تغــذیه آبزیــان
سال پنجم، شماره اول،
بهار و تابستان ۱۳۹۸

تاثیر نانو سلنیوم نفوذ پذیر شده با هیپوکلریت سدیم بر برخی شاخص‌های ایمنی و فراسنجه‌های خونی در مراحل مختلف زندگی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

ساناز عالیه، علی حاجی بگلو*، محمد سوداگر
گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۶/۲۹

چکیده
سلنیوم یکی از مواد معدنی کمیاب است که برای رشد و عملکرد فیزیولوژیک طبیعی آبزیان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این آزمایش به مدت ۶۰ روز، اثرات سطوح مختلف نانوذره سلنیوم بر برخی پارامترهای ایمنی و فراسنجه‌های خونی در ماهیانی که در مراحل مختلف تحت تیمار قرار گرفته بودند، بررسی شد. این آزمایش، در ۳ مرحله تکاملی (تخم، آلوین و شروع تغذیه آغازین)، ضمن نفوذ پذیر شدن با هیپوکلریت سدیم، تحت تیمار حمام با غلظت‌های صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی گرم در لیتر نانوذره سلنیوم هر یک با ۳ تکرار قرار گرفتند. بیش‌ترین میزان لیزوزیم در ماهیانی که در مرحله آلوین در معرض غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر نانوسلنیوم قرار گرفتند ($p<۰/۰۵$) و کم‌ترین میزان آن نیز در تیمار شاهد مشاهده شد. میزان ایمونوگلوبولین در ماهیانی که در مرحله آلوین در معرض غلظت‌های ۱ و ۱/۵ mg/L نانوذره قرار گرفتند، به‌طور معنی‌دار بیش از گروه شاهد و دیگر تیمارهای آزمایشی بود ($p<۰/۰۵$). نتایج شمارش گلبول‌های سفید نشان داد که بیش‌ترین تعداد گلبول سفید در غلظت‌های ۱/۵ و ۱ mg/L نانوذره سلنیوم در مرحله آلوین مشاهده می‌شود. همچنین، تعداد گلبول‌های سفید در گروه شاهد به طور معنی‌دار کم‌تر از دیگر تیمارهای آزمایشی بود ($p<۰/۰۵$). تعداد گلبول‌های قرمز در تمامی غلظت‌ها در ماهیانی که در مرحله آلوین تحت تیمار نانوذره قرار گرفتند، به طور معنی‌دار بیش از گروه شاهد بود ($p<۰/۰۵$). بیش‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در تیمارهای مرحله آلوین و کم‌ترین میزان هموگلوبین و هماتوکریت در گروه شاهد مشاهده شد، به طوری که تیمارهای آلوین اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد نشان دادند ($p<۰/۰۵$). به طور کلی غلظت ۱ mg/L نانو ذره سلنیوم در مرحله آلوین برای حمام دادن و نفوذ پذیری در بدن بهترین غلظت و بهترین زمان از دوره تکاملی قزل‌آلای رنگین کمان است.

کلمات کلیدی: نانو سلنیوم، پارامترهای ایمنی، فراسنجه‌های خون، قزل‌آلای رنگین کمان

نویسنده مسئول: Alihajibeglou@gmail.com

مقدمه

یکی از راهبردهای مهم توسعه کشاورزی در کشور، ارتقای سلامت جامعه و تحقق شعار پیشگیری بهتر از درمان است. توجه به غنی سازی مواد غذایی و کنترل غلظت آلاینده‌ها در محصولات کشاورزی از جمله راه‌های تحقق این امر مهم است. در این میان، محصولات شیلاتی از ارزش غذایی بالایی برخوردارند و توجه بشر نیز به مصرف چنین محصولاتی افزایش یافته است (مهدوی جهان آباد و همکاران، ۱۳۹۷). در بین اجزای جیره، مواد معدنی از اهمیت خاصی برخوردارند، زیرا با وجود این که در جیره به میزان کم به کار می‌روند، ولی بر فیزیولوژی و سوخت و ساز عمومی بدن موثرند (علیزاده، ۱۳۸۸).

سلنیوم عنصر کمیاب است و برای تکوین طبیعی، رشد، حفظ عملکرد متعادل بدن در غلظت‌های کم (Monteiro et al. 2009) و برای مکان‌های فعال آنزیم‌های وابسته به سلنیوم مانند گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) ضروری است (Kohrle et al. 2005). شکل‌های مختلف مکمل سلنیوم در ماهیان مختلف بررسی شده‌اند (Jovanovic and Model, 1997; Kouba et al. 2014). نتایج مطالعات نشان داد که شکل آلی سلنیوم هضم‌پذیرتر است و تجمع بهتر و فعالیت زیستی بیشتری در مقایسه با شکل‌های غیرآلی (معدنی) دارد (Ashouri et al. 2015). از شکل‌های دیگر سلنیوم، شکل نانوذره آن است. مواد در ابعاد نانومتری دارای خواص متفاوتی از هر دو اتم جدا شده و نیز مواد درشت هستند (Wang et al. 2007) که مربوط به نسبت سطح به حجم بالای آن‌هاست (شبرنگ هره‌دشت و میرواقفی، ۱۳۹۱).

خون شناسی یکی از شاخص‌های مهم پزشکی و دامپزشکی است که نقش آن در تشخیص اختلالات و بیماری‌ها اهمیت فراوان دارد (شاهسونی، ۱۳۷۷). به‌طور کلی، کاربرد علم خون‌شناسی علاوه بر مشخص کردن وضعیت فیزیولوژیک سلول‌های خونی، بیشتر در امر تشخیص بیماری‌هاست که با خون‌گیری از ماهی و تعیین پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون و مقایسه با شرایط طبیعی، می‌توان تا حدی از آن به عنوان یک ابزار آزمایشگاهی در تشخیص بیماری استفاده کرد (خواجه و همکاران، ۱۳۸۶)؛ بنابراین، دامنه طبیعی پارامترهای خونی یک ماهی می‌تواند به عنوان شاخص زیستی استفاده شود (Luskova, 1995). در چندین مطالعه، نشان داده شده است که نانوذرات می‌توانند شاخص‌های خونی ماهی‌ها را تغییر دهند (Ates et al. 2008; Remya et al. 2014). در کپور هندی (*Labeo rohita*) که به مدت ۲۵ روز در معرض نانوذرات اکسید آهن قرار گرفتند، افزایش معنی‌داری در مقدار هموگلوبین، تعداد گلبول قرمز و هماتوکریت در مقایسه با گروه شاهد گزارش شد (Remya et al. 2014). هم‌چنین، تغییر معنی‌داری در تعداد گلبول قرمز، هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول سفید در غلظت ۲۰ میکروگرم نانوذرات نقره در گربه ماهی رنگین‌کمان (*Pangasius hypophthalmus*) مشاهده شد (رزم‌آرا و همکاران، ۱۳۹۳).

در مطالعه Khan و همکاران (۲۰۱۶) جیره غذایی حاوی ۰/۶۸ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو سلنیوم در جنبه‌های فیزیولوژیک ماهی *Tor putitora* مانند فعالیت لیزوزیم سرم، تعداد گلبول قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت در مقایسه با جیره غذایی پایه افزایش معنی‌داری را نشان داد. نفوذپذیر کردن لایه کوریون یا کوریون‌زدایی به منظور افزایش نفوذپذیری مواد در جنین چندین گونه از ماهیان گزارش شده است (Simon et al. 1994; Valencia et al. 1996). نتایج مطالعات Adams و همکاران (۲۰۰۵) نشان داد پس از لقاح از میزان نفوذپذیری غشای پلاسمایی کاسته می‌شود. با ادامه روند تکامل جنینی به تدریج نفوذپذیری غشاء تا حدی افزایش می‌یابد، اما مقدار آن همواره کم‌تر از میزان نفوذپذیری پیش از لقاح خواهد بود. معمولاً برای افزایش نفوذپذیری کوریون نسبت به مواد، از دو روش استفاده می‌شود، یکی روش هضم آنزیمی و استفاده از هضم‌کننده‌های پروتئازی مانند آنزیم پروناز است و دیگری روش شیمیایی است که با موادی از قبیل هیپوکلریت سدیم انجام می‌شود. نفوذ پذیری با هیپوکلریت سدیم وقت‌گیر نیست و همچنین، ارزان‌تر و راحت‌تر از روش آنزیمی است. بنابراین، اگر غلظت‌های غیر سمی در دستیابی به افزایش نفوذ پذیری کوریون موثر باشد، بهترین انتخاب برای نفوذپذیری جنین است (Cabrita et al. 2003).

قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به دلیل دارا بودن ویژگی‌های منحصر به فرد از جمله کیفیت گوشت، اهلی شدن سریع و آسان، سخت‌گیر نبودن در غذاگیری، امکان پرورش متراکم، طول نسبتاً کوتاه دوره پرورش و مقاومت ماهی به طیف وسیعی از شرایط

فیزیکوشیمیایی محیط، از گونه‌های مهم و تجاری در ایران و جهان برای تأمین پروتئین مورد نیاز جوامع بشری است (Sugiura et al. 2000). از نکات مهم در پرورش این ماهی مدیریت صحیح تغذیه در مرحله اولیه زندگی است که همواره با تلفات نسبتاً بالایی همراه است (Gibson and Roberfroid, 1995). از آنجا که تاکنون مطالعه‌ای درباره تأثیر نانوسلنیوم از طریق نفوذپذیری در بدن در مراحل اولیه قزل‌آلای رنگین کمان انجام نشده است، مطالعه حاضر با هدف تعیین اثرات نانو سلنیوم در غلظت‌های مختلف بر برخی پارامترهای ایمنی و فراسنجه‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نفوذپذیر شده با هیپوکلریت سدیم انجام شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در آذر ۱۳۹۷ در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (گلستان، علی‌آباد کتول، زرین گل) انجام شد. برای انجام آزمایش، تعداد ۱۲۰۰۰ عدد تخم چشم زده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان تهیه شد. سپس تخم‌ها با تراکم ۴۰۰ قطعه تخم در ۳۰ سبد آزمایشی در تراف‌های کالیفرنیایی قرار داده شدند. آزمایش در سه مرحله، در قالب ۹ تیمار و یک گروه شاهد هر یک با سه تکرار و با حمام نانوذره سلنیوم در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر انجام شد. همچنین، قبل از حمام دادن، برای نفوذپذیری از هیپوکلریت سدیم با غلظت ۰/۰۰۵٪ به مدت ۱۵ ثانیه (Cabrita et al. 2003) استفاده شد. در مرحله اول، تخم‌های چشم‌زده قزل‌آلای رنگین‌کمان در روز اول ورود ابتدا به‌وسیله هیپوکلریت سدیم (شرکت مرک آلمان) نفوذپذیر شده و سپس به مدت ۳ دقیقه در معرض تیمار حمام نانوذره سلنیوم (پیشگامان نانو مواد ایرانیان، مشهد) (جدول ۱) قرار گرفتند. در مرحله دوم، آلوین‌ها بعد از تفریخ (روز دهم)، ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم نفوذپذیر شده و سپس به مدت ۳ دقیقه در معرض تیمار حمام نانوذره سلنیوم قرار گرفتند. در مرحله سوم، بچه‌ماهیانی که در زمان شروع تغذیه آغازین (روز بیست و سوم) بودند، ابتدا توسط هیپوکلریت سدیم نفوذپذیر شده و سپس به مدت ۳ دقیقه در معرض حمام نانوذره سلنیوم قرار گرفتند. از زمان بیست روزگی (آغاز شنای فعال) هر ۹ تیمار و گروه شاهد به طور همزمان تا رسیدن به وزن ۲ گرم به میزان ۶٪ وزن بدن با خوراک آغازین حاوی پروتئین خام ۵۲٪ ، چربی خام ۱۲/۵٪ ، انرژی قابل هضم ۴۳۰۰ کیلوکالری بر کیلوگرم و با قطر ۰/۸-۰/۵ (شرکت ۲۱ بیضاء شیراز) ۸ بار در روز تغذیه شدند.

جدول ۱ خصوصیات نانو ذره سلنیوم مورد استفاده در تحقیق.

درجه خلوص (٪)	حالت	سایز نانو ذره (nm)	محدوده رنگ	غلظت مایع (ppm)
۹۹/۹۹	محلول کلوئیدی	۱۰-۴۵	نارنجی- قرمز	۱۰۰۰

در طی دوره آزمایش جریان مداوم آب (۶۲ لیتر در دقیقه) و هوادهی (اکسیژن ۹ میلی گرم در لیتر) برقرار بود. تخم‌ها روزانه بررسی، و تا زمان تخم‌گشایی روزانه یک بار با محلول هالامید ۱۰ گرم در هزار لیتر ضدعفونی می‌شدند. همچنین، تخم‌های تخم‌گشایی نشده و آلوین‌های مرده و قارچ زده به صورت روزانه شمارش و خارج می‌شدند. میانگین دما (۱۲ ± ۱°C)، اکسیژن محلول (۸/۵ میلی گرم در لیتر) و pH (۷/۱) در طول دوره آزمایش با استفاده از دستگاه دیجیتالی (Horiba U10, Japan) اندازه گیری شد. در پایان آزمایش لیزوزیم، ایمونوگلبولین کل و برخی فراسنجه‌های خونی شامل تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، میزان هموگلوبین و درصد هماتوکریت برای تمام تیمارها سنجیده شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم با استفاده از سوبسترا *Micrococcus lysodeikticus* (ATCC 4698) و به روش کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام شد (Ellis, 1990). برای اندازه‌گیری ایمونوگلبولین کل از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و پس از رسوب توسط محلول پلی‌اتیلن گلیکول اندازه‌گیری شد.

اندازه گیری فراسنجه‌های خونی

در پایان روز شصتم از دوره آزمایش، بعد از برداشت تصادفی نمونه‌های ماهی از تراف‌ها، با پودر گل میخک (۲۵۵ mg/L) (میراب بروجردی و اخلاقی، ۱۳۹۱) بی‌هوش شدند. سپس خونگیری با قطع ساقه دمی انجام شد. تعداد گلبول‌های سفید و قرمز خون با استفاده از لام نئوبار و بعد از رقیق‌سازی خون با محلول دایس شمارش شدند. مقدار هموگلوبین خون از کیت تجاری (پارس آزمون، کرج، ایران) و به روش سیانومت هموگلوبین و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری (Biochrom, Libra S12, UK) و در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تعیین مقدار هماتوکریت نیز از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. برای این کار ابتدا لوله‌های مخصوص هماتوکریت (لوله‌های مویینه هپارینه) را از نمونه‌های خون پر کرده و سر لوله‌ها با استفاده از خمیر هماتوکریت بسته شد. سپس لوله‌ها درون دستگاه سانتریفیوژ میکروهماتوکریت (Hettich, Germany) (۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰) قرار داده شد. در نهایت با استفاده از خط‌کش هماتوکریت، مقدار آن اندازه‌گیری شد (Dacie and Lewis, 2001).

تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز داده‌های به دست آمده از این آزمایش با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov–Smirnov test) استفاده شد. داده‌ها به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) و تجزیه و تحلیل شدند. هم‌چنین، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) استفاده شد.

نتایج

نتایج شاخص‌های ایمنی تیمارهای مختلف قزل‌آلای رنگین کمان حمام داده شده با نانو سلنیوم در پایان روز شصتم در جدول ۲ ارائه شده است. تیمارهای آلوین‌ها در شاخص‌های لیزوزیم و ایمونوگلبولین کل نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند (p<۰/۰۵). فعالیت لیزوزیم در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر آلوین‌ها بیش‌ترین میزان را داشت، ولی کم‌ترین میزان فعالیت لیزوزیم در گروه شاهد و پس از آن در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر تخم اندازه‌گیری شد (p<۰/۰۵). بالاترین میزان ایمونوگلبولین کل در تیمار ۱ میلی‌گرم در لیتر و پس از آن، در تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر در ماهیان مربوط به مرحله آلوین مشاهده شد، ولی پایین‌ترین میزان ایمونوگلبولین در گروه شاهد بود (p<۰/۰۵).

جدول ۲ نتایج شاخص‌های ایمنی تیمارهای مختلف قزل‌آلای رنگین‌کمان حمام داده شده با نانو سلنیوم در پایان روز ۶۰.

گروه	غلظت نانوسلنیوم (mg/L)	میزان فعالیت لیزوزیم (µg/mL)	ایمونوگلبولین کل (g/dL)
شاهد	۰	۲/۵ ±۰ /۴۵^{d}	۱/۴۸ ± ۰/۰۳۷ ^{e}
تخم	۰/۵	۲/۶ ± ۰/۴۵^{d}	۱/۸۹ ± ۰/۲۸۷ ^{d}
تخم	۱	۴ ± ۰/۵۶^{c}	۱/۹۳ ± ۰/۱۴۷^{d}
تخم	۱/۵	۳/۶ ± ۰/۳۶^{cd}	۱/۸۰ ± ۰/۰۷۸^{d}
آلوین	۰/۵	۵/۴ ± ۱/۱^{ab}	۲/۲۸ ± ۰/۱۶۶^{b}
آلوین	۱	۵/۵ ± ۰/۶۵^{a}	۲/۷۱ ± ۰/۱۵۲^{a}
آلوین	۱/۵	۵/۸ ± ۰/۹۲^{ab}	۲/۵۵ ± ۰/۰۳۶^{a}
تغذیه آغازین	۰/۵	۴/۱ ± ۰/۶۶^{c}	۲/۰۳ ± ۰/۰۳۰^{cd}
تغذیه آغازین	۱	۴/۵ ± ۰/۶۵^{bc}	۲/۲۰ ± ۰/۰۲۴^{bc}
تغذیه آغازین	۱/۵	۴/۳ ± ۰/۳۸^{bc}	۱/۹۸ ± ۰/۱۱۰^{cd}

اعداد با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار آماری دارند (p<۰/۰۵).

نتایج حاصل از بررسی تغییرات فراسنجه‌های خون ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در انتهای دوره آزمایش در جدول ۳ ارائه شده است. بیش‌ترین تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای ۱/۵ و سپس ۱ میلی‌گرم در لیتر مرحله آلوین و کم‌ترین تعداد آنها در گروه شاهد مشاهده شد و اختلاف بین آنها معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). بیش‌ترین تعداد گلبول قرمز در تیمارهای مرحله آلوین دیده شد، ولی اختلاف معنی‌داری در تیمارهای این مرحله مشاهده نشد (p>۰/۰۵)، اما تعداد گلبول قرمز در گروه شاهد به طور معنی‌دار در مقایسه با تیمارهای مرحله آلوین کم‌تر بود (p<۰/۰۵). نتایج مقدار هموگلوبین خون نشان داد که بیش‌ترین مقدار در ماهیان مربوط به مرحله آلوین بود، به طوری که تیمار ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر بیش‌ترین مقدار را داشت، اما بین تیمارهای این مرحله اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵). در بررسی مقدار هموگلوبین دیگر تیمارها نیز دیده شد که بین تیمارهای هر گروه با گروه خود اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (p>۰/۰۵). کم‌ترین مقدار هموگلوبین خون در گروه شاهد مشاهد شد که اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵). بیش‌ترین درصد هماتوکریت در ماهیانی مشاهده شد که در مرحله آلوین در معرض نانوذره قرار گرفته بودنـد، اما اختلاف معنی‌داری در تیمارهای این مرحله وجود نداشت (p>۰/۰۵). کمترین درصد هماتوکریت نیز در گروه شاهد اندازه‌گیری شد که اختلاف معنی‌داری را با دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۳ نتایج فراسنجه‌های خونی تیمارهای مختلف قزل‌آلای رنگین کمان حمام داده شده با نانو سلنیوم در پایان روز ۶۰.

گروه	غلظت نانو سلنیوم (mg/L)	تعداد گلبول سفید (×۱۰^۴)	تعداد گلبول قرمز (×۱۰^۶)	مقدار هموگلوبین (g/dL)	هماتوکریت (درصد)
شاهد	۰	۰/۴ ± ۰/۰۷^e	۰/۸ ± ۰/۱^d	۴/۳۰ ± ۰/۱۱۰^d	۴۱/۳۳ ± ۱/۱۵^d
تخم	۰/۵	۰/۵ ± ۰/۰۴^d	۰/۹ ± ۰/۰۸^cd	۵/۶۳ ± ۰/۴۰۹^b	۴۶/۶۶ ± ۴/۰۴^cd
تخم	۱	۰/۵ ± ۰/۰۵^d	۱ ± ۰/۰۱^c	۵/۵۵ ± ۰/۱۶۰^b	۵۰/۳۳ ± ۴/۱۶^bc
تخم	۱/۵	۰/۷ ± ۰/۰۲^c	۱/۲ ± ۰/۰۲^b	۵/۳۹ ± ۰/۲۲۱^b	۵۰/۳۳ ± ۲/۰۸^bc
آلوین	۰/۵	۰/۸ ± ۰/۰۸^ab	۱/۴ ± ۰/۰۵^a	۶/۰۵ ± ۰/۱۲۹^a	۵۸/۳۳ ± ۱/۰۰^a
آلوین	۱	۰/۹ ± ۰/۱۱^a	۱/۴ ± ۰/۰۶^a	۶/۱۰ ± ۰/۲۷۷^a	۵۹/۳۳ ± ۱/۵۲^a
آلوین	۱/۵	۰/۹ ± ۰/۰۸^a	۱/۵ ± ۰/۱^a	۶/۳۶ ± ۰/۱۶۸^a	۶۱/۰۰ ± ۲/۶۴^a
تغذیه آغازین	۰/۵	۰/۷ ± ۰/۰۶^c	۰/۹ ± ۰/۰۷^cd	۴/۷۲ ± ۰/۱۲۹^c	۵۵ ± ۶/۵۵^ab
تغذیه آغازین	۱	۰/۷ ± ۰/۰۶^b	۱/۲ ± ۰/۰۷^b	۴/۸۴ ± ۰/۱۴۸^c	۵۵/۳۳ ± ۲/۵۱^ab
تغذیه آغازین	۱/۵	۰/۸ ± ۰/۰۳^b	۱/۲ ± ۰/۰۴^b	۴/۹۰ ± ۰/۲۲۴^c	۵۵/۶۶ ± ۰/۵۷^ab

اعداد با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار آماری دارند (p<۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی‌های انجام شده، مطالعات انجام شده در خصوص تأثیر نانو سلنیوم روی قزل‌آلای رنگین کمان عمدتاً با جیره غذایی در ارتباط بوده است. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نانو سلنیوم می‌تواند در مراحل مختلف تکاملی تأثیرات متفاوتی بر روی شاخص‌های ایمنی و فراسنجه‌های خونی بگذارد. به نظر می‌رسد مطالعه حاضر از جمله اندک مطالعاتی باشد که تأثیر نانو سلنیوم را از طریق نفوذ پذیری با هیپوکلریت سدیم در بدن بر روی شاخص‌های ایمنی و فراسنجه‌های خون قزل‌آلای رنگین کمان بررسی کرده است.

نتایج مطالعات حاضر نشان داد شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مرحله آلوین تحت تأثیر نانو سلنیوم بود، به طوری که بیش‌ترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم و میزان ایمونوگلبولین کل در تیمار ۱ میلی گرم در لیتر مرحله آلوین به ثبت رسید. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که نانوذره سلنیوم در این دوره از زندگی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم و در نتیجه، باعث افزایش قدرت بدن در برابر عوامل بیماری‌زا شده و با افزایش میزان ایمونوگلبولین کل، می‌تواند باعث بهبود ایمنی هومورال شود. Saffari و همکاران (۲۰۱۸) اثر منابع سلنیوم آلی، معدنی و نانو ذرات سلنیـوم بر رشـد و

شاخـص‌های بیوشیمیایی خون کپور معمولی (*Cyprynnus carpio*) را بررسی کردند. نتایج مطالعه آنها در خصوص اینکه رژیم غذایی حاوی نانوذرات سلنیوم، باعث افزایش ایمونوگلوبولین کل می‌شود، با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارد. همانند نتایج این مطالعه، khan و همکاران (۲۰۱۷) اثرات هم‌افزایی نانو سلنیوم و ویتامین C را بر روی رشد، تغذیه و شاخص‌های فیزیولوژیک ماهی *Tor putitora* جوان گزارش کردند. در مطالعه آنها، شاخص‌های فیزیولوژیک مانند فعالیت لیزوزیم سرم، تعداد گلبول قرمز، میزان هموگلوبین، میزان هماتوکریت در گروه تغذیه‌ای ماهیان حاوی ال-آسکوربیل ۲ پلی‌فسفات (APP) به میزان ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم به عنوان منبع ویتامین C در ترکیب با نانو سلنیوم به میزان ۰/۶۸ میلی گرم بر کیلوگرم در مقایسه با گروه شاهد به طور قابل توجهی افزایش یافت. مشابه نتایج تحقیق حاضر، در تحقیقی دیگر اثرات مکمل رژیم غذایی حاوی نانو سلنیوم بر روی پاسخ ایمنی سرم و موکوس ماهی قزل‌آلای قرمز پس از ۴۵ روز بررسی شد و نشان داد که در ماهیانی که با رژیم غذایی حاوی ۱ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو سلنیوم تغذیه شدند، میزان فعالیت لیزوزیم سرم به میزان قابل توجهی بالاتر از رژیم غذایی فاقد نانو سلنیوم بوده است. علاوه بر این، رژیم غذایی حاوی ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم نانو سلنیوم باعث افزایش لیزوزیم موکوس در مقایسه با رژیم غذایی فاقد نانو سلنیوم شد. در نتیجه، مکمل‌های غذایی حاوی نانو سلنیوم عمدتاً از ۱ تا ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم می‌توانند برای حفظ سلامت ماهی قزل‌آلای قرمز مفید باشند (Dawood et al. 2019).

در تحقیق حاضر، افزایش تعداد گلبول قرمز، مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیانی که در مرحله آلوین (لارو با کیسه زرده) در معرض نانوذره سلنیوم قرار گرفته بودند، نشان‌دهنده اثر مثبت نانو سلنیوم در این دوره زندگی قزل‌آلای رنگین کمان است. نقش سلنیوم در افزایش مقاومت گلبول‌های قرمز به اثبات رسیده است (Sadeghian et al. 2012). در تحقیق حاضر نیز تیمارهای مرحله آلوین تعداد گلبول قرمز و مقدار هموگلوبین بیشتری داشته و درصد هماتوکریت قابل توجهی نسبت به بقیه تیمارها نشان دادند. در نتیجه، سلنیوم می‌تواند سبب افزایش تعداد گلبول قرمز، مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان شود. در مطالعه حاضر، تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای مرحله آلوین از نانو سلنیوم تأثیر معنی‌داری پذیرفت. سلنیوم پاسخ ایمنی را بهبود می‌بخشد، زیرا این عنصر برای تکامل و بیان پاسخ‌های ایمنی هومورال و سلولی غیراختصاصی لازم است (Saad et al. 2009). صفاری و همکاران (۱۳۹۴) تأثیر منابع مختلف سلنیوم (سلنیوم آلی (سلنو ال متیونین)، سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم) و نانو سلنیوم به میزان ۰/۷ میلی گرم در کیلوگرم جیره پایه بر شاخص‌های خونی و برخی شاخص‌های ایمنی در ماهی کپور معمولی را بررسی کردند. بالاترین تعداد گلبول‌های سفید، نوتروفیل، گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و افزایش میانگین حجم گلبولی در ماهیان تغذیه شده با منابع نانو و آلی مشاهده شد. آنها گزارش کردند که سلنیوم با منابع نانو و آلی بر فعالیت شاخص‌های خونی و برخی شاخص‌های ایمنی کپور معمولی عملکرد موثرتری نسبت به منبع معدنی سلنیوم دارد. نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر در خصوص اینکه نانوسلنیوم می‌تواند پاسخ ایمنی غیراختصاصی را بهبود بخشد، مطابقت دارد.

در مطالعه Le و همکاران (۲۰۱۴) اثرات سلنیوم (۱ تا ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم) و ویتامین E (۴۰ تا ۱۸۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) و کنش متقابل آن‌ها در تغذیه تون دم‌زرد (*Seriola lalandi*) به مدت ۶ هفته مطالعه شد. آنها گزارش کردند که سلنیوم یا ویتامین E اثر معنی‌داری بر روی هماتوکریت و تعداد گلبول‌های سفید ندارند. با وجود این، مکـمل سلنیـوم به میزان ۲ میلی‌گرم در کیلوگرم به طور معنی‌داری تعداد گلبول‌های قرمز و هموگلوبین را افزایش داد. این نتایج با نتایج مطالعه حاضر در خصوص افزایش تعداد گلبول قرمز و میزان هموگلوبین همخوانی، اما در در مورد تعداد گلبول سفید و درصد هماتوکریت مغایرت داشت.

از سوی دیگر Ates و همکاران (۲۰۰۸) اثر سلنیوم را بر روی تنش فلزات سنگیـن ناشی از سرب و مس در قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند. بررسی شاخص‌های خونی در این مطالعه نشان داد که تعداد گلبول‌های قرمز، میانگین حجم سلول‌های خونی، میانگین هموگلوبین سلول در حضور سلنیوم افزایش یافت، اما تعداد گلبول‌های قرمز و مقدار هموگلوبین و هماتوکریت در ماهیانی که در نبود سلنیوم در معرض فلزات سنگین قرار گرفته بودند، کاهش یافت. سلنیوم (سلنیت سدیم) شاخص‌های خونی را به حالت

طبیعی بازگرداند. این نتایج، با نتایج مطالعه حاضر در خصوص اثر مثبت نانو سلنیوم در افزایش تعداد گلبول قرمز و میانگین هموگلوبین همخوانی داشت.

نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که غلظت ۱ میلی گرم در لیتر نانو ذره سلنیوم در مرحله آلوین (لارو واجد کیسه زرده برای حمام دادن و نفوذ پذیری در بدن بهترین غلظت و بهترین زمان از دوره زندگی قزل‌آلای رنگین کمان است، زیرا نانو سلنیوم در مرحله آلوین قزل‌آلای رنگین کمان عملکرد بهتری در فراسنجه‌های خونی و شاخص‌های ایمنی نسبت به مرحله تخم و تغذیه آغازین داشت. پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده بر روی ماهیان دیگر با هدف بهبود شاخص‌های ایمنی و فراسنجه‌های خونی با بهره‌گیری از نانوسلنیوم از طریق نفوذ پذیری با هیپوکلریت سدیم انجام شود.

منابع

خواجه، غ.، مصباح، م.، پیغان، ر. ۱۳۸۶. مطالعات مقایسه‌ای برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی بنی (*Brbusa sharpey*) و کپور علفخوار (*Cetenopharyngodon idella*) پرورشی. مجله دامپزشکی ایران ۱: ۲۳-۱۴.

رزم آرا، پ.، پیکان حیرتی، ف.، درافشان، س. ۱۳۹۳. اثر نانو ذرات نقره بر برخی شاخص‌های خون شناسی گربه ماهی رنگین کمان (*Pangasius hypopthalmus*). مجله سلول و بافت ۵: ۲۷۲-۲۶۳.

شاهسونی، د.، مهری، م.، مازندرانی، م. ۱۳۸۵. تعیین مقادیر برخی از الکترولیت‌های سرم خون ماهی خاویاری قره‌برون (*Acipenser persicus*) مجله دامپزشکی ایران ۲: ۱۱۷-۱۱۲.

شبرنگ هره‌دشت، م.، میرواقفی، ع.ر. ۱۳۹۱. کاربردهای فناوری نانو در شیلات. ماهنامه فناوری نانو ۱۱: ۱۵-۱۳.

صفاری، ص. ، کیوان شکوه، س.، ذاکری، م. ، جوهری، س.ع.، پاشا زانوسی، ح. ۱۳۹۴. تاثیر منابع مختلف سلنیوم (آلی، معدنی و نانو) بر شاخص‌های خونی و برخی فاکتورهای ایمنی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinnus carpio*). همایش چالش‌های امنیت و سلامت در کشاورزی و آبزی‌پروری: ۱۹۰-۱۸۳.

گیوم، ج.، کاشیک، س.، پرگات، پ.، متیلر، ر. ۲۰۰۱. تغذیه و غذادهی ماهی و سخت پوستان. ترجمه: علیزاده، م. ۱۳۸۸. موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۲۸۹ ص.

مهدوی جهان آباد، ج.، راستیان نسب، ا.، محمودی، ر.، کاظمی، ا.، صلاحی اردکانی، م. م.، گندمکار، ح.ا. ۱۳۹۷. نقش نانو ذرات سلنیوم در عملکرد تولیدمثلی ماهیان. مجله آبزیان زینتی ۳: ۳۹-۲۷.

میراب بروجردی، م. اخلاقی، م. ۱۳۹۱. بررسی اثر بی‌هوش کنندگی گل میخک بر ماهی قزل‌آلا و تعیین LC 50 آن. همایش ملی فراورده‌های طبیعی و گیاهان دارویی: ۵۲-۴۹.

Adams, S.L., Zhang, T., Rawson, D.M. 2005. The effect of external medium composition on membrane water permeability of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. Theriogenology 64: 1591-1602.

Ashouri, S., Keyvanshokooh, S., Salati, A. P., Johari, S.A., 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.

Ates, B., Orun, I., Talas, Z.S., Durmaz, G., Yilmaz, I. 2008. Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb^{2+} and Cu^{2+}. Fish Physiology and Biochemistry 34: 53-59.

Cabrita, E., Chereguini, O., Luna, M., De Paz, P., Herráez, M. P. 2003. Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 221: 593-604.

Dacie, J.V., Lewis, S.M. 2001. Practical Hematology. 9th Edition, Churchill Livingstone, London, 633 p.

Dawood, M.A., Koshio, S., Zaineldin, A.I., Van Doan, H., Moustafa, E.M., Abdel-Daim, M.M., Hassaan, M.S. 2019. Dietary supplementation of selenium

nanoparticles modulated systemic and mucosal immune status and stress resistance of red sea bream (*Pagrus major*). Fish Physiology and Biochemistry 45: 219-230.

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme assays. Techniques in Fish Immunology. 101-103.

Gibson, G.R., Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. The Journal of Nutrition 125: 1401-1412.

Jovanovic, G., Model, P. 1997. PspF and IHF bind co-operatively in the psp promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 25: 473-481.

Khan, K.U., Zuberi, A., Nazir, S., Fernandes, J.B.K., Jamil, Z., Sarwar, H. 2016. Effects of dietary selenium nanoparticles on physiological and biochemical aspects of juvenile *Tor putitora*. Turkish Journal of Zoology 40: 704-712.

Khan, K.U., Zuberi, A., Nazir, S., Ullah, I., Jamil, Z., Sarwar, H. 2017. Synergistic effects of dietary nano selenium and vitamin C on growth, feeding, and physiological parameters of mahseer fish (*Tor putitora*). Aquaculture Reports 5: 70-75.

Kohrle, J., Jakob, F., Contempre, B., Dumont, J.E. 2005. Selenium, the thyroid, and the endocrine system. Endocrine Reviews 26: 944-984.

Kouba, A., Petrusek, A., Kozák, P. 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems 5: 413-444.

Le, K.T., Dao, T.T., Fotedar, R., Partrigde, G.J. 2014. Effects of variation in dietary contents of selenium and vitamin E on growth and physiological and haematological responses of yellowtail kingfish, *Seriola lalandi*. Aquaculture International 22: 435-446.

Luskova, V. 1995. Determination of normal values in fish hematology. Acta-Universitatis Carolinae Biologica 39: 191-200.

Monteiro, D.A., Rantin, F.T., Kalinin, A. L. 2009. The effects of selenium on oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish matrinxã, *Brycon cephalus* exposed to organophosphate insecticide Folisuper 600 BR® (methyl parathion). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 149: 40-49.

Remya, N.S., Syama, S., Gayathri, V., Varma, H.K., Mohanan, P.V. 2014. An in vitro study on the interaction of hydroxyapatite nanoparticles and bone marrow mesenchymal stem cells for assessing the toxicological behaviour. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 117: 389-397.

Saad, M.B., Gertner, L.R., Bona, T.D., Santin, E. 2009. Selenium influence in the poultry immune response-review. Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture 1: 243-247.

Sadeghian, S., Kojouri, G. A., Mohebbi, A. 2012. Nanoparticles of selenium as species with stronger physiological effects in sheep in comparison with sodium selenite. Biological Trace Element Research 146: 302-308.

Saffari, S., Keyvanshokooh, S., Zakeri, M., Johari, S.A., Pasha-Zanoosi, H., Mozanzadeh, M.T. 2018. Effects of dietary organic, inorganic, and nanoparticulate selenium sources on growth, hemato-immunological, and serum biochemical parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). Fish Physiology and Biochemistry 44: 1087-1097.

Simon, C., Dumont, P., Cuende, F.X., Diter, A. 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. Cryobiology 31: 245-253.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Antychowicz, J. 1993. Nonspecific

defense mechanisms assay in fish I; Phagocytic index, adherence and phagocytic ability of neutrophils (NBT test) and myeloperoxidase activity test. In: Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Waluga, J., Disease Diagnosis and Prevention Methods, FAO-Project GCP/INT/JPA, IFI, Olsztyn, 95-104.

Sugiura, S.H., Babbitt, J.K., Dong, F.M., Hardy, R.W. 2000. Utilization of fish and animal by-product meals in low-pollution feeds for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquaculture Research 31: 585-593.

Valencia, M.D.P., Miller, L.H., Mazur, P. 1996. Permeabilization of Eggs of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. Cryobiology 33: 149-162.

Wang, Y., Han, J., Li, W., Xu, Z. 2007. Effect of different selenium source on growth performances, glutathione peroxidase activities, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Animal Feed Science and Technology 134: 243-251.

Effects of Nano-selenium on some immune and hematological indices in different life stages of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, permeabilized by sodium hypochlorite

Sanaz Aleieh, Ali Hajibeglou*, Mohammad Sudagar
Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran

Received 09 July 2019; accepted 20 September 2019

Abstract
Selenium is a trace element important for the normal growth and physiological functions in aquatic animals. In this experiment, its effects on the immune and hematological indices were studied in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792) at different stages for 60 days. The experiment was carried out on 3 life stages (egg, alevin, fry), exposed to 0 (control), 0.5, 1 and 1.5 mg/L selenium nanoparticles each with 3 repetitions once penetrating with sodium hypochlorite. The results exhibited that the highest lysozyme level was observed in the fish exposed to 1 mg/L nano selenium in the alevin stage ($p<0.05$), while the lowest was reported in the control group. Immunoglobulin levels in the alevin stage at 1 and 1.5 mg/L nanoparticles were significantly higher than the control group and also than the other experimental treatments ($p<0.05$). The highest numbers of white blood cells were found at treatments exposed to 1.5 and 1 mg/L in the alevin stage, while the cell number in the control group was significantly lower than in the other treatments ($p<0.05$). Besides, the numbers of red blood cells in all treatments during the alevin stage were significantly higher than in the control group ($p<0.05$). The highest hemoglobin and hematocrit levels were observed in the treatments during alevin stage, while the lowest levels were found in the control group, such that the differences were significant ($p<0.05$). In total, exposing to 1 mg/L selenium nanoparticles in the alevin stage is the best concentration during the exact life time for rainbow trout growth and development.

Keywords: Selenium nanoparticles, Immunological indices, Hematological indices, *Oncorhynchus mykiss*

Corresponding author: Alihajibeglou@gmail.com