پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات شیمیایی بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نانو ذرات سولفات منگنز

ابراهیم ستوده[۲،۱*]، افسانه امیری بهروسی[۱]، رعنا بهادری[۱]، حسن حبیبی[۳] و سالم مرمضی[۳]

[۱] ایران، بوشهر، دانشگاه خلیج‌فارس، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] ایران، بوشهر، دانشگاه خلیج‌فارس، دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه شیلات

[۳] ایران، بوشهر، دانشگاه خلیج‌فارس، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۹۶/۷/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۵

چکیده

در پژوهش حاضر اثرات نانو ذرات سولفات منگنز ($MnSo_4$) جیره بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی، پاسخ ایمنی غیراختصاصی و ترکیبات شیمیایی بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) موردبررسی قرارگرفت. تعداد ۴۰۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن اولیه ۰/۸±۰/۱ گرم در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تیمار با ۳ تکرار درون آکواریوم‌ها تقسیم شدند. ماهیان مورد آزمایش با جیره‌های مختلف شامل جیره شاهد (فاقد منگنز)، جیره حاوی منگنز غیر نانو (Mn-M)، جیره حاوی نانو منگنز با میزان ۱۰ mg/kg (Mn-N10)، جیره حاوی نانو منگنز با میزان ۱۵mg/kg (Mn-N15) به مدت ۶ هفته تغذیه شدند. در پایان آزمایش شاخص‌های رشد، پاسخ‌های ایمنی، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ترکیبات شیمیایی لاشه ماهیان موردسنجش قرارگرفت. نتایج نشان داد میانگین وزن نهایی بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد (فاقد منگنز) در مقایسه با گروه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نانو منگنز به‌طور معنی‌داری کمتر است (P<۰/۰۵). فعالیت لیزوزیم پلاسمای بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نانو منگنز (Mn-N10 و Mn-N15) نسبت به بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). فعالیت کمپلمان پلاسما در تیمار Mn-M نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵) اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P<۰/۰۵). میزان پروتئین خام لاشه بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی منگنز (به شکل نانوذره و غیر نانو) نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر به دست آمد (P<۰/۰۵). فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و پروتئاز کل بچه ماهیان مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداند (P<۰/۰۵). در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد افزودن نانو ذرات منگنز به جیره تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان ندارد، اما برخی از پاسخ‌های ایمنی این‌گونه را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: مکمل غذایی، نانوذره، تغذیه، لیزوزیم، کمپلمان، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۷۳۷۴۰۵۲۸ ، پست الکترونیکی: E.sotoudeh@pgu.ac.ir

مقدمه

باتوجه به افزایش روزافزون جمعیت و مصرف رو به رشد و محدودیت منابع غذایی، پروتئین موردنیاز سبد غذایی به‌سختی در دسترس افراد قرار می‌گیرد. ازاین‌رو آبزیان به‌عنوان غنی‌ترین منابع پروتئینی در بین مواد غذایی مردم، اهمیت فوق‌العاده‌ای دارند (۷). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی از عمده‌ترین ماهیان

پرورشی در نقاط مختلف جهان شناخته شده است. از ویژگی‌های بارز و مهم این ماهی، سازش خوب با شرایط پرورش متراکم است و از سرعت رشد خوبی نیز برخوردار می‌باشد (۴۲). استفاده از غذا و ترکیبات مناسب اجزای جیره علاوه بر تأمین نیازهای اولیه می‌تواند موجب بهبود شرایط رشد، مقاومت در برابر شرایط نامناسب محیطی، کاهش تلفات، افزایش وزن و درنهایت افزایش تولید گردد. برای آنکه بتوان ماهی سالمی به بازار عرضه نمود، باید به نوع تغذیه کیفیت غذای مصرفی توجه بسیار کرد. در یک فرمول غذایی مناسب و کامل علاوه بر تأمین حداقل مواد مغذی لازم برای رشد ماهیان ازجمله پروتئین خام، چربی خام و کربوهیدرات‌ها، جیره‌ی غذایی ماهیان باید حاوی افزودنی‌هایی برای افزایش سرعت رشد و کیفیت ماهیان نیز باشد.

مواد معدنی یکی از اجزای ضروری غذای مصرفی است که نقش مؤثری در سلامت و بسیاری از فعالیت‌های فیزیولوژیک ماهیان پرورشی نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان دارند (۱۶و۲۵). بنابراین ضروری است که مقدار بهینه یک ماده معدنی باتوجه به کارکرد فیزیولوژیک آن مدنظر قرارگیرد (۳۶). اصلی‌ترین علت استفاده از عناصر کمیاب، افزایش رشد، کاهش مصرف غذا، افزایش تولید و بدست آوردن محصولی باکیفیت می‌باشد (۲۵). منگنز یکی از مواد معدنی کم‌مصرف است که دارای عملکرد کوفاکتوری در بسیاری از سیستم‌های آنزیمی می‌باشد. این عنصر برای تنظیم کار دستگاه عصبی، رشد استخوان و تولیدمثل لازم است، همچنین در متابولیسم کربوهیدرات‌ها نقش مؤثری داشته و نیز برای افزایش سلامتی ماهی‌ها ضروری می‌باشد (۲). کمبود منگنز سبب کاهش رشد، رشد غیرطبیعی بخش دمی و کوتاه شدن بدن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و اختلال در تولیدمثل می‌شود. در مجموع کمبود این عنصر در ماهیان باعث بدشکلی و غیرطبیعی شدن استخوان و تأخیر در ساخت سلول‌های خونی خواهد شد. منگنز به‌عنوان یک متالوآنزیم و یک فعال‌کننده‌ی آنزیمی نقش دارد (۲۲). علاوه براین منگنز یکی از اجزای ضروری آنزیم پیروات کربوکسیلاز بوده و به‌عنوان یک کوفاکتور در فعالیت چندین سیستم آنزیمی مانند سوپراکسید دیسموتازها ضروری است (۲۱).

نانو ذرات به ذراتی اطلاق می‌گردد که حداقل یکی از ابعاد آن در محدوده‌ی ۱–۱۰۰ نانومتر باشد. استفاده از ذرات در مقیاس نانو موجب افزایش تأثیرگذاری ترکیبات در غلظت‌های پایین‌تر به شکلی می‌گردد که می‌توان در زمینه-های تغذیه، کنترل بیماری‌ها و کاهش اثرات زیست‌محیطی فعالیت‌های مرتبط با آبزی‌پروری استفاده نمود (۵، ۸، ۱۵و ۴۹) اندازه کوچک این ذرات می‌تواند به تغییرات اساسی در ساختار و خواص این عناصر منجر شود به‌طوری‌که تا به امروز صدها تولیدات جدید برای اهداف مختلف در زمینه فن‌آوری نانو ساخته شده است. ورود این فناوری به عرصه آبزی‌پروری و استفاده کاربردی از آن در بسیاری از کشورها گسترش‌یافته است. ازآنجاکه تبدیل مواد در ابعاد نانومتری موجب ایجاد یک سطح ویژه، فعالیت سطحی بالا با مراکز فعال فراوان و کارایی کاتالیزوری شدیدی می‌شود، در حال حاضر مطالعات متعددی در زمینه کاربرد نانوتکنولوژی در تغذیه حیوانات در حال انجام است. بنابراین نانو ذرات ازنظر شیمیایی و فیزیکی با مواد بزرگ‌تر متفاوت هستند و رفتارهای نوین و جالبی را در تعامل با مواد زنده ایجاد می‌کنند. آنها قادر به عبور از موانع بیولوژیکی هستند (۱۰)، به‌سرعت توسط سلول‌ها جذب می‌شوند و قابلیت دسترسی زیستی بالاتری نسبت به نمک‌های معدنی دارند (۱۰). در آبزیان بررسی‌هایی در زمینه اثرات تغذیه‌ای ترکیبات نانوذره انجام‌شده است. پروچرو و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی اثر نانو آهن بر پارامترهای زیستی ماهی کپور و ماهی خاویاری پرداختند (۳۹). نتایج آنها نشان داد این مکمل‌ها باعث افزایش سنتز گلبول‌های قرمز و هموگلوبین می‌شود و میزان مرگ‌ومیر را کاهش می‌دهد. بهرا و همکاران (۲۰۱۴) نیز طی تحقیقی از نانو آهن به‌عنوان ماده افزودنی در غذای کپور هندی

(*Labeo rohita*) استفاده نمودند و پارامترهای ایمنی و خونی این ماهی را موردبررسی قراردادند (۸). آنها گزارش کردند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میانگین وزن نهایی ماهیان تغذیه‌شده با نانوذره آهن بهبودیافته است. در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز اثر نانو ذراتی همچون طلا و نقره آهن و منگنز موردبررسی قرارگرفته است (۱، ۱۴، ۲۸ و ۳۳). در یک مطالعه اثرات سطوح مختلف نانوذره آهن (۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵و ۶۰ میلی‌گرم نانو ذرات آهن در هر کیلوگرم غذا) به‌عنوان شکل جدیدی از ترکیب آهن بر برخی فاکتورهای رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موردبررسی قرارگرفت (۱۸). محمدی و همکاران (۲۰۱۶) دریک بررسی مشابه اثرات نانو ذرات منگنز با شکل اکسید منگنز (Mn_2O_3) به‌عنوان مکمل غذایی در جیره بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرداختند (۳۳). نتایج آنها نشان داد که استفاده از نانوذره اکسید منگنز (۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم جیره) موجب بهبود عملکرد شاخص‌های رشد و شاخص‌های خونی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد. در بیشتر تحقیقات صورت گرفته شکل نانو مواد معدنی اثرات مثبتی بر عملکرد رشد و سلامتی ماهی داشته است، بااین‌حال اطلاعات کافی در مورد اثرات بیوشیمیایی و فیزیولوژی این ترکیبات بر ماهی وجود ندارد. باتوجه به اهمیت مواد معدنی در جیره آبزیان و اینکه تاکنون اثرات تغذیه‌ای نانو ذرات سولفات منگنز ($MnSO_4$) موردبررسی قرارنگرفته است، این تحقیق بمنظور بررسی اثرات به‌کارگیری نانو ذرات سولفات منگنز جیره و بررسی اثرات آن بر برخی از شاخص‌های عملکرد رشد و فعالیت آنزیم‌های گوارشی، پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی و ترکیبات شیمیایی بدن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام‌شده است.

مواد و روشها

تهیه بچه ماهی و تیماربندی: تعداد ۴۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از مرکز ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری یاسوج تهیه و پس از انتقال به سوله‌ی آبزیان دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه خلیج‌فارس به مدت ۲ هفته با شرایط آزمایش سازگار شدند. پس از گذشت دوره سازگاری، ماهیان با میانگین وزنی ۰/۱±۰/۸ گرم به‌طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم ۶۰ لیتری (۲۰ قطعه در ۳۸ لیتر) به‌صورت کاملاً تصادفی تقسیم گردیدند. دراین طرح از چهار تیمار (جیره غذایی) با ۳ تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. تیمارهای مورداستفاده شامل تیمار شاهد (جیره فاقد منگنز)، تیمار Mn-m (جیره حاوی سولفات منگنز غیرنانو)، تیمار Mn-N10 (جیره حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو منگنز) و Mn-N15 (جیره حاوی ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو منگنز). غذادهی روزانه در ۴ وعده در ساعات ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ به مدت ۶ هفته تا حد سیری انجام گرفت. روزانه قبل از اولین وعده غذایی غذاهای خورده نشده و مدفوع ماهیان سیفون و از آکواریوم خارج می‌شد. شروع و پایان دوره روشنایی کارگاه به ترتیب ۸ صبح و ۸ بعدازظهر بود. درجه حرارت آب روزانه ۲ بار به‌وسیله دماسنج الکلی اندازه‌گیری شد. همه بچه ماهیان در هفته سوم آزمایش و در انتهای آزمایش (هفته ششم) مورد زیست‌سنجی قرارگرفتند. برای اندازه‌گیری وزن از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و برای اندازه‌گیری طول ماهی از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر استفاده شد. در طول دوره میانگین درجه حرارت ۱±۱۴/۸درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۶±۸/۷ اسیدیته ۰/۵±۷/۴ و شوری کمتر از ۱ قسمت در هزار بود.

آماده‌سازی جیره غذایی مورد استفاده: ترکیبات اولیه غذایی از شرکت دراج بنیان دانش سیراف (بوشهر) تهیه و پس از آنالیز اقلام غذایی، جیره‌ها با استفاده از نرم‌افزار جیره نویسی لیندو فرموله شدند. اجزای خشک جیره قبل از ترکیب به‌خوبی آسیاب شده و طبق جدول ۱ توزین شده و به‌صورت دستی باهم مخلوط شدند. نانوذره سولفات منگنز ($MnSO_4 \cdot H_2O$) مورد استفاده دراین تحقیق (با متوسط اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر. شرکت دانش‌بنیان

احرار شرق، ایران، تبریز) تهیه گردید. نانوذرات سولفات منگنز و سایر ترکیبات معدنی براساس احتیاجات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۳۶) با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و براساس طرح آزمایش چهار مخلوط ماده معدنی تهیه گردید. مخلوط حاوی ۱۰mg/kg نانو ذرات سولفات منگنز (Mn-N10)، مخلوط حاوی ۱۵ mg/kgنانو ذرات سولفات منگنز (Mn-N15)، مخلوط حاوی ۱۰ mg/kg سولفات منگنز غیرنانو (Mn-M) و یک مخلوط معدنی فاقد هرگونه منگنز (جیره شاهد) تهیه شد. پس از مخلوط کردن مواد خشک با دست، لیستین و روغن ماهی و روغن سویای خوراکی و آب گرم را افزوده و کاملاً با دست مخلوط گردید و مخلوط یکنواخت بدست آمده با کمک چرخ‌گوشت به‌صورت رشته‌های با قطر ۲ میلی‌متر تهیه شد (۴۰). رشته‌های خشک‌شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵۰ درجه در آون نگهداری شد. غذاهای آماده شده در طول آزمایش در ظرف‌های پلاستیکی درپوش‌دار قرار داده و تا زمان مصرف در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

جدول ۱- ترکیبات اولیه جیره‌های مورد استفاده برای تغذیه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (برحسب گرم بر کیلوگرم)

ترکیبات جیره	تیمارهای آزمایشی مختلف			
	شاهد	Mn-M	Mn-N10	Mn-N15
پودر ماهی[1]	۴۴۰	۴۴۰	۴۴۰	۴۴۰
آرد سویا	۲۵۰/۸	۲۵۰/۸	۲۵۰/۸	۲۵۰/۸
آرد گندم	۷۰	۷۰	۷۰	۷۰
گلوتن گندم	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰
روغن ماهی[1]	۴۶/۹	۴۶/۹	۴۶/۹	۴۶/۹
لسیتین[1]	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
مواد معدنی	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
ویتامین	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
آنتی‌اکسیدان	۰/۲	۰/۲	۰/۲	۰/۲
بایندر[1]	۲۵	۲۵	۲۵	۲۵
روغن سویا	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
ترکیبات شیمیایی (درصد ماده خشک)				
پروتئین خام	۴۶/۵	۴۶/۴	۴۶/۵	۴۶/۳
چربی خام	۱۶/۱	۱۶/۲	۱۶/۲	۱۶/۳
خاکستر	۹/۶	۸/۹	۹/۳	۹/۱
NFE[2]	۲۱/۸۱	۲۲/۹۷	۲۱/۶۹	۲۱/۰۸
انرژی ناخالص (KJ/g)[3]	۱۹/۷۴	۱۹/۷۵	۱۹/۶۴	۱۹/۵۳

۱- تهیه‌شده از کارخانه دراج بنیان دانش سیراف

۲- (فیبر+خاکستر+چربی خام+پروتئین خام)- ۱۰۰= عصاره عاری از ازت (NFE)

۳- انرژی (ناخالص) کل در هر گرم جیره از طریق حاصل‌ضرب مقدار انرژی موجود در هر گرم پروتئین (۲۳/۶ kJ)، چربی (۳۹/۵ kJ) و کربوهیدرات (۱۷/۲ kJ) تعیین گردید (۳۶).

آنالیزهای شیمیایی: در پایان آزمایش و پس از ۶ هفته تغذیه جهت اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی بدن، کل بدن بچه ماهیان (۴ عدد بچه ماهی) بااستفاده از آسیاب برقی هموژن شد و فاکتورهای شیمیایی پروتئین خام، چربی خام، رطوبت و خاکستر به روش AOAC (۶) مورد سنجش قرارگرفت. برای اندازه‌گیری رطوبت، ۵ گرم از

نمونه‌ی گوشت ماهی همگن شده را در آون در دمای ۱۰۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده تا نمونه‌ها به وزن ثابت برسند. سپس میزان رطوبت برحسب درصد بیان شد. چربی خام به روش سوکسله (Soxtec 2050 ساخت کشور سوئد) و استخراج با حلال کلروفرم و میزان پروتئین خام کل به روش کلدال بااستفاده از دستگاه کجلدال اتوماتیک (Kjeltec Analyzer Unit 2300) با ضرب میزان نیتروژن بدست آمده در عدد ۶/۲۵ صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری خاکستر نمونه‌ها به مدت ۵ ساعت در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد سوزانده شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی: در پایان آزمایش جهت بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی، غذادهی ماهیان یک روز قبل از انجام نمونه‌برداری قطع شد (۳۸). از هر تانک ۳ ماهی به‌صورت کاملاً تصادفی انتخاب و دستگاه گوارش آنها پس از جداسازی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس جهت تهیه عصاره آنزیمی کل روده روی یخ جداسازی و با بافر ۵۰ میلی مولار Tris-HCl، ۲۰ میلی مولار $CaCl_2$ و ۵۰ میلی مولار KCl (pH=۸/۵) به نسبت ۱ به ۹ مخلوط و هموژن شده و سپس در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۳۰۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند (۴۱). درنهایت سوپرناتانت حاصله جداسازی و تا زمان سنجش فعالیت آنزیمی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش فعالیت آنزیم گوارشی لیپاز در بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان براساس روش ایجیما و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از پارا-نیتروفنیل مریستات به‌عنوان سوبسترای اختصاصی انجام شد (۱۹). میزان جذب نوری مخلوط واکنش در دستگاه اسپکتروفتومتر (PerkinElmer Lambda 25) در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر قرائت گردید. درنهایت فعالیت آنزیم لیپاز براساس U/mg protein محاسبه گردید.

مجموع فعالیت پروتئاز برطبق روش منتشرشده توسط آنسون (۱۹۳۸) (۳) سنجش گردید. دراین روش کازئین به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. مخلوط‌های واکنشی حاوی ۱ میلی‌لیتر محلول کازئین ۱/۵ درصد با pH =۷ در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و پس‌ازآن ۱ میلی‌لیتر از یک سوپرناتانت به آن اضافه گردید. واکنش به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد و سپس ۲ میلی‌لیتر اسید ۰/۴ مولار تری کلرواستیک به آن اضافه گردید. محلول فیلتر و ۲/۵ میلی‌لیتر Na_2Co_3 ۰/۴ مولار و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. درنهایت میزان جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پروتئین محلول کل توسط روش برادفورد (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به‌عنوان استاندارد اندازه‌گیری گردید (۹).

خون‌گیری و سنجش شاخص‌های ایمنی: در انتهای آزمایش تعداد ۵ قطعه ماهی از هر تکرار آزمایشی بمنظور بررسی فاکتورهای خونی توسط پودر گل میخک به میزان ۲۵۰ قسمت در میلیون بی‌هوش و خون آنها با استفاده از سرنگ از ساقه‌ی دمی گرفته و درون لوله‌های درب‌دار پلاستیکی حاوی هپارین ریخته شد. لوله‌ها درون ظرف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شدند. سپس برای تهیه پلاسما نمونه‌های خون را در سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در دور ۱۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و پلاسمای تهیه شده تا زمان سنجش شاخص‌های ایمنی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. مقدار آلبومین پلاسما بااستفاده از کیت تشخیصی شرکت زیست‌شیمی (تهران، ایران) و با روش معرف برموکروزول گرین اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه این روش شامل واکنش آلبومین با برموکرزول گرین در شرایط اسیدی و تشکیل کمپلکس سبز مایل به آبی است که شدت رنگ آن متناسب با غلظت آلبومین موجود در نمونه است. سنجش میزان آلبومین پلاسما با استفاده از معادله زیر و برحسب گرم بر دسی لیتر محاسبه گردید.

آلبومین – پروتئین کل = (g/dl)گلوبولین

اندازه‌گیری فعالیت سیستم کمپلمان پلاسما با استفاده از روش الایزا غیرمستقیم (Indirect Elisa) و با بکارگیری کیت تجاری (Wielsa ®comple300 total complement functional screen kit, Sweden) انجام گرفت. کیت‌ها با LPS (Bacterial lipopolysaccharides) باکتری *Salmonela typhi* (Sigma) پوشیده شده و جهت بررسی فعالیت سیستم کمپلمان از مسیر فرعی انتخاب گردیدند. ۵۰ میکرولیتر از پلاسمای نمونه وارد کیت نموده و به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون صورت گرفت. بعد از شستشو با محلول بافر فسفات ۰/۰۵ درصد، به فاز جامد (پلیت) محلول آلکالین فسفاتاز متصل به آنتی‌بادی مونوکلونال C5b-9 افزوده و سپس به مدت ۳۰ دقیقه دیگر انکوباسیون در دمای اتاق صورت گرفت. شستشوی نهائی با بافر فسفات صورت گرفته و به آن محلول سوبسترا اضافه گردید و برای ۳۰ دقیقه دیگر هم انکوباسیون صورت گرفت. در نهایت میزان جذب در طول‌موج ۴۰۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه Elisa Reader قرائت شد.

فعالیت لیزوزیم پلاسما توسط روش کدورت سنجی بررسی شد (۱۲). دراین روش فعالیت لایزوزیم (U/ml/min) با استفاده از نمودار استاندارد (لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ) تعیین شد. اساس این آزمایش تخریب لایه پپتیدوگلیکان باکتری *M.lysodeikticus* توسط لایزوزیم پلاسما می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: نتایج مربوط به سنجش فاکتورهای مختلف به‌صورت میانگین ± انحراف معیار (SD)، بیان شده‌اند. اختلاف بین داده‌ها و مقایسه میانگین نمونه‌ها در تیمارهای مختلف با آنالیز واریانس یک‌طرفه، در نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ بررسی شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها از آزمون دانکن برای گروه-بندی میانگین‌ها استفاده شد، alpha=۰/۰۵ به‌عنوان معیار معنی‌دار بودن نتایج تعیین شد. ترسیم نمودار در فضای نرم-افزار Microsoft Excel، نسخه ۲۰۱۶ انجام گرفت.

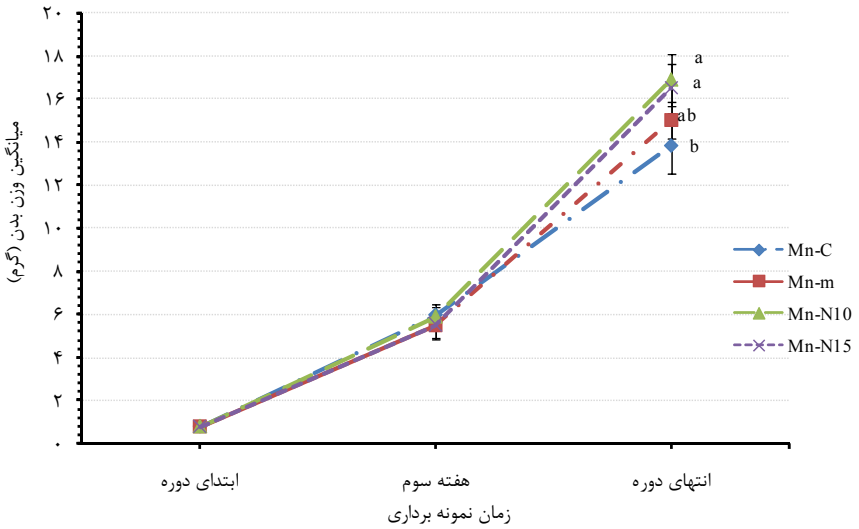
نتایج

نمودار ۱ میانگین اولیه، میانگین وزن بچه ماهیان در هفته سوم و میانگین وزن نهایی بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی را نشان می‌دهد. در هفته سوم آزمایش میانگین وزن بچه ماهیان تیمارهای مختلف اختلاف معنی-داری نداشتند. اما در پایان دوره آزمایش میانگین وزن بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد (فاقد منگنز) نسبت به سایر تیمارها کمتر بود و این اختلاف در مقایسه با گروه‌های تغذیه‌شده با غذاهای حاوی نانوذره منگنز (Mn-N10 و Mn-N15) معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در طول دوره آزمایش هیچگونه مرگ‌ومیری مشاهده نشد و میزان بازماندگی در همه تیمارها ۱۰۰ درصد بود.

آنالیز تقریبی لاشه در انتهای دوره پرورشی نشان داد میزان پروتئین ماهیان تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵). میزان پروتئین خام در بچه ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی منگنز (به شکل نانوذره و غیرنانو) نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (P<۰/۰۵). میزان چربی، خاکستر و رطوبت لاشه بچه ماهیان در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P<۰/۰۵) (جدول ۲).

نتایج مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان تیمارهای مورد مطالعه در پایان دوره در جدول ۳ ارائه‌شده است. فعالیت آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز کل بچه ماهیان مورد مطالعه اختلاف آماری معنی‌داری نشان نداند (P>۰/۰۵).

جدول ۴ شاخص‌های ایمنی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین-کمان تغذیه‌شده با جیره‌های مختلف را نشان می‌دهد.



نمودار ۱- میانگین (n=۳، نتایج براساس میانگین± انحراف معیار) وزن بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در هفته سوم و انتهای دوره آزمایش. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشند (P<۰/۰۵). Mn-C (جیره شاهد- فاقد منگنز)، Mn-M (جیره حاوی منگنز غیر نانو)، Mn-N10 (جیره حاوی نانو منگنز با میزان ۱۰ mg/kg)، Mn-N15 (جیره حاوی نانو منگنز با میزان ۱۵ mg/kg)

جدول ۲- میانگین و انحراف معیار (SD) پروتئین خام، چربی خام، خاکستر و رطوبت لاشه بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (n=۳، نتایج بر اساس میانگین± انحراف معیار)

تیمار	پروتئین خام (٪)	چربی خام (٪)	خاکستر (٪)	رطوبت (٪)
شاهد	۱۳/۵۱ ±۰/۸[b]	۷/۳۹±۰/۵	۲/۵۶ ±۰/۲	۷۳/۵۳±۰/۱
Mn-M	۱۴/۸۵ ±۰/۴[a]	۷/۷۳±۱/۸	۲/۵۰ ±۰ /۷	۷۳/۴۳±۱
Mn-N10	۱۴/۷۵ ±۰/۷[a]	۷/۹۱±۱/۷	۲/۴۴ ±۰/۴	۷۱/۸۳±۱/۴
Mn-N15	۱۵/۱۰ ±۰/۴[a]	۷/۸۹±۱/۵	۲/۵۹±۰/۲	۷۲/۵۳±۱/۹

میانگین‌های دارای علائم متفاوت در هر ستون ازنظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری هستند (P<۰/۰۵)

جدول ۳- میانگین و انحراف معیار (SD) فعالیت آنزیم‌های گوارشی آمیلاز، لیپاز و پروتئاز بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (n=۳، نتایج بر اساس میانگین± انحراف معیار)

تیمار	آمیلاز (U/ mg Pr)	لیپاز (U/ mg Pr)	پروتئاز (U/ mg Pr)
شاهد	۱/۱۳±۰/۳	۰/۰۲۲±۰	۱/۱۴±۰/۱
Mn-M	۱/۱۱±۱۰/۸	۰/۰۲۰±۰	۱/۱۲±۰/۲
Mn-N10	۱/۰۵±۲/۸	۰/۰۱۸±۰	۱/۱۰±۰/۱
Mn-N15	۱/۰۶±۶/۴	۰/۰۲۳±۰	۱/۱۷±۰/۲

میانگین‌های دارای علائم متفاوت در هر ستون ازنظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری هستند(P≤۰/۰۵)

میزان پروتئین کل در بین هیچ‌یک از تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). در مورد میزان گلوبولین نیز اختلاف معنی‌داری میان تیمارها دیده نشد (P>۰/۰۵). بین میزان آلبومین در بچه ماهیان تیمار شاهد با تیمارهای حاوی ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم نانوذره منگنز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). علی‌رغم

اینکه تفاوت معنی‌داری بین میزان آن در تیمار شاهد با تیمار حاوی ۱۰ میلی‌گرم سولفات منگنز غیرنانو بدست نیامد (P>۰/۰۵). میزان لیزوزیم در تیمارهای آزمایشی یک‌روند افزایشی را با افزودن نانو ذرات سولفات منگنز در تیمارها نشان داد (جدول ۳). بیشترین میزان لیزوزیم ۸۵/۵۰±۲/۹ در تیمار ۱۵ و ۱۰ میلی‌گرم نانو ذرات منگنز بدست آمد که به شکل معنی‌داری بیش از تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). بااین‌وجود تفاوت معنی‌داری در میزان لیزوزیم بین تیمار شاهد با تیمار حاوی سولفات منگنز بدست نیامد (P>۰/۰۵). بیشترین سطح فعالیت کمپلمان در سرم خون بچه ماهیان تغذیه‌شده با ۱۲ میلی‌گرم سولفات منگنز به دست آمد که به شکل معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود (جدول ۴). بااین‌وجود در میزان کمپلمان بچه ماهیان سایر تیمارها نسبت به گروه شاهد و گروه حاوی سولفات غیرنانو منگنز اختلاف معنی‌داری به دست نیامد (P>۰/۰۵).

جدول ۴- میانگین و انحراف معیار (SD) شاخص‌های خونی و ایمنی غیراختصاصی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (n=۳، نتایج بر اساس میانگین± انحراف معیار)

تیمار	پروتئین کل (g/dl)	گلوبولین (g/dl)	آلبومین (g/dl)	لیزوزیم (U/ml/min)	کمپلمان (U/ml)
شاهد	۳/۷۶±۰/۴	۱/۸۵±۰/۳	۱/۹۰±۰/۱[b]	۷۱/۳۳±۳/۲[b]	۳۳۸/۱۶±۲۹[b]
Mn-M	۳/۹۵±۰/۲	۱/۹۱±۰/۲	۲/۰۴±۰/۱[b]	۷۹/۳۰±۹/۱[ba]	۳۹۸/۳۳±۱۲/۷[a]
Mn-N10	۴/۱۴±۰/۵	۱/۶۱±۰/۶	۲/۵۳±۰/۱[a]	۸۳/۲۰±۳/۳[a]	۳۷۲/۶۶±۴۰/۲[ab]
Mn-N15	۴/۱۶±۱	۱/۸۴±۰/۹	۲/۳۲±۰/۱[a]	۸۵/۵۰±۲/۹[a]	۳۶۸/۶۶±۲۹/۷[ab]

میانگین‌های دارای علائم متفاوت در هر ستون ازنظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری هستند(P≤۰/۰۵)

بحث و نتیجه‌گیری

در فعالیت آبزی‌پروری میزان رشد آبزیان از مهم‌ترین مسائل محسوب می‌شود، زیرا با افزایش رشد ماهی، مدت نگهداری آن و درنتیجه هزینه نگهداری کاهش می‌یابد. بعضی از عناصر غذایی محدودکننده رشد هستند و در صورت وجود آنها در جیره غذایی ماهی، میزان رشد هم افزایش می‌یابد. مواد معدنی مانند کبالت، مس، آهن، منگنز، سلنیوم، روی، کروم و ید و غیره برای فرآیندهای حیاتی عادی موردنیاز هستند و همه حیوانات ازجمله ماهی و سخت‌پوستان به این عناصر معدنی نیاز دارند (۴۴). یافته های این پژوهش نشان داد که افزودن منگنز (غیرنانو یا نانوذره) به‌عنوان یک ماده معدنی باعث بهبود عملکرد رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود. مطالعات گذشته نشان می‌دهند که افزودن مکمل منگنز در جیره رابطه‌ی مثبتی با رشد ماهی دارد و برای رشد ماهیان آب شیرین و دریایی، مانند گربه‌ماهی کانال (*Ictalurus punctatus*) (۱۷)، قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور معمولی (۳۷)، ماهی آزادماهی اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) (۳۰)، کپور طلایی (*Carassius auratus gibelio*) (۳۸)، تیلاپیا (*Oreochromis niloticus× O. aureus*) (۲۳)، هامور معمولی (*Epinephelus coioides*) (۴۷)، گربه‌ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) (۴۳)، سوکلا (*Rachycentron canadum*) (۲۴) و ماهی توربوت (*Scophthalmus maximus*) (۲۹) ضروری است. در پایان آزمایش ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد (فاقد منگنز) در مقایسه با سایر تیمارها به‌ویژه تیمارهای تغذیه شده با جیره های نانو منگنز میانگین وزن نهایی پایین‌تری داشتند. در بین تیمارهای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی منگنز، گروه تغذیه شده با جیره Mn-N10 بالاترین میانگین وزن نهایی را به خود اختصاص داد، هرچند این افزایش نسبت به گروه Mn-N15 و Mn-M معنی‌دار نبود. منگنز، ماده‌ی غذایی است که وجود آن به مقدار کم برای تمام گونه‌های جانوری، ضروری است. همچنین کمبود منگنز سبب

کاهش رشد، رشد غیرطبیعی بخش دمی و کوتاه شدن بدن در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و اختلال در تولیدمثل می‌شود. در مجموع کمبود این عنصر در ماهیان باعث بدشکلی و غیرطبیعی شدن استخوان و تأخیر در ساخت سلول‌های خونی خواهد شد (۲۳). این عنصر در سیستم های آنزیمی نظیر سوپراکسید و آنزیم‌های شرکت‌کننده در اکسایش آمینواسیدها، اسیدهای چرب و گلوکز شرکت می نماید. افزودن منگنز به جیره غذایی، سبب افزایش فعالیت و تنظیم متابولیسم کربوهیدرات‌ها و برخی فعالیت‌های آنزیمی می‌شود (۲). منگنز به‌عنوان یکی از مواد معدنی کمیاب در رشد و نمو آبزیان شناخته‌شده است. همچنین این ماده معدنی برای رشد ماهی قزل‌آلا و فعالیت‌های متابولیک و بیولوژیک موجودات زنده ضروری است (۳۸). پّن و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه خود نشان دادند افزودن (۷/۲۱ تا ۲۲/۱۷ میلی‌گرم در کیلوگرم) منگنز باعث افزایش رشد و میزان منگنز اسکلتی در کپور ماهی جوان (*Carassius auratus gibelio*) می‌گردد (۳۸). همچنین در مطالعه محمدی و همکاران (۲۰۱۶) تأثیر نانوذره اکسید منگنز (Mn_2O_3) با مقدار ۴، ۸ و ۱۲ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌عنوان مکمل معدنی غذایی بر عملکرد رشد و یاخته‌های خونی بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را بررسی کردند (۳۳). نتایج آنها نشان داد اختلاف معنی‌داری در میزان افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، نرخ کارایی پروتئین، و همچنین ضریب چاقی ماهیان بین تیمارهای مختلف وجود ندارد (P>۰/۰۵). عوامل مختلفی نظیر نوع نانوذره و اندازه آن، گونه پرورشی، مدت‌زمان آزمایش و همچنین مرحله زیستی مورد استفاده می‌تواند در تفاوت نتایج این مطالعه (شاخص‌های رشد) با پژوهش‌های یادشده مؤثر باشد.

بررسی نتایج آماری ترکیبات لاشه‌ی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانوذره سولفات منگنز و سولفات منگنز غیرنانو در مدت ۶ هفته نشان داد که بیشترین میزان پروتئین خام در بچه ماهیان تغذیه شده با تیمار حاوی ۱۵ میلی‌گرم نانوذره منگنز مشاهده شد. سایر ترکیبات شیمیایی بدن مثل میزان خاکستر و رطوبت و چربی تفاوت معنی‌داری نشان ندادند. عاشوری و همکاران (۲۰۱۵) اثرات استفاده از سطوح مختلف نانو ذرات سلنیوم در رژیم غذایی بر عملکرد فاکتورهای رشد، ترکیب عضلانی، پروفیل‌های بیوشیمیایی خون و وضعیت آنتی‌اکسیدانی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) موردبررسی قراردادند (۵). نتایج حاصل از آنالیز ترکیبات عضلانی نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تغذیه شده با نانوذره سلنیوم و گروه شاهد وجود ندارد (P>۰/۰۵) که با نتایج پژوهش حاضر همخوانی دارد.

میزان فعالیت آنزیم‌های گوارشی به فراسنجه‌های مختلفی همچون ویژگی‌های ذاتی آنزیم، میزان تولید و ترشح آن وابسته است (۴۶). بررسی‌های نشان می‌دهد مکمل‌های مواد معدنی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۴، ۲۰ و ۳۴). دراین بررسی فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان نداد. برخلاف نتایج این مطالعه آسیکوتی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند فعالیت آنزیم‌های گوارشی میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانو ذرات اکسید منگنز نسبت به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها بیشتر است (۴). به نظر می‌رسد این تفاوت می‌تواند به دلیل متفاوت بودن نوع نانوذره استفاده‌شده در مطالعه مذکور و یا گونه‌های آبزی مورد آزمایش باشد.

در ماهیان سیستم ایمنی ذاتی یا غیراختصاصی یک مکانیسم دفاعی اساسی در برابر عوامل بیماری‌زا محسوب می‌شود. تقویت این سیستم برای ماهیان پرورشی بسیار ارزشمند است چراکه ماهیان در شرایط پرورشی به دلیل تراکم زیاد در برابر بسیاری از عوامل باکتریایی فرصت‌طلب آسیب‌پذیرند (۱۱). یکی از فاکتورهای مورد بررسی بمنظور دست‌یابی به شرایط سیستم ایمنی، فعالیت لیزوزیم می‌باشد (۳۱). لیزوزیم یک آنزیم تجزیه‌کننده قوی موجود

در خون و بافت‌های لنفوئید ماهیان است. این آنزیم دارای نقش زیادی در ایمنی ماهی بوده و یکی از مهم‌ترین فاکتورها در مقاومت طبیعی ماهیان محسوب می‌شود (۲۷). نقش لیزوزیم در عفونت به‌عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آنها و همچنین تحریک فاگوسیتوز می‌باشد (۳۵). باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده دراین مطالعه میزان لیزوزیم در تیمارها با افزایش میزان منگنز یک‌روند افزایشی داشت و بیشترین میزان لیزوزیم در ماهیان تیمار حاوی ۱۵ میلی گرم نانوذره منگنز مشاهده گردید. این افزایش می‌تواند نشان‌دهنده افزایش مقاومت ماهی در هنگام مواجهه با پاتوژن باشد. مطالعات اِل باسونی و همکاران (۲۰۱۷) در زمینه اثرات نانو ذرات مس و ویتامین C بر عملکرد رشد و پاسخ ایمنی ذاتی و مقاومت در برابر استرس در رژیم غذایی ماهی سی بریم (Pagrus major) با میزان ۰/۸، ۰/۱۰، ۰/۱۲، ۲/۸، ۲/۱ و ۲/۱۲ میلی‌گرم نانوذره مس بر کیلوگرم جیره نشان داد میزان لیزوزیم در جیره‌های حاوی نانو ذرات مس یا رژیم دارای مکمل مس بطور قابل‌توجهی نسبت به گروه شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵) (۱۳)، که با نتایج این آزمایش همخوانی دارد. آلبومین پروتئینی است که در کبد سنتز می‌شود و اندازه‌گیری آن معیار قابل‌اطمینانی است که در جهت پیش‌بینی و تعیین شدت اختلالات کبدی به کار می‌رود. نتایج این بررسی نشان داد که بیشترین میزان آن به ترتیب در تیمارهای حاوی ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم نانوذره منگنز بوده است و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها و تیمار شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). سیستم کمپلمان نقش کلیدی در ایمنی غیراختصاصی داشته و در فاگوسیتوزیس، کموتاکسی و لیزسلولی دخالت دارد. افزایش مقادیر کمپلمان موجب افزایش فعالیت فاگوسیتوزی می‌شود. C_3 ترکیب اصلی در آبشار کمپلمان است و در گروه پروتئین‌های فاز حاد جای داشته و در فرآیندهای التهابی حاد به‌شدت افزایش می‌یابد. عمده‌ی محل تولید C_3 کبد است ولی در پستانداران مونوسیت – ماکروفاژ نیز از منابع مولد خارج کبدی آن هستند (۳۲). میزان کمپلمان در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سولفات غیرنانو منگنز به‌طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بود. ولی نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانو منگنز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. تاکنون تحقیقی در زمینه اثرات نانو منگنز بر عملکرد سیستم ایمنی ماهیان انجام‌نشده است. منگنز جزء مهمی از متالوآنزیم منگنز سوپراکسیداز دیسموتاز (MnSOD) است. آنزیم MnSOD به‌عنوان یک جمع‌آوری‌کننده رادیکال‌های آزاد و جلوگیری کننده از بروز استرس اکسیداتیو، مهم‌ترین آنزیم حاوی منگنز می‌باشد (۲۶). آزمایشات انجام‌شده در ماهی نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم MnSOD با مقادیر منگنز رژیم غذایی تنظیم می‌شود (۲۳، ۲۴ و ۴۷). در نتیجه می‌توان گفت احتمالاً بهبود فعالیت این آنزیم آنتی‌کسیدانی در ماهیان تغذیه شده با جیره‌های حاوی منگنز غیرنانو و جیره‌های حاوی نانو ذرات منگنز در مقایسه با جیره فاقد منگنز موجب بهبود شرایط تولید پروتئین‌های سیستم کمپلمان در کبد گردیده است. مطالعه بهرا و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد میزان کمپلمان کپور ماهی روهو (*Labeo rohita*) تغذیه شده با جیره‌های حاوی نانو ذرات آهن و سولفات آهن نسبت به گروه شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (۸)، این نتایج با نتایج آزمایش حاضر همخوانی دارد. در سایر شاخصه‌های ایمنی غیراختصاصی مثل گلوبولین و پروتئین کل اختلاف معنی-داری در تیمارهای مختلف با گروه شاهد مشاهده نگردید. به‌طورکلی نتایج این مطالعه نشان داد گنجاندن نانوذرات منگنز تأثیر معنی‌داری بر ترکیبات شیمیایی بدن و فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ندارد، اما برخی از پاسخ‌های ایمنی این‌گونه را تحت تأثیر قرار می-دهد.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم شرکت دانش بنیان احرار شرق سرکار

خانم دکتر دیوبندی به دلیل فراهم نمودن نانو ذرات سولفات منگنز سپاسگزاریم. این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه خلیج‌فارس انجام‌شده است.

منابع

۱. جوهری، س.ع.، و حسینی، س.، ۱۳۹۳. سمیت تغذیه‌ای کلویید نانو ذرات نقره در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله علمی شیلات ایران، شماره ۱، صفحات ۳۱-۲۳.

۲. ملک نیا، ن.، و شهبازی، پ.، ۱۳۷۸. بیوشیمی عمومی، انتشارات دانشگاه تهران، شماره مجله ۱، صفحات ۱۰۴-۸۷.

3. Anson, M. L., 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin, Journal of General Physiology, 22, PP: 79–89.

4. Asaikkutti, A., Bhavan, P. S., Vimala, K., Karthik, M., and Cheruparambath, P., 2016. Dietary supplementation of green synthesized manganese-oxide nanoparticles and digestive enzyme activities of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 35, PP: 7-17.

5. Ashouri, S., Keyvanshokooh, S., Parvis, Salati, A., Johari, S. A., and Pashzanoosi, 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, PP: 25-29.

6. Association of Official Analytical Chemists, (AOAC). 1995. Official methods of analysis of Official Analytical Chemists International, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

7. Azari takami, G. h., 1983. Fish propagation and culture principles. Jahad Keshavarzi publication, 152 p.

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

9. Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 7, PP: 248–254.

10. Castellini, C., Ruggeri, S., Mattioli, S., Bernardini, G., Mac-chioni, L., Moretti, E., and Collodel, G., 2014. Long-term effects of silver nanoparticles on reproductive activity of rabbit buck. System Biology Reproductive Medicine, 60: 143–150.

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

12. Ellis, A. E., 1990. Lysozyme assays. In: Techniques in Fish Immunology. Stolen, J. S., Fletcher, D. P., Anderson, B.S. and Van Muiswinkel, W.B. (eds). SOS Publication, USA, PP: 101-103.

13. El Basuini, M. F., El-Hais, A. M., Dawood, M. A. O., Abou-Zeid, A. E. S., EL-Damrawy, S. Z., Khalafalla, M. M. E. S., Koshio, S., Ishikawa, M., and Dossou, S., 2017. Effects of dietary copper nanoparticles and vitamin C supplementations on growth performance, immune response and stress resistance of red sea bream, *Pagrus major*, Aquacult Nutrition, 23(6), PP: 1329-1340.

14. Farkas, J., Christian, P., Urreas, J. A. G., Roos, N., Hassellov, M., Tollefsen, K. E., and Thomas, K. V., 2009. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Journal of aquatic toxity, 96(1), PP: 44-52.

15. 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), PP: 7014-7026.

16. Gatlin, 3rd, D., and Wilson, R. P., 1983. Dietary zinc requirement of fingerling channel catfish. The Journal of nutrition, 113(3), PP: 630-635.

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

18. Ghobadi, S., Rajabi, H., Hosseinifard, M., and Palangi, L., 2017. Survey on Effects of Different Levels of Nano Iron on Growth and Nutrition Performance in Rainbow Trout. Journal of Breeding and Aquaculture Science, 1, PP: 67–82.

19. Iijima, N., Ota, Y., and Tanaka, S., 1998. Purification and characterization of bile salt-activated lipase from hepatopancrease of red sea bream *Pagarus major*. Fish Physiology and Biochemistry, 18(1), PP: 59-69.

20. Jain, K. L., 2009. Chronic effects of heavy metals on the activity of some digestive and metabolic enzymes in *Cyprinus carpio*. Annals of Biology25(1), PP: 63-67.

21. 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), PP: 495-501.

22. 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), PP: 703-715.

23. Lin, Y. H., Lin, S. M., and Shiau, S. Y., 2008. Dietary manganese requirements of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus*× *O. aureus*. Aquaculture, 284(1), PP: 207-210.

24. Liu, K., Ai, Q. H., Mai, K. S., Zhang, W. B., Zhang, L., and Zheng, S. X., 2013. Dietary manganese requirement for juvenile cobia, *Rachycentron canadum* L. Aquaculture Nutrition, 19, PP:461-467.

25. Lovell, T., 1988. Nutrition and feeding of fish. Published by Van Nostrand Reinhold,Vol. 260, Newyork, 68 p.

26. Luo, X. G., Su, Q., Huang, J. C., and Liu, J. X., 1992. Effects of manganese (Mn) deficiency on tissue Mn-containing superoxide dismutase (MnSOD) activity and its mitochondrial ultrastructures of broiler chicks fed a practical diet. Chin. J. Anim. Vet. Sci, 23, PP: 97–101.

27. Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and shellfish immunology, 20(2), PP: 137-151.

28. Monfared, A. L., and Soltani, S., 2013. Effects of silver nanoparticles administration on the liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histological and biochemical studies. European Journal of Experimental Biology, 3(2), PP: 285-289.

29. Ma, R., Hou, H., Mai, K., Bharadwaj, A., Ji, F., and Zhang, W., 2015. Comparative study on the effects of chelated or inorganic manganese in diets containing tricalcium phosphate and phytate on the growth performance and physiological responses of turbot *Scophthalmus maximus*. Aquaculture Nutrition, 21(6), PP: 780-787.

30. Maage, A., Lygren, B., and El-Mowafic, A. F. A., 2000. Manganese requirement of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fry. Fisheries science, 66(1), PP: 1-8.

31. Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and shellfish immunology. 20(2), PP: 137-151.

32. Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bgwld, J., Dalmo, R. A., 2005. Ontogeny of humeral immune parameters in fish. Fish & Shellfish Immunology, 19(5), PP: 429-439.

33. Mohammadi, Z., and Rajabi, H., 2016. Effect of manganese oxide nanoparticle on growth performance and blood cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) fingerlings. Iranian Scientific Fisheries Journal, 25(3), PP: 199-215.

34. Muralisankar, T., Bhavan, P. S., Radhakrishnan, S., Seenivasan, C., Manickam, N., and Srinivasan, V., 2014. Dietary supplementation of zinc nanoparticles and its influence on biology, physiology and immune responses of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biological trace element research, 160(1), PP: 56-66.

35. Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., and Austin, B., 2007. Bacillus subtilis AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss,* Walbaum). Applied Microbioligy, 103(5), PP: 1699-1706.

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

37. Ogino, C., and Yang, G. Y., 1978. Requirement of rainbow trout for dietary zinc. Bull JPN. Soc. Sci. Pish, 44, 1025 p.

38. 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), PP: 459-463.

39. Prochorov, A. M., Pavlov, G. V., Okpattah, G. A. C., and Kaetanovich, A. V., 2002. The effect of nano-disperse iron on the biological parameters of fish. 10th foresight conference on molecular Nanotechnology, PP: 11-13 October, Maryland.

40. Sotoudeh, E., Abedian Kenari, A., and Khodabandeh, S., 2013. Apparent lipid and fatty acid digestion, retention of lipid and growth performance in Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*) fry fed dietary n-3 highly unsaturated fatty acids and vitamin E. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 22(3), PP: 74-90.

41. Sotoudeh, E., Amiri Moghaddam, J., Shahhosseini, G., and Aramli, M. S., 2016. Effect of Dietary Gamma-irradiated and Fermented Soybean Meal on the Growth Performance, Body Composition, and Digestive Enzymes Activity of Caspian Brown Trout, *Salmo trutta caspius*, Juvenile. Journal of the World Aquaculture Society, 47(6), PP: 830-842.

42. Tacon, A. G. J., 1990. Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp. Argent Laboratories Press, PP: 4-24.

43. 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, PP: 68-73.

44. Vosoghi, G. H., and Mostajir, B., 1999. Freshwater fishes. Tehran university publication, 317 p.

45. Watanabe, T., Kiron, V., and Satoh, S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture, 151(1), PP: 185-207.

46. Yan, T., Teo, L. H., and Sin, Y. M., 1996. Effects of metals on α-amylase activity in the digestive gland of the green mussel, *Perna viridis* L. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 56(4), PP: 677-682.

47. Ye, C. X., Tian, L. X., Yang, H. J., Liang, J. J., Niu, J., 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(6), PP: 608-614.

48. Zhang, H., Sun, R., Xu, W., Zhou, H., Zhang, W., and Mai, K., 2016. Dietary manganese requirement of juvenile large yellow croaker *Larimichthys crocea* (Richardson, 1846). Aquaculture, 450, PP: 74–79.

49. 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(1), PP: 78-81.

Nonspecific immune responses, activity of digestive enzymes and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing manganese sulfate nanoparticles

Sotoudeh E.[1], Amiri Behrosi A.[1], Bahadori R.[1], Habibi H.[2] and Moramazi S.[2]

[1] Dept. of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, I.R. of Iran

[2] Dept. of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, I.R. of Iran

Abstract

The effects of dietary Manganese sulfate nanoparticles on digestive enzyme activity and non-specific immune responses for rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles were determined. Four-hundred rainbow trout (with an initial average weight of 0.8±0.1 g) were randomly distributed into four treatments, with three replicates and fed with four diets including a control diet (without manganese), Mn-M (containing manganese sulfate), Mn-N10 (containing 10 mg/kg manganese nanoparticles), Mn-N15 (containing 15 mg/kg manganese nanoparticles) for six weeks. At the end of the experiment, the average weight of fry fed the control diet (without manganese) was lower than other treatments and was significantly different compared to the groups fed diets containing manganese sulfate nanoparticles ($P<0.05$). The crude protein in juveniles fed diets containing manganese was significantly higher compared to the control group ($P<0.05$). Amylase, lipase and protease activity did not show statistically significant differences ($P>0.05$). Plasma lysozyme activity of fish fed with Mn-N10 and Mn-N15 were significantly higher than fish fed control diet ($P<0.05$). Plasma complement activity was significantly higher in Mn-M compared to control treatment ($P<0.05$) but did not show significant difference with other treatments ($P>0.05$). The results obtained in this study revealed that inclusion of manganese nanoparticles has no significant impact on activities of digestive enzymes in rainbow trout, but influences some immune responses of this spices.

Key words: Dietary supplement, Nanoparticles, Nutrition, Lysozyme, Complement, Rainbow trout