اثر سطوح مختلف سلنیوم جیره غذایی بر روند رشد و استرس اکسیداتیو بچه فیلماهی پرورشی(*Huso huso*) تغذیه شده با سطوح بالای مس

محمود محسنی* و امیر مجتبی ستوده

mahmoudmohseni@yahoo.com

١- انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری، رشت سد سنگر صندوق پستی: ٣٤٦٤-٤١٦٣٥

٢- دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، خیابان شهید فلاحی (زعفرانیه)، پلاک ١٤

تاریخ دریافت: خرداد ١٣٩١ تاریخ پذیرش: بهمن ١٣٩١

چکیده

تاثیر سطوح مختلف سلنیوم جیره غذایی بر روند رشد و استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) بچه فیلماهی پرورشی (*Huso huso*) تغذیه شده با سطوح بالای مس بررسی گردید. بچه ماهیان با متوسط (± انحراف معیار) وزن ٠/٦٩ ±١٣/٣٩گرم به مدت ١٢ هفته با جیره‌های محتوی مقادیر مختلف سلنیوم شامل: سطوح پایین (صفر میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم جیره HCuLSe)، به میزان کافی (١١ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره HCuNSe) و پنج برابر حد کفایت (٥٥ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره HCuHSe) هر یک حاوی سه برابر حد بهینه مس (٣٠ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و جیره شاهد محتوی مقادیر کافی سلنیوم (١١ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و مس (١٠میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) در شرایط یکسان پرورشی تغذیه شدند. درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه و ضریب چاقی ماهیان تغذیه شده با HCuHSe بطور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود. غلظت مس و سلنیوم کبد با افزایش مقادیر مس و سلنیوم جیره رابطه مستقیم داشت، بطوریکه بالاترین غلظت این عناصر در کبد ماهیان تغذیه شده با جیره HCuHSe مشاهده شد. همچنین بالاترین و کمترین مقادیر متوسط Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) و پراکسیداز گلوتاتیون (Glutathione peroxidase activity) در ماهیان تغذیه شده با HCuHSe ملاحظه گردید. فعالیت توتال ایمونوگلوبین و لایزیوزیم پلاسما ماهیان تغذیه شده با NCuNSe در بالاترین سطح بود و بدنبال آن ماهیان تغذیه شده تیمار HCuNSe قرار داشت، بطوریکه پایین‌ترین مقادیر آن در ماهیان تغذیه شده با جیره HCuHSe ثبت گردید. این نتایج دلالت بر این نکته دارند که سطوح مناسب مس و سلنیوم اضافه شده به جیره موجب کاهش استرس و بهبود پاسخ‌های ایمنی در ماهی می‌گردد. برعکس جذب بالای مس و سلنیوم موجب تحریک استرس و کاهش پاسخ‌های ایمنی در تحقیق حاضر گردید.

لغات کلیدی: فیلماهی، سلنیوم، مس،روند رشدو استرس اکسیداتیو

*نویسنده مسئول

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

بافت ماهی دارای خصوصیاتی است که از آن جمله می‌توان به غلظت بالای اسیدهای چرب بشدت غیراشباع (PUFA) اشاره کرد که ممکن است مستعد پری اکسیداسیون لیپید باشد (Stéphan *et al.*, 1995). امروزه فلزهای سنگین بعنوان پری اکسید کننده‌های قوی در پری اکسیداسیون اسیدهای چرب بشدت غیراشباع (PUFA) شناخته شده‌اند (Halliwell & Gutteridge, 1993). مس یک فلز سنگین در طبیعت است که موجب پری اکسیداسیون چربی (Lipid peroxidation) در غذا و بافت جانوران در خلال شکل‌گیری رادیکال‌های آزاد بوسیله واکنش اکسیداتیو این دو عنصر دو ظرفیتی (+CU و +CU2) یا خاصیت پراکسیداتیو +CU می‌شود (Klotz *et al.*, 2003). همچنین مس یک کوفاکتور برای سیستم‌های آنزیمی آنتی اکسیدانت است (Sueroxide dismutase, SOD) و آنزیمی برای چرخه انتقال الکترون بشمار می‌آید (Halliwell & Gutteridge, 1993). مس غالبا در جیره غذایی ماهیان بخصوص در جیره‌های تجاری، چندین برابر بیش از حد نیاز اضافه می‌شود (Mohseni, 2012; Maage, 1994). سطوح بالای مس در جیره موجب ضایعات سمی شامل: کاهش رشد، افزایش مرگ و میر (Mohseni *et al.*,2012; Shiau & Ning, 2003) و کاهش پاسخ‌های ایمنی (Lundebye *et al.*, 1999; Mohseni *et al.*, 2012; Berntssen *et al.*,1999) می‌گردد.

سلنیوم بعنوان ترکیبی Enzyme glutathione peroxidase بکار می‌رود که غشای سلول را از تخریب محافظت می‌کند (Lee *et al.*, 2008) در پستانداران نیز سلنیوم اثر حفاظتی در مقابل سطوح فلزات سنگین دارد (Rana &Verma, 1997). اگرچه این اثر چندان در ماهیان مورد مطالعه قرار نگرفته است.

فیلماهی یکی از بزرگترین گونه های ماهیان خاویاری می‌باشد که از سایر ماهیان خاویاری بعلت داشتن دهانی بزرگ و هلالی شکل و سبیلک‌های فشرده متمایز می‌شود. عمر این ماهی به ۱۰۰ سال و وزن آن به ۲ تن می‌رسد. زمان رسیدن به بلوغ جنسی در این گونه طولانی است، بطوریکه در طبیعت نرها تقریباً در ۱۰ تا ۱۲ سالگی و ماده‌ها بین ۱۲ تا ۱۶ سال به بلوغ جنسی می‌رسند. طول عمر طولانی تاسماهیان به همراه مدّت زمان طولانی برای بلوغ جنسی، یک زمان طولانی را برای تجمّع زیستی سلنیوم در ارگانهای سوماتیک و تولید مثلی فراهم می‌آورد. بعنوان مثال غلظت‌های سلنیوم در تخمک در حال توسعه تاسماهی سفید جمع‌آوری شده از بی‌دلتا سان فرانسیسکو به میزان ۷۲ میکرو گرم در گرم وزن خشک بدن در تخمدانها و ۲۹ میکرم گرم در گرم وزن خشک بدن اندازه‌گیری شده است. این غلظت‌ها به میزان زیادی بالاتر از آستانه غلظت سمّی برای لاروهای در حال رشد دیگر گونه‌های ماهیان گزارش شده است (Tachjian *et al.*, 2006).

از سویی دیگر انجام تحقیقات مختلف تغذیه‌ای، به منظور دستیابی به مناسبترین جیره غذایی برای هر گونه و در اوزان مختلف مهم و ضروری می‌باشد. بنابراین، مطالعه حاضر بمنظور بررسی اثرات سطوح سلنیوم جیره بر روند رشد و تجمّع سلنیوم و حساسیت فیلماهی به سمّیت سلنیوم غذایی محتوی سطوح بالای مس طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش کار

به منظور تهیه جیره‌های غذایی، ابتدا ترکیبات غذایی مورد نیاز جهت آنالیز به آزمایشگاه (آزمایشگاه آنالیز غذایی دانشگاه پوک یانگ بوسان - کره جنوبی) منتقل گردید تا براساس اطلاعات صحیح از ترکیب مواد اولیه نسبت به تنظیم جیره‌ها اقدام گردد. از کازئین (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)، نشاسته ذرت (Sigma Chemical)، روغن ماهی و روغن ذرت بترتیب بعنوان منابع پروتئین، کربوهیدرات و چربی برای تهیه جیره‌های غذایی استفاده گردید (جدول ۱). همه جیره‌ها در سطوح انرژی ۲۰ مگاژول انرژی خام در هر کیلوگرم جیره توصیه شده بوسیله محسنی و همکاران (۱۳۸۵) فرموله شدند. آرد ماهی کیلکا بعنوان جاذب غذایی به میزان ۶ درصد در تمام جیره‌ها به منظور خوش طعم کردن و پذیرفته شدن غذا توسط ماهی اضافه شد.

سه جیره غذایی محتوی سطوح مختلف سلنیوم (Selenomethionine; Sigma) شامل: سطح پایین سلنیوم متیونین (صفر میلی‌گرم سلنیوم در کیلوگرم جیره HCuLSe)، بمیزان کافی (۱۱ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره (HCuNSe) و پنج برابر حد کفایت (۵۵ میلیگرم در کیلوگرم جیره (HCuHSe) هر یک حاوی مقادیر بالای مس (۳۰ میلی‌گرم در

Archive of SID

www.SID.ir

کیلوگرم جیره مس (CuSo4, Sigma) تهیه و نتایج با جیره شاهد محتوی مقادیر کافی سلنیوم (١١ میلیگرم در کیلوگرم) و مس (١٠ میلیگرم در کیلوگرم جیره) مقایسه شدند. اجزای خشک غذا پس از مخلوط کردن کامل با یکدیگر با روغن مخلوط و سپس آب ولرم به آن اضافه گردید تا یک خمیر سفت تشکیل شود. پس از اطمینان از مخلوط شدن تمامی ترکیبات بصورت همگن و یکنواخت، اقدام به ترکیب و آماده‌سازی آنها توسط دستگاه پلت زن CPM نمودیم. پلت‌ها به قطر ٢/٥ میلی‌متر تهیه و به مدت ٢٤ ساعت در دستگاه خشک‌کن در دمای ٣٠ درجه سانتیگراد به منظور کاهش رطوبت به میزان ٩ تا ١٠ درصد قرار داده شدند. جیره‌ها پس از خشک شدن، بسته‌بندی،شماره‌گذاری شده و تا زمان مصرف در داخل یخچال نگهداری گردیدند. یک ساعت قبل از مصرف و توزیع غذا، جیره‌ها از یخچال خارج و پس از متعادل شدن با دمای اتاق با استفاده از ترازوی دیجیتال توزین و در اختیار ماهیان قرار گرفت.

جدول ١: اجزای غذایی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی

ترکیبات غذایی	مقدار (درصد)
کازئین	٣٥
ژلاتین	١٠
آرد ماهی	٦
دکسترین	١٢
نشاسته ذرت	١٢
ویتامین پرمیکس[١]	٢/٥
پرمیکس معدنی[٢]	١
لایزین	١/٥
روغن (روغن ماهی و روغن ذرت)	١٢
Se premixture[٤] (selenomethionine)	٣
α سلولز	٥
ترکیب بیوشیمیایی جیره (درصد)	
رطوبت	٩/١
پروتئین	٤٢/٢
چربی	١٤/٢
خاکستر	٧/٣
انرژی ناخالص (مگاژول در کیلوگرم جیره)	١٩/٧٩

[١]Vitamin mixture (IU or mg kg^{-1} diet): DL-alpha tocopherol acetate.60IU; DL-cholecalciferol, 3000IU; Thiamin, 15mg; riboflavin, 30mg; pyridoxine, 15mg; B12, 0.05mg; Nicotinic acid, 175mg; Folicacid, 5mg; Ascorbic acid, 500mg; inositol, 1000 mg; biotin, 2.5mg; Calcium panthoteate, 50mg; Choline chloride, 2000mg.

[٢]Mineral mixture (g or mg kg^{-1} diet): calcium carbonate (40% Ca),2.15g; Magnesium oxide (60% Mg), 1.24g; ferric citrate, 0.2g; potassium iodide (75% I), 0.4mg; zinc sulphate (36% Zn), 0.4g; Manganese sulphate (33% Mn),0.3g; dibasic calcium phosphate (20% Ca, 18% P), 5g; Cobaltsulphate, 2mg; KCl, 0.9g; NaCl,0.4g.

[٣]L-selenomethionine (SeMet, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA).

Archive of SID

www.SID.ir

ماهیان به مدت ۴ هفته در وانهای فایبرگلاس به شرایط جدید پرورشی سازگار گردیدند. در طول دوره سازگاری بچه ماهیان با غذای تجاری با آنالیز تقریبی: رطوبت ۱۱/۷ درصد، پروتئین خام ۴۳/۳ درصد، چربی ۸/۸ درصد و خاکستر ۹/۳ درصد تغذیه شدند. در ابتدای آزمایش تعداد ۲۴۰ عدد بچه فیلماهی با وزن (±متوسط انحراف) ۰/۶۹±۱۳/۳۹گرم (سازگار شده با غذای کنسانتره)، بطور تصادفی در ۱۲ وان فایبرگلاس (قطر ۱۰۵ سانتیمتر، ۵۱ سانتیمتر ارتفاع و حجم آب ۵۰۰ لیتر) در فضای سرپوشیده مجهز به سیستم هوادهی، تخلیه آب مرکزی و شیرهای تنظیم آب (بصورت فواره‌ای) با دبی آب ۴/۷۵ لیتر در دقیقه (آب رودخانه سفیدرود) در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری در قالب یک طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل ذخیره و با جیره‌های آزمایشی به مدت ۱۲ هفته تغذیه شدند. هر جیره به ۳ وان فایبرگلاس داده شد. ماهیان ۴ بار در روز در ساعات ۸-۱۴-۲۰-۲ صبح بصورت دستی تا حد سیری غذادهی شدند (جهت تغذیه در ساعات تاریکی از نور مصنوعی استفاده نشد). تغذیه بچه فیلماهیان حدوداً ۲ تا ۴ دقیقه بعد از غذادهی، طول کشید، غذای باقیمانده و مدفوع بلافاصله بوسیله سیفون بعد از غذادهی جمع می‌شد. بنابراین ته‌نشینی مس و سلنومتیونین در آب کم و ناچیز بود. ماهیان هر ۱۴روز یکبار بصورت انفرادی توزین و طبق آن مقدار جیره غذایی برای ۱۴ روز آینده تنظیم گردید. به منظور کاهش کنش بعد از توزین، تغذیه به مدت ۱۸ ساعت قطع شد. تمام ماهیان مرده جمع‌آوری شده و در طول دوره آزمایش جایگزین نگردیدند. دمای آب و اکسیژن محلول دوبار در روز (صبح و عصر) اندازه‌گیری شدند.

آنالیز تقریبی مواد اولیه جیره، جیره‌های آزمایشی و بدن ماهی با روشهای استاندارد جیره AOAC (۱۹۹۵) انجام شد. یک نمونه ۳ عددی از هر تانک در انتهای آزمایش جمع‌آوری شده و برای تعیین غلظت تقریبی مس و سلنیوم در ۸۶- درجه سانتیگراد منجمد شدند. غلظت مس و سلنیوم با Hydride generation atomic absorption spectrophotometer (Tinggi, 1999) و Atomic absorption photometry (AOAC, 1995) اندازه‌گیری شد. غلظت سلنیوم و مس در آب پرورشی بطور منظم در تمام دوره آزمایش اندازه‌گیری می‌شد. سلنیوم در آب یافت نشد و غلظت مس بین ۰/۱ تا ۰/۳ میلیگرم در لیتر بود.

در پایان دوره پرورش برای بررسی سیستم ایمنی و شاخص‌های خونی از ۳۰ درصد جمعیت ماهیان هر وان بصورت تصادفی خونگیری و شاخص‌هایی مانند IgM (Total Immunoglobulin) و لیزوزیم اندازه‌گیری گردید.IgM سرم برحسب **میلی‌گرم بر دسی لیتر** بوسیله دستگاه نفلومتری Minineph (Binding site- انگلستان) و با استفاده از کیت آزمایشگاهی Binding site به روش نفلومتری و سنجش میزان لیزوزیم در نمونه‌های خون براساس روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰ اندازه گیری گردید.

با استفاده از اطلاعات طول و وزن ماهیان در هر وان، فاکتورهای محاسباتی شامل: شاخص رشد ویژه (SGR, %BW) day^{-1}، میانگین افزایش وزن (%WG)، ضریب تبدیل غذا (FCR) و شاخص هپاتوسوماتیک (HSI درصد) محاسبه شد. تحقیق حاضر در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل در سه تکرار روی بچه فیلماهیان مورد بررسی قرار گرفت.

به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزارهای Ecxel و SAS و برای مقایسه میانگین تیمارها از طریق آزمون چند دامنه دانکن انجام شد، وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین گردید.

$S.G.R= (\ln Wt-\ln W_0)/t \times 100$

Weight gain (WG) = [100×(final body weight−initial body weight) / initial body weight]

$F.C.R = F/(Wt-W0)$ ضریب تبدیل غذا

$F=$ مقدار غذای مصرف شده توسط ماهی

$Wt=$ میانگین توده زنده نهایی(گرم)

$HSI = \text{Liver weight/body weight} \times 100$ درصد

Liver weight = وزن کبد (گرم)

Body weight = وزن بدن(گرم)

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

وزن نهایی، درصد افزایش وزن، شاخص رشد ویژه و ضریب تبدیل غذایی بطور معنی‌داری تحت تأثیر سطوح مختلف سلنیوم جیره غذایی قرار گرفت (F=69.6, d.f.=11, P≤0.05). در انتهای دوره پرورش، کمترین روند رشد و بیشترین ضریب تبدیل غذا را ماهیان تغذیه شده با جیره HCuHSe بخود اختصاص دادند و بلافاصله کمی از آنها ماهیان تیمار HCuLSe قرار داشتند، در حالیکه بالاترین کارآیی رشد و غذا در ماهیان تغذیه شده NCuNSe و HCuNSe ملاحظه گردید. همچنین داده‌های ارائه شده در جدول ٢ بیانگر تاثیر معنی‌دار سطوح مختلف سلنیوم بر ضریب چاقی ماهیان بود. کمترین میزان ضریب چاقی در ماهیان تغذیه شده از تیمار غذایی HCuHSe مشاهده گردید که با سایر تیمارهای بکار رفته دارای اختلاف معنی‌دار آماری بود (F=26.7, d.f.=11, P≤0.05).افزایش سطوح سلنیوم و مس جیره غذایی، بر مقادیر عددی شاخص هپاتوسوماتیک بی‌تاثیر بود (P≥0.05). همچنین در طول دوره پرورش، هیچگونه مرگ و میری مشاهده نشد.

غلظت پلاسما لایزیوزیم و توتال ایمونوگلوبولین در ماهیان تغذیه شده از جیره HCuHSe در پایین‌ترین سطح بود جدول ٣). بالاترین سطح فعالیت لایزیوزیم و توتال ایمونوگلوبولین پلاسما در ماهیان تغذیه شده از NCuNSe مشاهده شد که با ماهیان تغذیه شده با جیره HCuHSe و HCuLSe اختلاف معنی‌دار آماری داشتند (F=37.3, d.f.=11, P≤0.05).

نتایج حاکی از آن بود که غلظت سلنیوم و مس در کبد ماهیان با میزان سلنیوم و مس جیره همبستگی مثبت داشت (جدول ۴)، بطوریکه غلظت سلنیوم کبد ماهیانی که از سطوح سلنیوم بالاتر تغذیه کرده بودند، بطور معنی‌داری بیشتر از ماهیانی بود که با سطوح سلنیوم کمتر تغذیه شده بودند F=135.1, (d.f.=11, P≤0.05).

میانگین Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) در ماهیان تغذیه شده از جیره HCuHSe در بالاترین سطح بود و بلافاصله از آنها ماهیان تیمار HCuLSe قرار داشتند و پایین‌ترین مقدار در ماهیان تغذیه شده از NCuNSe و HCuNSe مشاهده شد F=33.5, d.f.=11, (P≤0.05).

ماهیان تغذیه شد با جیره های NCuNSe و HCuNSe بیشترین فعالیت پراکسیداز گلوتاتیون (Glutathione peroxidase activity) را داشتند که به دنبال آن ماهیان تیمار HCuLSe قرار داشت و پایین‌ترین آن در ماهیان جیره HCuHSe مشاهده شد(F=39.1, d.f.=11, P≤0.05).

جدول ٢: میانگین (±انحراف معیار) شاخص‌های رشد فیلماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف غذایی

شماره جیره	وزن (گرم)	طول کل (سانتیمتر)	میانگین افزایش وزن (WG)	شاخص رشد ویژه	ضریب تبدیل غذایی	ضریب چاقی	شاخص هپاتوسوماتیک(HSI)
NCuNSe[1]	١٤٨/٦ ±٣/١[a]	٣٠/١±٠/٢[a]	٩٩٦/٩±٦/٤[a]	٢/٨٤±٠/١[a]	١/٠٦±٠/٠١[a]	٠/٥٩ ±٠/٠١[a]	٢/٣±٠/١
HCuLSe[2]	١١٧/٦ ±٥/٤[b]	/٨±٠/١[ab] ٢٩	٨١٤/٥±١٣/٧[b]	٢/٠٩±٠/٠[ab]	١/٤١±٠/٠٤[b]	٠/٤٦±٠/٠٠[a]	٢/٥±٠/٣
HCuNSe[3]	١٣١/٧ ±٣/٦[ab]	/٧±٠/٢[ab] ٢٩	٨٧٣/٩±٩/٣[a]	٢/٦٨±٠/٠[a]	١/١١ ± ٠/٠٦[a]	٠/٤٧ ±٠/٠١[a]	٢/٦±٠/١
HCuHSe[4]	٩٨/٧ ±٦/٤[c]	٢٩/١±٠/١[b]	٦٣١/٦ ±٢٤/٦[c]	١/٦٩ ±١/٦[c]	١/٣٨±٠/٠١[b]	٠/٣٦±٠/٠٢[b]	٢/٥±٠/٧

[1]**NCuNSe: Adequate Cu (10mg Cu/kg), adequate Se (11mg Se/kg).**

[2]**HCuLSe: High Cu (30mg Cu/kg), low Se (0mg Se/kg).**

[3]**HCuNSe: High Cu (30mg Cu/kg), adequate Se (11mg Se/kg).**

[4]**HCuHSe: High Cu (30mg Cu/kg), high Se (55mg Se/kg).**

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: میانگین(±انحراف معیار) متوسط پلاسما لیزوزیم و ایمونوگلوبولین در فیلماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف غذایی

شماره جیره	Lysozyme activity (واحد بر میلی‌لیتر بر دقیقه)	Total IgM concentration (میلی‌گرم بر دسی لیتر)
NCuNSe	۱۷/۵±۱/۸^{a}	٤۹/٤± ۳/۹^{a}
HCuLSe	۱۲/۸±۱/۹^{b}	۳۳/٦± ۳/۲^{b}
HCuNSe	۱۵/۹±۰/۸^{ab}	۳۹/٤± ٤/۱^{ab}
HCuHSe	۱۰/۱±۲/۳^{c}	۲۵/۳± ۲/۷^{c}

جدول ٤: میانگین (±انحراف معیار) سلنیوم و مس؛ Glutathione peroxidase activity and Thiobarbiturice acid reactive substances (TBARS) در کبد (Hepatic Se and Cu concentrations) فیلماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف غذایی

شماره جیره	غلظت سلنیوم (میکروگرم در گرم)	غلظت مس (میکروگرم در گرم)	Glutathione Peroxidase activity (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	TBARS (نانومول MDA بر میلی گرم کبد)
NCuNSe	۱/۷۳ ±۱/۱^{b}	۲٤/۱±۱/۲^{b}	۱۲۹/۹±۳/٤^{a}	۵/۵٤±۱/۱^{c}
HCuLSe	۱/۱۵ ±۱/۰^{c}	۳۹/۸±۱/۱^{a}	۱۱۹/۱±٤/۸^{b}	٦/۰۳±۱/۰^{b}
HCuNSe	۱/۹۷ ±۱/٤ ^{b}	۳۹/۱±۱/۱^{a}	۱۲۷/۵±۳/۷^{a}	۵/۷٦±۱/۰^{c}
HCuHSe	۱۱/۷ ±۱/٤^{a}	۳۹/۷±۱/۲^{a}	۱۱٤/۱ ±۵/٦^{c}	۷/۹۱±۱/۰^{a}

بحث

بیشترین میزان افزایش وزن در مطالعه حاضر (۹۹۷ درصد، جدول ۲) در مقایسه با مطالعات پیشین (در آزمایشگاه برابر با ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ درصد) در اوزان و شرایط پرورش مشابه، در حد مقایسه‌ای مطلوبی بود (محسنی و همکاران، ۱۳۸۶، ۱۳۸۵). غلظت مس و سلنیوم جیره بکار رفته در این مطالعه براساس نیازمندی ماهی به مس (۱۳-۱۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و سلنیوم (۱۱ تا ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) (Mohseni, 2012; Arshad *et al.*, 2011) برای بچه فیلماهی تخمین زده در آزمایش پیشین بود. در مطالعه حاضر، رشد مشابه‌ای در بچه فیلماهیان تغذیه شده با مقادیر کافی سلنیوم و مس (NCuNSe)و یا ۳ برابر حد بهینه مس با مقادیر کافی سلنیوم (HCuNSe) دلالت براین موضوع داشت که در روند رشد بچه فیلماهیان تغذیه شده با ۳ برابر حد بهینه مس با مقادیر کافی سلنیوم کاهشی مشاهده نمی‌شود. حد تحمل روند رشد ماهیان در مقابل مس جیره متفاوت است. برای مثال افزودن ۸ و ۱۶ میلی‌گرم در کیلوگرم مس که بترتیب ۲ و ۳ برابر حد کفایت ماهیان تیلاپیا (Shiau & Ning, 2003) و گربه ماهی کانال (Gatlin & Wilson, 1986) رشد را در این ماهیان کاهش داد، در صورتیکه روند رشد قزل‌آلای رنگین کمان موقعی که با جبره حاوی ۳۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس (۱۰۰ برابر حد کفایت) تغذیه شده بود تغییر ننمود (Mount *et al.*, 1994). روند رشد ماهی آتلانتیک سالمون پس از سه ماه تغذیه با جیره محتوی غلظت بالای مس به میزان ۵۰۰ میلیگرم در کیلوگرم (۱۰۰ برابر حد کفایت) کاهش یافت (Lundebye *et al.*, 1999). نتایج مطالعه حاضر حاکی از آن است که فیلماهی در مقایسه با گونه های دیگر ماهیان حساسیت نسبتا کمتری به

Archive of SID

www.SID.ir

سمّیت سلنیوم و مس دارد. بطور خلاصه، کمترین حساسیت به سمّیت سلنیوم، مربوط به بقا بود، نقاط پایانی با حساسیت متوسط شامل رشد و میزان فعالیت آنزیمی بودند.

در طول دوره پرورش، هیچگونه مرگ و میری مشاهده نشد. درحالیکه میانگین (± انحراف معیار) بازماندگی فیلماهی تغذیه شده با غلظت‌های ۲/۴۴ تا ۲۰/۲۶ میکروگرم سلنیوم در گرم غذا ۹/۰±۷۵ درصد بود (Arshad *et al.*,2011). همچنین میانگین (± انحراف معیار) بازماندگی تاسماهی سفید تغذیه شده با جیره حاوی ۱/۶ تا ۱۹۱/۱ میکروگرم سلنیوم در گرم غذا ۹۹±۰/۴۳ درصد بود (Tachjian *et al.*, 2006)که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت .میانگین (± انحراف معیار) بازماندگی بلوگیل (*Lepomis macrochirus*) تغذیه شده با جیره ۶/۵ میکروگرم سلنیوم در گرم غذا به مدّت ۸ هفته، در حدود ۷۷/۵±۲/۵ درصد بود. همچنین آزاد ماهی چینوک (*Oncorhynchus tshawytscha*)حساسیت بالاتری را به سمّیت سلنیوم در مقایسه با فیلماهی نشان داد که درصد بازماندگی آزاد ماهی چینوک تغذیه شده با جیره محتوی ۳۵/۴ میلی‌گرم سلنیوم (SeMet) در کیلوگرم جیره به مدّت ۸ هفته بطور معنی‌داری تا میانگین (± انحراف معیار) ۶۲/۵±۱۴/۰ درصد کاهش یافت(Hamilton *et al.*, 1990). اگرچه درصد بازماندگی ماهیان در مطالعه حاضر، بعد از تغذیه ۱۲هفته‌ای با SeMet بطور نامطلوبی تحت تأثیر قرار نگرفت، امّا نرخ رشد منفی در تیمار تغذیه شده با HCuHSe (۵۵ میلیگرم سلنیوم در کیلوگرم جیره و ۳۰ میلیگرم مس در کیلوگرم جیره) طی ۸ هفته پایانی دوره آزمایش، میتوان اذعان نمود که مصرف طولانی مدّت سلنیوم و مس ممکن است تأثیرات نامطلوبی بر بقا و روند رشد در ادامه مراحل پرورش داشته باشد.

آنالیز Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) یکی از رایجترین اندیکاتورهای استفاده شده در پری اکسیداسیون بافت (Tissue peroxidation) است (Rosmini *et al.*, 1996). مقدار بهینه سلنیوم بعنوان یک حفاظت کننده در مقابل فلزات سنگین از طریق سنتز پروکسیداز گلوتاتیون (GPx; Glutathioneperoxidase activity)، همچنین تنظیم فعل و انفعال اسید تیوباربیتوریک (TBARS) شناخته شده است. در مطالعه حاضر مقدار TBARS در ماهیان تغذیه شده با سطوح بالای سلنیوم و مس (HCuHSe) بیشتر از ماهیانی بود که از مقادیر کافی مس و سلنیوم (NCuNSe) و حتی مقدار بهینه سلنیوم و بالای مس (HCuNSe) تغذیه شده بودند (جدول ۴) که دلالت بر آسیب احتمالی بافت کبد بوسیله جذب بالای مس داشت.

پروکسیدازگلوتاتیون (Glutathioneperoxidase activity; GPx) غشای سلول را از آسیب اکسیداتیو (Oxidative Damage) محافظت می‌کند (Rotruck *et al.*, 1973) پژوهش حاضر نشان داده است که SeMet می‌تواند استرس اکسیداتیو را در سلول القا کند. ماهیان تغذیه شد با جیره‌های NCuNSe و HCuNSe بیشترین فعالیت GPx را داشتند که به دنبال آن ماهیان تیمار HCuLSe قرار داشت و پایین‌ترین آن در ماهیان جیره HCuHSe مشاهده شد. این امر بدلیل تأثیر مستقیم سمّیت سلنیوم بر فعالیت چه از طریق مکانیسم‌های رفتاری و چه مکانیسم‌های فیزیولوژیکی می‌باشد. نتایج مشابهی برای Grey mullet (Baker *et al.*, 1998)، آتلانتیک سالمون (Berntssen *et al.*, 2000)، تاسماهی سفید (Tachjian *et al.*, 2006) و کفشک ماهی (*Paralichthys olivaceus*) (Lee *et al.*, 2008)) گزارش شده است. روند افزایشی پروکسیداز گلوتاتیون (GPx) و کاهش مقادیر TBARS همراه با افزایش بهینه سلنیوم جیره (جدول ۴) حاکی از آن بود که سلنیوم برای سنتز پروکسیداز گلوتاتیون (GPx) در پاسخ به استرس بوسیله جذب بالای مس جیره بکار رفته است. همچنین میتوان اذعان نمود که الحاق سلنیوم از تجمع مس در بافت و استرس اکسیداتیو (Oxidative damage) در بچه فیلماهی تغذیه شده با سطوح بالای مس جلوگیری میکند.

پارامترهای سیستم ایمنی غیراختصاصی از جمله فعالیت لایزیوزیم و توتال ایمونوگلوبین بطور عموم برای اندازه‌گیری اثر مواد غذایی بر ایمنی ماهی بکار می‌رود (Lin & Shiau, 2005$_{a\&b}$; Puangkaew *et al.*, 2004).

با توجه به توضیحات بالا می‌توان نتیجه گرفت هر موجودی برحسب شرایط فیزیولوژیک خود نیاز به جیره ای خاص با سطوح مشخصی از مواد مغذی دارد. در مطالعه حاضر کارآیی رشد با افزایش بیش از حد مس و سلنیوم جیره کاهش یافت، در صورتیکه مقادیر TBARS از روند افزایش برخوردار بود. بنابراین می‌توان بیان نمود، سیستم ایمنی در بچه فیلماهیان بدلیل جذب سطوح بالای مس و سلنیوم و در نتیجه بروز استرس اکسیداتیو (Oxidative stress) تحریک و آسیب دیده است. در صورتیکه سطوح مناسب مس و سلنیوم اضافه شده به جیره

Archive of SID

www.SID.ir

موجب افزایش روند رشد، کاهش استرس و بهبود پاسخهای ایمنی در بچه فیلماهیان در پژوهش حاضر گردید.

تشکر و قدردانی

از کلیه همکارانی که طی مراحل اجرایی پروژه از حمایتهای بیدریغ آنان بهره‌مند شدیم، صمیمانه تشکر می‌گردد.

منابع

محسنی، م.؛ پورکاظمی، م.؛ بهمنی، م.؛ پورعلی، ح.؛ کاظمی، ر. و علیزاده، م.، ۱۳۸۵. گزارش نهایی پروژه تعیین احتیاجات غذایی فیلماهی از مرحله لاروی تا مرحله عرضه به بازار. انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. ۲۲۴ صفحه.

محسنی، م.؛ پورکاظمی، م.؛ بهمنی، م.؛ پورعلی، ح.؛ سپهداری، ا.؛ سید حسنی، م.ح.؛ ارشد، ع.؛ علیزاده، م.؛ کاظمی، ر.؛ حلاجیان، ع.؛ زارع گشتی، ق. و سجادی، م.م.، ۱۳۸۶. مطالعه پرورش گوشتی فیلماهی (*Huso huso*) با استفاده از جیره‌های مختلف غذایی. طرح مصوب شورای تحقیقات و فناوری استان گیلان استان گیلان، شهرستان رشت. انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری. ۱۳۷ صفحه.

Arshad U., Takami A., Sadeghi Rad M., Pourali H.R., Lee S., 2011. Influence of dietary L-selenomethionine exposure on growth and survival of juvenile *Huso huso*. Applied Ichthyology, 27:651-655.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 1995. Official methods of analysis, 16th ed. AOAC, Arlington, VA.

Baker R.T.M., Handy R.D., Davies S.J. and Snook J.C., 1998. Chronic dietary exposure to copper affects growth, tissue lipid peroxidation, and metal composition of the grey mullet, *Chelon labrosus*. Marine Environmental Research, 45:356-365.

Berntssen M.H.G., Lundebye A.K. and Maage A., 1999. Effects of elevated dietary copper concentrations on growth, feed utilization and nutritional status of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fry. Aquaculture, 174:167-181.

Berntssen M.H.G., Lundebye A.K. and Harme K., 2000. Tissue lipid peroxidative responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) par fed high levels of dietary copper and cadmium. Fish Physiology and Biochemistry, 23:35-48.

Ellis A.E., 1990. Lysozyme assays. *In*: (Stolen J.S., Fletcher T.C., Anderson D.P., Robersen B.S., Van Muiswinkel W.B. eds). Techniques in fish immunology. Fair Haven: SOS Publications. pp.101-104.

Gatlin D.M. and Wilson R.P., 1986. Dietary copper requirement offingerling channel catfish. Aquaculture, 54:277-285.

Halliwell B. and Gutteridge J.M.C., 1993. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford. pp.12-20.

Hamilton S.J., Buhl K.J., Faerber N.L., Wiedmeyer R.H. and Bullard F.A., 1990. Toxicity of organic selenium in the diet of chinook salmon. Environmental Toxicology and Chemistry, 9:347-358.

Klotz L.O., Kröncke K.D., Buchczyk D.P. and Sies H., 2003. Role of copper, zinc, selenium and tellurium in the cellular defense againstoxidative and nitrosative stress. Journal of Nutrition,133:1448S-1451S.

Lee S., Lee J.H. and Bai S.C., 2008. Effects of different levels of dietary selenium (Se) on growth, tissue Se accumulations and histopathological changes in black seabream,

Archive of SID

www.SID.ir

Acanthopagrus schlegeli. Asian-Australian Journal of Animal Science, 21:1794-1799.

Lin M.F. and Shiau S.Y., 2005$_a$. Requirements of vitamin C (L-ascorbyl-2-sulfate and L-ascorbyl-2-polyphosphate) and its effects on nonspecific immune responses of grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture Nutrition, 11:183-189.

Lin Y.H. and Shiau S.Y., 2005$_b$. Dietary vitamin E requirements of grouper, *Epinephelus malabaricus*, under two lipid levels, and their effects on immune responses. Aquaculture, 248:235–244.

Lundebye A.K., Berntssen M.H.G., Bonga S.E.W. and Maage A., 1999. Biochemical and physiological in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure. Marine Pollution Bulletin,39:137-144.

Maage A., 1994. Trace elements in Atlantic salmon, *Salmo salar*, nutrition. Ph.D. Thesis. University of Bergen, Bergen, Norway. 20P.

Mohseni M., Park G.H., Lee J.H., Okorie E.O., Browdy C., Bharadwaj A. and Bai S.C., 2012. Evaluation of toxicity of dietary chelated copper in juvenile olive flounder, *Paralichthy solivaceus*, based on growth and tissue copper concentration. Journal of the World Aquaculture Society, 43:548-559.

Mohseni M., 2012. The optimum dietary organic and inorganic copper levels in marine fish, olive flounder, *Paralichthy solivaceus*, and freshwater fish, beluga sturgeon, *Huso huso*. Thesis for the Degree of Doctor of Philosophy.202P.

Mount D.R., Barth A.K. and Garrison T.D., 1994. Dietary and waterborne exposure of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to copper, cadmium, lead, and zinc using live diet. Environmental Toxicology and Chemistry, 13:2031-2041.

Puangkaew J., Kiron V., Somamoto T., Okamoto N., Satoh S.,Takeuchi T. and Watanabe T., 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. Fish & Shellfish Immunology, 16:25-39.

Rana S.V.S. and Verma S., 1997. Protective effects of GSH, α-tocopherol, and selenium on lipid peroxidation in liver and kidney of copper fedrats. The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 59:152-158.

Rosmini M.R., Perlo F., Pérez-Alvarez J.A., Pagán-Moreno M.J., Gago-Gago A., López-Santoveña F. and Aranda-Catalá V., 1996. TBA test by an extractive method applied to 'Paté'. Meat Science,42:103-110.

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.

Shiau S.Y. and Ning Y.C., 2003. Estimating of dietary copper requirements for juvenile tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. Journal of Animal Science, 77:287-292.

Stéphan G., Guillaume J. and Lamour F., 1995. Lipid peroxidation in turbot (*Scophthal musmaximus*) tissue: Effect of dietary vitamin E and dietary n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. Aquaculture,130:251-268.

Tachjian D.H., Teh S.J., Sogomonyan A. and Hung S.S.O., 2006. Bioaccumulation and chronic toxicity of dietary L-selenome-thonine in juvenile white sturgeon, *Acipensertrans montanus*. Aquatic Toxicology, 79:401-409.

Tinggi U., 1999. Determination of selenium in meat products byhydride generation atomic absorption spectrophotometry. Journal of AOAC International, 82:364-367.

Archive of SID

www.SID.ir

The effects of dietary selenium on the oxidative stress of beluga, *Huso huso,* fed high copper

Mohseni M.* and Sotudeh A.M.

mahmoudmohseni@yahoo.com

1- International Sturgeon Research Institute, P.O. Box 41635-3464, Rasht, Iran

2- Faculty of Marine Sciences and Technology, Islamic Azad University, No. 14, Shahid Falahi Ave., Tehran, Iran

Received: June 2012 Accepted: December 2012

Keywords: Beluga (*Huso huso),* Selenium, Copper, Growth rate, Oxidative stress

Abstract

The effects of dietary selenium (Se) were investigated on the oxidative stress of beluga, *Huso huso*, fed high dietary copper (Cu). The basal diet with high Cu (50mg Cu/kg) was supplemented with low (0mg Se/kg, HCuLSe), adequate (11mg Se/kg, HCuNSe) and 5× adequate (55mg Se/kg, HCuHSe) of Seandfed to fish with initial body mean (±SD) weight 14.96 ± 1.39g for 12 weeks. Basal diets containing adequate Se (11mg Se/kg) and adequate Cu (10mg Cu/kg) were used as controls (NCuNSe). Weight gain, specific growth rate and condition factor for fish fed the HCuHSe diet was significantly lower than fish that fed the other diets. Se and Cu content was positively correlated with dietary Se and Cu concentrations. Hepatic Se concentration was higher in fish fed the HCuHSe diet than fish that fed other diets. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) were significantly lower. Whereas, Glutathione peroxidase activity activities were significantly higher in liver tissue of fish fed HCuHSediet than those fish fed other diets. Plasma total immunoglobulin concentration and lysozyme activity were higherin fish fed the NCuNSe diet, followed by fish fed the HCuNSe diet, and were lower in fish fed the HCuHSe diet. The results indicated that optimum levels of Cu and Se ingestion induced an oxidative stress in beluga and improved their immune response. High dietary Se (5×adequate) supplementation reduced the oxidative stress and depressed the immune response of the fish.

*Corresponding author

Archive of SID

www.SID.ir