

## Diyetsel Gümüş Nanopartikülün Gökkuşuğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) Yetiştiricilik Parametreleri ve Yüksek Sıcaklık Toleransına Etkisi

### Effect of Diet Silver Nanoparticle on Cultivation Parameters and High Temperature Tolerance of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Özgür Uçaş<sup>1</sup>, Ece Evliyaoğlu<sup>1</sup>, Hüseyin Sevgili<sup>2</sup>, Esin Akarsu<sup>3</sup>, Siti Nur Insyirah Noor Izam<sup>1</sup>, Hatice Asuman Yılmaz<sup>1</sup>, Orhan Tufan Eroldoğan<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Adana, Türkiye

<sup>2</sup>Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Yetiştiriciliği Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya, Türkiye

<sup>4</sup>Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Adana, Türkiye

\*Sorumlu Yazar: [mtufan@cu.edu.tr](mailto:mtufan@cu.edu.tr)

Received: 30.10.2022

Accepted: 24.05.2023

Published: 01.09.2023

**How to Cite:** Uçaş, Ö., Evliyaoğlu, E., Sevgili, H., Akarsu, E., Noor Izam, S. N., Yılmaz, H. A., & Eroldoğan, E. T. (2023). Diyetel gümüş nanopartikülün Gökkuşuğu Alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) yetiştiricilik parametreleri ve yüksek sıcaklık toleransına etkisi. *Acta Aquatica Turcica*, 19(3), 246-256. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.1210907>

**Özet:** Son yıllarda balık yemlerinde kullanılan balık unlarının yerine bitkisel protein kaynaklarının kullanılması ile birlikte balıklar için esansiyel olan mikro elementlerin yem içerisindeki miktarları da oransal olarak azalmıştır. Bu sebeple, kritik seviyelerde kullanılması gereken bu mikro besinlerin nanopartikül formlarının, özellikle soğuk su balıklarında kullanımının araştırılması önem arz etmektedir. Bu çalışmada yemlere ilave edilen gümüş nanopartikülün (Nano-Ag) gökkuşuğu alabalığının (*Oncorhynchus mykiss*) büyüme, yem alımı, tüm vücut besinsel kompozisyonu ile kritik termal maksima değeri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Denemede 3 farklı dozda (0, 0.2 ve 2 mg/kg) Nano-Ag içeren yem hazırlanmıştır ve başlangıç ağırlıkları 41,5±0,31 g olan balıklar bu yemler ile 60 gün süresince günde iki defa olacak şekilde beslenmişlerdir. Deneme sonunda, alabalıkların final ağırlıkları 118,9 ve 112,9 g arasında değişmiş, gruplar arasında istatistiki önemli bir farklılık bulunmamıştır (P>0.05). Aynı şekilde, canlı ağırlık kazancı, yem tüketimi, yemden yararlanma oranı, visero-somatik indeks ve hepato-somatik indeks açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır (P>0.05). Gruplar arasında tüm vücut ham protein içeriği %16,1-16,3 arasında değişirken lipid içeriği %11,4-12,2 arasında değişim göstermiştir (P>0.05). Deneme sonunda gerçekleştirilen kritik termal maksima (CTMax) denemesinde yemlere ilave edilen Nano-Ag'nin önemli düzeyde istatistiki bir etkisinin olmadığı gözlenmesine karşın (P>0.05), yüksek Nano-Ag'nin termal toleransı kısmen de olsa artırdığı gözlenmiştir. Kontrol, 0.2 mg/kg ve 2 mg/kg grubu bireylerinin ortalama CTMax değerleri sırasıyla 27.0°C, 27.2°C ve 27.8°C olarak belirlenmiştir. 2 mg/kg Nano-Ag'nin CTMax'ı %3 artırdığı gözlenmiştir. Bu çalışma ile yemlere ilave edilen Nano-Ag'nin gökkuşuğu alabalıklarında büyüme performans verilerine ve yem alımına etkisinin olmadığı ancak kısmen de olsa CTMax değerini artırma eğiliminde olduğu ortaya konmuştur.

#### Anahtar kelimeler

- Nanopartikül gümüş
- Termal tolerans
- Yem katkı maddeleri
- Yem alımı

**Abstract:** In recent years, with the use of plant protein sources instead of fish meals in fish feeds, the amounts of dietary essential microelements have decreased proportionally. For this reason, it is important to investigate the use of nanoparticle forms of these micronutrients, which should be used at critical levels, especially in cold-water fish. In this study, the effects of silver nanoparticles (Nano-Ag) added to feeds on growth, feed intake, whole-body nutritional composition, and critical thermal maximum value of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were investigated. A feed containing Nano-Ag at three different doses (0, 0.2, and 2 mg/kg) was prepared for the trial, and fish with initial weights of 41 g were fed twice daily with these feeds for 60 days. At the end of the experiment, the final weights of the trout ranged between 118.9 and 112.9 g, without a statistically significant difference between the groups (P>0.05). Similarly, there was no statistically significant difference between the groups in terms of body weight gain, feed consumption, feed conversion ratio, viscerosomatic index, and hepatosomatic index

#### Anahtar kelimeler

- Nanoparticle silver
- Thermal tolerance
- Feed additives
- Feed intake



( $P>0.05$ ). Whole body crude protein content varied between 16.1-16.3%, while lipid content varied between 11.4-12.2% between the groups ( $P>0.05$ ). The critical thermal maxima (CTMax) trial carried out at the end of the trial exhibited that Nano-Ag added to feeds did not have a significant statistical effect ( $P> 0.05$ ) although it was observed that high Nano-Ag partially increased thermal tolerance. The mean CTMax values of individuals in the 0 (control), 0.2, and 2 mg/kg groups were found to be 27.0°C, 27.2°C, and 27.8°C. In the present study, it was revealed that Nano-Ag added to the feeds did not affect the growth performance data and feed intake of 41 g rainbow trout but partially increased the CTMax value.

## 1. GİRİŞ

Su ürünleri yetiştiriciliği yoluyla yapılan üretim dünya çapında toplam balık üretiminin yaklaşık %44'ünü teşkil etmekte olup, 2030 yılına kadar bu payın küresel üretimin %60'ına üzerine çıkacağı tahmin edilmektedir. (Cottrell vd., 2020; FAO, 2020). Yetiştiricilik endüstrisinde en önemli konuların başında yemler ve yemlerin besinsel içerikleri gelmektedir (Halves, 2002; Austin vd., 2022). Son yıllarda yapılan araştırmalarda göstermiştir ki yemlerde artan orandaki bitkisel yem hammaddeleri kullanımının canlıların gereksinim duyduğu mineralleri ve iz elementleri yeterli düzeylerde karşılayamadığı bu da balıklarda ciddi bağışıklık sorunlarına neden olmaktadır (Prabhu vd., 2019; Wischunes vd., 2020, Figueiredo-Silva, 2020). Mikro besinler esansiyel olan (çinko, demir, bakır) ve esansiyel olmayan (civa ve gümüş gibi) iz elementleri kapsamakta (Shaw & Handy, 2011) ancak esansiyel olmayanlarda mineral karmalarında kullanılmaktadır (NRC, 2011). Balıklarda iz elementlerin (demir, çinko, bakır, gümüş vb.) canlılar üzerindeki fizyolojik etkileri ile ilgili bilgiler oldukça eskiye dayanmaktadır. İz elementlerin özellikle balığın optimum (en uygun) konfor alanından çıktığı ve çevresel strese maruz kaldığı ortamlarda fonksiyonları daha önemli hale gelmektedir (Kamunde & Wood, 2004; Shaw & Handy, 2011). İz elementlerden olan gümüş ve bakır gibi birçok metal nanopartiküllerin balıkların bağışıklık potansiyellerinin artırılmasında, hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde başarılı sonuçların alındığı rapor edilmektedir (Márquez vd., 2018; Nasr-Eldahan vd., 2021; Ogunfowora vd., 2021; Aly vd., 2023). Hedefe yönelik çalışmalarda nanopartiküller, inhibitör bileşiklerin uygulanmasına yönelik yeni yöntemleri kolaylaştırabilir. Bu yöntemler, geleneksel yaklaşımlardan daha hızlı, müdahaleci olmayan ve daha uygun maliyetli olabilir (Fajardo vd., 2022). Günümüzde su ürünleri yetiştiriciliğinde değerlendirilen nanopartiküller sadece hastalıklar üzerine değil aynı zamanda pek çok türü kompozit formlar halinde (polilaktidkoglikolit, aljinat, bağışıklık uyarıcı kompleksler, kitosan, çeşitli metaller, karbon nanotüpler, lipozomlar ve virozomlar) yetiştiriciliğin çoğu aşamasında kullanılmaktadır (Taffala vd., 2013; Vinay vd., 2019).

Nano-gümüş (Nano-Ag) karasal hayvanlar ve su ürünleri yetiştiriciliğinde dezenfektan ve terapötik materyal olarak kullanılmaktadır (Nia, 2009). Diyetel Nano-Ag kullanımı çok az çalışılmış bir konudur. Mevcut araştırmalardan Aly vd. (2023) Nil tilipiası (*Oreochromis niloticus*) yemlerine 1 mg/kg düzeyinde Nano-Ag ilavesinin büyüme ve yemden yararlanmayı etkilemese de bağışıklık parametreleri ve hastalık direncini önemli derecede artırdığını rapor etmişlerdir. Diğer nanopartiküllerden, nano-selenyumun yemlere eklenmesinin balıklarda büyüme performansı ve antioksidan savunma sisteminde önemli bir iyileşme sağladığı bildirilmiştir (Shah ve Mraz, 2020). Gökkuşluğu alabalıklarında, yem katılan kitosan-aljinatın *Lactococcus garvieae* ve *Streptococcus iniae* bakterilerinin neden olduğu laktokokoz ve streptokokozu karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Fajardo vd., 2022; Austin vd., 2022).

Doğal şartlarda balıklar, vücut ısısını çevresel sıcaklık değişikliklerine göre dengeleyebilirler ya da dengelemek amacıyla optimum su sıcaklığının olduğu bölgelere göç edebilirler (Cossins vd., 2006; Eissa & Wang, 2016). Su ürünleri yetiştiriciliği koşulları dikkate alındığında, özellikle balıklarda ilkbahardan yaza ve/veya sonbahardan kışa geçi dönemlerinde su sıcaklıklarının yetiştirilen tür için optimumun üstündeki veya altında etkilerinin bilinmesi önemlidir. Axenov-Gribanov vd. (2016) optimum üzerindeki su sıcaklığı değişimlerinin balıklarda termal stresi tetiklediği ve balığın yem alımını ve büyüme performansını düşürdüğünü bildirmiştir. Balıkların yanı sıra diğer sucul canlıların da termal toleransı, sıcaklık stresine karşı dirençlerinin belirlenmesinde hayati bir kriterdir. Bazı çalışmalar termal toleransın oksijen tutma kapasitesini artıran mikro elementler ile artırılabilirliğini gösterirken, genel görüş oksijen tutma kapasitesinin balıklarda termal toleransı artırmadığı yönündedir (Brijs vd., 2015). Ancak, sucul canlıların artan su sıcaklığı karşısında nasıl adapte oldukları, nasıl

yaşamlarını devam ettirdikleri ve sıcaklığa karşı nasıl direndiklerini araştırmak bilim insanlarının önemle üzerinde durdukları konularında başında gelmiştir (Kumar vd., 2018). İklim değişikliğinin beraberinde gelen beklenmedik su sıcaklığı dalgalanmaları da doğal popülasyonlarda ciddi kayıplara sebep olmaktadır. Bu kayıplar, yükleme, nakliye, yemler ve esas olarak kültür koşullarında yüksek sıcaklıklara maruz kalma gibi pek çok stres faktörlerine bağlıdır (Kumar vd., 2018; Galappaththi vd., 2020). Sucul canlıların alt ve üst sıcaklık toleranslarının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem, kritik termal metodoloji (CTM) olarak bilinmektedir. Bu yöntem, ilk olarak Cowles ve Bogert (1944) tarafından ve tanımlanmış ve daha sonra Cox (1974), Spotila vd. (1979), Lutterschmidt & Hutchison (1997), Beitinger vd. (2000) gibi çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilerek balıklar ve diğer sucul hayvanlar üzerinde uygulanmıştır. CTM verileri, balıkların ekstrem sıcaklıklara toleransları hakkında kesin bilgiler vermek yerine göreceli bilgiler sunarak türler arasında karşılaştırma yapılmasını sağlar. CTMin ve CTMax verileri kullanılarak hesaplanan termal tolerans poligonu, balıkların yaşayabileceği sıcaklık aralığının genişliği hakkında bilgi verir (Bennet & Beitinger, 1997). Bu parametreler, sucul canlıların sıcaklık toleransı hakkında önemli bilgiler sağlayarak, çevresel faktörlerin sucul ekosistemler üzerindeki etkilerinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır. Balık yetiştiriciliği açısından, yemlere eklenen alternatif yem kaynakları veya iz elementlerin balık türlerinin sıcaklık toleranslarına etkileri hakkında bilgi ihtiyacı söz konusudur (Olsvik vd., 2016; Kumar vd., 2017a; Kumar vd., 2017b; Kumar vd., 2018).

Bu çalışmanın amacı, gökkuşağı alabalığı yemlerine farklı dozlarda (0, 0.2 ve 2 mg/kg) yeme ilave edilen Nano-Ag partiküllerinin büyüme ve yemden yararlanma performansı ile besin madde bileşenlerine olan etkilerini araştırmaktır. Ayrıca, deneme sonunda alabalıkların termal toleransının kritik termal tolerans (CTMax) verileri ölçülerek Nano-Ag'ün su sıcaklık değişimlerine etkisi ilk defa incelenmiş olacaktır.

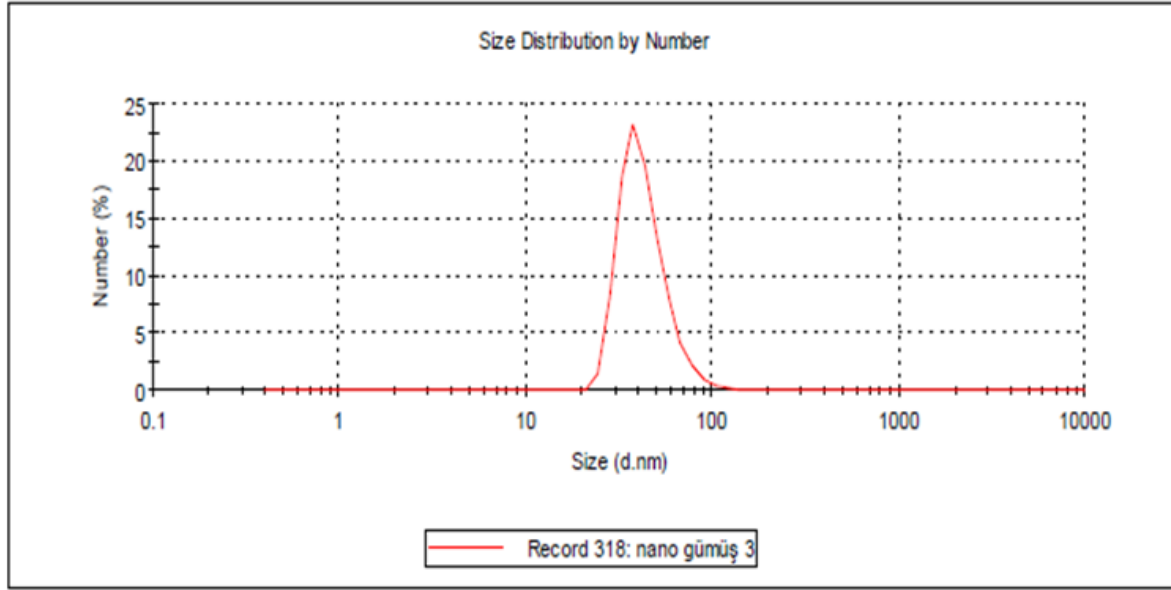
## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. Deneme materyali ve Dizaynı

Çalışma, Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Yetiştiricilik Ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Denemede kullanılan gökkuşağı alabalığı özel bir alabalık tesisinden (Kahramanmaraş) alınarak deneme ünitesine getirilmiştir. Balıklar deneme sisteminde bulunan tanklara (190 L) ve deneme koşullarına alışmaları için 2 hafta boyunca günde 2 kez doyana kadar kontrol yemi ile beslenmişler ve yaklaşık 40 g ağırlığa kadar büyütülmüşlerdir. Deneme boyunca tanklardan deşarj edilen su partikül filtrasyonuna tabi tutulmuş ve çözünmüş oksijen seviyesi 7-8 mg/L'nin altına düşmeyecek şekilde sürekli olarak bir hava motoru ile havalandırılmıştır.

Tüm deneme grupları 3 tekerrürlü olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre planlanmış ve her bir deneme tankına 30 balık stoklanmıştır. Denemede balık büyüklüklerine göre 2-3 mm'lik alabalık yemleri (Ham protein: %45, ham yağ: %20, ham selüloz: %3, su: %10, kül: %10) (Gümüşdoğa Yem A.Ş., Muğla) kullanılmıştır. Denemede 3 farklı dozda (0, 0.2 ve 2 mg/kg) Nano-Ag olacak şekilde deneme yemleri hazırlanmıştır. Nano-Ag deiyonize su ile bir sprey yardımıyla peletlerin üzerine sıkılarak kaplanmıştır. Kontrol grubu yemi ise sadece deiyonize su ile muamele edilmiştir. Tüm yemler 50 °C'de bir gece kurutulmuştur. Denemenin ilk aşamasında 2 mm daha sonra ise 3 mm'lik alabalık yemleri kullanılmıştır. Balıkların beslenmesi 60 gün boyunca günde iki kez saat 09:30 ve 16:30'da doyana kadar gerçekleştirilmiştir. Yemlemeden bir saat sonra tüketilmeyen yemler sifonlanarak sabit ağırlığa kadar 70°C'de kurutularak yem tüketimleri her tank için günlük olarak kaydedilmiştir. Deneme sonunda balıkların bireysel ağırlıkları alınmıştır. Tartım işlemlerinde balıkların strese girmelerini engellemek amacıyla 0.3 ml/L dozunda 2-phenoxyethanole (Sigma, St. Loise, MO, USA) kullanılmıştır.

Denemede kullanılan Nano-Ag, NANOEN (Antalya, Türkiye) firması tarafından üretilmiş su bazlı yapıdadır. Bileşik yüksek oranda anti-mikrobiyal etki gösteren bir çözelti olup, zararlı olarak kabul edilen hiçbir uçucu organik bileşik, peroksit çeşitli antibiyotik türevleri, triklosan, paraben, benzalkanyum klorür gibi kimyasallar da içermemektedir. Firma tarafından sağlanan Nano-Ag solüsyonuna ait partikül dağılımı (36 mm) Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. Denemede kullanılan Nano-Ag'nin partikül büyüklüğü.

Deneme başlangıcı ve sonunda tüm balıkların ağırlıkları bireysel olarak alınmıştır. Balıkların büyüme performansı, yem alımları ve vücut indeksleri ile ilgili veriler aşağıdaki formüller ile hesaplanmıştır.

$$\text{Spesifik Büyüme Oranı (SBO, \% / \text{gün})} = 100 \times [(\ln(\text{ağırlık}_{\text{final}}) - (\ln(\text{ağırlık}_{\text{başlangıç}})) / \text{gün})];$$

$$\text{Ağırlık Kazancı (\%)} = 100 \times [(\text{ağırlık}_{\text{final}} - \text{ağırlık}_{\text{başlangıç}}) / \text{ağırlık}_{\text{başlangıç}}];$$

$$\text{Günlük Ağırlık Kazancı} = (\text{ağırlık}_{\text{final}} - \text{ağırlık}_{\text{başlangıç}}) / \text{gün};$$

$$\text{Yem Çevirim Oranı (FCR)} = (\text{Verilen yem miktarı (g)} / \text{ağırlık}_{\text{kazancı}} (\text{g}));$$

$$\text{Günlük yem alımı (g/balık)} = \text{tank başına tüketilen yem} / \text{balık sayısı}$$

## 2.2. Kimyasal analizler

Deneme sonunda her tanktan 3 adet balık, toplamda her bir deneme grubu için 9 balık tüm vücut kompozisyonları belirlenmek üzere örneklenmiştir. Homojenize hale getirilen örnekler analize kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Örneklerin besin madde bileşenleri analizleri (nem, ham protein (HP), ham yağ (HY) ve ham kül (HK) standart metoda (AOAC, 1990) göre yapılmıştır.

## 2.3. CTMax Çalışması

CTMax çalışması için, 60 günlük deneme ve örneklemelerin ardından geriye kalan balıklar ait oldukları tanklara tekrar yerleştirilmiştir. Balıklar test yemleri ile bir hafta daha beslenmeye devam edilmiştir. Bu sürenin ardından CTMax ölçümleri için bir gün aç bırakıldıktan sonra her deneme tankından rastgele 3 adet balık (N=9) anestezi uygulaması yapılmadan, üç yüzeyi siyah film ile kaplı bir akvaryuma (20 x 30 x 40 cm) yerleştirilmiştir. Akvaryum deneme tanklarından alınan 15 °C'de tatlı su ile doldurulmuştur. Akvaryum üç hava taşı yardımı ile sürekli havalandırılmış ve ölçümler esnasında oksijen seviyesi ve su sıcaklığı sürekli olarak YSI (Yellow Spring Instrument Co., Yellow Spring, Ohio, Amerika) marka bir oksijen-metre ile anlık kontrol edilmiştir. Kritik Termal Metodoloji (CTM) yöntemi Cowles ve Bogert, 1944'göre gerçekleştirilmiştir. Test süresince sıcaklığın artışı Becker ve Genewoy (1979) tarafından önerildiği gibi 0,3°C/d olacak şekilde yapılmıştır. Su sıcaklığı, balığın motor aktivitesi ve koordinasyonunu yitirdiği, sonuçta denge kaybının olduğu ana kadar artırılmıştır (CTMax). Denge kaybı için, balıkların bir dakikadan fazla dorsoventral oryantasyonu sürdürememesi esas alınmıştır (Bennett & Beitinger, 1997). Her sıcaklık artış aşamasında (başlangıçta) kronometre ile süre takibi başlatılmış ve sıcak su akvaryuma homojen şekilde bir piset yardımıyla dağıtılmıştır. CTMax deneyi boyunca, balıkların sıcaklık değişimine karşı gösterdikleri hareketlilik, denge kaybı, salgı üretimi ve dışkılama gibi tepkiler dikkatlice gözlemlenerek kaydedilmiştir. Balıkların bireysel olarak kaydedilen CTMax değerlerinin aritmetik ortalaması, grupların CTM değeri olarak not edilmiştir.

## 2.4. İstatistiki analizler

Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi ile  $P < 0,05$  önem düzeyinde test edilmiştir. Deneme sonunda yemlere ilave edilen Nano-Ag ve balık ağırlıkları arasındaki iki yönlü ilişkinin kritik termal maksima (CTMax) üzerine olan etkisi general linear model ile iki yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. Önemli farkların bulunduğu durumlarda, ortalamalar Duncan (n sayıları eşit olduğu durumlarda) ya da Scheffe's (n sayıları eşit olmadığı durumlarda) çoklu karşılaştırma testleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart sapma (ort.  $\pm$ S.S.) şeklinde verilmiştir. Deneme sonunda elde edilen bütün veriler SPSS 15 (SPSS, Chicago,IL, Amerika) istatistik paket programında analiz edilmiştir.

## 3. BULGULAR

### 3.1. Çevresel Parametreler

Deneme kapalı devre bir sistemde yürütülmüş olup su kalite kriterleri gökkuşağı alabalığının optimum büyümesini sağlayacak aralıklarda tutulmuştur. Sistemde su sıcaklığı, oksijen, amonyak, nitrit ve nitrat seviyelerinde herhangi olumsuz bir değişim gerçekleşmemiştir. Deneme süresince su sıcaklığı ortalama olarak  $14,2 \pm 0,1^\circ\text{C}$  olarak kaydedilmiştir. Düzenli olarak ölçülen çözülmüş oksijen seviyesi ise deneme süresince ortalama  $10,1 \pm 0,7$  mg/L olarak tespit edilmiştir.

### 3.2. Büyüme Performansı ve Yem Alımı

Altmış günlük deneme sonunda gruplar arasındaki yaşama oranı %98-100 arasında değişmiştir ( $P > 0,05$ ). Deneme sonunda ortalama ağırlıkları gruplara göre istatistiki açıdan farklılık bulunmamış, kontrol, 0,2 ve 2 mg/kg Nano-Ag yemlerinde sırasıyla  $115,6 \pm 2,89$  (kontrol),  $118,94 \pm 5,81$  (0,2 mg/kg) ve  $112,96 \pm 5,40$  (2 mg/kg) olarak kayıt edilmiştir ( $P > 0,05$ ) (Tablo 1). Kontrol ve 0,2 mg/kg grubu bireylerinin final ağırlıkları 2 mg/kg grubu bireylerine göre sırasıyla %2,30 ve %5,98 daha fazla ortalama canlı ağırlık değerlerine ulaşmışlardır. Deneme gruplarındaki spesifik büyüme oranı %1,67-1,75 arasından değişim göstermiş ancak istatistiki bir farklılık bulunmamıştır ( $P > 0,05$ ). Deneme yemlerinin balıkların yem tüketimlerine olan etkileri de istatistiki olarak önemli düzeyde farklılık göstermemiştir ( $P > 0,05$ ). FCR verileri 0,98-1,04 arasında değişim gösterirken, her ne kadar istatistiki olarak bir farklılık çıkmamıştır (Tablo 1). Büyüme verileri de dikkate alındığında, bu yem içerisindeki en yüksek gümüş nanopartikül konsantrasyonlarının balığın gelişimine etki yaratmadığı değerlendirilmiştir.

**Tablo 1.** Altmış gün süresince deneme yemleri ile beslenen alabalıkların büyüme performans verileri ile yem alımı ve vücut indeks verileri

	Deneme Grupları		
	Kontrol	0.2 mg/kg	2 mg/kg
Başlangıç ağırlığı (g)	41,7 $\pm$ 0,43	41,4 $\pm$ 0,27	41,5 $\pm$ 0,24
Final ağırlık (g)	115,6 $\pm$ 2,89	118,9 $\pm$ 5,81	113,0 $\pm$ 5,40
Ağırlık kazancı (%)	177,2 $\pm$ 5,00	186,8 $\pm$ 12,15	172,2 $\pm$ 14,53
Günlük ağırlık kazancı (g)	1,2 $\pm$ 0,04	1,3 $\pm$ 0,09	1,2 $\pm$ 0,09
SBO (% /gün)	1,7 $\pm$ 0,03	1,8 $\pm$ 0,07	1,7 $\pm$ 0,09
FCR	1,03 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,06	1,04 $\pm$ 0,15
Yem tüketimi (g/balık)	76,2 $\pm$ 1,25	76,3 $\pm$ 2,22	74,7 $\pm$ 2,32
VSI (%)	10,6 $\pm$ 0,65	10,6 $\pm$ 0,50	10,1 $\pm$ 0,87
HSI (%)	1,00 $\pm$ 0,13	0,96 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,03
VYI (%)	2,39 $\pm$ 0,50	2,54 $\pm$ 0,33	2,84 $\pm$ 0,60

Tek yönlü varyans analizine göre gruplar arasında fark görülmemiştir ( $P > 0,05$ ).

SBO: Spesifik Büyüme Oranı

FCR: Yem Tüketim Oranı

VSI: Visero somatik indeks

HSI: Hepato somatik indeks

VYI: Visero yağ indeksi

Balıklarda hesaplanan visero somatik indeks (VSI) verileri 10,13-10,58 (%) arasında değişirken istatistiki açıdan gruplar arasında farklılık çıkmamıştır ( $P > 0,05$ ). Hepato somatik indeks (HSI) ve

visero yağ indeks (VYI) verilerinde de benzer şekilde gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

### 3.3. Tüm Vücut Besin Madde Bileşenleri

Farklı dozlarda Nano-Ag ilaveli yemler ile beslenen alabalık bireylerinde deneme sonunda elde edilen besinsel kompozisyon verileri incelendiğinde, 0, 0.2 ve 2 mg/kg gruplarında analiz edilen ham protein verileri sırasıyla %16,3, 16,1 ve 16,2 arasında değişmiş ve istatistiki olarak önemli bir farklılık gözlenmemiştir ( $P>0.05$ ). Tüm vücut lipid değerleri %11,4-12,2 arasında değişim göstermiştir ve istatistiki olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır ( $P>0.05$ ) (Tablo 2).

**Tablo 2.** Farklı dozlarda Nano-Ag ilave edilmiş yemlerle beslenen alabalıkların tüm vücut besin kompozisyonu seviyeleri

	Nano-Ag seviyeleri		
	Kontrol	0.2 mg/kg	2 mg/kg
Ham protein	16,3±0,29	16,1±0,42	16,2±0,81
Lipit	12,2±1,09	11,4±1,25	12,0±0,26
Kuru Madde	28,2±4,15	28,0±4,24	28,3±3,43
Kül	2,6±0,50	2,8±0,70	3,5±0,56

\*Tek yönlü varyans analizine göre gruplar arasında fark görülmemiştir ( $P>0.05$ ).

### 3.4. Kritik Termal Maksima (CTmax)

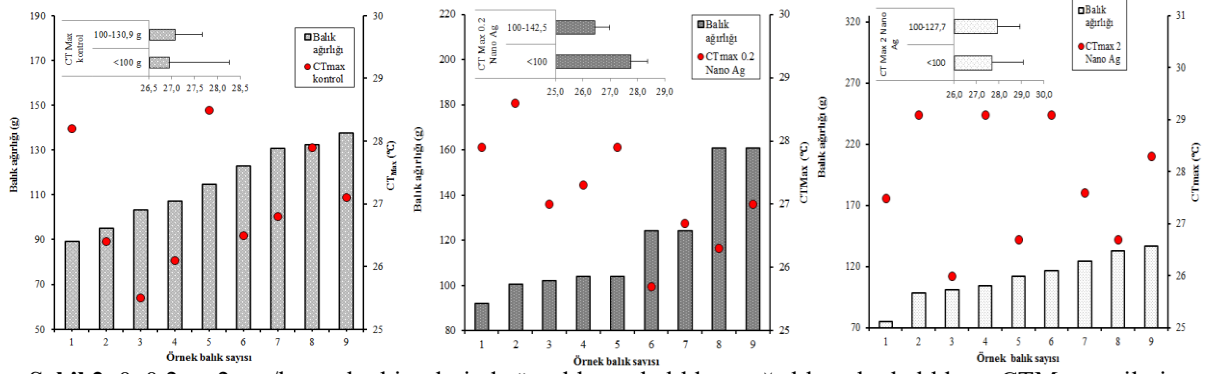
Deneme sonunda gerçekleştirilen kritik termal maksima (CTMax) denemesinde yemlere ilave edilen Nano-Ag'nin önemli düzeyde istatistiki bir etkisinin olmadığı gözlenmesine karşın, yüksek Nano-Ag'nin termal toleransı kısmen de olsa rakamsal olarak arttırdığı gözlenmiştir. Tablo 3'te görüleceği gibi kontrol, 0.2 mg/kg ve 2 mg/kg grubu bireylerinin ortalama CTMax değerleri 27.0°C, 27.2°C ve 27.8°C. Tek yönlü varyans analizine göre gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

**Tablo 3.** Deneme sonunda ölçülen Kritik termal maksima (CTMax, °C) değerleri

	Nano-Ag seviyeleri		
	Kontrol	0.2 mg/kg	2 mg/kg
CTMax (°C)	27,0±0,85	27,2 ±0,70	27,8 ±0,25

\*Tek yönlü varyans analizine göre gruplar arasında fark görülmemiştir ( $P>0.05$ ).

Deneme sonunda CTMax ölçümleri için Nano-Ag ve balık büyüklüğünün bir etkisinin olup olmadığı iki yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. Buna göre, balık ağırlığı ve Nano-Ag'nin CTMax üzerine bir etkisi bulunmamıştır ( $P>0.05$ ). Ancak, bireysel veriler detaylı şekilde incelendiğinde Nano-Ag'nin termal tolerans üzerine bir etkisinin olabileceği ortaya çıkmıştır. Detaylandırmak gerekirse, tüm grupların ortalama CTMax değeri 27.3°C'dir ve kontrol grubu ve 0.2 mg/kg gruplarında örneklenen sadece 4 balık bu ortalamanın üzerinde bir CTMax değeri gösterirken, 2 mg/kg grubunda 6 balık ortalama CTMax değeri 27.3°C'nin üzerinde bir değer göstermiştir. Bu veriler doğrultusunda, her bir gruptan örneklenen toplam 9 balığın ortalama ağırlıkları <100 g altı ve >100 g şeklinde gruplandırıldığında, balıkların CTMax değeri yatay bir bar grafik üzerinde gösterilmiştir. Şekil 2'de verilen yatay bar grafikte görüleceği gibi kontrol grubundan örneklenen ve ortalama ağırlıkları <100 g altı balıkların CTMax değerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubunda örneklenen bu küçük balıkların (<100 g) sıcaklık toleransının 100-142,5 g'lık balıklara göre daha düşük olduğu belirlenmiştir.



Şekil 2. 0, 0.2 ve 2 mg/kg grubu bireylerinde örneklenen balıkların ağırlık ve bu balıkların CTMax verileri arasındaki ilişki.

#### 4. TARTIŞMA

Deneme sonunda elde edilen büyüme performans verileri değerlendirildiğinde, yemlere ilave edilen farklı dozlardaki Nano-Ag'nin gökkuşağı alabalıklarında ağırlık kazancı, spesifik büyüme oranına üzerine bir etkisi bulunmamıştır. Benzer şekilde, Galvez vd. (2001) 0.05 µg/g (kontrol yemi) ve 3,1 µg/g (deneme yemi) gümüş içeren yemlerle 128 gün beslenen gökkuşağı alabalıklarında büyüme performansı ve yem alımında belirgin bir etkinin olmadığını bildirmişlerdir. Paralel olarak, 1 mg/kg dozunda Nano-Ag ilave yemlerle 60 gün boyunca beslenen Nil tilapialarında büyüme ve yemden yararlanma bakımından herhangi bir fark tespit edilmemiştir (Aly vd., 2023). Çalışmamızda deneme süresince akut bir balık ölüm vakası gerçekleşmemiştir. Bu veri bize yemlere ilave edilen Nano-Ag dozlarının toksik bir etki yaratmadığını göstermektedir. Diğer taraftan, zebra balığı ile yapılan çalışmada farklı konsantrasyonları (5, 10, 25, 50 ve 100 uygulanan µg/ml) Nano-Ag'nin embriyonik gelişimde toksik etkisinin olduğuna dair bulgular bazı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Asharani vd., 2008). Benzer şekilde, Yeo ve Kang (2008) Nano-Ag'ye maruz kalan zebra balıklarında embriyo gelişiminde yaşanan problemlerden dolayı yumurtaların açılma oranının düştüğünü tespit etmişlerdir. Farklı türlerde yapılan toksisite çalışmalarda kullanılan metal iyonları ve benzeri sentetik (veya organik) partiküllerin yüksek doz seviyeleri toksik etki yarattığı bildirilmektedir (Asharani vd., 2008). FCR 0,98 ile 1,04 arasında değişirken, balık başına düşen yem tüketimi deneme süresince ortalama 74-76 gr/balık olacak şekilde değişim göstermiştir. Galvez vd. (2001) gökkuşağı alabalıklarının yemlerine ilave edilen gümüşün FCR'ı istatistiki olarak etkilemediğini ve balıkların iştahının yemlerden kaynaklı bir olumsuzluğa neden olmadığını vurgulamışlardır. Deneme sonunda alınan karaciğer ve içorgan indeks verileri incelendiğinde, Nano-Ag'nin bu veriler üzerine de bir etkisinin olmadığı bulunmuştur. Ancak, yemde artan Nano-Ag ile iç organlarda yağlanmanın kısmende olsa arttığı (%2,5) gözlenmiştir. He vd. (2017) bir mikroalg türü olan *Scenedesmus obliquus*'un gelişimi ve lipid depolamasına yönelik yaptıkları çalışmada demir oksit (Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ve magnezyum oksit (MgO) nanopartiküllerin lipojenik aktiviteyi artırdığını bulmuşlardır. Laboratuvar farelerinde yaptıkları çalışmada, Yue vd. (2019) Nano-Ag'nin obeziteyi artırdığını ve 2 mg/kg Nano-Ag'nin intraperitoneal kasa enjeksiyonu sonucunda lipid birikiminin önemli düzeyde arttığını bulmuşlardır. Aynı araştırmacılar, bunun sebebinin aşırı Nano-Ag'nin reaktif oksijen türü (ROS) seviyelerini artırarak mitokondriyal işlevleri bozduğunu, böylece adipöz doku oluşumunda ve tüm vücut enerji dengesini etkilediğini ileri sürmüşlerdir. Selenyum (Se)'un Ag üzerinde yüksek bir afinitesi olduğu, bu iki elementin toksik etkilerinin birbirlerini etkileyebileceği rapor edilmektedir (Lall, 2022). Nano-Ag'nin tüm vücut protein ve lipid içeriklerine istatistiki bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Balıklarda tüm vücut yapısının önemli bileşenleri olan protein ve lipid içerikleri sırasıyla %16,1-%16,3 ve %11,4-%12,2'dir. Yukarıdaki bölümlerde de ele alındığı gibi yemlere ilave edilen Nano-Ag'nin tüm vücut protein miktarına bir etkisinin olmadığı söylenebilir. Ancak, Nano-Ag özellikle bakterilerin protein hücre membranlarına Ag<sup>+</sup> formunda tutunduğu ve bakterinin hücre yapısının bozulmasına ve sonuçta ölümüne yol açtığı bildirilmiştir (Lara vd., 2010; Huang vd., 2011). Ancak, bu konularda denememizde kullanılan oranlarda veya daha yüksek oranlarda Nano-Ag kullanımının protein birikimine etkisi üzerine daha fazla çalışmanın yapılması gerektiği görülmektedir.

Çalışmanın ikinci ve önemli amacı olan Nano-Ag'nin gökkuşağı alabalıklarının kritik termal maksima değerine CTMax olan etkisidir. Her ne kadar tek yönlü varyans analizi Nano-Ag'nin CTMax üzerine istatistiksel bir etkisi görünmese de artan Nano-Ag'nin CTMax değerlerini kısmen de (%3) olsa artırdığı gözlenmiştir. Özellikle sucul canlıların ölümcül su sıcaklığı koşullarında antioksidan enzimlerin devreye girmesiyle, vücuttaki serbest radikaller ile protein ve karbonhidratları metabolize eden enzimler artar (Kumar vd., 2017c). Bu durumda canlıların oksijen ihtiyacı artacaktır. Nano-Ag canlıların vücut içerisindeki mevcut kullanılabilir oksijeninin taşıyıcısı rolü oynamaktadır (Kumar vd., 2018). Su sıcaklığının arttığı sub-optimal koşullarda Nano-Ag'nin bu yeteneğini kullanarak serbest oksijeni vücutta ihtiyaç duyulan bölgeye taşıması ve böylece serbest radikallerin seviyesini azaltması beklenebilir. Çalışmamızda, Nano-Ag 2 mg/kg grubu bireyleri 27.8°C kadar yükseltilebilir su sıcaklığına kadar dayanabilmişlerdir. Deneme sonunda örneklenen balıkların ortalama ağırlıkları aynı olmasına karşın, CTMax çalışmasında örneklenen balıkların ağırlıkları ve bu balıkların CTMax verileri incelendiğinde, Nano-Ag 2 mg/kg grubunda örneklenen balıkların (N=9) 6 adedinin CTMax'ın 27.6°C'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Aynı değerlendirme kontrol grubu bireylerinde yapıldığında sadece 4 balığın 27.0°C'ın üzerinde bir CTMax gösterdiği gözlenmiştir. Ancak, bunun üzerine yapılan iki yönlü varyans analizi ile örneklenen balık büyüklüğü ile CTMax bir ilişkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bilindiği üzere, balıklarda ısı değişimi vücut boyutu ve ağırlığı ile ilişkilidir (Elliott, 1981). Yani balık büyüklüğü ile CTMax arasındaki ilişki, küçük balıkların balık yüzey alanına oranında büyük balıklara göre daha yüksek olduğu bu yüzden de büyük balıklara göre su sıcaklığından daha fazla etkilendiği bildirilmiştir (Recsetar vd., 2012). Bazı yetiştiricilik bölgelerinde gökkuşağı alabalığı yaz periyodunda geçici sürelerde yüksek (>26-27°C) su sıcaklıklarına maruz kalabilirken (Ineno vd., 2020), bu türün termal toleransının 24°C olduğu bildirilmiştir (Ineno vd., 2005). Yukarıda belirtilen çalışmalarda CTMax üzerine alınan farklı sonuçlar denemelerin fotoperiyotları (Elliott, 1981; Healy & Schulte, 2012; Ineno vd., 2020) veya balık büyüklükleri ve türlerine göre değişiklik göstermektedir (Ineno vd., 2019; Ineno vd., 2020). Diğer taraftan, canlıların sıcaklık toleransı yemlere eklenen katkı maddeleriyle de artırılabilir (Tejpal vd., 2014; Kumar vd., 2014; 2017). Kumar vd. (2018) 0,5 mg/kg Nano-Ag'nin tropik bir tür olan *Channa striatus* CTMax toleransını artırdığını gözlemlemişlerdir. Bu tez çalışmasında Nano-Ag ve CTMax arasındaki ilişkiyi gökkuşağı alabalıklarında ilk defa ortaya koymuştur. Ancak, ilerleyen dönemlerde özellikle farklı dozlarda Nano-Ag, Se (mineral, organik ve nano formlarının) ve farklı boyutlarda gökkuşağı alabalıklarının CTMax verisi üzerine araştırmaların yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır.

## 5. SONUÇ

Sonuç olarak, büyüme verileri dikkate alınmadan eğer balıkların sıcaklık toleransını artırılması isteniyorsa, >40 g gökkuşağı alabalığında özellikle yaz mevsimlerinde ve su geçişlerinin olduğu dönemlerde Nano-Ag içeren yemlerin kullanılması önerilebilir. Ancak, bu konuda daha fazla örnek sayısı ile daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Nano-Ag'nin toksik olmayan daha yüksek dozlarında gökkuşağı alabalık yemlerinde kullanılması ve balıkların gelişim, lipid birikimleri ve beslenme masrafı ile ilgili moleküler düzeyde analizlerin gerçekleştirilmesi Nano-Ag'nin etkisini daha net ortaya çıkartacaktır.

## TEŞEKKÜR

Yazarlar, denemede kullanılan yemin teminini tarafımıza ücretsiz yapan Gümüşdoğa Yem Firmasına (Muğla) ve Gümüş Nanopartikülü ücretsiz şekilde gönderen Antalya NANOEN A.Ş'ne (Antalya, Türkiye) teşekkür etmektedir.

## FİNANS KAYNAĞI

Bu çalışma yüksek lisans tezinden üretilmiş ve FYL-2020-12538 proje numarası ile Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

## ÇIKARÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar, bu çalışmayı etkileyebilecek finansal çıkarlar veya kişisel ilişkiler olmadığını beyan etmektedir.



## YAZAR KATKILARI

Çalışma kurgusu ve Metodoloji: OTE, HS; Materyal temini: OTE, EA, HS; Deneyin gerçekleştirilmesi: ÖU, EE, SNINI; Veri analizi: ÖU, EE, HS, HAY, OTE; Makale yazımı: OTE, HS, HAY, ÖU; Denetleme: OTE. Tüm yazarlar nihai taslağı onaylamıştır.

## ETİK ONAY BEYANI

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin (SABİDAM) 07.10 2022 tarihli, 7 nolu toplantısındaki onayı doğrultusunda yürütülmüştür.

## VERİ KULLANILABİLİRLİK BEYANI

Bu çalışmada kullanılan veriler makul talep üzerine ilgili yazardan temin edilebilir.

## KAYNAKLAR

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists, & Association of Official Agricultural Chemists) (US). (1925). Official methods of analysis.
- Al-Sagheer, A. A., Mahmoud, H. K., Reda, F. M., Mahgoub, S. A., & Ayyat, M. S. (2018). Supplementation of diets for *Oreochromis niloticus* with essential oil extracts from lemongrass (*Cymbopogon citratus*) and geranium (*Pelargonium graveolens*) and effects on growth, intestinal microbiota, antioxidant and immune activities. *Aquaculture nutrition*, 24(3), 1006-1014. <https://doi.org/10.1111/anu.12637>
- Aly, S.M., Eissa, A.E., Abdel-Razek, N., El-Ramlawy, A.O., 2023. The antibacterial activity and immunomodulatory effect of naturally synthesized chitosan and silver nanoparticles against *Pseudomonas fluorescens* infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): An in vivo study. *Fish & Shellfish Immunology*, 135, 108628. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2023.108628>
- Asharani, P. V., Wu, Y. L., Gong, Z., & Valiyaveetil, S. (2008). Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology*, 19(25), 255102. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/19/25/255102>
- Austin, B., Lawrence A.L., Can, E., Carboni, C., Crockett, J., Demirtaş Erol, N., Dias Schleder, D., Jatobá, A., Kayış, Ş., Karacalar, U., Kizak, V., Kop, A., Thompson, K., Mendez Ruiz, C. A., Serdar, O., Seyhaneyildiz Can, S., Watts, S. & Yücel Gier, G. (2022). Selected topics insustainable aquaculture research: Current and future focus. *Sustainable Aquatic Research*, 1(2), 74-122. <https://doi.org/10.5281/zenodo.7032804>
- Beitinger, T.L., Bennett, W.A. & McCauley, R.W. (2000). Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental biology of fishes*, 58(3), 237- 275. <https://doi.org/10.1023/A:1007676325825>
- Bennett, W.A. & Beitinger, T.L. (1997). Temperature Tolerance of the Sheepshead Minnow, *Cyprinodon variegatus*. *Copeia*, 77-87. <https://doi.org/10.2307/1447842>
- Cottrell, R. S., Blanchard, J. L., Halpern, B. S., Metian, M., & Froehlich, H. E. (2020). Global adoption of novel aquaculture feeds could substantially reduce forage fish demand by 2030. *Nature Food*, 1(5), 301-308. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0078-x>
- Cowles, R.B. & Bogert, C.M. (1944). A preliminary study of the thermal requirements a desert reptiles. *Iguana*, 83, 265-296.
- Cox, D.K. (1974). Effects of three heating rates on the critical thermal maximum of bluegill. *Thermal ecology*, 158-163.
- Elliott, J. M. (1981). Some aspects of thermal stress on fresh-water teleosts. *Stress and fish.*, 209-245.
- Fajardo, C., Martinez-Rodriguez, G., Blasco, J., Mancera, J.M., Thomas, B. & De Donato, M. (2022). Nanotechnology in aquaculture: Applications, perspectives and regulatory challenges. *Aquaculture and Fisheries*, 7(2), 185-200. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.12.006>
- FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture (p. 200). Rome, Italy
- Galvez, F., Hogstrand, C., McGeer, J. C., & Wood, C. M. (2001). The physiological effects of a biologically incorporated silver diet on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology*, 55(1-2), 95-112. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00155-2)
- Halves, J. E., (2002). *The vitamins. Fish Nutrition*. Academic press.

- He, M., Yan, Y., Pei, F., Wu, M., Gebreluel, T., Zou, S., & Wang, C. (2017). Improvement on lipid production by *Scenedesmus obliquus* triggered by low dose exposure to nanoparticles. *Scientific reports*, 7(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15667-0>
- Healy, T. M., & Schulte, P. M. (2012). Thermal acclimation is not necessary to maintain a wide thermal breadth of aerobic scope in the common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 85(2), 107-119. <https://doi.org/10.1086/664584>
- Huang, C. M., Chen, C. H., Pornpattananankul, D., Zhang, L., Chan, M., Hsieh, M. F., & Zhang, L. (2011). Eradication of drug resistant *Staphylococcus aureus* by liposomal oleic acids. *Biomaterials*, 32(1), 214-221. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.076>
- Ineno, T., Tsuchida, S., Kanda, M., & Watabe, S. (2005). Thermal tolerance of a rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* strain selected by high-temperature breeding. *Fisheries Science*, 71(4), 767-775. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2005.01026.x>
- Ineno, T., Yamada, K., Tamaki, K., Kodama, R., Tan, E., Kinoshita, S., & Watabe, S. (2020). Determination of thermal tolerance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* based on effective time, and its reproducibility for a large number of fish. *Fisheries science*, 86(5), 767-774. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01447-9>
- Kumar, N., Krishnani, K. K., Gupta, S. K., & Singh, N. P. (2017a). Selenium nanoparticles enhanced thermal tolerance and maintain cellular stress protection of *Pangasius hypophthalmus* reared under lead and high temperature. *Respiratory physiology & neurobiology*, 246, 107-116.
- Kumar, N., Krishnani, K. K., Gupta, S. K., & Singh, N. P. (2017b). Cellular stress and histopathological tools used as biomarkers in *Oreochromis mossambicus* for assessing metal contamination. *Environmental toxicology and pharmacology*, 49, 137-147.
- Kumar, N., Krishnani, K. K., Kumar, P., & Singh, N. P. (2017c). Zinc nanoparticles potentiates thermal tolerance and cellular stress protection of *Pangasius hypophthalmus* reared under multiple stressors. *Journal of Thermal Biology*, 70, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.10.003>
- Kumar, N., Krishnani, K. K., Chandan, N. K., & Singh, N. P. (2018). Dietary zinc potentiates thermal tolerance and cellular stress protection of *Pangasius hypophthalmus* reared under lead and thermal stress. *Aquaculture Research*, 49(2), 1105-1115.
- Kumar, N., Krishnani, K. K., Kumar, P., Sharma, R., Baitha, R., Singh, D. K., & Singh, N. P. (2018). Dietary nano-silver: Does support or discourage thermal tolerance and biochemical status in air-breathing fish reared under multiple stressors? *Journal of thermal biology*, 77, 111-121. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.011>
- Lall, S. P. (2002). The minerals. In Halver, J. E., Hardy, R.W. (Eds.) *Fish Nutrition*, 3rd edition (pp. 259–308). Academic Press San Diego.
- Lutterschmidt, W.I. & Hutchison, V.H. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Canadian Journal of Zoology*, 75(10), 1561-1574. <https://doi.org/10.1139/z97-783>
- Márquez, J.C.M., Partida, A.H., del Carmen, M., Dosta, M., Mejía, J.C. & Martínez, J.A.B., 2018. Silver nanoparticles applications (AgNPS) in aquaculture. *International Journal of Fisheries Aquatic Studies*, 6, 5-11.
- Merrifield, D.L., Shaw, B.J., Harper, G.M., Saoud, I.P., Davies, S.J., Handy, R.D. & Henry, T.B., 2013. Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 174, 157-163. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.11.017>
- Nasr-Eldahan, S., Nabil-Adam, A., Shreadah, M.A., Maher, A.M. & El-Sayed Ali, T., 2021. A review article on nanotechnology in aquaculture sustainability as a novel tool in fish disease control. *Aquaculture International*, 29, 1459-1480. <https://doi.org/10.1007/s10499-021-00677-7>
- Nia, Jafar Rahman, 2009. Using of Nanosilver in Poultry, Livestock and Aquatics Industry: Google Patents.
- NRC, N.R.C., 2011. Nutrient requirements of fish and shrimp. National academies press.
- Ogunfowora, L.A., Iwuozor, K.O., Ighalo, J.O. & Igwegbe, C.A., 2021. Trends in the treatment of aquaculture effluents using nanotechnology. *Cleaner Materials*, 2, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.clema.2021.100024>
- Olsvik P. A., Søfteland L., Hevrøy E. M., Rasinger J. D. & Waagbø, R. (2016). Fish pre-acclimation

- temperature only modestly affects cadmium toxicity in Atlantic salmon hepatocytes. *Journal of Thermal Biology*, 57, 21-34. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.02.003>. Epub 2016 Feb 27. PMID: 27033036.
- Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. D. C., & Rodríguez Padilla, C. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 615-621. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>
- Recsetar, M. S., Zeigler, M. P., Ward, D. L., Bonar, S. A., & Caldwell, C. A. (2012). Relationship between fish size and upper thermal tolerance. *Transactions of the American Fisheries Society*, 141(6), 1433-1438. <https://doi.org/10.1080/00028487.2012.694830>
- Shah, B. R., & Mraz, J. (2020). Advances in nanotechnology for sustainable aquaculture and fisheries. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 925-942.
- Spotila, J.R., Terpin, K.M., Koons, R.R. & Bonati, R.L. (1979). Temperature requirements of fishes from eastern Lake Erie and the upper Niagara River: a review of the literature. *Environmental Biology of Fishes*, 4(3), 281-307. <https://doi.org/10.1007/BF00005485>
- Tafalla, C., Bøgwald, J. & Dalmo, R. A. (2013). Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives. *Fish & Shellfish Immunology*, 35(6), 1740-1750. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.02.029>
- Vinay, T. N., Ray, A. K., Avunje, S., Thangaraj, S. K., Krishnappa, H., Viswanathan, B., & Patil, P. K. (2019). *Vibrio harveyi* biofilm as immunostimulant candidate for high-health pacific white shrimp, *Penaeus vannamei* farming. *Fish & shellfish immunology*, 95, 498-505.
- Yeo, M. K., & Kang, M. S. (2008). Effects of nanometer sized silver materials on biological toxicity during zebrafish embryogenesis. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(6), 1179-1184. <https://doi.org/10.5012/bkcs.2008.29.6.1179>
- Yue, L., Zhao, W., Wang, D., Meng, M., Zheng, Y., Li, Y., Qui., J., Yu, J., Yan Y., Sun, Y., Fu J., Wang, J., Zhang Q., Xu L., Ma, X. (2019). Silver nanoparticles inhibit beige fat function and promote adiposity. *Molecular metabolism*, 22, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.01.005>
-