اثرات تغذیه‌ای ساکارومایسس سرویزیا غنی شده با سلنیوم بر رشد و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به استرس‌های محیطی و باکتری یرسینیا روکری

- **امیر توکمه‌چی***: پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی١٦٥
- **راحله شهرکی**: دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی١٦٥

تاریخ دریافت: اردیبهشت ١٣٩١ تاریخ پذیرش: مهر ١٣٩١

چکیده

سلنیوم یک عنصر کمیاب و ضروری بوده که به‌دلیل ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی توجه زیادی را به‌خود جلب کرده است. شکل آلی این عنصر جذب زیستی بالایی داشته و از سمیت بسیار اندکی برخوردار می‌باشد. لذا مطالعه حاضر به‌منظور بررسی اثرات تغذیه‌ای مخمر غنی شده با سلنیوم به‌عنوان فرم آلی بر رشد و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گردید. برای این منظور، ٦٠٠ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ٤ ± ٢٩ گرم به مدت ٦٠ روز با غذای تجاری حاوی مقادیر مختلف مخمر غنی شده با سلنیوم (10^6 CFU/g، 10^7 و 10^8) و یا جیره شاهد (بدون مخمر حاوی سلنیوم) غذادهی شدند. نمونه‌برداری در روزهای صفر و ٦٠ به‌منظور زیست‌سنجی ماهیان انجام شد و بعد از ٦٠ روز ماهیان با استرس افزایش دما و کمبود اکسیژن روبرو شدند و یک آزمایش تجربی نیز برای مواجه باکتریایی با یرسینیا روکری طراحی گردید. یافته‌های حاصل نشان داد که افزودن مخمر غنی شده با سلنیوم به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در مقایسه با گروه شاهد بهبود بخشید. هم‌چنین ماهیانی که بیش‌ترین مقدار مخمر غنی شده یعنی 10^8 CFU/g را دریافت کردند به‌طور معنی‌داری بالاترین میزان مقاومت را در برابر استرس‌ها و آلودگی تجربی با باکتری یرسینیا روکری نسبت به سایر گروه‌ها از خود نشان دادند. بر اساس یافته‌های حاصل از این بررسی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که مخمر غنی شده با سلنیوم می‌تواند سبب افزایش رشد و مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر استرس‌های محیطی و بیماری گردد.

لغات کلیدی: قزل‌آلای رنگین کمان، ساکارومایسس سرویزیا غنی شده با سلنیوم، رشد، مقاومت

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: a.tukmachi@urmia.ac.ir

مقدمه

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از گونه‌های پرورشی و تجاری مهم در ایران محسوب می‌شود که در بسیاری از مناطق پرورش آن به‌صورت نیمه‌متراکم و متراکم صورت می‌گیرد. در حال حاضر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در بیش‌تر مزارع پرورشی ایران یرسینیوز بوده که باعث خسارات اقتصادی زیادی می‌گردد (۱). عامل این بیماری باکتری یرسینیا روکری بوده که علائمی مانند خونریزی در بسیاری از بافت‌ها و اندام‌ها، به‌ویژه اطراف دهان، آبشش‌ها، عضلات، چربی‌ها و احشاء را سبب می‌شود. هم‌چنین التهاب شدیدی را در قسمت‌های انتهایی روده و شکم ماهی به‌وجود می‌آورد. این باکتری در محیط پایدار بوده و به‌صورت افقی منتقل می‌شود (۲).

سلنیوم یک عنصر ریزمغذی ضروری برای موجودات زنده بوده و به‌عنوان کوفاکتور آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز عمل می‌کند، این آنزیم خاصیت آنتی اکسیدانی داشته و با کاهش ایجاد متابولیت‌های سرطان‌زا و ممانعت از رگ‌زایی در بدخیمی‌ها نقش مهمی دارد (۶)؛ هم‌چنین سلنیوم برای رشد بافت عضله ضروری بوده (۱۲) و کمبود آن در ماهیان به‌ویژه آزاد ماهیان باعث کاهش اشتها، تحلیل رفتن عضلات، به تاخیر افتادن رشد و افزایش تلفات می‌گردد (۲۳). سلنیوم در کبد و غدد تناسلی ماهی به‌طور زیستی تجمع می‌یابد و جذب آن در درجه اول از طریق رژیم غذایی صورت می‌گیرد نه از طریق آب و از راه آبشش‌ها (۱۸). عملکرد آنتی اکسیدانی سلنیوم به دلیل سلنوسیستئین بوده که ماده اخیر مرکز فعال آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز را تشکیل می‌دهد (۱۰). سلنیوم به دو فرم معدنی و آلی یافت می‌شود، فرم آلی این عنصر در ترکیب با اسیدهای آمینه بوده که در ماهیان و پستانداران بیش‌تر به صورت سلنومتیونین می‌باشد. سلنومتیونین در مقایسه با سایر فرم‌های آلی و معدنی سلنیوم از نظر بیولوژیک فعال‌تر است، دلیل این امر در آزاد ماهیان ناشی از قابلیت جذب بهتر سلنومتیونین عنوان شده است (۹).

Yang و همکاران (۲۰۱۲) و Choct و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی‌های خود مشاهده کردند که استفاده خوراکی سلنیوم آلی موجب افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، بهبود کیفیت گوشت و ازدیاد فعالیت آنتی اکسیدانی سرم در جوجه‌های گوشتی می‌شود. Zhou و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی اثر منابع مختلف سلنیوم (نانو ذره سلنیوم و سلنومتیونین) بر شاخص‌های رشد، ترکیب شیمیایی عضلات و فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز در ماهی *Carassius auratus* gibelio پرداختند. آن‌ها در تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که تکمیل جیره با منابع مختلف سلنیوم باعث بهبود وزن نهایی، افزایش نسبی وزن، ازدیاد فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و افزایش غلظت سلنیوم ماهیچه گردید. Gatlin and Wilson (۱۹۸۴) نیز نشان دادند که رشد گربه ماهی کانالی (*Zctalurus punctatus*) تحت تاثیر سطوح مختلف سلنیوم جیره قرار می‌گیرد.

استفاده از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان ناقل ریزمغذی‌ها ایده جدیدی است که برای نخستین بار در سال ۲۰۰۰ توسط Suhajda و همکاران پیشنهاد شد. ساکارومیسس سرویزیا کاربرد فراوانی در صنایع غذایی داشته و غنی‌سازی آن با سلنیوم شکل متداول کاربرد سلنیوم برای تکمیل جیره‌های غذایی تلقی می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تغذیه‌ای ساکارومیسس سرویزیا غنی شده با سلنیوم بر رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و مقاومت آن در برابر یرسینیا روکری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

کشت مخمر و غنی‌سازی آن

ساکارومیسس سرویزیا مورد استفاده در این مطالعه از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم ایران (PTCC 24860) تهیه شد. هم‌چنین نمک سلنیت سدیم (Na_2SeO_3؛ سیگما، آمریکا) توسط شرکت کیمیا گسترش پویان (تهران) تهیه گردید. غنی‌سازی مخمر براساس روش استاندارد Wang و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت. به‌طور خلاصه، ابتدا مخمر در ۹۰ میلی‌لیتر محیط کشت YEPD[1] و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد، pH برابر ۵/۸ و با دور ۱۶۰ rpm در انکوباتور شیکردار به‌مدت ساعت۱۲ کشت داده شد. سپس Na_2SeO_3 به محیط کشت استریل مخمر، در غلظت ۱۰ میلی‌گرم به‌ازاء هر میلی‌لیتر اضافه و عمل انکوباسیون به‌مدت یک شبانه روز دیگر با همان شرایط قبلی ادامه یافت. پس از رشد، محیط کشت

1. Yeast Extract Peptone Dextrose

استریل با دور ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و به منظور حذف سلنیوم اضافی رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. سرانجام با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون مخمر با تراکم‌های CFU/ml 1×10^{8}، 1×10^{7} و 1×10^{6} تهیه گردید، در ضمن شمارش مخمر با استفاده از لام نئوبار انجام گرفت.

طراحی آزمایش و غذا دهی

تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۴ ± ۲۹ گرم از یکی از مزارع پرورشی ارومیه تهیه و به کمک تانکر مجهز به مخزن اکسیژن به پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه انتقال یافتند. ماهیان در بدو ورود با آب نمک (۱۰ گرم در لیتر) ضد عفونی شده (۱) و به‌مدت یک هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه در حوضچه‌های پلی اتیلنی ۱۰۰۰ لیتری نگهداری شدند. پس از اتمام دوره سازش ماهیان به‌صورت تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. پرورش در حوضچه‌های ۳۰۰ لیتری از جنس پلی اتیلن و با تراکم ۵۰ قطعه در هر حوضچه به‌مدت ۶۰ روز صورت گرفت. آب مورد نیاز از طریق یک حلقه چاه نیمه عمیق تامین و دمای آب پرورش در طول مطالعه بر روی ۰/۵ ± ۱۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. ماهیان در دوره سازگاری و در طول مطالعه با غذای تجاری پلت (GFT1 و GFT2) شرکت فرادانه، ایران تغذیه شدند (جدول ۱). در ضمن پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب نظیر: اکسیژن محلول، دما و pH آب به ترتیب به‌وسیله اکسیژن‌متر دیجیتالی، دماسنج و pH متر در طول دوره آزمایش (۶۰ روز) به‌طور روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد.

جدول ۱- آنالیز تقریبی غذای تجاری پلت (درصد) مورد استفاده در این تحقیق

ترکیب	GFT 1	GFT 2
پروتئین خام	۳۸	۳۶
چربی خام	۱۴	۱۴
خاکستر	۱۰	۱۰
فیبر	۴	۴
فسفر	۱/۱	۱
رطوبت	۱۱	۱۱

در این تحقیق ماهیان به چهار گروه با سه تکرار تقسیم شدند. گروه اول با جیره شاهد (بدون افزودن مخمر حاوی سلنیوم) و گروه‌های دوم، سوم و چهارم به ترتیب با جیره‌های کامل حاوی مخمر غنی شده با سلنیوم شامل CFU/gr 1×10^{6}، 1×10^{7}، 1×10^{8} غذادهی شدند. تهیه غذا به‌صورت روزانه انجام گرفت برای این‌کار ابتدا مقدار غذای روزانه هر گروه محاسبه، سپس مقدار مورد نیاز از مخمر بر روی تمام قسمت‌های غذا اسپری و اجازه داده شد تا غذا به‌مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و محل تمیز خشک گردد (۲۱).

زیست‌سنجی ماهیان

زیست‌سنجی ماهیان در روزهای صفر و ۶۰ مطالعه انجام شد. برای این‌کار از هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی انتخاب و فاکتورهای رشد نظیر طول کل (Total length)، طول چنگالی (Forkal length) به‌طور جداگانه اندازه‌گیری و سپس بر اساس آن‌ها مقادیر وزن نهایی (Final weight)، وزن به‌دست آمده (Weight Gain)، نرخ رشد ویژه (Special Growth Rate)، و ضریب چاقی (Condition Factor) براساس روابط زیر مورد محاسبه قرار گرفتند (۸):

۱۰۰× [میانگین وزن اولیه به گرم + (میانگین وزن اولیه به گرم – میانگین وزن نهایی به گرم)]= وزن بدست آمده (درصد)

۱۰۰× [طول دوره پرورش + (لگاریتم وزن اولیه به گرم- لگاریتم میانگین وزن نهایی به گرم)]= ضریب رشد ویژه (درصد)

۱۰۰× [(میانگین طول نهایی به سانتی‌متر)^{3} ÷ میانگین وزن نهایی به گرم]=شاخص وضعیت (درصد)

سنجش مقاومت ماهیان

در پایان دوره پرورش یعنی در روز ۶۰ مطالعه از دو استرس کمبود اکسیژن و حرارت برای ارزیابی میزان مقاومت ماهیان تغذیه شده با پودر و عصاره مخمر استفاده گردید. برای ایجاد استرس‌ها از روش Bergh (۱۹۹۷) استفاده شد، براساس این روش ۲۴ ساعت قبل از شروع استرس غذادهی به ماهیان

متوقف گردید. در زیر به‌طور خلاصه بـه هرکـدام از اسـترس‌هـا اشاره خواهد شد:

استرس دما

برای این‌کار تعداد ۱۵ قطعه ماهی از هر تیمار (۵ ماهی از هر تکرار) به‌طور تصادفی انتخاب و به حوضچه‌هایی منتقل شدند که در آن دمای آب توسط بخاری آکواریوم در مدت زمان حدود ۳۰ تا ۴۵ دقیقه به ۲۴ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت، سپس استرس ادامه پیدا کرد تا زمانی که ۵۰ درصد ماهیان تلف شدند (۱۱).

استرس اکسیژن

برای استرس کمبود اکسیژن نیز مانند استرس حرارتی تعداد ۱۵ ماهی از هر تیمار (۵ ماهی از هر تکرار) انتخاب و میزان اکسیژن حوضچه‌ها توسط گاز ازت به ppm ۳ رسانده شده و ماهیان در این شرایط نگه‌داری و تا زمانی که ۵۰ درصد ماهیان تلف شدند استرس ادامه یافت (۱۱).

اندازه‌گیری گلوکز و کورتیزول سرم

میزان کورتیزول سرم و گلوکز پلاسما پس از یک ساعت مجاور شدن با استرس‌ها اندازه‌گیری شدند. برای این‌کار نمونه خون ۵ قطعه ماهی به ازاء هر تیمار به‌صورت تصادفی از ورید ساقه دمی گرفته شد. برای سنجش گلوکز از کیت پارس آزمون (ایران) و برای سنجش کورتیزول از کیت Monobind (آمریکا) استفاده گردید (۱۱).

آزمایش مواجه باکتریایی

در این بررسی پس از ۶۰ روز تغذیه با ساکارومایسس سرویزیا غنی شده با سلنیوم، آلودگی تجربی با سویه حاد *یرسینیا روکری* (BCCM/LMG[1] 3279) ایجاد شد. برای این منظور ماهیان هر تیمار به‌طور تصادفی به دو گروه تقسیم و در هر گروه ۱۰ قطعه ماهی قرار داده شد. برای ایجاد آلودگی تجربی از روش Rahmati Andani و همکاران(2011) استفاده گردید. به‌طور خلاصه، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با تراکم $1/1\times10^{7}$ CFU/ml به‌صورت داخل صفاقی به همه ماهیان تزریق شد. لازم به‌ذکر است که در این مرحله از مطالعه شش گروه به شرح زیر در نظر گرفته شدند. گروه اول (شاهد مثبت)، گروه دوم، سوم و گروه چهارم (تغذیه شده با غلظت‌های مختلف مخمر غنی شده با سلنیوم)، گروه شاهد منفی (تزریق با سرم فیزیولوژی استریل) و گروه دارو (تجویز اکسی تتراسایکلین ۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا). پرورش ماهیان تا دو هفته در حوضچه‌های ۹۰ لیتری انجام شد و روزانه دو بار از نظر تلفات و علائم بیماری شامل بی‌حالی، کاهش اشتها، بیرون‌زدگی چشم، تیرگی پوست و غیره مورد بررسی قرار گرفتند. هم‌چنین تلفات روزانه ماهیان ثبت و نمونه‌های تلف شده به‌منظور تائید عفونت مورد آزمایش باکتریایی و آگلوتیناسیون قرار گرفتند. برای انجام آگلوتیناسیون از روش Roberson (۱۹۹۰) استفاده شد. به‌طور خلاصه، ابتدا تعداد یک یا چند کلنی باکتری به ۱ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل افزوده شده و جهت غیرفعال کردن باکتری‌ها از فنل نیم درصد استفاده گردید. سپس یک قطره از سوسپانسیون فوق بر روی سطح یک لام تمیز ریخته شده و یک قطره نیز از سرم رقیق شده (۱ به ۱۰) ماهیان بی‌حال یا در حال مرگ به آن افزوده شد. لازم به‌ذکر است که بافر PBS استریل و سرم ماهیان سالم به‌عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. سپس لام در دمای اتاق به آرامی تکان داده شد و ظرف مدت ۵ دقیقه تشکیل آگلوتیناسیون به‌صورت ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت (۱۴).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه[2] (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون توکی[3] (آزمون اختلاف حقیقی که به‌طور مخفف HSD نامیده می‌شود) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $P<0/05$ در نظر گرفته شد. هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

ثبت شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌های پرورشی نشان داد که این شاخص‌ها در محدوده نرمال برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار دارند (جدول ۲).

[1]. Belgium Co-ordinated Collection of Microorganisms

[2]. One –way Analysis of variance

[3]. Tukey's Test

جدول ٢- میانگین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌های پرورشی در طول مطالعه

دما (سانتی‌گراد)	اکسیژن (ppm)	pH	آمونیوم (ppm)	نیتریت (ppm)
١٤/٧ ± ٠/٥	٩/٣٦ ± ٠/٩	٧/٥٦ ± ٠/٢	٠/٥٧٢ ± ٠/٠١	٠/٠١٠ ± ٠/٠٢

* اعداد به‌صورت X ± S.D. بیان شده‌اند.

همچنین نتایج مربوط به آنالیز شاخص‌های رشد در جدول ٣ آورده شده است. بر اساس این یافته‌ها ماهیان تغذیه شده با ساکارومایسس سرویزیا غنی شده با سلنیوم دارای شاخص‌های رشد بالاتری نسبت به ماهیان گروه شاهد بودند. بررسی‌های آماری بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار در سطح p=٠/٠٢٠٤ بین ماهیان تغذیه شده با 10^{7} و 10^{8} CFU/g مخمر حاوی سلنیوم نسبت به گروه شاهد و گروه ٢ (10^{6} CFU/g) بود (جدول ٣). البته یافته‌های بدست آمده هیچ‌گونه اختلاف آماری را از نظر فاکتور وضعیت در ماهیان ثابت نکردند.

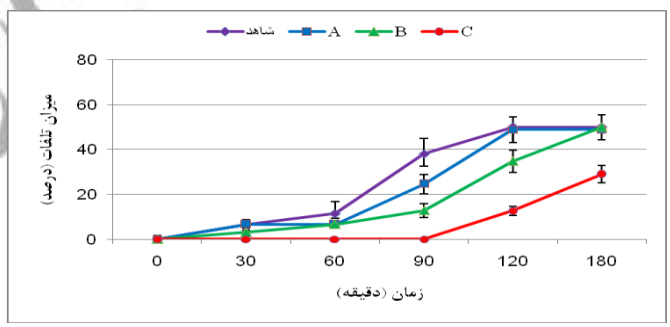
جدول ٣- شاخص‌های رشد ماهیان تغذیه شده با پودر ساکارومایسس سرویزیا غنی شده با سلنیوم به‌مدت ۶۰ روز

شاخص	شاهد	گروه ١	گروه ٢	گروه ٣
وزن اولیه (گرم)	^{a}٢٩/٠٦ ± ٣/٧٣	^{a}٢٩/٣٣ ± ٣/١٧	^{a}٢٩/٦٠ ± ٣/٤٣	^{a}٢٩/٦٨ ± ٤ /٠١
وزن نهایی (گرم)	^{a}٩٢/٣٨ ± ٧/٠١	^{b}٩٩/٩ ± ٣/٥	^{c}١٠٦/٦٤ ± ٨/٧	^{c}١٠٥/٥٣ ± ٢/١٦
طول اولیه (سانتی‌متر)	^{a}١٤/٣٣ ± ١/١٣	^{a}١٤/٤١ ± ١/٠٣	^{a}١٤/٦ ± ١/٢٢	^{a}١٤/٦ ± ١/٤٣
طول نهایی (سانتی‌متر)	^{a}١٩/٣ ± ١/٨٩	^{b}٢٠/٠١ ± ٢/١٧	^{c}٢٠/٣٦ ± ٢/٠١	^{c}٢٠/٣ ± ٢/١٩
وزن به‌دست آمده (درصد)	^{a}٢١٧/٨٧ ± ١٦/٥	^{b}٢٤٠/٦ ± ٧/١	^{c}٢٦٠/٢ ± ١٤/٩	^{c}٢٥٥/٥٥ ± ٧/٧
فاکتور وضعیت	^{a}١/٢٤٨ ± ٠/٠١	^{a}١/٢٤٥ ± ٠/٠١	^{a}١/٢٦١ ± ٠/٠٢	^{a}١/٢٦٢ ± ٠/٠٢
نرخ رشد ویژه (درصد)	^{a}٣/٢٢ ± ٠/٥	^{b}٣/٢٣ ± ٠/٢	^{c}٣/٣٥٤ ± ٠/٥	^{c}٣/٣٥٣ ± ٠/١

* اعداد به‌صورت X ± S.D. بیان شده‌اند (n=٣٠). گروه ١: تغذیه شده با 10^{6} CFU/g؛ گروه ٢: 10^{7} CFU/g و گروه ٣: 10^{8} CFU/g مخمر حاوی سلنیوم.

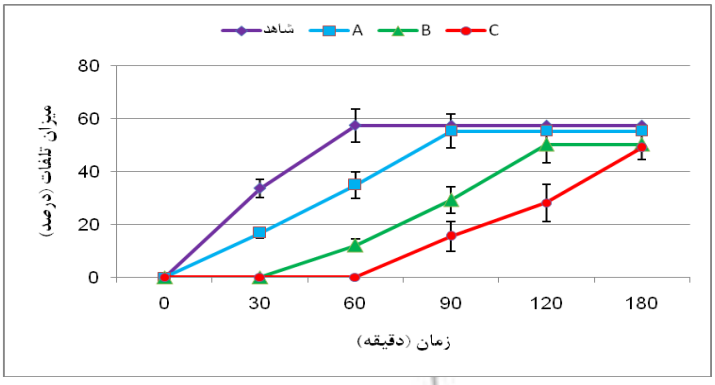
* اعداد با حروف غیریکسان در هر ردیف دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P< ٠/٠٥ می‌باشند.

نتایج مربوط به آزمون استرس هایپوکسی نیز نشان داد که هم در ماهیان شاهد و هم در ماهیان گروه دوم (تغذیه شده با 10^{6} CFU/g مخمر غنی شده با سلنیوم) و گروه سوم (تغذیه شده با 10^{7} CFU/g مخمر غنی شده با سلنیوم) نیم ساعت پس از شروع استرس تلفات شروع شد در حالی که در ماهیان گروه چهارم (تغذیه شده با 10^{8} CFU/g پس از ٢ ساعت تلفات آغاز گردید؛ نمودار ١). یافته‌ها نشان داد که ماهیان گروه چهارم پس از گذشت سه ساعت از شروع استرس هایپوکسی به‌طور معنی‌داری (p< ٠/٠٥) بیش‌ترین مقاومت را (با درصد تلفات) نسبت به سایر گروه‌ها داشتند.



نمودار ١- میزان تلفات ماهیان پس از مجاور شدن با استرس اکسیژن در پایان دوره. A: تغذیه شده با 10^{6} CFU/g؛ B: 10^{7} CFU/g و C: 10^{8} CFU/g مخمر حاوی سلنیوم

همچنین یافته‌های حاصل از استرس حرارت ثابت کرد که مشابه استرس هایپوکسی ماهیان تغذیه شده با 10^8 CFU/g مخمر غنی شده با سلنیوم نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌ترین مقاومت را از خود نشان دادند به‌طوری که میزان تلفات آن‌ها پس از گذشت زمان سه ساعت به ۴/۵۱ ± ۴۸/۸۹ درصد رسید. در حالی که میزان تلفات در شاهد پس از گذشت یک ساعت و در گروه دوم و سوم به ترتیب پس از یک و یک ونیم ساعت به بیش از ۵۰ درصد رسید (نمودار ۲).



نمودار ۲- میزان تلفات ماهیان پس از مجاور شدن با استرس حرارت در پایان دوره. A: تغذیه شده با 10^6 CFU/g :B؛ 10^7 CFU/g و C: 10^8 CFU/g مخمر حاوی سلنیوم

همچنین در بررسی حاصل میزان گلوکز پلاسما و کورتیزول سرم ماهیان پس از نیم ساعت از شروع استرس‌ها اندازه‌گیری و نتایج آن در جدول ۴ آورده شده است. در هر دو مورد ماهیان گروه چهارم به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) دارای مقادیر کم‌تری از گلوکز و کورتیزول نسبت به سایر گروه‌ها بودند.

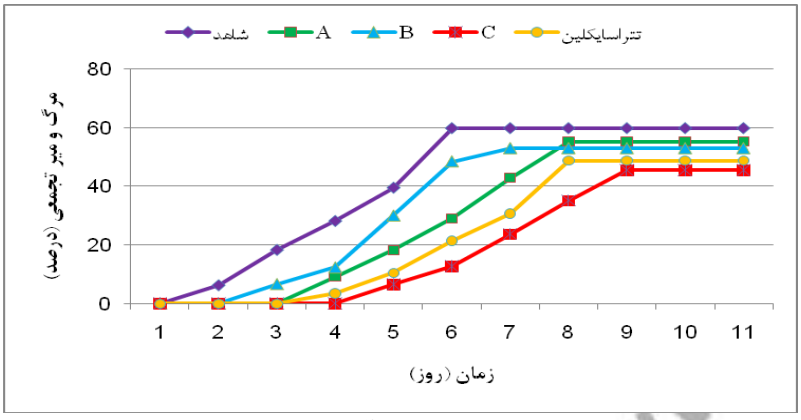
جدول ۴- مقادیر کورتیزول سرم و گلوکز پلاسما ماهیان مجاور شده با استرس‌های اکسیژن و حرارت در روز ۶۰

تیمار	استرس حرارت		استرس اکسیژن	
	گلوکز (mg/dl)	کورتیزول (µg/dl)	گلوکز (mg/dl)	کورتیزول (µg/dl)
شاهد	۱۷۹/۸۹ ± ۱۸/۷۳ ^{a}	۱۶۵/۴۵ ± ۲۱/۲۲ ^{a}	۱۷۶/۶۴ ± ۲۴/۲۹ ^{a}	۱۵۹/۰۹ ± ۱۷/۱۵ ^{a}
گروه ۱	۱۴۰/۳۴ ± ۱۶/۹۹ ^{a}	۱۵۵/۳۴ ± ۱۹/۱۲ ^{a}	۱۳۱/۲۱ ± ۱۲/۷۸ ^{a}	۱۳۱/۱۲ ± ۱۴/۰۹ ^{a}
گروه ۲	۱۲۴/۶۵ ± ۱۵/۶۵ ^{b}	۱۳۳/۶ ± ۱۲/۴۳ ^{b}	۱۱۵/۳۴ ± ۱۷/۰۹ ^{b}	۱۱۳/۵۴ ± ۱۴/۷۷ ^{b}
گروه ۳	۹۵/۱۲ ± ۱۷/۰۱ ^{c}	۱۱۲/۵۸ ± ۱۶/۰۳ ^{c}	۹۱/۰۹ ± ۱۳/۱۲ ^{c}	۹۴/۶۷ ± ۱۲/۰۵ ^{c}

* اعداد به‌صورت X ± S.D. بیان شده‌اند (n=۵). گروه ۱: تغذیه شده با 10^6 CFU/g؛ گروه ۲: 10^7 CFU/g و گروه ۳: 10^8 CFU/g مخمر حاوی سلنیوم.

* اعداد با حروف غیریکسان در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح P< ۰/۰۵ می‌باشند.

ماهیان تغذیه شده با 10^8 CFU/g مخمر حاوی سلنیوم بیش‌ترین مقاومت را در برابر پرسینیا روکری نشان دادند، طوری که میزان مرگ و میر تجمعی آن‌ها برابر با ۴۵/۵ درصد در پایان روز نهم پس از مواجه شدن با باکتری بود. همچنین میزان مرگ و میر تجمعی در ماهیانی که تتراسایکلین دریافت کردند برابر با ۴۸/۶۷ درصد بود که با تیمار ذکر شده تفاوت معنی‌داری نداشتند. بیش‌ترین میزان مرگ و میر در ماهیان گروه شاهد دیده شد که در روز پنجم پس از تزریق باکتری برابر با ۵۹/۸۰ درصد ثبت گردید (نمودار ۳).



نمودار ۳- میزان مرگ و میر تجمعی (درصد) ماهیان به‌دنبال آلودگی تجربی با یرسینیا روکری. A: تغذیه شده با 10^{6} CFU/g؛ B: 10^{7} CFU/g و C: 10^{8} CFU/g مخمر حاوی سلنیوم

بحث

سلنیوم یک عنصر کمیاب و ضروری برای انسان و حیوانات بوده و جزء اصلی آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز محسوب می‌شود. این آنزیم برای کاهش اکسیداسیون در ساختارهای داخل سلولی ضروری است. چرا که رادیکال‌های آزاد به‌طور دائم در فعالیت‌های فیزیولوژیک تولید می‌شوند و تولید آن‌ها در شرایط استرس افزایش می‌یابد. منابع اصلی رادیکال‌های آزاد در سلول شامل زنجیره انتقال الکترون در میتوکندری و سلول‌های سیستم ایمنی می‌باشد (۷)، به‌خصوص سلول‌های ایمنی جهت کشتن عوامل بیماری‌زا، رادیکال‌های آزاد را تولید می‌کنند. از طرفی سلنیوم با تاثیر بر اینترفرون‌ها و آدنوزین‌مونوفسفات حلقوی سلولی منجر به کاهش رشد سلولی شده و در نتیجه از این طریق مقاومت نسبت به پاتوژن را افزایش می‌دهد (۳).

در این تحقیق افزودن سطوح متفاوت مخمر غنی شده با سلنیوم به غذای تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری ($p<0/05$) منجر به افزایش بقای همه تیمارها نسبت به ماهیان شاهد گردید. یافته‌های این تحقیق با گزارش‌های Rider و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد که نشان دادند در صورت روبرو شدن ماهیان با استرس، نیاز ماهی به این عنصر بیش‌تر شده و در صورت تامین آن بقای بیش‌تری نسبت به گروه شاهد خواهند داشت. در واقع آن‌ها از مکمل معدنی و آلی سلنیوم برای تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده کردند و در مطالعه خود رشد، ایمنی و پارامترهای خون شناسی را مورد ارزیابی قرار دادند. یافته‌های این محققین نشان داد که میزان سلنیوم بافتی در ماهیان تغذیه شده با شکل آلی سلنیوم نسبت به ماهیانی که از مکمل معدنی سلنیوم استفاده کردند، بالاتر می‌باشد.

در مطالعه دیگری Sahin و Kucuk (۲۰۰۳) به این نتیجه رسیدند که به دلیل اثرات ضد تنش سلنیوم نیازمندی به آن در طول استرس افزایش می‌یابد. آن‌ها در مطالعه دیگری (۲۰۰۱) دریافتند که جیره‌های حاوی مقادیر بالاتر سلنیوم (۰/۱ یا ۰/۲ میلی‌گرم در کیلوگرم)، هنگامی که به صورت توام با ویتامین E استفاده شود منجر به بهبود عملکرد و خصوصیات لاشه می‌گردد.

مطالعات صورت گرفته توسط Penglase و همکاران (۲۰۱۱) و Kucukbay و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که افزودن مکمل سلنیوم در محدوده ۲-۰/۳ mg/kg به‌خصوص منابع آلی به غذای ماهیانی که در معرض استرس‌های محیطی هستند، مفید می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعات Miezeliene و همکاران (۲۰۱۱) موفقیت‌آمیز بودن تغذیه با مخمر غنی شده با سلنیوم را نشان داد، طوری که علاوه بر افزایش ایمنی و قدرت ضد اکسیدانی موجود، منجر به افزایش باروری، بهبود رشد و کیفیت لاشه نیز می‌شود.

Penglase و همکاران (۲۰۱۱) روتیفر غنی‌سازی شده با سلنیوم و ید را جهت تغذیه لارو ماهی کاد (*Gadus morhua*) به‌کار بردند. این محققین مشاهده کردند که لاروهای تغذیه شده با روتیفر غنی‌سازی شده نسبت به شاهد دارای رشد کم‌تر (که از نظر آماری معنی‌دار نبود) ولی بقای بیش‌تری تا ۳۲٪ هستند. هم‌چنین این پژوهشگران دریافتند که میزان فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز تفاوت آماری معنی‌داری را در بین گروه‌های تحت مطالعه ندارد. مطالعه Kucukbay و همکاران

(۲۰۰۹) نشان داد که ماهی تغذیه شده با جیره حاوی سلنیوم آلی رشد بهتری نسبت به سلنیوم معدنی دارد، احتمالاً سلنیوم آلی بهتر از منابع معدنی جذب می‌شود. آن‌ها اظهار کردند که مصرف غذا، رشد، ایمنی، مرگ و میر، و سایر صفات مهم حاکم بر رونق صنعت ماهی، به‌صورت منفی تحت تاثیر استرس‌های محیطی قرار می‌گیرد.

Yang و همکاران (۲۰۱۲) و Choct و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی‌های خود مشاهده کردند با توجه به نتایج حاصل از بهبود رشد جوجه‌های گوشتی و کارایی غذا، سلنیوم آلی بهتر از سلنیوم معدنی بوده و استفاده از سلنیوم آلی افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، کیفیت گوشت و آنتی اکسیداسیون را در جوجه‌های گوشتی در پی دارد. آن‌ها عنوان کردند احتمالاً دلیل آن راحتی جذب سلنیوم آلی از جدار روده و انتقال فعال آن به خون می‌باشد، در حالی‌که سلنیوم معدنی از طریق انتشار غیر فعال جذب می‌شود، از طرفی سلنیوم آلی متابولیسم هورمون‌های تیروئیدی را که برای رشد و توسعه طبیعی مهم هستند، افزایش می‌دهد. از طرفی اثر متفاوت سلنیوم آلی بر کاهش میزان بقا ممکن است ناشی از رشد سریع گروه تغذیه شده با سلنیوم آلی باشد که علت آن فعالیت بیش از حد قلب یا ناتوانی آن بوده و میزان زنده ماندن را کاهش می‌دهد.

Utterback و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش نمودند که سلنومخمر موجب افزایش بیش‌تری در سلنیوم تخم‌مرغ در مقایسه با سلنیت سدیم می‌شود. یکی از علل بالا بودن سلنیوم با استفاده از سلنومخمر این است که سلنیوم موجود در سلنومخمر به‌طور عمده به شکل سلنومتیونین می‌باشد. سلنومتیونین می‌تواند در ساختمان پروتئین‌ها وارد شود، در حالی که منابع غیرآلی سلنیوم مانند سلنیت سدیم به‌طور غیرفعال در بدن جذب می‌شوند.

نتایج این بررسی نشان داد که افزودن مخمر غنی شده با سلنیوم به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) می‌تواند شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را در مقایسه با گروه شاهد بهبود بخشد که با نتایج بررسی‌های Miezeliene و همکاران (۲۰۱۱) و Kucukbay و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. و با نتایج آزمایش‌های Tian و همکاران (۲۰۰۶) مغایرت دارد که نشان دادند جیره‌های حاوی سلنیوم هیچ اثری بر عملکرد رشد خوک‌ها ندارد. بررسی منابع موجود نتوانست دلیل قانع کننده‌ای را برای این اختلاف به‌دست آورد اما تصور می‌شود که این می‌تواند به خاطر اختلاف گونه‌ای باشد.

هم‌چنین نتایج مواجه باکتریایی ثابت کرد که ماهیان تغذیه شده با مقادیر 10^8 CFU/gr از مخمر غنی شده با سلنیوم، دارای بیش‌ترین مقاومت (۴۵/۵ درصد مرگ و میر تجمعی) نسبت به سایر ماهیان بودند.

Hilton و همکاران (۱۹۸۰) بر خلاف یافته‌های اخیر اظهار داشتند که مکمل سلنیوم هیچ تاثیری بر رشد، ایمنی و دیگر پارامترهای سلامتی در قبل و بعد از استرس ندارد. اثر کمبود مکمل سلنیومی بر عملکرد سیستم ایمنی و سلامت متناسب با وضعیت سلنیوم ماهیان تغذیه شده با جیره پایه است و نیز مشاهده کردند که در حالت کمبود شدید سلنیوم، در سطوح ۰/۰۷ mg/kg یا سطوح سمی، رشد کاهش پیدا می‌کند.

به‌طور کلی نتایج آزمایش حاضر نشان می‌دهد می‌توان از طریق غنی‌سازی مخمر با سلنیوم، سلنیوم آلی را وارد جیره ماهی کرد که این مساله نه تنها موجب افزایش ارزش غذایی ماهی برای انسان می‌شود بلکه باعث افزایش رشد و مقاومت آن در برابر استرس و بیماری می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از حمایت‌های مالی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان و نیز معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه ابراز می‌دارند.

منابع

1. **Akhlaghi, M. and Sharif Yazdi, H., 2008.** Detection and identification of a virulent *Yersinia ruckeri*: the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 9(4): 347-352.
2. **Bergh, Q., 2008.** Bacterial diseases of fish. In: Fish diseases. Eiras J.C., Segner H., Wahli T., Kapoor B.G. (Eds). Science publishers, New Hampshire, UK, pp. 255.
3. **Burton, R.; Higgins, P.J. and McConnell, K.P., 1977.** Reaction of selenium with immunoglobulin molecules. Biochimica et Biophysica Acta, 493: 323-31.
4. **Choct, M.; Naylor A.J. and Reinke, N., 2004.** Selenium supplementation affects broiler growth performance, meat yield and feather coverage. Brazilian journal of Poultry Science, 45: 677-683.
5. **Gatlin, M.D. and Wilson, R.P., 1984.** Dietary selenium requirement of fingerling

A.A.; Knigh, 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: 282–291.

16. **Sahin, K. and Kucuk, O., 2001.** Effects of vitamin E and selenium on performance, digestibility of nutrients and carcass characteristics of Japanese quails reared under heat stress. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 85: 342–348.
17. **Sahin, K. and Kucuk, O., 2003.** Heat stress and dietary vitamin supplementation of poultry diets. Nutr. Abst. Rev. Ser. B: Livestock Feeds Feed. 73, 41–50.
18. **Stewart, R.; Grosell, M.; Buchwalter, D.; Fisher, N.; Luoma, S.; Mathews, T.; Orr, P. and Wang, W.X., 2010.** Bioaccumulation and Trophic Transfer of Selenium. In: Ecological Assessment of Selenium in the Aquatic Environment. Chapman, P., Adams, W., Brooks, M., Delos, C., Luoma, S., Maher, W., Ohlendorf, H., Presser, T,. Shaw, P. (Eds.).CRC Press, New York, pp. 93–139.
19. **Suhajda, A.; Hegdczki, J.; Janzs, B.; Pais, I. and Vereczkey, G., 2000.** Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of trace elements in medicine and biology, 14: 43-47.
20. **Tian, J.Z.; Yun, M.S.; Kong, C.S.; Piao, L.G.; Long, H.F.; Kim, J.H.; Lee, J.H.; Lim, J.S.; Kim, C.H.; Kim, Y.Y. and Han, I.K., 2006.** Effects of Different Products and Levels of Selenium on Growth, Nutrient Digestibility and Selenium Retention of Growing-finishing Pig. Asian-Austrailian Journal of Animal Science, 19(1): 61-66.
21. **Tukmechi, A.; Rahmati Andani, H.R.; Manaffar, R. and Sheikhzadeh, N., 2011.** Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated *Saccharomyces cerevisiae* enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish and Shellfish Immunology, 30: 923-928.
22. **Utterback, P.L.; Parsons, C.M.; Yoon, I. and Butler, J., 2005.** Effect of supplementing Selenium yeast in diets of laying hens on egg selenium content. Poultry Science, 84: 1900–1901.
23. **Wang, Z.; Zhang, L. and Tan, T., 2010.** High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast

channel catfish. Journal of Nutrition, 114: 627–633.

6. **Hilton, J.W.; Hodson, P.V. and Slinger, S.J., 1980.** The requirement and toxicity of selenium in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Nutrition, 110: 2527–2535.
7. **Holovsk, J.R.; Holovsk, K.; Boldiz, K.K.V.S.; Cekonov, S.V.; Len, O.V.; Levkut, M.; Javorsk, P. and Leng, L., 2003.** The antioxidant enzyme activity in the liver tissue of chickens fed diets supplemented with various forms and amounts of selenium. Journal of Animal Feed Science, 12: 143-152.
8. **Huang, S.S.; Fuchi, L.; Higgs, D.A.; Balfry, S.K.; Schulte, P.M. and Brauner, C.J., 2008.** Effect of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ion regulatory development of spring Chinook salmon parr *(Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture, 274: 109-117.
9. **Kucukbay, F.Z.; Yalak, H.; Karaca, I.; Sahin, N.; Tuzcu, M. and Cakmak, M.N., 2009.** The effect of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. Aquaculture Nutrition, 15: 569-576.
10. **Levander, O.A. and Burk, R.F., 1994.** Selenium. In: Modern Nutrition in Health and Disease. Shils, M.E., Olson, J.A., Shike, M. (Eds.). Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 231-241.
11. **Meshkini, S.; Tafy, A.A.; Tukmechi, A. and Farhang-Pajuh, F., 2012.** Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Research Forum, 3(1): 49-54.
12. **Miezeliene, A.; Alencikiene, G.; Gruzauskas, R. and Barstys, T., 2011.** The effect of dietary selenium supplementation on meat quality of broiler chickens. Biotechnology Agronomy Society Environment, 15(S1): 61-69.
13. **Penglase, S.; Hamre, K.; Sweetman, J.W. and Nordgreen, A., 2011.** A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus* spp.). Aquaculture, 315: 144–153.
14. **Rahmati Andani, H.R.; Tukmechi, A.; Meshkiniy, S. and Ebrahimi, H., 2011.** Enhancement of rainbow trout resistant against *Aeromonas hydrophyla* and *Yersinia ruckeri* with isolated *Lactobacilli* from Common carp intestine. Iranian Journal of Veterinary Medicine, 7(2): 26-35.
15. **Rider, S.A.; Davies, S.J.; Jha, A.N.; Fisher,**

production. Korean Journal of Chemical and Engineering, 17(6): 1836-1840.

24. **Yang, Y.R.; Yin, Q.Q.; Wang, P.; Meng, F.C.; Zuo, R.Y.; Zheng, Q.H.; Liu, J.X.; Chang, J. and Jiang, Y.B., 2012.** Effect of organic and inorganic selenium supplementation on growth performance, meat quality and antioxidant property of broiler. African Journal of Biotechnology 11(12): 3031-3036.
25. **Yin, H.; Fan, G. and Gu, Z., 2010.** Optimization of culture parameters of selenium -enriched yeast (*Saccharomycess cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). LWT - Food Science and Technology 43: 666–669
26. **Zhou, X.; Wang, Y.; Gu, Q. and Li, W., 2009.** Effects of different dietary selenium sources (selenium nanoparticle and selenomethionine) on growth performance, muscle composition and glutathione peroxidase enzyme activity of crucian carp (*Carassius auratus* gibelio) .Aquaculture, 291: 78–81.

The Effect of feeding with Selenium enriched *Saccharomyces cerevisiae* on the growth and resistant of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against environmental stresses and *Yersinia ruckeri*

- **Amir Tukmechi *:** Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University, P.O.Box:165 Urmia, Iran
- **Raheleh Shahraki:** Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University, P.O.Box:165 Urmia, Iran

Received: May2012 Accepted: October 2012

Keywords: rainbow trout, Selenium enriched, *Saccharomyces cerevisiae*, growth, resistance

Abstract

Selenium is an essential micronutrient element due to the antioxidant and anti-cancer properties have attracted much attention. Organic form of this element has high bioavailability and toxicity is very low. The goal of this study was evaluate the effect of feeding by Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* as an organic form on the growth and resistant of rainbow trout. For this purpose, Six hundred rainbow trout with 29 ± 4 g mean weight were fed for a period of 60 days with a commercial pellet containing different concentration of Selenium Enriched yeast (10^6, 10^7 and 10^8 CFU/g of diet) and control diet (without complementation). Sampling was done for biometry at the day of 0 and 60 and at the end of trial the fish were challenged with thermal and hypoxia stresses, also an experimental challenge was scheduled with *Yersinia ruckeri*. Results showed that the addition of Selenium enriched yeast into the fish diet significantly ($P<0.05$) improved rainbow trout growth parameters in comparison the control. Also, the fish that received maximum level of Selenium enriched yeast (10^8 CFU/ml) had higher resistant against stresses and *Yersinia ruckeri* than the other groups. In conclusion, addition of selenium enriched *Saccharomyces cerevisiae* into diet could enhance the growth and resistant of rainbow trout against environment stresses and disease.

*Corresponding author's email: a.tukmachi@urmia.ac.ir