تاثیر مکمل غذایی اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) بر سیستم ایمنی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی کوی(*Cyprinus carpio carpio*)

فاطمه انصاری فرد[۱]، هومن رجبی اسلامی[۱*]، مهدی شمسایی مهرجان[۱]، مهدی سلطانی[۲]

[*] houman.rajabi@yahoo.com

۱ - گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران.
۲- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹٦

چکیده

این مطالعه اثر جیره غذایی حاوی سطوح ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ درصد جلبک اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) بر روی برخی از پارامترهای خونی و ایمنی ماهی کوی (*Cyprinus carpio*) را ارزیابی نموده است. این طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمارو سه تکرار برای ۸ هفته انجام شد. در پایان آزمایش، پارامترهای خونی و ایمنی ماهی اندازه‌گیری و تحلیل آماری شدند. نتایج نشان داد که افزودن اسپیرولینا به جیره غذایی باعث افزایش درصد هماتوکریت و غلظت هموگلوبین، تعداد گلبول سفید و گلبول‌های قرمز ماهی می گردد. به علاوه یک افزایش معنی‌دار در سطح برخی پارامترهای ایمنی لیزوزیم، ایمنوگلبوین Igm و عامل کمپلمانC_4 در ماهی تغذیه شده با۱۰ درصد اسپیرولینا مشاهده شد ($p<۰/۰۵$) .این نتایج نشان می دهند که گنجاندن ۱۰ درصد اسپیرولینا در جیره غذایی اثرات مثبت قابل توجهی در تحریک سیستم ایمنی ماهی کوی دارد.

کلمات کلیدی: ماهی کوی، اسپیرولینا، سیستم ایمنی، *Arthrospira platensis*

* نویسنده مسئول

مقدمه

ماهی کوی به نام علمی*Cyprinus carpio carpio* می باشد و از خانواده کپور ماهیان محسوب می گردد. این ماهی نام های انگلیسی مختلفی دارد. دارای ۲۲ زیرگونه (نژاد) می باشند و همچنین زیبا و رنگارنگ از: سفید، قرمز، سیاه، زرد و غیره در زیستگاه‌های طبیعی آب شیرین زندگی می‌کنند. این ماهیان نیاز به مراقبت زیاد ندارد. اندازه این ماهی تا ۱۳۰ سانتی متر می‌رسد. اسیدیته آب برای این ماهیان ۷ میلی‌گرم در لیتر و سختی آب بین۱۵-۱۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. دمای مورد نیاز برای ماهی کوی بین ۲۵-۳ درجه سلسیوس است که البته تحمل دامنه دمایی ۳۵-۰ درجه سانتی‌گراد را دارند (Sun *et al*., 2010). از آنجایی که بخش عمده‌ای از هزینه‌های یک واحد پرورشی را تأمین خوراک به خود اختصاص می‌دهد، بنابراین برای دستیابی به تولید بیشتر در یک واحد پرورشی لازم است که توجه بیشتری به این موضوع گردد (Tokur *et al*., 2006). رژیم‌های غذایی مبتنی بر پودر ماهی معمولاً موجب رشد مطلوب می شوند. افزایش قیمت پودر ماهی و کمیاب شدن آن موجب شده است که مطالعه در زمینه منابع پروتئین جایگزین اهمیت پیدا کند (Nandeesha *et al*., 2001). در حال حاضر تولید آبزیان زینتی در ایران از جمله کارهای زود بازده می باشد. انتخاب مواد اولیه مناسب به منظور تأثیرات مثبت آن‌ها بر روی رشد، سلامت آبزی، کیفیت آب، سمیت‌زدایی از مواد سمی موجود و کنترل کیفیت محصول تولیدی امری ضروری می‌باشد. از جمله مواد اولیه حائز اهمیت می‌تواند به جلبک‌ها، میکروجلبک‌ها و ماکروجلبک‌ها و انواع مکمل‌های غذایی که دارای تأثیر مثبت بر روی شاخص‌های رشد، متابولیسم، توان حیاتی، فعالیت کبدی و روده‌ای و معده‌ای، مقاومت نسبت به انواع بیماری‌ها می‌باشند، اشاره نمود. در این میان جلبک اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) می‌تواند به عنوان مکمل نسبی یا جایگزین کامل پروتئین‌ها در غذای آبزیان به کار برده شود (Volkman *et al*., 2008). جلبک سبز آبی اسپیرولینا به دلیل قابلیت تحریک سیستم ایمنی به عنوان مکمل غذایی انسانی، بیش از ۱۰ سال است که تولید تجاری خود را پشت سر گذاشته است. ترکیب شیمیایی اسپیرولینا نشان می دهد که می توان از این سیانوباکتر به عنوان غذای مناسب غنی از پروتئین برای آبزیان استفاده نمود.

هدف از انجام این تحقیق: تأثیر مکمل غذایی، اسپیرولینا بر روی برخی فاکتورهای سلولی خون، ایمنی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی کوی می‌باشد. تحقیقات مشابه با این مطالعه در جهان انجام گرفته است که از جمله به موارد زیر می توان اشاره نمود:

Kim و همکاران در سال ۲۰۱۳ در تحقیقی که بر روی اثرات حمایتی جلبک اسپیرولینا در طوطی ماهی (*Oplegnathus fasciatus*) انجام دادند، نشان دادند که افزودن جلبک اسپیرولینا در جیره این ماهیان باعث افزایش میزان هماتوکریت در آن‌ها مطالعه شد. آن‌ها بیان نمودند که افزایش مقادیر پارامترهای ذکر شده می‌تواند ناشی از اثرات این جلبک و ترکیبات موجود در آن بر مراکز خون‌ساز بدن و بافت هماتوپویتیک بوده و باعث افزایش تولید هموگلوبین وگلبول‌های قرمز خون و متعاقباً افزایش هماتوکریت گردد. Promya و همکاران در سال ۲۰۱۱ بر روی رشد، کیفیت گوشت و قابلیت تحریک کنندگی سیستم ایمنی (فاکتورهای خونی گلبول سفید و قرمز) گربه ماهی انگشت قدکه از مکمل اسپیرولینا در غذایشان استفاده کرده بودند مطالعه نمودند که نشان دادند گروهی از ماهیان که ۵ درصد اسپیرولینا دریافت کردند در مقایسه با گروهی که ۳ درصد اسپیرولینا دریافت کردند تعداد گلبول قرمز بیشتری دارد. Tawwab-Abdel و همکاران ۲۰۰۸ تأثیر اسپیرولینا را به عنوان یک محرک رشد و ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد مطالعه قرار دادند و در تحقیقات خود به این نتیجه دست یافتند که جیره‌ای که حاوی ۲/۵-۱۰ درصد اسپیرولینا است سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید در این ماهی در محدوده $۳/۳۱۳\times۱۰^{۵}$ سلول در میکرولیتر خواهد شد. آن‌ها همچنین بیان کردند بیشترین درصد میزان افزایش تعداد گلبول‌های سفید در گروهی از ماهیانی که ۱۰ اسپیرولینا به جیره‌ی آن‌ها افزوده شده بود قابل مشاهده است. همچنین به این نتیجه رسیدند که که مصرف اسپیرولینا باعث افزایش میزان آلبومین و پروتئین تام و گلبولین ها می شود.

مواد و روش ها

این تحقیق به مدت۶۰ روز در پاییز ۱۳۹۴ در شهرستان ورامین انجام شد، از وان های فایبرگلس به حجم آبگیری ۱۷۰ لیتری به تعداد ۱۵ عدد استفاده گردید. تعداد ۲۵۰ عدد ماهی از یکی از مراکز فروش ماهی‌های زینتی در شهر ورامین خریداری شد، سپس تعداد ۱۰ عدد ماهی با وزن حدود ۳۰ گرم پس از سازش در هر وان منتقل شد. آب وان ها به صورت روزانه تعویض می‌شدند. جهت تغذیه، ابتدا بچه ماهیان با جیره‌های پایه به منظور سازگاری تغذیه شدند و پس از گذشت یک هفته جیره‌های آزمایشی جایگزین غذای پایه شدند. سپس بچه ماهیان به مدت ۶۰ روز با جیره پایه و جیره های آزمایشی تغذیه می‌شوند. ماهیان روزانه سه بار، با غذای آماده شده به میزان ۳٪ وزن بدن تغذیه شدند(چله مال دزفول نژاد و همکاران، ۱۳۹۱). برای تهیه خوراک با درصد های مختلف اسپیرولینا، این جلبک از شرکت سیناریز قشم و خوراک مخصوص ماهی کپور (شرکت کیمیاگران) تهیه گردیدند. در مورد هر تیمار، با اضافه نمودن آب مقطر به صورت خمیر درآورده شد سپس پودر جلبک (اسپیرولینا) به مقدار ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گرم جلبک در هر کیلو گرم خوراک اضافه و با خمیر مخلوط گشت و در دستگاه مخلوط‌کن الکتریکی بصورت کاملا همگن در آورده شد سپس این خوراک با استفاده از چرخ گوشت بصورت پلت‌هایی با اندازه مناسب درآورده گردید، بعد از ۱ ساعت قرار دادن در هود ۴۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف به فریزر ۴۰ درجه سانتیگراد منقل شد. (چله مال دزفول نژاد،۱۳۹۱). ماهی ها در پنج تیمار(شامل تیمار شاهد و تیمارهای حاوی اسپیرولینا ۲/۵، ۵، ۷/۵ و۱۰ درصد) و هر تیمار با سه تکرار آماده شدند. نمونه برداری و خونگیری بعد از۶۰ روز از شروع پرورش به منظور بررسی برخی شاخص‌های ایمنوفیزیولوژیک انجام شد. بدین منظور از پودر گل میخک به میزان ۰/۲ گرم در لیتر آب به عنوان ماده بیهوشی استفاده گردید، از شریان دمی قسمت انتهای باله مخرجی خون گیری انجام شد(Alishahi *et al*., 2010). از نمونه های خون به دست آمده مقدار ۱ سی سی در لوله‌های سرولوژی فاقد ماده ضد انعقاد برای جداسازی سرم و ۱ سی سی در ظروف حاوی ماده ضد انعقاد هپارین تقسیم گردید. سپس با استفاده از سانتریفوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سرم جدا و با سمپلر در لوله‌های کوچک تخلیه و در مجاورت یخ به آزمایشگاه انتقال و در شرایط فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (چله مال دزفول نژاد و همکاران، ۱۳۹۱). فاکتور های خونی، از جمله WBC، RBC، هموگلوبین و hematocryte (HCT) بر اساس روش‌های Ameri Mahabadi (2008)، Klontz (1972) و Housteon (1990) اندازه‌گیری شدند.

پارامترهای ایمنی، از جمله C_4 بر اساس روش ارائه شده توسط (Feldman *et al*., 2000) انجام شد. ایمنو گلوبولین (IGM) بر اساس Pannall و Silva (1984)، و لیزوزیم بر اساس (Sahoo and Saurabh, 2008) اندازه-گیری شد. روش‌های سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی خون به روش توصیه شده Johnson و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شد. گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، کلسترول به روش کلسترول اکسیداز، تری گلیسرید به روش آنزیمی لیپاز، اسید اوریک به روش رنگ‌سنجی اوره‌آز، کراتینین به روش رنگ سنجی ژافه، پروتئین تام به روش بیوره، بیلی-روبین به روش دیازو و آلبومین به روش بروموکرزول سبز اندازه‌گیری خواهد گردید برای تعیین توزیع نرمال داده‌ها از آزمون کولموگراف ـ اسمیرنوف استفاده گردید سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و وجود یا نبود اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین گردید. برای انجام محاسبات فوق از نرم‌افزار آماری SPSS18 و EXCEL استفاده گردید(Zar,1999).

نتایج

با توجه به جدول ۱ بالاترین درصد هماتوکریت ماهی در هنگام استفاده از جیره ۱۰٪ اسپیرولینا به دست آمد این تیمار تفاوت معنی داری با سایر تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p<۰/۰۵$). در خصوص میزان هموگلوبین تعداد گلبول های سفید و قرمز نیز نتایج مشابهی مشاهده شد با این تفاوت که اختلاف معنی داری بین تیمار ۷/۵ درصد اسپیرولینا و ۱۰ درصد اسپیرولینا مشاهده نشد ولی این

دو تیمار با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری نشان دادند (p<۰/۰۵). نتایج شمارش گلبول‌های سفید ماهی کوی پس از استفاده از جلبک اسپیرولینا در جیره، در جدول ۲/۵ نشان داده شده است. طبق نتایج به دست آمده بیشترین میزان لنفوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۷/۵ درصد اسپیرولینا مشاهده شد. بالاترین میزان نوتروفیل در تیمار شاهد، بالاترین تعداد منوسیت در تیمار ۱۰ درصد و ۵ درصد و بیشترین بازوفیل و ترومبوسیت در تیمار ۲/۵ درصد اسپیرولینا شمارش شد. بر طبق جدول ۳ تاثیر مقادیر متفاوت جلبک اسپیرولینا بر روی ایمنوگلبولین (IgM) مثبت بود و با افزایش درصد اسپیرولینا ایمنوگلبولین (IgM) نیز افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان ایمنوگلبولین (IgM) در تیمار ۱۰٪ و ۵٪ اسپیرولینا مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارهای آزمایشی داشت. در خصوص تاثیرات این جلبک بر روی لایزوزیم نیز کمترین میزان لایزوزیم در تیمار شاهد و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۰٪ اسپیرولینا مشاهده شد که بین تیمارهای آزمایشی با هم تفاوت معنی‌داری وجود داشت (p<۰/۰۵). میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان(C_4 کمپلمان) نیز در تیمار ۷/۵٪ و ۱۰٪ اسپیرولینا دارای بالاترین میزان بود و این دو تیمار با هم تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (p<۰/۰۵). ولی با سایر تیمارهای آزمایشی دارای تفاوت معنی‌داری بودند(p<۰/۰۵). میزان پروتئین در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (p>۰/۰۵). در حالیکه میزان آلبومین تحت تاثیر استفاده از جلبک اسپیرولینا در تیمار ۷/۵٪ و ۱۰٪ اسپیرولینا دارای بالاترین میزان بود و اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارهای آزمایشی نشان داد (p<۰/۰۵). میزان گلوکز با استفاده از جلبک اسپیرولینا افزایش یافته و کمترین میزان گلوکز در تیمار شاهد و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۰٪ اسپیرولینا برابر ۱۶۱ mg/dl مشاهده شد. با افزایش درصد جلبک اسپیرولینا در جیره ماهیان میزان کلسترول و تری گلیسرید کاهش یافته و تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول۱: نتایج آنالیز فاکتورهای خونی ماهی کوی تغذیه شده با مقادیر مختلف جلبک اسپیرولینا

Table 1: The results of blood factors in koi fish fed different amounts of algae Spirulina

فاکتورهای اندازه‌گیری	تیمار				
	شاهد	٪۲/۵	٪۵	٪۷/۵	٪۱۰
HB (g/dl)	۵/۰۷±۰/۳۵ [a]	۵/۸±۰/۲[a]	۶/۱۶±۱/۰۴ [a]	۶/۵۳±۰/۵ [a]	۶/۴۳±۰/۷۳ [a]
WBC (تعداد در میلی متر مکعب)	۱۶/۶۷±۰/۵۸ [b]	۱۶/۷۶±۱ [c]	۱۹/۳۳±۱/۵۱ [bc]	۲۲±۱/۷۳ [ab]	۲۴/۶۶±۰/۵۷[a]
RBC (تعداد در میلی متر مکعب)	۳/۰۱±۰/۰۵ [b]	۳/۴۶±۱/۱۵[a]	۴/۱±۰/۶۵ [a]	۳/۷۳±۰/۱ [a]	۳/۲±۰/۵۵[a]

* حروف متفاوت درهر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است (Mean±S.E) (p<۰/۰۵).

*Different letters in each row indicate that there is a significant difference between the experimental groups (Mean±S.E) (p<0.05)

جدول ۲: نتایج آنالیز گلبول های سفید خونی ماهی کوی تغذیه شده با مقادیر مختلف جلبک اسپیرولینا

Table 2: The results of WBC(white blood cells) in koi fish fed different amounts of algae Spirulina

فاکتورهای اندازه‌گیری	تیمار				
	شاهد	٪۲/۵	٪۵	٪۷/۵	٪۱۰
ترومبوسیت	۱±۱ [a]	۱±۱[a]	۱±۱ [a]	۰/۶۶۷±۰/۵۸ [a]	۰/۶۷±۰/۵۸ [a]
منوسیت	۳±۱[a]	۵±۱[b]	۳/۳۳±۰/۵۸[a]	۳±۱[a]	۱/۳۳±۰/۵۸[ab]
بازوفیل	۷/۶۷±۱/۵۳[a]	۳/۶۷±۰/۵۸[a]	۲±۱[a]	۳±۱[a]	۲/۳۳±۱/۱۵[a]
نوتروفیل	۳۴/۳۳±۱/۱۵ [a]	۴۱/۶۷±۲/۰۸ [b]	۲۴/۳۳±۲/۰۸[c]	۴۴±۲/۶۵ [b]	۷۷±۴/۳۶[e]
لنفوسیت	۵۴±۱[a]	۳۹/۳۳±۱/۱۵[b]	۶۹/۳۳±۱/۵۳[c]	۴۹/۳۳±۱/۵۳[a]	۱۸/۳۳±۲/۰۸[d]

* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است (Mean±S.E)(p<۰/۰۵).

*Different letters in each row indicate that there is a significant difference between the experimental groups (Mean±S.E) (p<0.05).

جدول ۳: نتایج آنالیز فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنوفیزیولوژیک ماهی کوی تغذیه شده با مقادیر مختلف جلبک اسپیرولینا
Table 3: The results of Biochemical and immunophysiology factor in koi fish fed different amounts of algae Spirulina

فاکتورهای اندازه‌گیری	تیمار				
	شاهد	٪۲/۵	٪۵	٪۷/۵	٪۱۰
ایمونوگلبولین IgM	۱۳/۶۷ ±۱/۱۵ ^{a}	۱۱/۶۷ ±۱/۵۳ ^{b}	۱۷±۱ ^{c}	۱۵ ±۱^{c}	۱۷±۱^{c}
لیزوزیم(µg/ml)	۲۴/۳۳ ±۲/۸۲^{a}	۲۷ ±۱^{b}	۳۳/۲۷±۱/۵۳^{c}	۲۷ ±۱^{b}	۳۰±۱^{d}
C_4 کمپلمان	۱۵ ±۱ ^{a}	۲۱/۳۳±۱/۵۳ ^{b}	۱۹/۶۷±۱/۵۳ ^{b}	۲۳ ±۱^{c}	۲۳ ±۱^{c}
پروتئین(g/dl)	۳۳/۶۳±۰/۱۵ ^{a}	۴/۲±۰/۱ ^{a}	۴/۲۳±۰/۲۳ ^{a}	۴±۱^{a}	۴/۴۷±۰/۱۵ ^{a}
آلبومین(g/dl)	۱/۳±۰/۰۵^{a}	۱/۵±۰/۱^{b}	۱/۶±۰/۱^{b}	۱/۷۳±۰/۱۵ ^{c}	۱/۸±۰/۱^{c}
گلوکز	۹۶/۶۷±۲/۵۱^{a}	۱۰۳ ±۱^{b}	۱۱۶/۲۳±۱/۱۵^{c}	۱۲۴/۳۶۷±۲/۸۱^{d}	۱۶۱±۳/۶^{e}
کلسترول	۳۲۴±۱/۶^{a}	۳۱۵/۶۷±۳/۷۳ ^{b}	۳۱۷±۱^{b}	۳۰۳±۳/۶^{c}	۲۸۶/۶۷±۱۷/۰۹۳^{d}
تری گلیسرید	۳۵۲/۳۳±۶/۶۵^{a}	۳۱۶/۶۷±۱۸/۹۳^{b}	۳۴۰±۳/۶^{a}	۳۲۶±۷/۲۱^{c}	۲۸۳/۳۳±۴/۱۶^{d}

* حروف متفاوت در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است (Mean±S.E)(p<۰/۰۵).
*Different letters in each row indicate that there is a significant difference between the experimental groups (Mean±S.E) (p<0.05).

بحث

جلبک سبز آبی اسپیرولینا به دلیل قابلیت تحریک سیستم ایمنی به عنوان مکمل غذایی انسانی، بیش از ۱۰ سال است که تولید تجاری خود را پشت سر گذاشته است. این جلبک به دلیل محتوی با ارزش پروتئینی آن و سایر ترکیبات مغذی نظیر ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب ضروری و بتاکاروتن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Hayashi *et al.*, 1988). پارامترهای خونی در ماهیان ممکن است تحت تأثیر عوامل‌فیزیولوژیکی (Nespolo & Rosenmann, 2002) و یا عوامل خارجی مختلفی نظیر جیره غذایی دچار تغییر گردند (Rios *et al.*, 2002، حسینی فر و همکاران،۱۳۹۰). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ماهی کوی (*Cyprinus carpio*) پس از مصرف جیره حاوی مقادیر مختلف اسپیرولینا در دوره‌های زمانی مختلف، واکنش‌های متفاوت ایمنوفیزیولوژیک از خود نشان می‌دهد به طوریکه فعالیت لیزوزیم سرم در پایان هفته هشتم در گروه ۱۰ گرم جلبک به ازای هر کیلوگرم جیره، در مقایسه با گروه کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). تاثیر مقادیر متفاوت جلبک اسپیرولینا بر روی ایمنوگلبولین (IgM) مثبت بود و با افزایش درصد اسپیرولینا ایمنوگلبولین (IgM) نیز افزایش پیدا کرد. افزایش IgM سرم ماهی با مصرف میکرو جلبک، درمطالعات دیگری نیز به صورت مشابه با نتیجه تحقیق حاضر گزارش شده است به طوری که امانی نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۸ در بررسی تاثیر میکرو جلبک *Dunaliella salina* بر سطوح مختلف ایمنوگلوبین IgM در ماهی قزل آلای رنگین کمان از مقادیر ۰، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ گرم جلبک خالص خشک در هر کیلوگرم غذا استفاده نمودند و دریافتند که میزان IgM در ماهیان تغذیه شده با میکرو جلبک *D.salina* به طور معنی داری بیشتر از تیمار شاهد بوده است. لیزوزیم یک مولکول دفاعی مهم در سیستم ایمنی ذاتی ماهی است که به عنوان یک واسطه مناسب به محافظت در برابر هجوم میکروب‌ها می‌پردازد (Saurabb and Sahoo, 2008). همچنین لیزوزیم یک آنزیم تجزیه کننده قوی موجود در خون و بافت‌های‌لنفوئید ماهیان است. این‌آنزیم دارای نقش زیادی در ایمنی ماهی بوده و یکی از مهم‌ترین فاکتورها در مقاومت طبیعی ماهیان محسوب می‌شود (Magnadottir, 2006). در خصوص تاثیرات این جلبک بر روی لیزوزیم نیز کمترین میزان در تیمار شاهد و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۰٪ اسپیرولینا مشاهده شد و بین تیمارهای آزمایشی با هم تفاوت معنی داری وجود

داشت (p<۰/۰۵). نتیجه مطالعه حاضر مشابه با نتیجه تحقیق Promya و Chitmanat در سال ۲۰۱۱ است. افزایش فعالیت لیزوزیم در تحقیق حاضر می‌تواند ناشی از وجود C-فیکوسیانین و رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در جلبک اسپیرولینا باشد که باعث تحریک سیستم ایمنی می‌شوند. نتایج برخی تحقیقات دیگر نیز نشان داد که استفاده از جلبک اسپیرولینا سبب افزایش معنی‌دار لیزوزیم در کفشک زیتونی (Kim *et al*., 2013) می‌شود. Talpur و همکاران نیز در سال ۲۰۱۲ پی بردند که ماهیان باس دریایی آسیایی یا باراموندی تغذیه شده با ۱۰گرم سیر افزایش چشمگیری در فعالیت لیزوزیم نشان دادند.کمپلمان‌های C_3 و C_4 که ترکیباتی از مکانیسم دفاع غیراختصاصی به حساب می‌آیند در ماهی بسیار مهم هستند زیرا در صورتیکه این ترکیبات در سرم خون بالا باشند، نشان دهنده سلامت ماهیان‌اند (Yano, 1992). میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (C_4 کمپلمان) نیز در تیمار ۷/۵٪ و ۱۰٪ اسپیرولینا دارای بالاترین میزان بود و این دو تیمار با هم تفاوت معنی‌داری نشان ندادند (p>۰/۰۵). نتایج مشابهی توسط سلیقه زاده و همکاران در سال ۱۳۹۳ که اثر جلبک اسپیرولینا را بر روی سیستم ایمنی ماهی بنی انگشت قد بررسی نمودند مشاهده شد، آن‌ها دریافتند که میزان کمپلمان با افزایش دوز اسپیرولینا تا ۱۰ درصد افزایش می یابد و اختلاف معنی-داری بین گروه شاهد با تیمار حاوی اسپیرولینا ۱۰ درصد وجود دارد. همچنین امانی نژاد و همکاران در سال ۱۳۸۸ در بررسی تاثیر میکرو جلبک *Dunaliella salina* بر ماهی قزل الای رنگین کمان بیان نمودند که افزایش سطح کمپلمان به علت وجود کاروتنوئید در جلبک اسپیرولینا می باشد. هرگونه تغییر در سطح آلبومین، گلوبولین و پروتئین تام‌پلاسما می‌تواند به عنوان یک شاخص بالینی‌درپایش سلامت سیستم ایمنی، کبدوکلیه مورداستفاده‌قرارگیرد (John, 2007؛ بنایی و همکاران، ۱۳۸۹). عوامل متعددی بر میزان این پارامترها تأثیرگذار هستند که از جمله‌ی این عوامل می‌توان تغذیه‌ی ماهی را نام برد(شهیدی‌یاساقی و همکاران، ۱۳۸۷). افزایش میزان آلبومین، گلبولین در تیمار حاوی ۱۰ درصد جلبک اسپیرولینا درصد نشان‌دهنده تقویت سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهیان این گروه نسبت به سایر تیمارها است (Andrews *et al*., 2011). افزایش این پارامتر ها در تیمار حاوی ۱۰ درصد اسپیرولینا می تواند باعث افزایش سنتز این پروتئین ها در سلول های پارانشیمی بافت کبد باشد (بنایی و همکاران، ۱۳۸۹). میزان پروتئین تام در پایان آزمایش بین گروه شاهد و سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت. نتیجه مطالعه حاضر با نتایج به دست آمده از برخی مطالعات متفاوت است. Andrews و همکاران (۲۰۱۱)، Abdel -Tawwab و همکاران(۲۰۰۹) و Mustafa و همکاران (۱۹۹۴) افزایش سطح اسپیرولینا در جیره غذایی مشاهده کردند که میزان‌پروتئین‌تام دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود. پروتئین‌های ویژه خون دارای عمل بیولوژی متنوعی هستند، بعضی از آن ها به عنوان ناقل، آنزیم، مهار کننده پروتئازها و در ایمنی هومورال نقش دارند. یکی از این ترکیبات پروتئینی موجود در سرم خون ماهیان آلبومین است. پروتئین تام نیز به مجموع پروتئین‌های موجودر خون اطلاق می‌شود که یکی از نقش‌های این ترکیبات، ایجاد پاسخ‌های ایمنی معین است زیرا در تولید آنتی‌بادی بسیار موثرند (ستاری و همکاران، ۱۳۸۲). بطور کلی افزایش سطح پروتئین‌های سرم، شاخص‌های مناسبی برای وضعیت دفاعی ایمنی ماهی می‌باشند میزان بالای پروتئین سرم در نتیجه بهبود عملکرد کبد و دیگر ارگانیسم‌هایی است که پروتئین پلاسما را می‌سازند اما در اغلب موارد، بیماری‌ها سبب کاهش پروتئین تام خون می‌گردند (Yildiz *et al*., 2009؛ Yu *et al*., 2008). در مقایسه تعداد لکوسیت‌های خون، در گروه‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد جلبک نسبت به گروه شاهد در پایان هفته هشتم تفاوت معنی داری مشاهده شد. در بررسی افتراقی لکوسیت‌ها اختلاف معنی داری در تعداد لنفوسیت‌های خون در بین گروه‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد جلبک، در پایان هفته اول و دوم مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در بررسی تفریقی نوتروفیل‌ها نیز اختلاف معنی داری در مقایسه گروه‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد جلبک نسبت به گروه کنترل در پایان هفته هشتم گزارش شدکه بیشترین میزان لنفوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۷ درصد اسپیرولینا مشاهده شد. بالاترین میزان نوتروفیل در تیمار شاهد، بالاترین تعداد

منوسیت در تیمار ۱۰ درصد و ۵ درصد اسپیرولینا و بیشترین بازوفیل و ترومبوسیت در تیمار ۲ درصد اسپیرولینا شمارش شد. تعدادی از محققین معتقد هستند که سنجش سطح گلوکز خون شاخص مهمی برای ارزیابی ماهیان در شرایط تحت استرس می باشد (ریگی قزاق و همکاران، ۱۳۹۶)، میزان گلوکز با استفاده از جلبک اسپیرولینا افزایش یافته و کمترین میزان گلوکز در تیمار شاهد و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۰٪ اسپیرولینا برابر ۱۶۱ مشاهده شد. با افزایش درصد جلبک اسپیرولینا در جیره ماهیان میزان کلسترول و تری گلیسریدکاهش یافته و تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد (p<۰/۰۵). باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق مشخص گردید استفاده از جلبک *Arthrospira platensis* در جیره غذایی ماهی کوی باعث بهبود برخی پارامترهای ایمنی و بیوشیمیایی سرم خون این ماهی شود و در سطح ۱۰ درصد در شرایط پرورشی قابل توصیه در جیره غذایی این ماهی است.

منابع

امانی نژاد، پ.، عمادی، ح.، امتیازجو، م. و حسین-زاده صحافی، ه.، ۱۳۸۸. بررسی اثر جلبک *Dunaliella sailina* بر تغییرات شاخص-های ایمنی (کمپلمان و پراکسیداز) در ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی پژوهشی بیولوژی دریا، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز. دوره اول، شماره ۴، صفحات ۳-۲۰.

بنایی، م.، میرواقفی، ع.، رفیعی، غ.ر. و سوردا گومیل، آ.، ۱۳۸۹. تجویز خوراکی سیلی‌مارین برروی فاکتورهای بیوشیمیایی خون قزل آلای رنگین‌کمان نشریه، شیلات، مجله‌ی منابع طبیعی ایران، دوره ۶۳، شماره ۴، صفحات ۲۷۱-۲۸۶.

حسینی‌فر، ح.، میرواقفی، ع.، مجازی امیری، ب.، خوشباور رستمی، ح. و درویش بسطامی، ک.، ۱۳۹۰. بررسی تاثیر پروبیوتیک الیگوفروکتوز بر پاره-ای از شاخص های خونی، بیوشیمیایی سرم و آنزیم-های کبدی بچه فیل ماهی (*Huso huso* Linnaeus) مجله شیلات ایران، سال بیست، شماره ۲، صفحات ۲۷-۳۶.

چله مال دزفول نژاد، م.، جهانگیری زاده، م. و مصباح، م.، ۱۳۹۱. تاثیر تغذیه با اسپیرولینا بر سیستم ایمنی در ماهی پنگوسی *Pangasius hypophtalarnus*. مجله محیط زیست جانوری، سال چهارم، صفحات ۲۵- ۳۴.

سلیقه زاده، ر.، یاوری، م.، موسوی، م. و ذاکری، م.،۱۳۹۳. اثر سطوح مختلف مکمل تغذیه‌ای جلبک اسپیرولینا *Spirulina platensi* بر برخی شاخص-های رشد، تغذیه و ترکیب بیوشیمیایی ماهی بنی انگشت قد(*Mesopotamichthys sharpeyi*). مجله اقیانوس شناسی، سال پنجم، شماره ۱۸.

ستاری، م.، شاهسونی، د. و شفیعی، ش.،۱۳۸۲. ماهی شناسی (۲) (سیستماتیک) انتشارات حق شناس، ۵۰۲ صفحه.

شهیدی‌یاساقی، س،ا.، مازندرانی، م.، قربانی، آ.، سرایی، ح.، قربانی، ر. و سلیمانی، ن.، ۱۳۸۷. اندازه‌گیری مقادیر طبیعی برخی فاکتورهای سرم خون (الکترولیت و غیرالکترولیت‌های تاسماهی‌ایرانی). مجله شیلات، شماره ۱، صفحات ۲۵-۳۲.

ریگی قزاق، ح.، آبرومند، ع.، ضیایی نژاد، س. و اکبری، پ، ۱۳۹۶. اثر استاگزانتین بر رشد، ترکیب شیمیایی بدن و برخی شاخص های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کفال خاکستری(*Mugil cephalus*). مجله شیلات ایران، سال بیست و شش، شماره ۲، صفحات ۱۵-۲۴.

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., Abdel-Hadi, Y.M. and Seden, M.E.A., 2008. Use of spirulina (*Arthrospir platensis*) as a growth and immunity promoter for nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) fry challenged with pathogenic Aeromonas hydrophila. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. pp: 1015-1032.

Abdel-Tawwab, M. and Ahmad, M., 2009. Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture. 33: 44-48. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x

Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Mesbah, M. and Razi Jalali, M., 2010. Effects of dietary Aloe vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Int J Vet Res 2010, 4: 189-195.

Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Mukherjee, S.C. and Kumar S., 2011. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for Labeo rohita fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following Aeromonas hydrophila challenge. Research in Veterinary Science, 91: 103-109. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.08.009

Ameri Mahabadi, A., 2008. Veterinary hematological laboratory methods. Tehran university press. 126 p (In Farsi).

Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000. Schalm veterinary hematology, Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. 5th ed. 967 p.

John, P.J., 2007. Alteration of certain blood parameters of freshwater teleost *Mystus vittatus* after chronic exposure to Metasystox and Sevin. Fish Physiology Biochemistry, 33: 15-20. DOI: 10.1007/s10695-006-9112-7.

Houston, A.H., 1990. Blood and circulation. In: C.B. Schreck, P.B. Moyle (Eds.). Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. pp: 273-334.

Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and Silverman, L.M., 1999. Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER. Editors. Tiets textbook of clinical chemistry. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, pp: 477-540.

Klontz, G.W., 1979. Concepts and methods of fish disease epidemiology. University of Idaho Moscow. 42 p.

Kim, S.S., Rahimnejad, S., Kim, K.W. and Lee, K.J., 2013. Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus faciatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 197-204.

Magnadottir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology, 20: 137-151. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006.

Mustafa, M.G., Takeda, T., Umino, T., Wakamatsu, S. and Nakagawa, H., 1994. Effects of ascophyllum and spirulina meal as feed additives on growth performance and feed utilization of red Sea bream, Pagrus major. Journal of the Faculty of Applied Biological Sciences, Hiroshima University, 33: 125-132. http://doi.org/10.15027/24679.

Nandeesha, M.C., Gangadhara, B., Manissery, J.K. and Venkataraman, L.V., 2001. Growth performance of two Indian major carps, catla (*Catla catla*) and

Hayashi, O., Hirahashi, T., Katoh, T., Miyniigia, H., Hirano, T. and okuwaki, Y., 1998. Class speeifie influence of dietary Spirulino plantesis on antibody production in miee, l. Nutr. Sci. Vilaminol. 44: 841–851.
DOI: http://doi.org/10.3177/jnsv.44.841.

Sun, X., Chang, Y., Ye,Y., Ma, Z., Liang, Y., Li, T., Jiang, N., Xing, W. and Luo, L., 2012. The effect of dietary pigments on the coloration of Japanese ornamental carp (*koi, Cyprinus carpio* L.). 342–343: 62–68. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.019

Tokur, S., Ozkütük, E., Atici, G., Ozyurt, C.E. and Ozyur, E., 2006. The effects of frozen storage at− 18°C on the chemical and sensory qualities of fish fingers produced from unwashed and washed mirror carp (*Cyprinus carpio*) mince wereinvestigated.The amounts of moisture, crude protein, lipid, crude ash, ω3 polyunsaturated. Food Chemistry, Elsevier, 151: 5570. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.044.

Talpur, A. and Ikhwanuddin, M.H.D., 2012. Dietary effects of garlic Allium sativum on haematoimmunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, Lates calcariferBloch. Aquaculture, 364-365: 6-12. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.035.

rohu (*Labeo rohita*) fed diets containing different levels of Spirulina platensis. Bioresour. Technol. 80: 117–120. https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00085-2.

Nespolo, R.F. and Rosenmann, M., 2002. Intraspecific allometry of haematological parameters in *Basilichthys australis.* Journal of Fish Biology. 60(5): pp: 1358–1362.
DOI: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb01732.x.

Promya, J. and Chitmanat, C., 2011. The effects of *Spirulina platensis* and cladophora algae on the growth performance, meat quality and immunity stimulating capacity of the African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*). International Journal of Agriculture andBiology, 13: 77–82.
DOI:10–272/DJZ/2011/13–1–77–82.

Saurabh, P.K. and Sahoo, S., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research 39(3): 223-239.
DOI: 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.

Silva, J.F. and Pannal, P.R., 1984. Clinical chemistry in diagnosis and treatment, 4th ed. London: Lioyd-Luke (Medical Books). 480 p.

Rios, F.S., Kalinin, A.L. and Rantin, F.T., 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*, Journal of Fish Biology, 61: 85-95.
DOI: 10.1111/j.1095-8649.2002.tb01738.x.

Volkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J.L.B. and Santanna, E.S., 2008. Cultivation of arthrospira (*Spirulina platensis*) in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. Braz. J. Microbiol [online], 39(1): 98-101. http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100022 .

Yano, T., 1992. Assays of hemolytic complement activity. In: Stolen, S.J., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Kaattari, S.L., Rowley, A.F. (eds). Techniques in Fish Immunology. Fair Haven, NJ, USA: SOS publication. Pp: 131–141.

Yu, Z.L., Zhang, J.G., Wang, X.C. and Chen, J., 2008. Excessive copper induces the production of reactive oxygen species, which is mediated by phospholipase D, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase and antioxidant systems. Journal of Integrative Plant Biology, 50(2): 157-67. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00609.x.

Yıldız, M., Cigercia, İ.H., Konuk, M.A., Fidanb, F. and Terzi, H., 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere, 75(7): 934–938. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.023

Zar, J.H., 1999. Blostatistical Analysis. Prentic Hall. (4th Edition) New Jer sey. 663 p.

The effect of dietary supplement spirulina (*Arthrospira platensis*) on the immune system and blood biochemical factors of koi fish (*Cyprinus carpio carpio*)

Ansarifard F.[1]; Rajabi Islami H.[1]*; Shamsaie Mehrjan M.[1]; Soltani M.[2]

* houman.rajabi@yahoo.com

1-Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box 14515-775,Tehran, Iran.
2-Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.

Abstract
This study evaluated the effect of diets containing 0, 2.5, 5, 7.5 and 10% *Arthrospir platensis* on the hematological and immune parameters of Koi carp (*Cyprinus carpio*). A completely randomized experimental design was developed with five treatments and three replicates for 8 weeks. At the end of experiment, the hematological and, immune system parameters were measured and analyzed. The results revealed that supplementation of *Arthrospira platensis* in diets results in higher percentage of Hb, Hct, RBC and WBC. In addition, a significant increasein the levels of IgM, lysozyme and C4 complement levels were found in fish fed with 10% *Arthrospira platensis* ($p<0.05$). These results revealed that, inclusion of 10% *A. platensis* in diets did appear to have a significant positive effect on stimulation of immune system of Koi fish.

Keywords: *Cyprinus carpio carpio*, Spirulina, Immune system, *Arthrospira platensis*

*Corresponding author