

Dietary effects of *Haematococcus pluvialis* in improving ovarian fluid biochemical and ionic parameters in rainbow trout broodstock

Najmeh Sheikhzadeh^{1*}, Shalaleh Mousavi¹

1- Department of Food Hygiene and Aquatic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 20 January 2026

Accepted: 30 February 2026

Extended Abstract:

Introduction: Freshwater microalga *Haematococcus pluvialis* accumulates numerous amount of astaxanthin, about 1,000- to 3,000-fold higher than salmon fillets and has achieved acceptance in fish farming and other markets as a concentrated form of natural astaxanthin. The beneficial effects of this microalga on fish pigmentation, growth, immunity, antioxidant system and reproductive performance have been intensely studied in recent decades. Ovulated eggs lay in the fish coelomic cavity. Ovarian fluid is accumulated before or at the beginning of ovulation. The ovarian fluid origin is largely unknown but it seems to be produced by the secretion of epithelial cells in the ovarian cavity, relating to metabolic activity of follicular cells. The amount of ovarian fluid in Salmonidae is fairly 10-30% of the total egg volume. Fish ovarian fluid is rich in proteins, ions, sugars and hormones. The ovarian fluid has several function, namely stabilizing the microenvironment around the micropyle, modulation of sperm performance as well as sperm and egg protection from adverse environmental conditions. Previous studies demonstrated that different indicators, including female endocrine glands situation, water physicochemical parameters, stresses as well as consumed feed quality and quantity could affect fish ovarian fluid properties. Despite their importance in female reproduction, the effect of female nutrition on ovarian fluid quality has been relatively little investigated. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of feeding microalga *Haematococcus pluvialis* on the biochemical and ionic indices of ovarian fluid in rainbow trout broodstock.

Materials and Methods: A total of 60 rainbow trout broodstock (2845.9 ± 48.3 g) were randomly divided into four groups (three treatment groups and one control group) with three replicates. The treatment groups received diets containing 1, 2 and 3 grams kg^{-1} microalga *Haematococcus pluvialis* (Wuhan Yuancheng Technology Development Company, China) for 30 days, whereas the control group were fed with a basal diet without microalga. On day 30 of feeding trail, after anaesthetization into clove oil bath ($50 \mu\text{l L}^{-1}$), stripping was carried out. After separating the ovarian fluid from collected eggs, fluids were centrifuged (4000g, 10min) and final supernatants were frozen at -80°C until use. Biochemical parameters, namely acid phosphatase activity, lipid peroxidation product, glucose, protein, triglyceride and cholesterol levels as well as ionic parameters, including calcium, magnesium, sodium, and potassium- were measured in each supernatant. Total protein was measured by Lowry *et al.* (1951). Acid phosphatase activity, glucose, cholesterol and triacylglycerol levels were determined by enzymatic colorimetric methods. Lipid peroxidation product level was determined using the thiobarbituric acid test measuring the malondialdehyde (MDA) level in the samples. Cationic ions, namely calcium, magnesium, sodium, and potassium- were determined in ovarian fluid samples by flame photometer (Jenway PFP7, England).

Results and Discussion: The results showed that supplementing *Haematococcus pluvialis* could meaningfully improve lipid peroxidation product level in the ovarian fluid of all treated groups compared to the control group ($p < 0.05$). Similarly, following the administration of some additives, low peroxidation product level and improved antioxidant indices in reproductive system were reported in fish species (Sheikhzadeh *et al.*, 2012; Panjvini *et al.*, 2022; Mohammed *et al.*, 2024). Therefore, a convenient antioxidant can alleviate stresses in fish broodstock and protect sperms and eggs from lipid peroxidation (Sheikhzadeh *et al.*, 2012). The antioxidant system present in adult fish body are not synthesized until late in the embryonic development of larval fish. This point represents the

importance of improving larval quality through broodstock antioxidant enhancement. Feeding *Haematococcus pluvialis* could decrease the acid phosphatase activity in fish fed with the algae at 3 g kg⁻¹ compared to the control fish ($p < 0.05$). In the previous studies, an increase in the level of aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase and lactate dehydrogenase levels in the fish seminal fluid during stresses were reported (Sheikhzadeh *et al.*, 2010). Acid phosphatase and alkaline phosphatase enzymes are involved in phospholipids catabolism and yolk protein degradation. They leak from the intercellular part to the extracellular compartments during cell damages so these enzymes are regarded as indicators of egg degenerative processes in rainbow trout (Jia *et al.*, 2015). During stresses, high lipid peroxidation product level and enormously generated free radicals help the cytotoxicity effect to propagate intracellularly, increasing the interaction of these radicals with phospholipids structure and inducing a peroxidation process that result in destroying the organ structure (Roa *et al.*, 2015). In contrast, carotenoids can prevent lipid peroxidation and restore antioxidant enzymes, finally alleviating the tissue damages and declining acid phosphatase activity. Total protein level in the ovarian fluid of the treated brood stock were fairly similar to the control group, which were in the normal range. In the current study, glucose level in the ovarian fluid of fish treated with 2 and 3 g kg⁻¹ microalga were significantly lower than the control fish. Similarly, lower serum glucose level in the fish fed astaxanthin and *Haematococcus pluvialis* were noted. Astaxanthin can protect pancreatic β -cells against glucose toxicity by inhibiting the huge destruction of these cells in the diabetic mice (Hussein *et al.*, 2007). On the other side, during the fish culture, inevitable stresses can result in high serum glucose level following the glycolysis and gluconeogenesis mechanisms. Therefore, lower glucose level in the broodstock serum and then ovarian fluid by dietary administration of *Haematococcus pluvialis* is evident. The cholesterol content in broodstock ovarian fluid did not change in all treated groups, whereas triglyceride level was decreased in all treatment groups in comparison with the control group. Hussein *et al.* (2007) indicated a decline in plasma triglyceride level and adiponectin level improvement in rats fed astaxanthin oil. Adiponectin hormone can modulate some metabolic pathways, namely fatty acid metabolism and glucose regulation. Since presence of adiponectin has been proved in fish, it can be assumed that feeding *Haematococcus pluvialis* can improve the adiponectin level in rainbow trout and decrease glucose and triglyceride levels in broodstock body. In the present study, cationic ionic levels, including calcium, magnesium, sodium, and potassium, were not affected in all groups ($p > 0.05$) and observed within normal ranges. In the limited studies carried out on fish ovarian fluid, Melchor *et al* (2025) showed that green algae can enhance ionic balance and ovarian cells function. Similarly, Mohammed *et al* (2024) demonstrated that microalgae, as the main sources of minerals like iron, calcium, magnesium, can provide ionic optimum levels in fish plasma and ovarian fluid. So more studies are warranted to search the optimum doses of *Haematococcus pluvialis* on fish ionic indices.

Conclusion: These results indicate that dietary administration of microalga *Haematococcus pluvialis* at 3 gram kg⁻¹ to rainbow trout broodstock can modulate some biochemical parameters, including acid phosphatase activity and lipid peroxidation product, glucose and triglyceride contents in rainbow trout broodstock ovarian fluid. Further studies are needed to investing the dual effects of *Haematococcus pluvialis* on fish broodstock ovarian fluid as well as larval qualities.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest to declare.

Acknowledgment: The authors acknowledge for the financial supports by research affairs of University of Tabriz, Iran.

Keywords: *Haematococcus pluvialis*, Ovarian fluid, Ionic parameters, Biochemical parameters, Rainbow trout

* Corresponding Author: nsheikh@tabrizu.ac.ir, shalaleh.mousavi@tabrizu.ac.ir

"مقاله پژوهشی"

اثرات خوراکی هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) در بهبود شاخص های بیوشیمیایی و یونی مایع تخمدانی مولدین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

نجمه شیخ زاده*^۱، شلاله موسوی*^۱

۱- گروه بهداشت مواد غذایی و آبریان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۳۰

چکیده

هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات تغذیه با ریز جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) بر شاخص های بیوشیمیایی و یونی مایع تخمدانی در مولدین قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بود. بدین منظور، ۶۰ عدد مولد قزل آلای رنگین کمان (میانگین وزن ۲۸۴۵.۹ گرم) به ۴ تیمار (سه تیمار و یک شاهد، هر یک در سه تکرار) تقسیم شدند تیمار جیره های حاوی ۱، ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم میکرو جلبک به مدت ۳۰ روز دریافت کردند، درحالیکه تیمار شاهد با جیره پایه فاقد میکرو جلبک تغذیه شدند. در مرحله بعد مایع تخمدانی استحصال شد و شاخص های بیوشیمیایی، شامل فعالیت اسید فسفاتاز و میزان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، گلوکز، پروتئین، تری گلیسرید و کلسترول به همراه شاخص های یونی، شامل کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسیم اندازه گیری شدند. نتایج نشان داد که تغذیه با هماتوکوکوس پلوویالیس به صورت معنی داری سبب بهبود فعالیت اسید فسفاتاز در ماهی های تغذیه شده با جلبک به میزان ۳ گرم در کیلوگرم در مقایسه با گروه کنترل گردید ($p < 0.05$). به صورت مشابه، میزان محصول پراکسیداسیون لیپیدی، گلوکز و تری گلیسرید در تمام گروه های تیمار، به خصوص گروه های تغذیه شده با ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم، در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت ($p < 0.05$). در مقابل، میزان یون ها در همه گروه ها تحت تاثیر قرار نگرفت ($p < 0.05$). این نتایج نشان می دهند که مصرف خوراکی میکرو جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس با غلظت ۳ گرم در کیلوگرم در مولد قزل آلای رنگین کمان قادر به بهبود شاخص های بیوشیمیایی در مایع تخمدانی است.

کلمات کلیدی: هماتوکوکوس پلوویالیس، مایع تخمدانی، شاخص های یونی، شاخص های بیوشیمیایی، قزل آلای رنگین کمان

مقدمه

جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس (*Haematococcus pluvialis*) نوعی ریزجلبک آب شیرین است که به دلیل محتوای بالای آنتی‌اکسیدان قوی آستاگزانتین شناخته شده است. منابع طبیعی آستاگزانتین از جمله روغن کرپل و کنجاله و مخمر فافیا دارای غلظت پایین آستاگزانتین هستند، که از ۰/۱۵ درصد در روغن‌ها تا ۰/۴۰ درصد در مخمر فافیا متغیر است. در مقابل جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس حاوی ۱/۵ تا ۳ درصد آستاگزانتین است و در آبی‌پروری و سایر بازارها به عنوان شکل غلیظ شده آستاگزانتین طبیعی مورد توجه واقع شده است (Elbahnaswy and Elshopakey, 2024).

تخم‌های رسیده در حفره سلومیک ماهی‌های ماده قرار می‌گیرد. بنابراین، مایع تخمدانی قبل و یا ابتدای دوره اوولاسیون تجمع می‌یابد. منشا مایع تخمدانی به صورت کامل مشخص نیست اما به نظر می‌رسد که با ترشحات سلول‌های پوششی در حفره تخمدانی و در نتیجه فعالیت‌های متابولیک سلول‌های فولیکولر تولید می‌شود (Zadmajid et al., 2019). حجم مایع تخمدانی در گونه‌های مختلف متفاوت است. با این حال در آزاد ماهیان شامل ۳۰-۱۰ درصد کل توده تخمکی می‌باشد (Lahnsteiner, 2002). مایع تخمدانی ماهیان می‌تواند عملکردهای متنوعی مانند محافظت از تخمک‌ها در برابر فاکتورهای نامناسب محیطی و بهبود درصد تفریح، سرعت، نوع حرکت و مسیریابی اسپرم‌ها به سمت سوراخ میکروپیل تخمک‌ها داشته باشد (Zadmajid et al., 2019). ترکیبات مایع تخمدانی در گونه‌های مختلف ماهی متفاوت است اما در کل شامل انواع مواد مغذی، متابولیت‌ها و هورمون‌هاست

(Cardozo and Pilastro, 2018). مطالعاتی در خصوص خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی مایع‌های تخمدانی، شامل pH، اسمولالیت، غلظت یون‌ها، گلوکز، استروئیدها و پروتئین در گونه‌های ماهی وجود دارد (Lahnsteiner et al., 1995; Wojtczak et al., 2007). تنوع پروتئین‌های مایع تخمدانی قابل توجه است، صدها پروتئین مختلف در مایع تخمدانی شناسایی شده است که عملکردهای مختلفی از افزایش عملکرد اسپرم گرفته تا محافظت از اسپرم و تخمک در برابر شرایط محیطی نامطلوب را بر عهده دارند (Zadmajid et al., 2019). یون‌های سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم موجود در مایع تخمدانی نیز موجب ایجاد محیط بهینه برای تحرک اسپرم می‌شوند. این یون‌ها با تنظیم تعادل الکترولیتی، عملکرد بهتر و طولانی‌تر اسپرم را تضمین می‌کنند. از طرفی باعث افزایش مدت زمان و سرعت حرکت اسپرم و حفاظت از اسپرم در برابر استرس‌های محیطی می‌گردند (Hatef et al., 2009). عوامل مختلفی مانند وضعیت غدد درون ریز ماده در طی تخمک‌گذاری، پارامترهای فیزیکی‌شیمیایی آب، استرس مولدین و همچنین مقدار و کیفیت غذای مصرف شده بر کیفیت مایع تخمدانی ماهی تأثیر مستقیم دارند (Cardozo and Pilastro, 2018; Zadmajid et al., 2019).

اثر مثبت تغذیه با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس و آستاگزانتین بر کیفیت تخم و بهبود سیستم ایمنی و فاکتورهای بیوشیمیایی سرمی ماهی‌ها در مطالعات مختلفی مورد بررسی قرار گرفته است (Khan 2025). اما تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی تأثیر جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بر کیفیت مایع تخمدانی مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت

نگرفته است. با توجه به نکات ذکر شده، در مطالعه حاضر برای اولین بار اثر این ریز جلبک در بهبود کیفیت مایع تخمدانی مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار گرفت.

(Sheikhzadeh *et al.*, 2012b). بدین منظور، جلبک‌ها با روغن مخلوط شده و با خوراک ماهی‌ها کاملاً مخلوط گردید. به گروه شاهد جیره پایه بدون جلبک داده شد. در روز ۳۰ آزمایش، پس از بیهوشی در حمام عصاره گل میخک (۵۰ میکرولیتر در لیتر)، جداسازی مایع تخمدانی انجام گرفت (Sheikhzadeh *et al.*, 2012a). در هنگام تخم‌کشی با ریختن تخمک‌ها روی توری، مایع تخمدانی از توری عبور داده و پس از جدا سازی، به درون میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتر انتقال داده شد. تمامی نمونه‌های جمع آوری شده از مایع تخمدانی در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. مایع جدا شده فوقانی تا زمان سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی و یونی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش فراسنجه‌های بیوشیمیایی و یونی

سنجش پروتئین کل با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) انجام گرفت که مکانیسم آن به طور خلاصه بر اساس واکنش یون‌های مس با پیوندهای پپتیدی در شرایط قلیایی (آزمون بیوره) و اکسیداسیون باقی‌مانده‌های آروماتیک پروتئین است. غلظت یون‌های مس کاهش یافته (هتروپلی‌مولیدنوم آبی) با استفاده از جذب در ۶۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. آنزیم اسیدفسفاتاز، گلوکز و کلسترول مایع تخمدانی توسط کیت‌های تشخیصی پارس آزمون (کرج، ایران) اندازه‌گیری شد. به این منظور، این مقادیر به روش فتومتریک (آنزیمی، کالریمتری برای اندازه‌گیری تک نقطه‌ای)، مطابق پروتکل ارائه شده توسط کیت سنجش و در طول موج ۵۴۶ نانومتر قرائت شدند. جهت اندازه‌گیری سطح تری‌گلیسیرید نیز از روش رنگ سنجی

مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی مولد ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان

در این تحقیق ۶۰ عدد ماهی مولد ماده قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن 2845.9 ± 48.3 گرم که در یک مزرعه پرورش ماهی واقع در منطقه نیرشهرستان اردبیل مورد استفاده قرار گرفتند. در ابتدای بررسی، ناحیه شکم ماهی‌ها ماساژ داده شد تا اطمینان حاصل شود که در مرحله تخم‌ریزی نیستند. سازگاری با مخازن جدید به مدت ۱۴ روز با خوراک تجاری (شرکت چینه، ایران) با $0/85$ درصد وزن بدن یک بار در روز انجام شد (Sheikhzadeh *et al.*, 2012a). ماهی‌ها به‌طور تصادفی در ۱۲ تانک ($1/7$ متر \times $1/3$ متر \times $1/4$ متر) توزیع شدند. آب مورد استفاده در مخازن مورد پرورش با آب رودخانه با سرعت جریان ۱/۵ لیتر در ثانیه و دمای آب 1 ± 11 درجه سانتی‌گراد به همراه هوادهی بود.

طراحی آزمایش

ماهی‌ها به‌طور مساوی در ۴ تیمار و با ۱۵ ماهی در هر تیمار توزیع شدند. هر تیمار شامل سه تکرار و ۵ عدد ماهی در هر تکرار بود. ماهیان گروه تیمار با جیره‌های حاوی ۱، ۲ و ۳ گرم از جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس (Wuhan Yuancheng Technology Development Company, China) در کیلوگرم جیره غذایی به مدت ۳۰ روز تغذیه شدند

ANOVA) استفاده گردید. مقایسه تیمارها نیز با آزمون توکی (Tukey) انجام و سطح معنی داری آزمون‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

نتایج

فراسنجه‌های بیوشیمیایی

بر اساس نتایج بدست آمده در این تحقیق، فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز تنها در مایع تخمدانی ماهی‌های تغذیه شده با ۳ گرم در کیلوگرم جلبک در مقایسه با تیمار شاهد کاهش معنی داری را نشان داد. میزان پراکسیداسیون لیپیدی و تری گلیسرید در تمام گروه‌های تیمار دریافت کننده جلبک، کاهش معنی داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد. درحالی‌که مقدار گلوکز در دو تیمار دریافت کننده ۲ و ۳ گرم در کیلوگرم جلبک کاهش معنی داری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان داد. در مقایسه، میزان کلسترول و پروتئین مایع تخمدانی در گروه‌های تیمار تفاوت معنی داری با تیمار شاهد نداشت (جدول ۱).

آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های لیپوپروتئین لیپاز، گلیسرولکیناز، گلیسرفسفات اکسیداز و کروموژن ۴-آمینوفنازون و فنل برای تولید یک ترکیب رنگی به نام کینونیمین استفاده شد (Fossati and Prencipe, 1982). اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی با روش تیوباربتوریک اسید و سنجش مالون‌دی‌آلدئید (MDA) انجام گرفت، که به طور خلاصه پس از افزودن TCA به نمونه و سانتی‌فیوژ آن، اسید سولفوریک و تیوباربتوریک اسید به رسوب به‌دست آمده از سانتی‌فیوژ اضافه گردید. پس از افزودن π بوتانول به محلول و سانتی‌فیوژ آن، محلول رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت شد (Kei, 1978). جهت اندازه‌گیری میزان یون‌های کلسیم، پتاسیم، سدیم و منیزیم در مایع تخمدانی از دستگاه فلیم فتومتر مدل Jenway PFP7 استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۶ مورد سنجش قرار گرفت. در این تحقیق برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها از واریانس یکطرفه (One Way

جدول ۱. تاثیر تغذیه با جلبک هماتوکوکوس پروویالیس بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی در مایع تخمدانی مولدین ماده قزل‌آلای رنگین کمان

Table 1: Effects of feeding *Haematococcus pluvialis* on biochemical parameters in ovarian fluid of female rainbow trout broodstock

Treatment	Acid phosphatase activity (U/L)	Lipid peroxidation product (nmol/dl)	Triglyceride (mg/dl)	Glucose (mg/dl)	Cholesterol (mg/dl)	Protein (mg/dl)
C	20.43 ± 0.92 ^a	2.41 ± 0.02 ^a	10.55±0.27 ^a	42.17±1.54 ^a	19.47 ± 1.02	0.15 ± 0.02
T1	21.12 ± 1.14 ^a	2.14 ± 0.06 ^b	3.50 ± 0.41 ^b	45.93±1.01 ^a	19.93 ± 0.86	0.14 ± 0.01
T2	18.89 ± 1.15 ^a	2.28± 0.00 ^{bc}	3.28 ± 0.17 ^b	27.70±2.61 ^b	21.93 ± 1.05	0.21 ± 0.10
T3	13.09 ± 0.64 ^b	1.81 ± 0.05 ^c	2.85 ± 0.04 ^b	27.16±0.92 ^b	21.19 ± 0.74	0.16 ± 0.04

*اعداد با حروف متفاوت نسبت به یکدیگر معنی دار می‌باشند ($p < 0.05$).

*Numbers with different letters are significant ($p < 0.05$).

فراسنجه‌های یونی

میزان یون‌های مختلف شامل کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسیم در مایع تخمدانی بین گروه‌های تیمار و تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. در کل، میزان یون سدیم در مایع تخمدانی گروه‌های مختلف در بالاترین

میزان بوده و پایین‌ترین میزان غلظت یونی مربوط به کلسیم بود و هیچ تفاوتی در غلظت یون‌های مختلف با مصرف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس رخ نداد (جدول ۲).

جدول ۲: تاثیر تغذیه با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بر فراسنجه‌های یونی در مایع تخمدانی مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

Table 2: Effects of feeding *Haematococcus pluvialis* on ionic parameters in ovarian fluid of female rainbow trout broodstock

Treatment	Calcium (mmol/l)	Magnesium (mmol/l)	Sodium (mmol/l)	Potassium (mmol/l)
C	1.52 ± 0.23	3.03 ± 0.15	77.22 ± 0.21	2.83 ± 0.71
T1	1.48 ± 0.44	3.20 ± 0.40	79.91 ± 0.04	2.85 ± 0.66
T2	1.40 ± 0.21	3.00 ± 0.38	78.69 ± 0.11	2.79 ± 0.16
T3	1.57 ± 0.20	3.07 ± 0.13	75.80 ± 0.08	2.73 ± 0.26

*اعداد با حروف متفاوت نسبت به یکدیگر معنی‌دار می‌باشند ($p < 0.05$).

*Numbers with different letters are significant ($p < 0.05$).

بحث

مطالعه حاضر به منظور بررسی اثرات تغذیه ماهی مولد بر کیفیت مایع تخمدانی انجام شد که اثر مثبت تغذیه با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی در مایع تخمدانی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شامل فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز، محصول پراکسیداسیون لیپیدی، گلوکز و تری گلیسرید اثبات گردید. در کل، مطالعات محدودی در زمینه اثرات تغذیه ماهی مولد بر کیفیت مایع تخمدانی انجام شده است (Panjvini, Cardozo and Pilastro, 2018; Mohammed et al., 2024, et al., 2022). ماهی‌های مولد با استرس‌های اکسیداتیو به خصوص در زمان تکثیر به صورت اجتناب‌ناپذیری مواجه هستند که این استرس‌ها به صورت مستقیم بر کیفیت تخمک و اسپرم تاثیر می‌گذارد (Sheikhzadeh et al., 2012a). بنابراین مصرف ترکیبات مغذی قادر به ایجاد مقاومت

در بدن ماهی‌های مولد و تولید تخمک و اسپرم‌های با-کیفیت می‌باشد.

مالون دی آلدئید (MDA) محصول پایدار پراکسیداسیون لیپیدی است و از تجزیه پراکسیدهای ناپایدار اسیدهای چرب غیراشباع ایجاد می‌شود که سنجش آن در مایع تخمدانی شاخص مناسبی جهت بررسی پراکسیداسیون لیپیدها می‌باشد. در مطالعه حاضر تغذیه مولدین ماده با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس باعث کاهش معنی‌دار محصول پراکسیداسیون لیپیدی در مایع تخمدانی گروه‌های تیمار گردید. در مطالعات پیشین کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدان در بهبود فعالیت تولیدمثلی و افزایش کیفیت تخمک‌های استحصالی گزارش گردید. به عنوان مثال، Panjvini و همکاران (۲۰۲۲) نشان دادند که افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم آستانزانتین به همراه

آنتی‌اکسیدانی اولیه در لاروهای استحصال‌شده می‌گردد (Sheikhzadeh *et al.*, 2012a).

در مطالعه حاضر، فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز در مایع تخمدانی متعاقب مصرف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس کاهش معنی‌داری نشان داد. در مطالعات پیشین نیز در مایع سمینال در ماهی و سایر موجودات افزایش معنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های آسپاراتات‌آمینوترانسفراز، لاکتات‌دهیدروژناز و اسید فسفاتاز حین ایجاد استرس گزارش گردید (Sheikhzadeh *et al.*, 2010). اسید فسفاتاز و آلکالین فسفاتاز آنزیم‌هایی هستند که در کاتابولیسم فسفولیپید و دژنراسیون پروتئین زرده نقش دارند. این‌گونه آنزیم‌های داخل سلولی متعاقب ایجاد ضایعات سلولی به بخش خارج سلول انتشار می‌یابند. بنابراین وجود این آنزیم‌ها در مایع تخمدانی به عنوان نشانگر فرآیند تخریب تخمک در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تلقی می‌گردند (Jia *et al.*, 2014). با توجه به نکات ذکر شده به نظر می‌رسد که کاهش فعالیت اسیدفسفاتاز در مایع تخمدانی می‌تواند بیانگر کاهش فرآیند تخریب تخمک‌ها در ماهی‌های مولد تغذیه شده با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس باشد. مکانیسم اثر جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس در جهت کاهش تخریب تخمک‌ها هنوز به صورت دقیق مشخص نشده است، اما مطالعات پیشین نشان داده است که افزایش پراکسیداسیون لیپیدی حین استرس سبب افزایش تولید رادیکال‌های آزاد می‌شود. تولید رادیکال‌های آزاد فراوان سبب اثرات سیتوتوکسیک و افزایش تداخل این رادیکال‌ها با ساختار فسفولیپیدی و القا فرآیند پراکسیداسیون و در نهایت تخریب بافت می‌شود (Roa *et al.*, 2015). در مقابل، کاروتنوئیدهای موجود در

حداقل ۳۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ویتامین C و حداقل ۶ درصد لسیتین سویا، موجب افزایش هم‌آوری نسبی و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و قابلیت لقاح پذیری مایع تخمدانی ماهی آزاد دریای خزر شد. در مطالعه‌ای دیگر Mohammed و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند جلبک‌هایی مانند اسپیرولینا و کلرلا با خشتی‌سازی رادیکال‌های آزاد در محیط تخمدان، کیفیت تخم را حفظ می‌کنند و مایع تخمدانی را غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌نمایند. در مطالعه Sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲) نیز کاهش محصول پراکسیداسیون لیپیدی در تخمک‌های استحصالی از مولدین ماده تغذیه شده با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس گزارش گردید. Ahmadiania و همکاران (۲۰۲۱) نیز به بررسی اثر جلبک اسپیرولینا در کیفیت تخم مرغ‌های تخمگذار پرداختند و نشان دادند افزودن ۰/۶ درصد جلبک اسپیرولینا به جیره، سبب افزایش توده تخم‌مرغ تولیدی، بهبود رنگ زرده تخم مرغ و بهبود پاسخ آنتی‌بادی و متعاقباً کاهش پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود. ماهی‌ها به خصوص در زمان تولید مثل با استرس‌های مختلفی مواجه هستند. مطالعات در پستانداران نیز نشان داده است که افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مایع فولیکولار و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی آن، اثرات مثبتی بر لقاح، قابلیت تفریح و تکامل جنین دارد (Mohamed *et al.*, 2019). بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان مناسب قادر به تخفیف استرس در بدن و محافظت اسپرم و تخمک‌ها در برابر پراکسیداسیون لیپیدی است (Sheikhzadeh *et al.*, 2012a). سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی که در کبد و سایر بافت‌های ماهی بالغ وجود دارند، تا اواخر رشد جنینی لارو ماهی سنتز نمی‌شوند. بنابراین تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی مولدین سبب ایجاد محافظت

متابولیک مانند تنظیم سطح گلوکز و متابولیسم چربی است. از آنجایی که وجود ادیپونکتین در ماهی نیز اثبات شده است (Ji *et al.*, 2021). به نظر می‌رسد کاهش میزان تری‌گلیسرید و گلوکز در ماهی‌های مصرف کننده جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس از این مسیر نیز ممکن باشد.

در مطالعه حاضر تغذیه با جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس موجب تفاوت معنی‌داری در مقادیر یون‌های موجود در مایع تخمدانی مانند کلسیم، سدیم، منیزیم و پتاسیم بین تیمارها و شاهد نگردید و مقادیر در گروه‌های تیمار در حد نرمال گزارش گردید. در مطالعات محدودی که در زمینه تاثیر جلبک‌ها بر کیفیت یون‌های مایع تخمدانی پرداخته است، Melchor و همکاران (۲۰۲۵) نشان دادند جلبک‌های قهوه‌ای می‌توانند تعادل یونی و عملکرد سلول تخمدان را پشتیبانی کنند. در مطالعه‌ای دیگر Mohammed و همکاران (۲۰۲۴) نشان دادند میکرو جلبک‌ها منبع مواد معدنی مثل آهن، کلسیم و منیزیم و پتاسیم هستند که می‌توانند سطوح مطلوب مواد معدنی را در پلاسما و مایع تخمدانی فراهم کنند. جلبک‌هایی مانند اسپیرولینا و کلرلا با خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد در محیط تخمدان، کیفیت تخم را حفظ می‌کنند و مایع تخمدانی را غنی از آنتی‌اکسیدان‌ها می‌نمایند. بنابراین بررسی بیشتر در زمینه اثرات مقادیر مختلف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس بر شاخص‌های یونی مایع تخمدانی مورد نیاز می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق، مصرف خوراکی جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس، به‌ویژه در مقدار ۳

جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس با جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان سبب ممانعت از تخریب بافتی می‌گردد که در نهایت سبب کاهش فعالیت آنزیم‌های تخریب کننده مانند اسیدفسفاتاز می‌شود (Roa *et al.*, 2015).

مقدار پروتئین کل در مایع تخمدانی ماهی‌های مولد تغذیه شده با جلبک مشابه گروه شاهد بود، بنابراین این شاخص در حد طبیعی بود. بررسی شاخص میزان گلوکز در مایع تخمدانی نشان داد که مصرف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس سبب کاهش معنی‌دار در میزان گلوکز مایع تخمدانی می‌شود. در مطالعات قبل نیز کاهش سطح گلوکز سرمی متعاقب مصرف جلبک هماتوکوکوس و آستاگزانتین نشان داده شد. مطالعه پیشین نشان داد که آستاگزانتین از طریق جلوگیری از تخریب سلول‌های بتا در پانکراس در موش‌های دیابتی سبب کاهش سطح گلوکز می‌گردد (Hussein *et al.*, 2007). از طرف دیگر، در زمان روز استرس، که بخش اجتناب‌ناپذیر در پرورش ماهی است، بالا رفتن قند خون به دلیل مکانیسم‌های گلوکونئوزنز و گلیکولیز ناشی از هورمون‌های استرسی امری مبرهن است. بنابراین کاهش میزان قند خون در سرم ماهیان مولد پس از مصرف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس و متعاقب آن در مایع تخمدانی مولدین قزل‌آلا امری بدیهی به نظر می‌رسد. در مطالعه حاضر تغذیه با این جلبک در میزان کلسترول مایع تخمدانی تغییری ایجاد نکرد، اما منجر به کاهش معنی‌دار سطح تری‌گلیسرید در مایع تخمدانی گردید. Hussein و همکاران (۲۰۰۷) نیز بیان نمودند که مصرف آستاگزانتین در موش سبب کاهش میزان تری‌گلیسرید و بهبود میزان پروتئین ادیپونکتین می‌گردد. این هورمون قادر به تنظیم برخی فرآیندهای

- produces hydrogen peroxide. *Clinical chemistry*, 28(10), pp.2077-2080.
5. Hafez, A., Niksirat, H. and Alavi, S.M.H., 2009. Composition of ovarian fluid endangered Caspian brown trout, *Salmo trutta caspius*, and its effects on spermatozoa motility and fertilizing ability compared to freshwater and a saline medium. *Fish physiology and biochemistry*, 35(4), pp.695-700. DOI: 10.1007/s10695-008-9302-6
 6. Hussein, G., Nakagawa, T., Goto, H., Shimada, Y., Matsumoto, K., Sankawa, U. and Watanabe, H., 2007. Astaxanthin ameliorates features of metabolic syndrome in SHR/NDmcr-cp. *Life Science*, 80(16), pp.522-529. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.09.041
 7. Ji, R., Xu, X., Turchini, G.M., Mai, K. and Ai, Q., 2021. Adiponectin's roles in lipid and glucose metabolism modulation in fish: Mechanisms and perspectives. *Reviews in Aquaculture*, 13(4), pp.2305-2321. DOI: 10.1111/jfb.12676
 8. Jia, Y.D., Meng, Z., Liu, X.F. and Lei, J.L., 2014. Biochemical composition and quality of turbot (*Scophthalmus maximus*) eggs throughout the reproductive season. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(4), pp.1093-1104. DOI: 10.1007/s10695-014-9908-9
 9. Kei, S., 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clinica chimica acta*, 90(1), pp.37-43. DOI: 10.1016/0009-8981(78)90081-5
 10. Khan, F., 2025. Astaxanthin in Aquaculture: Enhancing abalone health through oxidative stress management. *Fish and Shellfish Immunology*, 165, 110502. DOI: 10.1016/j.fsi.2025.110502
 11. Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A., 1995. Composition of the ovarian fluid in 4 salmonid species: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta flacustris*, *Salvelinus alpinus* and *Hucho hucho*. *Reproduction Nutrition Development*, 35(5), pp.465-474.

گرم در کیلوگرم، سبب بهبود برخی شاخص‌های بیوشیمیایی شامل فعالیت آنزیم اسیدفسفاتاز و میزان پراکسیداسیون لیپیدی، گلوکز و تری گلیسرید در مایع تخمدانی ماهی های مولد قزل‌آلای رنگین کمان گردید. در مطالعات بعدی نیاز به بررسی همزمان کیفیت تخمک‌های استحصالی و درصد بازماندگی لاروها به همراه شاخص‌های مایع تخمدانی متعاقب مصرف مقادیر مختلف جلبک هماتوکوکوس پلوویالیس است تا اثر نهایی این ترکیب بر شاخص‌های تولیدمثلی ماهی اثبات گردد.

سپاسگزاری

مولفین مراتب سپاسگزاری خود را از حمایت مالی امور پژوهشی دانشگاه تبریز اعلام می‌دارند.

منابع

1. Cardozo, G. and Pilastro, A., 2018. Female nutritional condition affects ovarian fluid quality in guppies. *Biology Letter*, 14(5), 20180122. DOI: 10.1098/rsbl.2018.0122
2. Ahmadiania, E., Mehri, M. and Shirmohammad, F., 2021. Effects of dietary *Spirulina platensis* algae powder on performance, egg quality, ovarian follicles and immune system in Lohmann LSL laying hens. *Iranian Animal Sciences*, 51(4), 349-359. DOI: 10.22059/ijas.2021.314088.653810 [In Persian]
3. Elbahnaswy, S. and Elshopakey, G.E., 2024. Recent progress in practical applications of a potential carotenoid astaxanthin in aquaculture industry: a review. *Fish Physiology and Biochemistry*, 50(1), pp.97-126. DOI: 10.1007/s10695-022-01167-0
4. Fossati, P. and Prencipe, L., 1982. Serum triglycerides determined calorimetrically with an enzyme and

- activity of astaxanthin and astaxanthin esters from microalga-*Haematococcus pluvialis*. *Journal of Food Science and Technology*, 52(10), pp.6703–6710. DOI: 10.1007/s13197-015-1775-6
19. Sheikhzadeh, N., Asadpour, R., Jafari Jozani, R.A. and Tayefi-Nasrabadi, H., 2010. Effect of Ergosan on semen quality of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstock. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), pp.183–188. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2010.08.008
20. Sheikhzadeh, N., Koochaki, I., Asadpour, R., Tayefi-Nasrabadi, H. and Mahmoudi, H. 2012a. Effect of *Haematococcus pluvialis* in maternal diet on reproductive performance and egg quality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animal Reproduction Science*, 130(1-2), pp.119-123. DOI:10.1016/j.anireprosci.2011.12.010
21. Sheikhzadeh, N., Tayefi-Nasrabadi, H., Khani Oushan, A. and Najafi Enferadi, M.H., 2012b. Effects of *Haematococcus pluvialis* supplementation on antioxidant system and metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(3), pp.413-419. DOI: 10.1007/s10695-011-9519-7
22. Wojtczak, M., Dietrich, G.J., Słowińska, M., Dobosz, S., Kuźmiński, H. and Ciereszko, A., 2007. Ovarian fluid pH enhances motility parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Aquaculture*, 270(1-4), pp.259–264. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.03.010
23. Zadmajid V., Myers J.N., Sørensen S.R. and Butts I.A.E., 2019. Ovarian fluid and its impacts on spermatozoa performance in fish: a review. *Theriogenology*, 132, pp.144-152. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.03.021
- DOI: 10.1051/rnd:19950501
12. Lahnsteiner, F., 2002. The influence of ovarian fluid on the gamete physiology in the *Salmonidae*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 27(1), pp.49–59. DOI: 10.1023/B:FISH.0000021792.97913.2e
13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The journal of biological chemistry*, 193(1), pp.265–275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6
14. Melchor-Martinez, E.M., Reyes A.G., Pena-Rodriguez A., Delgado-Cortez I.G. and Flores-Contreras E.A., 2025. Utilization of brown algae and pre-treatment strategies as a source of bioactive nutrients for aquaculture species. *Journal of Applied Phycology*, 37(3), pp.2121-2146. DOI: 10.1007/s10811-025-03508-x
15. Mohammed, A.A. and Al-khamis, S., 2024. Effects of dietary microalgae inclusion on feed utilization, morphological and chemical characteristics and body health in fish: Advantages and disadvantages. *Indian journal of animal research*, 58(9), pp.1452-1459. DOI: 10.18805/IJAR.BF-1748
16. Mohamed, A.M., Mohammad, M.A., Khodry, M. and Abdallah, A.H., 2019. Day 3 versus day 5 embryo freezing: which is better, A comparative study. *SVU-International Journal of Medical Sciences*, 2(2), pp.10-16. DOI: 10.21608/svuijm.2019.122246
17. Panjvini, F., Sarvimoghanloo, K., Tahmasbi, R. and Imani, A., 2022. Effects of dietary adding vitamin C, astaxanthin, and soybean lecithin on fertilization ability and antioxidant indices in the ovarian fluids of Caspian trout (*Salmo caspius*) female broodstock. *Iranian scientific fisheries journal*, 31(3), pp.113-127. DOI: 10.22092/ISFJ.2022.127633 [In Persian]
18. Roa, A.R., Sarada, R., Shylaja, M.D., Ravishankar, G.A., 2015. Evaluation of hepatoprotective and antioxidant