

The effect of dietary red algae (*Laurencia caspica*) replacement on the intestinal bacterial microflora of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*

Sanaz Kord¹, Rahim Abdi^{1*}, Isaac Zamani¹, Rahim Peyghan²

1-Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Oceanography, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

2-Department of Clinical Sciences and Excellence Center of Warm Water Fish Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received: 8 December 2024

Accepted: 27 January 2025

Extended Abstract:

Introduction: In recent decades, the fish farming industry has grown significantly in many countries to provide part of their animal protein, so that the production of aquatic species has expanded significantly and is expected to grow in line with the increasing population and human need for protein sources (Abdel-Latif *et al.*, 2020). The quality of the diet received is very important in the growth process of fish, so with careful study, this process can be improved by achieving optimal food combinations and their appropriate amounts in a balanced diet (Glencross *et al.*, 2020). Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, has the highest global consumption and distribution, and is currently being concentrated in some parts of the world. Given the nutritional value of seaweeds as feed additives or food supplements, their availability and low cost have led to their use in aquaculture. The purpose of the present study was to replace the red algae in the diet with enzymes and its impact on the tissue of the Nile tilapia gastrointestinal tract. Khuzestan province has suitable climatic conditions for tilapia farming, which has high economic value in terms of providing food protein, export, employment, and foreign exchange. Therefore, given the reasonable price and ease of access to this type of algae, a recent study was conducted to investigate the possibility of replacing red seaweed with fish meal in the diet and its effect on the bacterial microflora of the Nile tilapia intestine. The bacterial flora of the digestive tract includes a collection of bacteria that live in the digestive tract of fish, and the intestine is the main place for these microorganisms to settle in the fish (Mahmoud *et al.*, 2020).

Material and Methods: For this purpose, 120 tilapia providing preparations and adaptation with an average weight of 30 ± 1 g were fed for 8 weeks in 100-liter aquariums with a Biomar diet containing 0, 3%, 6%, and 9% of the food weight with red algae in three replicates and based on the research of other researchers in each treatment. After the end of the breeding period, the fish were anesthetized with cloves and after opening the abdominal cavity, 1gr of midgut samples from different groups were homogenized with 99ml of normal saline serum and mixed (Moradkhani *et al.*, 2020). The homogenized mixture obtained was combined with 9ml of physiological serum, and serial dilutions up to 8-10 were prepared. Gram staining was used to isolate and purify bacterial strains from nutrient agar medium and to identify morphology. Also, Simon citrate, MR-VP, SIM medium, and oxidase tests were used for biochemical studies. To count bacteria, after dilution, samples from the experimental and treatment groups were transferred to Petri dishes containing transfer medium and spread (Wardani *et al.*, 2020).

Result and Discussion: In this study, in order to investigate the effect of oral administration of red algae on the intestinal bacterial microflora in Nile tilapia, four experimental diets were administered, including a control treatment without algae that received only the basal diet, and three diets containing red algae at a ratio of 3% of the food weight, treatment two containing red algae at a ratio of 6% of the food weight, and treatment three containing red algae at a ratio of 9% of the food weight, for 8 weeks. Based on the results of the present study, it was determined that the more the percentage of algae added to the diet, the greater the amount of gastrointestinal microflora in the species in question, based on the total bacterial count graph shown in Figure 3. Researchers have also stated that algae are rich in antioxidants and protect fish intestinal cells from oxidative stress and help maintain the health of the intestinal microbiota (Strassert *et al.*, 2021). As observed in a recent study and in comparison with similar studies and in line with the present study (Kord *et al.*, 2024), which stated that the use of red algae in the diet of Nile tilapia at the aforementioned level had no side effects and its use in this fish improved the parameters and tissue structure in the intestine and digestive enzymes. Using seaweed in the form of extract or feed as an additive to the basal diet in food has many benefits due to the presence of micronutrients, including health and palatability, increasing food quality, increasing growth and safety in aquatic animals, and improving the natural flora of the stomach and intestines. The results of the present study showed that in the control group, the colonies belonged only to Bacillus, and in the treatment group, the colonies belonged to Bacillus and Coccus. The results of total intestinal bacterial count showed a significant difference between the different treatments ($p < 0.05$). The highest number of intestinal bacteria in the fish was in the 9% treatment and the lowest was in the control group. Some algae have been reported to be able to bind to heavy metals and other toxins and reduce their harmful effects, providing a safer environment for beneficial bacteria to grow (Pan *et al.*, 2022). Seaweeds also contain compounds that help fish cope with environmental stressors such as temperature changes, high salinity, and poor water quality. Reducing stress levels can lead to a more stable and healthy gut microbiota. In general, adding algae to fish diets can lead to significant improvements in the growth and activity of beneficial gut bacteria, suppressing harmful bacteria, and promoting overall gut health (Radhakrishnan *et al.*, 2015).

Conclusion: According to the results of the present study, it can be stated that the possibility of using red algae in the Nile tilapia diet at the mentioned level will improve the intestinal bacterial microflora. According to the studies of other researchers and the results of the present study, considering the positive effect of this type of algae on the intestinal microbiota in terms of not causing losses or diseases and appropriate growth and weight compared to the control group, it can be a suitable alternative to fish meal in the Nile tilapia diet, along with possible alternatives to other animal and vegetable proteins for feeding this fish, which will ultimately reduce costs and reduce dependence on fish meal to provide the protein needed by Nile tilapia. Also, considerations related to the amino acid profile and digestibility of the algae under study can be searched and expressed in other similar studies.

Conflict of Interest: The authors declare no competing interests.

Acknowledgment: We hereby express our gratitude and appreciation for the assistance of all colleagues in conducting this research.

Keywords: Microflora, Intestine, Red algae (*Laurencia capsica*), Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

* Corresponding Author: abdir@kmsu.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

تأثیر جایگزینی جلبک قرمز (*Laurencia caspica*) در جیره بر میکرو فلور
باکتریایی روده تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*)ساناز کرد^۱، رحیم عبدی^{۱*}، اسحاق زمانی^۱، رحیم پیغان^۲

۱- گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران
 ۲- گروه علوم درمانگاهی و قطب علمی بهداشت ماهیان گرمابی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۹/۱۸

چکیده

تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) بیشترین مصرف و توزیع جهانی را در بین آبیان دارا بوده و در حال حاضر در برخی نقاط دنیا بر روی پرورش این گونه متمرکز شده‌اند. با توجه به ارزش غذایی جلبک‌های دریایی بعنوان افزودنی‌های خوراکی یا مکمل‌های غذایی، در دسترس بودن و هزینه پایین آنها سبب شده است تا در آبی‌پروری مورد استفاده قرار گیرند. هدف این تحقیق تأثیر جایگزینی جلبک قرمز در جیره بر میکرو فلور باکتریایی روده تیلاپای نیل بوده است. برای این منظور ۱۲۰ قطعه ماهی تیلاپا با میانگین وزنی 30 ± 1 گرم پس از فراهم کردن مقدمات و سازگاری، به مدت ۸ هفته در آکواریوم‌های ۱۰۰ لیتری با جیره بیومار حاوی صفر، ۳ درصد، ۶ درصد و ۹ درصد وزن غذا بوسیله جلبک قرمز با سه تکرار و براساس تحقیقات سایر محققین در هر تیمار تغذیه شدند. پس از پایان دوره پرورش ماهیان بوسیله گل میخک بیهوش شده و پس از باز کردن محوطه شکمی نمونه برداری به مقدار ۱ گرم از قسمت میانی روده تیمارهای مختلف به همراه ۹۹ میلی‌لیتر از سرم نمک فیزیولوژی نرمال هموژنیزه شده و بطور یک دست با هم مخلوط شدند. مخلوط هموژنیزه به دست آمده با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ترکیب شده و رقت‌های سریالی تا 10^{-8} تهیه گردید. جهت جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های باکتریایی از محیط نوترینت آگار و برای شناسایی مورفولوژی از رنگ‌آمیزی گرم استفاده گردید. همچنین برای مطالعات بیوشیمیایی از آزمون‌های سیمون سترات، MR-VP، محیط SIM، تست اکسیداز استفاده گردید. جهت شمارش باکتری‌ها بعد از انجام عمل رقت‌سازی نمونه‌های حاصل از گروه‌های آزمایش به پتری دیش حاوی محیط هر تیمار انتقال و با عمل پخش کردن منتقل شدند. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که در گروه شاهد کلنی‌ها فقط متعلق به باسیلوس و در گروه تیمار کلنی‌ها متعلق به باسیلوس و کوکوس بوده‌اند. نتایج حاصل از شمارش باکتری کل روده اختلاف چشمگیری را بین تیمارهای مختلف نشان داد ($p < 0.05$). بیشترین تعداد باکتری روده ماهی به تیمار ۹ درصد و کمترین مقدار آن به گروه شاهد تعلق داشت. با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که امکان استفاده از جلبک قرمز در جیره غذایی تیلاپای نیل در سطح مذکور باعث بهبود میکرو فلور باکتریایی روده خواهد شد.

کلمات کلیدی: میکرو فلور، روده، جلبک قرمز، تیلاپای نیل

مقدمه

در دهه‌های اخیر صنعت پرورش ماهی در بسیاری از کشورها به منظور تامین بخشی از پروتئین حیوانی رشد قابل توجهی داشته بطوری که میزان تولید انواع آبی‌گری گسترش چشم‌گیری یافته و پیش‌بینی می‌گردد. این میزان با توجه به افزایش جمعیت و نیاز انسان‌ها به منابع پروتئینی توسعه پیدا کند (Abdel-Latif *et al.*, 2020). پرورش ماهی یکی از منابع اصلی تامین پروتئین برای مصرف انسان می‌باشد و این صنعت در قیاس با سایر صنایع دامی از رشد چندین برابری برخوردار است. اگرچه بیماری‌ها رخدادی طبیعی در انواع موجودات می‌باشد اما پرورش متراکم و فوق متراکم ماهیان سبب شیوع انواع بیماری‌های غیر منتظره شده که در نهایت منجر به محدودسازی میزان تولید و افزایش ضرر و زیان اقتصادی می‌گردد (Butt and Volkoff, 2019). مطالعه ساز و کارهای دفاعی حیوان و آگاهی از نحوه عملکرد مواد مغذی در بهینه‌سازی کارایی سیستم ایمنی در جلوگیری، درمان و کنترل بیماری‌های آبزیان بسیار موثر است. این موضوع از سوی دیگر باعث کاهش مصرف انواع آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزیان گردیده که در نتیجه از اثرات جانبی این ترکیبات بر بدن انسان و محیط زیست به شدت می‌کاهد (Long *et al.*, 2022). علم تغذیه برای سالیان متمادی بر روی میزان نیاز انواع آبزیان به مواد مغذی متمرکز بوده است، اما امروزه نقش تغذیه در مدیریت بیماری‌های ماهیان پرورشی از طریق افزایش قدرت سیستم ایمنی ذاتی ماهی انکارناپذیر است. این نقش مهم سبب ایجاد شاخه‌ای از علم تغذیه به نام ایمنی تغذیه شده است که تمرکز آن بر روی کنترل بیماری‌ها با استفاده از سیستم ایمنی ماهی

و از طریق مواد مغذی موثر در این امر می‌باشد (Matrozdadeh *et al.*, 2023). ماهی تیلاپیا یکی از پرمصرف‌ترین ماهی‌های خوراکی در جهان است که نوع غیرپرورشی آن، بیش از هر جای دیگر در آب‌های آزاد اطراف قاره آفریقا به طور خاص در شرق آفریقا و سواحل کنیا موجود است (Ahmad *et al.*, 2020). بر خلاف تصور عمومی، تیلاپیا عنوان یک نوع ماهی خاص نیست. بلکه یک رده ماهی است که بیش از چندین گونه مختلف را شامل می‌شود. اکثر گونه‌های تیلاپیا از پلانکتون‌ها و انواع جلبک‌ها به خوبی تغذیه می‌کنند. تأمین آنها در اکوسیستم‌های آبی بسیار ساده و ارزان بوده به همین علت قیمت تمام شده این ماهی مقرون به صرفه می‌شود (Fan and Pedersen, 2021). ضمن اینکه رشد و زاد و ولد سریع و مقاومت بالا در برابر بیماری‌ها، پرورش این نوع ماهی را بسیار اقتصادی و توجیه پذیر می‌سازد. جلبک قرمز یک محصول طبیعی و مکمل بسیار مغذی برای تمام ماهیان چراکننده می‌باشد. این گونه غنی از ویتامین‌های مختلف بویژه C بوده و به آسانی قابل هضم می‌باشد. همچنین یک منبع غذایی ایده‌آل برای ماهیان گیاه‌خوار آب شور و شیرین دارای قسمت‌های دهانی نرم‌تر می‌باشند. جهت افزایش مقبولیت این جلبک و بهبود عملکرد سیستم ایمنی می‌توان آنرا با با عصاره طبیعی سیر تقویت کرد. این جلبک قرمز منبع غنی ویتامین‌های A، B، C، E و K، همچنین منبع مواد معدنی حیاتی مانند منیزیم، کلسیم، مس، پتاسیم، سلنیوم، روی، ید و آهن می‌باشد. مطالعات اخیر نشان داده‌است که جلبک قرمز علاوه بر چربی پایین، حاوی تمامی اسیدهای آمینه ضروری و اسیدهای چرب امگا ۳ ضروری برای ماهی می‌باشد. از جمله تاثیرات آن می‌توان به افزایش کیفیت خوراک،

سلامت و طمع خوب غذا، بالا رفتن سطح رشد و ایمنی در آبزیان اشاره کرد. همچنین باعث بهبود فلورهای طبیعی معده و روده شده و سبب بالا رفتن سطح تولید می شود. امروزه از مهمترین مسائل در پرورش آبزیان توجه به امر تغذیه بویژه در سیستم های پرورشی می باشد، به طوری که برآورد شده در آبی پروری بیش از نیمی از هزینه های جاری یک مزرعه پرورشی به این امر اختصاص داده می شود (Huang et al., 2023). از طرفی کیفیت جیره غذایی دریافتی در روند رشد ماهیان بسیار با اهمیت می باشد، بنابراین با مطالعه دقیق می توان با دستیابی به ترکیبات بهینه مواد غذایی و مقادیر مناسب آنها در یک جیره بالانس شده به این روند بهبود بخشید (Glencross et al., 2020). استان خوزستان دارای شرایط زیستی مناسب از لحاظ آب و هوا جهت پرورش تیلایا است. این ماهی دارای ارزش اقتصادی بالا به منظور تامین پروتئین غذایی، صادرات، اشتغال و ارز آوری می باشد. بنابراین با توجه به قیمت مناسب و در دسترس بودن این نوع جلبک، مطالعه اخیر به منظور بررسی مقدماتی امکان جایگزینی جلبک های دریایی قرمز بجای پودر ماهی در جیره غذایی و تاثیر آن بر میکرو فلور باکتریایی روده تیلایای نیل به مرحله اجرا درآمده است.

مواد و روش ها

برای انجام این تحقیق ماهی های تیلایا (*Oreochromis niloticus*) از یک مرکز پرورش ماهی در استان بوشهر به آکواریوم های ۱۰۰ لیتری از قبل ضد عفونی شده با آب و الکل موجود در بخش بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز منتقل شدند. سپس در ادامه

روند سازگاری با شرایط جدید جهت هوادهی و تامین اکسیژن در هر یک از آکواریوم ها توسط دو عدد سنگ هوا متصل به منبع هوادهی نصب گردید و تنها در هنگام غذا دهی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً بعد از تمیز کردن محیط برقرار می شد (Roshanfekar et al., 2017). برای تامین آب مورد نیاز از آب شهری کلرزدایی شده استفاده و به مدت دو هفته سازگاری انجام پذیرفت (Moradkhani et al., 2020). پس از این مدت ۱۲۰ قطعه ماهی با وزن تقریبی 1 ± 30 گرم بطور تصادفی به ۴ گروه با سه تکرار در آکواریوم های ۱۰۰ لیتری شامل تیمار شاهد مصرف کننده جیره تجاری بیومار ساخت فرانسه با ترکیب پروتئین ۵۵/۵ درصد، چربی ۱۵/۸ درصد، فیبر ۰/۵ درصد، رطوبت ۹/۱ درصد و خاکستر ۷/۶ درصد و فاقد پودر جلبک قرمز، گروه یک مصرف کننده جیره تجاری حاوی ۳ درصد پودر جلبک قرمز، گروه دو مصرف کننده جیره تجاری حاوی ۶ درصد پودر جلبک قرمز، گروه سه مصرف کننده جیره تجاری حاوی ۹ درصد پودر جلبک قرمز به مدت ۸ هفته دسته بندی شدند (Li et al., 2020). برای این منظور به مخلوط حاصل مقدار ۲۵ تا ۳۰ درصد جیره به صورت متوالی آب و سپس کمی روغن زیتون اضافه شد تا به شکل خمیری همگن شده در نهایت خمیرهای حاصل از گروه شاهد و تیمار بوسیله چرخ گوشت به پلت تبدیل شدند (Khodabakhshian et al., 2022). برای خشک شدن رشته های چرخ شده روی سینی به مدت ۲۴ ساعت در معرض جریان هوا قرار داده شدند تا رطوبت موجود در آنها به کمتر از ۱۰ درصد برسد. سپس این رشته ها خرد و شکسته شده و جیره متناسب با سایز دهان ماهیان (کمتر از ۲ میلی متر) (طبق استاندارد سازمان شیلات

ایران) ساخته شد (Amiripour *et al.*, 2015). همچنین پلت‌های آماده شده تا زمان مصرف در ظرف‌های پلاستیکی دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باید در نظر داشت که تیمارهای غذایی برای گروه‌های مختلف از لحاظ میزان پروتئین و انرژی یکسان بوده (میانگین پروتئین خام 45 ± 5 درصد و انرژی 20 ± 2 مگاژول) که براساس نیازمندی ماهی تیلاپیا در محدوده وزنی حاضر اندازه‌گیری شدند (Moallem *et al.*, 2015). در طول مدت آزمایش جهت تنظیم شرایط زیست محیطی برای ماهیان سنجش خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آب از قبیل تنظیم شوری (۵ ppt)، حفظ دما (۲۱ الی ۲۶ درجه سانتی‌گراد)، pH (۶ الی ۹) و ثابت نگه داشتن مقدار اکسیژن (۸ الی ۱۲ میلی‌گرم بر لیتر) به ترتیب با استفاده از رفراکتومتر نوری (Horiba U-10، ژاپن)، ترمومتر دیجیتالی (Horiba U-10، ژاپن)، دستگاه قابل حمل سنجش pH مدل Ebro.PHT-3140 انجام گرفت (Farhoudi *et al.*, 2020). همچنین اکسیژن محلول با استفاده از دستگاه دیجیتال اندازه‌گیری اکسیژن مدل TECPEL DO-1609 بطور روزانه اندازه‌گیری می‌شد. جهت اندازه‌گیری فاکتورهای آمونیاک (۰/۱ ppm)، نیتريت (۰/۰۳ ppm)، نترات (۶ ppm) و سختی کل آب (۱۷۵) از دستگاه کالریمتر هک (مدل ۸۹، شرکت هک، آمریکا) استفاده گردید. جهت تعویض آب در طول مدت نگهداری و آزمایش به میزان ۲۰ درصد حجم آکواریوم به صورت روزانه و پس از اتمام تغذیه جهت جلوگیری از افزایش آمونیاک و متابولیت‌های دیگر از ناحیه کف سیفون و تخلیه می‌گردید. همچنین غذادهی ماهیان در دو نوبت صبح و عصر تا زمان سیر شدن و با غذای تهیه شده انجام می‌گرفت. جهت

جلوگیری از آلودگی‌های ثانویه محیط آکواریوم از باقی‌مانده مواد غذایی پاک می‌گردید. پس از پایان دوره آزمایش پنج قطعه ماهی از هر تیمار انتخاب گردید. پس از بیهوش کردن ماهیان با پودر گل میخک به مقدار نیم گرم در لیتر به منظور مطالعات میکروبیولوژی برای شمارش جمعیت میکروفلور روده، مقدار ۱ گرم از قسمت میانی روده گروه‌های مختلف به همراه ۹۹ میلی‌لیتر از سرم نمک فیزیولوژی نرمال هموژنیزه شده و بطور یک دست با هم مخلوط گردیدند (Hasanzadeh *et al.*, 2018). مخلوط هموژنیزه به دست آمده با ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ترکیب شده و رقت‌های سریالی از 10^{-1} تا 10^{-8} تهیه گردید. جهت جداسازی و خالص‌سازی سویه‌های باکتریایی از محیط نوترینت آگار و برای شناسایی مورفولوژی از رنگ‌آمیزی گرم استفاده گردید. همچنین برای مطالعات بیوشیمیایی از تست‌های سیمون سترات، MR-VP، محیط SIM، تست اکسیداز استفاده گردید. جهت شمارش باکتری‌ها بعد از انجام عمل رقت‌سازی نمونه‌های حاصل از گروه‌های آزمایش به پتری دیش حاوی محیط انتقال و با عمل پخش کردن منتقل شدند (Wardani *et al.*, 2020). نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور آزمایشگاهی هوشمند مدل BIN22 با دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و کلونی‌های حاصل با دستگاه کلونی شمار محاسبه شدند. داده‌های بدست آمده براساس میانگین \pm خطای معیار (Mean \pm SEM) حاصل از میانگین آماری گزارش گردیدند.

تجزیه و تحلیل آماری

همچنین برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. برای مقایسه داده‌های بدست آمده از آزمون آنوای یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده گردید. در تمامی موارد مقدار $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد (Nochalabadi et al., 2023; Sathasivam et al., 2019).

نتایج

کشت رقت‌های 10^{-4} الی 10^{-7} در هر دو گروه کنترل و تیمار موجب رشد انبوه باکتری‌ها بر روی محیط کشت گردید که جداسازی و تخلیص آن‌ها را مشکل می‌کرد. لذا برای جداسازی باکتری‌ها از پلیت‌های حاصل از کشت رقت 10^{-8} که تراکم کلنی‌ها در آن کمتر و به صورت تک کلنی بودند استفاده گردید. کلنی‌های باکتریایی که در محیط کشت نوترینت آگار رشد کرده بودند با دقت بررسی و در نهایت ۱۶ کلنی از نمونه‌های تیمار و ۹ کلنی از نمونه‌های تیمار شاهد که از نظر ظاهری با هم تفاوت داشتند انتخاب و تخلیص شدند. سویه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلاپیا نیل گروه کنترل با نام c-SK و سویه‌های خالص سازی شده از گروه تغذیه شده با جلبک قرمز که شامل ترکیبات (پروتئین، کربوهیدرات، چربی، فیبر، خاکستر و عناصر معدنی) با درصدهای مختلف به نام‌های t-Sk

نام‌گذاری و برای سایر مراحل شناسایی و انتخاب گردیدند. با بررسی شکل کلنی از جمله رنگ، حاشیه، حالت لزج یا پودری و یا مخملی بودن مواردی که از لحاظ ظاهری مشابه بودند کنار گذاشته شدند و مشخصات سایر کلنی‌ها هم در گروه کنترل و هم گروه تیمار که تا حدودی متفاوت بودند به ترتیب به صورت جدول‌های ذیل گردآوری شدند. در گروه کنترل کلنی‌ها فقط متعلق به باسیلوس و در گروه تیمار کلنی‌ها متعلق به باسیلوس و کوکوس بوده‌اند. نتایج شمارش کل باکتری ($CFU/mL \times 10^3$) روده ماهی تیلاپیا در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج حاصل از شمارش باکتری کل روده اختلاف چشمگیری را بین تیمارهای مختلف نشان داد ($p < 0/05$). بیشترین تعداد باکتری روده ماهی به تیمار ۴ و کمترین آن به گروه شاهد داشت.

جدول ۱: ویژگی‌های مورفولوژیکی سویه‌های خالص سازی شده

از قسمت میانی روده ماهی تیلاپای نیل در گروه کنترل

Table 1: Morphological characteristics of strains purified from the midgut of Nile tilapia in the control group

Strain name	Colony color	Colony outskirts
c-Sk1	White	Pleated
c-Sk2	White	Irregular
c-Sk3	Cream	Irregular
c-Sk4	White	Smooth
c-Sk5	Cream	Smooth

جدول ۲: ویژگی‌های مورفولوژیکی سویه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلایپای نیل در تیمارهای مختلف

Table 2: Morphological characteristics of strains purified from the midgut of Nile tilapia in different treatments

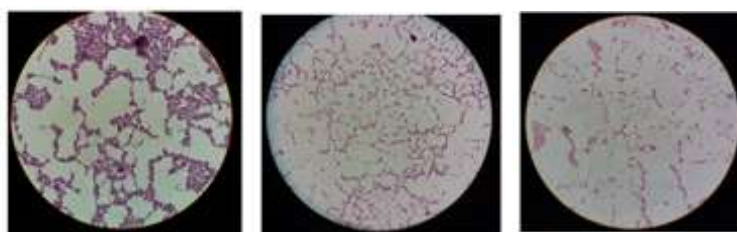
Strain name	Colony color	Colony outskirts	Strain name	Colony color	Colony outskirts
t-Sk1	White	Smooth	t-Sk2	Cream	Widely toothed margin
t-Sk3	Cream	Toothed	t-Sk4	-Cream White	Branched
t-Sk5	Cream	Smooth	t-Sk6	Cream	Irregular
t-Sk7	White	Pleated	t-Sk8	White	Irregular
t-Sk9	yellow	Irregular	t-Sk10	Cream	Branched

داده شده است. از لحاظ دیواره سلولی، برخی از این باکتری‌ها گرم مثبت و برخی گرم منفی، از لحاظ شکل ظاهری نیز میله‌ای شکل و کوکوسی و از لحاظ دارا بودن اسپور برخی اسپور دار و برخی فاقد اسپور بودند. جزئیات ویژگی‌های میکروسکوپی همه سویه‌های خالص سازی شده در هر دو گروه کنترل و تیمار به ترتیب در جدول‌های ذیل شرح داده شده است.

به منظور اطمینان بیشتر در بررسی ویژگی‌های مورفولوژیک، رنگ آمیزی سلول‌های میکروبی با استفاده از روش گرم، انجام شد و با میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی 100x) مورد بررسی قرار گرفتند. تصاویر میکروسکوپی کلنی جداسازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلایپای نیل گروه کنترل و کلنی انتخاب شده از گروه تیمار به ترتیب در شکل‌های ذیل نشان

جدول ۳: ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلایپای نیل گروه تیمار شاهد
Table 3: Microscopic characteristics of purified isolates from the midgut of Nile tilapia fish of the control treatment group

Strain name	Microscopic features
c-Sk1	Rod- Gram-positive- Relatively large- No spores
c-Sk2	Rod-hot-negative-relatively small
c-Sk3	Gram-negative rod



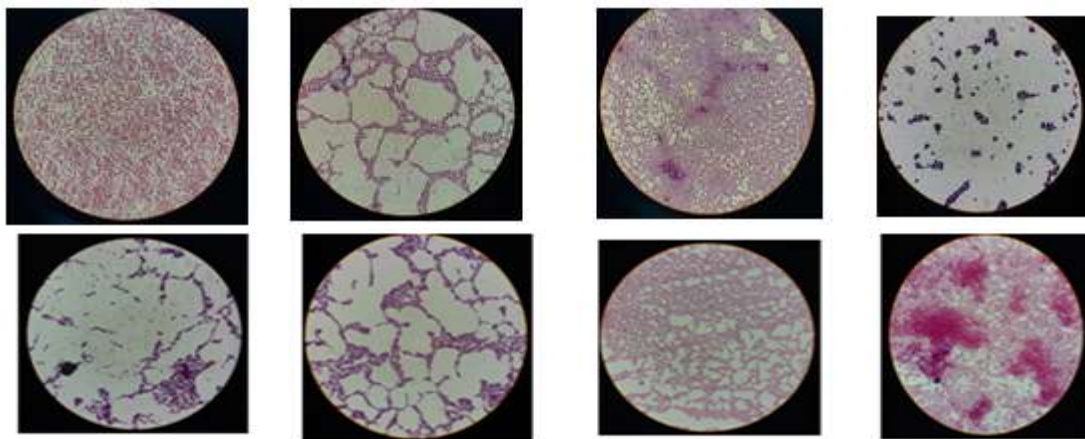
شکل ۱: تصاویر میکروسکوپی جدایه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلایپای نیل گروه کنترل (از چپ به راست به ترتیب c-Sk1، c-Sk2 و c-Sk3)

Figure 1: Microscopic images of purified isolates from the midgut of Nile tilapia fish of the control group (from left to right, c-Sk1, c-Sk2, and c-Sk3, respectively)

جدول ۴: ویژگی‌های میکروسکوپی جدایه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلاپا نیل گروه تغذیه شده با جیره‌های غذایی حاوی درصد‌های مختلف جلبک قرمز

Table 4: Microscopic characteristics of purified isolates from the midgut of Nile tilapia fish fed diets containing different percentages of red algae

Strain name	Microscopic features	Strain name	Microscopic features
t-Sk1	Gram-negative, short rod	t-Sk2	Gram-negative, Rod
t-Sk3	Gram-positive coccus	t-Sk4	Rod- Gram-positive- Spore-forming
t-Sk5	Large cells - probably yeast	t-Sk6	Rod- Gram-negative- relatively coarse
t-Sk7	Rod- Gram-positive- Short- Spore-forming	t-Sk8	Rod- Gram-negative- short



شکل ۲: تصاویر میکروسکوپی جدایه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلاپا نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی درصد‌های مختلف جلبک قرمز (از چپ به راست به ترتیب t-Sk1 الی t-Sk8).

Figure 2: Microscopic images of purified isolates from the midgut of Nile tilapia fish fed diets containing different percentages of red algae (from left to right, t-Sk1 to t-Sk8).

جدول ۵: نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌های خالص سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلاپا نیل تیمار شاهد

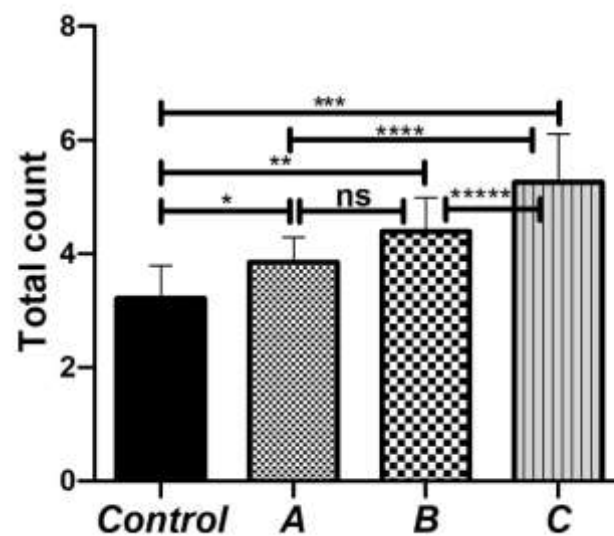
Table 5: Results of biochemical tests of purified isolates from the midgut of Nile tilapia fish treated with control

Isolation	MR	VP	Oxidase	Simon Citrate	SIM
c-Sk1	+	-	-	-	+
c-Sk2	+	+	+	-	+
c-Sk3	+	-	-	-	+

جدول ۶: نتایج تست‌های بیوشیمیایی جدایه‌های خالص‌سازی شده از قسمت میانی روده ماهی تیلاپیا نیل تغذیه شده با جیره غذایی حاوی درصد های مختلف جلبک قرمز

Table 6: Results of biochemical tests of purified isolates from the midgut of Nile tilapia fed diets containing different percentages of red algae

Isolation	MR	VP	Oxidase	Simon Citrate	SIM
t-Sk1	+	-	-	+	+
t-Sk2	+	+	-	+	-
t-Sk3	-	+	-	+	-
t-Sk4	-	-	+	+	-
t-Sk5	+	+	+	+	+
t-Sk6	-	-	-	+	-
t-Sk7	+	-	+	+	+
t-Sk8	+	+	-	+	+
t-Sk9	+	+	-	-	+



شکل ۳: تعداد کل باکتری و حروف غیر مشترک در هر ستون بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح ($p < 0.05$) می باشد. تعداد باکتری بر اساس (Log CFU/g) گزارش شده است (عدم وجود اختلاف معنی داری= ns) (A-C به ترتیب ۳ درصد، ۶ درصد و ۹ درصد).

Figure 3: Total bacterial count and non-common letters in each column indicate significant difference at the ($p < 0.05$) level. Bacterial count is reported as (Log CFU/g) (n.s. = no significant difference) (A-C = 3%, 6% and 9% respectively)

بحث

در این تحقیق، به منظور بررسی تأثیر تجویز خوراکی جلبک قرمز بر میکرو فلور باکتریایی روده در ماهی تیلایای نیل چهار جیره آزمایشی شامل تیمار شاهد فاقد جلبک که فقط جیره پایه را دریافت می کردند و سه جیره غذایی حاوی جلبک قرمز با نسبت ۳ درصد وزن غذا، تیمار دو حاوی جلبک قرمز با نسبت ۶ درصد وزن غذا و تیمار سه حاوی جلبک قرمز با نسبت ۹ درصد وزن غذا به مدت ۸ هفته انجام پذیرفت. براساس نتایج تحقیق حاضر مشخص گردید که هر چه بر مقدار درصد جلبک در جیره افزوده شده باعث افزایش و مقدار میکروفلور دستگانه گوارش گردید. استفاده از جلبک های دریایی به صورت عصاره و یا خوراک بعنوان افزودنی به جیره پایه در غذا به دلیل وجود ریز مغذی ها فواید زیادی دارد. از جمله موجب سلامت و خوش طعم بودن، افزایش کیفیت غذا، افزایش رشد و ایمنی در آبزیان و بهبود فلور طبیعی معده و روده می شود. همچنین این جلبک ها دارای کاروتنوئیدها که جزء رنگدانه هایی محلول در چربی بوده که توسط گیاهان، جلبک ها، فیتوپلانکتون ها و برخی قارچ ها و باکتری ها تولید می شوند (Andrade *et al.*, 2013). جلبک های خشک شده به عنوان مکمل غذایی در آبی پروری باعث افزایش رشد، کارایی غذا و کیفیت بیوشیمیایی لاشه در آبزیان مختلف می شوند (Wang *et al.*, 2021). سایر محققین گزارش کردند که جلبک های دریایی تک سلولی و میکروسکوپی منبع غنی از مواد غذایی مختلف و آنتی اکسیدان ها بوده و در آبی پروری در تولید نرم تنان دارای صدف، صدف دریایی، سخت پوستان و برخی از گونه های ماهی در زنجیره غذایی آبزیان مورد استفاده

قرار می گیرند. جلبک ها دارای پروتئین ها، اسیدهای چرب ضروری مانند امگا-۳، ویتامین ها و مواد معدنی می باشند که باعث رشد باکتری های مفید روده شده و به هضم و سلامت کلی ماهی کمک می کنند (Atabati *et al.*, 2014). همچنین برخی جلبک ها حاوی فیبرها و کربوهیدرات های پیچیده هستند که به عنوان پری بیوتیک عمل می کنند. پری بیوتیک ها ترکیباتی هستند که رشد و فعالیت باکتری های مفید مانند لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم را تحریک می کنند (Mahmoud *et al.*, 2020). برخی گونه های جلبک، مانند اسپیرولینا و کلرلا، دارای خواص ضد باکتریایی طبیعی بوده که می توانند رشد باکتری های مضر را در روده مهار و به حفظ تعادل میکروبی کمک نمایند (Falahatkar *et al.*, 2013). با ترویج باکتری های مفید و مهار باکتری های مضر، جلبک ها به حفظ تعادل میکروبی روده کمک می کنند که برای جذب مواد مغذی و سلامت کلی ماهی بسیار اهمیت دارد (Okuthe and Bhomela, 2021). جلبک ها با توجه به ساختار خود می توانند سیستم ایمنی ماهی را تقویت کرده و آنها را در برابر عفونت ها و بیماری ها مقاوم تر می کنند. سیستم ایمنی قوی به حفظ پایداری و تنوع میکروبی روده کمک می کند (Pakravan *et al.*, 2018). همچنین محققین بیان داشته اند که جلبک ها غنی از آنتی اکسیدان ها بوده و از سلول های روده ماهی در برابر استرس اکسیداتیو محافظت کرده و به حفظ سلامت میکروبیوتای روده کمک می کنند (Strassert *et al.*, 2021). همانطوریکه که در مطالعه اخیر مشاهده گردید و در مقایسه با مطالعات مشابه و همسو با تحقیق حاضر که بیان کردند استفاده از جلبک قرمز در جیره

مقاومت آنها را در برابر بیماری‌ها و استرس‌های محیطی افزایش دهد (Radhakrishnan et al., 2015).

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات سایر محققین و نتایج تحقیق حاضر با توجه عملکرد مثبت این گونه جلبک بر میکروبیوتای روده از نظر عدم ایجاد تلفات یا بیماری، رشد و وزن مناسب نسبت به گروه کنترل می‌تواند تا حدودی امکان جایگزین مناسب به جای پودر ماهی در جیره غذایی تیلاپیای نیل در کنار جایگزین‌های احتمالی پروتئین‌های حیوانی و گیاهی دیگر جهت تغذیه این ماهی باشد که در نهایت موجب کاهش هزینه و کاهش وابستگی به پودر ماهی جهت تامین پروتئین مورد نیاز ماهیان تیلاپیای نیل خواهد شد. همچنین ملاحظات مربوط به پروفایل آمینواسیدی و قابلیت هضم پذیری جلبک مورد تحقیق در دیگر مطالعات مشابه قابل جستجو و بیان می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بابت یاری کلیه همکاران در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایم.

منابع

1. Abdel-Latif, H.M., Dawood, M. A., Menanteau-Ledouble, S. and El-Matbouli, M., 2020. The nature and consequences of co-infections in Tilapia: A review. *Journal of Fish Diseases*, 43, pp.651-664. DOI: 10.1111/jfd.13164
2. Ahmad, M.T., Shariff, M., Yusoff, F.M., Goh, Y.M. and Banerjee, S., 2020. Applications of microalga *Chlorella vulgaris* in aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 12, pp.328-346. DOI: 10.1111/raq.12320

غذایی تیلاپیای نیل در سطح مذکور فاقد عوارض جانبی بوده و نیز کاربرد آن در این ماهی باعث بهبود پارامترها و ساختار بافتی در روده و آنزیم‌های دستگاه گوارش گردید (Kord et al., 2024). بطور کلی محققین گزارش کردند که جلبک‌ها همچنین می‌توانند تولید آنزیم‌های گوارشی را تحریک کنند که به تجزیه و جذب مواد مغذی کمک کرده، رشد و فعالیت باکتری‌های مفید روده در دستگاه گوارش ماهی را حمایت می‌کنند (Safari et al., 2022). بهبود هضم و جذب مواد مغذی منجر به سلامت کلی بهتر روده شده و احتمال بروز مشکلات گوارشی را کاهش می‌دهد و تنوع و پایداری میکروبی در روده آبی را ارتقا می‌دهند (Ricotta and Podani, 2017). گزارش‌ها حاکی از آنند برخی جلبک‌ها قادر به پیوند با فلزات سنگین و سایر سموم بوده و اثرات مضر آنها را کاهش می‌دهند، که این امر محیطی امن‌تر برای رشد باکتری‌های مفید را فراهم می‌کنند (Pan et al., 2022). همچنین جلبک‌های دریایی حاوی ترکیباتی هستند که به ماهی‌ها کمک می‌کنند تا با عوامل استرس‌زا محیطی مانند تغییرات دما، شوری بالا و کیفیت پایین آب مقابله کنند. کاهش سطح استرس می‌تواند منجر به پایداری و سلامت بهتر میکروبیوتای روده شود. بطور کلی اضافه کردن جلبک‌ها به رژیم غذایی ماهی‌ها می‌تواند بهبودهای قابل توجهی در رشد و فعالیت باکتری‌های مفید روده، مهار باکتری‌های مضر و ارتقای سلامت کلی روده به همراه داشته باشد. در نتیجه جلبک‌ها تأثیرات مثبتی بر میکروبیوتای روده ماهی‌ها دارند و می‌توانند به بهبود سلامت کلی ماهی‌ها کمک کنند. افزودن جلبک‌ها به رژیم غذایی ماهی‌ها می‌تواند منجر به رشد و عملکرد بهتر آنها شود و

- of single-cell ingredients in aquaculture feeds-a review. *Fishes*, 5, 22. DOI.org/10.3390/fishes5030022
11. Hasanzadeh, S., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Movahedinia, A. and Basir, Z., 2018. Comparative histomorphology of esophagus and intestine in two carnivorous and phytoplankton feeder fish of Persian gulf. *Journal of Animal Environment*, 10 (4), pp. 381-388. [In Persian]
 12. Huang, Z., Gao, J., Peng, C., Song, J., Xie, Z., Jia, J., Li, H., Zhao, S., Liang, Y. and Gong, B., 2023. The Effect of the Microalgae *Chlorella vulgaris* on the Gut Microbiota of Juvenile Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Is Feeding-Time Dependent. *Microorganisms*, 11, 1002. DOI.org/10.3390/microorganisms11041002
 13. Khodabakhshian, M., Shirali, S. and Abdi, R., 2022. Microscopic survey of Balbiani bodies in Yellowfin seabream (*Acanthopagrus latus*), Abu Mullet (*Planiliza abu*), Common carp (*Cyprinus carpio*) and Benni (*Barbus sharpeyi*). *Journal of Animal Research*, 34 (4), pp. 375-389. [In Persian]
 14. Kord, S., Abdi, R., Zamani, I. and Peyghan, R., 2024. The effect of replacing red algae on histomorphology and enzymes of digestive tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Animals Nutrition*, 10(1), pp. 1-14. [In Persian]
 15. Li, W., Zhou, Z., Li, H., Wang, S., Ren, L., Hu, J. and Liu, S., 2021. Successional Changes of Microbial Communities and Host-Microbiota Interactions Contribute to Dietary Adaptation in Allodiploid Hybrid. *Fish Microbiology Ecology*, pp. 1-12. DOI: 10.1007/s00248-022-01993-y
 16. Long, S., You, Y., Dong, X., Tan, B., Zhang, S., Chi, S. and Zhang, H., 2022. Effect of dietary oxidized fish oil on growth performance, physiological homeostasis and intestinal microbiome in hybrid grouper (♀*Epi-nephele fuscoguttatus* × ♂ *Epinephelus*
 3. Amiripour, L., Abdi, R., Movahedinia, A.A. and Sahraian, M., 2015. Study of liver and intestine tissue structure in orange spotted grouper (*Epinephelus coioides*) during larval development. *Journal of Oceanography*, 6(23), pp.87-92. [In Persian]
 4. Andrade, P.B., Barbosa, M., Matos, R.P., Lopes, G., Vinholes, J., Mouga, T. and Valentão, P., 2013. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chemistry*, 138(2-3), pp.1819-1828. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.11.081
 5. Atabati, A., Savari, A., Movahedinia, A. and Abdi, R., 2014. Histopathological studies on liver of *Euryglossa orientalis*, in coastal areas of the northern Persian Gulf. *Journal of Animal Environment*, 6(2), 135-144. [In Persian]
 6. Butt, R.L. and Volkoff, H., 2019. Gut microbiota and energy homeostasis in fish. *Frontiers in Endocrinology*, 10, pp.9-13. DOI.org/10.3389/fendo.2019.00009
 7. Fan Y. and Pedersen O., 2021. Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19, pp. 55-71. DOI: 10.1038/s41579-020-0433-9
 8. Falahatkar, B., Akhavan Rana, S., Efatpanah, I. Meknatkhah, B., 2013. Effect of winter feeding and starvation on the growth performance of young of year (YOY) great sturgeon, *Huso huso*. *Journal of Applied Ichthyology*, 29, pp. 26-30. DOI.org/10.1111/j.1439-0426.2012.02017.x
 9. Farhoudi, A., Sourinejad, I., Nafisi Bahabadi, M., Sajadi, M M. and Salarzadeh, A., 2020. Dietary supplemental effects of macroalgae *Gracilaria pygmaea* on proximate analysis, apparent digestibility and digestive enzymes activity of Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Sciences*, 7, pp. 195-206. [In Persian]
 10. Glencross, B.D., Huyben, D. and Schrama, J.W., 2020. The application

- (Perciformes: Cichlidae). *Zoologia* (Curitiba), 37(3), pp. 123-130. DOI:10.3897/zoologia.37.e38783
23. Pakravan, S., Akbarzadeh, A., Sajjadi, M.M., Hajimoradloo, A. and Noori, F., 2018. *Chlorella vulgaris* meal improved growth performance, digestive enzyme activities, fatty acid composition and tolerance of hypoxia and ammonia stress in juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 24, pp. 594-604. DOI:org/10.1111/anu.12594
24. Pan, B., Han, X., Yu, K., Sun, H., Mu, R. and Lian, C.A., 2022. Geographical distance, host evolutionary history, and diet drive gut microbiome diversity of fish across the Yellow River. *Molecular Ecology*, 32, pp.1183-1196. DOI:org/10.1111/mec.16812
25. Radhakrishnan, S., Saravana, B.P., Seenivasan, C. and Muralisankar, T., 2015. Effect of dietary replacement of fishmeal with *Chlorella vulgaris* on growth performance, energy utilization and digestive enzymes in *Macrobrachium rosenbergii* postlarvae. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 7, pp. 62-70. DOI: 10.5897/IJFA15.0471
26. Ricotta, C. and Podani, J., 2017. On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecology Complex*, 31, pp. 201-205. DOI:org/10.1016/j.ecocom.2017.07.003
27. Roshanfekr, K., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A. and Basir, Z., 2017. The Impact of Spent Mushroom Compost and Fertilizer on Esophagus Histological Indices of Some Cultured Warm Water Species. *Journal of Animal Biology*, 10 (1), pp. 23-33. [In Persian]
28. Safari, O., Paolucci, M. and Motlagh, H.A., 2022. Dietary supplementation of *Chlorella vulgaris* improved growth performance, immunity, intestinal microbiota and stress resistance of juvenile narrow clawed crayfish, *Pontastacus leptodactylus* Eschscholtz, lanceolatus) *Aquaculture Report*, 24,101130. DOI:org/10.1016/j.aqrep.2022.101130
17. Mahmoud, E.A., El-Sayed, B.M., Mahsoub, Y.H. and Neamat-Allah, A.N., 2020. Effect of *Chlorella vulgaris* enriched diet on growth performance, hemato-immunological responses, antioxidant and transcriptomics profile disorders caused by deltamethrin toxicity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish Shellfish Immunology*, 102, pp. 422-429. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.04.061
18. Matrozdadeh, M., Abdi, R., Basir, Z. and Peyghan, R., 2023. Histological and enzymatic study of the liver of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during the replacement of blood powder instead of fish meal in the diet. *Journal of Oceanography*, 14(53), pp. 69-78. [In Persian]
19. Moallem, Z., Abdi, R., Movahedinia, A., Shirali, S. and Salati, A.P., 2015. Gonad histology and gonadosomatic index variations during gonadal development of wild female *Tenulosa ilisha*. *Journal of the Persian Gulf*, 6(19), pp. 53-58. [In Persian]
20. Moradkhani, A., Abdi, R., Salari-Aliabadi, M.A., Nabavi, S.M.B. and Basir, Z., 2020. Quantification and description of gut-associated lymphoid tissue in, shabbout, *Arabibarbus grypus* (actinopterygii: cypriniformes: cyprinidae), in warm and cold seasons. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 50(4), pp. 423-432. DOI: 10.3750/AIEP/02910
21. Nochalabadi, A., Morovvati, H. and Abdi, R., 2023. Histomorphometry of Liver and some Blood Factors of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* Exposed to Different Concentrations of Ammonia. *Pollution*, 9(3), pp. 1225-1235. DOI:10.22059/poll.2023.352271.1716
22. Okuthe, G.E. and Bhomela, B., 2021. Morphology, histology and histochemistry of the digestive tract of the Banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*

1823. *Aquaculture*, 554,738138.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738138
29. Sathasivam, R., Radhakrishnan, R., Hashem, A. and Abd Allah, E.F., 2019. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. *Saudi Journal of Biological Science*, 26, pp.709–722. DOI:org/10.1016/j.sjbs.2017.11.000
30. Strassert, J.F., Irisarri, I., Williams, T.A. and Burki, F., 2021. A molecular timescale for eukaryote evolution with implications for the origin of red algal-derived plastids. *Nature Communications*, 12, 1879. DOI:org/10.1038/s41467-021-22044-z
31. Wang, C., Li, Z., Wang, T., Xu, X., Zhang, X. and Li, D., 2021. Intelligent fish farm the future of aquaculture. *Aquaculture International*, 4, pp. 1-31. DOI:10.1007/s10499-021-00773-8
32. Wardani, W.W., Alimuddin, A., Zairin, M., Setiawati, M., Nuryati, S. and Suprayudi, M.A., 2020. Evaluation of cysteamine supplementation in red tilapia (*Oreochromis* sp.) diet: Serum insulin and somatostatin, IGF-1 and GLUT4 genes expression, growth performance, and robustness against stress. *Aquaculture*, 528, pp. 1-9. DOI:10.1016/j.aquaculture.2020.73551

4