تاثیر نانو ذره آهن بر آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم و فلور باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **علیرضا ولی‌پور***: پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران
- **حمیده کردی**: پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران
- **محمود حافظیه**: سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، تهران، ایران
- **علیرضا شناورماسوله**: موسسه تحقیقات بین المللی تاس‌ماهیان دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٦ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٦

چکیده

در این تحقیق، تاثیر نانو ذره آهن بر آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) سرم و فلور باکتریایی روده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ماهیان پس از زیست‌سنجی با میانگین وزن ۱۲/۹٤±۰/۳۵ گرم (میانگین± انحراف معیار) به‌صورت تصادفی در ۱۲ مخزن ۵۰۰ لیتری (۳۰ عدد در هر مخزن) رهاسازی و با رژیم‌های غذایی مختلف، دو بار در روز، به‌مدت هشت هفته تغذیه گردیدند. برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد. جیره غذایی تیمار شاهد با اضافه کردن ٦٠ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر FeSO4.7H2O به سایر مواد خشک جیره و جیره سایر تیمارهای حاوی نانو ذرات آهن با اضافه کردن ۳۰، ٦٠ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذرات Fe3O4 به‌عنوان منبع آهن (جایگزین سولفات آهن) به جیره پایه، آماده گردید. زیست‌سنجی برای بررسی وزن بدن هر ١٤ روز یک‌بار صورت گرفت. جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و فلور باکتریایی روده در پایان دوره آزمایشی از ماهیان به‌صورت تصادفی (۳ عدد از هر تکرار) نمونه‌گیری صورت گرفت. باتوجه به نتایج بالاترین میزان AST و ALT در تیمار شاهد و تیمار حاوی ٦٠ میلی‌گرم برکیلوگرم نانو ذره آهن به‌دست آمد و هم‌چنین بین تیمار شاهد و تیمار حاوی۹۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نانو ذره آهن نیز اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). کم‌ترین میزان این آنزیم‌ها در تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نانو ذره آهن مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری با تیمار حاوی ۹۰ میلی‌گرم برکیلوگرم نانو ذره آهن نداشت (P>۰/۰۵). هم‌چنین دوزهای مختلف نانو ذره آهن تاثیر معنی‌داری بر میزان باکتری‌های اسیدلاکتیک روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت، اما تعداد کل باکتری‌های روده (توتال کانت) در تیمار حاوی ۳۰ میلی گرم نانوذره آهن در کیلوگرم غذا به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کم‌تر بود (P<۰/۰۵).

کلمات کلیدی: نانو ذره، آهن، آنزیم‌های متابولیک، باکتری، قزل‌آلای رنگین‌کمان

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: valipour40@gmail.com

مقدمه

نانو فناوری درک و کنترل ماده در ابعاد ۱ تا ۱۰۰ نانومتر است که در آن پدیده‌های منحصر به‌فرد، کاربردهای جدید و شگرفی را ممکن می‌سازند (راشدی و همکاران، ۱۳۸۹). در سال‌های گذشته توجه زیادی به سنتز ذرات آهن در اندازه نانو معطوف شده است که دلیل این امر افزایش توانایی‌های این ذرات با افزایش مساحت سطح و افزایش فعالیت سطحی در ابعاد نانو است (Sun و همکاران، ۲۰۰۶). فلز آهن در گروه عناصر ضروری قرار دارد چرا که نقش مهمی در سیستم‌های زیستی ایفا می‌کند. آهن برای بسیاری از فرایندهای متابولیکی نظیر حمل اکسیژن، متابولیسم داروها، سنتز استروئیدها، سنتز DNA، تولید ATP و نقل و انتقال الکترون‌ها نیاز است (Crichton، ۱۹۹۱). هم‌چنین آهن یکی از مهم‌ترین مواد معدنی در جریان زندگی باکتری‌ها بوده و در سنتز مواد سلولی برای رشد طبیعی میکروب‌ها لازم است (نایبی، ۱۳۶۹). البته عناصر ضروری ازجمله آهن زمانی‌که بیش از حد دریافت شوند، می‌توانند اثرات سمی ایجاد کنند (Mendil و همکاران، ۲۰۰۵). Talor و Webster(۲۰۰۹) بیان کردند غلظت‌های مختلف نانو ذرات اکسیدآهن سوپر پارا مغناطیس(۱،۰/۱ و ۲ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر)منجر به کاهش تصاعدی تراکم باکتری Staphylococcus epidermidis می‌شود.هم‌چنین Babushkina و همکاران (۲۰۱۰) بیان نمودند، نانوذرات‌آهن در غلظت‌کم اثر تحریک‌کنندگی‌و در غلظت‌های بالا اثر بازدارندگی روی رشد باکتری *Staphylococcus aureus* دارند. همچنین Tran و همکاران (۲۰۱۰) اثر غلظت‌های مختلف Fe_2O_3 (غلظت پایین۰/۰۳، متوسط ۰/۳ و زیاد ۳ میلی گرم بر میلی‌لیتر) را بر باکتری S. aureus در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که انکوباسیون با غلظت‌های بالا به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش نسبت سلول‌های زنده به مرده می‌شود.

آنزیم‌های سرمی ازجمله آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) شاخص‌های بسیار مهمی در ارزیابی سلامتی ماهیان هستند که در متابولیسم پروتئین و هم‌چنین آمینواسیدها نقش‌دارند(Peres و همکاران، ۲۰۱۴). Karthikeyeni و همکاران(۲۰۱۳) بیان کردند، نانو ذرات اکسید آهن منجر به تغییرات مثبت و معنی‌داری در عوامل بیولوژیکی (آنزیم‌های AST و ALT سرم) ماهی تیلاپیای موزامبیک می‌شوند. باتوجه‌به کمبوداطلاعات‌درباره تاثیر نانو ذرات آهن بر آنزیم‌های متابولیک سرم و باکتری‌های روده ماهیان، در این تحقیق اثرات نانوذره Fe_3O_4 برآنزیم‌های AST و ALT سرم‌و فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در شرکت ریز جلبکی پارسیان واقع در شهرک نیمه صنعتی پارک علم و فناوری فشتام، استان گیلان، انجام شد. در این تحقیق از نانو ذرات آهن (Fe_3O_4) در اندازه ۱۰-۸ نانومتر که از شرکت NGC واقع در پارک‌علم‌وفناوری‌گیلان(رشت-ایران) خریداری شده بود استفاده گردید. تغذیه بچه‌ماهیان به‌وسیله جیره دست‌ساز با ترکیب زیر (جدول ۱، ۲ و ۳) صورت گرفت.

جدول ۱: ترکیب جیره پایه

ردیف	ترکیبات	میزان در جیره ٪
۱	ژلاتین	۲/۵
۲	نشاسته	۹
۳	آرد گندم	۷/۸۴
۴	آرد ذرت	۳
۵	پودر ماهی	۴۸
۶	پودر سویا	۱۲/۲۹
۷	سلولز	۲/۴۷۷۸
۸	روغن ماهی	۹/۸۵
۹	Cویتامین	۰/۰۲
۱۰	کولین کلراید	۰/۵
۱۱	متیونین	۱/۵
۱۲	لیزین	۱/۵
۱۳	مخلوط ویتامینی	۱/۵
۱۴	مخلوط معدنی (جدول ۲)	۰/۰۲۲۲

جدول ۲: ترکیبات مخلوط معدنی بدون افزودن آهن در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان

ردیف	ترکیبات	میزان میلی‌گرم / کیلوگرم
۱	سولفات منگنز	۵۰
۲	سولفات مس	۶
۳	یدید پتاسیم	۶
۴	سولفات روی	۱۰۰

جدول ۳: آنالیز جیره پایه

ردیف	ترکیبات مغذی	میزان در جیره (٪)
۱	پروتئین خام	۴۵
۲	چربی خام	۱۴
۳	رطوبت	۷/۵
۴	خاکستر	۵
۵	کربوهیدرات	۲۴
۶	فیبر	۱/۵
۷	انرژی خام (کیلوکالری/کیلوگرم)	۴۷۱۰

جیره‌های آزمایشی: برای تهیه جیره‌های آزمایشی مواد اولیه خشک (جدول ۱)، آسیاب شده و با یکدیگر مخلوط شدند، جیره تیمار شاهد با اضافه کردن ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم پودر FeSO4.7H2O (خریداری‌شده از شرکت Sigma-Aldrich، ایالات متحده آمریکا) به عنوان منبع آهن (مشابه غذاهای تجاری) به سایر مواد خشک جیره و جیره سایر تیمارهای حاوی نانو ذرات آهن با اضافه کردن ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات Fe3O4 به‌عنوان منبع آهن به جیره پایه آماده گردید، سپس روغن و آب به‌آن‌ها اضافه شد. مخلوط خمیری از چرخ گوشت عبور داده شده و پس از آن، رشته‌ها در داخل آون با دمای حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردیدند، سپس به‌صورت پلیت درآمدند و مورد آنالیز از نظر پروتئین، چربی، کربوهیدرات و خاکستر قرار گرفتند (جدول ۳).

شرایط انجام آزمایش: قبل‌از شروع آزمایش بچه‌ماهیان به‌مدت ۲۱ روز با محیط سازگار شدند. سپس ماهیان پس از زیست‌سنجی با میانگین وزن ۰/۳۵±۱۲/۹۴ گرم (میانگین± انحراف معیار) به‌صورت تصادفی در ۱۲ مخزن ۵۰۰ لیتری (۳۰ عدد در هر مخزن) ریخته شدند و با رژیم‌های غذایی مختلف، ۴ تیمار مختلف، به‌مدت هشت هفته تغذیه گردیدند. برای هر تیمار سه تکرار درنظر گرفته شد. ماهیان دوبار در روز به‌میزان ۵ درصد وزن بدن در ماه اول و ۳ درصد وزن بدن در ماه دوم تغذیه شدند. زیست‌سنجی برای بررسی وزن بدن هر ۱۴روزیک‌بار صورت گرفت. تعویض آب به‌وسیله سیفون کردن به‌صورت روزانه انجام شد. هم‌چنین کیفیت آب در طی مدت تحقیق به‌صورت روزانه بررسی گردید. به‌طور میانگین، پی اچ آب ۰/۲±۷/۹۹ و دمای آب ۱/۳۵±۱۶/۷۱درجه سانتی‌گراد بود.

بررسی آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینو ترانسفراز سرم: جهت اندازه‌گیری آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، در پایان دوره آزمایشی از ماهیان به‌صورت تصادفی (۳ عدد از هر تکرار) نمونه‌برداری و با استفاده از سرنگ از قسمت ساقه دمی خونگیری صورت گرفت. نمونه‌های خون پس از جمع‌آوری از ماهیان به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و سرم آن‌ها به کمک سمپلر ۱۰۰ میکرون جدا و برای انجام آنالیزها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. سپس اندازه‌گیری آنزیم‌های فوق توسط دستگاه طیف سنج نوری و با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون انجام گرفت (Shahsavani و همکاران، ۲۰۱۰).

بررسی فلور باکتریایی روده: برای شمارش باکتری‌های روده در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تکرار به‌طور تصادفی صید و به آزمایشگاه انتقال داده شد. پس از بی‌هوشی ماهیان توسط پودر گل میخک، با استفاده از پنبه الکل ۷۰ درصد قسمت شکمی ماهیان ضد عفونی گردید. در شرایط استریل ناحیه شکمی ماهیان با تیغ اسکالپل استریل برش و روده خارج شد. روده پس از تخلیه کامل، سه بار توسط سرم فیزیولوژی استریل شستشو و پس از هموژنیزاسیون با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های ۱- ۱۰ تا ۵- ۱۰ از آن تهیه گردید. از رقت‌های تهیه شده روده به‌میزان ۰/۱ میلی‌لیتر بر روی محیط‌های کشت TSA(Tryptic Soy Agar) به‌منظور شمارش کلی باکتری‌های روده و محیط کشت اختصاصی باکتری‌های اسیدلاکتیک MRS تلقیح انجام شد. انکوباسیون پلیت‌های TSA در شرایط هوازی و MRS در شرایط بی‌هوازی به‌ترتیب در دمای ۲۵°C و ۳۰ °C انجام و پس از انکوباسیون، باکتری‌های هر پلیت برحسب واحد کلنی(CFU) در گرم، مورد شمارش قرار گرفت (Merrifield و همکاران، ۲۰۱۱).

روش‌ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده‌ها: طرح کلی این تحقیق طرح کاملاً تصادفی بود. جهت آزمون تاثیر مقادیر نانو ذره آهن جیره بر آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز، آلانین آمینوترانسفراز و فلور باکتریایی روده بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از آنالیزواریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن استفاده شد. تمامی آنالیزهای آماری با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS 18 موردارزیابی قرارگرفت. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ مشخص شد.

نتایج

آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفر از سرم: با توجه به نتایج به‌دست آمده میزان آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای حاوی ۳۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذره آهن بود (P<۰/۰۵) اما اختلاف معنی‌داری بین تیمار شاهد با تیمار حاوی ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). هم‌چنین بین تیمارهای حاوی ۳۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن و بین تیمارهای حاوی ۶۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵) (جدول ۴).

فلور باکتریایی روده: همان‌طورکه در جدول ۵ مشاهده می‌گردد دزهای مختلف نانوذره آهن تاثیر معنی‌داری بر میزان باکتری‌های اسید لاکتیک روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت (P>۰/۰۵)، اما تعداد کل باکتری‌های روده (توتال کانت) در تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانوذره آهن در کیلوگرم غذا به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کم‌تر بود (P<۰/۰۵) درحالی‌که اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای دیگر وجود نداشت (P>۰/۰۵).

جدول ۴: تاثیر دزهای مختلف نانو ذره آهن در جیره بر آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

	۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانو ذره آهن	۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانو ذره آهن	۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانو ذره آهن	شاهد (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سولفات آهن)
AST (u/L)	۱۷٤/٥٠±٦٦/٥٠^{bc}	۲۳۴/۵۰±۱۷/۵۰^{ab}	۱۱۷/۵۰±۳/۵۰^{c}	۲۸۶/۵۰±۲۵/۵۰^{a}
ALT (u/L)	۳/۵۰±۱/۵۰^{bc}	۴/۷۵±۰/۲۵^{ab}	۲/۰۰±۰/۰۰^{c}	۷/۲۵±۲/۲۵^{a}

حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۵: تاثیر دزهای مختلف نانو ذره آهن در جیره بر فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*)

تیمارها	شمارش کلی باکتری‌ها (Log CFU g^{-1})	باکتری‌های اسیدلاکتیک (Log CFU g^{-1})
شاهد (۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم سولفات آهن)	۶/۰۵±۰/۰۴^{a}	۰/۵۷±۰/۰۶
۳۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانو ذره آهن	۴/۱۶±۰/۰۹^{b}	۰/۵۹±۰/۰۴
۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانو ذره آهن	۵/۹۹±۰/۰۶^{a}	۰/۶۱±۰/۰۴
۹۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانو ذره آهن	۵/۹۷±۰/۰۴^{a}	۰/۶۰±۰/۰۹

حروف مختلف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

در این مطالعه اثر نانوذرات آهن بر آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز سرم و فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، یکی از محبوب‌ترین ماهیان مصرفی در ایران بررسی گردید تا در اثر تماس ماهیان با این نانوذره به‌مدت هشت هفته تأثیر آن بررسی و در صورت مشاهده اثرات سوء یا مفید نقطه عطفی برای انجام پژوهش‌های بعدی در زمینه این عنصر در سطح نانوذره باشد. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای توانایی بالقوه برای مطالعات مولکولی متابولیسم آهن به‌علت ویژگی ذخیره‌سازی آهن در خون و شکل‌های تجمع بافتی آهن می‌باشد، هم‌چنین Bury و همکاران (۲۰۰۳) پیشنهاد کردند که ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یک مدل خوب برای مطالعات آینده روی متابولیسم آهن در مهره‌داران است. مقدار آهن در ماهی نسبت به پستانداران بسیار پایین است (Van Dijk و همکاران، ۱۹۷۵). به‌نظر می‌رسد که مکانیسم جذب آهن از لوله گوارش و ذخیره و ترشح آن در ماهیان مشابه سایر مهره‌داران باشد. اگرچه قسمت اعظم جذب آهن در موکوس روده صورت می‌پذیرد، بخشی نیز از طریق غشای آبشش‌ها جذب می‌شود، اما غذا منبع اصلی تأمین آهن برای متابولیسم است. در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آهن از حفره صفاقی جذب شده و در غلظت‌های بالاتر در کبد، طحال و قسمت قدامی کلیه ذخیره می‌شود (Bury و Grosell، ۲۰۰۳). در تحقیق حاضر نیز جهت بررسی تأثیر نانوذرات اکسید آهن این نانوذرات در غلظت‌های مختلف به غذای ماهیان افزوده شدند.

سنجش سطوح آنزیم‌های آسپارتات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز به‌طور وسیعی در ارزیابی آسیب‌های کبدی مورد بررسی قرار می‌گیرد. آسیب‌های ایجاد شده به اندازه، غلظت و نحوه ورود نانو ذره بستگی دارد (Rezae Ranjbar Sardari، ۲۰۱۰). در این تحقیق بالاترین میزان AST و ALT در تیمار شاهد و تیمار حاوی ۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانوذره آهن بود (P<۰/۰۵) و میزان این آنزیم‌ها در تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از تیمار حاوی ۳۰ و ۹۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن بود اما بین این دو تیمار اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵). هم‌چنین کم‌ترین میزان آنزیم‌های AST و ALT در تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذره آهن مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری از تیمار شاهد و تیمار حاوی ۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم نانوذره آهن کم‌تر بود (P<۰/۰۵). با توجه به مطالعات انجام شده هرگونه آسیب به غشای سلولی منجر به رهاسازی این آنزیم‌ها به گردش خون می‌شود (Banaei و همکاران، ۲۰۱۱) اما در مواردی نیز گزارش‌هایی در رابطه با کاهش این آنزیم‌ها در مسمومیت‌ها وجود دارد. به‌عبارت دیگر در مسمومیت‌ها هم کاهش و هم افزایش این آنزیم‌ها ثبت شده است (قاسمی و همکاران، ۱۳۹۶). در گزارشی توسط Shubayer و همکاران (۲۰۰۹) مشخص شد که مهم‌ترین علت عدم تأثیرات سمی نانوذرات اکسیدآهن بر جانوران، حذف سریع آن‌ها از جریان خون توسط ماکروفاژهای موجود در کبد، طحال و گره‌های لنفاوی است که البته این حذف سریع پس از پدیده اپسونیزاسیون (تجمع پروتئین‌های خون در اطراف نانوذرات) رخ می‌دهد که باعث تحریک سیستم ایمنی

و دفع نانوذرات می‌شود. بنابراین بسیاری از نانوذرات تزریق شده به سرعت از جریان خون خارج و فقط مقدار کمی از آن‌ها فرصت نفوذ و ورود به اندام‌های مختلف بدن را پیدا می‌کنند و در نتیجه اثرات جانبی چندانی ایجاد نمی‌کنند. در بررسی‌های دقیق‌تر ثابت شده است که سلول‌های کوپفر کبد نقش اصلی و مرکزی را در خارج کردن نانوذرات مختلف از جریان خون بر عهده دارند (Sadauskas و همکاران، ۲۰۰۷). هم‌چنین Shariffi و همکاران (۲۰۰۱) بیان نمودند در عفونت‌هایی که آسیب کبدی را با خود به همراه دارند مقدار آنزیم‌های AST و ALT کاهش می‌یابند. اما به‌طور مغایر با نتیجه تحقیق حاضر، شیربند (۱۳۹۰) مشاهده کرد غلظت سرمی آنزیم‌های ALP و ALT در سرم خون موش‌های دریافت‌کننده دزهای حداقل و متوسط نانوذرات اکسیدآهن (۰/۰۲و ۰/۰۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم که در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شده بود) نسبت به گروه شاهد تغییر معنی‌داری را نداشت. اما غلظت سرمی در گروه دریافت‌کننده دز حداکثر (۰/۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری را در ALT نشان داد. هم‌چنین در گروه‌های دریافت‌کننده دز متوسط و حداکثر نانو ذره آهن غلظت سرمی آنزیم AST نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت. بررسی بافت‌شناسی کبد موش نیز بیانگر این موضوع بود که احتمالاً نانو ذرات اکسیدآهن با تخریب سلول‌های هپاتوسیت و با تاثیر بر نفوذپذیری غشای سلول‌های کبدی غلظت سرمی آنزیم‌ها را تغییر می‌دهند. راد (۱۳۹۰) بیان نمود نانو ذرات اکسید آهن (Fe_2O_3) بر سیستم ایمنی و مراکز خونساز موش تاثیرگذار بوده و در دراز مدت باعث تغییر در سلول‌های خونی و نیز در دیگر پارامترها می‌شود. نانو ذرات اکسیدآهن علاوه بر این‌که سبب کاهش سلول‌های سیستم ایمنی بدن می‌گردد با تخریب سلول‌های هپاتوسیت و با تاثیر بر نفوذپذیری غشای سلول‌های کبدی غلظت سرمی آنزیم‌ها را تغییر داده که افزایش ورود آنزیم‌ها (ALT, AST, ALP) به‌داخل پلاسمای خون، آسیب کبدی را ثابت می‌کند. به‌طورکلی با توجه به این‌که میزان این آنزیم‌ها در سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تحقیقات مختلف، متفاوت بیان شده است (خارا و همکاران، ۱۳۹۲، بنایی و همکاران، ۱۳۹۱؛ غفاری و خسروانی زاده، ۱۳۹۱؛ مرتضوی‌تبریزی و همکاران، ۱۳۹۰) و این‌که قابلیت دسترسی‌زیستی به عناصر ضروری متغیر است و بستگی به ترکیب جیره غذایی دارد (Halver و Hardly، ۱۹۸۹)، هم‌چنین با توجه به عدم وجود مطالعات مشابه روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، به‌نظر می‌رسد نیاز به تحقیق بیش‌تر در استفاده از این فاکتورها در جهت پیش‌بینی وضعیت سلامت ماهیان در زمان استفاده از نانوذرات در جیره غذایی ماهیان، وجود دارد.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، دزهای مختلف نانوذره آهن تاثیر معنی‌داری بر میزان باکتری‌های اسید لاکتیک روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشت ($P>0/05$). Shrivastava و همکاران (۲۰۰۷) بیان نمودند نانوذرات نقره به‌علت گرم‌مثبت بودن باکتری‌های اسیدلاکتیک و داشتن لایه پپتیدوگلیکان ضخیم نمی‌توانند تاثیر چندانی روی این باکتری‌ها داشته باشند. در تحقیق حاضر تعداد کل باکتری‌های روده در تیمار حاوی ۳۰ میلی‌گرم نانوذره آهن در کیلوگرم غذا به‌طور معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها کم‌تر بود ($P<0/05$) اما بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). نتایج حاصل از مطالعه انجام شده توسط سالاری‌جو و همکاران (۱۳۹۱) نشان داد نانوذره نقره تاثیر معنی‌داری بر باکتری‌های اسیدلاکتیک روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی نداشت. کلباسی و همکاران (۱۳۹۱) جمعیت باکتریایی روده ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان پرورشی را که در معرض نانوذرات نقره به‌میزان ۱ و صفر میلی‌گرم در لیتر به‌مدت ۱۴ روز قرار گرفته بودند را مورد بررسی قرار دادند، در این مطالعه تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیکی، مزوفیل و انتروباکتریاسه روده ماهیان در برابر نانوذرات نقره تغییری از خود نشان ندادند و بیان شد احتمالاً دز نانوذرات نقره در حدی نبوده است که باعث تغییر در میزان باکتری‌های روده این ماهی شود. مغایر با نتایج این تحقیق، نتایج تحقیقات خورشیدی و همکاران (۱۳۹۴) نشان داد که با افزایش غلظت نانوذرات نقره، جمعیت باکتری‌های کل، مزوفیل، انتروباکتریاسه و اسیدلاکتیکی در بافت‌های روده و پوست ماهی کپور علفخوار به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. هم‌چنین در طی دوران نگه‌داری ماهی، باکتری‌های انتروباکتریاسه و باکتری‌های اسیدلاکتیکی در بافت‌های روده و پوست به‌ترتیب کم‌ترین و بیش‌ترین تغییرات را داشتند. این مطالعه به‌وضوح نشان داد که خواص ضدباکتریایی نانوذرات نقره بسته به گروه‌های مختلف باکتریایی، متفاوت است. علت این تفاوت نتیجه در دو گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان و کپور علفخوار را می‌توان به تفاوت شرایط محیط دستگاه گوارش این دو گونه نسبت داد. به‌طوری‌که مطالعه‌ای که توسط Mickeniene و Šyvokiene (۲۰۰۱) روی اثر فلزات مس، نیکل، روی و آهن بر باکتری‌های انتروباکتریاسه دستگاه گوارش ماهی انجام شد مشخص شد که در اثر این فلزات باکتری‌های انتروباکتریاسه به‌میزان زیادی کاهش پیدا کرده‌اند در نتیجه هنوز این احتمال وجود دارد که با افزایش دز نانوذرات جمعیت باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری کاهش یابد. تغییر شرایط تغذیه‌ای و محیطی می‌تواند میکرواکوسیستم لوله گوارش ماهی را تغییر دهد هم‌چنین در زمان شرایط استرس‌زا ممکن است فلور باکتریایی روده تغییر کند (LeaMaster و همکاران، ۱۹۹۷؛ Ringù و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین این احتمال وجود دارد که دز نانوذرات ورودی به روده کم بوده و تنها اثر تحریک کننده رشد روی باکتری‌ها داشته است (Babushkina و همکاران، ۲۰۱۰؛ Tran و همکاران، ۲۰۱۰).

به‌طورکلی، این تحقیق نشان داد ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانو ذرات آهن در جیره، بر میزان آنزیم‌های AST و ALT و فلورباکتریایی روده در مقایسه با ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم FeSO4 تاثیر معنی‌داری نداشت اما با توجه به نتایج، میزان ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم نانوذرات آهن در جیره پیشنهاد نمی‌گردد. فناوری نانو بدون شک فرصت بزرگی برای اقتصاد و توسعه پایدار منابع آبزی در بسیاری از کشورها را ارائه می‌دهد. اگرچه کاربرد فناوری نانو هنوز در مراحل اولیه در حوزه آبزی پروری است، اما ممکن است پتانسیل حل بسیاری از مشکلات موجود در آبزی‌پروری و شیلات‌را با نوآوری فنی بهتر درسطوح مختلف داشته باشد. در نهایت لازم به ذکر است که کاربرد نانوذرات مختلف، مطالعات دقیق و جامع‌تری را پیرامون تأثیرات این نانوذرات بر موجودات زنده می‌طلبد. استفاده از مدل‌های حیوانی متفاوت و نحوه‌های مختلف تیمار و نانوذرات به‌دست آمده از منابع مختلف با ترکیبات و قطرهای مختلف، افق‌های نوینی را جهت بررسی کاربردهای فناوری نانو در آبزی پروری نمایان می‌کند.

تشکر و قدردانی

در پایان از تمام عزیزانی که در انجام این تحقیق از هیچ‌گونه کمک و کوششی دریغ نورزیدند به‌ویژه شرکت ریزجلبکی پارسیان و مدیر عامل محترم آن، آقای حمید دنیایی داریان به‌عنوان حامی مالی و تمامی کارکنان زحمتکش این مجموعه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. **بنایی، م.؛میرواقفی،ع.؛سورداگومیل، آ.؛ رفیعی، غ. و احمدی، ک.، ۱۳۹۱.** مطالعه تغییرات فاکتورهای بیوشیمیایی خون و آسیب شناسی بافتی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در تماس با غلظت‌های زیرکشنده دیازینون. نشریه محیط زیست طبیعی، مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۶۵، شماره ۳، صفحات ۲۹۷ تا ۳۱۳.

۲. **خارا، ح.؛ محمدزاده، و.؛ قیاسی، م. و رهبر، م.، ۱۳۹۲.** بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان فاقد و واجد عفونت باکتریایی (در مزارع پرورشی استان مازندران). مجله توسعه آبزی‌پروری. سال ۷، شماره ۲، صفحات ۱۷ تا ۲۳.

۳. **خورشیدی، ز.؛ کلباسی، م. و بهروزی، ش.، ۱۳۹۴.** بررسی تغییرات فلور باکتریایی روده و پوست ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) تحت تاثیر نانو ذرات نقره کلوئیدی. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان. سال ۳، شماره ۴، صفحات ۷۹ تا ۹۴.

۴. **راد، س.، ۱۳۹۰.** بررسی اثرات نانو ذرات اکسیدآهن بر سلول‌های خونی و میزان آنزیم‌های کبدی موجود در خون موش صحرایی نر. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته علوم جانوری گرایش فیزیولوژی. دانشگاه پیام نور. دانشکده علوم پایه. گروه علمی زیست‌شناسی. ۱۲۹ صفحه.

۵. **راشدی، ح.؛ عموعابدینی، ق. و اسکندری، س.، ۱۳۸۹.** زیست فناوری نانو. تالیف: پاپازوگلو، الف. و پارتا ساراسی، الف.، انتشارات دانشگاه تهران. ۱۶۰ صفحه.

۶. **سالاری‌جو، ح.؛ کلباسی، م. و عبدالله‌زاده، ا.، ۱۳۹۱.** تاثیر نانو ذرات نقره کلوئیدی بر فلور باکتریایی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان. مجله اقیانوس‌شناسی. دوره ۳، شماره ۱۱، صفحات ۸۳ تا ۹۰.

۷. **شیربند، ع.، ۱۳۹۰.** بررسی تأثیر غلظت نانو ذرات اکسیدآهن (۱۰ نانومتر) بر بافت‌های تیروئید وکبد و میزان غلظت هورمون‌های تیروئیدی و آنزیم‌های کبدی در خون موش صحرایی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد علوم جانوری گرایش فیزیولوژی. دانشگاه پیام نور. دانشکده علوم پایه مرکز تهران. ۷۸ صفحه.

۸. **غفاری، م. و خسروانی‌زاده، ع.، ۱۳۹۱.** اثر اسانس گل میخک (*Eugenia cairyophillata*) بارگذاری شده بر نانوذرات آهن روی شاخص‌های آنزیمی و بافت‌شناسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله پاتوبیولوژی مقایسه‌ای. سال ۹، شماره ۴، صفحات ۸۲۷ تا ۸۳۶.

۹. **قاسمی، ا.؛ مازندرانی، م.؛ سوداگر، م. و حسینی، س.م.، ۱۳۹۶.** اثرات تغذیه‌ای زردچوبه (*Curcuma longa*) بر کاهش آسیب‌های کبدی و کلیوی ناشی از مواجهه با سولفات مس در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). شیلات، مجله منابع طبیعی ایران. دوره ۷۰، شماره ۲، صفحات ۱۳۸ تا ۱۴۷.

۱۰. **کلباسی، م.؛ عبدالله‌زاده، ا. و سالاری‌جو، ح.، ۱۳۹۱.** تاثیر نانو ذرات نقره کلوئیدی برجمعیت فلور باکتریایی روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان. مجله تحقیقات دامپزشکی. دوره ۶۷، شماره ۲، صفحات ۱۸۱ تا ۱۸۹.

۱۱. **مرتضوی‌تبریزی، ج.؛ شیعه، ج.؛ نوتاش، ش.؛ میرزایی، ح. و وطن‌خواه، ا.، ۱۳۹۰.** تاثیر مقادیر مختلف مولتی آنزیم بر تغییرات آنزیم‌های کبدی و فاکتورهای عملکردی در ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پرواری. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی. دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۴۹ تا ۵۵.

۱۲. **نایبی، م.، ۱۳۶۹.** دنیای میکروب‌ها. انتشارات چهر. چاپ سوم. ۴۸۵ صفحه.

۱۳. **Babushkina, I.V.; Borodulin, V.B.; Korshunov, G.V. and Puchinjan, D.M., 2010.** Comparative study of anti-bacterial action of iron and copper nanoparticles on clinical *Staphylococcus aureus* strains. Saratov Journal of Medical Scientific Research. Vol. 6, No. 1, pp: 11-1٤.

۱۴. **Banaei, M.; Mirvaghefi, A.R.; Rafei, G.R. and Sureda Gomila, A., 2011.** Effects of oral administration of silymarin on biochemical parameters of blood in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources). Vol. 63, No. 4, pp: 271-2٨٦.

۱۵. **Bury, N.R. and Grosell, M., 2003.** Mechanistic study of waterborne iron acquisition by a freshwater teleost fish, zebrafish (Danio rerio). Journal of Experimental Biology. Vol. 206, pp: 3529-3535.

۱۶. **Bury, N.R.; Walker, P.A. and Glover, C.N., 2003.** Nutritive metal uptake in teleost fish. Journal of Experimental Biology. Vol. 206, pp: 11-23.

۱۷. **Crichton, R.R., 1991.** Inorganic biochemistry of iron metabolism. West Sussex: Ellis Horwood Ltd. 355 p.

۱۸. **Halver, J.E. and Hardly, R.W., 1989.** The vitamins in: Fish Nutrition. Halver J.E., (ed.), Academic press, New York, USA. pp: 31-109.

۱۹. **Karthikeyeni, S.; Siva Vijayakumar, T.; Vasanth, S.; Ganesh, A.; Manimegalai, M. and Subramanian, P., 2013.** Biosynthesis of Iron oxide nanoparticles and its haematological effects on fresh water fish Oreochromis mossambicus. Journal of Academia and Industrial Research. Vol. 1, No. 10, pp: 645-649.

۲۰. **LeaMaster, B.R.; Walsh, W.A.; Brock, J.A. and Fujiok, R.S., 1997.** Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. Journal of Fish Biology. Vol. 50, No. 4, pp: 770-780.

۲۱. **Mendil, D.; Uluozlu, O.D.; Hasdemir, E.; Tuzen, M.; Sari, H. and Suicmez, M., 2005.** Determination of trace metal levels in seven fish species in lakes in Tukat, Turkey. Food Chemistry, Vol. 90, No. 1-2, pp: 175-179.

۲۲. **Merrifield, D.L.; Bradley, G.; Harper, G.M.; Baker, R.T.M.; Munn, C.B. and Davies S.J., 2011.** Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Nutrition. Vol. 17, No. 1, pp: 73-79.

۲۳. **Mickeniene, L. and Šyvokiene, J., 2001.** Changes of the diversity of the bacteriocenosis in the digestive tract of fish under the impact of heavy metals. Ecology. Vol. 4, pp: 11-15.

۲۴. **Peres, H.; Santos, S. and Oliva-Teles, A., 2014.** Blood chemistry profile as indicator of nutritional status in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 40, No. 5, pp: 1339-1347.

۲۵. **Rezae Ranjbar Sardari, R., 2010.** Toxic Effects of nano particle of silver to the liver and spleen tissues in rats. Nanoscience and Nanotechnology Conference, Yazd province Payam Noor University. Vol. 26, No. 4, pp: 1-4.

۲۶. **Ringù, E.; Bendiksen, H.R.; Wesmajervi, M.S.; Olsen, R.E.; Jansen, P.A. and Mikkelsen, H., 2000.** Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar L*). Journal of Applied Microbiology. Vol. 89, No. 2, pp: 317-322.

۲۷. **Sadauskas, E.; Wallin, H.; Stoltenberg, M.; Vogel, U.; Doering, P.; Larsen, A. and Danscher, G., 2007.** Kupffer cells are cenremoval of tral in the nanoparticles from the organism. Particle and Fibre Toxicology.Vol. 4, 10 p.

۲۸. **Shahsavani, D.; Mohri, M. and Kanani, H.G., 2010.** Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus Pallas*. Fish Physiology and Biochemistry. Vol. 36, No. 1, pp: 39-43.

۲۹. **Shariffi, M.; Jayawardena, P.A.H.L.; Yusoff, F.M. and Subasinghe, R., 2001.** Immunological parameters of Javanese carp Puntiusgonionotus (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 11, No. 4, pp: 281-291.

۳۰. **Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P. and Dash, D., 2007.** Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver

nanoparticles. Nanotechnology. Vol. 18, No. 22, pp: 225103-225112.

۳۱. **Shubayer, V.I.; Pisanic, T.R. and Jin, S., 2009.** Magnetic nanoparticles for theragnostics. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol. 61, No. 6, pp: 467-477.

۳۲. **Sun, Y.; Li, X.; Cao, J.; Zhang, W. and Wang, H.P., 2006.** Characterization of zero-valent iron nanoparticles, Advanced Colloid Interface Science. Vol. 120, No. 1-3, pp: 47-56.

۳۳. **Taylor, E.N. and Webster, T.J., 2009.** The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. International Journal of Nanomedicine. Vol. 4, pp: 145-152.

۳۴. **Tran, N.; Mir, A.; Mallik, D.; Sinha, A.; Nayar, S. and Webster, T.J., 2010.** Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. International Journal of Nanomedicine. Vol. 5, pp: 277-2۸۳.

۳۵. **Van Dijk, J.P.; Lagerwerf, A.J.; van Eijk, H.G. and Leijnse, B., 1975.** Iron metabolism in the tench (*Tinca tinca* L.). Studies by means of intravascular administration of 59 Fe (III) bound to plasma. Journal of Comparative Physiology. Vol. 99, No. 4, pp: 321-330.