تاثیر مکمل معدنی نانوذره اکسید منگنز بر عملکرد رشد و یاخته‌های خونی بچه‌ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان

(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792)

زهرا محمدی[۱]، هومن رجبی اسلامی[۱*]

*rajani.h@srbiau.ac.ir

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۷۷۵-۱٤٥١٥، تهران، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹٤ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

چکیده

این پژوهش به منظور بررسی کاربرد نانوذره اکسید منگنز (Mn2O3) به عنوان مکمل معدنی غذایی بر شاخص‌های رشد و گلبول‌های قرمز و سفید بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طراحی گردید. تعداد ۴۵۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلا با میانگین وزن اولیه ۹/۱±۰/۳ گرم پس از سازگاری با شرایط استخر به صورت تصادفی در قالب ۵ تیمار هر یک با سه تکرار درون استخرهای جریان باز تقسیم شدند. غذای پایه به عنوان تیمار شاهد بدون افزودن مکمل معدنی منگنز آماده گردید. سایر غذاهای آزمایشی با افزودن ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منگنز (به عنوان شاهد مثبت) آماده شدند. ماهیان به مدت ۸ هفته در شرایط آزمایشی با جیره‌های غذایی اختصاصی تغذیه شده و در انتها فاکتورهای رشد همراه با ویژگی‌های اریتروسیتی و لکوسیتی با خونگیری از طریق قطع ساقه دمی تعیین گردید. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، نرخ کارایی پروتئین و همچنین ضریب چاقی ماهیان بین تیمارهای مختلف پژوهش حاضر وجود ندارد. این در حالی است که تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و سطح هماتوکریت ماهیان پس از تغذیه با ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز در جیره به شکل معنی‌داری بیشتر از ماهیان سایر تیمارهای آزمایشی بود ($p<0.05$)؛ ولی تفاوت معنی‌داری در بررسی اندیس‌های گلبول قرمز شامل حجم متوسط گلبولی، مقدار متوسط هموگلوبین گلبولی و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی بین تیمارها به دست نیامد. همچنین اختلاف معنی‌داری در متغیرهای فوق بین ماهیان تغذیه شده با غذای حاوی سولفات منگنز و ماهیان در تیمار شاهد ثبت نشد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نانوذره اکسید منگنز منجر به افزایش شاخص‌های رشد و شاخص‌های خونی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت گردید.

لغات کلیدی : نانوذرات، منگنز، قزل‌آلای رنگین‌کمان، کارایی رشد، یاخته‌های خونی.

*نویسنده مسئول

مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی است که تولید آن کمک شایانی در تامین پروتئین حیوانی مورد نیاز کشورهای در حال توسعه می‌کند. تولید قزل‌آلای رنگین‌کمان در آب‌های شیرین ایران از ۱۳۳۲ تن در سال ۱۹۹۵ به ۱۲۶۵۱۵ تن در سال ۲۰۱۴ میلادی رسیده است (FAO, 2016). چنین پیشرفتی نمی‌توانست بدون تامین غذای مورد نیاز با کیفیت مناسب امکان‌پذیر گردد. بررسی‌ها نشان داده که غذا بیش از ۵۰ درصد هزینه‌های جاری یک مزرعه را به خود اختصاص می‌دهد (Rana & Hasan, 2011). اگرچه ترکیبات غذایی بسیاری از آبزیان پرورشی شناسایی شده، ناتوانی غذای مصنوعی در تامین مقدار مورد نیاز و تعادل بین اجزای غذایی باعث گردیده که همچنان پژوهش در این زمینه ادامه داشته باشد (Prabhu *et al*., 2014). مواد معدنی یکی از اجزای ضروری غذای مصرفی است که نقش موثری در سلامت و بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک ماهیان پرورشی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان دارند (سپهری مقدم، 1390؛ Lovell, 1989؛ Gatlin & Wilson, 1984). با وجود نیاز اساسی جانوران پرورشی به ۲۹ عنصر از ۹۰ عنصر موجود در مواد غذایی (Lall & Milley, 2008)، تنها اثرات تعداد کمی از آن‌ها در ماهیان مورد بررسی کامل قرار گرفته است (Prabhu *et al*., 2014). میزان رشد، کارایی غذایی، نشانه‌های کمبود غذایی، غلظت مواد معدنی در تمام بدن یا در یک بافت مشخص، فعالیت‌های مرتبط با ترشحات آنزیمی، دفع ادراری و حتی بیان ژن‌ها از جمله متغیرهایی بوده‌اند که پاسخ‌های متفاوتی را برای برآورد مقدار صحیح مورد نیاز یک ماده معدنی بین مطالعات مختلف یا حتی درون یک مطالعه نشان داده‌اند (Grosell, 2010؛ Prabhu *et al*., 2014). بنابراین ضروری است که مقدار بهینه یک ماده معدنی با توجه به کارکرد فیزیولوژیک آن مدنظر قرار گیرد (NRC, 2011).

منگنز در بین مواد معدنی به عنوان یک عنصر مهم برای انجام سوخت و ساز معمول و فعالیت‌های فیزیولوژیک ماهیان شامل رشد، تولیدمثل و جلوگیری از تغییرات اسکلتی ضروری است (Hurley & Keen, 1987؛ Lall, 2002). همچنین منگنز به عنوان یک متالوآنزیم و یک فعال‌کننده آنزیمی نقش دارد (Li *et al*., 2005). منگنز یکی از اجزای ضروری آنزیم پیروات کربوکسیلاز بوده و به عنوان یک کوفاکتور در فعالت چندین سیستم آنزیمی مانند سوپر اکسید دیسموتازها ضروری است (Knox *et al*., 1981). همچنین این عنصر در ساختار استخوان‌ها (سنتز میکوپلی‌ساکارید)، احیای سلول‌های خونی و متابولیسم کربوهیدرات‌ها مشارکت اساسی دارد (Tacon, 1987).

اغلب ماهیان قادر به جذب منگنز مورد نیاز از آب نبوده و نیازمند دریافت آن از طریق اجزای جیره می‌باشند (NRC, 2011). از جمله اجزای جیره غذایی ماهی که حاوی منگنز می‌باشد می‌توان به آرد ماهی (Nassiri Moghaddam *et al*., 2007) همراه با کنجاله سویا و ذرت (Batal *et al*., 2010) اشاره نمود. اهمیت جذب منگنز از طریق جیره غذایی توسط پژوهشگران مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است. ماهیانی که از جیره‌های غذایی حاوی مقادیر پایین منگنز تغذیه نموده‌اند، علایم کمبودی همچون افزایش مرگ و میر، کاهش رشد، ضریب تبدیل بالا همراه با سطح پایین این عنصر را در بافت‌هایی نظیر عضلات نشان داده‌اند (Lorentzen *et al*., 2000؛ Pan *et al*., 2008؛ Ye *et al*., 2009). از سوی دیگر مقادیر بالای منگنز در محیط آبی می‌تواند با عوارضی مانند کاهش تعداد گلبول‌های قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت همراه باشد (Sharma & Langer, 2014). بنابراین لازم است مقدار منگنز در محدوده دقیقی برای ماهی تامین گردد تا نیازهای واقعی آبزی را برطرف سازد. مقدار مورد نیاز منگنز بر این اساس در گونه‌های مختلفی از جمله تیلاپیا (Lin *et al*., 2008)، گربه ماهی زرد (Tan *et al*., 2012)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Satoh, 1991)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Lorentzen *et al*., 2000) و سوکلا (Liu *et al*.,

2012) تعیین شده است.

فناوری نانو در قرن جدید منجر به تاثیر عظیمی بر جنبه‌های مختلف زندگی انسان گردیده است. توسعه فن‌آوری نانو طی سالیان اخیر فرصت‌های جدیدی را در جنبه مختلف علوم از جمله آبزی‌پروری عرضه کرده است (Wang *et al*., 2013; Behera *et al*., 2014). نانوذرات بنا به تعریف به ذراتی اطلاق می‌گردد که حداقل یکی از ابعاد آن در محدوده ۱۰۰-۱ نانومتر باشد. استفاده از ذرات در مقیاس نانو موجب افزایش تاثیرگذاری ترکیبات در غلظت‌های پایین‌تر به شکلی می‌گردد که می‌توان از این ویژگی‌ها در زمینه‌هایی نظیر تغذیه، کنترل بیماری‌ها و کاهش اثرات زیست‌محیطی فعالیت‌های مرتبط با آبزی‌پروری استفاده نمود (Zhou *et al*., 2009؛ Behera *et al*., 2014؛ Fenaroli *et al*., 2014؛ Ashouri *et al*., 2015).

خون به عنوان بافتی سیال از مهمترین مایعات زیستی بدن موجودات زنده است که ترکیبات آن تحت تاثیر حالات مختلف فیزیولوژیک و پاتولوژیک دست‌خوش نوسان می‌گردد. لذا بررسی چگونگی تغییرات پارامترهای خونی همواره از ابزارهای مهم برای تشخیص سلامت آبزیان است. شاخص‌های خونی در ماهیان می‌تواند متاثر از مواردی همچون گونه پرورشی، اندازه، سن، وضعیت فیزیولوژیک، شرایط محیطی و رژیم غذایی باشد (Affonso *et al*., 2002; Ballarin *et al*., 2004). با توجه به تاثیر منگنز بر رشد و ویژگی‌های خونی (Knox *et al*., 1981؛ Garg *et al*., 1989؛ Sharma & Langer, 2014)، پژوهش حاضر انجام پذیرفت تا اثر نانوذرات اکسید منگنز را بر شاخص‌های رشد و یاخته‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جیره غذایی

نانوذره اکسید منگنز مورد استفاده در این پژوهش با فرمول شیمیایی Mn_2O_3 از شرکت پیشگامان نانو مواد ایرانیان تهیه گردید (جدول ۱).

جدول ۱:ویژگی‌های نانوذرات اکسید منگنز مورد استفاده در این پژوهش (بر اساس اطلاعات ارائه شده از طرف فروشنده).

فرمول شیمیایی	اندازه	سطح ویژه	میزان خلوص	شکل ظاهری	چگالی
Mn_2O_3	۳۰ نانومتر	۱۵۰ گرم بر میلی‌متر مربع	۹۹/۲ درصد	پودر قهوه‌ای تیره نامحلول در آب	۰/۳۵ گرم بر سانتی متر مکعب

جیره غذایی پایه به عنوان غذای مصرفی برای تیمار شاهد بر اساس پیشنهاد Hidalgo و همکاران (۲۰۰۲) مطابق جدول ۲ تهیه گردید. تیمارهای آزمایشی با افزودن معادل ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم جرم ملکولی منگنز به شکل نانوذره اکسید منگنز (MnO) در جیره غذایی شاهد آماده گردیدند. جیره غذایی دیگری نیز با افزودن معادل ۱۲ میلی‌گرم در هر کیلوگرم جرم ملکولی منگنز به شکل سولفات منگنز ($MnSO_4$) گرانول تحت عنوان تیمار شاهد مثبت آماده گردید. سولفات منگنز یک مکمل معمول برای تأمین این عنصر در جیره ها محسوب می‌شود. اکسید منگنز نیز مکملی ارزان‌تر برای تامین منگنز بوده که در مقایسه با سولفات منگنز ۳۳ درصد، دسترسی زیستی کم تری دارد (Lovell, 1989).

اجزاء مورد استفاده در این جیره غذایی از شرکت خوراک دام و طیور سنندج، تهیه و طی دوره آزمایش در یک انبار خنک به دور از نور خورشید نگهداری شدند. اجزای مایع جیره غذایی نیز به منظور محافظت از تغییرات احتمالی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. اجزاء خشک جیره غذایی پیش از ترکیب به خوبی آسیاب شده و پس از توزین به صورت دستی با یکدیگر

مخلوط شدند. نانوذرات مورد نیاز برای هر آزمایش همراه با دیگر اجزای مکمل معدنی ابتدا به روغن ماهی اضافه و هم زده شدند تا مخلوط یکنواختی به دست آید. سپس این مخلوط همراه با مقداری آب به اجزای خشک جیره‌های آزمایشی اضافه گردید تا خمیر یکنواختی به دست آید. خمیر حاصله در ادامه با کمک چرخ گوشت به صورت رشته‌هایی با قطر ۰/۵ میلی‌متر در آمد تا پس از خشک شدن در مجاورت هوای آزاد به مدت ۲۴ ساعت به پلت‌هایی متناسب با اندازه دهان ماهیان تبدیل گردند. غذای آماده شده تا زمان شروع آزمایش داخل کیسه‌های نایلونی در دمای ۲۰- درجه نگداری شد. مقدار مواد مغذی موجود در جیره شامل چربی، پروتئین، خاکستر و رطوبت به ترتیب با استفاده روش سوکسله، روش کجلدال، کوره الکتریکی و آون طبق روش‌های استاندار AOAC محاسبه گردیدند (AOAC, 2000). مقدار منگنز موجود در هر جیره نیز در انتها با کمک دستگاه روش جذب اتمی شعله (AA-6800; Shimadzu, Kyoto, Japan) محاسبه گردید که مقدار آن به ترتیب برابر ۴/۹ (برای تیمار شاهد)، ۷/۸ (برای تیمار ۴ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز)، ۱۴/۱ (برای تیمار ۸ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز)، ۱۷/۳ (برای تیمار ۱۲ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز) و ۱۷/۴ (برای تیمار ۱۲ میلی‌گرم سولفات منگنز) میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره غذایی به دست آمد.

جدول ۲. اجزای جیره غذایی مورد استفاده برای بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این پژوهش بر اساس پیشنهاد Hidalgo و همکاران (۲۰۰۲).

ماده غذایی	درصد
آرد ماهی	۴۸/۰۰
گلوتن ذرت	۱۰/۰۰
آرد سویا	۲۰/۰۰
آرد گندم	۱۳/۹۰
روغن ماهی	۶/۰۰
هم‌بند (آلژینات سدیم)	۱/۰۰
مکمل ویتامینه‡	۱/۰۰
مکمل معدنی†	۰/۱۰
رطوبت (گرم در صد گرم وزن مرطوب)	۱۱
پروتئین (گرم در صد گرم وزن خشک)	۴۶/۰
چربی (گرم در صد گرم وزن خشک)	۱۲/۵
خاکستر (گرم در صد گرم وزن خشک)	۷/۹

‡ مکمل ویتامینه (میلی‌گرم در کیلوگرم غذا به استثنای موارد ذکر شده): دی‌کلسیم پنتوتنات، ۲۶۸۴۰؛ پیریدوکسین (pyridoxine HCl)، ۷۷۰۰؛ ریبوفلاوین، ۱۳۲۰۰؛ نیاسینامید، ۵۵۰۰۰؛ اسید فولیک، ۲۲۰۰؛ تیامین (منونیترات تیامین)، ۸۸۰۰؛ بیوتین، ۸۸؛ ویتامین B_{12}، ۵/۵؛ کمپلکس بی‌سولفات سدیم منادیونی، ۲/۷۵؛ ویتامین E (DL a-tocopherol acetate)، ۸۸۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D_3 (پایدار)، ۱۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین A (vitamin A palmitate پایدار)، ۱۶۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی.

† مکمل معدنی (میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم مکمل معدنی): کربنات کلسیم، ۲/۱؛ فسفات کلسیم، ۷۳/۵؛ اسید سیتریک، ۰/۲۲۷؛ سیترات مس، ۰/۰۴۶؛ سیترات آهن (٪ ۱۷-۱۶ آهن) ۰/۵۵۸؛ اکسید منیزیم، ۲/۵؛ یدید پتاسیم، ۰/۰۰۱؛ فسفات پتاسیم، ۸/۱؛ اکسید پتاسیم، ۶/۸؛ کلرید سدیم، ۳/۰۶؛ فسفات سدیم، ۲/۱۴؛ سیترات روی، ۰/۱۳۳ و سلنیت سدیم که به میزان ۵ میلی‌گرم در کیلوگرم مکمل معدنی اضافه گردید.

دوره تغذیه و پرورش

تعداد ۴۵۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این آزمایش با میانگین وزنی ۹/۱±۰/۳ گرم از مزرعه پرورش ماهی بهادری در منطقه شاهرود تهیه و با استفاده از ماشین حمل ماهیان مجهز به سیستم هوادهی به مزرعه فوقانی، شاهرود انتقال یافتند. ماهیان به مدت ۲ روز پس از رهاسازی در یک استخر کانالی با شرایط کارگاه بدون غذادهی سازگار شده و سپس در بین تیمارهای آزمایشی توزیع گردیدند. آب مورد نیاز از چشمه‌ای با دمای آب ۱۷/۵±۰/۶ درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول ۷/۲±۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر تامین گردید. میزان pH آب برابر ۷/۳۳±۱۴ و هدایت الکتریکی آب نیز معادل ۸۲۱±۱۷ میکروزیمنس بر سانتی‌متر به ثبت رسید.

تعداد ۵ استخر کانالی به ابعاده ۱/۵×۹ متر و دبی ۲ لیتر بر ثانیه با استفاده از توری به منظور ایجاد تکرارهای آزمایشی هر کدام به سه قسمت مساوی تقسیم گردیده و ۳۰ قطعه بچه ماهی در هر تکرار آزمایشی به صورت کاملا تصادفی رها شد. هر سه تکرار آزمایشی به صورت تصادفی انتخاب و به یکی از تیمارهای آزمایشی اختصاص یافت. ماهیان پس از معرفی به تکرارهای آزمایشی با استفاده از غذای پایه (تیمار شاهد) برای مدت دو هفته تا حد سیری غذادهی شدند. هیچ گونه تلفاتی در دوره سازگاری ماهیان مشاهده نگردید. ماهیان پس از طی زمان دو هفته‌ای برای مدت هشت هفته با کمک غذای مربوط به هر یک از تیمارها به میزان ۴ درصد وزن بدن غذادهی شده و فاکتورهای رشد و خون شناسی آنها در پایان هفته هشتم مورد سنجش قرار گرفت.

سنجش فاکتورهای رشد

تمام ماهیان در هر یک از تکرارهای آزمایشی پس از هشت هفته تغذیه با جیره‌های غذایی مربوطه به منظور سنجش شاخص‌های رشد خارج و طول و وزن آنها برای محاسبه افزایش وزن (FW) بر حسب گرم، ضریب رشد ویژه (SGR) بر حسب درصد روزانه، نرخ کارایی پروتئین (PER) بر حسب درصد و شاخص وضعیت (CF) بر حسب گرم بر سانتی‌متر طبق رابطه‌های زیر اندازه‌گیری شد (Sotoudeh *et al*. 2010):

$$WG = FW (g) - IW (g)$$

$$SGR = 100 \times [Ln\ FW (g) - Ln\ FW (g)] \times d^{-1}$$

$$CF = 100 \times FW (g) \times TL (cm)^{-1}$$

$$FCR = FI (g) \times [FW (g) - IW (g)^{-1}$$

$$PER = 100 \times [FW (g) - FW (g)] \times PI (g)^{-1}$$

که در آن FW برابر وزن نهایی، IW برابر وزن اولیه، TL برابر طول نهایی، FI برابر وزن غذای خشک مصرفی و PI برابر وزن خشک پروتئین مصرفی بود.

بررسی فاکتورهای خونی

تعداد ۳ قطعه ماهی از هر تکرار آزمایشی به منظور بررسی فاکتورهای خونی توسط اسانس گل میخک به میزان ۲۵۰ قسمت در میلیون (سلطانی و همکاران،. ۱۳۸۰) بی‌هوش و میزان ۱ میلی‌لیتر از خون آن‌ها پس از قطع ساقه دمی درون لوله‌های درب‌دار پلاستیکی حاوی هپارین ریخته شد (Svobodova *et al*., 1991). لازم به ذکر است که یک نمونه خون ترکیبی (pooled sample) با توجه به حجم خون به دست آمده برای هر یک از تکرارهای آزمایشی به دست آمد. تمام لوله‌ها درون ظروف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و تا شروع بررسی‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

شمارش گلبول‌های قرمز با استفاده از لام نئوبار و محلول hayem انجام گرفت (Blaxhall & Daisley 1973). سنجش هماتوکریت با کمک لوله میکروهماتوکریت برای مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژ عمودی (3-30K, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) انجام گرفت. میزان هماتوکریت در انتها با استفاده از خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری هماتوکریت به صورت درصد تعیین شد (Borges *et al*., 2004).

غلظت هموگلوبین (Hb) بر اساس روش سیانو متهموگلوبین با تعیین عدد جذب نوری

سیانومت‌هموگلوبین در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه طیف‌سنج نوری (UV-2700, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) به دست آمد (Houston, 1990).

اندیس‌های مربوط به فاکتورهای خونی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV) بر اساس فمتولیتر، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) بر حسب پیکوگرم و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (Mean corpuscular MCHC) بر حسب گرم بر دسی‌لیتر طبقمعادله‌های زیر در هر یک از تیمارهای آزمایشی محاسبه گردیدند (طبرستانی، ۱۳۸۴).

$$MCV = \frac{\text{هماتوکریت}}{\text{گلبول قرمز}} \times 10 \qquad MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100 \qquad MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100$$

شمارش گلبول‌های سفید نیز با استفاده از لام نئوبار بعد از رقیق‌سازی خون (رقت ۱:۵۰) توسط محلول Marcano انجام شد (Blaxhall & Daisley, 1973).

تجزیه و تحلیل آماری

تمام متغیرهای مطالعاتی شامل گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و اندیس‌های مربوط به گلبول قرمز به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شدند. مقایسه بین تیمارها به کمک آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و معنی‌داری اختلافات بین تیمارها توسط آزمون LSD تعیین گردید. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها برابر ۵ درصد در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ صورت پذیرفته و نمودارها با کمک نرم‌افزار Sigma Plot ترسیم شدند.

نتایج

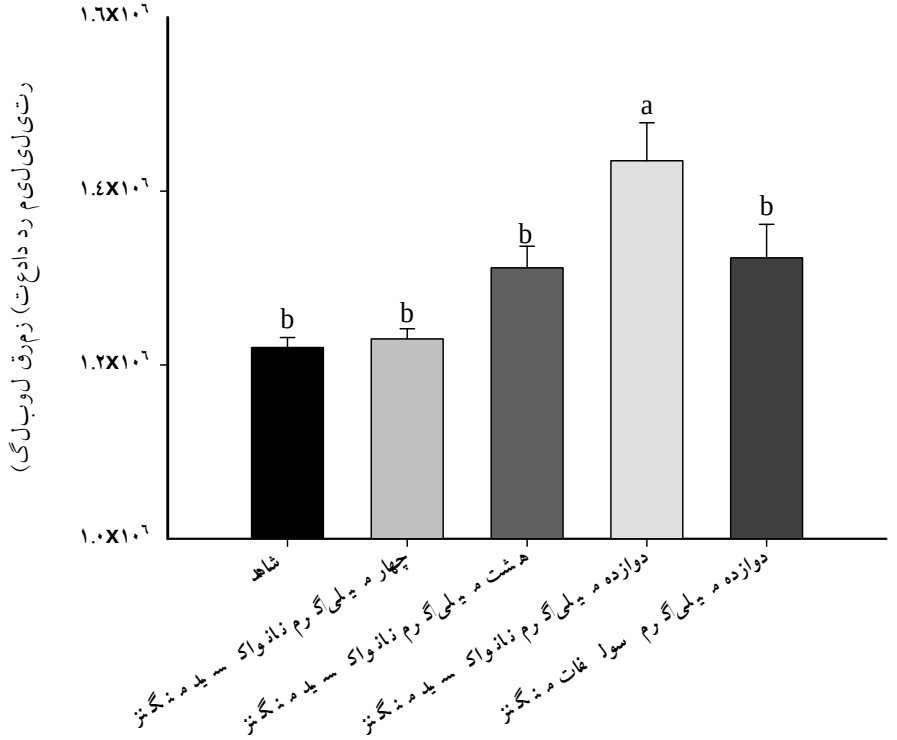
نتایج حاصل از سنجش فاکتورهای رشد در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۳ نشان داده شده است. این یافته‌ها نشان داد که وزن نهایی ماهیان به شکل معنی‌داری ($p>0.05$) تحت تاثیر مقادیر مختلف نانوذره اکسید منگنز و همچنین سولفات منگنز قرار گرفت ($p<0.05$)، به طوری که بیشترین افزایش وزن در ماهیان تغذیه شده با ۸ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز مشاهده شد. همچنین اختلاف معنی‌داری در ضریب رشد ویژه ماهیان تغذیه شده با ۸ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز با ماهیان در تیمار شاهد به دست آمد ($p<0.05$). با این وجود اختلاف معنی‌داری درنرخ کارایی پروتئین و ضریب چاقی بین ماهیان در تیمارهای مختلف غذایی به دست نیامد ($p>0.05$).

جدول ۳ : شاخص‌های رشد (میانگین±انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز (n=90)

	WG♣	SGR†	PER‡	CF♦
شاهد	۲۷/۰۶±۴/۶۲[c]	۱/۶۹±۰/۱۸[d]	۲/۲۵±۰/۰۴	۱/۰۳±۰/۰۱
۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات منگنز	۳۲/۰۸±۴/۶۰[b]	۲/۳۷±۰/۲۹[b]	۲/۲۷±۰/۰۶	۰/۹۴±۰/۰۴
۴ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز	۲۷/۷۶±۴/۷۴[c]	۱/۹۲±۰/۱۵[c]	۲/۲۳±۰/۰۶	۱/۰۷±۰/۰۱
۸ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز	۳۸/۹۳±۴/۳۸[a]	۲/۵۸±۰/۲۰[a]	۲/۲۵±۰/۰۲	۱/۰۰±۰/۰۰
۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز	۲۸/۰۰±۵/۲۸[c]	۲/۱۰±۰/۱۴[c]	۲/۲۹±۰/۰۷	۱/۰۲±۰/۰۱

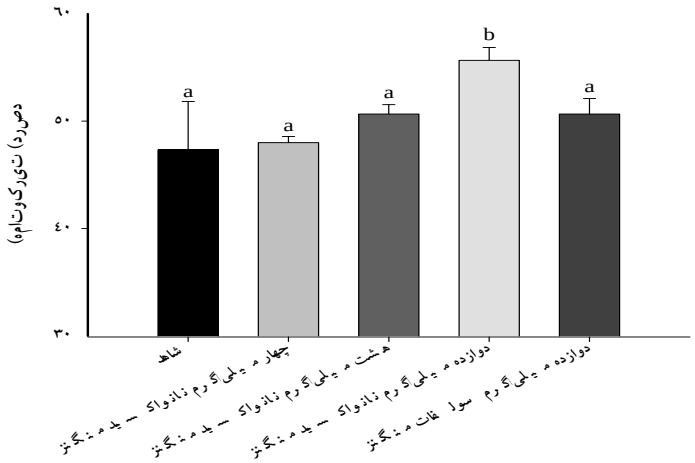
♣ افزایش وزن؛ † ضریب رشد ویژه؛ ‡ نرخ کارایی پروتئین؛ ♦ضریب چاقی

شمارش گلبول‌های قرمز در تیمارهای آزمایشی یک روند افزایشی را با افزودن نانوذرات اکسید منگنز در تیمارهای آزمایشی نشان داد (شکل ۲). تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار ۱۲ میلی‌گرم نانوذرات اکسید منگنز به بیشینه ۴۳۶۸۴±۱۴۳۵۰۰۰ عدد در میلی‌لیتر رسید که به شکل معنی‌داری بیش از سایر تیمارهای آزمایشی بود ($p<0.05$). با این وجود تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز بین تیمار شاهد با تیمارهای حاوی غلظت‌های کمتر نانوذرات اکسید منگنز و تیمار حاوی سولفات منگنز ثبت نگردید ($p>0.05$).

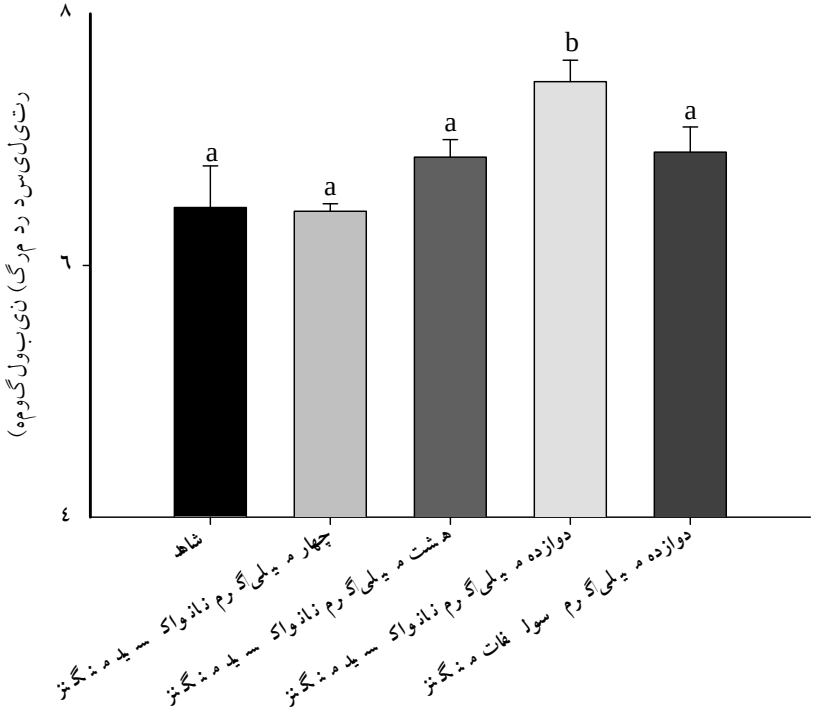


شکل ۲: تغییرات گلبول قرمز (میانگین±انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز و سولفات منگنز (n=9)

بیشترین سطح هماتوکریت نیز با ۱/۲۰±۵۵/۶۶ درصد در خون ماهیان تغذیه شده با ۱۲ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز به دست آمد که به شکل معنی‌داری ($p<0.05$) بیشتر از سایر تیمارهای آزمایشی بود (شکل ۳). با این وجود تفاوت معنی‌دار ($p<0.05$) در میزان هماتوکریت خون ماهیان بین سایر تیمارهای آزمایشی به دست نیامد. الگوی مشابهی نیز در مورد غلظت هموگلوبین خون ماهیان بین تیمارهای مختلف آزمایشی به دست آمد (شکل ۴)، به شکلی که میزان هموگلوبین به تدریج با افزایش غلظت نانوذره اکسید منگنز در تیمارهای آزمایشی افزایش یافته و به حداکثر میزان ۰/۳۰±۷/۴۸ گرم بر دسی لیتر در خون ماهیان تیمار ۱۲ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز در جیره غذایی رسید. کمترین مقدار هموگلوبین نیز با ۰/۲۶±۶/۴۳ گرم بر دسی لیتر در تیمار ۴ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز ثبت گردید که البته اختلاف معنی‌دار با تیمارهای شاهد و ۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز و تیمار ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منگنز در جیره غذایی نداشت ($p>0.05$).



شکل ۳: تغییرات هماتوکریت (میانگین±انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز و سولفات منگنز (n=9)



شکل ۴: تغییرات هموگلوبین (میانگین±انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز و سولفات منگنز (n=9)

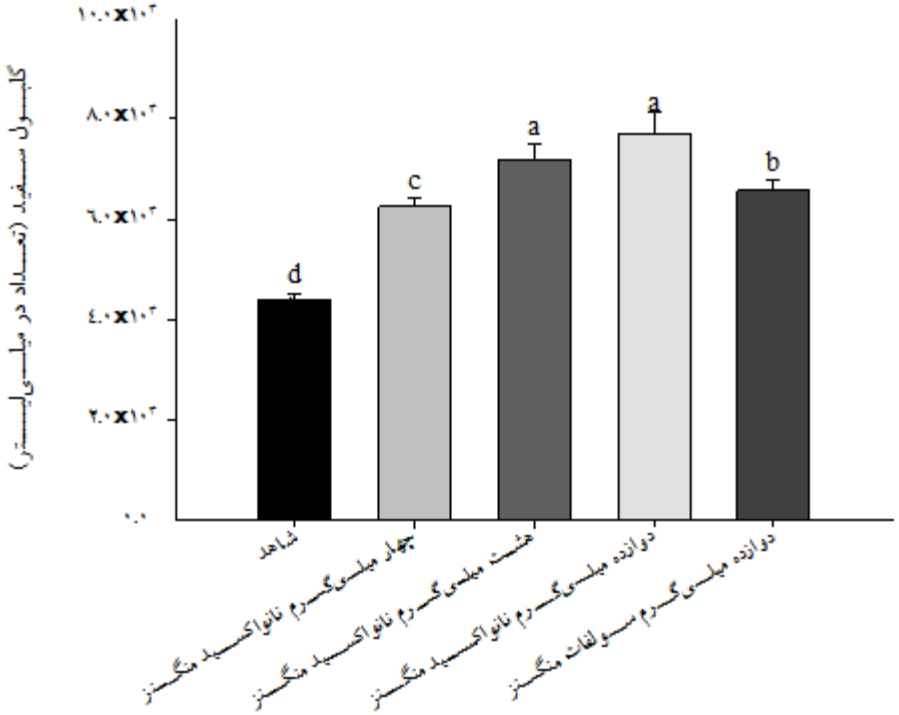
یافته‌های آزمایشی نشان داد که اختلاف معنی‌داری میان هیچ یک از اندیس‌های گلبول قرمز شامل حجم متوسط گلبولی(MCV)، مقدار متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) در تیمارهای آزمایشی وجود نداشت (جدول ۴). بیشترین میزان MCV برابر با ۱/۱۵±۳۹۰/۲۷ فمتولیتر در ماهیان تغذیه شده با ۴ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز در جیره غذایی و کمترین میزان MCV نیز برابر با ۱/۳۳±۳۸۲/۶۴ فمتولیتر در ماهیان تغذیه شده با ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم سولفات منگنز در جیره غذایی به دست آمد، هرچند که اختلاف معنی‌داری بین آنها ثبت نشد ($p>0.05$). همچنین بیشترین و کمترین مقدار MCH نیز به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با ۴ و ۸ میلی‌گرم نانوذرات اکسید منگنز مشاهده شد که در این مورد نیز اختلاف معنی‌داری بین تیمارها به دست نیامد ($p>0.05$). نتایج مشابهی نیز در مورد MCHC حاصل گردید که در این مورد نیز اختلاف معنی‌دار میان تیمارها دیده نشد ($p>0.05$).

جدول ۴: اندیس‌های خونی (میانگین±انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز (n=9)

	MCV♣ (فمتولیتر)	MCH† (پیکوگرم)	MCHC‡ (گرم بر دسی‌لیتر)
شاهد	۳۸۹/۳۰±۱/۲۰	۵۲/۳۳±۲/۹۶	۱۴/۰۰±۱/۱۵
۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم سولفات منگنز	۳۸۲/۶۴±۱/۳۳	۵۱/۶۶±۲/۷۲	۱۴/۰۸±۱/۱۵
۴ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز	۳۹۰/۲۷±۱/۱۵	۴۹/۳۳±۴/۸۴	۱۳/۳۵±۱/۲۰
۸ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز	۳۸۶/۲۹±۰/۵۷	۵۴/۳۱±۱/۸۵	۱۳/۶۴±۰/۸۸
۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز	۳۸۷/۰۵±۳/۳۸	۵۲/۳۲±۱/۷۶	۱۳/۷۳±۰/۳۰

♣ حجم متوسط گلبولی؛ † مقدار متوسط هموگلوبین گلبولی؛ ‡ غلظت هموگلوبین داخل گلبولی

بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار ۱۲ میلی‌گرم نانوذرات اکسید منگنز با میانگین ۴۱۶/۳۳±۷۷۰۰ عدد در میلی‌لیتر مشاهده شد و کمترین میانگین نیز مربوط به تیمار شاهد با ۱۱۶/۶۶ ± ۴۴۰۰/۱۶ عدد در میلی‌لیتر بود (شکل ۵). تعداد گلبول‌های قرمز تیمار ۱۲ و ۸ میلی‌گرم نانوذرات اکسید منگنز اختلاف معنی‌دار با سایر تیمارها داشته هرچند که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. بعلاوه اختلاف معنی‌داری در تعداد لکوسیت‌ها بین تیمار حاوی ۴ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز (۳۳۸/۲۹± ۵۹۶۶/۰۸ عدد در میلی‌لیتر) با تیمار شاهد (۱۱۶/۶۶±۴۴۱۶/۶۷ عدد در میلی‌لیتر) به دست آمد.



شکل ۵: تغییرات گلبول سفید (میانگین±انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز و سولفات منگنز (n=9)

بحث

یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوذره اکسید منگنز بر فاکتورهای رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان تاثیرگذار است. کمترین افزایش وزن و ضریب رشد ویژه در ماهیان تغذیه شده با تیمار شاهد به دست آمد در حالی که افزایش نانوذره اکسید منگنز موجب افزایش معنی‌دار وزن ماهیان گردید ($p<0.05$). این یافته‌ها نشان می‌دهد که منگنز موجود در جیره غذایی پاسخگوی نیاز قزل‌آلای رنگین‌کمان نبوده و نیاز به افزودن آن به صورت مکمل در جیره غذایی خواهد بود. نتایج مشابهی نیز در مورد نیاز ماهی قرمز، *Carassius auratus gibelio* (Pan *et al.*, 2008)، گربه ماهی زرد، *Pelteobagrus fulvidraco* (Tan *et al.*, 2012) و سوکلا، *Rachycentron canadum* (Liu *et al.*, 2008) به منگنز در جیره غذایی به دست آمد. همچنین یافته‌های این آزمایش نشان داد که منگنز به شکل نانوذره در مقدارهای کمتر در مقایسه با سولفات منگنز از تاثیر بیشتری بر افزایش وزن برخوردار است که می‌تواند به دلیل قابلیت جذب بالاتر نانوذرات باشد. میزان ضریب رشد ویژه ماهیان در این پژوهش با کاهش منگنز در جیره غذایی کاهش یافت به طوری که کمترین میزان آن در ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی پایه به دست آمد که هیچ منگنزی به آن افزوده نشده بود.

بیشترین مقدار منگنز خون در گلبول‌های قرمز ذخیره می‌گردد (Baruthio *et al.*, 1988) و بر این اساس تغییرات تعداد این دسته از سلول‌های خونی می‌تواند به عنوان شاخص مناسبی در بررسی کارایی منگنز استفاده شود. با این وجود تحقیقات اندکی در مورد اثرات منگنز به عنوان مکمل در جیره غذایی و تاثیر آن بر شاخص‌های خونی ماهیان صورت گرفته است. یافته‌های Knox و همکاران (۱۹۸۱) نشان داد که افزودن ۳۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم منگنز در جیره غذایی تاثیری بر غلظت هموگلوبین قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد. همچنین Lorentzen و همکاران (۲۰۰۶) مشخص نمودند که

منگنز موجود در جیره غذایی تاثیری بر میزان هموگلوبین و هماتوکریت ماهی آزاد اقیانوس اطلس نمی‌گذارد. با این حال نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن نانوذره اکسید منگنز به جیره غذایی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) تعداد گلبول‌های قرمز، درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین خون می‌گردد، هرچند که این افزایش معنی‌دار تنها در تیمار ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز در جیره غذایی نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید. وجود تفاوت در نتایج حاصل از این پژوهش با پژوهش‌های قبلی را شاید بتوان به ساختار فیزیکی جدید منگنز به شکل نانو نسبت داد. بسیاری از تحقیقات بیانگر بروز ویژگی‌های جدید ترکیبات نانو تحت تاثیر تغییراتی همچون افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه قابلیت تماس بیشتر ذرات نانو است (Shaw & Handy, 2011؛ Rather *et al*., 2011؛ Rai *et al*., 2009).

دلیل دیگر تفاوت‌های موجود را می‌توان در نوع ماده مصرفی دانست. سولفات منگنز معمول‌ترین شکل منگنز به عنوان مکمل معدنی در جیره غذایی ماهیان است (Lorentzen *et al*., 2006). تحقیقات Satoh و همکاران (۱۹۸۷) در مورد اثرات منابع مختلف منگنز در کپور معمولی نشان داد که قابلیت جذب منگز به شکل سولفات و کلراید بیش از کربنات است. Lall و Milley (۲۰۰۲) نیز بیان نمودند که قابلیت استفاده از اکسید منگنز توسط ماهی آزاد اقیانوس اطلس بسیار کم است. این در حالی است که تاثیر اکسید منگنز به شکل نانو حتی در مقادیر کمتر از حد بهینه ارائه شده بر شاخص‌های رشد، هموگلوبین و هماتوکریت قزل‌آلای رنگین‌کمان بیش از سولفات روی است که باید تاثیرگذاری بیشتری داشته باشد. انتظار می‌رود که نانوذره اکسید منگنز به علت اندازه کوچکتر از سرعت یونیزاسیون و جذب بالاتری در دستگاه گوارش قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار بوده (Rather *et al*., 2011) و در نتیجه حتی در مقادیر کمتر نسبت به سولفات منگنز از قابلیت اثرگذاری بالاتری برخوردار باشد.

میزان هموگلوبین و هماتوکریت در شرایط طبیعی تابعی از تغییرات گلبول قرمز بوده و ارتباط مستقیمی با آن دارد. افزایش هموگلوبین منجر به افزایش انتقال گازهای تنفس و بازده قلب شده و می‌تواند در ادامه باعث افزایش رشد ماهیان گردد (گازرانی فراهانی و همکاران، ۱۳۸۸). بنابراین افزایش معنی‌دار ($p<0.05$) هموگلوبین خون بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان همراه با افزایش ضریب رشد ویژه در تیمارهای حاوی ۸ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز در جیره غذایی می‌تواند به معنی قابلیت بالاتر این بچه ماهیان برای استفاده از اکسیژن محلول آب و در نتیجه مقابله با محدودیت‌های احتمالی اکسیژن در آب نسبت به ماهیان در تیمار شاهد باشد. قلب ماهیان استخوانی بیش از ۴/۴ درصد از مجموع انرژی بدن ماهی را مصرف می‌کند (Conte *et al*., 1963). وجود اختلاف معنی‌دار در میزان رشد همراه با تفاوت در تعداد گلبول‌های خونی بیانگر آن است که ماهیان تغذیه شده با نانوذره اکسید منگنز در مقایسه با ماهیان در تیمار شاهد از قابلیت بیشتری برای استفاده انرژی موجود در جیره غذایی برخوردار بودند.

Singh و Sirvastava (۲۰۱۰) اظهار داشتند که تغییر در میزان هموگلوبین می‌تواند به سبب تغییر در تعداد گلبول‌های قرمز باشد. Banaee و همکاران (۲۰۰۸) علاوه بر این بیان کردند که عوامل اثرگذار بر اندازه یا تعداد گلبول‌های قرمز بر میزان هماتوکریت نیز تاثیر می‌گذارند. نتایج این پژوهش نشان داد که همراه با افزایش تعداد گلبول‌های قرمز بر غلظت هموگلوبین نیز افزوده می‌گردد. به عبارت دیگر این افزایش میزان هموگلوبین ناشی از افزایش تعداد گلبول‌های قرمز می‌باشد. بعلاوه افزایش همزمان هماتوکریت و گلبول‌های قرمز در این پژوهش با توجه به عدم تغییر معنی‌دار MCV میان تیمارها حاکی از آن است که تنها تعداد گلبول‌های قرمز افزایش یافته و اندازه آنها ثابت مانده است.

تحقیقاتی نیز در رابطه با اثرات سمی منگنز موجود در محیط پرورشی و تعیین غلظت کشندگی آن در ماهیان صورت گرفته است (Agrawal & Srivastava, 1980؛ Sharma & Langer, 2014). نتایج

پژوهش‌های فوق در مجموع نشان داده کـه مقـادیر بـالای منگنـز موجـود در آب یـا جیـره غـذایی مطـابق انتظـار و همانند اثر مقادیر بالای سایر یون‌های فلـزی دارای اثـرات مخربـی بـر بافـت‌هـا و انـدام‌هـای مختلـف آبزیـان اسـت (Mebane, 2012؛ Ibemenuga, 2013؛ Hoseini *et al*., 2014؛ Thangam *et al*., 2014). یافته‌هـای Sharma و Langer (۲۰۱۴) برای مثـال نشـان داد کـه غلظت‌های کشنده منگنز باعث افزایش چشمگیر MCH و MCV گردیده ولی MCHC از روند ثابتی پیروی نکرده است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میـزان انـدیس‌هـای گلبول‌های قرمز در این پـژوهش بـه معنـی آن اسـت کـه. غلظت منگنز در حدی نیست کـه اثـرات سـمی بـر مـاهی بگذارد.

تعـدادگلبول‌هـای سـفید یکـی از شـاخص‌هـای مهـم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی ماهیان است کـه تحـت تاثیر عوامل مختلفی از جملـه تغذیـه قـرار دارد (گـازرانی فراهانی، ۱۳۸۸). تاکنون اثرات منگنز موجود در جیـره بـر گلبول سفید ماهی مورد بررسی قرار نگرفته است. بـا ایـن وجود نتایج پـژوهش حاضـر حـاکی آز آن بـود کـه تعـداد گلبول‌های سفید نیز با افزایش منگنز جیره افزایش می‌یابد به طوری که بیشترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمار ۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوذرات منگنز مشاهده گردید. لازم به ذکر است که تمام تیمارها نسبت به تیمـار شـاهد رونـد افزایشی در تعداد گلبـول‌هـای سـفید را نشـان دادنـد کـه می‌تواند بیانگر قابلیت بیشتر قزل‌آلای رنگـین‌کمـان بـرای مقابله با عوامل بیماری‌زایی باشد کـه بـه طـور معمـول در شرایط متـراکم پرورشـی وجـود دارنـد (Uribe *et al*., 2011)، هرچند کـه اثبـات دقیـق ایـن موضـوع نیازمنـد تحقیقات تکمیلی در این زمینه است.

یافتـه‌هـای پـژوهش حاضـر نشـان داد کـه اسـتفاده از نانوذرات اکسید منگنز موجب افزایش شاخص‌های مربـوط به گلبوهای قرمز شامل هموگلوبین، هماتوکریـت و تعـداد آنها در قزل‌آلای رنگین‌کمان مـی‌گـردد. همچنـین ارتقـاء سیستم دفاعی ماهی در مقابله با عوامل بیماری‌زا به دنبال افزایش گلبول سفید نیز از دیگر نتایج استفاده از نـانوذرات منگنز در جیره اسـت. افـزایش توانـایی مقابلـه بـا عوامـل بیماری‌زا به دنبال افزایش گلبول‌هـای سـفید تحـت تـاثیر تغذیه با نانوذره اکسید منگنـز در ایـن پـژوهش مـی‌توانـد بسیار حائز اهمیت باشد، چـرا کـه ماهیـان تحـت شـرایط پرورشی در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا آسـیب پـذیر هسـتند (Dixon & Stet, 2001). بـا ایـن وجـود پیشنهاد می‌شود که میزان سایر عـواملی کـه تحـت تـاثیر منگنز قرار دارند نیز (نظیر آنزیم‌های خونی) بررسـی شـود تا بتوان شناخت کامل‌تری از تاثیر نانوذرات اکسید منگنـز در جیره غذایی بر قزل‌آلای رنگین‌کمان به دست آورد.

سپاس و قدردانی

نویسـندگان بـر خـود لازم مـی‌داننـد کـه از جنـاب آقـای مهندس امید فوقانی به دلیل کمک‌های به دریغ ایشـان در بخش میدانی پـژوهش سپاسـگزاری نماینـد. همچنـین از جناب آقای مهندس رضا عصـاره بـه دلیـل همکـاری‌هـای صورت گرفتـه در بخـش آزمایشـگاهی پـژوهش قـدردانی می‌گردد.

منابع

سپهری مقدم، ح.، ۱۳۹۰. جیره نویسی تغذیه آبزیان. انتشارات دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. ۷۶ صفحه.

سلطانی، م.، امیدبیگی ر.، رضوانی، س.، مهرابی، م. و چیت ساز ح.، ۱۳۸۰. مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تحت شرایط کیفی آب. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۵۶(۴): ۸۵-۸۹.

طبرستانی، م.، ۱۳۸۴. خون شناسی پزشکی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران. ۱۰۸۳ صفحه.

گازرانی فراهانی، م.، ۱۳۸۸. بررسی برخی فاکتورهای هماتولوژیک در بعضی ماهیان خانواده Acipenseridae. زیست شناسی جانوری، ۲(۱): ۵۷-۶۱.

Affonso, E.G., Polez, V.L., Correa, C.F.,

Mozan, A.F., Araujo, M.R. and Moraes, G., 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Collosoma macropomum* exposed to solphide or hypoxia. Comprative Biochemistry, Physiology, Toxicology & Pharmacology, 133(3): 375-382.

Agrawal, S.J. and Srivastava, A.K., 1980. Haematological responses in a fresh water fish to experimental manganese poisoning. Toxicology, 17(1): 97-100.

AOAC, 2000. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Gaithersburg, Maryland, USA.

Ashouri, S., Keyvanshokooh, S., Parviz Salati, A., Johari, S.A. and Pasha zanoosi, H., 2015. Effect of different level of dietary selenium nanoparticle on growth performance, muscle composition, blood biochemical profile and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio)*. Aquaculture, 446: 25-29.

Ballarin, L., Dalloro, M., Bertotto, D., Libertini, I., Francescon, A. and Barbaro, A., 2004. Haematological parameters in *Umbrina Cirrosa* (Teleostei, Sciaenidae): a comparison between diploid and triploid specimens. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 138(1): 45-51.

Banaee, M., Mirvagefei, A.R., Rafei, G.R. and Majazi Amiri, B., 2008. Effect of sub-lethal diazinon concentration on blood plasma biochemistry. Environmental Research, 2(2): 189-198.

Baruthio, F., Guillard, O., Arnaud, J., Pierre, F. and Zawislak, R., 1988. Determination of manganese in biological materials by electrothermal atomic absorption spectrometry. Clinical Chemistry, 34(2): 227-234.

Batal, A.B., Dale, N.M. and Saha, U.K., 2010. Mineral composition of corn and soybean meal. The Journal of Applied Poultry Research, 19(4): 361-364.

Behera, T., Swain, P., Rangacharulu, P.V. and Samanta, M. 2014. Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters of fish, *Labeo rohita* H. Applied Nanoscience, 4(6): 687-694.

Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W., 1973. Routine heamatological methods for use fish blood. Journal of Fish Biology, 5; 771- 781.

Borges, A., Scotti, L., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F. and Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for hundia (*Rhamdia quelem*). Fish Physiology and Biochemistry, 30: 21-25.

Conte, F.P., Wagner, H.H. and Harris, T.O., 1963. Measurement of blood volume in the fish (*Salmo gairdneri*). The American Journal of Physiology, 205: 533-540.

Dixon, B. and Stet, R.J.M., 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Developmental and Comparative Immunology, 25(8-9):683-699.

FAO, 2016. National Aquaculture Sector

Overview Fact Sheets. FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 2 May 2016. [Cited 13 May 2016]. http://www.fao.org/fishery/countrysector/naso_iran/en.

Fenaroli, F., Westmoreland, D., Benjaminsen, J., Kolstad, T., Skjeldal, F.M., Meijer, A.H., van der Vaart, M., Ulanova, L., Roos, N., Nyström, B., Hildahl, J. and Griffiths, G., 2014. Nanoparticles as drug delivery system against tuberculosis in zebrafish embryos: direct visualization and treatment. ACS Nano, 8(7): 7014-7026.

Garg, V.K., Garg, S.K. and Tyagi, S.K., 1989. Manganese induced haematological and biochemical anomalies in *Heteropneustes fossilis*. Journal of Environmental Biology, 10(4):349- 353.

Gatlin, D. and Wilson, R., 1984. Studies on the manganese requirement of fingerling channel catfish. Aquaculture, 41(2): 85-92.

Grosell, M., 2010. The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance. Fish Physiology, 30: 135-164.

Hidalgo, M.C., Expósito, A., Palma, J.M. and Dela Higuera, M., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 34(2): 183-193.

Hoseini, S.M., Hedayati, A. and Ghelichpor, M., 2014. Plasma metabolites, ions and thyroid hormones levels, and hepatic enzymes activity in Caspian roach (*Rutilus rutilus caspicus*) exposed to waterborne manganese. Ecotoxicology and Environmental Safety, 107: 84-89.

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, USA. pp 273-334.

Huang, S., Wang, L., Liu, L., Hou, Y. and Li, L., 2015. Nanotechnology in agriculture, livestock, and aquaculture in China, a review. Agronomy for Sustainable Development, 35(2): 369-400.

Hurley, L.S. and Keen, C.L., 1987. Manganese. In: Underwood, E. and Mertz, W., (eds.) Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, New York, USA. pp 185-223.

Ibemenuga, K.N., 2013. Bioaccumulation and toxic effect if some heavy metal in fresh water fishes. Animal Research International, 10(3): 1792- 1798.

Knox, D., Cowey, C.B. and Adron, J.W., 1981. The effect of low dietary manganese intake on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition, 46(3): 495-501.

Lall, S.P., 2002. The minerals. In: Halver, J.E. and Hardy, R.W., (eds.) Fish nutrition. Academic Press, London, UK. pp 259-308.

L**all, S.P. and Milley, J.E., 2008.** Impact of aquaculture on aquatic environment: trace

Determination of chemical composition, mineral contents, and protein quality of Iranian Kilka fish meal. International Journal of Poultry Science, 6(5): 354-361.

NRC, 2011. National Research Council. Nutrient requirements of fish and shrimp. The National Academies Press, Washington D.C., USA.

Pan, L., Zhu, X., Xie, S. and Lei, W., 2008. Effects of dietary manganese on growth and tissue manganese concentrations of juvenile gibel carp, *Carassius auratus gibelio*. Aquaculture Nutrition, 14(5): 459-463.

Prabhu, P.A.J., Schrama, J.W. and Kaushik, S.J., 2014. Mineral requirements of fish, a systematic review. Aquaculture, 6: 1-48.

Rai, M., Yadav, A. and Gade, A., 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. Biotechnology Advances, 27(1): 76-83.

Rana, K.J. and Hasan, M.R., 2011. Impact of rising feed ingredient prices on aquafeeds and aquaculture production. FAO Fisheries and aquaculture Technical Paper 541. Rome, Italy.

Rather, M.A., Sharma, R., Aklakut, M., Ahmad, S., Kumar, M. and Ahmad, N., 2011. Nanotechnology: a novel tool for aquaculture and fisheries development. a prospective mini-review. Aquaculture, 23: 12-15.

Satoh, S.H., Takeuchi, T. and Watanabe, T., 1987. Availability to carp of manganese in white fish meal and of various minerals discharge. In: Schelegel, P., Durosoy, S. and Jongbloed, A.W., (eds) Trace elements in animal production systems. Academic Press. Wageningen, Netherlands. pp 203-214.

Li, S., Luo, X., Lu, L., Cerenshaw, T., Bu, Y. and Liu, B., 2005. Bioavailability of organic manganese sources in broilers fed high dietary calcium. Animal Feed Science and Technology, 123-124(2): 703-715.

Lin, Y.H., Lin, S.M. and Shiau, S.Y., 2008. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus.* Aquaculture, 284: 207-210.

Liu, K., Ai, Q.H., Mai, K.S. and Zhang, W.B., 2012. Dietary manganese requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture Nutrition, 19(4): 461-467.

Lorentzen, M., Maggem, A. and Julshamn, K., 2006. Manganese supplementation of a practical, fish meal based diet for Atlantic salmon parr. Aquaculture Nutrition, 2(2): 121-125.

Lovell, T., 1989. Nutrition and feeding of fish. Business Media. New York, USA.

Mebane, Ch., Dillon, F. and Henessy, D., 2012. Acute toxicity of cadmium, lead, zinc and their mixture to stream resident fish and vertebrate. Environmental Toxicology and Chemistry, 31: 1334-1348.

Nassiri Moghaddam, H., Danesh Masgaran, M., Jahanian Najfabadi, H. and Jahanian Najafabadi, R., 2007.

manganese compounds. Nippon Suisan Gakkaishi, 53: 825-832.

Satoh, S.H., Takeuchi, T. and Watanabe, T., 1991. Availability of manganese and magnesium contained in white fish meal to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Nippon Suisan Gakkaishi, 57(1): 99-104.

Sharma, J. and Langer, S., 2014. Effect of manganese on haematological parameters on fish, *Garra gotyla gotyla*. Journal of Entomology and Zoology Studies, 2(3): 77-81.

Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2011. Physiological effects of nanoparticles on fish: a comparison of nanometals versus metal ions. Enviroment International, 37(6): 1083-1097.

Singh, N.N. and Srivastava, A.K., 2010. Haematological parameters as bioindicators of insecticide exposure in teleosts. Ecotoxicology, 19(5): 838-854.

Svobodova, Z., Pravda, D. and Palackova, J., 1991. Unified methods of hematological examination of fish. Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology. Vodnany, Czech Republic.

Sotoudeh, E., Abedian Kenari, A. and Habibi Rezaei. M., 2010. Growth response, body composition and fatty acid profile of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) juvenile fed diets containing different levels of soybean phosphatidylcholine. Aquaculture International, 19:611-623.

Tacon, A.G.J., 1987. The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp-a training manual, part 1. The Essential Nutrients. FAO. Brasilia, Brazil.

Tan, X.Y., Xie, P., Luo, Z., Lin, H.Z., Zhao, Y.H. and Xi, W.Q., 2012. Dietary manganese requirement of juvenile yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*, and effects on whole body mineral composition and hepatic intermediary metabolism. Aquaculture, 326-329: 68-73.

Thangam, Y., Jayaprakash, S. and Perumayee, M., 2014. Effect of copper toxicity on hematological parameters to fresh water fish *Cyprinus Carpio* (Common Carp). Journal of Environmental Science, Toxicology & Food Technology, 8(9): 50-60.

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. and Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina, 56(10): 486-503.

Wang, Y., Yan, X., and Fu, L., 2013. Effect of selenium nanoparticles with different sizes in primary cultured intestinal epithelial cells of crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. International Journal of Nanomedicine, 8: 4007-4013.

Ye, C.X., Tian, L.X., Yang, H.J., Liang, J.J., Niu, J. and Liu, Y.J., 2009. Growth performance and tissue mineral content of juvenile grouper (*Epinephelus coioides*) fed diets supplemented with various levels of manganese. Aquaculture Nutrition, 15: 608-614.

Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q. and Lim, W.,

2009. Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Aquaculture, 291: 78-81.

Effect of manganese oxide nanoparticle on growth performance and blood cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) fingerlings

Mohammadi Z.[1]; Rajabi Islami H[1]*

*rajabi.h@srbiau.ac.ir

1-Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O. Box: 14515-775, Tehran Iran.

Abstract

This study was aimed to use nano manganese oxide (Mn_2O_3) as a mineral premix on growth parameters followed by the erythrocyte and leukocyte properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. 450 specimens of rainbow trout fingerlings with an average weight of 9.1±0.3 g after acclimation to the experimental condition were randomly distributed in triplicate to five treatments of raceways ponds with open flow. Basal diet as control treatment was prepared by adding no supplemental manganese mineral. Other experimental diets were prepared by adding 4, 8, 12 mg and 12 mg nano manganese oxide followed by 12 mg manganese sulfate (as positive control treatment) to each kg diet. The Fish were fed for 8 weeks under experimental conditions with the corresponding diets. At the end of feeding trial, growth performance followed by the hematological parameters were determined by cutting the caudal peduncle (n=5). Results demonstrated no significant differences in final weigh, specific growth rate, protein efficiency ratio, and condition factor of the fish among the treatments. However, erythrocytes, hemoglobin, and hematocrit of fish fed by 12 mg kg^{-1} nanoparticle manganese oxide were significantly higher than fish in other treatments ($p<0.05$), while no significant difference was found in erythrocyte indices including mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) between the treatments. There is also no significant difference in former variables of the fish fed manganese sulfate and control diet. Findings of the present study showed that the use of nano manganese oxide increase some blood parameters of rainbow trout fingerlings including number of erythrocytes, hemoglobin, and hematocrit.

Keywords: Nanoparticles, Manganese, Rainbow trout, Growth performance, Blood cells

---

*Corresponding author