبزیان ساکن در این اکوسیستم‌ها می‌شوند، لذا بررسی تأثیر این فلزات بر اکوسیستم‌های آبی ضروری به‌نظر می‌رسد؛ بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی سمیت یون مس و نیکل بر نئونات‌های دافنی ماگنا (*D. magna*) به‌عنوان یک مدل در سم‌شناسی اکولوژیکی است.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از نمک مس به صورت $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ محصول کارخانه Panreac اسپانیا و از نمک نیکل به صورت $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ محصول شرکت ACROS ایالات متحده استفاده گردید.

این تحقیق در سال ۱۳۹۵ با استفاده از نتون‌های دافنی ماگنا (*D. Magna*) با سن کمتر از ۲۴ ساعت انجام پذیرفت. چراکه براساس پروتکل پیشنهادی OECD، می‌بایست از نتون‌هایی با سن مشابه استفاده نمود تا از تاثیر سن بر پاسخ مشاهده شده، اجتناب شود. به این منظور، مولدین دافنی در ظروف جداگانه نگهداری و با جلبک *Scenedesmus* sp. به تعداد 5×10^5 سلول به ازای هر دافنی روزانه تغذیه شدند. از نتون‌هایی که در اولین زادآوری حاصل شده‌اند جهت بررسی سمیت مس و نیکل استفاده نگردید. پس از بررسی نتون‌ها در زیر لوپ و اطمینان از عدم وجود ظاهر رنگ پریده، ناقص و یا هرگونه رفتار غیر طبیعی در آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور بررسی سمیت حاد مس و نیکل بر دافنی ماگنا و تعیین غلظت میانه موثر (EC_{50}) مطابق با پروتکل OECD 202، از تست عدم تحرک (Immobilization) استفاده گردید. به این منظور، ۶۰ قطعه نتون‌ها در معرض ۶ غلظت مختلف از یون مس، شامل غلظت صفر یا شاهد، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۹، ۱/۳۵ و ۲/۲۵ میکروگرم بر لیتر و همچنین یون نیکل شامل غلظت‌های صفر یا شاهد، ۱۸، ۳۲/۴۰، ۵۸/۳۲، ۱۰۴/۹۸، ۱۸۸/۹۶ میکروگرم بر لیتر به صورت جداگانه قرار گرفتند. این غلظت‌ها براساس پیش آزمایش‌هایی صورت پذیرفت که طی آن، گونه مذکور در این غلظت‌ها فاقد و یا دارای تلفات بود (روش up and down). غلظت‌های در نظر گرفته شده برای مس به مراتب کمتر از استاندارد تعیین شده توسط دولت استرالیا و ایالات متحده بود و برای نیکل از غلظت موثره تعیین شده توسط دولت استرالیا بیشتر و در مقایسه با غلظت مجاز ایالات متحده کمتر بود (جدول ۱). در هر ظرف ۵ نتون‌ها با سن کمتر از ۲۴ ساعت قرار داده شد. حجم آب هریک از ظروف ۲۰۰ میلی لیتر در نظر گرفته شد و براساس روش semi-static، روزانه کل آب هر تیمار تعویض و به آب کلرزدايي شده مقادیر مورد نظر فلز مس یا نیکل اضافه گردید. عدم تحرک نتون‌ها در بازه‌های زمانی ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعته مورد بررسی قرار گرفتند. جهت افزایش دقت در تشخیص تحرک و یا عدم تحرک نتون‌ها در هر کدام از تیمارها، هریک از نتون‌ها به صورت انفرادی در مدت زمان ۱۵ ثانیه با نور کافی مورد بررسی قرار گرفتند و عدم تحرک در هر غلظت برای هر نتون‌ها به صورت جداگانه ثبت شد. عدم تحرک تنها زمانی تایید شد که علیرغم ایجاد تلاطم آهسته در آب، نتون‌ها همچنان بدون تحرک باقی ماندند (حرکت آنتن اهمیتی ندارد). نتون‌های مرده نیز در زمان‌های مشابه بررسی و ثبت گردید. پس از مشاهده و بررسی، نتون‌های بدون تحرک و یا مرده از ظرف آزمایش خارج شدند. در پایان آزمایش، داده‌های حاصل از تست سمیت حاد به منظور محاسبه غلظت میانه موثر (EC_{50}) مورد آنالیز قرار گرفتند. مراحل آزمایش در شکل ۱ به تصویر کشیده شده است.

جدول ۱: استاندارد تعیین شده توسط دولت استرالیا و ایالات متحده برای فلزات مس و نیکل در محیط آبی.

فلز	غلظت موثره ۹۵٪ (میکروگرم بر لیتر) ^۱	حداکثر غلظت مجاز (میکروگرم بر لیتر) ^۲
مس	سختی ۳۰ میلی گرم بر لیتر	سختی ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر
نیکل	سختی ۲۷۸-۲۵۵ میلی گرم بر لیتر	سختی ۱۳/۰

۱. ANZECC, 2000

۲. USEPA, 2004

هریک از تیمارها به صورت محدود به منظور حفظ سطح اکسیژن، هوادهی گردید. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب در طول دوره آزمایش به صورت مرتب اندازه‌گیری شد (APHA, 2005). دما (۲۰/۴-۲۰/۰ درجه سانتی گراد)، pH (۷/۹۶-۸/۱۱)، هدایت الکتریکی (۲۲۱-۲۲۹)

میکروزیمنس بر سانتی متر)، اکسیژن محلول (۵/۹-۶/۱ میلی گرم بر لیتر)، سختی (۲۵۵-۲۸۷ میلی گرم بر لیتر کربنات کلسیم) و جامدات کل (۳۲۲-۴۰۱ میلی گرم بر لیتر) به دست آمد.

عدم تحرک در فواصل زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت و در نهایت با استفاده از آنالیز رگرسیون پروبیت (SPSS ویرایش ۱۸) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و غلظت موثره یا Effective Concentration (EC_{50}) های مختلف در بازه های زمانی مذکور به دست آمد. علاوه بر این، آنالیز رگرسیون خطی خطوط لگاریتم-پروبیت نیز با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۸ انجام پذیرفت. میانگین به همراه ۹۵ درصد محدوده اطمینان محاسبه و فراوانی تجمعی تلفات نتوانت ها نیز متعاقب سمیت مس و نیکل ترسیم گردید.



ب



الف



د

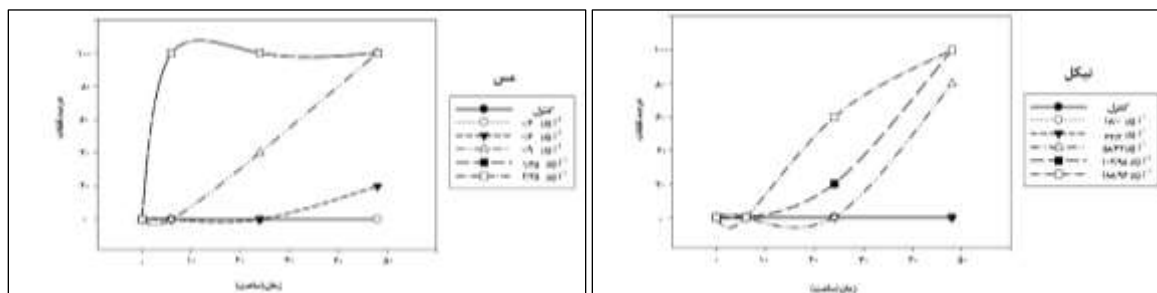


ج

شکل ۱: مراحل آزمایش را نشان می دهد. (الف و ب): برداشتن مس و نیکل از محلول استوک، (ج): تیمارهای آزمایشی و (د): مشاهده عدم تحرک دافنی زیر لوپ.

نتایج

نتایج به دست آمده نشان داد که تلفات نئوناته‌ها طی ۶ ساعت، تنها در تیمارهای ۱/۳۵ و ۲/۲۵ میکروگرم بر لیتر از مس قابل مشاهده بوده است و سایر تیمارهای مس فاقد تلفات بود. طی ۲۴ ساعت نیز ۴۰ درصد از نئوناته‌های تیمار ۰/۹ میکروگرم بر لیتر مس تلف شدند، این در-حالیست که طی ۴۸ ساعت در معرض قرارگیری با مس، میزان تلفات در تیمار مذکور به ۱۰۰ درصد جمعیت رسید و تیمار ۰/۶ میکروگرم بر لیتر نیز شاهد ۲۰ درصد تلفات در زمان مشابه بود. گروه شاهد و تیمار ۰/۴ میکروگرم بر لیتر مس نیز هیچ گونه تلفاتی را تا پایان آزمایش نشان ندادند. در خصوص تیمارهای نیکل، طی ۶ ساعت در معرض قرارگیری هیچ گونه تلفاتی در جمعیت نئوناته‌های دافنی مشاهده نگردید در حالیکه طی ۲۴ ساعت، تیمارهای ۱۰۴/۹۸ و ۱۸۸/۹۶ میکروگرم بر لیتر نیکل به ترتیب سبب مرگ و میر ۲۰ درصد و ۶۰ درصد جمعیت شدند. تیمارهای ۵۸/۳۲، ۱۰۴/۹۸ و ۱۸۸/۹۶ میکروگرم بر لیتر نیکل طی ۴۸ ساعت به ترتیب سبب مرگ و میر ۸۰ درصد، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد جمعیت نئوناته‌ها شدند و در سایر تیمارها هیچ گونه تلفاتی مشاهده نگردید (شکل ۲).



شکل ۲: فراوانی تجمعی تلفات در اثر تیمارهای نیکل و مس طی ۴۸ ساعت.

به منظور مقایسه کامل سمیت ترکیبات سمی بر گونه‌های مختلف، تخمین‌های نقطه‌ای به دست آمده از آنالیز رگرسیون پروبیت از جمله مقادیر EC_1 ، EC_5 ، EC_{10} ، EC_{25} ، EC_{50} ، EC_{75} ، EC_{90} ، EC_{95} و EC_{99} برای یون مس و نیکل به همراه ۹۵ درصد محدوده اطمینان محاسبه و در جدول ۲ ارایه شده است. همانطور که مشخص شده است، EC_1 که در بسیاری از مطالعات آن را با NSDC (Not Statistically Different from the Control concentration) معادل می‌دانند، هیچ تاثیری بر نئوناته‌های دافنی ماگنا نداشته است. از طرفی اعداد به دست آمده در محدوده EC_5 و EC_{10} کمترین تاثیر مس و نیکل را بر گونه دافنی ماگنا نشان می‌دهند و می‌توان از آنها به عنوان غلظت‌های مزمن دارای تاثیر (Chronic Value) یاد کرد. همچنین EC_{50} فلز نیکل برای دافنی ماگنا طی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب برابر با ۱۶۴/۲۴۳ و ۵۰/۰۶۷ میکروگرم بر لیتر بوده است. محدوده اطمینان برای EC_{50} به دست آمده طی ۲۴ ساعت طبق جدول ۲ برابر با ۱۷۲/۴۵۵-۱۵۶/۰۳۱ و برای ۴۸ ساعت برابر با ۵۲/۵۷-۴۷/۵۶۴ میکروگرم بر لیتر به دست آمد. میزان EC_{50} مس طی ۲۴ ساعت به همراه حدود اطمینان ۹۵ درصدی نیز عبارت است از ۰/۹۳۱ (۰/۸۸۵-۰/۹۹۷) میکروگرم بر لیتر و این شاخص طی ۴۸ ساعت در معرض قرار گیری با مس برابر با ۰/۶۶۷ (۰/۶۳۴-۰/۷۰۰) میکروگرم بر لیتر برای فلز مس به دست آمد (جدول ۲).

جدول ۲: میزان EC_{50} مس و نیکل به همراه محدوده اطمینان ۹۵ درصد.

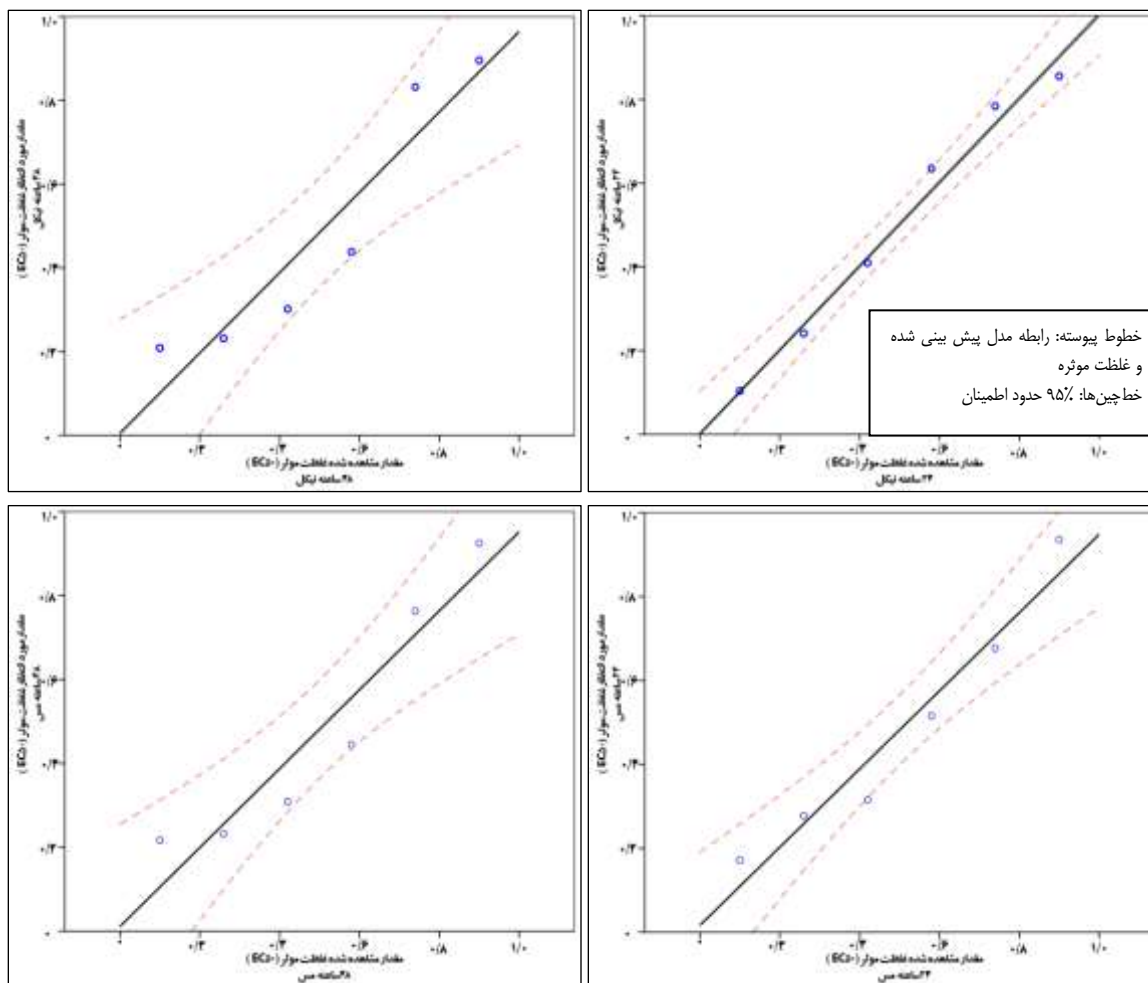
EC_x	نیکل (میکرو گرم بر لیتر)		مس (میکرو گرم بر لیتر)	
	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته	۲۴ ساعته	۴۸ ساعته
۱	۵۶/۶۲۷ (۵۳/۷۶۹-۵۹/۴۵۸)	۳۳/۹۰۲ (۳۲/۲۰۷-۳۵/۵۹۷)	۰/۶۹۹ (۰/۶۶۵-۰/۷۳۳)	۰/۵۰۳ (۰/۴۷۸-۰/۵۲۸)
۵	۷۷/۳۵۷ (۷۳/۴۸۹-۸۱/۲۲۴)	۳۸/۰۰۴ (۳۶/۱۰۴-۳۹/۹۰۴)	۰/۷۶۰ (۰/۷۲۲-۰/۷۹۸)	۰/۵۴۶ (۰/۵۱۹-۰/۵۷۳)
۱۰	۹۱/۳۵۳ (۸۶/۷۸۶-۹۵/۹۲۰)	۴۰/۳۹۰ (۳۸/۳۷۱-۴۲/۴۰۹)	۰/۷۹۵ (۰/۷۵۶-۰/۸۳۴)	۰/۵۷۱ (۰/۵۴۳-۰/۵۹۸)
۲۵	۱۲۰/۶۱۶ (۱۱۴/۵۸۶-۱۲۶/۶۴۶)	۴۴/۷۱۵ (۴۲/۴۸-۴۶/۹۵)	۰/۸۵۷ (۰/۸۱۵-۰/۸۹۹)	۰/۶۱۴ (۰/۵۸۴-۰/۶۴۴)
۵۰	۱۶۴/۲۴۳ (۱۵۶/۰۳۱-۱۷۲/۴۵۵)	۵۰/۰۶۷ (۴۷/۵۶۴-۵۲/۵۷)	۰/۹۳۱ (۰/۸۸۵-۰/۹۷۷)	۰/۶۶۷ (۰/۶۳۴-۰/۷)
۷۵	۲۲۳/۶۵۲ (۲۱۲/۷۴-۲۴۳/۸۳۴)	۵۶/۰۵۹ (۵۳/۲۵۷-۵۸/۸۶۱)	۱/۰۱۲ (۰/۹۶۲-۱/۰۶۲)	۰/۷۲۳ (۰/۶۸۷-۰/۷۵۹)
۹۰	۲۹۵/۲۹۲ (۲۸۰/۵۲۸-۳۱۰/۰۵۶)	۶۲/۰۶۲ (۵۸/۹۵۹-۶۵/۱۶۵)	۱/۰۹۰ (۱/۰۳۶-۱/۱۴۴)	۰/۷۷۹ (۰/۷۴۱-۰/۸۱۷)
۹۵	۳۴۸/۷۱۸ (۳۳۱/۲۸۳-۳۶۶/۱۵۳)	۶۵/۹۵۹ (۶۲/۶۶۲-۶۹/۲۵۶)	۱/۱۴۰ (۱/۰۸۳-۱/۱۹۷)	۰/۸۱۴ (۰/۷۷۴-۰/۸۵۴)
۹۹	۴۷۶/۳۷۶ (۴۵۲/۵۵۸-۵۰۰/۱۹۴)	۷۳/۹۳۹ (۷۰/۲۴۳-۷۷/۶۳۵)	۱/۲۴۰ (۱/۱۷۸-۱/۳۰۲)	۰/۸۸۴ (۰/۸۴-۰/۹۲۸)

همانطور که از جدول ۳ و شکل ۳ قابل درک است، مدل لگاریتم-پروبیوت بهترین مدل جهت ارزیابی غلظت موثره نیکل و مس بر نئونات-های دافنی ماگنا است چراکه کمترین فاکتور اختلاف در این مدل مشاهده شده است. این امر مبین این مساله است که بهترین پیش‌بینی در مدل لگاریتم-پروبیوت قابل حصول بوده است. همبستگی بالای مدل ارایه شده در جدول ۳ نشان‌دهنده کارایی بالای مدل تخمین زده شده در خصوص غلظت موثره مس و نیکل در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت است.

جدول ۳: آنالیز رگرسیون خطوط لگاریتم-پروبیوت برای سمیت نیکل و مس در *D. Magna*.

	نیکل		مس	
	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
a	۰/۰۳۱	۰/۰۱۶	۲/۷۷۳	۲/۶۵۸
b	۰/۲۴۰	-۰/۴۳۹	-۰/۵۴۲	۰/۲۳۱
R	۰/۸۴۵	۰/۹۵۲	۰/۹۰۲	۰/۸۲۰
r^2	۰/۷۱۴	۰/۹۰۷	۰/۸۱۳	۰/۶۷۲
تعداد	۵	۵	۵	۵

$$y = a + bx \quad a \text{ و } b \text{ براساس معادله خطی،}$$



شکل ۳: رابطه بین EC_{50} پیش‌بینی شده نیکل و مس در *D. magna* طی زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت. مدل رگرسیون خطی به همراه حدود اطمینان ۹۵٪ مشخص شده است.

بحث و نتیجه گیری

مطالعات سم شناسی از جمله شیوه‌های مفید جهت ارزیابی اثرات سموم مختلف در اکوسیستم‌های آبی است که طی آن به بررسی سرنوشت سموم پرداخته می‌شود. تست سمیت حاد نیز با بهره‌گیری از روش‌های استاندارد به بررسی تاثیر کشنده و حاد سموم بر میزان فعالیت و بقای آبزیان ساکن در اکوسیستم‌های آبی طی شرایط آزمایشگاهی مشابه می‌پردازد (Ezeonyejiaku et al., 2011). تاکنون مطالعات بسیاری در رابطه با اثرات نامطلوب فلزات بر ماهیان صورت گرفته است؛ با این حال توجه کمتری به اثرات سو این دسته از آلاینده‌ها بر جوامع پلانکتونی معطوف شده است (Tyagi et al., 2007). سمیت یک عنصر به غلظت و حالت شیمیایی آن در محیط، میزان دسترسی زیستی، جذب و دفع آن بستگی دارد (Khan, 2011). عوارض جانبی قرار گرفتن در معرض مواد سمی برای آبزیان باتوجه به موارد گفته شده متفاوت است؛ این عوارض برای آبزیانی مانند *دافنی ماگنا* به علت ساختار ساده بدن، از طرق مختلف بروز می‌نماید و عمدتاً به شکل تاثیر بر میزان بقا، تحرک، رشد و تولید مثل خود را نشان می‌دهد (Das et al., 2013).

نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نشان داد که میزان بقا در مقادیر اندک مس ($0/4$ میکروگرم بر لیتر) و یا نیکل ($18/0$ و $32/4$ میکروگرم بر لیتر) طی 48 ساعت همانند گروه شاهد تا صد درصد حفظ شده است. نتایج مشابهی در مطالعات پیشین روی *D. carinata* نیز منتشر شده است (Cooper et al., 2009). بر این اساس، در تیمار ترکیبی مس ($1/3$ میکروگرم بر لیتر)، روی (13 میکروگرم بر لیتر) و سرب ($1/1$ میکروگرم بر لیتر) در غلظت‌های کمتر از استاندارد تعیین شده توسط دولت استرالیا و ایالات متحده، هیچ گونه تلفاتی دیده نشد. این درحالیست که در مطالعه حاضر، در غلظت $1/35$ میکروگرم بر لیتر طی 24 و 48 ساعت، صد درصد جمعیت تلف شدند. این امر احتمالاً به دلیل اثر تداخلی فلز مس در مقابل روی و سرب است که علیرغم سختی بیشتر آب ($255-278$ میلی گرم بر لیتر کربنات کلسیم) در مطالعه حاضر در مقایسه با مطالعه Cooper و همکاران (2009) ($80-100$ میلی گرم بر لیتر کربنات کلسیم) قابل مشاهده است؛ بنابراین، با وجود سختی بیشتر در مطالعه فعلی که خود در عمل سبب کاهش دسترسی زیستی یون‌های فلزی و در نتیجه سمیت آنها می‌شود (Naddy et al., 2009; Kozlova et al., 2009)، وجود یون‌های فلزی دیگر مانع بروز اثرات سمی مس می‌شود. علاوه بر این، سایر پارامترهای کیفی آب مانند pH، شوری، قلیابیت و غیره نیز می‌تواند بر سمیت فلزات تاثیر گذار باشد (Hyne et al., 2005)؛ بنابراین، آزمایشی که در آن به حضور ترکیبی فلزات پرداخته شود، می‌بایست در مطالعات آتی مورد بررسی قرار گیرد.

مطالعات مشابهی درخصوص تاثیر مس بر گونه‌ی دافنی ماگنا صورت گرفته است که نشان دهنده‌ی سمیت مس در غلظت‌های بالا در محیط‌های آبی است (De Schamphelaere et al., 2004). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که EC_{50} مس طی 24 و 48 ساعت به ترتیب برابر با $0/931$ و $0/667$ میکروگرم بر لیتر است. این مقدار در مقایسه با EC_{50} به دست آمده در مطالعه (Khangarot and Ray, 1987) که به ترتیب به میزان $0/539$ و $0/93$ میکروگرم بر لیتر گزارش شده است، بیشتر است (به ترتیب $72/7$ درصد و $7/1$ برابر). نتایج تحقیقات روی *C. dubia* نشان داد که غلظتی در حدود 18 میکروگرم بر لیتر می‌تواند به عنوان غلظت موثر 48 ساعته محسوب شود. این غلظت در مورد *D. carinata* به مراتب بیشتر ($37/3$ میکروگرم بر لیتر) است (Cooper et al., 2009). عمده‌ی تفاوت مشاهده شده بین غلظت موثر مس در مطالعه حاضر با سایر مطالعات ذکر شده به دلیل تفاوت در پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب است. در مطالعه‌ای روی گونه‌های مختلف دافنی از جمله دافنی ماگنا، میزان LC_{50} 72 ساعته برای مس در pH قلیایی ($8/2-9/5$) در حدود $67/7-86/0$ میکروگرم بر لیتر به دست آمد (Winner and Farrell, 1976). بنابراین علیرغم تشابه در سایر شرایط کیفی آب، pH سبب افزایش غلظت موثره مس در جنس دافنی شده است.

همچنین مطالعه‌ی صورت گرفته توسط (Evens et al., 2009) نشان می‌دهد که نیکل موجود در آب سبب تغییر کیفیت آب و رژیم غذایی شده و بر جمعیت گونه‌ی دافنی ماگنا تاثیر نامطلوب بر جای می‌گذارد. میزان EC_{50} نیکل برای دافنی ماگنا در مطالعه حاضر $164/243$ و $50/067$ میکروگرم بر لیتر به ترتیب طی 24 و 48 ساعت به دست آمد. در گونه‌ی دیگری از دافنی‌ها (*C. dubia*)، با شرایط فیزیکوشیمیایی تقریباً مشابه، EC_{50} 48 ساعته بین $400-81$ میکروگرم بر لیتر به دست آمد (Keithly et al., 2004). در مطالعه دیگری با شرایط فیزیکوشیمیایی متفاوت (دما 13 درجه سانتی گراد و pH $7/6$) EC_{50} نیکل طی 24 و 48 ساعت برای دافنی ماگنا به ترتیب $10/9$ و $7/59$ میکروگرم بر لیتر به دست آمد (Khangarot and Ray, 1987) چراکه pH و دما نقش تعیین کننده‌ای در سمیت فلزات دارند؛ به عبارتی، با کاهش pH سمیت فلزات کمتر شده و بالطبع میزان EC_{50} افزایش می‌یابد (Kozlova et al., 2009). مقدار سمیت نیکل به شدت تحت تاثیر سختی آب است، بطوریکه در آب‌های سبک (سختی 45 میلی گرم بر لیتر) EC_{50} 48 ساعته نیکل در حدود 1048 میکروگرم بر لیتر گزارش شده است (Pane et al., 2003).

پیش از این نشان داده شده است که دافنی ماگنا نسبت به گونه‌های دیگر در برابر تغییرات محیطی و افزایش غلظت فلزات، ظرفیت تحمل بیشتری دارد (Bellavere and Gorbi, 1981; Piscia et al., 2015). در مقایسه با *Ceriodaphnia* sp. نیز تحمل بالاتری در جنس *Daphnia* sp. گزارش شده است. این امر احتمالاً به دلیل سازگاری بهتر جنس *Daphnia* sp. در مقابل استرس‌های ناشی از آلاینده‌ها

است (Shaw et al., 2006; Koivisto, 1995). نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر نیز نشان می‌دهد که سمیت فلزات مورد مطالعه؛ یعنی، مس و نیکل در صورت تشابه شرایط کیفی آب در گونه *دافنی ماگنا* تا اندازه ای کمتر از گونه‌های مشابه است.

علی‌رغم حساسیت کمتر دافنی ماگنا در مقایسه با سایر زیست‌مندان ساکن در اکوسیستم‌های آبی، این گونه به‌عنوان یک زیست‌مند آب شیرین می‌تواند شاخص مناسبی برای بررسی سمیت فلزات در آب باشد (Baird et al., 1989). در صورت مقایسه‌ی نتایج به دست آمده از تیمارهای مس و نیکل می‌توان به تاثیر بیشتر سمیت مس نسبت به نیکل بر *دافنی ماگنا* پی برد. علاوه براین، با بررسی میزان ECهای مختلف بین ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز این نکته قابل درک است که با افزایش زمان، غلظت موثر مس و نیکل کاهش می‌یابد. این بدان معنا است که با گذشت زمان بر میزان سمیت مس و نیکل افزوده شده است و با کمی تاخیر میزان مرگ و میر نئون‌ها نیز افزایش می‌یابد. علی‌رغم عدم امکان مقایسه آماری، تغییرات نیکل در مقایسه با مس مشهود تر است. با مقایسه EC₁ الی EC₉₉ نیز روند افزایشی قابل مشاهده است که البته بزرگنمایی مشاهده شده برای نیکل تا اندازه‌ای بیشتر از مس است (۲/۱۶ برابر برای نیکل و ۱/۷۵ برابر برای مس).

تیمارهایی که در معرض غلظت‌های بالا (۰/۹، ۱/۳۵ و ۲/۲۵ میکروگرم بر لیتر) از مس قرار گرفته بودند در بازه‌ی زمانی ۴۸ ساعته مرگ و میر بیشتری نسبت به تیمارهای قرار گرفته در معرض فلز نیکل در غلظت‌های بالا در همان بازه‌ی زمانی داشتند که این مسئله نشان دهنده‌ی حساسیت بالاتر مس در مقایسه با نیکل و تاثیر بیشتر آن بر *دافنی ماگنا* است و می‌توان دریافت که میزان کمتری از مس در مقایسه با نیکل تاثیر بیشتری بر نئون‌ها دارد. به‌طور مشابه، Arambašić و همکاران (۱۹۹۵) و Ray و Khangarot (۱۹۸۷) نیز سمیت بیشتر مس را در مقایسه با سایر فلزات گزارش نموده‌اند.

به‌طور کلی، با توجه به کاربرد وسیع‌تر مس - حتی به‌عنوان یک ماده آنتی‌سپتیک - در مزارع پرورشی باید توجه بیشتری نسبت به غلظت مصرفی آن اعمال داشت تا سبب از بین رفتن جامعه زئوپلانکتونی استخرهای پرورشی و اکوسیستم‌های آبی نگردد. همچنین در سال‌های اخیر استفاده از آفت‌کش‌های حاوی فلزات سنگین مانند مخلوط بوردو (سولفات مس) و مس اکسی‌کلراید در مقادیر مختلف به دلیل عملکرد مناسب آن‌ها در مهار آفات افزایش یافته (Liu et al., 2012) و بالطبع سبب ورود آن‌ها به اکوسیستم‌های خشکی و آبی و تجمع آن‌ها در محیط‌های گوناگون شده است. در نتیجه، با ورود این مواد به زنجیره‌ی غذایی نگرانی‌های محیط زیستی نیز افزایش یافته است. نتایج مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد که سمیت مس برای این گونه بیشتر از نیکل است و در نتیجه مقادیر کمتر آن سبب بروز اثرات نامطلوب بیشتری بر *دافنی ماگنا* می‌شود؛ بنابراین، با توجه به کاربردهای مطرح شده برای مس، در هنگام استفاده از آن جهت مقاصد آبی‌پروری، باید دقت بیشتری در این خصوص اعمال نمود.

منابع

- ANZECC, ARMCANZ, 2000. Australian and New Zealand guidelines for Fresh and Marine Water Quality. In: The Guidelines, vol. 1. Australian and New Zealand Environmental Conservation Council, Agriculture and Resource Management Council of Australia and New Zealand, Canberra.
- APHA, 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st ed American Public Health Association, Washington DC, 1220p.
- Arambašić, M. B., Bjelić, S. and Subakov, G., 1995. Acute toxicity of heavy metals (copper, lead, zinc), phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigations and the practical applications. Water Research, 29(2): 497-503.
- Baird, D. J., Barber, I., Bradley, M., Calow, P. and Soares, A. M., 1989. The *Daphnia* bioassay: a critique. Hydrobiologia, 188 (1): 403-406.
- Bellavere, C. and Gorbi, J., 1981. A comparative analysis of acute toxicity of chromium, copper and cadmium to *Daphnia magna*, *Biomphalaria glabrata*, and *Brachydanio rerio*. Environmental Technology, 2 (3): 119-128.

- Biesinger, K. E. and Christensen, G. M., 1972.** Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of *Daphnia magna*. Journal of the Fisheries Board of Canada, 29(12): 1691-1700.
- Cooper, N. L., Bidwell, J. R. and Kumar, A., 2009.** Toxicity of copper, lead, and zinc mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia carinata*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 72 (5): 1523-1528.
- Das, P., Xenopoulos, M. A. and Metcalfe, C. D., 2013.** Toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticle suspensions to the aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 91 (1): 76-82.
- Dave, G., 1984.** Effects of copper on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 78(2): 439-443.
- De Schamphelaere, K. A., Vasconcelos, F. M., Tack, F. M., Allen, H. E. and Janssen, C. R., 2004.** Effect of dissolved organic matter source on acute copper toxicity to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (5): 1248-1255.
- Du, J., Mei, C. F., Ying, G. G. and Xu, M. Y., 2016.** Toxicity thresholds for diclofenac, acetaminophen and ibuprofen in the water flea *Daphnia magna*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 97 (1): 84-90.
- Evens, R., De Schamphelaere, K. A. and Janssen, C. R., 2009.** The effects of dietary nickel exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. Aquatic Toxicology, 94 (2): 138-144.
- Ezeonyejiaku, C., Obiakor, M. and Ezenwelu, C., 2011.** Toxicity of copper sulphate and behavioral locomotor response of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and catfish (*Clarias gariepinus*) species. Online Journal of Animal and Feed Research, 1 (4): 130-134.
- Govind, P. and Madhuri, S., 2014.** Heavy metals causing toxicity in animals and fishes. Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences, 2 (2): 17-23.
- Guo, R., Ren, X. and Ren, H., 2012.** Assessment the toxic effects of dimethoate to rotifer using swimming behavior. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 89 (3): 568-571.
- Hyne, R. V., Pablo, F., Julli, M. and Markich, S. J., 2005.** Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran *Ceriodaphnia cf dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry, 24 (7): 1667-1675.
- Keithly, J., Brooker, J. A., Deforest, D. K., Wu, B. K. and Bríx, K. V., 2004.** Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella azteca*). Environmental Toxicology and Chemistry, 23 (3): 691-696.
- Khan, T.A., 2011.** Trace elements in the drinking water and their possible health effects in Aligarh City, India. Journal of Water Resource and Protection, 3 (07): 522.
- Khangarot, B. and Ray, P., 1987.** Correlation between heavy metal acute toxicity values in *Daphnia magna* and fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 38 (4): 722-726.
- Kim, D., Chae, Y. and An, Y. J., 2017.** Mixture toxicity of nickel and microplastics with different functional groups on *Daphnia magna*. Environmental Science and Technology, 51(21): 12852-12858.
- Koivisto, S., 1995.** Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? Environmental Pollution, 90 (2): 263-267.
- Kozlova, T., Wood, C. M. and McGeer, J. C., 2009.** The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the cladoceran *Daphnia pulex* and the development of a biotic ligand model. Aquatic Toxicology, 91 (3): 221-228.
- Kumar, M., Kumar, P. and Devi, S., 2015.** Toxicity of copper sulphate on behavioural parameter and respiratory surveillance in freshwater catfish, *Clarias batrachus* (Lin.). Research Journal of Chemistry and Environment, 3 (1): 22-28.
- Liu, Y., Qi, S., Zhang, W., Li, X., Qiu, L. and Wang, C., 2012.** Acute and chronic toxicity of buprofezin on *Daphnia magna* and the recovery evaluation. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 89 (5): 966-969.

- Malekpouri, P., Peyghan, R., Mahboobi-Soofiani, N. and Mohammadian, B., 2016.** Metabolic capacities of common carp (*Cyprinus carpio*) following combined exposures to copper and environmental hypoxia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127: 1-11.
- Mano, H., Ogamino, Y., Sakamoto, M. and Tanaka, Y., 2011.** Acute toxic impacts of three heavy metals (copper, zinc, and cadmium) on *Diaphanosoma brachyurum* (Cladocera: Sididae). *Limnology*, 12 (2): 193-196.
- Martins, C., Jesus, F. T. and Nogueira, A. J., 2017.** The effects of Copper and Zinc on survival, growth and reproduction of the cladoceran *Daphnia longispina*: introducing new data in an "old" issue. *Ecotoxicology*, 26(9): 1157-1169.
- Miner, B. E., De Meester, L., Pfrender, M. E., Lampert, W. and Hairston, N. G., 2012.** Linking genes to communities and ecosystems: *Daphnia* as an ecogenomic model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1735): 1873-1882.
- Naddy, R. B., Stern, G. R. and Gensemer, R. W., 2003.** Effect of culture water hardness on the sensitivity of *Ceriodaphnia dubia* to copper toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (6): 1269-1271.
- Pane, E. F., Smith, C., McGeer, J.C. and Wood, C. M., 2003.** Mechanisms of acute and chronic waterborne nickel toxicity in the freshwater cladoceran, *Daphnia Magna*. *Environmental Science and Technology*, 37 (19): 4382-4389.
- Piscia, R., Colombini, M., Ponti, B., Bettinetti, R., Monticelli, D., Rossi, V. and Manca, M., 2015.** Lifetime response of contemporary versus resurrected *Daphnia galeata* Sars (Crustacea, Cladocera) to Cu (II) chronic exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 94 (1): 46-51.
- Prosnier, L., Loreau, M. and Hulot, F. D., 2015.** Modeling the direct and indirect effects of copper on phytoplankton-zooplankton interactions. *Aquatic Toxicology*, 162: 73-81.
- Rainbow, P. S., 2002.** Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, 120 (3): 497-507.
- Shaw, J. R., Dempsey, T. D., Chen, C. Y., Hamilton, J. W. and Folt, C. L., 2006.** Comparative toxicity of cadmium, zinc, and mixtures of cadmium and zinc to daphnids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (1): 182-189.
- Siciliano, A., Gesuele, R., Pagano, G. and Guida, M., 2015.** How *Daphnia* (Cladocera) Assays may be used as Bioindicators of Health Effects? *Journal of Biodiversity and Endangered Species*, S1(5):1-6.
- Singh, A. and Agrawal, M., 2007.** Acid rain and its ecological consequences. *Journal of Environmental Biology*, 29 (1): 15.
- Tyagi, V., Chopra, A., Durgapal, N. and Kumar, A., 2007.** Evaluation of *Daphnia magna* as an indicator of toxicity and treatment efficacy of municipal sewage treatment plant. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 11 (1):61-67.
- USEPA, 2004.** National Recommended Water Quality Criteria: 2004. EPA-822-R-02-047, Washington, DC.
- Vandenbrouck, T., Soetaert, A., van der Ven, K., Blust, R. and De Coen, W., 2009.** Nickel and binary metal mixture responses in *Daphnia magna*: molecular fingerprints and (sub) organismal effects. *Aquatic Toxicology*, 92 (1): 18-29.
- Winner, R. W. and Farrell, M. P., 1976.** Acute and chronic toxicity of copper to four species of *Daphnia*. *Journal of the Fisheries Board of Canada*, 33 (8): 1685-1691.

