DOI: 10.22092/vj.2019.123096.1488
شماره ۱۲۴ پاییز ۱۳۹۸
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

اثر پودر گیاهان دارویی، تراکم پرورش و آلودگی جیره غذایی با آفلاتوکسین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

• زهرا محمودی کیا
کارشناس ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• احمد ایمانی (نویسنده مسئول)
دانشیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
• کوروش سروی مغانلو
دانشیار گروه شیلات و آبزیان، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷-۰۶-۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۱۰-۱۱
Email: a.imani@urmia.ac.ir

چکیده

در پژوهش حاضر اثر استفاده از پودر گیاهان دارویی (رزماری و آویشن) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین B1 در تراکم‌های مختلف پرورش مورد ارزیابی قرارگرفت. بدین منظور ۶۰۰ قطعه ماهي با میانگین وزني ۳±۹۰ گرم، در ۶ تیمار آزمایشی شامل دو تراکم پرورش (۱۵ و ۴۵ کیلوگرم بر متر مکعب)، حضور سم آفلاتوکسین در جیره غذایی (۰ و ۵۰ppb) به همراه افزودن ۴ درصد ترکیب پودر گیاهان دارویی (شامل ۲ درصد پودر آویشن شیرازی و۲درصد پودر رزماری) تقسیم شدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد و آزمایش به مدت ۶ هفته ادامه یافت. پرورش در تراکم بالا (۴۵ کیلوگرم در مترمکعب) و تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین موجب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل آمیلاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز شد (P≤۰/۰۵). همچنین، استفاده از پودر گیاهان آویشن و رزماری در جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین، توانست اثر پاتولوژیک آفلاتوکسین بر افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را تعدیل نماید (P≤۰/۰۵). با توجه به نتایج حاصل می‌توان بیان داشت که ترکیب برابر پودر گیاهان رزماری و آویشن در سطح مورد مطالعه توانایی کنترل آثار نامطلوب سم آفلاتوکسین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده ماهیان قزل‌آلای‌رنگین کمان پرورشی در تراکم‌های مختلف را دارد.

کلمات کلیدی: آنزیم‌های گوارشی، آفلاتوکسین، آویشن شیرازی، رزماری، تراکم پرورش

Veterinary Researches & Biological Products No 124 pp: 110-117

Effect medicinal plants powder, stocking density and dietary aflatoxin contamination on digestive enzymes activity of rainbow trout

By: Mahmoudikiya, Z., MSc graduate of Fisheries Science, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. Imani, A., (Corresponding Author) Associate professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran. and Sarvi Moghanlou, K., Associate professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I.R. of Iran.

Received: 2018-08-31 **Accepted: 2019-01-01**

Email: a.imani@urmia.ac.ir

The effect of stocking density and dietary aflatoxin B1 along with rosemary and thyme powders on intestinal digestive enzymes activity of rainbow trout was evaluated. Total of 600 fish with an average weight of 90±3 were randomly allotted among six experimental groups consisted of two stocking density (15 and 45 kg.m-3), aflatoxin contamination (0 and 50 ppb) with/without including 4 % herbal blend powder (2% rosemary and 2% thyme). Each treatment was replicated thrice and the experiment was lasted for 6 weeks. Stocking at high density and receiving aflatoxin B1 contaminated diet resulted in higher digestive enzymes activity including amylase, lipase and alkaline protease ($p \leq 0.05$). It seemed that including herbal blend consisting of rosemary and thyme powder could mitigate pathologically elevated digestive enzymes activity due to dietary aflatoxin contamination ($p \leq 0.05$). In conclusion, dietary inclusion of rosemary and thyme multi-blend in aflatoxin contaminated diets at the studied level could ameliorate undesirable effects of aflatoxin on intestinal digestive enzymes activity of rainbow trout reared at various densities.

Keyword: Digestive enzymes, aflatoxin, Shirazi Thyme, Rosemary, Stocking density

مقدمه

در حال حاضر با توجه به روند روزافزون جمعیت جهان و همچنین خشکسالی و بحران آب، دستیابي به منابع پروتئيني متنوع و سالم با منشا آبزیان با چالش‌هایی روبروست (۱۰) و نیازمند رویکرد جدیدی نظیر استفاده از شیوه‌های متراکم پرورش آبزیان و همچنین مدیریت اثر آلودگی جیره‌های غذایی از جمله استفاده از ترکیبات طبیعی مانند گیاهان دارویی جهت تعدیل اثرات سموم مختلف نظیر آفلاتوکسین‌ها است. در دهه‌های اخیر موفقیت‌های زیادی با استفاده از گیاهان دارویی در صنعت آبزی‌پروری از حیث بهبود رشد، افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها و همچنین افزایش ماندگاری فرآورده‌های تهیه شده از آبزیان حاصل شده است (۱۱).

امروزه در تولید جیره‌های غذایی آبزیان استفاده از منابع پروتئین گیاهی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است، به نحوی که موجب امیدواری متخصصین تغذیه آبزیان به روند توسعه روزافزون آبزی‌پروری شده است. چنین رویکردی اما موجب افزایش نگرانی‌ها در ارتباط با افزایش احتمال بروز آلودگی‌های مایکوتوکسینی در جیره‌های تجاری شده است (۱۳).

آفلاتوکسین‌ها گروهي از مایکوتوکسین‌ها مي‌باشند که بیشتر توسط کپك‌هاي جنس *Aspergillus* به ویژه گونه‌هاي *A. flavus* و *A. parasiticus* تولید مي‌شوند و به علت سمیت زیاد و مخاطراتي که براي مصرف‌کنندگان دربردارند، حائز اهمیت هستند. این سموم سرطان‌زا و در واقع جهش‌زا بوده و براي کبد، کلیه و سیستم عصبی سمي می‌باشند. آفلاتوکسین‌ها براي همة موجودات از جمله انسان و آبزیان به ویژه قزل‌آلاي رنگین‌کمان جوان بسیار سمي هستند (۱۳، ۱۴). در آبزیان خطر بروز بیماري، در اثر مصرف پودر ماهي آلوده به آفلاتوکسین و بویژه به دلیل افزایش استفاده از مواد غذایي با منشا گیاهي از جمله کنجاله پنبه دانه، بادام زمیني، ذرت، سویا و سبوس برنج براي فرمولاسیون خوراک آبزیان وجود دارد. آفلاتوکسین‌ها موجب کاهش قابل توجه میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین پلاسما مي‌گردند، البته حساسیت به آفلاتوکسین‌ها بسته به گونه، جنس، سن و شرایط محیطي متفاوت مي‌باشد. تحقیقات نشان‌دهنده‌ي اهمیت بالاي آلودگي آفلاتوکسیني خوراک قزل‌آلاي رنگین‌کمان نسبت به سایر ماهیان پرورشي مي‌باشد (۲۴).

آنزیم‌هاي گوارشی نقش بسیار مهمی در روند هضم و جذب مواد مغذي اعم از پروتئین و چربی دارند و مطالعه فعالیت آنزیم‌هاي گوارشی در انتخاب درست اجزاي غذایی جیره و همچنین سلامت آبزی براي محققان و پروش‌دهندگان حائز اهمیت است. با این وجود، پژوهش‌ها در زمینه فعالیت آنزیم‌هاي گوارشی گونه‌های مختلف آبزیان تحت تاثیر شرایط پرورش و همچنین آلودگی با سموم قارچی بسیار اندک است. از این

رو مطالعه تغییر فعالیت آنزیم‌هاي گوارشی در پاسخ به آلودگی‌های غذایی یک گام ضروري در جهت پی بردن به چگونگی مکانیسم گوارش و سازگاري جانداران با تغییر کیفیت جیره غذایی و شرایط محیط پرورش محسوب می‌شود (۲۱).

در آبزی‌پروری از گیاهان دارویی به منظور جلوگیری از فعالیت میکروبی، تسهیل رشد و بلوغ گونه‌های پرورشی استفاده می‌شود. عصاره‌های گیاهی می‌توانند رشد و گسترش تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا را در روده کنترل و محدود کنند. این ترکیبات همچنین می‌توانند از طریق تأثیر بر ریخت‌شناسی روده بر میزان جذب مواد مغذی در جانوران و در نتیجه بازده بهتر تغذیه تأثیرگذار باشند (۲).

آویشن یکی از گیاهان دارویی بومی مناطق جنوبی ایران است و دارای ترکیباتی مانند تانن، ساپونین، ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی، ترپنوئیدها و روغن‌های فرار مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد. این گیاه به‌واسطه داشتن ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (۱۸). گیاه رزماری حاوی مواد موثره مختلفی بوده و از این رو پیکر رویشی رزماری از بوی مطبوعی برخوردار است. مواد موثره این گیاه را اسانس، تانن و مواد تلخ تشکیل می‌دهند (۲۵). خاصیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی عصاره‌ي رزماري روي ماهی قزل‌آلاي رنگین‌کمان بسته‌بندي شده در خلاء گزارش شده است (۹). مطالعه حاضر با هدف بررسي اثر همزمان تراکم‌هاي مختلف پرورشي و سم آفلاتوکسین B1 بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده‌ی ماهی قزل‌آلاي رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و همچنین توانایی ترمیب برابر پودر گیاهان دارویی (رزماری و آویشن) در تعدیل این اثرات طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

تهیه و ذخیره‌سازي ماهیان

نخست تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۳±۹۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی کشور خریداری و پس از گذراندن یک هفته دوره قرنطینه و سازش با شرایط جدید، با محلول نمک ۳ درصد ضدعفونی شده و پس از توزین به صورت تصادفی در ۱۸ مخزن ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۰۰ لیتر آب با تراکم ۱۵ و ۴۵ کیلوگرم در مترمکعب ذخیره‌سازی گردیدند. تغذیه ماهیان ۳ نوبت در روز و به میزان ۳ درصد وزن بود. این مطالعه بصورت یک طرح کاملا تصادفي ساده شامل ۶ تیمار، هر کدام با ۳ تکرار و به مدت ۶ هفته بطول انجامید (جدول۱).

در طول دوره پرورش، فاکتورهاي فیزیکي و شیمیایي آب شامل دما (دما سنج جیوه‌ای) و میزان اکسیژن محلول (IDS ۳۶۳۰ WTW, Multi) بطور مرتب روزانه اندازه‌گیري و ثبت شد، این مقادیر در محدوده مناسب براي پرورش ماهي قزل‌آلاي رنگین‌کمان (به ترتیب ۰/۵±۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد و ۰/۶±۸/۰ میلی‌گرم در لیتر) قرار داشت.

ساخت جیره هاي آزمایشي

در این پژوهش از جیره غذایی تجاری GFT2 ساخت شرکت فرادانه، شهرکرد استفاده شد. برای ساخت جیره‌های آزمایشی، پس از آسیاب نمودن دانه‌های غذایی، آفلاتوکسین و/یا پودرگیاهان آویشن و رزماری با توجه به تیمارهای غذایی (جدول ۱) به جیره غذایی افزوده شد. در مرحله بعد با افزودن رطوبت به میزان مورد نیاز، خمیر به دست آمده به کمک چرخ گوشت صنعتی به صورت رشته های نازک (قطر تقریبی ۲ mm) درآمد. رشته ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق خشک گردید. سپس در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در آون به مدت یک شب نگهداری شدند، تا به طور کامل خشک گردند. رشته های خشک شده به قطعات کوچکتری شکسته شدند و برای زدودن خاکه از الک به اندازه چشمه کوچکتر (۱ mm) استفاده گردید. در نهایت دانه‌های تهیه شده در کیسه‌های فریزر یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم‌گیر با ثبت تاریخ و تیمار در فریزر نگهداری شدند. برای غذای دهی ماهیان هر گروه آزمایشی، یک کیسه معین از جیره غذایی آن گروه از فریزر بیرون آورده شده و بعد از توزین غذای هر مخزن به صورت جداگانه در هر ظرف، مابقی غذا به یخچال منتقل شد (۱۳).

در پایان دوره جهت نمونه‌برداری از بافت روده ماهیان، سه قطعه ماهی از هر تکرار بصورت تصادفی انتخاب شده و با پودر گل میخک (۲۰۰

جدول۱ - تیمارهای آزمایشی مورد بررسی در پژوهش حاضر

گروه آزمایشی	تیمارهای آزمایشی
تیمار ۱ (گروه شاهد)	۱۵ کیلوگرم بر مترمکعب ماهی (تغذیه با جیره غذایی تجاری)
تیمار ۲	۱۵ کیلوگرم بر مترمکعب ماهی (تغذیه با جیره غذایی تجاری + سم آفلاتوکسین ۵۰ pbb)
تیمار ۳	۴۵ کیلوگرم بر مترمکعب ماهی (تغذیه با جیره غذایی تجاری)
تیمار ۴	۴۵ کیلوگرم بر مترمکعب ماهی (تغذیه با جیره غذایی تجاری + سم آفلاتوکسین ۵۰ pbb)
تیمار ۵	۱۵ کیلوگرم بر مترمکعب ماهی(تغذیه با جیره غذایی تجاری + سم آفلاتوکسین ۵۰ pbb + ۲ درصد پودر آویشن + ۲ درصد پودر رزماری)
تیمار ۶	۴۵ کیلوگرم بر مترمکعب ماهی(تغذیه با جیره غذایی تجاری + سم آفلاتوکسین ۵۰ pbb + ۲ درصد پودر آویشن + ۲ درصد پودر رزماری)

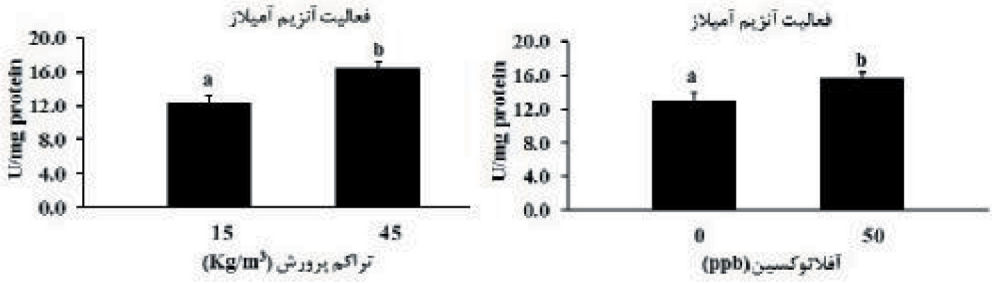
قسمت در میلیون) بیهوش شدند. در نهایت ماهیان آسانکشی (قطع نخاع) شده و بلافاصله در مجاورت یخ کالبدگشایی گردیدند. نمونه‌های تهیه شده تا زمان سنجش‌هاي مورد نظر در دماي ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداري شدند (۱۳).

سنجش ميزان فعاليت آنزيم‌هاي گوارشي

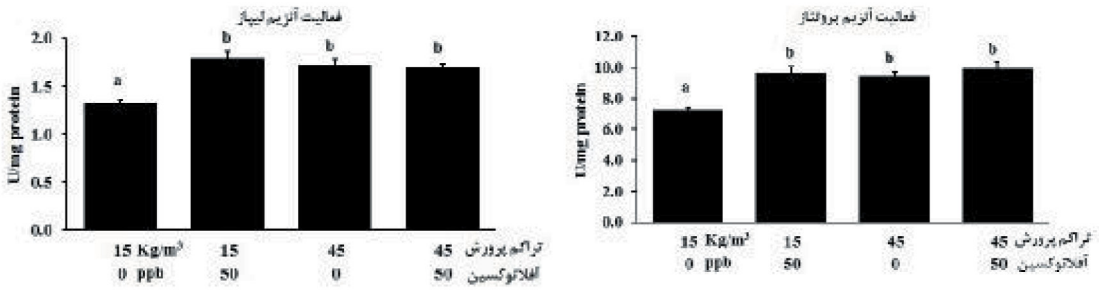
جهت تهیه عصاره آنزیمي، بافت روده ۳ قطعه ماهی از هر تیمار بصورت جداگانه و به نسبت وزني ۵:۱ در بافر Tris-HCl ۵۰ ميلي مولار، ۷، توسط هموژنایزر (مدل ΔPolytron PT۱۳۰۰) به مدت ۱/۵ دقیقه همگن شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل Z36HK) در دماي ۴ درجه سانتی‌گراد ۴ با دور g۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. محلول رویی، جهت سنجش پروتئین محلول و فعالیت آنزیمي در دماي ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداري شد (۷). میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به روش رنگ‌سنجی تعیین شد (۴). جهت تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز کل ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمي با ۰/۵ ميلي لیتر محلول Azocasein دو درصد در Tris-HCl ۵۰ ميلي مولار و پی اچ ۷/۵ مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دماي ۲۵ درجه، ۰/۵ ميلي لیتر TCA (Trichloroacetic Acid) به آن اضافه گردید. نمونه‌ها سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۶۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. فعالیت ویژه آلکالین پروتئاز به ازاي مدت انکوباسیون (۱۰ دقیقه) و میزان پروتئین عصاره آنزیمي (ميلي‌گرم) محاسبه گشت هر سنجش لیپازي شامل ۷ میکرولیتر عصاره خام آنزیمي به همراه ۸۶ میکرولیتر محلول Sodium cholate و ۲/۵ میکرولیتر محلول متوکسي‌اتانول بود. پس از افزودن ۵/۵ میکرولیتر پارانیتروفنیل مریستات به مجموعه فوق و انکوباسیون نمونه‌ها در دماي ۲۵ درجه سانتي‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری نموه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (۱۳). جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ابتدا به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمي ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد اضافه شد. پس از ۳ دقیقه ۰/۵ ميلي لیتر از معرف رنگي دنیتروسالیسیلیک اسید به آن اضافه گردیده و به مدت ۵ دقیقه در دماي ۱۰۰ درجه قرار گرفتند. سپس ۵ ميلي‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد (۱۲).

تحليل‌هاي آماري

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS، به روش آنالیز واریانس



شکل ۱- میزان فعالیت آنزیم آمیلاز روده ماهیان پرورشی در تراکم‌های مختلف پرورش و همچنین ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین، حروف غیر یکسان نشانه اختلاف آماري معني‌دار در سطح p≤۰/۰۵ مي‌باشند.

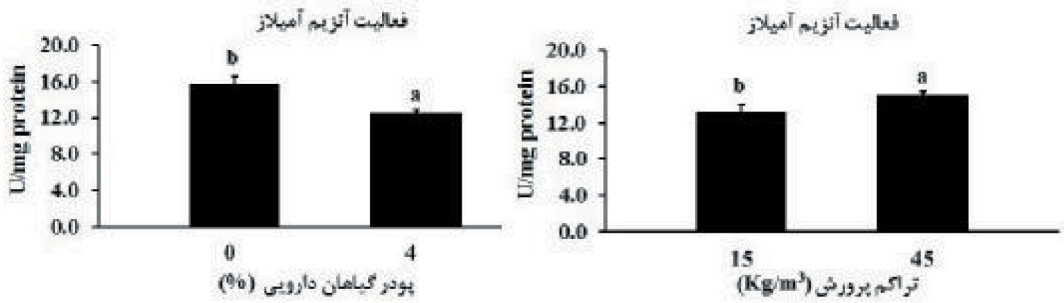


شکل ۲- میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز روده ماهیان تیمارهای مختلف در پایان آزمایش، حروف غیریکسان نشانه اختلاف آماري معني‌دار در سطح p≤۰/۰۵ مي‌باشند.

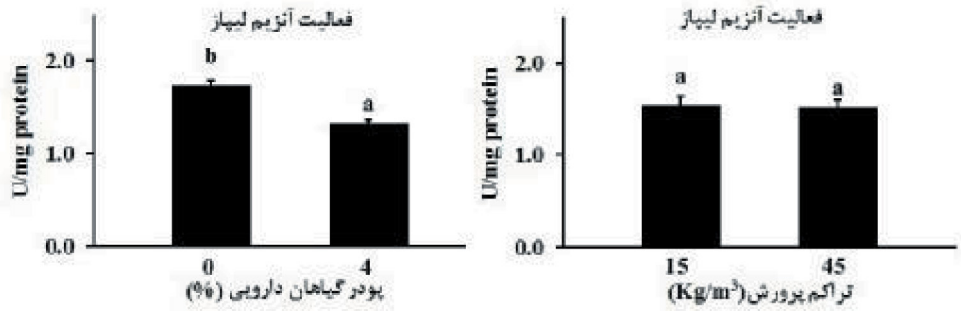
دوطرفه (ANOVA) و آزمون توکي واکاوی آماری شدند. برای حصول بهتر اهداف این پژوهش، داده‌های آزمایشی در دو گروه مختلف سازماندهی و به صورت دو طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۲ تجزیه آماری شدند. در آنالیز آماری نخست، به منظور تعیین اثر همزمان تراکم پرورش و آلودگی جیره‌های غذایی به آفلاتوکسین، داده‌های مربوط به تیمارهای ۱ تا ۴ مد نظر قرار گرفت. در این آنالیز اثر دو عامل تراکم پرورش (در دو سطح ۱۵ و ۴۵ کیلوگرم/مترمکعب) و آلودگی جیره به آفلاتوکسین (در دو حالت عدم آلودگی جیره و آلودگی جیره با ۵۰ pbb آفلاتوکسین) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در آنالیز آماری دوم که با هدف تعیین اثر مکمل‌سازی گیاهان دارویی به جیره‌ی غذایی آلوده به آفلاتوکسین در تراکم‌های مختلف انجام شد، نیز داده‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۲×۲ با دو عامل اصلی تراکم پرورش (در دو سطح ۱۵ و ۴۵ کیلوگرم/مترمکعب) و مکمل سازی جیره‌ای گیاهان دارویی (در دو سطح عدم مکمل‌سازی و مکمل‌سازی گیاهان دارویی) صورت پذیرفت. پیش از انجام آنالیزهای آماری مورد نظر، از نرمال بودن و همگنی واریانس‌ها به ترتیب توسط آزمون‌های شاپیروویلک و لون اطمینان حاصل گردید. سطح معني‌داري آزمون‌ها p≤۰/۰۵ بود. تمامي تحليل‌هاي آماري در محيط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ صورت پذیرفت.

نتایج

آنالیز واریانس مطالعه اثر همزمان تراکم پرورش و آلودگی جیره غذایی به آفلاتوکسین B1 نشان داد که اثر متقابل دو عامل اصلی بر میزان فعالیت پروتئاز (P=۰/۰۵) و لیپاز (P=۰/۰۰۴) معنی‌دار بود، در حالیکه میزان فعالیت آنزیم آمیلاز تنها از اثر مستقل دو عامل تراکم پرورش (P=۰/۰۰۱) و آلودگی جیره غذایی به آفلاتوکسین B1 (P=۰/۰۰۹) تاثیر



شکل ۳- میزان فعالیت آنزیم آمیلاز روده ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی در تراکم‌های مختلف نگهداری و همچنین میزان فعالیت آنزیم آمیلاز ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ترکیب پودر گیاهان دارویی. توجه شود که در این آزمایش ماهیان با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین تغذیه شده‌اند، حروف غیریکسان نشانه اختلاف آماري معني‌دار در سطح p≤۰/۰۵ مي‌باشند.



شکل ۴- میزان فعالیت آنزیم لیپاز روده ماهیان قزل آلای رنگین کمان پرورشی در تراکم‌های مختلف نگهداری و همچنین میزان فعالیت آنزیم لیپاز ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی ترکیب پودر گیاهان دارویی. توجه شود که در این آزمایش ماهیان با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین تغذیه شده‌اند، حروف غیریکسان نشانه اختلاف آماري معني‌دار در سطح p≤۰/۰۵ مي‌باشند.

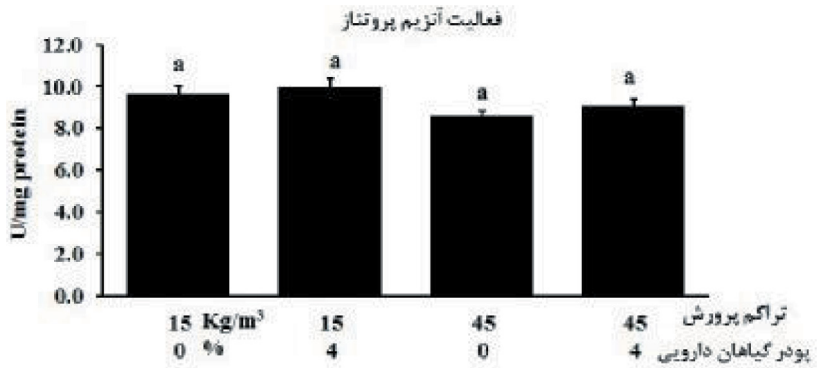
پذیرفت. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، میزان فعالیت آنزیم آمیلاز ماهیان پرورشی در تراکم بالا و همچنین ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین افزایش معنی‌داری یافت (p≤۰/۰۵). همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز و پروتئاز ماهیان پرورشی در تراکم بالا و تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین بطور معنی‌داری بالاتر از ماهیان نگهداری شده در تراکم کمتر که جیره غذایی عاری از آفلاتوکسین دریافت کردند، بود (شکل ۲، p≤۰/۰۵).

آنالیز واریانس بررسی اثر همزمان تراکم پرورش و افزودن پودر گیاهان دارویی به جیره غذایی ماهیان تغذیه شده با خوراک آلوده به آفلاتوکسین B1 نشان داد اثر متقابل دو عامل مورد بررسی (تراکم و پودر گیاهان دارویی) بر فعالیت هیچکدام از آنزیم‌های آمیلاز (p=۰/۱۶۸)، لیپاز (p=۰/۲۷۵) و پروتئاز (p=۰/۸۳۳) معنی‌دار نبود. همچنین، تنها فعالیت آنزیم آمیلاز از اثر مستقل دو عامل تراکم پرورش (P=۰/۰۲۶) و افزودن پودر گیاهان دارویی به جیره غذایی (p=۰/۰۰۱) تاثیر پذیرفت، در حالیکه میزان فعالیت آنزیم لیپاز تنها تحت تاثیر وجود پودر گیاهان دارویی در جیره غذایی (p=۰/۰۰۰) قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم آمیلاز، آنزیم لیپاز و پروتئاز به ترتیب در شکل‌های ۳، ۴ و ۵ آمده است. در این گروه از بررسی‌ها نیز مشخص شد که افزایش تراکم صرف نظر از آلودگی جیره غذایی به آفلاتوکسین موجب افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز گردید و همچنین افزودن پودر گیاهان دارویی به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین موجب خنثی‌شدن اثر افزایشی آن بر میزان فعالیت این آنزیم شد (p≤۰/۰۵). علاوه بر این، حضور پودر گیاهان دارویی در جیره غذایی آلوده به سم قارچی موجب کاهش فعالیت آنزیم لیپاز این گروه از ماهیان شد (p≤۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به افزایش تمایل به متراکم‌سازی پرورش آبزیان بعلت کمبود زمین و دسترسی به منابع آبی، اهمیت تغذیه و تامین خوراک با کیفیت بیش از پیش نمایان شده است. همچنین روز به روز به احتمال جیره‌های غذایی آبزیان با سموم قارچی افزوده می‌شود (۲۴). در چنین شرایطی درک تاثیر متراکم‌سازی سامانه‌های پرورشی آبزیان بویژه در مرحله پروازی و همچنین اثر آلودگی جیره‌های غذایی و شیوه‌های مدیریت تاثیر این سموم (استفاده از گیاهان دارویی) می‌تواند در بهینه سازی و مدیریت آبزی‌پروری و در نتیجه افزایش سود دهی مزارع مفید باشد.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آلودگی جیره غذایی با آفلاتوکسین سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز) گردید. در مطالعه Imani و همکاران (۱۳) روی بچه ماهیان ده گرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز نتیجه مشابهی بویژه از نظر میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز گزارش شده است. در مطالعه یاد شده مشخص گردید که تغذیه با جیره غذایی آلوده با نانوذره اکسید نیکل (۱۰۰ و ۵۰۰ mg/kg) سبب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز نسبت به گروه شاهد که فاقد آلودگی با نانوذره بود، گردید. علاوه بر این، پانکراتیتیس و هیپرتروفی سلول‌های آسینی لوزالمعده در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین تیلاپیای نیل در مواجهه با آفلاتوکسین B۱ گزارش شده است (۶). تصور بر این است که التهاب پانکراس از عوامل اصلی کاهش جذب روده‌ای مواد مغذی بویژه چربی‌ها و پروتئین است (۳). البته، تزریق درون صفاقی آفلاتوکسین در ماهی روهو (*Labeo rohita*) سبب نکروز سلول‌های آسینی لوزالمعده و کاهش گرانول‌های سیتوپلاسمی و یا به عبارت دیگر کاهش ساخت/ترشح آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه کاهش اشتهای ماهی شد (۲۳). نتایج پژوهش‌های مختلف می‌تواند با توجه به غلظت و مدت زمان مواجهه با سم/سموم، ماتریس غذا، اندازه ماهی، گونه و همچنین مسیر مواجهه بسیار متفاوت باشد. یکی از دلایل افزایش پاتولوژیک فعالیت آنزیم‌های گوارشی می‌تواند واکنش جبرانی حیوان به کاهش قابلیت جذب مواد



شکل ۵- میزان فعالیت آنزیم آلکالین روده ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین حاوی پودر گیاهان دارویی، حروف غیریکسان نشانه اختلاف آماري معنيدار در سطح p≤۰/۰۵ مي‌باشند.

مغذی به دلیل آفلاتوکسیکوزیس باشد، که بروز چنین واکنشی زمان‌بر بوده و در صورت ادامه‌دار بودن تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده بروز می‌نماید (۱). البته، مطالعه‌ای در این زمینه روی آبزیان صورت نگرفته است تا مشخص شود که آیا مدت زمان مواجهه با آفلاتوکسین یا اندازه (سن) ماهی چگونه می‌تواند بر شاخص‌های مختلفی فیزیولوژی تغذیه نظیر فعالیت آنزیم‌های گوارشی موثر باشد. با این وجود مطالعات اندکی روی جوجه‌ها وجود دارد که برای مثال نشان می‌دهد در روز چهاردهم تغذیه جوجه‌ها با سطوح مختلف آفلاتوکسین، سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز، آمیلاز و تریپسین نسبت به گروه شاهد (فاقد سم آفلاتوکسین در جیره غذایی) کاهش یافت، اما در پایان آزمایش سطح فعالیت آنزیم‌های فوق در گروه‌های دریافت کننده سم افزایش معنی‌داری داشت (۱۷). همچنین در پژوهشی علیرغم کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذره اکسید نیکل در ماه اول، یک فعالیت افزایشی در ماه دوم مطالعه مشاهده گردید (۱۹)، که حاکی از اثر مختلف سموم در مدت زمان‌های متفاوت مواجهه حیوان با آن‌هاست. در این پژوهش استفاده از پودر گیاهان آویشن و رزماری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه در ماهیان تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده به آفلاتوکسین اثر داشت. در منابع مختلف آثار تعدیل کنندگی ترکیبات گیاهی نظیر اسانس دارچین و سیلیمارین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان مواجه شده با سموم مختلف شامل آفلاتوکسین و نانوذره اکسید نیکل گزارش شده است، به این شکل که تغذیه با این ترکیبات گیاهی تا حدی از افزایش پاتولوژیکی فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز می‌کاهد (۱۳، ۱۹). همچنین افزایش سطح فعالیت آنزیم آمیلاز در موش‌های تحت تیمار زنجبیل گزارش شده است (۲۰).

در پژوهش حاضر مشخص گردید که افزایش تراکم پرورش ۴۵ کیلوگرم برمتر مکعب موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه گردید. در پژوهشی به منظور تعیین کمترین حجم آب به منظور پرورش متراکم ماهی جنگجوی سیامی (*Betta splendens*)، مشخص شد که کاهش حجم آب بطور معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی اثر گذاشت. به این ترتیب که از میزان فعالیت آنزیم‌های لیپاز، تریپسین و کیموتریپسین کاسته شد، اما بر میزان فعالیت آنزیم آمیلاز افزوده شد (۲۲). همچنین در مطالعه‌ای روی فلاندر ژاپنی (*Paralichthys olivaceous*) پژوهشگران دریافتند که انتقال لاروهای این ماهی به تراکم پایین سبب کاهش فعالیت آنزیم تریپسین گردید، که به کاهش نرخ تغذیه لاروها در این تراکم نسبت داده شد (۵). با این وجود، در مطالعه اثر تراکم‌های مختلف نگهداری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ایمنی، شاخص‌های استرس سرم و رشد ماهی *Cynoglossus semilaevis Günther* مشخص شد که در ماهیان پرورشی با تراکم ۲۰ از میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و لیپار کاسته شد (۱۶). علاوه بر این در مطالعه‌ای که روی *Palaemonetes sinensis* انجام شد، پژوهشگران دریافتند که میزان فعالیت تریپسین، آمیلاز و لیپاز بطور معنی‌داری با افزایش تراکم میگوها کاسته شد (۸). در بررسی اثر تراکم نگهداری روی میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی لاروهای ابریشم‌باف ناجور (*Lymantria dispar*) مشخص شد که فعالیت آنزیم تریپسین در لاروهای پرورشی در تراکم بالا بیشتر از میزان فعالیت این آنزیم در لاروهای نگهداری شده بصورت انفرادی بود، در حالی‌که میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لوسین آمینوپپتیداز تحت تاثیر تراکم قرارنگرفت (۱۵). اطلاعات محدودی در زمینه اثر تراکم بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی وجود دارد و نتیجه‌گیری در این ارتباط مستلزم انجام مطالعات بیشتری است. ذکر این نکته حائز اهمیت است که ممکن است بسته به نوع آنزیم، سن و گونه جانوری مورد مطالعه نتایج متفاوتی حاصل شود، که تفسیر آن‌ها نیازمند شناخت سازوکارهای اختصاصی ترشح هر آنزیم، شرایط استرسی حاکم بر موجود و در نتیجه تقاضای انرژیتیکی آن، کیفیت جیره غذایی مورد استفاده، مدت زمان مواجهه و عوامل متعدد ناشناخته دیگری است (۸،۱۵،۱۹).

در این پژوهش مشخص گردید که میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر سم آفلاتوکسین و تراکم افزایش یافت. استفاده از پودر گیاهان آویشن و رزماری در جیره غذایی به دلیل ترکیبات فعال گیاهی بویژه با آثار آنتی‌اکسیدانی، توانست اثر آفلاتوکسین بر افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را تعدیل یا خنثی نماید. چرا که پژوهشگران بر این باور هستند که سموم قارچی از طریق افزایش میزان رادیکال‌های آزاد فراتر از توان طبیعی سلول‌ها جهت حذف آن‌ها، سبب اختلال در پتانسیل اکسیداسیون و احیای سلولی و سرانجام اعمال آثار مخرب خود می‌گردند. همچنین برای درک سازوکار تاثیر تراکم پرورش بر افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و اهمیت چنین افزایشی مطالعات بیشتری در آینده لازم است، چرا که سامانه‌های پرورش متراکم آبزیان در حال گسترش و توسعه هستند.

منابع مورد استفاده

1. Applegate, T., J. Schatzmayr, G., Pricket, K., Troche, C., Jiang, Z. 2009. Effect of aflatoxin culture on intestinal function and nutrient loss in laying hens. *Poultry Science* 88(6): 1235-1241.

2. Bello, O. S.; EMIKPE, B. O. & OLAIFA, F. E. The body weight changes and gut morphometry of Clarias gariepinus juveniles on feeds supplemented with walnut (*Tetracarpidium conophorum*) leaf and onion (*Allium cepa*) bulb residues. *International Journal of Morphology* 30(1):253- 257, 2012.

3. Bliss, M.C. Jr, Wolfe, M.M., 2010. Common Clinical Manifestations of Gastrointestinal Disease. In: Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine, Benjamin, I.J., Griggs, R.C., Wing, E.J. (Eds.), Saunders Elsevier, Philadephia, pp. 382-400.

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

5. Bolasina, S., Perez, A., Yamashita, Y. 2006. Digestive enzymes activity during ontogenic development and effect of starvation in Japanese flounder, Paralichthys olivaceus. *Aquaculture* 252: 503-515.

6. Chavez-Sanchez, M.C., Palacios, C.M., Moreno, I.O., 1994. Pathological effects of feeding young *Oreochromis niloticus* diets supplemented with different levels of aflatoxin B1. *Aquaculture*

127(1): 49-60.
7. Chong, A. S. C., Hashim, R., Lee, C. Y., Ali, B. A., 2002. Partial characterization and activities of proteases form the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). *Aquaculture* 203: 321-333.
8. Dong, J., Zhao, Y.Y., Yu, Y.H., Sun, N., Li, Y.D., Wei, H., Yang, Z.Q., Li, X.D., Li, L., 2018. Effect of stocking density on growth performance, digestive enzyme activities, and nonspecific immune parameters of Palaemonetes sinensis. *Fish and Shellfish Immunology* 73: 37-41.
9. Etemadi A, Sadjadi A, Semnani S, et al (2008). Cancer registry in Iran: a brief overview. *Archives of Iranian Medicine* 11, 577-80.
10. FAO, 2015. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
11. Hahm, D. H., Yeom, M., Lee, E. H., Shim, I., Lee, H. J., Kim, H.Y., 2001. Effect of Scutellariae radix as a novel antibacterial herb on the PPK (*Polyphosphate kinase*) mutant of Salmonella typhimurium. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(6):1061-1065.
12. 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 Physiology and Biochemistry*, 18(1): 59-69.
13. Imani, A., Bani, M., S. Noori, F., Farzaneh, M., Moghanlou, K., S. 2017. The effect of bentonite and yeast cell wall along with cinnamon oil on aflatoxicosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Digestive enzymes, growth indices, nutritional performance and proximate body composition. *Aquaculture* 476: 160-167.
14. Largmani, C., 1990. Evaluation of ionic trypsin for acute pancreatitis. Methods in Enzymology 74:272–290.
15. Lazarevic, J., Peric-Mataruga, V., Vlahovic, M., Mrdakovic, M. and Cvetanovic, D., 2004. Effects of rearing density on larval growth and activity of digestive enzymes in Lymantria dispar L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Folia Biologica-Krakow,* 52: 105-112.
16. Liu, G. , Ye, Z. , Liu, D., Zhu, S. 2018. Influence of stocking density on growth, digestive enzyme activity, immunity, and cortisol levels of subadult half-smooth tongue sole Cynoglossus semilaevis in a recirculating aquaculture system. *North American Journal of Aquaculture* (in Press).
17. Marchioro, A., Mallmann, A., O. Diel, A., Dilkin, P., Rauber, R., H. Blazquez, F., J., H. Oliveira, M., G., A., Mallmann, C., A. 2013. Effects of aflatoxins on performance and exocrine pancreas of broiler chickens. *Avian Disease* 57: 280-284.
18. Mohagheghzadeh A., Shams-Ardekani M., Ghannadi A. and Minaeian M. 2004. Rosmarinic acid from Zataria multiflora tops and in vitro cultures. *Fitoterapia* 75:315-321.
19. Nazdar, N., Imani, A., Noori, F. and Moghanlou, K.S., 2018. Effect of Silymarin Supplementation on Nickel Oxide Nanoparticle Toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings: Pancreas Tissue Histopathology and Alkaline Protease Activity. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science* 42: 353–361.
20. Rao, R.R., Platel, K., Srinivasan, K. 2003. In vitro influence of spices and spice-active principles ondigestive enzymes of rat pancreas and small intestine. *Molecular Nutrition and Food Research* 47(6): 408-412.
21. Rungraungsak-Torrisen, K., Moss, R., Andrew, L. H., Berg, A., Waagbo, R., 2006. Different expression of trypsin and chymotrypsin in relation to growth in Atlantic salmon (Salmo salar L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 32: 7-23.
22. Saekhow, S., Thongprajukaew, K., Phromkunthong, W., Sae-Khoo, H., 2018. Minimal water volume for intensively producing male Siamese fighting fish (Betta splendens Regan, 1910). *Fish Physiology and Biochemistry* 1-11.
23. Sahoo, P.K., 2005. Histological distribution and ultrastructure of exocrine pancreas in Indian major carp (Labeo rohita Ham.) and its alteration in aflatoxicosis. *Bangladesh Journal of Fisheries Research,* 4 (1): 1–6.
24. Santacroce, M.P. and C. Zizzadoro. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 18: 99–130.
25. Zarghi, H., A. Golian, and H. Kermanshahi. 2015. The effect of rosemary hydro-alcoholic (*Rosmarinus Officinalis L.*) extract on performance and egg quality in laying hens. *Iranian Journal of Animal Science* 46(1): 1-8. (In Persian).