



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 3, 2023, pages: 49-64
DOI: 10.22124/janb.2024.26281.1228



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

The effect of using red algae powder on growth indices, some serum and mucus indices, and mucus protein patterns in common carp (*Cyprinus carpio*) fry

Fatemeh Abdollahnejad, Seyed Hossein Hosseinifar*, Hamed Paknejad, Abdolmajid Hajimoradloo, Mohammadreza Imanpoor

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran

Received 27 July 2023

Revised 17 September 2023

Accepted 19 September 2023

KEYWORDS

Red algae
Growth
indicators
Protein pattern
Non-specific
immunity
Common carp

ABSTRACT

Introduction

Nutrition plays an important role in the functioning of the immune system and resistance to diseases. As a result, feeding and nutritional management are very sensitive and important. Nowadays, the use of substances that stimulate immunity and growth in the diet of aquatic animals is very important. The main reason for using these stimulants is their benefits, which include increasing growth, reducing food loss, increasing production, and obtaining a high-quality product. On the other hand, immune stimulants are added as supplements to the diet of aquatic animals and are used to prevent disease and improve the food conversion ratio. Seaweeds have high quantity of vitamins, minerals, protein, carotenoids, fiber, and essential fatty acids. In addition to being used as food, algae can have industrial, cosmetic, and medical uses. Algae have great economic importance due to having valuable polysaccharides such as agar, carrageenan, and alginates. Studies have shown that the use of dried algae as an immune stimulant in the aquaculture industry improves the physiological responses of fish to stress and disease, and as an immune stimulant in aquaculture, they increase growth, food efficiency, and biochemical quality of carcasses in various aquatic animals. The genus *Gracilaria* from the family Gracilariaceae is the largest genus from the Rhodophyta branch. They have a wide distribution worldwide and have been seen in polar, equatorial, and Mediterranean regions. However, there are limited studies regarding the use of *Gracilaria gracilis* algae powder in aquaculture. Considering the importance of common carp as one of the most important aquaculture species, the present study aims to investigate using different levels of *G. gracilis* algae powder in the diet and its effect on growth performance as well as some serum and skin mucus parameters in common carp.

Materials and Methods: This research was conducted for seven weeks in Shahid Nasser Fazli Barabadi Aquaculture Lab of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. In this experiment, common carp fry with an average weight of 19 g was used. The fish were adapted for two weeks and then kept in 12 fiberglass tanks (4 treatments 0, 0.25, 0.5 and 1% *G. gracilis* powder) with a density of 15 fish. The added ingredient in the diet was *G. gracilis* powder, supplied from South Iran. In this experiment, the basal diet was commercial extruded food size FFC from Faradaneh Company, Shahrekord, Iran and then the required amounts of *G. gracilis* algae (2.5, 5, and 10 g/kg) were mixed with the ingredients and made into the pellets. To investigate growth factors, the length and weight of all fish were measured. Fish mucus samples and blood samples were also collected. Data analysis and determination of significant levels were performed using SPSS 16 software and Duncan's statistical test with a confidence level of 95% and One-Way ANOVA test.

Results: This research showed that the weight at the end of the period, the specific growth rate, and the food conversion ratio were not significantly different between the treatments containing red algae powder and the control group ($p>0.05$). Statistical analysis of the results showed no significant difference between the serum total immunoglobulin and total protein levels in the treatments fed with *G. gracilis* powder and the control group ($p>0.05$). The same results were noticed in case of skin mucus total immunoglobulin and total protein levels ($p>0.05$)

Discussion: The results showed that adding *G. gracilis* powder (0.25, 0.5 and 1%) has no significant effect on growth and immune indices compared to the control group. The effect of adding herbal supplements to the diet on growth performance differs according to factors such as appropriate concentration, diet composition, and rearing management. Also, fish species, life stages, and experimental conditions are effective on growth performance results. The lack of significant difference between different levels of *G. gracilis* powder and the control group may be related to these reasons.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments: This research has been done with the support of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran and in the form of a MSc. Dissertation. The authors would like to thank the efforts of the experts at Aquaculture Lab.

*Corresponding author: Hoseinifar@gau.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

اثر استفاده از پودر جلبک قرمز بر شاخص‌های رشد، برخی از شاخص‌های سرم و موکوس و الگوی پروتئینی موکوس در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

فاطمه عبدالله نژاد، سید حسین حسینی فر*، حامد پاک نژاد، عبدالمجید حاجی مرادلو، محمدرضا ایمانپور
گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۲۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۵/۰۵

کلمات کلیدی

چکیده

هدف از این تحقیق، بررسی اثرات استفاده از پودر جلبک قرمز بر شاخص‌های رشد، مصرف جیره و شاخص‌های سرم و موکوس و الگوی پروتئینی موکوس در بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بود. به این منظور، بچه‌ماهی‌های کپور معمولی به مدت ۷ هفته با جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف (صفر) (شاهد) ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱٪ پودر جلبک قرمز تغذیه شدند. شاخص‌های رشد (میانگین وزن، نرخ رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و میزان بقا) بین ماهی‌های تغذیه شده با پودر جلبک *Gracilaria gracilis* در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). ایمونوگلوبولین کل سرم در تیمار تغذیه شده با پودر جلبک *G. gracilis* در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). ایمونوگلوبولین کل و میزان پروتئین کل موکوس در تیمار تغذیه شده با پودر جلبک *G. gracilis* در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). در بررسی الگوی پروتئینی موکوس هم تراکم باندهای پروتئینی و ایجاد باندهای جدید بین تیمارها و شاهد تفاوت مشاهده شد. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، به کارگیری ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱٪ پودر جلبک *G. gracilis* تأثیر مثبتی بر شاخص‌های رشد و ایمنی غیراختصاصی سرم و موکوس نداشت. نظر به نتایج کسب شده و عدم تأثیر این میزان از پودر جلبک قرمز بر شاخص‌های رشد و برخی از فراسنجه‌های ایمنی غیراختصاصی سرم و موکوس و نیز اثرات مشاهده شده بر الگوی پروتئینی موکوس به نظر می‌رسد که تحقیقات بیشتری برای روشن شدن جنبه‌های مختلف اثرگذاری جلبک *G. gracilis* در پرورش ماهی کپور نیاز است.

مقدمه

قطبی، استوائی و مدیترانه‌ای دیده شده است (Hosseini, 2013). جلبک قرمز گراسیلاریا دوپایه است (Martinez et al. 1999) و به صورت شگفت‌انگیزی محتوای ژن اجدادی را در ژنوم پلاستید خود حفظ کرده است و به همراه دیگر جلبک‌های قرمز، شامل مجموعه‌ای از کامل‌ترین ژن پلاستید شناخته شده در یوکاریوت‌های فتوسنتتیک است (Hagopian et al. 2004). جلبک‌های قرمز با تابش مستقیم نور خورشید رنگ قرمز خود را از دست داده و به رنگ سبز درمی‌آیند (Ghahreman, 2009). رنگ جلبک قرمز به دلیل دارا بودن رنگدانه‌های محلول در آب به نام فیکوبیلین است که معمولاً به رنگ قرمز بوده، اما بعضی اوقات به رنگ سبز تیره تا روشن یا حتی قهوه‌ای تیره یا سیاه نیز ظاهر شده و در مناطق جزر و مدی کم عمق ساحلی یافت می‌شوند (Gan, 1999). بیشتر از ۵۳٪ آگار تولید شده در جهان از جلبک گراسیلاریا حاصل می‌شود. آگار شامل دو پلی ساکارید به نام آگارز و آگاروپکتین است. خاصیت ژلاتینی آگار به دلیل وجود ترکیب آگارز بوده، در صورتی که ترکیب آگاروپکتین خاصیت چسبندگی به وجود می‌آورد (Rezaei and Jaimand, 1997).

جلبک *Gracilaria gracilis* درشت‌جلبکی چندساله است و به راحتی از اندام نگهدارنده بازسازی می‌شود (Steentoft and Farnham, 1997). دمای بهینه برای رشد این گونه مشابه با گونه‌های *Gracilaria bursa-pastoris* و *G. multipartita* است، اما برخلاف *G. bursa-pastoris* و *G. multipartita*، جلبک *G. gracilis* نه تنها توانایی زنده ماندن در ۵ درجه سانتی‌گراد را دارد، بلکه در ۵ درجه سانتی‌گراد دارای رشد هم هست؛ یعنی پایین‌ترین دمای رشد آن ۵ درجه سانتی‌گراد و بالاترین دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد است؛ اما دمای بهینه رشد آن از ۱۶ درجه سانتی‌گراد شروع شده و تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد ادامه می‌یابد که در ۲۰ درجه سانتی‌گراد در بهترین وضعیت رشدی قرار می‌گیرد (Gorshkov, 1997).

مطالعات محدودی در خصوص به‌کارگیری پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در آبزی‌پروری وجود دارد. با توجه به اهمیت ماهی کپور معمولی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های آبزی‌پروری، مطالعه حاضر با هدف بررسی به-کارگیری سطوح مختلف پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس

صنعت آبزی پروری باید مؤثر، سودآور و دارای کمینه اثرات زیست محیطی باشد. تغذیه نقش مهمی در عملکرد دستگاه ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها داراست. در نتیجه، کیفیت جیره و مدیریت تغذیه بسیار حساس و حائز اهمیت است (Ebrahimi, 2006). کاهش هزینه‌های پرورش حاصل از بهبود جیره‌های غذایی یکی از عوامل کارآمد در بالابردن کارایی تولید ماهی است. امروزه استفاده از مواد محرک ایمنی و رشد در جیره غذایی آبزیان بسیار دارای اهمیت است. دلیل اساسی استفاده از این محرک‌ها فواید حاصل از به‌کارگیری آن‌هاست که شامل افزایش رشد، کاهش مصرف غذا، افزایش تولید و به دست آوردن محصولی با کیفیت بالا است. محرک‌های ایمنی و رشد جایگزین غذا و مواد مغذی مؤثر در جیره غذایی ماهیان نیستند، ولی توانایی افزایش جذب و ترکیب عناصر غذایی و افزایش میزان رشد را دارند (Sukhoverkhov, 2016). محرک‌های ایمنی به صورت مکمل‌هایی به جیره آبزیان افزوده، و برای جلوگیری از بیماری و بهبود ضریب تبدیل غذایی استفاده می‌شوند (Hoseinifar et al. 2013).

جلبک‌های دریایی دارای میزان بالایی ویتامین، مواد معدنی، پروتئین، کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند. جلبک‌ها علاوه بر کاربرد به‌عنوان غذا، می‌توانند کاربرد صنعتی، آرایشی و پزشکی نیز داشته باشند (Kotnala et al. 2013). جلبک‌ها به دلیل داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمندی مانند آگار، کاراژینان و آلژینات دارای اهمیت اقتصادی زیادی هستند (Taskin et al. 2007). مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از جلبک‌های خشک شده به‌عنوان محرک ایمنی در صنعت آبزی‌پروری، پاسخ‌های فیزیولوژیک آبزیان نسبت به استرس و بیماری را بهبود می‌بخشد، همچنین به‌عنوان محرک ایمنی در آبزی‌پروری باعث افزایش رشد، کارایی غذا و کیفیت بیوشیمیایی لاشه در آبزیان مختلف می‌شوند (Jaime-Ceballos et al. 2005). بر اساس تحقیقات و مطالعات انجام شده، ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در جلبک‌ها موجب بهبود دستگاه ایمنی و وضعیت اکسایش/ضد اکسایش آبزیان در آب‌ها را بهبود می‌بخشند (Bita and Ghorbani Ranjbari, 2016).

جنس گراسیلاریا از تیره *Gracilariaceae* بزرگ‌ترین جنس از شاخه ردوفیتا (*Rhodophyta*) است (Gan, 1999). در جهان پراکنش گسترده‌ای دارد و در مناطق

گراسیلاریا گراسیلیس (۲/۵، ۵ و ۱۰ گرم به ازای هر کیلوگرم از جیره) با مواد جیره مخلوط شده و به شکل پلت درآمد و در سایه خشک شد. بعد از خشک شدن کامل، پلت‌ها جمع‌آوری شده و در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار قرار داده شد و برای جلوگیری از فساد جیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شد. میزان غذای مورد نیاز روزانه برای هر تیمار محاسبه شده و سپس، مقدار موردنیاز هرروز از استوک برداشته و وزن می‌شد و در قوطی‌های مخصوص که برای هر تیمار در نظر گرفته شده بود، ریخته و استفاده می‌شد.

شاخص‌های رشد

به‌منظور بررسی چگونگی عملکرد سطوح مختلف پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در جیره غذایی و مقایسه آن‌ها، داده‌های به‌دست‌آمده از زیست‌سنجی‌ها بر اساس فرمول‌های موجود سنجش شده و برخی از شاخص‌های رشد به شرح زیر تعیین شد:

وزن اولیه - وزن نهایی = افزایش وزن بدن

$$100 \times \frac{\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}}{\text{وزن نهایی}} = \text{درصد افزایش وزن}$$

$$100 \times \left(\frac{\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}}{\text{طول دوره پرورش}} \right) = \text{نرخ رشد ویژه}$$

$$\text{ضریب تبدیل غذایی} = \frac{\text{غذای خورده شده (گرم)}}{\text{افزایش وزن (گرم)}}$$

$$100 \times \frac{\text{تعداد ماهیان مرده} - \text{تعداد ماهیان اولیه}}{\text{تعداد ماهیان اولیه}} = \text{درصد بقا}$$

جمع‌آوری موکوس بر اساس روش Ross و همکاران (۲۰۰۰) انجام شد. تمام ماهی‌های هر مخزن برداشته و پس از بیهوشی با ۵ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی (زیپ پلاست) حاوی ۲ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفتند و پس از ۲ دقیقه ماهی‌ها از کیسه‌ها خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در $g \times 1500$ سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت به میکروتیوب ۱۵ میلی‌لیتری انتقال یافته و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استفاده آزمایش‌ها نگهداری شد.

در رژیم غذایی و تأثیر آن بر عملکرد رشد و برخی از شاخص‌های سرمی ماهی کپور معمولی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به مدت ۷ هفته در سالن آبی‌پروری شهید ناصر فضلی برآبادی و آزمایشگاه ژنتیک و بیوتکنولوژی آبزیان گروه تکثیر و پرورش آبزیان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. در این آزمایش از بچه- ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی حدود ۱۹ گرم استفاده شد. ماهیان به مدت ۲ هفته سازگار، و سپس در ۱۲ مخزن فایبرگلاس (۴ تیمار صفر، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱٪ پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس) با تراکم ۱۵ ماهی نگهداری شدند.

تهیه جیره و غذاهای

ماده اضافه‌شده در جیره، پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس بود که از جنوب کشور تهیه شد. در این آزمایش جیره پایه ماهی کپور غذای اکستروود تجاری اندازه FFC شرکت فردانه در نظر گرفته شد و سپس مقادیر مدنظر پودر جلبک

افزایش وزن بدن (Tacon, 1997):

درصد افزایش وزن بدن (Bekcan et al. 2006):

نرخ رشد ویژه (Hevrøy et al. 2005):

ضریب تبدیل غذایی (Hevrøy et al. 2005):

محاسبه درصد بقا (Ai et al. 2006):

جمع‌آوری سرم

تعداد سه ماهی از هر مخزن برداشته و پس از بیهوشی با ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک، با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری هیپارینه از قسمت ساقه دمی خون گرفته شد. سپس خون هر ماهی به‌طور جداگانه در داخل ویال‌های استریل ریخته شد و به یخچال به مدت یک ساعت انتقال داده شد تا خون کاملاً منعقد شده و سرم جدا شود. سپس ویال‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دمای اتاق به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی به ویال جدید انتقال یافته و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها نگهداری شد.

جمع‌آوری موکوس

مرتب و نمودارهای آن رسم شد. همچنین، تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۱۶ و با آزمون آماری دانکن با درصد اطمینان ۹۵٪ و با آزمون واریانس یک‌طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد.

نتایج

شاخص‌های رشد

جدول ۱ نشان دهنده اثرات به‌کارگیری پودر جلبک قرمز در جیره غذایی ماهی کپور بر شاخص‌های رشد و مصرف جیره است. نتایج این تحقیق نشان داد که وزن انتهای دوره بین تیمارهای حاوی پودر جلبک قرمز با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری ندارد ($p > 0/05$). علاوه بر این، افزایش وزن در بین تیمارهای حاوی پودر جلبک قرمز با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > 0/05$). همچنین، نرخ رشد ویژه بین تیمارهای حاوی پودر جلبک قرمز با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$). میزان ضریب تبدیل غذایی بین تیمارهای پودر جلبک قرمز با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$). در نهایت، میزان بقا در انتهای دوره بین تیمارها و گروه شاهد نیز اختلاف معنی‌دار نداشت ($p > 0/05$).

شاخص‌های ایمنی سرم

مقادیر سطوح پروتئین کل سرم (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور تغذیه‌شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز در شکل ۱ نشان داده شده است. سنجش پروتئین کل سرم نشان داد که بین تیمارهای تغذیه‌شده با پودر جلبک قرمز و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($p > 0/05$).

شاخص‌های ایمنی سرم

مقادیر سطوح پروتئین کل سرم (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور تغذیه‌شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز در شکل ۱ نشان داده شده است. سنجش پروتئین کل سرم نشان داد که بین تیمارهای تغذیه‌شده با پودر جلبک قرمز و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار وجود ندارد ($p > 0/05$).

اندازه‌گیری پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل

ایمونوگلوبولین کل از روش Anderson و Siwicki (۱۹۹۳) محاسبه شد. پس از تعیین میزان پروتئین سرم به نمونه پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲٪ اضافه شد. پس از گرمخانه گذاری ۲ ساعته در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش بردفورد اندازه‌گیری شد. اندازه ایمونوگلوبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه شد.

سنجش پروفایل پروتئینی موکوس پوست توسط اس

دی اس پیج

پروفایل پروتئینی موکوس پوست ماهی از طریق الکتروفورز ژل سدیم دو دسیل پلی اکریل آمید به شکل زیر سنجش شد. نمونه‌های موکوس (۱۰ میلی‌گرم پروتئین خام) به نسبت ۱:۴ با بافر نمونه (۴٪ اس دی اس، ۵۰ میلی‌لیتر بر مول تریس اسید کلریدریک، ۲٪ مرکاپتواتانول، ۱۲٪ گلیسرول و ۵٪ بروموفنول بلو) حل کرده و به مدت ۵ دقیقه در حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد حرارت داده و مدت ۳ دقیقه با دور ۱۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس از محلول صاف‌شده رویی برای الکتروفورز استفاده شد. ۲۵ میکرولیتر از هر نمونه به‌همراه یک مارکر وزن مولکولی بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۸٪ و ژل انباری ۵٪ (استکینگ ژل) لود شد. الکتروفورز در ۱۲۰ ولت تا زمانی که مارکر بروموفنول بلو از استکینگ ژل عبور کند، تنظیم‌شده و سپس در ۲۰۰ ولت به مدت ۷ ساعت با بافر الکتروفورز ۵ ایکس انجام شد. پس از اتمام الکتروفورز برای مشخص کردن باندهای پروتئینی، ژل‌ها به‌وسیله ۵٪ کوماسی‌بلو (G ۲۵۰) به مدت ۲ ساعت رنگ‌آمیزی شد و سپس طی ۲ مرحله به‌وسیله محلول رنگ‌بری کوماسی‌بلو به مدت ۴ ساعت رنگ‌بری انجام شد. عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه اسکنر انجام شد. برای تخمین وزن مولکولی باندها از مارکر وزن مولکولی ۱۱ تا ۱۸۰ کیلودالتون، آلبومین با وزن مولکولی ۶۷ کیلودالتون و لیزوزیم با وزن مولکولی ۱۴ کیلودالتون استفاده شد.

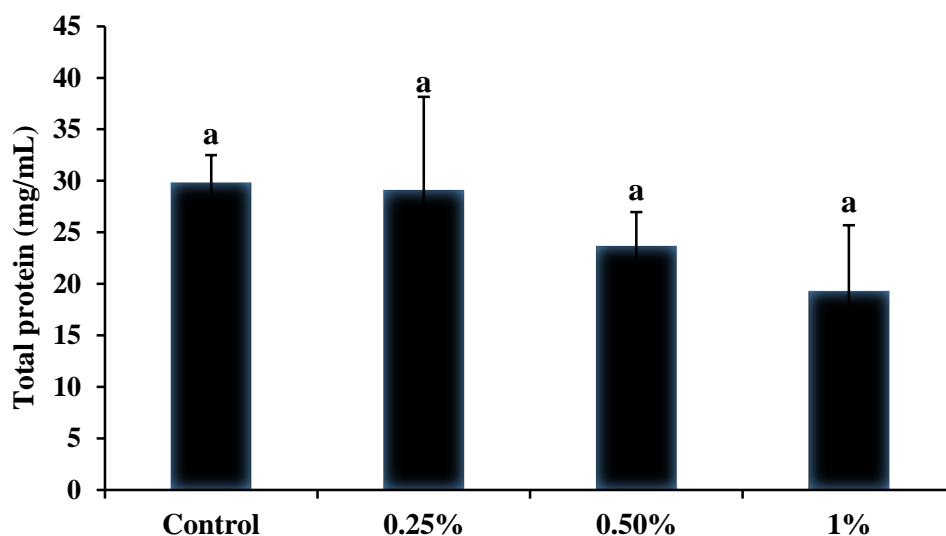
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در قالب طرح کاملاً تصادفی این تحقیق برنامه‌ریزی و اجرا شد. عدد به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۳

جدول ۱ مقایسه برخی از شاخص‌های رشد (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور معمولی تغذیه شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز

Table 1 Comparison of some growth indices (mean \pm standard deviation) of common carp fry fed diet containing red algae powder for 7 weeks.

	Red algae levels (%)			
	1	0.5	0.25	0
Initial weight (g)	19.10 \pm 0.14	19.17 \pm 0.15	19.13 \pm 0.07	19.24 \pm 0.03
Final weight (g)	28.79 \pm 3.82	30.50 \pm 0.91	30.29 \pm 3.05	31.93 \pm 2.99
Weight gain (g)	9.68 \pm 3.77	11.13 \pm 0.98	11.16 \pm 3.09	12.16 \pm 2.98
Weight gain (%)	50.64 \pm 19.64	59.12 \pm 5.49	58.36 \pm 16.39	65.95 \pm 15.47
SGR (%/day)	0.82 \pm 0.03	0.94 \pm 0.12	0.93 \pm 0.06	1.02 \pm 0.01
FCR	2.22 \pm 1.11	1.66 \pm 0.16	1.76 \pm 0.44	1.53 \pm 0.34
Survival (%)	97.77 \pm 4.71	100 \pm 0.00	97.77 \pm 3.85	95.55 \pm 7.70

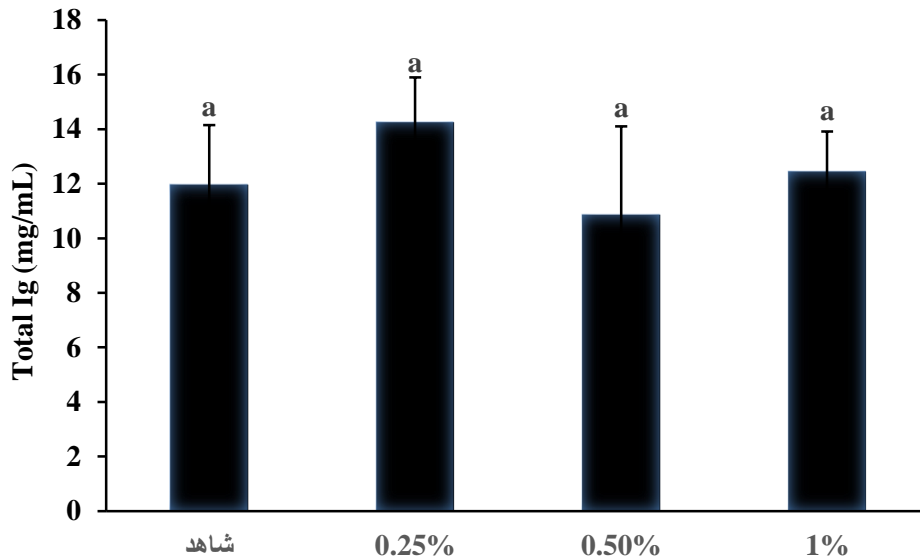


شکل ۱ مقادیر پروتئین کل سرم (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور تغذیه شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز.

Figure 1 Serum total protein levels (mean \pm standard deviation) of carp fry fed diet containing red algae powder for 7 weeks.

سطوح ایمونوگلوبولین کل سرم تیمارهای تغذیه‌شده با پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس و گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p > 0.05$).

سطوح ایمونوگلوبولین کل سرم بچه ماهی کپور تغذیه‌شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز در شکل ۲ نشان داده شده است. بررسی آمار نتایج نشان داد که بین



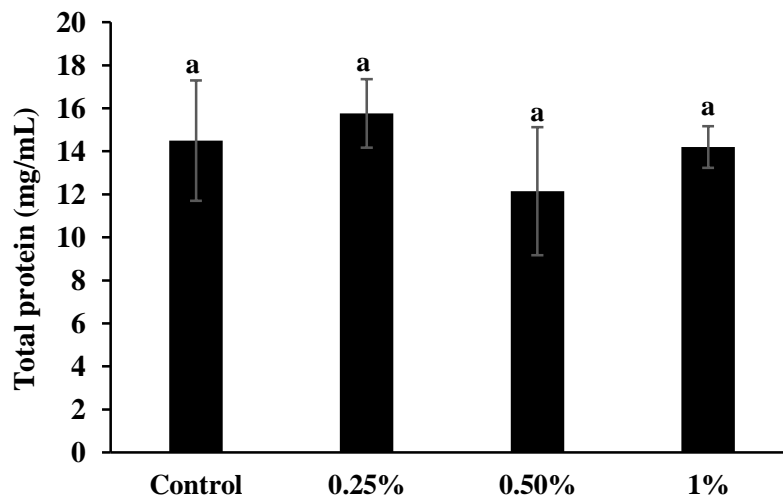
شکل ۲ سطوح ایمنوگلوبولین سرم (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور تغذیه شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز.

Figure 2 Serum immunoglobulin levels (mean \pm standard deviation) of carp fry fed diet containing red algae powder for 7 weeks.

آماري معنی دار نبود ($p > 0.05$). بیشترین میزان پروتئین کل در تیمار حاوی ۰.۲۵٪ مشاهده شد و کمترین مقدار آن در تیمار ۰.۵٪ بود.

شاخص‌های ایمنی موکوس پوست

سنجش پروتئین کل موکوس نشان داد که به رغم وجود تغییرات در مقادیر عددی پروتئین کل بین تیمارهای تغذیه شده با پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس و گروه شاهد، این تفاوت از نظر

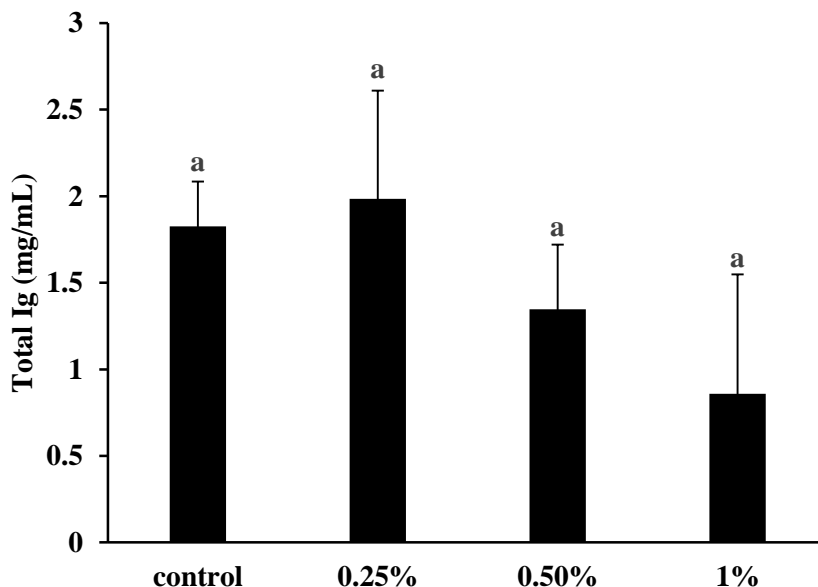


شکل ۴ مقادیر پروتئین کل موکوس پوست (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور تغذیه شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز.

Figure 4 The skin mucus total protein levels (mean \pm standard deviation) of carp fry fed diet containing red algae powder for 7 weeks.

ایمنوگلوبولین در تیمار حاوی ۰.۲۵٪ مشاهده شد و کمترین مقدار آن در تیمار ۰.۵٪ بود.

سنجش ایمنوگلوبولین کل موکوس نشان داد که بین تیمارهای تغذیه شده با پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس و گروه شاهد اختلاف معنی دار وجود ندارد ($p > 0.05$). بیشترین میزان



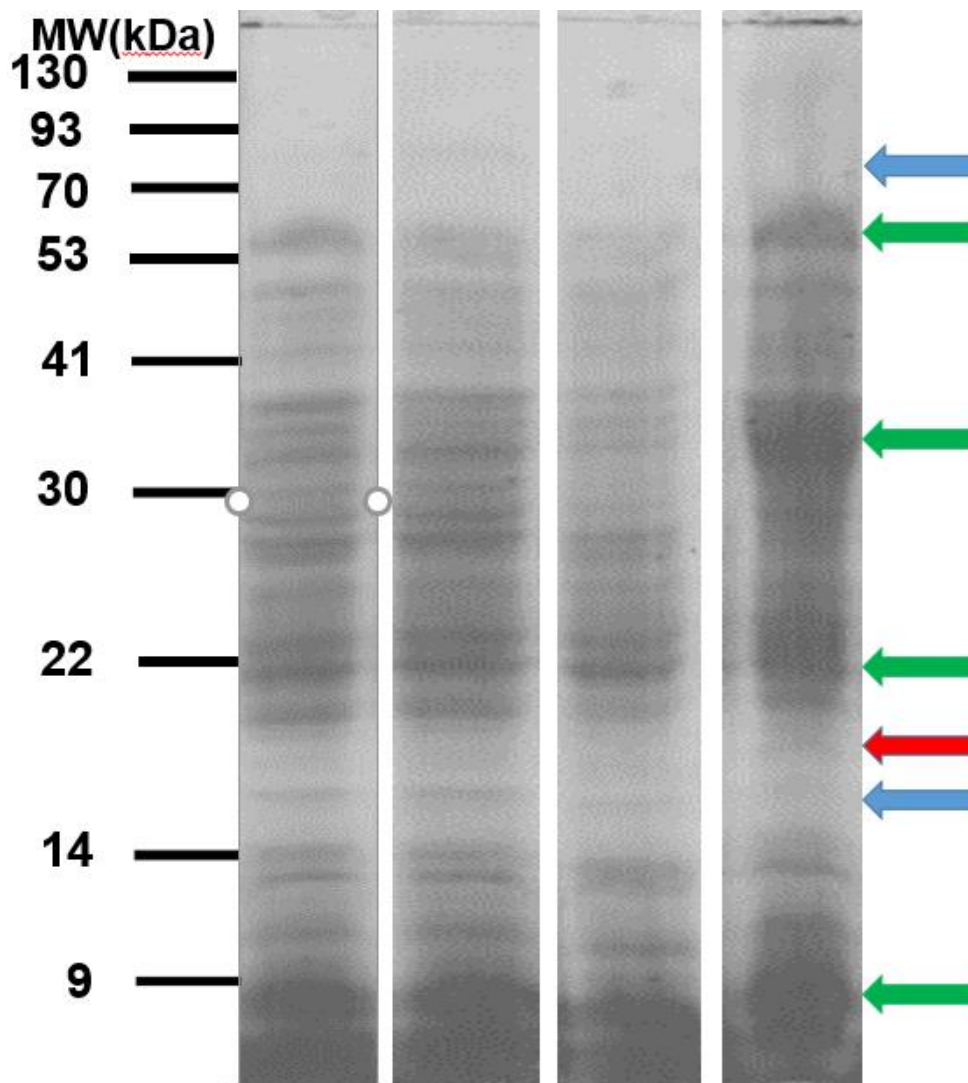
شکل ۵ مقادیر ایمونوگلوبولین موکوس پوست (میانگین \pm انحراف استاندارد) بچه ماهی کپور تغذیه شده طی ۷ هفته با جیره حاوی پودر جلبک قرمز

Figure 5 The skin mucus immunoglobulin (mean \pm standard deviation) of carp fry fed diet containing red algae powder for 7 weeks.

باند‌هایی که دارای افزایش تراکم هستند با رنگ سبز و باند‌هایی که در همه تیمارها وجود ندارند، با رنگ آبی، همچنین باند‌هایی که دارای کاهش تراکم شدند با رنگ قرمز مشخص شده‌اند.

سنجش الگوی پروتئینی موکوس

نتایج آزمایش انجام شده برای مقایسه الگوی پروتئینی موکوس ماهی کپور معمولی در شکل ۶ نشان داده شده است. در تصویر



شکل ۶ مقایسه الگوی پروتئینی موکوس بچه ماهی کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس با استفاده از ژل با درصد آکریل آمید ۱۸٪. به ترتیب از سمت راست لاین ۱: تیمار شاهد لاین ۲: تیمار ۰/۲۵٪، لاین ۳: تیمار ۰/۵٪، لاین ۴: تیمار ۱٪ است.

Figure 6 Comparison of the mucus protein pattern of common carp juveniles fed with different levels of *Gracilaria gracilis* algae powder using gel with 18% acrylamide. From the right side, line 1: Control, line 2: 0.25% treatment, line 3: 0.5% treatment, line 4: 1% treatment.

هرکدام از این دلایل مرتبط شود. مطالعات مرتبط با تأثیر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس بر رشد ماهیان تنها محدود به مطالعه Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۸) بوده که در نتیجه آن، استفاده از پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در جیره ماهی زبرا، در بهبود عملکرد رشد ماهی تأثیری نداشت. همچنین در مطالعه ای که به منظور ارزیابی تعدیل سلامتی با اضافه کردن جلبک *Gracilaria gracilis* به جیره غذایی ماهی باس اروپایی *Dicentrarchus labrax* با جیره‌های حاوی ۲/۵ و ۵٪ جلبک گراسیلاریا انجام شد، هیچ گونه اختلاف معنی داری در فراسنجه‌های رشد مشاهده نشد (Passos et al. 2021). نتیجه این

بحث

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد افزودن پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس (۰/۵، ۰/۲۵ و ۱٪) تأثیر معنی داری بر شاخص‌های رشد نسبت به گروه شاهد ندارد. تأثیر افزودن مکمل‌های گیاهی به جیره بر روی عملکرد رشد، با توجه به عواملی همچون غلظت مناسب، ترکیب جیره و مدیریت پرورش متفاوت است (Berreto et al. 2008). همچنین گونه ماهی، مراحل زندگی و شرایط آزمایشی نیز بر نتایج عملکرد رشد مؤثر هستند (Hoseinifar et al. 2018). نبود تفاوت معنی دار در بین سطوح مختلف پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس و گروه شاهد، ممکن است به

شاخص‌های رشد و برخی از شاخص‌های رنگی شدن ماهی دماسونی (*Pseudotropheus demasoni*) دارد. بر اساس نتایج حاصل از مطالعه Akbary و Shahraki (۲۰۱۶)، افزودن ۱۵ g/kg عصاره جلبک پادینا (*Padina australis*) به جیره غذایی ماهی کفال خاکستری به منظور بهبود شاخص‌های رشد، تغذیه، کیفیت لاشه و افزایش اسیدهای چرب چند زنجیره‌ای در این ماهی پیشنهاد می‌شود.

با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، افزودن پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در جیره بر مقدار پروتئین کل و ایمونوگلوبولین سرم تأثیری نداشت و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده نشد. برعکس نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه‌ای که توسط Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۹) انجام گردید، مصرف خوراکی اسپیرولینا در ماهی تیلاپیا سبب افزایش میزان پروتئین، آلبومین و گلوبولین شد. همچنین، مطالعه Youssefi و همکاران (۲۰۱۴) بیانگر افزایش پروتئین تام در گروه‌های تیمار ۵ و ۱۵ گرم جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) (در هفته اول) نسبت به گروه شاهد بود. مصرف خوراکی اسپیرولینا در ماهی کپور موجب افزایش پروتئین تام و برخی از اجزای پروتئین‌های سرم از جمله گاماگلوبولین شد. اختلاف بین نتایج ممکن است به دلیل گونه ماهی، شرایط پرورشی و همچنین نوع جیره مورد استفاده باشد.

ایمونوگلوبولین‌ها دسته‌ای از گلیکوپروتئین‌ها هستند که در سرم و مایعات بافتی تمام مهره‌داران یافت می‌شوند. ایمونوگلوبولین از لنفوسیت‌های ماهیان ترشح می‌شود و یکی از اجزای ایمنی ذاتی محسوب می‌شود. نتایج مطالعه Bita و همکاران (۲۰۱۷) در زمینه ایمونوگلوبولین تام سرم همسو با نتایج مطالعه حاضر بر میزان ایمونوگلوبولین است. آن‌ها گزارش کردند که نانوذرات نقره سنتز شده از جلبک سارگاسوم، بر میزان ایمونوگلوبولین تام سرم با هر دو روش اندازه‌گیری کدورت‌سنجی و رسوبی هیچ‌گونه اثرات مهاری یا تحریک‌کنندگی ندارد. نتایج مطالعه Zamannejad و همکاران (۲۰۱۵) برعکس نتایج مطالعه حاضر است به گونه‌ای که فاکتورهای ایمنی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان که با جلبک *Sargassum illicifolium* تغذیه شده بودند در مقایسه با گروه شاهد، اختلاف معنی‌داری داشتند و سطح ایمونوگلوبولین Igm و فعالیت لیزوزیم با افزایش مقدار جلبک سارگاسوم و افزایش

بررسی هم‌راستا با نتیجه مطالعه حاضر بر عملکرد رشد ماهی کپور است. با توجه به مرور منابع انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص اثرات پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس بر ماهی کپور معمولی گزارش نشده است؛ اما با توجه به مطالعاتی که بر روی جنس گراسیلاریا انجام شده، نتایج این مطالعات برخلاف نتایج مطالعه حاضر بر عملکرد رشد است. به گونه‌ای که در مطالعه‌ای برای بررسی اثرات جایگزینی ماکرو جلبک گراسیلاریا با آرد ماهی در جیره غذایی و تأثیر آن روی شاخص‌های خونی ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) که با جیره‌های حاوی ۳، ۶ و ۹٪ پودر جلبک گراسیلاریا به ازای هر کیلوگرم غذا و گروه شاهد مثبت و منفی (هر دو فاقد جلبک) تغذیه شدند، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جایگزینی جلبک (*Gracilaria pygmaea*) در سطح ۳٪ باعث افزایش چشم‌گیری در میزان گلبول سفید و لیزوزیم نسبت به گروه شاهد شده و مقدار پروتئین در سطح ۳ و ۶٪ افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است.

با توجه به مطالعات دیگری که در خصوص به‌کارگیری انواع جلبک در جیره آبزیان انجام شده، در مطالعه Sondakzahi و Akbary (۲۰۱۶) گزارش شده است که با افزودن ۱۵g/kg پودر جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) به جیره غذایی ماهی کفال خاکستری (*Mugil cephalus*) شاخص‌های رشد، تغذیه، کیفیت لاشه و افزایش اسیدهای چرب چند زنجیره‌ای در این ماهی بهبود می‌یابد. همچنین در مطالعه‌ای دیگر که توسط Xuan و همکاران (۲۰۱۳) بر روی ماهی سیم دریایی سیاه *Acanthopagrus schlegelii* انجام شد، مشخص شد که افزودن *Gracilaria lemaneiformis* تا سطح ۱۵٪ منجر به بهبود عملکرد رشد و وضعیت فیزیولوژیک می‌شود. همچنین، به‌کارگیری ماکرو جلبک گراسیلاریا (*Gracilaria pygmaea*) در سه سطح ۵، ۱۰ و ۱۵٪ در جیره غذایی میگوی پسفید غربی دارای تأثیر مثبتی بر روی شاخص‌های رشد میگو و پایداری غذا در آب است (Gholami et al. 2017). همچنین، همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که در ماهی کفال خاکستری پوزه ضخیم (*Chelon labrosu*) با افزایش میزان جلبک قرمز (*Porphyra purpurea*) از ۹ به ۱۸٪ در جیره، میزان رشد کاهش می‌یابد. در تحقیقی، Sudagar و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که استفاده از جلبک اسپیرولینا در جیره غذایی اثرات مثبتی بر

تعیین دقیق مکانیسم اثر پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس بر پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل موکوس نیازمند مطالعات بیشتری است. در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک الکتروفورز، الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کپور معمولی از طریق ژل سدیم دو دسیل سولفات پلی آکریل امید تعیین شد. الگوی پروتئینی یک موجود زنده بسته به شرایط داخلی و خارجی، انواع بافتها و مراحل تکامل متفاوت است (Shepard et al. 2000). همچنین افزودن محرکهای ایمنی به غذای موجود بر روی الگوی پروتئینی آن مؤثر است. بررسی الگوی پروتئینی موکوس پوست بچه ماهیهای کپور تغذیه شده با جیرههای آزمایشی حاوی سطوح مختلف پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در مطالعه حاضر نشان دهنده تغییر در الگوی پروتئینی موکوس پوست در انتهای مطالعه بود. در تراکم باندهای پروتئینی و ایجاد باندهای جدید بین تیمارها و شاهد تفاوت مشاهده شد. بر اساس مرور منابع انجام شده، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص بررسی اثرات پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس بر پروفایل پروتئینی موکوسی ماهی انجام نشده است. با وجود این، در برخی از مطالعات انجام شده، پروفایل پروتئینی موکوس با استفاده از تکنیک اس دی اس پیج بررسی شده است. در مطالعه Rastegari و همکاران (۲۰۱۵) الگوی پروتئینی موکوس پوست ماهی کلمه با سطوح مختلف نعنار در جیره تعیین شد. هم‌راستا با یافته‌های مطالعه حاضر، در این مطالعه گزارش کردند که استفاده از نعنار در جیره غذایی ماهی کلمه سبب تغییراتی در پروفایل پروتئینی موکوس می‌شود. تغییر در پروفایل پروتئینی موکوس پوست احتمالاً ناشی از تغییر در فعالیت آنزیم‌های و اجزای پروتئینی دستگاه ایمنی موکوس است. یافته‌های به دست آمده در این مطالعه در خصوص سطوح ایمونوگلوبولین کل موکوس مؤید این مدعاست. بر اساس یافته‌های به دست آمده از ارزیابی پروفایل پروتئینی موکوس و دیگر موارد بررسی شده در موکوس پوست می‌توان چنین برداشت کرد که استفاده از پودر برگ جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در جیره غذایی بچه ماهی کپور اثرات مثبتی بر ایمنی موکوس داشته است. تعیین دقیق مکانیسم اثر این مکمل غذایی بر دستگاه ایمنی موکوس نیازمند انجام مطالعات بیشتری است.

نتیجه‌گیری

با نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که استفاده از پودر

وزن، افزایش می‌یابد. درصد تلفات نیز نشان داد که ماهیان تغذیه شده با جلبک، تلفات کمتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند که این موضوع نشان دهنده اثر ایمنی‌زایی جلبک سارگاسوم است. طبق نتایج نهایی این تحقیق، روند تغییرات ایمونولوژیک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در نتیجه تغذیه با جلبک سارگاسوم افزایش می‌یابد. افزایش شاخص‌ها در این مطالعه، بیانگر این است که بتاکاروتن موجود در جلبک به شکل قابل توجهی، دستگاه ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را تحریک می‌کند و باعث افزایش مقاومت آن می‌شود. همچنین، در مطالعه Khani و همکاران (۲۰۱۷) افزودن مکمل ریزجلبک *Chlorella vulgaris* به جیره کپور کوی باعث افزایش قابل توجهی در سطوح IgM، لیوزیم و C4 در ماهی تغذیه شده با سطوح مختلف *C. vulgaris* می‌شود. همچنین بیان کردند که افزودن مکمل *C. vulgaris* به خصوص در سطح ۵٪ پودر خشک آن به جیره غذایی کپور کوی می‌تواند نقش مهمی در تحریک دستگاه ایمنی ماهی داشته باشد. نتایج این مطالعات با نتایج به دست آمده در این آزمایش مطابقت ندارد و دلایل آن همان‌طور که قبلاً بیان شد، ممکن است ناشی از گونه ماهی، شرایط پرورش و همچنین نوع و میزان ماده افزودنی به جیره مورد استفاده باشد. با توجه به خلاء تحقیقاتی در زمینه به کارگیری جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در پرورش ماهی کپور معمولی اظهار نظر قطعی در این زمینه نیازمند مطالعات بیشتر است.

لایه مخاطی پوست اولین خط دفاعی در برابر طیف گسترده‌ای از پاتوژن‌های باکتریایی و ویروسی حاوی بسیاری از مولکول‌های فعال زیستی است. بررسی فعالیت پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل موکوس پوست بچه ماهی‌های کپور معمولی تغذیه شده با سطوح مختلف پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در مطالعه‌ای که Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۸) با به کارگیری پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در جیره ماهی زبرا انجام دادند، بالاترین میزان پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل را در تیمار ۱٪ بعد از ۸ هفته تغذیه با پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس گزارش کردند. نتایج بررسی میزان پروتئین کل و ایمونوگلوبولین کل موکوس در این مطالعه، با نتایج مطالعه حاضر مطابقت نداشت. از جمله دلایل احتمالی آن ممکن است گونه ماهی، شرایط پرورش و همچنین مرحله پرورش ماهی باشد.

مکانسیم بهبود رشد و پاسخ ایمنی برای درک بهتر اثرات رژیم غذایی پودر جلبک گراسیلاریا گراسیلیس در پرورش ماهی لازم است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد انجام شده است. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از زحمات کارشناسان سالن ویرو و آزمایشگاه گروه شیلات تشکر نمایند.

جلبک گراسیلاریا گراسیلیس تاثیر مثبتی بر دستگاه ایمنی و پارامترهای رشدی نداشته است. از جمله دلایل احتمالی آن می‌توان به میزان دوز جلبک استفاده شده در جیره و شرایط پرورش ماهی اشاره کرد. به دلیل ترکیبات خواص این جلبک و همچنین روش تهیه ساده آن از طبیعت، می‌توان به عنوان جایگزینی مناسب برای مواد شیمیایی در پیشگیری و درمان بیماری‌ها در پرورش آبزیان از آن استفاده کرد، اما با توجه به نتایج این تحقیق و عدم تأثیر مثبت این میزان از پودر جلبک بر شاخص‌های رشد و برخی از فراسنجه‌های ایمنی غیراختصاصی سرم و موکوس و همچنین به دلیل خلأ تحقیقاتی در زمینه استفاده از این جلبک در آبی‌پروری، تحقیقات بیشتری برای روشن شدن

منابع

- Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H. 2009. Live *Spirulina (Arthrospira platensis)* as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research* 40: 1037-1046. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H., Zhang, L. 2006. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 260: 255-263. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.043.
- Akbary, P., Shahraki, N. 2016. Effect of *Padina atraulis* extract on growth, feed, fatty acids profile and carcass composition in *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 25: 161-170. doi: 10.22092/ISFJ.2017.110248. (In Persian).
- Akbary, P., Sondakzahi, A. 2016. Effect of *Spirulina platensis* powder on growth, feed, body chemical composition and fatty acids in *Mugil cephalus* Linnaeus, 1758. *Journal of Fisheries* 69: 1-9. doi: 10.22059/jfisheries.2016.57878 (In Persian).
- Anderson, R.J., Levitt, G.J., Share, A. 1996. Experimental investigations for the mariculture of *Gracilaria* in Saldanha Bay, South Africa. *Journal of Applied Phycology* 8: 421-430. doi: 10.1007/BF02178587.
- Barreto, M.S.R., Menten, J.F.M., Racanicci, A.M.C., Pereira, P.W.Z. and Rizzo, P.V. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science* 10: 109-115. doi: 10.1590/S1516-635X2008000200006.
- Bekcan, S., Dogankaya, L., Cakirogullari, G.C. 2006. Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis* L.) fed diets containing different percentages of protein. *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh* 58: 137-142 doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.06.045.
- Berreto, M.S.R., Menten, J.F.M., Racanicci, A.M.C., Pereira, P.W.Z., Rizzo, P.V. 2008. Plant extracts used as growth promoters in broilers. *Brazilian Journal Poultry Science*. 10: 109-115. doi: 10.1590/S1516-635X2008000200006
- Bitá, S., Ghorbani Ranjbari, N. 2016. Antioxidant and immune-stimulating effects of *Sargassum angustifolium* extract on the common carp (*Cyprinus carpio*) juvenile. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology* 3: 15-32. doi: 20.1001.1.23453966.1394.3.4.3.9 (In Persian).
- Bitá, S., Mesbah, M., Shahriari, A., Ghorbaanpoor, M. 2017. Compare the total immunoglobulin assays using turbidity and precipitation test in common carp exposed to synthesized

- silver nanoparticles using sargassum seaweed. *Iranian Veterinary Journal* 13: 24-31. doi: 10.22055/ivj.2017.53077.1725 (In Persian).
- Davies, S.J., Brown, M.T., Camilleri, M. 1997. Preliminary assessment of the seaweed *Porphyra purpurea* in artificial diets for thick-lipped grey mullet (*Chelon labrosus*). *Aquaculture* 152: 249-258 doi: 10.1016/S0044-8486(96)01513-X.
- Ebrahimi, E. 2006. Nutrition and nutritional needs of fish in aquaculture. Jihad-e Daneshgahi Press, IUST, 304 p. (In Persian).
- Gan, S.Y. 1999. Molecular taxonomic studies of *Gracilaria changii* from various locations using the random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique/Gan Sook Yee. Doctoral dissertation, University of Malaya. doi: 10.1007/s10811-007-9224-1.
- Gahreman, A. 2009. Basic Botany (Volume 1). Tehran University Press. 314p. (In Persian).
- Gholami, S., Oji Fard, A., Sotoudeh, A., Qaidnia, B. 2017. Growth performance, feed utilization, diet stability and apparent digestibility in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with different levels of *Gracilaria pygmaea*. *Fisheries Science and Technology* 6: 105-121. (In Persian).
- Gorshkov, S.G. 1979. World Ocean Atlas. Atlantic and Indian Oceans. Pergamon Press, Oxford. doi: 10.1175/1520-0485(1975)005%3C0201:NMOTAA%3E2.0.CO;2.
- Hagopian, J.C., Reis, M., Kitajima, J.P., Bhattacharya, D., de Oliveira, M.C. 2004. Comparative analysis of the complete plastid genome sequence of the red alga *Gracilaria tenuistipitata* var. *liui* provides insights into the evolution of rhodoplasts and their relationship to other plastids. *Journal of Molecular Evolution* 59: 464-477. doi: 10.1007/s00239-004-2638-3.
- Havrøy, E.M., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., Hemre, G.I. 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition* 11: 301-313. doi: 10.1111/j.1365-2095.2005.00357.x
- Hosseini, M.R. 2013. Cultivation guidelines for *Gracilaria* and seaweed products in China. Publications of the Iranian Fisheries Research Institute. 142 p. (In Persian).
- Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rostami, H.K., Esteban, M.Á. 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & Shellfish Immunology* 35: 1416-1420. doi: 10.1016/j.fsi.2013.08.007.
- Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Capillo, G., Paknejad, H., Khalili, M., Tabarraei, A., Van Doan, H., Spanò, N., Faggio, C. 2018. Mucosal immune parameters, immune and antioxidant defense related genes expression and growth performance of zebrafish (*Danio rerio*) fed on *Gracilaria gracilis* powder. *Fish & Shellfish Immunology* 83: 232-237. doi: 10.1016/j.fsi.2018.09.046.
- Jaime Ceballos, B., Villarreal, H., García, T., Pérez Jar, L., Alfonso, E. 2005. Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shrimp larvae. *Revista de Investigaciones Marinas* 26: 235-241. <http://hdl.handle.net/1834/1891>.
- Khani, M., Soltani, M., Shamsaie Mehrjan, M., Foroudi, F., Ghaeni, M. 2016. The effect of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga on some hematological and immune system parameters of Koi carp (*Cyprinus carpio*). *Iranian Journal of Ichthyology* 4: 62-68. doi: 10.7508/iji.2016.
- Kotnala, S., Garg, A., Chatterji, A. 2009. Screening for the presence of antimicrobial activity in few Indian seaweeds. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science* 32: 69-75.
- Martinez, E.A., Destombe, C., Quillet, M.C., Valero, M. 1999. Identification of random amplified polymorphic DNA

- (RAPD) markers highly linked to sex determination in the red alga *Gracilaria gracilis*. *Molecular Ecology* 8: 1533-1538. doi: 10.1046/j.1365-294x.1999.00721.x.
- Passos, R., Correia, A.P., Pires, D., Pires, P., Ferreira, I., Simões, M., do Carmo, B., Santos, P., Pombo, A., Afonso, C. and Baptista, T. 2021. Potential use of macroalgae *Gracilaria gracilis* in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Health benefits from a sustainable source. *Fish & Shellfish Immunology* 119: 105-113. doi: 10.1016/j.fsi.2021.09.033.
- Rastegari, S. 2015. Effect of different levels of peppermint powder on growth parameters and protein pattern of *Rutilus caspicus* fish skin mucus. Master Thesis, GUASNR, 71 p. (In Persian).
- Rezaei, M.B., Jaimand, B. 1997. Agar-agar. Research Institute of Forests and Rangelands. 165 p. (In Persian).
- Ross, N., Firth, K., Wang, A., Burka, J.F., Johnson, S. 2000. Changes in hydrolytic enzyme activities of naive Atlantic salmon *Salmo salar* skin mucus due to infection with the salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* and cortisol implantation. *Diseases of Aquatic Organisms* 41: 43-51. doi: 10.3354/dao041043.
- Smit, A.J., Robertson, B.L., du Preez, D.R. 1996. Influence of ammonium-N pulse concentrations and frequency, tank condition and nitrogen starvation on growth rate and biochemical composition of *Gracilaria gracilis*. *Journal of Applied Phycology* 8: 473-481. doi: 10.1007/BF02186325.
- Shepard, J.L., Olsson, B., Tedengren, M., Bradley, B.P. 2000. Protein expression signatures identified in *Mytilus edulis* exposed to PCBs, copper and salinity stress. *Marine Environmental Research* 50: 337-340. doi: 10.1016/S0141-1136(00)00065-9.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. 1993. Non-specific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. *FAO-Project GCP/INT/526/JPN*, pp.105-112. doi: 10019210752/0.
- Steenoft, M., Farnharn, W.F. 1997. Northern distribution boundaries and thermal requirements of *Gracilaria* and *Gracilariopsis* (Gracilariales, Rhodophyta) in Atlantic Europe and Scandinavia. *Nordic Journal of Botany* 17: 87-94. doi: 10.1111/j.1756-1051.1997.tb00292.x.
- Sudagar, M., Khalese, M., Mazandarani, M., Hosseini, S.A., Zakariaee, H. 2016. Effects of Spirulina algae on growth, survival and coloration demasoni fish (*Pseudotropheus demasoni*). *Journal of Fisheries* 69: 21-27. doi: 10.22059/jfisheries.2016.57887. (In Persian).
- Sukhoverkhov, F.M. 2006. The effect of cobalt, vitamins, tissue preservations and antibiotics on carp production. <http://www.FAO.com>.
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. *Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods*. Olsztyn, Poland, 105-112.
- Taskin, E., Ozturk, M., Kurt, O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African journal of Biotechnology* 6: 27-46. doi: 10.5897/AJB2007.000-2439.
- Youssefi, P., Soltani, M., Taheri, M., Mazaheri Nezhad Fard, R. 2014. The Effects of oral administration of *Spirulina platensis* on serum total protein and protein electrophoresis patterns of *Cyprinus carpio*. *Journal of Veterinary Microbiology* 10: 57-64.
- Xuan, X., Wen, X., Li, S., Zhu, D., Li, Y. 2013. Potential use of macro-algae *Gracilaria lemaneiformis* in diets for the black sea bream, *Acanthopagrus schlegelii*, juvenile. *Aquaculture* 412: 167-172. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.07.022.
- Zamannejad, N., Emadi, H., Hossein-zadeh, A. 2015. Investigating the nutritional

effect of *Sargassum illicifolium* algae on changes in immunoglobulin (IgM) and lysozyme levels in rainbow trout

(*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Marine Science and Technology Research 10: 59-70 (In Persian).