تأثیر مخمر غنی‌شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر پارامترهای رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در دوگونهٔ آرتمیا

ثریا عسگری[۱]، ابراهیم حسین نجدگرامی*، صمد زارع[۱]، رامین منافر[۲]

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
[۲]گروه شیلات، دانشکدهٔ منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
*مسئول مکاتبات: e.gerami@urmia.ac.ir

چکیده. امروزه نانوذرات فلزی کاربرد وسیعی در صنایع مختلف دارند. در بین نانوذرات مورد استفاده، دی‌اکسیدتیتانیوم، با توجه به استفادهٔ وسیع آن، نگرانی‌هایی را ازنظر اکوتوکسیکولوژی و اکوفیزیولوژی بعداز ورود به منابع آبی ایجاد کرده است. در این آزمایش، تأثیر استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر رشد، زنده‌مانی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در دو گونهٔ *آرتمیا ارومیانا* و *آرتمیا فرانسیسکانا* بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از مخمر غنی‌شده با این نانوذره تأثیر معنی‌دار بر رشد دو گونهٔ آرتمیا ندارد ولی به‌طور معناداری میزان زنده‌مانی *آرتمیا فرانسیسکانا* را افزایش می‌دهد و تأثیر معنی‌داری هم بر زنده‌مانی *آرتمیا ارومیانا* ندارد. فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت تأثیر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم قرار گرفت و نتایج نشان داد که استفاده از این نانوذره، فعالیت آنزیم‌های گوارشی را در *آرتمیا ارومیانا* به طور معناداری کاهش می‌دهد و برعکس، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در *آرتمیا فرانسیسکانا* مشاهده شد. میزان درصد چربی بدن تحت تأثیر مخمر غنی‌شده با دی‌اکسیدتیتانیوم در *آرتمیا ارومیانا* کاهش یافت ولی اختلاف معنی‌دار در *آرتمیا فرانسیسکانا* مشاهده نشد. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند، علاوه‌بر بحث سمی‌بودن در اکوسیستم‌های آبی، ازنظر اکوفیزیولوژی نیز برای جانداران آبزی مهم باشد.

واژه‌های کلیدی. *آرتمیا فرانسیسکانا*، *آرتمیا ارومیانا*، نانوذرهٔ فلزی، اکوفیزیولوژی

The effect of titanium dioxide nanoparticles enriched yeast on the growth performance, digestive enzymes activity and lipid metabolism in two *Artemia* species

Sorayya Asgari [1], Ebrahim H. Najdegerami[1*], Samad Zare[1], Ramin Manaffar[2]

Received: 11/01/2016 / Accepted: 12/06/2016

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran
[2]Department of Aquaculture, Faculty of Natural Science, Urmia University, Urmia, Iran
*Correspondent author: e.gerami@urmia.ac.ir

Abstract. Nowadays, nanoparticles (NPs) have a great potential application in different industries. Titanium dioxide NPs cause the biggest eco-toxicological and eco-physiological concerns due to the increase of anthropogenic input into the aquatic ecosystems, compared with other NPs. In this study, the impact of yeast enriched with titanium dioxide NPs on the growth, survival, digestive enzyme activity and lipid metabolism in *Artemia urmiana* (AU) and *Artemia franciscana* (AF) is investigated. The experiment was designed in two treatments (control and enriched yeast with titanium dioxide NPs) and each with four replicates for both *Artemia* species. The investigation indicated that titanium dioxide nanoparticles did not affect the *Artemia* species growth but increased AF survival significantly. However, No significant difference was observed in AU survival. Also, the results showed that NPs decreased AU digestive enzyme activity significantly and the reverse pattern was observed for AF. The impact of NPs on the body lipid content was investigated in *Artemia* species and the results revealed that using this NPs decrease this parameter in AU but did not affect on AF lipid body content. The results obtained in this experiment suggest that the eco-physiological effects of titanium dioxide NPs differ in *Artemia urmiana* and *Artemia franciscana*.

Keywords. *Artemia franciscana*, *Artemia urmiana*, magnetic nanoparticles, ecophysiology

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

مقدمه

مواد نانو براساس تعریف، شامل موادی مانند ذره‌های نانو، میکروتیوب‌های نانو، ساختارها و پوشش‌های نانو هستند که اندازه آنها کمتر از صد میکرون باشد (Martin, 1994). این مواد در مقایسه با ساختارهای مشابه میکرو خود دارای ویژگی‌های متفاوت از نظر شیمیایی و فیزیکی هستند (Smith *et al.*, 2008; Nel *et al.*, 2009). به‌این‌دلیل، دارای کاربرد وسیعی در صنایع مختلف الکترونیکی، کشاورزی و بهداشتی هستند (Smith *et al.*, 2008; Tiede *et al.*, 2009). تأثیر مثبت استفاده از این مواد به منزلهٔ واسطه‌های سلولی، تأثیر در تمایز و تکثیر سلولی، تأثیر ضدباکتریایی و همچنین کاربردهای بهداشتی آنها در مطالعات و منابع مختلف گزارش شده است (Kim *et al.*, 2011; Xiong *et al.*, 2011; Chojnacki & Sliwinsk, 2013)، ارزش مبادلات تجاری این صنعت به حدی است که در سال ۲۰۱۴، به حدود ۲/۴ تریلیون دلار رسیده است (Holman & Lackner, 2006). درعین‌حال، استفاده از نانوذرات در علوم مختلف موجب شده است که مقادیر بسیار بالایی از این دسته مواد در محیط پیرامون ما آزاد شوند و گسترش آن در طبیعت احتمال تأثیر آنها بر ارگانیسم‌های زنده را افزایش داده است (Sharma *et al.*, 2009). این مواد یا به‌صورت غیرمستقیم ازطریق تولید انواع اکسیژن فعال و در نتیجهٔ ایجاد استرس اکسیژنی و تخریب غشای سلولی، تخریب پروتئین‌ها و DNA در موجودات زنده می‌توانند تأثیرگذار باشند (Holbrook, 2000; Finkel & Winterbourn, 2008). همچنین به‌صورت مستقیم موجب تخریب فیزیکی ساختارهای مهم سلولی مانند میتوکندری می‌شوند و عملکرد سلول را مختل می‌کنند (Xia *et al.*, 2006; Hsin *et al.*, 2008).

درمیان نانوذرات اکسید فلزی، نانوذرهٔ دی‌اکسیدتیتانیوم بیشترین کاربرد را نسبت به دیگر نانوذرات در صنعت دارند (Jovanovic, 2011). بنابراین، نگرانی دربارهٔ آلودگی‌های محیطی با توجه به روند روبه‌افزایش ورود نانوذرهٔ دی‌اکسیدتیتانیوم نسبت به دیگر نانوذرات در محیط‌های طبیعی بیشتر است. این نانوذره در رنگ و پوشش خارجی قرص‌ها و کپسول‌های آنتی بیوتیک (Luft *et al.*, 2010)، کرم‌های ضدآفتاب، برخی لوسیون ها و دیگر لوازم بهداشتی (Melquiades *et al.*, 2008) و همچنین محصولات کاغذی، پلاستیک، جوهر و به مثابهٔ رنگ غذا (چهار میلیون‌تن در سال) در صنایع غذایی کاربرد دارد (Ortlieb, 2010). درنتیجه استفاده وسیع و آب‌شویی حاصل از آن، حجم عظیمی از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم وارد منابع و اکوسیستم‌های آبی می‌شود و براساس برخی تخمین‌ها غلظت این نانوذرات در منابع آبی به حدود ۰/۰۲۴ و ۰/۰۰۰۷ میکروگرم در میلی‌لیتر رسیده است (Kaegi *et al.*, 2008; Mueller & Nowak, 2008).

بیشتر تحقیقات در زمینهٔ سمیت نانوذرات دربارهٔ سیستم تنفسی پستانداران یا دیگر سلول‌های آنها در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفته است (Handy & Shaw, 2007). ازجملهٔ این تحقیقات، نتایج آزمایش‌هایی است که تأثیر نانوذرهٔ دی‌اکسیدتیتانیوم را در التهاب سلول‌های اپی‌تلیال ریه، تخریب DNA و اکسیداسیون چربی‌ها در پستانداران مختلف گزارش کرده‌اند (Bermudez *et al.*, 2002, 2004; Warheit *et al.*, 2005, 2006; Federici *et al.*, 2007). افزایش سمی‌بودن نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در ایجاد التهاب‌های ریوی، ارتباط افزایش میزان ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها با کاهش اندازهٔ ذرات، از دیگر نتایج تحقیقات مرتبط با این مسئله بود (Bermudez *et al.*, 2004).

تحقیقات در زمینهٔ تأثیر نانوذرهٔ دی‌اکسیدتیتانیوم در میان آبزیان بسیار محدود است و تأثیر منفی آن بر مرگ‌ومیر برخی بی‌مهرگان مانند *دافنی‌ماگنا* (*Daphnia magna*) و کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با کاهش اندازهٔ ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ثابت شده است (Zhang *et al.*, 2007; Federici *et al.*, 2007; Klaper *et al.*, 2009). باتوجه به بررسی‌های نگارنده مطالعه‌هایی که تأثیر نانوذرات اکسیدتیتانیوم را از بُعد فیزیولوژیکی (آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی) در آبزیان بررسی کرده باشد بسیار محدودند و بررسی این پارامترها در موجودی مانند آرتمیا که به‌منزلهٔ یک مدل حیوانی در بررسی‌های زیستی مطرح است می‌تواند به روشن‌شدن زوایای مختلف نقش نانوذرات در اکوسیستم‌های طبیعی کمک کند. بنابراین، این طرح با هدف بررسی تأثیر مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید تیتانیوم بر رشد، بقا، متابولیسم چربی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در تغذیهٔ *آرتمیا ارومیانا* به‌عنوان یک گونهٔ بومی و

همچنین *آرتمیا فرانسیسکانا* به‌مثابهٔ یک گونهٔ وارداتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

سیست مربوط به دو گونهٔ *A.urmiana* و *A. franciscana* از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه تهیه گردید. برای تفریخ سیست‌ها از روش استاندارد سورگیلوس و همکاران (۱۹۸۶) استفاده شد. تعداد هشتادهزار عدد ناپلی تفریخ‌شده از هرگونه بعداز شمارش به شانزده ظرف یک‌لیتری با تراکم یک-ناپلی در دو میلی‌لیتر منتقل شد. تیمارهای آزمایش هر کدام با سه تکرار به این شرح بودند: ۱- تغذیهٔ *آرتمیا ارومیانا* با مخمر غنی‌نشده ۲- تغذیهٔ *آرتمیا ارومیانا* با مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس ۳- تغذیهٔ *آرتمیا فرانسیسکانا* با مخمر غنی‌نشده ۴- تغذیهٔ *آرتمیا فرانسیسکانا* با مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس.

تغذیهٔ ناپلی‌ها براساس پروتکل‌های استاندارد، با جلبک و مخمر در آزمایشگاه انجام گرفت. مخمر لازم برای تغذیهٔ آرتمیا در شرایط آزمایشگاهی کشت و با نانوذرهٔ دی‌اکسید تیتانیوم، به منظور تولید نانوذرات بیولوژیک غنی‌سازی شدند. وجود این نانوذره در دیوارهٔ مخمرها با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نوع روبشی (SEM) تأیید شد. برای تهیهٔ مخمر غنی‌شده با نانوذرهٔ دی‌اکسید تیتانیوم، مشخص شده بود که بهترین غلظت نانوذرات برای جلوگیری از توده (bulk)، حدود ۵ mg/l است. بنابراین، به۶۰۰ میلی‌لیتر حجم ارلن، حدود ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول نانوذرهٔ دی‌اکسیدتیتانیوم با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۶ میلی‌لیتر از محلول آلبومین اضافه شد. سپس ۲ گرم مخمرخشک که در ۱۵ cc آب مخلوط شده بود به درون ظرف کشت غنی‌شده افزوده و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶/۵ درجهٔ سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار نگهداری شد. مخمرهای غنی‌شده با نانوذرات در دور ۳۵۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شده و مخمرهای غنی‌شده جهت استفاده‌های بعدی به فریزر منتقل شد. مخمر غنی‌شدهٔ فوق برای تغذیهٔ دوگونهٔ آرتمیا در تیمارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفت.

برای گروه شاهد، از مخمر معمولی که با نانوذرات دی-اکسیدتیتانیوم غنی‌سازی نشده بود استفاده شد. درطول مدت پرورش ناپلی‌ها، دمای آب درون هر بطری ۱±۲۵ درجهٔ سلسیوس و pH آب بین ۸ الی ۸/۶ بوده و هوادهی از انتهای بطری‌ها انجام می‌گرفت و رژیم نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) بود. نوردهی توسط لامپ مهتابی بود و تمام ویژگی‌های محیطی و پرورشی بجز نوع تغذیه برای تمام بطری-ها ثابت و یکسان بود. در هر بطری پرورشی تجدید و تعویض آب در روزهای ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ انجام شد. در هر تعویض آب، رشد و بازماندگی آرتمیاهای درون بطری‌ها تعیین می‌شد.

تعیین رشد و زنده‌مانی آرتمیا

بررسی میزان رشد و زنده‌مانی گونه های آرتمیا در تیمارها بر اساس استفاده از تکنیک استاندارد (Browne *et al.*, 1988; Triantaphyllidis *et al.*, 1995) که برای بررسی‌های بیولوژیک آرتمیا تعریف شده بود استفاده شد. جهت بررسی میزان رشد آرتمیا، طول بدن از ناحیهٔ چشم سوم تا انتهای بدن در روزهای ۷، ۱۱ و ۱۵ اندازه‌گیری شد. برای این منظور، از ۴ تکرار مختلف هر تیمار، جمعاً تعداد ۲۰ آرتمیا به‌طور تصادفی انتخاب و به داخل چاهک‌های میکروپلیت منتقل شدند؛ سپس با افزودن چند قطره محلول لوگول ۱ درصد، آرتمیاها کشته و تثبیت می‌شدند و بلافاصله جهت بیومتری به روی لام منتقل می-شدند و توسط یک لوپ ترسیم زایس مدل Steme SV 11 مجهز به بیومتر چشمی اندازه‌گیری انجام شد. برای بررسی زنده-مانی آرتمیاها، با توجه به اینکه به‌صورت کنترل‌شده در درون ظروف ۱/۵ لیتری کشت داده می‌شوند از روش شمارش مستقیم که دقیق‌تر است استفاده شد. در این روش، تعداد آرتمیاها با بررسی هفتگی نمونه‌ها محقق می‌شود. در تحقیق حاضر تراکم اولیه ۵۰۰ لارو در یک‌لیتر آب بود. بنابراین، میزان زنده‌مانی در طول دورهٔ ۱۵روز پرورش در تیمارهای تحقیقاتی سنجیده شد. بدین‌منظور، میزان زنده‌مانی آرتمیاهای گروه‌های فوق نسبت به نمونه‌های تغذیه‌شده با مخمر غنی‌نشده در روزهای ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ تحت سنجش قرار گرفت. جهت این کار تمامی آرتمیاهای هر تکرار آزمایشی در هر گروه، با استفاده از فیلترهای ۲۰۰ میکرونی فیلتر و شمارش شد. درنهایت، تعداد آرتمیاهای باقی-

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

مانده نسبت به آرتمیاهای اولیه محاسبه شد و درصد آن به‌دست آمد.

اندازه‌گیری آنزیم‌های گوارشی

در انتهای دورهٔ پرورشی (روز پانزدهم) میزان یک گرم از هر تکرار برای بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی نمونه‌برداری شد.

درجهٔ سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی پس‌از جمع‌آوری به فریزر ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد منتقل شد.

برای اندازه‌گیری توتال پروتئاز از روش والتر و همکاران در سال ۱۹۸۴، پپسین از روش زامبونینو و کاهو در سال ۱۹۹۴، آنزیم آمیلاز از روش متاس و بیتس در سال ۱۹۶۸، آنزیم لیپاز با روش ایجیما در سال ۱۹۹۴ و برای اندازه‌گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش بسی و همکاران در سال ۱۹۴۶ استفاده شد.

میزان پروتئین کل در هموژنات براساس روش برادفورد در سال ۱۹۷۶ با استفاده از آلبومین گاوی به منزلهٔ استاندارد اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژهٔ این آنزیم‌ها براساس فعالیت آنزیم به‌ازای میلی‌گرم پروتئین بیان شد (U/mg protein).

بررسی ترکیب بدنی

در انتهای آزمایش و تغذیه با تیمارهای غذایی، ترکیب بدنی آرتمیاها با توجه به روش‌های استاندارد (AOAC, 2000) تحت بررسی قرار گرفت. درصد چربی آرتمیاها با توجه به روش فولش و همکاران در سال ۱۹۵۷ انجام شد که وی و هانان در سال ۱۹۶۴ آن را اصلاح کردند. پروفیل اسیدهای چرب لاروها به‌وسیله گاز کروماتوگرافی انجام شد و میزان FAME (Fatty Acid Methyl Ester) با استفاده از روش لیپیج و روی در سال ۱۹۸۴ انجام گرفت. با توجه به اینکه هدف اصلی این آزمایش بررسی تأثیر استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم بر رشد، زنده‌مانی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و درصد چربی بود، امکان تکرار آزمایش‌ها مربوط به پروفیل اسیدهای چرب نبود و داده‌های این بخش به‌دلیل کمبود بافت آرتمیا، فقط با یک تکرار انجام گرفت و نتایج مقایسه نشد و صرفاً گزارش پروفیل اسیدهای چرب در دو گونهٔ آرتمیا بعداز تغذیه با نانوذرات اکسیدتیتانیوم صورت گرفته است.

تمامی نمونه‌ها در یک بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl با نسبت ۹ به یک دستگاه هموژنایزر (Heidolph, Switzerland) هموژنایز شدند. با توجه به وضعیت خاص آنزیم‌های گوارشی، تمام مراحل تهیهٔ محلول آنزیم‌های گوارشی از هموژنایزکردن تا سانتریفیوژ در درجهٔ حرارت ۴ درجهٔ سانتی‌گراد انجام گرفت. محلول هموژنایزشده با سرعت g ۲۰۰۰۰ برای ۲۰ دقیقه در ۴

محاسبات آماری

داده‌های به‌دست‌آمده در این طرح قبل‌از انجام هرگونه تحلیل آماری از نظر نرمال‌بودن داده‌ها ارزیابی شدند. سپس براساس روش‌های موجود، از آزمون T برای مقایسهٔ میانگین‌ها در نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۱۷ (SPSS Inc., IL, USA) استفاده شد.

نتایج

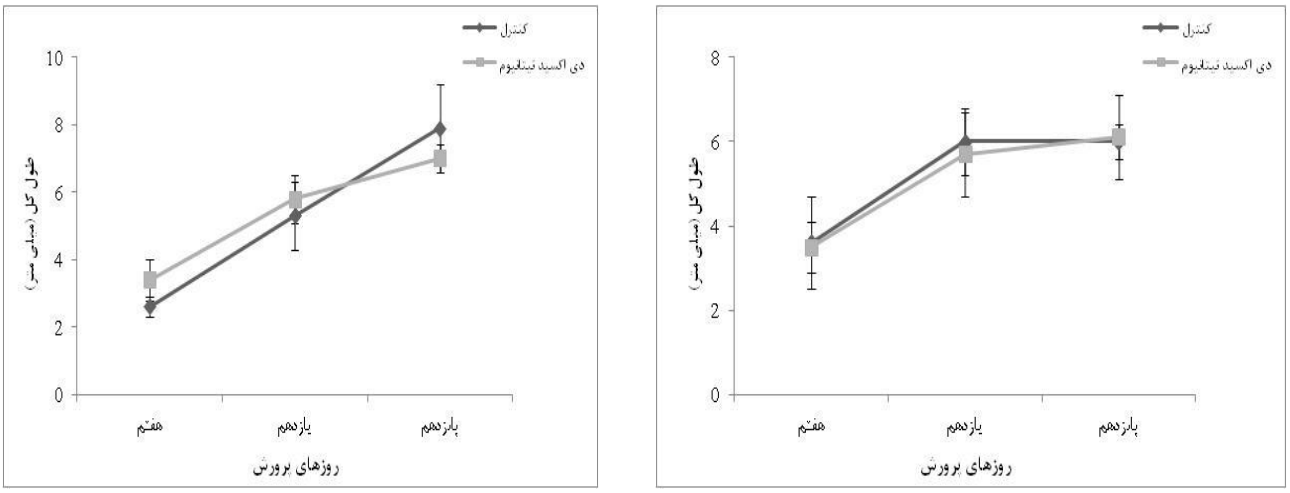
نتایج استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در تغذیهٔ دو گونهٔ آرتمیا و تأثیر آن بر رشد آنها در شکل ۱ آمده است. چنان‌که مشاهده می‌شود

تأثیر استفاده از مخمر ساده به‌منزلهٔ تیمار کنترل و مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید تیتانیوم بر رشد *آرتمیا اورمیانا* و *آرتمیا فرانسیسکانا* در پایان روز پانزدهم معنادار نبوده است ($P\geq0.05$). *آرتمیا اورمیانا* باتوجه به ماهیت گونه‌ای خود دارای رشد سریع‌تر و اندازهٔ بزرگ‌تر است و روند رشد آن نیز در شکل ۱ سمت چپ کاملاً مشهود است. نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی گونهٔ *آرتمیا اورمیانا* بعداز تغذیه با تیمار کنترل و نانوذرات اکسیدتیتانیوم مشابه با الگوی رشد بود و استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم نتوانست رشد *آرتمیا اورمیانا* را به‌طور معناداری در طول دورهٔ پرورش افزایش دهد ($P\geq0.05$) (شکل ۲). درحالی‌که نتایج در بارهٔ *آرتمیا فرانسیسکانا* نسبت به گونهٔ *آرتمیا اورمیانا* در این مورد متفاوت بود و استفاده از تیمار نانوذرهٔ اکسید تیتانیوم به‌طور معناداری میزان زنده‌مانی گونهٔ *آرتمیا فرانسیسکانا* را نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($P\leq0.05$).

تأثیر استفاده از مخمر غنی‌شده با اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در هر دو گونهٔ آرتمیا در جدول ۱ مشاهده می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که الگوی تأثیر نانوذرات اکسیدتیتانیوم

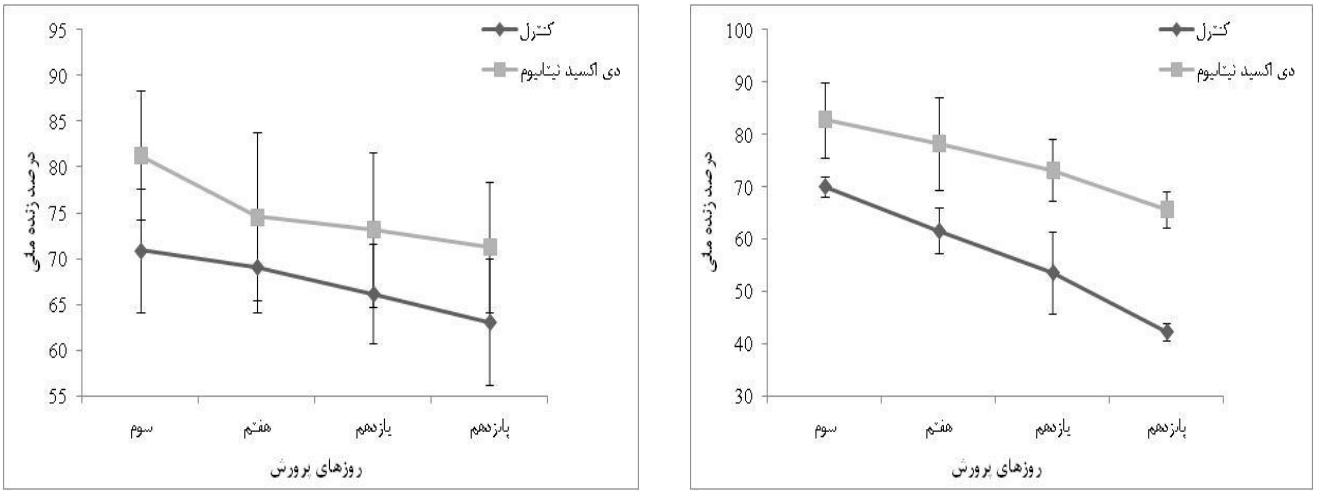
[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونهٔ *آرتمیا ارومیانا* و *آرتمیا فرانسیسکانا* متفاوت است. ولی نکته‌ای که در هر دو گونه به‌طور مشابه اتفاق افتاد تأثیر افزایشی بسیار معنی‌دار استفاده از نانوذرات اکسید تیتانیوم، در افزایش فعالیت پروتئاز کل در هر دو گونه بود ($P\leq0.05$). درباب دیگر آنزیم‌های گوارشی، استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسیدتیتانیوم فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز را به طور معناداری کاهش داد ($P\leq0.05$)، درحالی‌که عکس این مسئله دربارهٔ گونهٔ *آرتمیا فرانسیسکانا* اتفاق افتاد و تغذیهٔ این گونه با مخمر غنی‌شده با اکسیدتیتانیوم فعالیت آنزیم‌های پیش‌گفته را به‌طور معناداری افزایش داد ($P\leq0.05$). نتایج مربوط به تأثیر اکسیدتیتانیوم بر درصد چربی بدن و همچنین پروفایل اسیدهای چرب به‌ترتیب در شکل ۳ و جدول ۲ ارائه شده است.



شکل ۱- تأثیر استفاده از نانوذرهٔ اکسیدتیتانیوم بر رشد دو گونهٔ *آرتمیا ارومیانا* (چپ) و *آرتمیا فرانسیسکانا* (راست) بعداز ۱۵ روز پرورش.

Fig. 1. The effects of titanium dioxide nanoparticles on growth rate of *A. urmiana* (Left) and *A. franciscana* (Right) after 15 days experiment period.



شکل۲- تأثیر استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم بر زنده‌مانی دو گونهٔ *آرتمیا ارومیانا* (چپ) و *آرتمیا فرانسیسکانا* (راست) بعداز ۱۵ روز پرورش.

Fig. 2. The effects of titanium dioxide nanoparticles on survival percentage of *A. urmiana* (left) and *A. franciscana* (right) after 15 days experiment period.

نتایج نشان داد که استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسیدتیتانیوم تأثیر معنی‌دار بر میزان چربی *آرتمیا فرانسیسکانا* ندارد ($P\geq0.05$) ولی به‌طور معنی‌داری میزان چربی *آرتمیا ارومیانا* را کاهش می‌دهد ($P\leq0.05$). چنانچه در بخش مواد و

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

روشها اشاره شد پروفایل اسیدهای چرب در دو گونهٔ آرتمیا چون با یک تکرار انجام شد امکان مقایسهٔ آنها وجود نداشت، ولی افزایش محسوسی در میزان اسیدهای چرب اشباع، غیراشباع، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک در هر دو گونهٔ آرتمیا مشاهده شد و الگوی تغییرات مشابه بود. برعکس، استفاده از نانوذرات اکسید تیتانیوم، میزان اسیدهای چرب را در هر دو گونه کاهش داد که بیانگر پتانسیل بالای این نانوذرات فلزی است.

بحث

محیط‌های آبی، باتوجه به سیال بودن و همچنین سهولت گسترش ازجملهٔ منابعی هستند که نانوذرات در آن پراکنش یافته و با توجه به ویژگی‌های خود می‌توانند موجب تغییراتی در عملکرد فیزیولوژیک آبزیان (به منزلهٔ یکی از حلقه‌های اولیهٔ زنجیرهٔ غذایی) و همچنین انسانها (به منزلهٔ حلقهٔ آخر زنجیره) شوند (Ates *et al.*, 2013). بنابراین، در سال‌های اخیر، تمرکز بر روی اکوفیزیولوژی و توکسیکولوژی این دسته از مواد افزایش یافته است. آرتمیا به مثابهٔ سخت‌پوستی آبزی، دارای سیستم تغذیه‌ای فیلترکنندگی غیرانتخابی است؛ بنابراین، می‌تواند تمامی ذراتی را که کوچک‌تر از ۴۰ میکرون باشند فیلتر و استفاده کند (Ates *et al.*, 2013). این مسئله درکنار دیگر ویژگی‌های آرتمیا، آن را به یک مدل حیوانی در مطالعات مربوط به توکسیکولوژی و اکو فیزیولوژی تبدیل کرده است.

جدول ۱- تأثیر استفاده از نانوذرات بیولوژیک اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی *A. urmiana* و *A. franciscana*

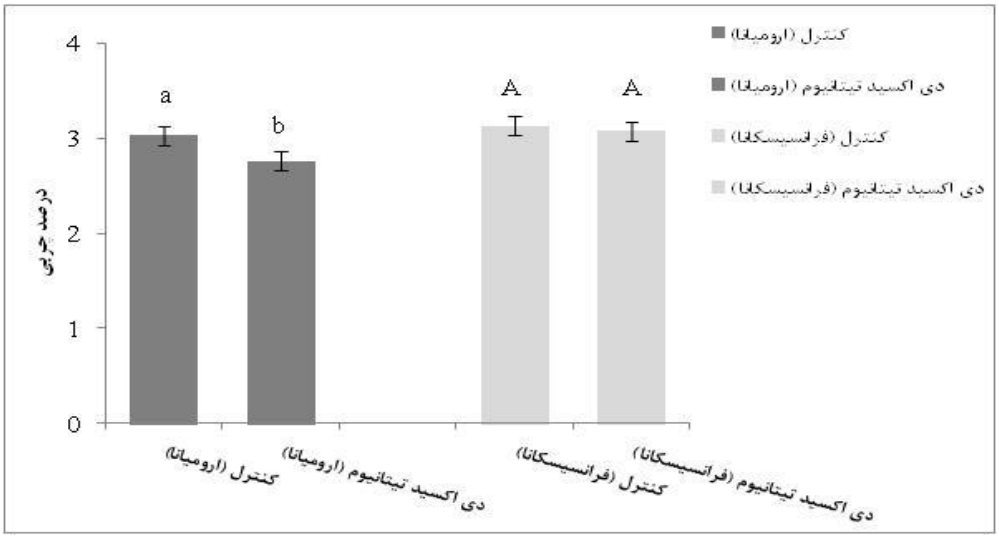
Table 1.The effects of titanium dioxide nanoparticles on *A. urmiana* and *A. franciscana* digestive enzymes activity

	Control	TiO_2
A. urmiana		
Protease	6.9±2.0 [b]	46.4±15.1[a]
Pepsin	43.3±7.4	36.3±8.1
Amylase	0.005±0.0 [a]	0.0011±0.0 [b]
Lipase	0.51±0.08 [a]	0.24±0.03 [b]
Alkaline Phosphatase	0.055±0.02 [a]	0.022±0.0 [b]
A. franciscana		
Protease	0.23±0.1[b]	168.1±15.0 [a]
Pepsin	22.1±6.0 [b]	224.1±22.0 [a]
Amylase	0.0004±0.0 [b]	0.0035±0.0 [a]
Lipase	0.009±0.0 [b]	0.58±0.1 [a]
Alkaline Phosphatase	0.017±0.0 [b]	0.07±0.0 [a]

- فعالیت ویژهٔ آنزیم‌های گوارشی براساس توتال پروتئاز و پپسین براساس mmol of tyrosine released / min/ mg protein، آمیلاز mg starch hydrolyzed / min /mg protein، لیپاز mmole of substrate hydrolyzed / minute / mg protein، آلکالین فسفاتاز mmol substrate released / min / mg protein at 37˚ C *داده‌ها براساس mean ± SD گزارش شدند و داده‌هایی با حروف مختلف در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵درصد هستند.

- Specific enzymes activity: Total protease and pepsin, mmol of tyrosine released / min/ mg protein; Amylase, mg starch hydrolyzed / min /mg protein; Lipase, mmole of substrate hydrolyzed / minute / mg protein; Alkaline phosphatase, mmol substrate released / min / mg protein at 37˚ C *Data are presented as mean ± SD and means with the same superscript letters suggest no significant differences, while different letters significant differences ($P<0.05$).

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]



شکل ۳- تأثیر استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم بر درصد چربی بافت دو گونهٔ *آرتمیا ارومیانا* و *آرتمیا فرانسیسکانا* بعداز اتمام دورهٔ پرورش.

Fig. 3. The effects of titanium dioxide nanoparticles on *A. urmiana* and *A. franciscana* lipid percentage at the end of the experiment.

جدول۲- تأثیر استفاده از نانوذرات بیولوژیک اکسیدتیتانیوم بر پروفایل اسیدهای چرب *A. urmiana* و *A. franciscana*

Table 2. The effects of titanium dioxide nanoparticles on *A. urmiana* and *A. franciscana* fatty acids profiles.

	Control	**TiO_2**
A. urmiana		
Total saturated	16.2	22.5
Total monoensaturated	14.7	39.7
C18:2n6	7.8	11.4
C18:3n3	10.3	14.5
C20:4n6	0.7	0
C20:5n3(EPA)	16.5	0
C22:6n3(DHA)	0.25	0.12
A. franciscana		
Total saturated	21.8	19.4
Total monoensaturated	36.4	44
C18:2n6	9.3	11.6
C18:3n3	10.8	13.9
C20:4n6	0	0.11
C20:5n3(EPA)	4.7	0
C22:6n3(DHA)	1.4	0

با توجه به بررسی‌های نگارنده، مطالعات درباب تأثیر نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در آبزیان بسیار محدود است و بیشتر نتایج موجود به بررسی تأثیر غلظت، حالت‌های مختلف اکسیدهای فلزی (توده، پودر یا نانوذره) و نیز تجمع زیستی این نانوذرات بر سمی بودن و همچنین برخی از شاخص‌های فیزیولوژیکی آبزیان پرداخته است (Federici *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011; Ates *et al.*, 2013). نتایج مطالعات رامسدن و همکارانش (۲۰۰۹) دربارهٔ تأثیر استفاده از نانوذرات دی-اکسیدتیتانیوم (۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) در جیرهٔ غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که باوجود تمام تغییرات بیوشیمیایی که در برخی ارگان‌ها ازجمله مغز اتفاق افتاده بود تغییر معنی‌دار در شاخص‌های رشد بچه‌ماهیان بعداز اتمام دورهٔ پرورش مشاهده نشد. آنها دلیل این مسئله را غلظت پایین دی‌اکسیدتیتانیوم (Sub-lethal toxic) در جیرهٔ غذایی قزل‌آلا و در نتیجه سازگاری بچه‌ماهیان با این غلظت عنوان کردند. نتایج مطالعات آنها، مشابه نتایج هندی و همکاران ۱۹۹۹؛ هویل و همکاران ۲۰۰۷؛ و شاو و هندی ۲۰۱۱ بود. با توجه به بررسی‌های نگارنده، نتایج مطالعهٔ حاضر، اولین گزارش

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

درزمینهٔ تأثیر نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم بر رشد، زنده‌مانی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در *آرتمیا ارومیانا* و *آرتمیا فرانسیسکانا*، و جزء اولین گزارش‌ها دربارهٔ تأثیر این نانوذرات بر ترکیب بدنی در هر دو گونهٔ *آرتمیا* است. در این مطالعه، از مخمر غنی‌شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (شکل ارگانیک) برای تغذیهٔ هر دو گونهٔ آرتمیا استفاده شد و نتایج نشان داد که استفاده از این نانوذرات تأثیری معنی‌دار بر رشد *آرتمیا ارومیانا* و *آرتمیا فرنسیسکانا* ندارد. به نظر می‌رسد استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در غلظت مورد استفاده، نتوانسته سمیت لازم و در نتیجه کاهش رشد در آرتمیاها را داشته باشد و به‌نوعی سازگاری با این نانوذرات در محیط پرورش انجام گرفته است. همچنین استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم بر زنده مانی *آرتمیا ارومیانا* تأثیر معنی‌دار نداشت ولی میزان زنده‌مانی *آرتمیا فرانسیسکانا* را به‌طور معناداری افزایش داد. دلیل این امر دقیقاً مشخص نیست، ولی به‌نظر می‌رسد *آرتمیا ارومیانا* با توجه به شرایط خاص دریاچهٔ ارومیه، که حاوی مقادیر بالایی از انواع اکسیدهای فلزی است نسبت به این نانوذرات و همچنین نانوذرات دیگر حساسیت کمتری دارد (عسگری و همکاران، ۱۳۹۴) و در نتیجه میزان مرگ‌ومیر آن طبیعی بوده است و در مقابل نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم با تغییرات مثبت ازجمله نشان دادن خاصیت آنتی‌باکتریال (Brunet *et al.*, 2009; Visai *et al.*, 2011) و حذف باکتری‌های پاتوژن میزان زنده‌مانی *آرتمیا فرانسیسکانا* را که با توجه به ماهیت گونه‌ای خود که ذاتاً گونه‌ای حساس است افزایش داده است. تحقیق در مورد فلور باکتریایی محیط پرورش می‌تواند به اثبات این فرضیه کمک شایانی بکند.

فعالیت آنزیم‌های گوارشی (پروتئاز، آمیلاز و لیپاز) می‌تواند به منزلهٔ شاخص مصرف غذا و اختلاف رشد در آبزیان مطرح باشد (Sunde *et al.*, 2001; Gomez-Requeni *et al.*, 2013). شاید منبعی که به تأثیر استفاده از نانوذرات بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در آبزیان پرداخته است مطالعه وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در بارهٔ تأثیر استفاده از نانوذرات مس و همچنین یون مس به‌صورت سولفات مس بر فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در بچه‌ماهیان گروپر نارنجی (*Epinephelus coioides*) باشد. نتایج مطالعات آنها نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات مس و همچنین یون‌های فلزی مس، فعالیت آنزیم‌های مذبور کاهش پیدا می‌کند. دلایل مختلفی برای این کاهش در فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند مطرح باشد که ازجمله می‌توان به تأثیر مستقیم یون‌های فلزی در کاهش سنتز این آنزیم‌ها اشاره کرد (Dedourge-Geffard *et al.*, 2009). همچنین به تأثیر غیرمستقیم این مواد بر رفتار ماهی و تأثیر بر کیفیت مواد غذایی و درنتیجه کاهش مصرف غذایی در ماهی می‌توان اشاره کرد که ممکن است باعث کاهش ترشح آنزیم‌های گوارشی شود (Maltby & Crane, 1994; Sunde *et al.*, 2001; Suzer *et al.*, 2006).

مطالعات مختلف تغییر پروفایل آنزیم‌های گوارشی همانند تریپسین، آمیلاز و لیپاز را بعداز مجاورت با انواع فلزات نشان می‌دهد (Fouqueray *et al.*, 2013). افزایش فعالیت آنزیمهای گوارشی تریپسین، آمیلاز و لیپاز بعداز مجاورت با فلزات آهن و روی در ماهی کپور ازجمله این گزارش‌ها است (Ling *et al.*, 2010). همچنین نتایج تحقیق ساسترای و گوپتا و همکاران در سال ۱۹۷۹، افزایش فعالیت آنزیم پپسین و کاهش آنزیم فسفاتاز را بعداز مصرف کادمیوم به‌مدت ۳۰ روز در گربه‌ماهی نشان داد. درباب دی‌اکسید تیتانیوم، برخی گزارش‌ها کاهش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را بعداز استفاده از این اکسید فلزی نشان می‌دهد (Dedourge-Geffard *et al.*, 2009) که ممکن است به‌دلیل نقش منفی این اکسید فلزی در تغییررفتار تغذیه‌ای جاندار یا تأثیر مستقیم در فعالیت و سنتز آنزیم‌ها باشد. در مطالعهٔ حاضر، فعالیت آنزیم‌های گوارشی در *آرتمیا فرانسیسکانا* بعداز استفاده از این نانوذرات افزایش یافت و عکس این مسئله درباب *آرتمیا ارومیانا* مشاهده شد و استفاده از تیمار دی‌اکسید تیتانیوم فعالیت آنزیم‌های گوارشی را در گونهٔ اخیر به‌طور معناداری کاهش داد. با توجه به نکات بالا امکان رصد میزان تغذیهٔ آرتمیاها و بررسی تأثیر نانوذرات بر رفتار این جاندار وجود نداشت. بنابراین، تفکیک این مسئله که نانوذرات با کدام روش (تأثیر بر فعالیت و سنتز آنزیم‌ها یا تأثیر بر رفتار تغذیه‌ای) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تأثیرگذارند امکان‌پذیر نبود. به نظر می‌رسد تفاوت‌های گونه‌ای در رفتار و تغذیه ازجمله عوامل تأثیرگذار باشند. اگرچه نقش عوامل دیگر

ازجمله سازگاری گونه‌ها با اکسیدهای فلزی را در محیط‌های زندگی خود در طول هزاران سال نباید فراموش کرد.

تغییرات در متابولیسم چربی و پروفایل اسیدهای چرب ممکن است پاسخی به ویژگی‌های متضاد محیطی و تغذیه‌ای باشد که شاید با تغییر پروفایل اسیدهای چرب و همچنین درصد چربی موجود زنده همراه باشد (Fokina *et al.*, 2013). در مطالعهٔ حاضر، درصد چربی بدن در گونهٔ *آرتمیا ارومیانا* بعداز تغذیه با مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس کاهش یافت، ولی تغییر معنی‌داری در درصد چربی *آرتمیا فرانسیسکانا* مشاهده نشد. در مطالعهٔ رامسدن و همکاران در سال ۲۰۱۲، استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) در جیرهٔ غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کاهش درصد چربی در بچه‌ماهیان شد.

این کاهش درصد چربی با عدم تأثیرگذاری این نانوذرات بر رشد این بچه‌ماهیان همراه بود که در توضیح این مسئله، رامسدن و همکارانش استراتژی حفظ رشد با استفاده از روش‌های در دسترس را مطرح کردند. در این استراتژی، موجود برای حفظ رشد خود در مواجهه با استرس، از دیگر ذخایر موجود در بدن استفاده می‌کند.

به‌نظر می‌رسد حساسیت *آرتمیا ارومیانا* به سمیت دی-اکسیدتیتانیوم بیشتر از حساسیت آن به *آرتمیا فرانسیسکانا* باشد. با توجه به عدم رشد معنی‌دار در هر دو گونه در مواجهه به این نانوذره، *آرتمیا ارومیانا* از ذخایر چربی خود برای مقابله با سمیت نانوذرهٔ دی‌اکسید تیتانیوم استفاده کرده است.

تأثیر استفاده از اکسیدهای فلزی در تغییر پروفیل اسیدهای چرب در مطالعات مختلف گزارش شده است. در مطالعه سائز و همکاران (۲۰۱۳) تغییرات پروفایل اسیدهای چرب در مواجهه با غلظت‌های مختلف مس (سولفات مس) در ماهی گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*) تحت مطالعه قرار گرفت و نتایج عدم تغییر معنی‌دار این پروفایل را در این ماهی نشان داد. عکس این مسئله در کاهش محسوس اسیدهای چرب PUFA از جمله (EPA, DHA, AA) در مطالعه‌ای که مازوزی و همکاران (۲۰۰۸) انجام دادند گزارش شد. کاهش غلظت اسیدهای چرب اشباع و همچنین تک غیراشباع در آبشش صدف‌های تحت مطالعه و افزایش PUFA (EPA, DHA, AA) پس‌از مواجهه با غلظت‌های مختلف مس در مطالعه‌ای که فاکینا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام دادن از دیگر نتایجی بود که گزارش شد. در مطالعهٔ حاضر، میزان اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع، اسیدلینولئیک و اسیدلینولنیک در هر دو گونهٔ آرتمیا در تیمار نانوذرهٔ دی‌اکسید تیتانیوم، بیشتر از تیمار کنترل بود، درحالی‌که استفاده از نانوذرهٔ دی‌اکسید تیتانیوم مقادیر EPA, DHA را در هر دو گونه کاهش داد.

نتایج این تحقیق، مشابه نتایج مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۱۳) و مازوزی و همکاران (۲۰۰۸) است که افزایش اسیدهای چرب اشباع و تک غیراشباع در ماهی گروپر را پس‌از مواجهه با یون‌های فلزی مس و نیز نانوذرات مس را گزارش دادند.

کاهش مقادیر EPA, DHA در بدن ماهی از دیگر نتایج آنها بود. استدلال آنها برای این تغییرات پاسخ استرسی ماهی در مواجهه با یون‌های فلزی مس و همچنین نانوذرات مس عنوان شد (Wang *et al.*, 2014). برای اظهارنظر دقیق دربارهٔ تأثیر این دسته از اکسیدهای فلزی، اندازه‌گیری آنزیم‌های دخیل در متابولیسم چربی و تغییر و تبدیلات اسیدهای چرب ضروری است که می‌تواند پایهٔ مطالعهٔ دیگری در این زمینه باشد.

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (ارگانیک) تأثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد در هر دو گونهٔ آرتمیا ندارد و فقط میزان زنده‌مانی *آرتمیا فرانسیسکانا* را افزایش می‌دهد. ولی در بحث آنزیم‌های گوارشی، تفاوت معنی‌داری در نتایج دیده می‌شود که می‌تواند به تفاوت‌های فیزیولوژیک دو گونهٔ آرتمیا مربوط باشد.

همچنین درباب تأثیر بر ترکیب بدنی نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق با برخی نتایج در بارهٔ دیگر آبزیان مشابه است که دلایل دقیق و مستدل آن مشخص نیست و به مطالعهٔ بیشتر در زمینهٔ تأثیر نانوذرات در پاسخ استرسی آبزیان و همچنین ارتباط آنها با تغییر پروفایل اسیدهای چرب نیاز است.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

References

AOAC. 2000. Official Methods of Analysis16th edn. – AOAC International Washington, DC, USA.

Ates, M.,Daniels, J., Arslan, Z. and Farah, O.I. 2013. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, ac- cumulation, and toxicity. – Environ. Monit. Assess. 185: 3339-3348.

Bermudez, E., Mangum, J.B., Asgharian, B., Wong, B.A., Reverdy, E.E., Janszen, D.B., Hext, P.M., Warheit, D.B. and Everitt, J.I. 2002. Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. – Toxicol. Sci. 70: 86-97.

Bermudez, E., Mangum, J.B., Wong, B.A., Asgharian, B., Hext, P.M., Warheit, D.B. and Everitt, J.I. 2004. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. – Toxicol. Sci. 77: 347-357.

Bessey, O.A., Lowry, O.H. and Brock, M.J. 1946. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. – J. Biol. Chem. 164: 321-329.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. – Analytical Biochem. 72: 248-254.

Browne, R.A., Davis, L.E. and Sallee, S.E. 1988. Temperature effects on life history traits and relative fitness of sexual and asexual Artemia. – J. Experimental Marine Boil. Ecol. 124: 1-20.

Brunet, L., Lyon, D.Y., Hotze, E.M., Alvarez, P.J.J. and Wiesner, M.R. 2009. Comparative photoactivity and antibacterial properties of C-60 fullerenes and titanium dioxide nanoparticles. – Environmental Sci. Technol. 43(12): 4355-4360.

Chen, T.H., Lin, C.Y. and Tseng, M.C. 2011. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (*Danio rerio*). –Marine Pollut. Bulletin 63(5): 303-308.

Chojnackim M. and Sliwińskim J. 2013. The effects of exposure of ide's larvae and juvenile *Leuciscus idus* (L.) to silver nanoparticles via the digestive tract. – Annales XXXI (4): 1-13.

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagianti-Risbourg, S., Geffard, O. and Geffard, A. 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*:an *in situ* experiment. – Chemosphere 77: 1569-1576.

Federici, G., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. – Aquat. Toxicol. 84: 415-430.

Finkel, T. and Holbrook, N.J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the nature of ageing. – Nature 408: 239-247.

Fokina, N.N., Ruokolainen, T.R., Nemova, N.N. and Bakhmet, I.N. 2013. Changes of blue mussels Mytilus edulis L. lipid composition under cadmium and copper toxic effect. – Biol. Trace Elem. Res. 154: 217-225.

Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. – J. Biol. Chem. 226: 497-509.

Fouqueray, M., Noury, P., Dherret, L., Chaurand, P., Abbaci, K., Labille, J., Rose, J. and Garric, J. 2013. Exposure of juvenile *Danio rerio* to aged TiO2 nanomaterial from sunscreen. – Environ. Sci. Pollut. Res. 20(5): 3340-3350.

Gomez-Requeni, P., Bedolla-C ´ azares, F. and Montecchia, C., 2013. Effects of increasing the dietary lipid levels on the growth performance, body composition and digestive enzyme activities of the teleost pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). – Aquaculture 416-417: 15-22.

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 rain- bow trout (*Oncorhynchus*

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]

[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

mykiss) during chronic dietary exposure to copper. – Aquat. Toxicol 47(1): 23-41.

Handy, R.D., Henry, T.B., Scown, T.M., Johnston, B.D. and Tyler, C.R. 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish: a mechanistic analysis. –Ecotoxicology 17: 396-409.

Holman, M.W. and Lackner, D.I. 2006. The Nanotech Report, fourth ed. Lux Research, New York. 1-25.

Hoyle, I., Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2007. Dietary copper exposure in African walking catfish, *Clarias gariepinus*: transient osmoregulatory disturbances and oxidative stress. – Aquat. Toxicol. 83: 62-72.

Hsin, Y.H., Chena, C.F., Huang, S., Shih, T.S., Lai, P.S. and Chueh, P.J. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. – Toxicol. Lett. 179: 130-139.

Iijima, N., Tanaka, S. and Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). – Fish Physiol. Biochem. 18: 59-69.

Jovanovic, B. 2011. Immunotoxicology of titanium dioxide and hydroxylated fullerenes engineered nanoparticles in fish models. PhD Thesis. Iowa State University.

Klaper, R., Crago, J., Barr, J., Arndt, D., Setyowati, K. and Chen, J. 2009. Toxicity biomarker expression in daphnids exposed to manufactured nanoparticles: Changes in toxicity with functionalization. – Environ. Pollut. 157(4): 1152-1156

Kaegi, R., Ulrich, A., Sinnet, B., Vonbank, R., Wichser, A., Zuleeg, S., Simmler, H., Brunner, S., Vonmont, H., Burkhardt, M. and Boller, M. 2008. Synthetic TiO_2 nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. – Environ. Pollut. 156: 233-239.

Kim, J., Lee, N., Kim, B., Rhee, W., Yoon, S., Hyeon, T. and Park, T. 2011. Enhancement of neurite outgrowth in PC12 cells by iron oxide nanoparticles. – Biomaterials 32: 2871-2877

Lepage, G. and Roy, C.C. 1984. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification. – J. Lipid Res. 25: 1391-1396.

Ling, J., Feng, L., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W.D., Hu, K., Li, S.H. and Zhou, X.Q. 2010. Effect of dietary iron levels on growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). – Aquacult. Nutr. 16(6): 616-624.

Luft, J.R., Furlani, N.M., NeMoyer, R.E., Penna, E.J., Wolfley, J.R., Snell, M.E., Potter, S.A. and Snell, E.H. 2010. Crystal cookery - using high-throughput technologies and the grocery store as a teaching tool. – J. Appl. Crystal. 43: 1189-1207.

Maazouzi, C. Masson, G.; Izquierdo, M. S. and Pihan, J. C. 2008. Chronic copper exposure and fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: results from a field study. – Environ. Pollut. 156: 221-226.

Maltby, L. and Crane, M. 1994. Responses of Gammarus pulex (*amphipoda, crustacea*) to metalliferous effluents: identification of toxic components and the importnace of interpopulation variation. – Environ. Pollut. 84: 45-52.

Martin, C.R. 1994. Nanomaterials: a membrane-based synthetic approach. – Science 266: 1961-1966.

Melquiades, F.L., Ferreira, D.D., Appoloni, C.R., Lopes, F., Lonni, A.G., Oliveira, F.M. and Duarte, J.C. 2008. Titanium dioxide determination in sunscreen by energy dispersive X-ray fluorescence methodology. – Anal. Chem. Acta 613: 135-143.

Métais, P. and Bieth, J. 1968. Détermination de l'amylase par une microtechnique. – Ann. Biol Clin. 26: 133-142.

Mueller, N.C. and Nowack, B. 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. – Environ. Sci. Technol. 42: 4447-4453.

Nel, A.E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somosundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. and Thomson, M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. – Nature Materials J. 8: 543-557.

Ortlieb, M. 2010. White giant or white dwarf? Particle size distribution measurements of TiO_2. – Laboratory Journal Europe 14: 42-43.

Pérez, S., Farré, M. l. and Barceló, D. 2009. Analysis, behavior and ecotoxicity of carbon-based nanomaterials in the aquatic environment. TrAC. – Trends Anal. Chem. 28: 820-832.

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.

Ramsden, C.R., Henry, T.B. and Handy, R.D. 2012. Sub-lethal effects of titanium dioxide nanoparticles on the physiology and reproduction of zebrafish. – Aquat. Toxicol. 126: 404-413.

Saez, M.I., Garcıa-Mesa, S. and Casas J.J. 2013. Effect of sublethal concentrations of waterborne copper on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant response in *Gambusia holbrooki.* – Environ. Toxicol. Pharmacol. 36: 125-134.

Sharma, V.K., Yngard, R.A. and Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. – Adv. Colloid. Interfac. 145: 83-96.

Shaw, B.J. and Handy, R.D. 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. – Environ. Int. 37 (6): 1083-1097.

Smith, A.M., Duan, H.W., Moh, A.M. and Nie, S.M. 2008. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging. – Adv. Drug Deliv. Rev. 60: 1226-1240.

Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P., Merchie, G. and Lavens, P. 1998. Use of brine shrimp *Artemia* sp. in larval crustacean nutrition: a review. – Rev. Fish. Sci. 6: 55- 68.

Sastry, K.V. and Gupta, P.K. 1979. The effect of cadmium on the digestive system of the teleost fish, *Heteropneustes fossilis.* – Environ. Res. 19(2): 221-230.

Sunde, J., Taranger, G.L. and Rungruangsak-Torrissen K.2001. Digestive protease activities and free amino acids in white muscle as indicators for feed conversion efficiency and growth rate in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). – Fish Physiol. Biochem. 25: 335- 345.

Suzer, C., Firat, K. and Saka, S. 2006. Ontogenic development of the digestive enzymes in common pandora, *Pagellus erythrinus*, L. larvae. – Aquacult. Res. 37: 1565-1571.

Tiede, K., Hasselly, M., Breitbarth, E., Chaudhry, Q. and Boxall, A.B.A. 2009. Considerations for environmental fate and ecotoxicity testing to support environmental risk assessments for engineered nanoparticles. – J. Chromatogr. A 1216: 503-509.

Triantaphyllidis, G.V., Poulopoulou, K., Abatzopoulos, T.J., Pinto Pérez; C.A. and Sorgeloos, P. 1995. International study on Artemia XLIX. Salinity effects on survival, maturity, growth, biometrics, reproductive and lifespan characteristics of a bisexual and a parthenogenetic population of *Artemia*. –Hydrobiologia 302: 215-227.

Visai, L., Nardo, L.D., Punta, C., Melone, L., Cigada, A. and Imbriani, M. 2011. Titanium oxide antibacterial surfaces in biomedical devices. – Int. J. Artif. Organs 34: 929-46.

Walter, H. 1984. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V. Verlag Chemie, Weinheim, 270-277.

Wang, Y., Li, L., Cui, W., Xu, S., Shen, W. and Wang, R. 2012. Hydrogen sulfide enhances alfalfa (*Medicago sativa*) tolerance against salinity during seed germination by nitric oxide pathway. – Plant Soil 351: 107-119.

Wang, J., Carlos S. and Cooper, P. 2013. The spatial distribution of galactic satellites in the Λ cold

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]

dark matter cosmology. – Mon. Not. R. Astron. Soc. 429: 1502-1513.

Wang, T., Long, X., Yongzhou, Ch., Liu, Zh. and Shaohua, Y. 2015. A Comparison Effect of Copper Nanoparticles versus Copper Sulphate on Juvenile *Epinephelus coioides*: Growth Parameters, Digestive Enzymes, Body Composition, and Histology as Biomarkers. – Int. J. Genomics: 1-10.

Warheit, D.B., Brock, W.J., Lee, W.J., Webb, K.P. and Reed, K.L. 2005. Comparative pulmonary toxicity inhalation and instillation studies with different TiO_2 particle formulations: impact of surface treatments on particle toxicity. – Toxicol. Sci. 88: 514-524.

Warheit, D.B., Webb, T.R., Sayes, C.M., Colvin, V.L. and Reed, K.L. 2006. Pulmonary instillation studies with nanoscaleTiO2 rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. – Toxicol. Sci. 91: 227-236.

Ways, P. and Hanahan, D. 1964. Characterizations and quantification of red cell lipids in normal man. – J. Lipid Res. 5: 318-328.

Winterbourn, C. 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. – Nat. Chem. Biol. 4: 278-286.

Xia, T., Kovochich, M., Brant, J., Hotze, M., Sempf, J., Oberley, T., Sioutas, C., Yeh, J.I., Wiesner, M.R. and Nel, A.E. 2006. Comparison of the abilities of ambient and engineered nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. – Nano Lett. 6: 1794-1807.

Xiong, D., Fang,T., Yu, L., Sima, X. and Zhu, W. 2011. Effects of nano-scale TiO_2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. – Sci. Total Environ. 409(8): 1444-1452.

Zambonino, J.L. and Cahu, C.L. 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. – Comparative Biochem. Physiol. 109: 209-212.

Zhang, Y. and Sun, J.A. 2007. Study on the bio-safety for nano-silver as anti-bacterial materials. – Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi 31: 35-38.

*****

Asgari, S., Najdegerami, E.H., Zare, S. and Manaffar, R. 2016. The effect of titanium dioxide nanoparticles enriched yeast on the growth performance, digestive enzymes activity and lipid metabolism in two *Artemia* species. – Nova Biol. Rep. 3: 48-60.

عسگری، ث.، حسین نجدگرامی، ا.، زارع، ص. و مناف‌فر، ر. ۱۳۹۵. تأثیر مخمر غنی‌شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر پارامترهای رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در دوگونهٔ آرتمیا. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۶۰-۴۸.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2024-09-20]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1395.3.1.5.9]
[DOI: 10.21859/acadpub.nbr.3.1.48]