تأثیر مخمر غنی‌شده با نانو ذرات اکسید مس بر پارامترهای رشد، فعالیت آنزیمهای گوارشی و متابولیسم چربی در آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) و آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*)

ابراهیم حسین نجدگرامی[1*]، ثریا عسگری[1]، صمد زارع[1] و رامین مناف فر[2]

[1] **ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی**

[2] **ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات**

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۰/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۸

چکیده

افزایش کاربرد نانو ذرات اکسید مس در پزشکی (عامل آنتی‌باکتریال) و سایر صنایع، نگرانیهایی را از نظر ورود این نانوذرات به منابع آبی ایجاد کرده است. بنابراین تأثیرات این نانوذرات از نکته نظر اکوتوکسیکولوژی و اکوفیزیولوژی در آبزیان اهمیت زیادی دارد. در این آزمایش تأثیرات استفاده از مخمر غنی شده با نانو ذرات اکسید مس بر رشد، زمان، فعالیت آنزیمهای گوارشی و متابولیسم چربی در دو گونه آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) و آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) بررسی شد. آزمایش در دو تیمار (مخمر غنی نشده به‌عنوان کنترل و مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس) و هر تیمار با چهار تکرار برای هر دو گونه آرتمیا طراحی و اجرا شد. نتایج نشان داد که استفاده از مخمر غنی‌شده با این نانوذره تأثیر معنی‌دار بر رشد دو گونه آرتمیا ندارد ولی به‌طور معنی‌داری میزان زنده مانی آنها را افزایش می‌دهد ($P<0.05$). فعالیت آنزیمهای گوارشی تحت تأثیر نانو ذرات اکسید مس قرارگرفت و نتایج نشان داد که بجز لیپاز استفاده از این نانوذرات، تأثیر معنی‌دار بر فعالیت آنزیمهای گوارشی در آرتمیا ارومیانا ندارد و برعکس میزان فعالیت آنزیمهای گوارشی در آرتمیا فرانسیسکانا را افزایش می‌دهد. میزان درصد چربی بدن تحت تأثیر مخمر غنی‌شده با نانو ذرات اکسید مس در آرتمیا ارومیانا کاهش یافت ولی اختلاف معنی‌دار در آرتمیا فرانسیسکانا مشاهده نشد. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از نانوذرات اکسید مس می‌تواند علاوه بر بحث سمیت در اکوسیستمهای آبی، از نظر اکوفیزیولوژیکی نیز برای جانداران آبزی مهم باشد.

واژه‌های کلیدی: آرتمیا فرانسیسکانا، آرتمیا ارومیانا، نانوذره، اکسید مس

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۴۲۷۴۵۴۵ ، پست الکترونیکی: e.gerami@urmia.ac.ir

مقدمه

مواد نانو براساس تعریف شامل موادی مانند ذرات نانو، میکروتیوبهای نانو، ساختارها و پوششهای نانو هستند که اندازه آنها کمتر از ۱۰۰ میکرون باشد (۴۱). این مواد در مقایسه با ساختارهای مشابه خود دارای ویژگیهای متفاوتی از نظر شیمیایی و فیزیکی هستند (۲۷، ۴۵) به این دلیل دارای کاربرد وسیعی در صنایع مختلف الکترونیکی، کشاورزی و بهداشتی هستند (۵۴). تأثیرات مثبت استفاده از این مواد به‌عنوان واسطه‌های سلولی، تأثیر در تمایز و تکثیر سلولی، تأثیرات ضد باکتریایی و همچنین کاربردهای بهداشتی در مطالعات و منابع مختلف گزارش‌شده است (۱۴، ۲۳، ۳۵ و ۳۸) بطوریکه ارزش مبادلات تجاری این صنعت را در سال ۲۰۱۴ حدود ۲/۴ تریلیون دلار رسانده است (۱۸). درعین‌حال استفاده از این نانوذرات در علوم مختلف موجب شده است که مقادیر بسیار بالایی از این

مواد در محیط پیرامون ما آزاد شوند و گسترش آن در طبیعت احتمال تأثیر آنها را بر ارگانیسم‌های زنده افزایش داده است (۵۲). این مواد می‌توانند به‌صورت غیرمستقیم از طریق تولید انواع اکسیژن فعال (Reactive oxygen species)، تخریب غشای سلولی و تخریب پروتئینها و همچنین DNA در ساختارهای زنده تأثیرگذار باشند (۲۵، ۵۳). همچنین گزارشاتی مبنی بر تأثیر مستقیم این مواد از طریق تخریب فیزیکی ساختارهای مهم سلولی مانند میتوکندری، عملکرد سلول در تحقیقات مختلف ارائه‌شده است (۲۴ و ۳۶).

در میان نانوذرات اکسیدهای فلزی، نانوذره اکسید مس واکنش‌پذیری بالایی به دلیل تراکم بالای جابجا شدگی و سطح ویژه بالا دارا می‌باشد (۱۷). امروزه نانوذره اکسید مس، دارای کاربرد وسیعی در مواد آنتی‌باکتریال، صنعت نساجی، نگهدارنده ها و مکملهای غذایی، وسایل خانگی، کاتالیستها، نیمه هادیها، دستگاههای الکتروکرومیک، مواد الکترودی و مواد فوق آب‌دوست دارد (۷، ۹، ۲۹، ۳۹ و ۴۹). بنابراین این مواد می‌توانند در محیط‌های آبی با توجه به سیال بودن و همچنین سهولت پخش آن گسترش‌یافته و با توجه به عملکردهایی که برای نانوذرات اکسیدهای فلزی مخصوصاً اکسید مس بیان شد می‌توانند موجب تغییراتی در عملکرد فیزیولوژیک آبزیان و درنهایت انسان به‌عنوان حلقه آخر زنجیره غذایی شوند (۳۹). با توجه به‌مرور منابع توسط نگارنده، عمده تحقیقات در مورد استفاده از نانو ذرات مس در آبزیان بر روی سطح سمیت آنها (۵)، تجمع زیستی آن (۵۰)، سیستم ایمنی (۲۱ و ۴۸)، تنظیم اسمزی (۳۳) و استرس (۴۲) بوده است و متأسفانه مطالعه‌ای که تأثیرات آن را بر فیزیولوژی دستگاه گوارش و همچنین ترکیب بدنی در جانداران بررسی کرده باشد وجود ندارد.

آرتمیا یکی از انواع مهم و نسبتاً گسترده سخت‌پوستان است که کاربرد زیادی در علوم تحقیقاتی وآبزی پروری پیداکرده است. این جاندار به‌عنوان غذای آغازین لارو بسیاری از ماهیان و میگورا تشکیل می‌دهد (۱۲). بنابراین از همین طریق مواد نانو مانند ذرات اکسید مس وارد زنجیره‌های غذایی شده و انسان هم به‌عنوان یکی از حلقه‌های این زنجیره می‌تواند تحت تأثیر قرارگیرد. بنابراین بررسی تأثیرات استفاده از این نانوذرات در موجودی مانند آرتمیا که دارای ساختار فیزیولوژیک ساده‌تری نسبت به سایر جانداران هست می‌تواند دانش بشری را در مورد ابعاد تأثیرگذاری نانو ذرات افزایش دهد. بنابراین این طرح باهدف بررسی تأثیرات مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس بر رشد، زنده‌مانی، متابولیسم چربی و فعالیت آنزیمهای گوارشی در تغذیه آرتمیا ارومیانا به‌عنوان یک‌گونه بومی و همچنین آرتمیا فرانسیسکانا به‌عنوان یک‌گونه وارداتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روشها

سیست مربوط به دو گونه *A.urmiana* و *A. franciscana* از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه تهیه گردید. برای تفریخ سیست‌ها از روش استاندارد که توسط سارجلوس و همکاران (۱۹۸۶) (۴۲) ارائه شده بود استفاده شد. تعداد ۸۰۰۰۰ عدد ناپلی تفریخ شده از هرگونه بعد از شمارش به ۱۶ ظرف یک لیتری با تراکم یک ناپلی در دو میلی‌لیتر منتقل شد. تیمارهای آزمایش به شرح زیر بودند: ۱- تغذیه آرتمیا ارومیانا با مخمر غنی نشده ۲- تغذیه آرتمیا ارومیانا با مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس ۳- تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا با مخمر غنی نشده ۴- تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا با مخمر غنی‌شده با نانو ذرات اکسید مس.

تغذیه ناپلی‌ها براساس پروتکلهای استاندارد، با جلبک و مخمر در آزمایشگاه انجام گرفت. مخمر موردنیاز برای تغذیه آرتمیا در شرایط آزمایشگاهی کشت و با نانوذرات اکسید مس، به‌منظور تولید نانوذرات بیولوژیک غنی‌سازی شدند. برای این منظور جهت تهیه‌ی مخمر غنی‌شده با

نانوذرات اکسید مس، مشخص‌شده بود که بهترین غلظت نانوذرات برای جلوگیری از توده (bulk)، ۵ mg/l می‌باشد بنابراین به۶۰۰ میلی‌لیتر محتوی ارلن، حدود ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول نانوذره اکسید مس با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۶ میلی‌لیتر از محلول آلبومین اضافه شد. سپس۲ گرم مخمرخشک که در ۱۵ cc آب مخلوط شده بود به درون ظرف کشت غنی‌شده افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار نگهداری شد. مخمرهای غنی‌شده با نانوذرات در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته و مخمرهای غنی‌شده به فریزر جهت استفاده‌های بعدی منتقل شد. مخمر غنی‌شده فوق برای تغذیه دو گونه آرتمیا در تیمارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرارگرفت.

برای گروه شاهد از مخمر معمولی که با نانوذرات اکسید مس غنی‌سازی نشده بود استفاده شد. درطول مدت پرورش ناپلی ها، دمای آب درون هر بطری ۱±۲۵ درجه سیلسیوس و pH آب بین ۸ الی ۸/۶ بوده و هوادهی از انتهای بطریها انجام می‌گرفت و رژیم نوری۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) بود. نوردهی توسط لامپ مهتابی بود و تمام شرایط محیطی و پرورشی بجز نوع تغذیه برای تمام بطری‌ها 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 وزنده مانی آرتمیا: برای بررسی میزان رشد و زنده مانی آرتمیاها در تیمارها از تکنیک استاندارد (۳۱ و ۳۲) که برای بررسیهای بیولوژیک آرتمیا تعریف شده بود استفاده شد. جهت بررسی میزان رشد آرتمیا، طول بدن از ناحیه چشم سوم تا انتهای بدن در روزهای ۷، ۱۱ و ۱۵ اندازه‌گیری شد. برای این منظور از چهار تکرار مختلف هر تیمار، جمعاً تعداد ۲۰ آرتمیا بطور تصادفی انتخاب شده و به داخل چاهک‌های میکروپلیت منتقل شدند، سپس با افزودن چند قطره محلول لوگول ۱٪، آرتمیاها کشته و تثبیت می‌شدند و بلافاصله جهت بیومتری به روی لام منتقل گشته و توسط یک لوپ ترسیم زایس مدل Steme SV 11 مجهز به بیومتر چشمی اندازه‌گیری انجام می‌شد. برای بررسی زنده مانی آرتمیاها، با توجه به اینکه بصورت کنترل شده در درون ظروف ۱٫۵ لیتری کشت داده می‌شوند از روش شمارش مستقیم که دقیق‌تر هست استفاده شد. در این روش تعداد آرتمیاها با بررسی هفتگی نمونه‌ها محقق می‌شود. در تحقیق حاضر تراکم اولیه ۵۰۰ لارو در یک لیتر آب بود. بنابراین میزان زنده مانی در طول دوره ۱۵ روزه پرورش در تیمارها تحقیقاتی سنجیده شد. بدین منظور میزان زنده مانی آرتمیاهای گروههای فوق نسبت به نمونه‌های تغذیه شده با مخمر غنی نشده در روزهای ۳، ۷، ۱۱، ۱۵ مورد سنجش قرارگرفت. جهت این کار تمامی آرتمیاهای هر تکرار آزمایشی در هر گروه، با استفاده از فیلترهای ۲۰۰ میکرونی فیلتر شده و شمارش گردید. در نهایت تعداد آرتمیاهای باقیمانده نسبت به آرتمیاهای اولیه محاسبه شدند و درصد آن بدست آمد.

اندازه‌گیری آنزیمهای گوارشی: در انتهای دوره پرورشی (روز بیستم) میزان یک گرم از هر تکرار برای بررسی فعالیت آنزیمهای گوارشی نمونه‌برداری شد. تمامی نمونه‌ها در یک بافر ۵۰ میلی‌مولار Tris-Hcl با نسبت ۹ به یک دستگاه هموژنایزر (Heidolph, Instruments Switzerland) هموژنایز شدند. با توجه به شرایط خاص آنزیمهای گوارشی تمام مراحل تهیه محلول آنزیمهای گوارشی از هموژنایز کردن تا سانتریفیوز در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. محلول هموژنایز شده با سرعت ۲۰۰۰۰ g برای ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی پس از جمع‌آوری به فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شد.

برای اندازه گیری توتال پروتئاز از روش والتر و همکاران در سال ۱۹۸۴ (۴۷) ، پپسین از روش زامبونینو و کاهو در سال ۱۹۹۴ (۵۵)، آنزیم آمیلاز از روش متایس و بیث در سال ۱۹۶۸ (۳۴)، آنزیم لیپاز با روش ایجیما در سال ۱۹۹۴ (۲۶) و برای اندازه گیری آنزیم آلکالین فسفاتاز از روش بسی و همکاران در سال ۱۹۴۶ (۱۱) استفاده شد.

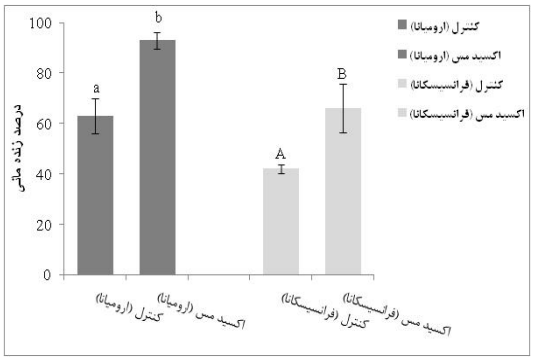
میزان پروتئین کل در هموژنات بر اساس روش برادفورد در سال ۱۹۷۶ (۱۰) با استفاده از آلبومین گاوی به عنوان استاندارد اندازه گیری شد. فعالیت ویژه این آنزیمها بر اساس فعالیت آنزیم به ازای میلی گرم پروتیئن بیان شد (U/mg protein).

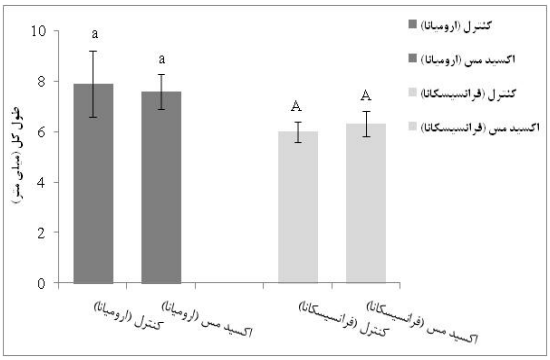
بررسی ترکیب بدنی: در انتهای آزمایش و تغذیه با تیمارهای غذایی، ترکیب بدنی آرتمیاها با توجه به روشهای استاندارد (۱۳، ۸) مورد بررسی قرار گرفت. درصد چربی آرتمیاها با توجه به روش فولچ و همکاران در سال ۱۹۵۷ (۲۰) که بوسیله وی و هاناهان در سال ۱۹۶۴ (۵۱) اصلاح شده بود انجام گرفت. پروفیل اسید های چرب لاروها بوسیله گاز کروماتوگرافی انجام شد و FAME (Fatty acid methyl ester) با استفاده از روش لیپیگ و روی در سال ۱۹۸۴ (۲۸) انجام گرفت. با توجه به اینکه هدف اصلی این آزمایش بررسی تاثیر استفاده از نانو ذرات اکسید مس بر رشد، زنده مانی، فعالیت آنزیمهای گوارشی و درصد چربی بود امکان تکرار آزمایشات مربوط به پروفیل اسیدهای چرب نبود و داده های این بخش به خاطر کمبود بافت آرتمیا، فقط با یک تکرار انجام گرفت و نتایج مقایسه نشد و صرفا گزارش پروفیل اسیدهای چرب در دو گونه آرتمیا می باشد.

محاسبات آماری: داده‌های بدست آمده در این طرح قبل از انجام هرگونه آنالیز آماری از نظر نرمال بودن داده‌ها مورد ارزیابی قرارگرفتند. سپس براساس روشهای موجود، از آزمون T تست برای مقایسه میانگینها در نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ (SPSS Inc., IL, USA) استفاده شد.

نتایج

نتایج استفاده از نانوذرات اکسید مس در تغذیه دو گونه آرتمیا و تأثیرات آن بر رشد و زنده مانی آنها در شکل ۱ آمده است. چنانچه مشاهده می‌شود تأثیر استفاده از مخمر غنی نشده به‌عنوان تیمار کنترل و مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس بر رشد آرتمیا اورمیانا و فرانسیسکانا در پایان روز ۱۵ معنی‌دار نبوده است ($P\geq ۰,۰۵$) ولی استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس به‌طور معنی‌داری میزان زنده مانی هر دو گونه آرتمیا را در پایان آزمایش افزایش داده است ($P\leq ۰,۰۵$).





شکل ۱- تأثیر استفاده از نانوذرات اکسید مس بر رشد و زنده مانی دو گونه آرتمیا ارومیانا و فرانسیسکانا بعد از ۱۵ روز پرورش

تأثیرات استفاده از نانوذرات اکسید مس بر فعالیت آنزیمهای گوارشی در دو گونه آرتمیا در جدول ۱ ارائه‌شده است.

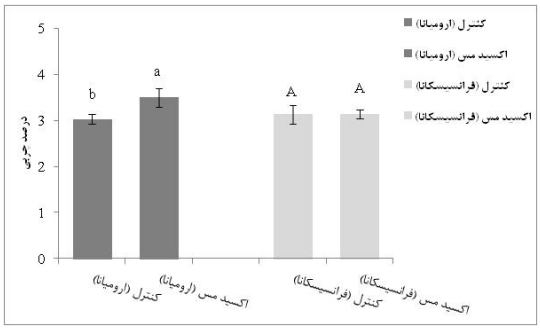
جدول ۱- تأثیر استفاده از نانوذرات بیولوژیک اکسید مس بر فعالیت آنزیمهای گوارشی *A. urmiana* و *A. franciscana*

	Control	CuO
A. urmiana		
Protease	6.9±2.0	4.7±1.0
Pepsin	43.3±7.4	57.0±17.0
Amylase	0.005±0.0	0.0016±0.0
lipase	0.51±0.08[a]	0.2±0.0[b]
Alkaline Phosphatase	0.055±0.02	0.02±0.0
A. franciscana		
Protease	2.3 ± 0.1[b]	21.3±5.2[a]
Pepsin	22.1±6.0	17.8±3.0
Amylase	0.0004±0.0[b]	0.0027±0.0[a]
lipase	0.009±0.0[b]	0.09±0.03[a]
Alkaline Phosphatase	0.017±0.0[b]	0.025±0.0[a]

• فعالیت ویژه آنزیمهای گوارشی براساس: توتال پروتئاز و پپسین براساس mmol of tyrosine released / min/ mg protein، آمیلاز mg starch hydrolyzed / min /mg protein، لیپاز mmole ofsubstrate hydrolyzed / minute / mg protein، آلکالین فسفاتاز mmol substrate released / min / mg protein at 37° C، داده‌ها بر اساس mean ± SD گزارش شدند و داده‌هایی با حروف مختلف در هر ردیف دارای اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵٪ می‌باشند.

براساس نتایج به‌دست‌آمده تأثیر نانوذرات اکسید مس بر فعالیت آنزیمهای گوارشی گونه آرتمیا ارومیانا معنی‌دار نبوده و استفاده از این نانوذرات به‌غیراز آنزیم لیپاز، تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت آنزیمهای پروتئاز کل، پپسین، آمیلاز و آلکالین فسفاتاز نداشته است (P≥ ۰,۰۵). همچنین براساس این نتایج استفاده از نانوذرات اکسید مس، فعالیت آنزیم لیپاز را به‌طور معنی‌داری کاهش داده است (P≤ ۰,۰۵). برعکس گونه آرتمیا ارومیانا، استفاده از نانوذرات اکسید مس فعالیت آنزیمهای گوارشی گونه آرتمیا فرانسیسکانا را به‌طور معنی‌داری افزایش داده‌اند (P≤ ۰,۰۵). بالاترین میزان فعالیت آنزیم توتال پروتئاز، آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز در تیمار نانوذرات اکسید مس مشاهده شد که با تیمار کنترل که فقط از مخمر غنی نشده استفاده کرده بود اختلاف معنی‌دار داشت (P≤ ۰,۰۵).

همچنین نتایج نشان داد که استفاده از نانوذرات اکسید مس تأثیر معنی‌داری بر میزان درصد چربی آرتمیا فرانسیسکانا ندارد (P≥ ۰,۰۵). ولی به‌طور معنی‌داری میزان چربی آرتمیا ارومیانا را افزایش می‌دهد (P≤ ۰,۰۵)(شکل ۲).



شکل ۲- تأثیر استفاده از نانوذرات اکسید مس بر درصد چربی بافت دو گونه آرتمیا ارومیانا و فرانسیسکانا

چنانچه در بخش مواد و روشها اشاره شد پروفیل اسیدهای چرب در دو گونه آرتمیا به علت کم بودن نمونه‌ها با یک تکرار انجام شد (جدول ۲) بنابراین امکان مقایسه آماری آنها وجود نداشت.

جدول۲- تأثیر استفاده از نانوذرات بیولوژیک اکسید مس بر پروفیل اسیدهای چرب *A. urmiana* و *A. franciscana*

	Control	CuO
A. urmiana		
Total saturated	16.2	25
Total monoensaturated	14.7	32.7
C18:2n6	7.8	9.7
C18:3n3	10.3	11.9
C20:4n6	0.7	0
C20:5n3(EPA)	16.5	0.6
C22:6n3(DHA)	0.25	1
A. franciscana		
Total saturated	21.8	26.6
Total monoensaturated	36.4	41
C18:2n6	9.3	10
C18:3n3	10.8	12.5
C20:4n6	0	0
C20:5n3(EPA)	4.7	0
C22:6n3(DHA)	1.4	1.1

ولی افزایش محسوسی در میزان اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع، اسیدلینولئیک و اسیدلینولنیک در هر دو گونه آرتمیا که از مخمر غنی‌شده از نانوذرات اکسید مس تغذیه

کرده بودند مشاهده شد. بلعکس، استفاده از نانوذرات اکسید مس، میزان اسیدهای چرب EPA, DHA را در هر دو گونه کاهش داد.

بحث

با توجه به استفاده وسیع از نانوذرات فلزی، بررسی کیفیت منابع آبی و همچنین آلودگی این منابع یکی از نگرانیهای اصلی در کنترل سطح سلامتی آبزیان در دهه‌های اخیر می‌باشد که در برخی از تحقیقات مرگ‌ومیر آبزیان در مقادیر مختلف گزارش‌شده است (۱، ۲ و ۴). شاو و همکارانش در سال ۲۰۱۲ (۴۰) میزان مرگ‌ومیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در مواجه با میزان ۱۰۰ میکرولیتر یون مس به‌صورت سولفات مس و همان میزان مس به‌صورت نانوذرات فلزی به ترتیب ۸۵ و ۱۴ درصد بیان کردند که نشان‌دهنده کاهش سمیت نانوذرات فلزی در مقایسه با یونهای فلزی همان عنصر می‌باشد. در مطالعه حاضر استفاده از نانوذرات اکسید مس میزان مرگ‌ومیر هر دو گونه آرتمیا را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داد. با توجه به مطالعات و منابع موجود دلایل مستندی در خصوص علت این امر وجود ندارد ولی در برخی از مطالعات به نقش بسیار مهم آنتی‌باکتریال اکسید مس در محیطهای کشت اشاره‌شده است (۳۴). به نظر می‌رسد نانو ذرات اکسید مس با کاهش بار باکتریایی، میکروارگانیسمهای پاتوژن در محیط کشت آرتمیا، که به‌عنوان یکی از غذاهای زنده مهم در بحث آبزی‌پروری مطرح می‌باشد (۳ و ۳۲) در افزایش زنده مانی هر دو گونه نقش داشته‌اند. اگرچه تحقیق در مورد فلورباکتریایی محیط پرورش می‌تواند به اثبات این فرضیه کمک شایانی بکند.

آباد-روسالس و همکارانش در سال ۲۰۱۰ (۴) گزارش دادند که مواجهه میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با یون مس باعث کاهش رشد این‌گونه می‌شود آنها دلیل این امر را به دلیل افزایش سوخت‌وساز بدن جهت سم‌زدایی و حفظ تعادل و همچنین افزایش دفعات پوست‌اندازی میگو بیان کردند. در این مطالعه استفاده از نانوذرات مس تأثیر معنی‌دار بر رشد آرتمیا ارومیانا و فرانسیسکانا بعد از اتمام دوره پرورش نداشت. به نظر می‌رسد استفاده از نانوذرات فلزی مس که به‌صورت بیولوژیک همراه با غذا وارد بدن آرتمیا می‌شود در مقایسه با یونهای فلزی غیرنانو دارای سمیت و تأثیرگذاری کمتری است (۲۲).

فعالیت آنزیمهای گوارشی (پروتئاز، آمیلاز و لیپاز) می‌تواند به‌عنوان یک شاخص مصرف غذا و اختلاف رشد مطرح باشد (۴۲،۲۲). شاید تنها منبعی که به تأثیرات استفاده از نانوذرات بر فعالیت آنزیمهای گوارشی در آبزیان پرداخته است مطالعه وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ (۴۹) بر روی تأثیر استفاده از نانوذرات مس و همچنین یون مس به‌صورت سولفات مس بر روی فعالیت پروتئاز، آمیلاز و لیپاز در بچه ماهیان گروپر نارنجی (*Epinephelus coioides*) باشد. نتایج مطالعات آنها نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات مس و همچنین یونهای فلزی مس، فعالیت آنزیمهای مذکور 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 (۴۴). همچنین به تأثیرات غیرمستقیم این مواد بر رفتار ماهی و تأثیر بر کیفیت مواد غذایی و درنتیجه کاهش مصرف غذایی در ماهی اشاره کرد که می‌تواند کاهش ترشح آنزیمهای گوارشی را در پی داشته باشد (۱۹، ۳۳، ۳۸ و ۴۳). در مطالعه حاضر، افزایش فعالیت آنزیمهای گوارشی بعد از استفاده از این نانوذرات در گونه آرتمیا فرانسیسکانا محسوس‌تر از گونه ارومیانا بود که این امر می‌تواند به دلیل شرایط حاکم بر سیستهای آرتمیا ارومیانا در دریاچه ارومیه باشد که در طی سالیان دراز هموار در معرض انواع آلودگیهای فلزی و غیرفلزی بوده و به‌بیان‌دیگر نوعی سازش با محیط داشته‌اند. بنابراین تغییر در غلظت مس در غذای این‌گونه، تغییری در میزان فعالیت

آنزیمهای گوارشی نداشته است و حتی باعث کاهش فعالیت آنزیمهای گوارشی شده است اگرچه اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. ولی نتایج فعالیت آنزیمهای گوارشی در مورد آرتمیا فرانسیسکانا برخلاف نتایج به‌دست‌آمده وانگ و همکاران در سال ۲۰۱۵ (۴۸) در ماهی گروپر بود که این امر می‌تواند به اختلاف در غلظت نانوذرات مورد استفاده در دو آزمایش و همچنین اختلافات فیزیولوژیک گونه مورد آزمایش در طرح حاضر و آزمایش وانگ و همکاران (۲۰۱۵) باشد.

در مطالعه حاضر درصد چربی بدن در گونه آرتمیا ارومیانا بعد از تغذیه با مخمر غنی‌شده با نانو ذرات اکسید مس افزایش یافت ولی تغییر معنی‌دار در درصد چربی فرانسیسکانا مشاهده نشد. نتایج مشابه با نتایج این مطالعه در تحقیقات سائز و همکاران (۲۰۱۳) (۳۷) در مواجهه ماهی گومبوزیا با غلظتهای مختلف مس (سولفات مس) گزارش‌شده است که عکس نتایجی است که بوسیله دی بوئک و همکاران (۱۹۹۷) (۱۶) و علی و همکاران (۲۰۰۳) (۶) است که کاهش درصد چربی بدن را به ترتیب در ماهی کپور معمولی و تیلاپیا در مواجهه با مس گزارش کردند. در مطالعه سائز و همکاران (۲۰۱۳) علت افزایش درصد چربی در بدن ماهی را، پاسخ استرسی ماهی به سمیت این عنصر گزارش کردند که به‌صورت تجمع چربی بیشتر برای مواجهه بهتر با سمیت مس بود. همچنین تغییرات متابولیسم چربی و پروفیل اسیدهای چرب می‌تواند پاسخی به شرایط متضاد محیطی و تغذیه‌ای باشد (۱۶). در مطالعه‌ای که بوسیله سائز و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام شد تغییرات پروفیل اسیدهای چرب ماهی گامبوزیا (*Gambusia holbrooki*) در مواجهه با غلظتهای مختلف مس (سولفات مس) مورد مطالعه قرارگرفت و نتایج عدم‌تغییر معنی‌دار این پروفیل را در این ماهی نشان داد. عکس این مسئله در کاهش محسوس اسیدهای چرب PUFA (EPA, DHA, AA) در مطالعه‌ای که بوسیله مازوزی و همکاران (۲۰۰۸) (۳۰) انجام گرفت گزارش شد. کاهش غلظت اسیدهای چرب اشباع و همچنین تک غیراشباع در آبشش صدفهای مورد مطالعه و افزایش PUFA (EPA, DHA, AA) پس از مواجه با غلظتهای مختلف مس در مطالعه‌ای که بوسیله فوکینا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام‌گرفته بود از دیگر نتایجی بود که گزارش شد. در این مطالعه میزان اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع، اسیدلینولئیک و اسیدلینولنیک در هر دو گونه آرتمیا در تیمار نانوذرات اکسید مس بیشتر از تیمار کنترل بود در حالیکه استفاده از نانوذرات اکسید مس مقادیر EPA, DHA را در هر دو گونه کاهش داد. نتایج بدست آمده در این تحقیق، مشابه نتایج مطالعه وانگ و همکاران (۲۰۱۵) و مازوزی و همکاران (۲۰۰۸) است که افزایش اسیدهای چرب اشباع و تک غیراشباع در ماهی گروپر را پس از مواجهه با یونهای فلزی مس و همچنین نانوذرات مس را گزارش دادند. کاهش مقادیر EPA, DHA در بدن ماهی از دیگر نتایج آنها بود. استدال آنها برای این تغییرات پاسخ استرسی ماهی در مواجهه با یونهای فلزی مس و همچنین نانوذرات مس عنوان شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از مخمر غنی‌شده با نانوذرات اکسید مس (ارگانیک) تأثیر مثبت بر شاخصهای رشد در هر دو گونه آرتمیا دارد و میزان زنده مانی آنها را افزایش می‌دهد. ولی در بحث آنزیمهای گوارشی تفاوت معنی‌دار در نتایج دیده می‌شود که می‌تواند به تفاوتهای فیزیولوژیک دو گونه آرتمیا مربوط باشد. همچنین در مورد تأثیر بر ترکیب بدنی نتایج بدست آمده در این تحقیق با برخی از نتایج بدست آمده در سایر آبزیان مشابه است که دلایل آن مشخص نیست و نیاز به مطالعه بیشتر در زمینه تأثیرات نانوذرات در پاسخ استرسی آبزیان و همچنین ارتباط آنها با تغییر پروفیل اسیدهای چرب دارد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله از زحمات پرسنل آزمایشگاهی پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه که در

اجرای این طرح، ما را یاری کردند نهایت تشکر و سپاسگزاری را دارد.

منابع

۱- حاجی رحیمی، ا.، فرخی، ف.، و توکمه چی، ا.، ۱۳۹۴. بررسی تأثیر نانوذرات اکسیدآهن و روی بر بافت کبد و عضله در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله پژوهشهای جانوری، شماره ۳، صفحات ۲۹۳-۳۰۶.

۲- حیدری، م.، و اکبری، پ.، ۱۳۹۲. تأثیر ناپلئوس آرتمیا بر روی تخمریزی، هم آوری، درصد لقاح و رشد فرشته‌ماهی (*Pterophyllum scalar*)، مجله پژوهشهای جانوری، شماره ۴، صفحات ۳۵۵-۳۶۴.

۳- شفیعی، س.، احمدی، م.، شفیعی، س.، شاپوری، م.، ورشویی، ح.، و آذری، ف.، ۱۳۹۴. سنتز نانوذرات اکسید مس و بررسی خصوصیات باکتری کشی آن بر روی باکتری آئروموناس هیدروفیلا، مجله علوم پزشکی فسا، شماره ۱، صفحات ۴۳-۳۶ .

4- Abad-Rosales, S.M., Frías-Espericueta, A., Inzunza-Rojas, I., OsunaLópez, Lozano-Olvera, R., and Voltolina, D., 2010. Histological effect of Cu to white shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles at low salinities. Revista de Biología y Oceanografía. 45 (1), PP: 99-105.

5- Al-Bairuty, G.A., Shaw, B.J., Handy, R.D., and Henry, T.B., 2013. Histopathological effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on the organs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Aquacuture Toxicology, 126, PP: 104–115.

6- Ali, A., Al-Ogaily, S.M., Al-Asgah, N.A., and Gropp, J., 2003. Effect of sublethal concentrations of copper on the growth performance of *Oreochromis niloticus*, Journal of Applied Ichthyology, 19, PP: 183-188.

7- Alizadeh-Gheshlaghi, E., Shaabani, B., Khodayari, A., Azizian-Kalandaragh, Y., and Rahimi, R., 2012. Investigation of the catalytic activity of nano-sized CuO, Co_3O_4 and $CuCo_2O_4$ powders on thermal decomposition of ammonium perchlorate. Powder Technology, 217. PP: 330-339.

8- A.O.A.C., 2000. Official Methods of Analysis16th edn. AOAC International Washington, DC, USA.

9- Ates, M., Daniels, J., Arslan, Z., and Farah, I.O., 2012. Effects of aqueous suspensions of titanium dioxide nanoparticles on *Artemia salina*: assessment of nanoparticle aggregation, accumulation, and toxicity. Environmental Monitoring and Assessment. 185 (4), PP: 3339-3348.

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

11- 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, Journal of Biological Chemistry. 164, PP: 321–329.

12- 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. Journal of experimental marine biology and ecology, 124, PP: 1-20.

13- Campos, B., Rivetti, C., Rosenkranz, P., Navas, J.M., and Barata, C., 2013. Effects of nanoparticles of TiO_2 on food depletion and life-history responses of *Daphnia magna*, Aquature Toxicology. 130, PP: 174–183.

14- Chojnacki, M., and śliwiński, J., 2013. The effects of exposure of ide's larvae and juvenile *Leuciscus idus* (L.) to silver nanoparticles via the digestive tract, XXXI (4), PP:1-13

17- Condorelli, G.G., Costanzo, I.L., Fragala, I.L., Giuffrida, S., and Ventimiglia, G., 2003. A single photochemical route for the formation of both copper nanoparticles and patterned nanostructured films, Journal of Materials Chemistry, 13(10), PP: 2409– 2411.

16- De Boeck, G., Vlaeminck, A., and Blust, R., 1997. Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, food consumption, growth, energy stores, and nucleic acid content in common carp. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 33. PP: 415–422.

17- 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(11), PP: 1569-1576

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

19- 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 Element Research, 154, PP: 217–225.

20- Folch, J., Lees, M., and Sloane-Stanley, G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, Journal of Biological Chemistry, 226, PP: 497-509

21- Gomes, J.P., Pinheiro, I., Cancio, C.G., Pereira, C., and Cardoso, M.J.O., 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environmental Science & Technology, 45, PP: 9356–9362

22- 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, PP: 15–22.

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

24- Horiguchi, H., 1980. Chemistry of Antimicrobial Agents, Tokyo, Japan: Sankyo Press; 46 p.

25- 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. Toxicology Letters, 179, PP:130–139.

26- 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, PP: 59-69.

27- 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, PP: 2871-2877

28- Lepage, G., and Roy, C.C., 1984. Improved recovery of fatty acids through direct transesterification without prior extraction or purification, Journal of Lipid Research, 25, PP: 1391-1396.

29- Jun, W., Shanshan, H., Zhanshuang, L., Xiaoyan, J., Milin, Z., and Zhaohua, J., 2009. Self-assembled CuO nanoarchitectures and their catalytic activity in the thermal decomposition of ammonium perchlorate, Colloid and Polymer Science, 20(7), PP: 853-858.

30- 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. Environment Pollution, 156, PP: 221–226.

31- 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. Environmental Pollution, 84, PP: 45–52.

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

33- Najdegerami, E.H., Baruah, K., Shiri, A., Rekecki, A., Van den Broeck, W., Sorgeloos, P., Boon, N., Bossier, P., and De Schryver, P., 2013. Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larvae fed Artemia nauplii enriched with poly-β-hydroxybutyrate (PHB): effect on growth performance, body composition, digestive enzymes, gut microbial community, gut histology and stress tests. Aquaculture Research, 45, PP: 1-12.

34- Métais, P., and Bieth, J., 1968. Détermination de l'amylase par une microtechnique. Annales de Biologie Clinique. 26, PP: 133–142.

35- 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, 8, PP: 543–557.

36- Oelerich, W., Klassen, T., and Bormann, R., 2001. Metal oxides as catalysts for improved hydrogen sorption in nanocrystalline Mg-based materials, Journal of Alloys and Compounds, 5, PP: 237-242.

37- Saez, M.I., Garcıa-Mesa, S., and Casas, J.J.l., 2013. Effect of sublethal concentrations of waterborne copper on lipid peroxidation and enzymatic antioxidant response in *Gambusia holbrooki*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 36, PP: 125–134.

38- Sharma, V.K., Yngard, R.A., and Lin, Y., 2009. Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in Colloid and Interface Science, 145, PP: 83-96.

39- Shaw, B.J., and Handy, R.D., 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. Environmental International, 37, PP:1083–1097.

40- Shaw, B.J., Al-Bairuty, G., and Handy, R.D., 2012. Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): physiology and accumulation. Aquaculture Toxicology, 116, PP: 90–101.

41- Smith, A.M., Duan, H.W., Moh, A.M., and Nie, S.M., 2008. Bioconjugated quantum dots for in vivo molecular and cellular imaging, Advanced Drug Delivery Reviews, 60, PP: 1226–1240.

42- Sorgeloos, P., Coutteau, P., Dhert, P., Merchie, G., and Lavens, P., 1998. Use of brine shrimp Artemia sp. in larval crustacean nutrition: a review. Reviews in fisheries sciences, 6, PP: 55-68

43- 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, PP: 335– 345

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

45- 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. Journal of Chromatography A. 1216, PP: 503–509.

46- 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, PP: 215-227

47- 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, PP: 270–277

48- Wang, T., Long, X., Liu, Z., Cheng, Y., and Yan, S., 2015. Effect of copper nanoparticles and copper sulphate on oxidation stress, cell apoptosis and immune responses in the intestines of juvenile Epinephelus coioides. Fish Shellfish Immunol, 44, PP: 674–682.

49- 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, http://dx.doi.org/10.1155/2015/783021.

50- Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., and Yan, S., 2014. The potential toxicity of copper nano- particles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*, Aquature Toxicology. 152, PP: 96–104.

51- Ways, P., and Hanahan, D., 1964. Characterizations and quantification of red cell lipids in normal man. Journal of Lipid Research, 5, PP: 318-328.

52- Winterbourn, C., 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, Nature Chemical Biology, 4, PP: 278–286.

53- 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 Letters, 6, PP: 1794–1807.

54- Xiong, D., Fang, T., Yu, L., Sima, X., and Zhu, W., 2011. Effects of nano-scale TiO2, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. Science of the Total Environment, 409, PP:1444–1452.

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

The effects of copper oxide nanoparticles enriched yeast on the growth performance, digestive enzymes activity and lipid metabolism in *Artemia urmiana* and *Artemia franciscana*

Najdegerami E.H.[1], Asgari S.[1], Zare S.[1] and Manaffar R.[2]

[1] Biology Dept., Faculty of Science, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

[2] Fisheries Dept., Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

Abstract

Increasing the application of copper oxide nanoparticles (NPs) in medicine (bactericidal agent) and other industries have raised serious concerns about ecotoxicology and ecophysiology effects on the aquatic animals. In this study, the effects of copper oxide NPs enriched yeast on the growth, survival; digestive enzymes activity and lipid metabolism in *Artemia urmiana* (AU) and *Artemia franciscana* (AF) were investigated. The experiment was designed in two treatments (non- enriched yeast as a control and enriched yeast with copper oxide NPs) and each with four replicates for both *Artemia* species. At the end of experiment, the results indicated that copper oxide NPs did not affect on the *Artemia* species growth rate but significantly increased both *Artemia* species survival. Also the results showed, copper oxide NPs did not affect on AU digestive enzymes activity, but significantly increased AF digestive enzymes activity. The effect of NPs on the body lipid content was investigated in *Artemia* species and the results revealed that copper oxide NPs significantly decrease AU lipid content but did not affect on AF. The results obtained in this experiment, suggest that the ecophysiological effects of copper oxide NPs different in *Artemia urmiana* and *Artemia franciscana*.

Key words: *Artemia franciscana*, *Artemia urmiana*, nanoparticles, titanium dioxide