Iranian Journal Of Biological Science. 2024; 19(1):17-29

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Effect of *Nannochloropsis oculate* dietary supplementation on growth performance, some hematological indices, and serum biochemistry of zebrafish *(Danio rerio)*

Shima Jafari[1], Kavus Nazari[2], Mohammad Akhavan-Bahabadi[3*], Seyed Pejman Hosseini Shekarabi[3*], Kasra Lotfi[1], Elly Lowen[4], Azin Azari[1], Behdis Tehrani[5], Mehdi Shamsaie Mehrgan[1]

1- Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2-Animal Science Research Section, Research and Education Center of Agricultural and Natural Resources of Tehran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

3- National Research Center of Saline-waters Aquatics, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bafq, Iran.

4- Swinburn, University of Technology, Melbourne, Australia.

Place of Research: Laboratory of Science and Research Branch

Article Info

Article History:

Recived 2024.10.28
Revised 2024.11.17
Accepted 2024.11.23

KeyWords:

Zebrafish
Nannochloropsis oculate
Blood biochemistry
Growth
Blood parameters

*Corresponding author:
E-mail address:

akhavan3107@gmail.com
shekarabi@areeo.ac.ir

Abstract

Introduction: Nutritional supplements in aquafeed have favorable effects on growth performance and increases their resistance to stressors and pathogens. One of these additives is microalgae species.

Material and methods: 315 zebrafish (0.25 g initial weight) were randomly divided into 3 treatments with three replications (35 fish in each aquarium), and they were fed with the produced diets containing 0 (control), 5% (T1) and 10% (T2) of N. oculate for 8 weeks.

Results: After the end of the rearing period, the highest final weight and weight gain were observed in treatment 2, which was significantly different from treatment 1 and the control group ($p<0.05$). Also, the highest specific growth rate and the lowest feed conversion ratio were observed in treatment 2. The results related to the blood parameters (including red blood cell count, white blood cell count, differential leukocyte count) did not differ significantly among the experimental groups ($p<0.05$). The highest and lowest total protein levels were recorded in treatment 2 and the control group, respectively. Also, the levels of albumin and globulin in both treatments 1 and 2 increased significantly compared to the control group ($p<0.05$).

Conclusion: Dietary supplementation with 10% of N. oculate probably improved the growth performance and serum biochemical parameters in zebrafishs.

Cite this article: Jafari, Sh. Nazari, K., Akhavan-Bahabadi, M., Hosseini Shekarabi, S.P., Lotfi, K., Lowen, E., Behdis, Tehrani, Shamsaie Mehrgan, M. Effect of *Nannochloropsis oculate* dietary supplementation on growth performance, some hematological indices, and serum biochemistry of zebrafish *(Danio rerio)*. Iranian Journal of Biological Sciences. 2024; 19 (1): 17-29

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iaubaramin.ac.ir

اثر سطوح مختلف ریزجلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم ماهی گورخری (*Danio rerio*)

شیما جعفری[۱]، کاوس نظری[۲]، محمد اخوان بهابادی[۳*]، سیدپژمان حسینی شکرابی[۳*]، کسری لطفی[۱]، الی لوان[٤]، آذین آذری[۱]، بهدیس طهرانی[٥]، مهدی شمسایی مهرجان[۱]

۱- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

۲- بخش علوم دامی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۳- مرکز تحقیقات ملی آبزیان آب‌های شور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بافق، ایران.

٤- دانشگاه سواینبرن، ملبورن، استرالیا.

٥- گروه مدیریت محیط زیست، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.

محل انجام تحقیق: آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱٤۰۲/۰۸/۰۷
بازنگری ۱٤۰۳/۰۸/۲۷
پذیرش ۱٤۰۳/۰۹/۰۳

کلمات کلیدی
نانوکلروپسیس اکولاتا
ماهی گورخری
شاخص رشد
خون شناسی
شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

* **مسئول مکاتبات:**
akhavan3107@gmail.com
shekarabi@areeo.ac.ir

چکیده

مقدمه: استفاده از مکمل‌های غذایی در جیره آبزیان، اثرات مطلوبی بر عملکرد رشد و افزایش مقاومت آن¬ها نسبت به عوامل استرس‌زا و بیماری‌زا می‌گذارد، یکی از این افزودنی‌ها انواع ریزجلبک‌ها می‌باشند.

مواد و روش‌ها: تعداد ۳۱۵ عدد ماهی گورخری (وزن اولیه ۰/۲۵ گرم) در یک طرح آزمایشی تصادفی شامل سه تیمار و ۳ تکرار، در ۹ آکواریوم تقسیم شدند. بدین منظور جیره‌های آزمایشی با مقادیر صفر (شاهد)، ۵ (تیمار ۱) و ۱۰ (تیمار ۲) درصد ریزجلبک خشک آماده گردید و ماهیان به مدت ٥٤ روز با این جیره‌ها تغذیه شدند

نتایج: پس از پایان دوره پرورش، بیشترین مقدار وزن نهایی و افزایش وزن در تیمار ۲ مشاهده شد که میزان آن نسبت به تیمار ۱ و گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). همچنین، بیشترین نرخ رشد ویژه و کم ترین ضریب تبدیل غذایی نیز در تیمار ۲ مشاهده شد. نتایج مربوط به پارامترهای خونی (شامل تعداد گلبول قرمز، تعداد گلبول سفید، شمارش افتراقی لکوسیت‌ها) در بین تیمارها فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($p>0/05$). بیشترین و کمترین میزان پروتئین کل به ترتیب در تیمار ۲ و شاهد ثبت شد. همچنین میزان آلبومین و گلوبولین در هر دو تیمار ۱ و ۲ به‌طور معنی‌دار نسبت به گروه شاهد افزایش یافت ($p<0/05$)

نتیجه‌گیری: افزودن ۱۰ درصد ریزجلبک نانوکلروپسیس اکولاتا به جیره سبب بهبود عملکرد رشد و پارامترهای بیوشیمیایی سرم در ماهیان گورخری می‌گردد

شیوه آدرس‌دهی این مقاله :جعفری،ش.، نظری،ک.، اخوان بهابادی،م.، حسینی شکرابی ،س .پ. ، لطفی،ک.، لون ، ا.، آذری،آ.، طهرانی، ب.، شمسایی مهرجان،م.، اثر سطوح مختلف ریزجلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) بر عملکرد رشد، فراسنجه‌های خونی و برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم ماهی گورخری (*Danio rerio*) . مجله دانش زیستی ایران. ۱٤۰۳: ۱۹ (۱): ۱۷-۲۹

ناشر: دانشگاه آزاد اسامی واحد ورامین - پیشوا شاپا چاپی: ٤۲۲٦-۱۷۳٥ شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷ - ٤٥۹ X

نویسندگان: حق مؤلف©

مقدمه

ریزجلبک‌ها میکروارگانیسم‌هایی تک سلولی، یوکاریوتی یا پروکاریوتی با فعالیت فتوسنتزی هستند که به عنوان افزودنی‌های طبیعی در خوراک دام، طیور و آبزیان استفاده می‌شوند (۱). این ارگانیسم ها حاوی اسیدهای آمینه و چرب ضروری متنوع، کربوهیدرات ها و لیپیدها و همچنین عناصر ریزمغذی مانند مواد معدنی، ویتامین ها، پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی می باشند (۲،۳). همچنین به عنوان منبع طبیعی اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره، منبع غذایی مهمی برای بسیاری از موجودات آبزی و جزء اصلی عملکرد تغذیه آن ها محسوب می‌شوند (٤)

جلبک نانوکلروپسیس (*Nannochloropsis oculata*) یکی از مهم‌ترین ریزجلبک‌های شناخته شده در صنعت آبزی‌پروری است (۵). همچنین یک منبع بسیار با ارزش از انواع مختلف محصولات طبیعی همچون اسیدهای چرب امگا ۳، ویتامین E، کلروفیل α و رنگدانه‌هایی مانند زیزانتین، کانتازانتین و آستازانتین به شمار می‌روند (٦،۷،۸). روغن استخراج شده از *N. oculata* برای استفاده به عنوان مکمل غذایی برای انسان توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (۹) توصیه و بی‌خطر بیان شده است. چندین مطالعه نشان داده است که *N. oculata* اثرات مفیدی بر خوش طعمی و هضم خوراک داشته و همچنین دارای خواص سم زدایی، آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطانی و محرک سیستم ایمنی نیز می‌باشد (۱۰،۱۱). اخیراً گونه‌های مختلف نانوکلروپسیس نتایج امیدوار کننده‌ای را در رابطه با بهبود عملکرد رشد در ماهیان از خود نشان داده‌اند (۱۲)

تغذیه در آبزی پروری بخش بسزایی از هزینه‌های تولید را به خود اختصاص می‌دهد و بنابر گزارش‌ها، سالانه ده‌ها میلیون تن غذای ماهی در سراسر جهان تولید می‌شود (۱۳). در ماهیان، سطح کل پروتئین های سرم نشان دهنده شاخص های زیستی حیاتی، شرایط تغذیه ای و سلامتی ماهی است (١٤). پروتئین کل در سرم ماهی بسته به عوامل مختلفی از جمله جیره غذایی، گونه ماهی، تغییرات آب و هوایی، مرحله بلوغ جنسی و دمای آب متفاوت است (۱۵). می‌توان گفت افزایش سطح پروتئین سرم نشان‌دهنده افزایش نرخ بقای ماهی و بهبود سیستم ایمنی است (١٦). اخیراً مشخص شده است افزودن جلبک نانوکلروپسیس به جیره ماهی باعث افزایش شاخص‌های پروتئین خون (پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و نسبت آلبومین به گلوبولین) می‌شود (۱۷). یکی دیگر از مواردی که می‌تواند به عنوان شاخصی مناسب برای بررسی پاسخ ماهی‌ها در برابر عوامل استرس‌زا مطرح باشد، شاخص‌های خونی مانند گلبول قرمز و گلبول سفید هستند که به عنوان اجزای اصلی سیستم ایمنی غیر اختصاصی شناخته می‌شوند (۱۸). جلبک نانوکلروپسیس به دلیل دارا بودن اسید چرب غیر اشباع امگا ۳ می‌تواند باعث تحریک اندام های خون ساز در بدن شود که در نهایت منجر به افزایش تعداد گلبول‌های قرمز می‌شود (۱۹). به‌طورکلی تحقیقات متعددی در رابطه با تأثیر ریزجلبک‌ها در جیره غذایی آبزیان وجود دارد. برای مثال در تحقیقی که توسط Carneiro و همکاران در سال ۲۰۲۰ در رابطه با اثرات جایگزینی ریزجلبک کلرلا با آرد ماهی بر رشد، عملکرد تولید مثلی، پارامترهای بیوشیمی و آنزیم‌های گوارشی در ماهی گورخری انجام گرفت؛ مشخص شد در پایان دوره ٦۰ روزه آزمایش، ماهیانی که جیره غذایی آن ها حاوی ٤۰ گرم در کیلوگرم جلبک کلرلا بود، رشد بهتر و قابل توجهی در مقایسه با گروه شاهد داشتند (۲۰). در آزمایش Gbadamosi و Lupatsch (۲۰۱۸) اثرات جیره غذایی واجد نانوکلروپسیس (*N. salina*) روی ماهی تیلاپیا نیل (*Oreochromis niloticus*) بررسی شد و در پایان آزمایش، مشخص شد تغذیه ماهی‌ها با نانوکلروپسیس سالینا باعث بهبود پروفایل اسیدهای چرب شده است و این جلبک می‌تواند به عنوان جایگزینی برای روغن ماهی و روغن سویا در جیره ماهی تیلاپیا استفاده شود (۲۱). همچنین در در تحقیقی که توسط Zahran و همکاران (۲۰۲۳) انجام شد، اثر تغذیه‌ای و ایمونولوژیک مکمل نانوکلروپسیس (*N. oculata*) در ماهی تیلاپیا بررسی شد و نشان داد استفاده از ۵ و ۱۰ درصد از این مکمل در جیره غذایی ماهی به مدت ۷ هفته باعث افزایش پروتئین خام کل بدن و شاخص های رشد ماهی تیلاپیا در هر دو گروه مکمل می شود (۲۲)

در مجموع، نانوکلروپسیس یک مکمل غذایی بسیار امیدوار کننده برای بهبود سلامت ماهی و پایداری تولید آبزی پروری است

ماهی گورخری یا گورخرماهی با نام علمی *Danio rerio* به دلیل سازگاری بالا و شرایط نگهداری آسان از ماهیان زینتی و آکواریومی محسوب می‌شود (۲۳) که دارای مزایای زیادی مانند تغذیه و نگهداری کم هزینه، تعداد زیاد نتاج، بلوغ جنسی سریع و شفافیت بدن جنین و لارو است (۲٤). این ویژگی‌ها سبب شده تا تحقیق روی این گونه ماهی علاوه بر صنعت ماهیان زینتی، در مطالعات زیست پزشکی نیز مفید باشد (۲۵). ماهی گورخری جزء حیوانات مدل بوده که اغلب برای تحقیقات پزشکی و دارویی استفاده می‌شوند (۲٦،۲۷). بنابراین در این تحقیق برای اولین بار اثرات سطوح مختلف ریزجلبک نانوکلروپسیس اکولاتا در جیره غذایی ماهی گورخری و اندازه‌گیری برخی شاخص‌های رشد، بازماندگی، فراسنجه‌های خونی و برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم در یک دوره آزمایشی ٥٤ روزه انجام شد. غذادهی به ماهیان دو نوبت در روز (صبح و ظهر) به میزان ٤ درصد وزن بدن ماهی‌ها انجام گرفت

مواد و روش ها

پیش از شروع آزمایش، طرح تحقیقاتی با شناسه IR.IAU.SRB.REC.۱٤۰۳.۰۲۳ مورد تصویب کارگروه/ کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اسلامی- واحد علوم و تحقیقات قرار گرفت و تمام کارهای آزمایشی روی گورخر ماهی در این مطالعه طبق رعایت پروتکل‌های اخلاق ملی/ بین المللی کار با حیوانات آزمایشگاهی و برای اهداف پژوهشی انجام شد

تهیه ماهی و شرایط پرورش

برای انجام این تحقیق تعداد ۳۱۵ عدد ماهی گورخری با میانگین وزن ۰/۰۲ ±۰/۲۵ گرم و میانگین طول ۲/۸ ±۰/۰٤ سانتی متر از یکی از مراکز تکثیر ماهی در رشت خریداری شد و به آزمایشگاه شیلات واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات (تهران) منتقل گردید. ماهی‌ها به طور تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار در ۹ آکواریوم پلاستیکی با ابعاد ٤۰×٥۰×٤۰ توزین شدند (۳۵ ماهی در هر مخزن). ماهی‌ها جهت سازگاری با محیط به مدت ۷ روز با جیره شاهد تغذیه شدند. در طول دوره پرورش فاکتورهای کیفی آب دو هفته یکبار و دمای آب هر هفته اندازه‌گیری شد (pH: ۰/۵ ± ۷/٦، اکسیژن محلول(میلی‌گرم در لیتر) ۰/۵ ± ٦/٤، درجه حرارت (°C): ۲۵/±۷/۳). دوره نوری پرورش به صورت ۱٤ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد. عملیات سیفون و جمع‌آوری فضولات به صورت روزانه انجام گرفت و هر بار ۵ لیتر آب تازه هم دمای محیط و بدون کلر برای هر آکواریوم جایگزین گردید.

تهیه جیره‌های آزمایشی

پرورش جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا در آزمایشگاه شیلات دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات انجام گرفت. استوک اولیه جلبک از شرکت رویان طب مکمل شاهوار تهیه شد و در ظروف پلاستیکی ۱۰ لیتری داخل محیط کشت ۲/f داخل ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تحت هوادهی شدید به مدت ۱٤ روز پرورش داده شد. برای برداشت جلبک از روش لخته سازی توسط FeCl۳ استفاده شد (۲۸). در پایان جلبک به مدت ۲٤ ساعت درون دستگاه فریز دراير (Germany ,٤-Christ Alpha۱) خشک گردید

برای انجام این آزمایش ۳ جیره غذای با پروتئین و چربی پیشنهاد شده برای ماهی گورخری (۲۹) فرموله شد (جداول ۱ و۲). به منظور بررسی اثر نانوکلروپسیس اکولاتا به جیره تیمار ۱ و ۲ به ترتیب میزان ۵ و ۱۰ درصد جلبک به جیره شاهد افزوده شد. پس از آسیاب کردن مواد اصلی، منابع چربی به جیره‌ها اضافه شد و توسط محلول آب گرم و ژلاتین به حالت خمیری در آمده، سپس چرخ گردید و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد خشک شده و تا زمان استفاده در ظروف پلاستیکی در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱. ترکیبات غذایی جیره‌های آزمایشی برای ماهی گورخری

ترکیبات جیره (%)	شاهد	5 درصد جلبک	10 جلبک	درصد
آرد گندم	18.61	14.94	11.27	
کنجاله سویا	5.10	5.10	5.10	
آرد ذرت	0.50	0.50	0.50	
آرد جو	15.08	15.08	15.08	
بذر کتان	8.74	8.74	8.74	
آرد ماهی	39.75	39.75	39.75	
روغن آفتابگردان	3.25	1.92	0.59	
روغن ماهی	3.97	3.97	3.97	
لسیتین	1	1	1	
روغن سوخته	0	0	0	
مکمل جلبکی	0	5	10	
مکمل ویتامینی*	1	1	1	
مکمل معدنی**	1	1	1	
ژلاتین	2	2	2	

* هر ۱۰۰۰ گرم پرمیکس ویتامینی حاوی ۱۶۰۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۴۰۰۰۰۰ IU ویتامین D۳، ۳۰ گرم ویتامین E، ۱۰۰ گرم تیامین، ۸ گرم ریبوفلاوین، ۸ گرم پیریدوکسین، ۳ گرم اسیدفولیک، ۰/۰۱ گرم سیانو کوبامالین، ۱۰۰ گرم ویتامین C، ۱۰ گرم ویتامین K۳، ۱۰ گرم بیوتین، ۲۰ گرم BHT و ۱۰۰ گرم ویتامین اینوزیتول می باشد.

** هر ۱۰۰۰ گرم پرومیکس معدنی حاوی ۲۰ گرم آهن، ۶۰ گرم روی، ۴۰۰ میلی گرم سلنیوم، ۲۰۰ میلی گرم کبالت، ۲ گرم مس، ۴۰ گرم منگنز و ۴۰۰ میلی گرم ید می باشد.

جدول۲ . ترکیبات تقریبی جیره‌های غذایی

	جیره‌های غذایی		
	شاهد	5 درصد جلبک	10 درصد جلبک
پروتئین (%)	32.46	32.28	32.50
چربی (%)	12.57	12.71	12.69
رطوبت (%)	7.13	7.04	7.10
خاکستر (%)	10.68	10.38	10.93
کربوهیدرات (%)	37.16	37.59	36.78

عملکرد رشد و بقاء

انجام عملیات زیست سنجی در روز اول و روز آخر آزمایش انجام گرفت. بدین صورت که از هر گروه آزمایشی ۳ ماهی توسط محلول ۲ درصد گل میخک بیهوش شدند (۳۰) و وزن آن‌ها توسط ترازو دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ و طول آن‌ها توسط خط‌کش با دقت ۱ میلی‌متر اندازه گرفته شد و ثبت گردید. در نهایت پارامترهای مربوط به رشد و تغذیه توسط فرمول‌های زیر محاسبه شد

افزایش وزن (گرم) = وزن نهایی (گرم) - وزن اولیه (گرم)

نرخ رشد ویژه (درصد/روز) = {(لگاریتم طبیعی وزن نهایی - لگاریتم طبیعی وزن اولیه)/تعداد روزهای آزمایش} ×۱۰۰

$$\text{شاخص وضعیت} = \frac{\text{وزن(گرم)}}{\text{طول کل(سانتی‌متر)}^3} \times 100$$

$$\text{بازماندگی (درصد)} = \frac{\text{تعداد نهایی ماهی}}{\text{تعداد اولیه ماهی}} \times 100$$

اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی

پس از اتمام دوره ۵۴ روزه آزمایش، بمنظور انجام عملیات خونگیری، ماهی‌ها به مدت ۲۴ ساعت قطع غذا شدند، سپس از هر آکواریم ۱۰ ماهی به صورت تصادفی جهت تهیه نمونه خون در مخلوط آب و یخ کاملاً بی حس شدند (۳۱) و پس از آن، قطع باله دمی انجام گرفت و در قسمت برش خورده جهت جلوگیری از انعقاد خون، یک قطره هپارین اضافه شد. هر ماهی از سمت دم داخل میکروتیوپ (انتهای یک میکروتیوپ بریده شد و داخل میکروتیوپ کامل فیکس شد) قرار گرفت (۳۲). سپس میکروتیوپ‌ها به مدت ۲ دقیقه با دور ۲۵۰۰ و دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد داخل دستگاه سانترفیوژ (Sigma 30k, Germany-3) سانترفیوژ شدند تا نمونه خون در انتهای اپندورف جمع گردد

برای شمارش گلبول‌های قرمز و سفید موجود در خون، ابتدا خون توسط محلول رقیق کننده نات (Natt-Herrick) رقیق گشت، سپس توسط لام هموسیتومتر نئوبار تعداد آن‌ها بر حسب میلی‌متر مکعب محاسبه گردید (۳۳). برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید، ابتدا گسترش خونی تهیه و سپس توسط محلول ۱۰ درصد گیمسا رنگ‌آمیزی لام‌ها انجام گرفت و در پایان لام ها زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی ۴۰× بررسی و انواع گلبول‌های سفید شامل لنفوسیت، مونوسیت، ائوزینوفیل و نوتروفیل به صورت زیگزاگ شمرده شد (۳۴)

تهیه نمونه سرم ماهی

جهت تهیه سرم ماهی، در پایان دوره آزمایش، ماهی‌ها به مدت ۲٤ ساعت قطع غذا شدند. تعداد ۵ ماهی از هر تکرار توسط محلول گل میخک ۲ درصد، بیهوش شدند (۳۰) سپس قطع سر و باله دمی به وسیله تیغ بیستوری انجام گرفت و محتویات شکمی ماهی‌ها تخلیه شد. در نهایت هریک از نمونه ها در هاون چینی همراه با ازت مایع کوبیده و خرد گردید و درون میکروتیوپ ریخته شد. به محتویات داخل میکروتیوپ میزان ۱۰۰ میکرولیتر بافر سیترات شامل ۱۵۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و ۳/۸ درصد سیترات سدیم، اضافه شد و میکروتیوپ به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سانترفیوژ (Sigma-۳ ۳۰k, Germany) با دور ۷۹۰۰ و دمای ۱۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در نهایت محلول دوفازی حاصل شد که فاز بالایی (سرم) برای انجام آزمایشات سرولوژی برداشت شد (۳۵)

اندازه گیری میزان پروتئین کل (Total protein) توسط کیت شرکت پارس آزمون به صوت فوتومتریک طبق روش Biuret انجام گرفت (۳٦). برای انجام آزمایش، نمونه همراه با معرف‌های موجود در کیت، داخل دستگاه فوتومتر (مدل ٦۰۰-AE ساخت شرکت EMRA کشور ژاپن) قرار داده شد و در طول موج ٥٤٦ نانومتر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد خوانش انجام شد

برای تعیین میزان آلبومین موجود در سرم، از کیت تشخیص شرکت من استفاده شد. آزمایش به روش رنگ سنجی با استفاده از بروموکرزول گرین (Bromocresol Green) توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Unico S۲۱۰۰UV, USA) در طول موج ٦۲۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۳۷). میزان گلوبولین از طریق روش محاسباتی و اختلاف بین پروتئین تام و آلبومین به دست آمد

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه، تمام آزمایشات با سه تکرار انجام گرفت و نتایج به صورت میانگین ± انحراف از معیار گزارش شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۱) و با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت. برای تعیین نرمال سازی داده‌ها از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف و برای برابری واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد. مقایسه بین میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد تعیین گردید. جهت ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel نسخه ۲۰۱۹ استفاده شد

نتایج

عملکرد رشد و تغذیه

با توجه به جدول ۳، اضافه کردن سطوح مختلف جلبک نانوکلروپسیس به جیره های آزمایشی، تأثیر معنی‌داری بر برخی از پارامترهای رشد و تغذیه ماهیان گورخری داشته است ($p<۰/۰۵$). طبق نتایج به دست آمده، بیشترین مقدار وزن نهایی و افزایش وزن در تیمار ۱۰ درصد جلبک نانوکلروپسیس مشاهده شد و کمترین وزن نهایی مربوط به گروه شاهد و ۵ درصد جلبک بود. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری طول کل ماهیان، شاخص وضعیت و درصد بازماندگی در تیمارهای مختلف، فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($p>۰/۰۵$). حداکثر میزان نرخ رشد ویژه در تیمار ۱۰ درصد جلبک ثبت شد، در حالیکه تیمار ۱۰ درصد جلبک دارای کمترین میزان ضریب تبدیل غذایی (۰/۸۹±۰/۰۲) بود ($p<۰/۰۵$)

جدول ۳. میانگین شاخص‌های رشد و بازماندگی در ماهیان گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا

پارامترها	سطوح مختلف ریزجلبک (درصد)		
	0 (شاهد)	5	10
وزن اولیه (گرم)	0.23 ±0.04 a	0.25 ±0.01 a	0.23 ±0.02 a
وزن نهایی (گرم)	1.83 ±0.14 b	1.83 ±0.14 b	2.20 ±0.19 a
افزایش وزن (گرم)	1.59 ±0.13 b	1.58 ±0.15 b	1.97 ±0.22 a
طول کل نهایی (میلی متر)	0.80 ±0.10 a	0.97 ±0.06 a	0.97 ±0.06 a
نرخ رشد ویژه (درصد/روز)	3.70 ±0.25 b	3.57 ±0.17 b	3.86 ±0.35 a
ضریب تبدیل غذایی	1.01 ±0.08 a	1.02 ±0.09 a	0.89 ±0.02 b
بازماندگی (درصد)	88.57 ±5.71 a	87.62 ±5.95 a	86.67 ±4.36 a
شاخص وضعیت	4.28 ±0.53 a	3.73 ±0.47 a	4.48 ±0.58 a

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف از معیار می‌باشد.

تغییرات فراسنجه‌های خونی

نتایج و اثرات افزودن سطوح مختلف جلبک نانوکلروپسیس به جیره ماهیان گورخری در جدول ٤ ارائه شده است. با توجه به این نتایج، مشاهده شد که افزودن جلبک نانوکلروپسیس به جیره غذایی، هیچگونه اختلاف معنی‌داری در رابطه با تعداد گلبول‌های سفید و قرمز در بین تیمارها ایجاد نکرده است ($p>0/05$). همچنین در شمارش افتراقی گلبول های سفید نیز بین تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک و گروه شاهد هیچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$)

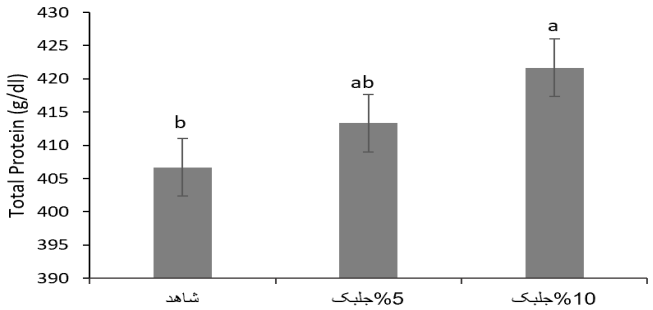
جدول ٤.تغییرات فراسنجه‌های خونی در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا

پارامترها	سطوح مختلف ریزجلبک (درصد)		
	0 (شاهد)	5	10
WBC ($mm^3 \times 10^3$)	6.30 ±0.06 a	6.4 ±0.05 a	6.46 ±0.05 a
RBC ($mm^3 \times 10^6$)	1.32 ±0.03 a	1.30 ±0.05 a	1.35±0.05a
لنفوسیت (درصد)	83.00 ±2.00 a	81.67±2/89 a	84.67 ±1.53 a
مونوسیت (درصد)	4.67 ±0.58 a	4.00 ±1.00 a	3.67 ±1.15 a
نوتروفیل (درصد)	11.67 ±1.53 a	11.67 ±1.53 a	11.33 ±0.58 a
ائوزینوفیل (درصد)	0.33 ±0.58 a	1.67 ±0.58 a	0.33 ±0.58 a

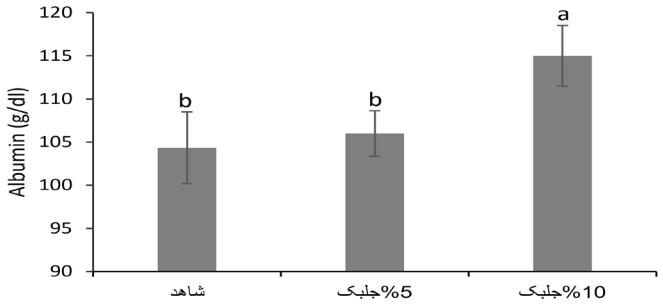
حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد و داده‌ها بصورت میانگین ± انحراف معیار می‌باشد.
WBC: تعداد گلبول‌های سفید، RBC: تعداد گلبول‌های قرمز.

برخی پارامترهای بیوشیمیایی سرم

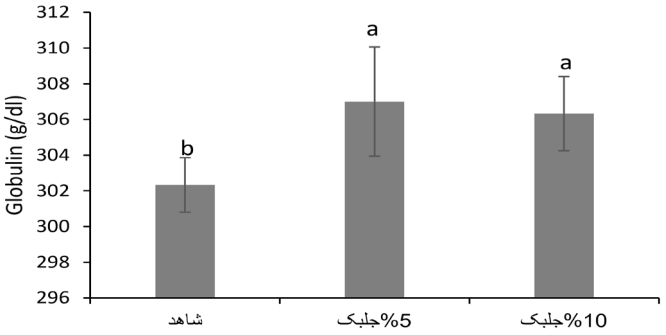
همانطور که در شکل ۱ قابل مشاهده است، میزان پروتئین تام در بین تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<0/05$). بیشترین میزان پروتئین کل متعلق به تیمار ۱۰٪ جلبک بود (٥/٥١ ± ٤٢١/٦٧ گرم بر دسی‌لیتر) و کمترین میزان آن در گروه شاهد مشاهده گردید (٥/٦٩ ± ٤٠٦/٦٧ گرم بر دسی‌لیتر)



شکل ۱.تغییرات میزان پروتئین کل (g/dl) سرم گورخرماهی تغذیه شده با سطوح مختلف ریزجلبک نانوکلروپسیس در پایان دوره آزمایش



شکل ۲.تغییرات میزان آلبومین (g/dl) سرم گورخرماهی تغذیه شده با سطوح مختلف ریزجلبک نانوکلروپسیس تیمارهای مختلف در پایان دوره



شکل ۳.تغییرات میزان گلوبولین (g/dl) سرم گورخرماهی تغذیه شده با سطوح مختلف ریزجلبک نانوکلروپسیس تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش

با توجه به شکل ۲، بیشترین میزان آلبومین در تیمار ۱۰٪ جلبک مشاهده شد (۳/۵۱ ± ۱۱۵ گرم بر دسی‌لیتر) که با سایر تیمار ها دارای اختلاف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). در تیمار تغذیه شده با ۵٪جلبک نانوکلروپسیس، میزان آلبومین نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است. با این حال میزان آن در این دو گروه فاقد اختلاف معنی‌دار است (p>۰/۰۵)

طبق نتایج به دست آمده، افزایش میزان گلوبولین در تیمارهای ۵ و ۱۰ درصد جلبک نانوکلروپسیس نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید (شکل ۳) (p<۰/۰۵)

بحث

استفاده از مکمل‌های غذایی در جیره آبزیان اثر مطلوبی بر عملکرد رشد و افزایش مقاومت آبزیان در برابر عوامل استرس‌زا و بیماری‌زا می‌گذارد (۳۸). از مهم‌ترین مواردی که در آبزی‌پروری باید به آن توجه شود، استفاده از جیره‌های غذایی با کیفیت بالا و و مقرون به صرفه از نظر اقتصادی است که بتواند در عین حال که نیازهای تغذیه‌ای ماهی را برطرف می‌کند، منجر به کاهش هزینه‌های تولید گردد (۳۹). یکی از راه‌های اصلی برای افزایش کیفیت خوراک مورد استفاده ماهیان، گنجاندن انواع ریزجلبک‌ها به عنوان مکمل غذایی به جیره‌های مصرفی است (٤٠). در این مطالعه بررسی نتایج آزمایش مربوط به عملکرد رشد و بقاء نشان داد، وزن نهایی، میزان افزایش وزن و میزان نرخ رشد ویژه در تیمار تغذیه شده با ۱۰ درصد جلبک نانوکلروپسیس نسبت به گروه شاهد و تیمار تغذیه شده با ۵ درصد جلبک نانوکلروپسیس افزایش یافته و دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشد. مشاهده نتایج فوق احتمالاً به دلیل تأثیر تحریک تولید هورمون‌های رشد توسط جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا موجود در جیره گورخر ماهی می باشد (٤١). به علاوه جلبک نانوکلروپسیس حاوی مقادیر زیاد از ایکوزا پنتانوئیک اسید (EPA) می‌باشد که افزودن این جلبک به جیره ماهی سبب تبدیل EPA به دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) از طریق فعالیت الانگاز و دسچوراز می‌شود که این امر باعث رفع نیازهای گونه‌های مختلف آبزی به DHA می‌شود (٤٢). اسیدهای چرب لینولنیک و DHA تجزیه پذیری مواد مغذی را فعال می‌کنند، که این می‌تواند بهبود عملکرد سلامت و رشد ماهی را به همراه داشته باشد (٤٣)

در مطالعه Qiaoو همکاران (۲۰۱۹) طبق نتایج به دست آمده از این آزمایش مشخص شد، با افزایش میزان نانوکلروپسیس و جایگزین کردن آن با آرد ماهی در جیره لارو سرماهی، افزایش وزن نسبت به گروه شاهد اتفاق افتاد که در آزمایش حاضر نیز شاهد این بهبود بوده و درنتیجه نتایج دو پژوهش با یکدیگر مطابقت دارد (٤٤). همسو با نتایج به دست آمده از این آزمایش، نتایج تحقیقاتی که توسط El-Dahhar وهمکاران (۲۰۱٤) انجام گرفت نشان داد افزودن جلبک نانوکلروپسیس با میزان ۲۱ درصد به جیره بچه ماهی کفال خاکستری به‌طور قابل توجهی عملکرد رشد، مصرف خوراک و وضعیت سلامت را بهبود بخشید (٤٥). همچنین مطابق با نتایج این مطالعه، در آزمایش انجام گرفته توسط Abd El-Gany و همکاران در سال ۲۰۲۰ نتایج نشان داد تیمار ماهیان تیلاپیا تغذیه شده با ۵ درصد جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا بیشترین میزان رشد را نسبت به گروه شاهد داشته اند (۱۷).

در این تحقیق با توجه به نتایج به دست آمده از آزمایش فراسنجه‌های خونی، بین تیمارهای تغذیه شده با جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا و گروه شاهد هیچ اختلاف معنی‌دار آماری در تعداد اریتروسیت‌ها و لوکوسیت‌ها مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای که نراقی و همکاران (۱۳۹۷) در رابطه با اثر مکمل غذایی جلبک نانوکلروپسیس بر ماهی قزل‌آلای رنگین کمان داشتند، همسو با نتایج این آزمایش، مشخص شد تعداد گلبول‌های سفید در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار نداشته است اما در ارتباط با گلبول‌های قرمز، بیشترین تعداد در تیمار تغذیه شده با ۱۵ درصد جلبک نانوکلروپسیس مشاهده شد که با نتایج آزمایش حال حاضر مطابقت ندارد که این می‌تواند به علت استفاده از مقدار بیشتر جلبک و همچنین تفاوت گونه ماهی آزمایشی باشد (٤٦). با این حال طبق نتایج آزمایش Kagan و Matulka (۲۰۱۵)، مطابق نتایج به دست آمده از این تحقیق افزودن ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم جلبک نانوکلروپسیس به جیره غذایی موش‌های نر و ماده باعث به وجود آمدن اختلاف معنادار در تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به گروه شاهد نشده است (٤٧)

در ماهیان اندازه‌گیری میزان غلظت آلبومین و گلوبولین موجود در خون جهت ارزیابی چگونگی اثرگذاری مواد مغذی موجود در جیره بر ایمنی آن‌ها می‌باشد و یک ابزار تشخیصی است که تا حدودی منعکس کننده سلامت ماهی، سلامت کبد و شرایط استرس است (٤٨). نتایج حاصل از آزمایش، پارامترهای بیوشیمیایی سرم در ماهیان گورخری نشان دهنده افزایش معنی‌دار میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در تیمارهایی است که جیره غذایی آن‌ها واجد مکمل جلبک نانوکلروپسیس اکولاتا نسبت به گروه شاهد می باشد. در واقع افزایش سطح پروتئین سرم در ماهی نشان‌دهنده بهبود سیستم ایمنی است (١٦) این امر می‌تواند به علت سطوح بالای پروتئین، اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین ها، مواد

مـــواد معدنی، فســـفولیپیدها و آنتی اکســـیدان های موجود در نانوکلروپســـیس باشـــد کـــه باعث افزایـــش قابل توجهی در میـــزان پروتئیـــن کل می‌شـــود (۴۹). همســـو بـــا نتایج ایـــن آزمایش، Abbas و همکاران در ســـال ۲۰۲۰ آزمایشـــی بـــر روی ماهـــی تیلاپیا انجـــام دادند که طبق نتایج، ســـطح پروتئین تـــام، آلبومین و گلوبولین در سرم تیمار تغذیه شـــده بـــا ۵ درصـــد جلبک کلرلا ولگاریس نســـبت به گروه شـــاهد افزایش معنی‌داری داشـــت (۵۰). همچنین Simanjuntak و همـــکاران (۲۰۱۸)، با تحقیق روی تأثیر جیـــره غذایی حاوی ســـطوح مختلف مکمل غذایی جلبک اســـپیرولینا پلاتنسیس بـــر ماهـــی گورامـــی به ایـــن نتیجه رســـیدند کـــه افزودن مکمـــل جلبکی بـــه جیـــره ماهیان باعـــث افزایـــش میزان پروتئیـــن کل، آلبومین و گلوبولین نســـبت به گروه شـــاهد می‌شـــود کـــه نتایج حاصل از ایـــن آزمایش بـــا مطالعه حال حـــاضر مطابقت داشـــت (۱۶). به همین ترتیـــب، Yeganeh و همـــکاران (۲۰۱۵) گـــزارش کردنـــد که افـــزودن ۱۰ درصد جلبک اســـپرولینا پلاتنســـیس به جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان ســـبب افزایش ســـطوح آلبومیـــن در این تیمار نســـبت به گروه شـــاهد می‌شـــود که ایـــن تایج بـــا نتایج حاصـــل از مطالعه حاضر منطبق اســـت (۵۱)

نتیجه گیری

بـــا توجه بـــه نتایج به دســـت آمـــده، اکثر عوامل رشـــد در ماهیـــان گورخـــری تغذیه شـــده بـــا ۱۰ درصـــد ریزجلبک نانوکلروپســـیس نســـبت به گروه شـــاهد بهبود یافته است، بطوریکـــه می‌تـــوان افزایش معنـــی‌دار وزن نهایـــی، میزان افزایش وزن و نرخ رشـــد ویـــژه را در این تیمار نســـبت به ســـایر تیمارها مشـــاهده کرد. همچنین نتایج میزان پروتئین تـــام، آلبومین و گلوبولیـــن نیز در هر دو تیمار تغذیه شـــده با ســـطوح مختلف نانوکلروپســـیس نســـبت به تیمار شاهد افزایش یافتـــه بود. در نهایت پیشـــنهاد می‌شـــود تحقیقات تکمیلـــی در رابطه با بررســـی اثر ریزجلبک نانوکلروپســـیس بـــر فاکتـــور هـــای ایمنـــی و آنزیم‌هـــای گوارشـــی ماهی گورخـــری نیز انجام شـــود

تقدیر و تشکر

بدین وســـیله از همکاری پرســـنل مـــحترم مجتمع آزمایشـــگاهی رازی دانشـــگاه آزاد اسلامی واحـــد علوم و تحقیقـــات به ویژه مســـئول محترم آزمایشـــگاه شـــیلات، آقای مهنـــدس حمید فتحعلیـــان، تشـــکر و قدردانی به عمـــل می‌آید

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند هیچ تعارض منافعی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

1. Paterson S, Gómez-Cortés P, de la Fuente MA, Hernández-Ledesma B. Bioactivity and digestibility of microalgae *Tetraselmis* sp. and Nannochloropsis sp. as basis of their potential as novel functional foods. Nutrients. 2023; 15(2):477. doi.org/10.3390/nu15020477

2. Saadaoui I, Rasheed R, Aguilar A, Cherif M, Al Jabri H, Sayadi S, Manning SR. Microalgal-based feed: promising alternative feedstocks for livestock and poultry production. Journal of Animal Science and Biotechnology. 2021; 12(1):76. doi.org/10.1186/s40104-021-00593-z

3. El-Sayed M, El-Azzazi F, Khalil H, El-Gayar M. Using marine algae *(Nannochloropsis oculata)* as natural feed additives to improve reproductive performance in rabbits. Journal of Animal, Poultry & Fish Production. 2022; 11:15–23. doi.org/10.21608/japfp.2022.284089

4. Mohammadi M, Kazeroni N, Baboli MJ. Fatty acid composition of the marine micro alga *Tetraselmis* chuii Butcher in response to culture conditions. J. Algal. Biomass Utln. 2015; 6:49-55.

5. Rodolfi L, Zittelli GC, Barsanti L, Rosati G, Tredici MR. Growth medium recycling in Nannochloropsis sp. mass cultivation. Biomolecular engineering, 2003; 20(4-6):243-248. doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00063-7

6. Lubián LM, Olimpio M, Ignacio MG, Huertas IE, Sobrino C, Manuel Gonzálezdel V, Griselda P. *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as source of commercially valuable pigments. Journal of Applied Phycology. 2000; 12(10): 249-255. doi.org/10.1023/A:1008170915932

7. Rebolloso-Fuentes MM, Navarro-Pérez A, García-Camacho F, Ramos-Miras JJ, Guil-Guerrero JL. Biomass nutrient profiles of the microalga Nannochloropsis. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2001; 49(6):2966-2972. doi.org/10.1021/jf0010376

8. Durmaz Y. Vitamin E (αtocopherol) production by the marine microalgae Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. Aquaculture. 2007; 272(1-4):717-722. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.213

9. FDA, US Food and Drug Administration New Dietary Ingredient Notification Report #826, 2015

10. Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SMD, Fett R. Microalgas, produtos e aplicações. Ciência Rura. 2006; 36:1959-1967. doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050

11. Colla LM, Furlong EB, Costa JAV. Antioxidant properties of Spirulina *(Arthospira)* platensis cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. Brazilian archives of biology and technology. 2007; 50:161-167. doi.org/10.1590/S1516-89132007000100020

12. Ayala MD, Balsalobre N, Chaves-Pozo E, Sáez MI, Galafat A, Alarcón FJ, Martínez TF, Arizcun M. Long-Term Effects of a Short Juvenile Feeding Period with Diets Enriched with the Microalgae Nannochloropsis gaditana on the Subsequent Body and Muscle Growth of Gilthead Seabream, Sparus aurata L. Animals. 2023; 13(3):482. doi.org/10.3390/ani13030482

13. Kheradpir N, Yousefi S, Tavassoli SP, Shokraneh N. Evaluation of chemical composition of seven invertebrate species for applying in poultry and fish nourishment. Iranian Journal of Biological sciences. 2018; 2(13):19-28. doi.org/20.1001.1.17354226.1397.13.2.3.7

14. Patriche T, Patriche N, Tenciu M. Cyprinids total blood proteins determination. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies. 2009; 42(2):95-95.

15. Ponsen S, Narkkong NA, Pamok S, Aengwanich W. Comparative hematological values, morphometric and morphological observation of the blood cell in capture and culture Asian Eel, *Monopterus* albus (Zuiew). American Journal of Animal and Veterinary Science. 2009; 4(2):32-36.

16. Simanjuntak SBI, Indarmawan I, Wibowo ES. Impact of fed containing different levels of diets supplementation Spirulina platensis on growth, haematological, body composition and biochemical parameters, of Gurami *(Osphronemus gouramy)*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2018; 18(5):681-690. doi.org/10.4194/1303-2712-v18_5_04

17. Abdelghany MF, El-Sawy HB, Abd El-hameed S., Khames MK, Abdel-Latif HM, Naiel MA. Effects of dietary *Nannochloropsis oculata* on growth performance, serum biochemical parameters, immune responses, and resistance against Aeromonas *veronii* challenge in Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)*. Fish & shellfish immunology. 2020; 107:277-288. doi.

.org/10.1016/j.fsi.2020.10.015

18. Ahmadifar E, Takami GA, Sudagar M. Growth performance, survival and immunostimulation, of Beluga (Huso huso) juvenile following dietary administration of alginic acid (ergosan). Pakistan Journal of Nutrition. 2009; 8(3):227-232. doi.org/10.3923/pjn.2009.227.232

19. Mohammed B, Elzubeir AM, Elmahdi T. Assessment the Effect of Omega-3 Fatty Acid Supplementation in Sudanese patients with Sickle Cell Anemia; Khartoum, Sudan. International Journal of Multidisciplinary and Current Research. 2014; 7:133-138.

20. Carneiro WF, Castro TFD, Orlando TM, Meurer F, de Jesus Paula DA, Virote BDCR, Vianna ARDCB, Murgas LDS. Replacing fish meal by Chlorella sp. meal: effects on zebrafish growth, reproductive performance, biochemical parameters and digestive enzymes. Aquaculture. 2020; 528:735612. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735612

21. KGbadamosi O, Lupatsch I. Effets of dietary *Nannochloropsis* salina on the nutritional performance and fatty acid profile of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Algal Research. 2018; 33:48-54. doi.org/10.1016/j.algal.2018.04.030

22. Zahran E, Elbahnaswy S, Ahmed F, Ibrahim I, AKhaled A, AEldessouki E. Nutritional and immunological evaluation of Nannochloropsis oculate as apotential Nile tilapia-aquafeed supplement. BMC Veterinary Research. 2023; 19(1):65-83. doi.org/10.1186/s12917-023-03618-z

23. Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. The behavior and ecology of the Zebrafish, Danio rerio. Biological Rev. 2008; 83 (1): 13-34. doi.org/10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x

24. Asaoka Y, Terai S, Sakaida I, Nishina H. The expanding role of fish models in understanding non-alcoholic fatty liver disease. Disease models & mechanisms. 2013; 6(4):905-914. doi.org/10.1242/dmm.016022

25. Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. Zebrafish. 2007; 4(1):21-40. doi.org/10.1089/zeb.2006.9997

26. Wang S, Miller SR, Ober EA, Sadler KC. Making it new again: insight into liver development, regeneration, and disease from zebrafish research. Current topics in developmental biology. 2017; 124:161-195. doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.11.012

27. Salmi TM, Tan VW, Cox AG. Dissecting metabolism using zebrafish models of disease. Biochemical Society Transactions. 2019; 47(1):305-315. doi.org/10.1042/BST20180335

28. Knuckey RM, Brown MR, Robert R, Frampton DM. Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds. Aquacultural Engineering. 2006; 35(3):300-313. doi.org/10.1016/j.aquaeng.2006.04.001

29. Riki F, Sudagar M, Paknejad H, Yousefi Siyahkalrudy S. The effect of different levels of dietary protein and lipid on growth indices and reproductive performance in zebrafish (Danio rerio). Journal of Animal Physiology and Development (Quarterly Journal of Biological Sciences). 2019; 12(2):51-62.

30. Murtha JM, Keller ET. Characterization of the heat shock response in mature zebrafish *(Danio rerio)*. Experimental Gerontology. 2003; 38(6):683-691. doi.org/10.1016/S0531-5565(03)00067-6

31. Wallace CK, Bright LA, Marx JO, Andersen RP, Mullins MC, Carty AJ. Effectiveness of rapid cooling as a method of euthanasia for young zebrafish (Danio rerio). Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. 2018; 57(1):58-63.

32. Babaei F, Ramalingam R, Tavendale A, Liang Y, Yan LSK, Ajuh P, Cheng SH, Lam YW. Novel blood collection method allows plasma proteome analysis from single zebrafish. Journal of Proteome Research. 2013; 12(4):1580-1590. doi.org/10.1021/pr3009226

33. Bullis RA. Clinical pathology of temperate freshwater and estuarine fishes. fish medicine. WB Sanders Co., Philadelphia. 1993: 232-239.

34. Brown BA. Hematology: principles and procedures. Philadelphia: Lea and Febiger; 1993.

35. Blaxhall PC, Daisley KW. Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology. 1973; 5(6): 771 –781. doi.org/10.1111/j.1095-8649.1973.tb04510.x

36. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz textbook of clinical chemistry. Philadelphia, 1999:1654-5.

37. Doumas BT, Watson WA, Biggs HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. Clinica chimica acta. 1971; 31(1):87-96. doi.org/10.1016/0009-8981(71)90365-2

38. Lara-Flores M, Olvera-Novoa MA,

Guzmán-Méndez BE, López-Madrid W. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia *(Oreochromis niloticus)*. Aquaculture. 2003; 216(1-4):193-201. doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00277-6

39. Zarif Manesh T, Zoreih Zahra S. (2012). Sustainable development, Persistent Future. The first national conference of solutions for access to Sustainable development in deferent sections of agriculture, natural resources and environment. March 2012, Tehran, Iran.

40. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae–A review. Journal of Algal Biomass Utilization. 2012; 3(4):89-100.

41. Chen HL, Li SS, Huang R, Tsai HJ. Conditional production of a functional fish growth hormone in the transgenic line of Nannochloropsis oculata (Eustigmatophyceae) 1. Journal of Phycology. 2008; 44(3):768-776. doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00508.x

42. Wang Q, Feng Y, Lu Y, Xin Y, Shen C, Wei L, Liu Y, Lv N, Du X, Zhu W, Jeong BR. Manipulating fatty-acid profile at unit chain-length resolution in the model industrial oleaginous microalgae Nannochloropsis. Metabolic Engineering. 2021; 66:157-166. doi.org/10.1016/j.ymben.2021.03.015

43. Yadav AK, Rossi Jr W, Habte-Tsion HM, Kumar V. Impacts of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) level and ratio on the growth, fatty acids composition and hepatic-antioxidant status of largemouth bass (Micropterus salmoides). Aquaculture. 2020; 529:735683. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735683

44. Qiao H, Hu D, Ma J, Wang X, Wu H, Wang J. Feeding effects of the microalga Nannochloropsis sp. on juvenile turbot (Scophthalmus maximus L.). Algal Research. 2019; 41:101540. doi.org/10.1016/j.algal.2019.101540

45. El-Dahhar AA, Salama ME, Moustafa YT, Elmorshedy EM. Effect of using algae (Nannochloropsis Oculata) in grey mullet (Liza Ramada) larval diets on growth performance and feed utilization. Arabian Aquaculture society. 2014; 374(3354):1-14.

46. Naraghi M, Shamsaeie Mehrgan M, Rajabi Islami H, Hosseini Shekarabi SP. Effect of dietary supplementation of Nannochloropsis oculata powder on some hematological indices of rainbow trout fingerling. Iranian Scientific Fisheries Journal. 2018; 27(6):105-113. doi.org/10.22092/ISFJ.2019.118400

47. Kagan ML, Sullivan Jr DW, Gad SC, Ballou CM. Safety assessment of EPA-rich polar lipid oil produced from the microalgae Nannochloropsis oculata. International Journal of Toxicology. 2014;33(6):459-74. doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.008

48. Wiegertjes GF, Stet RM, Parmentier HK, van Muiswinkel WB. Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. Developmental & Comparative Immunology. 1996; 20(6):365-381. doi.org/10.1016/S0145-305X(96)00032-8

49. Schulze PS, Pereira HG, Santos TF, Schueler L, Guerra R, Barreira LA, Perales JA, Varela JC. Effect of light quality supplied by light emitting diodes (LEDs) on growth and biochemical profiles of Nannochloropsis oculata and Tetraselmis chuii. Algal research. 2016; 16:387-398. doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.034

50. Abbas N, El-shafei R, Zahran E, Amer M. Some pharmacological studies on Chlorella vulgaris in tilapia fish. Kafrelsheikh Veterinary Medical Journal. 2020; 18(1):6-9. doi.org/10.21608/kvmj.2020.109063

51. Yeganeh S, Teimouri M, Amirkolaie AK. Dietary effects of Spirulina platensis on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Research in Veterinary Science. 2015; 101:84-8. doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.06.002