

"مقاله پژوهشی"

اثرات منابع مختلف سلنیوم جیره (سلنیت سدیم، سلنومتیونین و نانوسلنیوم) بر رشد، ایمنی و خون‌شناسی بچه‌ماهیان تمام ماده ترپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

علی حاجی بگلو*^۱، محمد سوداگر^۱ و زهره امیرپور^۱

۱. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۳۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۸

چکیده

این مطالعه به منظور مقایسه اثرات منابع مختلف سلنیوم بر شاخص‌های رشد، بقا، برخی پارامترهای ایمنی و خون‌شناسی ماهیان تمام ماده ترپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. ۱۰ جیره شامل سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم)، سلنیوم آلی (سلنومتیونین) و نانوسلنیوم با مقدار صفر (شاهد)، ۰/۱ (تیمار ۱)، ۰/۵ (تیمار ۲) و ۱ (تیمار ۳) میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی ساخته شد. بعد از ۸ هفته تغذیه میزان وزن نهایی در تیمار ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم بیش‌ترین مقدار را داشت. بالاترین درصد ضریب رشد ویژه ($4/60 \pm 0/24$) نیز در ماهیان تغذیه شده با جیره ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم مشاهده شد. پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی ($0/71 \pm 0/23$) و بیش‌ترین افزایش وزن ($41/99 \pm 1/36$ گرم) نیز در همین تیمار مشاهده شد که با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). تغذیه تیمارها با نانوسلنیوم همچنین موجب حصول بهترین ضریب تبدیل غذایی شد ($P < 0/05$). تیمارهای نانوسلنیوم و سلنیوم آلی در میزان گلبول‌های قرمز و سفید، هموگلوبین و لیزوزیم با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0/05$)؛ اما این اختلاف در تیمارهای تغذیه شده با سلنیوم معدنی مشاهده نشد ($P > 0/05$). میزان هماتوکریت در هیچ یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد ($P > 0/05$). میزان ایمونوگلوبولین در تمام تیمارها در هر سه منبع تغذیه‌ای با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$) و بیش‌ترین میزان آن در غلظت ۱ میلی‌گرم نانوسلنیوم در کیلوگرم جیره مشاهده شد. نتایج نشان دادند که افزودن نانوسلنیوم تا ۰/۵ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا، نسبت مناسبی از شاخص‌های رشد، بقا، برخی فاکتورهای خونی و ایمنی را در بچه‌ماهیان تمام ماده ترپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان را به همراه داشت.

کلمات کلیدی: نانوسلنیوم، شاخص‌های رشد، پارامترهای ایمنی و خون‌شناسی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه

با وجود نیاز اساسی جانوران پرورشی به ۲۹ عنصر از ۹۰ عنصر موجود در مواد غذایی (Lall 2008)، تنها اثرات تعداد کمی از آن‌ها در ماهیان مورد بررسی کامل قرار گرفته است (Prabhu *et al.*, 2014). میزان رشد، کارایی غذایی، نشانه‌های کمبود غذایی، غلظت عنصر در تمام بدن یا در یک بافت مشخص، فعالیت‌های مرتبط با ترشحات آنزیمی، دفع ادراری و حتی بیان ژن‌ها از جمله متغیرهایی بوده‌اند که پاسخ‌های متفاوتی را برای برآورد مقدار صحیح مورد نیاز یک عنصر بین مطالعات مختلف یا حتی درون یک مطالعه نشان داده‌اند (Grosell, 2010; Prabhu *et al.*, 2014). بنابراین ضروری است که مقدار بهینه یک عنصر با توجه به کارکرد فیزیولوژیک آن مدنظر قرار گیرد (Jobling, 2012). سلنیوم عنصری ضروری ولی کم‌نیاز در تغذیه ماهیان است و اثرات آن تا کنون در گونه‌هایی از ماهیان شامل قزل‌آلای رنگین‌کمان (Hilton *et al.*, 1980)، گربه‌ماهی آفریقایی (Wilson, 1984)، ماهی گروپر (*Epinephelus malabaricus*) (Lin and shiau, 2005; Lin, 2014) و ماهی kingfish yellowtail (*Seriola lalandi*) (Le and Fotedar, 2014) مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌است. این عنصر در چرخه تنظیم انرژی، متابولیسم اسیدهای چرب ضروری، سنتز پایه پورین و پیریمیدین، عمل اسپرماتوژنز، سنتز پروستوگلاندین‌ها و سیستم‌های ایمنی حیوانات نقش موثری دارد (Lin, 2014). ورود سلنیوم به ساختمان همه این آنزیم‌ها از طریق ایجاد سلنوسیتین و متیونین بوده و تجمع اشکال معدنی باقی‌مانده این عنصر قادر است اثرات سمی بر سلول‌های بدن ایجاد کند (Misra *et al.*, 2009).

بیشتر سلنیوم مورد نیاز بدن از مواد غذایی تامین می‌شود. فرم سلنیوم می‌تواند به صورت معدنی نظیر: سلنیت و سلنات یا به فرم آلی و فلزی مانند سلنومتیونین، سلنوسیتین و سلنوسیتین در طبیعت وجود داشته باشد (Kucukbay *et al.*, 2009). سلنیت سدیم متداول‌ترین شکل معدنی آن است که در تغذیه دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرد. دسترسی زیستی سلنیوم به فرم آن بستگی دارد (Kouba *et al.*, 2014) به طوری که امروزه فرم آلی سلنیوم مانند مخمر سلنیوم در آمریکا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Federal Register, 2002). در ماهیان مشاهده شده است که سلنیوم آلی نسبت به فرم معدنی با سهولت بیشتری جذب شده و از نظر دسترسی زیستی و بهبود سلامت موثرتر عمل می‌کند (Lorentzen *et al.*, 1994; Wang and Lovell, 1997; Wang *et al.*, 2007). مواد در ابعاد و مقیاس نانو ویژگی‌های جدیدی را از خود نشان می‌دهند از جمله فعالیت سطحی بالا، ناحیه سطحی اختصاصی بیشتر، بازده و کارایی کاتالیزوری بالا، مراکز سطحی فعال متعدد و قابلیت جذب سطحی فراوان (Wang *et al.*, 2007). اخیراً فرم نانوی عنصر سلنیوم به دلیل اثرگذاری بیشتر و سمیت کمتر بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Shi *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013). نتایج بررسی در ماهی کپور نشان داد مکمل نانوسلنیوم می‌تواند موجب بهبود عملکرد رشد و سیستم ایمنی آنتی‌اکسیدانی در ماهی کپور معمولی شود (Ashouri *et al.*, 2015).

قزل‌آلای رنگین‌کمان از مهم‌ترین ماهیان اقتصادی و از خانواده آزادماهیان است که امروزه به صورت ماهی شماره یک اکثر مزارع پرورش ماهیان سردآبی در بیشتر نقاط جهان از جمله ایران درآمده است (خارا

بتنی مستطیل شکل (۱۰۰۰ لیتری) و در هر حوضچه تعداد ۵۰ قطعه بچه ماهی به طور تصادفی رهاسازی شدند.

از آب چشمه جهت انجام آزمایش استفاده گردید. در طول دوره سازگاری و نگهداری شاخص های فیزیکی و شیمیایی آب به طور روزانه کنترل شد. میانگین دما، اکسیژن محلول، pH در طول دوره پرورش با استفاده از دستگاه دیجیتالی (Horiba U10, Japan) اندازه گیری شد و به ترتیب 1 ± 16 درجه سانتی گراد، $7/5$ میلی گرم در لیتر و $7/8$ بود. طی این مدت و دو روز قبل از تیمار بندی و شروع آزمایش، بچه ماهیان با جیره تجاری قزل آلا (شرکت ۲۱ بیضا، ایران) روزانه ۴ بار و به میزان ۳ درصد وزن بدن تغذیه شدند.

جیره های غذایی آزمایشی

برای تهیه جیره های آزمایشی، سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم)، سلنیوم آلی (سلنومیتونین) و نانوسلنیوم در سه سطح $0/1$ ، $0/5$ و 1 میلی گرم به ازای هر کیلوگرم به جیره پایه افزوده شد (جدول ۱)؛ علاوه بر این سه تیمار آزمایشی برای هر منبع سلنیوم، تیمار دیگری بدون سلنیوم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تغذیه با جیره های غذایی آزمایشی روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن در چهار وعده در روز (ساعت ۸، ۱۱، ۱۵ و ۱۸) طی یک دوره ۸ هفته ای انجام شد.

و همکاران، ۱۳۹۲). در حال حاضر این ماهی به دلیل شرایط بوم شناختی و سازگاری با شرایط زیست محیطی و رشد سریع به یک صنعت در حال توسعه تبدیل شده است (امیرپور و همکاران، ۱۳۹۸). کشور ایران از جمله بزرگترین تولیدکنندگان ماهی قزل آلا در جهان می باشد و سالانه میلیون ها قطعه تخم چشم زده از خارج کشور وارد می شود (حاجی بگلو و صفری، ۱۳۹۶). با توجه به این که مطالعات اندکی در مورد نیازهای غذایی در ماهیان تریپلوئید قزل آلا وجود دارد و با توجه به این که اثرات جیره های حاوی منابع مختلف سلنیوم بر ماهی قزل آلا ی رنگین کمان تریپلوئید مورد مقایسه قرار نگرفته است، بنابراین هدف از مطالعه حاضر ارزیابی و مقایسه اثرات استفاده از منابع مختلف سلنیوم اعم از سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم)، سلنیوم آلی (سلنومیتونین) و نانوسلنیوم به عنوان افزودنی در جیره بچه ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل آلا ی رنگین کمان برای نخستین بار بود.

مواد و روش ها

زمان، مکان و شرایط انجام تحقیق

تحقیق حاضر در کارگاه تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا ی رنگین کمان (گلستان، علی آباد کتول، زرین-گل) انجام شد. برای انجام آزمایش تعداد ۱۵۰۰ قطعه ماهی با میانگین وزن اولیه $0/1 \pm 3$ گرم در ۱۰ تیمار و سه تکرار به ازای هر تیمار، در مجموع در ۳۰ حوضچه

جدول ۱. تیمارهای آزمایشی

تیمار	میزان سلیوم افزوده شده به جیره (میلی گرم در کیلوگرم)	سلیوم معدنی (سلیت سدیم)	سلیوم آلی (سلیوم تیونین)	نانوسلیوم
شاهد	۰	۰	۰	۰
اول	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
دوم	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سوم	۱	۱	۱	۱

اندازه گیری شاخص های رشد

زیست سنجی ماهیان در ابتدا و انتهای دوره انجام شد. پس از پایان دوره آزمایش، قبل از زیست سنجی ماهیان با استفاده از پودر گل میخک (به میزان ۲۵۵ میلی گرم در لیتر) بیهوش شدند (میراب بروجردی و اخلاقی، ۱۳۹۱) و وزن ماهیان با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه گیری شد. به منظور ارزیابی شاخص های رشد و تغذیه شامل: افزایش وزن بدن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب رشد ویژه و درصد بقای بچه ماهیان در تیمارهای مختلف از روابط زیر استفاده شد (Hevray et al., 2005).

(وزن اولیه - وزن ثانویه) = شاخص افزایش وزن بدن

$100 \times (\text{وزن اولیه ماهی} - \text{وزن نهایی ماهی}) / (\text{طول دوره}$

پرورش \times مقدار غذای خورده شده) = ضریب تبدیل غذایی

\ln - وزن نهایی ماهی) / \ln = ضریب رشد ویژه

$100 \times ((\text{طول دوره آزمایش}) / (\text{وزن اولیه}$

$100 \times (\text{تعداد کل ماهیان} / \text{تعداد ماهیان زنده}) = \text{درصد بقا}$

مطالعات خون شناسی و بیوشیمیایی سرم

شمارش تعداد گلبول های قرمز و گلبول سفید پس از رقیق سازی نمونه خون به وسیله لام نئوبار با استفاده از فرمول های زیر انجام شد (Atamanalp et al., 2008).
تعداد گلبول های قرمز در یک میلی متر مکعب نمونه خون = تعداد گلبول های شمرده شده در ۵ مربع کوچک $(N) \times 5$ (مربع بزرگ) $\times 10$ (ارتفاع لام و لامل) $\times 200$ رقت خون $(N \times 10000) =$

تعداد گلبول های سفید در هر میلی متر مکعب خون =
تعداد گلبول های سفید شمارش شده در سطح مترمکعب $(N) \times 10$ (ارتفاع لام و لامل) $\times 20$ (رقت خون) $(N \times 200) =$

درصد هماتوکریت با استفاده از لوله های موینه و سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ و به کمک خط کش مخصوص هماتوکریت اندازه گیری شد (Klontz, 1994). میزان هموگلوبین با استفاده از کیت تجاری (زیست شیمی، ایران) بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۶ نانومتر انجام شد (Klontz, 1994).

لیزوزیم بر اساس لیز باکتری گرم مثبت میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (*Micrococcus lysodeikticus*) سنجش گردید (Carlton et al., 2004). ایمونوگلوبولین کل طبق روش سوئیسی و آندرسون اندازه گیری شد (Siwicki and Anderson, 1993).

تجزیه و تحلیل آماری

نمونه برداری در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. داده‌های به دست آمده از این آزمایش به کمک آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد.

نتایج

نرخ بقا در کلیه بچه‌ماهیان تغذیه شده با جیره‌های مختلف در پایان دوره پرورش بالاتر از ۹۶ درصد تعیین شد ($P > 0.05$). نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رشد در مدت تغذیه بچه‌ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل-آلای رنگین کمان با جیره‌های حاوی منابع و غلظت‌های مختلف سلنیوم نشان داد که در میزان افزایش رشد همه تیمارها به غیر از تیمار ۰/۱ سلنیوم معدنی تفاوت معنی-داری با گروه شاهد وجود داشت ($P < 0.05$). ضریب تبدیل غذایی تیمار شاهد با سایر تیمارها متفاوت بود، به طوری که تغذیه با نانوسلنیوم موجب حصول بهترین

ضریب تبدیل غذایی شد و پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی (0.71 ± 0.23) در تیمار ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره از نانوسلنیوم مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۲). میزان وزن نهایی در تیمار ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم بیش‌ترین مقدار را داشت ($P < 0.05$). بالاترین ضریب رشد ویژه (4.06 ± 0.24) و بیش‌ترین افزایش وزن (41.99 ± 1.36 گرم) در ماهیان تغذیه شده با جیره ۰/۵ میلی گرم نانوسلنیوم در کیلوگرم جیره مشاهده شد ($P < 0.05$) (جدول ۲).

نتایج حاصل از آنالیز پارامترهای خونی و ایمنی که در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان گلبول قرمز در تیمار ۰/۵ نانوسلنیوم و کم‌ترین میزان گلبول قرمز در گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). بیش‌ترین میزان گلبول سفید در گروه تغذیه شده با جیره حاوی نانوسلنیوم مشاهده شد که با تیمار شاهد و سایر تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی سلنیوم معدنی و سلنیوم آلی اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0.05$). میزان هموگلوبین در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0.05$). بیش‌ترین میزان هماتوکریت ابتدا در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی نانوسلنیوم و به دنبال آن تیمارهای سلنیوم آلی مشاهده شد که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند ($P < 0.05$)؛ اما میزان هماتوکریت در تیمارهای تغذیه شده با جیره دارای سلنیوم معدنی با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0.05$). میزان ایمونوگلوبولین در غلظت یک

میلی گرم نانوسلنیوم در کیلو گرم جیره بیشترین میزان را داشت، همچنین میزان ایمونوگلوبولین در کلیه تیمارها در هر سه منبع تغذیه‌ای با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت ($P < 0/05$). میزان لیزوزیم در هر سه غلظت تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی نانوسلنیوم و

سلنیوم آلی با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشت؛ اما تیمارهای تغذیه شده با سلنیوم معدنی در هر سه غلظت اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فعالیت لیزوزیم با شاهد نشان نداد ($p > 0/05$). (جدول ۳).

جدول ۲- شاخص‌های رشد و بقا در بچه‌ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با منابع و سطوح مختلف سلیوم جیره

شماره جیره، منبع و میزان سلیوم (میلی‌گرم در کیلوگرم جیره)									
سلیوم معدنی (سلیت سدیم)			نانوسلیوم			سلیوم آلی (سلنومتیونین)			شاخص‌های رشد
۰/۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۵	۱	تیمار شاهد (۰)
۵/۱±۰/۱ ^a	۵/۰۱±۰/۲۱ ^a	۵/۰۳±۰/۲۴ ^a	۴/۹۳±۰/۴ ^a	۴/۸۵±۰/۱۶ ^a	۴/۸۳±۰/۶ ^a	۵/۰۶±۰/۲۰ ^a	۵/۱±۰/۱۷ ^a	۴/۹±۰/۳ ^a	۵/۰۲±۰/۱۸ ^a
۳۵/۳۳±۰/۷۶ ^e	۳۵/۸۳±۱/۰۴ ^e	۳۷/۹۰±۰/۲۶ ^d	۳۷/۶۲±۰/۸۱ ^d	۴۲/۲۰±۱/۱۲ ^b	۴۶/۸۳±۰/۷۶ ^a	۴۲/۵۶±۰/۶۳ ^b	۳۸/۰۶±۰/۲۰ ^d	۴۰/۲۶±۰/۲۵ ^c	۴۲/۲۵±۲/۱۲ ^c
۳۰/۲۳±۰/۸۰ ^e	۳۰/۸۲±۱/۱۹ ^e	۳۲/۸۶±۰/۱۶ ^d	۳۲/۶۸±۰/۴۱ ^d	۳۷/۳۵±۱/۲۹ ^b	۴۱/۹۹±۱/۳۶ ^a	۳۷/۴۹±۰/۴۸ ^b	۳۲/۹۶±۰/۰۵ ^d	۳۵/۳۶±۰/۴۹ ^c	۳۵/۲۳±۱/۹۴ ^c
۰/۹۹±۰/۰۲ ^a	۰/۹۷±۰/۰۳۷ ^a	۰/۹۱±۰/۰۰۴ ^b	۰/۹۱±۰/۰۱۱ ^d	۰/۸±۰/۰۲۷ ^d	۰/۷۱±۰/۰۲۳ ^e	۰/۸±۰/۰۱ ^d	۰/۸۷±۰/۰۰۱ ^{bc}	۰/۸۴±۰/۰۱۱ ^c	۰/۸۵±۰/۰۴۷ ^c
۳/۳۳±۰/۰۵ ^e	۳/۴۳±۰/۱۴ ^{de}	۳/۶۰±۰/۰۷ ^{cd}	۳/۶۳±۰/۱۰ ^{cd}	۳/۸۶±۰/۱۰ ^b	۴/۰۶±۰/۲۴ ^a	۳/۸۰±۰/۰۵ ^{bc}	۳/۵۸±۰/۰۵ ^{cd}	۳/۷۶±۰/۱۱ ^{cd}	۳/۷۱±۰/۰۳ ^{cd}
۹۷/۳۳±۱/۵ ^a	۹۸/۳۳±۲/۰۸ ^a	۹۷/۰۰±۱/۷۳ ^a	۹۷/۰۰±۱/۰ ^a	۹۸/۳۳±۰/۵۷ ^a	۹۸/۰۰±۱/۰۰ ^a	۹۶/۳۳±۱/۱۵ ^a	۹۷/۶۶±۳/۲۱ ^a	۹۶/۶۶±۱/۵۲ ^a	۹۷/۰۰±۱/۰۰ ^a

 حروف غیر مشابه در یک ردیف، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P < ۰/۰۵$)

جدول ۳. شاخص های خون شناسی و ایمنی شناسی در بچه ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل آلا ی رنگین کمان تغذیه شده با منابع و سطوح مختلف سلیوم جیره

شاخص های										شماره جیره، منبع و میزان سلنیوم (میلی گرم در کیلو گرم جیره)
خون شناسی و ایمنی شناسی										
سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم)			نانو سلنیوم			سلنیوم آلی (سلنومتیونین)				
تیمار شاهد (۰)	۰/۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۵	۱	۰/۱	۰/۵	۱	
گلبول قرمز (۱۰ ^۶)	۱/۰۲ ± ۰/۰۶ ^c	۱/۰۴ ± ۰/۰۸ ^c	۱/۰۳ ± ۰/۰۷ ^c	۱/۰۱ ± ۰/۰۹ ^c	۱/۲۴ ± ۰/۰۷ ^b	۱/۳۹ ± ۰/۰۹ ^a	۱/۲۳ ± ۰/۰۱ ^b	۱/۰۲ ± ۰/۰۸ ^c	۱/۲۳ ± ۰/۰۸ ^b	
گلبول سفید (۱۰ ^۴)	۲/۰۱ ± ۰/۱۷ ^c	۲/۰۶ ± ۰/۰۶ ^c	۱/۸۹ ± ۰/۰۹۸ ^c	۱/۹۴ ± ۰/۰۹۵ ^c	۲/۶۳ ± ۰/۱۲ ^a	۲/۷۱ ± ۰/۰۸ ^a	۲/۵۶ ± ۰/۰۱ ^a	۲/۰۲ ± ۰/۰۱ ^c	۲/۲۸ ± ۰/۰۵ ^b	
لیزوزیم (میکرو گرم بر میلی لیتر)	۴۲/۱۶ ± ۱/۸۹ ^c	۴۱/۰۰ ± ۱/۶۰ ^c	۴۲/۲۴ ± ۲/۲۵ ^c	۴۱/۰۰ ± ۳/۱۷ ^c	۶۵/۹۶ ± ۲/۴۵ ^a	۶۵/۰۶ ± ۴/۱۷ ^a	۵۶/۱۰ ± ۳/۸۵ ^b	۵۶/۰۵ ± ۳/۰۴ ^b	۵۸/۴۱ ± ۳/۸۶ ^b	
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۶/۶۷ ± ۰/۷۵ ^a	۶/۹ ± ۰/۱۷ ^a	۶/۸۷ ± ۰/۱۷ ^a	۶/۹۳ ± ۰/۲۵ ^a	۶/۵۹ ± ۰/۵۶ ^a	۶/۳۷ ± ۰/۵۴ ^a	۷/۰۴ ± ۰/۲۶ ^a	۶/۷۱ ± ۰/۲۸ ^a	۶/۵۳ ± ۰/۱۶ ^a	
هماتوکریت (درصد)	۳۷/۱ ± ۰/۴۵ ^b	۳۶/۰ ± ۱/۲ ^b	۳۷/۰ ± ۱/۲۴ ^b	۳۶/۵ ± ۲/۱۷ ^b	۴۳/۱۳ ± ۱/۷۲ ^a	۴۲/۲۲ ± ۲/۰۳ ^a	۴۳/۱۶ ± ۳/۲۵ ^a	۴۰/۶۶ ± ۲/۸۸ ^a	۴۱/۰۰ ± ۲/۰۰ ^a	
ایمونوگلوبولین (میلی گرم در دسی لیتر)	۳۱/۰۰ ± ۱/۳۱ ^d	۳۵/۰۸ ± ۱/۴۶ ^c	۳۵/۰۳ ± ۱/۴۶ ^c	۳۶/۰۰ ± ۱/۴۸ ^c	۴۶/۱۶ ± ۱/۸۳ ^b	۵۱/۰۲ ± ۰/۹۲ ^a	۵۲/۱۱ ± ۱/۸۹ ^a	۴۳/۹۰ ± ۱/۵۲ ^b	۴۴/۲۴ ± ۱/۱۱ ^b	

حروف غیر مشابه در یک ردیف، نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشند (P<۰/۰۵)

بحث

سلنیوم عنصری کم نیازی است که وجود آن در جیره غذایی قادر است رشد بسیاری از گونه‌های ماهیان را بهبود بخشد (Le and Gatlin and Wilson, 1984; Fotedar, 2011; Elia et al., 2011; Lin, 2014)؛ به-طوری که در گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) وزن نهایی در گروهی که با جیره حاوی سلنیوم تغذیه شد بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی داری را نشان داد (Gatlin and Wilson, 1984). بررسی اثر نانوسلنیوم و سلنیوم آلی بر ماهی کپور معمولی نشان داد غلظت ۱/۵ میلی گرم بر کیلوگرم نانوسلنیوم بهترین رشد را به همراه داشت و فرم نانوسلنیوم تاثیر بهتری نسبت به سلنیوم آلی داشت (احمدوند و همکاران، ۱۳۹۴). در مطالعه‌ای دیگر اثر غلظت‌های مختلف نانوسلنیوم بر رشد ماهی قزل‌آلا بررسی شد و بهترین میزان شاخص‌های رشد در بالاترین غلظت مورد آزمایش (۱/۱ میلی گرم بر کیلوگرم) به ثبت رسید (شبرنگ هره‌دشت و میرواقفی، ۱۳۹۱). نتایج افزودن سلنیوم آلی تا ۰/۴۵ میلی گرم در کیلوگرم جیره موجب بهبود شاخص‌های رشد و پارامترهای خونی ماهیان قزل‌آلا شد (نظری و همکاران، ۱۳۹۶). نتایج مطالعه‌ای بر مولدین کاراس طلایی نشان داد با افزایش غلظت نانوسلنیوم میزان رشد افزایش یافت و بهترین میزان رشد در جیره حاوی ۱ میلی گرم بر کیلوگرم نانوسلنیوم مشاهده شد (سیدی و کلباسی، ۱۳۹۶). مطالعات مختلف نشان‌دهنده اثرگذاری هر دو فرم آلی و معدنی سلنیوم روی گونه‌های مختلفی از ماهیان است (Gaber, 2009; Elia et al., 2011)، با این وجود در بررسی‌های انگشت‌شماری اثر نانوسلنیوم

مورد ارزیابی قرار گرفته است. در تحقیق حاضر، اثر منابع مختلف سلنیوم جیره اعم از سلنیوم آلی (سلنومیتونین)، سلنیوم معدنی (سلنیت سدیم) و نانوسلنیوم روی بچه‌ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفت.

ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی سلنومیتونین و نانوسلنیوم ضریب رشد ویژه بالاتری را نسبت به ماهیان تیمار شده با فرم معدنی سلنیوم (سلنیت سدیم) نشان دادند. نتایج نشان داد که سلنومیتونین و نانوسلنیوم منابع کارا تر و مناسب تری از سلنیوم برای بچه‌ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین کمان است. این نتیجه با نتایج سایر تحقیقات که نشان داد سلنومیتونین و نانوسلنیوم جیره در مقایسه با سلنیت سدیم کارایی و دسترسی زیستی بالاتری را در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) داشت مطابقت دارد (Saffari et al., 2017). همچنین مطالعات نشان داد ترکیب سلنومیتونین و نانوسلنیوم جیره موجب بهبود عملکرد رشد در ماهی کاراس (*Carassius auratus gibelio*) می گردد (Zhou et al., 2009). با این وجود این نتایج بر خلاف نتایجی بود که نشان‌دهنده اثرات یکسان منابع آلی و معدنی سلنیوم بر ماهی گروپر (*Epinephelus malabaricus*) می باشد (Lin, 2014)؛ همچنین بهترین ضریب تبدیل غذایی در بچه‌ماهیان تمام ماده تریپلوئید قزل‌آلای رنگین کمان تغذیه شده با جیره حاوی ۰/۵ میلی گرم در کیلوگرم نانوسلنیوم مشاهده شد. محققین نشان دادند غلظت معینی از نانوسلنیوم، محتوای پروتئین سلول‌های اپی تلیال روده را در ماهی کاراس افزایش داد (Wang et al., 2013). افزایش در محتوای پروتئین درون سلول‌های اپی تلیال روده می تواند منجر به متابولیسم بهتر اجزاء غذا شده و در نتیجه رشد را

افزایش دهد. بنابراین ضریب تبدیل غذایی بهتر در کپورماهیان تغذیه شده با جیره حاوی نانوسلنیوم را می-توان بر افزایش محتوای پروتئین بالاتر سلول‌های اپی-تلیال روده مرتبط دانست.

نتایج بدست آمده از آنالیز فاکتورهای خونی نشان داد که میزان گلبول سفید و قرمز در غلظت‌های ۰/۵ و یک میلی گرم بر کیلوگرم جیره سلنیوم آلی و نانوسلنیوم بیشتر از گروه شاهد و تیمارهای تغذیه شده با سلنیوم معدنی بود (جدول ۳). مطالعات نشان می‌دهد که سدیم معدنی باعث کاهش تعداد گلبول قرمز می‌شود (Sopjani et al., 2008). بر طبق نتایج این مطالعه نیز تفاوت معنی داری بین تعداد گلبول قرمز در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی سلنیوم معدنی با گروه شاهد مشاهده نشد. در مطالعات انجام شده روی حیوانات، ثابت گردیده است که دسترسی زیستی فرم آلی سلنیوم نسبت به فرم معدنی آن بیشتر است (Levander, 1993; Smith and Picciano, 1987).

تحقیقات نشان می‌دهد که مقادیر گلبول سفید در خورشید ماهی در مواجهه با آب‌های حاوی سلنیوم افزایش یافت (Lemly, 2002) که با نتایج حاصل از این تحقیق در جیره ۰/۵ و یک میلی گرم بر کیلوگرم از نانوسلنیوم و سلنیوم آلی مطابقت داشت. گزارش شده است که در گربه ماهی کانالی آفریقایی مقادیر هموگلوبین، هماتوکریت، مقادیر گلبول قرمز با افزایش سطوح سلنیوم آلی به مقدار ۰/۳ و ۰/۵ گرم به ازای هر کیلوگرم وزن غذا در رژیم غذایی ماهی می‌تواند بدون تفاوت معنی داری بین آنها باعث بالا بردن سطح سلامت ماهی شود (Abdel-Tawwab et al., 2007). مطالعات نشان داده است که قرار گرفتن خورشید ماهی در آب‌های حاوی سلنیوم باعث کاهش هماتوکریت

در ماهی شد که این کاهش را در ارتباط با اثر سمی زیر حد کشنده سلنیوم آلی و معدنی دانست (Lemly, 2002). نتایج نشان داد که افزودن سلنیوم آلی تا ۰/۴۵ کیلوگرم غذا در رژیم غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان نسبت مناسبی از عوامل رشد، پارامترهای خونی و پاسخ‌های ایمنی را به همراه خواهد داشت و احتمالاً می‌تواند به عنوان یک محرک رشد عمل نماید. بیش‌ترین میزان فعالیت لیزوزیم در تیمار ۰/۵ از نانوسلنیوم مشاهده شد. این افزایش با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Grinde et al., 1989)، اما در تیمارهای سلنیوم آلی و معدنی با شاهد اختلاف معنی داری نداشت ($p > 0.05$). گزارش شده است که گلبول‌های سفید از منابع اصلی تولید لیزوزیم هستند. افزایش فعالیت اجزاء ایمنی نشان دهنده افزایش توان ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زای مهاجم می‌باشد. افزایش میزان لیزوزیم پلاسما در حقیقت باعث افزایش نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در جریان خون می‌گردد که آن‌ها نیز با ترشح لیزوزیم، باعث افزایش آن در سرم می‌شود و افزایش میزان گلبول سفید باعث افزایش لیزوزیم می‌شود (Subhadra et al., 2006). میزان ایمونوگلوبولین در هر سه غلظت و در هر سه منبع سلنیوم نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری را نشان داد. افزایش میزان ایمونوگلوبولین‌ها با افزایش وزن، نشان دهنده تکامل سلول‌های خونی و اندام‌های خون‌ساز و در نتیجه افزایش کارایی سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان است (نظری و همکاران، ۱۳۹۶). گزارش شده است که افزایش فاکتورهای خونی به علت افزایش سلنیوم می‌تواند دلیلی بر بالا بردن سلامت و ایمنی بدن باشد (Abdel-Tawwab et al., 2007).

هدف از بکارگیری این عنصر به عنوان مکمل در جیره غذایی ماهیان، افزایش رشد و سطح ایمنی و در نهایت صرفه اقتصادی است (محسنی و ستوده، ۱۳۹۳). نتایج این تحقیق نشان داد افزودن مکمل سلنومیتونین و نانوسلنیوم به جیره بچه ماهیان تمام ماده تریلوئید قزل-آلای رنگین کمان موجب بهبود شاخص های رشد و ایمنی و افزایش برخی فاکتورهای خونی از جمله: تعداد گلبول قرمز و سفید و هماتوکریت می گردد و احتمالاً می تواند به عنوان یک محرک رشد و ایمنی عمل کند. همچنین مقایسه این نتایج با مطالعات انجام شده در گذشته نشان می دهد که فرم نانوسلنیوم تاثیر بسیار مطلوبی روی عوامل رشد داشت به طوری که در غلظت ۰/۵ میلی گرم در کیلو گرم بهترین ضریب تبدیل غذایی به ثبت رسید. با استناد به نتایج این بررسی می توان بیان کرد که استفاده از نانوسلنیوم در جیره می تواند در بهبود روند پرورش بچه ماهیان تمام ماده تریلوئید قزل-آلای رنگین کمان موثر باشد.

سپاسگزاری

از کلیه همکارانی که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشته اند، تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. احمدوند، ش.، امیرکلایی، ع.، اورجی، ح.، احمدوند، ش.، ۱۳۹۴. بررسی اثرات نانوذرات سلنیوم در مقایسه با سلنیوم آلی بر عملکرد شاخص های رشد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله محیط زیست جانوری، ۷ (۲)، ۱۹۶-۱۸۹.

۲. امیرپور، ز.، حاجی بگلو، ع.، سوداگر، م.، پاکنژاد، ح. ۱۳۹۸. اثرات حمام کوتاه مدت هورمون رشد (سوماتوتروپین) بر برخی شاخص های رشد و ایمنی در مراحل اولیه رشد قزل-آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه توسعه آبی-پروری، سال ۱۳، شماره ۳.
۳. حاجی بگلو، ع.، صفری، ر.، ۱۳۹۶. بررسی نیاز پروتئینی بچه ماهیان تمام ماده تریلوئید قزل-آلای رنگین کمان شرکت آکوآلند فرانسه (*Oncorhynchus mykiss*). مجله محیط زیست جانوری، ۹ (۴)، ۱۹۸-۱۹۳.
۴. خارا، ح.، محمدزاده، و.ا.، قیاسی، م.، رهبر، م.، ۱۳۹۲. بررسی برخی از فاکتورهای بیوشیمیایی و سرمی خون ماهیان قزل-آلای رنگین کمان فاقد و واجد عفونت باکتریایی (در مزارع پرورشی استان مازندران). نشریه توسعه آبی-پروری، ۷ (۲)، ۲۳-۱۷.
۵. سیدی، ج.، کلباسی، م.، ر.، ۱۳۹۶. تاثیر سطوح مختلف نانوسلنیوم جیره بر شاخص های رشد، کیفیت گناد و فعالیت آنتی اکسیدانی پلاسمای سمینال ماهی کاراس طلایی نر (*Carassius auratus gibelio*). مجله فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبیان، ۵ (۲)، ۸۰-۶۷.
۶. شبرنگ هره دشت، م.، میرواقفی، ع.، ۱۳۹۱. کاربرد فناوری های نانو در شیلات. ماهنامه فناوری نانو، ۱۱ (۶)، ۱۵-۱۳.
۷. نظری، ک.، شمسایی مهرجان، م.، ایلا، ن.، شریف پور، ع.، کمالی، ا.، ۱۳۹۶. اثرات سلنیوم آلی و معدنی بر عوامل رشد، پارامترهای خونی و ایمنی شناسی بچه ماهیان قزل-آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۶ (۳)، ۱۳۸-۱۲۹.

- carp. Ecotoxicology and Environmental Safety, 74(2), 166-173.
15. Federal Register., 2002. Food additive permitted in feed and drinking water: Selenium yeast. Federal Register, 67(137), 46850-46851.
 16. Gaber, M.M., 2009. Efficiency of selenium ion inclusion into common carp (*Cyprinus carpio* L.) diets. African Journal of Agricultural Research, 4(4), 348-353.
 17. Gatlin, D.M., Wilson, R.P., 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. The Journal of nutrition, 114(3), 627-633.
 18. Grinde, B., 1989. Lysozyme from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. Journal of Fish Diseases, 12(2), 95-104.
 19. Grosell, M., 2010. The role of the gastrointestinal tract in salt and water balance. Fish Physiology, 30, 135-164.
 20. Hevrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G. I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. Aquaculture Nutrition, 11(4), 301-313.
 21. Hilton, J.W., Hodson P.V., Slinger, S.J., 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The Journal of nutrition, 110(12), 2527-2535.
 22. Jobling, M., 2012. National Research Council (NRC): Nutrient requirements of fish and shrimp.
 23. Klontz, G.W., 1994. Fish hematology. Techniques in fish immunology, Stolen J.S, Fletcher T.C, Rowley A.F, Kelikoff T.C, Kaatari S.L, Smith S.A. (eds). Vol. 3rd. SOS Publications, Fair Haven, New Jersey, USA, pp.121-132.
 24. Kouba, A., Velíšek, J., Stará, A., Masojídek, J., Kozák, P., 2014. Supplementation with sodium selenite and selenium-enriched microalgae biomass
 ۸. میراب بروجردی، م.، اخلاقی، م.، ۱۳۹۱. بررسی اثر بیهوش کنندگی گل میخک بر ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*) و تعیین LC₅₀ آن. همایش ملی فرآورده های طبیعی و گیاهان دارویی. دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی. بجنورد. صفحه ۳۹۰.
 ۹. محسنی، م.، ستوده، ا.م.، ۱۳۹۳. اثر سطوح مختلف سلنیوم جیره غذایی بر روند رشد و استرس اکسیداتیو بچه فیل ماهی (*Huso huso*) پرورشی تغذیه شده با سطوح بالای مس. مجله علمی شیلات ایران، ۲۱ (۴)، ۱۱۴-۱۰۵.
 10. Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A.A., Ahmad, M.H., Sakr, S.F., 2007. The use of calcium pre-exposure as a protective agent against environmental copper toxicity for juvenile Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Aquaculture, 264 (1-4), 236-246.
 11. Atamanalp, M., Angis, S., Oguzhan, P., Aksakal E., 2008. Alterations in hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to DDVP. Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgheh. pp. 9-12.
 12. Ashouri, S., Keyvanshokoo, 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.
 13. Carlton, E.T., Williamson, D.A., Stroud, P.A., Talley, D.J., 2004. Evaluation and comparison of commercially available Aloe vera L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. International Immunopharmacology, 4, 1727-1737.
 14. Elia, A.C., Prearo, M., Pacini, N., Dörr, A.J.M., Abete, M.C., 2011. Effects of selenium diets on growth, accumulation and antioxidant response in juvenile

- inducing oxidative stress. *Toxicology In Vitro*, 23, 1249-1258.
34. Prabhu, P.A.J., Schrama, J.W., Kaushik, S.J. 2014. Mineral requirements of fish, a systematic review. *Aquaculture*, 6, 1-48.
 35. Saffari, S., Keyvanshokoo, S., Zakeri, M., Johari, S. A., Pasha-Zanoosi, H., 2017. Effects of different dietary selenium sources (sodium selenite, selenomethionine and nanoselenium) on growth performance, muscle composition, blood enzymes and antioxidant status of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture nutrition*, 23(3), 611-617.
 36. Siwicki, A.K., Anderson, D.P., 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn, Poland*, 105-12.
 37. Smith, A.M., Picciano, M.F., 1987. Relative bioavailability of selenocompounds in the lactating rat. *Journal of Nutrition*, 117, 725-731.
 38. Sopjani, M., Foeller, M., Gulbins, E., Lang, F., 2008. Suicidal death of erythrocytes due to selenium-compounds. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 22(5-6), 387-394.
 39. Subhadra B., Lochmann R., Rawles S., Chen R., 2006. Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus almoides*). *Aquaculture*, 255(1-4), 210-222.
 40. Shi, L.G., Yang R.J., Yue, W.B., Xun, W.J., Zhang C. X., Ren Y. S., Lei F. L., 2010. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Animal reproduction science*, 118(2-4), 248-254.
 41. Wang, C., Lovell, R.T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, show varying effects on blood enzymes activities, antioxidant response, and accumulation in common barbel (*Barbus barbus*). *BioMed research international*, 2014. 1-8.
 25. Küçükbay, F.Z., Yazlak, H., Karaca, I., Sahin, N., Tuzcu, M., Cakmak, M.N., Sahin, K., 2009. The effects of dietary organic or inorganic selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under crowding conditions. *Aquaculture Nutrition*, 15(6), 569-576.
 26. Lemly, A.D., 2002. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish: the Belews Lake case example. *Aquatic Toxicology*, 57(1-2), 39-49.
 27. Lall, S.P, Milley, J.E., 2008. Impact of aquaculture on aquatic environment: trace minerals discharge. In: Schelegel P, Durosoy S, Jongbloed A.W (eds) *Trace elements in animal production systems*. Academic Press. Wageningen, Netherlands, Pp. 203-214.
 28. Levander, O.A., 1983. Considerations in the design of selenium bioavailability studies. In *Federation proceedings*, 42(6), pp. 1721-1725.
 29. Le, K.T, Fotedar, R., 2014. Bioavailability of selenium from different dietary sources in yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 420, 57-62.
 30. Lin, Y.H., Shiau, S.Y., 2005. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 250, 356-363.
 31. Lin, Y.H., 2014. Effects of dietary organic and inorganic selenium on the growth, selenium concentration and meat quality of juvenile grouper *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 430, 114-119.
 32. Lorentzen, M., Maage A., Julshamn K., 1994. Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 121, 359-367.
 33. Misra, S., Niyogi S., 2009. Selenite causes cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes by

- epithelial cells of crucian carp, *Carassius auratus gibelio*. International journal of nanomedicine, 8, 4007.
44. Zhou, X., Wang, Y., Gu, Q., 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(1-2), 78-81.
 42. 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(3-4), 243-251.
 43. Wang, Y., Yan, X., Fu, L., 2013. Effect of selenium nanoparticles with different sizes in primary cultured intestinal sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture, 152(1-4), 223-234.