

تأثیر مخمر غنی شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر پارامترهای رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در دو گونه آرتمیا

ثریا عسگری^۱، ابراهیم حسین نجدگرامی^{۱*}، صمد زارع^۱، رامین مناففر^۲

دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۳/۲۳

^۱گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

^۲گروه شیلات، دانشکده 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 استفاده وسیع آن، نگرانی‌هایی را از نظر اکوتوکسیکولوژی و اکوفیزیولوژی بعد از ورود به منابع آبی ایجاد کرده است. در این آزمایش، تأثیر استفاده از مخمر غنی شده با نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم بر رشد، زنده‌مانی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در دو گونه آرتمیا ارومیا و آرتمیا فرانسیسکانا بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از مخمر غنی شده با این نانوذره تأثیر معنی‌دار بر رشد دو گونه آرتمیا ندارد ولی به‌طور معناداری میزان زنده‌مانی آرتمیا فرانسیسکانا را افزایش می‌دهد و تأثیر معنی‌داری هم بر زنده‌مانی آرتمیا ارومیا 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 ارومیا به‌طور معناداری کاهش می‌دهد و برعکس، افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی در آرتمیا فرانسیسکانا مشاهده شد. میزان درصد چربی بدن تحت تأثیر مخمر غنی شده با دی‌اکسیدتیتانیوم در آرتمیا ارومیا کاهش یافت ولی اختلاف معنی‌دار در آرتمیا فرانسیسکانا مشاهده نشد. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم می‌تواند، علاوه بر بحث سمی بودن در اکوسیستم‌های آبی، از نظر اکوفیزیولوژی نیز برای جانداران آبرزی مهم باشد.

واژه‌های کلیدی. آرتمیا فرانسیسکانا، آرتمیا ارومیا، نانوذره 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 Asgari¹, Ebrahim H. Najdegerami^{1*}, Samad Zare¹, Ramin Manaffar²

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

¹Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, Urmia, Iran

²Department 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

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., 2009; Nel et al., 2008). به این دلیل، 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 منزله 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 & Sliwinski, 2013). ارزش مبادلات تجاری این صنعت به حدی است که در سال ۲۰۱۴، به حدود ۲/۴ تریلیون دلار رسیده است (Holman & Lackner, 2006). در عین حال، 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 به صورت غیرمستقیم از طریق تولید انواع اکسیژن فعال و در نتیجه ایجاد استرس اکسیداتیو و تخریب غشای سلولی، تخریب پروتئین‌ها و DNA در موجودات زنده می‌توانند تأثیرگذار باشند (Holbrook, 2000; Finkel & Winterbourn, 2008). همچنین به صورت مستقیم موجب تخریب فیزیکی ساختارهای مهم سلولی مانند میتوکندری می‌شوند و عملکرد سلول را مختل می‌کنند (Xia et al., 2006; Hsin et al., 2008).

در میان نانوذرات اکسید فلزی، نانوذره دی‌اکسیدتیتانیوم بیشترین کاربرد را نسبت به دیگر نانوذرات در صنعت دارند (Jovanovic, 2011). بنابراین، نگرانی درباره آلودگی‌های محیطی با توجه به روند روبه‌افزایش ورود نانوذره 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 لوسیون‌ها و دیگر لوازم بهداشتی

(Melquiades et al., 2008) و همچنین محصولات کاغذی، پلاستیک، جوهر و به مثابه رنگ غذا (چهار میلیون تن در سال) در صنایع غذایی کاربرد دارد (Ortlieb, 2010). در نتیجه 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 زمینه سمیت نانوذرات درباره سیستم تنفسی پستانداران یا دیگر سلول‌های آنها در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفته است (Handy & Shaw, 2007). از جمله این تحقیقات، نتایج آزمایش‌هایی است که تأثیر نانوذره 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., 2007; Federici et al., 2005, 2006; al., 2007). افزایش سمی بودن نانوذرات دی‌اکسیدتیتانیوم در ایجاد التهاب‌های ریوی، ارتباط افزایش میزان ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها با کاهش اندازه ذرات، از دیگر نتایج تحقیقات مرتبط با این مسئله بود (Bermudez et al., 2004).

تحقیقات در زمینه تأثیر نانوذره 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 اندازه ذرات دی‌اکسیدتیتانیوم ثابت شده است (Zhang et al., 2007; Federici et al., 2009; Klaper et al., 2007). با توجه 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 به منزله یک مدل حیوانی در بررسی‌های زیستی مطرح است می‌تواند به روشن شدن زوایای مختلف نقش نانوذرات در اکوسیستم‌های طبیعی کمک کند. بنابراین، این طرح با هدف بررسی تأثیر مخمر غنی شده با نانوذرات اکسید تیتانیوم بر رشد، بقا، متابولیسم چربی و فعالیت آنزیم‌های گوارشی در تغذیه آرتمیا ارومیا نا به عنوان یک گونه بومی و

همچنین آرتمیا فرانسیسکانا به‌مثابه یک گونه وارداتی طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

سیست مربوط به دو گونه *A. franciscana* و *A. urmiana* از پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه تهیه گردید. برای تفریخ سیست‌ها از روش استاندارد سورگیلوس و همکاران (۱۹۸۶) استفاده شد. تعداد هشتاد هزار عدد ناپلی تفریخ شده از هر گونه بعد از 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- تغذیه آرتمیا ارومیا با مخمر غنی نشده ۲- تغذیه آرتمیا ارومیا با مخمر غنی شده با نانوذرات اکسید مس ۳- تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا با مخمر غنی نشده ۴- تغذیه آرتمیا فرانسیسکانا با مخمر غنی شده با نانوذرات اکسید مس.

تغذیه ناپلی‌ها براساس پروتکل‌های استاندارد، با جلبک و مخمر در آزمایشگاه انجام گرفت. مخمر لازم برای تغذیه آرتمیا در شرایط آزمایشگاهی کشت و با نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، به منظور تولید نانوذرات بیولوژیک غنی‌سازی شدند. وجود این نانوذره در دیواره مخمرها با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نوع روبشی (SEM) تأیید شد. برای تهیه مخمر غنی شده با نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، مشخص شده بود که بهترین غلظت نانوذرات برای جلوگیری از توده (bulk)، حدود ۵ mg/l است. بنابراین، به ۶۰۰ میلی‌لیتر حجم ارلن، حدود ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم با غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و ۶ میلی‌لیتر از محلول آلبومین اضافه شد. سپس ۲ گرم مخمر خشک که در ۱۵ cc آب مخلوط شده بود به درون ظرف کشت غنی شده افزوده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶/۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور شیکردار نگهداری شد. مخمرهای غنی شده با نانوذرات در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. محلول رویی دور ریخته شده و مخمرهای غنی شده جهت استفاده‌های بعدی به فریزر منتقل شد. مخمر غنی شده فوق برای تغذیه دو گونه آرتمیا در تیمارهای تحقیقاتی مورد استفاده قرار گرفت.

برای گروه شاهد، از مخمر معمولی که با نانوذرات دی-اکسید تیتانیوم غنی‌سازی نشده بود استفاده شد. در طول مدت پرورش ناپلی‌ها، دمای آب درون هر بطری 25 ± 1 درجه 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 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 و زنده‌مانی آرتمیا

بررسی میزان رشد و زنده‌مانی گونه‌های 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 ناحیه 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، آرتمیاهای کشته و تثبیت می‌شدند و بلافاصله جهت بیومتری به روی لام منتقل می‌شدند و توسط یک لوپ ترسیم زایس مدل Steme SV 11 مجهز به بیومتر چشمی اندازه‌گیری انجام شد. برای بررسی زنده‌مانی آرتمیاهای، با توجه به اینکه به‌صورت کنترل شده در درون ظروف ۱/۵ لیتری کشت داده می‌شوند از روش شمارش مستقیم که دقیق‌تر است استفاده شد. در این روش، تعداد آرتمیاهای بررسی هفتگی نمونه‌ها محقق می‌شود. در تحقیق حاضر تراکم اولیه ۵۰۰ لارو در یک‌لیتر آب بود. بنابراین، میزان زنده‌مانی در طول دوره ۱۵ روز پرورش در تیمارهای تحقیقاتی سنجیده شد. بدین منظور، میزان زنده‌مانی آرتمیاهای گروه‌های فوق نسبت به نمونه‌های تغذیه شده با مخمر غنی نشده 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. در نهایت، تعداد آرتمیاهای باقی-

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

اندازه گیری آنزیم های گوارشی

در انتهای دوره پرورشی (روز پانزدهم) میزان یک گرم از هر تکرار برای بررسی فعالیت آنزیم های گوارشی نمونه برداری شد. درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد و محلول بالایی پس از جمع آوری به فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شد.

برای اندازه گیری 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 ایچیمیا در سال ۱۹۹۴ و برای اندازه گیری 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 منزله استاندارد اندازه گیری شد. فعالیت ویژه این آنزیم ها براساس فعالیت آنزیم به ازای میلی گرم پروتئین بیان شد (U/mg protein).

بررسی ترکیب بدنی

در انتهای آزمایش و تغذیه با تیمارهای غذایی، ترکیب بدنی آرتمیها با توجه به روش های استاندارد (AOAC, 2000) تحت بررسی قرار گرفت. درصد چربی آرتمیها 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 به وسیله گاز کروماتوگرافی انجام شد و میزان FAME (Fatty Acid Methyl Ester) با استفاده از روش لیپیچ و روی در سال ۱۹۸۴ انجام گرفت. با توجه به اینکه هدف اصلی این آزمایش بررسی تأثیر استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم بر رشد، زنده ماندن، فعالیت آنزیم های گوارشی و درصد چربی بود، امکان تکرار آزمایش ها مربوط به پروفیل اسیدهای چرب نبود و داده های این بخش به دلیل کمبود بافت آرتمیا، فقط با یک تکرار انجام گرفت و نتایج مقایسه نشد و صرفاً گزارش پروفیل اسیدهای چرب در دو گونه آرتمیا بعد از تغذیه با نانوذرات اکسیدتیتانیوم صورت گرفته است.

تمامی نمونه ها در یک بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با نسبت ۹ به یک دستگاه هموژنایزر (Heidolph, Switzerland) هموژنایز شدند. با توجه به وضعیت خاص آنزیم های گوارشی، تمام مراحل تهیه محلول آنزیم های گوارشی از هموژنایز کردن تا سانتریفیوژ در درجه حرارت ۴ درجه سانتی گراد انجام گرفت. محلول هموژنایز شده با سرعت ۲۰۰۰۰ g برای ۲۰ دقیقه در ۴

محاسبات آماری

داده های به دست آمده در این طرح قبل از انجام هرگونه تحلیل آماری از نظر نرمال بودن داده ها ارزیابی شدند. سپس براساس روش های موجود، از آزمون T برای مقایسه میانگین ها در نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۷ (SPSS Inc., IL, USA) استفاده شد.

نتایج

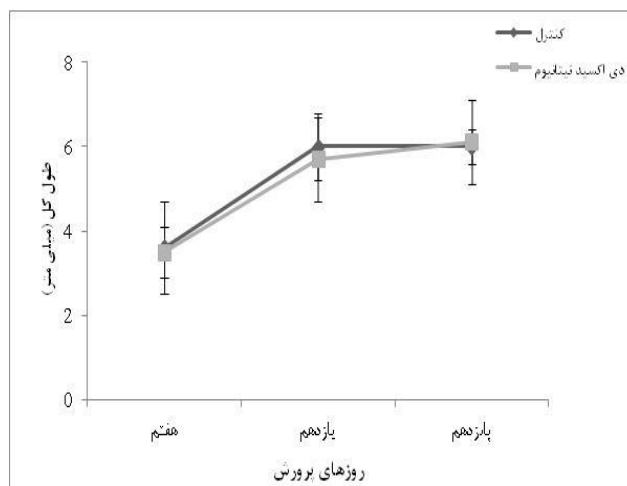
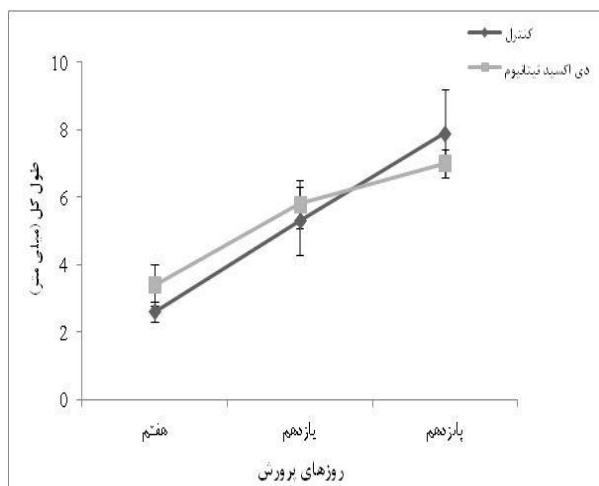
نتایج استفاده از نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم در تغذیه دو گونه آرتمیا و تأثیر آن بر رشد آنها در شکل ۱ آمده است. چنان که مشاهده می شود

تأثیر استفاده از مخمر ساده به منزله تیمار کنترل و مخمر غنی شده با نانوذرات اکسید تیتانیوم بر رشد آرتمیا ارومیا و آرتمیا فرانسیسکانا در پایان روز پانزدهم معنادار نبوده است ($P \geq 0.05$). آرتمیا ارومیا با توجه به ماهیت گونه ای خود دارای رشد سریع تر و اندازه بزرگ تر است و روند رشد آن نیز در شکل ۱ سمت چپ کاملاً مشهود است. نتایج مربوط به درصد زنده ماندن گونه آرتمیا ارومیا بعد از تغذیه با تیمار کنترل و نانوذرات اکسیدتیتانیوم مشابه با الگوی رشد بود و استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم نتوانست رشد آرتمیا ارومیا را به طور معناداری در طول دوره پرورش افزایش دهد ($P \geq 0.05$) (شکل ۲). در حالی که نتایج در باره آرتمیا فرانسیسکانا نسبت به گونه آرتمیا ارومیا در این مورد متفاوت بود و استفاده از تیمار نانوذرة اکسید تیتانیوم به طور معناداری میزان زنده ماندن گونه آرتمیا فرانسیسکانا را نسبت به گروه کنترل افزایش داد ($P \leq 0.05$).

تأثیر استفاده از مخمر غنی شده با اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیم های گوارشی در هر دو گونه آرتمیا در جدول ۱ مشاهده می شود. نتایج نشان می دهد که الگوی تأثیر نانوذرات اکسیدتیتانیوم

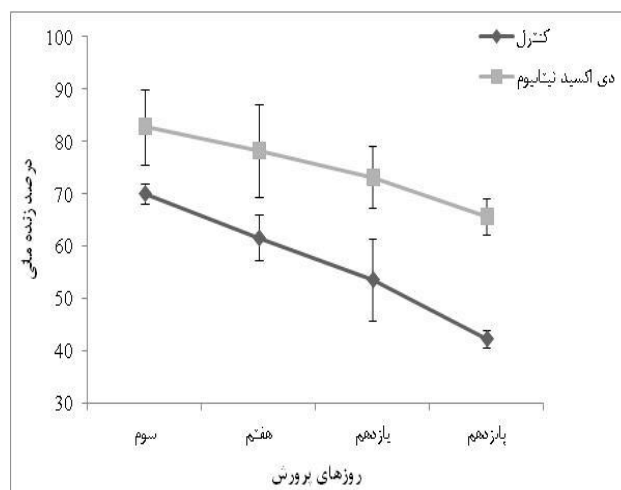
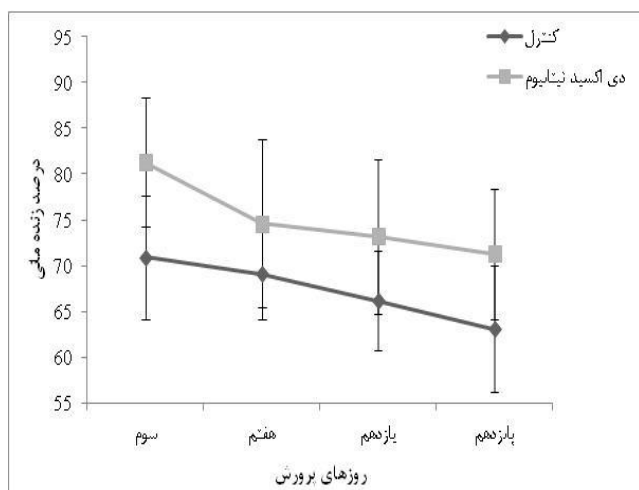
کاهش داد ($P \leq 0.05$)، درحالی‌که عکس این مسئله درباره گونه آرتیمیا فرانسیسکانا اتفاق افتاد و تغذیه این گونه با مخمر غنی شده با اکسیدتیتانیوم فعالیت آنزیم‌های پیش گفته را به طور معناداری افزایش داد ($P \leq 0.05$). نتایج مربوط به تأثیر اکسیدتیتانیوم بر درصد چربی بدن و همچنین پروفایل اسیدهای چرب به ترتیب در شکل ۳ و جدول ۲ ارائه شده است.

بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در گونه آرتیمیا ارومیا و آرتیمیا فرانسیسکانا متفاوت است. ولی نکته‌ای که در هر دو گونه به طور مشابه اتفاق افتاد تأثیر افزایشی بسیار معنی‌دار استفاده از نانوذرات اکسید تیتانیوم، در افزایش فعالیت پروتئاز کل در هر دو گونه بود ($P \leq 0.05$). درباب دیگر آنزیم‌های گوارشی، استفاده از مخمر غنی شده با نانوذرات اکسیدتیتانیوم فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و آلکالین فسفاتاز را به طور معناداری



شکل ۱- تأثیر استفاده از نانوذره اکسیدتیتانیوم بر رشد دو گونه آرتیمیا ارومیا (چپ) و آرتیمیا فرانسیسکانا (راست) بعد از 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.



شکل ۲- تأثیر استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم بر زنده مانی دو گونه آرتیمیا ارومیا (چپ) و آرتیمیا فرانسیسکانا (راست) بعد از 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.

ندارد ($P \geq 0.05$) ولی به طور معنی‌داری میزان چربی آرتیمیا ارومیا را کاهش می‌دهد ($P \leq 0.05$). چنانچه در بخش مواد و

نتایج نشان داد که استفاده از مخمر غنی شده با نانوذرات اکسیدتیتانیوم تأثیر معنی‌دار بر میزان چربی آرتیمیا فرانسیسکانا

روشها اشاره شد پروفایل اسیدهای چرب در دو گونه آرتمیا چون با یک تکرار انجام شد امکان مقایسه آنها وجود نداشت، ولی افزایش محسوسی در میزان اسیدهای چرب اشباع، غیراشباع، اسید لینولئیک و اسید لینولنیک در هر دو گونه 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 از جمله منابعی هستند که نانوذرات در آن پراکنش یافته

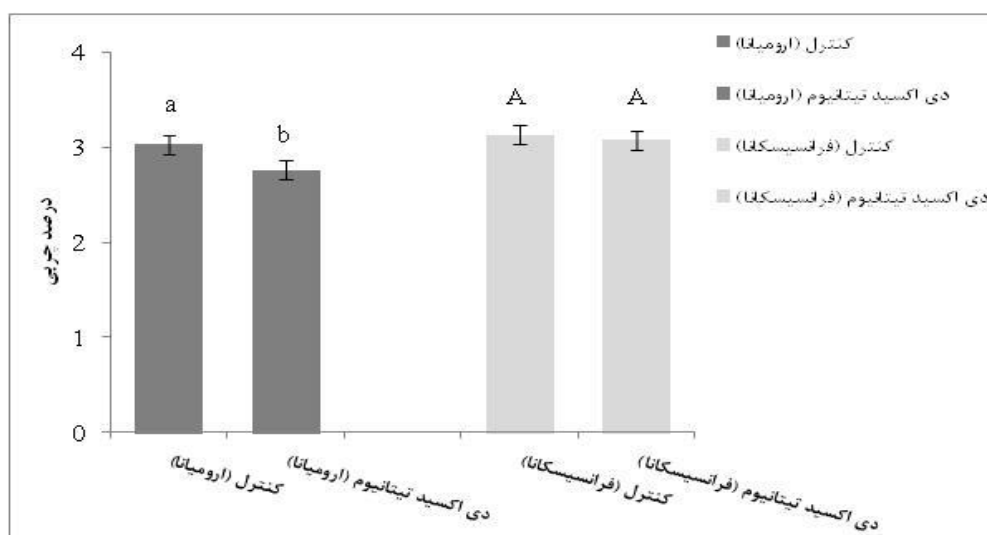
و با توجه به ویژگیهای خود می توانند موجب تغییراتی در عملکرد فیزیولوژیک آبزیان (به منزله یکی از حلقه های اولیه زنجیره غذایی) و همچنین انسانها (به منزله حلقه آخر زنجیره) شوند (Ates et al., 2013). بنابراین، در سالهای اخیر، تمرکز بر روی اکوفیزیولوژی و توکسیکولوژی این دسته از مواد افزایش یافته است. آرتمیا به مثابه سخت پوستی آبی، دارای سیستم تغذیه ای فیلترکنندگی غیرانتخابی است؛ بنابراین، می تواند 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 اکوفیزیولوژی تبدیل کرده است.

جدول ۱- تأثیر استفاده از نانوذرات بیولوژیک اکسیدتیتانیوم بر فعالیت آنزیمهای گوارشی *A. franciscana* و *A. urmiana*
Table 1. The effects of titanium dioxide nanoparticles on *A. urmiana* and *A. franciscana* digestive enzymes activity

	Control	TiO ₂
<i>A. urmiana</i>		
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
<i>A. franciscana</i>		
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 ویژه آنزیمهای گوارشی براساس توتال پروتئاز و پپسین براساس μmol of tyrosine released / min / mg protein آملایز μmol starch hydrolyzed / min / mg protein، لپاز μmol of substrate hydrolyzed / minute / mg protein، آلکالین فسفاتاز μmol substrate released / min / mg protein at 37° C داده ها براساس $\text{mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند و داده هایی با حروف مختلف در هر ردیف دارای اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

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



شکل ۳- تأثیر استفاده از نانوذرات اکسیدتیتانیوم بر درصد چربی بافت دو گونه آرتیمیا ارومیا و آرتیمیا فرانسیسکانا بعد از اتمام دوره پرورش.

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

جدول ۲- 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
<i>A. urmiana</i>		
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
<i>A. franciscana</i>		
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

غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان نشان داد که با وجود تمام تغییرات بیوشیمیایی که در برخی ارگان‌ها از جمله مغز اتفاق افتاده بود تغییر معنی‌دار در شاخص‌های رشد بچه ماهیان بعد از اتمام دوره پرورش مشاهده نشد. آنها دلیل این مسئله را غلظت پایین دی‌اکسیدتیتانیوم (Sub-lethal toxic) در جیره غذایی قزل‌آلا و در نتیجه سازگاری بچه ماهیان 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 مطالعه حاضر، اولین گزارش

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) درباره تأثیر استفاده از نانوذرات دی-اکسیدتیتانیوم (۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا) در جیره

در زمینه تأثیر نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر رشد، زنده ماندی و فعالیت آنزیم های گوارشی در *آرتمیا ارومیا* و *آرتمیا فرانسیسکانا*، و جزء اولین گزارش ها درباره تأثیر این نانوذرات بر ترکیب بدنی در هر دو گونه *آرتمیا* است. در این مطالعه، از مخمر غنی شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم (شکل ارگانیک) برای تغذیه هر دو گونه *آرتمیا* استفاده شد و نتایج نشان داد که استفاده از این نانوذرات تأثیری معنی دار بر رشد *آرتمیا ارومیا* و *آرتمیا فرانسیسکانا* ندارد. به نظر می رسد استفاده از نانوذرات دی اکسید تیتانیوم در غلظت مورد استفاده، نتوانسته سمیت لازم و در نتیجه کاهش رشد در *آرتمیا*ها را داشته باشد و به نوعی سازگاری با این نانوذرات در محیط پرورش انجام گرفته است. همچنین استفاده از مخمر غنی شده با نانوذرات دی اکسید تیتانیوم بر زنده ماندی *آرتمیا ارومیا* تأثیر معنی دار نداشت ولی میزان زنده ماندی *آرتمیا فرانسیسکانا* را به طور معناداری افزایش داد. دلیل این امر دقیقاً مشخص نیست، ولی به نظر می رسد *آرتمیا ارومیا* با توجه به شرایط خاص دریاچه 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 مرگ و میر آن طبیعی بوده است و در مقابل نانوذرات دی اکسید تیتانیوم با تغییرات مثبت از جمله نشان دادن خاصیت آنتی باکتریال (Brunet et al., 2009; Visai et al., 2011) و حذف باکتری های پاتوژن میزان زنده ماندی *آرتمیا فرانسیسکانا* را که با توجه به ماهیت گونه ای خود که ذاتاً گونه ای حساس است افزایش داده است. تحقیق در مورد فلور باکتریایی محیط پرورش می تواند به اثبات این فرضیه کمک شایانی بکند.

فعالیت آنزیم های گوارشی (پروتاز، آمیلاز و لیپاز) می تواند به منزله 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 آنزیم های گوارشی در آبزیان پرداخته است مطالعه وانگ و همکارانش در سال ۲۰۱۵ در باره تأثیر استفاده از نانوذرات مس و همچنین یون مس به صورت سولفات مس بر فعالیت پروتاز، آمیلاز و لیپاز در بچه ماهیان گروپر نارنجی (*Epinephelus coioides*) باشد. نتایج مطالعات آنها نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات مس

و همچنین یون های فلزی مس، فعالیت آنزیم های مذکور کاهش پیدا می کند. دلایل مختلفی برای این کاهش در فعالیت آنزیم های گوارشی می تواند مطرح باشد که از جمله می توان به تأثیر مستقیم یون های فلزی در کاهش سنتز این آنزیم ها اشاره کرد (Dedourge-Geffard et al., 2009). همچنین به تأثیر غیرمستقیم این مواد بر رفتار ماهی و تأثیر بر کیفیت مواد غذایی و در نتیجه کاهش مصرف غذایی در ماهی می توان اشاره کرد که ممکن است باعث کاهش ترشح آنزیم های گوارشی شود (Maltby & Crane, 1994; Sunde et al., 2001; Suzer et al., 2006).

مطالعات مختلف تغییر پروفایل آنزیم های گوارشی همانند تریپسین، آمیلاز و لیپاز را بعد از مجاورت با انواع فلزات نشان می دهد (Fouqueray et al., 2013). افزایش فعالیت آنزیم های گوارشی تریپسین، آمیلاز و لیپاز بعد از مجاورت با فلزات آهن و روی در ماهی کپور از جمله این گزارش ها 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 بعد از مصرف کادمیوم به مدت ۳۰ روز در گربه ماهی نشان داد. در باب دی اکسید تیتانیوم، برخی گزارش ها کاهش فعالیت آنزیم های گوارشی را بعد از استفاده از این اکسید فلزی نشان می دهد (Dedourge-Geffard et al., 2009) که ممکن است به دلیل نقش منفی این اکسید فلزی در تغییر رفتار تغذیه ای جاندار یا تأثیر مستقیم در فعالیت و سنتز آنزیم ها باشد. در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم های گوارشی در *آرتمیا فرانسیسکانا* بعد از استفاده از این نانوذرات افزایش یافت و عکس این مسئله در باب *آرتمیا ارومیا* مشاهده شد و استفاده از تیمار دی اکسید تیتانیوم فعالیت آنزیم های گوارشی را در گونه اخیر به طور معناداری کاهش داد. با توجه به نکات بالا امکان رصد میزان تغذیه *آرتمیا*ها و بررسی تأثیر نانوذرات بر رفتار این جاندار وجود نداشت. بنابراین، تفکیک این مسئله که نانوذرات با کدام روش (تأثیر بر فعالیت و سنتز آنزیم ها یا تأثیر بر رفتار تغذیه ای) بر فعالیت آنزیم های گوارشی تأثیر گذارند امکان پذیر نبود. به نظر می رسد تفاوت های گونه ای در رفتار و تغذیه از جمله عوامل تأثیر گذار باشند. اگرچه نقش عوامل دیگر

از جمله 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 مطالعه حاضر، درصد چربی بدن در گونه *آرتمیا ارومیا* بعد از تغذیه با مخمر غنی شده با نانوذرات اکسید مس کاهش یافت، ولی تغییر معنی داری در درصد چربی *آرتمیا فرانسیسکانا* مشاهده نشد. در مطالعه رامسدن و همکاران در سال ۲۰۱۲، استفاده از نانوذرات دی‌اکسید تیتانیوم (۱۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا) در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان باعث کاهش درصد چربی در بچه ماهیان شد.

این کاهش درصد چربی با عدم تأثیرگذاری این نانوذرات بر رشد این بچه ماهیان 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.

به نظر می‌رسد حساسیت *آرتمیا ارومیا* به سمیت دی‌اکسید تیتانیوم بیشتر از حساسیت آن به *آرتمیا فرانسیسکانا* باشد. با توجه به عدم رشد معنی دار در هر دو گونه در مواجهه با این نانوذره، *آرتمیا ارومیا* از ذخایر چربی خود برای مقابله با سمیت نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم استفاده کرده است.

تأثیر استفاده از اکسیدهای فلزی در تغییر پروفایل اسیدهای چرب در مطالعات مختلف گزارش شده است. در مطالعه سائر 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 معنی دار 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) پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف مس در مطالعه‌ای که فاکینا و همکارانش در سال ۲۰۱۳ انجام دادن از دیگر نتایجی بود که گزارش شد. در مطالعه حاضر، میزان اسیدهای چرب اشباع، تک غیراشباع، اسیدلینولئیک و اسیدلینولئیک در هر دو گونه *آرتمیا* در تیمار نانوذره دی‌اکسید تیتانیوم، بیشتر از تیمار کنترل بود، درحالی که استفاده از نانوذره 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 پس از 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 درباره تأثیر این دسته از اکسیدهای فلزی، اندازه‌گیری آنزیم‌های دخیل در متابولیسم چربی و تغییر و تبدیلات اسیدهای چرب ضروری است که می‌تواند پایه مطالعه دیگری در این زمینه باشد.

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

همچنین درباب تأثیر بر ترکیب بدنی نتایج به دست آمده در این تحقیق با برخی نتایج در باره دیگر آبریان مشابه است که دلایل دقیق و مستدل آن مشخص نیست و به مطالعه بیشتر در زمینه تأثیر نانوذرات در پاسخ استرسی آبریان و همچنین ارتباط آنها با تغییر پروفایل اسیدهای چرب نیاز است.

References

- AOAC.** 2000. Official Methods of Analysis 16th 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, accumulation, 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 Biol. 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 *Leuciscus idus* (L.) 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 rainbow trout (*Oncorhynchus*

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 TiO₂ 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 importance 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 TiO₂. – *Laboratory Journal Europe* 14: 42-43.
- Pérez, S., Farré, M. I. 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., Garcia-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., Hassel, 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., Pouloupoulou, 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

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 TiO₂ 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 TiO₂, 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 غنی شده با نانوذرات دی اکسیدتیتانیوم بر پارامترهای رشد، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و متابولیسم چربی در دو گونه آرتمیا. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۳: ۴۸-۶۰.