

تاثیر نانوذره روی در جیره غذایی بر شاخص‌های اریتروسیستی 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: 775-14515
- **هومن رجبی‌اسلامی*:** گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: 775-14515
- **مهدی سلطانی:** گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، صندوق پستی: 14155-6453
- **شهناز پورحسینی:** گروه بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، صندوق پستی: 775-14515

تاریخ پذیرش: شهریور 1393

تاریخ دریافت: اردیبهشت 1393

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 900 قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ($17/22 \pm 5/41$ گرم) تهیه و پس از توزیع تصادفی به تعداد مساوی میان 18 فضای آزمایشی (شش تیمار با سه تکرار) برای 2 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 10، 30، 50 و 70 میلی‌گرم نانوذره روی (قطر 40 تا 60 نانومتر) و 70 میلی‌گرم سولفات روی به هر کیلوگرم غذای پایه به‌عنوان تیمارهای مختلف آزمایشی تهیه گردیدند. ماهیان برای 8 هفته با جیره‌های مربوط به هر تیمار تغذیه و ویژگی‌های اریتروسیستی آن‌ها در انتهای آزمایش بررسی شد. نتایج نشان داد میزان هموگلوبین، هماتوکریت، و متوسط هموگلوبین گلوبول (MCH) در تیمار 50 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 30 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم جیره مشاهده شد، که البته اختلاف معنی‌داری را با تیمار 50 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 اریتروسیستی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌گردد.

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

مقدمه

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، 1386). اغلب جیره‌های غذایی قادر به تامین کامل نیازهای معدنی در ماهیان نبوده و ضروری است که این کمبودها در قالب مکمل‌های ویتامینی و معدنی

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، 2008). 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، 2004؛ Landolt، 1989). امروزه انواع مختلفی از جیره‌های غذایی برای سنن



با تأثیر بازدارندگی بر آزادسازی آهن از منابع ذخیره‌ای موجب کم-خونی ناشی از فقر آهن گردد. از سوی دیگر روی در ساخت آنزیم‌های آنیدراز کربن و سوپراکسید دیسموتاز گلوبول‌های قرمز شرکت داشته و در نتیجه به-عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی برای حفظ و نگه‌داری غشای اریتروسیته‌ها و جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد مطرح است (Tomova و همکاران، 2009؛ ÓDell و همکاران، 1987؛ Hambidge و همکاران، 1986). گزارشات مختلف نشان می‌دهند که روی می‌تواند نقش مهمی در توسعه اریتروسیته‌ها و گلوبول قرمز ایفا کند (Sahin و همکاران، 2005) 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، 1987).

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 تأثیر نانوذره روی به‌عنوان شکل ساختمانی جدیدی از آن در جیره غذایی بر تعداد گلوبول‌های قرمز همراه با دیگر اندیس‌های مربوط به اریتروسیته‌ها 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 1 ارائه شده است. ذرات به‌شکل حامل آزاد (Free carrier) با اندازه‌ای بین 40 تا

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، 1973). عنصر روی هم‌چنین بر شکل بدن اثر گذاشته (Yamaguchi و همکاران، 1987) و موجب رشد طبیعی و توسعه اسکلتی در آبزیان می‌گردد (Yamaguchi و همکاران، 2005). روی نقش اصلی را در فعالیت هورمون‌هایی مانند انسولین، گلوکوکورتیکوئیدها و هم‌چنین گنادوتروپین‌ها ایفا می‌کند (Coulston و Nandona، 1980). فعالیت آنتی-اکسیدانی و شرکت در سیستم‌های دفاعی از دیگر نقش‌های روی است (Powell، 2000)، به‌طوری‌که کاهش سطح این عنصر فلزی موجب استرس اکسیداتیو در قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود (Hidalgo و همکاران، 2002). 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، 2011؛ Tokudome و همکاران، 2007؛ Wintergerst و همکاران، 2003؛ Caulfield و همکاران، 1998).

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، 2003). علاوه بر این مقادیر بالای روی در خون ممکن است موجب کاهش کارایی مس (Maret و Sandstead، 2006؛ Willis و همکاران، 2005) و در نتیجه اختلالاتی نظیر کم‌خونی، لوکوپنی و نوتروپنی شود (Salzman و همکاران، 2002). هم‌چنین مقادیر بالای روی می‌تواند



60 نانومتر و قطر متوسطی برابر 49 نانومتر بودند.

جدول 1: خصوصیات نانو ذره روی خنثی

نوع	اندازه	سطح ویژه	میزان خلوص	شکل ظاهری	چگالی
یون آزاد	40-60 نانومتر	90 گرم بر مترمربع	99 درصد	پودر سفید	0/65 گرم بر مترمکعب

هایی با اندازه 2 میلی متر (متناسب با اندازه دهان بچه- ماهیان) تبدیل شد. غذای مورد استفاده در هر یک از جیره های غذایی برای مقابله با هر تغییر احتمالی در ترکیب شیمیایی طی فواصل دو هفته ای تهیه و تا قبل از استفاده در فریزر با دمای 20- 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 جیره های غذایی همراه با نانو ذره 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 نام گذاری شدند.

جیره غذایی پایه به عنوان غذای مصرفی در تیمار شاهد براساس پیشنهاد Hidalgo و همکاران (2002) تهیه گردید (جدول 2). اجزای مورد استفاده در این جیره غذایی از شرکت به پرور، کرج، ایران تهیه و تا زمان آماده سازی در جای خنک و به دور از نور خورشید نگهداری شدند. همچنین اجزای مایع جیره غذایی نیز به منظور محافظت از تغییرات احتمالی در فریزر با دمای 20- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

اجزای مورد استفاده در جیره غذایی پس از توزین دقیق ابتدا به خوبی با یکدیگر مخلوط شده و سپس با افزودن مقدار کمی آب توسط همزن برقی به شکل خمیر در آمدند. خمیر حاصله در ادامه چرخ شده و با دستگاه پلتن به پلت-

جدول 2: ترکیب جیره غذایی قزل آرای رنگین کمان به عنوان غذای پایه براساس پیشنهاد Hidalgo و همکاران (2002)

درصد	ماده غذایی
48/00	آرد ماهی
10/00	گلو تن ذرت
20/00	آرد سویا
13/90	آرد گندم
6/00	روغن ماهی
1/00	هم بند (آلژینات سدیم)
1/00	مکمل ویتامینه
0/10	مکمل معدنی

^a مکمل معدنی (میلی گرم در هر کیلوگرم غذا): سولفات آهن، 6/49؛ سولفات منگنز 207، 20؛ سولفات مس، 36/3؛ ید 0، 84؛ حمل کننده، 4/55

^b مکمل ویتامینه (میلی گرم در هر کیلوگرم غذا به استثنای موارد ذکر شده): دی کلسیم پنتوتنات 26، 840؛ پیریدوکسین (pyridoxine HCl)، 7700؛ ریبوفلاوین 2/13؛ نیاسینامید، 55؛ فولیک اسید، 2200؛ تیامین، 8800؛ بیوتین، 88؛ ویتامین B₁₂، 5/5 واحد بین المللی؛ ویتامین آ، 88 واحد بین المللی؛ ویتامین D₃، 110 واحد بین المللی؛ ویتامین آ، 1650000 واحد بین المللی

پرورش قزل آرای مازندران، جاده هراز، استان مازندران در اردیبهشت 1392 تهیه و به یک مزرعه محلی در رباط کریم، استان تهران منتقل شدند. ماهیان برای مدت 2

زیست سنجی: تعداد 900 قطعه بچه ماهی قزل آرای رنگین کمان در این تحقیق از نژاد فرانسوی (Aqualand، فرانسه) با وزن متوسط 5/41±17/22 گرم از کارگاه تکثیر و



50 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 (4 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.

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 $17/3 \pm 0/6$ درجه سانتی‌گراد تأمین گردید. این آزمایش در سه استخر کانالی با ابعاد $10 \times 3 \times 1$ متر هر یک با دبی ورودی 3 لیتر بر ثانیه انجام گرفت که هر یک توسط توری پارچه‌ای به شش قسمت مساوی (در مجموع 18 فضای آزمایشی) تقسیم شدند. فضاهای آزمایشی در ادامه بر اساس جدول 3 به‌صورت کاملاً تصادفی به شش تیمار هر یک با سه تکرار تقسیم گردیدند. سپس تعداد

جدول 3: تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش

ردیف	تیمار
1	فاقد روی (شاهد منفی)
2	10 میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
3	30 میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
4	50 میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
5	70 میلی‌گرم نانو روی در هر کیلوگرم جیره غذایی
6	70 میلی‌گرم سولفات روی روی در هر کیلوگرم جیره غذایی (شاهد مثبت)

گلوبول‌های قرمز خون بر حسب میلیون در میلی‌مترمکعب ($n \times 10^6 \text{ mm}^{-3}$) زیر میکروسکوپ نوری شمارش گردید. میزان هماتوکریت نیز بر حسب درصد طبق روش استاندارد میکروهماتوکریت اندازه‌گیری شد. میزان 3 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 10 دقیقه با سرعت 5000 دور در دقیقه سانتریفوژ شده و میزان هماتوکریت با تقسیم نسبت حجم گلوبول‌های قرمز به حجم کل خون به‌صورت درصد حجم فشرده تعیین گردید (Snieszko, 1960). میزان هموگلوبین به‌روش سیانومت‌هموگلوبین طبق روش Hines و Yashou (1970) تعیین شد. ده میلی‌لیتر محلول درابکین برای این کار در لوله آزمایش ریخته و مقدار 20 میکرولیتر از خون حین تکان دادن لوله‌ها به آرامی درون

تعیین فاکتورهای خونی:

تعداد 5 عدد از ماهیان هر یک از تیمارهای آزمایشی در انتهای دوره مطالعاتی و پس از یک شبانه‌روز قطع غذاهای با کمک 250 قسمت در میلیون پودر گل میخک بی‌هوش شدند (سلطانی و همکاران، 1380). خون‌گیری از ماهیان با قطع ساقه دمی انجام گرفته و خون به‌دست آمده از تمام نمونه‌ها به لوله‌های اپندرف حاوی هیپارین انتقال یافته و به‌سرعت در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه خون‌شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، شهریار انتقال یافتند. شمارش گلوبول‌های قرمز پس از رقیق‌سازی به نسبت 1:200 توسط محلول رقیق‌کننده هایم (Hiem's fluid) با استفاده از ملانوز مخصوص گلوبول‌های قرمز صورت گرفت. نمونه خون در ادامه زیر لام نئوبار پیشرفته قرار گرفته و تعداد



متوسط گلبولولی (Mean corpuscular volume) بر اساس فمتولیتتر (fl)، متوسط هموگلوبین گلبولولی (MCH= corpuscular hemoglobin Mean) بر حسب پیکوگرم در سلول (pg) و غلظت هموگلوبین داخل گلبولولی (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، 1384).

$$MCHC = \frac{10 \times \text{هموگلوبین}}{\text{هماتوکریه}} \quad MCV = \frac{10 \times \text{هماتوکریه}}{\text{ت}} \quad MCH = \frac{10 \times \text{هموگلوبین}}{\text{ن}} = \frac{\text{گلبول قرمز}}{\text{به میلیون}}$$

که تیمار حاوی 30 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 50 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم از جیره غذایی نشان نداد (شکل 1).

هماتوکریه: میزان هماتوکریه ماهیان تغذیه شده در تیمار شاهد با 14/5±2/1 درصد به کمترین میزان در مقایسه با سایر تیمارها رسید (شکل 2). همچنین میزان هماتوکریه یک روند صعودی را با افزایش میزان نانوذره روی تا میزان 50 میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا نشان داده و پس از آن در تیمار حاوی 70 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم جیره کاهش یافت، هرچند که تفاوت معنی‌داری بین این تیمار با تیمار حاوی 50 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا وجود نداشت (p>0/05). همچنین اختلاف معنی‌داری در میزان هماتوکریه بین تیمارهای شاهد، سولفات روی، 10 میلی‌گرم و 30 میلی‌گرم نانوذره روی به ثبت نرسید (p>0/05).

لوله‌های اپندورف اضافه شد. لوله‌های آزمایش پس از آن برای مدت 5 دقیقه روی دستگاه لرزاننده قرار گرفت تا اختلاط خون و محلول درابکین به خوبی انجام گیرد. غلظت هموگلوبین در انتها براساس گرم در دسیلیتر با تعیین میزان جذب در طول موج 540 نانومتر و مقایسه آن با منحنی استاندارد تعیین گردید.

سایر اندیس‌های مربوط به فاکتورهای خونی شامل حجم

تجزیه و تحلیل آماری:

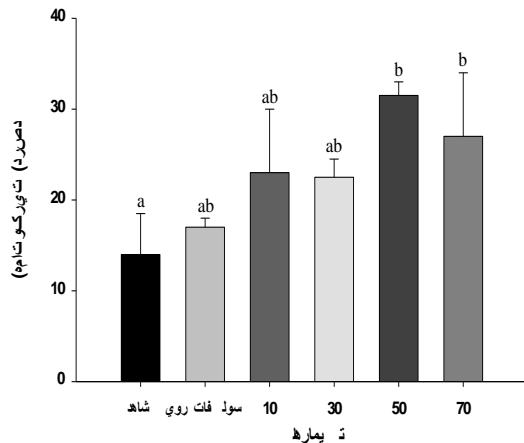
تمام متغیرهای مطالعاتی در این پژوهش شامل تعداد گلبولهای خونی، میزان هماتوکریه، هموگلوبین و اندیس‌های گلبولهای قرمز در هر یک از تیمارها به صورت میانگین±انحراف استاندارد حاصل از پنج بار تکرار محاسبه گردیدند. اختلاف بین تیمارها با کمک آنالیز واریانس (ANOVA) تعیین و محل اختلافات براساس آزمون Tukey's HSD به دست آمد. سطح معنی‌داری در تمام آزمون‌ها برابر 5 درصد در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با کمک نرم افزار آماری SPSS نسخه 16 انجام گرفته و نمودارها به کمک نرم افزار SigmaPlot رسم شدند.

نتایج

نتایج تعداد گلبولهای

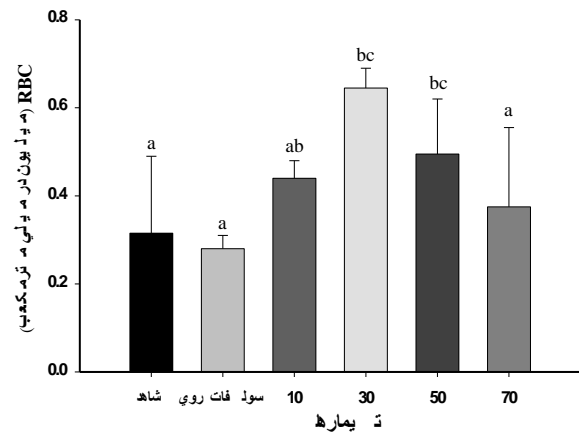
قرمز (RBC): بررسی میانگین تعداد گلبولهای قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای شاهد، سولفات روی، 10 میلی‌گرم نانوذره روی و 70 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم از جیره غذایی وجود ندارد (p>0/05). این درحالی بود





شکل 2: 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 ($p < 0/05$)



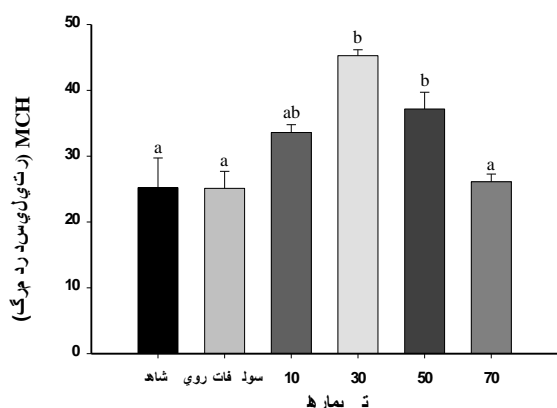
شکل 1: تغییرات تعداد گلبول قرمز (RBC) قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

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 متغیر بین تیمارهای آزمایشی وجود دارد ($p < 0/05$)، به طوری که یک الگوی کاهش شامل 50 میلی‌گرم نانوذره روی < 70 میلی‌گرم نانوذره روی < 10 میلی‌گرم نانوذره روی < 30 میلی‌گرم نانوذره روی < سولفات روی < شاهد را می‌توان در میان هر یک از تیمارهای غذایی مشاهده نمود.

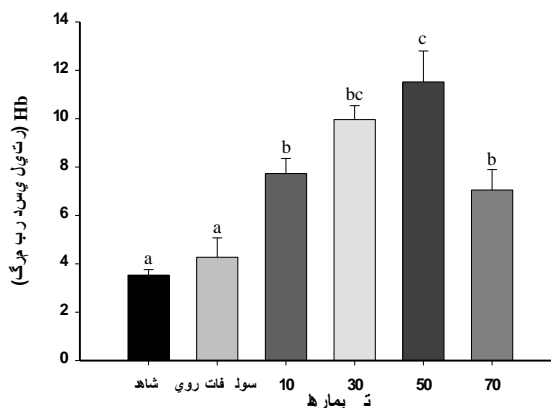
هموگلوبین: غلظت

هموگلوبین نیز اختلاف معنی‌داری را در میان تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p < 0/05$). تیمار حاوی 50 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا با $11/52 \pm 0/01$ گرم بر دسی‌لیتر دارای بالاترین میزان هموگلوبین در میان سایر تیمارها بود (شکل 3). همچنین تیمارهای سولفات روی، 10 میلی‌گرم نانوذره روی و 70 میلی‌گرم نانوذره روی به ترتیب کاهش معنی‌داری را در میزان هموگلوبین نسبت به تیمار حاوی 50 میلی‌گرم نانوذره روی نشان دادند ($p < 0/05$).



شکل 4: 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 ($p < 0/05$)



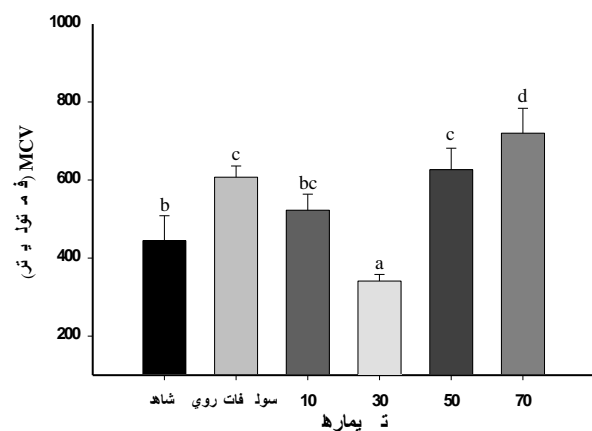
شکل 3: میزان هموگلوبین (Hb) خون قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0/05$)

میلی‌گرم نانوذره روی به ثبت نرسید ($p > 0/05$).

حجم متوسط گلبولی (MCV):

الگوی چندان ثابت و مشخصی در میزان حجم متوسط گلبولی خون بین هر یک از تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد (شکل 6). بیشترین میزان حجم متوسط گلبولی خون با میلی‌گرم نانوذره در تیمار 70 $720/0 \pm 5/5$ میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم غذا ثبت شد، که به شکل معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارهای غذایی بود ($p < 0/05$). همچنین تیمار حاوی 30 میلی‌گرم نانوذره روی در کیلوگرم جیره با $108/265 \pm 0/265$ فمتولیترا دارای کمترین حجم متوسط گلبولی خون بود.

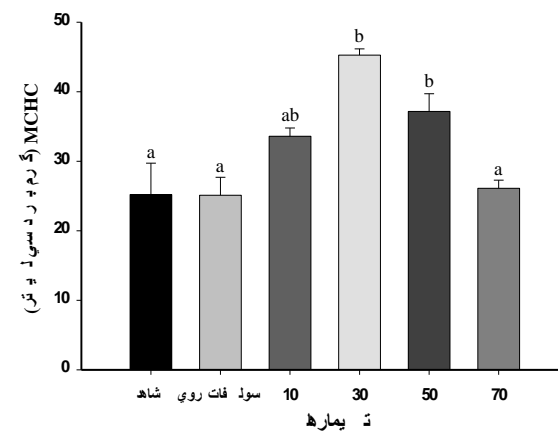


شکل 6: حجم متوسط گلبولی (MCV) خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمارهای آزمایشی حاوی

غلظت هموگلوبین داخل

گلبولی (MCHC): یافته‌های مربوط

به غلظت هموگلوبین داخل گلبولی نیز در شکل 5 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 30 میلی‌گرم نانوذره روی در هر کیلوگرم از جیره غذایی با بالاترین میزان هموگلوبین داخل گلبولی بود. لازم به ذکر است که تفاوت معنی‌داری در غلظت هموگلوبین داخل گلبولی بین تیمارهای 30 و 50 و همچنین 10 و 30



شکل 5: غلظت هموگلوبین داخل گلبولی (MCHC) خون قزل‌آلای رنگین‌کمان در



تیمارهای آزمایشی حاوی مقادیر مختلف روی

مقادیر مختلف روی

حروف مشابه بر روی هر یک از ستون‌ها بیان‌گر عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است ($p < 0/05$)

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، 2011؛ Bury و همکاران، 2003؛ Playle و همکاران، 1993). اشکال مختلفی از عناصر فلزی با ساختمان متفاوت برای 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 به دلیل ماهیت کوچک از ویژگی‌های متمایزی در مقایسه با اشکال معمول آن‌ها برخوردار هستند (فدایی و لاری، 1390). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مقادیر مختلف نانوذره روی با اندازه‌ای بین 40 تا 60 نانومتر به‌عنوان یکی از اشکال نوین عناصر فلزی از تأثیر معنی‌داری بر فاکتورهای اریتروسیستی خون قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار است.

گزارشات مختلف نشان می‌دهد که منابع مختلف روی نقش مهمی در توسعه اریتروسیست‌های گونه‌های مختلف ماهی‌ان دارد (Sahin و همکاران، 2005). Tavares-Dias و همکاران (1998) مشاهده نمودند که تعداد اریتروسیست بچه‌ماهی‌ان تیلاپیا در مخازن بارور شده با غذای طبیعی به $106 \times 7/1$ عدد در هر میکرولیتر خون رسید، درحالی‌که این تعداد در نمونه‌های تغذیه شده با جیره غذایی فاقد روی به $4/4 \times 106$ عدد در میکرولیتر خون کاهش یافت. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که تعداد اریتروسیست‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان با افزایش میزان نانو روی تا 30 میلی‌گرم در هر کیلوگرم غذا به حداکثر 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، 1998؛ Hambidge و همکاران، 1986). به همین دلیل روی به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مطرح بوده که برای حفظ و نگهداری غشای اریتروسیست‌ها و جلوگیری فعالیت رادیکال‌های آزاد ضروری می‌باشد (Tomova و همکاران، 2009؛ Tomova و همکاران، 2008؛ ÓDell و همکاران، 1987). بنابراین مقادیر بالاتر اریتروسیست‌ها در تیمار حاوی 30 و 50 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، 2005).

میزان هماتوکریت بیان‌گر نسبت پلاسما به سلول‌های خونی بوده و معیار خوبی برای تعیین ظرفیت حمل اکسیژن در خون است (Larsson و همکاران، 1985). نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میزان هماتوکریت قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار حاوی 50 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 21 تا 44 درصد در نوسان است (Miller و همکاران، 1983) که با یافته‌های پژوهش حاضر مطابقت داشته و نشان می‌دهد که



روی) برای تولید آنزیم‌های فلزی نظیر گلوکاتایونین پراکسیداز داشته باشد که نقش مهمی در محافظت از هموگلوبین در مقابل تجزیه اکسیداتیو دارد (Maret و Sandstead، 2006). هم‌چنین مقادیر بالاتر هموگلوبین در تیمار حاوی 50 میلی‌گرم نانوذره روی را می‌توان به سنتز بیشتر اسپکتین 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، 1990؛ Goodman و همکاران، 1988).

ترکیب و ساختمان شیمیایی عناصر ضروری بر میزان جذب و نحوه کارایی آن‌ها تاثیرگذار است، به‌طوری‌که آبی‌پروران همواره به‌دنبال مواد معدنی با قابلیت بالاتر جذب توسط آبزیان پرورشی می‌باشند (Lin و همکاران، 2013). بررسی‌ها بیان‌گر گزارشات متناقضی از تاثیر روی با ساختمان‌های شیمیایی مختلف بر رشد قزل‌آلای رنگین‌کمان است. برای مثال Hardy و همکاران (1987) 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 (1993) در مقابل گزارش نمودند که هیچ اختلاف معنی‌داری در غلظت روی پلاسما و یا لاشه قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت تاثیر تغذیه با سولفات روی و یا متیونین روی وجود ندارد. Apines و همکاران (2001) نیز یافته‌های مشابهی از عدم تاثیر روی به‌اشکال سولفات روی، سولفات متیونین روی و یا روی کیلت شده با آمینواسیدها در تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌دست آوردند. با این وجود، تحقیق حاضر به‌عنوان اولین پژوهش در زمینه تاثیر روی به‌شکل نانو بر ویژگی‌های اریتروسیته قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان می‌دهد که نانو روی قادر به افزایش معنی‌دار متغیرهای خونی مطالعاتی شامل

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 30 میلی‌گرم نانوذره روی درحالی‌که 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 30 میلی‌گرم نانوذره روی (علی‌رغم افزایش غیرمعنی‌دار در تعداد) به‌شکل معنی‌داری نسبت به تیمار 50 میلی‌گرم نانوذره روی کاهش یافته است. این درحالی‌که است که بالاترین میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) نیز در تیمار 50 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، 2011). بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که خون ماهیان در تیمار حاوی 50 میلی‌گرم 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 (2004) نشان دادند که ماهیان تیلاپیی 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 50 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



میدانی و مهندس رضا عصاره در تحلیل اطلاعات تشکر می‌گردد.

منابع

1. احتشامی، ف.، 1386. تغذیه ماهیان پرورشی، انتشارات سازمان شیلات ایران. 396 صفحه.
2. سلطانی، م.؛ امیدبیگی، ر.؛ رضوانی، س.؛ مهربانی، م. و جیت-ساز، ح.، 1380. مطالعه اثرات هوشبری اسانس و عصاره گل میخک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحت شرایط کیفی آب. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره 56، ردیف 4، صفحات 85 تا 89.
3. غلامپور، ط.ع.؛ ایمانی‌پور، م.؛ حسینی، س.ع. و شعبانی‌پور، ب.، 1390. تأثیر سطوح مختلف شوری بر شاخص‌های رشد، میزان بازماندگی، غذاگیری و پارامترهای خونی در بچه ماهیان سفید (*Rutilus frisii kutum kamensky*) (1901). مجله زیست‌شناسی ایران. دوره 24، شماره 4، صفحات 539 تا 549.
4. طبرستانی، م.، 1384. خون‌شناسی پزشکی. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد. 952 صفحه.
5. فدایی، م.ر. و لاری، م.، 1390. بهبود کیفیت آب و خاک به کمک نانوذرات آهن. ماهنامه فناوری نانو. سال 10، شماره 11، صفحات 21 تا 23.
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. Carpena, 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.

گلبول‌های قرمز، هماتوکریست، 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، به طوری که تا به امروز صدها محصول جدید برای اهداف مختلف در زمینه فن‌آوری نانو ساخته شده است (Griffitt و همکاران، 2009). بنابراین اندازه کوچکتر ذرات اکسید نانو (40 تا 60 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 آبروی‌پروری را در پیشبرد اهداف حفظ، تکثیر، نگهداری و پرورش آبزیان یاری نماید (غلامپور و همکاران، 1390؛ Feist و همکاران، 2004). به طور خلاصه، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نیاز قزل‌آلای رنگین‌کمان به روی تحت تأثیر شکل مصرفی آن قرار دارد، به طوری که روی به شکل نانو تأثیر معنی‌داری بر تمام فاکتورهای اریتروسیستی در این مطالعه داشته و موجب بهبود آن‌ها در مقادیری پایین‌تر از حد بهینه گزارش شده توسط NRC (2011) گردیده است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از زحمات کارکنان مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران سپاسگزارى نمایند. همچنین از آقای مهندس غلامحسین خلیل‌نژاد به دلیل کمک‌های بی‌دریغ در تهیه بچه‌ماهیان و طراحی آزمایش



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. Zinc 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-145AS.
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
12. Caulfield, L.E.; Zavaleta, N.; Shankar, A.H. and Meriardi, 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 Küfrevioğlu, 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.



- 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.

