شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۰
صفحات ۱۷۸-۱۶۵

اثرات غنی‌سازی جلبک‌های نانوکلروپسیس و ایزوکرایسیس به صورت همزمان با سلنیوم و روی بر فاکتورهای رشد و میزان مواد معدنی روتیفر آب شور *Brachionus plicatilis*

سروه قادرپور[۱]، نصراله احمدی فرد[۲]*، ناصر آق[۳]، ذکریا وهاب زاده[۴]، آلیسیا استوز[۵]

۱. دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استاد پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۴. استادیار گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۵. محقق ارشد گروه آبزی پروری، مرکز تحقیقات و فناوری غذای آبزیان (IRTA)، تاراگونا، اسپانیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۰۲

چکیده

علیرغم نقش مثبت روتیفر در بسیاری از تفریخ گاه‌ها برای تغذیه مراحل اولیه لارو ماهیان و سخت پوستان، محتوای کمتر مواد معدنی مانند سلنیوم (Se، ۳۰ برابر) و روی (Zn، ۵ برابر) به عنوان یکی از معایب این غذای زنده در مقایسه با پاروپایان ا ست. بنابراین افزایش مقادیر این مواد مغذی از طریق غنی سازی ضروری ا ست. بدین منظور، پژوهش حا ضر اثرات ترکیب ۲ جلبک *Isochrysis galbana* و *Nannochloropsis oculata* غنی شده با نمک‌های سدیم سلنیات و سولفات روی را بر رشد و میزان مواد معدنی روتیفر مورد مطالعه قرار داد. ابتدا ترکیب ۱:۱ جلبک‌ها با مخلوطی از نمک‌های روی و سلنیوم (غلظت‌های۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر از هرکدام در محیط غنی سازی جلبک) غنی شدند. بعد از تغذیه روتیفرها با جلبک‌های غنی شده بیشترین مقدار Zn و Se در تیمار ۸۰ میلی گرم بر میلی لیتر از هر دو ماده مشاهده شد. بیشترین تعداد روتیفر (۱۱/۰۶ ± ۳۳۹ ind mL^{-1})، SGR (۰/۰۰۸ ± ۰/۴۸ day^{-1}) و کمترین زمان دو برابر شدن بدون تفاوت معنی‌داری در روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با ۴۰ mg L^{-1} از هر دو ماده معدنی مشاهده شد ($p>۰/۰۵$). به طور کلی، تغذیه روتیفر با جلبک‌های غنی شده با Se و Zn منجر به افزایش Se و Zn شد. بنابراین، جلبک‌های غنی شده با Se و Zn می‌توانند برای تغذیه روتیفرهای آب شور جهت برآورده کردن نیازهای غذایی آن‌ها استفاده شوند.

واژگان کلیدی: غنی‌سازی، جلبک، رشد، مواد معدنی، روتیفر

* نویسنده مسئول: نصراله احمدی فرد
Email: n.ahmadifard@urmia.ac.ir

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 2, Summer 2021
pp. 165-178

Effects of enriched *Nannochloropsis* and *Isochrysis* algae simultaneously with selenium and zinc on growth factors and mineral contents of saltwater rotifer *Brachionus plicatilis*

Sirwe Ghaderpour[1], Nasrollah Ahmadifard[2*], Naser Agh[3], Zakaria Vahabzadeh[4], Alicia Estevez[5]

[1] PhD Student, Department of fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
[2] Associate Professor, Department of fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran.
[3] Professor, Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran
[4] Assistant professor, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
[5] Senior Researcher, Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Tarragona, Spain

Received: 05-Mar-2020 **Accepted: 22-Apr-2021**

Abstract

Despite the positive role of rotifers in many hatcheries for feeding the early stages of fish larvae and crustaceans, the lower content of minerals such as selenium (Se, 30 times) and zinc (Zn, 5 times) is considered as one of the disadvantages of this live prey compared to copepods. Therefore, increasing the amount of these nutrients through enrichment is essential. To this end, the present study investigated the effects of the combination of 2 algae *Isochrysis aff. galbana* and *Nannochloropsis oculata* enriched with sodium selenite and zinc sulfate on growth and mineral content of rotifer. First, the 1:1 composition of the algae was enriched with a mixture of zinc and selenium salts (each with concentrations of 20, 40 and 80 mg L^{-1} in algal enrichment medium). The highest number of rotifers (339 ± 11.06 ind mL^{-1}), SGR (± 0.48 ± 0.008 day^{-1}), and the lowest doubling time without any significant difference observed in rotifers fed with algae enriched with 40 mg L^{-1} of both minerals ($p>0.05$). However, the highest amount of Zn and Se were observed in those fed with 80 mg L^{-1} of both minerals. In conclusion, feeding rotifers with Se and Zn enriched algae increased Se and Zn in the rotifers. Thus, microalgae enriched with Se and Zn can be used to feed marine rotifer to meet the nutritional requirements.

Keywords: Enrichment, algae, growth, mineral, rotifer.

Corresponding author: Nasrollah Ahmadifard Email: n.ahmadifard@urmia.ac.ir

۱. مقدمه

در کنار صید و صیادی، آبزی پروری جهانی به دلیل افزایش جمعیت جهان و تقاضای روز افزودن در حال گسترش می‌باشد. تولید تعداد کافی لارو ماهی با کیفیت به عنوان یکی از چالش‌های پرورش آبزیان قلمداد می‌شود. عوامل مختلفی بر بهبود لارو پرورشی تأثیرگذار است که تولید غذای زنده مناسب (به عنوان مثال، روتیفر، آرتمیا و پاروپایان) یکی از مشکلات اصلی در این زمینه است (Hagiwara and Marcial, 2019). در شبکه غذایی طبیعی، زئوپلانکتون بخش عمده جیره غذایی لارو ماهیان دریایی را تشکیل می‌دهد که معمولاً بر این باورند که پاروپایان نیاز غذایی لارو ماهیان را برآورده می‌کنند (Evjemo *et al.*, 2003). اما پرورش این زئوپلانکتون ها بدلایل حساسیت بالای پرورش (حساس بودن به آلودگی)، خطر ابتلا به عفونت‌های انگلی در صورت صید آن‌ها از طبیعت، تولید کم تخم در یک دوره پرورشی و طولانی بودن دوره تکثیر آن‌ها چندان موفقیت آمیز نبوده است (Ajiboye *et al.*, 2011). بنابراین در بسیاری از تفریخ گاه‌ها، روتیفر برای تغذیه مراحل اولیه لارو ماهی و سخت پوستان استفاده می‌شود (Sayegh *et al.*, 2007; Nordgreen *et al.*, 2013; Hamre, 2016; Loo *et al.*, 2016) که به دلیل اندازه کوچک، حرکات کند، تولید مثل سریع و کشت آسان آن است. بعلاوه، روتیفرها تا زمانی که شرایط کشت مناسب باشد، رشد نمایی دارند (Mejias *et al.*, 2018).

با وجود اینکه روتیفر ویژگی های مطلوبی دارد اما استفاده از آن جهت تغذیه لارو ماهیان دریایی چندان موفقیت آمیز نبوده است که به دلیل کمبود برخی مواد مغذی روتیفر در مقایسه با پاروپایان می باشد (Srivastava *et al.*, 2011). بنابراین افزایش مقادیر این مواد مغذی با استفاده از روش‌های غنی سازی مستقیم یا غیرمستقیم ضروری است. مواد معدنی گروهی از ریزمغذی ها هستند که در روتیفر وجود ندارد و برای آبزیان ضروری است. به عنوان مثال مقدار سلنیوم و روی در روتیفر (به ترتیب ۰/۰۸ و ۴۹ میلی گرم در کیلوگرم وزن خشک) است که سلنیوم تا ۳۰ برابر و روی تا ۵ برابر کمتر از مقادیر موجود در پاروپایان (به ترتیب ۵-۳ و ۵۷۰-۳۴۰ میلی گرم در کیلوگرم در وزن خشک) است (Hamre *et al.*, 2008; Penglase *et al.*, 2011; Nordgreen *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Nematzadeh *et al.*, 2018). علاوه بر این میزان سلنیوم و روی در روتیفر کمتر از نیاز ماهی است (NRC, 2011).

سلنیوم یکی از عناصر ضروری در تغذیه آبزیان است که جزئی از آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز است، این آنزیم سلول‌های موجود را در برابر آسیب حاصل از اکسیداتیو حفاظت می‌کند. بدین صورت که این آنزیم، پراکسید هیدروژن و هیدروپراکسیداز لیپید را از بین می‌برد (Molina-Poveda, 2016). همچنین سلنیوم در عملکرد سیستم ایمنی و افزایش متابولیسم هورمون تیروئید دخیل است (Rayman, 2000). کمبود سلنیوم در جیره سبب کاهش رشد، بقا و تولیدمثل جانوران می‌شود (Loscalzo, 2014). نانو ذرات سلنیوم در مقایسه با سلنومتیونین، میزان سلنیوم ماهیچه ماهی را بیشتر افزایش می‌دهند اما سلنیوم به شکل سلنومتیونین، دسترسی زیستی و قابلیت هضم بیشتر و خواص آنتی اکسیدانی بیشتری دارد و در عوض سمیت کمتری برای موجود و محیط زیست دارد، بنابراین با استفاده از شکل آلی این ماده معدنی، می‌توان مقدار کمتری نسبت به شکل معدنی آن به کار برد (Suhajda *et al.*, 2000; Kim and Mahan, 2001; Molina-Poveda, 2016; Silva *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). ریزجلبک‌ها می‌توانند سلنات و سلنیت را از آب گرفته و آن‌ها را به سلنوسیستئین (اتصال سلنیوم به اسیدآمینه سیستئین) و SeMet (اتصال سلنیوم به اسید آمینه متیونین) تبدیل کنند (Gojkovic *et al.*, 2015). بنابراین، SeMet مشتق شده از جلبک‌ها می‌تواند در پرورش آبزیان برای تأمین نیازهای سلنیوم استفاده شود (Thiry *et al.*, 2012; Gojkovic *et al.*, 2014). طبق مطالعات قبلی، ماهی‌ها و سخت پوستان نمی‌توانند SeMet تولید کنند و بنابراین به موجودات سطح پایین‌تر مانند جلبک‌ها و قارچ‌ها وابسته هستند (Williams *et al.*, 1994; Schrauzer, 2003;

(Pacitti *et al.*, 2015). Kim و همکاران (۲۰۱۴) گزارش دادند که تغذیه روتیفر با *Chlorella vulgaris* غنی شده با سلنیوم باعث بهبود تولیدمثل روتیفر می‌شود.

عنصر روی، یک ریزمغذی ضروری برای ماهیان و دیگر جانوران است که فراوانترین ماده معدنی کمیاب در ماهیان است. این عنصر در عملکردهای فیزیولوژیکی از جمله رشد، نمو، تولیدمثل، تشکیل استخوان، تکثیر سلولی و عملکرد ایمنی نیز نقش دارد (Ibs and Rink, 2003; Yamaguchi and Fukagawa, 2005; Matsumoto *et al.*, 2009; Prasad, 2009). همچنین، روی به عنوان کوفاکتور در بیش از ۳۰۰ آنزیم از جمله کربونیک انیدراز، سوپراکسید دیسموتاز، آلکالین فسفاتاز، DNA پلیمراز و RNA پلیمراز وجود دارد که سبب حفظ پایداری غشای پلاسما می شود (Vallee and Falchuk, 1993; Molina-Poveda, 2016). مواد معدنی در طبیعت به شکل معدنی و آلی وجود دارند. مواد معدنی به شکل آلی در مقایسه با شکل معدنی، قابلیت دسترسی زیستی بیشتر و سمیت کمتری دارند، همچنین دو ستدار محیط زیست هستند (Yang *et al.*, 2012; Gharekhani *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017). مفید یا مضر بودن عنصر روی بستگی به شکل مورد استفاده و مقدار آن دارد، که بسته به آن‌ها می‌تواند به عنوان ماده مغذی، آنتی اکسیدان یا سم عمل کند (Lin *et al.*, 2013). شکل آلی روی عملکرد رشد را بهبود می‌بخشد (Wang and Lovell, 1997; Nordgreen *et al.*, 2013) و می‌توان از جلبک‌ها جهت جذب روی معدنی و تبدیل آن به شکل آلی استفاده کرد.

همچنین اینکه غنی‌سازی مستقیم روتیفر با چندین ماده مغذی و طی مراحل مختلف، آن را در معرض غلظت زیاد ماده مغذی قرار داده که سطح اکسیژن محیط را کاهش می‌دهد و سبب کاهش کیفیت فیزیکی روتیفر و احتمالا آلوده شدن آن به عوامل بیماریزا شود (Dhert *et al.*, 2014). بنابراین در این مطالعه غنی سازی روتیفر به صورت تغذیه مستقیم با مواد معدنی انجام نشد و از ریزجلبک‌های غنی شده با آن‌ها استفاده شد.

در این مطالعه، *Isochrysis* aff. *galbana* (T-ISO) و *Nannochloropsis oculata* به دلیل سطح بالای دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) و ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) به ترتیب، همچنین اندازه مطلوب برای تغذیه روتیفر (۱۰-۴ µm)، جهت غنی‌سازی با سلنیوم (Se) و روی (Zn) انتخاب شدند (Sun *et al.*, 2020). بنابراین، این ریزجلبک ها می‌توانند همزمان مقادیر زیادی مواد معدنی آلی و اسیدهای چرب ω3 را تأمین کنند. بعلاوه، ریزجلبک‌ها می‌توانند ماده معدنی را با سرعت بیشتری نسبت به روتیفر جذب کنند (Matsumoto *et al.*, 2009). همچنین، غنی‌سازی روتیفرها با مواد معدنی در صورت اتصال به یک ذره قابل هضم در مقایسه با اشکال محلول، کارآمدتر است (Nordgreen *et al.*, 2013).

بر این اساس، افزایش کیفیت غذایی ریزجلبک‌ها از تولید مقادیر زیاد زیست توده مهم‌تر است زیرا آن‌ها ترکیب بیوشیمیایی روتیفرها را تعیین می‌کنند (Ferreira *et al.*, 2018). تاکنون، هیچ مطالعه‌ای در مورد تغذیه روتیفر با T-ISO و *N. oculata* تقویت شده با Se و Zn در پرورش آبزیان انجام نشده است. اهداف اصلی غنی‌سازی طولانی مدت روتیفر با این جلبک‌های غنی از مواد معدنی افزایش کمی میزان مواد معدنی روتیفرها در کنار عدم کاهش بقا و رشد آن‌ها بود. بنابراین، این مطالعه اثرات غنی‌سازی روتیفر با روی و Se بر رشد جمعیت، نسبت تخم و ترکیب مواد معدنی را ارزیابی می‌کند.

۲. روش کار

۲.۱. منشا مواد

در این مطالعه، دو ریزجلبک یعنی *I. galbana* و *N. oculata* و روتیفر *Brachionus plicatilis* (طول لوریکا بالغین = ۱۸۵ میکرومتر) از موسسه تحقیقات میگو بوشهر، ایران تهیه شد. آب دریا با شوری ۲۰ گرم در لیتر برای کشت ریزجلبک‌ها و روتیفرها اتوکلاو شد (۱۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه). از سولفات روی ($ZnSO_4.7H_2O$) و سدیم سلنایت ($Na_2SeO_3.5H_2O$) تهیه شده توسط شرکت سیگما-آلدریچ برای غنی سازی ریزجلبک‌ها استفاده شد.

۲.۲. کشت و غنی‌سازی ریزجلبک‌ها

ریزجلبک ها در ظروف ۱۰ لیتری در دمای ۱± ۲۶ درجه سانتیگراد و ۲۴ ساعت روشنایی با استفاده از محیط کشت f/2 Guillard کشت شدند (Guillard, 1975). سپس، ریزجلبک‌ها در مرحله رشد نمایی برداشت و با استفاده از سانتریفیوژ با حجم بالا (مدل سیگما) در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه تغلیظ شدند.

ریزجلبک‌های تغلیظ شده در تراکم $\times$ ۱۰^{۹} cell mL^{-1} ۱۸ با آب شور ppt ۲۰ به حالت تعلیق درآمده و سپس بر اساس پروتکل پیشنهادی Matsumoto و همکاران (۲۰۰۹) با اندکی اصلاح غنی شدند. این آزمایش برای بررسی تأثیرات غنی‌سازی جلبک‌ها با ترکیب Se و Zn بر رشد و بقا و میزان مواد معدنی مذکور در روتیفر طراحی شده است. بدین منظور سه سطح مختلف (۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر) از روی و سلنیوم به طور جداگانه تهیه شد و به دنبال آن ۱ میلی لیتر از هر محلول موجود در ۱۰۰ میلی لیتر جلبک با تراکم مذکور ریخته شد. غنی‌سازی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت در سه تکرار انجام شد. کل مواد با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ماده معدنی محلول باقیمانده در محیط حذف شود. سپس، ریزجلبک‌های رسوبی و غنی شده دو بار با ppt ۲۰ گرم در لیترآب شور استریل شسته و به مدت ۵ دقیقه در دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس، اثر جلبک‌های غنی شده بر روی روتیفر بررسی شد. محصول تولید شده برای تغذیه روتیفر در آب نمک استریل دوباره تعلیق شد.

۲.۳. کشت روتیفر

کشت روتیفر در زوگ‌های شیشه‌ای ۷ لیتری با دمای ۰/۵± ۲۸ درجه سانتیگراد، pH تقریبا برابر با ۸/۳، اکسیژن محلول بیش از ppm ۵، شوری ppt ۲۰، روشنایی ۱۰۰۰ لوکس به مدت ۲۴ ساعت و تراکم ۴۰ ind mL^{-1} انجام شد. هوادهی روتیفرها طوری بود که در قسمت پایین جمع نشده و حرکت آهسته آب در قسمت بالایی ظروف وجود داشت. روتیفرها در یک سیستم دسته‌ای و بدون تعویض آب در طی ۴ روز کشت داده شدند. روتیفرها در سه تکرار با استفاده از مخلوط ریزجلبک‌های غنی شده *N. oculata* و *I. galbana* (نسبت ۱:۱ با تراکم ۳ $\times$ ۱۰^{۶} cell mL^{-1}) دو بار در روز تغذیه شدند.

۲.۴. سنجش میزان مواد معدنی

روتیفرها در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت درون آون خشک شدند. پس از آن، نمونه‌های خشک شده در ظروف ۱۰ میلی لیتری پیرکس جهت هضم قرار گرفتند. سپس ۹ میلی لیتر از HNO_3 با خلوص ٪۶۵ در سه نوبت با فاصله ۱۰ دقیقه) به همراه ۱۲۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (H_2O_2) اضافه شد تا زیست توده کاملاً هضم شود. هضم در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتیگراد و طی ۳۰ دقیقه انجام شد. در نمونه‌های هضم شده، غلظت Zn، Se، مس، منگنز، سدیم و پتاسیم با استفاده از دستگاه جذب اتمی novAA® 400 (PAtomic Analytic Jena, Germany) اندازه‌گیری شد (Lowry and Lopez, 1946).

۲.۵. شاخص‌های رشد روتیفر

از هر زوگ سه نمونه ۳ میلی‌لیتری گرفته شد تا تعداد روتیفرها و تخم‌ها با استفاده از لام بوگاوروف شمارش شود. سپس نرخ رشد ویژه (SGR) (Krebs, 1995; Abbasi *et al.*, 2019) و مدت زمان دو برابر شدن (DT) (Vallejo *et al.*, 1993) با استفاده از فرمول های زیر محاسبه شد.

$$SGR = (Ln\ N_t - Ln\ N_0)/2$$

$$DT = (Ln\ 2)/SGR$$

N_0 و N_t تراکم اولیه و نهایی روتیفرها هستند و t مخفف دوره آزمایش (روزها) است. مقدار SGR در مرحله کشت نمایی محاسبه شد.

در پایان دوره تغذیه، همه روتیفرها از طریق فیلتر با اندازه چشمه برابر با ۵۰ میکرومتر فیلتر شدند، و پس از شستشو به درون میکروتیوب‌ها منتقل و تا زمان تجزیه و تحلیل در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

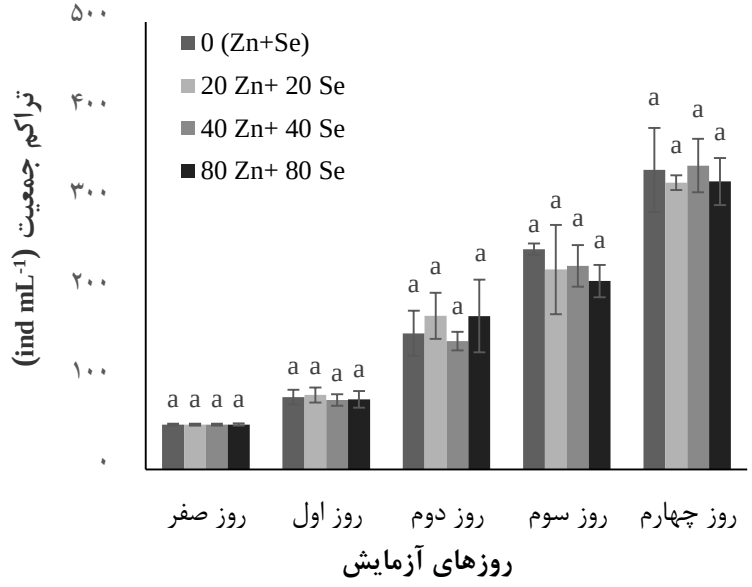
۲.۶. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا شد. برای انجام تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS با نسخه ۲۱ و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۶ استفاده شد. داده‌های به دست آمده به صورت میانگین ± انحراف معیار با ۳ تکرار گزارش گردیدند. قبل از انجام تجزیه واریانس، نرمال بودن داده‌های خام با استفاده از آزمون Shpiro-wilk و همگنی واریانس‌ها توسط آزمون Leven's بررسی شدند. برای تجزیه داده های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگین بین تیمارهای مختلف از آزمون Tukey HSD استفاده شد. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها $p\leq ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

۳. نتایج

نتایج شاخص‌های رشد روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با هر دو ماده معدنی سولفات روی و سدیم سلنایت، هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد در کل روزهای آزمایش نشان نداد ($p >۰/۰۵$) (نمودار شکل ۱). بیشترین تعداد روتیفر (N_{max}) (۳۳۹ ± ۱۱/۰۶ ind mL^{-1}) و SGR (۰/۰۰۸ ± ۰/۴۸ day^{-1}) و کمترین DT در روتیفر های تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با ۴۰ mg L^{-1} از هر دو ماده معدنی مشاهده شد. با این حال، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از لحاظ شاخص‌های مذکور وجود نداشت (جدول ۱).

نتایج تعداد تخم روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های تقویت شده با ترکیب سولفات روی و سدیم سلنایت در نمودار شکل ۲ نشان داده شده است. تعداد تخم روتیفرها در همه روزها به جز روز سوم اختلاف معنی‌داری نشان نداد. بیشترین تعداد تخم در روز سوم در تیمار ۴۰ mg L^{-1} از دو ماده معدنی مذکور مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و تیمار ۸۰ mg L^{-1} نداشت ($p >۰/۰۵$). همچنین کمترین تعداد تخم روتیفر در روز سوم مربوط به تیمار ۲۰ mg L^{-1} از ترکیب مواد معدنی مورد استفاده بود که اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد و تیمار ۸۰ mg L^{-1} نداشت ($p >۰/۰۵$).

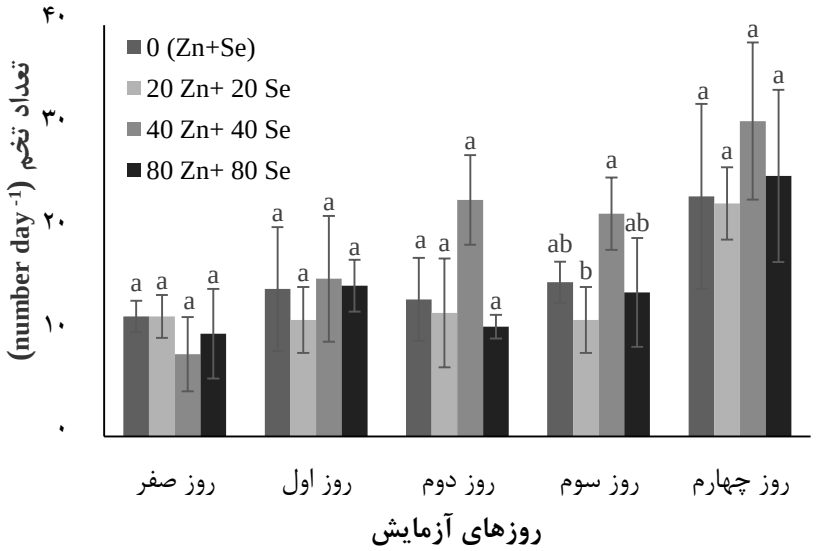


شکل ۱- نمودار تراکم جمعیت روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های تقویت شده با مقادیر مختلف سولفات روی و سدیم سلنایت، به مدت ۴ روز (میانگین ± انحراف معیار، ۳ تکرار). حروف لاتین یکسان نشان عدم تفاوت معنی دار در بین تیمارها می باشد.

جدول ۱- میانگین نرخ رشد ویژه (SGR)، N_{max}، و DT در روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده کوتاه مدت به مدت ۴ روز (میانگین ± انحراف معیار، ۳ تکرار).

تیمارها (mg/L)	N_{max} (ind mL^{-1})	SGR (day^{-1})	(day) DT
شاهد (صفر)	۳۳۵ ± ۴۶/۹۸[a]	۰/۴۷ ± ۰/۰۳۴[a]	۱/۴۷ ± ۰/۱۰۱[a]
۲۰	۳۲۰ ± ۱۸/۸۲[a]	۰/۴۶ ± ۰/۰۱۴[a]	۱/۴۹ ± ۰/۰۴۶[a]
۴۰	۳۳۹ ± ۱۱/۰۶[a]	۰/۴۸ ± ۰/۰۰۸[a]	۱/۴۵ ± ۰/۰۲۵[a]
۸۰	۳۲۲ ± ۶۰/۸۶[a]	۰/۴۶ ± ۰/۰۴۷[a]	۱/۵۱ ± ۰/۱۵۳[a]

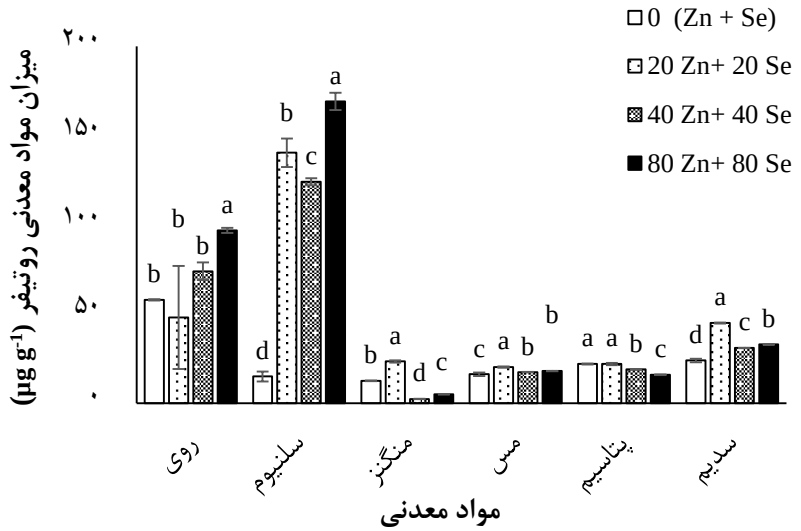
تذکر: اعداد ذکر شده در تیمارها برابر مقدار مورد استفاده مواد معدنی بر حسب میلی گرم در لیتر جلبک است.
حروف لاتین یکسان نشان عدم تفاوت معنی دار در بین تیمارها می باشد.



شکل ۲- نمودار تعداد تخم روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های تقویت شده با مقادیر مختلف سولفات روی و سدیم سلنایت، به مدت ۴ روز (میانگین ± انحراف معیار، ۳ تکرار). حروف لاتین متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در بین تیمارها است.

نتایج تاثیر تغذیه روتیفر با ترکیب جلبک های غنی شده با سولفات روی و سدیم سلنایت بر ترکیب مقادیر روی، سلنیوم، مس، منگنز، سدیم و پتاسیم روتیفر در نمودار شکل ۳ ارائه شده است. در روتیفرهای تغذیه شده با تیمارهای جلبک‌های غنی شده با ترکیب سدیم سلنایت و سولفات روی، میزان روی در روتیفرها همزمان با افزایش سولفات روی در محیط جلبک‌ها افزایش یافت و بیشترین مقدار روی (۹۶/۸۹ ± ۱/۳۶ µg g^{-1} DW) در روتیفر تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با ۸۰ mg L^{-1} از هر دو ماده معدنی مشاهده شد ($p < ۰/۰۵$). در این آزمایش، میزان سلنیوم به طور قابل توجهی افزایش یافت. به عبارت دیگر میزان سلنیوم در روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با ۴۰ mg L^{-1} از هر دو ماده معدنی در مقایسه با جلبک‌های غنی شده با ۲۰ mg L^{-1} از آن‌ها، کاهش یافت ($p < ۰/۰۵$). قابل توجه است که بیشترین میزان سلنیوم (۱۶۹/۱۰ ± ۴/۸۳ µg g^{-1} DW) در روتیفرهای

تغذیه شده با مخلوط جلبکی غنی شده با $80\ mg\ L^{-1}$ از هر دو ماده معدنی مشاهده شد ($p <$ ۰/۰۵). علاوه بر این، بیشترین میزان منگنز، مس، پتاسیم و سدیم در تیمار روتیفر تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با $20\ mg\ L^{-1}$ از مواد معدنی مذکور حاصل شد در حالی که گروه شاهد، کمترین مقدار مس را نشان داد ($p <$ ۰/۰۵).



شکل ۳- نمودار تغییرات میزان مواد معدنی روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های تقویت شده با مقادیر مختلف ترکیب سولفات روی و سدیم سلنایت به مدت ۴ روز (میانگین ± انحراف معیار، ۳ تکرار).

۴. بحث

در تیمارهای روتیفر تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با ترکیب سولفات روی و سدیم سلنایت، هیچ اختلاف معنی‌داری بین پارامترهای رشد همه تیمارها مشاهده نشد. همچنین این تیماربندی تاثیری بر کاهش تعداد تخم این روتیفرها نداشت و حتی در بعضی موارد باعث افزایش تعداد تخم روتیفر شد. در این آزمایش، میزان سلنیوم در روتیفرهای غنی شده در حدود ۱۱ برابر بیشتر از تیمار شاهد بدست آمد. در این آزمایش، میزان سلنیوم روتیفرها بیشتر از مقادیر گزارش شده در روتیفرهای تغذیه شده با مخمر، Culture Selco 3000 و AlgaMac 2000 بدست آمد (Hamre *et al.*, 2008; Hamre *et al.*, 2016). با این حال، میزان روی در روتیفرهای تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با ترکیب سولفات روی و سدیم سلنایت ($\mu g\ g^{-1}$ ۹۶-۴۸) کمتر از میزان آن در پاروپایان ($\mu g\ g^{-1}$ ۵۷۰-۳۴۰) حاصل شد؛ در حالی که همین میزان بیشتر از مقدار مورد نیاز ماهیان ($\mu g\ g^{-1}$ ۳۰-۲۰) می باشد (NRC, 2011). الگوی تغییرات روی از سایر مواد معدنی مانند مس و سلنیوم در روتیفرها و جلبک‌ها پیچیده‌تر است که این می‌تواند مربوط به گیرنده‌های جذب روی در سطح سلول جلبک، متابولیسم ریز عناصر و مدت زمان ماندگاری مواد معدنی در داخل بدن روتیفر باشد. اگر چه پی بردن به آن نیاز به بررسی بیشتری در آینده دارد. محققان دریافتند که روتیفر حدود ۳۵٪ روی ذخیره شده خود را در اولین ساعت پس از تغذیه از دست می دهند، اما سلنیوم به تدریج کاهش می‌یابد (Wang *et al.*, 2019). بر طبق این روش غنی‌سازی، روتیفرها نمی‌توانند با مقادیر بیشتر روی غنی شوند زیرا مقادیر بیشتر این ماده معدنی می‌تواند تاثیر استرس‌زایی بر روتیفر و جلبک‌ها داشته باشد. همچنین توصیه می شود که روتیفرهای غنی شده با این روش برای لارو آبزیان استفاده شود تا بررسی شود که آیا این روتیفرها می‌توانند نیاز لارو ماهیان را به این مواد معدنی برآورده کنند زیرا غنی‌سازی روتیفر بدین روش

دسترسی زیستی بالایی دارد.

از آنجایی که مس به طور عمده در اندام‌های جنسی روتیفر یافت می‌شود (Ezoe *et al.*, 2002) بنابراین نقش مهمی در تولیدمثل روتیفر دارد. در این آزمایش، منابع مس و منگنز دستکاری نشده‌اند اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای روتیفر مشاهده شد. میزان مس در همه تیمارهای روتیفر تغذیه شده با این روش در محدوده میزان آن در پاروپایان بود ($\mu g\ g^{-1}$ ۳۸-۱۲). بنابراین، این روش غنی‌سازی می‌تواند نیاز لاروماهیان به مس ($\mu g\ g^{-1}$ ۵-۳) را طبق مقدار گزارش شده در NRC (۲۰۱۱) برآورده کند. بر هم کنش بین سلنیوم، روی و مس منجر به افزایش میزان مس می‌شود بنابراین ممکن است نیازی به غنی‌سازی روتیفر با مس نباشد. چندین مطالعه کمبود مس را در روتیفر ارزیابی کرده‌اند و روتیفرها را با مس غنی‌سازی کردند (Hamre *et al.*, 2008; Penglase *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013). برای مثال Hamre و همکاران (۲۰۰۸) هیچ افزایشی در میزان مس روتیفرهای غنی شده با Culture Selco 3000 حاوی بیشترین میزان مس (۲/۲ ± ۸/۱ میلی گرم بر کیلوگرم وزن خشک) در بین دیگر مواد غنی کننده نیافتند. بر این اساس، می‌توان توصیه کرد که در صورت غنی‌سازی روتیفر با عناصر Zn و Se، نیازی به غنی‌سازی با مس برای تأمین نیاز به لارو نمی‌باشد.

میزان منگنز روتیفرها در همه تیمارها به جز تیمار روتیفر تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با $20\ mg\ L^{-1}$ از هر دو ماده معدنی در مقایسه با گروه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. مطالعات مشابهی روی غنی‌سازی روتیفر با فلز روی انجام شده است که کاهش منگنز روتیفر را نشان دادند (Hamre *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2009). میزان منگنز روتیفرها در همه تیمارها به جز گروه شاهد و تیمار روتیفر تغذیه شده با جلبک‌های غنی شده با $20\ mg\ L^{-1}$ از مواد معدنی مذکور، کمتر از محدوده پاروپایان و مقدار مورد نیاز ماهی بود (NRC, 2011). Nordgreen و همکاران (۲۰۱۳) نتیجه گرفتند روتیفرهایی که از جلبک تغذیه می‌کنند مقدار کافی منگنز در محدوده پاروپایان ($\mu g\ g^{-1}$ ۲۵-۸) را دارند اما در پژوهش حاضر با وجود استفاده از دو گونه جلبک با ارزش غذایی بالا برای تغذیه روتیفر، غنی‌سازی با مواد دیگر به ویژه روی و سلنیوم منجر به دفع یا مصرف منگنز در روتیفر شد. میزان منگنز روتیفر با غنی‌سازی، زیاد قابل تغییر نیست به طور مثال در مطالعه Penglase و همکاران (۲۰۱۳) افزایش میزان منگنز روتیفر بیشتر از سه برابر مقدور نبود. با توجه به اینکه محتوای منگنز با وجود غنی‌سازی با Se و Zn افزایش نیافت، ترجیح داده شد که روتیفر با Mn غنی سازی نشود به مانند مطالعه‌ای که قبلا برای غنی‌سازی مس مشاهده شده بود (Nordgreen *et al.*, 2013).

اثرات مخلوط مواد معدنی بر رشد و تولید مثل روتیفر کمتر شناخته شده است، اگرچه Xu و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند پارامترهای تولیدمثل *B. calyciflorus* از جمله افزایش جمعیت و نرخ تولیدمثل تقریباً تحت تأثیر مخلوطی از چند فلز (مس، روی، کادمیم، کروم و منگنز) قرار می‌گیرد. با این حال، در پژوهش حاضر اختلاف معنی‌داری در بین تیمارها از لحاظ میزان رشد جمعیت یافت نشد، اگرچه تفاوت‌هایی در تولید تخم روتیفر غنی شده با مخلوط روی و سلنیوم مشاهده شد. در مطالعه دیگری، Norwood و همکاران (۲۰۰۳) آزمون‌های سمیت مخلوط فلزات را بر روی روتیفر بررسی کردند و نتیجه گرفت که هیچ قانون معینی وجود ندارد و گاهی اوقات نتایج متناقضی مشاهده می‌شود. همانطور که نتایج نشان داد، مقدار $20\ mg\ L^{-1}$ از مخلوط فلزات سلنیوم و روی بر تولید تخم تاثیر کمتری در مقایسه با گروه شاهد داشت؛ در حالی که تاثیر تیمار روتیفر غنی شده با $40\ mg\ L^{-1}$ از هر دو ماده معدنی بیشتر از شاهد بود. مکانیسم‌های جذب، ذخیره و دفع مواد معدنی در روتیفر متغیر است اما دلیل آن مشخص نیست (Nordgreen *et al.*, 2013).

۵. نتیجه‌گیری نهایی

به طور کلی مشخص شد که غنی‌سازی ترکیب جلبک‌های مورد استفاده با سلنیوم و روی سبب افزایش جذب آن‌ها در روتیفر می شود. لازم به ذکر است که سه

عناصر Zn، Se و مس الگوی افزایشی مشابه داشتند اما منگنز الگوی مخالفی داشت. بنابراین، غنی‌سازی با این عناصر (Se و Zn) باعث کاهش سطح منگنز می‌شود. یافته‌های این مطالعه نشان داد که به راحتی می‌توان سطح مس، Zn و Se را به صورت همزمان و بدون نیاز به غنی‌سازی با مس، در روتیفر دستکاری کرد. در آخر پیشنهاد می‌شود که با بکار گیری فناوری غنی‌سازی، تولید روتیفر با غنی‌سازی مواد مغذی ضروری، به عنوان یک ضرورت صورت گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از کارکنان بخش شیلات و پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری دانشگاه ارومیه جهت همکاری و ارائه امکانات لازم تشکر می‌کنند.

۶. منابع

References

Abbasi, Y., Ahmadifard, N., Tukmechi, A., 2019. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on growth, reproductive and bacterial count of marine rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Aquatic Biology* 7(1), 27-34.

Ajiboye, O., Yakubu, A ,.Adams, T., Olaji, E., Nwogu, N., 2011. A review of the use of copepods in marine fish larviculture. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21(2), 225-246.

Dhert, P., King, N., O'brien, E., 2014. Stand-alone live food diets, an alternative to culture and enrichment diets for rotifers. *Aquaculture* (431), 59-64.

Evjemo, J.O., Reitan, K.I., Olsen, Y., 2003. Copepods as live food organisms in the larval rearing of halibut larvae (Hippoglossus hippoglossus L.) with special emphasis on the nutritional value. *Aquaculture* 227(1-4), 191-210.

Ezoe, M., Sasaki, M., Hokura, A., Nakai, I., Terada, Y., Yoshinaga, T., Tukamoto, K., Hagiwara, A., 2002. Two-dimensional micro-beam imaging of trace elements in a single plankton measured by a synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis. *Bunseki Kagaku (Japan Analyst)* 51(10), 883-890.

Ferreira, M., Cortina-Burgueño, Á., Freire, I., Otero, A., 2018. Effect of nutritional status and concentration of *Nannochloropsis gaditana* as enrichment diet for the marine rotifer *Brachionus sp*. *Aquaculture* (491), 351-357.

Gharekhani, A., Takami, G.A., Tukmechi, A., Afsharnasab, M., Agh, N., 2015. Effect of dietary supplementation with zinc enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on immunity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian journal of veterinary research* 16(3), 278.

Gojkovic, Ž., Garbayo, I., Ariza, J.L.G., Márová, I., Vílchez, C., 2015. Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. *Algal Research* 106-116.

Gojkovic, Ž., Vílchez, C., Torronteras ,R., Vigara, J., Gómez-Jacinto, V., Janzer, N., Gómez-Ariza, J.-L., Márová, I., Garbayo, I., 2014. Effect of Selenate on Viability and Selenomethionine Accumulation of *Chlorella sorokiniana* Grown in Batch Culture. *The Scientific World Journal* (2014)1-13.

Guillard, R.R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: (Eds.), Culture of marine invertebrate animals. Springer, pp. 29-60.

Hagiwara, A., Marcial, H.S., 2019. The use of non-*Brachionus plicatilis* species complex rotifer in larviculture. *Hydrobiologia* 844(1), 163-172.

Hamre, K., 2016. Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus sp.*) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. *Aquaculture* 450136-142.

Hamre, K., Mollan, T.A., Sæle, Ø., Erstad, B., 2008. Rotifers enriched with iodine and selenium increase survival in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Aquaculture* 284(1), 190-195.

Hamre, K., Sissener, N.H., Lock, E.-J., Olsvik, P.A., Espe, M., Torstensen, B.E., Silva, J., Johansen, J., Waagbø, R., Hemre, G.I., 2016. Antioxidant nutrition in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and post-smolt, fed diets with high inclusion of plant ingredients and graded levels of micronutrients and selected amino acids. *PeerJ* 4e2688.

Hamre, K., Srivastava, A., Rønnestad, I ,.Mangor-Jensen, A., Stoss, J., 2008. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus sp.* may not fulfil the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition* 14(1), 51-60.

Ibs, K.-H., Rink, L., 2003. Zinc-Altered Immune function. *The Journal of Nutrition* 133(5), 1452S-1456S.

Kim, H.J., Nakamura, K., Hagiwara, A., 2014. Dietary effect of selenium-fortified *Chlorella vulgaris* on reproduction of *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera: Monogononta). *International Review of Hydrobiology* 99(1-2), 161-165.

Kim, Y.Y., Mahan, D.C., 2001. Comparative effects of high dietary levels of organic and inorganic selenium on selenium toxicity of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science* 79(4), 942-948.

Krebs, C.J., 1995. Two paradigms of population regulation. *Wildlife Research* 22(1), 1-10.

Lin, S., Lin, X., Yang, Y., Li, F., Luo, L., 2013. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture* 406- 407 (1), 79-84.

Loo, P.L., Chong, V.C., Vikineswary, S., Ibrahim, S., 2016. Waste-grown phototrophic bacterium supports culture of the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Aquaculture Research* 47(10), 3029-3041.

Loscalzo, J., 2014. Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. *New England Journal of Medicine* 370(18), 1756-1760.

Lowry, O.H., Lopez, J.A., 1946. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *Journal of Biological Chemistry* 162421-428.

Matsumoto ,S., Satoh, S., Kotani, T., Fushimi, H., 2009. Examination of a practical method for zinc enrichment of euryhaline rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* 286(1), 113-120.

Mejias, C., Riquelme, C., Sayes, C., Plaza, J., Silva-Aciares, F., 2018. Production of the rotifer *Brachionus plicatilis* (Müller 1786) in closed outdoor systems fed with the microalgae *Nannochloropsis gaditana* and supplemented with probiotic bacteria *Pseudoalteromonas sp.* (SLP1). *Aquaculture International* 26(3), 869-884.

Molina-Poveda, C., 2016. Nutrient requirements. In: Nates, S.F. (Eds.), Aquafeed Formulation. Academic Press, San Diego, pp. 75-216.

Nematzadeh, K., Ahmadifard, N., Samadi, N., Agh, N., Ghaderpour, S., 2018. The effects of zinc-enriched *Saccharomyces cerevisiae* on the growth and mineral composition of marine rotifer, *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Aquatic Biology* 6(2), 88-94.

Nordgreen, A., Penglase, S., Hamre, K., 2013. Increasing the levels of the essential trace elements Se, Zn, Cu and Mn in rotifers (*Brachionus plicatilis*) used as live feed. *Aquaculture* 380-383120-129.

Norwood, W.P., Borgmann, U., Dixon, D.G., Wallace, A., 2003. Effects of Metal Mixtures on Aquatic Biota: A Review of Observations and Methods. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9(4), 795-811.

NRC, N.R.C., 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National academies press, Washington, DC., p.

Pacitti, D., Lawan, M.M., Sweetman, J., Martin, S.A., Feldmann, J., Secombes, C.J., 2015. Selenium supplementation in fish: A combined chemical and biomolecular study to understand Sel-Plex assimilation and impact on selenoproteome expression in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *PLoS One* 10(5), e0127041.

Penglase, S., Hamre, K., Sweetman, J.W ,.Nordgreen, A., 2011. A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus spp.*). *Aquaculture* 315(1), 144-153.

Penglase, S., Harboe, T., Sæle, Ø., Helland, S., Nordgreen, A., Hamre, K., 2013. Iodine nutrition and toxicity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *PeerJ* 1e20.

Prasad, A.S., 2009. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 12(6), 646-652.

Rayman, M.P., 2000. The importance of selenium to human health. *The Lancet* 356(9225), 233-241.

Sayegh, F.A.Q., Radi, N., Montagnes, D.J.S., 2007. Do strain differences in microalgae alter their relative quality as a food for the rotifer *Brachionus plicatilis*? *Aquaculture* 273(4), 665-678.

Schrauzer, G.N., 2003. The nutritional significance, metabolism and toxicology of selenomethionine. *Advances in Food and Nutrition Research* 4773-112.

Silva, M.S., Kröckel, S., Jesu Prabhu, P.A., Koppe, W., Ørnsrud, R., Waagbø, R., Araujo, P., Amlund, H., 2019. Apparent availability of zinc, selenium and manganese as inorganic metal salts or organic forms in plant-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 503562-570.

Srivastava, A., Stoss, J., Hamre, K., 2011. A study on enrichment of the rotifer Brachionus "Cayman" with iodine and selected vitamins. *Aquaculture* 319(3), 430-438.

Suhajda, Á., Hegóczki, J., Janzsó, B., Pais, I., Vereczkey, G., 2000. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched Saccharomyces cerevisiae .*Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 14(1), 43-47.

Sun, S., Chen, L., Ge, X., Qin, J., 2013. Examination of a practical method for copper enrichment of euryhaline rotifers (*Brachionus plicatilis*) as diet of Eriocheir sinensis zoea larvae. *Aquaculture Nutrition* 19(5), 809-817.

Thiry, C., Ruttens, A., De Temmerman, L., Schneider, Y.-J., Pussemier, L., 2012. Current knowledge in species-related bioavailability of selenium in food. *Food Chemistry* 130(4), 767-784.

Vallee, B.L., Falchuk, K.H. 1993.The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological reviews* 73(1), 79-118.

Vallejo, A., Newmark, F., Mercedes Críales, M., 1993. Efecto de la salinidad sobre el crecimiento poblacional y el rendimiento del rotífero *Brachionus plicatilis* (cepa Ciénaga Grande de Santa Marta). *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras-INVEMAR* 22(1), 112-121.

Wang, C., Lovell, R.T., 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source ,sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture* 152(1), 223-234.

Wang, J., Shu, X., Wang, W.-X., 2019. Micro-elemental retention in rotifers and their trophic transfer to marine fish larvae: Influences of green algae enrichment. *Aquaculture* 499374-380.

Wang, L., Xiao, J.-X., Hua, Y., Xiang, X.-W., Zhou, Y.-F., Ye, L., Shao, Q.-J., 2019. Effects of dietary selenium polysaccharide on growth performance, oxidative stress and tissue selenium accumulation of juvenile black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*. *Aquaculture* 503389-395.

Williams, M.J., Ogle, R.S., Knight, A.W., Burau, R.G., 1994. Effects of sulfate on selenate uptake and toxicity in the green alga Selenastrum capricornutum. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27(4), 449-453.

Xu, X.-P., Xi, Y.-L., Huang, L., Xiang, X.-L., 2015. Effects of Multi-metal (Cu, Zn, Cd, Cr, and Mn) Mixtures on the Reproduction of Freshwater Rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 95(6), 714-720.

Yamaguchi, M., Fukagawa, M., 2005. Role of Zinc in Regulation of Protein Tyrosine Phosphatase Activity in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells: Zinc Modulation of Insulin-like Growth Factor-I's Effect. *Calcified Tissue International* 76 (1), 32-38

Yang, Y., Meng, F., Wang, P., Jiang, Y., Yin, Q., Chang, J., Zuo, R., Zheng, Q., Liu, J., 2012. Effect of organic and inorganic selenium supplementation on growth performance, meat quality and antioxidant property of broilers. *African Journal of Biotechnology* 11(12), 3031-3036.

Zhang, S., Zeng, X., Ren, M., Mao, X., Qiao, S., 2017. Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 8(1), 1-10.