متوفرة على الموقع:http://www.basra-sciencejournal.org

ISSN –1817 –2695

تأثير عنصر السيلينيوم على البقاء و فعالية الانسلاخ في الروبيان *Macrobrachium nipponense*

انتصار نعيم سلطان

قسم الأسماك و الثروة البحرية / كلية الزراعة / جامعة البصرة / البصرة – العراق

ensultan@yahoo.com

الاستلام 28-10-2011، القبول 12-3-2012

المستخلص

أظهرت الدراسة الحالية باستخدام تراكيز تحت القاتلة لعنصر السيلينيوم في ا لروبيان *Macrobrachium nipponense* , أن قيمة $Lc_{50} = 0.88\,ppm$. صوّر تأثير سمية 2% من قيمة Lc_{50} على مراحل الانسلاخ (postmoult, moult , premoult ,intermoult). ظهر تغير واضح على جميع مراحل الانسلاخ في المروحة الذنبية للروبيان. مقارنة بحيونات السيطرة لوحظ فوضى في توزيع الأصباغ و ظهور الشعيرات الجديدة و طبيعة التخلص من الكيوتكل, و هذا يعني عدم اكتمال الانسلاخ و من ثم بطء في النمو يتبعه موت الحيوان.

Keywords: Selenium toxicity, Moult, *Macrobrachium nipponense* shrimp

1. المقدمة

اكتشف عنصر السيلينيوم Se عام 1817 من قبل العالم برزيلوس, حيث وجدت مركبات العنصر ضمن القشرة الأرضية بمقدار $7x10^{-5}$ وزن بالمائة. يحتل السيلينيوم موقعا في الجدول الدوري بين عنصري الكبريت و التيلريوم , و يتحد مع عناصر أخرى بشكل سلينيدات مثل Tl_2Se و Cu_2Se و Ag_2Se [1] . يتواجد السيلينيوم في المياه السطحية بصورة واضحة من خلال مصادرها الطبيعية أو الصناعية كهبوب الرياح, تعرية الصخور , عمليات السقي و البزل, صهر المعادن, احتراق الفحم الحجري, انبعاث الغازات من زيت الوقود, زرع الألغام و حرق القمامة. أن الحلقة النهائية لهذا العنصر هو مياه الأنهار و البحار و بالتالي تراكمه في الأحياء المائية, إذ يعتقد أن السيلينيوم يتواجد بكميات سامة $(120-1200mg/Kg)$في ترب المناطق شبه الجافة الجرداء و في ترب الصخور الطباشيرية و الصخور البركانية و ترسبات اليورانيوم الرملية. اكتشف حديثا الطبيعة السمية لعنصر السيلينيوم في المناطق الرطبة[2] $(10-50mg/Kg)$

لدراسة الأشكال الكيمياوية لعنصر السيلينيوم في النظام البيئي, كان لابد من دراسة دورته في التربة و عمود

الماء و طبيعة تراكمه في أنسجة الكائنات الحية. ففي التربة يعتمد وجوده على نوعية مكونات التربة من البقايا العضوية و الهائمات و على السيلينيوم العضوي و اللاعضوي الممتزج مع الطين, كما و يعتمد على وجود الترب الهوائية و اللاهوائية. الجدير بالذكر أن اللافقريات القاعية و البكتريا و الطحالب تلعب دورا مهما في عملية تراكم السيلينيوم [3]. وجد أن السيلينيوم مغذيا دقيقا Essential micronutrient لمختلف الحيوانات اذ يعتبر عاملا غذائيا (يدعى العامل الثالث) يأتي بعد الأحماض الأمينية و فيتامين E [4]. تختلف عملية امتصاص السيلينيوم باختلاف الكائنات الحية و كذلك تواجد العناصر و المركبات الأخرى كالزرنيخ و الكادميوم و الرصاص و الزئبق و الفوسفات و الكبريتات و السلفات, كما أن لقيمة الأس الهيدروجيني و درجة الحرارة و الملوحة الأثر الواضح على تراكم السيلينيوم في السلسلة الغذائية [5].

اكتشفت سمية السيلينيوم عام 1850, فأما أن تكون حادة Acute أو مزمنة Chronic, إذ تسبب الأولى مرض الترنح العمياوي Blind Staggers , و من أعراضه صعوبة التنفس و النحول و الإسهال و الارتفاع في درجة الحرارة و تورم العضلات و من ثم الموت. أما الثانية فتسبب ما يسمى بالمرض القلوي, و من أعراضه سقوط الشعر و خشونة الجلد و اعوجاج الظهر و التهاب المفاصل [6]. تتحدد سمية السيلينيوم من خلال طبيعته الكيميائية, اذ يتحول من صيغة السيلينايت إلى السيلينيت ثم إلى سيلينيوم عضوي وبذلك يكون من أخطر العناصر النزرة. أن للتراكيز المختلفة لعنصر السيلينيوم الأثر الواضح في موت الكائنات الحية, و ذلك من خلال تأثيرها على طبيعة كل من النمو و التكاثر و الإخلاف و مكونات الدم [4,7]. لاحظ Lemly [3] في دراسة أجراها على اسماك *Anabs testudineus* و *Lepomis macrochirus* انفجار كريانها الحمر عند تعرضها لعنصر السيلينيوم و ذلك طبقا لظاهرة Nuclear shadow . كما وجد Botton [8] أن زيادة نسبة السيلينيوم في الغذاء و الماء تسبب نقص ا واضحا في أنتاج البيض و صعوبة في عملية فقس هـو تشوه الأجنة و تعطل عمليتي التكاثر و النمو في الطيور المائية و الأسماك.

لاحظ Lemly [3] أن $15-20\mu g/g$ من السيلينيوم تؤدي إلى تشوه أسماك Bluegill و فشل في نسبة التكاثر تصل إلى نسبة $10-20\%$. كما أن تركيز $3-10\mu g/g$ وزن جاف من السيلينيوم في الغذاء يسبب نقصان في نمو اليرقات كما يؤثر على عملية فقس بيض كل أنواع الأسماك في نهر كولورادو [2]. في دراسة للسرطان *Portunus pelgicas* في مياه الخليج العربي, وجد اختلافا بين أعضاء الجسم في القيمة التراكمية للسيلينيوم, حيث تكون $0.17\mu g/g$ وزن جاف في الغلاصم و $0.14\mu g/g$ وزن جاف في الأعضاء التكاثرية و $0.11\mu g/g$ وزن جاف في المعدة, في حين تصل إلى $0.25\mu g/g$ وزن جاف في الغدة الكبدية و البنكرياسية [9]. يسبب تراكم السيلينيوم في اللافقريات مجموعة من التغيرات في الخلايا الدموية أو نقص في أيون الكالسيوم Ca^{+2} داخل المايتوكوندريا و اختلاف مستوى الفعالية الأيضية و التماثل و الانقسام للخلايا كما في *Mytilus edulis* و *lobster sp.* و *Macoma balthica* [10].

أكد مجموعة من الباحثين أن عملية الاسترداد أو إزالة السمية تعتمد على ارتباط العنصر الملوث بمواقع الجسم كالحبيبات غير الذائبة أو جزيئات البروتين و الدهون و على الظروف البيئية التي يعيشها الحيوان من حرارة و تغذية و ملوحة [11].الجدير بالذكر أن هنالك العديد من المنظمات العالمية التي تحث على دراسة سمية عنصر السيلينيوم منها : U.S. Enivromental Protection Agency و Water Health and Ecological Criteriea Division[4] .

2. طريقة العمل

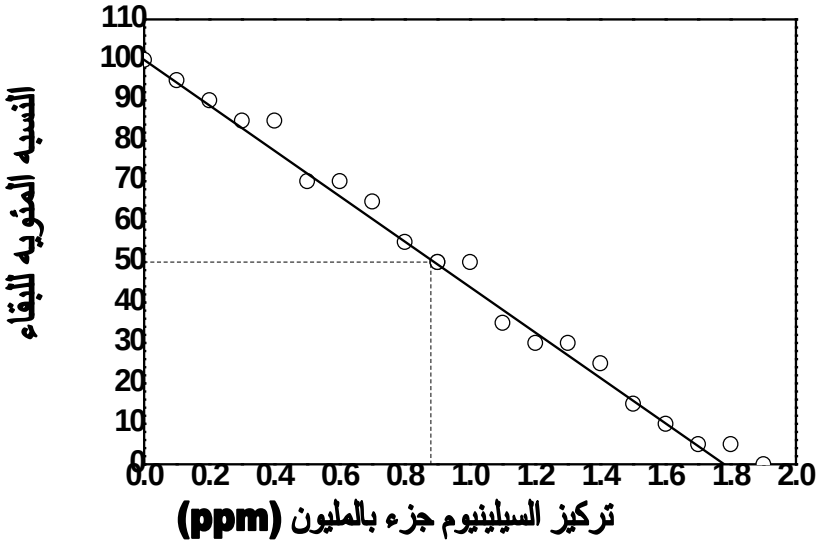
استعمل الميزان الحساس Mettler Model AE106 لوزن 3.332 غم من $Na_2SeO_3.5H_2O$ ليذاب بالماء المقطر الخالي من الايونات. أكمل حجم المحلول إلى لتر ليصبح تركيز عنصر السيلينيوم غم / لتر. ل تجنب عملية الترسيب, أضيفت قطرتان من حامض النتريك إلى المحلول المحضر. حضرت المحاليل القياسية المست عملة بتراكيز 0.1 , 0.2 , 0.4 , 0.6 , 0.8 , 1.0 , 1.5 , 2.0 , 2.5 , 3.0ppm , و اختيرت أفراد من الروبيان *Macrobrachium nipponense* كعينات للدراسة بمعدل طول يتراوح بين 5 و 6cm . أقلمت الأفراد في أحواض زجاجية سعة 2.5 لتر مملوءة بماء حنفية مخزون (خالي من الكلور) مع الحرص على توفير الأوكسجين باستعمال مضخة هواء كهربائية. استعمل 15 فرد لكل تركيز بحيث غير المحلول كل 24 ساعة (ثلاث مكررات لكل تركيز). قيست شدة تأثير سمية السيلينيوم كل 12 ساعة من فترة التجربة (96 ساعة).

لدراسة تأثير عنصر السيلينيوم على عملية الانسلاخ, اختيرت تراكيز أقل من 2% من قيمة متوسط التركيز المميت Lc_{50} . وضعت عينات الحيوان في نفس الحجم السابق (5–6 cm) في أحواض للأقلمة لمدة ثلاثة أيام , بعدها بدأت المراقبة لعملية الانسلاخ في الحيوان. جرى مراقبة الهيكل الخارجي للحيوان مظهريا و تحت المجهر من خلال معاينة طبيعة المروحة الذنبية Telson خلال أطوار الانسلاخ الأربع و مراحلها: قبل الانسلاخ $premoult\ (D_1^1, D_1^{11}, D_1^{111})$, ما بين انسلاخين $intermoult\ (D_\circ^b, D_\circ^L)$, الانسلاخ $moult\ (D_3, D_2^{11}, D_2^1)$, بعد الانسلاخ $postmoult\ (A, B, ca, cb)$.

3. النتائج و المناقشة

تكمن أهمية سمية عنصر السلينيوم في اللافقريات من خلال موقع الحيوان من السلسلة الغذائية , لأن توفر العنصر بتراكيز عالية يؤدي إلى موت الكائنات الحية أو تغيرات في طبيعة الجماعة السكانية لبعض الأنواع [2]. أن عملية دخول عنصر السيلينيوم لأجسام اللافقريات تكون بهضم الطعام أو انتشار أيونات السيلي نيوم عن طريق الغلاصم أو شرب الماء أو الامتصاص عن طريق الجلد[10].

يوضح الشكل (1) إلى أن قيمة Lc_{50} للسلينيوم في الروبيان *M. nipponense* 0.88 ppm (تمثل الحد الفاصل بين القيمة القاتلة و تلك التي يتحملها الحيوان والمؤثرة على فعاليته الحيوية). أن هذه النسبة تقارب ما وجده سلطان [5] في دراسته على السرطان *Sesarma boulengeri* , اذ وجد أن 3.0 ppm تقتل 30% من أعداد السرطانات و 10 ppm تقتل 70%, في حين كانت القيمة في السمكة *Cyprinus carpio*, 0.8 ppm اذ تقتل 50% من عددها . كما وجد Lemly [3] أن 0.54ppm من قيمة Lc_{50} تؤثر في فعالية السمكة *Gambusia affinis* و 0.251ppm منها في *Microplerus salnoides* و 0.211ppm في *Lepomis maerochirus*. على الرغم من تصنيف السيلينيوم كأحد العناصر التي تحدث تغيرات كيميائية و سمية للمياه و ميل هنحو التراكم في السلسلة الغذائية و قابليته على التحول لإشكاله الكيميائية المختلفة (ضروابط وكالة حماية البيئة الأميركية E.P.A تحت بند304a[4] , لكننا نجد ن دراسة سمية السيلينيوم في البيئة المائية المحلية اقتصرت على دراسة سلطان [5].



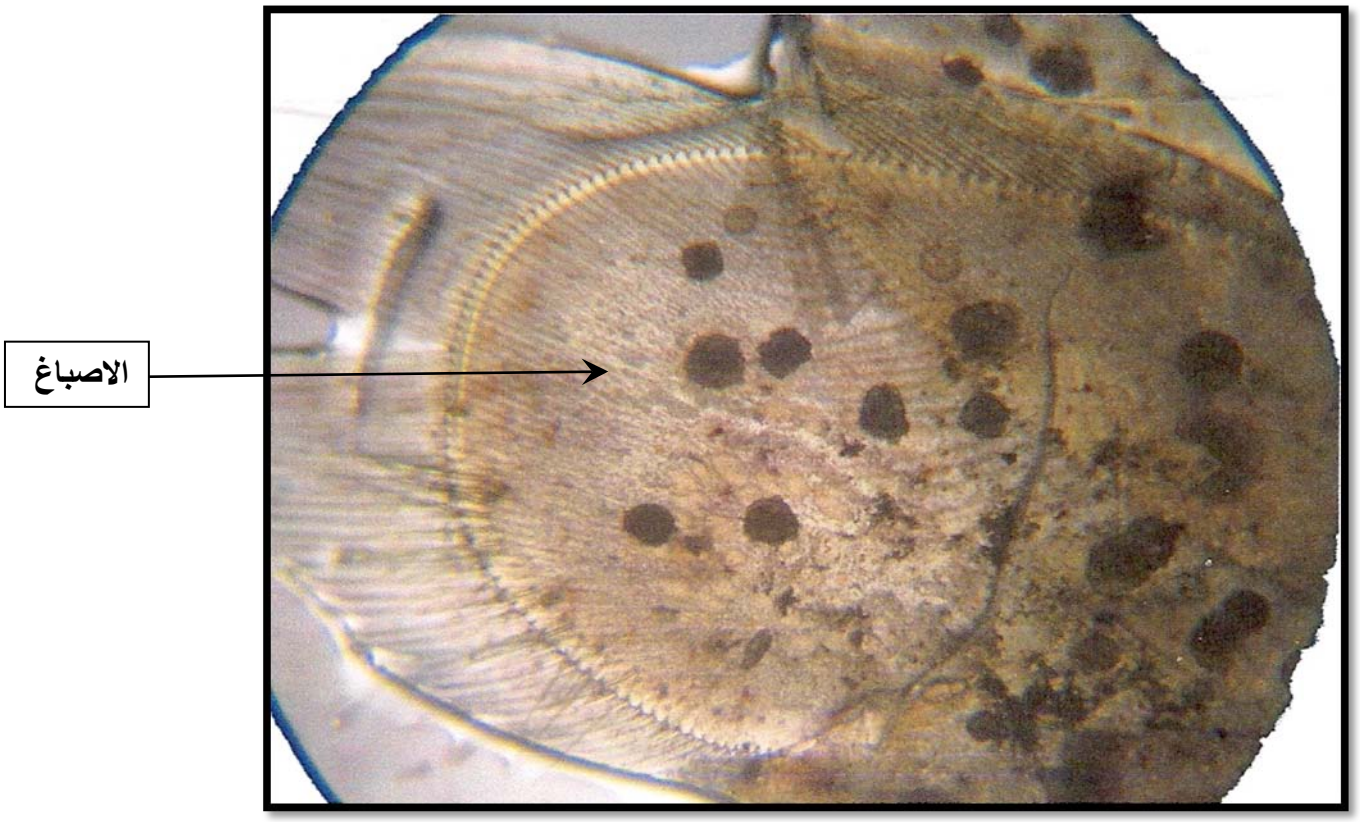
الشكل (1): العلاقة بين النسبة المئوية للبقاء و تركيز عنصر السيلينيوم في الروبيان *M. nipponense*

وجد اختلاف واضح في تأثير عنصر السيلينيوم على البالغات عنه في يرقات السرطان *Sesarma boulengeri* [5], كما وجد نفس الاختلاف بين الفئات الحجمية للحيوان *Crassosterea gigas* [12]. الجدير بالذكر أن القشريات تتعرض إلى عملية الانسلاخ (Moulting) لأكثر من مرة خلال دورة حياتها, حيث يصاحبها عدم تصلب في الكيوتكل المغطي للجسم مما يؤدي إلى سرعة نفاذية العناصر داخل جسم الحيوان[13]. و عليه فقد وجد سلطان [5] سرعة أكبر في استجابة يرقات السرطان *Sesarma boulengeri* بعمر يومين لسمية السيلينيوم من تلك التي بعمر ستة أيام ، و ذلك بسبب عملية الانسلاخ المتوقع حدوثها في اليوم الثاني من عمر السرطان. كما أن أطوار الانسلاخ (postmoult, moult, premoult, intermoult) تتكرر حوالي 20 مرة خلال عمر الحيوان القشري حتى يصل إلى طوله النهائي, اذ وجدت انها تختلف بطول فتراتها و طبيعة تأثرها بدرجة الحرارة و كذلك بنوع و حجم الحيوان [13]. مما سبق و لتجنب الاختلاف في تأثير السيلينيوم و في الانسلاخ الناتج عن الحجوم المختلفة, فقد تم مراقبة عملية الانسلاخ لفئات حجميه متقاربة من الروبيان *M. nipponense* (5-6cm) لمدة 15 يوما مع ضمان ثبات درجات الحرارة.

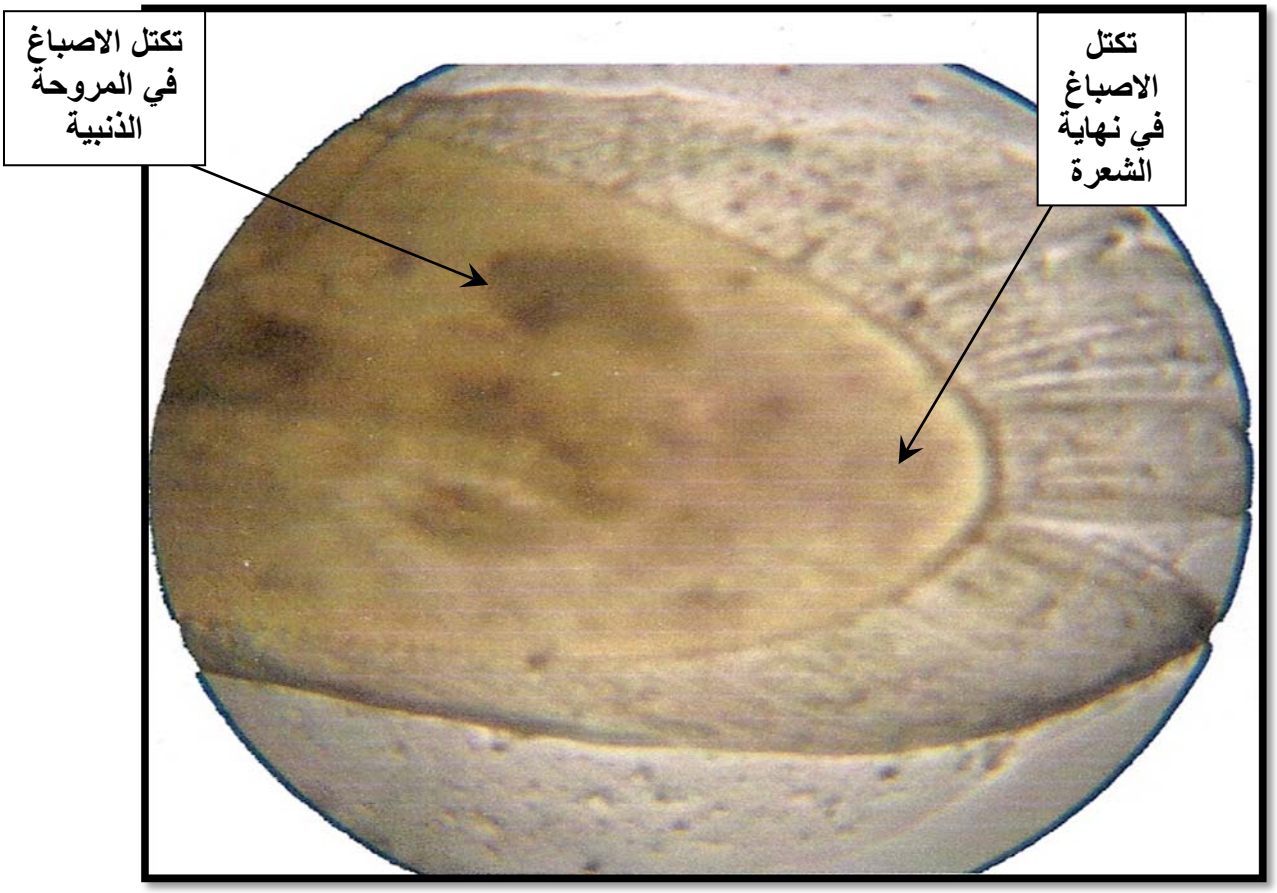
لوحظ في الدراسة الحالية أن الطور intermoult هو البداية الفعلية لعملية الانسلاخ عندما يبدأ تأثير الهرمونات على الأنسجة الطلائية المحيطة بالمروحة الذنبية حيث تكون على شكل أصباغ واضحة و متكتلة على طول المروحة, كما تظهر كمية من هذه الأصباغ على الشعيرات (Setae) المحيطة بها على شكل ألوان داكنة ممكن رؤيتها بالعين المجردة.

تحتل هذه الأصباغ حوالي نصف طول الشعيرة و كما موضح في الصورة (1) لحيوانات السيطرة. أن طبيعة توزع الأصباغ و كميتها تختلف حسب مراحل طور الانسلاخ intermoult, حيث يلاحظ في المرحلة $D_{\circ}^{b}$ (المرحلة المتقدمة) توزيع متجانس للأصباغ على امتداد ربع الشعيرة. في حين نجد توزيعها أكثر تجانسا داخل المروحة الذنبية في المرحلة المتأخرة $D_{\circ}^{L}$. كما لاحظت الدراسة أن تأثير سمية السيلينيوم على طور الانسلاخ intermoult يؤدي إلى تكتل الأصباغ بصورة غير منتظمة و انتشارها بصورة عشوائية داخل الشعيرات الذنبية(الصورة 2).

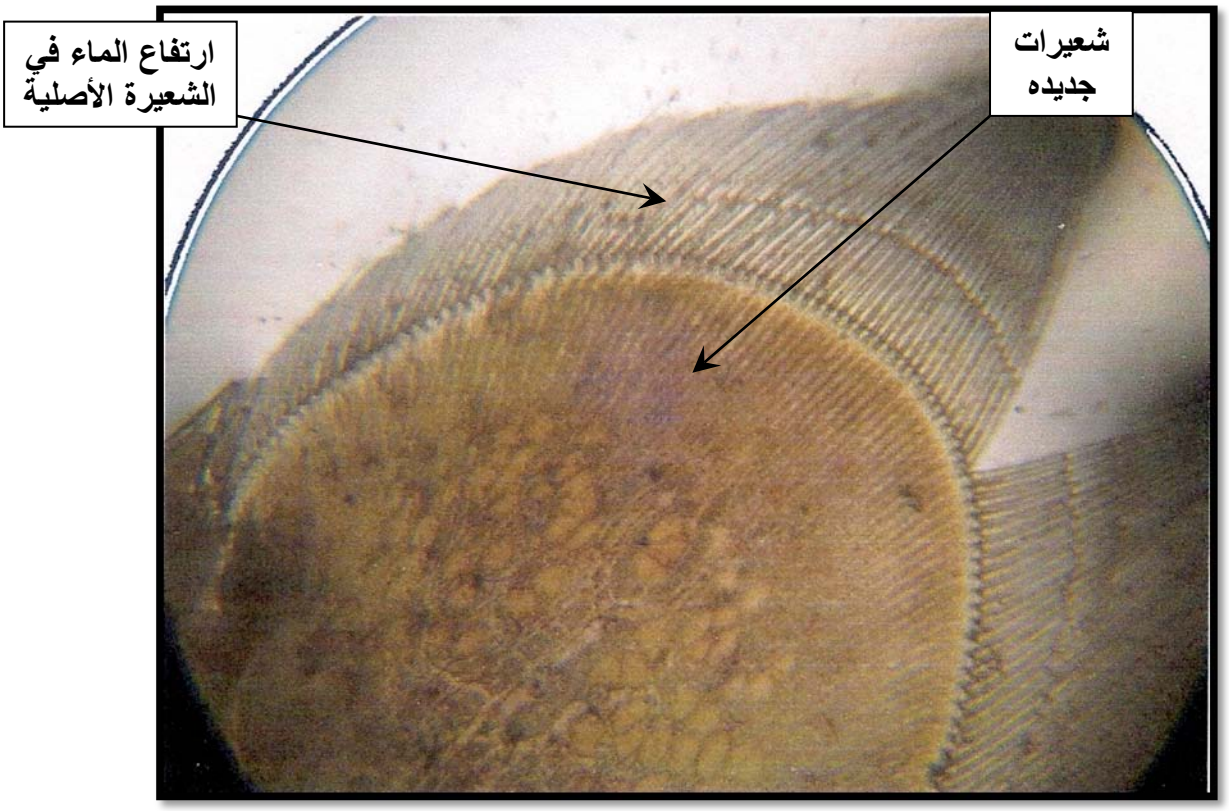
في طور premoult تتكون شعيرات جديدة على شكل خطوط متوازية داخل طيات البشرة القديمة مع بداية ظهور كمية من الماء يصل إلى ربع الشعيرة الأصلية(الصورة 3). في حين يتصف هذا الطور عند تعرض الروبيان إلى السيلينيوم ببقاء الأصباغ متكدسة في وسط المروحة بترتيب عشوائي مع عدم وضوح الحد الفاصل بين الشعيرات القديمة و الجديدة المتكونة داخل البشرة. يمر هذا الطور بالمراحل D_1^1 و D_1^{11}و D_1^{111} و التي تمثل المدة الزمنية لظهور الشعيرات و امتلائها بالماء و توزيع الأصباغ في المروحة الذنبية (الصورة 4).



الصورة (1): طور الانسلاخ intermoult في المروحة الذنبية للروبيان *M. nipponense*



الصورة (2): أثر سمية السيلينيوم على الطور **intermoult** في المروحة الذنبية للروبيان ***M. nipponense***



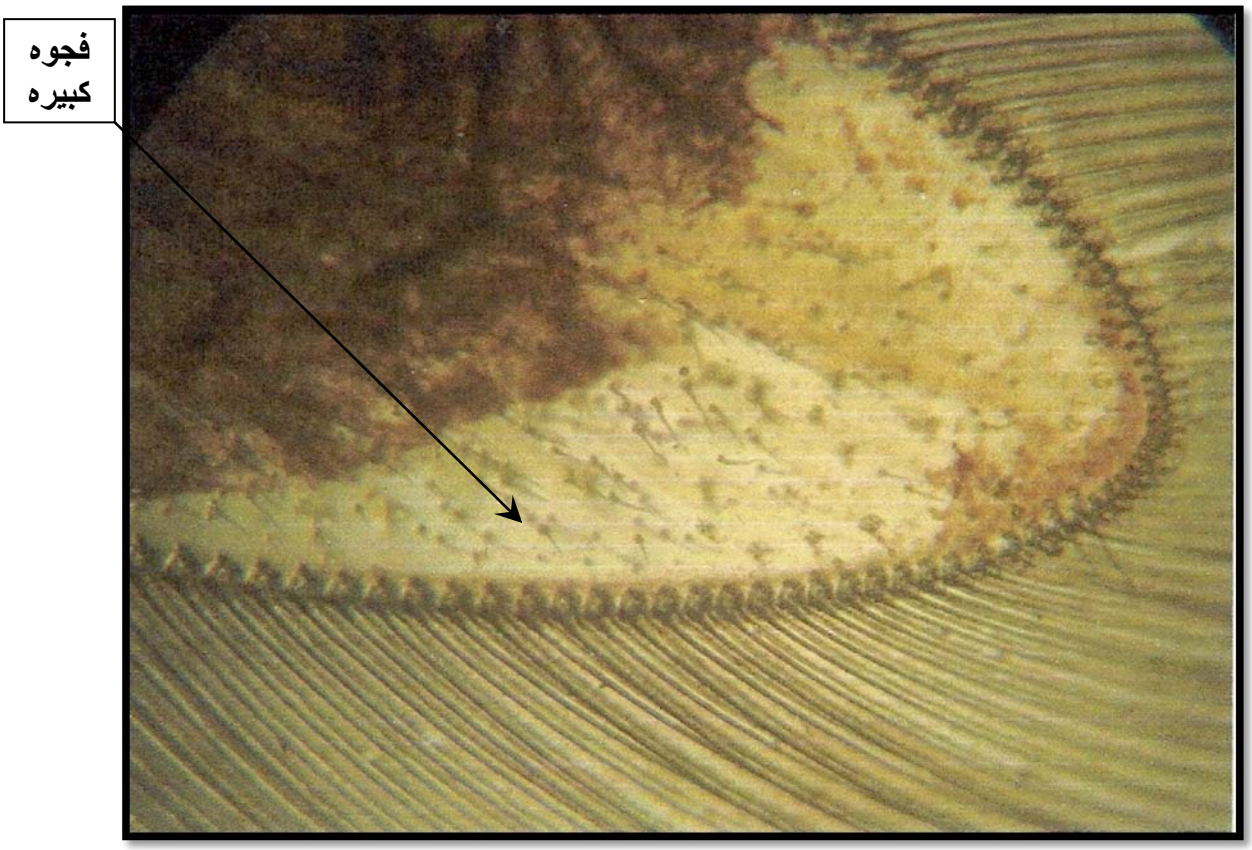
الصورة (3): طور الانسلاخ **premoult** في المروحة الذنبية للروبيان ***M. nipponense***

الصورة(4): أثر سمية السيلينيوم على طور الانسلاخ premoult في المروحة الذنبية للروبيان *M. nipponense*.

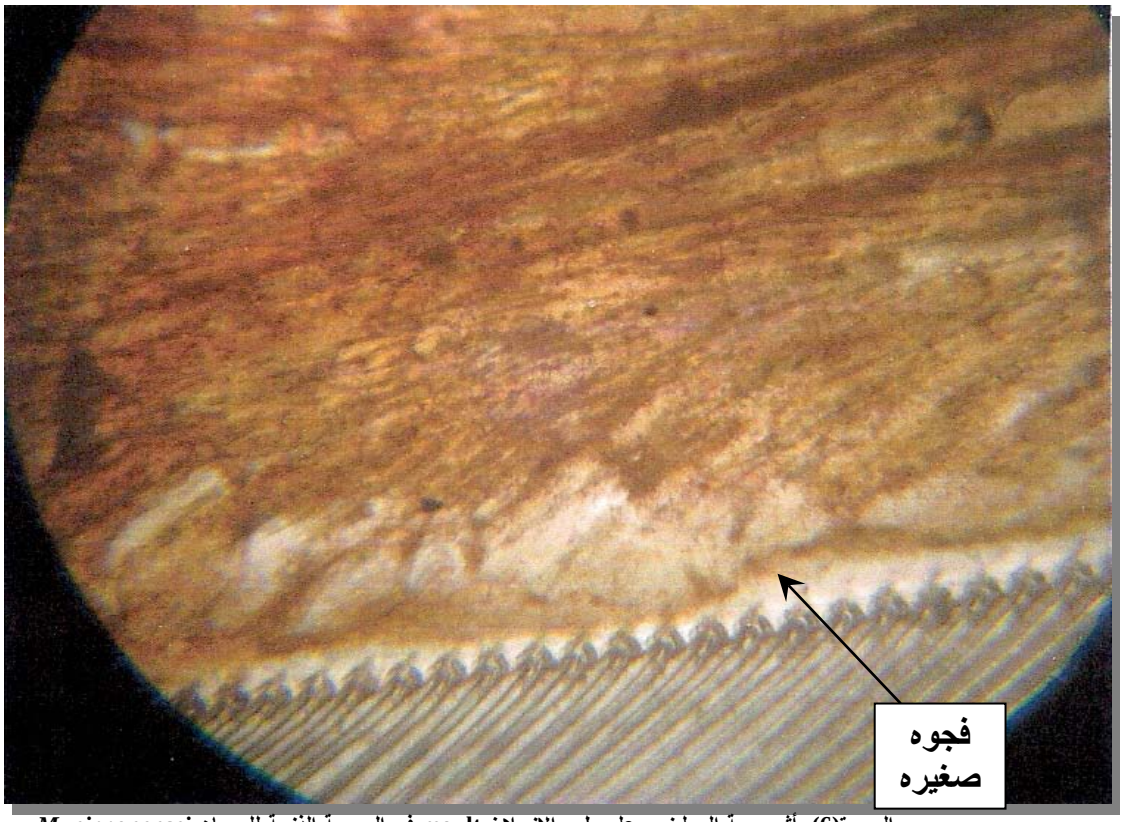
تكمن أهمية الطور moult في عملية الانسلاخ كونه من الأطوار الأساسية فيها و خاصة في القشريات. اذ يتكون من المراحل D_2^1 و D_2^{11} و D_3 التي يتم فيها تكون فجوة

بين الهيكل القديم و الجديد مما يؤدى إلى إزالة الهيكل القديم مع بروز الشعيرات الجديدة و كما هو موضح بالصورة (5). في حين يلاحظ تأثير السيلينيوم في عدم وضوح الشعيرات الجديدة و بطأ عملية نزع الهيكل القديم(الصورة 6).

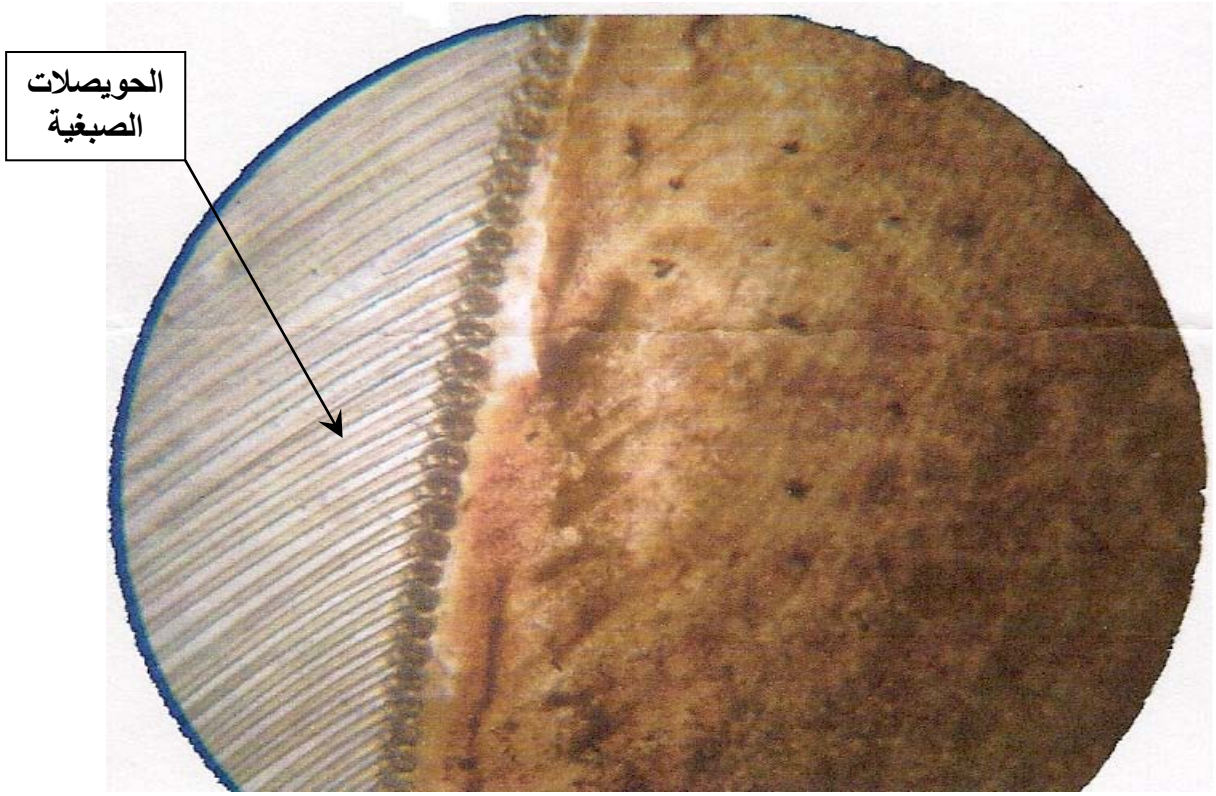
يتصف الطور الأخير للانسلاخ postmoult بتكون المروحة الجديدة و توزيع متجانس للأصباغ و طول متقارب للشعيرات الجديدة مع ظهور واضح للحويصلات الصبغية في قاعدة كل شعيرة setae (صورة 7). أن تأثير السيلينيوم على أطوار الانسلاخ السابقة يؤثر حتما على هذا الطور من حيث أكمال مراحل الانسلاخ *A* و *B* و *ca* و *cb* . مما يؤدي إلى اختلال واضح في عملية توزع الأصباغ داخل المروحة و خاصة عند منتصفها و قاعدتها (صورة 8A), كما يلاحظ اختفاء الحويصلات الصبغية في المروحة و ظهور عقد داخل الشعيرة setae مما يؤدي إلى تكسرها بسهولة (صورة 8B).



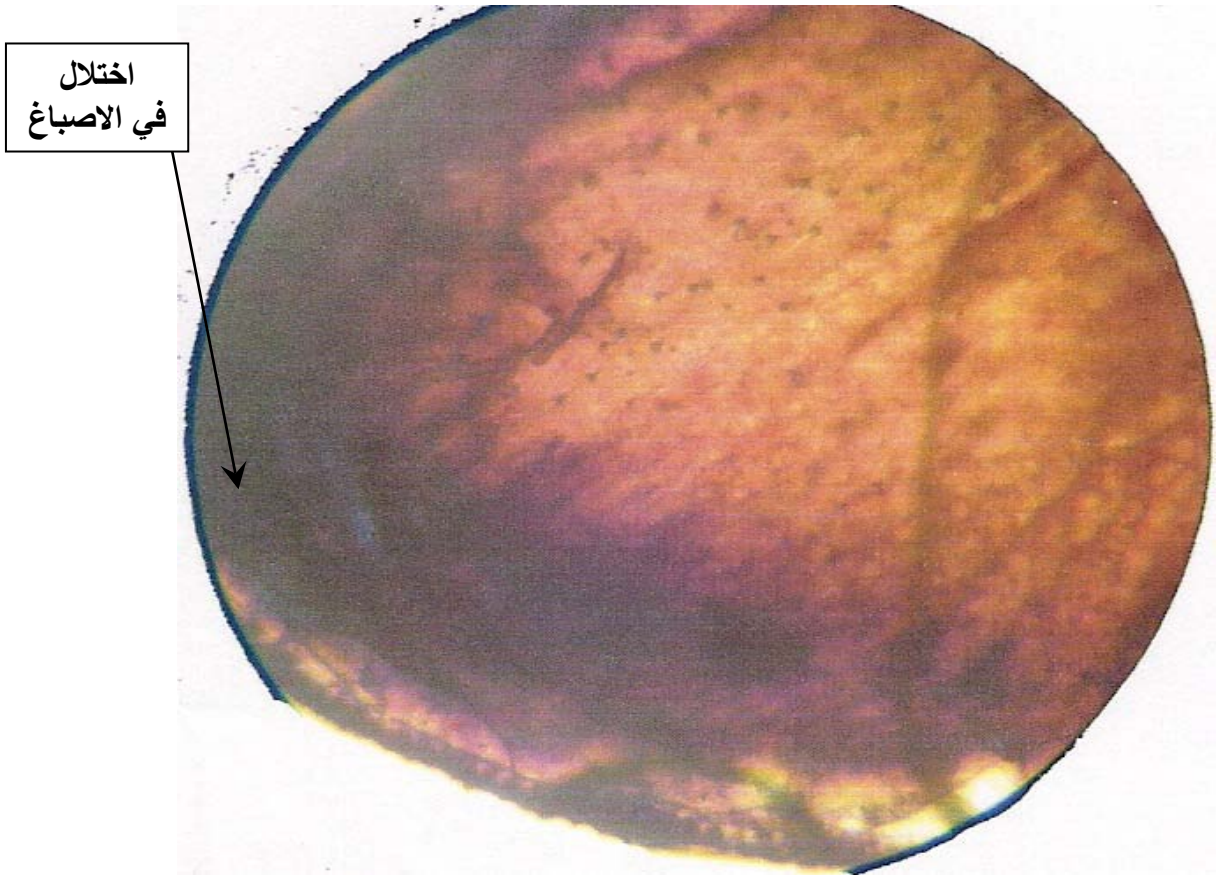
الصورة (5): طور الانسلاخ moult في المروحة الذنبية للروبيان *M. nipponense*



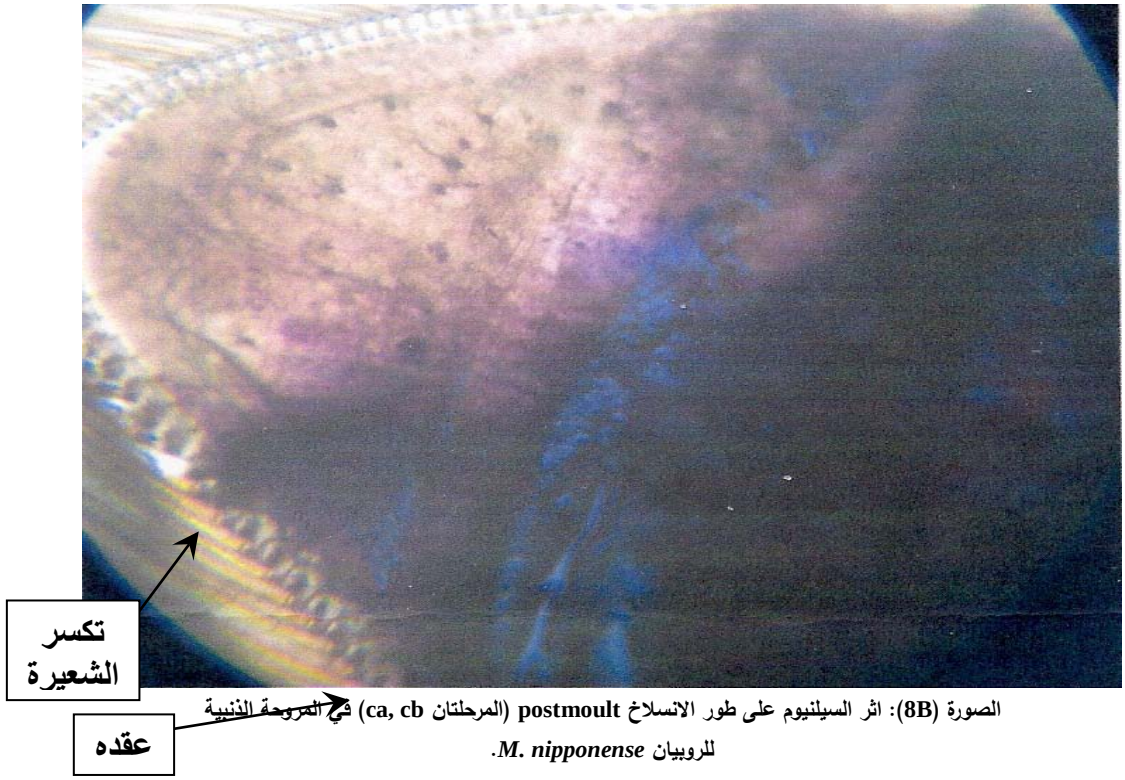
الصورة(6): أثر سمية السيلينيوم على طور الانسلاخ **moult** في المروحة الذنبية للروبيان ***M. nipponensei***



الصورة (7): طور الانسلاخ **postmoult** في المروحة الذنبية للروبيان ***M. nipponense***



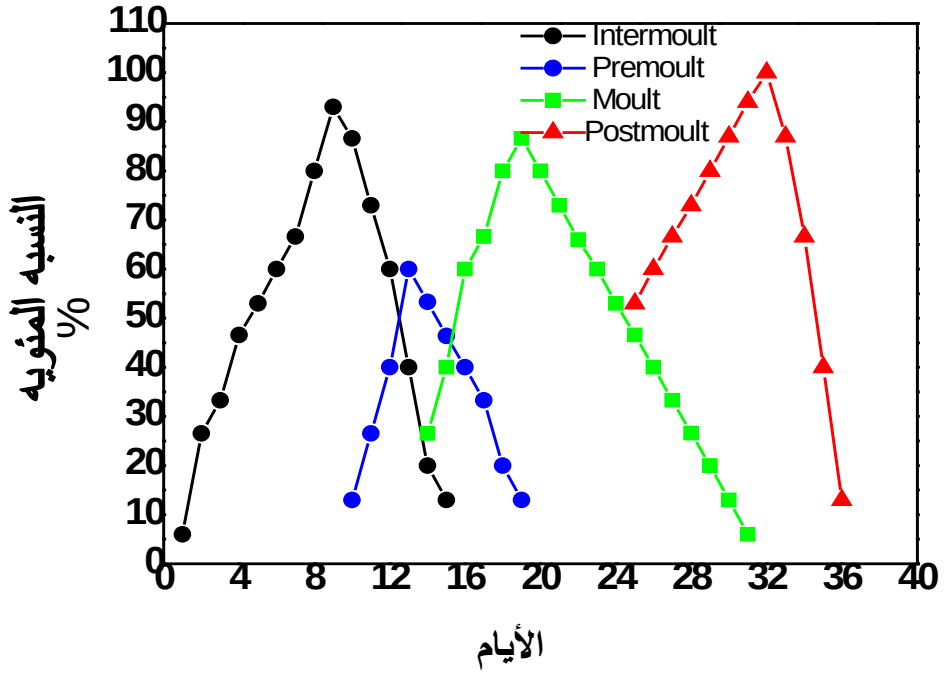
الصورة(8A): أثر السيلينيوم على طور الانسلاخ postmoult (المرحلتان A,B) في المروحة الذنبية للروبيان *M. nipponense* .



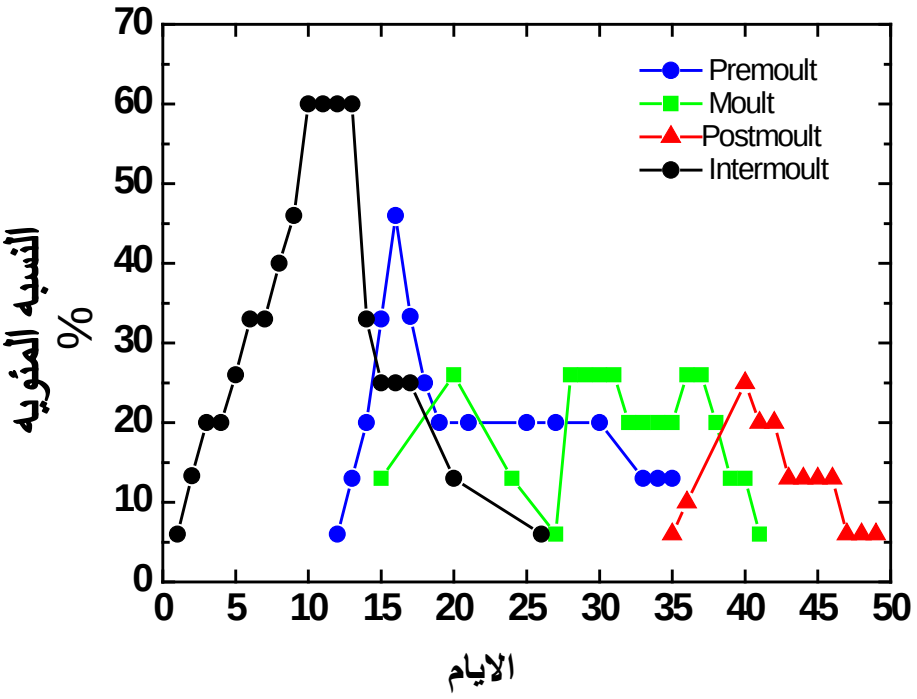
الصورة (8B): اثر السيلنيوم على طور الانسلاخ postmoult (المرحلتان ca, cb) في المروحة الذنبية للروبيان *M. nipponense*.

نتيجة لتراكم عنصر السيلينيوم تظهر مناطق الاختلال في توزيع الأصباغ داخل المروحة كبقع سوداء .وهذا يتفق مع ما وجده سلطان [5] في دراسته لآثر سمية السيلينيوم على عمليتي الإخلاف و الانسلاخ في يرقات السرطان *Sesarma boulengeri* . كما لابد من الإشارة إلى ان المراحل الأربعة لعملية الانسلاخ داخل المروحة الذنبية يمكن أن توضح أيضا بواسطة الفحص الخارجي للحيوان, و ذلك من خلال لون و سماكة الكيوتكل في الدرع و كذلك بداية نزع الكيوتكل بعد نهاية مرحلة postmoult و خاصة عند منطقة الرأس و الصدر و البطن ثم المروحة الذنبية. تبدو هذه المراحل بشكل واضح في حيوانات السيطرة. أما عملية تغير الكيوتكل في الحيوانات الملوثة فإنها تستغرق زمنا أطول و قد تتعثر مما يؤدي إلى عدم اكتمال عملية الانسلاخ

يظهر الشكل (2) وضوح الفترات الزمنية لأطوار الانسلاخ في حيوانات السيطرة. حيث تكون أطول ما يكون في طور الانسلاخ moult (17 يوم), في حين نجدها 9 أيام في الطور premoult . أن أعلى و أقل نسبة مئوية لحيوانات السيطرة كانت في طوري الانسلاخ postmoult(%100) و premoult(%60) على التوالي. في الحيوانات التي عرضت لعنصر السيلينيوم (الشكل 3), نلاحظ اختلال في توزيع أطوار الانسلاخ و تداخل واضح في فتراتها الزمنية يمتد لأكثر من فترتين زمنيتين. كما يمكن أن نلاحظ التناقص الواضح في أعداد الحيوانات نتيجة لموتها.



الشكل (2): التغير في النسبة المئوية لحيوانات السيطرة خلال الفترات الزمنية لأطوار الانسلاخ.



الشكل (3): التغير في النسبة المئوية للحيوانات المعرضة للسيلينيوم خلال الفترات الزمنية لأطوار الانسلاخ

يتخذ عنصر السيلينيوم شكلا تراكميا في تأثيره على الحيوانات, و هذا يؤدي إلى اختلال في عملية الانسلاخ و من ثم بطء في عملية النمو. وهذا ما وضحه سلطان [5] عند دراسة تأثير السيلينيوم على نمو السرطان *Sesarma boulengeri*.

الجدير بالذكر أن الحيوانات التي تكون في طور intermoult أو طور premoult أكثر مقاومة للتلوث بالعناصر الثقيلة م ن تلك التي بطور moult و ربما يعود سبب ذلك إلى نزع الكيوتكل تماما أثناء الطور الثالث مما يؤدي إلى امتصاص جسم الحيوان للعناصر بصورة أوسع مما هو عليه في الطورين الأولين, و هذا ما أكده Long et al.[12].

لقد اختيرت أحجام متقاربة من الحيوانات في التجربة , بسبب كون الصغيرة منها تختلف في قابليتها على امتصاص العناصر الثقيلة عن الكبيرة و ذلك لزيادة أنتاج بروتين ميتا لوثيونين Metallothionein الذي له قابلية على الاتصال بالعناصر الثقيلة و الذي يلعب دورا مهما في إزالة سميتها .

و كذلك لعدم كفاءة الأحجام الصغيرة في ا لتخلص من العناصر الثقيلة و ضعف قدرتها على تحمل الجفاف مما يؤدي إلى زيادة امتصاصها لايونات العناصر الموجودة في محاليل الاختبار [14].

أكد كل من Lemly [3] و سلطان [5] على أن سمية السيلينيوم تزداد في فصل الشتاء بسبب الإجهاد ألشتائي و التي تتطور بوجود المؤثرات الأخرى كبرودة الماء و زمن الإضاءة و قلة الغذاء و استنزاف مخزون الجسم من الدهون, و عليه فقد تم إجراء التجربة في بداية فصل الصيف (شهر مايس).

قد يتزامن تأثير السيلينيوم في عملية الانسلاخ مع تأثيره على القابلية التنفسية حيث يزيد من استهلاك الأوكسجين في الماء مما يؤدي إلى اختلال التوازن بين احتياجات التنفس و الكفاءة التنفسية , هذا ما أشار له Coyle et al.[15] عند دراسة اسماك *Lepomis marochrius*. أو قد يؤثر على أنزيمات الكبد بعد تثبيطها و انتقاله إلى بلازما الدم و انخفاض المحتوى المائي فيه [2].

المصـــادر

[1] W.D. Van Derveer and S.P. Canton, Sediment selenium toxicity thresholds derivation of water quality criteria for freshwater biota of western stream. Envir. Toxicol. Chem., 16, 1260-1268, (1997).

[2] S.J. Hamilton, Hypothesis of historical effects from selenium on endangered fish in the Colorado river basin. Human Ecol. Risk Assess, 5, 1153-1180, (1999).

[3] A.P. Lemly, Selenium impacts on fish ecological risk assessment. Ecotoxicol Environ., 5(6), 1139-1151, (1999).

[4] EPA (Environmental Protection Agency) Report on the peer constitution workshop, Selenium aquatic Toxicity and Bioaccumulation. U.S.P.A. office of water , (1998).

[5] انتصار نعيم سلطان, تأثير عنصر السيلينيوم في بعض النواحي الحياتية للسرطان النهري *Sesarma boulengeri* و سمك الكارب *Cyprinus carpiol* ,L. الاعتيادي رسالة دكتوراه مقدمة إلى جامعة البصرة - كلية العلوم, (2004).

[6] R. Eisler, Selenium hazards to fish wild life and invertebrates: asynopic review U.S. Fish wild, Serv. Biol. Rep., 85(1.5), 57- 68,(1985).

[7] P.M. Chapman, Selenium a potential time bomb or just another contaminant human, Ecol. Risk Assess, 5,1123-1138, (1999).

[8] M.L. Botton, Toxicity of Cadimum and Mercury to Horseshoe crab *Limulus phemus* Embryos and Larvae, Bull. Environ. Contam. Toxicol, 64, 137-143, (2000).

[9] S.Y. Al Mohanna and M.N. Subrahmanyan, Flux of heavy metal accumulation in various organs of the intertidal marine blue crab *Portunus pelagicus* L. from the Kuwait coast after the Gulf War, Envir. Intern., 27, 321-326, (2001).

[10] N.A. Awad, Determination of Selenium in fish by hydride generation atomic absorption spectrum metry, Marina Mesopotamica, 22(1), 59-70, (2007).

[11] N. Glickstein, Acute toxicity of mercury and selenium to *Crassosterea gigas* and *Cancer magrster* larvae, Mar. Biol., 49, 113-170, (1978).

[12] E.R. Long, L.G. Field and D.D. Donald, Predicting toxicity marine sediments with numerical sediments quality guide lines, Toxicol. Chem., 17, 714-727, (1998).

[13] M.I. Abdul-sahib and E.N. Sultan, Moult stages and Fortnightly moulting of the penaeid shrimp *Metapenaeus affinis*, Marina Mesopotamica, 11(1), 79-87, (1996).

[14] J.G. Davis, T.J. Steffeins, T.E. Engle, K.L. Mallow and S.E. Cotton, Preventing selenium toxicity, Colorado State University Cooperative Extension, 11/100 N- 6.109, (2002).

[15] J.J. Coyle, D.R. Buckler, G.G. Ingersoll, J.F. Fairchild and T.W. May, Effect of dietary selenium on the reproductive success of blue gills *Lepomis marochrius*, Envir. Toxicol. Chem., 12, 551-565, (1993).