فصلنامه علوم تکثیر و آبزی‌پروری/ سال اول/ شماره اول/ زمستان ۹۲ صفحات۸۲-۶۷

بررسی اثرات سطوح مختلف نانو ذره آهن (Fe) بر فاکتورهای رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

شایان قبادی[۱]، هومن رجبی اسلامی[۲]، سید مهدی حسینی‌فرد[۱]، لیلا پلنگی[*۱]

چکیده

موفقیت در تمامی سیستم‌های پرورش ماهی نیازمند تغذیه مطلوب به منظور رشد مناسب، حفظ سلامت و افزایش مقاومت در برابر عوامل نامناسب محیطی نظیر انواع استرس‌ها و بیماری‌ها می‌باشد. به طوریکه وجود مکمل‌های ویتامینی و معدنی برای بهبود رشد و سلامت بیشتر ماهیان به جیره‌های غذایی اضافه می‌گردند. نقش‌های مختلفی در رابطه با ترکیبات غذایی بیان شده است که از آن جمله می‌توان به سوخت و ساز بهتر غذا، افزایش سختی ومقاومت استخوان‌ها، تبادلات یونی و تعادل بهتر اسمزی اشاره نمود. آهن از جمله عناصر ضروری برای ماهی و سایر موجودات عالی است که در همه سلول‌های موجودات زنده وجود دارد و نقشی کلیدی در تغذیه و متابولیسم آنها بازی می کند. این تحقیق به بررسی اثرات سطوح مختلف نانو ذره آهن (Fe) به عنوان شکل جدیدی از ترکیب آهن بر برخی شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی قزل آلای‌رنگین کمان پرداخته است. طی این تحقیق، تعداد ۳۹۶ عدد بچه ماهی قزل‌آلا از نژاد فرانسوی (Aqualand) تهیه و پس از سازگاری با محیط مزرعه با استفاده از غذای پایه (تیمار شاهد) در سه نوبت به مدت چهار روز تا حد سیری غذادهی شدند، سپس شش تیمار که با اضافه نمودن ۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن به شکل یون آزاد و ۶۰ میلی‌گرم سولفات آهن به هر کیلوگرم از غذای پایه تهیه شده بود، به مدت هشت هفته تغذیه شدند. تأثیر آهن بر رشد ماهیان بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از نانو ذره آهن خنثی در سطح ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذای خشک، سبب افزایش عملکرد رشد و تغذیه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی می‌گردد.

کلید واژه: نانو ذره آهن، قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، فاکتورهای رشد، تغذیه.

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، گروه شیلات، بابل، ایران shgh_science@yahoo.com
۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه شیلات، تهران، ایران

۱- مقدمه

قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Onchorhynchus mykiss*) از جمله ماهیان پرورشی محسوب می‌شود که از اواخر قرن نوزدهم میلادی اهلی شده است و به صورت تجاری به عنوان منبع پروتئینی قابل عرضه به بازار پرورش داده می‌شود (Cha *et al*., 2008). دستیابی به تولید اقتصادی قزل‌آلای رنگین‌کمان مستلزم استفاده مناسب از غذا و ترکیب مناسب اجزای جیره غذایی به شکلی است که بتواند علاوه بر تأمین نیازهای اولیه، موجب بهبود شرایط رشد، مقاومت در برابر شرایط نامناسب محیطی، کاهش تلفات، ماهیانی با وزن بالاتر و در نهایت دستیابی به تولیدی بالاتر در شرایط پرورشی گردد.

جیره غذایی دستی قزل‌آلای رنگین‌کمان به طور کلی از پروتئین‌ها و چربی‌ها همراه با مقدار زیادی رطوبت است تا بتواند نیازهای غذایی ماهی را تامین نماید. با این وجود مکمل‌های ویتامینی و معدنی برای بهبود رشد و سلامت بیشتر ماهیان به جیره‌های غذایی اضافه می‌گردند (Amar *et al*., 2004). اغلب موجودات زنده قادر به سنتز عناصر معدنی نبوده و مایحتاج بدن را از راه خوراکی تأمین می‌نمایند. بنابراین فقیر جیره غذایی از حیث این مواد با گرفتاری‌های متعددی همراه بوده و اختلالات مهمی همچون آسیب‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی را سبب می‌گردند. البته باید در نظر داشت که مصرف بیش از حد مجاز مواد معدنی به عنوان مکمل غذایی خود با مسمومیت‌های غذایی و حتی مرگ آبزیان همراه خواهد شد. بنابراین تعیین حد مجاز مصرف هر یک از این عناصر معدنی ماهیان پرورشی بسیار ضروری خواهد بود (Watanabe *et al*., 1997).

آهن از جمله عناصر معدنی است که به عنوان مکمل معدنی به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اضافه می‌گردد. آهن جز ترکیب تمام یاخته های بدن می‌باشد و بخصوص در کبد و طحال ذخیره می‌شود و لولکوسیت‌ها آن را از کبد و طحال به مغز استخوان انتقال داده که برای ساختن گلوبول‌های قرمز به کار می‌رود. آهن برای متابولیسم صحیح ویتامین‌های ب ضروری است. وظایف آهن انتقال اکسیژن در گلوبول‌های قرمز، تولید هموگلوبین خون، مقاومت در برابر استرس و عملکرد صحیح آنزیم‌ها و تقویت سیستم ایمنی می‌باشد. گزارش شده که کمبود آهن در انواع مختلفی از ماهیان موجب کم‌خونی (Gatlin and Wilson, 1986a) و یا کاهش تخمه گشایی تخم ماهیان می‌شود (Hirao *et al*., 1955).

نانوتکنولوژی، یک تکنولوژی امید بخش است که در بسیاری از علوم کاربرد دارد. توسعه سریع علوم نانو و نانوتکنولوژی در سال‌های اخیر، افق جدیدی به روی بسیاری از صنایع و بخش های مختلف گشوده که سرچشمه انقلاب صنعتی جدید بخصوص در بخش کشاورزی و بخش‌های مرتبط با آن گردیده است (Rather *et al*., 2011). امروزه از فن‌آوری نانو به عنوان یک تکنولوژی

کلیدی و تأثیرگذار بر علم و صنعت یاد می‌شود (Gerf *et al.*, 1994).اندازه کوچک این ذرات می تواند به تغییرات اساسی در ساختار و خواص این عناصر منجر شود بطوریکه تا به امروز صدها تولیدات جدید برای اهداف مختلف در زمینه فن آوری نانو ساخته شده است. ورود این فن‌آوری به عرصه آبزی پروری و استفاده کاربردی از آن در بسیاری از کشورها گسترش یافته است.

بطوری‌که Prochorov و همکاران (۲۰۰۲) به بررسی اثر نانو آهن بر پارامترهای زیستی ماهی کپور و ماهی خاویاری پرداختند. Behera و همکاران (۲۰۱۳) نیز طی تحقیقی از نانو آهن به عنوان ماده افزودنی به غذای ماهی کپور هندی *Labeo rohita*، استفاده نمودند و پارامترهای ایمنی و خونی این ماهی را مورد بررسی قرار دادند. در قزل آلا نیز اثر نانوذراتی همچون طلا و نقره مورد بررسی قرار گرفته است (Farkas *et al*., 2009; Louei Monfared and Soltani, 2013).

این تحقیق نیز به منظور بررسی اثرات سطوح مختلف نانو ذره آهن (Fe) به عنوان شکل جدیدی از ترکیب آهن بر روی برخی فاکتورهای رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می پردازد.

۲- مواد و روش کار

۲-۱- تهیه ماهی

طی این تحقیق از ۳۹۶ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان از نژاد فرانسوی (AqualandFrance) با وزنی بین ۲ ±۲۱ گرم استفاده شد. ماهیان به مدت هفت روز باشرایط مزرعه سازگار شدند و طی ۴۸ ساعت نخست، هیچ گونه غذادهی صورت نگرفت.

۲-۲- آماده‌سازی جیره غذایی

جیره غذایی پایه به عنوان غذای مصرفی برای تیمار شاهد تهیه گردید (جدول۱). اجزای خشک جیره غذایی طی تحقیق در جای خنک و به دور از نور خورشید نگهداری شدند و اجزای مایع جیره غذایی نیز به منظورمحافظت ازتغییرات احتمالی درفریزر صندوقی با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

نانو ذره آهن مورداستفاده دراین تحقیق به میزان یک کیلوگرم به شکل حامل آزاد از شرکت فن آور سپهر پارمیس (تهران، ایران) تهیه گردید که ویژگی‌های آن درجدول ۲ ارائه شده است.

هر یک از اجزاء مورد استفاده در جیره غذایی پس از توزین دقیق ابتدا به خوبی با یکدیگر مخلوط شده و سپس با افزودن مقداری آب توسط همزن برقی به شکل خمیر در آمده خمیر حاصله در ادامه از یک چرخ گوشت بااندازه منافذ خروجی به قطر ۲ میلیمتر به رشته‌های درازی تبدیل شده

و پس از خشک شدن در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت به پلت‌هایی بااندازه ۲ میلیمتر (متناسب با اندازه دهان بچه ماهیان) تبدیل شد. غذای مورد استفاده در هر یک ازجیره‌های غذایی برای پرهیز از هرگونه تغییر در ترکیب شیمیایی در فواصل دو هفته‌ای تهیه و تا شروع آزمایش در فریزر با دمای ۲۰ – درجه سانتیگراد نگهداری گردید تا از تغییرات احتمالی جیره جلوگیری شود. میزان آهن تیمارهای آزمایشی ازحاصل جمع غلظت آهن موجود در هر یک از اجزاء جیره غذایی همراه با نانو ذره آهن به عنوان تیمار در نظر گرفته شد.

جدول ۱. ترکیب جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان به عنوان غذای پایه

ماده غذایی	درصد
آردماهی	۵۱/۰۰
آردسویا	۲۴
آرد گندم	۱۴/۹۰
روغن ماهی	۶/۰۰
هم بند (نشاسته)	۱/۰۰
مکمل ویتامینه[1]	۱/۰۰
مکمل معدنی[2]	۰/۱۰

۱– مکمل معدنی (میلی گرم در هر کیلو گرم غذا) : سولفات منگنز: ۲۰۷/۲۰ ، سولفات مس: ۳/۸۶ ، یدید پتاسیم: ۰/۸۴ و سولفات روی: ۶۰

۲–مکمل ویتامین (میلی گرم در هر کیلو گرم غذا به استثنای موارد ذکر شده) : دی کلسیم پنتوتنات ۲۶ : ۸۴۰ ، پیریدوکسین (pyridoxine HCI): ۷۷۰۰ ، ریبوفلاوین ۱۳ : ۲ ، نیاسینامید: ۵۵، فولیک اسید: ۲۲۰۰، تیامین: ۸۸۰۰ ، بیوتین: ۸۸ ، ویتامین B_{12} : ۵.۵ واحد بین المللی ، ویتامین آی: ۸۸ واحد بین‌المللی، ویتامین D_3 : ۱۱۰ واحد بین المللی ، ویتامین آ : ۱۶۵۰۰۰۰ واحد بین المللی.

جدول۲. خصوصیات نانو ذره آهن خنثی مورداستفاده

نوع	اندازه	ویژه سطح	خلوص میزان	ظاهری شکل	چگالی
یون آزاد	۶۰–۴۰ نانومتر	۹۰ گرم بر متر مربع	۹۹ درصد	پودر سیاه	۰/۶۵ گرم بر متر مکعب

۲–۳. تیماربندی و تغذیه

مطالعات انجام گرفته نشان می‌دهد که میزان بهینه عنصرآهن به عنوان یکی ازاجزاء مکمل معدنی مورد نیاز برای قزل‌آلای رنگین‌کمان برابر۶۰ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از جیره غذایی است. بر این

اساس چهار تیمار شامل۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن به شکل یون آزاد برای مطالعه تاثیر مقادیر مختلف نانو ذره آهن بر متغیرهای آزمایشی انتخاب گردید. تیمار غذایی شاهد در این تحقیق فاقد آهن بود. همچنین یک تیمار آزمایشی دارای ۶۰ میلی‌گرم سولفات آهن به ازای هر کیلوگرم از جیره غذایی برای مقایسه اثر نانو ذرات آهن با شکل متداول آهن(ترکیب سولفاته) در جیره‌های غذایی در نظر گرفته شد (جدول ۳). تغذیه با غذای پایه (تیمارشاهد) برای مدت چهار روز و تا حد سیری انجام شد. پس از اتمام دوره سازگاری، و تیمار بندی ماهیان، تغذیه با غذای آزمایشی هر یک از تیمارها به مدت شش هفته انجام شد. غذادهی به بچه ماهیان قزل آلا بر اساس مشاهدات و رفتار تغذیه‌ای آنها تا حد سیری در ۳ نوبت (ساعات ۸، ۱۲ و ۱۶) انجام می‌گرفت که بین ۴-۵ درصد وزن توده زنده در کل دوره آزمایش متغیر بود.

جدول۳. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این پژوهش

نام تیمار	میزان و نوع آهن
۱	)شاهدمنفی(فاقدآهن
۲	۱۵میلی گرم نانو آهن درهرکیلوگرم جیره غذایی
۳	۳۰میلی گرم نانو آهن درهرکیلوگرم جیره غذایی
۴	۴۵میلی گرم نانو آهن درهرکیلوگرم جیره غذایی
۵	۶۰میلی گرم نانو آهن درهرکیلوگرم جیره غذایی
۶	۶۰میلی گرم سولفات آهن درهرکیلوگرم جیره غذایی (شاهد مثبت)

۲-۴- زیست‌سنجی و بررسی شاخص‌های رشد و تغذیه

همه بچه ماهیان هر دو هفته یک بار مورد زیست سنجی قرار گرفتند بدین صورت که برای اندازه‌گیری وزن از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۱ گرم و برای اندازه‌گیری طول چنگالی از خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر استفاده شد.

برای بررسی چگونگی عملکرد جیره‌های مختلف و مقایسه آنها، در فواصل زمانی مشخص از طریق داده های بدست آمده از زیست سنجی و انجام آزمایشات تغذیه‌ای برخی از فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای، از جمله افزایش وزن بدن (BWI) (Tacon, 1990)، درصد افزایش وزن بدن (PBWI) (Bekcan, *et al*., 2006)، نرخ رشد ویژه (درصد در روز) (SGR) و ضریب تبدیل غذایی (FCR) (Hevroy, 2005)، غذای خورده شده روزانه (درصد در روز) (DFI) (Xue, *et al*., 2006)، فاکتور وضعیت (CF) و نسبت کارایی پروتئین(PER) (Helland, *et al*., 1996)، بر اساس فرمول‌های زیر تعیین گردید:

میانگین وزن ابتدای دوره به گرم - میانگین وزن انتهای دوره به گرم = **افزایش وزن بدن**

[(وزن انتهای دوره به گرم / (وزن ابتدای دوره به گرم - وزن انتهای دوره به گرم) }×۱۰۰ = **درصد افزایش وزن بدن** {زمان/ (لگاریتم طبیعی وزن ابتدای دوره به گرم- لگاریتم طبیعی وزن انتهای دوره به گرم)}×۱۰۰ = **نرخ رشدویژه**

(میانگین وزن نهایی × تعداد ماهیان آخر دوره) -(میانگین وزن اولیه × تعداد ماهیان اول دوره) = **افزایش وزن زنده**

افزایش وزن بدن (گرم)/ مقدار غذای خورده شده (گرم) = **ضریب تبدیل غذایی**

مقدار مصرف پروتئین (گرم) / افزایش وزن بدن (گرم)= **نسبت کارایی پروتئین**

مقدار غذای خورده شده (گرم) / افزایش وزن بدن (گرم) = **کارایی غذا**

[زمان/$^{۰/۵}$(وزن اولیه (گرم)× وزن نهایی (گرم)) / (کل غذای خورده شده ×۱۰۰)]= **غذای خورده شده روزانه**

(۱۰۰ ×^{۳}(طول کل بر حسب سانتی متر) / وزن بر حسب گرم) = **فاکتور وضعیت**

۵-۲- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری شامل محاسبه میانگین و انحراف معیار با استفاده از نرم افزار SPSS صورت پذیرفت. تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به تغییرات معیارهای رشد و فاکتورهای تغذیه‌ای از طریق آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (one-way analysis of variance ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای (تست جدا ساز) دانکن (Duncans multiple-range test) استفاده شد و وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ با استفاده از نرم افزار SPSS (Ver. 12) بررسی گردید و مقادیر P<۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردید.

۶- نتایج

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که ماهیان تغذیه نموده از ۳۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن در هر کیلوگرم غذا (تیمار ۳)، بهترین عملکرد رشد را داشته‌اند بطوریکه مقادیر BWI، PBWI، SGR، FCR، DFI و PER در تیمار ۳ ، تفاوت معنی‌داری با تیمار ۱ و سایر تیمارهای تغذیه شده با نانو ذره آهن داشته است و در بسیاری از فاکتورها همچون PBWI، CF، FCR و PER نیز تفاوت معنی‌داری با تیمار ۶ نداشته است (جدول ۴).

جدول ۴. مقادیر فاکتورهای رشد و تغذیه ای در تیمارهای مختلف

تیمار / فاکتور	T1 (شاهد)	T2 (غذا ۱۵ mg/kg نانو آهن)	T3 (غذا ۳۰ mg/kg نانو آهن)	T4 (غذا ۴۵ mg/kg نانو آهن)	T5 (غذا ۶۰ mg/kg نانو آهن)
BWI (g)	۳۹/۶۸ ±۰/۰۴ b	۳۳/۷۲ ±۰/۰۵ a	۶۶/۰۶ ± ۳/۵۰ d	۳۶/۸۲±۰/۰۱ ab	۴۵/۸۳ ±۰/۰۲ c
PBWI(%)	۱/۸۲ ±۰/۰۳ a	۱/۶۳ ±۰/۰۲ a	۲/۹۰ ±۰/۱ b	۱/۴۶ ±۰/۰۲ a	۱/۹۶ ±۰/۰۲ a
SGR	۴/۰۶ ±۰/۰۲ b	۳/۹۴ ± ۰/۰۲ a	۴/۴۳ ±۰/۰۱ d	۴/۰۷ ± ۰/۰۲ b	۴/۱۹ ± ۰/۰۲ c
FCR	۱/۷۷ ±۰/۰۱ bc	۱/۹۵ ±۰/۰۲ bc	۱/۴۴±۰/۰۱ a	۲/۰۳ ±۰/۰۲ c	۱/۷۴ ± ۰/۰۲ b
DFI	۲/۵۱ ±۰/۰۱ a	۲/۳۰ ±۰/۰۲ a	۳/۴۰ ± ۰/۰۱ c	۲/۴۰± ۰/۰۱ a	۲/۷۲ ± ۰/۰۲ b
PER	۰/۰۳±۰/۰۰۱ ab	۰/۰۲۸ ±۰/۰۰۱ ab	۰/۰۳ ±۰/۰۰۱ c	۰/۰۲ ±۰/۰۰۱ a	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۱ b
CF	۰/۹۶ ± ۰/۰۲ b	۰/۷۲ ±۰/۰۱ a	۰/۹۶ ± ۰/۰۱ b	۰/۹۰ ± ۰/۰۱ ab	۰/۸۷ ± ۰/۰۲ ab

- **داده های دارای حروف متفاوت در هر ردیف، دارای تفاوت معنی‌دار هستند ($P<0.05$)**

۷- بحث

تحقیقات چندانی در زمینه استفاده از نانو آهن در تغذیه ماهیان و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام نشده است، از این رو منابع چندانی جهت مقایسه و تفسیر نتایج وجود ندارد. بر این اساس، در این بخش، از مقالاتی که به تأثیر نقش آهن در تغذیه ماهیان پرداخته شده، استفاده شده است.

در تحقیق حاضر، نتایج آنالیز رشد نشان داد که بهترین تیمار استفاده نموده از نانو ذره آهن، تیمار دریافت‌کننده ۳۰ میلی‌گرم نانو آهن در هر کیلوگرم غذا بوده است. هرچند که شاهد مثبت (تیمار ۶، ۶۰ میلی‌گرم سولفات آهن) بهترین و کاراترین تفاوت معنی‌دار را در فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای مورد بررسی داشته است. به طوریکه بیشترین مقادیر افزایش وزن بدن و SGR و کمترین FCR در تیمار ۶ (۶۰ میلی‌گرم سولفات آهن) مشاهده شد و پس از تیمار ۶، تیمار ۳ (۳۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن) ، بیشترین مقادیر افزایش وزن بدن و SGR و کمترین FCR را نشان داد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. همچنین فاکتورهایی همچون درصد افزایش وزن بدن، PER و افزایش طول ماهی، در تیمار ۳، بیشتر از سایر تیمارهای دریافت‌کننده نانوآهن بود که این فاکتورها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و تیمارهای ۲، ۴ و ۵ داشت اما با تیمار ۶، تفاوت معنی‌داری نشان نداد. نقش مثبت میکروالمنت‌ها در تغذیه آبزیان جهت داشتن زندگی سالم و طبیعی به اثبات رسیده است (Davoodi poor *et al*., 2013)، ماهیان این مواد معدنی را از غذا و آب پیرامون خود تامین می‌کنند (Nekoubin *et al*., 2012). غلظت‌های مشخص و اشکال کاربردی مواد معدنی باید مشخص گردند و در غذای فرموله‌ای که برای آبزیان پرورشی تهیه می‌گردد، بکار برده شوند و نباید

اهمیت این مواد در غذای مصنوعی، نادیده انگاشته شود (Davoodi poor *et al.*, 2013). آهن نیز جزء میکروالمنت‌هایی است که تاثیر به سزایی در انجام فعالیت‌های طبیعی اندامهای بدن ماهی دارد. یکی از نتایج موثری که در ماهیان تغذیه نموده از دوز مناسب آهن مشاهده می‌شود، افزایش کارایی عملکرد رشد در ماهیان است (Prochorov *et al.*, 2002; Naser *et al.*, 1998; Ye *et al.*, 2007; Rigos *et al.*, 2010).

در تحقیقات مختلف، نتایجی مشابه با یافته‌های این تحقیق حاصل شده است به عنوان مثال، دو نفر از محققین در سال ۱۹۶۶ به بررسی اثر آهن بر نرخ رشد شمشیر ماهی (*Xiphophorus helleri*) و Platyfish (*Xuphophorus maculatus*) پرداختند و روزانه به غذای این ماهیان سولفات فروس افزودند، آنها با افزودن آهن به غذای این ماهیان، افزایشی در وزن و نرخ رشد ماهیان مشاهده نمودند (Roeder & Roeder, 1966).

همچنین تحقیقی جهت بررسی اثر رژیم غذایی دارای مکمل آهن بر رشد و عناصر ریز (میکروالمان‌ها) ماهی هامور ماهی جوان (*Epinephelus coioides*)، انجام شد. در این تحقیق به رژیم غذایی پایه مقادیر ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ ، ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سولفات ترکیبات آهنی افزوده شد. بیشترین وزن حاصله در ماهی تغذیه نموده از رژیم غذایی مکمل شده با ۱۰۰ میلی‌گرم آهن در هر کیلوگرم غذا، بدست آمد و کمترین وزن حاصله نیز در ماهیان تغذیه نموده از رژیم غذای پایه که فاقد مکمل آهن بود، مشاهده گردید. کارایی و بازده غذا نیز از همین روند تبعیت نمود با این تفاوت که کمترین کارایی در ماهیان تغذیه نموده از رژیم غذایی پایه و ماهیان تغذیه نموده از غذای مکمل شده با ۲۵۰ میلیگرم در کیلوگرم آهن مشاهده شد.

در طی یک بررسی ۶۰ روزه، که اثر نانو آهن پراکنده[1] بر شاخص‌های زیستی ماهی کپور و ماهی خاویاری، مورد مطالعه قرار گرفت و افزایش نرخ رشد در این ماهیان، مشاهده شد (*et al.*, Prochorov 2002). همچنین طی تحقیقی دیگر، از نانو آهن به عنوان ماده افزودنی به غذای ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*)، استفاده شد. در این تحقیق، در ۳ نوع تیمار مختلف، اثرات نانو ذره اکسید آهن (تیمار ۱) و سولفات فرروس (۲) در این ماهی بررسی گردید و تفاوت معنی‌داری در وزن نهایی این دو گروه در مقایسه با تیمار شاهد (تیمار ۳) مشاهده شد (Behera *et al.*, 2013).

Vangen و Hemre، در بررسی کربوهیدرات‌های غذایی تعاملات آهن و روی در ماهی آزاد دریای آتلانتیک نشان دادند که رژیم غذایی آهن و روی به طور قابل ملاحظه‌ای بر وزن پایانی، شاخص وضعیت و شاخص کبدی اثر می‌گذارد و هر چه میزان این مواد بیشتر شود تاثیر بیشتری بر

1.nano-disperse Iron

روی این شاخص‌ها دارد (Vangen & Hemre, 2003).

اما در برخی تحقیقات، نتایجی مغایر با تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، مثلاً Naser و همکاران (۱۹۹۸) مطالعه‌ای جهت تعیین اثرات مکمل‌های آهنی هم (حالت آلی) و غیر هم (حالت غیر آلی) بر روی رشد، بهره برداری از غذا، پاسخ ایمنی و خون شناسی ماهی آزاد اقیانوس اطلس پرورش یافته در آب شیرین (*Salmo salar*)، انجام دادند. گروه های سه تایی از ماهی آزاد اقیانوس اطلس در مرحله پار با غذایی مکمل شده با سطوح درجه بندی شده‌ای از آهن هم (H) (اسپری هموگلوبین خشک شده در سطوح ۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم آهن به ازای هر کیلوگرم) و غیر هم (NH) ($FeSO_4.7H_2O$ در سطوح ۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم آهن به ازای هر کیلوگرم)، به مدت ۲۰ هفته، تغذیه شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که، تفاوت معنی‌داری در وزن حاصله، کارایی غذا و مرگ و میر کلی که بتوان آن را به سطح متفاوت یا نوع متفاوت آهن نسبت داد، وجود نداشت.

در یک بررسی دیگر، اثرات مقایسه‌ای سطوح آهن مکمل بر رشد ماهی سیم دریایی سرطلایی (*Sparus aurata*) با استفاده از ۴ منبع آهن آلی (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم آهن الی در هر کیلو از غذا) و یک منبع آهن غیر آلی (۲۰۰ میلی گرم آهن غیرالی در هر کیلو از غذا) مورد بررسی قرار گرفت. ماهی ها به مدت ۱۲ هفته تحت تیمار قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری در رشد (وزن نهایی و نرخ رشد ویژه) مشاهده نشد (Rigos *et al*., 2010).

همچنین طی یک بررسی که عملکرد رشد لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncoryhnchus mykiss*) در استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک و آهن مکمل شده در جیره غذایی مورد مطالعه قرار گرفت، مشخص شد که حداکثر مقدار درصد پروتئین و حداقل میزان چربی در جیره‌ای که حاوی پروبیوتیک و بدون مکمل آهن بود، دیده شد و تأیید شد که اگر جیره حاوی پروبیوتیک باشد در مقایسه با مخلوط پروتئین و آهن، تأثیر بهتری در رشد و فاکتورهای تغذیه‌ای لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده می‌شود (ناصری و همکارن، ۱۳۸۷).

دلیل وجود نتایج متفاوت مبنی بر تأثیر مثبت یا بی‌اثر بودن استفاده از آهن در غذای ماهیان مورد بررسی قرار گرفته در تحقیقات مختلف می‌تواند به نیازهای متفاوت ماهیان به میزان آهن باشد. در صورتیکه دوز مناسبی از آهن به غذا افزوده شود، نتایج مثبتی در زمینه بهبود فاکتورهای رشد و تغذیه مشاهده خواهد شد.

بهترین دوز نانو آهنی که در این تحقیق، برای استفاده در غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مناسب شناخته شد، دوز ۳۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن در هر کیلوگرم غذا است. میزان دوز آهن مورد نیاز جهت رفع نیازهای ماهیان مختلف، متفاوت است اما همه انواع ماهیان، نیاز به میزان کمی آهن در غذا دارند، بطوریکه طی تحقیقات مختلفی، نیازهای آهنی چندین گونه ماهی مشخص شد و

حداقل آهن مورد نیاز برای ماهی آزاد اقیانوس اطلس بین ۶۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Anderson *et al*., 1996)، برای گربه ماهی کانالی ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Gatlin and Wilson, 1986b)، برای مارماهی ژاپنی ۱۷۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Nose and Arai, 1979)، برای تیلاپیا mg/Kg^{-1} ۱۶۰-۱۵۰ (سیترات فریک) و mg/Kg^{-1} ۸۵ (سولفات ترکیبات آهن دار) (Shiau & Su, 2003) و برای سیم دریایی قرمز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Sakamoto and Yone, 1976) تخمین زده شد.

از این رو با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، دوز مصرفی در تیمار ۳ (۳۰ میلیگرم نانو آهن به ازای هر کیلوگرم غذا)، به عنوان بهترین دوز جهت استفاده در تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان، پیشنهاد می‌گردد.

۸- بحث

تحقیقات چندانی در زمینه استفاده از نانو آهن در تغذیه ماهیان و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام نشده است، از این رو منابع چندانی جهت مقایسه و تفسیر نتایج وجود ندارد. بر این اساس، در این بخش، از مقالاتی که به تأثیر نقش آهن در تغذیه ماهیان پرداخته شده، استفاده شده است.

در تحقیق حاضر، نتایج آنالیز رشد نشان داد که بهترین تیمار استفاده نموده از نانو ذره آهن، تیمار دریافت کننده ۳۰ میلی‌گرم نانو آهن در هر کیلوگرم غذا بوده است. هرچند که شاهد مثبت (تیمار ۶، ۶۰ میلی‌گرم سولفات آهن) بهترین و کاراترین تفاوت معنی‌دار را در فاکتورهای رشد و تغذیه‌ای مورد بررسی داشته است. به طوریکه بیشترین مقادیر افزایش وزن بدن و SGR و کمترین FCR در تیمار ۶ (۶۰ میلی‌گرم سولفات آهن) مشاهده شد و پس از تیمار ۶، تیمار ۳ (۳۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن) ، بیشترین مقادیر افزایش وزن بدن و SGR و کمترین FCR را نشان داد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت. همچنین فاکتورهایی همچون درصد افزایش وزن بدن، PER و افزایش طول ماهی، در تیمار ۳، بیشتر از سایر تیمارهای دریافت کننده نانوآهن بود که این فاکتورها تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد و تیمارهای ۲، ۴ و ۵ داشت اما با تیمار ۶، تفاوت معنی‌داری نشان نداد. نقش مثبت میکروالمنت‌ها در تغذیه آبزیان جهت داشتن زندگی سالم و طبیعی به اثبات رسیده است (Davoodi poor *et al*., 2013)، ماهیان این مواد معدنی را از غذا و آب پیرامون خود تامین می‌کنند (Nekoubin *et al*., 2012). غلظت‌های مشخص و اشکال کاربردی مواد معدنی باید مشخص گردند و در غذای فرموله‌ای که برای آبزیان پرورشی تهیه می‌گردد، بکار برده شوند و نباید اهمیت این مواد در غذای مصنوعی، نادیده انگاشته شود (Davoodi poor *et al*., 2013). آهن نیز جزء میکروالمنت‌هایی است که تاثیر به سزایی در انجام فعالیت‌های طبیعی اندامهای بدن ماهی دارد.

یکی از نتایج مؤثری که در ماهیان تغذیه نموده از دوز مناسب آهن مشاهده می‌شود، افزایش کارایی عملکرد رشد در ماهیان است (Prochorov *et al*., 2002; Naser *et al*., 1998; Ye *et al*., 2007; Rigos *et al*., 2010).

در تحقیقات مختلف، نتایجی مشابه با یافته‌های این تحقیق حاصل شده است به عنوان مثال، دو نفر از محققین در سال ۱۹۶۶ به بررسی اثر آهن بر نرخ رشد شمشیر ماهی (*Xiphophorus helleri*) و Platyfish (*Xuphophorus maculatus*) پرداختند و روزانه به غذای این ماهیان سولفات فروس افزودند، آنها با افزودن آهن به غذای این ماهیان، افزایشی در وزن و نرخ رشد ماهیان مشاهده نمودند (Roeder & Roeder, 1966).

همچنین تحقیقی جهت بررسی اثر رژیم غذایی دارای مکمل آهن بر رشد و عناصر ریز (میکروالمان‌ها) ماهی هامور ماهی جوان (*Epinephelus coioides*)، انجام شد. در این تحقیق به رژیم غذایی پایه مقادیر ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ ، ۲۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، سولفات ترکیبات آهنی افزوده شد. بیشترین وزن حاصله در ماهی تغذیه نموده از رژیم غذایی مکمل شده با ۱۰۰ میلی‌گرم آهن در هر کیلوگرم غذا، بدست آمد و کمترین وزن حاصله نیز در ماهیان تغذیه نموده از رژیم غذای پایه که فاقد مکمل آهن بود، مشاهده گردید. کارایی و بازده غذا نیز از همین روند تبعیت نمود با این تفاوت که کمترین کارایی در ماهیان تغذیه نموده از رژیم غذایی پایه و ماهیان تغذیه نموده از غذای مکمل شده با ۲۵۰ میلیگرم در کیلوگرم آهن مشاهده شد.

در طی یک بررسی ۶۰ روزه، که اثر نانو آهن پراکنده[1] بر شاخص‌های زیستی ماهی کپور و ماهی خاویاری، مورد مطالعه قرار گرفت و افزایش نرخ رشد در این ماهیان، مشاهده شد (*et al*., Prochorov 2002). همچنین طی تحقیقی دیگر، از نانو آهن به عنوان ماده افزودنی به غذای ماهی کپور هندی (*Labeo rohita*)، استفاده شد. در این تحقیق، در ۳ نوع تیمار مختلف، اثرات نانو ذره اکسید آهن (تیمار ۱) و سولفات فرروس (۲) در این ماهی بررسی گردید و تفاوت معنی‌داری در وزن نهایی این دو گروه در مقایسه با تیمار شاهد (تیمار ۳) مشاهده شد (Behera *et al*., 2013).

Vangen و Hemre، در بررسی کربوهیدرات‌های غذایی تعاملات آهن و روی در ماهی آزاد دریای آتلانتیک نشان دادند که رژیم غذایی آهن و روی به طور قابل ملاحظه‌ای بر وزن پایانی، شاخص وضعیت و شاخص کبدی اثر می‌گذارد و هر چه میزان این مواد بیشتر شود تأثیر بیشتری بر روی این شاخص‌ها دارد (Vangen & Hemre, 2003).

اما در برخی تحقیقات، نتایجی مغایر با تحقیق حاضر نیز مشاهده شد، مثلاً Naser و همکاران

1-nano-disperse Iron

(۱۹۹۸) مطالعه‌ای جهت تعیین اثرات مکمل‌های آهنی هم (حالت آلی) و غیر هم (حالت غیر آلی) بر روی رشد، بهره برداری از غذا، پاسخ ایمنی و خون شناسی ماهی آزاد اقیانوس اطلس پرورش یافته در آب شیرین (*Salmo salar*)، انجام دادند. گروه های سه تایی از ماهی آزاد اقیانوس اطلس در مرحله پار با غذایی مکمل شده با سطوح درجه بندی شده‌ای از آهن هم (H) (اسپری هموگلوبین خشک شده در سطوح ۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم آهن به ازای هر کیلوگرم) و غیر هم (NH) ($FeSO_4.7H_2O$) در سطوح ۰، ۱۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم آهن به ازای هر کیلوگرم)، به مدت ۲۰ هفته، تغذیه شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که، تفاوت معنی‌داری در وزن حاصله، کارایی غذا و مرگ و میر کلی که بتوان آن را به سطح متفاوت یا نوع متفاوت آهن نسبت داد، وجود نداشت.

در یک بررسی دیگر، اثرات مقایسه‌ای سطوح آهن مکمل بر رشد ماهی سیم دریایی سرطلایی (*Sparus aurata*) با استفاده از ۴ منبع آهن آلی (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم آهن الی در هر کیلو از غذا) و یک منبع آهن غیر آلی (۲۰۰ میلی گرم آهن غیرالی در هر کیلو از غذا) مورد بررسی قرار گرفت. ماهی ها به مدت ۱۲ هفته تحت تیمار قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری در رشد (وزن نهایی و نرخ رشد ویژه) مشاهده نشد (Rigos *et al*., 2010).

همچنین طی یک بررسی که عملکرد رشد لارو ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncoryhnchus mykiss*) در استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک و آهن مکمل شده در جیره غذایی مورد مطالعه قرار گرفت، مشخص شد که حداکثر مقدار درصد پروتئین و حداقل میزان چربی در جیره‌ای که حاوی پروبیوتیک و بدون مکمل آهن بود، دیده شد و تائید شد که اگر جیره حاوی پروبیوتیک باشد در مقایسه با مخلوط پروتئین و آهن، تاثیر بهتری در رشد و فاکتورهای تغذیه‌ای لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مشاهده می‌شود (ناصری و همکارن، ۱۳۸۷).

دلیل وجود نتایج متفاوت مبنی بر تأثیر مثبت یا بی‌اثر بودن استفاده از آهن در غذای ماهیان مورد بررسی قرار گرفته در تحقیقات مختلف می‌تواند به نیازهای متفاوت ماهیان به میزان آهن باشد. در صورتیکه دوز مناسبی از آهن به غذا افزوده شود، نتایج مثبتی در زمینه بهبود فاکتورهای رشد و تغذیه مشاهده خواهد شد.

بهترین دوز نانو آهنی که در این تحقیق، برای استفاده در غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، مناسب شناخته شد، دوز ۳۰ میلی‌گرم نانو ذره آهن در هر کیلوگرم غذا است. میزان دوز آهن مورد نیاز جهت رفع نیازهای ماهیان مختلف، متفاوت است اما همه انواع ماهیان، نیاز به میزان کمی آهن در غذا دارند، بطوریکه طی تحقیقات مختلفی، نیازهای آهنی چندین گونه ماهی مشخص شد و حداقل آهن مورد نیاز برای ماهی آزاد اقیانوس اطلس بین ۶۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Anderson *et al*., 1996)، برای گربه ماهی کانالی ۳۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Gatlin

and Wilson, 1986b)، برای مارماهی ژاپنی ۱۷۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Nose and Arai, 1979)، برای تیلاپیا mg/Kg^{-1} ۱۶۰-۱۵۰ (سیترات فریک) و mg/Kg^{-1} ۸۵ (سولفات ترکیبات آهن دار) (Shiau & Su, 2003) و برای سیم دریایی قرمز ۱۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم (Sakamoto and Yone, 1976) تخمین زده شد.

از این رو با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، دوز مصرفی در تیمار ۳ (۳۰ میلیگرم نانو آهن به ازای هر کیلوگرم غذا)، به عنوان بهترین دوز جهت استفاده در تغذیه ماهی قزل آلای رنگین کمان، پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱. **ناصری،س.، بلوچی نظامی، ش.، خارا، ح.، فرزان فر ع.، لشتو آقایی، غ.، ۱۳۸۷**. بررسی عملکرد رشد لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در استفاده از سطوح متفاوت پروبیوتیک و آهن مکمل شده در جیره غذایی. مجله شیلات. سال دوم . شماره سوم.صفحات ۲۲-۱۵ .

2. **Amar, E. C., K., V, Satoh, S. 2004.** Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) associated with dietary intake of caroenoids from natural products. Fish &Shellfish Immunology, 16, 527-527.

3. **Anderson, F., Maage, A., Julshman, K. 1996.** An estimation of dietary requirements of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., parr. Aquacult ut. 24, 41-47.

4. **Behara,T., Swain,P., Rangachrulu,P.V. and Samanta,M . 2013.** Nano-Fe as feed additive improves the hematological and immunological parameters if fish, *Labeo rohita* H. J. Appl Nanosci.13, 251 – 258.

5. **Bekcan, S., Dogankaya, L. and cakirogollari, G.C., 2006.** Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis*) fed diet containing different percentages of protein. The Israeli journal of Aquaculture- Bamidgeh 58(2) , 137-142.

6. **Cha, S.H., Lee, J.S., Song, C.B., Lee, K. & Jeon, J.Y.J. 2008.** Effect of chitoson-coated diet on improving water quality and innate immunity in the oliver flounder, *Paralichthys olivaceus*. Aquaculcture, 278, 110-118.

7. **Farkas, J., Christian,P., Urreas, J.A.G., Roos, N., Hassellov,M, Tollefsen,**

K.E. and Thomas, K.V. 2009. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. Journal of aquatic toxity.96(1), 44-52.

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

9. **Gatlin, I., D.M & Wilson, R.P. 1986 a.** Characterization of iron deficiency and the dietary iron requirement of fingerling channel catfish. Aquaculture, 52, 191-198.

10. **Gatlin, I., D.M & Wilson, R.P. 1986 b.** Dietary copper requirement of fingerling channel cat fish. Aquaculture, 54, 277-285.

11. **Greff, R., Minamitake, Y.M., Peracchia, T., Trubetskoy, V., Torchilin, V. & Langer, R. 1994.** Biodegradable longcirculating polymeric nanosghere. s. Science, 263, 1600-1603.

12. **Helland, S.J., Grisdale, B. and Nerland, S., 1996.** A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. Aquaculture, 139,157-163.

13. **Hevroy, E.M., Espe, M., Waagbo, R., Sandness, K., Rund, M. and Hemer, G.I., 2005.** Nutrition utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed increased level of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition 11, 301-313.

14. **Hirao, S., Yamada, J. & Kikuchi, R. 1955.** Relation between chemical constituents of rainbow trout eggs and the hatching rate. Nippon Suisan Gakkaishi, 21, 240-243.

15. **Naser. N., Lall, S.P., Brown, L. & Olivier, G. 1998.** Role of dietary iron in immune response and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. World Aquaculture 98.p.447.

16. **Nekoubin H, Hatefi SH, Javahery S, Sudagar M 2012**. Effects of dietary L-carnitine supplementation on body composition and growth performance in Caspian Sea Kutum (*Rutilus firsii kutum*). Idosi Publication, Global Veterinaria, 8(3): 276-279.

17.**Nose, Y. & Arai, S. 1979.** Recent advances in studies on mineral nutrition of fish in Japan. In:Pillary TVR,Dill W A (eds). Advances in Aquaculture. Fishing News (Books) Ltd, Farnham.

18.**Prochorov, A.M., Pavlov, G.V., Okpattah, G.A.C. & Kaetanovich. 2002.** The effect of nano-disprse iton on the biological parameters of fish. 10th foresight conference on molecular Nanotechnology.

19.**Rather, M.A., Sharma, R., Aklakur, M., Ahmad, S., Kumar, M. Khan, M. and Ramya,V.I. 2011.** Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development. A Prospective Mini-Review. Fisheries and Aquaculture Journal, Vol.16, 1-5. 1

20.**Roeder,M. & Roeder,R.H.1966.** Effect of Iron on the growth rate of fishes. Journal of Nutrition. 90(66), 86- 90.

21.**Rigos, G., Samartzis, A., Henry, M., Fountoulaki, E., Cotou, E., Sweetman, J., Davies, S. and Nengas, I. 2010.** Effects of additive iron on growth, tissue distribution, haematology and immunology of gilthead sea bream, *Sparus aurata*. Aquaculture International. 16, 1093-1104.

22.**Sakamoto, S., & Yone, Y. 1976.** Requerment of red sea bream for dietary iron.Rep Fish Res Lab Kyushu Univ. 3, 53-58.

23.**Shiau, S.Y., & Su, L.W., 2003.** Ferric citrate is half as effective as ferrous sulphate in meeting the iron requirement of juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O.auratu*. j. Nutr. 133, 483-488.

24.**Tacon, A.J. 1992.** Nutritional Fish Pathology. Morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. FAO Fish Technical Paper. No.330. Rome, FAO,P 75.

25.**Vangen, B. & Hemre, G.I. 2003.** Dietary carbohydrate, iron and zinc interactions in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquacultre. 219, 597- 611.

26.**Watanabe, T., Kiron, V. and Satoh, S.H. 1997.** Trace minerals in fish nutrition. Aquaculture, 151, 185-207.

27.**Xu, B., Wang, Y., Li, J., and Lin, Q. 2009.** Effects of prebiotic xylooligosaccharides on growth performance and digestive activities of allogynogenetic carp (*Carassius auratus gibelio*). *Fish Physiol. Biochem.*

35,351–357.