

تأثیر 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

* rajabi.h@srbiau.ac.ir

۱- گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، صندوق پستی: ۷۷۵-۱۴۵۱۵، تهران، ایران.

۲- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۶

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 تیمار و 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 می‌گردد. به علاوه یک افزایش معنی‌دار در سطح برخی پارامترهای ایمنی لیزوزیم، ایمنوگلوبین Igm و عامل کمپلمان C₄ در ماهی تغذیه شده با ۱۰ درصد اسپیرولینا مشاهده شد ($p < 0/05$). این نتایج نشان می‌دهند 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 زیستگاه های طبیعی آب شیرین زندگی می کنند. این ماهیان نیاز به مراقبت زیاد ندارد. اندازه این ماهی تا ۱۳۰ سانتی متر می رسد. اسیدیته آب برای این ماهیان ۷ میلی گرم در لیتر و سختی آب بین ۱۵-۱۰ میلی گرم در لیتر می باشد. دمای مورد نیاز برای ماهی کوی بین ۲۵-۳ درجه سلسیوس است که البته تحمل دامنه دمایی ۳۵-۰ درجه سانتی گراد را دارند (Sun et al., 2010). از آنجایی که بخش عمده ای از هزینه های یک واحد پرورشی را تأمین خوراک به خود اختصاص می دهد، بنابراین برای دستیابی به تولید بیشتر در یک واحد پرورشی لازم است که توجه بیشتری به این موضوع گردد (Tokur et al., 2006). رژیم های 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 (Nandeesh 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 آن ها بر روی رشد، سلامت آبزی، کیفیت آب، سمیت زدایی از مواد سمی موجود و کنترل کیفیت محصول تولیدی امری ضروری می باشد. از جمله مواد اولیه حائز اهمیت می تواند به جلبک ها، میکرو جلیک ها و ماکرو جلیک ها و انواع مکمل های غذایی که دارای تأثیر مثبت بر روی شاخص های رشد، متابولیسم، توان حیاتی، فعالیت کبدی و روده ای و معده ای، مقاومت نسبت به انواع بیماری ها می باشند، اشاره نمود. در این میان جلبک اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) می تواند به عنوان مکمل نسبی یا جایگزین کامل پروتئین ها 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 می باشد. 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 آن ها مطالعه شد. آن ها بیان نمودند که افزایش مقادیر پارامترهای ذکر شده می تواند ناشی از اثرات این جلبک و ترکیبات موجود در آن بر مراکز خون ساز بدن و بافت هماتوپوئیک بوده و باعث افزایش تولید هموگلوبین و گلبول های 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 جیره ای که حاوی ۲/۵-۱۰ درصد اسپیرولینا است سبب افزایش تعداد گلبول های سفید در این ماهی در محدوده $3/313 \times 10^5$ سلول در میکرولیتر خواهد شد. آن ها همچنین بیان کردند بیشترین درصد میزان افزایش تعداد گلبول های سفید در گروهی از ماهیانی که ۱۰ اسپیرولینا به جیره ای آن ها 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 مدت ۶۰ روز در پاییز ۱۳۹۴ در شهرستان ورامین انجام شد، از وان های فایبرگلس به حجم آبیگری ۱۷۰ لیتری به تعداد ۱۵ عدد استفاده گردید. تعداد ۲۵۰ عدد ماهی از یکی از مراکز فروش ماهی های 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 می شدند. جهت تغذیه، ابتدا بچه ماهیان با جیره های پایه به منظور سازگاری تغذیه شدند و پس از گذشت یک هفته جیره های آزمایشی جایگزین غذای پایه شدند. سپس بچه ماهیان به مدت ۶۰ روز با جیره پایه و جیره های آزمایشی تغذیه می شوند. 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 مخلوط کن الکتریکی بصورت کاملاً همگن در آورده شد سپس این خوراک با استفاده از چرخ گوشت بصورت پلت هایی با اندازه مناسب درآورده گردید، بعد از ۱ ساعت قرار دادن در هود ۴۰ درجه سانتی گراد تا زمان مصرف به فریزر ۴۰ درجه سانتی گراد منتقل شد. (چله مال دزفول نژاد، ۱۳۹۱). ماهی ها در پنج تیمار (شامل تیمار شاهد و تیمارهای حاوی اسپیرولینا ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) و هر تیمار با سه تکرار آماده شدند. نمونه برداری و خونگیری بعد از ۶۰ روز از شروع پرورش به منظور بررسی برخی شاخص های 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 لوله های 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 لوله های 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 روش های Ameri Mahabadi (2008)، Klontz (1972) و Housteon (1990) اندازه گیری شدند.

پارامترهای ایمنی، از جمله C₄ بر اساس روش ارائه شده توسط (Feldman et al., 2000) انجام شد. ایمنو گلوبولین (IGM) بر اساس Silva و Pannall (1984)، و لیزوزیم بر اساس (Sahoo and Saurabh, 2008) اندازه گیری شد. روش های 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 رنگ سنجی اوره آز، کراتینین به روش رنگ سنجی ژافه، پروتئین تام به روش بیوره، بیلی روبین به روش دیازو و آلبومین به روش بروموکرزول سبز اندازه گیری خواهد گردید برای تعیین توزیع نرمال داده ها از آزمون کولموگراف - اسمیرنوف استفاده گردید سپس تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون تحلیل واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد و وجود یا نبود اختلاف معنی دار در سطح اعتماد ۹۵ درصد تعیین گردید. برای انجام محاسبات فوق از نرم افزار 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 ($p < 0.05$). 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 ($p < 0.05$). 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 ایمونوگلوبولین (IgM) مثبت بود و با افزایش درصد اسپیرولینا ایمونوگلوبولین (IgM) نیز افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان ایمونوگلوبولین (IgM) در تیمار ۱۰٪ و ۵٪ اسپیرولینا مشاهده شد که تفاوت معنی داری با سایر تیمارهای آزمایشی داشت. در خصوص تاثیرات این جلبک بر روی لایوزیم نیز کمترین میزان لایوزیم در تیمار شاهد و بیشترین میزان آن در تیمار ۱۰٪ اسپیرولینا مشاهده شد که بین تیمارهای آزمایشی با هم تفاوت

معنی داری وجود داشت ($p < 0.05$). 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 معنی داری نشان ندادند ($p < 0.05$). ولی با سایر تیمارهای آزمایشی دارای تفاوت معنی داری بودند ($p < 0.05$). میزان پروتئین در هیچ یک از تیمارهای آزمایشی با تیمار شاهد تفاوت معنی داری نشان نداد ($p > 0.05$). در حالیکه میزان آلبومین تحت تاثیر استفاده از جلبک اسپیرولینا در تیمار ۷/۵٪ و ۱۰٪ اسپیرولینا دارای بالاترین میزان بود و اختلاف معنی داری با دیگر تیمارهای آزمایشی نشان داد ($p < 0.05$). 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 معنی داری با تیمار شاهد نشان داد ($p < 0.05$).

جدول ۱: 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 اندازه گیری	شاهد	تیمار			
		۲/۵٪	۵٪	۷/۵٪	۱۰٪
HB (g/dl)	۵/۰۷±۰/۳۵ ^a	۵/۸±۰/۳ ^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 در هر ردیف نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه های آزمایشی است (Mean±S.E) ($p < 0.05$).*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 اندازه گیری	شاهد	تیمار			
		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) ($p < 0.05$).*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

تیمار					فاکتورهای اندازه گیری
۱۰٪	۷/۵٪	۵٪	۲/۵٪	شاهد	
۱۷±۱ ^c	۱۵±۱ ^c	۱۷±۱ ^c	۱۱/۶۷±۱/۵۳ ^b	۱۳/۶۷±۱/۱۵ ^a	ایمونوگلوبولین IgM
۳۰±۱ ^d	۲۷±۱ ^b	۳۳/۲۷±۱/۵۳ ^c	۲۷±۱ ^b	۲۴/۳۳±۲/۸۲ ^a	لیزوزیم (μg/ml)
۲۳±۱ ^c	۲۳±۱ ^c	۱۹/۶۷±۱/۵۳ ^b	۲۱/۳۳±۱/۵۳ ^b	۱۵±۱ ^a	C ₄ کمپلمان
۴/۴۷±۰/۱۵ ^a	۴±۱ ^a	۴/۲۳±۰/۲۳ ^a	۴/۲±۰/۱ ^a	۳۳/۶۳±۰/۱۵ ^a	پروتئین (g/dl)
۱/۸±۰/۱ ^c	۱/۷۳±۰/۱۵ ^c	۱/۶±۰/۱ ^b	۱/۵±۰/۱ ^b	۱/۳±۰/۰۵ ^a	آلبومین (g/dl)
۱۶۱±۳/۶ ^e	۱۲۴/۳۶۷±۲/۸۱ ^d	۱۱۶/۲۳±۱/۱۵ ^c	۱۰۳±۱ ^b	۹۶/۶۷±۲/۵۱ ^a	گلوکز
۲۸۶/۶۷±۱۷/۰۹۳ ^d	۳۰۳±۳/۶ ^c	۳۱۷±۱ ^b	۳۱۵/۶۷±۳/۷۳ ^b	۳۲۴±۱/۶ ^a	کلتترول
۲۸۳/۳۳±۴/۱۶ ^d	۳۲۶±۷/۲۱ ^c	۳۴۰±۳/۶ ^a	۳۱۶/۶۷±۱۸/۹۳ ^b	۳۵۲/۳۳±۶/۶۵ ^a	تری گلیسرید

* 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

IgM) نیز افزایش پیدا کرد. افزایش IgM سرم ماهی با مصرف میکرو جلبک، در مطالعات 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 ایمنوگلوبولین IgM در ماهی قزل آلا 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 می پردازد (Saurabb and Sahoo, 2008). همچنین لیزوزیم یک آنزیم تجزیه کننده قوی موجود در خون و بافت های لنفوئید ماهیان است. این آنزیم دارای نقش زیادی در ایمنی ماهی بوده و یکی از مهم ترین فاکتورها در مقاومت طبیعی ماهیان محسوب می شود (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

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 ویتامین ها، 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 عوامل فیزیولوژیکی (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 می دهد که ماهی کوی (*Cyprinus carpio*) پس از مصرف جیره حاوی مقادیر مختلف اسپیرولینا در دوره های زمانی مختلف، واکنش های متفاوت ایمنوفیزیولوژیک از خود نشان می دهد 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 معنی داری نشان داد (p<۰/۰۵). تاثیر مقادیر متفاوت جلبک اسپیرولینا بر روی ایمنوگلوبولین (IgM) مثبت بود و با افزایش درصد اسپیرولینا ایمنوگلوبولین

داشت ($p < 0.05$). 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-فیکوسیائین 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 ۱۰ گرم 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 ماهیان اند (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 ($p > 0.05$). 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 می‌یابد و اختلاف معنی‌داری 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 قزل‌الای رنگین کمان بیان نمودند که افزایش سطح کمپلمان به علت وجود کاروتنوئید در جلبک اسپیرولینا می‌باشد. هرگونه تغییر در سطح آلبومین، گلوبولین و پروتئین تام‌پلاسما می‌تواند به عنوان یک شاخص بالینی‌درپایش سلامت سیستم ایمنی، کبد و کلیه مورد استفاده قرار گیرد (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، گلوبولین 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 پارامترها در تیمار حاوی ۱۰ درصد اسپیرولینا می‌تواند باعث افزایش سنتز این پروتئین‌ها در سلول‌های 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 میزان پروتئین تام دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه کنترل بود. پروتئین‌های ویژه خون دارای عمل بیولوژی متنوعی هستند، بعضی از آن‌ها 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 موجود در 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 ارگان‌های 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 معنی‌داری مشاهده شد. در بررسی افتراقی لکوسیت‌ها اختلاف معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌های خون در بین گروه‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد جلبک، در پایان هفته اول و دوم مشاهده نشد ($p > 0.05$). در بررسی تفریقی نوتروفیل‌ها نیز اختلاف معنی‌داری در مقایسه گروه‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد جلبک نسبت به گروه کنترل در پایان هفته هشتم گزارش شد که بیشترین میزان لنفوسیت در ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی ۷ درصد اسپیرولینا مشاهده شد. بالاترین میزان نوتروفیل در تیمار شاهد، بالاترین تعداد

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 hypophthalmus*. مجله محیط زیست جانوری، سال چهارم، صفحات ۲۵-۳۴.

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

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

شهیدی یاساقی، س.ا.، مازندرانی، م.، قربانی، آ.، سرابی، ح.، قربانی، ر. و سلیمانی، ن.، ۱۳۸۷. اندازه‌گیری مقادیر طبیعی برخی فاکتورهای سرم خون (الکترولیت و غیرالکترولیت‌های تاسماهی ایرانی). 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 شاخص‌های 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 (*Arthrospira 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.

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 گلیسرید کاهش یافته و تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نشان داد ($p < 0.05$). 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 salina* بر تغییرات شاخص‌های ایمنی (کمپلمان و پراکسیداز) در ماهی قزل آلاي 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 سورداد گومیل، آ.، ۱۳۸۹. تجویز خوراکی سیلی مارین بروی فاکتورهای بیوشیمیایی خون قزل آلاي رنگین کمان نشریه، شیلات، مجله‌ی منابع طبیعی ایران، دوره ۶۳، شماره ۴، صفحات ۲۷۱-۲۸۶.

حسینی فر، ح.، میرواقفی، ع.، مجازی امیری، ب.، خوشباور رستمی، ح. و درویش بسطامی، ک.، ۱۳۹۰. بررسی تاثیر پروبیوتیک الیگوفروکتوز بر پاره‌ای از شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی سرم و آنزیم‌های کبدی بچه فیل ماهی (*Huso huso*)

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

- 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](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 and Biology*, 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: Liody-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.
- 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 calcarifer*Bloch. *Aquaculture*, 364-365: 6-12. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.07.035>.

- 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.** *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. (4th Edition) New Jersey. 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

* rajabi.h@srbiau.ac.ir

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% *Arthrospira 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 increase in 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