

## تأثیر مکمل معدنی نانوذره اکسید منگنز بر عملکرد رشد و یاخته‌های خونی

### بچه‌ماهی انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان

(*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792)

زهرا محمدی<sup>۱</sup>، هومن رجبی اسلامی<sup>\*</sup>

\*rajani.h@srbiau.ac.ir

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۴

#### چکیده

این پژوهش به منظور بررسی کاربرد نانوذره اکسید منگنز ( $Mn_2O_3$ ) 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  $9/1 \pm 0/3$  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 دم 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.

**کلمات 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، Gatlin & Wilson, Lovell, 1989؛ 1390). 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 (Prabhu et al., 2014؛ Grose, 2010). 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). 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 فعالیت 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، علائم 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). 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 تیلپیا (Lin et al., 2008)، گربه‌ماهی زرد (Tan et al., 2012)، قزل‌آلای رنگین‌کمان (Satoh, 1991)، ماهی آزاد اقیانوس اطلس (Liu et al., 2000) و سوکلا (Liu et al., 2000)

نوسان می‌گردد. لذا بررسی چگونگی تغییرات پارامترهای خونی همواره از ابزارهای مهم برای تشخیص سلامت آبزیان است. شاخص‌های خونی در ماهیان می‌تواند متأثر 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 (Garg *et al.*, 1989; Knox *et al.*, 1981)؛ (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).

(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 آبی‌پروری 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 آبی‌پروری 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

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 سانتی‌متر مکعب

می‌شود. اکسید منگنز نیز مکملی ارزان‌تر برای تامین منگنز بوده که در مقایسه با سولفات منگنز ۳۳ درصد، دسترسی زیستی کم‌تری دارد (Lovell, 1989). اجزاء مورد استفاده در این جیره غذایی از شرکت خوراک دام و طیور سندج، 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

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 جیره‌ها محسوب

به ترتیب با استفاده روش سوکسله، روش کجلدال، کوره الکتریکی و آن طبق روش‌های استاندارد 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 میلی گرم نانوذره اکسید منگنز)، ۱۴/۱ (برای تیمار ۸ میلی گرم نانوذره اکسید منگنز)، ۱۷/۳ (برای تیمار ۱۲ میلی گرم نانوذره اکسید منگنز) و ۱۷/۴ (برای تیمار ۱۲ میلی گرم سولفات منگنز) میلی گرم در هر کیلوگرم از جیره غذایی به دست آمد.

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 میلی متر 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 نگهداری شد. مقدار مواد مغذی موجود در جیره شامل چربی، پروتئین، خاکستر و رطوبت

جدول ۲. اجزای جیره غذایی مورد استفاده برای بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان در این پژوهش بر اساس پیشنهاد Hidalgo و همکاران (۲۰۰۲).

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

\* مکمل ویتامینه (میلی گرم در کیلوگرم غذا به استثنای موارد ذکر شده): دی کلسیم پنتوتنات، ۲۶۸۴۰؛ پیریدوکسین (pyridoxine HCl)، ۷۷۰۰؛ ربیوفلاوین، ۱۳۲۰۰؛ نیاسینامید، ۵۵۰۰۰؛ اسید فولیک، ۲۲۰۰؛ تیامین (منونیترا تیامین)، ۸۸۰۰؛ بیوتین، ۸۸؛ ویتامین B<sub>12</sub>، ۵/۵؛ کمپلکس بی سولفات سدیم منادیونی، ۲/۷۵؛ ویتامین E (DL a-tocopherol acetate)، ۸۸۰۰؛ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D<sub>3</sub> (پایدار)، ۱۱۰۰۰؛ واحد بین‌المللی؛ ویتامین A (vitamin A palmitate)، ۱۶۵۰۰۰؛ واحد بین‌المللی.

† مکمل معدنی (میلی گرم در هر ۱۰۰ گرم مکمل معدنی): کربنات کلسیم، ۲/۱؛ فسفات کلسیم، ۷۳/۵؛ اسید سیتریک، ۰/۲۲۷؛ سیترات مس، ۰/۰۴۶؛ سیترات آهن (۱۶-۱۷٪ آهن) 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 میلی گرم در کیلوگرم مکمل معدنی اضافه گردید.

## دوره تغذیه و پرورش

شد (Sotoudeh et al. 2010):

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

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

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

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

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

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 هیپارین 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 میکروهیاتوکریت برای مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه سانتریفیوژ عمودی (Sigma-Aldrich, St 3-30K, 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

تعداد ۴۵۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این آزمایش با میانگین وزنی  $9/1 \pm 0/3$  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 غذاهای سازگار شده و سپس در بین تیمارهای آزمایشی توزیع گردیدند. آب مورد نیاز از چشمه‌ای با دمای آب  $17/5 \pm 0/6$  درجه سانتی‌گراد و اکسیژن محلول  $7/2 \pm 0/5$  میلی‌گرم بر لیتر تامین گردید. میزان pH آب برابر  $7/33 \pm 1/4$  و هدایت الکتریکی آب نیز معادل  $821 \pm 17$  میکروزیمنس بر سانتی‌متر به ثبت رسید.

تعداد ۵ استخر کانالی به ابعاد  $9 \times 1/5$  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 کاملاً 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 غذایی 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 خون‌شناسی 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

تیمارها به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و معنی داری اختلافات بین تیمارها توسط آزمون LSD تعیین گردید. سطح معنی داری 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 نرم افزار Sigma Plot ترسیم شدند.

### نتایج

نتایج حاصل از سنجش فاکتورهای رشد در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در جدول ۳ نشان داده شده است. این یافته‌ها نشان داد که وزن نهایی ماهیان به شکل معنی داری ( $p > 0.05$ ) 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 میلی گرم در کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز مشاهده شد. همچنین اختلاف معنی داری در ضریب رشد ویژه ماهیان تغذیه شده با ۸ میلی گرم در کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز با ماهیان در تیمار شاهد به دست آمد ( $p < 0.05$ ). با این وجود اختلاف معنی داری در نرخ کارایی پروتئین و ضریب چاقی بین ماهیان در تیمارهای مختلف غذایی به دست نیامد ( $p > 0.05$ ).

سیانومت هموگلوبین 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 فمتولیتتر، وزن هموگلوبین داخل گلبولی (MCH) بر حسب پیکوگرم و غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (Mean corpuscular MCHC) بر حسب گرم بر دسی لیتر طبق معادله‌های زیر در هر یک از تیمارهای آزمایشی محاسبه گردیدند (طبرستانی، ۱۳۸۴).

$$MCV = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100 \quad MCH = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100 \quad MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریت}} \times 100$$

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  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدند. مقایسه بین

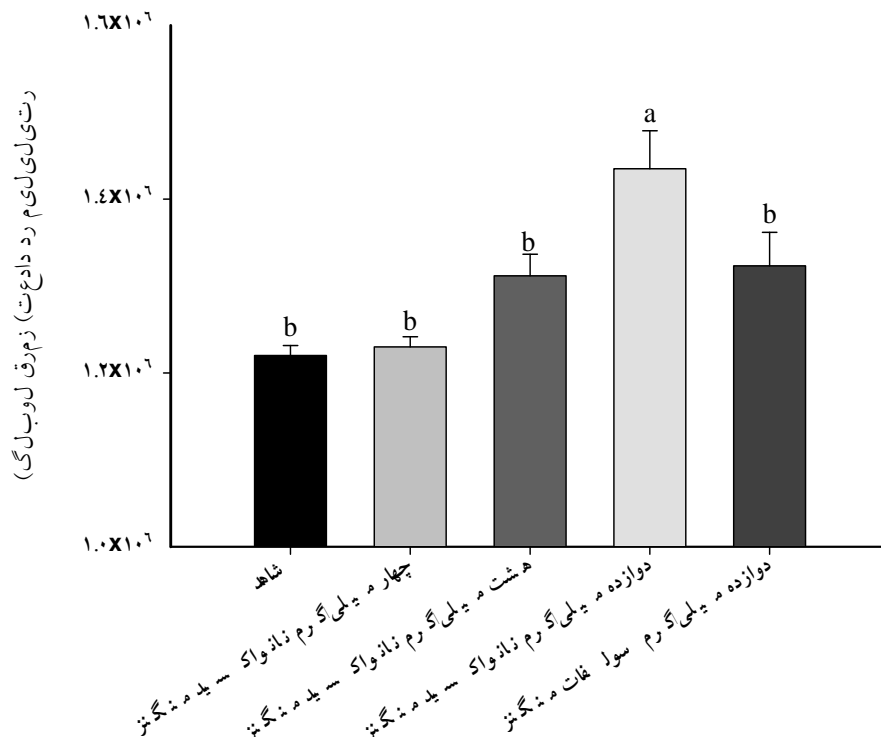
جدول ۳: شاخص‌های رشد (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز (n=90)

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

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

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 ( $p > 0.05$ ).

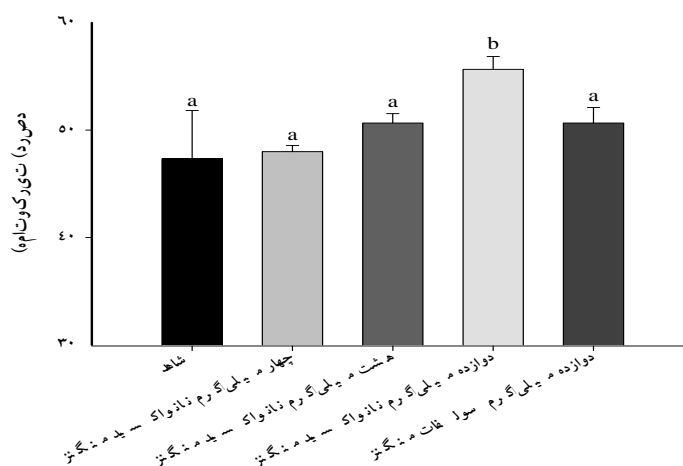
شمارش گلبول‌های قرمز در تیمارهای آزمایشی یک روند افزایشی را با افزودن نانوذرات اکسید منگنز در تیمارهای آزمایشی نشان داد (شکل ۲). تعداد گلبول‌های قرمز در تیمار ۱۲ میلی‌گرم نانوذرات اکسید منگنز به بیشینه  $1435000 \pm 43684$  عدد در میلی‌لیتر رسید که به شکل



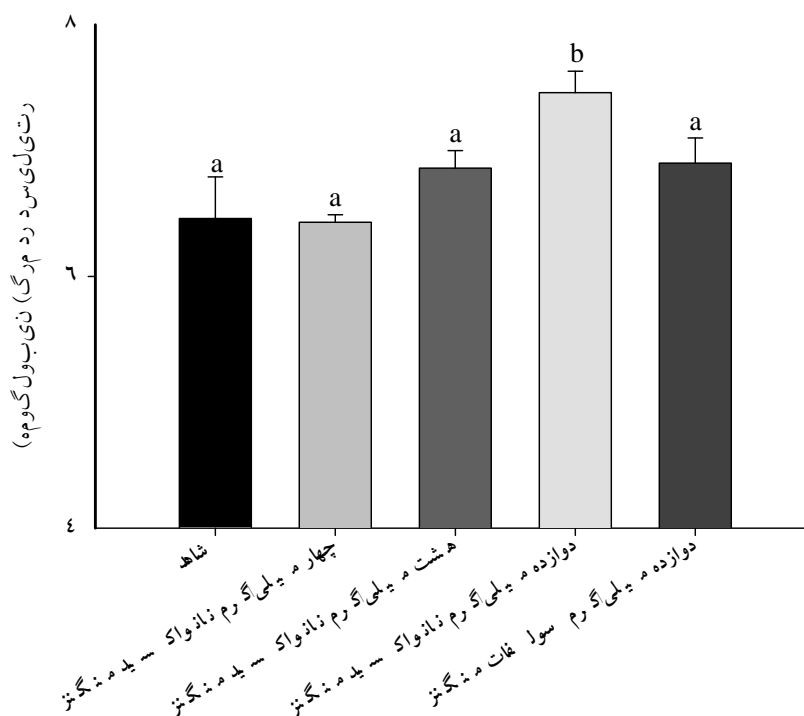
شکل ۲: تغییرات گلبول قرمز (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز و سولفات منگنز ( $n=9$ )

افزایش یافته و به حداکثر میزان  $7/48 \pm 0/30$  گرم بر دسی‌لیتر در خون ماهیان تیمار ۱۲ میلی‌گرم نانوذره اکسید منگنز در جیره غذایی رسید. کمترین مقدار هموگلوبین نیز با  $6/43 \pm 0/26$  گرم بر دسی‌لیتر 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 ( $p > 0.05$ ).

بیشترین سطح هماتوکریت نیز با  $55/66 \pm 1/20$  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



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



میله گرم بر کیلوگرم سولفات منگنز در جیره غذایی به دست آمد، هرچند که اختلاف معنی داری بین آنها ثبت نشد ( $p>0.05$ ). همچنین بیشترین و کمترین مقدار MCH نیز به ترتیب در ماهیان تغذیه شده با ۴ و ۸ میله گرم نانوذرات اکسید منگنز مشاهده شد که در این مورد نیز اختلاف معنی داری بین تیمارها به دست نیامد ( $p>0.05$ ). نتایج مشابهی نیز در مورد MCHC حاصل گردید که در این مورد نیز اختلاف معنی دار میان تیمارها دیده نشد ( $p>0.05$ ).

یافته‌های آزمایشی نشان داد که اختلاف معنی داری 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  $115 \pm 390/27$  فمتولیترا در ماهیان تغذیه شده با ۴ میله گرم بر کیلوگرم نانوذره اکسید منگنز در جیره غذایی و کمترین میزان MCV نیز برابر با  $123 \pm 382/64$  فمتولیترا در ماهیان تغذیه شده با ۱۲

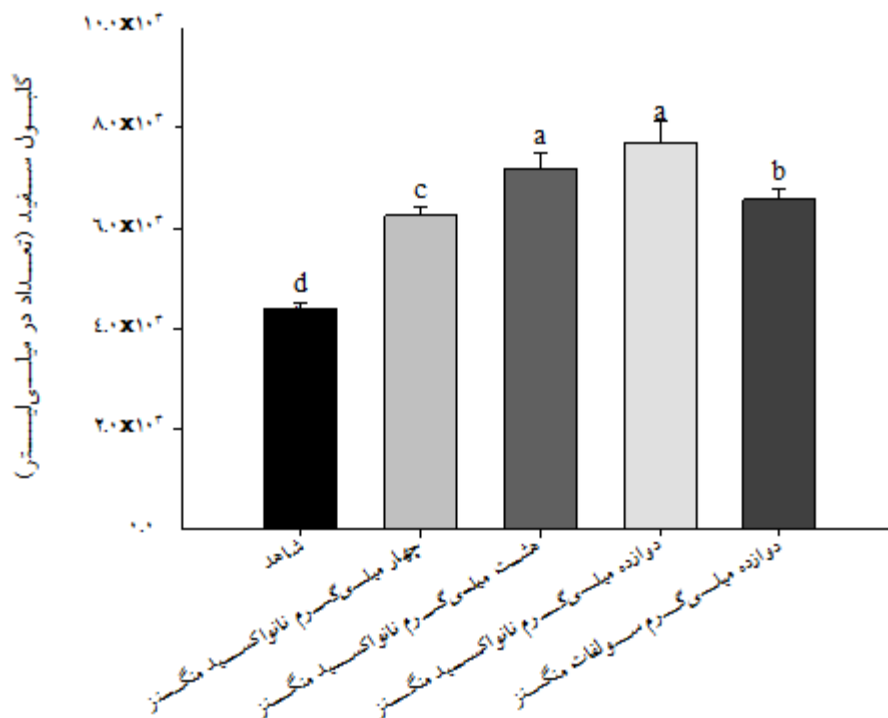
جدول ۴: اندیس‌های خونی (میانگین  $\pm$  انحراف معیار) بچه ماهی قزل آلائی رنگین کمان پس از هشت هفته تغذیه با مقادیر مختلف نانوذرات اکسید منگنز (n=9)

MCHC* <sup>‡</sup> (گرم بر دسی لیتر)	MCH <sup>†</sup> (پیکوگرم)	MCV* (فمتولیترا)	
$14/00 \pm 1/15$	$52/33 \pm 2/96$	$389/30 \pm 1/20$	شاهد
$14/08 \pm 1/15$	$51/66 \pm 2/72$	$382/64 \pm 1/33$	۱۲ میله گرم در کیلوگرم سولفات منگنز
$13/35 \pm 1/20$	$49/33 \pm 4/84$	$390/27 \pm 1/15$	۴ میله گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز
$13/64 \pm 0/88$	$54/31 \pm 1/85$	$386/29 \pm 0/57$	۸ میله گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز
$13/73 \pm 0/30$	$52/32 \pm 1/76$	$387/05 \pm 3/38$	۱۲ میله گرم در کیلوگرم نانوذرات اکسید منگنز

♣ حجم متوسط گلبولی؛ <sup>†</sup> مقدار متوسط هموگلوبین گلبولی؛ <sup>‡</sup> غلظت هموگلوبین داخل گلبولی

داشته هرچند که اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند. بعلاوه اختلاف معنی داری در تعداد لکوسیت‌ها بین تیمار حاوی ۴ میله گرم نانوذره اکسید منگنز ( $338/29 \pm 5966/08$  عدد در میلی لیتر) با تیمار شاهد ( $4416/67 \pm 116/66$  عدد در میلی لیتر) به دست آمد.

بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار ۱۲ میله گرم نانوذرات اکسید منگنز با میانگین  $416/33 \pm 770$  عدد در میلی لیتر مشاهده شد و کمترین میانگین نیز مربوط به تیمار شاهد با  $116/66 \pm 4400/16$  عدد در میلی لیتر بود (شکل ۵). تعداد گلبول‌های قرمز تیمار ۱۲ و ۸ میله گرم نانوذرات اکسید منگنز اختلاف معنی دار با سایر تیمارها



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

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 منگیزی 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 تأثیر 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 تأثیری بر غلظت هموگلوبین قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد. همچنین Lorentzen و همکاران (۲۰۰۶) مشخص نمودند که

یافته‌های این پژوهش نشان داد که نانوذره اکسید منگنز بر فاکتورهای رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیرگذار 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)، گربه‌ماهی 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 تأثیر

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.

Sirvastava و Singh (۲۰۱۰) اظهار داشتند که تغییر در میزان هموگلوبین می‌تواند به سبب تغییر در تعداد گلبول‌های قرمز باشد. Banace 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 ۲۰۹

منگنز موجود در جیره غذایی تاثیر 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 (Rather, Shaw & Handy, 2011; Rai et al., 2009; et al., 2011).

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 منگنز 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

منگنز در جیره است. افزایش توانایی مقابله با عوامل بیماری‌زا به دنبال افزایش گلبول‌های سفید تحت تاثیر تغذیه با نانوذره اکسید منگنز در این پژوهش می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد، چرا که ماهیان تحت شرایط پرورشی در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا آسیب پذیر هستند (Dixon & Stet, 2001). با این وجود پیشنهاد می‌شود که میزان سایر عواملی که تحت تاثیر منگنز قرار دارند نیز (نظیر آنزیم‌های خونی) بررسی شود تا بتوان شناخت کامل‌تری از تاثیر نانوذرات اکسید منگنز در جیره غذایی بر قزل‌آلای رنگین‌کمان به دست آورد.

### سپاس و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از جناب آقای مهندس امید فوقانی به دلیل کمک‌های به دریغ ایشان در بخش میدانی پژوهش سپاسگزاری نمایند. همچنین از جناب آقای مهندس رضا عصاره به دلیل همکاری‌های صورت گرفته در بخش آزمایشگاهی پژوهش قدردانی می‌گردد.

### منابع

- سپهری مقدم، ح.، ۱۳۹۰. جیره نویسی تغذیه آبیان. 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 رنگین‌کمان 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.,

پژوهش‌های فوق در مجموع نشان داده که مقادیر بالای منگنز موجود در آب یا جیره غذایی مطابق انتظار و همانند اثر مقادیر بالای سایر یون‌های فلزی دارای اثرات مخری بر بافت‌ها و اندام‌های مختلف آبیان است (Hoseini, Ibemenuga, 2013; Mebane, 2012). یافته‌های (Thangam et al., 2014; et al., 2014). Sharma و Langer (۲۰۱۴) برای مثال نشان داد که غلظت‌های کشنده منگنز باعث افزایش چشمگیر MCH و MCV گردیده ولی MCHC از روند ثابتی پیروی نکرده است. عدم وجود اختلاف معنی‌دار در میزان اندیس‌های گلبول‌های قرمز در این پژوهش به معنی آن است که غلظت منگنز در حدی نیست که اثرات سمی بر ماهی بگذارد.

تعداد گلبول‌های سفید یکی از شاخص‌های مهم سلامتی و وضعیت سیستم ایمنی ماهیان است که تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله تغذیه قرار دارد (گازرانی فراهانی، ۱۳۸۸). تاکنون اثرات منگنز موجود در جیره بر گلبول سفید ماهی مورد بررسی قرار نگرفته است. با این وجود نتایج پژوهش حاضر حاکی از آن بود که تعداد 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 تیمار شاهد روند افزایشی در تعداد گلبول‌های سفید را نشان دادند که می‌تواند بیانگر قابلیت بیشتر قزل‌آلای رنگین‌کمان برای مقابله با عوامل بیماری‌زایی باشد که به طور معمول در شرایط متراکم پرورشی وجود دارند (Uribe et al., 2011)، هرچند که اثبات دقیق این موضوع نیازمند تحقیقات تکمیلی در این زمینه است.

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از نانوذرات اکسید منگنز موجب افزایش شاخص‌های مربوط به گلبول‌های قرمز شامل هموگلوبین، هماتوکریت و تعداد آنها در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد. همچنین ارتقاء سیستم دفاعی ماهی در مقابله با عوامل بیماری‌زا به دنبال افزایش گلبول سفید نیز از دیگر نتایج استفاده از نانوذرات

- Mozan, A.F., Araujo, M.R. and Moraes, G., 2002.** Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Collosoma macropomum* exposed to sulphide or hypoxia. *Comparative 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., Keyvanshokoh, S., Parviz Salati, A., Johari, S.A. and Pashazanoosi, 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 hematological 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 hundiá (*Rhamdia quelen*). *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/country-sector/naso\\_iran/en](http://www.fao.org/fishery/country-sector/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.
- Lall, S.P. and Milley, J.E., 2008.** Impact of aquaculture on aquatic environment: trace

- 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.** 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

- 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. Environment 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.<sup>1</sup>; Rajabi Islami H<sup>1\*</sup>

\*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  $9.1 \pm 0.3$  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  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  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