تاثیر نانوذره روی در جیره غذایی بر شاخص‌های اریتروسیتی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792)

- **مریم جعفرپور:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
- **هومن رجبی‌اسلامی*:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵
- **مهدی سلطانی:** گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳
- **شهناز پورحسینی:** گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: ۱۴۵۱۵-۷۷۵

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۳

چکیده

پژوهش حاضر به مطالعه تاثیر نانوذره روی به‌عنوان مکمل معدنی در جیره غذایی بر خصوصیات خون‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شامل تعداد گلبول‌های قرمز همراه با اندیس‌های خونی پرداخت. تعداد ۹۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۰/۴۱±۱۷/۲۲ گرم) تهیه و پس از توزیع تصادفی به تعداد مساوی میان ۱۸ فضای آزمایشی (شش تیمار با سه تکرار) برای ۲ روز با شرایط کارگاهی سازگار شدند. جیره پایه بدون افزودن مکمل روی آماده و به‌عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. پنج جیره غذایی دیگر با افزودن ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ میلی‌گرم نانوذره روی (قطر ۴۰ تا ۶۰ نانومتر) و ۷۰ میلی‌گرم سولفات روی به هر کیلوگرم غذای پایه به‌عنوان تیمارهای مختلف آزمایشی تهیه گردیدند. ماهیان برای ۸ هفته با جیزه‌های مربوط به هر تیمار تغذیه و ویژگی‌های اریتروسیتی آن‌ها در انتهای آزمایش بررسی شد. نتایج نشان داد میزان هموگلوبین، هماتوکریت، و متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) در تیمار ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم جیره در بالاترین میزان نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی قرار داشت ($p<0/05$). هم‌چنین بیش‌ترین تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) نیز در تیمار ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم جیره مشاهده شد، که البته اختلاف معنی‌داری را با تیمار ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی نشان نداد. یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که مقادیر مختلف نانوذره روی به‌عنوان یکی از اشکال نوین عناصر فلزی موجب بهبود اغلب شاخص‌های اریتروسیتی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد.

کلمات کلیدی: نانوذره، روی، گلبول‌های قرمز، اندیس‌های اریتروسیتی، *Oncorhynchus mykiss*

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: rajabi.h@srbiau.ac.ir

مقدمه

پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از صنایع مهم تولید پروتئین است که براساس تراکم ذخیره‌سازی به اشکال متراکم، نیمه‌متراکم و حتی گسترده انجام می‌گیرد (Cha و همکاران، ۲۰۰۸). حفظ سلامت ماهیان در هر یک از این روش‌های پرورشی مستلزم تغذیه مناسب برای ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و هم‌چنین حفظ رشد مناسب ماهیان پرورشی است (Amar و همکاران، ۲۰۰۴؛ Landolt، ۱۹۸۹). امروزه انواع مختلفی از جیره‌های غذایی برای سنین مختلف ماهیان پرورشی طراحی شده تا بتواند جوابگوی نیاز رو به افزایش جوامع بشری به پروتئین باشند.

مواد معدنی از اجزای تمام جیره غذایی آبزیان پرورشی هستند که برای انجام بسیاری از فرآیندهای متابولیکی و سلامت آبزیان پرورشی ضروری می‌باشد (احتشامی، ۱۳۸۶). اغلب جیره‌های غذایی قادر به تامین کامل نیازهای معدنی در ماهیان نبوده و ضروری است که این کمبودها در قالب مکمل‌های ویتامینی و معدنی به جیره‌های غذایی اضافه گردند. روی (Zn) یکی از عناصر ضروری برای ماهی است که در اغلب اندام‌ها، بافت‌ها و مایعات بدن به‌عنوان تثبیت‌کننده غشاء و اجزای سلولی عمل می‌کند (Chvapil، ۱۹۷۳). عنصر روی هم‌چنین بر شکل بدن اثر گذاشته (Yamaguchi و همکاران، ۱۹۸۷) و موجب رشد طبیعی و توسعه اسکلتی در آبزیان می‌گردد (Yamaguchi و همکاران، ۲۰۰۵). روی نقش اصلی را در فعالیت هورمون‌هایی مانند انسولین، گلوکاگون، کورتیکوتروپین‌ها و هم‌چنین گنادوتروپین‌ها ایفا می‌کند (Coulston و Nandona، ۱۹۸۰). فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شرکت در سیستم‌های دفاعی از دیگر نقش‌های روی است (Powell، ۲۰۰۰)، به‌طوری‌که کاهش سطح این عنصر فلزی موجب استرس اکسیداتیو در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود (Hidalgo و همکاران، ۲۰۰۲). علاوه بر این نقش روی در بسیاری از فرآیندهای سلولی نظیر تکثیر سلولی، تولیدمثل، ایمنی و مقاومت در برابر رادیکال‌های آزاد به‌خوبی ثابت شده است (Fountoulaki و همکاران، ۲۰۱۱؛ Tokudome و همکاران، ۲۰۱۱؛ Wintergerst و همکاران، ۲۰۰۷؛ Carpene و همکاران، ۲۰۰۳؛ Caulfield و همکاران، ۱۹۹۸).

هرچند عناصر فلزی مانند مس، آهن و روی برای سوخت و ساز طبیعی ماهی ضروری بوده و لازم است که از طریق آب یا غذا دریافت گردند، مقادیر بیش از حد این ترکیبات نیز قادر به ایجاد اثرات سمی بر آبزیان خواهد بود. تحقیقات نشان می‌دهد که مقادیر بالای روی می‌تواند به ایجاد سیتوپنی (Cytopenia) یا کاهش یاخته‌های خونی منجر گردد (Irving و همکاران، ۲۰۰۳). علاوه بر این مقادیر بالای روی در خون ممکن است موجب کاهش کارایی مس (Maret و Sandstead، ۲۰۰۶؛ Willis و همکاران ۲۰۰۵) و در نتیجه اختلالاتی نظیر کم‌خونی، لوکوپنی و نوتروپنی شود (Salzman و همکاران، ۲۰۰۲). هم‌چنین مقادیر بالای روی می‌تواند با تأثیر بازدارندگی بر آزادسازی آهن از منابع ذخیره‌ای موجب کم‌خونی ناشی از فقر آهن گردد.

از سوی دیگر روی در ساخت آنزیم‌های آنیدراز کربن و سوپراکسید دیسموتاز گلبول‌های قرمز شرکت داشته و در نتیجه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی برای حفظ و نگه‌داری غشای اریتروسیت‌ها و جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد مطرح است (Tomova و همکاران ۲۰۰۹ ؛ ÓDell و همکاران، ۱۹۸۷؛ Hambidge و همکاران ۱۹۸۶). گزارشات مختلف نشان می‌دهند که روی می‌تواند نقش مهمی در توسعه اریتروسیت‌ها و گلبول قرمز ایفا کند (Sahin و همکاران، ۲۰۰۵) لذا ترکیبات مختلف روی (سولفات روی، نیترات روی، کلرید روی، کربنات روی و اکسید روی) با غلظت‌های مختلف برای تعیین کم‌ترین میزان مورد نیاز روی در جیره غذایی برای رشد طبیعی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد آزمایش قرار گرفته است (Satoh و همکاران، ۱۹۸۷).

گسترش ترکیبات نانو در سراسر جهان و کاربردهای فراوان این مواد در صنایع دارویی و غذایی موجب شده که تحقیقات مختلفی در مورد کاربرد نانوذرات فلزی به‌عنوان مکمل غذایی در موجودات مختلف از جمله ماهی صورت پذیرد. تحقیق حاضر بر این اساس و با توجه به اهمیت روی به مطالعه تاثیر نانوذره روی به‌عنوان شکل ساختمانی جدیدی از آن در جیره غذایی بر تعداد گلبول‌های قرمز همراه با دیگر اندیس‌های مربوط به اریتروسیت‌ها در قزل‌آلای رنگین‌کمان پرداخت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی جیره غذایی: نانو ذره روی (ZnO) مورد استفاده در این تحقیق به میزان یک کیلوگرم از شرکت فن‌آور سپهر پارمیس، تهران، ایران تهیه گردید که ویژگی‌های آن در جدول ۱ ارائه شده است. ذرات به‌شکل حامل آزاد (Free carrier) با اندازه‌ای بین ۴۰ تا ۶۰ نانومتر و قطر متوسطی برابر

۴۹ نانومتر بودند.

جدول ۱: خصوصیات نانوذره روی خنثی

نوع	اندازه	سطح ویژه	میزان خلوص	شکل ظاهری	چگالی
یون آزاد	۶۰-۴۰ نانومتر	۹۰ گرم بر مترمربع	۹۹ درصد	پودر سفید	۰/۶۵ گرم بر مترمکعب

جیره غذایی پایه به‌عنوان غذای مصرفی در تیمار شاهد براساس پیشنهاد Hidalgo و همکاران (۲۰۰۲) تهیه گردید (جدول ۲). اجزای مورد استفاده در این جیره غذایی از شرکت به‌پرور، کرج، ایران تهیه و تا زمان آماده‌سازی در جای خنک و به دور از نور خورشید نگه‌داری شدند. هم‌چنین اجزای مایع جیره غذایی نیز به‌منظور محافظت از تغییرات احتمالی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

اجزای مورد استفاده در جیره غذایی پس از توزین دقیق ابتدا به‌خوبی با یکدیگر مخلوط شده و سپس با افزودن مقدار کمی آب توسط هم‌زن برقی به‌شکل خمیر در آمدند. خمیر حاصله در ادامه چرخ شده و با دستگاه پلت‌زن به پلت‌هایی با اندازه ۲ میلی‌متر (متناسب با اندازه دهان بچه‌ماهیان) تبدیل شد. غذای مورد استفاده در هر یک از جیره‌های غذایی برای مقابله با هر تغییر احتمالی در ترکیب شیمیایی طی فواصل دو هفته‌ای تهیه و تا قبل از استفاده در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. میزان روی (نانو و سولفات) تیمارهای آزمایشی در حقیقت برابر با حاصل جمع روی موجود در تمام اجزای مورد استفاده برای هر یک از جیره‌های غذایی همراه با نانوذره یا سولفات روی اضافه شده به هر تیمار بود. تیمارهای آزمایشی با این وجود و برای سهولت مقایسه براساس مقدار و نوع روی دریافتی از طریق مکمل معدنی نام‌گذاری شدند.

جدول ۲: ترکیب جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان غذای پایه براساس 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

[a] مکمل معدنی (میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا): سولفات آهن، ۶/۴۹؛ سولفات منگنز ۲۰۷، ۲۰؛ سولفات مس، ۳۶/۳؛ ید ۰، ۸۴؛ حمل‌کننده، ۴/۵۵

[b] مکمل ویتامینه (میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا به استثنای موارد ذکر شده): دی کلسیم پنتوتنات ۲۶، ۸۴۰؛ پیریدوکسین (pyridoxine HCl)، ۷۷۰۰؛ ریبوفلاوین ۲/۱۳؛ نیاسینامید، ۵۵؛ فولیک اسید، ۲۲۰۰؛ تیامین، ۸۸۰۰؛ بیوتین، ۸۸؛ ویتامین B_{12}، ۵/۵ واحد بین‌المللی؛ ویتامین آی، ۸۸ واحد بین‌المللی؛ ویتامین D_3، ۱۱۰ واحد بین‌المللی؛ ویتامین آ، ۱۶۵۰۰۰۰ واحد بین‌المللی

زیست‌سنجی: تعداد ۹۰۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق از نژاد فرانسوی (Aqualand، فرانسه) با وزن متوسط ۵/۴۱±۱۷/۲۲ گرم از کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلای مازندران، جاده هراز، استان مازندران در اردیبهشت ۱۳۹۲ تهیه و به یک مزرعه محلی در رباط کریم، استان تهران منتقل شدند. ماهیان برای مدت ۲ روز با شرایط کارگاه در یک حوضچه کانالی سازگار شده و سپس به تیمارهای آزمایشی انتقال یافتند. آب کارگاه از یک منبع چاه با درجه حرارت ثابت ۰/۶±۱۷/۳ درجه سانتی‌گراد تأمین گردید.

این آزمایش در سه استخر کانالی با ابعاد ۱×۳×۱۰ متر هر یک با دبی ورودی ۳ لیتر بر ثانیه انجام گرفت که هر یک توسط توری پارچه‌ای به شش قسمت مساوی (در مجموع ۱۸ فضای آزمایشی) تقسیم شدند. فضاهای آزمایشی در ادامه بر اساس جدول ۳ به‌صورت کاملاً تصادفی به شش تیمار هر یک با سه تکرار تقسیم گردیدند. سپس تعداد ۵۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌روش کاملاً تصادفی در هر یک از فضاهای آزمایشی توزیع و برای دو روز دیگر با شرایط هر یک از فضاهای آزمایشی سازگار شدند. لازم به‌ذکر است که هیچ‌گونه

تلفات و یا علائم ظاهری ناشی از بیماری طی سازگاری ماهیان با شرایط کارگاهی مشاهده نگردید. ماهیان در هر یک از فضاهای آزمایشی برای مدت هشت هفته با مقدار مشابهی (۴ درصد وزن بدن) از جیره‌های غذایی مربوط به هر یک از تیمارها تغذیه شده و فاکتورهای خونی ماهیان نیز در انتهای مدت زمان آزمایشی بررسی گردید.

جدول ۳: تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	تیمار
۱	فاقد روی (شاهد منفی)
۲	۱۰ میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
۳	۳۰ میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
۴	۵۰ میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
۵	۷۰ میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
۶	۷۰ میلی‌گرم سولفات روی روی در هر کیلوگرم جیره غذایی (شاهد مثبت)

تعیین فاکتورهای خونی: تعداد ۵ عدد از ماهیان هر یک از تیمارهای آزمایشی در انتهای دوره مطالعاتی و پس از یک شبانه‌روز قطع غذادهی با کمک ۲۵۰ قسمت در میلیون پودر گل میخک بی‌هوش شدند (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۰). خون‌گیری از ماهیان با قطع ساقه دمی انجام گرفته و خون به‌دست آمده از تمام نمونه‌ها به لوله‌های اپندرف حاوی هپارین انتقال یافته و به‌سرعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه خون‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، شهریار انتقال یافتند.

شمارش گلبول‌های قرمز پس از رقیق‌سازی به نسبت ۱:۲۰۰ توسط محلول رقیق‌کننده هایم (Hiem's fluid) با استفاده از ملانوژ مخصوص گلبول‌های قرمز صورت گرفت. نمونه خون در ادامه زیر لام نئوبار پیشرفته قرار گرفته و تعداد گلوبول‌های قرمز خون بر حسب میلیون در میلی‌مترمکعب ($n\times10^6\ mm^{-3}$) زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردید. میزان هماتوکریت نیز بر حسب درصد طبق روش استاندارد میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. میزان ۳ میلی‌لیتر از نمونه خون فاقد ماده ضدانعقاد برای این کار وارد لوله میکروهماتوکریت گردیده و یک انتهای آن توسط خمیر مخصوص بسته شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و میزان هماتوکریت با تقسیم نسبت حجم گلبول‌های قرمز به حجم کل خون به‌صورت درصد حجم فشرده تعیین گردید (Snieszko، ۱۹۶۰).

میزان هموگلوبین به‌روش سیانومت‌هموگلوبین طبق روش Hines و Yashouv (۱۹۷۰) تعیین شد. ده میلی‌لیتر محلول درابکین برای این کار در لوله آزمایش ریخته و مقدار ۲۰ میکرولیتر از خون حین تکان دادن لوله‌ها به آرامی درون لوله‌های اپندورف اضافه شد. لوله‌های آزمایش پس از آن برای مدت ۵ دقیقه روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت تا اختلاط خون و محلول درابکین به‌خوبی انجام گیرد. غلظت هموگلوبین در انتها براساس گرم در دسی‌لیتر با تعیین میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر و مقایسه آن با منحنی استاندارد تعیین گردید.

سایر اندیس‌های مربوط به فاکتورهای خونی شامل حجم متوسط گلبولی (MCV=Mean corpuscular volume) بر اساس فمتولیتر (fl)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH= corpuscular hemoglobin Mean) بر حسب پیکوگرم در سلول (pg) و غلظت هموگلوبین داخل‌گلبولی (MCHC=Mean corpuscular hemoglobin concentration) بر حسب گرم در دسی‌لیتر ($g\ dL^{-1}$) طبق فرمول‌های زیر در هر یک از تیمارهای آزمایشی محاسبه گردیدند (طبرستانی، ۱۳۸۴).

$$MCH = \frac{\text{هموگلوبین}\times10}{\text{گلبول قرمز به میلیون}} \qquad MCV = \frac{\text{هماتوکریت}\times10}{\text{گلبول قرمز به میلیون}} \qquad MCHC = \frac{\text{هموگلوبین}\times10}{\text{هماتوکریت}}$$

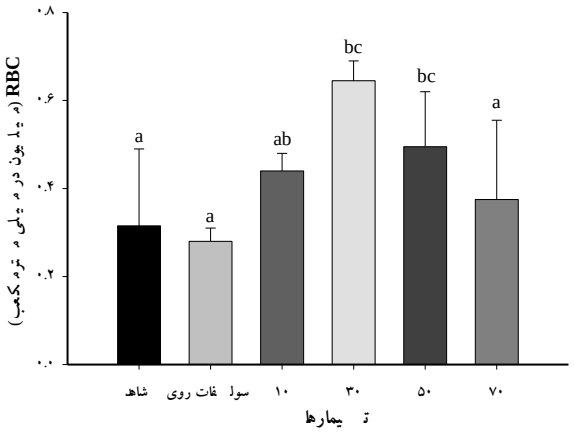
تجزیه و تحلیل آماری: تمام متغیرهای مطالعاتی در این پژوهش شامل تعداد گلبول‌های خونی، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و اندیس‌های گلبول‌های قرمز در هر یک از تیمارها به‌صورت میانگین±انحراف استاندارد حاصل از پنج بار تکرار محاسبه گردیدند. اختلاف بین تیمارها با کمک آنالیز واریانس (ANOVA) تعیین و محل اختلافات براساس آزمون

Tukey's HSD به‌دست آمد. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها برابر ۵ درصد درنظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ انجام گرفته و نمودارها به‌کمک نرم‌افزار SigmaPlot رسم شدند.

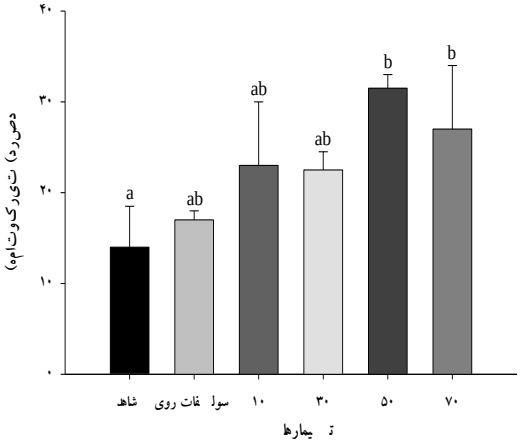
نتایج

نتایج تعداد گلبول‌های قرمز (RBC): بررسی میانگین تعداد گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای شاهد، سولفات روی، ۱۰ میلی‌گرم نانوذره روی و ۷۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم از جیره غذایی وجود ندارد (p>۰/۰۵). این درحالی بود که تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا دارای بالاترین تعداد گلبول‌های قرمز در مقایسه با سایر تیمارها بود که البته اختلاف معنی‌داری را با تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم از جیره غذایی نشان نداد (شکل ۱).

هماتوکریت: میزان هماتوکریت ماهیان تغذیه شده در تیمار شاهد با ۱۴/۵±۲/۱ درصد به کم‌ترین میزان در مقایسه با سایر تیمارها رسید (شکل ۲). هم‌چنین میزان هماتوکریت یک روند صعودی را با افزایش میزان نانوذره روی تا میزان ۵۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا نشان داده و پس از آن در تیمار حاوی ۷۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم جیره کاهش یافت، هرچند که تفاوت معنی‌داری بین این تیمار با تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا وجود نداشت (p>۰/۰۵). هم‌چنین اختلاف معنی‌داری در میزان هماتوکریت بین تیمارهای شاهد، سولفات روی، ۱۰ میلی‌گرم و ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی به ثبت نرسید (p>۰/۰۵).



شکل ۱: تغییرات تعداد گلبول قرمز (RBC) قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

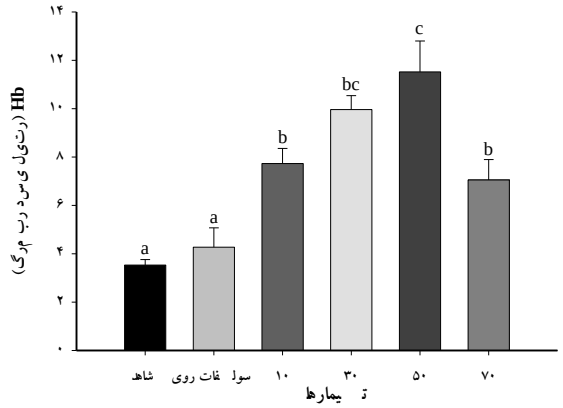


شکل ۲: میزان هماتوکریت خون قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

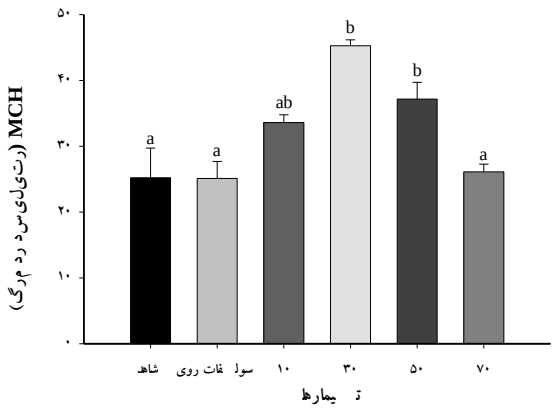
حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۵)

هموگلوبین: غلظت هموگلوبین نیز اختلاف معنی‌داری را در میان تیمارهای آزمایشی نشان داد (p<۰/۰۵). تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا با ۱۱/۵۲±۰/۰۱ گرم بر دسی‌لیتر دارای بالاترین میزان هموگلوبین در میان سایر تیمارها بود (شکل ۳). هم‌چنین تیمارهای سولفات روی، ۱۰ میلی‌گرم نانوذره روی و ۷۰ میلی‌گرم نانوذره روی به‌ترتیب کاهش معنی‌داری را در میزان هموگلوبین نسبت به تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی نشان دادند (p<۰/۰۵).

مقدار متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH): نتایج حاصل از تغییرات متوسط هموگلوبین گلبولی پس از هشت هفته آزمایش نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در میزان این متغییر بین تیمارهای آزمایشی وجود دارد (p<۰/۰۵)، به‌طوری‌که یک الگوی کاهشی شامل ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی>۷۰ میلی‌گرم نانوذره روی>۱۰ میلی‌گرم نانوذره روی>۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی>سولفات روی>شاهد را می‌توان در میان هر یک از تیمارهای غذایی مشاهده نمود.



شکل ۳: میزان هموگلوبین (Hb) خون قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

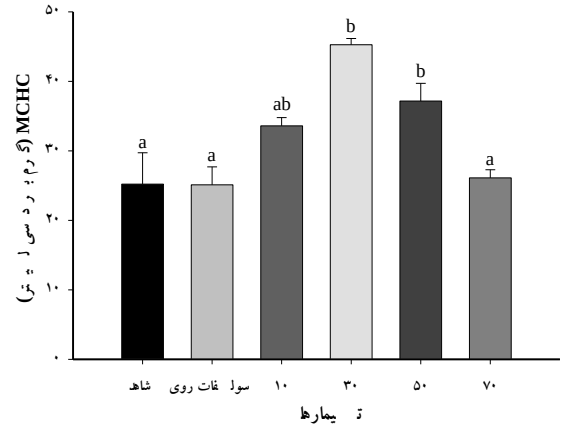


شکل ۴: میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) خون قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

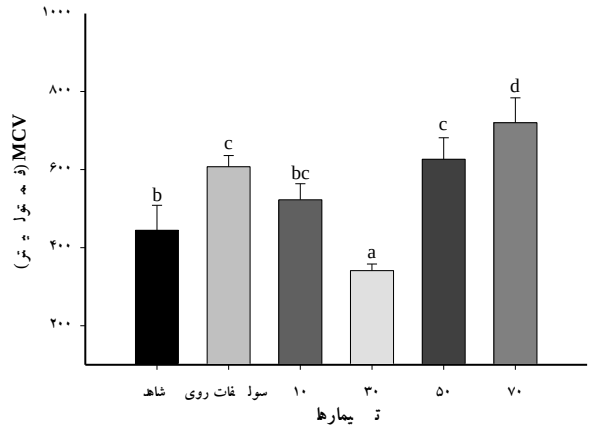
حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۵)

غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC): یافته‌های مربوط به غلظت هموگلوبین داخل گلبولی نیز در شکل ۵ ارایه گردیده است. ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد در این تحقیق دارای کم‌ترین میزان هموگلوبین داخل گلبولی در مقایسه با سایر جیره‌های غذایی بودند. تیمار ۳۰ میلی‌گرم نانوذره وری در هر کیلوگرم از جیره غذایی با ۰/۲۹±۵۸/۲۹ گرم در دسی‌لیتر دارای بالاترین میزان هموگلوبین داخل گلبولی بود. لازم به‌ذکر است که تفاوت معنی‌داری در غلظت هموگلوبین داخل گلبولی بین تیمارهای ۳۰ و ۵۰ و هم‌چنین ۱۰ و ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی به ثبت نرسید (p>۰/۰۵).

حجم متوسط گلبولی (MCV): الگوی چندان ثابت و مشخصی در میزان حجم متوسط گلبولی خون بین هر یک از تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (شکل ۶). بیش‌ترین میزان حجم متوسط گلبولی خون با ۰/۵±۷۲۰/۵ فمتولیتر در تیمار ۷۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا ثبت شد، که به شکل معنی‌داری بیش‌تر از سایر تیمارهای غذایی بود (p<۰/۰۵). هم‌چنین تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی در کیلوگرم جیره با ۰/۲۶۵±۱۰۸/۲۶۵ فمتولیتر دارای کم‌ترین حجم متوسط گلبولی خون بود.



شکل ۵: غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) خون قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی



شکل ۶: حجم متوسط گلبولی (MCV) خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (p<۰/۰۵)

بحث

نیاز به عناصر فلزی و نحوه جذب آن‌ها در اندام هدف آبزیان از جمله مباحث تغذیه‌ای است که طی چند دهه اخیر مورد مطالعه فراوان قرار گرفت است (Shaw و Handy، ۲۰۱۱؛ Bury و همکاران، ۲۰۰۳؛ Playle و همکاران، ۱۹۹۳). اشکال مختلفی از عناصر فلزی با ساختمان متفاوت براین اساس برای استفاده در آبزی‌پروری معرفی گردیده‌اند که البته هر یک با مزایا و معایبی نیز همراه بوده‌اند. تکنیک‌های نوین مهندسی شیمی در سالیان اخیر منجر به ساخت نانوفلزهای مختلفی گردیده که به‌دلیل ماهیت کوچک از ویژگی‌های متمایزی در مقایسه با اشکال معمول آن‌ها برخوردار هستند (فدایی و لاری، ۱۳۹۰). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مقادیر مختلف نانوذره روی با اندازه‌ای بین ۴۰ تا ۶۰ نانومتر به‌عنوان یکی از اشکال نوین عناصر فلزی از تأثیر معنی‌داری بر فاکتورهای اریتروسیتی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار است.

گزارشات مختلف نشان می‌دهد که منابع مختلف روی نقش مهمی در توسعه اریتروسیت‌های گونه‌های مختلف ماهیان دارد (Sahin و همکاران، ۲۰۰۵). Tavares-Dias و همکاران (۱۹۹۸) مشاهده نمودند که تعداد اریتروسیت بچه‌ماهیان تیلاپیا در مخازن بارور شده با غذای طبیعی به ۱۰۶ ×۷/۱ عدد در هر میکرولیتر خون رسید، درحالی‌که این تعداد در نمونه‌های تغذیه شده با جیره غذایی فاقد روی به ۱۰۶×۴/۴ عدد در میکرولیتر خون کاهش یافت. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که تعداد اریتروسیت‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزایش میزان نانو روی تا ۳۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا به‌حداکثر تعداد خود رسید که تفاوت معنی‌داری را با تیمار حاوی سولفات روی به‌عنوان شکل رایج مکمل معدنی روی در جیره غذایی ماهیان سردآبی داشت ($p<0/05$). روی هم‌چنین یکی از اجزای اصلی و ضروری در ساختمان آنزیم‌های کربونیک انیدراز (CA) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در گلبول‌های قرمز است (Tavares-Dias و همکاران، ۱۹۹۸؛ Hambidge و همکاران، ۱۹۸۶). به‌همین دلیل روی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مطرح بوده که برای حفظ و نگه‌داری غشای اریتروسیت‌ها و جلوگیری فعالیت رادیکال‌های آزاد ضروری می‌باشد (Tomova و همکاران، ۲۰۰۹؛ Tomova و همکاران، ۲۰۰۸؛ ÓDell و همکاران، ۱۹۸۷). بنابراین مقادیر بالاتر اریتروسیت‌ها در تیمار حاوی ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در مقایسه با تیمار شاهد و حتی تیمار حاوی سولفات روی نشان می‌دهد که روی به‌شکل نانو موجب افزایش مقاومت به استرس‌های اکسیداتیو و جلوگیری از شکنندگی گلبول‌های قرمز و در نتیجه کم‌خونی در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد (Hisar و همکاران، ۲۰۰۵).

میزان هماتوکریت بیان‌گر نسبت پلاسما به سلول‌های خونی بوده و معیار خوبی برای تعیین ظرفیت حمل اکسیژن در خون است (Larsson و همکاران، ۱۹۸۵). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان هماتوکریت قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی بیش از سایر تیمارهای آزمایشی بوده که می‌تواند بیانگر قابلیت بالاتر ماهیان در این تیمار برای انتقال اکسیژن در مقایسه با ماهیان سایر تیمارها باشد. میزان هماتوکریت در قزل‌آلای رنگین‌کمان بسته به شرایط نگه‌داری بین ۲۱ تا ۴۴ درصد در نوسان است (Miller و همکاران، ۱۹۸۳) که با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت داشته و نشان می‌دهد که نانوذره روی نه تنها تاثیر منفی بر میزان هماتوکریت نداشته، بلکه موجب تقویت میزان آن در مقادیر کم‌تر نسبت به سولفات روی می‌گردد.

اندیس‌های خونی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای مختلف این پژوهش از یک الگوی مشخص تبعیت نمی‌کرد. تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی درحالی بالاترین تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) را به‌خود اختصاص می‌داد که کم‌ترین میزان حجم متوسط گلبولی (MCV) نیز در این تیمار به ثبت رسید. به‌عبارت دیگر اندازه گلبول‌های قرمز در تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانوذره روی (علی‌رغم افزایش غیرمعنی‌دار در تعداد) به‌شکل معنی‌داری نسبت به تیمار ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی کاهش یافته است. این درحالی است که بالاترین میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) نیز در تیمار ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا به‌دست آمد. تحقیقات نشان می‌دهد که افزایش سن علاوه بر کاهش اندازه موجب تقلیل قابلیت انتقال اکسیژنی گلبول‌های قرمز می‌گردد (Satheeshkumar و همکاران، ۲۰۱۱). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که خون ماهیان در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرن نانوذره روی علی‌رغم تعداد کم‌تر از قابلیت به‌مراتب بیش‌تری برای انتقال اکسیژنی برخوردار بوده و می‌تواند نیاز ماهی را به‌ویژه در شرایط کمبود اکسیژنی مانند تراکم بالای ماهیان در سیستم‌های فوق متراکم تامین نماید.

Carmo و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که ماهیان تیلاپیای تغذیه شده با مقادیر مختلف روی دارای میزان هموگلوبین بالاتری نسبت به ماهیانی هستند که با جیره‌های فاقد روی تغذیه شده بودند. مقادیر بالاتر هموگلوبین در تیمار

۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی در این پژوهش نسبت به تیمار شاهد و یا سولفات روی نیز می‌تواند در تایید این موضوع به قابلیت بالاتر این شکل از مکمل معدنی روی (نانو روی) برای تولید آنزیم‌های فلزی نظیر گلوتاتیونین پراکسیداز داشته باشد که نقش مهمی در محافظت از هموگلوبین در مقابل تجزیه اکسیداتیو دارد (Maret و Sandstead، ۲۰۰۶). هم‌چنین مقادیر بالاتر هموگلوبین در تیمار حاوی ۵۰ میلی‌گرم نانوذره روی را می‌توان به سنتز بیشتر اسپکترین به‌عنوان مهم‌ترین پروتئین ساختمانی در اریتروسیت‌ها برای حفظ شکل ظاهری، تقارن لیپیدهای غشایی و در نتیجه کارکرد گلبول‌های قرمز برای انتقال اکسیژن نسبت داد (Bennett، ۱۹۹۰؛ Goodman و همکاران، ۱۹۸۸).

ترکیب و ساختمان شیمیایی عناصر ضروری بر میزان جذب و نحوه کارایی آن‌ها تاثیرگذار است، به‌طوری‌که آبزی‌پروران همواره به‌دنبال مواد معدنی با قابلیت بالاتر جذب توسط آبزیان پرورشی می‌باشند (Lin و همکاران، ۲۰۱۳). بررسی‌ها بیان‌گر گزارشات متناقضی از تاثیر روی با ساختمان‌های شیمیایی مختلف بر رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان است. برای مثال Hardy و همکاران (۱۹۸۷) بیان نمودند که میزان تجمع روی در قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر کیلت روی به‌مراتب بیش‌تر از روی به‌شکل سولفات و یا سولفات EDTA در نسبت‌های پایین کلسیم به فسفر می‌باشد. Gomes و Kaushik (۱۹۹۳) در مقابل گزارش نمودند که هیچ اختلاف معنی‌داری در غلظت روی پلاسما و یا لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تأثیر تغذیه با سولفات روی و یا متیونین روی وجود ندارد. Apines و همکاران (۲۰۰۱) نیز یافته‌های مشابهی از عدم تاثیر روی به اشکال سولفات روی، سولفات متیونین روی و یا روی کیلیت شده با آمینواسیدها در تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دست آوردند. با این وجود، تحقیق حاضر به‌عنوان اولین پژوهش در زمینه تأثیر روی به‌شکل نانو بر ویژگی‌های اریتروسیتی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که نانو روی قادر به افزایش معنی‌دار متغیرهای خونی مطالعاتی شامل گلبول‌های قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین، MCH و MCHC در مقایسه با سولفات روی می‌باشد ($p<0/05$). چنین اختلافی در یافته‌های پژوهش حاضر با مطالعات گذشته می‌تواند با ساختمان روی و یا خصوصیات فیزیکی آن در ارتباط باشد. مصرف ترکیبات در اندازه نانو می‌تواند به تغییرات اساسی در ساختار و خواص این عناصر منجر شود، به‌طوری‌که تا به امروز صدها محصول جدید برای اهداف مختلف در زمینه فن‌آوری نانو ساخته شده است (Griffitt و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین اندازه کوچک‌تر ذرات اکسید نانو (۴۰ تا ۶۰ نانومتر) در این پژوهش می‌تواند به قابلیت بالاتر جذب روی از جیره غذایی و در نتیجه کارایی بیش‌تر آن در سنتز سلول‌های خونی منجر شده باشد.

توجه به خصوصیات فیزیولوژیک از اهمیت ویژه‌ای در پرورش آبزیان برخوردار می‌باشد. خون یکی از حیاتی‌ترین بخش‌های بدن ماهیان است که آگاهی از شرایط آن می‌تواند آبزی‌پروری را در پیشبرد اهداف حفظ، تکثیر، نگه‌داری و پرورش آبزیان یاری نماید (غلامپور و همکاران، ۱۳۹۰؛ Feist و همکاران، ۲۰۰۴). به‌طور خلاصه، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نیاز قزل‌آلای رنگین‌کمان به روی تحت تاثیر شکل مصرفی آن قرار دارد، به‌طوری‌که روی به‌شکل نانو تاثیر معنی‌داری بر تمام فاکتورهای اریتروسیتی در این مطالعه داشته و موجب بهبود آن‌ها در مقادیری پایین‌تر از حد بهینه گزارش شده توسط NRC (۲۰۱۱) گردیده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می‌دانند که از زحمات کارکنان مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران سپاسگزاری نمایند. هم‌چنین از آقای مهندس غلامحسین خلیل‌نژاد به‌دلیل کمک‌های بی‌دریغ در تهیه بچه‌ماهیان و طراحی آزمایش میدانی و مهندس رضا عصاره در تحلیل اطلاعات تشکر می‌گردد.

منابع

۱. **احتشامی، ف.، ۱۳۸۶.** تغذیه ماهیان پرورشی، انتشارات سازمان شیلات ایران. ۳۹۶ صفحه.

۲. **سلطانی، م.؛ امیدبیگی، ر.؛ رضوانی، س.؛ مهرابی، م. و چیت‌ساز، ح.، ۱۳۸۰.** مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت شرایط کیفی آب. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره ۵۶، ردیف ۴، صفحات ۸۵ تا ۸۹.

۳. **غلامپور، ط.ع.؛ ایمانپور، م.؛ حسینی، س.ع. و شعبانپور، ب.، ۱۳۹۰.** تاثیر سطوح مختلف شوری بر شاخص‌های رشد، میزان بازماندگی، غذاگیری و پارامترهای خونی در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum* kamensky, 1901). مجله زیست شناسی ایران. دوره ۲۴، شماره ۴، صفحات ۵۳۹ تا ۵۴۹.

۴. **طبرستانی، م.، ۱۳۸۴.** خون‌شناسی پزشکی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. ۹۵۲ صفحه.

۵. **فدایی، م.ر. و لاری، م.، ۱۳۹۰.** بهبود کیفیت آب و خاک به کمک نانوذرات آهن. ماهنامه فناوری نانو. سال ۱۰، شماره ۱۱، صفحات ۲۱ تا ۲۳.

6. **Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S. and Watanabe, T., 2004.** Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shell Immuno. Vol. 16, pp: 527-537.

7. **Apines, M.J.; Satoh, S.; Kiron, V.; Watanabe, T.; Nasu, N. and Fujita, S., 2001.** Bioavailability of amino acids chelated and glass embedded zinc to rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fingerlings. Aqua Nutr. Vol. 7, pp: 221-228.

8. **Bennett, V., 1990.** Spectrin-based membrane skeleton: a multipotential adaptor between plasma membrane and cytoplasm. Physiol Rev. Vol. 70, pp: 1029-1065.

9. **Bury, N.R.; Walker, P.A. and Glover, C.N., 2003.** Nutritive metal uptake in teleost fish. J Exp Biol. Vol. 206, pp: 11-23.

10. **Carmo, M.V.; Pezzato, L.E.; Lima, M.M.B.F. and Padilha, P.M., 2004.** Optimum zinc supplementation level in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* juveniles diets. Aquaculture. Vol. 238, pp: 385-401.

11. **Carpene, E.; Andreani, G.; Monari, M.; Kindt, M. and Isani, G., 2003.** Biochemical changes during post-larval growth in White Muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed zinc-fertilized diets. Vet Res Commun. Vol. 27, pp: 215-218.

12. **Caulfield, L.E.; Zavaleta, N.; Shankar, A.H. and Merialdi, M., 1998.** Potential contribution of maternal zinc supplementation during pregnancy to maternal and child survival. Am J Clin Nutr. Vol. 68, pp: 499S-508S.

13. **Cha, S.H.; Lee, J.S.; Song, C.B.; Lee, K. and Jeon, J.Y.J., 2008.** Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculture. Vol. 278, pp: 110-118.

14. **Chvapil, M., 1973.** New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. Life Sci. Vol. 13, pp: 1041-1049.

15. **Coulston, L. and Nandona, P., 1980.** Insulin-like effect of zinc in adipocytes. Diabetes. Vol. 29, pp: 665-667.

16. **Feist, G.; Van Eenennaam, J.P.; Doroshov, S.I.; Schreck, C.B.; Schneider, R.P. and Fitzpatrick, M.S., 2004.** Early identification of sex in cultured white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using plasma steroid levels. Aquaculture. Vol. 232, pp: 581-590.

17. **Fountoulaki, E.; Morgane, H.; Rigos, G.; Antigoni, V.; Menti, E.; Sweetman, J. and Nengas, I., 2011.** Evaluation of zinc supplementation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juvenile diets. Aquacul Res. Vol. 41, pp: 208-216.

18. **Griffitt, R.J.; Hyndman, K.; Denslow, N.D. and Barber, D.S., 2009.** Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. Toxicolo Sci. Vol. 107, pp: 404-415.

19. **Gomes, E.F. and Kaushik, S.J., 1993.** Effect of replacement of dietary inorganic zinc by zinc methionine on vegetable and animal protein utilization by rainbow trout. In Fish Nutrition in Practice. Edited by SJ Kaushik and PJ Louquet. Coll. Les Colloque, No.61, Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Paris, France. pp: 897–902.

20. **Goodman, S.R.; Krebs, K.E.; Whitfield, C.F.; Riederer, B.M. and Zagon, I.S., 1988.** Spectrin and related molecules. Crit Rev Biochem Mol Bio. Vol. 23, pp: 171-234.

21. **Hambidge, K.M.; Casey, C.E. and Krebs, N.F. 1986.** Zinc. In Trace Elements in Human and Animal Nutrition. Edited by W Mertz. Academic Press, Orlando, USA. pp: 1-137.

22. **Hardy, R.W.; Sullivan, C.V. and Koziol, A.M., 1987.** Absorption, body distribution, and excretion of dietary zinc by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Fish Physiol Bioch. Vol. 3, pp: 133-143.

23. **Hidalgo, M.C; Sito, A.; Palma, J. and Higuera, M., 2002.** Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Int J Biochem Cell Biol. Vol. 34, pp: 83-193.

24. **Hines, R.S. and Yashouv, A. 1970.** Differential leukocyte counts and total leukocyte and erythrocyte counts for some normal Israeli mirror carp. Bamidgeh. Vol. 22, pp: 106-113.

25. **Hisar, O.; Beydemür, S.; GüLçin, I.; Hüsar, S.A.; YANIK, T. and Küfrevioglu, O.I., 2005.** The Effects of Melatonin Hormone on Carbonic Anhydrase Enzyme Activity in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Erythrocytes in Vitro and In Vivo. Turk J Vet Anim Sci. Vol. 29, pp: 841-845.

26. **Irving J.; Mattman A.; Lockitch G.; Farrell K. and Wadsworth L., 2003.** Element of caution: a case of reversible cytopenias associated with excessive zinc supplementation. Can Med Assoc J. Vol. 169, No. 2, pp: 129-131.

27. **Landolt, M.L., 1989.** The relationship between diet and immune response. Aquaculture. Vol. 79, pp: 193-206.

28. **Larsson, A.; Haux, C. and Sjöbeck, M.L. 1985.** Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. Ecotoxicol Environ Saf. Vol. 9, pp: 250-281.

29. **Lin, S.; Lin, X.; Yang, Y.; Li, F. and Luo, L. 2013.** Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. Vol. 84, No. 9, pp: 406-407.

30. **Maret, W. and Sandstead, H.H., 2006.** Zink requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. J Trace Elem Med Biol. Vol. 20, pp: 3-18.

31. **Miller, W.R.; Hendricks, A.C. and Cairns, J.J.R., 1983.** Normal ranges for diagnostically important hematological and blood chemistry characteristics of rainbow trout *Salmo gairdneri*. Can J Fisher Aqua Sci. Vol. 40, pp: 420-425.

32. **NRC, 2011.** Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academies Press, Washington D.C. 376 p.

33. **ÓDell, B.L.; Browning, J.D. and Reeves, P.G., 1987.** Zinc deficiency increases the osmotic fragility of rat erythrocytes. J Nutr. Vol. 117, pp: 1883-1889.

34. **Playle, R.C.; Dixon, D. and Burnison, K., 1993.** Copper and cadmium binding to fish gills: modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands Can J Fisher Aqua Sci. Vol. 50, pp: 2667-77.

35. **Powell, S.R., 2000.** The antioxidant properties of zinc. J Nutr. Vol. 130, pp: 47S-1454S.

36. **Salzman, M.B.; Smith, E.M. and Koo, C., 2002.** Excessive oral zinc supplementation. J Pediat Hematol/ Oncol. Vol. 24, No. 7, pp: 582-584.

37. **Sahin, K.; Smith, M.O.; Onderci, M.; Sahin, N.; Gursu, M.F. and Kucuk, O., 2005.** Supplementation of zinc from organic or inorganic source improves performance and antioxidant status of heat distressed quail. Poult Sci. Vol. 84, pp: 882-887.

38. **Satoh, S.; Takeuchi, T. and Watanabe, T., 1987.** Availability to rainbow trout of zinc in white fish meal and of various zinc compounds. Nippon Suisan Gakkaishi. Vol. 53, pp: 595-599.

39. **Shaw, B.J. and Handy, R.D., 2011.** Physiological effects of nanoparticles on fish: A comparison of nanometals versus metal ions. Environ Int. Vol. 37, pp: 1083-1097.

40. **Snieszko, S.F., 1960.** Microhaematocrit as a tool in fisheries management. Special scientific report fisheries. No. 314. US Department of the Interior Fish and Fisheries Wildlife Special Science report, UAS, 15 P.

41. **Satheeshkumar, P.; Ananthan, G.; Senthil Kumar, D. and Jagadeesan, L., 2011.** Haematology and biochemical parameters of different feeding behavior of teleost fishes from Vellar estuary, India. Comp Clin Pathol. Vol. 21, No. 6, pp: 1-5.

42. **Tavares-Dias, M.; Sandrim, E.F.S. and Sandrim, A., 1998.** Características hematológicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) Cuvier, 1818 (Osteichthyes: Characidae) em sistema de monocultivo intensivo. I. Serie eritrocitária. Revista Brasileira de Biologia. Vol. 58, pp: 197-202.

43. **Tokudome, Y.; Ito, A. and Otsuka, M., 2011.** Effect of Zinc-Containing β-Tricalcium Phosphate Nano Particles Injection on Jawbone Mineral Density and Mechanical Strength of Osteoporosis Model Rats. J Pharm Soc Jpn. Vol. 34, No. 8, pp: 1215-1218.

44. **Tomova, E.; Arnaudov, A. and Velcheva, L. 2008.** Effects of zinc on morphology of erythrocytes and spleen in *Carassius gibelio*. J Environ Biol. Vol. 29, No. 6, pp: 897-902.

45. **Tomova, E.S.; Velcheva, I.G. and Arnaudov, A.D., 2009.** Influence of copper and zinc on the erythrocyte-metric parameters of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae), II. Influence of zinc on the erythrocyte-metric parameters of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae). Bulgar Agri Sci. Vol. 15, No. 3, pp: 183-188.

46. **Willis, M.S.; Monaghan, S.A.; Miller, M.L.; McKenna, R.W.; Perkins, W.D.; Levinson, B.S.; Bhushan, V. and Kroft, S.H., 2005.** Zinc-induced copper deficiency: a report of three cases initially recognized on bone marrow examination. Am J Clin Pathol. Vol. 123, No. 1, pp: 125-131.

47. **Wintergerst, E.S.; Maggini, S. and Horing, D.H., 2007.** Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. Ann Nutrition and Metab. Vol. 51, No. 4, pp: 301-323.

48. **Yamaguchi, M.; Oishi, H. and Suketa, Y., 1987.** Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture. Biochem Pharmacol. Vol. 36, pp: 4007-4012.

49. **Yamaguchi, M. and Fukagawa, M., 2005.** Role of zinc in regulation of protein tyrosine phosphatase activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells: zinc modulation of insulin-like growth factor-I's effect. Calcified Tissue Int. Vol. 76, pp: 32-38.