CC BY

**مقاله علمی – پژوهشی:**

# اثرات نانوذرات سلنیوم بر عملکرد آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و یون‌های تخمک مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

عیسی فلاحت ناصرآباد[۱]، اسماعیل کاظمی*[۱]، سید عبدالحمید حسینی[۱]، محمدمیثم صلاحی اردکانی[۱]، رقیه محمودی[۱]

*esmaeil.kazemi.1986@gmail.com

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

تاریخ دریافت: خرداد ۱۴۰۲ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۲

## چکیده

در این پژوهش تاثیر نانوذرات سلنیوم بر عملکرد آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شامل سوپر اکسید دیسموتار (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)، سطح مالون دی آلدئید MDA و کاتالاز (CAT) و یون‌های تخمک مولدین ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۴۴ قطعه مولد ماده ایرانی ۴ ساله، به چهار تیمار در سه تکرار تقسیم شدند. تیمارها با جیره حاوی صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم نانوذرات سلنیوم در کیلوگرم جیره به مدت ۶۰ روز تا زمان رسیدگی تخمک تغذیه شدند. بر اساس نتایج پژوهش، مقادیر SOD، CAT و MDA در تخمک تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان آنزیم SOD و بیشترین میزان آنزیم CAT در تیمار کنترل مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد. اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم GPx بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید ($p>۰۵$). مقادیر آنزیم MDA در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد درحالی‌که گروه کنترل با میزان ۱۶/۸±۳۶۳ میلی‌مول بر میلی‌لیتر بیشترین و تیمار تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا با میزان ۹/۵±۱۸۱ میلی‌مول بر میلی‌لیتر دارای کمترین مقدار بودند. مقایسه میانگین مقادیر منیزیم و کلسیم در بین تیمارهای مختلف نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقادیر یون‌های مذکور در تیمار تغذیه شده با نانو ذرات سلنیوم به میزان ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا نسبت به سایر تیمارها بود ($p<۰/۰۵$). در مجموع، با توجه به نقش کاهشی آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و نقش افزایشی آن در مقادیر ترکیبات غیرآلی منیزیم و کلسیم در تخمک‌های مربوط به مولدین تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم بیشتر، این ریز مغذی ضروری می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای تحقیقات بیشتر در جهت بهبود کیفیت تخم مولدین ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق افزودن به جیره غذایی در نظر گرفته شود.

**لغات کلیدی:** قزل‌آلای رنگین‌کمان، جیره غذایی، نانو ذرات سلنیوم، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، یون‌های تخمک

*نویسنده مسئول



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]
[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

## مقدمه

متخصصان تغذیه در بسیاری از نقاط جهان برای افزایش تولید و کاهش اثرات عوامل استرس‌زای محیطی بر ماهیان پرورشی اقدام به افزودن بعضی مواد معدنی و ویتامین یا عناصر فلزی خاص به جیره غذایی می‌کنند (Adineh *et al*., 2020). در این میان شبه فلز سلنیوم از اهمیت خاصی برخوردار است (Küçükbay *et al*., 2009). سلنیوم یکی از عناصر شیمیایی شبه فلز و کمیاب است که بیشتر به صورت ترکیب یافت می‌شود. مصرف مقدار زیاد آن سمی بوده ولی در مقادیر کم برای فعالیت سلول‌ها لازم است. این عنصر در چرخه تنظیم انرژی، متابولیسم اسیدهای چرب ضروری، سنتز پایه بازهای پورین و پیریمیدین، عمل اسپرماتوژنز، سنتز پروستوگلاندین‌ها و بالابردن سیستم‌های ایمنی حیوانات نقش مؤثری دارد (Heindl *et al*., 2010). این ماده یک عنصر ریزمغذی ضروری در انسان، حیوان و ماهی محسوب می‌شود که جزو اصلی ساختمان آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است و نقش حفاظت از سلول و غشاء در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد را از طریق تشکیل سلنوپروتئین‌ها (گلوتاتیون پراکسیداز و تیوردوکسین ردوکتاز)، ایفاء می‌کند (Miezeliene *et al*., 2011). سلنیوم نقش مهمی در فرآیندهای دستگاه ایمنی و غدد درون‌ریز دارد (Khan *et al*., 2017) و ماهیانی که مقادیر کافی از این ماده را 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).

در محیط طبیعی، ماهیان معمولاً سلنیوم مورد نیاز خود را از منابع موجود در اطراف خود (آب و غذاهای زنده) که با مقدار مناسب سلنیوم غنی شده‌اند، به‌دست می‌آورند. هر گونه اختلال در میزان سلنیوم دریافتی موجب کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود (Jamil, 2013; Khan *et al*., 2016). از آن‌جایی‌که در جیره‌های غذایی مبتنی بر پودر ماهی و پروتئین‌های گیاهی و جانوری پرورشی، سلنیوم به اندازه کافی وجود ندارد، اضافه کردن سلنیوم در اشکال مختلف به جیره غذایی ماهیان توصیه می‌شود (Wang and Lovell, 1997). نانوذرات سلنیوم فرم جدیدی از سلنیوم است که به دلیل دسترسی زیستی بالاتر و سمیت نسبتاً کمتر در مقایسه با سایر اشکال سلنیوم، توجه محققان را به‌خود جلب کرده است (Wang *et al*., 2013). از سوی دیگر، نانو ذرات سلنیوم دارای خواص منحصربه‌فرد نانوذرات است که از آن جمله می‌توان نسبت سطح به حجم بالا، افزایش فعالیت سطحی، ضریب بالای کاتالیزوری و میزان جذب بیشتر نام برد (Shi *et al*., 2011). مهم‌ترین آنتی‌اکسیدان‌های آنزیماتیک در درون سلول شامل آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آنزیم کاتالاز (CAT) و آنزیم گلوتاسیون پراکسیداز (GPx) است (Agarwal *et al*., 2005). هدف از انجام این پژوهش، بررسی تاثیر نانو ذرات سلنیوم بر عملکرد آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و یون‌های تخمک مولدین ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) است.

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تاثیرات استفاده از نانو ذرات سلنیوم بر فاکتورهای آنزیمی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به منظور سنجش کیفیت و کمیت تخمک استحصالی صورت نگرفته است، لذا پژوهش حاضر برای اولین بار این موضوع را مورد بررسی قرار داد. ولی پژوهشگران مختلف اثرات منابع مختلف سلنیوم را در قالب آلی، معدنی و نانو بر رشد، بازماندگی و سایر ویژگی‌های زیستی و فیزیولوژیک در گونه‌های سایر ماهیان مورد بررسی قرار داده‌اند. هدف از انجام این پژوهش پاسخ دادن به سوالاتی ذیل است: آیا نانو ذرات سلنیوم می‌تواند در بازدهی تکثیر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موثر باشد؟ آیا افزودن نانوذرات سلنیوم به جیره موجب بهبود عملکرد بهتر آنزیم‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می شود؟ و آیا وضعیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ماهیان تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم نسبت به ماهیان تغذیه شده با جیره پایه بهبود پیدا می‌کند؟ آیا مصرف جیره غذایی غنی‌شده با نانو ذرات سلنیوم باعث افزایش کیفیت تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود؟



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

## مواد و روش کار

### تهیه مولدین و آماده‌سازی استخرها

این پژوهش در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، اجرا شد. تعداد استخرهای مورد نیاز برای اجرای پژوهش ۱۲ استخر با ابعاد ۱۰ متر (طول)، ۲ متر (عرض) و ۱ متر (ارتفاع) بود. آب استخرها از یک چشمه که در فاصله حدود ۵۰۰ متری از مرکز قرار داشت تهیه گردید. استخرهای مورد نظر قبل از معرفی ماهیان شسته شده و نکات بهداشتی و ضدعفونی برای آنها اعمال شد. بعد از تمیز نمودن و شستشو، استخرها به مدت ۲۴ ساعت به‌وسیله مواد ضدعفونی رایج از جمله ترکیبی از سولفات مس، فرمالین و نمک، ضدعفونی شدند. سپس تعداد ۱۴۴ قطعه ماهی مولد ماده ۴ ساله با میانگین وزن ۹۵±۲۶۸۳ گرم و طول ۶/۹±۵۷/۴ سانتی‌متر از بین گله مولدین به‌گزینی شده (بر اساس بهترین وزن و طول) مرکز، انتخاب شد. جهت انتخاب مولدین معیارهایی از قبیل سلامت ظاهری ماهی مد نظر قرار گرفت. ماهیان انتخابی به طور تصادفی در ۱۲ استخر توزیع شدند.

### تیماربندی مولدین

یک هفته پس از سازگاری با شرایط استاندارد محیطی، ماهیان بر اساس جیره به ۴ گروه آزمایشی به شرح ذیل تقسیم شدند که هر تیمار شامل ۳۰ قطعه مولد ماده و دارای ۳ تکرار بود:

شاهد: مولدهای ماده شاهد که با غذای تجاری (فاقد منابع مختلف سلنیوم) تغذیه شدند.

تیمار ۱: مولدهای ماده که با جیره‌ی حاوی ۰/۵ میلی‌گرم نانو ذرات سلنیوم به ازاء هر کیلوگرم غذای تجاری تغذیه شدند.

تیمار ۲: مولدهای ماده که با جیره‌ی حاوی ۱ میلی‌گرم نانو ذرات سلنیوم به ازاء هر کیلوگرم غذای تجاری تغذیه تغذیه شدند.

تیمار ۳: مولدهای ماده که با جیره‌ی حاوی ۲ میلی‌گرم نانو ذرات سلنیوم به ازاء هر کیلوگرم غذای تجاری تغذیه تغذیه شدند. (Ashouri *et al*., 2015).

### مراحل آماده‌سازی غذا

در این مطالعه، غذای تجاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (EXB2، کیمیاگران تغذیه، شهرکرد، ایران) به عنوان جیره پایه مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات فیزیکی و آنالیز خورک مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان بر اساس آنالیز اعلامی کارخانه شامل: حداقل پروتئین ۳۸ درصد، حداقل چربی ۱۴ درصد، حداقل فیبر ۳/۵ درصد، حداکثر رطوبت ۱۰ درصد و اندازه خوراک ۰/۵±۱۱ بود. در هر تیمار، مقدار محاسبه شده نانو ذرات سلنیوم (نانوذرات اکسید سلنیوم (Se-NPs) با اندازه ۳۰-۱۰ نانومتر و خلوص بیش از ۹۹ درصد، وارده از شرکت Research Nanomaterials Co., USA (از طریق شرکت پیشگامان نانومواد ایرانیان)، برای دست‌یابی به دوزهای مورد نظر، ابتدا در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند و سپس به صورت جداگانه ۲ مرتبه بر روی غذاها اسپری گردید. جیره گروه شاهد بدون اضافه کردن نانوذرات سلنیوم آماده شد. به منظور یکسان سازی شرایط، در تیمار شاهد مقدار مساوی آب مقطر (فاقد نانوذرات سلنیوم) روی غذا اسپری شد (جدول ۱). غذاهای آماده شده به مدت ۳ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند. سپس برای محافظت از غذاها و جلوگیری از رها شدن نانو ذرات و ورود آنها به محیط آب، غذاهای آماده شده به روش ذیل، به‌وسیله لایه‌ای از ژلاتین گاوی پوشانده شدند. بدین‌منظور، ابتدا محلول ۱۰ درصد ژلاتین گاوی در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر تهیه شد و سپس روی هر یک از انواع غذاها به میزان ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ژلاتین به صورت یکنواخت اسپری گردید. در پایان، غذاها به مدت ۳ ساعت دیگر در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد خشک شدند (Ashouri *et al*., 2015). البته باید توجه داشت که فرایند آماده‌سازی غذا به منظور جلوگیری از فساد و در دسترس بودن مواد افزودنی در هر هفته انجام شد.

طی یک هفته دوره سازگاری، ماهیان با جیره تجاری EXB2 تغذیه می‌شدند. پس از دوره سازگاری، مولدین به صورت روزانه، در دو نوبت (۸:۳۰ صبح و ۵:۳۰ عصر) و به میزان ۱ درصد وزن بدن تغذیه شدند. غذادهی مولدین هر تیمار با جیره خاص خود به مدت دو ماه صورت گرفت و بعد از آن عملیات زیست‌سنجی بر ماهیان تیمارهای مختلف



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

جهت به‌دست آمدن نتایج انجام گرفت. برای بیهوشی مولدین جهت تخم‌گیری از عصاره گل میخک به میزان ۱۰۰ppt در ۱۰۰ لیتر آب استفاده شد (Ashouri *et al.*, 2015).

**جدول ۱: میزان نهایی نانوذرات سلنیوم در جیره های غذایی ساخته شده برای مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان**

**Table 1: The final amount of selenium nanoparticles in diets made for rainbow trout breeders**

| Treatment | The amount of adding selenium nanoparticles to the diet (mg/kg) |
|---|---|
| control | 0 |
| Treatment 1 | 0.5 |
| Treatment 2 | 1 |
| Treatment 3 | 2 |

## استحصال تخمک از مولدین

استحصال تخمک از مولدین بعد از معاینه جنسی انجام گرفت. قبل از تخم‌کشی، هر ماهی تمیز و ناحیه اطراف منفذ تناسلی با یک حوله نرم خشک شد تا باقی‌مانده ماده بیهوشی موجب از بین رفتن تخمک نگردد. آب، موکوس ماهی، مدفوع و خون نباید هنگام تکثیر با تخمک‌ها مخلوط شود. در زمان تکثیر ماهیان مولد ناحیه شکمی از جلو به عقب ماساژ داده می‌شود تا تمام تخمک‌ها از بدن خارج شود. شایان ذکر است، ماهیان مولد ماده این پژوهش بر اساس الگوی ذیل لقاح داده شدند (جدول ۲).

**جدول ۲: آزمایش لقاح به منظور بارورسازی تخمک ماهیان مولد ماده قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره غذایی حاوی مقادیر مختلف نانوذرات سلنیوم**

**Table 2: Fertilization test for the purpose of fertilizing the eggs of female rainbow trout fed with diets containing different amounts of selenium nanoparticles**

| Treatment | Description of intercourse |
|---|---|
| (control) | Control male × control female |
| Treatment 1 | Control male × female fed with a diet containing 0.5 mg of selenium nanoparticles |
| Treatment 2 | Control male × female fed with a diet containing 1 mg of selenium nanoparticles |
| Treatment 3 | Control male × female fed with a diet containing 2 mg of selenium nanoparticles |

از بین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب، اکسیژن محلول (پارامتر کلیدی کیفیت آب)، دما و pH اندازه‌گیری شدند. برای سنجش آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از روش Marklund و Marklund (۱۹۷۴) استفاده شد، اندازه‌گیری فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز به روش Reitman و Frankel (۱۹۵۷) و برای اندازه‌گیری آنزیم کاتالاز از روش Goth (۱۹۹۱) استفاده شد.

## اندازه‌گیری ترکیبات غیر آلی تخمک

اندازه‌گیری منیزیم به صورت Endpoint و به روش فتومتری با استفاده از Xylidyl Blue انجام شد (Ehrhardt and Paschen, 1992). فسفر به‌وسیله دستگاه بیوشیمی آنالایزر با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی پارس آزمون به روش فتومتریک UV-test در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Burtis *et al.*, 2012). برای سنجش کلسیم از روش Cresolphthalein complexone /Endpoint استفاده شد (Yoshimura *et al.*, 1976).

## روش تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها

تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت. قبل از تجزیه‌وتحلیل، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smironov و همگنی واریانس با آزمون Leven ارزیابی شد. نتایج حاصل از تیمارهای مختلف پس از اطمینان از برقراری پیش شرط‌های لازم، با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه بررسی شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون Duncan در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده گردید. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شد.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

## نتایج

### اندازه‌گیری شاخص‌های کیفیت آب

شاخص‌های کیفیت آب طی دوره پرورش ماهیان به صورت منظم ثبت گردید (جدول ۳). آب چشمه با دمای ۱/۵±۱۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۶±۷/۹ میلی‌گرم بر لیتر و pH، ۰/۳±۷/۶ تأمین شد. مقدار خطرناکی برای غلظت آمونیاک ثبت نشد (کمتر از ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر، اندازه‌گیری با استفاده از کیت سنجش آمونیاک Insta-Test® (ANALYTIC).

**جدول ۳: میزان میانگین مشخصات فیزیکوشیمیایی آب در دوره آزمایش**

**Table 3: The average amount of physicochemical characteristics of water during the test period**

| Physicochemical characteristics | Temperature (°C) | Oxygen (mg. L) | pH |
|---|---|---|---|
| Average amount | 11 ± 1.5 | 7.9 ± 0.6 | 7.6 ± 0.3 |

Values represent the mean ± standard deviation of three replicates of each treatment.

### اثر تیمارهای مختلف غذایی بر آنزیم‌های تخمک

با توجه به نتایج، آنزیم‌های SOD، CAT و MDA در تخمک تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان داده‌اند ($p$<۰/۰۵) (جدول ۴). کمترین میزان SOD در تیمار کنترل مشاهده شد که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد. بیشترین میزان آنزیم CAT در تیمار کنترل با میزان ۴±۸۳/۷ بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری در میزان آنزیم GPx بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید ($p$>۰/۰۵). مقادیر آنزیم MDA در بین تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد به‌طوری‌که تیمار کنترل با میزان ۱۶/۸±۳۶۳ میلی‌مول بیشترین و تیمار تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم (۲ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا) با میزان ۹/۵±۱۸۱ میلی‌مول دارای کمترین مقدار بودند.

**جدول ۴: مقایسه میانگین و انحراف معیار مقادیر آنزیم‌های تخمک مولدین قزل آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف**

**Table 4: Comparison of the mean and standard deviation of the egg enzymes of rainbow trout spawners in different treatments**

| Enzymes | fed with food without added selenium (control) | Treatment (1) fed with selenium nanoparticles (0.5 mg/kg food) | Treatment (2) fed with selenium nanoparticles (1 mg/kg food) | Treatment (3) fed with selenium nanoparticles (2 mg/kg food) |
|---|---|---|---|---|
| GPx (mmol/mp) | $1.2 \pm 0.15^{a}$ | $1.2 \pm 0.15^{a}$ | $1.1 \pm 0.1^{a}$ | $1.1 \pm 0.11^{a}$ |
| SOD (mmol/mp) | $9.7 \pm 1.5^{a}$ | $11.9 \pm 2.5^{ab}$ | $13.8 \pm 2.3^{b}$ | $14.6 \pm 1.3^{b}$ |
| CAT (mmol/mp) | $83.7 \pm 4.4^{c}$ | $66.8 \pm 4.9^{b}$ | $57 \pm 6.5^{a}$ | $57.8 \pm 3.8^{ab}$ |
| MDA(mmol/ml) | $363 \pm 6.8^{c}$ | $269 \pm 11^{b}$ | $264 \pm 7.8^{b}$ | $181 \pm 9.5^{a}$ |

Non-identical letters in each line indicate a significant difference (P<0.05).

### اثر تیمارهای مختلف غذایی بر یون‌های تخمک

مقادیر پارامترهای ترکیبات غیر آلی تخمک در جدول ۵ ارائه شده است. یون فسفر تحت تأثیر مکمل‌های مختلف سلنیوم قرار نگرفت و اختلاف معنی‌داری بین هیچ‌یک از تیمارها مشاهده نگردید ($p$>۰/۰۵). مقایسه میانگین مقادیر منیزیم و کلسیم در بین تیمارهای مختلف نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار مقادیر یون‌های مذکور در تیمار تغذیه شده با نانوذره سلنیوم ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا نسبت به سایر تیمارها بود ($p$<۰/۰۵).



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

**جدول ۵: مقایسه میانگین و انحراف معیار مقادیر یون‌های تخمک مولدین قزل‌آلای رنگین کمان در تیمارهای مختلف**

**Table 5: Comparison of the mean and standard deviation of the egg ions of rainbow trout spawners in different treatments**

| The ions | fed with food without added selenium (control) | Treatment (1) fed with selenium nanoparticles (0.5 mg/kg food) | Treatment (2) fed with selenium nanoparticles (1 mg/kg food) | Treatment (3) fed with selenium nanoparticles (2 mg/kg food) |
|---|---|---|---|---|
| magnesium (mg/dl) | $2.3 \pm 0.6^{a}$ | $2.5 \pm 0.2^{ab}$ | $2.6 \pm 0.2^{ab}$ | $3.2 \pm 0.3^{b}$ |
| phosphorus (mg/dl) | $55.9 \pm 1.4^{a}$ | $54.2 \pm 5.5^{a}$ | $58.5 \pm 5.3^{a}$ | $58.3 \pm 3.8^{a}$ |
| Calcium (mg/dl) | $8.7 \pm 0.6^{a}$ | $9.8 \pm 0.8^{ab}$ | $10.8 \pm 0.4^{bc}$ | $11.4 \pm 0.6^{c}$ |

Non-identical letters in each line indicate a significant difference ($P<0.05$).

## بحث

سلنیوم جزو سلنوپروتئین‌های کاربردی است و در عملکردهای طبیعی بدن دخالت دارد (Rayman, 2000). مهم‌ترین کاربرد شناخته شده این عنصر، نقش آن در ساختمان آنزیم‌های آنتی اکسیدانی از قبیل گلوتاتیون پراکسیداز است که عملکرد آنها حذف رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال است (Behne *et al*., 1982).

افزودن نانوذرات روی به جیره مولدین نر قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند سبب بهبود عملکرد شاخص‌های تولید مثلی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان شود (Kazemi *et al*., 2019). Ashouri و همکاران (۲۰۱۵) اثرات سطوح مختلف نانوذرات سلنیوم را در کپور معمولی ارزیابی کردند. در این پژوهش سطح مالون دی آلدهید کبد در ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانو سلنیوم در کیلوگرم به طور معنی‌داری کمتر بود درحالی‌که فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در کبد بالاتر بود. بالاترین فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم مشاهده شد که نسبت به گروه ۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم تفاوت معنی‌داری نداشت که در تحقیق حاضر نیز بیشترین مقدار سطح آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمار ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم مشاهده گردید. در مطالعه Tahmasebi و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر ویتامین E به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و نانوسلنیوم به میزان ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم بر میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز و میزان مالون‌دی‌آلدهید کل بدن در ماهی سفید (*Rutilus kutum*) بررسی شد. نتایج نشان از فعالیت بالاتر آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهیانی که جیره آنها حاوی نانوذرات سلنیوم بود داد و با نتایج این مطالعه که فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز بین تیمارها، اختلاف معناداری نشان نداد، یکسان نبود. Jovanovic و همکاران (۱۹۹۷) تاثیر رژیم غذایی سلنیوم (سلنات و مخمر سلنیوم) را بر سیستم آنتی اکسیدانی پلاسما و کبد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) مورد بررسی قرار دادند. در گروه تغذیه شده با سلنات سدیم، هیچ تغییر قابل‌توجهی در فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ثبت نگردید. در گروه همراه با مخمر سلنیوم میزان فعالیت‌های گلوتاتیون پراکسیداز (GSH-PX), سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) به طور قابل‌توجهی در گلبول‌های قرمز افزایش یافت درحالی‌که فعالیت گلوتاتیون S ترانسفراز (GST) در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. فعالیت SOD کبدی و GST در مقایسه با گروه کنترل افزایش‌یافته بود. نتایج نشان داد که سلنیوم ارگانیک باند شده (مخمر سلنیوم) به صورت مؤثرتری روی سیستم آنتی‌اکسیدانی بچه ماهی کپور نسبت به نمک‌های معدنی عمل می‌کند و در تحقیق حاضر نیز میزان فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز در تیمار ماهیان تغذیه شده با ۲ میلی‌گرم نانوسلنیوم افزایش یافته بود. Wang و همکاران (۱۹۹۷) اثرات منابع مختلف سلنیوم بر بازماندگی، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و وضعیت سلنیوم عضله ماهی طلایی (*Carassius auratus gibelio*) را بررسی کردند. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در پلاسما و کبد نسبت به گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌داری بود درحالی‌که در پژوهش حاضر اختلاف معناداری بین تیمارها در آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مشاهده نشد. Han و همکاران (۲۰۱۱) طی یک آزمایش ۱۰۰ روزه میزان سلنیوم مورد نیاز ماهی گلد فیش جوان (*Carassius auratus gibelio*) را مورد بررسی قرار دادند. این پژوهشگران با افزودن



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

سلنومتیونین به میزان ۰، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره دریافتند، شاخص‌های استرس اکسیداتیو شامل فعالیت سوپراکسید دیسموتاز سرم و گلوتاتیون پراکسیداز کبد در سطح ۵ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم جیره به‌ترتیب کاهش و افزایش معنی‌داری نشان دادند. همچنین غلظت سلنیوم موجود در بافت‌ها به طور معنی‌داری در سطح ۵ میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم جیره افزایش نشان داد. این پژوهشگران رابطه خطی مشخصی را بین فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کبد و افزایش غلظت سلنیوم در این بافت مشاهده کردند. در مطالعه Zhu و همکاران (۲۰۱۲) اثر سلنیوم بر رشد، ترکیب بدن و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کبد در ماهی بأس دهان‌بزرگ (*Micropterus salmoide*) بررسی گردید. مالون‌دی‌آلدئید کبد تحت تاثیر سلنیوم جیره‌ها قرار نگرفت، ولی از سوی دیگر، فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و گلوتاتیون رداکتاز کبد با افزایش غلظت سلنیوم جیره به‌ترتیب افزایش و کاهش قابل‌توجهی نشان دادند. در تحقیق حاضر نیز فعالیت مالون‌دی‌آلدئید در تخمک در تیمار کنترل به دلیل فقدان سلنیوم که نقش آنتی‌اکسیدانی دارد، افزایش قابل‌توجهی داشته است. Chen و همکاران (۲۰۱۳) اثرات افزودن ویتامین E (۱۶۰، ۲۸۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و سلنیوم (۱/۲ و ۱/۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم) را به جیره‌های حاوی روغن ماهی اکسید شده در ماهی بأس دهان بزرگ (*Micropterus salmoide*) جوان بررسی کردند. جیره کنترل حاوی روغن ماهی تازه همراه با ۱۶۰ میلی‌گرم ویتامین E و ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم بود. نتایج نشان داد که روغن اکسید شده جیره، فعالیت کاتالاز کبد را نسبت به گروه کنترل تحریک می‌کند و تکمیل جیره با ویتامین E این اثر را از میان می‌برد که در تحقیق حاضر نیز سلنیوم، میزان فعالیت آنزیم کاتالاز را در تخمک کاهش داد که بین تیمارها اختلاف معناداری داشت ($P<0.05$). همچنین ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۱/۲ میلی‌گرم سلنیوم و ۱۶۰ میلی‌گرم ویتامین E، محتوای مالون‌دی‌آلدهید بالاتری نسبت به گروه کنترل داشتند که با افزایش ویتامین E یا سلنیوم جیره به طور معنی‌داری کاهش یافت که در این تحقیق هم با افزودن و افزایش میزان سلنیوم جیره، میزان آنزیم مالون‌دی‌آلدهید کمتر شد و بیشترین میزان در تیمار کنترل که فاقد سلنیوم بود، مشاهده گردید. بنابراین، هر دو ویتامین E و سلنیوم می‌توانند ماهی بأس دهان بزرگ و قزل‌آلای رنگین‌کمان را از آسیب اکسیداتیو ناشی از روغن اکسید شده جیره محافظت نمایند. در مطالعه Ali و همکاران (۲۰۰۰) ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان به ۴ گروه آزمایشی شامل کنترل، آفت‌کش دیازینون، ویتامین C به‌علاوه دیازینون و ویتامین E، سلنیوم به‌علاوه دیازینون تقسیم شدند. بعد از ۲ و ۴ هفته خونگیری انجام شد و وضعیت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت کاتالاز در سه گروهی که در معرض دیازینون قرار گرفتند، نسبت به گروه کنترل به طور معنی‌داری بالاتر بود، اما گروه تکمیل شده با ویتامین E، سلنیوم کمترین اختلاف را با گروه کنترل داشت. بیشترین و کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌ترتیب در ماهیان تغذیه شده با جیره تکمیل شده با ویتامین E، سلنیوم و ماهیانی که در معرض دیازینون قرار داشتند، مشاهده گردید. همچنین گروه دیازینون دارای بالاترین سطح مالون‌دی‌آلدهید بود. این یافته‌ها نشان‌دهنده اثرات آنتی‌اکسیدانی ویتامین E، سلنیوم یا ویتامین C هستند. همچنین ترکیب ویتامین E، سلنیوم نسبت به ویتامین C اثرات آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری دارد. علاوه‌براین، نتایج نشان داد که سوپراکسید دیسموتاز و مالون‌دی‌آلدهید مناسب‌ترین شاخص‌های ارزیابی اثرات دیازینون هستند و درتحقیق حاضر نیز در تیمار کنترل به دلیل نداشتن سلنیوم، میزان آنزیم کاتالاز دارای بیشترین سطح بود.

مواجهه ماهی با استرس‌های زیاد طی دوره پرورش طبیعی است. در این حالت یک آنتی‌اکسیدان مناسب می‌تواند استرس‌های اکسیداتیو را کاهش دهد و از تخمک در برابر اکسیداسیون چربی محافظت کند یا حتی موجب کاهش آزادشدن آنزیم‌هایی همچون MDA و CAT به درون تخمک شود. کاتالاز همراه با سوپر اکسید دیسموتاز مانع از تشکیل رادیکال‌های فوق‌العاده سمی هیدروکسیل می شود و از تخمک در برابر اثرات مخرب رادیکال هیدروکسیل محافظت می نماید (Alvarez *et al.*, 1987). در مجموع، با توجه به نقش کاهشی سلنیوم بر آنزیم‌ها در تخمک‌های



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

مربوط به مولدین تغذیه شده با نانوذرات سلنیوم بیشتر و نقش افزایشی آن در مقادیر ترکیبات غیرآلی منیزیم و کلسیم، این ریز مغذی ضروری می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسبی برای تحقیقات بیشتر در جهت بهبود کیفیت تخم مولدین ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان از طریق افزودن به جیره غذایی در نظر گرفته شود.

## تشکر و قدردانی

از مساعدت رئیس محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج به دلیل فراهم نمودن امکانات آزمایشگاهی و مشارکت همکاران محترم سپاسگزاری می‌گردد.

## منابع

**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*, 52:789-804. doi:10.1111/jwas.12747.

**Agarwal, A., Prabakaran, S.A. and Said, T.M., 2005.** Prevention of oxidative stress injury to sperm. *Journal of Andrology*, 26(6): 654-660. doi: 10.2164/jandrol.05016.

**Ali, M., Mirvaghefi, A. and Asadi, F., 2000.** Effects of vitamin E, selenium and vitamin C on various biomarkers following oxidative stress caused by diazinon exposure in rainbow trout ege. *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 32, 151-158. doi:10.15406/jamb.2015.02.00035.

**Alvarez, J.G., Touchstone, J.C., Blasco, L. and Storey, B.T., 1987**. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8(5), 338-48.

**Ashouri, S., Keyvanshokooh, S., Salati, A.P., Johari, S.A. and Pasha-Zanoosi, H., 2015.** Effects of different levels of dietary selenium nanoparticles on growth performance, muscle omposition, blood biochemical profiles and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 446, pp. 25-29. doi:10.1016/j.aquaculture.2015.04.021.

**Behne, D., Hofer, T., Von Berswardt-Wallrabe, R. and Elger, W., 1982.** Selenium in the testis of the rat: studies on its regulation and its importance for the organism.*National Library of Medicine*. 102(11), 1682-1687. doi: 10.1093/jn/112.9.1682.

**Burtis, C., Ashwood, E. and Bruns, D., 2012.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, *5th Edition ed. Elsevier*, St. Louis, USA, 2012, 2238 P. doi: 10.1007/s12291-012-0287-7.

**Chen, Y.J., Liu, Y.J., Tian, L.X., Niu, J., Liang, G.Y., Yang, H.J., Yuan, Y. and Zhang, Y.Q., 2013.** Effect of dietary vitamin E and selenium supplementation on growth, body composition, and antioxidant defense mechanism in juvenile largemouth bass (*Micropterus salmoides*) fed oxidized fish oil. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 593-604. doi: 10.1007/s10695-012-9722-1.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

**Kazemi, A., Sorinejad, ., Ghaedi, A., Johari, A., and Ghasemi, Z., 2019.** The effect of feeding with different sources of zinc supplements on the reproductive indices of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*. Seventh year, number four, [In Persian].

**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 bioc,hemical aspects of juvenile *Tor putitora*, *Turkish Journal of Zoology*, 40, 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, 1689-1705. doi: 10.1007/s10695-017-0402-z.

**Küçükbay, F.Z., Yazlak, H., Karaca, I., Sahin, N., Tuzcu, M., Cakmak, M.N. and Sahin, K., 2009.** The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition*, 15, 569-576. doi:10.1111/j.1365-2095.2008.00624.x.

**Marklund, S. and Marklund, G., 1974.** Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European journal of biochemistry*, 47, 469-474. doi: 10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x.

**Ehrhardt, V., Appel, W. and Paschen, K., 1992.** Evakuierung eines Xylidyl-Blau-Reagenz zur Bestimmung von Magnesium. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 104, 5-11.

**Goth, L., 1991.** A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196(2-3), 143-151. doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-m.

**Han, D., Xie, S., Liu, M., Xiao, X., Liu, H., Zhu, X. and Yang, Y., 2011.** The effects of dietary selenium on growth performances, oxidative stress and tissue selenium concentration of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), *Aquaculture Nutrition*, 17, 741-749. doi:10.1111/j.1365-2095.2010.00841.x.

**Heindl, J., Ledvinka, Z., Tumova E. and Zita, L., 2010.** The importance, utilization and sources of selenium for poultry: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41, 55-64.

**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. doi: 10.1016/j.aqrep.2017.01.002.

**Jovanovic, A, Grubor-Lajsic, G., Djukic, N., Gardinovacki, G., Matic, A. and Spasic, M., 1997.** The effect of selenium on antioxidant system in erythrocytes and liver of the carp (*Cyprinus carpio L.*). *National Library of Medicine*, 37(5):443-8. doi: 10.1371/journal.pone.0274734.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

**Miezeliene, A., Alencikiene, G., Gruzauskas, R. and Barstys, T., 2011.** The effect of dietary selenium supplementation on meat quality of broiler chickens. *Biotechnology, Agronomy, Société et Environmen*t, 15, 61-69.

**Rayman, M.P., 2000.** The importance of selenium to human health. *Lancet,* 356(15), 233–234. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02490-9.

**Reitman, S., and Frankel, S., 1957.** A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28, 56-63. doi: 10.1093/ajcp/28.1.56.

**Shi, L., Xun, W., Yue, W., Zhang, C., Ren, Y., Shi, L., Wang, Q., Yang, R. and Lei F., 2011.** Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance. *Small Ruminant Research,* 96, 49–52. doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.11.005.

**Sritunyalucksana, K., Intaraprasong, A., Sanguanrut, 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/scienceasia1513-1874.2011.37.024.

**Tahmasabi, D., 2013.** "Feeding a diet containing vitamin E (alpha-tocopherol acetate) and selenium nanoparticles on growth indicators, survival, carcass composition, and total body glutathione peroxidase and malondialdehyde levels in white fish (*Rutilus kutum*). Master's thesis in the field of fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, *Faculty of Fisheries and Environment*, 100 pages [In Persian].

**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, 223-234. doi: 10.1016/S0044-8486(96)01523-2.

**Wang, Y., Yan, X., 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.

**Yoshimura, K., Waki, H. and Ohashi, S., 1976.** Ion-exchanger colorimetry—I: Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water. *Talanta*, 23, 449-454. doi: 10.1016/0039-9140(76)80126-9

**Zhu, Y., Chen, Y., Liu, Y., Yang, H., Liang, G. and Tian, L., 2012.** Effect of dietary selenium level on growth performance, body composition and hepatic glutathione peroxidase activities of largemouth bass *Micropterus salmoide*. *Aquaculture Research*, 43, 1660-1668. doi: 10.1111/j.1365-2109.2011.02972.x.



[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]

# Effects of selenium nanoparticles on the performance of antioxidant enzymes and ions of rainbow trout eggs (*Oncorhynchus mykiss*)

Falahat Naserabad E.[1]; Kazemi E.[1*]; Hoseini S.A.[1]; Salahi Ardakani M.M.[1]; Mahmoudi R.[1]

*esmaeil.kazemi.1986@gmail.com

1-Cold-water Fishes Genetic and Breeding Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yasouj, Iran.

## Abstract

In this research, the effect of selenium nanoparticles on the performance of antioxidant enzymes, including superoxide dismutar (SOD), glutathione peroxidase (GPx), malondialdehyde (MDA), and catalase (CAT) levels, and male reproductive egg ions of rainbow trout was investigated. The number of 144 fertile pieces of 4-year-old Iranian females was divided into four treatments in three replications. The treatments were fed with diet containing zero (control), 0.5, 1 and 2 mg of selenium nanoparticles per kg of diet for 60 days until egg maturation. Based on the results of the research, the values of SOD, CAT, and MDA have shown significant differences in the eggs from different treatments ($p<0.05$). The lowest level of SOD enzyme and the highest level of CAT enzyme were observed in the control treatment, which showed a significant difference with other treatments. There was no significant difference in the amount of GPx enzyme between different treatments ($p>05$). The amount of MDA enzyme showed a significant difference among the treatments, while the control group had the highest level of 363±16.8 mmol/ml and the fish fed with selenium nanoparticles at 2 mg/kg had the lowest level of 181±9.5 mmol/ml Comparing the average amounts of magnesium and calcium among different treatments showed a significant increase in the amounts of the mentioned ions in the treatment fed with selenium nanoparticles at the rate of 2 mg/kg of food compared to other treatments ($p<0.05$). In general, considering the decreasing role of antioxidant enzymes and its increasing role in the amounts of magnesium and calcium inorganic compounds in the eggs of mothers fed with more selenium nanoparticles, this essential micronutrient can be used as It should be considered as a suitable candidate for further research in order to improve the quality of spawning eggs of female rainbow trout by adding to the diet.

**Keywords:** Rainbow trout, Diet, Selenium nanoparticles, Antioxidant enzymes, Egg ions

*Corresponding author

[ Downloaded from isfj.ir on 2026-06-24 ]

[ DOR: 20.1001.1.10261354.1402.32.3.5.8 ]