

مقاله علمی - پژوهشی:

تأثیر نانوذره سلنیوم، ویتامین‌های C و E ریزپوشانی شده بر عملکرد رشد، شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های کبدی فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی جوان

علی حسین پورزلتی^۱، میرحامد سید حسنی^{۱*}، حسین آدینه^۲، تورج سهرابی^۱

*mirhamedhassani@yahoo.com

۱-انستیتو تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت

ایران. صندوق پستی: ۴۶۶۴-۴۱۶۳۵

۲-دانشگاه گنبد کاووس، گروه شیلات- دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گنبدکاووس، ایران. صندوق پستی:

۴۹۷۱۷۹۹۱۵۱

تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: شهریور ۱۴۰۰

چکیده

در آزمایش حاضر، تأثیر مخلوطی از مکمل‌های ریزپوشانی شده نانوذره سلنیوم (اندازه ذره ۳۰ نانومتر) (شرکت پیشگامان نانو مواد، خراسان)، ویتامین‌های C و E (۰/۱، ۳۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم: جیره A)، (۰/۲، ۶۰ و ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم: جیره B)، (۰/۳، ۹۰ و ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم: جیره C) و جیره شاهد (فاقد مکمل: جیره D) بر شاخص‌های رشد، کارایی غذا، سیستم ایمنی و آنزیم‌های کبدی ۱۲۰ عدد فیل ماهی با میانگین وزن اولیه $1/38 \pm 77/34$ گرم پرورش یافته در تانک‌های فایبرگلاس نیم‌تنی (آب‌رسانی شده بامخلوطی از آب چاه و رودخانه) در قالب ۴ تیمار (هریک با ۳ تکرار) به مدت ۱۰ هفته مورد بررسی قرار گرفت. ماهیان ۲ درصد وزن بدن و ۳ بار در روز تغذیه شدند. در انتهای آزمایش، وزن نهایی (۵ درصد)، درصد افزایش وزن بدن (۳/۸۴ درصد)، نرخ رشد ویژه (۱/۸۹ درصد در روز) و رشد روزانه (۶/۲۳ درصد) در ماهیان تغذیه‌شده با جیره B به طور معنی‌داری بیشتر از جیره شاهد بود ($P<0.05$). فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات آمینوترانسفراز (SGOT) و آلانین آمینوترانسفراز (SGPT) سرم نسبت به ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد بیشتر بود ($P<0.05$). اختلاف معنی‌داری در سطح ایمونوگلوبولین کل (Ig) سرم ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های B، C و شاهد مشاهده نشد ($P>0.05$)، میزان کمپلمان سرم در ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از جیره‌های A و B بود ($P<0.05$) و اختلاف معنی‌داری در میزان لیزوزیم سرم ماهیان تیمار شاهد، A و B ثبت نگردید ($P>0.05$). نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن مقادیر ۰/۲، ۶۰ و ۲۰۰ میلی گرم در کیلوگرم نانوذره سلنیوم، ویتامین‌های C و E ریزپوشانی شده به جیره تجاری می‌تواند موجب افزایش معنی‌دار وزن نهایی و شاخص‌های رشد گردد، اما باید مطالعات بیشتری در مورد تأثیر نانوذره سلنیوم ریزپوشانی شده بر عملکرد کبد و شاخص‌های بیوشیمیایی این گونه صورت گیرد.

لغات کلیدی: *Huso huso*، نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E، شاخص‌های رشد، ضریب تبدیل غذا، سیستم ایمنی، آنزیم‌های کبدی

*نویسنده مسئول

مقدمه

در سالیان اخیر با وجود افزایش مزارع پرورش ماهیان خاویاری (عبدالحی و کرمی‌راد، ۱۳۹۷)، ضررهای اقتصادی سنگین به دلیل شیوع بیماری‌های عفونی و تلفات به‌خصوص در مرحله لارو و بچه ماهی در تراکم بالا گزارش شده است. اغلب روش‌های درمانی شامل آنتی‌بیوتیک‌های و درمان‌های شیمیایی اغلب مؤثر نبوده و امروزه استفاده از روش‌های ارتقاء مکانیسم سیستم دفاع غیراختصاصی با استفاده از تحریک کننده‌ها و افزایش‌دهنده‌های سیستم ایمنی غیراختصاصی تغذیه‌ای و محرک‌های رشد (Wang et al., 2013) موجب کاهش حساسیت آبزیان به عوامل بیماری‌زا، بهبود کیفیت محیط زیست و کاهش استفاده از مواد شیمیایی و داروها در آبی‌پروری شده است (Nayak, 2010).

در ماهیان عنصر سلنیوم در سنتز پروتئین (Jamil, 2016; Khan et al., 2013)، تولید هورمون رشد (Ewan, 1976; Jamil, 2013; Khan et al., 2016) و بیان چندین نوع سلنوپروتئین (Rotruck et al., 1973) نقش دارد. ماهیانی که مقادیر کافی سلنیوم دریافت نمی‌کنند، دچار نقص سیستم ایمنی شده و به انواع عفونت‌ها و بیماری‌ها حساس و در نهایت دچار کاهش رشد می‌گردند (Sritunyalucksana et al., 2011). از آنجایی‌که در جیره ماهیان پرورشی و به‌خصوص پودر ماهی سلنیوم به حد کافی وجود ندارد (Rider et al., 2009)، افزودن سلنیوم در اشکال مختلف به جیره غذایی ماهیان توصیه می‌شود (Lorentzen et al., 1994; Wang and Lovell, 1997). اما در سال‌های اخیر توجه بر خاصیت هم‌افزایی و سینرژیک این ماده با عناصر معدنی و آلی معطوف شده است (Khan et al., 2017). چون اگرچه این ترکیب با برخی عناصر مانند آرسنیک، جیوه، کادمیوم، بیسموت، آنتیموان، نقره، مس، تنگستن و ژرمانیوم (Diplock and Hoekstra, 1976; Whanger, 1986; Levander, 1981) موجب افزایش سمیت در ماهیان می‌شود، اما فعل و انفعال تغذیه‌ای مثبت و قوی با ویتامین‌های E و C دارند (NRC, 2011; Khan et al., 2017) و از قابلیت قابل تعویض با یکدیگر برخوردارند و هر

یک به عنوان یک مکانیسم ذخیره‌ای عمل می‌کنند. ویتامین E بیشتر در محافظت علیه پراکسیداسیون لیپد و سلنیوم بر علیه رادیکال‌های آزاد عمل می‌کند و کمبود هر یک با دیگری قابل جبران است. بنابراین، حتی در شرایط نامساعد محیطی انبارداری خوراک و پرورش، ترکیب نانوسلنیوم، ویتامین C و E در دامنه‌های خاص از طریق جلوگیری از انتشار رادیکال‌های آزاد یا رادیکال‌های آزاد اکسیژن (ROS)^۱ (Dabrowski and Ciereszko, 2001) ممانعت از اکسیدشدن اسیدهای چرب غیراشباع بافت، افزایش ظرفیت ضد آنتی اکسیدانی و در نهایت افزایش متابولیسم و بازده خوراک (Khan et al., 2017) و در نهایت رشد آبی (Taveekijakarn et al., 1996) کردند. مطالعات نشان داده است که مکمل ترکیبی ویتامین E (۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و سلنیوم (۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) موجب افزایش وزن و نسبت تبدیل خوراک در قزل‌آلای رنگین‌کمان (Rodríguez and Paralicthys, 2014)، کفشک ماهی زیتونی (Moniruzzaman et al., 2015; Lee et al., 2016)، ترکیب ویتامین C (۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و نانو ذره سلنیوم (۰/۶۸ میلی‌گرم در کیلوگرم) موجب ارتقاء عملکرد رشد، شاخص‌های خون، بیوشیمیایی و سیستم ایمنی گونه *T. putitora* (Khan et al., 2017) و الحاق ۱۵۰ میلی‌گرم کیلوگرم ویتامین C، ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم ویتامین E و ۰/۲ میلی‌گرم کیلوگرم سلنیوم موجب بقاء ۱۰۰ درصدی لارو تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) در مقابل چالنج با انگل *Edwardsiella tarda* (Kim et al., 2003) گردید.

در سال‌های اخیر شکل نانوی سلنیوم به بازار عرضه شده است (Khan et al., 2016) که دارای اثرات منحصربه‌فردی نظیر سطوح جذب بالا در دستگاه گوارش و زیست‌فراهمی می‌باشد (Albrecht et al., 2006) و نسبت به فرم‌های معدنی و آلی اثرات بهتری بر شاخص‌های رشد و فیزیولوژیک ماهی دارند (Khan et al., 2016). همچنین روش‌های مختلفی برای محصورسازی اسید اسکوربیک و آلفا-توکوفرول به منظور

¹ Radical free oxygen (RFO)

کاهش اثر آبشویی و حفظ خواص ویتامینی آن نظیر خشک‌کن پاششی، سرد کردن پاششی و خنک کردن پاششی، اکستروژن، بستر سیال، پوشاندن به‌وسیله لیپوزوم، متراکم کردن، میکروامولسیون‌ها (آب در روغن یا روغن در آب) و کریستال‌های مایع (بازلی محبوب و همکاران، ۱۳۹۴) وجود دارد. چنین مواردی موجب کاهش آبشویی و خواص آنتی‌اکسیدانتی این ویتامین‌ها می‌شوند. تحقیقات آدینه و همکاران (۱۳۹۸) نشان داد که سطوح مختلف مکمل آنتی‌اکسیدان ریزپوشانی شده نانوسلنیوم، ویتامین‌های E و C بر عملکرد رشد، ترکیبات بدن و برخی شاخص‌های بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تأثیر مثبت دارد. با این حال، اثرات سینرژیک این ریزمغذی‌ها بر بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک مانند رشد، سیستم دفاعی آنتی اکسیدان (مانند SOD و CAT) و ایمنی سایر ماهیان به‌خوبی توصیف نشده (Fonseca et al., 2013; Naderi et al., 2017).

این تحقیق به منظور بررسی تأثیر مخلوطی از ریزمغذی‌های نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E ریزپوشانی شده بر شاخص‌های رشد، آنزیم‌های کبدی و سیستم ایمنی فیله‌ماهی در دوران رشد صورت گرفت.

مواد و روش کار

تهیه جیره و نحوه افزودن ریزمغذی‌ها به آن

نانوسلنیوم با خلوص ۹۹/۹۹ درصد، اندازه ذره ۳۰ نانومتر از شرکت پیشگامان نانو مواد، خراسان، ایران، ویتامین E (آلفا-توکوفرول) با خلوص ۹۹ درصد از شرکت (لایدیس، انگلستان) و ویتامین C (اسکوربات پلی فسفات) از شرکت امید پارسا دماوند (تهران، ایران) تهیه شدند. مواد پوشاننده شامل میزان ۳۰ گرم مالتودکسترین و ۱۰ گرم صمغ عربی

با ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مخلوط و مخلوط ژله مانند به مدت سه دقیقه به‌وسیله هوموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه همگن و به مدت ۲۴ ساعت در بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای هیدراته شدن نگهداری شد. سپس مخلوط نانوسلنیوم، ویتامین‌های E و C به نسبت ۱:۳ با مواد پوشاننده به مدت ۳۰ دقیقه برای هر تیمار به صورت مجزا در قالب تیمارهای A (۰/۱، ۳۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B (۰/۲، ۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و C (۰/۳، ۹۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) مخلوط شدند (آدینه و همکاران، ۱۳۹۸). برای تیمار شاهد فقط از مواد پوشاننده بدون مکمل آنتی اکسیدانی استفاده شد. جهت خشک کردن انجمادی مکمل‌های ریزپوشانی شده همه تیمارها به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار داده شد. در ادامه ماده جامد متخلخل به‌دست آمده برای هر یک از تیمارها در هاون چینی به صورت مجزا خرد شد. از جیره (GFS₁) شرکت فرادانه به عنوان جیره پایه استفاده شد. (جدول ۱). ۰/۵ گرم از مکمل آنتی‌اکسیدانی (نانوسلنیوم، ویتامین‌های E و C) ریزپوشانی شده به یک کیلوگرم غذای پودر شده اضافه و با آن مخلوط گردید. در مرحله بعد به جیره پودر شده آب اضافه شد و خمیر تهیه از چرخ گوشت صنعتی (Pars Esfahan, GM₃₂, Isfahan, Iran) با قطر صفحه ۳ میلی‌متر عبور داده شد و به صورت رشته‌های ماکارونی بیرون آمد پلت‌های خارج شده از چرخ گوشت روی سینی‌های توری گسترده و با یک فن با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک (Hardy and Barrows, 2002)، بسته‌بندی، شماره‌گذاری و در فریزر -۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف، نگهداری شد.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی جیره (GFS₁). شرکت فرادانه

Table 1: Chemical composition of diet (GFS₁, Faradaneh Company)

سایز غذا (میلی‌متر)	پروتئین (%)	چربی (%)	فیبر خام (%)	خاکستر (%)	رطوبت (%)	فسفر (%)
۳	۴۵	۱۶	۳/۵	۱۰	۱۰	۱/۲

تغذیه و پرورش ماهیان

۱۲۰ عدد بچه ماهی فیلماهی با وزن متوسط $1/38 \pm$ گرم در بخش آبی‌پروری انستیتو تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر (روستای شاقاجی، رشت، استان گیلان) در مخازن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری با قطر ۱۰۵ سانتی‌متر، ۵۱ سانتی‌متر ارتفاع و حجم آب ۵۰۰ لیتر که با آب رودخانه سفیدرود و آب چاه نیمه عمیق با دبی ۴/۷۵ لیتر در دقیقه آب‌رسانی می‌گردید، به تعداد ۱۰ عدد ماهی در هر مخزن بدون اختلاف معنی‌دار در شاخص وزن ($P>0.05$) توزیع و از جیره‌های آزمایشی به میزان ۲ درصد وزن بدن در ساعات ۸/۰۰ صبح، ۱۵/۰۰ و ۲۱/۰۰ به مدت ۷۰ روز هفته تغذیه شدند. دوره نوری به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی بود. جهت ارزیابی میزان رشد و تعیین زیتوده هر مخزن، بیومتری در فواصل ۱۵ روزه انجام گرفت (Luo et al., 2006). در پایان دوره تغذیه ماهیان با جیره‌های آزمایشی، از ۳۰ درصد جمعیت ماهیان (۳ ماهی از هر مخزن) با استفاده از سرنگ ۲ میلی لیتر آغشته به هیپارین از ساقه دمی خون‌گیری به عمل آمد. به منظور تهیه پلاسما نمونه‌های خون با دور ۳۰۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه به وسیله دستگاه (Labfuge 200, Frankfort, Germany) سانتریفیوژ (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹) و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش‌های آزمایشگاهی

آلکالین فسفاتاز با استفاده از روش اسپکتوفتومتری و با استفاده از کیت‌های پارس آزمون براساس روش ارائه شده در کاتالوگ ارائه شده مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (Koyama et al., 1987).

جهت ارزیابی میزان کلی ایمونوگلوبولین سرم از روش رسوب با سولفات روی استفاده شد. ابتدا بافر ۰/۷ میلی‌مول سولفات روی تهیه شد و pH آن به ۵/۸ رسانده شد. سپس در میکروتیوب‌های استریل ۱۲/۵ میکرولیتر از سرم‌های زمان‌های صفر، ۳۰ و ۶۰ به صورت جداگانه ریخته شد و ۸۵۰ میکرولیتر از سولفات روی به هر میکروتیوب اضافه و به خوبی مخلوط شدند. بعد از ۲ ساعت قرار گرفتن در دمای اتاق، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق

در پلیت ۹۶ خان‌های الیزا ریخته شد و در طول موج ۵۹۰ نانومتر جذب نوری قرائت شد. جهت تهیه نمودار استاندارد میزان کلی ایمونوگلوبولین نمونه‌های سرم با حجم مساوی (هر نمونه ۲۰ میکرولیتر) با هم مخلوط و پس از تهیه رقت‌های دو برابر مطابق روش مذکور و به صورت همزمان بررسی شدند. میزان ایمونوگلوبولین در نمونه اولیه ۲۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر در نظر گرفته شد (Affonso et al., 2004).

فعالیت فرعی کمپلمان با پروتکل Yano (۱۹۹۲) و بر اساس روش همولیز گلبول قرمز خرگوش (RaRBC) به شرح ذیل انجام شد. نمونه‌های رقیق شده سرم خون ماهی در رقت‌های ۰/۱ تا ۰/۲۵ میلی‌لیتر تهیه و در لوله‌های آزمایشگاهی توزیع شد. سپس با محلول بافر باربیتورات حاوی EGTA (اتیلن گلیکول بیس-β-آمینو اتیل اتر - ان - ان تترا استیک اسید) به ۲۵ میلی‌لیتر رسید. در مرحله بعد ۰/۱ میلی‌لیتر گلبول قرمز خرگوش (RaRBC) به هر لوله آزمایش اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد ۳/۱ میکرومول کلرید سدیم ۰/۹ درصد اضافه شد. بعد از این مرحله نمونه در دستگاه سانتریفیوژ در دور ۸۳۶ g به مدت ۵ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا RaRBC لیز نشده حذف گردد. غلظت نوری سوپرناتانت حاصل در طول موج ۴۱۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. حجم ۵۰ درصدی گلبول قرمز حل‌نشده برای تعیین فعالیت کمپلمان نمونه بر اساس فرمول ذیل مورد استفاده قرار گرفت: ۱۱۱

$$ACH_{50} (\text{un} / \%) = 1/k \times (\text{عکس سرم رقیق شده}) \times 0/5$$

$K =$ مقدار سرم (میلی لیتر) که بر حسب ۵۰ درصد گلبول قرمز لیز شده و عدد ۰/۵ ضریب اصلاح معادله است که به عنوان مقیاس روش اصلی به کار رفته است. فعالیت لیزوزیم با روش کدورت‌سنجی بر اساس روش Ellis (۱۹۹۰) اندازه‌گیری شد. بدین‌منظور، غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر سفیده تخم مرغ برای تخلیه استاندارد استفاده شد. ۲۵ میکرولیتر نمونه سرم ماهی در تکرارهای سه‌تایی در پلت‌های ۹۶ سوراخه ریخته و ۱۷۵

انکوبه گردید و سپس به این محلول، ۲۵۰ میکرولیتر معرف شماره ۲ (۱۵ میکرومول در لیتر 2-Oxoglutarate، ۰/۱۸ میکرومول در لیتر NADH) اضافه و مراحل جذب نوری در زمان‌های ۱، ۲ و ۳ دقیقه در دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۴۰ نانومتر، قطر کووت یک سانتی‌متر و دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرائت گردید. در مرحله بعد مقدار اختلاف جذب نوری پس از دقایق ۱، ۲ و ۳ جمع و بر عدد ۳ تقسیم و میانگین به دست آمده بر اساس پروتکل ارائه شده از شرکت مزبور در ضریب جذب (۱۹۸۵) ضرب و براساس جدول ضرایب خطا، غلظت ALT محاسبه گردید (Thomas, 1998)

محاسبه شاخص‌های رشد

با انجام زیست‌سنجی‌های یک‌ماهه و با توجه به اطلاعات به‌دست آمده از طول و وزن ماهیان و تشکیل بانک اطلاعاتی، محاسبات آماری شاخص‌های رشد، تغذیه، بر اساس فرمول‌های ذیل محاسبه گردید:

ضریب چاقی (K) = $100 \times (\text{وزن ماهی}) / (\text{طول کل یا چنگالی})$ (Fynn-Aikins et al., 1993)

افزایش وزن (WG) (گرم) = وزن نهایی (g) - وزن اولیه (g) (Hung et al., 1989)

افزایش وزن بدن (BWI) (درصد) = $(\text{افزایش وزن (g)} / \text{وزن ابتدایی (g)}) \times 100$ (Hung et al., 1987)

ضریب رشد ویژه ((SGR)) (% در روز) = $100 \times [(\text{لگاریتم وزن نهایی} - \text{لگاریتم وزن اولیه}) / \text{تعداد روز (زمان)}]$ (Rónyai et al., 1990)

نرخ تبدیل غذایی (FCR) = $\text{غذای خشک مصرفی شده (g)} / \text{افزایش وزن (g)}$ (Abdelghany and Ahmad, 2002).

نرخ کارایی پروتئین (PER) = $\text{وزن تر اضافه شده (افزایش بیوماس) (g به گرم)} / \text{مقدار پروتئین مصرفی (g)}$ (Moore et al., 1988)

Chicago, USA) انجام شد. سطح معنی‌دار بودن برای همه موارد ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

پارامترهای فیزیوشیمیایی آب در طول دوره پرورش مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲). فاکتورهای کیفی آب بین تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌دار آماری نداشت به‌طوری‌که میانگین معیارها در بین تیمارهای آزمایشی تا حدودی یکسان بود. مقادیر درجه حرارت آب، اکسیژن

میکرولیتر سوسپانسیون *Micrococcus luteus* در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم بافر فسفات ۰/۵ مولار در pH=۶/۲ اضافه شد. در تیمار کنترل منفی بافر فسفات نمکی جایگزین سرم گردید. کاهش در مقدار OD در طول موج ۳۵۰ نانومتر بعد از یک ساعت و پنج دقیقه در ۲۲ درجه سانتی‌گراد ثبت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم لیزوزیم، بر مبنای کاهش جذب ۰/۰۰۱ در دقیقه تعریف گردید.

فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز (SGOT-ALT) و آلانین آمینوترانسفراز (AST-SGPT) با استفاده از کیت‌های شرکت پارس آزمون و با روش فتومتریک با دستگاه اسپکتروفتومتر (IRMA, Tokyo, Japan) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. جهت اندازه‌گیری غلظت ALT سرم خون ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سرم خون ماهی با ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف شماره یک (۱۰۰ میکرومول در لیتر TRIS در pH=۷/۵، ۵۰۰ میکرومول در لیتر آل آلانین و ۱۲۰۰ واحد در لیتر لاکتات دی‌هیدروژناز) مخلوط و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌های کسب‌شده در نرم‌افزار Excel ثبت و مورد پردازش قرار گرفت. سپس نرمال‌بودن داده‌ها از طریق آزمون Kolmogorov-Smirnov و معنی‌دار بودن داده‌ها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه مورد سنجش قرار گرفت و در صورت مشاهده اختلاف، تست Tukey برای مقایسه میانگین‌ها به‌عنوان Post-hoc اعمال شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار (SPSS, IBM Corp Version 24.0.)

محلول، pH و آمونیاک کل به‌ترتیب در محدوده‌های ۷/۲۲±۰/۳۶ میلی‌گرم درجه سانتی‌گراد، ۱۷/۸۵±۰/۴۵ در لیتر، ۶/۸±۰/۳۰ و ۰/۴±۰/۱۶ میلی‌گرم در لیتر ثبت شد.

جدول ۲: شرایط فیزیکیوشیمیایی آب تانک‌های پرورش طی دوره تغذیه ماهیان با جیره‌های فرموله شده (میانگین ± انحراف معیار)

Table 2: Physicochemical water conditions of rearing tanks during feeding period of fish with formulated diets (mean ±SD)

پارامترها	بیست و پنج روز اول	بیست و پنج روز دوم	بیست روز سوم	میانگین کل
درجه حرارت (سانتی‌گراد)	۱۷/۱ ± ۰/۴	۱۷/۲ ± ۰/۵	۱۸/۳ ± ۰/۴۶	۱۷/۸۵ ± ۰/۴۵
اکسیژن محلول (میلی‌گرم در لیتر)	۷/۵ ± ۰/۵۱	۷/۱ ± ۰/۲	۷/۱۴ ± ۰/۴	۷/۲۲ ± ۰/۳۶
پ.ا.چ	۷/۱ ± ۰/۱	۶/۹۶ ± ۰/۵	۶/۸۵۷ ± ۰/۳	۶/۸ ± ۰/۳۰
آمونیاک کل (میلی‌گرم در لیتر)	۰/۳۸ ± ۰/۲۱	۰/۴۲ ± ۰/۱۵	۰/۴۳ ± ۰/۲۲	۰/۴ ± ۰/۱۶

شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل غذا
 شاخص‌های رشد و ضریب تبدیل غذای ماهیان تغذیه‌شده
 با جیره شاهد و جیره‌های مخلوط مکمل آنتی اکسیدانی
 ریزپوشانی‌شده نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E به‌ترتیب
 جیره A (۰/۱، ۳۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم)، B (۰/۲، ۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و C (۰/۳، ۹۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در جدول ۳ ارائه شده است.

جدول ۳: عملکرد رشد فیلماهی (*Huso huso*) تغذیه‌شده با مخلوط مکمل آنتی اکسیدانی ریزپوشانی‌شده نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E (n=۳، میانگین ± انحراف معیار)

Table 3: Growth performance of *Huso huso* fed with microencapsulated antioxidant supplement mixture of nanoselenium, vitamins C and E (n = 3, mean ± SD)

شاخص‌ها / جیره	A: مکمل‌های ریزپوشانی‌شده نانو سلنیوم، ویتامین‌های C و E (۰/۱، ۳۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	B: مکمل‌های ریزپوشانی‌شده نانو سلنیوم، ویتامین‌های C و E (۰/۲، ۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	C: مکمل‌های ریزپوشانی‌شده نانو سلنیوم، ویتامین‌های C و E (۰/۳، ۹۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)	D: جیره شاهد (دارای دیواره بدون نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E)
وزن اولیه (گرم)	۷۸/۳ ± ۰/۰۳	۷۸/۱۶ ± ۰/۱۷	۷۸/۵۰ ± ۱/۵۶	۷۶/۱۱ ± ۱/۷۸
وزن نهایی (گرم)	۳۵۱/۷ ± ۳/۸ ^{ab}	۳۷۰/۸ ± ۱۶/۱ ^a	۳۱۱/۰۵ ± ۲۵/۲۴ ^{bc}	۲۸۶/۱ ± ۱۱/۵۰ ^c
طول اولیه (سانتی‌متر)	۲۷/۹۳ ± ۰/۶۵	۲۷/۹۹ ± ۰/۰۵	۲۷/۹۲ ± ۰/۵۹	۲۸/۱۵ ± ۰/۳۱
طول نهایی (سانتی‌متر)	۴۲/۷۵ ± ۰/۶۲ ^a	۴۳/۹۹ ± ۰/۹۹ ^a	۴۱/۸۲ ± ۰/۶۸ ^{ab}	۳۹/۵ ± ۰/۴۱ ^b
ضریب چاقی	۰/۴۵ ± ۰/۰۱	۰/۴۳ ± ۰/۰۱	۰/۴۲ ± ۰/۰۱	۰/۴۶ ± ۰/۰۰۳
درصد افزایش وزن درصد در طول دوره)	۳۴۹/۱ ± ۴/۶۷ ^{ab}	۳۶۲/۵۲ ± ۱۹/۰ ^a	۳۰۶/۲۷ ± ۱۴/۰۷ ^{bc}	۲۸۹/۶۵ ± ۶/۳۳ ^c
نرخ رشد ویژه (درصد در روز)	۲/۱۱ ± ۰/۰۱ ^{ab}	۲/۱۵ ± ۰/۰۵ ^a	۱/۹۷ ± ۰/۰۴ ^{bc}	۱/۹۱ ± ۰/۰۲ ^c
رشد روزانه (گرم در روز)	۳/۸۵ ± ۰/۰۵ ^{ab}	۴/۰۹ ± ۰/۲۳ ^a	۳/۳ ± ۰/۰۳ ^{bc}	۲/۹۹ ± ۰/۱۳ ^c
مقدار غذای مصرفی به ازای هر ماهی (گرم)	۱۸۹۱/۱۴	۲۰۱۰/۳	۱۷۹۸/۱۲	۷۰۴/۰۲
ضریب تبدیل غذا	۰/۶۹ ± ۰/۰۰ ^b	۰/۶۹ ± ۰/۰۳ ^b	۰/۷۶ ± ۰/۰۰ ^a	۰/۸ ± ۰/۰۰ ^a
نسبت بازده پروتئین	۳/۶۱ ± ۱/۳۴ ^a	۳/۶۱ ± ۰/۲۰ ^a	۳/۲ ± ۰/۴ ^b	۳/۱۱ ± ۰/۰۳ ^b

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری است (P<0.05).

به طوری که نسبت بازده پروتئین در ماهیان تغذیه شده با جیره های A و B در مقایسه با جیره های C و D افزایش معنی دار آماری داشت ($P < 0.05$).

شاخص های سیستم ایمنی غیر اختصاصی و آنزیم های کبدی

آنالیز برخی از فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی و آنزیم های کبدی فیل ماهی تغذیه شده با سطوح مختلف ترکیب نانوسلنیوم، ویتامین E و C ریزپوشانی شده در جدول ۴ ارائه شده است. میزان آلکالین فسفاتاز سرم ماهیان از تیمارهای مختلف غذایی تأثیر پذیرفت و بیشترین مقدار آن در ماهیان تیمارهای A و B به مقدار $(388/25 \pm 8/6)$ و $444/0 \pm 12/6$ واحد در لیتر) مشاهده شد که به طور معنی داری بیشتر از ماهیانی بود که با جیره D (دارای دیواره و فاقد نانوسلنیوم، ویتامین C و E) تغذیه شده بودند ($P < 0.05$) ($219/0 \pm 26/01$ واحد در لیتر).

شاخص وزن نهایی در ماهیان تغذیه شده با جیره B ($370/8 \pm 16/1$ گرم) در مقایسه با جیره شاهد ($286/1 \pm 11/5$ گرم) افزایش معنی دار آماری داشت ($P < 0.05$). شاخص ضریب چاقی ماهیان تیمارهای مختلف فاقد اختلاف معنی دار آماری بود ($P > 0.05$). بیشترین درصد افزایش وزن بدن ماهیان تغذیه شده با جیره B بود که به طور معنی داری بیشتر از ماهیان تغذیه شده با جیره های C و شاهد بود ($P < 0.05$). ضریب رشد ویژه و رشد روزانه نیز از تیمارهای غذایی تأثیر پذیرفت. این شاخص ها در ماهیان تغذیه شده با جیره های A و B به طور معنی داری بیشتر از ماهیان تغذیه شده با جیره فاقد مکمل بود ($P < 0.05$). کمترین ضریب تبدیل غذا متعلق به ماهیان تغذیه شده با جیره های A و B بود که به طور معنی داری بر ضریب تبدیل غذای ماهیان تغذیه شده از جیره های C و D برتری داشت ($P < 0.05$). روند مشابهی در شاخص نسبت بازده پروتئین مشاهده شد.

جدول ۴: تغییرات شاخص های سیستم ایمنی غیر اختصاصی و آنزیم های کبدی فیلماهی (*Huso huso*) تغذیه شده با مخلوط مکمل آنتی اکسیدانی ریزپوشانی شده نانوسلنیوم، ویتامین های C و E ($n=3$) میانگین $\pm$ انحراف معیار

Table 4: Changes in nonspecific immune system parameters and hepatic film enzymes (*Huso huso*) fed with nanoselenium microencapsulated antioxidant supplementation, vitamins C and E ($n = 3$, mean $\pm$ SD)

شاخص ها / جیره	A: مکمل های	B: مکمل های	C: مکمل های	D: جیره شاهد
ریزپوشانی شده نانو سلنیوم، ویتامین های C و E (100 و 300 میلی گرم بر کیلوگرم)	ریزپوشانی شده نانو سلنیوم، ویتامین های C و E (200 و 600 میلی گرم بر کیلوگرم)	ریزپوشانی شده نانو سلنیوم، ویتامین های C و E (300 و 900 میلی گرم بر کیلوگرم)	ریزپوشانی شده نانو سلنیوم، ویتامین های C و E (300 و 900 میلی گرم بر کیلوگرم)	(دارای دیواره بدون نانوسلنیوم، ویتامین های C و E)
آلکالین فسفاتاز (واحد در لیتر)	$388/25 \pm 8/06^a$	$444/0 \pm 12/60^a$	$318/5 \pm 24/00^{ab}$	$219/0 \pm 26/01^b$
ایمونوگلوبولین (میلی گرم در لیتر)	$37/5 \pm 5/25^b$	$46/5 \pm 2/38^a$	$46/25 \pm 0/95^a$	$45/0 \pm 1/41^a$
(واحد / درصد) ACH_{50}	$131/5 \pm 1/29^c$	$132/75 \pm 1/7^{bc}$	$134/25 \pm 0/50^{ab}$	$135/5 \pm 0/57^a$
لیزوزیم (واحد / میلی لیتر / دقیقه)	$35/0 \pm 1/63^b$	$37/0 \pm 2/1^{ab}$	$34/20 \pm 3/30^b$	$39/75 \pm 2/06^a$
(واحد / لیتر) AST^1	$404/5 \pm 23/16^a$	$547/25 \pm 68/66^a$	$348/25 \pm 51/4^{ab}$	$121/52 \pm 20/82^b$
(واحد / لیتر) ALT^2	$13/5 \pm 1/7^{ab}$	$16/75 \pm 1/7^a$	$13/7 \pm 1/25^{ab}$	$10/0 \pm 0/00^b$

حروف انگلیسی متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری است ($P < 0.05$)

۱- آسپارات آمینوترانسفراز، ۲- آلانین آمینوترانسفراز

نداشت ($P > 0.05$)، ولی به مراتب بیشتر از مقدار لیزوزیم سرم خون ماهیان تغذیه شده با جیره C ($34/2 \pm 3/30$) واحد / میلی لیتر / دقیقه) بود ($P < 0.05$). الحاق مکمل های ریزپوشانی شده نانوسلنیوم، ویتامین های C و E در سطوح

میزان لیزوزیم در ماهیان تغذیه شده با جیره شاهد ($39/75 \pm 2/06$ واحد / میلی لیتر / دقیقه) اختلاف معنی داری با ماهیان تغذیه شده با جیره های A و B ($35/0 \pm 1/63$ و $37/0 \pm 2/1$ واحد / میلی لیتر / دقیقه)

(۰/۲، ۶۰، ۲۰۰ و ۰/۳، ۶۹، ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) موجب افزایش معنی‌دار Ig در مقایسه با جیره D (فاقد مکمل) نگردید ($P>0.05$)، اما مقدار Ig در ماهیان تغذیه‌شده با جیره A ($5/25 \pm 37/5$ میلی گرم در لیتر) به طور معنی‌داری کمتر از جیره D ($45/00 \pm 1/41$ میلی گرم در لیتر) بود ($P<0.05$). مقدار کمپلمان در ماهیان تغذیه‌شده با مکمل‌های ریزپوشانی شده نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E در سطوح ۰/۳، ۶۰، ۳۰۰ میلی گرم در کیلوگرم (جیره C) فاقد اختلاف معنی‌دار با جیره D بود ($P>0.05$). ولی میزان کمپلمان ACH_{50} در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های A و B به طور معنی‌داری کمتر از ماهیان تغذیه‌شده با جیره D بود ($132/75 \pm 1/29$ و $131/5 \pm 1/70$ در مقابل $135/5 \pm 0/57$ واحد / درصد) ($P<0.05$). اگرچه تفاوت معنی‌داری در آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز (SGOT-AST) در ماهیان تغذیه‌شده با جیره C در مقایسه با جیره D مشاهده نشد ($P>0.05$)، اما مقدار این آنزیم در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های A و B به طور معنی‌داری بیشتر از جیره مذکور بود ($404/5 \pm 23/16$ و $547/25 \pm 48/66$ در مقابل $121/52 \pm 20/82$ واحد در لیتر) ($P<0.05$). در روندی مشابه اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (SGPT-ALT) در پلاسمای خون ماهیان تیمارهای A، B و D مشاهده نشد درحالی‌که میزان این آنزیم در ماهیان تغذیه‌شده با جیره B به طور معنی‌داری بیشتر از ماهیان تیمار D بود ($16/75 \pm 1/7$ در مقابل $10/00 \pm 0/00$ واحد در لیتر) ($P<0.05$).

بحث

در مطالعه حاضر، ماهیان تغذیه‌شده با ترکیب نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E ریزپوشانی شده، شاخص‌های رشد بهتری نسبت به ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد داشتند. بیشترین وزن نهایی، درصد افزایش وزن و نسبت بازده پروتئین متعلق به ماهیان تغذیه‌شده با جیره A ($0/1$ ، ۳۰ و ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم) و همسو با مطالعه Khan و همکاران (۲۰۱۷ و ۲۰۱۶) در مورد تأثیر نانوسلنیوم و ویتامین C بر شاخص‌های رشد گونه *Tor putitora* است.

که حاکی از شاخص‌های رشد بهتر در ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی نانوسلنیوم و ویتامین C در سطوح ۰/۶۸ و ۳۰۰ میلی گرم در مقایسه با ماهیان تغذیه‌شده با مکمل‌های انفرادی سلنیوم و ویتامین C و هماهنگ با مطالعات پیشین در مورد اثر هم‌افزایی سلنیوم و ویتامین‌های دیگر نظیر ویتامین E بر بهبود شاخص‌های رشد و فیزیولوژیک ماهیان است (Gatlin et al., 1986; Fonseca et al., 2013). همچنین مطالعات محمدی‌دوست و همکاران (۱۳۹۹) در ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*)، Harsij و همکاران (۲۰۲۰) در گونه قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و Adineh و همکاران (۲۰۲۰) در ماهی آمور (*Ctenopharyngodon Idella*) تغذیه‌شده با سطوح ترکیبی نانوسلنیوم و ویتامین‌های C و E دلالت بر افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد در مقایسه با جیره‌های فاقد این ریزمغذی‌ها داشت، احتمالاً به این دلیل که سلنیوم به عنوان یک جزو مهم آنزیم دی‌یدیناز، به طور غیرمستقیم در ترشح هورمون رشد از غده هیپوفیز در همه مهره‌داران از جمله ماهی نقش دارد (Muller et al., 1999). Cotter و همکاران (۲۰۰۸) افزایش فعالیت هورمون‌های تیروئید را در هیبرید باس مخطط (*Morone chrysops*) تغذیه‌شده از جیره حاوی سلنیوم را ثبت کردند و بر این نکته اذعان داشتند که این عامل موجب رشد بهتر و بازده خوراک در ماهی می‌شود. به همین ترتیب، ویتامین‌های E و C، در دامنه‌های خاص موجب رشد آبزیان (Taveekijakarn et al., 1996) از طریق ممانعت از اکسیدشدن اسیدهای چرب غیراشباع در بافت، افزایش متابولیسم و در نهایت موجب افزایش وزن، بازده خوراک و ضریب رشد ویژه در ماهیان می‌شوند (Khan et al., 2017). مطالعاتی نیز نشان داده است که احتمالاً تأثیر نانوذرات سلنیوم در بهبود رشد به دلیل تسریع در ساخت سلنوپروتئین‌ها در سلول‌های اپی‌تلیال روده است که تسهیل در هضم مؤثر مواد مغذی را به دنبال دارد (Wang et al., 2013). علاوه بر این، سلنیوم به عنوان یک کوانزیم در تولید و ساخت آنزیم‌های گوارشی عمل می‌کند و موجب افزایش فعالیت آنها می‌شود.

(Shenkin, 2006). فعال شدن آنزیم‌های گوارشی قابلیت هضم مواد مغذی را افزایش داده و مواد مغذی بیشتری را برای جذب از طریق سلول‌های اپی‌تلیال روده آزاد می‌کند که در نهایت موجب افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذا می‌گردد. هرچند در مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌داری در ضریب تبدیل غذا مشاهده نشد، اما شاخص‌های رشد مطلوب‌تر در تیمارهای تغذیه‌ای با مخلوط مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی ریزپوشانی شده در جیره فیل ماهی در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده شد. اما علت عدم ثبت اختلاف معنی‌دار را می‌توان به عواملی چون اندازه ماهی، شرایط محیط پرورش، درجه حرارت آب و طریقه افزودن این ریزمغذی‌ها به جیره نسبت داد (Khan et al., 2017).

سیستم دفاعی ماهیان شامل دو بخش: سیستم دفاعی ذاتی و سیستم دفاعی اکتسابی می‌باشد که از طریق سازگاری و انطباق با محیط اطراف و پاتوژن‌های مربوطه، فعال می‌شود. ایمونوگلوبولین‌ها دسته‌ای از مولکول‌های زیستی ذاتی هستند که در سیستم ایمنی فعال بوده و به‌طور اختصاصی علیه آنتی‌ژن‌ها ترشح می‌شوند (Van Muiswinkel et al., 2006). در آزمایش حاضر افزودن مخلوطی از نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E در جیره‌های B و C موجب افزایش معنی‌دار IgM در مقایسه با ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد گردید. مطالعاتی نشان داده است که مکمل نانوسلنیوم می‌تواند عملکرد رشد و سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کپور را بهبود بخشد (Ashouri et al., 2015, Saffari et al., 2017). مطالعات قبلی نیز نشان داده بود که ویتامین E و سلنیوم عناصر ریزمغذی مهمی هستند که به صورت هم افزایی (Gatlin et al., 1986; Fonseca et al., 2013) عمل کرده و بر بسیاری از فرایندهای سیستم ایمنی (El-Shenawy et al., 2015) و محافظت در برابر استرس اکسیداتیو (Bernabucci et al., 2002) تأثیر مثبت دارند که در مطالعه حاضر، خود را با افزایش و تحریک تولید Ig کل سرم خون نشان و هم‌سو با مطالعات محمدی‌دوست و همکاران (۱۳۹۹) در ماهی سی‌باس آسیایی است که در آن میزان ایمونوگلوبولین کل ماهی تغذیه‌شده با تیمار

دریافت‌کننده مکمل (نانوسلنیوم، ویتامین C و E) بالاتر بود. در این مطالعه میزان کمپلمان در ماهیان تغذیه‌شده از جیره A حاوی ۰/۱، ۳۰ و ۱۰۰ نانو سلنیوم، ویتامین C و E به طور معنی‌داری بالاتر از ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد بود. کمپلمان نقش اصلی را در ایمنی ذاتی بدن بازی می‌کند و دارای نقش تسهیل‌کننده فرایند Chemotaxis (تاکتیسیم شیمیایی: مکانیزمی که به‌وسیله آن سلول‌ها در پاسخ به محرک شیمیایی حرکت می‌کنند) و از بین‌برنده عوامل بیماری‌زا می‌باشد (Holland and Lambris, 2002). همچنین با سیستم ایمنی اکتسابی مرتبط است. زیرا فعال‌سازی آن باعث تقویت تکثیر سلول‌های B می‌شود (Morgan et al., 2005). احتمالاً به‌نظر می‌رسد، علاوه بر نقش در محافظت در برابر استرس اکسیداتیو نانوسلنیوم (Yu et al., 2020)، ویتامین‌های C و E جیره نیز موجب تحریک پاسخ ایمنی نظیر افزایش فعالیت‌های گلوبول‌های سفید بیگانه خوار، تکثیر سلولی می‌شود که در این مطالعه اثر خود را با افزایش فعالیت کمپلمان نشان داد (Khara et al., 2016). میزان لیوزیم، آنزیم آسپارات آمینوترانسفراز و آنزیم آلانین آمینو ترانسفراز در ماهیان تغذیه‌شده دارای اختلاف معنی‌دار آماری نبود، اما میزان فعالیت آنزیم‌های مذکور در ماهیان تغذیه‌شده با جیره C حاوی نانو سلنیوم و ویتامین‌های C و E ریزپوشانی‌شده به مقدار ۰/۳، ۹۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بیشتر از ماهیان تغذیه‌شده با جیره فاقد مکمل بود. آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمین ترانسفراز آنزیم‌های مهمی در ارزیابی وضعیت کبد هستند و افزایش آنها در پلاسمای ماهی ممکن است آسیب کبد یا عملکرد آن را نشان دهد (Coz-Rakovac et al., 2005). مطالعاتی نشان داده است که سطوح بالای سلنیوم جیره می‌تواند در کبد و آبشش ماهیان انباشته شده و موجب تغییرات پاتولوژیک در کبد شامل احتقان سلول‌های آسینار، سینوزوئیدهای کبدی و واکوئل‌های مربوطه شود (Khalil et al., 2019) که احتمال دارد با افزایش تراوش آسپارات آمینوترانسفراز (AST) و آلانین آمینوترانسفراز (ALT) خود را نشان دهد (Mansour et al., 2017). نتایج مطالعات Harsij و همکاران (۲۰۲۰)

کاظمی، ر.، پوردهقانی، م.، یوسفی، آ.، یارمحمدی، م. و نصری‌تجن، م.، ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان، رشت، ۱۹۴ صفحه.

محمدی دوست، م.، آهنگرزاده، م.، هوشمند، ح.، حکمت پور، ف.، خسروی، م.، محمدیان، ت. و محسنی‌نژاد، ل.، ۱۳۹۹. تأثیر ویتامین‌های E و C و سلنیوم به عنوان محرک سیستم ایمنی بر فاکتورهای رشد و ایمنی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*). مجله تغذیه آبزیان، ۶(۲): ۷۴-۶۳.

Abdelghany, A.E. and Ahmad, M.H., 2002.

Effects of feeding rates on growth and production of Nile tilapia, common carp and silver carp polycultured in fertilized ponds. *Aquaculture Research*, 33(6): 415-423. Doi: 10.1046/j.1365-109. 2002. 00689 .x.

Adineh, H., Naderi, M., Nazer, A., Yousefi,

M. and Ahmadifar, E., 2020. Interactive effects of stocking density and dietary supplementation with Nano selenium and garlic extract on growth, feed utilization, digestive enzymes, stress responses, and antioxidant capacity of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 8(5): 417-432. Doi:10.1111/jwas.12747.

Affonso, C.M., Da Silva, L.C., Lima, F.G.

and Soares, S., 2004. MW and MVar management on supply and demand side for meeting voltage stability margin criteria. *IEEE TRANSACTIONS on Power Systems*, 19 (3): 1538-1545. DOI: 10.1109/TPWRS.2004.831659.

در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با جیره حاوی سطوح مشابه نانوسلنیوم، ویتامین‌های C و E بر این نکته اذعان داشت که کمترین فعالیت AST سرم در ماهیان تغذیه شده با جیره (۰/۳، ۹۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) مشاهده شد که نشانگر حداقل آسیب به عملکرد طبیعی کبد و آسیب سلول‌های قرمز خون در این گروه است که هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر و گونه فیلماهی نمی‌باشد. جهت اثبات این امر باید مطالعات بافت‌شناسی در کبد فیلماهیان صورت گیرد.

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن مخلوطی از مکمل‌های ریزپوشانی شده نانوذره سلنیوم، ویتامین‌های C و E به میزان ۰/۲، ۶۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم موجب افزایش معنی‌دار وزن نهایی (۵ درصد)، درصد افزایش وزن بدن (۳/۸۴ درصد)، نرخ رشد ویژه (۱/۸۹ درصد) و رشد روزانه (۶/۲۳ درصد) در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود ($P < 0.05$)، اما با توجه به افزایش معنی‌دار آنزیم‌های کبدی (آسپارات آمینوترانسفراز و آلانین آمینوترانسفراز) سرم نسبت به ماهیان تغذیه‌شده با جیره شاهد توصیه می‌شود، مطالعات بعدی در خصوص بررسی تأثیر الحاق همین دوز بر بافت کبد و شاخص‌های بیوشیمیایی این گونه صورت گیرد.

منابع

آدینه، ح.، هرسیج، م.، اسدی، م. و احمدی‌فر، ا.، ۱۳۹۸. تأثیر سطوح مختلف مکمل‌های آنتی اکسیدانی ریزپوشانی شده بر عملکرد رشد و تغذیه، ترکیبات بدن و برخی شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تغذیه آبزیان، ۵(۱) ۹۷-۱۰۹.

باذلی محبوب، ف.، ایمان، م.، عمو عابدینی، ق. و عطار، ح.، ۱۳۹۴. انکپسوله کردن اسکوربیک اسید درون نانومیسل. مجله تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی، ۲۰(۵) ۴۷-۵۳.

عبدالحی، ح. و کرمی راد، ن.، ۱۳۹۷. توسعه پرورش ماهیان خاویاری در ایران. دو فصلنامه ترویجی ماهیان ماهیان استروژن، ۱: ۳۲-۴۴.

- Albrecht, M.A., Evans, C.W. and Raston, C.L., 2006.** Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry*, 8(5): 417-432. DOI: 10.1039/b517131h.
- Ashouri, S., Keyvanshokoo, S., Salati, A.P., Johari, S.A. and Pasha-Zanoosi, H., 2015.** Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle composition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 446: 25-29. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.04.021.
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N. and Nardone, A., 2002.** Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science*, 85(9): 2173-2179. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(02)74296-3.
- Cotter, P.A., Craig, S. R. and McLean, E., 2008.** Hyperaccumulation of selenium in hybrid striped bass: a functional food for aquaculture?. *Aquaculture Nutrition*, 14(3): 215-222. DOI:10.111.1365-2095. 2007.00520 .x 1/j.
- Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Hacmanjek, M., Lipej, Z. and Sostaric, B., 2005.** Blood chemistry and histological properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. *Veterinary Research Communications*, 29(8): 677-687. DOI: 10.1007 /s11259-005-3684-z.
- Dabrowski, K. and Ciereszko, A., 2001.** Ascorbic acid and reproduction in fish: endocrine regulation and gamete quality. *Aquaculture Research*, 32(8): 623-638. DOI:10.1046/j.1365-2109.2001.00598.x
- Diplock, A.T. and Hoekstra, W.G., 1976.** Metabolic aspects of selenium action and toxicity. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, 4(3): 271-329. DOI:10.1080/10408447609164016.
- Ellis, A.E., 1990.** Lysozyme assays. In: Stoka, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson, B.S. Van Muiswisal, W.B. (Eds). *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications. USA, 101-103.
- El-Shenawy, N.S., AL-Harbi, M.S. and Hamza, R.Z., 2015.** Effect of vitamin E and selenium separately and in combination on biochemical, immunological and histological changes induced by sodium acid in male mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 67(1): 65-76. DOI: 10.1016/j.etp.2014.10.005.
- Ewan, R.C., 1976.** Effect of selenium on rat growth, growth hormone and diet utilization. *The Journal of Nutrition*, 106: 702-709. DOI:10.1093/jn/106.5.702.
- Fonseca, S.B.D., Silva, J.H.V.D., Beltrão Filho, E.M., Mendes, P.D.P., Fernandez, J.B.K., Amancio, A.L.L. and Silva, F.R.P.D., 2013.** Influence of levels and forms of selenium associated with levels of vitamins C and E on the performance, yield and composition of tilapia fillet. *Food Science and Technology*, 33: 109-115. DOI:10.1590/S0101-20612013000500017.

- Fynn-Aikins, K., Hung, S.S.O and Hughes, S.G., 1993.** Effects of feeding a high level of D-glucose on liver function in juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 12 (4): 317-325. DOI:org/10.1007/BF00004416.
- Gatlin, III, D.M., Poe, W.E., Wilson, R.P., Ainsworth, A.J. and Bowser, P.R., 1986.** Effects of stocking density and vitamin C status on vitamin E-adequate and vitamin E-deficient fingerling channel catfish. *Aquaculture*, 56(3-4): 187-195. DOI:10.1016/0044-8486(86)90334-0.
- Hardy, R.W. and Barrows, F.T., 2002.** Diet formulation and manufacture. In: Halver, J.E., Hardy, R.W (Eds). *Fish Nutrition*. Academic Press, London. pp. 505-600.
- Harsij, M., Kanani, H.G. and Adineh, H., 2020.** Effects of antioxidant supplementation (nano-selenium, vitamin C and E) on growth performance, blood biochemistry, immune status and body composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under sub-lethal ammonia exposure. *Aquaculture*, 521: 734-942. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.734942.
- Holland, M.C.H. and Lambris, J.D., 2002.** The complement system in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*, 12: 399-420. DOI:10.1006/fsim.2001.0408.
- Hung, S.S.O. and Lutes, P.B., 1987.** Optimum feeding rate of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*): at 20 C. *Aquaculture*, 65(3-4): 307-317. DOI:1016/0044- 8486 (87) 90243-2.
- Jamil, Z., 2013.** Effects of inorganic and nanoform of selenium on growth performance and biochemical indices of mahseer (*Tor putitora*). M.Phil. Thesis, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan. 260 P.
- Khalil, H.S., Mansour, A.T., Goda, A.M.A. and Omar, E.A., 2019.** Effect of selenium yeast supplementation on growth performance, feed utilization, lipid profile, liver and intestine histological changes, and economic benefit in meagre, (*Argyrosomus regius*), fingerlings. *Aquaculture*, 501: 135-143. DOI:10.1016/j.aquaculture.2018.11.018.
- Khan, K.U., Zuberi, A., Nazir, S., Fernandes, J.B.K., Jamil, Z. and Sarwar, H., 2016.** Effects of dietary selenium nanoparticles on physiological and biochemical aspects of juvenile *Tor putitora*. *Turkish Journal of Zoology*, 40 (5): 704-712. DOI:10.3906/zoo-1510-5.
- Khan, K.U., Zuberi, A., Fernandes, J.B.K., Ullah, I. and Sarwar, H., 2017.** An overview of the ongoing insights in selenium research and its role in fish nutrition and fish health. *Fish physiology and Biochemistry*, 43(6): 1689-1705. DOI: 10.1007/s10695-017-0402-z.
- Khara, H., Sayyadborani, M. and Sayyad Borani, M., 2016.** Effects of α -Tocopherol (vitamin E) and ascorbic acid (vitamin c) and their combination on growth, survival and some hematological and

- immunological parameters of Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius* juveniles. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 16: 385-393. DOI:10.4194/1303-2712-v16_2_18.
- Kim, K., Wang, X., Choi, S., Park, G., Koo, J. and Bai, S. C., 2003.** No synergistic effects by the dietary supplementation of ascorbic acid, α -tocopheryl acetate and selenium on the growth performance and challenge test of *Edwardsiella tarda* in fingerling Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L). *Aquaculture Research*, 34: 1053-1058. DOI:10.4194/1303-2712-v17_3_09.
- Koyama, I., Miura, M., Matsuzaki, H., Sakagishi, Y. and Komoda, T., 1987.** Sugar-chain heterogeneity of human alkaline phosphatases: differences between normal and tumour-associated isozymes. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 413: 65-78. DOI:10.1016/0378-4347(87)80214-1.
- Lee, S., Park, G., Moniruzzaman, M., Bae, J., Song, Y., Kim, K. and Bai, S.C., 2016.** Synergistic effects of dietary vitamin C and selenium on induced methylmercury toxicity in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Turkish Journal Fish Aquaculture Science*. 17: 527-533. DOI:10.4194 /1303-2712-v17_3_09.
- Levander, O.A., 1986.** Selenium. In: Mertz W (ed) Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press, London, pp. 139-197.
- Lorentzen, M., Maage, A. and Julshamn, K., 1994.** Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 121(4): 359-367. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90270-4](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90270-4)
- Luo, L., Xue, M., Wu, X.F., Cai, X.F., Cao, H.N. and Liang, Y.M., 2006.** Partially or totally replacement of fish meal by solvent extracted cottonseed meal in diets for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Nutrition*, 12: 418-424. DOI:10.1111/j.1365-2095.2006.00443.x.
- Mansour, A.T.E., Goda, A.A., Omar, E.A., Khalil, H.S. and Esteban, M.A., 2017.** Dietary supplementation of organic selenium improves growth, survival, antioxidant and immune status of meagre, (*Argyrosomus regius*), juveniles. *Fish & Shellfish Immunology*, 68: 516-524. DOI: 10.1016/j.fsi.2017.07.060.
- Moniruzzaman, M., Park, G., Yun, H., Lee, S., Park, Y. and Bai, S.C., 2015.** Synergistic effects of dietary vitamin E and selenomethionine on growth performance and tissue methyl mercury accumulation on mercury induced toxicity in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*, Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 48 (2): 1-11 DOI: 10.1111/are.12904.
- Moore, B.J., Hung, S.S. and Medrano, J.F., 1988.** Protein requirement of hatchery-produced juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquaculture*,

- 71(3): 235-245. DOI: 10.1016/0044 - 8486(88)90262-1
- Morgan, B.P., Marchbank, K.J., Longhi, M.P., Harris, C.L. and Gallimore, A.M., 2005.** Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunology Letter*, 97: 171-179. DOI:10.1016/j.imlet.2004.11.010.
- Muller, E.E., Locatelli, V. and Cocchi, D., 1999.** Neuroendocrine control of growth hormone secretion. *Physiological Reviews*, 79 (2): 511-607. DOI:10.1152/physrev.1999.79.2.511.
- Naderi, M., Keyvanshokoh, S., Salati, A. P. and Ghaedi, A., 2017.** Effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles supplementation on acute stress responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) previously subjected to chronic stress. *Aquaculture*, (473): 215-222. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.02.020.
- Nayak, S.K., 2010.** Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14. DOI:10.1016/j.fsi.2010.02.017.
- NRC (National Research Council), 2011.** Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. The National Academy Press, Washington, D. C., 329 P.
- Rider, S. A., Davies, S.J., Jha, A.N., Fisher, A.A., Knight, J. and Sweetman, J.W., 2009.** Supra-nutritional dietary intake of selenite and selenium yeast in normal and stressed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): implications on selenium status and health responses. *Aquaculture*, 295(3-4): 282-291. DOI:10. 1016/j .aquaculture .2009.07.003.
- Rodríguez, H. and Rojas, S., 2014.** Efecto de dietas enriquecidas con vitamina ey selenio orgánico en el comportamiento productivo y calidad funcional del filete de trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(2): 213-225.
- Rónyai, A., Ruttkay, A., Varadi, L. and Peteri, A., 1990.** Growth of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* B.) and that of its both hybrids with the sterlet (*Acipenser ruthenus* L.) in recycling system. In: Rónyai, A., (ed) *Acipenser Premier Colloque International Sur l'esturgeon*, Bordeaux, CEMAGREF. pp. 423-427.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G., 1973.** Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179: 585-590. DOI: 10.1126/science.179.4073.588.
- Saffari, S., Keyvanshokoh, S., Zakeri, M., Johari, S. A. and Pasha-Zanoosi, H. J. A. N., 2017.** Effects of different dietary selenium sources (sodium selenite, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition, blood enzymes and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Nutrition*, 23(3): 611-617. DOI:10.1111/anu.12428.
- Shenkin, A., 2006.** Micronutrients in health and disease. *Postgraduate Medical Journal*, 82(971): 559-567.

<http://dx.doi.org/10.1136/pgmj.2006.047670>.

Sritunyalucksana, K., Intaraprasong, A., Sa-nguanrut, P., Filer, K. and Fegan, D.F., 2011. Organic selenium supplementation promotes shrimp growth and disease resistance to Taura syndrome virus. *Science Asia*, 37: 24–30. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2011.37.02.

Taveekijakarn, P., Miyazaki, T., Matsumoto, M. and Aral, S., 1996. Histopathological and haematological changes in amago salmon, *Oncorhynchus rhodurus* (Jordan & McGregor), fed a vitamin-D-free diet. *Journal of Fish Diseases*, 19(4): 289-294. DOI:10. 1046/j.1365-2761.1996.d01-85.x.

Thomas, I., 1998. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate amino transferase (AST). In: Thomas, I (ed). *Clinical Laboratory Diagnostic*. 2rd.edn. Frankfurt TH-Books Verlagsgesellsc, pp. 55-65.

Van Muiswinkel, W. B. and Vervoorn-Van Der Wal, B., 2006. The Immune System of Fish. In: Woo, P.T.K.,(ed) *Fish Diseases and Disorders*. CAB International, Netherlands, Wageningen, pp. 678-701.

Wang, C. and Lovell, R. T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability

than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 152(1-4): 223-234. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01523-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01523-2).

Wang, Y., Yan, X. and Fu, L., 2013. Effect of selenium nanoparticles with different sizes in primary cultured intestinal epithelial cells of crucian carp, (*Carassius auratus gibelio*). *International Journal of Nanomedicine*, 8: 4007-4013. DOI: 10.2147/IJN.S43691.

Whanger, P.D., 1981. Selenium and heavy metal toxicity. In: Spallholz J.E; Martin J. L; Ganther, H.E (ed) *Selenium in biology and medicine*. 2rd edn AVI Publishing, England, Westport CT, pp. 230–255.

Yano, T., 1992. Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P (ed). *Techniques in Fish Immunology*, 2rd.edn Fair Haven, USA, New Jersey, pp.150- 158.

Yu, H., Zhang, C., Zhang, X., Wang, C., Li, P., Liu, G. and Ji, H., 2020. Dietary nano-selenium enhances antioxidant capacity and hypoxia tolerance of grass carp *Ctenopharyngodon idella* fed with high-fat diet. *Aquaculture Nutrition*, 26(2): 545-557. DOI: [org/10.1111/anu.13016](https://doi.org/10.1111/anu.13016).

Effect of micro coated selenium, vitamins C and E on growth performance, immune indices and liver enzymes in juvenile beluga (*Huso huso*)

Pourzelti A.H.¹; Seyed Hassani M.H.^{* 1}; Adineh H.²; Sohrabi T.¹

^{*}mirhamedhassani@yahoo.com

1-International Caspian Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Rasht, P.O.Box: 3464-41635.

2- Gonbad Kavous University, Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, P.O.Box: 4971799151.

Abstract

In the present experiment, the effect of a mixture of microcoated supplements of selenium nanoparticles (particle size 30 nm) (Pishgaman Nanomavad Company, Khorasan), vitamins C and E (0.1, 30, and 100 mg/kg: A diet), (0.2, 60, and 200 mg/kg: B diet), (0.3, 90, and 300 mg/kg: C diet) and a control diet (no supplement: D diet) on growth indices, feed efficiency, immune system, and liver enzymes of 120 beluga with an average initial weight of 77.34±1.38 g grown in fiberglass tanks (supplied with a mixture of well and river water) in the form of 4 treatments (each with 3 replications) for 10 weeks were investigated. The fish were fed at 2% of body weight 3 times a day. At the end of the experiment, final weight (5%), body weight gain percentage (3.84%), specific growth rate (1.89 %/day) and daily growth (6.23%) in the fish fed with B diet were significantly higher than the control diet ($P<0.05$). The activity of aspartate aminotransferase (SGOT) and alanine aminotransferase (SGPT) serum enzymes was higher than the fish fed with the control diet. ($P<0.05$). significant difference was not observed in serum total immunoglobulin (Ig) fish fed diets B, C and control ($P>0.05$), but serum ACH_{50} in fish fed control was significantly higher than diets A and B ($P<0.05$), also there was no significant difference in serum lysozyme in control, A and B treatments ($P>0.05$). The results of this study showed that adding 0.2, 60, and 200 mg/kg selenium nanoparticles, vitamins C and E to the commercial diet could significantly increase of final weight and growth indices, but more studies should be done on the effect of microcoated selenium nanoparticles on liver performance and biochemical indices of this species.

Keywords: *Huso huso*, Nanoselenium, Vitamins C and E, Growth indices, Food conversion ratio, Immune system, Liver enzymes

^{*}Corresponding author