Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Print ISSN: 2345-427X
Online ISSN: 2345-4288

The effects of dietary humic acid on growth, immune response and antioxidant defence in zebrafish (*Danio rerio*)

Seyed Hossein Hoseinifar[*1], Zohreh Fazelan[2], Thora Leike[3], Shiva Nedaei[4], Roghieh Safari[5], Metin Yazici[6], Hien Van Doan[7]

1. Corresponding Author, Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: hoseinifar@gau.ac.ir
2. Dept. of Fisheries, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran. E-mail: zohreh.fazelan@gmail.com
3. Dept. of Fisheries and Water Conservation, Faculty of South Bohemia, Czech Republic. E-mail: thora.leike@leibniz.de
4. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: shiva.nedaei102@gmail.com
5. Dept. of Aquaculture, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: fisheriessafari@yahoo.com
6. Dept. of Marine Science and Technology, Iskenderun Polytechnic University, Türkiye. E-mail: metin.yazdi@iskenderun.tr
7. Dept. of Fisheries and Animal Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Thailand. E-mail: hien.doan@cmu.th

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received:
Revised:
Accepted:

Keywords:
Antioxidant defence,
Danio rerio,
Fulvic acid,
Gene expression,
Humoral immunity,
Mucosal immunity

ABSTRACT

The aim of this research is to investigate the effects of different levels of dietary fulvic acid on systemic immunity, antioxidant capacity, and immune-antioxidant relative gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). In order to investigate the effect of dietary fulvic acid (FLA), 600 healthy fish (average body weight 96.01 ± 3.01 mg) were randomly placed in 12 aquariums. During an experimental period of 8 weeks, fish was fed basal diets containing different levels of fulvic acid (0 (ctrl), 0.25 (FLA1), 0.5 (FLA2) and 1 (FLA3) g/kg diet) and they were fed three times a day. At the end of the experimental period, no significant difference was observed among experimental treatments regarding growth performance ($P<0.05$). However, lysozyme activity, total immunoglobulin (Ig) and total protein of whole body extract were significantly increased in response to 0.5-1 g kg^{-1} diet fulvic acid compared to other treatments ($P<0.05$). However, no difference was observed among the experimental groups in terms of catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzyme activities. The interferon-α (INF-α) and tumor necrosis factor alpha (TNF-α) genes expression increased in the treatments using fulvic acid, and the highest level was observed in 0.5 g/kg fulvic acid received treatment ($P<0.05$). Also, the expression of interleukin 1 (IL-1) gene in this group was significantly increased compared to other experimental treatments ($P<0.05$). The expression of GPx gene was significantly increased in the group received fulvic acid without any significant difference among the treatments ($P>0.05$). CAT gene expression did not show any difference among experimental groups ($P>0.05$). Although SOD gene expression showed a significant increase in response to dietary fulvic acid, which the highest level was observed in the 0.5 g/kg received group ($P<0.05$). In conclusion, according to the positive results obtained, fulvic acid can be potentially used as a feed additive in Zebrafish to boost growth performance and immnene performance and regulate anti-oxidant, and immune gene expression.

Cite this article: Hoseinifar, Seyed Hossein, Fazelan, Zohreh, Leike, Thora, Nedaei, Shiva, Safari, Roghieh, Yazici, Metin, Van Doan, Hien. 2024. The effects of dietary humic acid on growth, immune response and antioxidant defence in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, ---- (----), 1-21.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2024.22174.1852
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

اثرات به‌کارگیری هیومیک اسید در جیره غذایی بر کارایی رشد، پاسخ ایمنی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های مرتبط در روده ماهی زبرا (*Danio rerio*)

سید حسین حسینی‌فر*[۱]، زهره فاضلان[۲]، تورا لئیکه[۳]، شیوا ندایی[٤]، رقیه صفری[٥]، متین یاسیزی[٦]، هین ون دوان[۷]

۱. نویسنده مسئول، گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: hoseinifar@gau.ac.ir

۲. گروه شیلات، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران. رایانامه: zohreh.fazelan@gmail.com

۳. گروه شیلات و حفاظت آب، دانشکده سوث بوهمیا، جمهوری چک. رایانامه: thora.leike@leibniz.de

٤. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: shiva.nedaei102@gmail.com

٥. گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران. رایانامه: fisheriessafari@yahoo.com

٦. گروه علوم و فنون دریا، دانشگاه پلی‌تکنیک اسکندرون، ترکیه. رایانامه: metin.yazdi@iskenderun.tr

۷. گروه شیلات و علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه چیانگ مای، تایلند. رایانامه: hien.doan@cmu.th

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت:

تاریخ ویرایش:

تاریخ پذیرش:

واژه‌های کلیدی:
آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی،
بیان ژن،
سیستم ایمنی غیراختصاصی،
ماهی گورخری،
هیومیک اسید

چکیده

هدف از این طرح پژوهشی بررسی اثرات سطوح مختلف مکمل هیومیک اسید بر عملکرد رشد، برخی شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی سرم، بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و ایمنی در روده ماهی گورخری (*Danio rerio*) بود. به‌منظور بررسی اثر اسید هیومیک (FLA)، ٦۰۰ ماهی سالم (میانگین وزن بدن ۳/۰۱ ± ۹٦/۰۱ میلی‌گرم) به‌طور تصادفی در ٤ تیمار با ۳ تکرار در ۱۲ آکواریوم قرار گرفتند. در طی یک دوره آزمایشی ۸ هفته‌ای، ماهی‌ها با جیره‌های پایه حاوی سطوح مختلف هیومیک اسید (۰ (ctrl)، ۰/۲۵ (FLA1)، ۰/۵ (FLA2) و ۱ (FLA3) گرم در کیلوگرم جیره غذایی) سه بار در روز در حد سیری تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش اگرچه تفاوت معنی‌داری در میان تیمارهای آزمایشی در خصوص عملکرد رشد مشاهده نشد ($P>0/05$)، فعالیت آنزیم لیزوزیم، ایمونوگلوبولین کل و غلظت پروتئین سرم کل بدن به‌طور معنی‌داری در پاسخ به ۱-۰/۵ گرم هیومیک اسید در هر کیلوگرم جیره غذایی در مقایسه با سایر جیره‌ها افزایش یافت ($P<0/05$). با این‌حال، هیچ تفاوتی در میان تیمارهای آزمایشی از نظر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در سرم کل بدن مشاهده نشد ($P>0/05$). میزان بیان ژن‌های اینترفرون-α (INF-α) و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) در تیمارهای مصرف‌کننده هیومیک اسید

افزایش یافت که بیش‌ترین میزان آن در تیمار مصرف‌کننده ۰/۵ گرم در کیلوگرم هیومیک اسید مشاهده شد (P<۰/۰۵). هم‌چنین بیان ژن اینترلوکین ۱ (IL-1) در تیمار مصرف‌کننده ۰/۵ گرم در کیلوگرم هیومیک اسید در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). بیان ژن GPx در تیمارهای مصرف‌کننده هیومیک اسید افزایش یافت (P<۰/۰۵) اگرچه هیچ تفاوت معنی‌داری در میان سطوح مختلف مصرف هیومیک اسید مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بیان ژن CAT هیچ تفاوت معنی‌داری را در بین تیمارهای آزمایشی نشان نداد (P>۰/۰۵)، اگرچه بیان ژن SOD افزایش معنی‌داری را در پاسخ به هیومیک اسید جیره نشان داد که بیش‌ترین میزان آن در تیمار مصرف‌کننده ۰/۵ گرم در کیلوگرم مشاهده شد (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج مثبت به‌دست آمده از این مطالعات، مکمل هیومیک اسید را می‌توان به‌عنوان یک افزودنی غذایی مفید به‌منظور تقویت عملکرد رشد و پاسخ‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در ماهی گورخری در نظر گرفت.

استناد: حسینی‌فر، سید حسین، فاضلان، زهره، لئیکه، تورا، ندایی، شیوا، صفری، رقیه، یاسیزی، متین، ون دوان، هین (۱۴۰۳). اثرات به‌کارگیری هیومیک اسید در جیره غذایی بر کارایی رشد، پاسخ ایمنی، دفاع آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های مرتبط در روده ماهی زبرا (*Danio rerio*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ---- (----)، ۲۱-۱.
DOI: 10.22069/japu.2024.22174.1852

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
© نویسندگان.

مقدمه

همگام با افزایش جمعیت انسانی و توسعه کشورهای کم‌درآمد، تقاضای در حال افزایشی برای ماهی و غذاهای دریایی وجود دارد (۱). از آن‌جایی‌که تولیدات صیادی در طی دهه‌های گذشته ثابت مانده است، آبزی‌پروری منبع اصلی به‌منظور تامین این تقاضای در حال افزایش در نظر گرفته می‌شود (۲ و ۳). امروزه آبزی‌پروری نقش فزاینده‌ای در اقتصاد جهانی ایفا کرده و به تامین بیش از ۵۰ درصد از تولیدات جهانی غذاهای دریایی کمک می‌کند.

آبزی‌پروری مدرن که با پرورش متراکم همراه است، به‌دلیل استرس و مشکلات ناشی از کیفیت آب می‌تواند در نهایت منجر به سرکوب سیستم ایمنی و تهدید سلامت آبزی شود (٤). شیوع بیماری‌ها تهدیدی اصلی در صنعت آبزی‌پروری متراکم است که منجر به خسارات اقتصادی قابل توجه می‌گردد (۵). اگرچه، داروهای شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و واکسن‌ها در مقیاس وسیع به‌منظور کنترل بیماری در صنعت آبزی‌پروری استفاده می‌شوند (٦)، هنوز در عمل مناسب، پایدار یا موفق نیستند. به‌کارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به ایجاد استرس در ماهی می‌شود و باید از آن‌ها اجتناب شود. هم‌چنین، به‌دلیل افزایش تعداد پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و اثرات نامطلوب آن‌ها بر سلامت ماهی (۷ و ۸)، امروزه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان مرسوم ترین مواد شیمیایی به‌منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها به‌دلیل پیامدهای نامطلوب آن بر حیوانات هدف و غیرهدف و زیستگاه طبیعی آن‌ها، محدود یا ممنوع شده است (۹، ۱۰ و ۱۱).

بنابراین تقویت سیستم ایمنی ماهی با محرک‌های ایمنی طبیعی یک راه‌حل مؤثر و جایگزین است که می‌تواند مقاومت در برابر بیماری‌ها را افزایش داده و نیاز به آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر داروهای درمانی را کاهش دهد. در سال‌های اخیر، استفاده از محرک‌های ایمنی در آبزیان به‌منظور بهبود ایمنی، رشد و مقاومت در برابر بیماری‌ها به‌طور گسترده در حال افزایش است (۲).

گنجاندن عصاره‌های گیاهی به‌عنوان یک ماده طبیعی، استراتژی مناسبی برای بهبود عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و مقاومت به بیماری در ماهی‌های پرورشی است (۱۲)، که حضور محتوای بالای مولکول‌های فعال زیستی مانند ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی داشتن چنین ویژگی‌هایی را توضیح می‌دهد (۱۳ و ١٤).

اسیدهای هیومیک دسته‌ای از مواد آلی هستند که عمدتاً از تجزیه میکروبی و تبدیل مواد گیاهی و حیوانی در طبیعت تولید می‌شوند (۱۵). اسیدهای هیومیک از نظر حلالیت به سه دسته تقسیم می‌شوند که شامل اسیدهای قهوه‌ای، اسیدهای سیاه و اسیدهای هیومیک (FLAs) است (۱۵ و ١٦). به‌دلیل حلالیت بالا در محلول‌های اسیدی و قلیایی و وزن مولکولی کم، هیومیک اسیدها فعالیت بیولوژیکی بالاتری نسبت به سایر اسیدهای هیومیک دارند (۱۵، ۱۷ و ۱۸). خواص ایمونولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد میکروبی برای هیومیک اسیدها گزارش شده است که به وجود گروه‌های عاملی مانند کینون‌ها، گروه‌های کربوکسیل و هیدروکسیل و فنول‌ها بستگی دارد (۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ٢٤).

اگرچه اخیراً اثرات مفید اسید فولیک بر روی آبزیان نیز گزارش شده است. به‌عنوان مثال در ماهی لوچ، *Paramisgurnus dabryanus* (Sauvage)، افزودن هیومیک اسید به صورت خوراکی در مقادیر ۲-۱/۵ درصد به‌عنوان جایگزینی برای درمان آنتی‌بیوتیکی پیشنهاد شده است، زیرا اثربخشی آن بر اجزای ایمنی روده (فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت پروتئاز، فعالیت‌های لیزوزیم و کمپلمان، محتوای

ایمونوگلوبولین M، فعالیت آلکالین فسفاتاز و فعالیت اسید فسفاتاز) و عملکرد رشد مشاهده شد (۲۵). علاوه بر این، ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم هیومیک اسید به‌عنوان مکمل غذایی توانست عملکرد رشد را در ماهی تیلاپیا نیل بهبود بخشید (۲۶).

هم‌چنین در مطالعه‌ای که توسط Gao و همکاران (۲۰۱۷) به‌منظور بررسی اثر مکمل‌های اسید هیومیک جیره غذایی در سطوح مختلف (۰، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پارامترهای ایمنی و ترکیبات فلور میکروبی روده ماهی لوچ جوان *P. dabryanus* انجام شد نشان داد که عملکرد رشد شامل وزن نهایی، افزایش وزن (WG)، نرخ رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل خوراک (FCR) در تیمارهایی که توسط اسید هیومیک تغذیه شده بودند افزایش یافت (۲۵). حداکثر نرخ افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در سطح ۱/۵ درصد جیره مشاهده شد. علاوه بر این، فعالیت پروتئاز روده، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، فعالیت لیزوزیم، فعالیت کمپلمان ۳ (C3)، ایمونوگلوبولین M (IgM)، فعالیت اسید فسفاتاز (ACP) و فعالیت آلکالین فسفاتاز (AKP) به‌طور معنی‌داری با افزایش هم‌زمان سطوح هیومیک اسید جیره غذایی افزایش یافت.

ماهی گورخری، *D. rerio* یک ارگانیسم مدل برای آزمایش‌های مختلف بیولوژیکی است که به‌دلیل چرخه تولیدمثل کوتاه، قدرت آماری بالایی را ارائه می‌دهد (۲۷ و ۲۸). با توجه به موارد فوق در خصوص تأثیرات مثبت مکمل هیومیک اسید در آبزی‌پروری به‌منظور بهبود شاخص‌های رشد و پارامترهای ایمنی در مواجهه با شرایط استرس‌زای محیطی و پاتوژن‌ها و نیز نظر به اینکه در دهه گذشته ماهی گورخری یک مدل ایده‌آل برای بررسی‌های اولیه در خصوص نقش ترکیبات زیست‌فعال است، در مطالعه جاری بررسی امکان افزایش رشد، ایمنی و دفاع آنتی‌اکسیدانی در ماهی گورخری با استفاده از مکمل هیومیک اسید بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در شرکت گرگان ماهی، واحد تکثیر و پرورش ماهیان زینتی (شصت‌کلا، گلستان، ایران) انجام شد. در ابتدا ۶۵۰ قطعه ماهی گورخری به مدت دو هفته در آکواریوم‌های شیشه‌ای (۱۰۰ لیتر) نگهداری شدند. ماهی‌ها سه بار در روز جیره غذایی پایه را در حد سیری دریافت کرد. پس از سپری کردن دوره سازگاری، ۶۰۰ ماهی سالم (میانگین وزن بدن ۳/۰۱ ± ۹۶/۰۱ میلی‌گرم) به‌طور تصادفی در ۱۲ آکواریوم (۷۲ لیتر) (۵۰ ماهی/آکواریوم، ۳ آکواریوم در هر تیمار) با هوادهی دائمی و تبادل آب روزانه (۷۰ درصد) قرار گرفتند. در طی یک دوره آزمایشی ۵۶ روزه، ماهی‌ها با جیره‌های حاوی ۰/۱ درصد هیومیک اسید (ctrl)، ۰/۲۵ گرم/کیلوگرم هیومیک اسید (FLA 1)، ۰/۵ گرم/کیلوگرم هیومیک اسید (FLA2) و ۱ گرم/کیلوگرم هیومیک اسید (FLA3) سه بار در روز در حد سیری تغذیه شدند. دما، pH و اکسیژن محلول به‌ترتیب در ۰/۸ ± ۲۵/۲ درجه سانتیگراد، ۰/۳ ± ۷/۶ و ۰/۱۹ ± ۷/۲۲ میلی‌گرم در لیتر و هم‌چنین NO_2، NO_3 و NH_4 در محدوده مناسب (P<۰/۱ ppm) در طول آزمایش نگهداری شدند.

تهیه جیره غذایی: یک جیره غذایی تجاری ماهی گوره خری شرکت بیومار فرانسه در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، جیره پایه به‌طور کامل پودر شد و سطوح مختلف هیومیک اسید (۰، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ گرم به‌ازای کیلوگرم) به آن اضافه گردید و توسط یک همزن برقی کاملاً مخلوط شد. سپس تا زمانی‌که مخلوط حالت

خمیری سفت به خود گیرد آب اضافه شد. خمیر حاصل از یک چرخ گوشت با قطر چشمه ۱ میلی‌متر عبور داده شده و به‌صورت رشته‌های ماکارونی خارج گردید. رشته‌های حاصل، پلت‌ها شکسته شدند تا به اندازه مناسب درآیند. پس از انجام مراحل فوق پلت‌ها در پلاستیک‌های نایلونی دوجداره بسته‌بندی و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شدند.

محاسبه شاخص‌های رشد و زنده‌مانی: به‌منظور بررسی تأثیر مکمل هیومیک اسید در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد، داده‌های به‌دست آمده از زیست‌سنجی‌ها بر اساس فرمول‌های موجود آنالیز شده و برخی از فاکتورهای رشد به شرح ذیل تعیین گردید:

Weight gain (WG, %) = 100 × [(final weight – initial weight) /initial weight]
Feed conversation ratio (FCR) = Feed intake (g)/ (final weight – initial weight)
Specific growth rate (SGR, %/d) =100 × [(Ln final weight-Ln initial weight)/days]
Survival rate (SR, %) = 100 × (final number/initial number)

بررسی شاخص های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی سرم

تهیه نمونه: به‌منظور ارزیابی پارامترهای ایمنی و آنتی‌اکسیدانی سرم خون به‌دلیل این‌که اندازه ماهی بسیار کوچک بود و نمونه‌گیری خون امکان‌پذیر نبود، عصاره کل بدن (WBE) بر اساس روش Yousefi و همکاران (۲۰۱۸) تهیه شد. بدین‌منظور، برای هر تیمار ۹ نمونه تهیه شد و به ویال‌های ۱/۵ سی‌سی استریل منتقل و به‌منظور استفاده طی آنالیزهای ایمنی و آنتی‌اکسیدانی در دمای ۸۰- نگهداری شد (۲۹).

سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم: سنجش آنزیم لیزوزیم سرم به روش کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد (۳۰). برای سنجش این آنزیم از باکتری میکروکوکوس لیزودیکتیکوس (ATCC strain # 4698) به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه میکروکوکوس لوتئوس کشت داده شده بر روی محیط کشت نوترینت آگار در بافر فسفات پتاسیم (pH=۷) ۰/۱ M حل شده و جذب این محلول در مقابل شاهد (کوت حاوی بافر فسفات پتاسیم)، در طول موج ٤٥٠ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/٦ تنظیم شد؛ سپس ۲/۹ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری به کوت اضافه شد، بعد از ٥-٤ دقیقه به دمای تعادل رسید، سپس به کوت شاهد ۰/۱ میلی‌لیتر بافر و به کوت نمونه ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه سرم اضافه شد. کاهش جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس به‌مدت ۱۰ دقیقه در طول موج ٤٥٠ نانومتر ثبت گردید. یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول موج ٤٥٠ نانومتر و دمای ۲٥ درجه سانتی‌گراد، کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های میکروکوکوس لوتئوس ایجاد می‌کند، محاسبه گردید.

اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل سرم: جهت اندازه‌گیری ایمونوگلبولین کل سرم از روش Siwicki و Anderson (۱۹۹۳) استفاده شد. ابتدا میزان پروتئین سرم تعیین شده و سپس به نمونه، پلی‌اتیلن گلایکول ۱۲ درصد اضافه شد. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجددا توسط روش بردفورد اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلایکول محاسبه گردید (۳۱).

سنجش میزان پروتئین کل سرم: اندازه‌گیری میزان پروتئین کل سرم با استفاده از کیت تجاری پارس آزمون و دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی: فعالیت آنزیم‌های سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل فعالیت کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و مالون دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از کیت‌های تجاری کیازیست (همدان، ایران) انجام پذیرفت. فعالیت کاتالاز از طریق تجزیه هیدروژن پراکسید به H_2O_2 با استفاده از کیت‌های تجاری و بر اساس پرتکل شرکت سازنده انجام گرفت (کیازیست، همدان). فعالیت SOD با استفاده از کیت تجاری و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده و توانایی Mn-SOD در مهار تبدیل رسازورین به رسوروفین از طریق کاهش رادیکال‌های سوپراکساید انجام پذیرفت. هم چنین فعالیت GPX از طریق اکسیداسیون NADPH به +NADP با استفاده از دستگاه الایزا انجام پذیرفت. تعیین سطح فعالیت MDA نیز با استفاده از کیت تجاری (ZellBio GmbH، آلمان) با توجه به واکنش با اسید تیوباربیتوریک در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد مورد سنجش قرار گرفت.

استخراج RNA و سنتز cDNA: از هر تکرار سه ماهی به صورت تصادفی برداشته شد. و با استفاده از اسانس گل میخک بیهوش گردید. نمونه روده جداسازی گردید و نمونه‌ها به سرعت در نیتروژن مایع منجمد گردید. نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع در هاون چینی استریل پودر گردید و با استفاده از دستورالعمل RNAx-PLUS، RNA کل از نمونه استخراج گردید. برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، از ژل اگاروز ۱ درصد استفاده گردید. هم‌چنین برای بررسی کمی RNA با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ (Thermofisher 2000c, USA) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۳۰ خوانده شد و مقدار RNA برای نمونه‌ها محاسبه گردید. برای این‌که نمونه‌ها فاقد DNA باشند و در محلول فقط RNA وجود داشته باشد، باید نمونه‌های RNA را تحت تیمار با DNase قرارداد. جهت انجام این کاربر اساس دستورالعمل استفاده آنزیم انجام می‌پذیرد که برای این کار از کیت DNasel شرکت سیناژن استفاده شد.

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از ۱ میکروگرم RNA استخراج شده، ۱ میکرولیتر آنزیم reverse transcriptase (سیناکلون، ایران)، ٤ میکرولیتر بافر RT، ۱ میکرولیتر اولیگونوکلئوتید T، ۲ میکرولیتر dNTPs، و ۱ میکرولیتر بازدارنده RNase انجام پذیرفت.

انجام Real time PCR: Real time PCR در تیوپ‌های مخصوص آن و در ٤ تکرار تکنیکی برای هر تیمار صورت گرفت که محتویات هر تیوپ به مقدار ۲۰ میکرولیتر به‌صورت زیر بود:

۱۰µl بافر سایبر گرین (Ampliqon, Denmark)

۱µl آغازگر پیش‌رونده ژن هدف و رفرنس (غلظت ۱۰ پیکومول)

۱µl آغازگر پس‌رونده ژن هدف و رفرنس (غلظت ۱۰ پیکومول)

۲/۸µl آب

۰/۲µl آنزیم تگ پلیمراز

۵µl cDNA رقیق‌شده (۳-۲ نانوگرم RNA در هر میکرولیتر)

از ژن بتا اکتین به‌عنوان ژن رفرنس برای نرمال سازی سطح بیان ژن‌های مورد نظ استفاده گردید نتایج به‌دست‌آمده توسط دستگاه Real time PCR تحت عنوان CT می‌باشد که نشان‌دهنده تعداد چرخه‌هایی است که سیگنال فلورسنت نسخه‌های ژنی را شناسایی می‌کند.

طراحی آغازگرها: آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از مطالعات قبلی گرفته‌شده و با نرم‌افزار آغازگر ۳ با استفاده از توالی موجود در بانک ژن آزموده شدند و با آزمایش کردن در دستگاه PCR بهترین دما برای تکثیر به‌دست آمد. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده‌شده است.

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده.

کد دسترسی	توالی پرایمر	
AY340959.1	CGTCTCCACATCTCGTACTCA	IL-1 q-PCRF
	GTGTCTTTCCTGTCCATCTCC	IL-1 q-PCRR
AB128865.1	GAATGGCTTGGCCGATACAGGATA	IFN q-PCRF
	TCCTCCACCTTTGACTTGTCCATC	IFN q-PCRR
AB128865.1	CTGCTTCACGCTCCATAAGA	TNF-a-PCRF
	CTGGTCCTGGTCATCTCTCC	TNF-a-PCRR
NM_001007281	CCAAGTAAACCAGCGGCTTCT	GPx q-PCRF
	TGATGTGCAGTGGACGGTTTAT	GPx q-PCRR
BC055516.1	GGGTGGCAATGAGGAAAG	SOD q-PCRF
	GCCCACATAGAAATGCACAG	SOD q-PCRR
AJ007505.1	GCATGTTGGAAAGACGACAC	CAT q-PCRF
	GTGGATGAAAGACGGAGACA	CAT q-PCRR
BC083506	GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC	Gapdh q-PCRF
	GTGCAGGAGGCATTGCTTACA	Gapdh q-PCRR

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها: این مطالعه در قالب چهار تیمار و هر کدام در سه تکرار انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنف بررسی شد. بررسی آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS20 و به کمک آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین توکی (Tukey' HSD test) انجام گردید. تمام مفروضات آنالیز واریانس پیش از انجام تحلیل‌های آماری، مورد بررسی قرار گرفت و در صورت لزوم از تبدیل‌های مناسب استفاده شد. شایان ذکر است که تمامی آزمون‌ها در سطح معنی‌داری کم‌تر از ۵ درصد تفسیر شد و نتایج نهایی به‌صورت Mean ± SE گزارش گردید. برای ترسیم نمودارها نیز از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۶ استفاده شد.

نتایج

پارامترهای رشد: جدول ۲ اثرات مکمل غذایی هیومیک اسید را بر پارامترهای رشد نشان می‌دهد. افزودن هیومیک اسید به جیره ماهی تأثیر معنی‌داری بر پارامترهای رشد (FW، WG و FCR) نداشت ($P>0/05$).

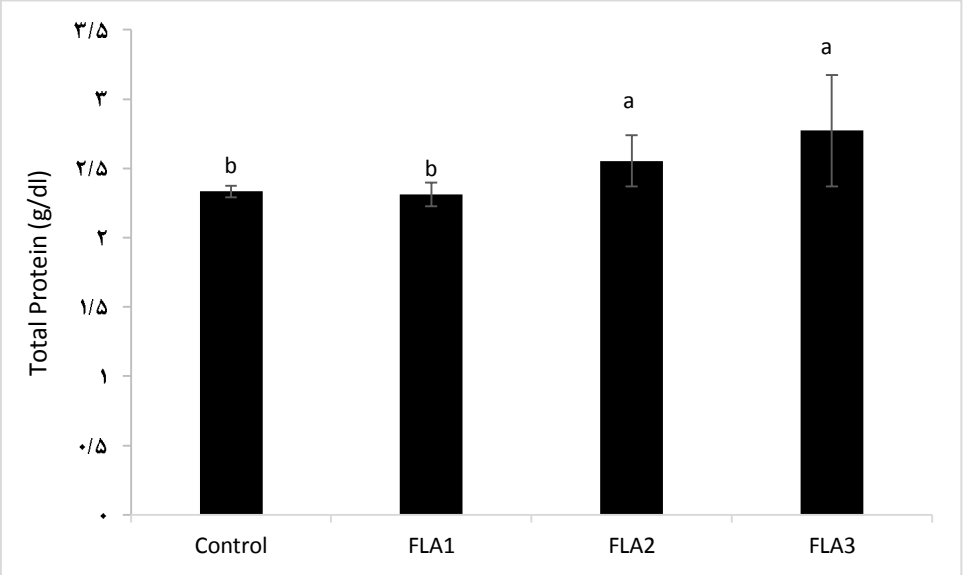
جدول ۲- اثرات سطوح مختلف مکمل هیومیک اسید بر عملکرد رشد ماهی گورخری.

	CT	T۱	T۲	T۳
وزن اولیه (mg)	۹٦/۰ ± ۳/۰۱	۸۵/۵ ± ۱۰/۰۹	۸۱/۳ ± ۱۰/۰۱	۸۱/۳ ± ۱۱/۰٦
وزن نهایی (mg)	۳۳۸/٤ ± ۳/۳	۳۵۳/٦ ± ٦/۷	۳۱۳/۲ ± ۲/۹	۳۱٦/۳ ± ۵/٦
افزایش وزن (mg)	۲۸۷/۳ ± ۱۸/۰	۲۸۷/٦ ± ٦/۱	۲۳۲/٦ ± ۱۲/۹	۲۳۵/۷ ± ۵/٦
نرخ رشد ویژه (%/d)	۲/۵۱ ± ۰/۳۸	۲/۷۷ ± ۰/۲۰	۲/٤۰ ± ۰/۳٤	۲/٤۳ ± ۰/۳۰

اعداد (میانگین ± انحراف معیار) در یک ردیف با حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵)

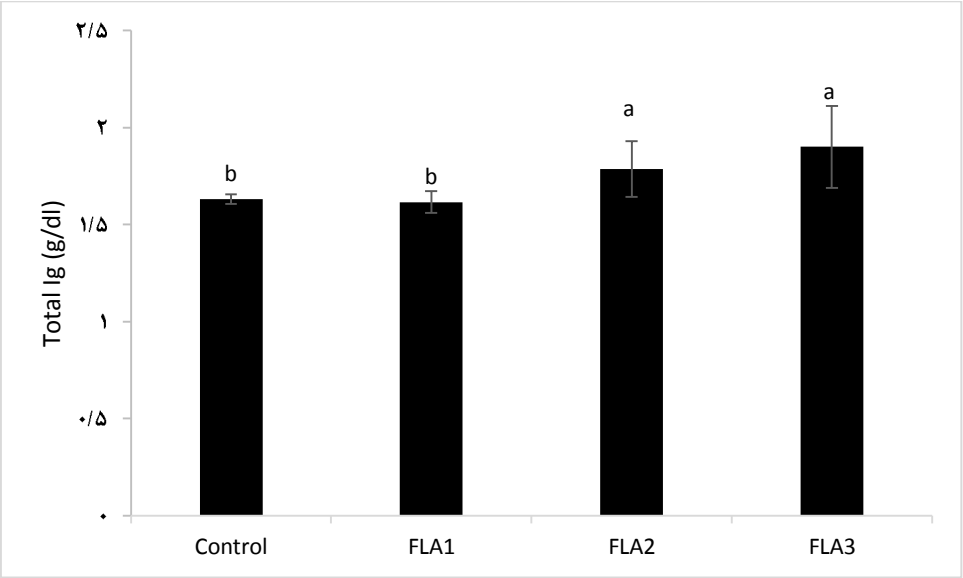
پارامترهای ایمنی و آنتی‌اکسیدانی کل بدن: به‌منظور ارزیابی اثرات مکمل هیومیک اسید بر پاسخ ایمنی ماهی گورخری، سطح فعالیت آنزیم لیزوزیم، ایمونوگلوبولین و پروتئین کل در سرم کل بدن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۱-۰/۵ گرم در کیلوگرم هیومیک اسید به‌طور معنی‌داری تمام پارامترهای ایمنی را نسبت به سایر جیره‌ها افزایش داد (P<۰/۰۵).

اگرچه تفاوت معنی‌داری در سطح پارامترهای ایمنی میان تیمارهای مصرف‌کننده ۰/۲۵ گرم بر کیلوگرم هیومیک اسید و تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵). هم‌چنین هیچ تفاوت معنی‌داری در سطح پارامترهای ایمنی میان تیمارهای مصرف‌کننده ۰/۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم هیومیک اسید مشاهده نشد (P>۰/۰۵).



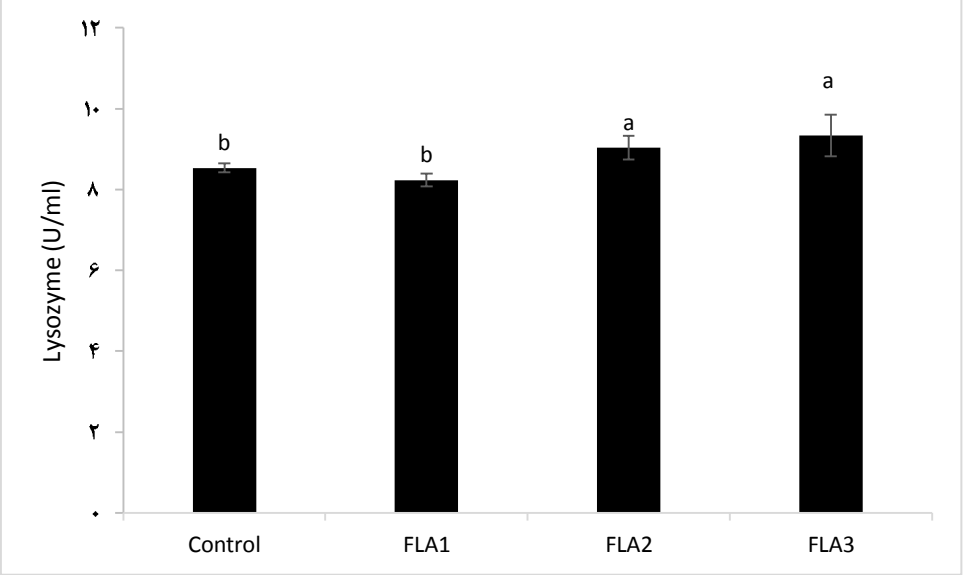
شکل ۱- اثرات سطوح مختلف مکمل هیومیک اسید بر پروتئین کل سرم در ماهی گورخری تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



شکل ۲- اثرات سطوح مختلف مکمل هیومیک اسید بر ایمونوگلوبولین کل سرم در ماهی گورخری تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



شکل ۳- اثرات سطوح مختلف مکمل هیومیک اسید بر میزان سطح فعالیت لیزوزیم سرم در ماهی گورخری تغذیه شده با جیره حاوی سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.

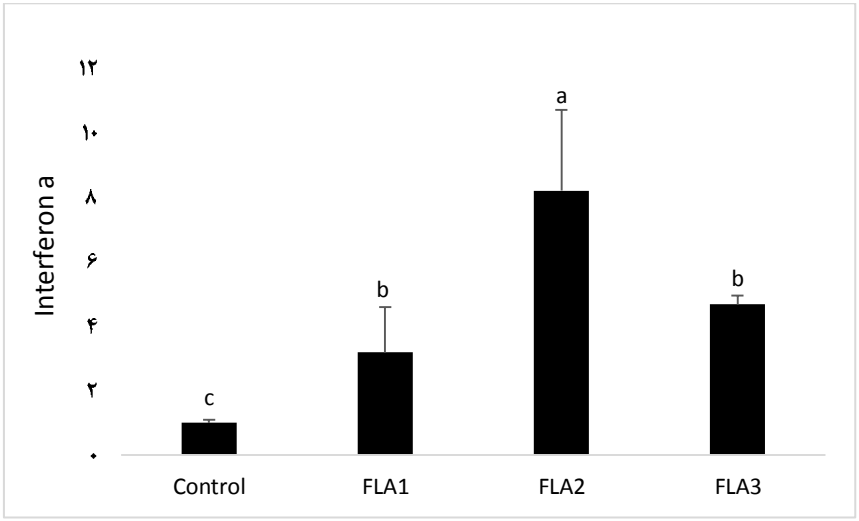
در خصوص فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم کل بدن، هیچ اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های CAT، SOD و GPX در میان تیمارهای مصرف‌کننده هیومیک اسید و تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۳).

جدول ۳- اثرات سطوح مختلف مکمل هیومیک اسید بر پارامترهای آنتی‌اکسیدانی در سرم کل بدن ماهی گورخری.

	CT	T۱	T۲	T۳
Catalase (ml/min/n)	۸/۰۹ ± ۰/۰۳ [a]	۸/۰۲ ± ۰/۰۸ [a]	۸/۱٤ ± ۰/۱۲ [a]	۸/۱۹ ± ۰/۲۱ [a]
SOD (u/ml)	۷۹۵/۲۲ ± ۲۸/۲۱ [a]	۷۹۳/۲۳ ± ۹/٤٦ [a]	۸۰۲/٦۸ ± ۱٦/۱۱ [a]	۸۱۰/٦۰ ± ۱۹/۹۳ [a]
GPx (nmol/min/ml)	۱۲٦/۰۰ ± ۰/۷٦ [a]	۱۲۵/٤۹ ± ۰/۷۸ [a]	۱۲۷/٤۵ ± ۰/۹۰ [a]	۱۲۸/۵۲ ± ۱/٤۹ [a]

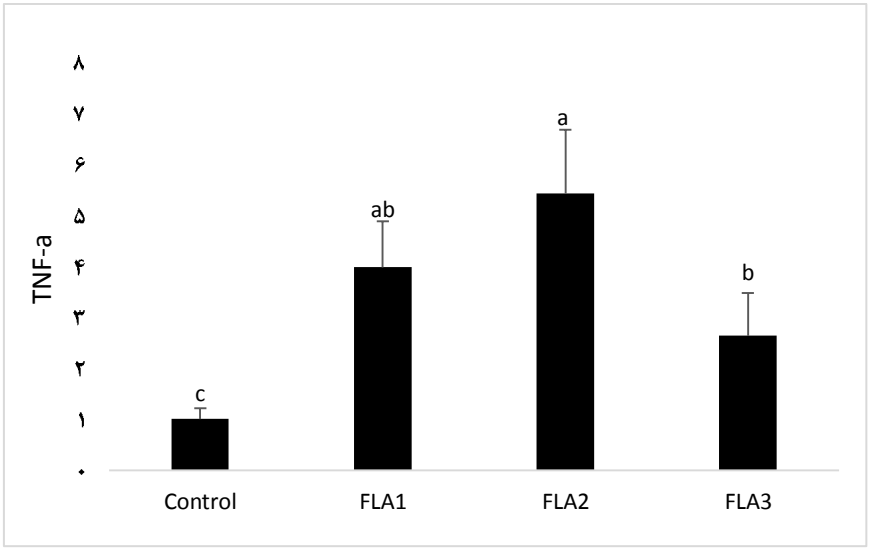
اعداد (میانگین ± خطای استاندارد) در یک ردیف با حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵)

بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی و آنتی‌اکسیدانی: مکمل هیومیک اسید موجود در جیره غذایی به‌طور معنی‌داری بر بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی و مرتبط با ایمنی در ماهی گورخری تأثیر گذاشت. بیان ژن‌های IFN-α و TNF-α در ماهی‌های تغذیه شده با ۱-۰/۲۵ گرم هیومیک اسید در هر کیلوگرم جیره نسبت به تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که با حداکثر میزان بیان در تیمار مصرف‌کننده ۰/۵ گرم بر کیلوگرم هیومیک اسید همراه بود (P<۰/۰۵) (شکل‌های ٤ و ۵). اگرچه هیچ تفاوت معنی‌داری در میزان بیان ژن‌های IFN-α و TNF-α در میان تیمارهای مصرف‌کننده ۰/۲۵ و ۱ گرم بر کیلوگرم هیومیک اسید مشاهده نشد (P>۰/۰۵). بیان IL-1 نیز در تیمار مصرف‌کننده ۰/۵ گرم بر کیلوگرم هیومیک اسید نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) (شکل ٦). سایر غلظت‌های هیومیک اسید بر بیان ژن IL-1 تأثیری نداشتند (P>۰/۰۵). بیان ژن GPx در پاسخ به تمام سطوح مصرف هیومیک اسید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵) که بدون تفاوت معنی‌داری در بیان GPx در میان تیمارهای آزمایشی همراه بود (P>۰/۰۵) (شکل ۸). هم‌چنین افزایش معنی‌داری در بیان ژن کاتالاز در میان تیمارهای مصرف‌کننده هیومیک اسید و تیمار شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (شکل ۹). بیان ژن SOD به‌دنبال مصرف تمام سطوح مکمل غذایی هیومیک اسید به‌طور معنی‌داری افزایش یافت که بالاترین سطح آن در تیمار مصرف‌کننده ۰/۵ گرم در کیلوگرم هیومیک اسید مشاهده شد (P<۰/۰۵) (شکل ۷). مشابه ژن IFN-α، تفاوت معنی‌داری در بیان SOD بین تیمارهای ۰/۲۵ و ۱ گرم در کیلوگرم هیومیک اسید وجود نداشت (P>۰/۰۵).



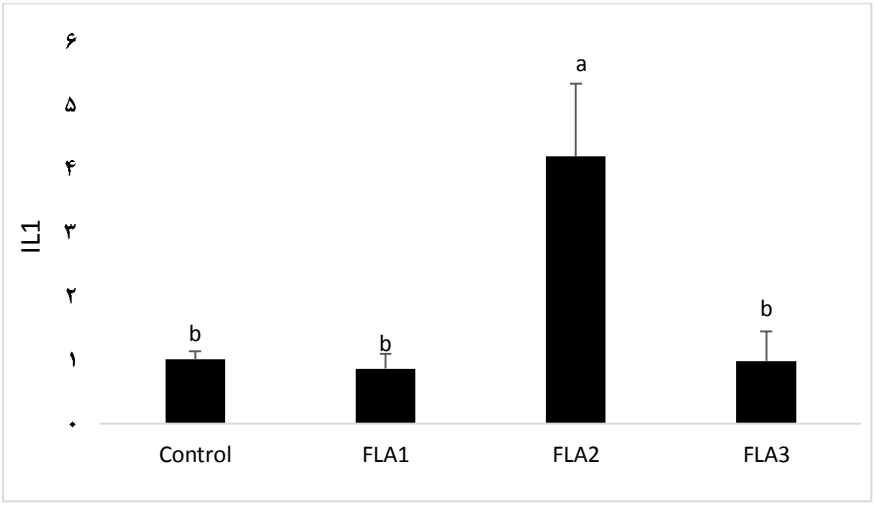
شکل ٤- اثرات سطوح مختلف مصرف مکمل هیومیک اسید بر بیان ژن IFN-α در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



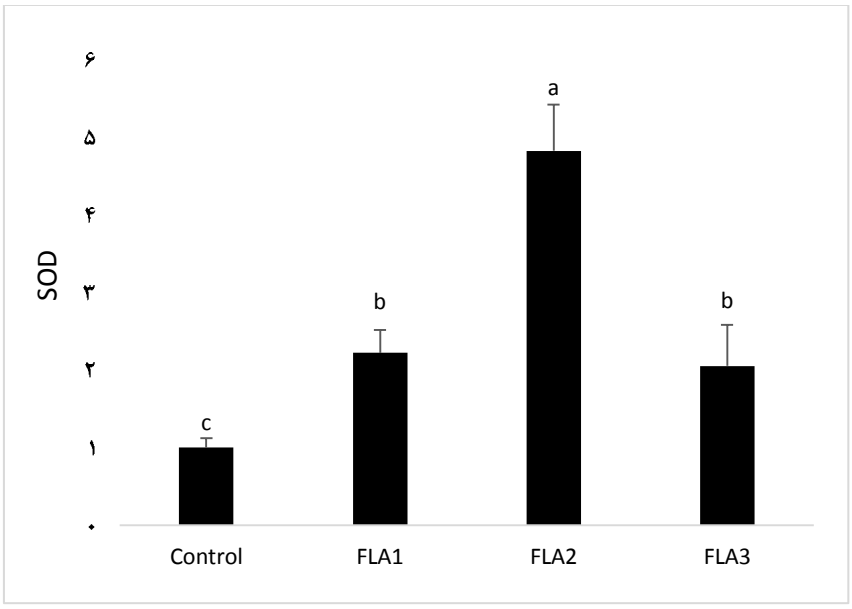
شکل ٥- اثرات سطوح مختلف مصرف مکمل هیومیک اسید بر بیان ژن TNF-a در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



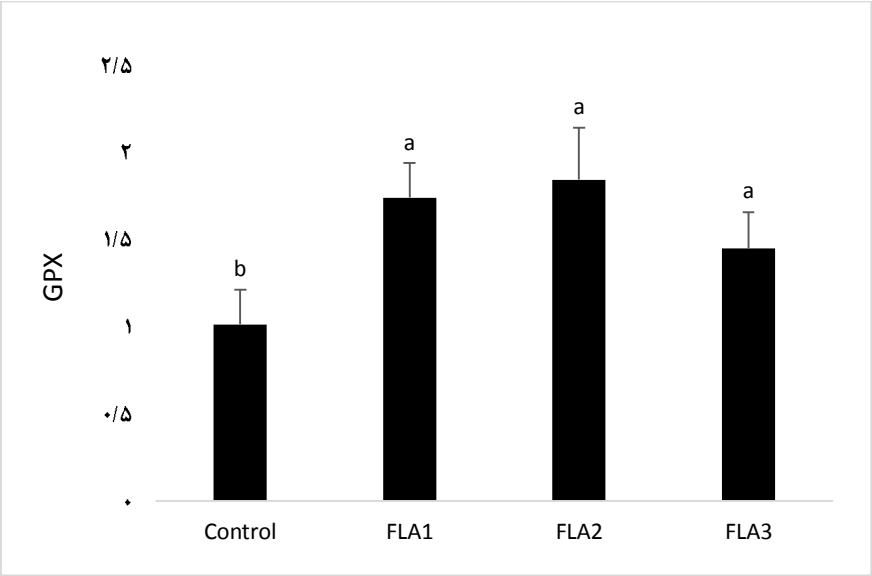
شکل ٦- اثرات سطوح مختلف مصرف مکمل هیومیک اسید بر بیان ژن IL1 در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



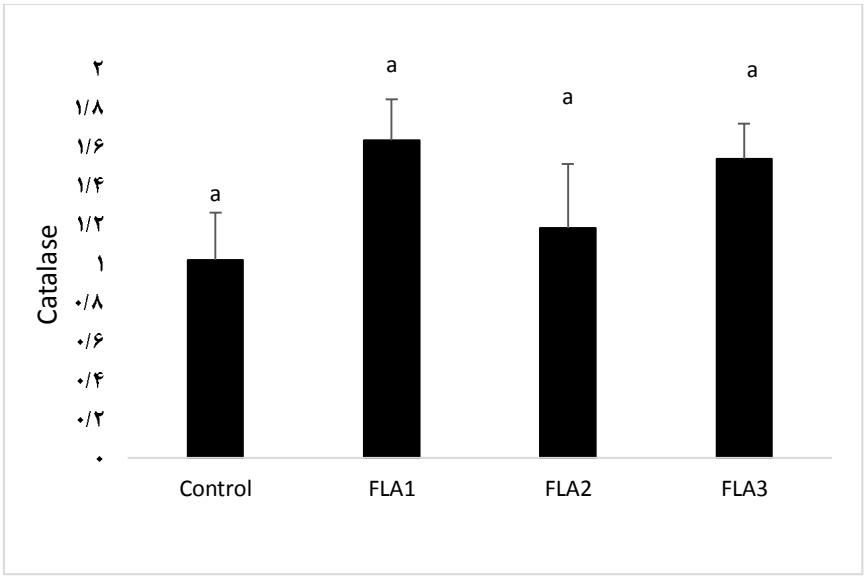
شکل ۷- اثرات سطوح مختلف مصرف مکمل هیومیک اسید بر بیان ژن آنزیم آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



شکل ۸- اثرات سطوح مختلف مصرف مکمل هیومیک اسید بر بیان ژن آنزیم آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پر اکسیداز در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.



شکل ۹- اثرات سطوح مختلف مصرف مکمل هیومیک اسید بر بیان ژن آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز در ماهی گورخری تغذیه شده با سطوح مختلف هیومیک اسید.

در هر نمودار حروف متفاوت نشانه معنی‌دار بودن در سطح ۰/۰۵ می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه می‌شوند.

بحث و نتیجه‌گیری

پتانسیل استفاده از اسیدهای آلی در بهبود رشد و ایمنی حیوانات اهلی بارها مورد بررسی قرار گرفته است (۳۲، ۳۳ و ۳٤). علاوه بر این، اسیدهای آلی به‌عنوان یک مکمل غذایی تأثیرات مثبتی بر روی آبزیان، عمدتاً ماهی‌ها، داشته است (۳٤، ۳۵، ۳٦، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ٤۰، ٤۱). در پژوهش حاضر، ماهی گورخری به‌عنوان یک ماهی مدل به‌منظور تعیین پتانسیل هیومیک اسید به‌عنوان یک اسید آلی غنی از فنول در بهبود ایمنی و رشد ماهی مورد استفاده قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، استفاده از جیره غذایی حاوی هیومیک اسید تأثیر معنی‌داری بر عملکرد رشد ماهی گورخری نداشت. این نتایج برخلاف پژوهش‌های پیشین بود که بهبود رشد ماهی را به دنبال مصرف مکمل هیومیک اسید گزارش کرده بودند. به‌عنوان مثال، Gao و همکاران (۲۰۱۷) پس از تغذیه ماهی با جیره غذایی حاوی ۲-۱/۵ درصد هیومیک اسید، بهبود آشکاری را در عملکرد رشد لوچ ماهی *P. dabryanus* مشاهده کردند که به عملکرد تحریک‌کننده هیومیک اسید بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی نسبت داده شد (۲۵). در پژوهش Lieke و همکاران (۲۰۲۱)، افزودن ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از مکمل هیومیک اسید به‌مدت ۲۸ روز به آب باعث افزایش رشد و کاهش ضریب تبدیل غذایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، *O. mykiss* شد که پژوهش‌گران نتیجه گرفتند افزایش رشد می‌تواند به‌دلیل تأثیر مثبت هیومیک اسید بر سلامت کلی و مقاومت در برابر استرس ماهی باشد (٤۲). در تیلاپیا نیل، ٤۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم هیومیک اسید در جیره غذایی منجر به رشد ماهی از طریق بهبود استفاده از پروتئین شد (۲٦). در تیلاپیا موزامبیک، جیره غذایی حاوی ٤ درصد هیومیک اسید ضریب تبدیل غذایی را کاهش داد (٤۳). اثرات محرک رشد هیومیک اسید در حیوانات دیگری مانند خوک (٤٤ و ٤۵) و طیور (۱۵ و ٤٦) نیز گزارش شده است، که عمدتاً به افزایش عملکرد هیومیک اسید بر سلامت موجود، فعالیت آنزیم‌های گوارشی و بهره‌وری از خوراک نسبت داده شده است. اگرچه در تأیید نتایج ما، هیچ بهبودی در رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در پاسخ به اسید هیومیک ۱/۲-۰/۳ درصد در جیره غذایی طی دوره تغذیه ٦۰ روزه نشان داده نشد (٤۷). نتایج مشابهی در ماهی کپور معمولی (٤۸) و ماهی باس (*D. labrax*) (٤۹) پس از مصرف اسید هیومیک گزارش شد. تفاوت در گونه‌های ماهی، شرایط آزمایشی، نوع اسیدهای آلی و سطوح مورد استفاده در جیره غذایی ممکن است دلیل تضاد بین نتایج ما و سایر مطالعات باشد.

ایمونوگلوبولین‌ها به‌عنوان یکی از بخش‌های اصلی ایمنی ذاتی هومورال در ماهی، گلیکوپروتئین‌هایی هستند که می‌توانند طیف وسیعی از پاتوژن‌ها را شناسایی کرده و سایر سلول‌ها و مولکول‌های ایمنی را به‌منظور از بین بردن آن‌ها به‌کار گیرند (۵۰) علاوه بر این، لیزوزیم از طریق هیدرولیز پیوندهای گلیکوزیدی بتا- [۱،٤] موجود در پپتیدوگلیکان‌های دیواره سلولی باکتری، فعالیت باکتری‌کشی دارد (۵۱). علاوه بر این، پروتئین کل به‌عنوان یکی از مهم‌ترین بیومارکرهای بررسی وضعیت ایمنی در ماهی که از آنتی‌بادی‌ها و آلبومین تشکیل شده است، شناخته می‌شود (۵۲). نتایج مطالعه جاری عملکرد تقویت‌کننده سیستم ایمنی ناشی از مصرف هیومیک اسید را در ماهی گورخری نشان داد که از طرق پارامترهای ایمنی بالاتر از جمله ایمونوگلوبولین، فعالیت لیزوزیم و پروتئین کل در پاسخ به مصرف هیومیک اسید در سطوح ۱-۰/۵ گرم در کیلوگرم جیره غذایی مشخص می‌شود. نتایج مطالعه حاضر با سایر پژوهش‌هایی که اثرات ایمنی‌زایی هیومیک اسیدها را در حیوانات اهلی

مختلف (۵۳، ٥٤ و ٥٥)، ماهی (۲۵ و ٤۲) و گونه‌های مختلف سخت‌پوستان (٥٦، ٥۷ و ٥۸) بررسی کرده‌اند، مطابقت دارد. در مجموع، پتانسیل هیومیک اسیدها در بهبود سطوح ایمنی ماهی هنوز در آغاز راه است. در ماهی لوچ جوان *P. dabryanus*، پارامترهای ایمنی روده (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت پروتئاز روده، لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، کمپلمان ۳ (C3)، مقادیر آلکالین فسفاتاز و اسید فسفاتاز) با افزایش سطوح هیومیک اسید در جیره غذایی افزایش یافت (۲۵). قرار گرفتن لارو ماهی گورخری در معرض غلظت‌های ۵ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیومیک اسید منجر به بیان ژن‌های مرتبط با ایمنی مانند لیزوزیم و پراکسیداز اختصاصی میلوئید شد (٤۲)، در حالی‌که غلظت‌های بالا منجر به سرکوب پاسخ ایمنی شد. به‌طورکلی، هنوز اطلاعات بسیار کمی در مورد مکانیسم‌های دخیل در خصوص اثرات تعدیل‌کننده هیومیک اسید بر روی سیستم ایمنی وجود دارد. اگرچه، بر اساس شواهد، هیومیک اسید می‌تواند وضعیت ایمنی میزبان را از طریق تعدیل میکرو فلور روده ارتقا دهد (۲۲، ۲۵ و ٤٦). علاوه بر این، به خوبی شناخته شده است که برخی از انواع هیومیک اسیدها ممکن است عملکرد ضد التهابی داشته باشند (۲۲، ۵۹ و ٦۰). بر این اساس، در این مطالعه، تغذیه ماهی با هیومیک اسید منجر به تحریک بیان ژن‌های سیتوکین‌های التهابی (IL-1، IFN-α، TNF-α) شد، به‌ویژه در ماهی‌هایی که ۰/۵ گرم هیومیک اسید در کیلوگرم جیره غذایی دریافت کردند. سیتوکین‌ها را می‌توان به‌عنوان نشانگر پاسخ ایمنی ذاتی در ماهی استفاده کرد (٦۱ و ٦۲). سیتوکین‌ها به‌عنوان مولکول‌های سیگنال‌دهی، نقش مهمی در سیستم ایمنی ذاتی و تطبیقی دارند. سیتوکین‌هایی که ایمنی ذاتی را در ماهی تنظیم می‌کنند عمدتاً توسط ماکروفاژها تولید می‌شوند (٦۱، ٦۳ و ٦٤). IL-1β، اینترفرون و فاکتور نکروز تومور آلفا (TNF-α) از میانجی‌های اصلی التهاب در ماهی هستند (٦۱ و ٦۲). در پژوهش‌های کنونی، تحریک پاسخ‌های التهابی در ماهی ممکن است نشان‌دهنده اثرات تحریک‌کننده ایمنی توسط هیومیک اسید باشد. اگرچه فعالیت تعدیل‌کننده التهاب توسط هیومیک اسید هنوز در ماهی‌ها مورد مطالعه قرار نگرفته است، اما مطالعات مختلفی در مورد فرآیندهای التهابی با اسیدهای هیومیک در ماهی و سایر مهره‌داران وجود دارد (٤۰ و ٥٥). در باس اروپایی، *D. labrax*، افزایش بیان ژن‌های ضد التهابی (IL10، TGF-b) پس از قرار گرفتن در معرض اسید هیومیک مشاهده شد (٥٥). هم‌چنین، یک آزمایش برون‌تنی انجام شده توسط Constance و همکاران (۲۰۰۹) عملکرد ضد التهابی هومات پتاسیم را تأیید کرد (٦٥).

با این‌حال، هیومات سدیم به‌طور معنی داری بیان ژن‌های التهابی از جمله TNF-α، اینترلوکین‌های IL-6 و IL-1β را در خوکچه‌های از شیر گرفته کاهش داد که نشان‌دهنده اثرات تعدیل‌کننده ایمنی اسید هیومیک از طریق کاهش تولید سیتوکین‌های پیش التهابی است (٥٥). با در نظر گرفتن نتایج مطالعات فوق، این فرض تقویت می‌شود که ایمنی تقویت شده ناشی از هیومیک اسید در این مطالعه ممکن است به‌دلیل اثرات تحریک‌کننده هیومیک اسید بر پارامترهای ایمنی (به‌عنوان مثال ایمونوگلوبولین، فعالیت لیزوزیم و پروتئین کل)، ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (مانند اینترفرون-α، IL-1، TNF-α، SOD، GPx) و میکرو فلور روده (۲۲، ۲۵، ٤۲ و ٦٦) باشد.

SOD، CAT و GPX معمولاً به‌عنوان بیومارکرهای مناسب به‌منظور بررسی آسیب رادیکال‌های آزاد در ماهی در نظر گرفته می‌شوند، که در حالی‌که مقادیر آن‌ها افزایش می‌یابد، فعالیت‌های ضداکسیدانی در برابر پروکسید آن‌ها نیز افزایش

می‌یابد (٦٧، ٦٨ و ٦٩). در مطالعه حاضر، هیومیک اسید هیچ تأثیری بر فعالیت‌های CAT، SOD و GPx نداشت. این نتایج در تضاد با پژوهش‌های پیشین بود که در آن اثر محرک هیومیک اسید بر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گزارش شد (٧٠). در ماهی لوچ (*P. dabryanus*)، فعالیت SOD، CAT و GPx با افزایش سطح هیومیک اسید جیره غذایی افزایش یافت (٢٥). با این حال، در مطالعه حاضر هیومیک اسید بیان ژن SOD و GPx را افزایش داد. این نتیجه می‌تواند به این دلیل باشد که بیان یک ژن خاص همیشه منجر به سنتز پروتئین مربوط به آن نمی‌گردد، که ممکن است دلایل مختلفی داشته باشد مانند خاموش شدن ژن بر اثر فعالیت میکرو RNA (٧١). مشابه نتایج مطالعه جاری، ٥٠٠ میلی‌گرم هیومیک اسید بیان ژن‌های آنتی‌اکسیدانی (cat, sod-1) را در لارو ماهی گورخری افزایش داد (٤٢). بر اساس شواهد، خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد هیومیک اسید به حضور گروه‌های فنولی در ترکیب بیوشیمیایی آن نسبت داده شده است (٢١).

در مجموع نتایج مطالعه حاضر نشان داد که غنی‌سازی جیره غذایی ماهی گورخری با ١-٠/٥ گرم هیومیک اسید در کیلوگرم غذا سیستم ایمنی ماهی را از طریق افزایش پارامترهای ایمنی ذاتی (Ig، لیزوزیم و پروتئین کل) و تحریک بیان ژن‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی تقویت کرد (IFN-α, IL-1, TNF-α, SOD and GPx). با این‌حال، جیره غذایی حاوی هیومیک اسید هیچ اثر معنی‌داری بر فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی نداشت. علاوه بر این، هیومیک اسید رژیم غذایی تأثیری بر پارامترهای رشد ماهی نداشت. یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که جیره غذایی حاوی ٠/٥ گرم هیومیک اسید در کیلوگرم به‌عنوان بهترین دوز به‌منظور بهبود پارامترهای ایمنی در ماهی گورخری است.

منابع

1. Hoseinifar, S. H., Jahazi, M. A., Nikdehghan, N., Van Doan, H., Volpe, M. G., & Paolucci, M. (2020). Effects of dietary polyphenols from agricultural by-products on mucosal and humoral immune and antioxidant responses of convict cichlid (*Amatitlania nigrofasciata*). *Aquaculture*, 517, 734790.
2. Dawood, M. A., Koshio, S., & Esteban, M. Á. (2018). Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10, 950-974.
3. Wang, X., Li, C., Thongda, W., Luo, Y., Beck, B., & Peatman, E. (2014). Characterization and mucosal responses of interleukin 17 family ligand and receptor genes in channel catfish Ictalurus punctatus. *Fish & shellfish immunology*, 38, 47-55.
4. Hoseini, S. M., Taheri Mirghaed, A., & Ghelichpour, M. (2020). Effects of dietary tryptophan levels and fish stocking density on immunological and antioxidant responses and bactericidal activity against Aeromonas hydrophila in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*, 51, 1455-1463.
5. Abdel-Latif, H. M., Abdel-Tawwab, M., Khafaga, A. F., & Dawood, M. A. (2020). Dietary origanum essential oil improved antioxidative status, immune-related genes, and resistance of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to Aeromonas hydrophila infection. *Fish & shellfish immunology*, 104, 1-7.
6. Shoemaker, C., Xu, D.H., Lafrentz, B., & Lapatra, S. (2015). Overview of fish immune system and infectious diseases. *Dietary nutrients, additives and fish health. Wiley, Canada*, 1-24.
7. Carnevali, O., Avella, M., & Gioacchini, G. (2013). Effects of probiotic administration on zebrafish development

and reproduction. *General and comparative endocrinology*, 188, 297-302.
8. Rodrigues, S., Antunes, S., Nunes, B., & Correia, A. (2017). Histological alterations in gills and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after exposure to the antibiotic oxytetracycline. *Environmental toxicology and pharmacology*, 53, 164-176.
9. Cabello, F. C. (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental microbiology*, 8, 1137-1144.
10. Manage, P. M. (2018). Heavy use of antibiotics in aquaculture ;emerging human and animal health problems–a review.
11. Lulijwa, R., Rupia, E. J., & Alfaro, A. C. (2020). Antibiotic use in aquaculture, policies and regulation, health and environmental risks: a review of the top 15 major producers. *Reviews in Aquaculture*, 12, 640-663.
12. Suphoronski, S., Chideroli, R., Facimoto, C., Mainardi, R., Souza, F., Lopera-Barrero, N., Jesus, G., Martins, M., Di Santis, G., & De Oliveira, A. (2019). Effects of a phytogenic ,alone and associated with potassium diformate, on tilapia growth, immunity, gut microbiome and resistance against francisellosis. *Scientific reports*, 9, 1-14.
13. Arjin, C., Pringproa, K., Hongsibsong, S., Ruksiriwanich, W., Seel-Audom, M., Mekchay, S., & Sringarm, K. (2020). In vitro screening antiviral activity of Thai medicinal plants against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *BMC veterinary research*, 16, 1-9.
14. Awad, E. & Awaad, A. (2017). Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & shellfish immunology*, 67, 40-54.
15. Mao, Y. (2019). Modulation of the growth performance, meat composition, oxidative status, and immunity of broilers by dietary fulvic acids. *Poultry Science*, 98 (10), 4509-4513.
16. Senn, T. L., & Kingman, A. R. (1973). A review of humus and humic acids. *Research series*, 145, 1-5.
17. Petronia, C. (2020). Use of Biostimulants to Improve Salinity Tolerance in Agronomic Crops. *Agronomic Crops: Volume 3: Stress Responses and Tolerance*, 423.
18. El-Baset, A., & Kasem, M. M. (2022). Improving growth characteristics and vase life of dendranthema grandiflorum 'flyer'using humic and fulvic acids as biostimulants substances. *Scientific Journal of Flowers and Ornamental Plants*, 9 (2), 87-102.
19. Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L., & Maccarthy, P. (1986). Humic substances in soil, sediment, and water. 1985. *Soil Science*, 142 (5), 323.
20. Vucskits, A. V., Hullár, I., Bersényi, A., Andrásofszky, E., Kulcsár, M., & Szabó, J. (2010). Effect of fulvic and humic acids on performance, immune response and thyroid function in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94 (6), 721-728.
21. Rodríguez, N. C., Urrutia, E. C., Gertrudis, B. H., Chaverri, J. P., & Mejía, G. B. (2011). Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 9 (3), 123-7.
22. Winkler, J., & Ghosh, S. (2018). Therapeutic potential of fulvic acid in chronic inflammatory diseases and diabetes. *Journal of diabetes research*, 2018.
23. Qin, Y., Zhang, M., Dai, W., Xiang, C., Li, B., & Jia, Q. (2019). Antidiarrhoeal mechanism study of fulvic acids based on molecular weight fractionation. *Fitoterapia*, 137, 104270.
24. Dai, C., Xiao, X., Yuan, Y., Sharma, G., & Tang, S. (2020). A comprehensive toxicological assessment of fulvic acid. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020.
25. Gao, Y., He, J., He, Z., Li, Z., Zhao, B., Mu, Y., Lee, J.Y., & Chu, Z. (2017). Effects of fulvic acid on growth performance and intestinal health of juvenile loach Paramisgurnus dabryanus (Sauvage). Fish & shellfish immunology, 62, 47-56.

26. Jusadi, D., Aprilia, T., Setiawati, M., Suprayudi, M. A., & Ekasari, J. (2020). Dietary supplementation of fulvic acid for growth improvement and prevention of heavy metal accumulation in Nile tilapia fed with green mussel. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46 (3), 295-301.
27. Goldsmith, P. (2004). Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when. *Current opinion in pharmacology*, 4 (5), 504-512.
28. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. *Biological reviews*, 83 (1), 13-34.
29. Yousefi, S., Hoseinifar, S. H., Paknejad, H., & Hajimoradloo, A. (2018). The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). *Fish & shellfish immunology*, 73, 192-196.
30. Subramanian, S., Mackinnon, S. L., & Ross, N. W. (2007). A comparative study on innate immune parametrs in the pidrmal mucus of various fish species. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: *Biochmistry and Molecular Biology*, 148, 256-263.
31. Siwicki, A. K., & Anderson, D. P. (1993). Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum.*Fish Disease Diagnosis and Prevention Methods Olsztyn*, Poland. 105-12.
32. Lee, D. N., Liu, S. R., Chen, Y. T., Wang, R. C., Lin, S. Y., & Weng, C. F. (2007). Effects of diets supplemented with organic acids and nucleotides on growth, immune responses and digestive tract development in weaned pigs. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 91 (11-12), 508-518.
33. Khan, S. H., & Iqbal, J. (2016). Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. *Journal of applied animal research*, 44 (1), 359-369.
34. Ng, W. K., & Koh, C. B. (2017). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 9 (4), 342-368.
35. Abdel-Wahab, A. M., El-Refaee, A. M., & Ammar, A. A. (2012). Effects of humic acid as feed additive in improvement of nonspecific immune response and disease resistance in common carp (*Cyprinus carpio*). *Egyptian Journal for Aquaculture*, 2 (1).
36. El-Ashram, A. M., & Mohammed, M. A. (2012). Protective Effects of Humic Acid to Intoxication with Deltamethrin in Nile-Tilapia (Oreochromis Niloticus). *Journal of the Arabian aquaculture society*, 7 (2), 65-72.
37. Busti, S., Rossi, B., Volpe, E., Ciulli, S., Piva, A., D'Amico, F., Soverini, M., Candela, M., Gatta, P.P., Bonaldo, A., & Grilli, E. (2020). Effects of dietary organic acids and nature identical compounds on growth, immune parameters and gut microbiota of European sea bass. Scientific Reports, 10 (1), 21321.
38. Deng, J., Lin, B., Zhang, X., Guo, L., Chen, L., Li, G., Wang, Q., Yu, C., & Mi, H. (2020). Effects of dietary sodium humate on growth, antioxidant capacity, non-specific immune response, and resistance to Aeromonas hydrophila in genetic improvement of farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*). Aquaculture, 520, 734788.
39. Pelusio, N. F., Rossi, B., Parma, L., Volpe, E., Ciulli, S., Piva, A., D'Amico, F., Scicchitano, D., Candela, M., Gatta, P. P., & Bonaldo, A. (2020). Effects of increasing dietary level of organic acids and nature-identical compounds on growth, intestinal cytokine gene expression and gut microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) reared at normal and high temperature. Fish & Shellfish Immunology, 107, 324-335.
40. Brandts, I., Balasch, J. C., Gonçalves, A. P., Martins, M. A., Pereira, M. L., Tvarijonaviciute, A., Teles, M., & Oliveira, M. (2021). Immuno-

modulatory effects of nanoplastics and humic acids in the European seabass (Dicentrarchus labrax). *Journal of Hazardous Materials*, 414, 125562.

41. Prokešová, M., Bušová, M., Zare, M., Tran, H.Q., Kučerová, E., Ivanova, A.P., Gebauer, T., & Stejskal, V. (2021). Effect of humic substances as feed additive on the growth performance, antioxidant status, and health condition of african catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). Animals, 11 (8), 2266.
42. Lieke, T., Steinberg, C. E., Bittmann, S., Behrens, S., Hoseinifar, S. H., Meinelt, T., Knopf, K., & Kloas, W. (2021a). Fulvic acid accelerates hatching and stimulates antioxidative protection and the innate immune response in zebrafish larvae. Science of The Total Environment, 796, 148780.
43. Wet, L. D., & Visagle, W. (2010). Evaluating CHD-FA carbohydrate-derived Fulvic acid for use in diets of Mozambicus Tilapia Oreochromis niloticus. Feed Technology Group Division Aquaculture, University of Stellenbosh South Africa.
44. Chang, Q., Bai, H., Shi, B., Shan, A., Wei, C., Yu, C., & Tong, B. (2013). Effects of fulvic acid on growth performance, serum biochemical parameters, blood routine parameters and immunity function of growing pigs. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 25 (8), 1836-1842.
45. Bai, H. X., Chang, Q. F., Shi, B. M., & Shan, A. S. (2013). Effects of fulvic acid on growth performance and meat quality in growing-finishing pigs. *Livestock Science*, 158 (1-3), 118-123.
46. Feng, P., Li, Q., Sun, H., Gao, J., Ye, X., Tao, Y., Tian, Y., & Wang, P. (2022). Effects of fulvic acid on growth performance, serum index, gut microbiota, and metabolites of Xianju yellow chicken. Frontiers in Nutrition, 9, 963271.
47. Yılmaz, S., Ergun, S., Çelik, E. Ş., & Yigit, M. (2018). Effects of dietary humic acid on growth performance, haemato-immunological and physiological responses and resistance of *Rainbow trout*, *Oncorhynchus mykiss* to *Yersinia ruckeri*. *Aquaculture Research*, 49 (10), 3338-3349.
48. Rousdy, D. W., & Wijayanti, N. (2015). Hematology profile and growth respons of carp (*Cyprinus carpio* Linn.) on administration of humic acid from kalimantan peat soil. Prosiding Semirata, Prosiding Semirata 2015 bidang MIPA BKS-PTN Barat, Universitas Tanjungpura Pontianak, pp. 135-144.
49. Soytaş, N. (2015). Effects on survival rate and some blood parameters of Amyloodinium sp. infestation at the sea bass (Dicentrarchus labrax) fed on humic acid added diet. (MsC), Graduate School of Natural and Applied Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, Turkey.
50. Salinas, I., Zhang, Y. A., & Sunyer, J. O. (2011). Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35 (12), 1346-1365.
51. Song, Q., Xiao, Y., Xiao, Z., Liu, T., Li, J., Li, P., & Han, F. (2021). Lysozymes in Fish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69 (50), 15039-15051.
52. Corbel, M. J. (1975). The immune response in fish: a review. *Journal of Fish Biology*, 7 (4), 539-563.
53. Weber, T. E., Van Sambeek, D. M., Gabler, N. K., Kerr, B. J., Moreland, S., Johal, S., & Edmonds, M. S. (2014). Effects of dietary humic and butyric acid on growth performance and response to lipopolysaccharide in young pigs. *Journal of animal science*, 92 (9), 4172-4179.
54. Disetlhe, A. R. P., Marume, U., Mlambo, V., & Dinev, I. (2017). Humic acid and enzymes in canola-based broiler diets: Effects on bone development, intestinal histomorphology and immune development. *South African Journal of Animal Science*, 47 (6), 914-922.
55. Wang, J., Zhang, C., Zhang, J., Xie, J., Yang, L., Xing, Y., & Li, Z. (2020). The effects of quercetin on immunity, antioxidant indices, and disease resistance in zebrafish (Danio rerio). *Fish physiology and biochemistry*, 46, 759-770.

56. Fierro-Coronado, J. A., Angulo, C., Rubio-Castro, A., Luna-González, A., Cáceres-Martínez, C. J., Ruiz-Verdugo, C. A., Álvarez-Ruíz, P., Escamilla-Montes, R., González-Ocampo, H. A., & Diarte-Plata, G. (2018). Dietary fulvic acid effects on survival and expression of immune-related genes in Litopenaeus vannamei challenged with Vibrio parahaemolyticus. *Aquaculture Research*, 49 (9), 3218-3227.
57. Gao, Y., Zhu, J., Bao, H., Hector, V., Zhao, B., & Chu, Z. (2018). Effect of lignite fulvic acid on growth, antioxidant ability, and HSP70 of Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. *Aquaculture International*, 26 (6), 1519-1530.
58. Liao, W., Lin, Z., Liao, M., Xue, Y., Zhou, J., Wang, Y., Hou, D., & Sun, C. (2022). Effects of sodium humate and probiotics on growth performance enzyme activity and microbial environment of Litopenaeus vannamei in high-density zero-water exchange systems. *Frontiers in Marine Science*, 9, p.989325.
59. Lieke, T., Steinberg, C. E., Meinelt, T., Knopf, K., & Kloas, W. (2022). Modification of the chemically induced inflammation assay reveals the Janus face of a phenol rich fulvic acid. *Scientific reports*, 12 (1), 1-8.
60. Sabi, R., Vrey, P., & van Rensburg, C. E. J. (2012). Carbohydrate-derived Fulvic acid (CHD-FA) inhibits Carrageenan-induced inflammation and enhances wound healing: efficacy and Toxicity study in rats. *Drug Development Research*, 73 (1), 18-23.
61. Secombes, C.J., Wang, T., Hong, S., Peddie, S., Crampe, M., Laing, K.J., Cunningham, C., & Zou, J. (2001). Cytokines and innate immunity of fish. Developmental & Comparative Immunology, 25(8-9), 713-723.
62. Sakai, M., Hikima, J. I., & Kono, T. (2021). Fish cytokines: current research and applications. *Fisheries Science*, 87 (1), 1-9.
63. Wiegertjes, G. F., Wentzel, A. S., Spaink, H. P., Elks, P. M., & Fink, I. R. (2016). Polarization of immune responses in fish: The 'macrophages first'point of view. *Molecular immunology*, 69, 146-156.
64. Grayfer, L., Kerimoglu, B., Yaparla, A., Hodgkinson, J. W., Xie, J., & Belosevic, M. (2018). Mechanisms of fish macrophage antimicrobial immunity. *Frontiers in immunology*, 9, 1105.
65. Constance, E., Jansen, V. R., & Pleter, J. N. (2009). 'Potassium humate inhibits complement activation and the production of inflammatory cytokines *in vitro'*, *Inflammation*, 32 (24), 270-275.
66. Lieke, T., Steinberg, C. E., Pan, B., Perminova, I. V., Meinelt, T., Knopf, K., & Kloas, W. (2021b). Phenol-rich fulvic acid as a water additive enhances growth, reduces stress, and stimulates the immune system of fish in aquaculture. *Scientific reports*, 11 (1), 1-12.
67. Harikrishnan, R., Thamizharasan, S., Devi, G., Van Doan, H., Kumar, T. T. A., Hoseinifar, S. H., & Balasundaram, C. (2020). Dried lemon peel enriched diet improves antioxidant activity, immune response and modulates immuno-antioxidant genes in Labeo rohita against Aeromonas sorbia. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 675-684.
68. Hoseini, S. M., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2021). Growth performance and hematological and antioxidant characteristics of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fed diets supplemented with Roselle, Hibiscus sabdariffa. *Aquaculture*, 530, 735827.
69. Lesser, M. P. (2006). Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253-278.
70. Neamatallah, W. A., Sadek, K. M., El-Sayed, Y. S., Saleh, E. A., & Khafaga, A. F. (2022). 2, 3-Dimethylsuccinic acid and fulvic acid attenuate lead-induced oxidative misbalance in brain tissues of Nile tilapia Oreochromis niloticus. *Environmental Science and Pollution Research*, 29 (15), 21998-22011.
71. Fazelan, Z., Hoseini, S. M., Yousefi, M., Khalili, M., Hoseinifar, S. H., & Van Doan, H. (2020). Effects of dietary eucalyptol administration on antioxidant and inflammatory genes in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to ambient copper. *Aquaculture*, 520, 734988.