

اثرات نانو ذره آهن بر عملکرد رشد، بقاء، برخی فاکتورهای خونی - ایمنی و بافت کبد بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*)

پویا ابراهیمی^۱، رضا چنگیزی^{۱*}، شایان قبادی^{۱*}، پولین شهره^۲، صابر وطن دوست^۱

۱. گروه شیلات، واحد بابل، دانشگاه آزاد اسلامی، بابل، ایران

۲. گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۳

چکیده

هدف تحقیق حاضر، تعیین اثرات نانو ذره آهن بر عملکرد رشد، بقاء، بافت شناسی کبد و برخی پارامترهای خونی و ایمنی بچه ماهی ازون برون (*Acipenser stellatus*) بود. مجموعاً ۱۴۴ قطعه ماهی ۱۹۵-۱۷۵ گرمی با غذای حاوی مقادیر مختلف نانو ذره آهن (۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم غذا) به مدت ۸ هفته غذادهی شدند. براساس نتایج، تفاوت معنی داری در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، حجم متوسط هموگلوبین (MCV)، وزن متوسط هموگلوبین (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC)، آنزیم های ALT، آسپارات آمینو ترانسفراز (AST)، و فعالیت لیزوزیمی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ($P>0/05$). ماهیان تغذیه نموده از ۵۰ میلی گرم نانو ذره آهن تفاوت معنی داری از لحاظ تعداد گلبول های قرمز و سفید، نوتروفیل، پروتئین کل، انفجار تنفسی و سطح ایمنوگلوبین کل خون نشان دادند ($P<0/05$) و اثر منفی بر بافت کبد این ماهیان مشاهده نشد. میزان بقاء پس از ۸ هفته در تیمارهای تغذیه شده با مقادیر ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم به ترتیب برابر با ۸۶/۱۱، ۹۴/۴ و ۹۷/۲۲ درصد و در تیمار شاهد برابر با ۹۴/۴۴ درصد بود. نتایج نشان داد که استفاده از نانو ذره آهن به مقدار ۵۰ میلی گرم بر کیلو گرم سبب بهبود سلامت و بقای بچه ماهیان ازون برون شده، و اثر منفی بر کبد ماهی ازون برون نداشت.

کلمات کلیدی: نانو ذره آهن، ایمنوگلوبولین کل، پروتئین کل، کبد، *Acipenser stellatus*

*عهده دار مکاتبات (✉). ghobadi@baboliau.ac.ir و changizi@baboliau.ac.ir

مقدمه

ماهیان خاویاری از خانواده تاس‌ماهیان (Acipenseridae)، از جمله گونه‌های آبی با ارزشی هستند که حدود ۹۳ درصد از جمعیت آن‌ها، در دریای خزر زندگی می‌کنند (علیزاده نوذری و شاپوری، ۱۳۹۶) و ماهی ازون‌برون (*Acipenser stellatus*) یکی از گونه‌های تجاری و با ارزش اقتصادی بالای متعلق به این خانواده است. متأسفانه صید بیش از حد، ساخت و ساز سد، تخریب رودخانه، آلودگی رودخانه‌ها و ... موجب کاهش و به خطر افتادن جمعیت ماهیان خاویاری در دریای خزر شده است (Khodorevskaya et al., 2009). با این حال، تقاضا برای خاویار و گوشت ماهیان خاویاری رو به افزایش است و بهترین راه برای تأمین این نیاز، تکثیر و پرورش مصنوعی ماهیان خاویاری است. دولت ایران از سال ۱۳۶۷ توجه بسیاری به تکثیر مصنوعی و پرورش بچه‌ماهی خاویاری معطوف داشته است. زیرا تکثیر و پرورش مصنوعی این ماهیان به کاهش فشار بر جمعیت‌های طبیعی ماهیان خاویاری در دریای خزر کمک می‌کند (Karimpour et al., 2013). تهیه غذا برای ماهیان در سیستم‌های پرورش مصنوعی از اهمیت بسزایی برخوردار است. چراکه حداقل نیمی از هزینه‌های تولید ماهی به غذا مربوط می‌گردد و کیفیت غذا تأثیر مستقیم بر عملکرد رشد و سلامت ماهی دارد (Ringo et al., 2016). از این‌رو، مطالعات بسیاری در رابطه با غذا و مکمل‌های افزوده شده به غذا با هدف بهبود کیفیت و افزایش رشد و سلامت ماهیان در شرایط پرورشی در ایران انجام شده است (صابریان جویباری و همکاران، ۱۳۹۶؛ صالحی میر و همکاران، ۱۳۹۶؛ Heidarieh et al., 2014; Binaii et al., 2014; Nobahar et al., 2015; Nazerian et al., 2016; Bazari; Moghaddam et

al., 2017; Sharif Rohani et al., 2017; Jafari et al., 2018).

یکی از انواع این مکمل‌ها، نانو ذرات فلزی است. نانو ذرات آهن یکی از محصولات فن‌آوری نانو است که در عرصه‌های مختلف کاربرد دارد. آهن در ابعاد بزرگتر فلزی با خاصیت واکنش‌دهی کم می‌باشد، ولی زمانی که به ابعاد کوچک در حد نانومتر تبدیل می‌شود، واکنش‌دهی آن افزایش می‌یابد. هرچند این فن‌آوری به تازگی مورد توجه زیادی قرار گرفته و رونق بسیاری پیدا کرده است، اما فلزات به صورت نانو ذرات یکی از مهم‌ترین گروه‌هایی می‌باشد که در آبی‌پروری استفاده می‌شوند و معمولاً از یک فلز و یا اکسید فلزات و یا ترکیب چند فلز می‌باشد (Shaw and Handy, 2011). آهن یکی از عناصر معدنی کمیاب ضروری در ماهیان است که بر عملکرد سیستم ایمنی، دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای مختلف (Beisel, 1982) و نیز رشد ماهی (Roeder and Roeder, 1968) اثر می‌گذارد و در ساختن اسکلت ماهی، مکانیسم‌های کنترل تشکیل خون، تنفس، ساخت هورمون و متابولیسم اسیدهای چرب در ماهی، اثرات مهمی را دارا می‌باشد (عمادی، ۱۳۸۴).

منبع اصلی آهن برای ماهیان از طریق تغذیه تأمین می‌شود. اما ماهیان قادر به جذب آهن محلول در آب از طریق آبشش‌هایشان و موکوس روده نیز هستند (Bury et al., 2003). کمبود آهن در جیره غذایی سبب کم‌خونی در قزل‌آلا (*Salvelinus fontinalis*) (Kawatsu et al., 1972)، کاهش رشد، تضعیف عملکرد سیستم ایمنی، تغییر در فاکتورهای خونی و کاهش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا در ماهی کپور معمولی می‌گردد (Andersen, 1996; Hosseini et al., 2019). اثرات

جهت تهیه غذا، ابتدا غذای بیومار آسیاب گردید و ذرات نانو آهن (US Research Nanomaterials, Inc, USA) دارای میانگین اندازه ۴۵-۳۵ نانومتر و خلوص ۹۹/۵٪ به آن افزوده شد. طی این تحقیق، ۴ تیمار مختلف طراحی گردید که مقادیر نانو آهن افزوده شده به غذای تیمارهای شاهد، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب برابر با ۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم در هر کیلو گرم غذا بود. غذا مجدداً به شکل پلت درآمد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد، خشک گردید و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، نگهداری شد. غذادهی به ماهیان به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. ترکیبات غذا بیومار شامل پودر ماهی، کنجاله سویا، گندم، روغن ماهی، روغن گیاهی، گلوتن گندم، پرمیکس ویتامین، اکسید منگنز ۱۲ میلی گرم، اکسید روی ۷۵ میلی گرم، ید ۱/۸ میلی گرم و سولفات مس ۴/۴ میلی گرم، پرمیکس مواد معدنی و مکمل ها بود. انرژی قابل هضم آن ۴۳۰۰ کیلو کالری بر کیلو گرم بود.

جهت تعیین عملکرد رشد و بقای بچه ماهی ازون برون، همه ماهیان در شروع آزمایش و پس از آن هر ۱۵ روز یکبار، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شدند. ماهیان یک روز قبل از زیست-سنجی، قطع غذا گردیدند و پس از بیهوشی با عصاره گل میخک (۱۰۰ mg/l)، توزین شدند. مقادیر درصد افزایش وزن (PBWI)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و بقاء با استفاده از فرمول های ارائه شده توسط Bekan (۲۰۰۶) محاسبه شدند.

در پایان آزمایش، ۳ ماهی از هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب گردید و با استفاده از عصاره گل میخک (۱۰۰ mg/l) (شرکت پارس ایمن دارو) بیهوش شدند. خون گیری از سیاهرگ دمی و با استفاده از

مثبت نانو ذرات آهن بر فاکتورهای خونی، عملکرد رشد و پاسخ ایمنی ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) گربه ماهی پرورشی (*Clarias gariepinus*)، تیلپای نیل (*Oreochromis niloticus*) و پست لارو میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) گزارش شده است (Behera et al., 2014; Onuegbu Chris, 2018; El-Shenawy et al., 2019; Srinivasan et al., 2016) اما تحقیقی در رابطه با اثر نانو ذره آهن بر ماهی ازون برون صورت نگرفته است. از این رو، در تحقیق حاضر به تعیین اثر نانو ذره آهن بر عملکرد رشد، بقاء، فاکتورهای خونی، عملکرد ایمنی و بافت-شناسی کبد بچه ماهی ازون برون که گونه ای پرورشی با ارزش تجاری زیاد در ایران است، پرداخته می شود.

مواد و روش ها

مجموعاً ۱۴۴ قطعه بچه ماهی ازون برون در محدوده وزنی ۱۷۵ تا ۱۹۵ گرم مورد استفاده قرار گرفت. این تحقیق طی مرداد تا مهر سال ۱۳۹۷، در کارگاه پرورش ماهیان خاویاری واقع در روستای اسکنده (بابلسر) انجام پذیرفت. ماهیان پس از گذراندن ۲ هفته دوره سازگاری، به صورت تصادفی تیمار بندی گردیدند. ۱۲ قطعه ماهی در ۱۲ نیروی ۲۰۰۰ لیتری تقسیم شدند بطوریکه هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. ماهیان در دوران سازگاری با غذای پایه (بیومار، فرانس، حاوی ۴۷٪ پروتئین، ۸/۴٪ خاکستر و ۱۴٪ چربی) به میزان ۲ درصد وزن بدن و سه بار در روز، غذادهی شدند. طی دوره آزمایش، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب چاه اندازه گیری شدند و مقادیر دمای آب، اکسیژن محلول، pH و شوری به ترتیب برابر با $25/19 \pm 0/71$ °C، $5/98 \pm 0/06$ و $7/49 \pm 0/06$ ppt و $1/7$ بود.

سرنگ‌های هپارینه و غیر هپارینه (جهت تهیه سرم خون) انجام شد. نمونه خون‌های هپارینه در یخچال نگهداری و پس از انتقال به آزمایشگاه به سرعت برای بررسی خون‌شناسی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه خون‌های غیر هپارینه نیز با استفاده از سانتریفیوژ (Koukusan H-18, Japan) ۱۵۰۰ rmp به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و نمونه‌های سرم از آن جداسازی شد و تا زمان انجام آزمایشات مربوطه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (Binaei et al., 2014). تعداد گلبول‌های قرمز و سفید خون، هماتوکریت، هموگلوبین (Blaxhall and Daisley, 1973)، MCHC، MCH، MCV (Seiverd, 1964) و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید خون (Lee et al., 1998) از فاکتورهای خونی اندازه‌گیری شده، بودند.

از سرم خون نیز برای اندازه‌گیری مقادیر آلبومین، پروتئین کل، گلوکز، آنزیم‌های کبدی (ALT و AST) با استفاده از کیت‌های تجاری (پارس آزمون، تهران، ایران)، و اتوآنالایزر بیوشیمیایی (Eurolyser، بلژیک) (Binaii et al., 2014)، کورتیزول با استفاده از کیت ST AIA-PACK CORT (ژاپن) و دستگاه الیزا (مدل AWARENESS TECHNOLOGY INC)، میزان IgM (Amar et al., 2000)، فعالیت لیزوزیم (Ellis, 1990) و انفجار تنفسی (Binaei et al., 2014) استفاده شد.

جهت تهیه مقاطع بافت‌شناسی از کبد نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌ها ابتدا تثبیت گردیدند و سپس با استفاده از دستگاه اتوماتیک آماده‌سازی بافتی (Shandon، انگلستان) آماده‌سازی شدند. نمونه‌های آماده‌سازی شده، قالب‌گیری شدند و برش‌هایی با ضخامت ۷-۵ میکرومتر از آن‌ها تهیه گردید، بر روی

لام قرار داده شدند، خشک گردیدند و به روش هماتوکسیلین - ائوزین رنگ‌آمیزی شده و با استفاده از میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند (Meyers, 2009).

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (ورژن ۱۸) و با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way analysis of variance) صورت گرفت. در ابتدا، توزیع و نرمال‌سازی داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov Test) صورت گرفت. مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف براساس آزمون چند دامنه دانکن (Duncans Multiple- range test) در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید (Zar, 2007).

نتایج

نتایج بررسی عملکرد رشد و بقای بچه‌ماهیان ازون‌برون تغذیه‌شده با غذای حاوی مقادیر مختلف نانو آهن در جدول ۱ آورده شده است. تفاوت معنی‌داری از لحاظ فاکتورهای رشد و بقا در بین تیمارها مشاهده نشد اما با افزایش مقدار نانو آهن مصرفی، مقدار عددی ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن و درصد بقا، افزایش و مقدار ضریب تبدیل غذایی کاهش یافت ($P > 0.05$) (جدول ۱). نتایج اندازه‌گیری فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی ازون‌برون تغذیه‌شده با مقادیر مختلف نانو آهن در جیره غذایی، به ترتیب در جداول ۲ و ۳ آورده شده است. نتایج حاکی از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز خون در تیمارهای دریافت‌کننده نانو آهن در مقایسه با شاهد است. بطوریکه بیشترین میزان گلبول قرمز در تیمار ۲ مشاهده شد ($P < 0.05$). مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین نیز در تیمارهای ۲ و ۳ به

طور معنی داری بیشتر از تیمارهای ۱ و شاهد بودند ($P < 0/05$). همچنین افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل در تیمار ۲ به طور معنی داری بیشتر از شاهد بود ($P < 0/05$). تفاوت معنی داری در میزان MCV، MCH، MCHC، درصد لمفوسیت و ائوزینوفیل در بین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0/05$)

(جدول ۲). تفاوت معنی داری در سطوح ALT، AST، آلبومین و فعالیت لیزوزیم در بین تیمارها مشاهده نشد ($P > 0/05$) اما مقادیر انفجار تنفسی و IgM در تیمار ۲ به طور معنی داری بیشتر از شاهد بود ($P < 0/05$) (جدول ۳).

جدول ۱: فاکتورهای رشد و بقاء بچه ماهی ازون برون پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت نانو آهن

تیمار	شاخص	۱۰۰ mg/Kg	۵۰ mg/Kg	۲۵ mg/Kg	شاهد
میانگین وزن اولیه (گرم)		$193/30 \pm 31/73^a$	$180/60 \pm 25/54^a$	$176/00 \pm 14/23^a$	$177/90 \pm 43/09^a$
میانگین وزن نهایی (گرم)		$367/50 \pm 39/88^a$	$348/00 \pm 56/13^a$	$316/50 \pm 58/22^a$	$306/50 \pm 58/22^a$
افزایش وزن بدن (گرم)		$183/80 \pm 48/24^a$	$167/40 \pm 62/38^a$	$140/50 \pm 63/98^a$	$128/60 \pm 60/95^a$
درصد افزایش وزن بدن (%)		$98/74 \pm 35/20^a$	$96/43 \pm 42/67^a$	$70/52 \pm 52/66^a$	$77/48 \pm 35/03^a$
ضریب رشد ویژه (%)		$1/11 \pm 0/34^a$	$1/09 \pm 0/37^a$	$0/96 \pm 0/35^a$	$0/92 \pm 0/38^a$
ضریب تبدیل غذایی		$0/9 \pm 0/07^a$	$1/02 \pm 0/21^a$	$1/01 \pm 0/29^a$	$1/19 \pm 0/17^a$
درصد بقاء (%)		97/22	94/4	86/11	94/4

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. داده‌های دارای بالانویس متفاوت در یک ردیف، دارای تفاوت معنی داری هستند ($P < 0/05$).

جدول ۲: میانگین فاکتورهای خونی بچه ماهی ازون برون پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت نانو آهن

تیمار	شاخص	۱۰۰ mg/Kg	۵۰ mg/Kg	۲۵ mg/Kg	شاهد
گلبول قرمز (M/mm^3)		$1/52 \pm 0/06 \times 10^{12}^b$	$1/83 \pm 0/10 \times 10^{12}^c$	$1/39 \pm 0/08 \times 10^{12}^{ab}$	$1/24 \pm 0/07 \times 10^{12}^a$
گلبول سفید ($Cell/mm^3$)		$7083/33 \pm 642/08^{ab}$	$7733/33 \pm 461/63^b$	$7050/00 \pm 367/65^{ab}$	$6050/00 \pm 143/17^a$
هموگلوبین (g/dl)		$4/93 \pm 0/11^b$	$5/26 \pm 0/23^b$	$3/96 \pm 0/30^a$	$3/86 \pm 0/12^a$
هماتوکریت (%)		$31/16 \pm 0/30^b$	$32/66 \pm 1/02^b$	$27/33 \pm 1/02^a$	$24/33 \pm 1/81^a$
لنفوسیت (%)		$84/66 \pm 2/15^a$	$83/66 \pm 2/89^a$	$86/16 \pm 4/19^a$	$90/50 \pm 2/23^a$
نوتروفیل (%)		$4/33 \pm 0/61^{ab}$	$5/83 \pm 1/04^b$	$4/16 \pm 1/16^{ab}$	$2/83 \pm 0/79^a$
ائوزینوفیل (%)		$11/00 \pm 1/61^a$	$10/50 \pm 3/09^a$	$9/66 \pm 4/65^a$	$6/66 \pm 2/18^a$
(MCV) (فمتولتر)		$207/39 \pm 10/61^a$	$179/49 \pm 6/09^a$	$198/08 \pm 10/69^a$	$195/98 \pm 12/60^a$
(MCH) (پیکو گرم)		$32/76 \pm 1/57^a$	$29/15 \pm 2/00^a$	$28/47 \pm 1/70^a$	$31/40 \pm 1/72^a$
(MCHC) (%)		$15/83 \pm 0/38^a$	$16/22 \pm 0/96^a$	$14/51 \pm 0/90^a$	$16/18 \pm 0/90^a$

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. داده‌های دارای بالانویس متفاوت در یک ردیف، دارای تفاوت معنی دار هستند ($P < 0/05$).

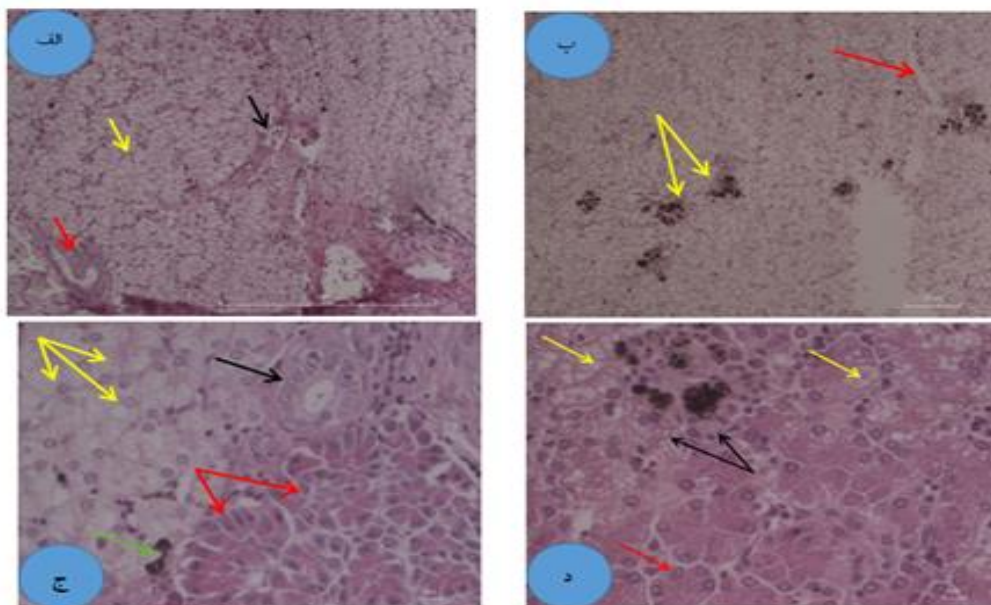
جدول ۳: میانگین فاکتورهای سرمی و ایمنی بچه ماهی ازون برون پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت نانو آهن

شاخص	تیمار	۱۰۰ mg/Kg	۵۰ mg/Kg	۲۵ mg/Kg	شاهد
پروتئین کل (gdL^{-1})	$4/16 \pm 0/29^a$	$5/70 \pm 0/56^b$	$3/35 \pm 0/33^a$	$3/35 \pm 0/23^a$	
آلبومین (gdL^{-1})	$1/36 \pm 0/61^a$	$1/50 \pm 0/07^a$	$1/35 \pm 0/2^a$	$1/40 \pm 0/06^a$	
AST (U/L)	$283/40 \pm 21/13^a$	$252/35 \pm 16/69^a$	$299/38 \pm 30/01^a$	$300/33 \pm 14/20^a$	
ALT (U/L)	$10/01 \pm 1/20^a$	$8/86 \pm 1/07^a$	$11/26 \pm 1/03^a$	$10/31 \pm 0/51^a$	
IgM (mgmL^{-1})	$119/91 \pm 15/32^{ab}$	$168/31 \pm 15/05^b$	$134/88 \pm 18/9^{ab}$	$112/23 \pm 19/13^a$	
لیزوزیم (μgmL^{-1})	$2/71 \pm 0/42^a$	$1/66 \pm 0/23^a$	$2/41 \pm 0/38^a$	$2/40 \pm 0/49^a$	
انفجار تنفسی (RLUs^{-1})	$520/36 \pm 32/2^{ab}$	$551/23 \pm 38/65^b$	$478/85 \pm 20/09^{ab}$	$450/46 \pm 28/24^a$	
گلوکز (gdL^{-1})	$67/48 \pm 10/27^{ab}$	$49/06 \pm 6/08^a$	$70/55 \pm 4/87^{ab}$	$75/08 \pm 5/91^b$	
کورتیزول (μgdL^{-1})	$6/23 \pm 1/10^{bc}$	$3/93 \pm 0/41^a$	$5/06 \pm 0/47^{ab}$	$7/85 \pm 0/35^c$	

داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. داده‌های دارای بالانویس متفاوت در یک ردیف، دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($P < 0/05$).

تصویر بافت‌های کبدی تهیه شده از ماهیان تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. سلول‌های کبدی در همه تیمارها مشابه بودند و حالت غیرطبیعی در آن‌ها مشاهده نشد. با این حال، نکروز خفیفی به دلیل دژنراسیون چربی در برخی قسمت‌های کبد مشاهده شد. سیتوپلاسم سلول‌های کبدی در

ماهیان همه گروه‌ها، دارای واکوئل‌های چربی بود. سینوزوئیدهای کبدی دارای ساختاری طبیعی و بدون خونریزی بودند. همچنین رنگدانه ملانین و مراکز ماکروفاژ ملانینه (MMC) در همه نمونه‌ها مشاهده شد که میزان آن با افزایش میزان نانو آهن مصرفی در غذا افزایش یافت (شکل ۱).



شکل ۱: کبد بچه ماهی از وزن برون. الف) تجمع چربی در سیتوپلاسم (فلش های زرد)، مجرای صفراوی سالم (فلش قرمز) و مجرای عروقی بدون خونریزی (فلش مشکی) در ماهیان تیمار شاهد پس از ۶۰ روز. مقیاس = ۱ mm، بزرگنمایی X۱۰. ب) نمایی از سلول های کبدی با تجمع چربی در سیتوپلاسم و تجمع مراکز MMC (فلش های زرد) و مجرای عروقی بدون خونریزی (فلش قرمز). در ماهیان تیمار ۱، پس از ۶۰ روز. مقیاس = ۱۰۰ μ m، بزرگنمایی X۱۰. ج) نمایی از سلول های کبدی با تجمع چربی در سیتوپلاسم (فلش های زرد)، بافت پانکراس (فلش های قرمز)، مجرای صفراوی سالم (فلش سیاه)، تجمع رنگدانه ملانین (فلش سبز) در ماهیان تیمار ۲، پس از ۶۰ روز. مقیاس = ۱۰ μ m، بزرگنمایی X۴۰. د) نمایی از سلول های کبدی با تجمع چربی در سیتوپلاسم (فلش های زرد)، سلول های کبدی سالم (فلش های قرمز)، تجمع رنگدانه ملانین (فلش سیاه). در ماهیان تیمار ۳، پس از ۶۰ روز. مقیاس = ۱۰ μ m، بزرگنمایی X۴۰.

بحث

اطلاعات کمی در رابطه با متابولیسم آهن در ماهیان خصوصاً ماهیان خاویاری وجود دارد. آهن یکی از عناصر فلزی است که به دلیل خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کم نظیری که دارد، به عنوان مکمل خوراکی توانایی زیادی در افزایش رشد ماهیان دارد (Prochorov et al., 2011; Naser et al., 1998). هرچند در یک نگاه کلی به نتایج شاخص های رشد تفاوت معنی داری بین گروه های تیمار و شاهد مشاهده نشد. ولی به نظر می رسد شاخص های رشد در گروه های تیمار از شرایط بهتری نسبت به شاهد برخوردار بوده اند. همچنین در شاخص هایی چون افزایش وزن،

درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه، تیمار ۳ نسبت به سایر تیمارها از افزایش عددی بیشتری برخوردار بوده است. میزان ضریب تبدیل غذایی در این تیمار نسبت به سایر گروه ها از نظر عددی کمترین مقدار را داشت. طی مطالعات مختلف انجام شده در رابطه با ماهیانی همچون گربه ماهی رونده (*Clarias batrachus*)، کپور بزرگ هندی (*Labo rohita*)، تیلپای نیل (*Oreochromis niloticus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مشخص شد که افزودن نانو ذره آهن به غذا سبب بهبود معنی دار عملکرد رشد در مقایسه با شاهد می گردد (Akter et al., 2018; Behera et al., 2014; El-shenawy et

al., 2019; قلی زاده اصل و همکاران، ۱۳۹۶؛ قبادی و همکاران، ۱۳۹۲). به نظر می رسد عنصر آهن با بهبود در تنفس سلولی و به دنبال آن بهبود عملکرد متابولیسم می تواند موجب بهبود شاخص های رشد گردد.

براساس نتایج این مطالعه بیشترین میزان بازماندگی در تیمار ۳ و پس از آن تیمار ۲ و شاهد مشاهده شد. ارزیابی اثرات نانو ذره آهن بر درصد بقاء ماهیان مختلف متفاوت بود. بطوریکه اثر مصرف دوزهای ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ نانوذره آهن بر درصد بازماندگی گربه ماهی رونده (Akter et al., 2018)، تفاوت معنی داری را با شاهد نشان نداد و بازماندگی در تمام گروه ها ۱۰۰٪ بود. لیکن مطالعات El-Shenaw و همکاران (۲۰۱۹)، نشان داد استفاده از دوزهای ۶۳/۷۵ و ۴۲/۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره تیلاپای نیل در مقایسه با شاهد و نیز سایر تیمارها از بیشترین درصد بقاء برخوردار بوده است. مطالعه Remya و همکاران (۲۰۱۵)، نشان داد که در دوزهای ۲، ۱۰، ۱۰۰ و ۲۵۰ تلفاتی در کپور بزرگ هندی اتفاق نیفتاد. ولی تلفات در دوزهای ppm ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ رخ داد. ارزیابی درصد بقاء یکی از شاخص های مهم در رابطه با اثر ترکیبات نانو ذره فلزی است که بصورت مکمل خوراکی در آبزیان مورد استفاده قرار می گیرند. باید توجه داشت در تأثیر نانو ذره فلزی بر بازماندگی ماهیان، عواملی چون میزان نانو ذره، نوع ترکیب فلزی، نوع پوشش مصرفی، جذب و متابولیسم مناسب از اهمیت ویژه ای برخوردار است. در کنار این عوامل همچنین مراحل زندگی و نیز گونه ماهی از دیگر عوامل مؤثر است (Singha et al., 2017).

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که تعداد گلبول قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت در تیمار ۲ از افزایش معنی داری نسبت به شاهد و حتی دیگر تیمارها برخوردار بوده است. مشابه این مطالعه، گزارشاتی از بهبود شاخص های خونی در پی استفاده از نانو ذره آهن در ماهی کپور بزرگ هندی (Behera et al., 2014)، قزل آرای رنگین کمان (Carriquiriborde et al., 2004)، بچه ماهی انگشت قد گربه ماهی پرورشی (*Clarias gariepinus*) (Chris et al., 2017)، بچه ماهی انگشت قد کپور معمولی (قلی زاده اصل و همکاران ۱۳۹۶) و تاس ماهی استرلیاد (*Acipenser nudiventris*) (Hosseini et al., 2019) ارائه شده است. هر چند طی تحقیقاتی نیز تغییری در شاخص های خونی ماهی تیلاپای نیل (El-Shenawy et al., 2019) و کپور بزرگ هندی (Remya et al., 2015) در شرایط آزمایشی انجام شده، مشاهده نشد. دلیل وجود نتایج متفاوت مبنی بر تأثیر مثبت یا بی اثر بودن استفاده از آهن در غذای ماهیان مورد بررسی قرار گرفته در تحقیقات مختلف می تواند به نیازهای متفاوت ماهیان به میزان آهن باشد. در صورتیکه دوز مناسبی از آهن به غذا افزوده شود، نتایج مثبتی در زمینه بهبود فاکتورهای خونی مشاهده خواهد شد. به طور کلی، تابلوی خونی ماهیان نشان دهنده وضعیت سلامت ماهیان و شاخص خوبی برای کافی بودن میزان آهن موجود در غذای آن هاست (Chu et al., 2007). مطالعات نشان داده است که آهن در روند خون سازی ماهیان نقش بسیار مهمی دارد و کمبود آهن در ماهیان موجب بروز کم خونی میکروسیتیک هیپوکرومیک می گردد. در واقع دریافت آهن (بصورت ترکیب معدنی و نانوذره) موجب بهبود

روند خونسازی (اریتروپویزس) فاکتورهای خونی در ماهیان می شود (Chu et al., 2007).

سیستم ایمنی مهم ترین سد دفاعی ماهیان در برابر عوامل بیماری زا است و امروزه مطالعات زیادی در خصوص ارزیابی عملکرد این سیستم و اندازه گیری شاخص های آن به عنوان ابزار تعیین سلامت در ماهیان صورت گرفته است (Mogensen, 2009). مطالعات نشان داده است که نانو ذره های فلزی می توانند با تأثیر بر سیستم ایمنی و بهبود شاخص های آن موجب افزایش مقاومت حیوانات مختلف در برابر بیماری ها شوند (Luoi monfared et al., 2015). در نتایج این تحقیق مشخص شد که تعداد گلبول های سفید، درصد نوتروفیل، IgM و تولید رادیکال آزاد اکسیژن بطور معنی داری در تیمار ۲ در مقایسه با شاهد افزایش معنی داری داشت. در مطالعاتی که در خصوص ارزیابی اثرات نانو ذره آهن بر سیستم ایمنی ماهیان انجام شده است نتایج متفاوتی بدست آمده است. اما به طور کلی، با تعیین وضعیت گلبول های سفید خون می توان به وضعیت عمومی سیستم ایمنی ماهی پی برد و نتایج بسیاری از مطالعات حاکی از تأثیر نانو ذره آهن به عنوان یک عامل محرک ایمنی و افزایش دهنده تعداد گلبول سفید خون بود. بطوریکه مطالعات Behera و همکاران (۲۰۱۴)، نشان داد تعداد گلبول های سفید با استفاده از نانو ذره آهن در ماهی کپور بزرگ هندی تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت. اما میزان گلوبولین کل (دربرگیرنده ایمونوگلوبولین ها و از جمله IgM تام سرم)، تولید رادیکال آزاد اکسیژن، فعالیت ضدباکتریایی سرم و فعالیت کمپلمان بطور معنی داری در تیمار نانوذره آهن در مقایسه با شاهد افزایش داشت. در مطالعه Onuegbu و همکاران (۲۰۱۸)، استفاده از

نانو ذره آهن در جیره غذایی گربه ماهی پرورشی تأثیر بر تعداد گلبول های سفید نداشت. ولی سبب شد تا میزان گلوبولین کل بطور معنی داری در مقایسه با شاهد افزایش یابد. تولید رادیکال آزاد اکسیژن توسط نوتروفیل های خون ناشی از واکنش های انجام شده طی انفجار تنفسی، پدیده ای مهم در مسیر ازبین بردن باکتریها در بدن ماهی است (Sharp and Secombes, 1993 & 1992). مطالعات نشان داده است که نانو ذرات آهن می توانند واکنش های ایمنی بین آنتی ژن - آنتی بادی را اصلاح کرده و موجب افزایش تولید آنتی - بادی شوند. همچنین نانو ذره آهن می تواند سبب افزایش عملکرد لنفوسیت های T شود (Shen et al., 2011). با توجه به مطالب گفته شده، افزایش تولید IgM تام سرم در این مطالعه را می توان توجیه نمود. در خصوص تغییرات تعداد گلبول های سفید در این بررسی و نتایج متفاوت بدست آمده در سایر مطالعات باید در نظر گرفت که دوز مصرفی و نیز نوع گونه ماهی می تواند در تأثیر مکمل های مؤثر بر شاخص های خونی و ایمنی اثرگذار باشد. در این بررسی افزایش میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن مشاهده شد. این موضوع از یک سو می تواند مربوط به افزایش تعداد نوتروفیل و از سوی دیگر تأثیر نانوذره آهن بر نوتروفیل ها باشد. باید توجه داشت که کمبود آهن موجب کاهش فعالیت میلوپراکسیداز، قابلیت ضد میکروبی سرم، فعالیت نوتروفیل ها و میزان بیگانه خواری آن ها می شود (Behera et al., 2014). براساس نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه به نظر می رسد استفاده از نانو ذره آهن به عنوان یک مکمل ایمنی در ماهیان پرورشی در کشور می تواند مطرح و قابل ترویج باشد.

نتایج این مطالعه نشان داد که میزان آنزیم‌های ALT، AST، لیزوزیم و آلبومین در بین گروه‌های شاهد و تیمار از تفاوت معنی داری برخوردار نبود. میزان گلوکز و کورتیزول بطور معنی داری کمتر از شاهد و سایر تیمارها بود. ولی میزان پروتئین تام بطور معنی داری در همین گروه بیشتر از شاهد و سایر تیمارها بود. در ارزیابی نتایج تجویز جیره‌ای نانو ذره آهن به ماهیان کپور بزرگ هندی مشخص شد که میزان پروتئین کل و آلبومین در مقایسه با گروه شاهد افزایش معنی داری داشته است. نتایج مطالعه El-Shenawy و همکاران (۲۰۱۹)، در تجویز نانو ذره آهن به تیلاپای نیل در میزان پروتئین تام سرم و آلبومین مشابه نتایج تحقیق حاضر بود. همچنین میزان آلبومین در بین گروه‌های دریافت کننده نانوذره آهن و شاهد، فاقد اختلاف معنی دار بود. همچنین میزان پروتئین تام سرم در دوزهای ۶۳/۷۵ و ۴۲/۵ میلی گرم بطور معنی داری بیشتر از شاهد بود. پروتئین تام سرم شامل آلبومین و گلوبولین است. گلوبولین خود متشکل از آلفا ۱، آلفا ۲، بتا و گاما گلوبولین‌ها است که خود گاما گلوبولین تشکیل دهنده ایمونوگلوبولین‌های سرم هستند. بنابراین، افزایش میزان پروتئین کل در ماهی همبستگی زیادی با تقویت و بهبود پاسخ‌های ایمنی ذاتی در ماهی دارد (Wiegertjes et al., 1996). پتیدهای مختلفی مانند لیزوزیم‌ها در سرم برای جلوگیری از تشکیل کلنی توسط میکروارگانیسم‌ها وجود دارند و به عنوان اولین خط دفاع در ماهی عمل می‌کنند. این پتید یک عنصر دفاعی است، که باعث لیز شدن باکتری‌های گرم مثبت و برخی باکتری‌های گرم منفی و فعال شدن فاگوسیت‌ها می‌شود (Saurabh and Sahoo, 2008). در مطالعه حاضر، فعالیت لیزوزیم بچه‌ماهیان خاویاری پس از

تغذیه با دوزهای مختلف نانو آهن تغییر معنی داری نداشت. هیچ مدرکی در مورد تأثیر نانو آهن بر فعالیت لیزوزیم در ماهی‌ها وجود ندارد. و به نظر می‌رسد مطالعه حاضر اولین مطالعه در این رابطه باشد. کورتیزول هورمونی است که بطور گسترده‌ای برای ارزیابی وضعیت سلامت ماهیان در معرض استرس مورد استفاده قرار می‌گیرد (Pickering, 1993). تغییر در میزان کورتیزول پلاسما بستگی به طبیعت عامل استرس‌زا، طول دوره استرس و نیز گونه ماهی دارد. بسیاری از محققین بر این باورند که کورتیزول با افزایش گلیکولیز موجب افزایش قند خون می‌شوند. ولی گروه دیگر اعتقاد دارند که افزایش اولیه قند خون ناشی از کاته کول آمین‌هایی است که تحت عنوان هورمون‌های "جنگ و گریز" شناخته می‌شوند و بعد از این‌ها کورتیزول موجب افزایش گلوکز می‌شود. اما کورتیزول از طریق گلیکونئوژنز نیز باعث افزایش گلوکز می‌شود. برای تشخیص آنکه افزایش گلوکز تحت تأثیر کورتیزول از روش گلیکولیز ایجاد شده یا گلوکونئوژنز ضروری است تا آنزیم‌های کبدی ALT و AST اندازه‌گیری شود. در مسیر گلیکونئوژنز میزان این آنزیم‌ها افزایش می‌یابند (Ray and Sinha, 2014). با توجه به نتایج این بررسی به نظر می‌رسد نانوذره آهن موجب کاهش استرس و پایین ماندن سطح کورتیزول و گلوکز در مقایسه با گروه شاهد شده است و همچنین آسیبی به بافت‌های کبدی وارد نکرده است که البته عدم مشاهده تفاوت معنی دار در میزان ALT و AST ماهیان تیمارها و گروه شاهد، دلیل دیگری بر این ادعاست. برخلاف نتایج بدست آمده در این مطالعه، میزان آنزیم‌های ALT و AST در مطالعه Akter و همکاران (۲۰۱۸)، تابعی از افزایش دوز نانوذره آهن

بود. بطوریکه در دوزهای بالاتر بطور معنی داری بیشتر از شاهد و دوزهای کمتر بودند. آنزیم های ALT و AST دو آنزیم مهم نشان دهنده بروز آسیب کبدی است که می تواند ناشی از عفونت، مسمومیت و یا هر نوع آسیب دیدگی باشد (Pascual et al., 2003). گاهی استفاده از نانو ذرات فلزی می تواند سبب آسیب کبدی شده و موجب افزایش این دو آنزیم گردد. Zaghloul و همکاران (۲۰۰۶)، نشان دادن استفاده از نانو ذره مس در ماهی *Clarias gariepinus* موجب مسمومیت کبدی و افزایش دو آنزیم ALT و AST می شود. براساس نتایج این بررسی به نظر نمی رسد دوزهای مصرفی نانو ذره آهن موجب آسیب دیدگی در بافت کبد شده باشند. با بررسی بافت شناسی کبد نیز مشخص گردید که سلول های کبدی کاملاً یک دست و بدون هرگونه اختلال و بی نظمی سلولی بودند. تنها با افزایش دوز نانو ذره آهن رنگدانه ملانین و مراکز ملانوماکروفاژ (MMC) افزایش داشت. در خصوص اثرات نانو ذرات بر اندام های داخلی ماهیان خاویاری مطالعات اندکی وجود دارد. در ارزیابی اثرات این ترکیبات دوزهای مختلف نانو ذره مس و نقره بر کبد ماهی خاویاری سبیری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ترکیبات موجب عوارضی چون افزایش حضور سلول های کوپفر، کاریوپیکنوزیس و اجسام ائوزینوفیلیک (نشان دهنده دژنراسیون سلول های کبد)، اتساع فضای سینوزوئیدی، نفوذ سلول های خونی در عروق (پر خونی کبد)، بروز واکوئلاسیون و چروک شدن در سلول های کبدی می شود. افزایش بروز ضایعات با افزایش دوز نانو ذرات فلزی در این بررسی همراه بود (Ostaszewska et al., 2016). نتایج بیوشیمیایی خون حاصل از اندازه گیری میزان ALT و

AST در کنار یافته های بافت شناسی نشان می دهد که دوز نانو ذره آهن استفاده شده در این مطالعه فاقد اثرات سمی بر کبد بوده است. در رابطه با مشاهده تجمع رنگدانه ها ملانین و مراکز MMC در تیمارهای با دوز بیشتر نانو ذره آهن باید بیان نمود که گلبول های قرمز پس از پیر شدن، در بدن منهدم می شوند و مهم ترین محل تخریب آن بافت کبد است (Morera and MacKenzie, 2011). بعد از تخریب گلبول های قرمز در کبد، بقایای سلولی آن ها بصورت تجمع رنگدانه های ملانین در بافت کبد تجمع یافته و بتدریج از بین می روند (Witeska, 2013). با توجه به افزایش میزان گلبول های قرمز در این مطالعه در کنار افزایش دوز نانو ذره آهن، به نظر می رسد تخریب گلبولی از حجم بیشتری برخوردار بوده و تجمع رنگدانه ها ملانین و مراکز MMC در تیمارهای با دوز بیشتر نانو ذره آهن ناشی از این امر باشد. Carriquiriborde و همکاران (۲۰۰۴)، نشان دادند در صورت استفاده از دوزهای بالای آهن عوارضی چون افزایش فضای سینوزوئیدی، افزایش سائز سلول های کبدی و هیپرتروفی آن ها و کاهش میزان گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول های کبدی مشاهده می شود. با توجه به نتایج و مقایسه آن با نتایج دیگر محققین به نظر میرسد دوزهای استفاده شده در این مطالعه عوارض آسیب شناختی بر کبد ماهیان نداشته اند.

بطور کلی نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می دهد که افزودن نانو آهن به میزان ۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم غذا، سبب بهبود برخی پارامترهای خونی و ایمنی بچه ماهی ازون برون گردید. و هر چند تأثیر معنی داری بر عملکرد رشد و بقاء نداشت، اما از لحاظ عددی سبب بهبود عملکرد رشد گردید. پیشنهاد

ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فصلنامه علوم تکثیر و آبی پروری، ۱ (۱)، ۸۲-۶۷

۵. قلی زاده اصل، ک.، خوش خلق، م. و فلاحتکار، ب.، ۱۳۹۶. اثر سطوح متفاوت نانوذره آهن جیره بر رشد و شاخص‌های خونی بچه‌ماهی انگشت‌قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان، ۵ (۳)، ۱۱۹-۹۵.

6. Akter, N., Alam, M.J., Jewel, M.A.S., Haque, M.A., Khatun, S. & Akter, S., 2018. Evaluation of dietary metallic iron nanoparticles as feed additive for growth and physiology of Bagridae catfish (*Clarias batrachus*) (Linnaeus, 1758). International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 6, 371-377.
7. Amar, C.E., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N. & Watanabe, T., 2000. Effect of dietary β -carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science, 66, 1068-1075.
8. Andersen, F., Maage, A. & Julshamn, K., 1996. An estimation of dietary requirements of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Aquaculture Nutrition, 2, 41-47.
9. Bazari Moghaddam, S., Haghighi, M., Sharif Rohani, M., Hamidi, M. & Ghasemi, M., 2017. The effects of different levels of Aloe vera extract on some of the hematological and non-specific immune parameters in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Iranian Journal of Fisheries Science, 16, 1234-1247.
10. Behera, T., Swain, P., Rangacharulu, P.V. & Samanta, M., 2014. Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H. Applied Nanoscience 4, 687-694.
11. Beisel, W.R. 1982. Single nutrient and immunity. American Journal of Clinical Nutrition, 35, 417-468.
12. Binaii, M., Ghiasi, M., Farabi, S.M.V., Pourgholam, R., Fazli, H., Safari, R.,

می‌گردد در آینده مطالعاتی در زمینه تأثیر نانو آهن بر مقاومت این گونه در برابر بیماری‌ها و پاسخ آن‌ها به استرس نیز صورت گیرد.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. صابریان جویباری، م.، قبادی، ش. و وطن دوست، ص.، ۱۳۹۶. تأثیر سطوح مختلف پری بیوتیک A-MAX بر شاخص‌های رشد، بازماندگی و ترکیبات لاشه در بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبی پروری، ۱۱ (۱)، ۶۳-۷۵.
۲. صالحی میر، و.، سوداگر، م.، ذکریایی، ح. و دادگر، ش.، ۱۳۹۶. تأثیر عصاره ماهیان کاراس (*Carasius ausatus*) و کلمه (*Rutilus rutilus*) بر شاخص‌های رشد بچه‌فیل ماهیان پرورشی (*Huso huso*). مجله توسعه آبی پروری، ۱۱ (۲)، ۶۹-۷۸.
۳. علیزاده نودری، م. و شاپوری، م.، ۱۳۹۶. بررسی تأثیر پروبیوتیک آلفامیون بر شاخص‌های رشد، پارامترهای بیوشیمیایی خون و ترکیب لاشه فیل-ماهی پرورشی (*Huso huso*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶ (۴)، ۱۵۱-۱۶۰.
۴. قبادی، ش.، رجبی اسلامی، ه.، حسینی فرد، م. و پلنگی، ل.، ۱۳۹۲. بررسی اثرات سطوح مختلف نانو ذره آهن (Fe) بر فاکتورهای رشد و تغذیه

- different levels of iron sulfate on some haematological parameters of ship sturgeon, *Acipenser nudiiventris*. Iranian Journal of Fisheries Science, 18, 163-172.
22. Jafari, F., Agh, N., Noori, F., Tokmechi, A, & Gisbert, E., 2018. Effects of dietary soybean lecithin on growth performance, blood chemistry and immunity in juvenile stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*). Fish & Shellfish Immunology, 80, 487-496.
 23. Karimpour, M., Harlioglu, M.M., Khanipour, A.A., Abdolmalaki, S. & Aksu, O., 2013. Present statues of fisheries in Iran. Journal of Fisheries Sciences, 7,161-177.
 24. Kawatsu, H., 1972. Studies on the anaemia of fish. 5. Dietary iron deficient anaemia in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Bulletin of freshwater fish research laboratory. (Tokyo), 22, 59-67.
 25. Khodorevskaya, R.P., Ruban, G.I. & Pavlov, D.S., 2009. Behavior, migrations, distribution and stocks of sturgeons in the Volga-Caspian basin. World Sturgeon Conservation Society Special Publication No. 3, H. Rosenthal (editor). Norderstedt, Germany, Books on Demand GmbH. pp: 233.
 26. Lee, R.G., Foerster, J., Jukens, J., Paraskevas, F., Greer, J.P. & Rodgers, G.M., 1998. Wintrobe's clinical hematology. 10th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins.
 27. Louei Monfared, A., Mohammad Bahrami, A.M., Hosseini, E., Soltani, S., Shaddel, M., 2015, Effects of nano-particles on histo-pathological changes of the fish, Journal of Environmental Health Science & Engineering, 13, 62.
 28. Meyers, T.R., 2009. Fish Pathology Section Laboratory Manual, Special Publication No. 12, 2th Edition, Alaska Department of Fish and Game Commercial Fisheries Division, Juneau, Alaska, 251pp.
 29. Mogensen T H., 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses," Clinical Microbiology Reviews, 22(2), 240-273.
 30. Morera, D. & MacKenzie, S.A., 2011. Is there a direct role for erythrocytes in the
 - Alavi, S.E., Taghavi. M.J. & Bankehsaz, Z., 2014. Biochemical and hamate-immunological parameters in juvenile beluga (*Huso huso*) following the diet supplemented with nettle (*Urtica dioica*). Fish and Shellfish Immunology, 36, 46-51.
 13. Blaxhall, P.C. & Daisley, W., 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology, 771- 781.
 14. Bury, N.R., Walker, P.A. & Glover, and C.N., 2003. Nutritive metal uptake in teleost fish. Journal of Experimental Biology, 206, 11-23.
 15. Carriquiriborde P., Handy R.D. and Davies, S.J., 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. Journal of Experimental Biology, 207:75-86.
 16. Chris, U.O., Singh, N.B. & Agarwal, A., 2018. Nanoparticles as feed supplement on growth behavior of Cultured Catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings, Materials Today: Proceedings (NCNN 2017), 5, 9076-9081.
 17. Chu, J.M., Chen, S.M. & Huang, C.H., 2007. Effect of dietary iron concentrations on growth, hematological parameters, and lipid peroxidation of soft-shelled turtles, *Pelodiscus sinensis*, Aquaculture 269, 532-537.
 18. Ellis, A.E., 1990. In: JS. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Robertson, W.R. Van Muiswinkel, editors. Lysozyme assay in techniques in fish immunology. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publications. p. 101 -103.
 19. El-Shenawy, A.E., Gad, D.M. & Yassin, S.A., 2019. Effect of iron nanoparticles on the development of fish farm feeds. Alexandria Journal for Veterinary Sciences, 60, 102-115.
 20. Heidarieh, M., Soltani, M., Tamimi, A.H. & Toluei, M.H., 2014. Some immune responses of raw fiber (vitacel) on giant sturgeon (*Huso huso*). Iran Agriculture Research, 31, 33-37.
 21. Hosseini, S.H., Kamali, A., Yazadani, M.A. & Khara, H., 2019. Effect of

- Foresight Conference on Molecular Nanotechnology.
39. Ray, SNC., Sinha, RC., 2014. Serum Cortisol and Glucose: Reliable Bioindicators of stress in the Fish *Labeo rohita*, International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology, 1(8), 6 – 17.
 40. Ringo, E., Zhou, Z., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S. & Romero, J., 2016. Effect of dietary components on the gut microbiota of aquatic animals. A never-ending story? Aquaculture Nutrition, 22, 219-282.
 41. Roeder, M. & Roeder, R.H., 1968. Effect of iron on the growth rate of fishes. Journal of Nutrition, 90(1), 86–90.
 42. Remya, AS., Ramesh, M., Saravanan, M., Poopal, RK, Bharathi, Nataraj, D., 2015, Iron oxide nanoparticles to an Indian major carp, *Labeo rohita*: Impacts on hematology, ionic regulation and gill Na⁺/K⁺ ATPase activity, Journal of King Saud University – Science, 27, 151–160.
 43. Saurabh, S., & Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research, 39, 223-239. x.
 44. Seiverd, C.E., 1964. Hematology for medical technologists. Philadelphia, PA: Lea and Febiger; pp. 946.
 45. Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. Environmental International 37, 1083-1097
 46. Sharif Rohani, M., Haghighi, M. & Bazari Moghaddam, S., 2017. Study on nanoparticles of Aloe vera extract on growth performance, survival rate and body composition in Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Iranian Journal of Fisheries Science, 16, 457- 468.
 47. Sharp, G.J. & Secombes, C.J., 1992. Observations on the killing of *Aeromonas salmonicida* by rainbow trout (*O. mykiss*, Walbaum) macrophages. Diseases in Asian Aquaculture, 1, 379–389.
 48. Sharp, G.J. & Secombes, C.J., 1993. The role of reactive oxygen species in the killing of the bacterial pathogen immune response? Veterinary Research, 42 (1), 89.
 51. Naser. N., Lall, S.P., Brown, L. & Olivier, G., 1998. Role of dietary iron in immune response and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. World Aquaculture. 98. Pp: 447.
 52. Nazerian, S., Gholipour kanani, H., Jafaryan, H.A., Soltani, M., Patimar, R. & Esmaili Mola, A., 2016. Effect of purple coneflower (*Echinacea purpora*) and garlic (*Allium satvium*) as a supplemented dietary intake on some non-specific immune status, hematological parameters and growth performance in grower (*Huso huso*). Iranian Journal of Veterinary Science Technology, 8, 29-39.
 53. Nobahar Z, Gholipour-Kanani, Kakoolaki, S. & Jafaryan, H., 2015. Effect of garlic (*Allium sativum*) and nettle (*Urtica dioica*) on growth performance and hematological parameters of beluga (*Huso huso*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health, 1, 63-69.
 54. Onuegbu Chris, U., Singh, N.B. & Agarwal, A., 2018. Nanoparticles as feed supplement on Growth behavior of cultured catfish (*Clarias gariepinus*) fingerlings. Material Proceedings, 5, 9076–9081..
 55. Ostaszewska, T., Chojnacki, M., Maciej Kamaszewski, M. & Sawosz-Chwalibóg, E. 2016., Histopathological effects of silver and copper nanoparticles on the epidermis, gills, and liver of Siberian sturgeon. Environmental Science and Pollution Research, 23(2), 1621–1633.
 56. Pascual. P., Pedrajas. J.R., Toribio. F., Lopez-Barea. J., Peinado. J., 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). Chemico-Biological Interactions, 145, 191-199.
 57. Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. Aquaculture, 111, 51-63.
 58. Prochorov, A.M., Pavlov, G.V., Godwin, A.C. & Okpattah, K.A.V., 2011. The effect of Nano-disperse iron on the biological parameters of fish. In: An abstract in 10th

- freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post-larvae. International Journal of Fisheries Aquatic Studies, 4, 170-182.
52. Wiegertjes, G.F., Stet, R.J.M., Parmentier, H.K. & Van Muiswinkel, and W.B., 1996. Immunogenetics of disease resistance in fish; a comparative approach. Developmental and Comparative Immunology, 20 (6), 365-381.
 53. Witeska, M., 2013. Erythrocytes in teleost fishes: a review, Zoology and Ecology. 23(4), 1-7.
 54. Zaghloul K.H., Omar W.A., Abo-Hegab, S., 2006. Toxicity specificity of copper in some freshwater fishes.
 55. Zar, J.H., 2007. Bio statistical analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 662 pp.
 - Aeromonas salmonicida* by rainbow trout macrophages. Fish & Shellfish Immunology, 3, 119-129.
 49. Shen, C.C., Wang, C.C., Liao, M.H. & Jan, T.R., 2011. A single exposure to iron oxide nanoparticles attenuates antigen-specific antibody production and T-cell reactivity in ovalbumin-sensitized BALB/c mice. International Journal of Nanomedicine. 6, 1229-1235.
 50. Singha, S., Das, K., Jha, N., 2017. Nano-Systems for Micro-Nutrient Delivery in Aquaculture: A Critical Analysis, Annals of Aquaculture and Research, 4(4), 1046.
 51. Srinivasan, V., Saravana Bhavan, P., Rajkumar G., Satgurunathan, T. & Muralisankar, T., 2016. Effects of dietary iron oxide nanoparticles on the growth performance, biochemical constituents and physiological stress responses of the giant