اثرات نانو ذره آهن بر عملکرد رشد، بقاء، برخی فاکتورهای خونی - ایمنی و بافت کبد بچه‌ماهی ازون‌برون (*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 دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۴/۵

چکیده

هدف تحقیق حاضر، تعیین اثرات نانو ذره آهن بر عملکرد رشد، بقاء، بافت‌شناسی کبد و برخی پارامترهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی 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 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا) به مدت ۸ هفته غذادهی شدند. براساس نتایج، تفاوت معنی‌داری در افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، حجم متوسط هموگلوبین (MCV)، وزن متوسط هموگلوبین (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین (MCHC)، ائوزینوفیل، مونوسیت، آلبومین، آلانین آمینو ترنسفراز (ALT)، آسپارات آمینو ترنسفراز (AST)، و فعالیت لیزوزیمی بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵). ماهیان تغذیه نموده از ۵۰ میلیگرم نانو ذره آهن تفاوت معنی‌داری از لحاظ تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، نوتروفیل، پروتئین کل، انفجار تنفسی و سطح ایمنوگلوبین کل خون نشان دادند (P <۰/۰۵) 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 میلی‌گرم به ترتیب برابر با ۸۶/۱۱، ۹۴/۴، 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 میلی‌گرم بر کیلوگرم سبب بهبود سلامت و بقای بچه‌ماهیان ازون‌برون شده، و اثر منفی بر کبد ماهی ازون‌برون نداشت.

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

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

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

مقدمه

ماهیان خاویاری از خانواده تاس‌ماهیان (Acipenseridae)، از جمله گونه‌های آبزی با ارزشی هستند که حدود ۹۳ درصد از جمعیت آن ها، 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 مکمل های 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 زمانی‌که 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 آبزی‌پروری استفاده می‌شوند و معمولاً از یک فلز و یا اکسید فلزات و یا ترکیب چند فلز می باشد (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 تامین 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 کم-خونی 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

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

مثبت نانو ذرات آهن بر فاکتورهای خونی، عملکرد رشد و پاسخ ایمنی ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*) گربه ماهی پرورشی (*Clarias gariepinus*)، تیلاپیای 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 ازون‌برون 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 ازون‌برون که گونه‌ای پرورشی با ارزش تجاری زیاد در ایران است، پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

مجموعاً ۱۴۴ قطعه بچه‌ماهی ازون‌برون 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 تیماربندی گردیدند. ۱۲ قطعه ماهی در ۱۲ ونیروی ۲۰۰۰ لیتری تقسیم شدند بطوریکه هر تیمار دارای ۳ تکرار بود. ماهیان در دوران سازگاری با غذای پایه (بیومار، فرانسه، 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 اندازه‌گیری شدند و مقادیر دمای آب، اکسیژن محلول، pH و شوری به ترتیب برابر با ۰/۷۱ ± °C ۲۵/۱۹، ۰/۵۷mg/l ± ۵/۹۸ ، ۰/۰۶ ± ۷/۴۹ و ۱/۷ ppt بود.

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 میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا بود. غذا مجدداً به شکل پلت درآمد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، 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 میلی‌گرم، اکسید روی ۷۵ میلی گرم، ید ۱/۸ میلی‌گرم و سولفات مس ۴/۴ میلی‌گرم، پرمیکس مواد معدنی و مکمل‌ها بود. انرژی قابل هضم آن ۴۳۰۰ کیلو کالری بر کیلو گرم بود.

جهت تعیین عملکرد رشد و بقای بچه‌ماهی 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 فرمول‌های 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. خون‌گیری از سیاهرگ دمی و با استفاده از

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

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 غیرهپارینه 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)، MCV ، MCH، MCHC، (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 (AST و ALT) 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 الایزا (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 آماده سازی شده، قالب‌گیری شدند و برش‌هایی با ضخامت ۷ – ۵ میکرومتر از آن ها 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 بقاء در بین تیمارها مشاهده نشد اما با افزایش مقدار نانو آهن مصرفی، مقدار عددی ضریب رشد ویژه، درصد افزایش وزن بدن و درصد بقاء، افزایش و مقدار ضریب تبدیل غذایی کاهش یافت (P>۰/۰۵) (جدول ۱). نتایج اندازه‌گیری فاکتورهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی ازون‌برون تغذیه شده 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 دریافت کننده نانو آهن در مقایسه با شاهد است. بطوریکه بیشترین میزان گلبول قرمز در تیمار ۲ مشاهده شد (P<۰/۰۵). مقادیر هماتوکریت و هموگلوبین نیز در تیمارهای ۲ و ۳ به

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

طور معنی‌داری بیشتر از تیمارهای ۱ و شاهد بودند (P<۰/۰۵). همچنین افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درصد نوتروفیل در تیمار ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵). تفاوت معنی‌داری در میزان MCV، MCH، MCHC، درصد لمفوسیت و ائوزینوفیل در بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۲). تفاوت معنی داری در سطوح ALT، AST، آلبومین و فعالیت لیزوزیم در بین تیمارها مشاهده نشد (P>۰/۰۵) اما مقادیر انفجار تنفسی و IgM در تیمار ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۱: فاکتورهای رشد و بقاء بچه‌ماهی ازون‌برون 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)	۱۹۳/۳۰ ± ۳۱/۷۳ a	۱۸۰/۶۰ ± ۲۵/۵۴ a	۱۷۶/۰۰ ±۱۴/۲۳a	۱۷۷/۹۰ ± ۴۳/۰۹ a
میانگین وزن نهایی (گرم)	۳۶۷/۵۰ ± ۳۹/۸۸ a	۳۴۸/۰۰ ± ۵۶/۱۳ a	۳۱۶/۵۰ ± ۵۸/۲۲ a	۳۰۶/۵۰ ± ۵۸/۲۲ a
افزایش وزن بدن (گرم)	۱۸۳/۸۰ ± ۴۸/۲۴ a	۱۶۷/۴۰ ± ۶۲/۳۸ a	۱۴۰/۵۰ ± ۶۳/۹۸ a	۱۲۸/۶۰ ± ۶۰/۹۵ a
درصد افزایش وزن بدن (٪)	۹۸/۷۴ ± ۳۵/۲۰ a	۹۶/۴۳ ± ۴۲/۶۷ a	۷۰/۵۲± ۵۲/۶۶ a	۷۷/۴۸ ± ۳۵/۰۳ a
ضریب رشد ویژه (٪)	۱/۱۱ ± ۰/۳۴ a	۱/۰۹ ± ۰/۳۷ a	۰/۹۶ ± ۰/۳۵ a	۰/۹۲ ± ۰/۳۸ a
ضریب تبدیل غذایی	۰/۹ ± ۰/۰۷ a	۱/۰۲ ±۰/۲۱ a	۱/۰۱ ±۰/۲۹ a	۱/۱۹ ± ۰/۱۷ a
درصد بقاء (٪)	۹۷/۲۲	۹۴/۴	۸۶/۱۱	۹۴/۴

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. داده‌های دارای بالانویس متفاوت در یک ردیف، دارای تفاوت معنی‌داری هستند (P<۰/۰۵).

جدول ۲: میانگین فاکتورهای خونی بچه‌ماهی ازون‌برون 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)	۱/۵۲ ± ۰/۰۶ × ۱۰^۶ b	۱/۸۳ ± ۰/۱۰ × ۱۰^۶ c	۱/۳۹ ± ۰/۰۸ × ۱۰^۶ ab	۱/۲۴ ± ۰/۰۷ × ۱۰^۶ a
گلبول سفید ($Cell/mm^3$)	۷۰۸۳/۳۳ ± ۶۴۲/۰۸ ab	۷۷۳۳/۳۳ ± ۴۶۱/۶۳ b	۷۰۵۰/۰۰ ± ۳۶۷/۶۵ ab	۶۰۵۰/۰۰ ± ۱۴۳/۱۷ a
هموگلوبین (g/dl)	۴/۹۳ ± ۰/۱۱ b	۵/۲۶ ± ۰/۲۳ b	۳/۹۶ ± ۰/۳۰ a	۳/۸۶ ± ۰/۱۲ a
هماتوکریت (٪)	۳۱/۱۶ ± ۰/۳۰ b	۳۲/۶۶ ± ۱/۰۲ b	۲۷/۳۳ ± ۱۰/ ۲۸a	۲۴/۳۳ ± ۱/۸۱ a
لنفوسیت (٪)	۸۴/۶۶ ± ۲/۱۵ a	۸۳/۶۶ ± ۲/۸۹ a	۸۶/۱۶ ± ۴/۱۹ a	۹۰/۵۰ ± ۲/۲۳ a
نوتروفیل (٪)	۴/۳۳ ± ۰/۶۱ ab	۵/۸۳ ± ۱/۰۴ b	۴/۱۶ ± ۱/۱۶ ab	۲/۸۳ ± ۰/۷۹ a
ائوزینوفیل (٪)	۱۱/۰۰ ± ۱/۶۱ a	۱۰/۵۰ ± ۳/۰۹ a	۹/۶۶ ± ۴/۶۵ a	۶/۶۶ ± ۲/۱۸ a
(MCV) (فمتولیتر)	۲۰۷/۳۹ ± ۱۰/۶۱ a	۱۷۹/۴۹ ± ۶/۰۹ a	۱۹۸/۰۸ ± ۱۰/ ۶۹ a	۱۹۵/۹۸ ± ۱۲/۶۰ a
(MCH) (پیکوگرم)	۳۲/۷۶ ± ۱/۵۷ a	۲۹/۱۵ ± ۲/۰۰ a	۲۸/۴۷ ± ۱/۷۰ a	۳۱/۴۰ ± ۱/۷۲ a
(MCHC) (٪)	۱۵/۸۳ ± ۰/۳۸ a	۱۶/۲۲ ± ۰/۹۶ a	۱۴/۵۱ ± ۰/۹۰ a	۱۶/۱۸ ± ۰/۹۰ a

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. داده‌های دارای بالانویس متفاوت در یک ردیف، دارای تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

جدول ۳: میانگین فاکتورهای سرمی و ایمنی بچه‌ماهی ازون‌برون پس از ۶۰ روز تغذیه با جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت نانو آهن

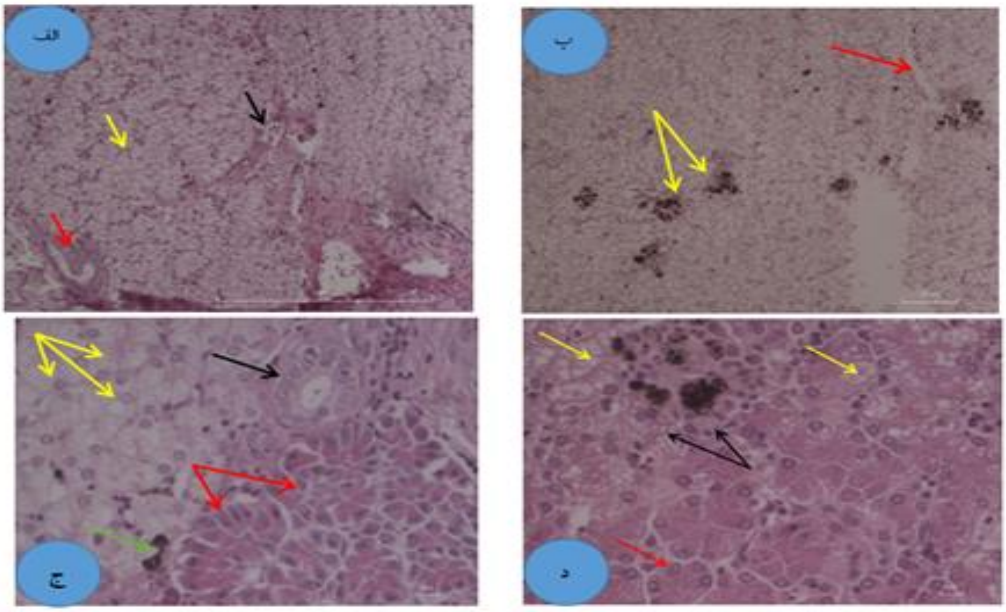
تیمار / شاخص	۱۰۰ mg/Kg	۵۰ mg/Kg	۲۵ mg/Kg	شاهد
پروتئین کل (gdL^{-1})	۴/۱۶ ± ۰/۲۹[a]	۵/۷۰ ± ۰/۵۶[b]	۳/۳۵ ± ۰/۳۳[a]	۳/۳۵ ± ۰/۲۳[a]
آلبومین (gdL^{-1})	۱/۳۶ ± ۰/۶۱[a]	۱/۵۰ ± ۰/۰۷[a]	۱/۳۵ ± ۰/۲[a]	۱/۴۰ ± ۰/۰۶[a]
AST (U/L)	۲۸۳/۴۰ ± ۲۱/۱۳[a]	۲۵۲/۳۵ ± ۱۶/۶۹[a]	۲۹۹/۳۸ ± ۳۰/۰۱[a]	۳۰۰/۳۳ ± ۱۴/۲۰[a]
ALT (U/L)	۱۰/۰۱ ± ۱/۲۰[a]	۸/۸۶ ± ۱/۰۷[a]	[a]۱۱/۲۶ ± ۱/۰۳	۱۰/۳۱ ± ۰/۵۱[a]
IgM ($mgmL^{-1}$)	۱۱۹/۹۱ ± ۱۵/۳۲[ab]	۱۶۸/۳۱ ± ۱۵/۰۵[b]	۱۳۴/۸۸ ± ۱۸/۹[ab]	۱۱۲/۲۳ ± ۱۹/۱۳[a]
لیزوزیم (μgmL^{-1})	۲/۷۱ ± ۰/۴۲[a]	۱/۶۶ ± ۰/۲۳[a]	۲/۴۱ ± ۰/۳۸[a]	۲/۴۰ ± ۰/۴۹[a]
انفجار تنفسی ($RLUs^{-1}$)	۵۲۰/۳۶ ± ۳۲/۲[ab]	۵۵۱/۲۳ ± ۳۸/۶۵[b]	۴۷۸/۸۵ ± ۲۰/۰۹[ab]	۴۵۰/۴۶ ± ۲۸/۲۴[a]
گلوکز (gdL^{-1})	۶۷/۴۸ ± ۱۰/۲۷[ab]	۴۹/۰۶ ± ۶/۰۸[a]	۷۰/۵۵ ± ۴/۸۷[ab]	۷۵/۰۸ ± ۵/۹۱[b]
کورتیزول (μgdL^{-1})	۶/۲۳ ± ۱/۱۰[bc]	۳/۹۳ ± ۰/۴۱[a]	۵/۰۶ ± ۰/۴۷[ab]	۷/۸۵ ± ۰/۳۵[c]

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. داده‌های دارای بالانویس متفاوت در یک ردیف، دارای تفاوت معنی‌داری هستند ($P<۰/۰۵$).

تصویر بافت‌های کبدی تهیه شده از ماهیان تیمارهای مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. سلول های کبدی در همه تیمارها مشابه بودند و حالت غیرطبیعی در آن ها مشاهده نشد. با این حال، نکروز خفیفی به دلیل دژنراسیون چربی در برخی قسمت‌های کبد مشاهده شد. سیتوپلاسم سلول های 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 (شکل۱).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]



شکل ۱: کبد بچه‌ماهی ازون‌برون. الف) تجمع چربی در سیتوپلاسم (فلش‌های زرد)، مجرای صفراوی سالم (فلش قرمز) و مجرای عروقی بدون خونریزی (فلش مشکی) در ماهیان تیمار شاهد پس از ۶۰ روز. مقیاس = mm ۱، بزرگنمایی X۱۰. ب) نمایی از سلول های کبدی با تجمع چربی در سیتوپلاسم و تجمع مراکز MMC (فلش‌های زرد) و مجرای عروقی بدون خونریزی (فلش قرمز). در ماهیان تیمار ۱، پس از ۶۰ روز. مقیاس = µm ۱۰۰، بزرگنمایی X۱۰. ج) نمایی از سلول های کبدی با تجمع چربی در سیتوپلاسم (فلش‌های زرد)، بافت پانکراس (فلش‌های قرمز)، مجرای صفراوی سالم (فلش سیاه)، تجمع رنگدانه ملانین (فلش سبز) در ماهیان تیمار ۲، پس از ۶۰ روز. مقیاس = µm ۱۰، بزرگنمایی X ۴۰. د) نمایی از سلول های کبدی با تجمع چربی در سیتوپلاسم (فلش‌های زرد)، سلول های کبدی سالم (فلش‌های قرمز)، تجمع رنگدانه ملانین (فلش سیاه). در ماهیان تیمار ۳، پس از ۶۰ روز. مقیاس = µm ۱۰، 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 کم‌نظیری 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 شاخص‌های رشد تفاوت معنی‌داری بین گروه‌های تیمار و شاهد مشاهده نشد. ولی به نظر می‌رسد شاخص‌های رشد در گروه-های تیمار از شرایط بهتری نسبت به شاهد برخوردار بوده‌اند. همچنین در شاخص‌هایی چون افزایش وزن، درصد افزایش وزن و ضریب رشد ویژه، تیمار۳ نسبت به سایر تیمارها از افزایش عددی بیشتری برخوردار بوده است. میزان ضریب تبدیل غذایی در این تیمار نسبت به سایر گروه‌ها 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*)، (*Cyprinus carpio*)، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*)، کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) و قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مشخص شد که افزودن نانو ذره آهن به غذا سبب بهبود معنی‌دار عملکرد رشد در مقایسه با شاهد می‌گردد (Akter *et al.*, 2018; Behera *et al.*, 2014; El-shenawy *et*

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

al., 2019; قلی‌زاده اصل و همکاران، ۱۳۹۶؛ قبادی و همکاران، ۱۳۹۲). به نظر می‌رسد عنصر آهن با بهبود در تنفس سلولی و به دنبال آن بهبود عملکرد متابولیسم می‌تواند موجب بهبود شاخص‌های 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 ۱۰mg/kg، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ نانوذره آهن بر درصد بازماندگی گربه ماهی رونده (Akter *et al.*, 2018)، تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان نداد و بازماندگی در تمام گروه‌ها ۱۰۰٪ بود. لیکن مطالعات El-Shenawو همکاران (۲۰۱۹)، نشان داد استفاده از دوزهای ۶۳/۷۵ و ۴۲/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره تیلاپیای 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 ۲ppm، 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 شاخص‌های مهم در رابطه با اثر ترکیبات نانو ذره فلزی است که بصورت مکمل خوراکی در آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرند. 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 ویژه‌ای 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 معنی‌داری نسبت به شاهد و حتی دیگر تیمارها برخوردار بوده است. مشابه این مطالعه، گزارشاتی از بهبود شاخص‌های خونی در پی استفاده از نانو ذره آهن در ماهی کپور بزرگ هندی (Behera *et al.*, 2014)، قزل‌آلای رنگین کمان (Carriquiriborde *et al.*, 2004) ، بچه‌ماهی انگشت‌قد گربه ماهی پرورشی (*Clarias gariepinus*) (Chris *et al.*, 2017) ، بچه ماهی انگشت قد کپور معمولی (قلی‌زاده اصل و همکاران ۱۳۹۶) و تاس‌ماهی استرلیاد (*Acipenser nudiventris*) (Hosseini *et al.*, 2019) ارائه شده است. هر چند طی تحقیقاتی نیز تغییری در شاخص‌های خونی ماهی تیلاپیای 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 می‌تواند 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 نشان‌دهنده 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 خون‌سازی ماهیان نقش بسیار مهمی دارد و کمبود آهن در ماهیان موجب بروز کم خونی میکروسیتیک هیپوکرومیک می‌گردد. در واقع دریافت آهن (بصورت ترکیب معدنی و نانوذره) موجب بهبود

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

روند خونسازی (اریتروپویزس) فاکتورهای خونی در ماهیان می‌شود (Chu *et al.*, 2007).

سیستم ایمنی مهم‌ترین سد دفاعی ماهیان در برابر عوامل بیماری‌زا است و امروزه مطالعات زیادی در خصوص ارزیابی عملکرد این سیستم و اندازه‌گیری شاخص‌های آن به عنوان ابزار تعیین سلامت در ماهیان صورت گرفته است (Mogensen, 2009). مطالعات نشان داده است که نانو ذره‌های فلزی می‌توانند با تأثیر بر سیستم ایمنی و بهبود شاخص‌های آن موجب افزایش مقاومت حیوانات مختلف در برابر بیماری‌ها شوند (Luoi monfared *et al.*, 2015). در نتایج این تحقیق مشخص شد که تعداد گلبول‌های سفید، درصد نوتروفیل، IgM و تولید رادیکال آزاد اکسیژن بطور معنی‌داری در تیمار ۲ در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری 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 گلبول‌های سفید خون می‌توان 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 افزایش‌دهنده تعداد گلبول سفید خون بود. بطوریکه مطالعات Behera و همکاران(۲۰۱۴)، نشان داد تعداد گلبول‌های سفید با استفاده از نانو ذره آهن در ماهی کپور بزرگ هندی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. اما میزان گلوبولین کل (دربرگیرنده ایمونوگلوبولین‌ها و از جمله IgM تام سرم)، تولید رادیکال آزاد اکسیژن، فعالیت ضدباکتریایی سرم و فعالیت کمپلمان بطور معنی‌داری 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 گلبول‌های سفید نداشت. ولی سبب شد تا میزان گلوبولین کل بطور معنی‌داری در مقایسه با شاهد افزایش یابد. تولید رادیکال آزاد اکسیژن توسط نوتروفیل‌های خون ناشی از واکنش‌های انجام شده طی انفجار تنفسی، پدیده‌ای مهم در مسیر ازبین بردن باکتریها در بدن ماهی است (Sharp and Secombes, 1992 & 1993). مطالعات نشان داده است که نانو ذرات آهن می‌توانند واکنش‌های ایمنی بین آنتی ژن – آنتی‌بادی را اصلاح کرده و موجب افزایش تولید آنتی-بادی شوند. همچنین نانو ذره آهن می‌تواند سبب افزایش عملکرد لنفوسیت‌های T شود (Shen *et al.*, 2011). با توجه به مطالب گفته شده، افزایش تولید IgM تام سرم در این مطالعه را می‌توان توجیه نمود. در خصوص تغییرات تعداد گلبول‌های 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 مکمل‌های مؤثر بر شاخص‌های خونی و ایمنی اثرگذار باشد. در این بررسی افزایش میزان تولید رادیکال آزاد اکسیژن مشاهده شد. این موضوع از یک سو می‌تواند مربوط به افزایش تعداد نوتروفیل و از سوی دیگر تاثیر نانوذره آهن بر نوتروفیل‌ها باشد. باید توجه داشت که کمبود آهن موجب کاهش فعالیت میلوپراکسیداز، قابلیت ضدمیکروبی سرم، فعالیت نوتروفیل‌ها و میزان بیگانه‌خواری آن ها می‌شود (Behera *et al.*, 2014). براساس نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه به نظر می‌رسد استفاده از نانو ذره آهن به عنوان یک مکمل ایمنی در ماهیان پرورشی در کشور می‌تواند مطرح و قابل ترویج باشد.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

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 معنی‌داری کمتر از شاهد و سایر تیمارها بود. ولی میزان پروتئین تام بطور معنی‌داری 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 معنی‌داری داشته است. نتایج مطالعه El-Shenawy و همکاران (۲۰۱۹)، در تجویز نانو ذره آهن به تیلاپیای 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 معنی‌دار بود. همچنین میزان پروتئین تام سرم در دوزهای ۶۳/۷۵ و ۴۲/۵ میلی‌گرم بطور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. پروتئین تام سرم شامل آلبومین و گلبولین است. گلبولین خود متشکل از آلفا۱، آلفا۲، بتا و گاما گلبولین‌ها است که خود گاماگلبولین 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). پپتیدهای مختلفی مانند لیزوزیم‌ها در سرم برای جلوگیری از تشکلیل کلنی توسط میکروارگانیسم‌ها وجود دارند و به عنوان اولین خط دفاع در ماهی عمل می‌کنند. این پپتید یک عنصر دفاعی است، که باعث لیز شدن باکتری‌های گرم مثبت و برخی باکتری‌های گرم منفی و فعال‌شدن فاگوسیت‌ها می‌شود (Saurabh and Sahoo, 2008). در مطالعه حاضر، فعالیت لیزوزیم بچه‌ماهیان خاویاری پس از تغذیه با دوزهای مختلف نانو آهن تغییر معنی‌داری 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 این ها 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 پایین‌ماندن 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 معنی‌دار در میزان ALTوAST ماهیان تیمارها و گروه شاهد، دلیل دیگری بر این ادعاست. برخلاف نتایج بدست‌آمده در این مطالعه، میزان آنزیم‌های ALT و AST در مطالعه Akter و همکاران (۲۰۱۸)، تابعی از افزایش دوز نانوذره آهن

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

بود. بطوریکه در دوزهای بالاتر بطور معنی‌داری بیشتر از شاهد و دوزهای کمتر بودند. آنزیم‌های ALT و AST دو آنزیم مهم نشان دهنده بروز آسیب کبدی است که می‌تواند ناشی از عفونت، مسمومیت ویا هر نوع آسیب دیدگی باشد (Pascual *et al.*, 2003). گاهی استفاده از نانو ذرات فلزی می‌تواند سبب آسیب کبدی شده و موجب افزایش این دو آنزیم گردد. Zaghloul و همکاران (۲۰۰۶) ، نشان‌دادن استفاده از نانوذره مس در ماهی *Clarias gariepinus* موجب مسمومیت کبدی و افزایش دو آنزیم ALT و AST می‌شود. براساس نتایج این بررسی به نظر نمی‌رسد دوزهای مصرفی نانو ذره آهن موجب آسیب دیدگی در بافت کبد شده باشند. با بررسی بافت‌شناسی کبد نیز مشخص گردید که سلول های کبدی کاملاً یک دست و بدون هرگونه اختلال و بی‌نظمی سلولی بودند. تنها با افزایش دوز نانو ذره آهن رنگدانه ملانین و مراکز ملانوماکروفاژ (MMC) افزایش داشت. در خصوص اثرات نانو ذرات بر اندام‌های داخلی ماهیان خاویاری مطالعات اندکی وجود دارد. در ارزیابی اثرات این ترکیبات دوزهای مختلف نانو ذره مس و نقره بر کبد ماهی خاویاری سیبری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که این ترکیبات موجب عوارضی چون افزایش حضور سلول های کوپفر، کاریوپیکنوزیس و اجسام ائوزینوفیلیک (نشان‌دهنده دژنراسیون سلول های کبد)، اتساع فضای سینوزوئیدی، نفوذ سلول های خونی در عروق (پر خونی کبد)، بروز واکوئلاسیون و چروک‌شدن در سلول های کبدی می‌شود. افزایش بروز ضایعات با افزایش دوز نانوذرات فلزی در این بررسی همراه بود (Ostaszewska *et al.*, 2016). نتایج بیوشیمیایی خون حاصل از اندازه‌گیری میزان ALT و AST در کنار یافته‌های بافت‌شناسی نشان می‌دهد که دوز نانوذره آهن استفاده شده در این مطالعه فاقد اثرات سمی بر کبد بوده است. در رابطه با مشاهده تجمع رنگدانه‌ها ملانین و مراکز MMC در تیمارهای با دوز بیشتر نانو ذره آهن باید بیان نمود که گلبول‌های قرمز پس از پیر شدن، در بدن منهدم می‌شوند و مهم‌ترین محل تخریب آن بافت کبد است (Morera and MacKenzie, 2011). بعد از تخریب گلبول‌های قرمز در کبد، بقایای سلولی آن ها بصورت تجمع رنگدانه-های ملانین در بافت کبد تجمع یافته و بتدریج از بین می‌روند (Witeska, 2013). با توجه به افزایش میزان گلبول‌های قرمز در این مطالعه در کنار افزایش دوز نانو ذره آهن، به نظر می‌رسد تخریب گلبولی از حجم بیشتری برخوردار بوده و تجمع رنگدانه‌ها 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 سایز سلول های کبدی و هیپرتروفی آن ها و کاهش میزان گلیکوژن در سیتوپلاسم سلول های کبدی مشاهده می‌شود. باتوجه به نتایج و مقایسه آن با نتایج دیگر محققین به نظر میرسد دوزهای استفاده شده در این مطالعه عوارض آسیب‌شناختی بر کبد ماهیان نداشته‌اند.

بطور کلی نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که افزودن نانو آهن به میزان ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا، سبب بهبود برخی پارامترهای خونی و ایمنی بچه‌ماهی ازون‌برون گردید. و هر چند تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد و بقاء نداشت، اما از لحاظ عددی سبب بهبود عملکرد رشد گردید. پیشنهاد

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

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

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم 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. تاثیر سطوح مختلف پری بیوتیک A-MAX بر شاخص های رشد، بازماندگی و ترکیبات لاشه در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۱(۱)، ۶۳- ۷۵.

۲. صالحی میر، و.، سوداگر، م.، ذکریایی، ح. و دادگر، ش.، ۱۳۹۶. تاثیر عصاره ماهیان کاراس (*Carasius ausatus*) و کلمه (*Rutilus rutilus*) بر شاخص های رشد بچه فیل ماهیان پرورشی (*Huso huso*). مجله توسعه آبزی پروری، ۱۱(۲)، ۶۹-۷۸.

۳. علیزاده نوذری، 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 ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری، ۱ (۱)، ۸۲ – ۶۷

۵. قلی‌زاده 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.,

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

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 Muisvinkel, 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 different levels of iron sulfate on some haematological parameters of ship sturgeon, *Acipenser nudiventris*. 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

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

immune response? Veterinary Research, 42 (1), 89.

31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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..
35. 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.
36. 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.
37. Pickering, A.D., 1993. Growth and stress in fish production. Aquaculture, 111, 51-63.
38. 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 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, iono 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

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]

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

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2023-03-22]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1399.14.4.9.3]