مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

اثر افزودن پودر گیاهان دارویی و آلودگی جیره غذایی به آفلاتوکسین B_1 بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در تراکم‌های مختلف

زهرا محمودی کیا[۱]، احمد ایمانی[۱*]، کوروش سروی مغانلو[۱]، مزدک رازی[۲]

[۱] گروه شیلات و آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ایران

[۲] گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۷/۰۴/۰۶
اصلاح: ۹۷/۰۶/۰۹
پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۲

کلمات کلیدی:
آفلاتوکسین
آویشن
رزماری
قزل‌آلای رنگین‌کمان

چکیده

در پژوهش حاضر اثر تراکم نگهداری و سم آفلاتوکسین B_1 به همراه پودر گیاهان آویشن و رزماری جیره غذایی بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی زوائد پیلوریک قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور ۶۰۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی 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 ppb ۵۰) به همراه افزودن ۴ درصد ترکیب پودر گیاهان آویشن و رزماری تقسیم شدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد و آزمایش به مدت ۴۵ روز ادامه یافت. پرورش در تراکم بالا (۴۵ کیلوگرم در مترمکعب) و تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین در مقایسه با گروه شاهد موجب افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی شامل آمیلاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز شد ($P<0/05$). استفاده از پودر گیاهان آویشن و رزماری در جیره غذایی شاید به دلیل عدم دسترسی ماهی به ترکیبات فعال گیاهی موجود در درون سلول‌های گیاهی، نتوانست اثر پاتولوژیک آفلاتوکسین بر افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را تعدیل یا خنثی نماید ($P>0/05$). درک سازوکار تأثیر تراکم و آلودگی جیره غذایی با آفلاتوکسین بر افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی و اهمیت چنین افزایشی بر فیزیولوژی گوارش آبزی هدف مستلزم مطالعات بیشتری در آینده است.

مقدمــه

امروزه با توجه به کاهش منابع آبی، افزایش تراکم پرورش یکی از راه‌کارهای افزایش تولید در واحد سطح می‌باشد (Trenzado *et al.*, 2006; Rafatnezhad *et al.*, 2008). اما افزایش تراکم ممکن است به دلیل استرس ناشی از ازدحام موجب کاهش سرعت رشد ماهی شود (Jorgensen *et al.*, 1993). در شیوه پرورش متراکم اهمیت غذا و سلامت آن به‌طور مستقیم بر سلامت ماهی و عملکرد آن مؤثر است (Abbas *et al.*, 2008). بنابراین توجه به کیفیت غذا در سیستم‌های متراکم پرورش آبزیان نقش بی‌بدیلی در موفقیت این صنعت در آینده خواهد داشت. اقلام غذایی مانند ذرت و فرآورده‌های جانبی دانه‌های روغنی نظیر بادام زمینی و پنبه‌دانه که برای تأمین احتیاجات غذایی آبزیان قابل استفاده هستند، در شرایط رطوبت و درجه حرارت بالا به راحتی در معرض آلودگی با سموم قارچی می‌باشند (Kabak *et al.*, 2006).

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: a.imani@urmia.ac.ir

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

بر اساس آمار FAO حداقل ۲۵٪ محصولات غذایی توسط قارچها و سموم ناشی از آن‌ها آلوده می‌شوند. طی سال‌های اخیر تمایل به استفاده از اقلام غذایی گیاهی در غذای دام و آبزیان افزایش یافته است. به همین دلیل خطر آلوده شدن غذای آبزیان به سموم قارچی افزایش یافته است (Abdalla,1997). آفلاتوکسین‌ها گروهی از سموم قارچی می‌باشند که بیشتر توسط کپک‌های جنس *Aspergillus* به ویژه گونه‌های *A. flavus* و *A. parasiticus* تولید می‌شوند و به علت سمیت زیاد و مخاطراتی که برای مصرف‌کنندگان (دام و انسان) در بردارند، حائز اهمیت هستند. این سموم سرطان‌زا و در واقع هپاتوکارسینوژن بوده و برای کبد، کلیه و سیستم عصبی سمی می‌باشند (Khan *et al*., 2001). آفلاتوکسین‌ها برای همهٔ موجودات از جمله انسان و آبزیان به ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان جوان بسیار سمی هستند (Imani *et al*., 2018).

آفلاتوکسین B_1 (Aflatoxin B_1) سمی‌ترین و فراوان‌ترین ترکیب سرطان‌زای طبیعی تلقی می‌شود و در حال حاضر یکی از مهم‌ترین سموم قارچی تحت نظارت سازمان غذا و داروی آمریکا می‌باشد (Celik and Sur, 2003). آفلاتوکسین در دام و طیور موجب اختلالات گوارشی، کاهش سرعت رشد و بازدهی پایین حیوان می‌شود (Gallo *et al*., 2010). در آبزیان خطر بروز بیماری در اثر مصرف پودر ماهی و به‌ویژه نهاده‌های غذایی با منشأ گیاهی آلوده به آفلاتوکسین از جمله کنجاله پنبه‌دانه، بادام زمینی، ذرت و سویا جهت فرمولاسیون خوراک آبزیان وجود دارد. آفلاتوکسین موجب کاهش قابل‌توجه میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین پلاسما می‌گردند، البته حساسیت به آفلاتوکسین‌ها بسته به گونه، جنس، سن و شرایط محیطی متفاوت می‌باشد (Santacroce *et al*., 2008). تحقیقات نشان‌دهنده‌ی اهمیت بالای آلودگی آفلاتوکسینی خوراک قزل‌آلای رنگین‌کمان نسبت به سایر ماهیان پرورشی می‌باشد (Lovell, 2003).

آنزیم‌های گوارشی نقش بسیار مهمی در روند هضم و جذب مواد مغذی اعم از پروتئین و چربی دارند (Rungraungsak-Torrisen *et al*., 2006) و مطالعه فعالیت آنزیم‌های گوارشی در انتخاب درست اجزای غذایی جیره و همچنین سلامت آبزی برای محققان و پروش‌دهندگان بسیار مفید است. با وجود اهمیت زیاد این موضوع، گزارش‌ها درزمینه تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت تأثیر شرایط پرورش و همچنین آلودگی با سموم قارچی بسیار اندک است. ازاین‌رو مطالعه تغییر فعالیت آنزیم‌های گوارشی در پاسخ به آلودگی‌های غذایی یک گام ضروری در پی بردن به چگونگی مکانیسم گوارش و سازگاری جانداران با تغییر کیفیت جیره غذایی است (Sunde *et al*., 2001).

استفاده از ترکیبات طبیعی از جمله گیاهان دارویی جهت تعدیل اثرات سموم مختلف از جمله آفلاتوکسین‌ها بسیار مورد توجه قرارگرفته 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 (Hahm *et al*., 2001). از این گیاهان می‌توان به رزماری اشاره کرد که دارای ترکیبات آلفا پینن، سینئول، کامفن و کامفور با فعالیت‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی اشاره داشت (Benchaar *et al*., 2007; Bozin *et al*., 2007). آویشن نیز یکی دیگر از گیاهان دارویی بومی مناطق جنوبی ایران است (Ashtaral *et al*., 2007) و دارای ترکیباتی مانند تانن، ساپونین، ترکیبات فنولی، ترکیبات فلاونوئیدی، ترپنوئیدها و روغن‌های فرار ترکیبات اکسیژن‌دار مانند تیمول و کارواکرول می‌باشد (Malik *et al*., 2003). این گیاه به‌واسطه داشتن ترکیبات فنولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی است (Naghdi Badi *et al*., 2004). اثر گیاهان دارویی به عنوان محرک اشتها، رشد، بهبود عملکرد دستگاه گوارش و سیستم ایمنی ماهیان مورد بررسی قرار گرفته است (Reverter *et al*., 2014; Imani *et al*., 2018).

به دلیل افزایش رغبت عمومی برای افزایش تراکم ذخیره‌سازی در سامانه‌های آبزی‌پروری به دلیل محدودیت زمین و آب و همچنین افزایش خطر آلودگی جیره‌های غذایی آبزیان با سموم قارچی به جهت افزایش روزافزون استفاده از منابع گیاهی در تنظیم و ساخت جیره‌های غذایی آبزیان، مطالعه حاضر به بررسی اثر تراکم‌های مختلف ذخیره‌سازی و سم آفلاتوکسین B_1 بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداخته است. همچنین اثر استفاده از پودر گیاهان دارویی (رزماری و آویشن) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین که در تراکم‌های مختلف پرورش یافته‌اند، نیز در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

مواد و روش‌ها

تهیه و ذخیره‌سازی ماهیان

نخست تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۳±۹۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی آذربایجان غربی شهرستان ارومیه 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 مخازن ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۰۰ لیتر آب با تراکم ۱۵ و ۴۵ کیلوگرم در مترمکعب در سالن تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه ارومیه پرورش یافتند. تغذیه ماهیان ۳ نوبت در روز و به میزان ۳ درصد وزن بود. این مطالعه به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی ساده شامل ۶ تیمار، هر کدام با ۳ تکرار و به مدت ۴۵ روز به طول انجامید (جدول۱).

در طول دوره پرورش، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما و میزان اکسیژن محلول به‌طور مرتب روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد، این مقادیر در محدوده مناسب برای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار داشت (به ترتیب ۰/۵±۱۵/۵ درجه سانتی‌گراد و ۰/۶±۸/۰ میلی‌گرم در لیتر).

جدول ۱. تیمارهای آزمایشی مورد بررسی در پژوهش حاضر

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

ساخت جیره‌های آزمایشی

در این پژوهش از جیره غذایی تجاری $GFT_{۲}$ استفاده شد، به این شکل که پس از آسیاب نمودن دان‌های غذایی، آفلاتوکسین و/یا پودر گیاهان 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 رشته‌های نازک (قطر تقریبی ۲ mm) درآمد. رشته‌ها 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 شوند. رشته‌های خشک شده به قطعات کوچک‌تری شکسته شدند و برای زدودن خاکه از الک به‌اندازه چشمه کوچک‌تر (۱ mm) استفاده گردید. در نهایت دان‌های تهیه شده در کیسه‌های فریزر یک کیلوگرمی به همراه مقداری ژل نم‌گیر با ثبت تاریخ و تیمار در فریزر نگهداری شدند. برای غذادهی ماهیان هر گروه آزمایشی، یک کیسه معین از جیره غذایی آن گروه از فریزر بیرون آورده شد و بعد از توزین غذای هر مخزن به صورت جداگانه در هر ظرف، مابقی غذا به یخچال منتقل شد (Imani *et al*., 2018).

نمونه‌برداری از ماهیان

در پایان دوره جهت نمونه‌برداری از زوائد پیلوریک ماهیان، سه قطعه ماهی از هر تکرار به‌صورت تصادفی انتخاب شد و با پودر گل میخک (۲۰۰ قسمت در میلیون) بی‌هوش شدند (Imani *et al*., 2018). در نهایت ماهیان آسانکشی (قطع نخاع) شده و سریعاً در مجاورت یخ کالبدگشایی گردیدند. نمونه‌های تهیه شده تا زمان سنجش‌های مورد نظر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Lemieux *et al*., 1999).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

سنجش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی

جهت تهیه عصاره آنزیمی، بافت زوائد پیلوریک به نسبت وزنی ۵:۱ در بافر Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، ۷، توسط هموژنایزر (مدل Polytron PT1300Δ) به مدت ۱/۵ دقیقه همگن شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل Z36HK) در دمای ۴°C با دور ۱۰۰۰۰g سانتریفیوژ گردید. محلول رویی، جهت سنجش پروتئین محلول و فعالیت آنزیمی در دمای ۸۰°C- نگهداری شد (Chong *et al*., 2002). میزان پروتئین محلول نمونه‌ها به روش Bradford (1976) تعیین شد. جهت تعیین فعالیت آنزیم پروتئاز کل ابتدا ۲۰ میکرولیتر از عصاره خام آنزیمی با ۰/۵ میلی‌لیتر محلول Azocasein دو درصد در Tris-HCl ۵۰ میلی مولار و پی اچ ۷/۵ مخلوط و پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه، ۰/۵ میلی‌لیتر TCA (Trichloroacetic Acid) به آن اضافه گردید. نمونه‌ها سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت g ۶۵۰۰ سانتریفیوژ شدند. فعالیت ویژه آلکالین پروتئاز به ازای مدت انکوباسیون (۱۰ دقیقه) و میزان پروتئین عصاره آنزیمی (میلی‌گرم) محاسبه شد (Garcia-Carreno and Haard, 1993). هر سنجش لیپازی شامل ۷ میکرولیتر عصاره خام آنزیمی به همراه ۸۶ میکرولیتر محلول Sodium cholate و ۲/۵ میکرولیتر محلول متوکسی اتانول بود. پس از افزودن ۵/۵ میکرولیتر پارانیتروفنیل مریستات به مجموعه فوق و انکوباسیون نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر قرائت شد (Iijima *et al*., 1998). جهت سنجش فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز ابتدا به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی ۲۵۰ میکرولیتر نشاسته یک درصد اضافه شد. پس از ۳ دقیقه ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف رنگی دنیتروسالیسیلیک اسید به آن اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه قرار گرفتند. سپس ۵ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه و جذب نوری در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. میزان فعالیت آلفا آمیلاز، بر حسب میکرو مول مالتوز آزاد شده تحت اثر آنزیم در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد (Bernfeld, 1955).

تحلیل‌های آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون توکی انجام شد. همچنین برای بررسی (۱) اثر تراکم‌های مختلف بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه، (۲) اثر سم آفلاتوکسین بر فعالیت آنزیم‌های مورد مطالعه فارغ از تراکم پرورش، (۳) اثر پودر آویشن شیرازی و رزماری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان پرورشی در تراکم پرورشی ۱۵ کیلوگرم بر مترمکعب که با جیره غذایی حاوی سم آفلاتوکسین تغذیه شده‌اند، (۴) اثر پودر آویشن شیرازی و رزماری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان پرورشی در تراکم پرورشی ۴۵ کیلوگرم بر مترمکعب که با جیره غذایی حاوی سم آفلاتوکسین تغذیه شده‌اند و (۵) اثر پودر آویشن شیرازی و رزماری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان پرورشی تغذیه شده با جیره‌های غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین فرق از تراکم نگهداری، از مقایسات متعامد با ضرایب ویژه (جدول۲) استفاده شد (Yazdi Samadi *et al*., 2007). سطح معنی‌داری آزمون‌ها کمتر از ۵ درصد بود. تمامی تحلیل‌های آماری در محیط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ انجام شد. رسم نمودارها نیز با استفاده از نرم‌افزارExcel نسخه ۲۰۱۳ صورت پذیرفت.

جدول ۲. ضرایب مقایسات متعامد مورد استفاده در این پژوهش

مقایسات متعامد	تیمارها					
	۱	۲	۳	۴	۵	۶
۱*	۱	۰	-۱	۰	۰	۰
۲	۱	-۱	۱	-۱	۰	۰
۳	۰	۱	۰	۰	-۱	۰
۴	۰	۰	۰	۱	۰	-۱
۵	۰	۱	۰	۱	-۱	-۱

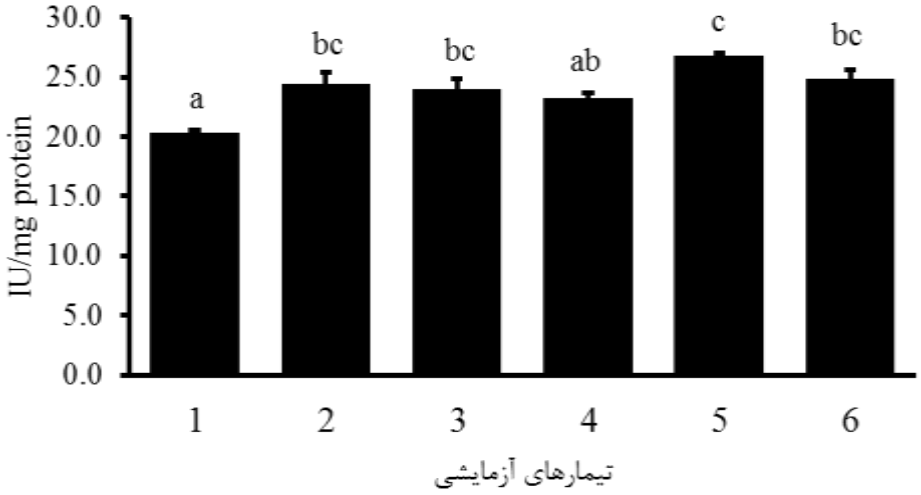
* برای توضیح در هر مورد هرکدام مقایسات متعامد مورد استفاده به متن مراجعه نمایید.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

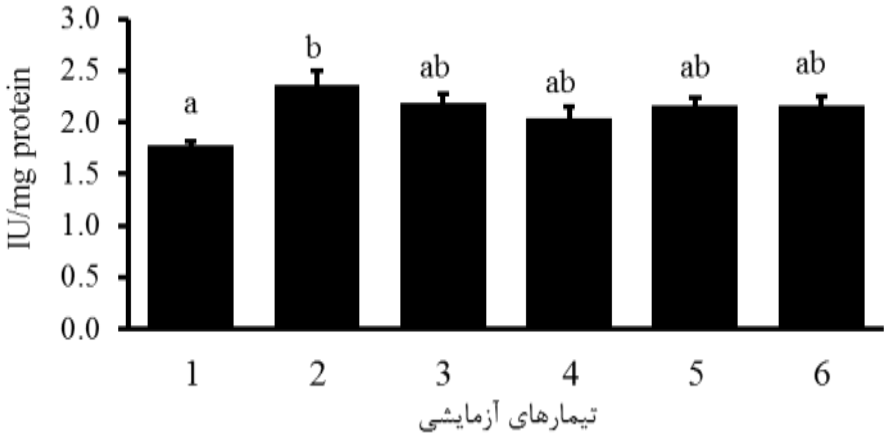
نتایـج

شکل ۱ میزان فعالیت آنزیم آمیلاز تیمارهای آزمایشی را در انتهای دوره پرورش نشان می‌دهد. بیشترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب مربوط به تیمار ۵ و ۱بود (P<۰/۰۵). پرورش در تراکم بالا (تیمار ۳ در مقایسه با تیمار ۱) و تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین (تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۱) باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آمیلاز شد (P<۰/۰۵). افزودن ترکیب پودر گیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین (تیمارهای ۵ و ۶) فارغ از تراکم پرورش اثری بر میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه به تیمارهای متناظر آن‌ها (به ترتیب تیمارهای ۲ و ۴) نداشت (P<۰/۰۵)، به عبارت دیگر نتوانست اثر آفلاتوکسین بر افزایش فعالیت این آنزیم را مهار نماید.



شکل ۱. میزان فعالیت آنزیم آمیلاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش. حروف غیر یکسان نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشند. برای اطلاعات بیشتر در مورد تیمارهای آزمایشی به جدول ۱ مراجعه نمایید.

شکل ۲ میزان فعالیت آنزیم لیپاز گروه‌های مختلف آزمایشی را در انتهای دوره پرورش نشان می‌دهد. بیشترین و کمترین میزان فعالیت این آنزیم به ترتیب مربوط به تیمار۲ و تیمار ۱بود (P<۰/۰۵). مشابه فعالیت آنزیم آمیلاز، پرورش در تراکم بالا (تیمار ۳ در مقایسه با تیمار ۱) و تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین (تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۱) باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم لیپاز شد (P<۰/۰۵).

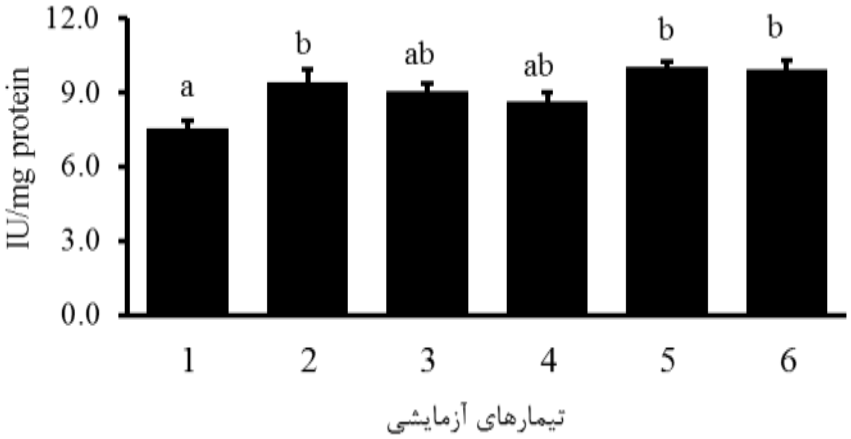


شکل ۲. میزان فعالیت آنزیم لیپاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش. حروف غیر یکسان نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ می‌باشند. برای اطلاعات بیشتر در مورد تیمارهای آزمایشی به جدول ۱ مراجعه نمایید

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

شکل ۳ میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی را در انتهای دوره پرورش نشان می‌دهد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به تیمارهای ۲، ۵ و ۶ بود و کمترین فعالیت آن در تیمار ۱ سنجش گردید (P<۰/۰۵). میزان فعالیت آنزیم یاد شده در تیمارهای ۳ و ۴ مشابه هم بود (P>۰/۰۵). پرورش در تراکم بالا (تیمار ۳ در مقایسه با تیمار ۱) و تغذیه با جیره غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین (تیمار ۲ در مقایسه با تیمار ۱) باعث افزایش معنی‌دار میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز شد (P<۰/۰۵). افزودن ترکیب پودر گیاهان رزماری و آویشن به جیره غذایی آلوده به آفلاتوکسین (تیمارهای ۵ و ۶) فارغ از تراکم پرورش اثری بر میزان فعالیت این آنزیم در مقایسه با تیمارهای متناظر آن‌ها (به ترتیب تیمارهای ۲ و ۴) نداشت (P<۰/۰۵)، به عبارت دیگر نتوانست اثر آفلاتوکسین بر افزایش فعالیت این آنزیم را مهار نماید.



شکل ۳. میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز تیمارهای مختلف آزمایشی در انتهای دوره پرورش. حروف غیر یکسان نشانه اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ است. برای اطلاعات بیشتر در مورد تیمارهای آزمایشی به جدول ۱ مراجعه نمایید.

بر اساس نتایج مقایسات متعامد (جدول ۳) اثر تراکم‌های مختلف پرورش (کنتراست ۱) و همچنین حضور سم آفلاتوکسین در جیره غذایی فارغ از تراکم پرورشی (کنتراست ۲) بر میزان فعالیت تمامی آنزیم‌های گوارشی معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). علاوه بر این، اثر افزودن پودر آویشن و رزماری به جیره غذایی ماهیان پرورشی در تراکم ۱۵ کیلوگرم بر مترمکعب که با جیره غذایی حاوی سم آفلاتوکسین تغذیه شده بودند، بر میزان فعالیت آمیلاز معنی‌دار بود (کنتراست ۳). اثر پودر آویشن شیرازی و رزماری در ماهیان پرورشی در تراکم نگهداری ۴۵ کیلوگرم بر مترمکعب که با جیره غذایی حاوی سم آفلاتوکسین تغذیه شده بودند بر میزان فعالیت آلکالین پروتئاز معنی‌دار بود (کنتراست ۴). علاوه بر این، در کل فارغ از تراکم پرورش، افزودن پودر آویشن شیرازی و رزماری بر فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ماهیان پرورشی تغذیه شده با جیره‌های غذایی آلوده به سم آفلاتوکسین معنی‌دار بود (کنتراست ۵).

جدول ۳. نتایج مقایسات متعامد

آنزیم	مقایسه متعامد	P-value (دو دامنه)	آنزیم	مقایسه متعامد	P-value (دو دامنه)	آنزیم	مقایسه متعامد	P-value (دو دامنه)
آمیلاز (IU/mg protein)	۱	۰/۰۰۲	لیپاز (IU/mg protein)	۱	۰/۰۰۹	آلکالین پروتئاز (IU/mg protein)	۱	۰/۰۱۱
	۲	۰/۰۲۴		۲	۰/۰۴۲		۲	۰/۰۶۵
	۳	۰/۰۲۸		۳	۰/۱۸۱		۳	۰/۲۶۵
	۴	۰/۱۰۹		۴	۰/۳۵۴		۴	۰/۰۲۷
	۵	۰/۰۱۱		۵	۰/۷۵۲		۵	۰/۰۲۳

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

بحث

با توجه به افزایش تمایل به متراکم سازی پرورش آبزیان به علت کمبود زمین و دسترسی به منابع آبی، اهمیت تغذیه و تأمین خوراک با کیفیت بیش از پیش نمایان شده است. علاوه براین همان‌طور که بیان شد، به دلایل مختلفی چون افزایش جایگزینی نهاده‌های دریایی مورد استفاده در تنظیم جیره غذایی آبزیان با منابع گیاهی، تغییر اقلیم و در نتیجه افزایش میزان شیوع آلودگی‌های سموم قارچی در نهاده‌های با منشأ گیاهی، احتمال حضور این آلاینده‌ها در جیره‌های غذایی آبزیان افزایش یافته است (Santacroce *et al*., 2008). در چنین شرایطی درک تأثیر متراکم‌سازی سامانه‌های پرورشی آبزیان به‌ویژه در اوزان پرواری و همچنین اثر آلودگی جیره‌های غذایی و شیوه‌های مدیریت تأثیر این سموم (استفاده از گیاهان دارویی) می‌تواند در بهینه‌سازی و مدیریت آبزی‌پروری و در نتیجه افزایش سود دهی مزارع مفید باشد (Singh *et al*., 2005).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که آلودگی جیره غذایی با آفلاتوکسین سبب افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و آلکالین پروتئاز) گردید. Imani و همکاران (۲۰۱۸) گزارش دادند آلودگی جیره غذایی با آفلاتوکسین روی بچه ماهیان ده گرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز نتیجه مشابهی به‌ویژه از نظر میزان فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز داشت. همچنین در جوجه‌ها (Marchioro *et al*., 2013) و اردک (Han *et al*., 2008) افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مشاهده شده است. علاوه بر این، پانکراتیتیس و هیپرتروفی سلول‌های آسینی لوزالمعده در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و همچنین تیلاپیای نیل در مواجهه با آفلاتوکسین B1 گزارش شده است (Ashley, 1965; Chavez-Snachez *et al*., 1994). تصور بر این است که پانکراتیتیس از عوامل اصلی کاهش جذب روده‌ای مواد مغذی به‌ویژه چربی‌ها و پروتئین است (Bliss and Wolfe, 2010). همچنین میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لیپاز در جوجه‌های دریافت کننده ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین در جیره غذایی افزایش یافت (Richardson and Hamilton, 1987). با این حال، چنین افزایشی در فعالیت آنزیم‌های گوارشی به مفهوم عملکرد بهتر در جذب مواد مغذی نیست، چرا که آسیب‌های حاد یا مزمن لوزالمعده باعث می‌شود مقادیر بیشتری آنزیم از سلول‌های ترشحی لوزالمعده حیوان آزاد می‌شوند و این امر باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی دستگاه گوارش می‌گردد (Largmani, 1990). برای مثال، آفلاتوکسین B_1 در اردک می‌تواند باعث کاهش رشد، کاهش قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی و تغییر در فعالیت آنزیم‌های گوارشی دوازدهه گردد. البته، تزریق درون صفاقی آفلاتوکسین در ماهی روهو (Rohu) 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 (Sahoo, 2005). نتایج مشابهی در گربه ماهی روگاهی گزارش شده است (Jantrarotai *et al*., 1990). همچنین Osborne and Hamilton (1981) مشاهده کردند که در جوجه‌های تغذیه با آفلاتوکسین سطح فعالیت آنزیم‌های لیپاز، تریپسین و آمیلاز کاهش یافت. Matur و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که فعالیت لیپاز در مرغ‌هایی که از غذای آلوده به آفلاتوکسین مصرف کرده بودند، در مقایسه با مرغ‌هایی که غذای عاری از آفلاتوکسین دریافت کرده بودند، کاهش یافت. تفاوت موجود میان نتایج پژوهش‌های مختلف می‌تواند با توجه به 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 مغذی به دلیل آفلاتوکسیکوزیس باشد، که بروز چنین واکنشی زمان‌بر بوده و در صورت ادامه‌دار بودن تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده بروز می‌نماید (Applegate *et al*., 2009). برای مثال، 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 (Marchioro *et al*., 2013). همچنین در پژوهش Nazdar و همکاران (۲۰۱۷) علیرغم کاهش فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف نانوذره اکسید نیکل در ماه اول، یک افزایش فعالیتی در ماه دوم مطالعه مشاهده گردید.

عصاره‌های مختلف گیاهی به منظور بهبود عملکرد حیوانات با اثر تحریک‌کنندگی بر ترشحات دستگاه گوارش یا به دلیل اثرات ضد باکتریایی مستقیم روی فلور روده به جیره اضافه می‌شوند (Citarasu, 2010). در این پژوهش استفاده از پودر گیاهان آویشن و رزماری اثری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه در ماهیان تغذیه با جیره‌های غذایی آلوده به آفلاتوکسین

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

نداشت، در حالی که در منابع مختلف آثار تعدیل‌کنندگی ترکیبات گیاهی نظیر اسانس دارچین و سیلیمارین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی گزارش شده است، به این شکل که تغذیه با این ترکیبات گیاهی تا حدی از افزایش پاتولوژیکی فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز کاسته بود (Nazdar *et al*., 2017; Imani *et al*., 2018). شاید دلیل چنین نتایج متفاوتی به استفاده از پودر گیاه آویشن و رزماری و در نتیجه غیر قابل دسترس بودن ترکیبات مؤثر گیاهی برای ماهیان پرورشی در این پژوهش باشد. با این وجود استفاده از عصاره این گیاهان به همراه پودر گیاهان در تیمارهای جداگانه در مطالعات آتی می‌تواند در درک علت اصلی بروز چنین پاسخ‌های متفاوتی راهگشا باشد. با این وجود در این زمینه نیز اطلاعات همسویی وجود ندارد؛ برای مثال افزایش سطح فعالیت آنزیم آمیلاز در موش‌های تحت تیمار زنجبیل گزارش شده است (Rao *et al*., 2003)، اما در مطالعه مشابهی تأثیر بازدارندگی زنجبیل بر فعالیت آمیلاز گزارش شده است (Akinyemi *et al*., 2010).

در پژوهش حاضر مشخص گردید که افزایش تراکم پرورش موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی مورد مطالعه گردید. در پژوهشی که Saekhow و همکاران (۲۰۱۸) به منظور تعیین کمترین حجم آب به منظور پرورش متراکم ماهی جنگجوی سیامی نر انجام دادند، مشخص شد که کاهش حجم آب به‌طور 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. 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 ترکم نسبت داده شد (Bolasina *et al*., 2006). با این وجود، Liu و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه اثر تراکم‌های مختلف نگهداری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ایمنی، شاخص‌های استرس سرم و رشد ماهی *Cynoglossus semilaevis* Günther دریافتند که در ماهیان پرورشی در تراکم بالا از میزان فعالیت آنزیم آمیلاز و لیپار کاسته شد. در این پژوهش دلیلی برای چنین کاهشی اشاره نشده است. علاوه بر این در مطالعه‌ای که روی *Palaemonetes sinensis* انجام شد، پژوهشگران دریافتند که میزان فعالیت تریپسین، آمیلاز و لیپاز به‌طور معنی‌داری با افزایش تراکم میگوها کاسته شد (Dong *et al*., 2018). در مطالعه Lazarevic و همکاران (۲۰۰۴) مشخص شد که میزان فعالیت آنزیم تریپسین در لاروهای ابریشم‌باف ناجور (*Lymantria dispar*) پرورشی در تراکم بالا بیشتر از میزان فعالیت این آنزیم در لاروهای نگهداری شده به‌صورت انفرادی بود، درحالی‌که میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و لوسین آمینوپپتیداز تحت تأثیر تراکم قرار نگرفت. اطلاعات محدودی در زمینه اثر تراکم بر میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی وجود دارد و نتیجه‌گیری در این ارتباط مستلزم انجام مطالعات بیشتری است. اما 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 (Lazarevic *et al*., 2004; Nazdar *et al*., 2017; Dong *et al*., 2018).

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی لوزالمعده ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان تحت تأثیر سم آفلاتوکسین و تراکم افزایش یافت و استفاده از پودر گیاهان آویشن و رزماری در جیره غذایی شاید به دلیل عدم دسترسی ماهی به ترکیبات فعال گیاهی موجود در درون سلول‌های گیاهی، نتوانست اثر پاتولوژیک آفلاتوکسین بر افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی را تعدیل یا خنثی نماید.

منابـع

Abbas, S., Ahmed, I., Hafeez-UR-Rahman, M., Mateen, A. 2008. Replacement of fish meal by canola meal in diet for major carp in fertilized ponds. Pakistan Veterinary Journal. 28: 111-114.

Abdalla, E.S. 1997. Zearalenone: incidence, toxigenic fungi and chemical decontamination in Egyptian cereals. Molecular Nutrition and Food Research. 41(6): 362-365.

Akinyemi, A.J., Obon, G., Akindahunsi, A.A. 2010. Inhibitory effect of aqueous extracts of two varieties of ginger on α-amylase.α-glucosidase and acetyl cholinesterase activities. Journal of Food and Nutrition Research. 49(1): 14-20.

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.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

Ashley, L.M. 1965. Histopathology of Rainbow trout aflatoxicosis. In Trout Research Conference Papers. U. S. D. H. E. W. and U. S. D. lnt. Fish/Wildlife Res. Rep. 70: 103-120.

Ashtaral Nakhai, L., Mohammadirad, A., Yasa, N., Minaie, B., Nikfar, S., Ghazanfari, G., Zamani, M. J., Dehghan, G., Jamshidi, H., Shetab Boushehri, V. Khorasani, R., Abdollahi, M. 2007. Benefits of Zataria multiflora Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM). 4: 43-50.

Benchaar, C., Yuxi, W., Chaves, A.V., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., Acharya, S.N., Thomas, J.E. 2007. Use of plant extracts in ruminant nutrition. Advances in Medicinal Plant Research. pp. 465-489.

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

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

Bliss, A., Hock, J. Cogley, G. 2013. A new inventory of mountain glaciers and ice caps for the Antarctic periphery. Annals of Glaciology. 54(63): 191-199.

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.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik I., Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*., Lamiaceae) essential oils. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 55: 7879-7885.

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.

Celik, I., Sur, E. 2003. Effects of aflatoxin B_1 on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. Journal of British Poultry Science. 44: 558–66.

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.

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.

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

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.

Gallo, A., Masoero, F., Bertuzzi, T., Piva, G., Pietri, A. 2010. Effect of the inclusion of adsorbents on aflatoxin B_1 quantification in animal feedstuffs. Food Additives and Contaminants. 27(1): 54-63.

Garcia-Carreno, F.L., Haard, N.F. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. Journal of Food Biochemistry. 17(2): 97-113.

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.

Han, X.Y., Huang, Q.C., Li, W.F., Jiang, J.F., Xu, Z.R. 2008. Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B_1 levels. Livestock Science. 119: 216-220.

Iijima, N., Tanaka, S., 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.

Imani, A., Bani, M.S., Noori, F., Farzaneh, M., Moghanlou, K.S. 2018. 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.

Jantrarotai, W., Lovell, R.T., Grizzle, J.M. 1990. Acute toxicity of aflatoxin B_1 to channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health. 2(4): 237-247.

Jorgensen, E.H., Christiansen, J.S., Jobling, M. 1993. Effects of stocking density on food intake, growth performance and oxygen consumption in Arctic charr (*Salvelinu salpinus*). Aquaculture. 110: 191-204.

Kabak, B., Dobson, A.D., Var, I.I.L. 2006. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 46(8): 593-619.

Khan, M.J., Renata, U.C., Christine, I., Bohm, J. 2001. Occurrence of aflatoxins in some common concentrate feeds in Bangladesh. Journal of Bangladesh Veterinarian.18(2): 130-135.

Largmani, C. 1990. Evaluation of ionic trypsin for acute pancreatitis. Methods in Enzymology. 74(2): 272-290.

Lazarevic, J., Peric-Mataruga, V., Vlahovic, M., Mrdakovic, M., 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.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]

Lemieux, H., Blier, P., Dutil, J.D. 1999. Do digestive enzymes set a physiological limit on growth rate and food conversion efficiency in the Atlantic cod (*Gadus morhua*). Fish Physiology and Biochemistry. 20(4): 293-303.

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. Fish Shellfish Immunol. 81: 416-422.

Lovell, R.T. 2003. Diet and Fish Husbandry. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (eds.). Fish Nutrition. 3rd edition. Academic Press. pp. 703-754.

Malik, M.S., Iqbal, M.J., Hamid, S. 2003. Essential oils resources of Pakistan studies on the essential oils of the species of Labiatae: Part-1. Pakistan Journal of Science. 55: 34-36.

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(2): 280-284.

Matur, E., Ergul, E., Akyazi, I., Eraslan, E., Cirakli, Z.T. 2010. The effects of Saccharomyces cerevisiae extract on the weight of some organs,liver, and pancreatic digestive enzyme activity in breeder hens fed diets contaminated with aflatoxins. Poultry Science. 89: 2213-2220.

Naghdi Badi, H., Darab, H., Yazdani, D., Sajedi, M., Nazari, F. 2004. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality of oil in thyme. Industrial Crops and Products. 19(3): 231-238.

Nazdar, N., Imani, A., Noori, F., Moghanlou, K.S. 2017. 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(2): 353-361.

Osborne, D.J., Hamilton, P.B. 1981. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. Poultry Science. 60: 1818-1821.

Rafatnezhad, S., Falahatkar, B., Tolouei Gilani, M.H. 2008. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of *Huso huso* juveniles. Aquaculture Research. 39: 1506-1513.

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.

Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., Sasal, P. 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: Current status and future perspectives. Aquaculture Research Aquaculture. 433: 50-61.

Richardson, K.E., Hamilton, P.B. 1987. Enhanced production of pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis in egg-type chickens. Poultry Science. 66: 640-644.

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.

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. 44(4): 1-11.

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.

Santacroce, M.P., Conversano, M.C., Casalino, E., Lai, O., Zizzadoro, C., Centoducati, G., Crescenzo, G. 2008. Aflatoxins in aquatic species: metabolism, toxicity and perspectives. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 18(1): 99-130.

Singh, P.K., Gaur, S.R., Barik, P., Sulochana, S., Shukla, S., Singh, S. 2005. Effect of protein levels on growth and digestibility in the Indian major carp (*Labeo rohita*) using slaughter house waste as the protein source. International Journal of Agriculture and Biology. 7: 939-941.

Sunde, J., Taranger, G. L., Rungraungsak-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 Physiology and Biochemistry. 25: 335-345.

Trenzado, C., Morales, A., Higuera, M. 2006. Physiological effects of crowding in Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, selected for low and high stress responsiveness. Aquaculture. 258: 583-593.

Yazdi Samadi, B., Rezaei, A., Valyzadeh, N. 2007. Ststitical Designs in Agricultural Research. 6th edition. Tehran University Press. 764 p. (in Persian)

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1398.9.1.4.3]