

## تعیین غلظت میان کشندگی نیترات سرب و بررسی پاسخ‌های رفتاری در خرچنگ منزوی *Diogenes avarus*

نرگس بدری، نرگس امراللهی بیوکی\* و محمدشریف رنجبر

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، هرمزگان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۷/۱۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۲/۷

شناسه دیجیتال (DOI): [10.22113/jmst.2016.34143](https://doi.org/10.22113/jmst.2016.34143)

### چکیده

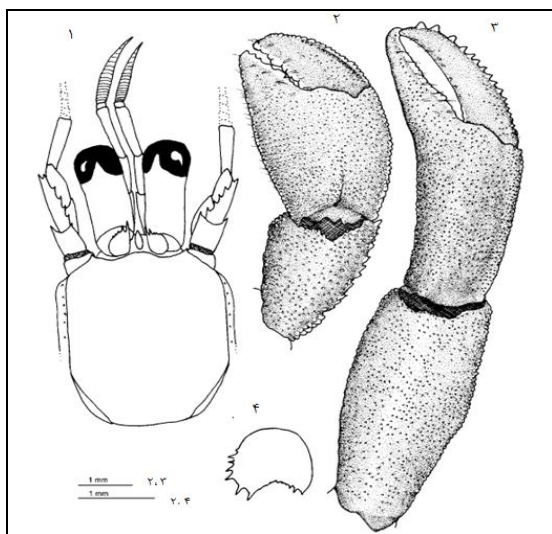
غلظت میان کشندگی (LC<sub>50</sub> 96h) میزان حساسیت و پتانسیل ماندگاری موجودات را در برابر آلاینده‌ها از جمله فلزات سنگین مشخص می‌کند. در طی این مطالعه میزان غلظت میان کشندگی نیترات سرب (Pb NO<sub>3</sub>) بر خرچنگ منزوی *Diogenes avarus* (Heller, 1865) طبق روش استاندارد O.E.C.D، به صورت ساکن و به مدت ۹۶ ساعت تعیین گردید. در آذر ماه ۱۳۹۳، ۸۴ قطعه خرچنگ منزوی *D. avarus* با میانگین وزنی ۱۹±۰/۰۱ گرم در ۵ تیمار (۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر سرب) با سه تکرار به همراه یک تیمار شاهد مورد استفاده قرار گرفت (۱۲ قطعه خرچنگ منزوی در هر تیمار). پارامترهای موثر فیزیکی و شیمیایی آب از جمله pH، سختی کل، اکسیژن محلول و درجه حرارت در طول دوره آزمایش کنترل گردید. در نهایت میزان غلظت میان کشندگی (LC<sub>50</sub> 96h) سرب با استفاده از برنامه آماری Probit analysis برابر با ۱۸۴/۰۴۵ میکروگرم بر لیتر محاسبه شد. همچنین به وسیله‌ی رسم نمودارها میزان LC<sub>10</sub>، LC<sub>50</sub>، LC<sub>90</sub>، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت نیز محاسبه گردید؛ نتایج نشان داد که با افزایش زمان، غلظت کم‌تری از سرب لازم است تا باعث ایجاد مرگ و میر در خرچنگ منزوی *D. avarus* شود، همچنین درصد مرگ و میر با افزایش مدت زمان مواجهه خرچنگ با سرب و افزایش غلظت آن افزایش یافت. تغییرات رفتاری مشاهده شده در خرچنگ‌های منزوی *D. avarus* در طی دوره‌ی آزمایش شامل عدم تعادل در راه رفتن، کاهش فعالیت و جنبش، حرکت آهسته، عدم تحریک‌پذیری و همچنین تغییر رنگ در ناحیه‌ی شکم بود.

**کلمات کلیدی:** *Diogenes avarus*، غلظت میان کشندگی (LC<sub>50</sub>)، نیترات سرب، خرچنگ منزوی، رفتار، فلزات سنگین.

\*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [amrollahi@hormozgan.ac.ir](mailto:amrollahi@hormozgan.ac.ir)

## ۱. مقدمه

روی بسترهای صخره‌ای و ماسه‌ای و گلی درنواحی کم عمق ساحلی تغذیه می‌کنند، بیش‌تر در معرض آلودگی فلزات سنگین قرار می‌گیرند و از این لحاظ این مسئله حائز اهمیت می‌باشد. این موجودات گروهی از سخت‌پوستان هستند که برای حفاظت از شکم نرم خود وابسته به صدف‌های خالی شکم‌پایان هستند، آن‌ها یک مدل جانوری ایده‌آل برای بررسی پاسخ‌های رفتاری ایجاد شده تحت تاثیر مواجهه با آلاینده‌ها، می‌باشند (Bilock and Dunbar, 2009).



شکل ۱ عکس شماتیک از خرچنگ منزوی *D. avarus* (۱) غلاف و ضمائم سر، (۲) چلا و کارپوس جنس ماده، (۳) چلا و کارپوس جنس نر، (۴) تلسون (منبع: Mclaughlin and Dworschak, 2001).

همچنین این جانوران از اعضای مهم جوامع ماکروژئوبنتیک در نواحی جزر و مدی و زیر جزر و مدی در سراسر جهان هستند (Biagi et al., 2006)، آن‌ها در هرم تغذیه‌ای در سطح نزدیک به سطوح اولیه‌ی تغذیه‌ای قرار دارند، پوده‌خوار و تنظیم کننده‌ی مواد آلی دتریتوس هستند (Peura et al., 2013)، به همین دلایل نقش مهمی را در زنجیره‌ی غذایی دریایی ایفا می‌کنند (Biagi et al., 2006) با توجه به این که بستر و سواحل، جایگاه نهایی آلودگی‌ها می‌باشند و خرچنگ‌های منزوی بنتیک می‌باشند بیش‌تر در معرض آلودگی‌هایی همچون

به طور کلی، حدود ۳۰ درصد از فعالیت‌های حمل و نقل نفتی کل جهان در خلیج فارس صورت می‌گیرد که سبب ورود فلزات سنگین به محیط زیست آبی می‌شوند (Pourrang et al., 2005). این آلاینده‌ها می‌توانند روی موجودات این منطقه و انسان تاثیرات جبران ناپذیری را به دنبال داشته باشند. فلزات سنگین به عنوان آلاینده‌های مهم در محیط‌های آبی شناخته شده‌اند. این آلاینده‌ها هنگامی که در غلظت‌های بالا در محیط باشند باعث آسیب‌های جبران ناپذیر متابولیکی، فیزیولوژیکی و ساختاری در ارگانسیم‌های آبی می‌شوند. برخی فلزات سنگین در غلظت‌های بسیار پایین برای بسیاری از ارگانسیم‌ها سمی هستند و کاربرد مفیدی در بدن موجودات ندارند. فلزاتی از قبیل: جیوه، کادمیوم و سرب از این گروه‌اند (Sarmedian et al., 2015). فلزات سنگین می‌توانند عملکرد اندام‌های حسی را تحت تاثیر قرار دهند و بنابراین رفتار به وسیله‌ی کاهش یا تغییر ارسال اطلاعات به مغز تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Blaxter and Ten Hallers-Tjabbes, 1992). سرب فلز سنگینی است که اغلب، کانال‌های انتقال یون و سیگنال‌های سلولی را تحت تاثیر قرار می‌دهد بنابراین، دارای خاصیت نوروتوکسینی می‌باشد (Garza et al., 2006) و مواجهه با این آلاینده می‌تواند سبب تغییرات رفتاری در موجودات زنده از جمله خرچنگ‌های منزوی شود و بقا آن‌ها را تحت تاثیر قرار دهد (Weis and Weis, 1998). آلودگی فلزات سنگین در رسوبات بستر برای کفزیان، بنتوزخواران (پوده‌خواران) و همچنین گیاهان آبی اهمیت ویژه‌ای دارد. در صورتی که میزان آلودگی رسوبات از مقادیر مشخصی تجاوز نماید، موجبات بر هم خوردن تعادل بوم‌شناختی و زوال زیستی اکوسیستم را فراهم می‌نماید (Jalali Jafari and Aghazadeh Mshaki, 2007). از آنجایی که خرچنگ‌های منزوی جانورانی کفزی و پوده‌خوار هستند و از جلبک‌های کوچک و دیگر ارگانسیم‌های

در آذر ماه ۱۳۹۳، خرچنگ منزوی *D. avarus* به تعداد مورد نیاز (۸۴ قطعه خرچنگ منزوی) به صورت تصادفی و در زمان جزر از ساحل خواجه عطا بندرعباس نمونه برداری شد. منطقه نمونه برداری با طول و عرض جغرافیایی  $21^{\circ}19'56''$  N  $59^{\circ}10'27''$  E در قسمت جنوب استان هرمزگان و در شهر بندرعباس قرار گرفته است (شکل ۲)، میزان نیترات سرب در آب این منطقه ۰/۱ میلی گرم بر لیتر و در رسوبات این منطقه ۷/۴ میلی گرم بر کیلوگرم رسوب می باشد. نمونه ها در گروه های ۳۰ تایی با کمترین استرس به آزمایشگاه زیست شناسی دانشگاه هرمزگان منتقل گردیدند. سپس یک هفته به خرچنگ ها مهلت داده شد تا با شرایط آزمایشگاه سازگار شوند. بعد از سازگاری، خرچنگ ها با کمترین استرس به روش گرم کردن نوک صدف از صدفشان خارج گردیدند (Hahn, 1998). بعد از خارج کردن خرچنگ ها از صدفشان، به منظور کاهش استرس ناشی از این کار (خارج کردن آنها از صدفشان)، آنها به مدت ۲ روز سازگار شدند (Ismail, 2012). تعویض آب به صورت روزانه انجام می شد. شرایط فیزیکیوشیمیایی آب آزمایش در جدول ۱ مشخص شده است. خرچنگ ها دو بار در هفته با پلیت ماهی تجاری غذادهی می شدند (Ismail, 2012; White et al., 2013). تغذیهی خرچنگ ها ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش قطع گردید. آزمایشات به صورت ساکن و بر اساس روش استاندارد (TRC, 1984) O.E.C.D انجام شد.

جدول ۱. فاکتورهای فیزیکیوشیمیایی آب آزمایش

مقدار	پارامتر
$23 \pm 1$	دما (سانتی گراد)
$8 \pm .1$	pH
$5/2 \pm .1$	اکسیژن محلول (mg/l)
$44/7 \pm .1$	شوری (ppt)

فلزات سنگین قرار می گیرند. آنها همچنین، نشانگرهای زیستی خوبی برای بازنگری غلظت فلزات سنگین در بسیاری از سرزمین ها در سراسر جهان هستند (Somasundaran and Ajmal, 2010). بنابراین، در این مطالعه یکی از گونه های (گونه *D. avarus* شکل ۱) این جانوران مورد استفاده قرار گرفت.

تست تعیین غلظت میان کشندگی ۹۶ ساعته ( $LC_{50}$ ) برای سنجش قابلیت مستعد بودن و پتانسیل بقا جانوران در برابر مواد سمی از جمله فلزات سنگین می باشد (Sarmedian et al., 2015). با وجود این که در سال های اخیر، بررسی های زیست محیطی و زیست شناختی تغییرات میزان فلزات سنگین در سواحل جنوبی کشور اکثراً معطوف به نواحی ساحلی خلیج فارس بوده است (Sadeghi et al., 2014) ولی مطالعات جامعی در خصوص تعیین محدودهی کشندگی فلزات سنگین بر روی خرچنگ های منزوی این منطقه انجام نگرفته است. بنابراین، این مطالعه اولین تحقیق در خصوص تعیین غلظت میان کشندگی ( $LC_{50}$ ) فلز سرب بر روی خرچنگ منزوی *Diogenes avarus* (Heller, 1865) در ایران می باشد که هدف آن تعیین میزان کشندگی نیترات سرب ( $PbNO_3$ ) به عنوان یکی از سمی ترین ترکیبات برای موجودات زنده و بررسی تغییرات رفتاری این گونه در غلظت های مختلف فلز سرب می باشد. همچنین تعیین این غلظت در این گونه می تواند پایه ای برای مطالعات بعدی توکسیکولوژی و اکوتوکسیکولوژی در این گونه باشد. نتایج حاصل از این مطالعه می تواند راهنمای مناسبی برای انتخاب سمیت حاد و پایش اثرات سرب بر خرچنگ منزوی *D. avarus* باشد. همچنین پایش منظم و مداوم رفتار این خرچنگ منزوی می تواند نشانگر هشدار دهندهی اولیه مسمومیت این گونه با نیترات سرب باشد.

## ۲. مواد و روش ها



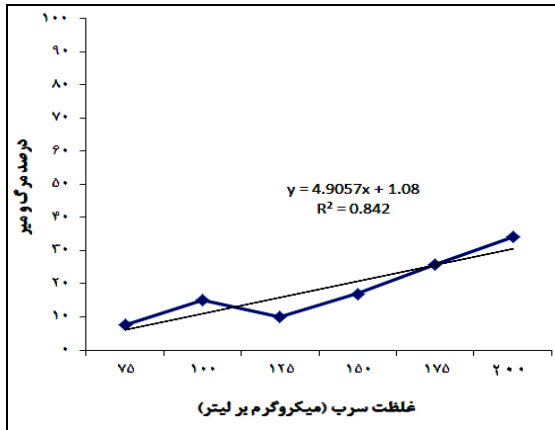
شکل ۲ موقعیت جغرافیایی منطقه‌ی نمونه‌برداری.

ظرف با حجم ۲ لیتر آب، ۴ عدد خرچنگ منزوی با میانگین وزنی  $0.1 \pm 0.19$  گرم، قرار داده شد. در طول ۹۶ ساعت آزمایش تغییرات رفتاری و ناهنجاری‌های ریخت‌شناختی خرچنگ‌های در معرض غلظت‌های مختلف نیترات سرب و همچنین خرچنگ‌های گروه شاهد به صورت منظم بررسی و ثبت گردید.

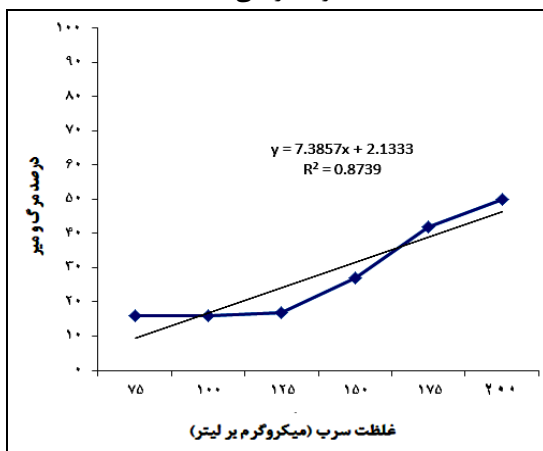
### ۳. نتایج و بحث

همان‌طور که قبلاً بیان شد، مرگ و میر نمونه‌های *D. avarus* برای دوزهای ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر سرب در طول مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مواجهه برای یافتن محدوده‌ی کشندگی سرب بر گونه *D. avarus*، مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج نشان داد که دامنه اصلی کشندگی بین ۲۵۰-۵۰ میکروگرم بر لیتر سرب می‌باشد. زیرا مشاهده شد که مرگ و میر در ۵۰ میکروگرم بر لیتر سرب برابر با صفر و در ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر سرب برابر با ۱۰۰ درصد بود. بنابراین، مرگ و میر نمونه‌های *D. avarus* در اثر سرب، در غلظت‌های ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر سرب در طول ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت برای آزمایش  $LC_{50}$  با سه

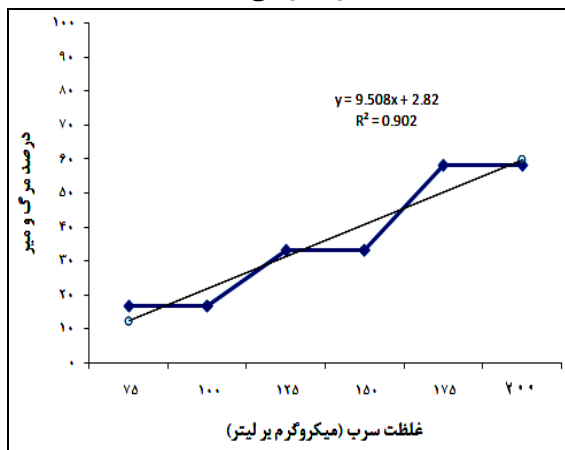
بر اساس جستجوهای انجام شده، اطلاعاتی در زمینه توکسیکولوژیک فلز سرب بر روی خرچنگ منزوی *D. avarus* موجود نیست و محدوده‌ی کشندگی سرب برای این خرچنگ منزوی مشخص نیست. لذا قبل از انجام تست میان کشندگی  $(LC_{50})$  سرب، تست تعیین محدوده‌ی کشندگی سرب برای خرچنگ منزوی انجام شد. بنابراین مرگ و میر خرچنگ‌های منزوی *D. avarus* برای دوزهای ۵۰، ۱۵۰ و ۲۵۰ میکروگرم بر لیتر سرب (نیترات سرب مارک: Merck) در طول مدت ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت مواجهه، برای یافتن دامنه‌ی کشندگی سرب بر روی گونه *D. avarus*، مورد آزمایش قرار گرفته شد. میزان مرگ و میر خرچنگ‌ها هر ۸ ساعت یک‌بار بررسی و خرچنگ‌های مرده از ظرف‌ها خارج گردید (Sadeghi et al., 2014). بر اساس تکرار مجدد آزمایشات ذکر شده (سه تکرار)، تیمار نهایی برای فلز سرب با احتساب تیمار شاهد ۶ تیمار به دست آمد که به منظور افزایش دقت آزمایش هر تیمار سه بار تکرار شد و تیمار شاهد فقط جهت اطمینان از سلامت کامل خرچنگ‌ها و شرایط فیزیکوشیمیایی مناسب آب در محلول آزمایش در نظر گرفته شد. در این آزمایش از ظرف‌های ۲ لیتری استفاده شد و در هر



شکل ۴. میزان درصد مرگ و میر نمونه‌های *D. avarus* در تست تعیین غلظت کشندگی حاد ( $LC_{50}$ ) در غلظت‌های مختلف سرب در طی ۴۸ ساعت



شکل ۵. میزان درصد مرگ و میر نمونه‌های *D. avarus* در تست تعیین غلظت کشندگی حاد ( $LC_{50}$ ) در غلظت‌های مختلف سرب در طی ۷۲ ساعت



شکل ۶. میزان درصد مرگ و میر نمونه‌های *D. avarus* در تست تعیین غلظت کشندگی حاد ( $LC_{50}$ ) در غلظت‌های مختلف سرب در طی ۹۶ ساعت

با استفاده از روش آماری Probit (USEPA, 1985) با سطح اطمینان ۹۵ درصد در محیط SPSS

تکرار مورد بررسی قرار گرفته شد. مشاهدات نشان داد که بیش‌ترین میزان مرگ و میر در غلظت ۱۷۵ و ۲۰۰ میکروگرم بر لیتر سرب (۷ عدد) و کم‌ترین میزان مرگ و میر در غلظت ۷۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر سرب (۲ عدد) بود. همچنین در تیمار شاهد تلفاتی مشاهده نشد (جدول ۲).

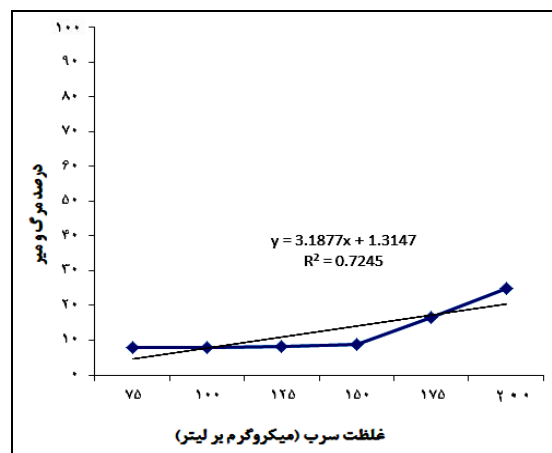
جدول ۲: مرگ و میر تجمعی خرچنگ‌های منزوی *D.*

*avarus* (تعداد در هر غلظت برابر با ۱۲) در آزمایش برای

تعیین  $LC_{50}$  ۹۶ ساعته

غلظت (میکروگرم بر لیتر)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
کنترل	۰	۰	۰	۰
۷۵	۱	۱	۲	۲
۱۰۰	۱	۲	۲	۲
۱۲۵	۱	۱	۲	۳
۱۵۰	۱	۲	۳	۳
۱۷۵	۲	۳	۵	۷
۲۰۰	۳	۴	۶	۷

میزان درصد مرگ و میر خرچنگ منزوی *D. avarus* در مواجهه با سرب طی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت در غلظت‌های انتخابی جهت تعیین غلظت میان کشندگی ( $LC_{50}$ ) به ترتیب در شکل‌های ۳، ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود.



شکل ۳. میزان درصد مرگ و میر نمونه‌های *D. avarus* در

تست تعیین غلظت کشندگی حاد ( $LC_{50}$ ) در غلظت‌های

مختلف سرب در طی ۲۴ ساعت

می‌دهد که هر چقدر زمان افزایش پیدا می‌کند غلظت کم‌تری از سرب لازم است تا باعث ایجاد مرگ و میر در خرچنگ منزوی *D. avarus* شود. تغییرات رفتاری در طول دوره‌ی آزمایش شامل عدم تعادل در راه رفتن، کاهش فعالیت و جنبش، حرکت آهسته، عدم تحریک‌پذیری و همچنین تغییر رنگ در ناحیه‌ی شکم و پاهای کج غیرمعمول بود. که تغییرات رفتاری و ریخت‌شناختی خرچنگ‌های منزوی *D. avarus* با افزایش غلظت نیترات سرب افزایش می‌یافت.

LC<sub>50</sub> محاسبه شد که میزان آن برای سرب در خرچنگ منزوی *D. avarus* با میانگین وزنی ۰/۱۹±۰/۰۱ گرم برابر با ۱۸۴/۰۴۵ میکروگرم بر لیتر سرب محاسبه شد. همچنین مطابق با این روش‌های آماری ذکر شده مقادیر LC<sub>10</sub>، LC<sub>50</sub>، LC<sub>90</sub> در ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت سرب بر روی خرچنگ منزوی *D. avarus* اندازه‌گیری شدند. مقادیر LC<sub>10</sub>، LC<sub>50</sub>، LC<sub>90</sub> در ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت سرب بر روی خرچنگ منزوی *D. avarus* در جدول ۳ آورده شده‌اند. نتایج به دست آمده در جدول ۳ نشان

جدول ۳ غلظت‌های کشنده سرب در طی ۹۶ ساعت بر روی خرچنگ منزوی *D. avarus*

LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC <sub>10</sub>	۱۱۲/۸۷۱	۹۰/۱۹۴	۸۱/۸۱۶	۷۳/۱۴۷
LC <sub>20</sub>	۳۲۳/۶۵۱	۱۷۴/۷۹۵	۱۲۳/۵۳۶	۱۱۵/۱۲۵
LC <sub>30</sub>	۵۰۱/۰۹۳	۲۲۳/۷۸۵	۱۵۹/۲۲۵	۱۳۸/۵۸۷
LC <sub>40</sub>	۷۲۷/۹۹۷	۲۷۶/۳۲۵	۱۹۷/۷۸۳	۱۶۲/۳۸۷
LC <sub>50</sub>	۸۳۷/۹۰۵	۳۸۰/۴۰۲	۲۴۲/۴۴۳	۱۸۴/۰۴۵
LC <sub>60</sub>	۱۴۶۳/۳۹۱	۴۰۹/۹۴۹	۲۹۶/۶۴۵	۲۱۸/۳۸۲
LC <sub>70</sub>	۲۱۲۶/۰۴۴	۵۰۶/۲۵۷	۳۶۸/۴۸۰	۲۵۵/۸۸۶
LC <sub>80</sub>	۳۲۹۱/۶۴۳	۶۴۸/۰۶۸	۴۷۴/۹۳۲	۳۰۸/۰۳۴
LC <sub>90</sub>	۶۲۲۰/۲۴۹	۱۶۰۴/۳۸۱	۸۶۹/۰۵۳	۴۶۳/۰۷۹

#### ۴. نتیجه‌گیری

همان‌طور که در بخش نتایج بیان شد، میزان غلظت کشنده سرب طی ۹۶ ساعت برای گونه‌ی مورد مطالعه با میانگین وزنی ۰/۱۹±۰/۰۱ گرم برابر با ۱۸۴/۰۴۵ میکروگرم بر لیتر سرب می‌باشد. بر اساس این می‌توان نتیجه گرفت که حداکثر غلظت مجاز (MAC value) بر اساس فرمول TRC (1984) که به عبارتی غلظت غیر موثر (NOEC) نیز خوانده می‌شود برای سرب ۱۸/۴۰۴۵ می‌باشد. و همچنین حداقل غلظت موثر (LOEC) این فلزات که به آن LC<sub>10</sub> ۹۶ ساعت اطلاق می‌شود (Finney, 1990) برابر با ۱۴۷/۷۳ میکروگرم بر لیتر بود.

پاسخ‌های متفاوت جانداران به ترکیبات فلزی و دیگر مواد شیمیایی می‌تواند وابسته به چندین فاکتور نظیر

غشای بدن یا کوتیکول، متابولیسم، قابلیت دفع، جنس، سن، اندازه‌ی بدن، محل عملکرد آلاینده در بدن و رفتار می‌باشد (Otitoloju and Dan-Pedro, 2002). در مطالعات صورت گرفته توسط محققان دیگر، Otitoloju و Don-Pedro (2002) غلظت LC<sub>50</sub> ۹۶ ساعت سرب بر روی خرچنگ منزوی *Clibanarius africanus* برابر با ۳۷۰/۷۶ میلی گرم بر لیتر برآورد گردید، این پارامتر LC<sub>50</sub> ۹۶ ساعت سرب بر روی خرچنگ مانگرو *Sesarma huzardi* برابر با ۲۳۲۰/۱۳ میلی گرم بر لیتر بود و برای شکم‌پا *Tympanotonus fuscatus* برابر با ۶۰۹/۷۷۹ میلی گرم بر لیتر تخمین زده شده است. سطح نسبتاً بالای تحمل حیوانات به بعضی ترکیبات فلزی به دلیل مکانیسم‌های رفتاری آن‌ها می‌باشد، به عنوان مثال *T.*

بر پایه‌ی تشخیص ترکیبات مضر در محیط پیرامونش به درون صدف خود عقب‌نشینی می‌کند و روزانه صدف خود را به وسیله اپرکولومش (سرپوش آبششی) می‌پوشاند و از این طریق از ورود ترکیبات فلزی مضر جلوگیری می‌کند. تحمل نسبتاً پایین‌تر یا حساسیت بالاتر *C. africanus* به اثر سمی ترکیبات فلزی ممکن است احتمالاً به علت سطح بالاتر مواجهه با آلاینده سرب باشد. زیرا، این جانور دارای غشای نازک‌تر و نرم‌تر در ناحیه شکمی‌اش است، صدفی که جانور در آن سکنی گزیده است صدفی است که آن را پیدا کرده است، بنابراین محافظت محدودی را برایش فراهم می‌کند زیرا نمی‌تواند روزانه‌اش را محکم ببندد. همچنین، مشاهدات نشان داد زمانی که خرچنگ‌های منزوی تحت تاثیر استرس (به طور مثال، مواجهه با فلز سنگین) قرار می‌گیرند، تمایل دارند از صدف‌شان بیرون بیایند، بنابراین، آن‌ها بیشتر در مواجهه با آلاینده قرار می‌گیرند (Oititoloju and Don-Pedro, 2002). در مطالعه‌ی اخیر به دلیل این که خرچنگ‌های منزوی *D. avarus* از صدفشان بیرون کشیده شده بودند بیشتر در معرض سرب قرار گرفتند و در نتیجه حساسیت بیش‌تری به این فلز نسبت به خرچنگ منزوی *C. africanus* نشان دادند، علاوه بر این میزان  $LC_{50}$  ۹۶ ساعت با توجه به نوع گونه و شرایط فیزیوشیمیایی آب متفاوت می‌باشد. عوامل فیزیوشیمیایی آب بر میزان حلالیت فلزات سنگین در آب و به دنبال آن افزایش یا کاهش سمیت آن‌ها موثرند (Aghazadeh Meshgi and Jalali Jafari, 2007).

سمیت سرب به دلیل خاصیت جایگزینی‌اش با دیگر کاتیون‌های چند ظرفیتی (به ویژه دو ظرفیتی‌ها نظیر  $[Ca^{2+}]$  و  $[Zn^{2+}]$ ) در سیستم مولکولی موجودات زنده می‌باشد، این خاصیت جایگزینی، به سرب اجازه می‌دهد تا فرایندهای زیستی مختلف را تحت تاثیر قرار دهد. کانال‌های انتقال یون و سیگنال‌های سلولی بیشتر تحت تاثیر سرب قرار می‌گیرند که این امر به نوروتوکسینی مولکول‌های سرب کمک می‌کند (Garza et al., 2006). در جانوران دارای سیستم عصبی پیچیده سرب از طریق جایگزینی با کلسیم درون پایانه‌های عصبی تاثیرات نوروترانسمیتری خود را روی سیستم عصبی می‌گذارد (Garza et al., 2006). سرب سبب تجمع زیستی در گونه‌ی *Strongylocentrotus purpuratu* می‌شود و همچنین تاثیر سمیت خود را به وسیله‌ی تخریب هموستازی یون Ca ارائه می‌دهد (Tellis et al., 2014). Weber و همکاران (1991) اشاره کردند که اثرات رفتاری حاصل از مواجهه سرب احتمالاً به وسیله‌ی تغییر انتقال دهنده‌های عصبی ایجاد می‌شود. در طول آزمایش اخیر، عدم تعادل خرچنگ‌های منزوی *D. avarus* در راه رفتن مشاهده شد اگرچه این گونه سیستم عصبی پیچیده‌ای ندارد اما ممکن است سرب تاثیر مشابهی روی سیستم عصبی این جانور گذاشته باشد و در نتیجه سبب عدم تعادل این جانور در راه رفتن شده باشد. و همچنین در غلظت‌های پایین سرب شاهد میزان پوست اندازی بیش‌تری نسبت به غلظت‌های بالا بودیم و افرادی که در این غلظت‌ها در ساعات اولیه آزمایش پوست اندازی کرده بودند بعد از ۹۶ ساعت دارای پاهای غیر معمولی و کج شده بودند. احتمالاً خاصیت جایگزینی سرب با کاتیون‌های چند ظرفیتی علت مشاهده پاهای کج غیر معمول می‌باشد. همچنین نمونه‌های *D. avarus* آلوده به سرب نسبت به نمونه‌های سالم یا همان شاهد دارای جنبش و فعالیت کم‌تری بودند. این کاهش فعالیت احتمالاً به این دلیل است که سرب فعالیت متابولیکی جانور را بالا برده است زیرا جانور در معرض آلودگی قرار گرفته شده بیش‌ترین انرژی خود را صرف بار متابولیکی بالا می‌کند و این بار متابولیکی بالا اغلب به عنوان دلیلی برای تغییر در رفتار (به عنوان مثال کاهش جنبش) می‌باشد. از آنجایی که افراد در معرض آلودگی قرار گرفته شده هزینه مقابله با اثرات فیزیولوژیکی آلاینده را پرداخت می‌نمایند (به عنوان مثال دفع بالا برای حذف ترکیبات مضر) انرژی برای انجام سایر فعالیت‌هایشان کاهش می‌یابد (White et al., 2006).

سمیت سرب به دلیل خاصیت جایگزینی‌اش با دیگر کاتیون‌های چند ظرفیتی (به ویژه دو ظرفیتی‌ها نظیر  $[Ca^{2+}]$  و  $[Zn^{2+}]$ ) در سیستم مولکولی موجودات زنده می‌باشد، این خاصیت جایگزینی، به سرب اجازه می‌دهد تا فرایندهای زیستی مختلف را تحت تاثیر قرار دهد. کانال‌های انتقال یون و سیگنال‌های سلولی بیشتر تحت تاثیر سرب قرار می‌گیرند که این امر به نوروتوکسینی مولکول‌های سرب کمک می‌کند (Garza et al., 2006). در جانوران دارای سیستم عصبی پیچیده سرب از طریق جایگزینی با کلسیم درون پایانه‌های عصبی تاثیرات نوروترانسمیتری خود را روی سیستم عصبی می‌گذارد (Garza et al., 2006). سرب سبب تجمع زیستی در گونه‌ی *Strongylocentrotus purpuratu* می‌شود و همچنین تاثیر سمیت خود را به وسیله‌ی تخریب هموستازی یون Ca ارائه می‌دهد (Tellis et al., 2014). Weber و همکاران (1991) اشاره کردند که اثرات رفتاری حاصل از مواجهه سرب احتمالاً به وسیله‌ی تغییر انتقال دهنده‌های عصبی ایجاد می‌شود. در طول آزمایش اخیر، عدم تعادل خرچنگ‌های منزوی *D. avarus* در راه رفتن مشاهده شد اگرچه این گونه سیستم عصبی پیچیده‌ای ندارد اما ممکن است سرب تاثیر مشابهی روی سیستم عصبی این جانور گذاشته باشد و در نتیجه سبب عدم تعادل این جانور در راه رفتن شده باشد. و همچنین در غلظت‌های پایین سرب شاهد میزان پوست اندازی بیش‌تری نسبت به غلظت‌های بالا بودیم و افرادی که در این غلظت‌ها در ساعات اولیه آزمایش پوست اندازی کرده بودند بعد از ۹۶ ساعت دارای پاهای غیر معمولی و کج شده بودند. احتمالاً خاصیت جایگزینی سرب با کاتیون‌های چند ظرفیتی علت مشاهده پاهای کج غیر معمول می‌باشد. همچنین نمونه‌های *D. avarus* آلوده به سرب نسبت به نمونه‌های سالم یا همان شاهد دارای جنبش و فعالیت کم‌تری بودند. این کاهش فعالیت احتمالاً به این دلیل است که سرب فعالیت متابولیکی جانور را بالا برده است زیرا جانور در معرض آلودگی قرار گرفته شده بیش‌ترین انرژی خود را صرف بار متابولیکی بالا می‌کند و این بار متابولیکی بالا اغلب به عنوان دلیلی برای تغییر در رفتار (به عنوان مثال کاهش جنبش) می‌باشد. از آنجایی که افراد در معرض آلودگی قرار گرفته شده هزینه مقابله با اثرات فیزیولوژیکی آلاینده را پرداخت می‌نمایند (به عنوان مثال دفع بالا برای حذف ترکیبات مضر) انرژی برای انجام سایر فعالیت‌هایشان کاهش می‌یابد (White et al., 2006).

می‌باشد زیرا آلاینده‌ها می‌توانند رفتارهای ارگانسیم‌ها را تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین با استفاده از رفتار می‌توان به طور اکولوژیکی یک سنجش وابسته به تأثیرات آلاینده را فراهم نمود، یعنی می‌توان با استفاده از رفتار تأثیرات آلاینده‌ها را بر روی ارگانسیم‌ها سنجید و از تغییرات رفتاری برای پیش‌گویی روش عملکرد ترکیبات ناشناخته، تعیین سمیت‌ها در فاضلاب‌های پیچیده و آزمایش آب فاضلاب قبل از تخلیه‌ی آن درون محیط، استفاده کرد (Newman, 2009).

### منابع

Biagi, R., Meireles, A. L., and Mantelatto, F. L. 2006. Bio-ecological aspects of the hermit crab *Paguristes calliopsis* (Crustacea, Diogenidae) from Anchieta Island, Brazil. Biological seines. vol. 78, no. 3.

Finney, D., 1990. Probit Analysis. 1st Edn., Cambridge University Press, Cambridge, p: 1-222.

Garza, A., Vega, R., and Soto, E. 2006. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. Medical Science Monitor. 12 (3): RA, p: 57-65.

Hahn, D, R. 1998. Hermit crab shell use patterns; response to previous shell experience and to water flow. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 228, p: 35- 51.

Heller, C. 1865. Crustaceen Reise der Osterreichischen Fregatte Novara umdie Erde in den Jahren 1857, 1858, 1859 unter den Befehlen des Commodors B. von Wuellerstorff-Urbair. Zoologischer Theil, . vol. 2, part 3., 280 pp.

Jalali Jafari, B., and Aghazadeh Meshgi, M. Fish poisoning due to heavy metals in water and its importance in public health, Tehran: Book Publishing. 134 pages. In Persian

Ismail, T. G. 2012. Effects of visual and chemical cues on orientation behavior of the Red Sea hermit crab *Clibanarius signatus*. The Journal of Basic and Applied Zoology. 65, p: 95– 105.

Khorasani, N., Shayegan, J., and Karimi Shahri, N. 2005. Determination of heavy

(al., 2013). همچنین مشاهده شده است که آلودگی مس نیز در خرچنگ منزوی *Pagurus bernhardus* سبب افزایش فعالیت متابولیکی بدن شده‌است و به همین دلیل در رفتار مشاگره‌ای‌شان بر سر صدف، مشاهده شد که افراد آلوده به مس ضربه‌هایی که وارد می‌کردند از نظر قدرتی ضعیف‌تر از افراد سالم بوده‌است (White et al., 2013).

آلاینده‌ها علاوه بر این که در غلظت‌های خاصی سبب کشندگی می‌شوند در غلظت‌های پایین‌تر نیز می‌تواند تأثیرات فیزیولوژیکی بر روی جانور گذاشته و جانور این تاثیر را با استفاده از تغییر رفتارش بروز دهد (Newman, 2009)، به عبارت دیگر رفتار یک نشانگر حساس به استرس سمیت در ارگانسیم‌های آبی

metals concentration (zinc, copper, iron, chromium and copper) in surface sediments of Bandar Abbas coasts. Iranian Natural Resources Journal. 85, p. 861- 869. In Persian

Mortazavi, S., Esmaili Sari, A., and Riahi Bakhtiari, AS. 2002. Zinc, Lead, Cadmium and Chromium Determination in Rocky Oysters (*Saccostrea cucullata*) on the coast of Hormozgan province. Iranian Journal of Marine Science. Volume 2, Issue 1, p. 67-76.

Newman, M.C., 2009. Fundamentals of Ecotoxicology, Third Edition Hardcover – September 28, 2009, Tylor and Francis Group. Pp: 235- 239.

Perua, J. F., Lovvorn, J. R., North, C. A., and Kolts, M. J. 2013. Hermit crab population and association with gastropod shells in the northern Bering sea. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 449, P: 10- 16.

Sadeghi, P., Rari, A., Movahedinia, A., Saffehieh, A., and Azhdari, D. 1393. Determination of the mean lethal concentration (LC50) of potassium dichromate and the evaluation of behavioral responses in the epiglottis (*Epinephelus stoliczkae*). Journal of Oceanography, Vol. 5, No. 17, p. 1-9. In Persian.

Sarmandian, S., Saffehiyeh, A., Z. Alkarnin, H., A., B., Hashemi, M. 1394. Determination of semi-lethal concentration (LC50 96h) of heavy metal cadmium in new species of oyster *crassostrea* sp .. Journal of Marine Science and Technology, Volume 14, Issue 2, 13 p. In Persian.



- Somasundaran, L., Ajmal, K. 2010. Larval development of hermit crab *Clibanarius longitarsus*: Synergistic effect of heavy metals. *Biologia Journal*. 65/4, p: 714-719.
- Tellis, M, S., Lauer, M, M., Nadella, S., Bianchini, A., and Wood, Ch, M. 2014. Sublethal mechanisms of Pb and Zn toxicity to the purple sea urchin (*Strongylocentrotus purpuratus*) during early development. *Aquatic Toxicology Journal*. Vol 146, p: 220-229.
- T.R.C. 1984. O.E.C.D. Guideline for testing if chemical section 2, on biotic systems, pp: 1-39.
- Weber, D. N., Russo, A., Seale, D. B., and Spieler, R. E. 1991. Waterborne lead affects feeding abilities and neurotransmitter levels of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology Journal*, 21, p: 71– 80.
- Weis, J., and Weis, P. Effects of exposure to lead on behavior of mummichog (*Fundulus heteroclitus* L.) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 222, p: 1- 10.
- White, S. J., Pipe, R. K., Fisher, A., and Briffa, M. 2013. Asymmetric effects of contaminant exposure during asymmetric contests in the hermit crab *Pagurus bernhardus*. *Animal Behaviour*. 86, p: 773- 781.

## Determination of Median lethal concentration lead (II) nitrate and Behavioral responses of hermit crab, *Diogenes avarus*

Narges Badri<sup>1</sup>, Narges Amrollahi Biuki<sup>1†</sup>, Mohammad Sharif Ranjbar<sup>1</sup>

Department of marine biology, Faculty of Marine Science and Technology, Hormozgan University

### Abstract

The LC50-96h test paradigm is used to measure the susceptibility and survival potential of organisms exposed to particular toxic substances, such as heavy metals. In this study, the statically acute toxicity of Pb on hermit crab *D. avarus* was determined according to standard methods O.E.C.D in 96h. 84 individual hermit crab with  $0.19 \pm 0.01$  g weight average were used in five different treatments (75, 100, 150, 175, 200 microgram per liter of lead) with three replicates and a control treatment (15 hermit crab per in each treatment). The effective physical and chemical parameters of water including pH, total hardness, dissolved oxygen and temperature were controlled throughout the experiment. Finally, the rate of the acute toxicity (LC<sub>50</sub> 96h) was determined to be 184.045 µg/l by using the statistic method Probit analysis. Furthermore, the rates of LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub>, LC<sub>90</sub> (24, 48, 72 and 96h) were calculated. Results indicate that when the experiment time is extended, lower concentration of Pb is leading to mortality in hermit crab *D. avarus*. The percentage of mortality increased with increasing duration of exposure of crab to different amounts of lead concentration. The behavioral changes observed in hermit crabs *D. avarus* in the experiment period included an imbalance in walking, reduced activity and movement, slow motion, no irritability and also color change of the abdomen.

**Keywords:** *Diogenes avarus*, median lethal concentration, Lead (II) nitrate, Hermit crab, behavior, heavy metals.

Figure 1 Schematic image of hermit crab *D. avarus*. (1) Pods and appendages of the head, (2) chella and carpus of female, (3) chella and carpus of male, (4) Telson (Mclaughlin and Dworschak, 2001).

Figure 2 Geographical location of the sampling area.

Figure 3. The percentage of mortality of *D. avarus* samples in the test for determining concentration (LC50) at different concentrations of lead during 24 hours.

Figure 4. The percentage of mortality of *D. avarus* samples in the test for determining the lethal concentration (LC50) at different concentrations of lead during 48 hours.

Figure 5. The percentage of mortality of *D. avarus* samples in the test for determining the lethal concentration (LC50) at different concentrations of lead during 72 hours.

Figure 6. The percentage of mortality of *D. avarus* samples in the test for determining the lethal concentration (LC50) at different concentrations of lead during 96 hours.

Table 1. Physicochemical Factors of experimental water.

Table 2: Cumulative mortality of hermit crabs *D. avarus* (number in any concentration equal to 12) in the test LC50 96 hours.

Table 3 lethal concentrations of Lead over 96 hours on a hermit crab *D. avarus*

†نویسنده مسئول، پست الکترونیک: amrollahi@hormozgan.ac.ir