فعالیت آنزیم‌های گوارشی و شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی نانوذره نیکل و سیلیمارین

نینا نازدار[۱]، احمد ایمانی[۱*]، فرزانه نوری[۲]، کوروش سروی مغانلو[۱]

[*]a.imani@urmia.ac.ir

۱- دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه

۲- پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۵

چکیده

توسعه سریع و افزایش روز افزون استفاده از نانو ذرات موجب نگرانی‌هایی در زمینه احتمال ورود این مواد به محیط‌های آبی و بروز مسمومیت در آبزیان شده است. هدف مطالعه حاضر ارزیابی تجویز خوراکی ترکیب حفاظت کننده سیلیمارین به منظور مقابله با اثرات سمی نانوذره اکسید نیکل با تأکید بر فاکتورهای رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌باشد. برای این منظور تعداد ۱۲۰۰ قطعه ماهی (۰/۰۱±۳/۸۳ گرم) در هشت تیمار آزمایشی شامل تیمار شاهد و هفت تیمار دیگر بصورت ترکیبی از مقادیر مختلف نانوذره اکسید نیکل (۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا) و سیلیمارین (۰ و ۱ گرم در هر کیلوگرم غذا) در ماه‌های اول و دوم آزمایش تقسیم گردیدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد و آزمایش به مدت ۶۰ روز ادامه یافت. یافته‌ها نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز مربوط به تیمار ۶ (۱/۰۰± ۱۶/۵۶)، (فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین- ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و به همراه ۱ گرم سیلیمارین) بود که با تیمارهای ۵ (فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین -حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و ۱ گرم سیلیمارین)، ۷ (۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین - ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) و ۸ (۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین- ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) اختلاف معنی‌دار داشت (P≤۰/۰۵). بیشترین فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز مربوط به تیمار۱ (۰/۰۵± ۰/۵۴)، (فاقد نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین) بود که با تیمارهای ۷ و ۸ اختلاف معنی‌دار داشت (P≤۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیپاز مربوط به تیمار ۴ (۵۰۰ میلی گرم نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین- فاقد نانوذره و حاوی ۱ گرم سیلیمارین) (۰/۰۴±۱/۰۳) بود که با اکثر تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت (P≤۰/۰۵). حضور همزمان سیلیمارین و نانوذره در جیره غذایی تیمارهای ۳ (حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و ۱ گرم سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین)، ۴، ۵ و ۶ موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در مقایسه با تیمارهای ۷ و ۸ گردید. همچنین در مطالعه حاضر وجود سیلیمارین، نانوذره اکسید نیکل و همچنین استفاده همزمان سیلیمارین و نانوذره اکسید نیکل اثری بر شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل غذایی تیمارهای مختلف نداشت (P>۰/۰۵). البته به نظر می‌رسد در صورت افزایش مدت زمان رویارویی با نانوذره و سیلیمارین، امکان تغییر شاخص‌های رشد و کارآیی تغذیه وجود دارد که نیازمند بررسی بیشتری است.

واژگان کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، شاخص‌های رشد، نانوذره اکسید نیکل، سیلیمارین، *Oncorhynchus mykiss*.

[*]نویسنده مسئول

مقدمه

نانوذرات[1] به عنوان موادی با حداقل یک بعد ۱۰۰ نانومتری یا کوچکتر تعریف می‌شوند (Bergin and Witzmann, 2013). طی سال‌های اخیر مواد نانو به طور فزاینده‌ای تولید و به مصرف رسیده اند، به شکلی که پیش بینی می‌شود تا سال ۲۰۱۵ بیش از یک تریلیون دلار ارزش محصولات نانوفناورانه موجود در بازارهای جهانی باشد (Rather *et al*., 2011). نوآوری‌های جدید علمی در زمینه ذرات در مقیاس نانو (اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر) موجب برنامه‌های کاربردی گسترده‌ی جدید و مفیدی در الکترونیک، مواد شیمیایی، حفاظت از محیط زیست، تصویربرداری پزشکی، تشخیص بیماری، درمان سرطان، ژن درمانی و ... شده است (Yah *et al*., 2011). بخشی از نانوذرات وارد شده به محیط‌های آبی می‌توانند در ستون آب بصورت سوسپانسیون باقی مانده و توسط موجودات آبزی جذب شوند. همچنین نانوذرات با تغییر محیط طبیعی پیامدهای بوم شناختی در سطوح باکتری‌ها و ویروس‌ها تا سایر موجودات آبی مانند گونه‌های مختلف زئوپلانکتون‌ها و ماهی‌ها را سبب می‌شوند (Zhu *et al*., 2010). آلاینده‌ها موجب آسیب‌های بافتی، تغییرات رفتاری، رشد و تولیدمثل و نشانگرهای زیستی در سطوح ژن، پروتئین یا آنزیم ها می‌گردند (Hussain *et al*., 2005). سمیت حاد نانوذرات اکسید نیکل در ماهی گورخری (*Danio rerio*) پایین ارزیابی گردیده است، اما تماس دراز مدت با این ترکیب می‌تواند منجر به انباشت آن در بافت شده و سمیت آن را افزایش دهد (Kovriznych *et al*., 2014). همچنین پژوهشگران بیان نموده‌اند که با توجه به استفاده گسترده از نیکل در صنعت، سمیت مزمن نانوذرات اکسید نیکل ممکن است تأثیر منفی بر جمعیت موجودات آبزی و پویایی شبکه های غذایی در سازگان‌های آبی داشته باشد (Kovriznych *et al*., 2014). نانو ذرات طلا و نقره حتی در غلظت‌های کم اثرات نامطلوبی بر سلول‌های کبد ماهی قزل آلای رنگین کمان داشته‌اند (Farkas *et al*., 2011).

بسته به نوع رویارویی، نانو مواد ممکن است خواسته یا ناخواسته از طریق دستگاه گوارش (روده) نیز وارد بدن شوند (Yah *et al*., 2011). فلزات سنگین چه از راه آب (Baker, 1969; Figueiredo-Fernandes *et al*., 2007) و چه از راه جیره غذایی (Handy *et al*.,1999) می توانند آثار آسیب‌شناختی در کبد ماهی ایجاد کنند (Handy, 2003; Grosell *et al*., 2007; Mustafa *et al*., 2012). وجود نانوذره تیتانیوم در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان سبب تجمع تیتانیوم در آبشش، روده، کبد، مغز و طحال گردیده است (Ramsden *et al*., 2009). بررسی مسیر ورود آلاینده‌هایی همچون نانوذرات از طریق دستگاه گوارش نیازمند مطالعات بیشتری است (Agarwal *et al*., 2013). با افزایش تعداد نانوذرات ساخته شده و کاربرد آن‌ها در محصولات صنعتی و مصرفی، خطر در معرض قرار گرفتن انسان و همچنین بوم سازگان‌های آبی در حال افزایش بوده و ممکن است سلامت انسان و محیط زیست را تهدید نماید (Johari *et al*., 2014). با کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم آن‌ها، بر کنش‌پذیری شیمیایی و زیستی آن‌ها افزوده می‌شود. این ویژگی منجر به افزایش تولید رادیکال‌های آزاد[2] از جمله گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) در حدی فراتر از قابلیت تحمل یک سازگان زیستی جهت از بین بردن و کاهش اثرات تخریبی آن‌ها می‌شود (Valko *et al*., 2007). تولید ROS در محدوده متنوعی از نانو مواد از جمله نانو ذرات اکسید فلزی مشاهده شده است (Kim *et al*., 2009; Tee *et al*., 2015). رادیکال های آزاد با پراکسیداسیون چربی‌ها و واسرشتی پروتئین‌های ساختاری سلول منجر به واکنش‌های التهاب، تخریب غشای سلولی و سرانجام مرگ سلول‌ها و از دست رفتن کارکردهای حیاتی یک بافت یا اندام می‌شوند (صبوری و عطری، ۱۳۹۰؛ Zhan *et al*., 2005). امروزه نقش تخریب اکسیداتیو پروتئین‌ها بوسیله رادیکال های آزاد در فرآیند پیری و آسیب شناسی بیماری‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Nakamura *et al*., 2007).

[1] Nanoparticles

[2] Free radicals

به منظور تقویت سیستم آنتی اکسیدانی و همچنین کاهش اثرات رادیکال‌های آزاد از موادی با ویژگی آنتی اکسیدانی استفاده می‌شود (Ardestani *et al*., 2008). آنتی اکسیدان‌ها قادر به مهار یا توقف تولید و همچنین جمع آوری رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشند (صبوری و عطری، ۱۳۹۰). مکانیسم عمل فلاوونوییدها، به عنوان نوعی آنتی اکسیدان طبیعی، به افزایش بیان ژن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و یا افزایش پایداری mRNA به کمک ویژگی جمع کنندگی رادیکال‌های آزاد، نسبت داده شده است (Nagata *et al*., 1999). پلی‌فنول‌های چای[1] (Na and Surh, 2008) و همچنین کورستین[2] (Molina *et al*., 2003) منجربه تغییر الگوی فعالیتی طیف گسترده‌ای از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گردند. همچنین عصاره پلی فنولی کاکائو از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های گلوتاتیون پروکسیداز و ردوکتاز موجب کاهش میزان مرگ سلولی حاصل از Tert-butyl hydroperoxide در HepG2، نوعی رده سلولی، می‌گردند (Martin *et al*., 2010).

اسانس‌های گیاهی از پتانسیل بالایی به عنوان منبع ترکیبات آنتی‌اکسیدان برخوردارند، بنابراین می‌توان گونه‌ها و اجزای اسانس‌های گیاهی مختلف را برای این امر انتخاب کرد (گلیان و همکاران، ۱۳۹۰). ماریتیغال یا خار مریم (*Silybum marianum*) گیاهی خودرو، دوساله، بدون کرک و متعلق به تیره کاسنی (Asteraceae) است که در اغلب کشورهای اروپایی، آسیایی و آمریکایی پراکنش دارد (بنایی و همکاران، ۱۳۸۹؛ نبئی و همکاران، ۱۳۹۲). به دلیل خاصیت دارویی این گیاه، کشت صنعتی آن نیز در بسیاری از کشورهای جهان، از جمله ایران طی سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است. سیلیمارین[3]، عصاره تخلیص شده بذر گیاه دارویی خار مریم است و بیش از ۲۰۰ سال است که به عنوان یک گیاه دارویی در درمان بیماری‌های کبدی ناشی از سوء مصرف انواع داروها، هورمون‌ها، مسمومیت با آفت‌کش‌ها و دیگر سموم و حتی در درمان بسیاری از بیماری‌های کشنده نظیر هپاتیت، دیابت، سرطان، کم‌خونی و ... استفاده می‌شود (Sersen *et al*., 2006). اثرات دارویی سیلیمارین به ویژگی‌های آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی (Kaur and Agarwal., 2007) و ضد فیبروزی آن و نیز افزایش میزان گلوتاتیون احیای سلولی (GSH)، تقویت توان بازسازی کبد و حفظ پایداری غشای سلولی باز می‌گردد (Sersen *et al*., 2006).

به رغم وجود اطلاعات زیاد در زمینه اثرات مطلوب عصاره‌های گیاهان دارویی در جیره‌های غذایی دام، طیور و آبزیان و همچنین کاربرد تجاری این ترکیبات در صنایع تغذیه دام و طیور، هنوز اطلاعات جامعی در مورد امکان کاربرد این ترکیبات به منظور کاهش اثرات سوء حضور سموم نوظهور در طبیعت و بوم سازگان‌های آبی- نانوذرات- در بدن آبزیان بویژه از طریق آلودگی‌های ناشی از زنجیره‌های غذایی وجود ندارد. البته مطالعات متعددی در ارتباط با آثار حفاظتی ترکیبات آنتی اکسیدانی بر سلامتی گونه‌های مختلف آبزیان در رویارویی با آفت‌کش‌های مرسوم در کشاورزی و همچنین برخی ترکیبات آلی صورت گرفته است (علی و همکاران، ۱۳۹۴؛ Malekinejad *et al*., 2010). مطالعه حاضر با هدف ارزیابی تجویز خوراکی نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین در ماهی قزل آلای رنگین کمان با تأکید بر فاکتورهای رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی انجام شد، چرا که فعالیت آنزیم‌های گوارشی (به عنوان مثال، پروتئاز، آمیلاز و لیپاز) می‌تواند به عنوان شاخصی از وضعیت تغذیه‌ای و همچنین نشانگر شرایط محیطی محل زندگی یا پرورش گونه آبزی به کار روند (Suzer *et al*., 2006; Rungruangsak- Torrissen, 2007).

مواد و روش‌ها

تهیه و ذخیره سازی بچه ماهیان

تعداد ۱۲۰۰ قطعه قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزنی حدود ۳/۸۳±۰/۰۱ گرم پس از یک هفته سازگاری به شرایط آزمایشی، توزین و در مخازن ۹۰ لیتری توزیع شدند. این مطالعه بصورت یک طرح کاملا تصادفی ساده

[1] Epigallaocatechin gallate, Theaflavins
[2] Quercetin
[3] Silymarin

شامل ۸ تیمار، هر کدام با ۳ تکرار، به مدت ۸ هفته بطول انجامید (جدول۱). دبی متوسط آب برای هر مخزن پرورشی ۱/۵ لیتر در دقیقه تنظیم گردید.

اندازه گیری فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب مخازن پرورشی

در طول دوره پرورش، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما و میزان اکسیژن محلول بطور مرتب بصورت هفتگی اندازه گیری و ثبت شد (درجه حرارت آب ۰/۵± ۱۴ درجه سانتی گراد، اکسیژن محلول ۰/۲± ۸/۲ میلی گرم در لیتر)، این مقادیر در محدوده مناسب برای پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان بود.

ساخت جیره‌های آزمایشی

برای این منظور غذای تجاری ماهی قزل آلای رنگین کمان تهیه (به ترتیب حاوی ۴۶، ۱۴، ۱۰ و ۱۱ درصد پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت) و آسیاب گردید. سپس با توجه به تیمارهای غذایی مورد نظر، مقادیر مختلف نانوذره اکسید نیکل شامل ۰، ۱۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم (Razavipour *et al*., 2015) و سیلیمارین شامل ۰ و ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم به جیره غذایی (Jia *et al*., 2013) اضافه گردید (جدول ۱). نانوذرات اکسید نیکل مورد استفاده در این پژوهش در ابعاد ۲۵ نانومتر از شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان تهیه شد (شکل ۱، US Research Nanomaterials, Inc.). همچنین سیلیمارین مورد استفاده از شرکت سیگما (S0292) تهیه گردید. با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر حاصل به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته‌های نازک در آمد. در نهایت رشته‌های خشک شده به قطعات کوچکتری شکسته و برای زدودن خاکه‌ها از الک با اندازه چشمه خیلی ریز استفاده گردید. سرانجام پلت‌های تهیه شده در کیسه‌های پلاستیکی یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم‌گیر با ثبت تاریخ ساخت، میزان نانوذره و سیلیمارین تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

نمونه برداری از ماهیان

به منظور بیهوشی ماهیان از پودر گل میخک با غلظت ۲۰۰ قسمت در میلیون استفاده شد (Holloway *et al*., 2004). در پایان دوره (روز ۶۰) نمونه‌هایی از زوائد پیلوریک ماهیان (۳ ماهی از هر مخزن پرورشی) برای سنجش‌های آنزیمی تهیه و تا زمان سنجش‌های مورد نظر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Lemieux *et al*., 1999).

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی

برای تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید (Bernfeld, 1955; Worthington, 1991). هر سنجش لیپازی (۰/۵ میلی لیتر) شامل ۰/۵ میلی مولار از p – nitrophenyl myristate، ۰/۲۵ میلی مولار از 2-methoxy ethanol، ۵ میلی مولار از sodium cholate و ۰/۲۵ مولار ۹ Tris – HCl , pH = بود. میزان جذب لایه آبی زیرین در ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید (Iijima *et al*., 1998). سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز با استفاده از محلول آزوکازئین ۲ درصد صورت پذیرفت (Garcia-Carreno and Haard, 1993).

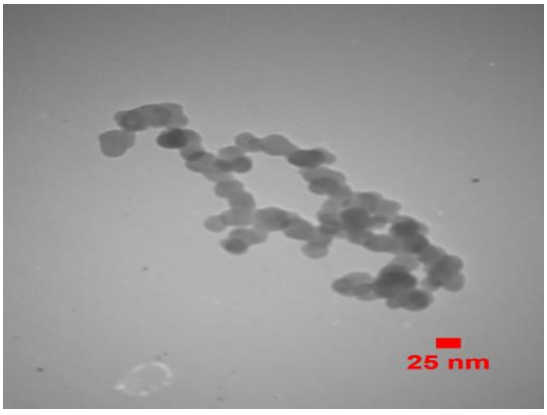
زیست سنجی و بررسی شاخص‌های رشد

اندازه گیری وزن بچه ماهیان با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم و اندازه گیری طول با خط کش با دقت یک میلیمتر انجام شد. شاخص‌های رشد ماهیان شامل ضریب تبدیل غذایی (FCR)[1]، ضریب رشد ویژه (SGR)[2]، درصد افزایش وزن (WG)[3] در پایان دوره محاسبه شدند (Whittington *et al*., 2005). یک روز قبل از زیست سنجی گروه‌های آزمایشی، غذای آن‌ها قطع شد (Figueiredo-Silva *et al*., 2010).

[1] Feed Conversion Rate
[2] Specific Growth Rate
[3] Weight gain

جدول ۱ : تیمارهای آزمایشی

تیمار	مرحله اول (چهار هفته نخست)	مرحله دوم (چهار هفته دوم)
۱	جیره غذایی فاقد نانوذره و سیلیمارین	
۲	جیره غذایی حاوی ۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	
۳	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۴	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۵	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۶	جیره غذایی فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و یک گرم سیلیمارین در کیلوگرم غذا
۷	جیره غذایی حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل در کیلوگرم غذا و فاقد سیلیمارین	
۸	جیره غذایی حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل در کیلوگرم غذا و فاقد سیلیمارین	



شکل۱- تصویر میکروسکوپ الکترونی گذاره (TEM) از نانوذرات اکسید نیکل مورد استفاده در این مطالعه (ارائه شده توسط شرکت فروشنده).

تحلیل‌های آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که بطور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف و همگنی واریانس‌ها با استفاده از آزمون لون بررسی گردید. همچنین برای بررسی (۱) اثر وجود و عدم وجود نانوذره بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه، (۲) اثر وجود و عدم وجود سیلیمارین بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه، (۳) اثر غلظت سم بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه، (۴) اثر زمان ارائه سم در گروه دریافت کننده سیلیمارین بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه، (۵) اثر غلظت نانوذره در گروه دریافت کننده سیلیمارین بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه و (۶) اثر غلظت نانوذره و زمان ارائه آن در گروه دریافت کننده سیلیمارین بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه از مقایسات متعامد با ضرایب ویژه (جدول ۲) استفاده شد (یزدی صمدی و همکاران، ۱۳۸۵). سطح معنی داری آزمون‌ها $P\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. تمامی تحلیل‌های آماری در محیط

نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام شد.

نتایج

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی تیمارهای مختلف آزمایشی

شکل ۲ میزان فعالیت آنزیم آمیلاز تیمارهای مختلف آزمایشی را در انتهای دوره پرورش نشان می‌دهد. طبق نمودار مذکور بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب مربوط به تیمار ۶ (فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین-۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین) و تیمار ۷ (۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین- ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) بود ($P\leq ۰/۰۵$). با توجه به میزان فعالیت آنزیم آمیلاز در تیمار ۲ (فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین) و تیمار ۱ (فاقد نانوذره و سیلیمارین- فاقد نانوذره و سیلیمارین) مشخص می‌شود که سیلیمارین موجب کاهش فعالیت این آنزیم شده است، هرچند که این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود، همچنین با مقایسه میانگین فعالیت آنزیم آمیلاز در تیمارهای ۷ (حاوی ۱۰۰ میلی گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین- حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) و ۸ (حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین- حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) با تیمار ۱، مشخص می‌گردد که نانوذره اکسید نیکل منجر به کاهش میزان فعالیت آنزیم آمیلاز شده است. حضور همزمان سیلیمارین و نانوذره در جیره غذایی تیمارهای ۳ (حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و ۱ گرم سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین)، ۴ (حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و ۱ گرم سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین)، ۵ (فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین- حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و ۱ گرم سیلیمارین) و ۶ (فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین- حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و ۱ گرم سیلیمارین) موجب افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمارهای ۷ و ۸ گردیده است.

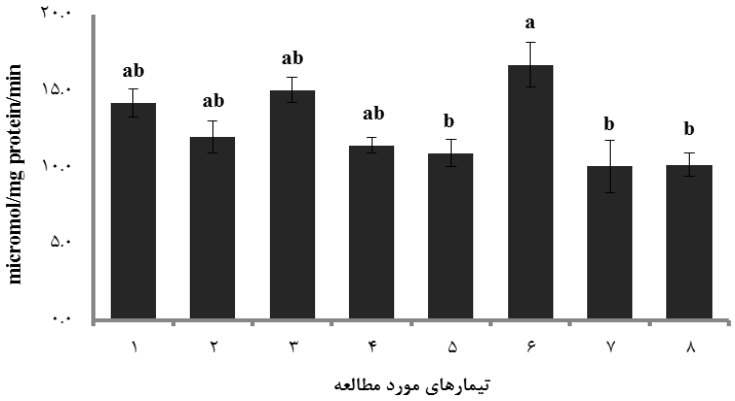
شکل ۳ میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش را نشان می‌دهد. طبق نمودار مذکور بیشترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب مربوط به تیمار ۱ (فاقد نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین) و تیمار ۷ (۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین- ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) بود ($P\leq ۰/۰۵$). وجود سیلیمارین در جیره غذایی (تیمار ۲) موجب کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز شد. همچنین فعالیت آنزیم مذکور در تیمارهای ۷ و ۸ در مقایسه با تیمار ۱ کاهش قابل توجهی نشان داد. حضور همزمان سیلیمارین و نانوذره در جیره غذایی تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ موجب افزایش فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمارهای ۷ و ۸ گردید.

شکل ۴ میزان فعالیت آنزیم لیپاز تیمارهای مختلف آزمایشی را در انتهای دوره پرورش نشان می‌دهد. طبق نمودار مذکور بیش‌ترین و کم‌ترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب مربوط به تیمار ۴ (۵۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین- فاقد نانوذره اکسید نیکل و حاوی ۱ گرم سیلیمارین) و تیمار ۷ (۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین- ۱۰۰ میلی‌گرم نانوذره اکسید نیکل و فاقد سیلیمارین) بود ($P\leq ۰/۰۵$). میزان فعالیت آنزیم لیپاز تیمار ۲ با تیمار ۱ تفاوت معنی‌داری نداشت و دو تیمار ۷ و ۸ نیز تفاوت معنی‌داری با این دو تیمار نشان ندادند. البته مشابه سایر آنزیم‌ها حضور همزمان سیلیمارین و نانوذره در جیره غذایی تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ موجب افزایش فعالیت این آنزیم گردید.

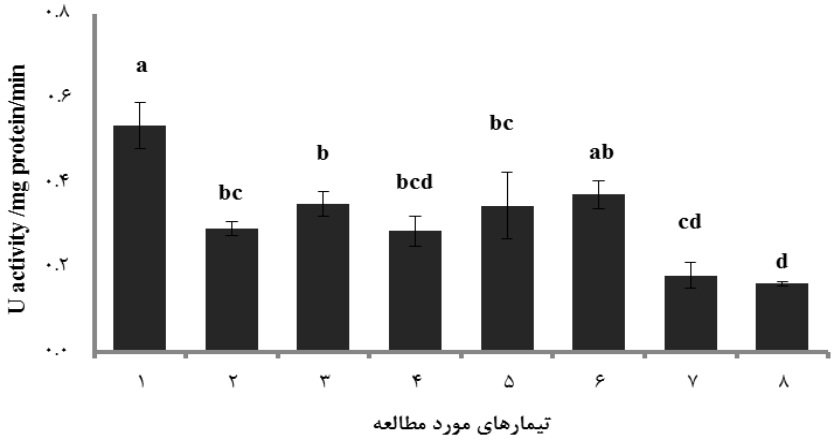
با توجه به جدول ۳ می‌توان چنین نتیجه گرفت که غلظت نانوذره در گروه دریافت کننده سیلیمارین بر فعالیت آنزیم لیپاز مؤثر بوده است، به نحوی که در غلظت‌های بالای نانوذره فعالیت آنزیم لیپاز افزایش یافته است.

جدول ۲: ضرایب مقایسات متعامد

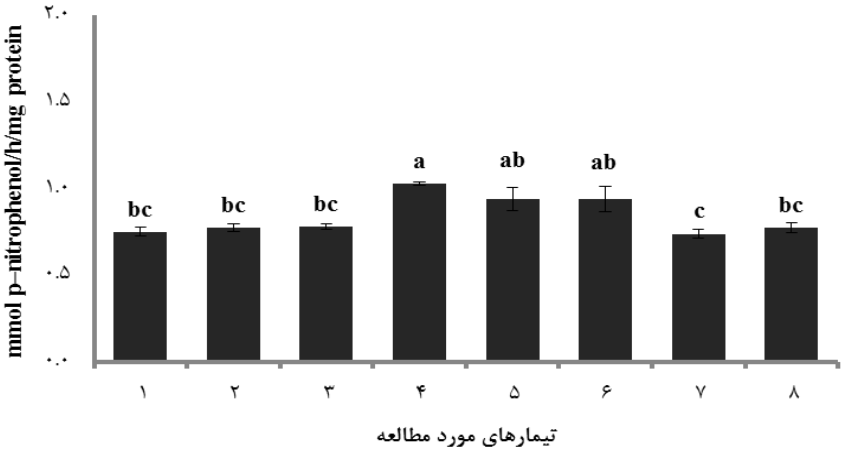
مقایسات متعامد	تیمار							
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
۱	۲	۰	۰	۰	۰	۰	-۱	-۱
۲	۱	-۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱	-۱
۴	۰	۰	۱	۱	-۱	-۱	۰	۰
۵	۰	۰	-۱	۱	-۱	۱	۰	۰
۶	۰	۰	-۱	۱	۱	-۱	۰	۰



شکل ۲: میزان فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش .
تیمار ۱: تیمار شاهد، تیمار ۲: تغذیه شده فقط با سیلیمارین، تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی نانوذره اکسید نیکل و سیلیمارین، تیمار ۷ و ۸: تیمارهای دریافت کننده نانوذره اکسید نیکل.
حروف غیر یکسان نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح P ≤۰/۰۵ می‌باشند.



شکل ۳: نمودار میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش .
حروف غیر یکسان در هر مجموعه نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P ≤۰/۰۵ می‌باشند.



شکل ۴: نمودار میزان فعالیت آنزیم لیپاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش

حروف غیر یکسان در هر مجموعه نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P ≤۰/۰۵ می‌باشند.

جدول ۳: نتایج مقایسات متعامد

	مقایسه متعامد مورد نظر	P-value (دو دامنه)		مقایسه متعامد مورد نظر	P-value (دو دامنه)		مقایسه متعامد مورد نظر	P-value (دو دامنه)
لیپاز	۱	۰/۸۸۱	آمیلاز	۱	۰/۰۰۷	آلکالین پروتئاز	۱	۰/۰۰۰
	۲	۰/۶۶۳		۲	۰/۱۶۱		۲	۰/۰۱۷
	۳	۰/۵۲۸		۳	۰/۹۴۶		۳	۰/۸۵۵
	۴	۰/۳۸۵		۴	۰/۶۰۷		۴	۰/۴۴۰
	۵	۰/۰۰۷		۵	۰/۳۳۶		۵	۰/۸۹۲
	۶	۰/۰۰۶		۶	۰/۰۰۰		۶	۰/۴۰۵
	۱	۰/۸۸۱		۱	۰/۰۰۷		۱	۰/۰۰۰

همچنین غلظت نانوذره و زمان ارائه آن در گروه دریافت کننده سیلیمارین روی فعالیت آنزیم لیپاز مؤثر بود و در گروه دریافت کننده مقدار کمتر نانوذره در مرحله اول آزمایش میزان فعالیت آنزیم لیپاز کمتر از گروه دریافت کننده همان غلظت نانوذره در مرحله دوم آزمایش بود. در ارتباط با فعالیت آنزیم آمیلاز، وجود نانوذره در جیره غذایی صرف نظر از غلظت آن موجب کاهش فعالیت این آنزیم گردید. همچنین غلظت نانوذره و زمان ارائه آن در گروه دریافت کننده سیلیمارین روی فعالیت آنزیم آمیلاز مؤثر بود، به نحوی که گروه دریافت کننده مقدار کمتر نانوذره در مرحله اول آزمایش از میزان فعالیت بالاتری برخوردار بود، البته بیشترین میزان فعالیت آنزیم در مرحله دوم متعلق به گروه دریافت کننده غلظت بالای نانوذره در جیره غذایی بود. نتایج مقایسات متعامد[1] نشان داد که وجود نانوذره در جیره غذایی صرف نظر از غلظت آن موجب کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز گردید. همچنین افزودن سیلیمارین به مقدار یک گرم در کیلوگرم

[1] Orthogonal

جیره غذایی موجب کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز شد.

نتایج فاکتورهای رشد

شاخص‌های رشد (وزن نهایی، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه) و ضریب تبدیل غذایی ماهیان تیمارهای مورد مطالعه در پایان دوره در جدول ۴ آمده است. تحلیل‌های آماری اختلاف معنی داری از نظر شاخص‌های مورد مطالعه میان تیمارهای مختلف نشان نداد (P>۰/۰۵).

جدول ۴: شاخص های رشد بچه ماهیان تیمارهای مختلف طی آزمایش

تیمار	وزن آغازین	وزن میان‌دوره	وزن نهایی	درصد افزایش وزن	ضریب تبدیل غذایی	ضریب رشد ویژه
۱	۳/۸۲±۰/۰۲[a]	۱۱/۹۶±۰/۲۶[a]	۲۶/۹۶±۱/۵۰[a]	۶۲۸/۷۳±۲۷/۳۸[a]	۰/۹۱±۰/۰۲[a]	۳/۳۱±۰/۰۶[a]
۲	۳/۸۳±۰/۰۱[a]	۱۱/۵۰±۰/۴۷[a]	۲۷/۱۶±۱/۳۳[a]	۶۱۲/۷۵± ۲۹/۱۰[a]	۰/۹۱±۰/۰۲[a]	۳/۲۷±۰/۰۷[a]
۳	۳/۸۵±۰/۰۰[a]	۱۱/۳۷±۰/۲۲[a]	۲۷/۸۷±۱/۵۵[a]	۶۳۲/۰۵ ±۴۴/۴۹[a]	۰/۹۳±۰/۰۴[a]	۳/۳۱±۰/۱۰[a]
۴	۳/۸۱±۰/۰۲[a]	۱۱/۲۰±۰/۰۹[a]	۲۷/۶۵±۰/۳۷[a]	۶۲۶/۹۲ ±۵/۵۸[a]	۰/۹۲±۰/۰۲[a]	۳/۳۱±۰/۰۱[a]
۵	۳/۸۵±۰/۰۰[a]	۱۱/۵۱±۰/۱۱[a]	۲۷/۵۵±۰/۳۵[a]	۶۱۱/۷۷± ۹/۰۹[a]	۰/۸۶±۰/۰۲[a]	۳/۲۷± ۰/۰۲[a]
۶	۳/۸۲±۰/۰۲[a]	۱۱/۵۹±۰/۲۷[a]	۲۷/۵۲±۰/۸۰[a]	۶۱۵/۹۸ ±۳۲/۶۷[a]	۰/۸۴±۰/۰۱[a]	۳/۲۸±۰/۰۷[a]
۷	۳/۸۱±۰/۰۱[a]	۱۰/۷۵±۰/۴۲[a]	۲۴/۷۲±۱/۱۹[a]	۵۶۸/۶۶ ±۳۲/۹۱[a]	۰/۹۶±۰/۰۹[a]	۳/۱۶±۰/۰۸[a]
۸	۳/۸۴±۰/۰۱[a]	۱۱/۶۴±۰/۲۳[a]	۲۶/۵۵±۰/۵۴[a]	۵۷۰/۱۰ ±۱۹/۳۶[a]	۰/۹۷± ۰/۰۵[a]	۳/۱۷±۰/۰۵[a]

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود تفاوت آماری معنی دار می باشد (p>۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری

میزان فعالیت آنزیم های گوارشی به فراسنجه های مختلفی همچون ویژگی‌های ذاتی آنزیم، میزان تولید و ترشح آن وابسته است (Yan *et al*., 1996). آلاینده‌ها به احتمال زیاد از طریق تعامل مستقیم یا غیر مستقیم با پروتئین‌ها میزان فعالیت آنزیم‌ها را متاثر می‌سازند. جذب آلاینده‌های شیمیایی به وسیله جانوران آبزی ممکن است مستقیم و از طریق آب (پوست و یا جذب آبشش) و غیر مستقیم و به شکل خوراکی (از طریق غذا به دنبال جذب گوارشی) صورت پذیرد، اهمیت نسبی این دو مسیر بسته به زیست شناسی موجودات زنده و زیست فراهمی[1] آلاینده‌ها متغیر است (Wang and Fisher,1999). آلاینده‌ها علاوه بر اثر مستقیم بر ویژگی‌های هیدرولیتیک آنزیم‌ها، ممکن است به صورت غیر مستقیم و با اثرات سمی خود بر ساخت و یا مکانیسم ترشح آن‌ها و سرانجام فعالیت زیستی آن‌ها تأثیر بگذارند. همچنین ممکن است ساختار دستگاه گوارش دستخوش تغییرات قابل ملاحظه‌ای (تحلیل و مرگ سلولی بافت گوارشی) گردد (Amiard-Triquet *et al*., 2012). ترکیبات بیگانه‌زی[2] بسته به سرنوشت‌شان در آب، هوا، خاک و رسوبات ممکن است از راه‌های مختلف در دسترس موجودات زنده قرار گیرند (Prabhu and Poulose, 2012). اکسید نیکل می‌تواند پس از ورود به بوم سازگان آبی، در آن تجمع یابد و تنها ظرفیت شیمیایی و موقعیت عنصر (رسوبات یا ستون آب) می‌تواند تغییر یابد. ترکیبات نیکل معمولا به عنوان سموم

[1] Bioavailability

[2] Xenobiotic

ژنی، ایمنی و سرطان‌زا طبقه بندی می‌شوند (Kasprzak *et al.*, 2003).

Wang و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثر مقایسه‌ای نانوذرات مس در مقابل سولفات مس در بچه ماهیان هامور با تأکید بر شاخص‌های رشد، آنزیم‌های گوارشی، ترکیب بدن و بافت شناسی پرداختند. در هر دو شکل رویارویی با مس فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، آمیلاز و لیپاز) و رشد بچه ماهیان کاهش یافت، البته میزان آن در سولفات مس نسبت به نانوذرات مس بیشتر بود. در مطالعه حاضر نیز صرف نظر از دوز نانوذره اکسید نیکل در جیره غذایی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی کاهش یافت، البته ماهیان گروه‌های مختلف تفاوتی از نظر شاخص‌های رشد نشان ندادند؛ عوامل مختلفی نظیر نوع نانوذره و اندازه آن، گونه پرورشی، مدت زمان آزمایش و همچنین مرحله زیستی مورد استفاده می‌تواند در تفاوت نتایج این مطالعه (شاخص‌های رشد) با پژوهش یاد شده موثر باشد، که مستلزم مطالعات مقایسه‌ای بیشتری است. تغذیه ماهی گورخری (*Danio rerio*) با چهار جیره‌ی آزمایشی حاوی ۰، ۵، ۲۰ و ۴۰ قسمت در بیلیون نانوذره نقره موجب شد که ماهیان دریافت کننده ۲۰ قسمت در بیلیون و پس از آن ۴۰ قسمت در بیلیون نانوذره نقره از بالاترین افزایش وزن روزانه و ضریب رشد ویژه برخوردار باشند، در حالی‌که هیچ تفاوت قابل توجهی بین تیمارهای دریافت کننده ۰ و ۵ قسمت در بیلیون نانوذره نقره مشاهده نشد و در مورد فعالیت آنزیم پروتئاز نیز روند مشابهی مشاهده گردید (Sarkar *et al.*, 2015). همچنین در بررسی تاثیر علف کش *آلمیکس*[1] بر الگوی فعالیت آنزیم‌های گوارشی سه گونه از ماهیان آب شیرین (تیلاپیای نیل[2]، گربه ماهی آسیایی[3] و نوعی ماهی سوف[4])، بالاترین فعالیت آمیلاز در روده *A. testudineus* مشاهده شد و کم‌ترین فعالیت آن در روده *H. fossilis* بود، در حالی‌که حداکثر فعالیت لیپاز در معده *O. niloticus* و کم‌ترین میزان آن در معده *H. fossilis* سنجیده شد. فعالیت پروتئاز در کبد *O. niloticus* بالا بود، اما در معده *H.fossilis* کم‌ترین میزان بود. پژوهشگران چنین نتیجه گرفتند که *A. testudineus* و *O. niloticus* حساس‌تر هستند و رویارویی طولانی مدت با *آلمیکس* حتی در غلظت‌های سازگار با محیط زیست ممکن است باعث تغییرات در عملکرد گوارشی ماهیان گردد (Samanta *et al.*, 2014). به منظور مطالعه سمیت تغذیه‌ای کلوئید نانوذرات نقره در قزل آلای رنگین کمان، جوهری و حسینی در سال ۱۳۹۳، ۲۴ عدد ماهی قزل آلای رنگین کمان را با میانگین وزنی ۱۳ گرم به صورت کاملا تصادفی به ۳ گروه ۸ تایی تقسیم کردند (جیره غذایی محتوی ۰، ۲۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات نقره بود). نتایج این پژوهشگران نشان داد که دوز بالای نانوذرات نقره موجب کاهش درصد افزایش وزن ماهیان شد. با این وجود میزان افزایش وزن گروه تغذیه شده با غلظت پایین نانوذرات (۲۵ میلی گرم بر کیلوگرم) تفاوت معنی داری با رشد گروه شاهد (فاقد نانوذره) نشان نداد. در بررسی رویارویی ماهی کپور معمولی با دو غلظت نیکل (۰/۰۲۵ و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر) در آب محیط پرورش، کاهش فعالیت آنزیم های گوارشی مشاهده شد (Jain, 2009). رویارویی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با کادمیوم و مس موجب ناهنجاری و اختلالات عملکرد کیسه شنا، تغییر رفتار و فعالیت حرکتی و تغذیه‌ای و سرانجام کاهش نرخ رشد و بقای ماهیان گردید (Barbara *et al.*, 2009). Li و همکاران (۲۰۰۷) نیز نوسان فعالیت آنزیم های گوارشی مختلف در تیلاپیای دورگه[5] در طول رویارویی با مس، آهن و روی را در شرایط درون و برون تنی مشاهده کردند. از سوی دیگر در بررسی سایر آبزیان، Hsieh و همکاران (۲۰۰۸) فعالیت آنزیم آمیلاز دو گونه از شکم‌پایان آبزی (*Sulculus diversicolor* و *Haliotis sieboldii aquatilis*) را بررسی نمودند. آن‌ها مشاهده کردند که منگنز، نیکل یا نقره موجب افزایش فعالیت آنزیم مورد نظر گردیده و مس، کادمیوم یا روی موجب مهار فعالیت آنزیم

[1] Almix
[2] *Oreochromis niloticus*
[3] *Heteropneustes fossilis*
[4] *Anabas testudineus*
[5] *Oreochromis niloticus* × *Oreochromis aureus*

آمیلاز گردید. رویارویی *Corbicula striatella*، نوعی صدف آب شیرین، با مس یا جیوه موجب کاهش ترشحات آنزیمی غده گوارشی صدف‌ها شد (Zambare & Mahajan, 2001). همچنین رویارویی با نقره موجب کاهش میزان فعالیت پروتئازی ماهی مرکب (*Sepia officinalis*) گردید (Le Bihan *et al*., 2004). همچنین نیکل موجب کاهش فعالیت آمیلازی صدف سبز (*Perna viridis*) شد (Sabapathy and Teo, 1992). در بررسی سمیت حاصل از اندازه و شکل‌های مختلف نانوذرات نیکل در ماهی گورخری، سه اندازه مختلف نانوذره نیکل در ۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ نانومتر و گروهی با ساختار درخت‌سانی و با اندازه ذرات بزرگتر از ۶۰ نانومتر تهیه شدند. هرسه اندازه نانوذرات نیکل (۳۰، ۶۰ و ۱۰۰ نانومتر) سمیت کمتر یا معادل نیکل محلول داشتند، در حالیکه نوع درخت‌سان سمی‌تر بود و رویارویی با نیکل موجب نازک شدن اپیتلیوم روده ماهیان گردید (Ispas *et al*., 2009).

عصاره‌های مختلف گیاهی به منظور بهبود عملکرد حیوانات با اثر تحریک بر ترشحات روده یا به دلیل اثرات ضدباکتریایی مستقیم روی فلور روده و همچنین به منظور تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی به جیره اضافه می‌شوند (Citarasu, 2010). در مطالعه Jang و همکاران (۲۰۰۷) در رابطه با تأثیر نوعی اسانس تجاری بر عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی و جمعیت فلور روده در جوجه‌های گوشتی مشخص گردید که فعالیت تریپسین در پانکراس به طور معنی‌داری در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس نسبت به گروه‌های شاهد و جیره حاوی آنتی‌بیوتیک بیشتر بود و میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز در گروه حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس نسبت به جیره پایه به طور معنی‌داری بالاتر بود. در مطالعه حاضر وجود ترکیب پلی فنولی سیلیمارین در جیره غذایی (تیمار ۲ در مقایسه با گروه شاهد) موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی شد که مطابق با گزارش های موجود در زمینه استفاده از ترکیبات فلاوونوئیدی در درمان بیماری‌هایی نظیر دیابت و چاقی در حیوانات آزمایشگاهی و همچنین انسان است (Hanhineva *et al*., 2010). البته وجود سیلیمارین در جیره غذایی ماهیان تغذیه شده با نانوذره اکسید نیکل موجب بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی گردید که می‌تواند به نقش حفاظت کنندگی آن در برابر آثار مخرب نانوذرات باشد (Jia *et al*., 2013) که مستلزم مطالعات بیشتر و بررسی‌های آسیب شناختی بویژه در بافت لوزالمعده به عنوان یکی از اندام‌های مهم دخیل در ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی است. در مورد دلیل تفاوت روند تغییرات فعالیت آنزیم‌های گوارشی مختلف در ماهیان یک گروه آزمایشی نسبت به حضور یک آلاینده اطلاعاتی دست نیست. چنین تفاوت‌هایی ممکن است به منظور پاسخگویی به تقاضای انرژی برای غلبه بر تأثیر سم به عنوان یک پاسخ تنظیمی باشد. علاوه بر این، رفتار این آنزیم‌ها در برابر شرایط محیطی متفاوت است (ایمانی و همکاران، ۱۳۸۸؛ Applebaum *et al*., 2001; Marchioro *et al*., 2013). البته باید به اثر مدت زمان و دوز سم مورد استفاده نیز توجه نمود (Marchioro *et al*., 2013). آلاینده‌ها می‌توانند به طور مستقیم بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و یا مراحل ساخت آن‌ها تأثیر بگذارند، همچنین با اثرات منفی خود بر رفتار ماهی موجب کاهش فعالیت تغذیه گشته و به شکل غیر مستقیم بر میزان آنزیم‌های گوارشی اثر می‌گذارند. این ترکیبات همچنین کمیت و کیفیت مواد غذایی در دسترس را تغییر داده و موجب تغییر الگوی فعالیت آنزیم‌های گوارشی مختلف می‌شوند (Suzer *et al*., 2006). با توجه به روند فعالیت آنزیم‌های لیپاز و آلکالین پروتئاز چنین به نظر می رسد که ماهیان تیمارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ توجه خود را به بهره برداری بیشتر از چربی جیره غذایی معطوف کرده‌اند. این امر می‌تواند به دلیل اهمیت تأمین انرژی مورد نیاز در این گروه‌های آزمایشی باشد، به نحوی که در ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) تغذیه شده با غذای مصنوعی با محتوای چربی بالا در مقایسه با سایر گروه‌ها، تدارک سطوح بالای انرژی برای بهبود وضعیت زیستی حیوان ضروری تلقی شده است (Zambonino Infante and Cahu, 1999).

به عنوان نتیجه گیری کلی می‌توان چنین بیان نمود که استفاده از شاخص‌هایی نظیر درصد افزایش وزن یا شاخص‌های تغذیه‌ای همیشه نمی‌تواند گویای وضعیت سلامت ماهیان در شرایط رویارویی با سطوح مزمن آلودگی جیره‌های غذایی با فلزات سنگین بویژه نانوذرات (در این مطالعه نانوذره اکسید نیکل) باشد و استفاده از شاخص‌های بیوشیمیایی نظیر اندازه گیری آنزیم‌های گوارشی می‌تواند در درک ساز و کار فرآیندهای گوارشی و به دنبال آن سازگاری با تغییرات ناشی از مسمومیت مؤثر باشد. چنین نتایجی در مطالعات پیشین در آبزیان گزارش شده است (Ramsden *et al*., 2009; Samanta *et al*., 2014). همچنین با توجه به قابلیت استفاده از گیاهان دارویی در درمان عوارض ناشی از تولید سطوح بالای رادیکال‌های آزاد در بیماری‌های مختلف، به نظر می‌رسد بهره گیری از عصاره‌های گیاهان دارویی در جیره‌های غذایی آبزیان، از طریق بهبود و پشتیبانی عملکرد سیستم آنتی اکسیدان طبیعی بدن می‌تواند در کاهش آسیب‌های وارده مؤثر واقع گردد.

منابع

ایمانی، ا.، یزدانپرست، ر.، فرهنگی، م.، بختیاری، م.، مجازی امیری، ب. و شکوه سلجوقی، ظ.، ۱۳۸۸. بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در طی دوره محرومیت غذایی و غذادهی مجدد. مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۸، شماره ۳ و ۴، صفحات ۳۳-۲۴.

بنایی، م.، میرواقفی، ع. ر.، رفیعی، غ. ر. و سوردا گومیل، ا.، ۱۳۸۹. تأثیر تجویز خوراکی سیلیمارین بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی خون قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله منابع طبیعی ایران، دوره ۶۳، شماره ۴، صفحات ۲۸۶-۲۷۱.

جوهری، س. ع. و حسینی، س.، ۱۳۹۳. سمیت تغذیه‌ای کلوئید نانوذرات نقره در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، دوره ۲۳، شماره ۱، صفحات ۳۱-۲۳.

صالحی، م.، جعفری، م.، عسگری، ع.، صالح مقدم، م.، سلیمیان، م.، عباس نژاد، م. و حاج غلامعلی، م. ۱۳۸۸. پاسخ سیستم دفاعی آنتی اکسیدان مغز موش صحرایی به دوز های حاد پاراکسون. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران. سال ۷، شماره ۳، صفحات ۱۶۲-۱۵۶.

صبوری، ع.ا. و عطری، م.، ۱۳۹۰. اکسیژن و تکامل حیات. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۴۴ صفحه.

علی، م.، میرواقفی، ع.، پورباقر، ه. و اسدی جمنانی، ف.، ۱۳۹۴. نقش آنتی اکسیدانی ویتامین C در کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از مسمومیت تحت حاد ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با دیازینون. فصلنامه محیط زیست جانوری، دوره ۷، شماره ۱، صفحات ۷۳-۸۷.

گلیان، ا.، اکبریان، ع. و صالح، ح.، ۱۳۹۰. گیاهان دارویی در تغذیه حیوانات (ترکیبات طبیعی برای بهبود و کارایی دستگاه گوارش). انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، ۲۱۶ صفحه.

نبئی، م.، روشندل، پ. و محمدخانی، ع.، ۱۳۹۲. تأثیر مواد تنظیم کننده رشد گیاهی بر شکست خواب بذرهای گیاه خار مریم (*Silybum marianum* L.). مجله سلول و بافت، دوره ۴، شماره ۱، صفحات ۵۴-۴۵.

یزدی صمدی، ب.، رضائی، ع. و ولی زاده. ۱۳۸۵. طرحهای آماری در پژوهش‌های کشاورزی. چاپ ششم. انتشارات دانشگاه تهران، ۷۶۴ صفحه.

Agarwal, M., Murugan, M.S., Sharma, A., Rai, R., Kamboj, A., Sharma, H. and Roy, S.-K., 2013. Nanoparticles and its toxic effects: A review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(**10**): 76-82.

Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C. and Rainbow, P.S., 2012. Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects. CRC Press,pp. 279-306.

Applebaum, S.L., Perez, R., Lazo, G.P. and Holt, G.L., 2001. Characterization of chymotrypsin activity during ontogeny of larval red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 25: 291-300.

Ardestani, A., Yazdanparast, R. and Jamshidi, Sh. 2008. Therapeutic effects of Teucrium polium extract on oxidative stress in pancreas of streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Medicinal Food, 11(3):525-32.

Baker J.T.P., 1969. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 26: 2785-2793.

Barbara, J., Pioter, S., Małgorzata, W. and Katarzyna, L., 2009. Disturbances of early development of fish caused by heavy metals (a review). Electronic Journal of Ichthyology, 2: 76-96.

Bergin, I.L. and Witzmann, F. A., 2013. Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps. International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology, 3(1-2): 163-210.

Bernfeld, P., 1955. Amylases, α and β. Methods in Enzymology, 1: 149-158.

Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International, 18(3):403-414.

Farkas, J., Christian, P., Gallego-Urrea, J.A., Roos, N., Hassellov, M., Tollefsen, K.E. and Thomas, K.V., 2011. Uptake and effects of manufactured silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gill cells. Aquatic Toxicology, 101: 117-125.

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J.V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S.M., Carrola, J., Matos, P. and Fontaínhas-Fernandes, A., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesquisa Veterinária Brasileira, 27: 103–109.

Figueiredo-Silva A.C., Corraze G., Kaushik S., Peleteiro J.B. and Valente L.M., 2010. Modulation of blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*) intermediary metabolic pathways by dispensable amino acids. Amino acids, 39(5), 1401-1416.

Garcia-Carreno, F.L. and Haard, N.F., 1993. Characterization of proteinase classes in *Langostilla Pleuroncodesplanipes* and Crayfish *Pacifastacus astacus* extracts. Journal of Food Biochemistry, 17: 97–113.

Grosell, M., Blanchard, J., Brix, K.V. and Gerdes, R., 2007. Physiology is pivotal for inter- actions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. Aquatic Toxicology, 84: 162–172.

Han, X.Y., Du, W.L., Huang, Q.C., Xu, Z.R. and Wang, Y.Z., 2012. Changes in small intestinal morphology and digestive enzyme activity with oral administration of copper-loaded chitosan nanoparticles in rats. Biological trace element research, 145(3): 355-360.

Handy, R.D., 2003. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 135(1): 25-38.

Handy, R.D., Sims, D.W., Giles, A., Campbell, H.A. and Musonda, M.M., 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. Aquatic Toxicology, 47: 23–41.

Hanhineva, K., Torronen, R., Bondia-Pons, I., Pekkine, J., Kolehmainen, M., Mykkanen, H.and Poutanen, K., 2010. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. International Journal of Molecular Sciences, 11: 1365-1402.

Holloway, A.C., Keene, J. L., Noakes, D.G. and Moccia, R.D., 2004. Effects of clove oil and MS- 222 on blood hormone profiles in rainbow trout *oncorhynchus mykiss*, Walbaum. Aquaculture Research, 35: 1025-1030.

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.

Hussain, S.M., Hess, K.L., Gearhart, J.M. and Geiss, K.T., 2005. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro, 19(7): 975–983.

Iijima, N., Ota, Y. and Tanaka, S., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from hepatopancrease of red sea bream *Pagarus major*. Fish Physiology and Biochemistry, 18: 59-69.

Ispas, C., Andreescu, D., Patel, A., Goia, D. V., Andreescu, S. and Wallace, K.N., 2009. Toxicity and developmental defects of different sizes and shape nickel nanoparticles in zebrafish. Environmental Science and Technology, 43(16): 6349-6356.

Jain, K.L., 2009. Chronic effects of heavy metals on the activity of some digestive and metabolic enzymes in *Cyprinus carpio*. Annals of Biology, 25(1): 63-67.

Jang, I.S., Ko, Y.H., Kang, S.Y. and Lee, C.Y., 2007. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. Animal Feed Science and Technology, 134(3): 304-315.

Jia, R., Cao, L., Du, J., Xu, P., Jeney, G. and Yin, G., 2013. The protective effect of silymarin on the carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in common carp (*Cyprinus carpio*). In Vitro Cellular and Developmental Biology-Animal, 49(3): 155-161.

Johari, S.A., Sourinejad, I., Barsch, N., Saed Moocheshi, S., Kaseb, A. and Nazdar, N., 2014. Dose physical production of nanoparticles reduce their ecotoxicity? A case of lower toxicity of AgNPs produced by laser ablation to Zebrafish (*Danio rerio*).

efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). Fish Physiology and Biochemistry, 20: 293-303.

Li, S.J., Li, J.L. and Wu, T.T., 2007. The effects of copper, iron and zinc on digestive enzyme activities in the hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) × *Oreochromis aureus* (Steindachner). Journal of Fish Biology, 71:1788–98.

Malekinejad, H., Alizadeh, A., Cheraghi, H., Meshkin, S. and Dardmeh, F., 2010. The protective effect of liquorice plant extract on CCl_4-induced hepatotoxicity in common carp (*Cyprinus carpio*). Veterinary Research Forum, 1(3): 158-164.

Marchioro, A., Mallmann, A.O., Diel, A., Dilkin, P., Rauber, R.H., Blazquez, F.J.H., Oliveira, M.G.A. and Mallmann, C.A., 2013. Effects of aflatoxins on performance and exocrine pancreas of broiler chickens. Avian Diseases, 57(2): 280-284.

Martin, M.A., Grando Serrano, A.B., Ramos, S., Pulido, A.I., Bravo, L. and Gova, L., 2010. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. Journal of Nutritional Biochemistry, 21(3): 196-205.

Molina, M.F., Sanchez-Reus, I., Iglesias, I. and Benedi, J., 2003. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects against ethanol-induced oxidative stress in mouse liver. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26:1398-1402.

International Journal of Aquatic Biology, 2(4):188-192.

Kasprzak, K.S., Sunderman Jr, F.W. and Salnikow, K., 2003. Nickel Carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 533(1-2): 67-97.

Kaur, M. and Agarwal, R., 2007. Silymarin and epithelial cancer chemoprevention: how close we are to bedside? Toxicology and Applied Pharmacology, 224(3): 350-359.

Kim, S., Choi, J.E., Choi, J., Chung, K.H., Park, K., Yi, J. and Ryu, D.Y., 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. Toxicology *In Vitro*, 23(6):1076-1084.

Kovriznych, J.A., Sotnikova, R., Zeljenkova, D., Rollerova, E. and Szabova, E., 2014. Long- term (30 days) toxicity of Nio nanoparticles for adult zebrafish (*Danio rerio*). Interdisciplinary Toxicology, 7(1): 23- 26.

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.

Lemieux, H., Blier, P. and Dutil, J., 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion

Mustafa, S.A., Davies, S.J. and Jha, A.N., 2012. Determination of hypoxia and dietary copper mediated sub-lethal toxicity in carp, *Cyprinus carpio*, at different levels of biological organisation. Chemosphere, 87: 413–422.

Na, H.K. and Surh, Y.J., 2008. Modulation of Nrf2-mediated antioxidant and detoxifying enzyme induction by the green tea polyphenol EGCG. Food Chemistry and Toxicology, 46:1271-1278.

Nagata, H., Takekoshi, S., Takagi, T., Honma, T. and Watanabe, K., 1999. Antioxidative action of flavonoids, quercetin and catechin, mediated by the activation of glutathione peroxidase. Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine, 24 (1): 1-11.

Nakamura, S., Li, H., Adijiang, A., Pischetsrieder, and M., Niwa, T., 2007. Pyridoxal phosphate prevents progression of diabetic nephropathy. Nephrology Dialysis Transplantation, 22: 2165-2174.

Prabhu, S. and Poulose, E. K., 2012. Silver nanoparticles : mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. International Nano Letters, 2(32): 5326- 2- 32.

Ramsden, C., Smith, T.; Shaw, B. and Handy, R., 2009. Dietary exposure to titanium dioxide nanoparticles in rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): no effect on growth, but subtle biochemical disturbances in the brain. Ecotoxicology, 18: 939-951.

Rather, M.A., Sharma, R., Aklakur, A., Ahmad, S., Kumar. N., Khan, M. and Ramya, V.L., 2011. Nanotechnology: A novel tool for aquaculture and fisheries development. A prospective mini- review. Fisheries and Aquaculture Journal, 1-5.

Razavipour, S.T., Behnammorshedi, M. R., Razavipour, R. and Ajdary, M., 2015. The toxic effect of nickel nanoparticles on oxidative stress and inflammatory markers. Biomedical Research, 26(2): 370-374.

Sabapathy, U. and Teo, L.H., 1992. A kinetic study of the α-amylase from the digestive gland of *Perna viridis* L. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 101B:73-7.

Sarkar, B., Kumar, M., Verma, S. and Rhathore, R.M. 2015. Effect of dietary nanosilver on gut proteases and general performance in zebrafish (*Danio rerio*). International Journal of Aquatic Biology, 3(2):60-67.

Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Senapati, T., Kole, D. and Ghosh, A.R., 2014. Effects of almix herbicide on profile of digestive enzymes of three freshwater teleostean fishes in rice field condition. Toxicology Reports, 1: 379-384.

Sersen, F., Vencel, T. and Annus, J., 2006. Silymarin and its components scavenge phenylglyoxylic ketyl radicals. Fitoterapia, 77: 525- 529.

Suzer, C., Saka, Ş. 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.

Tee, J.K., Ong, C.N., Bay, B.H., Ho, H.K. and Leong, D.T., 2015. Oxidative stress by inorganic nanoparticles. WIREs Nanomed Nanobiotechnol. doi: 10.1002/wnan.1374.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 39: 44-84.

Wang, W.X. and Fisher, N.S., 1999. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. Science of the Total Environment, 237: 459-472.

Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z. and Yan, S., 2015. A comparison effect of copper nanoparticles versus copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*: growth parameters, digestive enzymes, body composition, and histology as biomarkers. International Journal of Genomics.

Whittington, R., Lim, C. and Klesius, P., 2005. Effect of dietary h-glucan levels on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae* vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 248: 217- 225.

Worthington, C.C., 1991. Worthington enzyme manual related biochemical. 3rd Edition. Freehold. New Jersey. 38-42.

Yah, C.S., Iyuke, S. E. and Simate, G.S., 2011. A review of nanoparticles toxicity and their routes of exposures. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 8(1): 299-314.

Yan, T., Teo, L.H. and Sin, Y.M., 1996. Effects of metals on α-amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 56(**4**): 677-682.

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.

Zambonino-Infante, J.L. and Cahu, L.C., 1999. High dietary lipid levels enhance digestive tract maturation and improve *Dicentrarchus labrax* larvae development. The Journal of Nutrition, 129: 1195-1200.

Zhan, X.A., Li, J.X., Xu, Z.R. and Wang, M., 2005. Effects of fluoride on pancreatic digestive enzyme activities and ultrastructure in young pigs. Fluoride, 38(**3**), p.215.

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y. and Chen, Y., 2010. Trophic transfer of TiO_2 nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. Chemosphere, 79(9): 928-933.

Digestive enzymes activity and growth indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets supplemented with silymarin and Nickle Oxide nanoparticles

Nazdar N.[1], Imani A.[1*], Noori F.[2], Sarvi Moghanlou K.[1]

[*]a.imani@urmia.ac.ir

1-Faculty of Natural Resources, Urmia University
2-Urmia Lake Research Institute, Urmia University

Abstract

There is growing concern regarding nano-sized material discharge into water bodies and their subsequent toxicity to aquatic lives owing to increasingly rapid development and industrial applications of nanoparticles. This study evaluates the oral prescription of silymarin and Nickel Oxide nanoparticles in rainbow trout with an emphasis on growth indices and digestive enzymes activity. To that end, 1200 fish (3.83±0.01g) were randomly allotted into 8 distinct treatments including control group without any supplemental dietary Nickel Oxide nanopartcles or silymarin and the remaining seven experimental groups comprised of different combinations of Nickel Oxide nanoparticles (0, 100 and 500 mg /kg feed) and silymarin (0 and 1 g /kg feed) in the first and second month of the trial. All treatments were carried out in trplicate and the experiment lasted for 60 days. Results showed that the highest amylase activity was recorded in treatment 6 (16.56±1.00) (0 mg Nickel nanoparticle along with 1 g silymaryn - 500 mg Nickel nanoparticle and 1 g silymarin) which significantly differed from treatments 5 (0 mg Nickel Oxide nanoparticles and 1 mg silymarin-100 mg Nickel Oxide nanoparticles with 1 mg silymarin), 7 and 8 (fed diets containing 100 and 500 mg Nickel Oxide nanoparticles, respectively) ($P \leq 0.05$). The highest alkaline protease activity was observed in treatment 1 (0.54±0.05) (without any supplemental Nickel or silymarin), which was significantly different from those of treatments 7 and 8 ($P \leq 0.05$). The highest lipase activity was reported for treatment 4 (1.03±0.04) (500 mg Nickel nanoparticle with 1 g silymaryn- 0 mg nanoparticle and 1 g silymarin) which was significantly different from other treatments ($P \leq 0.05$). The results showed that simultaneous use of Nickel nanoparticle and silymarin in treatments 3, 4, 5 and 6 led to higher digestive enzymes activities in comparison to treatments 7 and 8. However, growth indices did not show any noticeable differences amongst studied treatments. It seems that in a long term exposure to Nickel Oxide nanoparticles and simoltanoues dietary silymarin inclusion, it would also be possible to observe differences in growth and nutritional indices, requiring furthure clarification.

Keywords: Digestive enzymes, Growth indices, Nickel Oxide nanoparticles, Silymarin, *Oncorhynchus mykiss*.

[*] Corresponding author