شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۱، بهار ۱۳۹۵

صفحات ۱۱۴-۱۰۱

اثر سطوح مختلف زئولیت نانو ساختار بر مسمومیت مزمن تجربی با آفلاتوکسین B1 موجود در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ارزیابی شاخصهای رشد و فیزیولوژی

مهدی فریدی کلورزی[۱]، بهرام فلاحتکار *[۲]، سهیل علی نژاد[۳]، داریوش داودی[۴]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد تکثیر و پرورش آبزیان، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

۳. استادیار مؤسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، ایران

۴. استادیار بخش تحقیقات نانوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۶/۳۱

چکیده

به منظور بررسی میزان کاهش آفلاتوکسین B1 (AFB1) به واسطه کاربرد زئولیت نانو ساختار (NZ) در جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلا (*Oncorhynchus mykiss*)، یک آزمایش تغذیه‌ای طراحی و به مدت ۵۶ روز اجرا شد. ۲۷۰ ماهی با وزن میانگین ۳/۷ ± ۲۳ گرم در ۶ گروه شامل C (شاهد)، NZ0.5 (جیره پایه + ۰/۵ درصد NZ)، NZ1 (جیره پایه + ۱ درصد NZ)، AF5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم AFB1)، AF5 NZ0.5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم AFB1 + ۰/۵ درصد NZ)، AF5 NZ1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم AFB1 + ۱ درصد NZ) و با ۳ تکرار تیماربندی و در ۴ نوبت در شبانه روز بر حسب اشتهای ماهی غذادهی شدند. در پایان دوره آزمایش، اختلاف معنی‌داری در شاخصهای رشد مشاهده نشد. در تیمار AF5 NZ0.5 نسبت به تیمار NZ0.5 شاخص کبدی، میزان گلبول‌های سفید و نوتروفیل بطور معنی‌داری کاهش و میزان لنفوسیت افزایش یافت. از سوی دیگر، سطح ائوزینوفیل در تیمار NZ0.5 نسبت به تیمار AF5 از افزایش معنی‌دار برخوردار بود. در سایر فاکتورهای هماتولوژیک اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. مقدار پروتئین کل و آلبومین در تمام تیمارهای حاوی آفلاتوکسین نسبت به تیمارهای فاقد آفلاتوکسین و نیز مقدار گلوبولین در تیمار AF5 نسبت به تیمار شاهد بطور معنی‌دار کاهش یافت. افزایش معنی‌دار مقدار فسفر در تیمار NZ0.5 نسبت به تیمار C مشاهده شد. میزان سدیم، کلسیم و کلسترول در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشت. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از زئولیت نانو ساختار به میزان ۰/۵ درصد جیره پایه در غذای بچه ماهیان قزل‌آلا، می‌تواند تا حد زیادی موجب کاهش اثرات منفی ناشی از آفلاتوکسین B1 شود.

واژگان کلیدی: آفلاتوکسین، زئولیت، رشد، هماتولوژی، قزل‌آلای رنگین کمان

* نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۳۴۴۳۲۳۰۲۴ Email: falahatkar@guilan.ac.ir

۱. مقدمه

با گسترش روزافزون مراکز پرورش دام، طیور و آبزیان در سطح جهان، تقاضا برای دریافت نهاده‌های غذایی به منظور ساخت خوراک در چنین مراکزی نیز افزایش چشمگیری یافته است. تهیه غذا مهمترین فرایند در آبزی‌پروری به شمار می‌آید و به عنوان مثال در پرورش ماهی قزل‌آلا تقریباً نیمی از هزینه‌های تولید را به خود اختصاص می‌دهد (Higgs *et al*., 1995). از اینرو صاحبان مزارع پرورش ماهی و نیز کارخانجات تولید کننده غذای آبزیان درصدد برآمده‌اند که از منابع ارزانتر برای ساخت غذا بهره بگیرند. یکی از راهکارهای مورد استفاده در این زمینه، جایگزینی آرد ماهی با پروتئین‌هایی است که منشاء گیاهی داشته و بنابراین کم هزینه‌تر هستند.

کاربرد مواد اولیه کشاورزی مانند غلات برای ساخت جیره غذایی آبزیان، همواره با این خطر اساسی همراه است که می‌تواند قارچ‌ها و سموم تولیدی توسط آنها را به غذای آبزیان وارد نماید. این سموم و از جمله آفلاتوکسینها ممکن است هنگام تولید، برداشت، ذخیره‌سازی و یا عمل‌آوری، باعث آلودگی محصولات کشاورزی شوند (Ahsan *et al*., 2001; Williams *et al*., 2004). سالانه حدود ۲۰ درصد از محصولات غذایی تولید شده در جهان توسط سموم قارچی آلوده می‌شوند که در این میان آلودگی ناشی از آفلاتوکسینها سهم بیشتری نسبت به آلودگی با سایر سموم دارد (Razzaghi *et al*., 2011). آفلاتوکسینها برای انسان و حیوانات، سمّی و سرطان‌زا می‌باشند (Wild *et al*., 1990). بر طبق اظهارات Wogan (۱۹۹۲) آفلاتوکسین B1 باعث ایجاد سرطان کبد در بسیاری از جانوران، از جمله ماهی‌هایی مثل قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ماهی آزاد sockeye (*Oncorhynchus nerka*) و گوپی (*Poecilia reticulata*)، همچنین سبب کاهش رشد، کاهش قدرت تولید مثل و کم‌خونی می‌شود. مطالعات Jiang و همکاران (۲۰۰۸) نشان داده است که آفلاتوکسینها سبب سرکوب سیستم ایمنی، به ویژه پاسخهای ایمنی سلولی در بسیاری از جانوران می‌شوند. در میان ماهیان پرورشی، قزل‌آلای رنگین کمان، حساسترین ماهی به آفلاتوکسین B1 محسوب می‌شود (Alinezhad *et al*., 2011).

مؤثرترین راه مقابله با ورود سموم قارچی به خوراک آبزیان، پیشگیری از رشد قارچهای مولد این سموم در مزارع تولید کننده محصولات کشاورزی است. با این وجود ممکن است علیرغم تمام تمهیدات اندیشیده شده، غذای آبزیان به طریقی آلوده به این سموم شده باشند. بنابراین لازم است برای دفع آنها از موادی استفاده کرد که قادر به اتصال به این سموم و خنثی کردن آنها باشند. برای مقابله با سمّ آفلاتوکسین، مواد مختلف شیمیایی مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. برخی از این مواد که به جاذب‌های شیمیایی معروف هستند، به جیره غذایی حیوانات اضافه می‌شوند. یکی از این مواد آلومینوسیلیکات هیدراته سدیم کلسیم* است که نوعی زئولیت بوده و می‌تواند با اتصال محکم به مولکول‌های آفلاتوکسین، از جذب آنها جلوگیری کند (Phillips *et al*., 1988). برخی از مطالعات نشان می‌دهد که موادی مانند سیلیکات‌های سدیم آلومینیوم و بنتونیت‌ها می‌توانند به بخش قابل توجهی از آفلاتوکسین موجود در غذاها متصل و مانع جذب آنها شوند (Waldneer and Lalman, 1998). زئولیت در غذا و بدن آبزیان نقشهای متعددی دارد که از جمله می‌توان به خواص ضدّ میکروبی و قارچی در دستگاه گوارش و خاصیت ضدّ آفلاتوکسینی در جیره غذایی آبزیان اشاره کرد. به همین دلیل، زئولیت با افزایش جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش و افزایش راندمان مصرف مواد مغذّی، می‌تواند به‌طور غیر مستقیم، سبب افزایش رشد و بقای جاندار آبزی شود (Nikawa *et al*., 1997). در یک آزمایش میزان توانایی چند زئولیت مصنوعی (Nax، NaY، NaA و CaA) در جذب آفلاتوکسین B1 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن نشان داد که زئولیت قادر به جذب ۹۰ درصد از آفلاتوکسین در شرایط *In vitro* می‌باشد (Miazzo *et al*., 2000). از آنجا که توان اتصال زئولیت‌ها با سموم قارچی سبب استفاده از آنها به عنوان جاذب این سموم شده است (Kubena *et al*., 1990; Goodarzi and Modiri, 2008). با کاربرد این ماده

* Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate

در ابعاد نزدیک به نانو، تأثیر آن را در کنترل این سموم و نیز میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنها مورد ارزیابی قرار داد.

طبق تعریف مصوّب توسط کمیسیون اروپا در سال ۲۰۱۱، نانو مواد به مواد طبیعی یا مصنوعی گفته می‌شود که از لحاظ توزیع اندازه، حداقل ۵۰ درصد ذرات آن، حداقل در یک بُعد دارای اندازه‌ای بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر باشند. در موارد ویژه و هر جا که نگرانی‌هایی در مورد محیط زیست، سلامتی و ایمنی وجود داشته باشد، حتی ماده‌ای که ۱ تا ۵۰ درصد آن، ابعادی بین ۱ تا ۱۰۰ نانومتر داشته باشد نیز در زمره ی نانو مواد قرار می گیرد (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm).

با توجه به مخاطراتی که ماهی قزل‌آلا با آن روبروست، ضرورت دارد که تولید و کیفیت غذای این آبزی استراتژیک، مورد توجه ویژه قرار گیرد. در پژوهش حاضر به مطالعه شاخصهای خونی و رشد در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف پرداخته شده است تا با بررسی تغییرات متابولیک و میزان رشد ماهی، اثر بازدارندگی زئولیت‌های نانو ساختار بر فعالیت آفلاتوکسین B1 به صورت تجربی مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲. مواد و روشها

۱.۲. طراحی آزمایش و سیستم پرورشی

این آزمایش در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی واقع در دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان به مدت ۸ هفته انجام شد. پس از تهیه بچه ماهیان از شرکت تولیدی قزل‌آلای درناب قلعه رودخان (فومن، گیلان) و انتقال آنها به محل اجرای آزمایش، ماهیان به منظور سازگاری با شرایط محیط پرورش، به مدت دوازده روز در دو تانک فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری نگهداری شدند. بعد از این مدت، تعداد ۲۷۰ عدد بچه ماهی با میانگین وزن ۳/۷ ± ۲۳ گرم و طول کل ۰/۸ ± ۱۳/۰۹ سانتیمتر در ۱۸ تانک فایبرگلاس به ابعاد ۱۰۶×۱۰۶×۵۱ سانتیمتر به عمق آبگیری ۴۰ سانتیمتر (حجم ۴۵۰ لیتر) به تعداد ۱۵ عدد در هر تانک و بصورت کاملاً تصادفی توزیع شد. جیره غذایی پایه در طول مدت سازگاری و پس از آن، غذای تجاری قزل‌آلا از نوع Ex-TG2 (شرکت تعاونی تولیدی ۲۱ بیضاء، سپیدان، ایران) با قطر تقریبی ۳/۳ میلی‌متر و حاوی ۴۶/۱ درصد پروتئین خام، ۱۵/۶ درصد چربی خام، ۱۰/۳ درصد خاکستر خام، ۲/۲ درصد فیبر خام و ۰/۸ درصد فسفر قابل جذب بود. غذادهی روزانه بصورت دستی و بر حسب اشتهای ماهی در ۴ نوبت در شبانه روز (ساعات ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰) انجام گرفت. آب مورد نیاز از یک حلقه چاه تأمین می‌شد. دمای آب در طول دوره به طور متوسط ۰/۶ ± ۱۵ درجه سانتیگراد و دبی آب ورودی به هر تانک ۰/۱۱ ± ۵/۴ لیتر در دقیقه بود. دوره نوری مطابق با شرایط طبیعی (۱۲D:۱۲L) و با استفاده از نور مصنوعی تنظیم شد. هوادهی به هر تانک با استفاده از سنگ هوا که به هواده مرکزی متصل بود، انجام می‌گرفت. پارامترهای شیمیایی آب در طول دوره، اندازه‌گیری شد. بر این اساس، اکسیژن محلول برابر با ۰/۲ ± ۶/۹ میلی‌گرم در لیتر، pH برابر ۰/۱ ± ۷/۴، مقدار یون آهن کمتر از ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر، نیترات ۰/۰۲± ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر و سختی کل برابر با ۵/۲ ± ۱۵۳/۹ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد.

۲.۲. جیره های آزمایشی

در این مطالعه از ۶ تیمار و ۳ تکرار برای هر تیمار استفاده شد (جدول ۱). تیمارها شامل C (شاهد)، NZ0.5 (جیره پایه + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار)، NZ1 (جیره پایه + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)، AF5 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B1)، AF5 NZ0.5 (جیره پایه + ۵ میلی گرم آفلاتوکسین B1 + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار)، AF5 NZ1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B1 + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار) بود.

جدول ۱: مقادیر آفلاتوکسین B_1 و زئولیت نانو ساختار در جیره بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

تیمار	مقدار آفلاتوکسین B_1 در جیره (میلی‌گرم/کیلوگرم)	مقدار زئولیت نانو ساختاردر جیره (درصد)
C	۰	۰
$NZ_{0.5}$	۰	۰/۵
NZ_1	۰	۱
AF_5	۵	۰
AF_5 $NZ_{0.5}$	۵	۰/۵
AF_5 NZ_1	۵	۱

۳.۲. تهیه آفلاتوکسین B1 و زئولیت نانو ساختار

آفلاتوکسین B1 در انستیتو پاستور ایران و با خلوص ۹۹٪ تولید و در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. میزان آفلاتوکسین مورد نیاز در این تحقیق بر اساس غلظت کشنده این سم برای ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و نیز با توجه به مطالعات قبلی در این زمینه محاسبه شد. زئولیت نانو ساختار از شرکت nanoscape (Munich, Germany) تهیه گردید. برای بررسی توپوگرافی سطح نانو ذره، از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM یا Atomic Force Microscope) استفاده شد. مطابق نتایج AFM، اندازه ذرات به طور متوسط ۳۰۰ نانومتر بود که ذرات کوچکتر بین ۱۰۰ تا ۲۰۰ نانومتر نیز وجود داشتند. آنالیز اندازه ذره (PSA یا Particle-size analysis) نیز برای ارزیابی اندازه پودر زئولیت به کار گرفته شد. نتایج PSA نیز نشان داد که ذرات دارای توضیعی بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر می‌باشند و بیشترین جمعیت را ذرات دارای قطر ۳۰۰ نانومتر تشکیل می‌دهند. بررسی ترکیب شیمیایی، شناسایی فازها و میزان بلورینگی با استفاده از پراش اشعه ایکس (XRD یا X-Ray Diffraction) انجام گرفت. آنالیز XRD نشان داد که ماده مورد استفاده، زئولیت از نوع کلینوپتیلولیت می‌باشد. با انجام آزمایشات HPLC در انستیتو پاستور ایران بر روی نمونه غذای مورد استفاده در این مطالعه، فقدان آلودگی به آفلاتوکسین مورد تأیید قرار گرفت. برای مخلوط کردن آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار با جیره غذایی، ابتدا پلت‌های غذای مربوط به هر تیمار، بصورت یکنواخت و در یک لایه بر روی صفحاتی پلاستیکی پخش شد. با توجه به مقادیر در نظر گرفته شده برای هر تیمار، زئولیت نانو ساختار و آفلاتوکسین، در ۱۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول ۹۶ درصد به ازای هر کیلوگرم جیره، مخلوط و کاملاً هم زده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. سپس با استفاده از افشانه‌ای که دارای روزنه‌هایی با قطر مناسب بود، این مخلوط بر روی غذا اسپری شد. جیره غذایی همه تیمارها و از جمله تیمار شاهد تحت اسپری قرار گرفتند و برای تبخیر الکل از سطح غذا، سه ساعت در معرض هوای آزاد قرار داده شدند.

۴.۲. شاخصهای رشد و تغذیه

هر دو هفته یکبار، کلیه ماهیان مورد زیست سنجی قرار گرفتند. برای این منظور ۲۴ ساعت پس از قطع غذادهی، ماهیان از مخازن صید و در ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به روش غوطه‌وری بیهوش شدند. سپس بصورت انفرادی، طول (با دقت میلی‌متر) و وزن (با دقت ۰/۰۱ گرم) مورد اندازه گیری قرار گرفت. شاخصهای مورد بررسی در این آزمایش شامل شاخصهای زیستی و تغذیه‌ای، از جمله وزن نهایی (FW)، وزن کسب شده (WG)، درصد افزایش وزن بدن (BWI)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و شاخص وضعیت (CF) مورد بررسی قرار گرفت (Ricker, 1979; Wing *et al*., 2008; Singh *et al*., 2009; Li *et al*., 2012). در انتهای دوره از هر تانک، ۵ عدد ماهی بصورت تصادفی صید و نمونه‌های کبد آنها جدا گردید و شاخص کبدی (HSI) اندازه‌گیری شد. شاخصهای

رشد با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید:

WG (گرم) = وزن نهایی – وزن اولیه

BWI (٪) = WG / وزن اولیه × ۱۰۰

SGR (٪ / روز) = [Ln (وزن نهایی (گرم) – Ln (وزن اولیه (گرم)] ×۱۰۰ / تعداد روزهای آزمایش

FCR = مقدار غذای خورده شده / مقدار افزایش وزن

CF = وزن نهایی (گرم) × ۱۰۰ / [طول کل (سانتیمتر)]^{3}

HSI (٪) = (وزن کبد / وزن بدن) × ۱۰۰

۵.۲. شاخصهای خون‌شناسی و بیوشیمایی پلاسما

در پایان دوره، به منظور بررسی پارامترهای هماتولوژیک [هماتوکریت (Hct)، میزان گلبول‌های سفید (WBC)، میزان گلبول‌های قرمز (RBC)، مقدار هموگلوبین (Hb)، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH) و میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC)] و پارامترهای بیوشیمیایی خون (پروتئین کل، سدیم، آلبومین، فسفر، کلسیم و کلسترول)، ۳ ماهی از هر تانک بطور تصادفی صید شد و پس از بیهوش کردن به وسیله پودر گل میخک با دُز ۱۰۰ppm، خونگیری با استفاده از سرنگ پلاستیکی ۲ میلی‌لیتری هپارینه از سیاهرگ وریدی در انتهای باله مخرجی ماهیان به عمل آمد. ۰/۵ میلی‌لیتر خون جهت بررسی‌های هماتولوژیک و ۱/۵ میلی‌لیتر خون جهت بررسی شاخصهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های خون در نظر گرفته شده برای بررسی‌های بیوشیمیایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۶۰۰g سانتریفیوژ (Hettich, Tuttlingen, Germany) شدند. پلاسما پس از جداسازی، تا زمان اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی، در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای تعیین میزان Hct از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. لوله هماتوکریت پس از پر شدن از نمونه خون تا حدود دوسوم، از انتهای حاوی خون با خمیر هماتوکریت مسدود شد و به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ (Hettich, Tuttlingen, Germany) با دور ۳۵۰۰ g قرار گرفت. در پایان با استفاده از خط کش هماتوکریت، حجم سلول‌های خونی بصورت درصد تعیین شد (Rehŭlka, 2000). برای تعیین مقدار Hb از روش سیانومت هموگلوبین و دستگاه Sysmexlys (Sysmex, Kobe, Japan) استفاده شد. پس از تعیین میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر، این مقدار با منحنی استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت (Drabkin, 1954). برای شمارش گلبول‌های قرمز از لام هموسیتومتر استفاده شد. برای این منظور بعد از رقیق سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱:۲۰۰) تعداد گلبول‌های قرمز در مربع میانی (شامل ۵ خانه وسط) لام هموسیتومتر شمارش و عدد بدست آمده در ۱۰۰۰۰ ضرب شد. در نهایت، تعداد گلبول‌های قرمز در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید (Houston, 1990). مقادیر MCV، MCH و MCHC با توجه به روابط زیر محاسبه شد (Klinger *et al*., 1996).

MCV (فمتولیتر) = ۱۰× [تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب) / هماتوکریت (درصد)]

MCH (پیکوگرم در سلول) = ۱۰× [تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب) / هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)]

MCHC (گرم بر دسی‌لیتر) = ۱۰۰× [هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر) / هماتوکریت (درصد)]

تعداد گلبول‌های سفید با استفاده از لام هموسیتومتر بعد از رقیق سازی خون منعقد نشده با محلول ریس (رقت ۱:۵۰) شمارش شد. از ۴ مربع کناری لام هموسیتومتر برای شمارش گلبول سفید استفاده و عدد بدست آمده در ۵۰ ضرب شد. در پایان، تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌متر مکعب خون محاسبه گردید (Houston, 1990). برای تعیین درصد افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و ائوزینوفیل) پس از تهیه گسترش خونی و رنگ آمیزی آن با محلول گیمسا، شمارش هر یک از گلبول‌های سفید با استفاده از میکروسکوپ نوری با عدسی ۱۰۰ و روغن ایمرسیون انجام شد. شمارش به صورت مارپیچی تا رسیدن تعداد سلول‌ها به عدد ۲۰۰ صورت گرفت. سرانجام درصد هر یک از گلبول‌های سفید خون محاسبه گردید (Blaxhall and Daisley, 1973). سنجش مقدار کلسیم بر حسب $mg\ dL^{-1}$ به روش رنگ سنجی و با استفاده از کیت زیست شیمی (تهران، ایران) صورت گرفت و برای اندازه‌گیری میزان جذب نوری از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey,

USA) با طول موج ۵۰۰ نانومتر استفاده شد. فسفر با استفاده از کیت من (تهران، ایران) به روش فتومتریک و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) با طول موج ۳۴۰ نانومتر و با واحد $mg\ dL^{-1}$ اندازه‌گیری شد. میزان کلسترول با استفاده از کیت من با واحد $mg\ dL^{-1}$ به روش رنگ سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) با طول موج ۵۰۰ نانومتر محاسبه شد. مقدار پروتئین و آلبومین با واحد $g\ dL^{-1}$ به روش رنگ سنجی و با استفاده از کیت زیست شیمی و دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico UV-2100, New Jersey, USA) به ترتیب با طول موج ۵۴۶ نانومتر و ۵۸۵ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت. یون سدیم با واحد $mmol\ L^{-1}$ به روش شعله‌سنجی اندازه‌گیری شد.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS v18.0 انجام شد. برای کنترل نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف[۱] و همگن بودن واریانسها از آزمون لون[۲] استفاده شد. جهت مشخص نمودن اثر اختلاف میانگین بین سطوح مختلف نانوزئولیت و آفلاتوکسین بر سایر پارامترها، تجزیه واریانس دو طرفه[۳] به کار گرفته شد. پس از معنی‌دار شدن اختلافات در این آزمون به منظور مقایسه شاخصهای خونی و رشد بین تیمارهای حاوی و فاقد آفلاتوکسین B1 در سطوح مختلف زئولیت نانو ساختار از آزمون تی با نمونه های جفت شده[۴] و بین تیمارهای مختلف حاوی زئولیت نانو ساختار در سطوح مختلف آفلاتوکسین B1 از تجزیه واریانس یک طرفه[۵] استفاده شد. اختلاف بین میانگینها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای توکی[۶] مورد ارزیابی قرار گرفت. سطح معنی‌داری در این آنالیز، $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. همه مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده‌اند.

۳. نتایج

۱.۳. ارزیابی شاخصهای رشد

در جدول ۲ نتایج حاصل از ارزیابی شاخصهای رشد بچه ماهیان قزل‌آلا در جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار در یک دوره ۵۶ روزه نشان داده شده است. بر این اساس در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری در شاخصهای FW، WG، BWI، SGR، FCR و CF بچه ماهیان قزل‌آلا مشاهده نشد ($P > 0.05$). در پایان دوره پرورش، میزان HSI متأثر از اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار نبود ($P > 0.05$)، اما مقدار آن در تیمار حاوی آفلاتوکسین نسبت به تیمار فاقد آفلاتوکسین، به طور معنی‌داری در سطح نیم درصد زئولیت نانو ساختار کاهش نشان داد ($P < 0.05$). در سایر سطوح زئولیت نانو ساختار و آفلاتوکسین، اختلاف معنی‌داری در میزان HSI مشاهده نشد ($P > 0.05$).

۲.۳. ارزیابی شاخصهای خون‌شناسی و بیوشیمیایی پلاسما

نتایج مربوط به شاخصهای هماتولوژیک در بچه ماهیان قزل‌آلای پرورش یافته با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار در یک دوره ۵۶ روزه در جدول ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصله، اختلاف معنی‌دار در فاکتورهای Hct، Hb، RBC، MCV، MCH، MCHC و مونوسیت مشاهده نشد ($P > 0.05$). میزان WBC و نوتروفیل در تیمار AF5 NZ0.5 به طور معنی‌داری نسبت به تیمار NZ0.5 کاهش و میزان لنفوسیت افزایش یافت ($P < 0.05$). اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این سه فاکتور، تأثیر معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). همچنین مقدار آنها در سایر سطوح زئولیت نانو ساختار و آفلاتوکسین، دارای اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). سطح ائوزینوفیل در تیمار NZ0.5

---

[۱] Kolmogorov-Smirnov
[۲] Levene
[۳] Two-way ANOVA
[۴] Paired-Samples T-Test
[۵] One-way ANOVA
[۶] Tukey

نسبت به تیمار AF5 از افزایش معنی‌دار برخوردار بود ($P < 0.05$). مقدار ائوزینوفیل در سایر سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، دارای اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین تقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر این فاکتور، تأثیر معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۲: اثر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر شاخصهای رشد (میانگین ± انحراف معیار) بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۵۶ روز پرورش

شاخصهای رشد	تیمارهای آزمایشی					
	C(شاهد)	$NZ_{0.5}$	NZ_1	AF_5	AF_5 $NZ_{0.5}$	AF_5 NZ_1
وزن اولیه (گرم)	۲۳/۲۳ ± ۰/۱۶	۲۳/۲۸ ± ۰/۱۶	۲۲/۹۵ ± ۰/۴۵	۲۳/۱۵ ± ۰/۲۹	۲۲/۷۷ ± ۰/۷۳	۲۲/۸۸ ± ۰/۶
وزن نهایی (گرم)	۶۳/۷ ± ۹/۷۳	۷۱/۶ ± ۱۰/۱۲	۷۰/۲ ± ۱۰/۲۸	۵۸/۹ ± ۸/۰۱	۵۸/۶ ± ۷/۶۲	۶۷/۲ ± ۷/۸۷
طول کل اولیه (سانتیمتر)	۱۳/۱ ± ۰/۸۱	۱۳/۱ ± ۰/۹۷	۱۳ ± ۰/۸۳	۱۳/۲ ± ۰/۰۷	۱۳/۱ ± ۰/۴۹	۱۳ ± ۰/۷۶
طول کل نهایی (سانتیمتر)	۱۷/۶۴ ± ۱/۰۴	۱۸/۲۹ ± ۱/۰۶	۱۸/۲۲ ± ۰/۷۶	۱۷/۳۳ ± ۰/۷۲	۱۷/۲۵ ± ۰/۰۸	۱۷/۸۶ ± ۰/۶۹
وزن کسب شده (گرم)	۴۰/۵ ± ۹/۸۹	۴۸/۳ ± ۱۰/۲۳	۴۷/۳ ± ۱۰/۴۵	۳۵/۷ ± ۷/۹۴	۳۵/۸ ± ۶/۹۷	۴۴/۳ ± ۷/۴۲
درصد افزایش وزن (درصد)	۱۷۴/۵ ± ۴۷/۰۹	۲۰۷/۵ ± ۵۷/۴۹	۲۰۵/۶ ± ۴۳/۲۷	۱۵۴/۳ ± ۳۳/۷۷	۱۵۷/۴ ± ۸/۲۴	۱۹۳/۴ ± ۲۸/۸۸
نرخ رشد ویژه (درصد/ روز)	۱/۷۸ ± ۰/۳۲	۱/۹۹ ± ۰/۳۳	۱/۹۸ ± ۰/۲۶	۱/۶۶ ± ۰/۲۵	۱/۶۹ ± ۰/۰۶	۱/۹۲ ± ۰/۱۷
ضریب تبدیل غذایی	۱/۱۲ ± ۰/۲۰	۰/۹۷ ± ۰/۰۸	۰/۹۷ ± ۰/۱۸	۱/۱۵ ± ۰/۱۱	۱/۱۸ ± ۰/۰۷	۱/۰۳ ± ۰/۱۰
شاخص وضعیت	۱/۱۶ ± ۰/۰۳	۱/۱۷ ± ۰/۰۳	۱/۱۶ ± ۰/۰۴	۱/۱۳ ± ۰/۰۲	۱/۱۴ ± ۰/۰۲	۱/۱۸ ± ۰/۰۰
شاخص کبدی (درصد)	۱/۰۱ ± ۰/۱۳^{ab}	۱/۰۲ ± ۰/۰۶^{a}	۱/۰۱ ± ۰/۲۳^{ab}	۰/۷۳ ± ۰/۱۵^{ab}	۰/۶۱ ± ۰/۰۵^{b}	۰/۷۳ ± ۰/۱۱^{ab}

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P < 0.05$) - AF_5 $NZ_{0.5}$ (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار) - AF_5 NZ_1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)

جدول ۳: اثر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر شاخصهای هماتولوژیک (میانگین ± انحراف معیار) بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۵۶ روز پرورش (n = ۱۵)

شاخصهای هماتولوژیک	تیمارهای آزمایشی					
	C(شاهد)	$NZ_{0.5}$	NZ_1	AF_5	AF_5 $NZ_{0.5}$	AF_5 NZ_1
Hct (درصد)	۵۹/۲ ± ۶/۱	۶۱ ± ۶/۷	۵۵/۳ ± ۷/۲	۵۴/۲ ± ۶/۶	۵۴ ± ۵/۶	۵۸/۶ ± ۵/۵
Hb (گرم/دسی‌لیتر)	۹/۳ ± ۰/۹	۹/۶ ± ۱	۸/۹ ± ۱	۸/۷ ± ۰/۹	۸/۷ ± ۰/۸	۹/۴ ± ۰/۸
RBC (میلی‌متر مکعب/$\times 10^3$)	۹۹۷/۸۹ ± ۱۰۷/۷	۱۰۴۰/۳۳ ± ۱۰۱	۹۵۸/۸۹ ± ۱۳۳/۱	۹۲۷/۳۳ ± ۱۰۰/۹	۹۳۴/۵۶ ± ۱۰۵/۷	۱۰۱۴/۱۱ ± ۱۱۴/۱
MCV (فمتولیتر)	۵۹۶/۸ ± ۱۷/۲	۵۸۵/۶ ± ۱۹/۷	۵۷۷/۴ ± ۱۹/۱	۵۸۳/۸ ± ۱۷/۳	۵۷۸/۲ ± ۲۱/۹	۵۷۷/۸ ± ۲۱/۷
MCH (پیکوگرم/سلول)	۹۳/۹ ± ۱/۹	۹۲/۴ ± ۱/۸	۹۲/۹ ± ۲/۶	۹۳/۴ ± ۱/۲	۹۲/۸ ± ۲/۴	۹۲/۴ ± ۳/۳
MCHC (گرم/دسی‌لیتر)	۱۵/۶ ± ۰/۵	۱۵/۸ ± ۰/۷	۱۶ ± ۰/۵	۱۶ ± ۰/۷	۱۶ ± ۰/۷	۱۶/۱ ± ۰/۳
WBC (میلی‌متر مکعب/$\times 10^3$)	۹/۹۱ ± ۲/۶۳^{ab}	۱۰/۵۸ ± ۲/۹۶^{a}	۹/۲۰ ± ۱/۵۵^{ab}	۸/۷۸ ± ۱/۲۲^{ab}	۸/۳۳ ± ۱/۳۵^{b}	۸/۳۶ ± ۰/۹۷^{ab}
لنفوسیت (درصد)	۶۵/۲ ± ۳/۳^{ab}	۶۳/۲ ± ۲/۸^{b}	۶۵/۸ ± ۳/۲^{ab}	۶۷/۸ ± ۲/۶^{ab}	۶۸ ± ۲^{a}	۶۷/۱ ± ۱/۵^{ab}
نوتروفیل (درصد)	۳۱/۱ ± ۳/۲^{ab}	۳۱/۳ ± ۳^{a}	۳۰/۱ ± ۲/۹^{ab}	۲۹/۳ ± ۲/۶^{ab}	۲۸ ± ۲/۱^{b}	۲۸/۴ ± ۱/۳^{ab}
مونوسیت (درصد)	۳/۱ ± ۰/۸	۳ ± ۱	۳ ± ۰/۹	۲/۷ ± ۰/۹	۲/۸ ± ۰/۸	۳/۴ ± ۰/۷
ائوزینوفیل (درصد)	۰/۷ ± ۰/۷^{ab}	۱/۴ ± ۰/۷^{a}	۱/۱ ± ۰/۸^{ab}	۰/۴ ± ۰/۵^{b}	۱/۲ ± ۰/۸^{ab}	۱ ± ۰/۹^{ab}

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P < 0.05$) - AF_5 $NZ_{0.5}$ (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار) - AF_5 NZ_1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)

در جدول ۴ روند تغییرات در برخی از شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما در بچه ماهیان قزل‌آلای پرورش یافته با جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار در یک

دوره ۵۶ روزه نشان داده شده است. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که میزان سدیم، کلسیم و کلسترول در بین بچه ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با جیره‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نداشته است ($P > 0.05$). مقدار فسفر در تیمار NZ0.5 نسبت به تیمار C (شاهد) بطور معنی‌داری افزایش نشان داد ($P < 0.05$). در سایر سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، اختلاف معنی‌دار در میزان فسفر مشاهده نشد ($P > 0.05$). همچنین اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این فاکتور تأثیر معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$). مقدار پروتئین کل و آلبومین در تیمار حاوی آفلاتوکسین نسبت به تیمار فاقد آفلاتوکسین، در تمام سطوح زئولیت نانو ساختار، کاهش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). اثر متقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این دو فاکتور تأثیر معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$).

سطح گلوبولین در تیمار AF5 نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌دار کاهش یافت ($P < 0.05$). مقدار گلوبولین در سایر سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، دارای اختلاف معنی‌دار نبود ($P > 0.05$). همچنین تقابل سطوح آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار، بر این فاکتور تأثیر معنی‌دار نداشت ($P > 0.05$).

جدول ۴: اثر جیره‌های حاوی سطوح مختلف آفلاتوکسین و زئولیت نانو ساختار بر شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما (میانگین ± انحراف معیار) بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از ۵۶ روز پرورش (n = ۱۵)

شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما	تیمارهای آزمایشی					
	C(شاهد)	$NZ_{0.5}$	NZ_1	AF_5	AF_5 $NZ_{0.5}$	AF_5 NZ_1
سدیم (میلی‌مول/لیتر)	۱۶۱/۷۸ ± ۴/۱	۱۶۳/۳۳ ± ۴/۶	۱۵۹/۱۱ ± ۴/۴	۱۶۳/۳۳ ± ۵/۵	۱۶۲/۲۲ ± ۵	۱۶۱/۳۳ ± ۳/۲
فسفر (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۱۰/۰۶ ± ۱^{b}	۱۱/۷۳ ± ۱/۲^{a}	۱۱/۲۰ ± ۱/۳^{ab}	۱۰/۵۶ ± ۱/۱^{ab}	۱۱/۷۰ ± ۰/۹^{ab}	۱۰/۹۳ ± ۱/۸^{ab}
کلسیم (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۹/۸۱ ± ۰/۶۱	۱۰/۳۹ ± ۱/۱۲	۹/۹۹ ± ۰/۷۶	۹/۳۱ ± ۰/۴	۹/۷۸ ± ۰/۷۱	۱۰/۰۳ ± ۰/۸
کلسترول (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)	۲۵۹/۶۷ ± ۴۵/۱۰	۲۷۴/۴۴ ± ۴۸/۱۳	۲۷۰/۱۱ ± ۶۴/۳۰	۲۶۸/۶۷ ± ۵۷/۱۹	۲۴۵/۲۲ ± ۳۱/۵۷	۲۷۲/۳۳ ± ۵۰/۵۵
پروتئین کل (گرم/دسی‌لیتر)	۴/۲ ± ۰/۴*	۴/۴۱ ± ۰/۷$^{+}$	۴/۴۴ ± ۰/۵$^{\blacklozenge}$	۳/۲۱ ± ۰/۳	۳/۳۲ ± ۰/۳	۳/۳۶ ± ۰/۲
آلبومین (گرم/دسی‌لیتر)	۱/۹ ± ۰/۲*	۱/۹۳ ± ۰/۳$^{+}$	۱/۹۷ ± ۰/۳$^{\blacklozenge}$	۱/۲۷ ± ۰/۲	۱/۳۷ ± ۰/۲	۱/۳۴ ± ۰/۱
گلوبولین (گرم/دسی‌لیتر)	۲/۳ ± ۰/۲*	۲/۴۸ ± ۰/۴	۲/۴۸ ± ۰/۳	۱/۹۴ ± ۰/۱	۱/۹۶ ± ۰/۲	۲/۰۱ ± ۰/۲

داده‌هایی که با حروف غیر مشابه مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($P < 0.05$) - داده‌هایی که با علامت * مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار AF_5 هستند ($P < 0.05$) - داده‌هایی که با علامت + مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار AF_5 $NZ_{0.5}$ هستند ($P < 0.05$) - داده‌هایی که با علامت ♦ مشخص شده‌اند، دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار AF_5 NZ_1 هستند ($P < 0.05$).

AF_5 $NZ_{0.5}$ (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 + ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار) - AF_5 NZ_1 (جیره پایه + ۵ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 + ۱ درصد زئولیت نانو ساختار)

۴. بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر شاخصهای رشد در تیمارهای NZ0.5، NZ1 و AF5 NZ1، نسبت به تیمار شاهد، AF5 و AF5 NZ0.5 از وضعیت مطلوب تری برخوردار بودند. با این حال، اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها مشاهده نشد. می‌توان چنین استنباط نمود که وجود آفلاتوکسین تا حد ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم از جیره غذایی، مانع رشد بچه ماهیان قزل‌آلا در یک دوره کوتاه ۸ هفته‌ای نمی‌شود. Navirian و همکاران (۲۰۱۱) اظهار داشتند که استفاده از ۴ درصد زئولیت در جیره غذایی ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*) سبب بهبود وزن، نرخ رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی در این ماهی شده است. در مطالعه Smith (۱۹۸۰) نیز افزودن سدیم بنتونیت تا ۱۰ درصد در جیره قزل آلای رنگین کمان سبب افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی شد. Lanari (۱۹۹۴) با استفاده از ۲/۵ تا ۵ درصد زئولیت در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین کمان، افزایش وزن در این ماهی را گزارش کرد. گفته شده است زئولیت موجود در جیره با افزایش زمان ماندگاری غذا در روده سبب افزایش جذب مواد غذایی می‌شود و از این

طریق نقش مثبت خود را در رشـــد ماهی ایفا می‌کند (Dias *et al*., 1998)؛ بـا این وجود، مطالعات انجام شده توسط Edsall و Smith (۱۹۸۹) بر روی ماهی آزاد کوهو، Rafiee و Saad (۲۰۰۵) بر روی مـاهی تـیلاپیـا، Zamani Kyasajmahaleh و همکـاران (۲۰۰۷) بر روی خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*) نشان داد که زئولیت اثر معنی‌داری بر رشـــد ندارد. در مورد تأثیر آفلاتوکســـین بر میزان رشـــد، Raghazan و همکاران (۲۰۱۱) و Huang و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که آفلاتوکســین B1 اثری بر نرخ رشـد ویژه ماهیان مورد آزمایش نداشـته اســـت امـا یـافتـه‌های Ayyat و همکاران (۲۰۱۳) و Jalilpour و همکاران (۲۰۱۴) حاکی از کاهش میزان فاکتورهای رشد تحت تأثیر آفلاتوکسین می‌باشد.

کبـد از مهمترین مراکز ذخیره انرژی در بـدن اسـت و به همین علت می‌توان از شاخص کبدی برای ارزیـابی وضـــعیـت انرژی مـاهیـان اســـتفـاده کرد (Chellappa *et al*., 1995). یکی دیگر از کارکردهای کبد، نقش آن در مســـمومیت‌زدایی از بدن می‌باشـــد. کبد ماهی با اِعمال مجموعه‌ای از تغییر و تبدیلات در سـموم بدن، پلاسمای خون را تصفیه و مواد حاصل را از راه صـــفرا خارج می‌کند (Ferguson,1995). ورود عوامل ســـمی به بدن می‌تواند ســـبب افزایش فعالیت کبد و حجیم شـدن سـلول‌های آن شـود (Tung *et al*., 1975). در مطالعه حاضـــر، شـــاخص کبدی در تیمار AF5 NZ0.5 در مقایسه با تیمار NZ0.5 بطور معنی‌داری کـاهش یـافـت کـه منطبق بر مطـالعـات Usanno و همکـاران (۲۰۰۵) و Deng و همکـاران (۲۰۱۰) در مورد اثر آفلاتوکسین B1 بر ماهی تیلاپیا می‌باشـد. کاهش میزان شـاخص کبدی علیرغم وجود آفلاتوکســـین می‌تواند به علت کاهش تغذیه ماهی در طول دوره آزمـایش و بـه تبع آن، اســـتفاده از انرژی ذخیره شـده در کبد ماهی باشـد (Vijayan *et al*., 1990; Barton *et al*., 2002). از ســوی دیگر، وزن کبـد کـاملاً وابســـتـه به میزان چربی موجود در کبد اسـت. اما در جانورانی که در معرض آفلاتوکسین قرار می‌گیرند، ترکیب اسیدهای چرب آزاد برای سنتز تری گلیسـرید بطور واضحی کاهش یافته و از انتقال چربی موجود در بافت‌های چربی به سـمت پلاسـما ممانعت بـــه عـــمـــل مـــی آیـــد (Singh and Venkitasubramanian, 1975). در مطالعه حاضـر، اختلاف معنی‌داری در میزان HSI ســـایر تیمـارهـا مشـاهده نشد که مشابه نتایج Raghazan و همکاران (۲۰۱۱) و نـیز Huang و همکـاران (۲۰۱۴) و در تعارض با آزمایش Katherine و همکاران (۲۰۱۲) و Sherif و همکاران (۲۰۱۳) می‌باشد.

با اسـتفاده از شاخص‌های هماتولوژیک می‌توان بـه ارزیـابی بهتری در مورد میزان ســـلامـت ماهی و عکس‌العمـل آن در برابر آلودگی‌هایی که با آن مواجه می‌شـود دسـت پیدا کرد. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که مقادیر Hct، Hb، RBC، MCV، MCH و MCHC در تیمـارهـای مختلف، تغییر معنی‌داری نداشـت. این امر می‌تواند حاکی از آن باشـد که وجود آفلاتوکســـین تـا حـد ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذای ماهی سـبب افزایش نیاز ماهی به اکسیژن و در نتیجه تغییر در ظرفیت خون‌سـازی ماهی نمی‌شود. در مورد تأثیر نانو ذرات بر شـــاخصـــهای خونی و پلاســـمای ماهیان، مطالعات چندانی صـــورت نگرفته اســـت ولی Federici و همکاران (۲۰۰۷) اظهار داشـــتند که نانو ذرات اکســـید تیتانیوم در یک دوره دو هفته‌ای، تأثیر قـابل توجهی بر فاکتورهای خونی ماهی قزل‌آلا ندارد. Kececi و همکـاران (۱۹۹۸) نیز با افزودن چند ماده و از جمله زئولیت در جیره غذایی جوجه‌های گوشتی، اثر آنها را در کاهش میزان آفلاتوکسـین مورد بررسی قرار دادند. آنها اظهار داشـتند که مواد جاذب افزودنی بـه جیره‌هـای حـاوی آفلاتوکســـین تأثیر چندانی بر فاکتورهای هماتولوژیک و بیوشیمیایی خون ندارد. در بررســـی تـأثیر چنـد جـاذب در آزمـایش Ayyat و همکاران (۲۰۱۳)، اثر متقابل بنتونیت و آفلاتوکســین در ماهی تیلاپیا تغییری در میزان Hct، Hb، RBC و WBC ایجاد نکرد. از سوی دیگر، Oguze و همکاران (۲۰۰۰) اظهار داشـتند که آفلاتوکسـین سبب کاهش Hct، Hb، RBC و مونوسـیت در جوجه‌های گوشتی شـــده اســـت. Sherif و همکاران (۲۰۱۳) نیز گزارش کردند که آفلاتوکســـین ســـبب تغییر در Hct، Hb، RBC، MCV، MCH و MCHC و مونوســـیـت می‌شـــود. در مطالعه حاضـــر، اختلاف معنی‌داری در میزان مونوسـیت مشاهده نشد. گزارش مشابهی از اثر متقابل بنتونیت و آفلاتوکســـین در مطالعه Farrag و همکاران (۲۰۰۹) ارائه شده است. همچنین در بررسی

اثر زئولیت بر فاکتورهای هماتولوژیک قزل‌آلای رنگین کمان توسط Paritova و همکاران (۲۰۱۳) مقدار مونوسیت تغییری نداشت. بر اساس نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر، میزان نوتروفیل‌ها در تیمار حاوی ترکیبی از آفلاتوکسین و ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار در مقایسه با تیمار حاوی ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار کاهش یافت. از سوی دیگر سطح ائوزینوفیل در جیره حاوی فقط آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار حاوی فقط ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار با کاهش مواجه شد. می‌توان اظهار داشت که آفلاتوکسین سبب آپوپتوزیس[1] و مرگ گسترده سلول‌های ائوزینوفیل شده است؛ در حالی که حضور زئولیت نانو ساختار همراه با آفلاتوکسین، از عمل تخریبی آفلاتوکسین بر سلول‌های فاگوسیتیک جلوگیری کرده، سبب افزایش میزان ائوزینوفیل می‌شود. مطالعه Donmez و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که در گوسفند مرینوس میزان ائوزینوفیل تحت تأثیر آفلاتوکسین قرار نگرفت در حالی که در تیمار حاوی آفلاتوکسین در مقایسه با تیمار شاهد، مقدار نوتروفیل افزایش یافت. یافته‌های Farrag و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ماهی تیلاپیا حاکی از عدم تغییر در میزان این دو فاکتور در بر هم کنش بنتونیت و ماده سمی اکسید سرب است. در مطالعه حاضر، سطح لنفوسیت در تیمار حاوی آفلاتوکسین و زئولیت ۰/۵ درصد بیشتر از تیمار حاوی ۰/۵ درصد زئولیت بود. به نظر می‌رسد که علت این امر، تحریک سیستم ایمنی بدن و در نتیجه، افزایش میزان لنفوسیت در خون می‌باشد. در آزمایش Donmez و همکاران (۲۰۱۲) میزان لنفوسیت با اثر آفلاتوکسین کاهش یافت و در مطالعه Farrag و همکاران (۲۰۰۹) تحت اثر متقابل بنتونیت و آفلاتوکسین، سطح لنفوسیت ثابت ماند.

با ارزیابی شاخصهای بیوشیمیایی پلاسما مشخص شد که در میزان سدیم و کلسیم در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. در اثر استرس‌های ناشی از آلودگی، اختلالاتی در تنظیم یونی سطح آبشش رخ می‌دهد و این امر سبب کاهش برخی از یون‌های پلاسما از جمله سدیم می‌شود (Galvez *et al.*, 1998). از سوی دیگر، برخی از استرسها می‌توانند سبب افزایش کلسیم خون شوند (Pierson *et al.*, 2004). با توجه به وجود سدیم و کلسیم در فرمول ساختمانی زئولیت و جذب این ماده توسط دستگاه گوارش، می‌توان انتظار داشت که استفاده از زئولیت در جیره غذایی بر میزان این عناصر در خون تأثیر بگذارد اما از سوی دیگر بدن جانور قادر است از طریق ساز و کارهایی همچون کلیه (Nazifi *et al.*, 2008) و آبشش‌ها در ماهی مقدار این یون‌ها را در خون تنظیم کند (Stoskopf, 1993; Heath, 1987) و این می‌تواند دلیلی بر عدم تغییر در میزان سدیم و کلسیم سرم در مدت مصرف زئولیت باشد. در تحقیقات به عمل آمده توسط Ward و همکاران (۱۹۹۱) بر روی خوک و نیز Chestnut و همکاران (۱۹۹۲) بر روی گوسفند مشاهده شد که زئولیت بر میزان سدیم سرم تأثیر ندارد. Leach و همکاران (۱۹۹۰) و Nazifi و همکاران (۲۰۰۸) با تحقیق بر روی ماکیان اظهار داشتند که زئولیت قادر است میزان کلسیم سرم را افزایش دهد. یافته‌های Khodanazary و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که افزودن زئولیت به جیره غذایی ماهی کپور معمولی سبب کاهش میزان سدیم و افزایش مقدار کلسیم در سرم خون می‌شود. در مطالعه حاضر، میزان فسفر در تیمار حاوی ۰/۵ درصد زئولیت نسبت به تیمار شاهد از افزایش معنی‌داری برخوردار بود. این در حالی است که طبق نظر Leach و همکاران (۱۹۹۰) زئولیت سبب کاهش جذب فسفر از روده و در نتیجه کاهش میزان آن در سرم می‌شود. در آزمایش Khodanazary و همکاران (۲۰۱۳) مشخص شد که زئولیت افزوده شده به جیره، تأثیری در مقدار فسفر خون ندارد. مقدار کلسترول در مطالعه حاضر، فاقد اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها بود. Oguze و همکاران (۲۰۰۰) اظهار داشتند که آفلاتوکسین سبب کاهش کلسترول خون می‌شود. در آزمایش Kececi و همکاران (۱۹۹۸) افزودن بنتونیت به تیمار حاوی آفلاتوکسین، سبب افزایش میزان کلسترول شد. مطالعه Farrag و همکاران (۲۰۰۹) بر روی ماهی تیلاپیا نشان داد که اثر متقابل بنتونیت و ماده سمی اکسید سرب، تأثیری در مقدار کلسترول ندارد. مقدار

[1] Apoptosis

کلسترول در آزمایش Khodanazary و همکاران (۲۰۱۳) تحت تأثیر افزودن زئولیت به جیره غذایی کپور قرار نگرفت. در مطالعه حاضر مشاهده شد که در تمام تیمارهای حاوی آفلاتوکسین، میزان پروتئین کل و آلبومین پلاسمای خون ماهیان به طور معنی‌داری کاهش یافته است. همچنین میزان گلوبولین در تیمار AF5 نسبت به تیمار شاهد کاهش معنی‌دار یافت. بجز ایمونوگلوبین‌ها سایر پروتئین‌های پلاسما در کبد ساخته می‌شوند. آلبومین، فراوان‌ترین پروتئین پلاسما محسوب می‌شود و محل اصلی تولید آن کبد است (Di Giulio and Hinton, 2008). با توجه به اثر تخریبی سموم بر بافت کبد، ساخت پروتئین‌های پلاسما و به ویژه آلبومین کاهش می‌یابد. علاوه بر این، استرس ناشی از مسمومیت نیز سبب کاهش تغذیه در ماهی و به تبع آن کاهش پروتئین کل در سرم می‌شود (Casillas *et al*., 1985; Stoskopf *et al*., 1993). کاهش آلبومین در تیمارهای حاوی آفلاتوکسین احتمالاً در اثر آسیب‌های کبدی و کلیوی ناشی از ورود این سم در جیره غذایی ماهیان می‌باشد. از جمله عواملی که سبب کاهش میزان پروتئین کل می‌شود، می‌توان به افزایش سوخت و ساز پروتئین‌ها در جریان تنش‌های حاد، کاهش سنتز پروتئین به دلیل آسیب‌های وارده به کبد و همچنین کاهش بازجذب پروتئین‌ها در اثر صدمات کلیوی اشاره کرد (Rehŭlka *et al*., 2005). گزارشات متعدد حاکی از کاهش میزان پروتئین کل و آلبومین سرم در جانورانی است که در مواجهه با آفلاتوکسین قرار گرفته‌اند (Van Soest, 1994; Curtui, 2000; Oguze *et al*, 2000; Selim *et al*, 2014). با این حال، برخی از مطالعات نشان می‌دهد که میزان این فاکتورها و گلوبولین در اثر آفلاتوکسین تغییر نمی‌یابد (Abdelhamid, 2007). طبق گزارش Ayyat و همکاران (۲۰۱۳) میزان پروتئین کل و آلبومین در اثر آفلاتوکسین افزایش یافت.

در مطالعه حاضر، توان زئولیت برای اتصال به آفلاتوکسین و خنثی کردن اثر آن در برخی جنبه‌ها مورد تأیید قرار گرفت. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، می‌توان اظهار داشت که زئولیت نانو ساختار دارای اثرات مثبتی بر کارایی فیزیولوژیک بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان است؛ به گونه‌ای که می‌توان با افزودن ۰/۵ درصد زئولیت نانو ساختار به جیره، موجبات ارتقاء ایمنی و بهبود برخی از شاخصهای فیزیولوژیک را در این ماهی فراهم آورد.

۵. تشکر و قدردانی

از مسئولین و کارکنان دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، ستاد ویژه توسعه فناوری نانو، موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی و همچنین از آقای دکتر مهدی رزاقی ابیانه ریاست بخش قارچ‌شناسی انستیتو پاستور ایران که امکان اجرای این طرح را فراهم نمودند، کمال تشکر به عمل می‌آید. لازم است از همکاری آقایان مهندس محمدی برسری، موسی پور، حبیبی، دل‌افکار و خانم‌ها مهندس تاری، شیروان، جعفری و باقرپور که در طول اجرای این پروژه و در شرایط سخت، همواره از مساعدت و حمایت‌هایشان برخوردار بوده‌ایم، صمیمانه سپاسگزاری گردد.

References

Abdelhamid, A.M., Salem, M.F.I., Mehrim, A.I., El-Sharawy, M.A.M., 2007. Nutritious attempts to detoxify aflatoxin diets of tilapia fish: 1. fish performance, feed and nutrients utilization, organs indices, residues and blood parameters. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 10, 205-223.

Ahsan, H., Wang, L.Y., Chen, C.J., Tsai, W.Y., Santella, R.M., 2001. Variability in aflatoxin-albumin adduct levels and effects of hepatitis B and C virus infection and glutathione S-transferase M1 and T1 genotype. *Environmental Health Perspectives*, 109, 833-837.

Alinezhad S., Tolouee M., Kamalzadeh A., Motalebi A. A., Nazeri M., Yasemi M., Shams-Ghahfarokhi M., Tolouei R.,

Razzaghi-Abyaneh M., 2011. Mycobiota and aflatoxin B1 contamination of rainbow trout (*Oncorhinchus mykiss*) feed with emphasis to Aspergillus section Flavi. *Iranian Journal of Fisheries*, 10, 363-374.

Ayyat, M.S., Abd Rhman, G.A., El-Marakby, H.I., Mahmoud, H.K., Hessan, A.A.A., 2013. Reduction the aflatoxin toxicity in Nile tilapia fish. *Egyptian Journal of Nutrition and Feeds*, 16, 469-479.

Barton, B.A., Morgan, J.D., Vijayan, M.M., 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. In: Adams, S.M. (Ed.), Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society, Bethesda, USA, pp. 111-148.

Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology*, 5, 771-781.

Casillas, E., Myers, M. S., Rhodes, L.D., McCain, B.B., 1985. Serum chemistry of diseased English sole, *Parophrys vetulus* Girard, from polluted areas of Puget Sound, Washington. *Journal of Fish Diseases*, 8, 437-449.

Chellappa, S., Huntingforrd, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 47, 775-787.

Chestnut, A.B., Anderson, P.D., Cochran, M.A., Fribourg, H.A., Twinn, K.D., 1992. Effects of hydrated sodium calcium aluminosilicate on fescue toxicosis and mineral absorption. *Journal of Animal Science*, 70, 2838-2846.

Curtui, V.G., 2000. Effects of feeding a fusaruim poae extract and a natural zeolite to broiler chickens. *Mycotoxin Research*, 16, 43-52.

Dias, J., Huelvan, C., Dinis, M.T., Metailler, R., 1998. Influence of dietary bulk Aagent (silica, cellulose and a natural zeolite) on protein digestibility, growth, feed intake and feed transit time in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquatic Living Resources*, 11, 219-226.

Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., 2008. The Toxicology of Fishes. CRC Press, Florida, USA, 1096 p.

Donmez, N., Donmez, H.H., Keskin, E., Kısadere, I., 2012. Effects of aflatoxin on some haematological parameters and protective effectiveness of esterified Glucomannan in Merino Rams. *The Scientific World Journal 2012*, 1-4.

Drabkin, D.R., 1954. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. *The American Journal of the Medical Sciences*, 209, 268-270.

Edsall, D.A., Smith, C.E., 1989. Effect of dietary clinoptilolite on levels of effluent ammonia from hatchery Coho Salmon. *The Progressive Fish-Culturist*, 51, 98-100.

Farrag, F.H., Khalil, F. F., Mehrim, A.I., 2009. Reduction of lead oxide toxicity by using bentonite in mono-sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* diets. *Abbassa International Journal for Aquaculture*, Special Issue for Global Fisheries and Aquaculture Research Conference, Cairo International Convention Center, Zagazig, Egypt, pp. 429-451.

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

Ferguson, H.W., 1995. Systemic Pathology of Fish: A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press, 146 p.

Galvez, F., Hogstrand, C., Wood, C.M., 1998. Physiological responses of juvenile rainbow trout to chronic low level exposures of waterborne silver. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 119, 131-137.

Goodarzi, M., Moridi, D., 2008. The use clinoptilolite in broiler diet to decrease of aflatoxin effects. *The Scientific Journal of Agriculture*, 30, 109-121.

Heath, A.G., 1987. Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press, Florida, USA, 245 p.

Higgs, D.A., Dosanj, B.S., Prendergast, A.F., Beams, R.M., Hardy, R.W., Riley, W., Deacon, G., 1995. Use of rapeseed/canola protein produets in finfish diets. In: Sessa, D. J. and Lim. C. (Eds.), Nutrition and Utilization technology in Aguaculture. AOCS Press, Illinois, USA, pp. 130-156.

Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In: Schreck, C.B. and Moyle, P.B., (Eds.), Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp. 273-334.

Huang, Y., Han, D., Xiao, X., Zhu, X., Yang, Y., Jin, J., Chen, Y., Xie, S., 2014. Effect of dietary aflatoxin B1 on growth, fecundity and tissue accumulation in gibel carp during the stage of gonad development. *Aquaculture*, 428-429: 236-242.

Jalilpour, J., Vahabzadeh, H., Sepahdari, A., Pajand, Z., 2014. Effect of toxicity contaminated food by aflatoxin B1 on growth and some liver enzymes of starred sturgeon (*Acipencer stellatus*) juveniles. *Journal of Aquaculture Development*, 7, 1-11.

Jiang, Y., Jolly, P.E., Preko, P., Wang, J.S., Ellis, W.O., Phillips, T.D., Williams, J.H., 2008. Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. In: Clinical and Developmental Immunology. Available from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2496958/. Accessed 5th August 2008. 12 p.

Kececi, T., Oguz, H., Kurtoglu, V., Demet, O., 1998. Effects of polyvinyl polypyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 39, 452-458.

Khodanazary, A., Boldaji, F., Tatar, A., Dastar, B., 2013. Effects of dietary zeolite and perlite

supplementations on growth and nutrient utilization performance and some serum variables in common carp, (*Cyprinus carpio*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 13, 495-501.

Klinger, R.C., Blazer, V.S., Echevarria, C., 1996. Effects of dietary lipid on the haematology of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture*, 147, 225-233.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Huff, W.E., Elissalde, H., Yersin, A.G., Phillips, T.D., Rottinghaus, G.E., 1993. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and diacetoxy scirpenol. *Poultry Science*, 72, 51-59.

Kubena, L.F., Harvey, R.B., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Huff, W.E., 1990. Diminution of aflatoxicosis in growing chickens by dietary addition of a hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Poultry Science*, 69, 727-735.

Lanari, D., 1994. Rapporto tra alimentazione de qualita dei reflui in acquacoltura. Atti Convegno Intemazionale "Parliamo di Acquacoltura", Dipartimento di Scienze Zootecniche, Universita di Torino, Fossano, 13-14 October.

Leach, R.M., Heinrichs, B.S., Burdette, J., 1990. Broiler chicks fed low-calcium diets. Influence of zeolite on growth rate and parameters of bone metabolism. *Poultry Science*, 69, 1539-1543.

Li, D., Liu, Z., Xie, C., 2012. Effect of stocking density on growth and serum concentrations of thyroid hormones and cortisol in Amur sturgeon, *Acipenser schrenckii*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 511-520.

Miazzo, R., Rossa, C.A.R., Queiroz Carvalho, E.C.D., Magnoli, C., Chiacchiera, S.M., 2000. Efficacy of synthetic zeolite to reduse the toxicity of aflatoxin in broiler chicks. *Poultry Science*, 79, 1-6.

Navirian, H., Sotohian, F., Mostafazadeh, S., 2011. The Effect of different levels of natural zeolite on growth indices of juvenile Caspian frisii Kutum (*Rutilus frisii kutum*, Kamenskii, 1901). *Iranian Journal of Biology*, 24, 155-161.

Nazifi, S., Dadras, H., Koosha, A., 2008. The effect of zeolite on serum electrolytes of broiler chickens. *Irainian Veterinary Journal*, 4, 85-93.

Nikawa, H., Yamamoto, T., Hamada, T., Rahardjo, M.B., Murata, H., Nakanoda, S., 1997. Antifungal effect of zeolite-incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* growth and / or acid production. *Journal of Oral Rehabilitation*, 24, 350-357.

Oguze, H., Kurtoglu, V., Coskum, B., 2000. Prevention efficacy of clinoptilolite in broilers during chronic aflatoxin (50, 100 ppb) exposure. *Research in Veterinary Science*, 69, 197-201.

Paritova, A., Sarsembayeva, N., Łozowicka, B., Maulanov, A., Kuzembekova, G., Abzhalieva, A., Kaczyński, P., 2013. The influence of Chankanay zeolites as feed additives on the chemical, biochemical and histological profile of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 5, 1-8.

Phillips, T.D., Clement, B.A., Kubena, L.F., Harvey, R.B., 1988. Detection and detoxification of aflatoxins. Prevention of aflatoxicosis and aflatoxin residues with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *Veterinary and Human Toxicology*, 32, 15-19.

Rafiee, Gh.R and Saad, Ch.R, 2005. Effect of dietary zeolite on the growth of red tilapia (*Oreochromis* sp.) and lettuce (*Lactuca sativa*) in an aquaponic system. *Iranian Journal Natural Resources*, 58, 363-371.

Raghavan, P.R., Zhu, X., Lei, W., Han, D., Yang, Y., Xie, S., 2011. Low levels of aflatoxin B1 could cause mortalities in juvenile hybrid sturgeon, *Acipenser ruthenus* ♂ × *A. baeri* ♀. *Aquaculture Nutrition*, 17, 39-47.

Razzaghi Abyaneh, M., Pilehvar Soltanahmadi, Y., Shams Ghahfarokhi, M., Alinezhad, S., 2011. Aflatoxins: Public Health and Agricultural Significance. Publication of Research, Education and Agricultural Extension, Tehran, Iran, 148 p.

Rehŭlka, J., Minarik, B., Adamec, V., Rehulkova, E., 2005. Investigations of physiological and pathological levels of total plasma protein in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 36, 22-32.

Rehŭlka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout. *Aquaculture*, 190, 27-47.

Ricker W.E., 1979. Growth rates and models. In: Hoar W.S. and Brett J.R. (Eds.), Fish Physiology, Vol. 8. Academic Press, New York, USA. pp 677-743.

Selim, K.M., El-hofy, H., Khalil, R.H., 2014. The efficacy of three mycotoxin adsorbents to alleviate aflatoxin B1-induced toxicity in *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 22, 523-540.

Sherif, A.H., Abdel-Maksoud, S.A., Shukry, M.M., 2013. Study on toxicity of *Oreochromis niloticus* with aflatoxin B1. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 17, 107-119.

Singh, N., Manshian, B., Jenkins, G.J., Griffiths, S.M., Williams P.M, Maffeis, T.G., Wright, C.J., Doak, S.H., 2009. Nano Genotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30, 3891-3914.

Singh, N., Venkitasubramanian, T.A., 1975. Effect of aflatoxin B1 on lipids of rat tissues. *Environmental Physiology and Biochemistry*, 5, 147-157.

Smith, R.R, 1980. Nutritional Bioenergetics in Fish, In: Fish Feed Technology. UNDP, FAO, Rome, Italy. 11, 21-27.

Stoskopf, M.K., 1993. Fish Medicine. Phelps, T.H. and Bauer, B.A. (Eds.), Philadelphia: W.B. Saunders Company, 882 p.

Tung, H.T., Cook, F.W., Wyatt, R.D., Hamilton, P.B., 1975. The anemia caused by aflatoxin. *Poultry Science*, 54, 1962-1969.

Usanno, O., Chaisilapasung, S., Sukrakanchana, N., Supamattaya, K., 2005. Effects of aflatoxin B1 on sex reversed red tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn. × *O. mossambicus* Peters). Songklanakarin. *Journal of Science and Technology*, 27, 187-197.

Van Soest, P.J., 1994. Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY. Available from http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/aflatoxin/aflatoxin.html. Accessed 22th May 2014.

Vijayan, M.M., Ballantyne, J.S., Leatherland, J.F., 1990. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Aquaculture*, 88, 371-381.

Waldneer, D.N., Lalman, D., 1998. Drought brings concern of aflatoxin contamination of livestock foods to Oklahoma dairy and beef producers. Available from http://www.okstate.edu/ag/oces/timely/aflatoxi.htm. Accessed 2014.

Ward, T.L., Watkins, K.L., Southern, L.L., French, D.D., Hoyt, P.G., 1991. Interactive effects of sodium zeolite A and copper in growing swine: growth and bone tissue mineral. *Journal Animal Science*, 69, 726-733.

Wild, C., Jiang, Y., Sabbioni, G., Chapot, B., Montesano, R., 1990. Evaluation of methods for quantitation of aflatoxin-albumin adducts and their application to human exposure assessment. *Cancer Research*, 50, 245-251.

Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80, 1106-1122.

Wing, K.N., Norfauziah, A., Sena, D.S., 2008. The dietary protein requirement of the Malaysian mahseer, *Tor tambroides* (Bleeker), and the lack of protein-sparing action by dietary lipid. *Aquaculture*, 284: 201-206.

Wogan, G.N., 1992. Aflatoxins as risk factors for hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer Research*, 52, 2114-2118.

Zamani Kyasajmahaleh, H.A., Hadavi, M., Khoshkholgh, M.R., 2007. Effects of zeolite levels on growth indexes of juvenile freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 16, 81-90.

Zychowski, K.E., Pohlenz, C., Mays, T., Romoser, A., Hume, M., Buentello, A., Gatlin III, D.M., Phillips, T.D., 2013. The effect of NovaSil dietary supplementation on the growth and health performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed aflatoxin-B1 contaminated feed. *Aquaculture*, 376-379, 117-123.