

اثر جایگزینی پودر ماهی با ریز جلبک اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) در جیره برفاکتورهای ایمنی و خونی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

آرزو مشکوه روحانی^۱، مریم فلاحتی کپورچالی^{۱*}، عبدالمحمد عابدیان کناری^۲، محمد صیاد بورانی^۱، سید جلیل ذریه زهرا^۳، امیر حسین اسماعیلی^۲

۱- پژوهشکده آبی‌پروری آبهای داخلی ایران، موسسه تحقیقات شیلات ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی، بندر

انزلی، ایران

۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، گروه شیلات و آبی‌پروری، نور، ایران

۳- موسسه تحقیقات شیلات ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی و منابع طبیعی، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۳/۲۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲

چکیده

در این تحقیق تاثیر اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) بر فاکتورهای بیوشیمیایی، خونشناسی و پاسخ‌های ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) بررسی گردید. پنج جیره آزمایشی با سطح پروتئین (۴۵٪) و انرژی یکسان (20 MJ kg^{-1}) طراحی و ساخته شدند. در این آزمایش ریز جلبک اسپیرولینا در سطوح صفر درصد (تیمار شاهد)، ۲ درصد (۱۳/۲ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم)، ۴ درصد (۲۶/۴ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم)، ۶ درصد (۳۹/۶ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم) و ۸ درصد (۵۲/۸ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم) جایگزین پودر ماهی جیره (۶۵/۸۹ درصد در جیره شاهد) گردید. ۶۰۰ بچه ماهی آزاد با وزن متوسط ۱۱ گرم در ۱۵ تانک پرورش ذخیره شدند. دوره غذادهی ۱۰ هفته و روزانه ۲ بار صورت می‌گرفت. در انتهای دوره شاخص‌های بیوشیمیایی و خونشناسی شامل تعداد گلبولهای قرمز، گلبولهای سفید، اندیسهای گلبولی، درصد افتراقی گلبولهای سفید، هماتوکریت و هموگلوبین و فاکتورهای بیولوژیک و ایمنی شامل پروتئین کل، آلبومین، تری گلیسیرید، کلسترول، گلوکز، ایمونوگلوبولین‌ها، عامل کمپلمان، آنزیم لیزوزیم و رادیکال آزاد اکسیژن سنجیده شد. با افزایش میزان اسپیرولینای جیره، پارامترهای هماتولوژی بچه ماهیان آزاد دریای خزر از جمله تعداد گلبولهای قرمز، تعداد گلبولهای سفید، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین، لنفوسیت، نوتروفیل و اندیس‌های خونی روند افزایشی داشته و بین تیمارها اختلاف معنی‌دار بوده است ($P < 0.05$). سطوح آنزیم لیزوزیم، کمپلمان های C_4 ، C_3 ، $ACH50$ ، رادیکال آزاد اکسیژن و ایمونوگلوبولین بطور معنی‌داری تحت تاثیر سطوح اسپیرولینای جیره قرار گرفتند ($P < 0.05$)، بطوری‌که بیشترین میزان این پارامترها در تیمار ۸ درصد و کمترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شد. در مجموع می‌توان گفت سطح ۸-۶ درصد جایگزینی پودر ماهی با اسپیرولینا می‌تواند در افزایش توان ایمنی ماهی آزاد دریای خزر موثر باشد.

کلمات کلیدی: اسپیرولینا، بچه ماهی آزاد دریای خزر، ایمنی، فاکتورهای خونشناسی و بیوشیمیایی.

مقدمه

داروهای شیمیایی فراوانی برای درمان و مقابله با عفونت های میکروبی در آبزیان در ۲۰ سال اخیر به صنعت آبرزی پروری معرفی شده اند ولی با بروز مقاومت های دارویی در برخی از بیماریها به یکی از معضلات مهم این صنعت تبدیل شده و در حال حاضر توجه استفاده از این داروها را به حداقل رسیده است (Andrews *et al.*, 2011) و در عوض به روشهایی از جمله استفاده از واکسن ها، انواع محرک های ایمنی غیر اختصاصی و پروبیوتیک ها به عنوان کنترل زیستی بیشتر توصیه و تاکید می گردد (Andrew *et al.*, 2013; Krishnaveni *et al.*, 2011). در سالهای اخیر، مکمل های جلبکی (علفهای دریایی و فیتوپلانکتونها) نیز به عنوان یک ماده مغذی و تأمین کننده پروتئین، محرک رشد و تقویت کننده سیستم ایمنی آبزیان توجه بسیاری از محققین و صنعتگران را به خود جلب نموده است (Becker, 2007; Jafari *et al.*, 2014). در میان این منابع، ریزجلبک اسپیرولینا به دلایل مختلفی چون سهولت تولید و فرآوری و دامنه وسیع و متنوع ریز مغذی ها و درشت مغذی های تأمین کننده سلامت از سالها پیش مورد توجه بوده است (Ravi *et al.*, 2010). اسپیرولینا جزء ریزجلبکهای چندسلولی میکروسکوپی و رشته ای سبزآبی (Cyanobacterium) و متعلق به رده جلبکی Cyanophyta و یا به عبارتی باکتریهای فتوسنتزکننده می باشند (Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009). بهبود قابلیت هضم و توان آنزیمی، رنگ، فاکتورهای بیوشیمیایی و خونشناسی، عملکرد رشد، توان ایمنی، مقاومت در برابر عوامل استرس زا و افزایش اسیدهای چرب غیر اشباع در لاشه توسط اسپیرولینا قبلا توسط محققان مختلفی گزارش و تایید

گردیده است (Velasquez *et al.*, 2016; Jafari *et al.*, 2014; Gogoi *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2016; Khanzadeh *et al.*, 2016; Cao *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2017; Palmegiano *et al.*, 2008; Sarker *et al.*, 2016; Teimouri *et al.*, 2016; Teimouri *et al.*, 2013).

علاوه بر این اسپیرولینا دارای ذخیره پروتئینی بالا (۷۰-۶۰ درصد وزن خشک)، میزان قابل توجه ویتامین ها بویژه ویتامین B12، پروفایل اسید آمینه و چرب ضروری مناسب و طیف وسیعی از انواع رنگدانه ها بویژه فیکوسیانین ها می باشد و به همین دلیل توجه بسیاری از محققین و صنعتگران را به خود معطوف نموده است (Mustafa *et al.*, 1994; Mustafa and Nakagava, 1995; Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009; Palmegiano *et al.*, 2008; Teimouri *et al.*, 2013).

دانشمندان تأیید نمودند که اسپیرولینا نه تنها مانع تکثیر سلولی و ویروس ها می گردد، بلکه باعث تقویت توانایی بدن برای تولید سلولهای خونی جدید می شود. بخشهای مهم سیستم ایمنی مثل سلولهای بنیادی مغز استخوان، ماکروفاژها (تعداد سلولها و قدرت فاگوسیتوزی)، سلولهای T (لنفوسیتها)، سلولهای NK (سیتوتوکسیک های غیر اختصاصی)، طحال و تیموس تحت تأثیر اسپیرولینا افزایش محسوس و معنی داری در فعالیت خود نشان می دهند (Henrikson, 1998; Watanuki *et al.*, 2006; Yong-Chin *et al.*, 2010; Tongsiriri *et al.*, 2010; Shahbazi and Bolhassani, 2016).

قزل آلالی قهوه ایبا نام علمی *Salmo trutta Linnaeus*، یکی از ۹ زیرگونه قزل آلالی قهوه ای در جهان است که در بین تمام زیرگونه های قزل آلالی قهوه ای به بیشترین اندازه و وزن رسیده و بالاترین میزان رشد را داشته و در دریاچه خزر زیست می کند

1998, 6.1 release) صورت گرفت. فرمول جیره های آزمایشی ساخته شده در جدول ۱ آورده شده است. برای تهیه جیره های غذایی، تمام مواد با ترازوی دیجیتال توزین شدند و با دست به مدت ۲۰ دقیقه کاملاً مخلوط گردیدند و همراه با اضافه کردن آب به مقدار لازم به مدت حدوداً ۲۰ دقیقه دیگر با هم مخلوط شدند. سپس خمیر به چرخ گوشت منتقل و از سوراخ ۲ میلی متری عبور داده شد. رشته های ایجاد شده به دستگاه خشک کن (در دمای ۶۰ درجه به مدت ۵ ساعت) انتقال داده شد. جیره ها پس از خشک شدن بصورت دستی خرد شدند تا متناسب با اندازه دهان ماهی گردند. سپس در پلاستیک های مخصوص در فریزر (۱۸- درجه سانتی گراد) قرار داده شد.

بچه ماهی آزاد دریای خزر با وزن متوسط ۱۱ گرم از مرکز بازسازی ذخایر آبزیان شهید باهنر کلاردشت تهیه و به کارگاه پرورش ماهیان سردابی شرکت تعاونی چندمنظوره نیاک واقع در روستای باغبانکلای شهرستان آمل در آبان ماه سال ۹۴ انتقال داده شد. قبل از آغاز آزمایش، به مدت دو هفته در مخازن فایبر گلاس ۶۰۰ لیتری انتقال داده شده و با غذای اکستروود تجاری تولیدی شرکت ۲۱ بیضاء، ۲ بار در روز به میزان اشباع تغذیه شدند. پس از طی دوره آدآپتاسیون، بچه ماهیان بصورت تصادفی به پنج تیمار و ۳ تکرار تقسیم و در ۱۵ مخزن فایبر گلاس ۳۰۰ لیتری ذخیره سازی (۴۰ ماهی در هر مخزن) شدند. در طی دوره آزمایشی، بچه ماهیان بصورت دستی دو بار در روز تا حد اشباع تغذیه شدند. دمای آب (2 ± 15 درجه سانتی گراد) بصورت روزانه با دماسنج جیوه ای، اکسیژن محلول ($1 \pm 8/3$ میلی گرم بر لیتر) و pH ($7/6 \pm 0/3$) به صورت هفتگی کنترل و ثبت می گردید.

(Sedgwick 1995., Rajabi et al., 2016) از سال ۱۹۹۹، ماهی آزاد دریای خزر در لیست قرمز IUCN و در فهرست گونه های در معرض خطر اعلام گردید (Kalbasi et al., 2006).

تکثیر مصنوعی این گونه و رهاسازی بچه ماهیان به دریا یک راهکار جهت جلوگیری از انقراض آن است (Rajabi et al., 2016). ماهی آزاد دریای خزر مانند اغلب گونه های پرورشی بسیار حساس به عوامل استرس زا و بیماریزا است. بنابر این مکانیسم های تقویت ایمنی این گونه و بهبود سلامت عمومی آن از الزامات مسیر توسعه تکثیر و پرورش این گونه تلقی می گردد. ولی علی رغم اهمیت این گونه به عنوان یک گونه بومی در معرض خطر انقراض تاکنون اطلاعات بسیار اندکی از نیازهای دقیق غذایی، سببستم ایمنی و راههای تقویت آن وجود دارد. بنابر این اصلی ترین هدف این مطالعه تعیین تاثیر ریز جلبک اسپیرولینا به عنوان یک مکمل غذایی بر توان ایمنی و فاکتورهای خونی ماهی آزاد دریای خزر به عنوان یک گونه با ارزش بومی ایران می باشد.

مواد و روشها

پنج جیره آزمایشی با پروتئین یکسان (۴۵٪) و انرژی یکسان (20 MJ kg^{-1}) طراحی و ساخته شدند. در این آزمایش ریز جلبک اسپیرولینا در سطوح صفر درصد (تیمار شاهد)، ۲ درصد ($13/2$ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم)، ۴ درصد ($26/4$ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم)، ۶ درصد ($39/6$ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم) و ۸ درصد ($52/8$ گرم اسپیرولینا در هر کیلوگرم) جایگزین پودر ماهی جیره ($65/89$ درصد در جیره شاهد) گردید. فرمولاسیون جیره ها با استفاده از نرم افزار لیندو (Lindo copyright,)

جدول ۱: ترکیب جیره ساخته شده برای بچه ماهیان آزاد دریای خزر در تیمارهای مختلف بر حسب درصد

مواد اولیه (%)	تیمار شاهد	تیمار ۲درصد	تیمار ۴درصد	تیمار ۶درصد	تیمار ۸درصد
پودر ماهی ^۱	۶۵/۸۹	۶۴/۵۷	۶۳/۲۴	۶۱/۹۴	۶۰/۶۲
اسپیرولینا ^۲	۰	۱/۳۲	۲/۶۵	۳/۹۵	۵/۲۷
آرد گندم ^۳	۱۱/۵۹	۱۱/۷۸	۱۱/۹۴	۱۲/۰۹	۱۲/۲۴
روغن ماهی ^۴	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵	۴/۵
روغن سویا ^۵	۵/۰۳	۵/۱۳	۵/۲۳	۵/۳۳	۵/۴۵
لسیتین ^۶	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
فیلر (ماسه بادی)	۶	۵/۷۱	۵/۴۶	۵/۲۱	۴/۹
مکمل معدنی ^۷	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
مکمل ویتامینی ^۸	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
آنتی اکسیدان ^۹	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۲
کولین کلراید ^{۱۰}	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱
منوکلسیم فسفات ^{۱۱}	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ضدقارچ ^{۱۲}	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
لیزین ^{۱۳}	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
متیونین ^{۱۴}	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
ویتامین ث ^{۱۵}	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱	۰/۱

تجزیه‌تقریبی (%)

پروتئین	۴۵/۱	۴۵/۲	۴۴/۸۹	۴۵/۰۷	۴۵/۱۲
چربی	۱۷/۹۶	۱۷/۷۵	۱۸/۱	۱۸/۲	۱۸/۱
رطوبت	۷/۹	۸/۰۲	۸/۰۰	۷/۹	۸/۱
خاکستر	۸/۹	۸/۸	۸/۷	۸/۹	۹/۱
کربوهیدرات	۱۲/۱۴	۱۱/۹۳	۱۲/۲۱	۱۱/۷۳	۱۱/۵۸
انرژی ناخالص (mJ/kg)	۱۹/۸۳	۱۹/۷۳	۱۹/۸۴	۱۹/۸۴	۱۹/۸

۱- تهیه شده در شرکت پودر ماهی میروید بابلسر و شرکت تعاونی چند منظوره نیاک ۲ - تهیه شده از شرکت سیناریز جلبک قشم

۳- تهیه شده از شرکت تعاونی چند منظوره نیاک ۴ و ۵ و ۶ تهیه شده از کارخانه خوراک دام و آبزیان ساری

۷- هر کیلوگرم مکمل ماده معدنی شامل مواد معدنی کمیابی مانند منگنز ۲۶۰۰ mg/kg، مس ۶۰۰، آهن ۶۰۰، روی ۴۶۰۰، سلنیوم ۵۰، ید ۱۰۰، کبالت ۵۰ و کریر تا ۱ کیلوگرم می باشد.

۸- هر کیلو مکمل ویتامین حاوی ویتامین های A=1200000IU، D3=400000IU، E=3000IU، K3=1200 mg، C=5400 mg، H2=200mg، B1=200mg، B2=3360mg، B7=7200mg، B5=9000mg، B6=2400mg، B9=600mg، B12=4mg و کریر تا یک کیلوگرم.

۹- تهیه شده از کارخانه خوراک دام و آبزیان ساری و ترکیبات آن شامل Synergist، Etoxyquin، Propylgallate، BHT

۱۰- تهیه شده از کارخانه ارس بازار و کولین کلراید ۶۰ درصد

۱۱- تهیه شده از کارخانه داروسازی ارس تابان. ۱۳ و ۱۴- تهیه شده از کارخانه ارس بازار ۱۵- ویتامین ث آبزیان تولید کارخانه ارس بازار

تصادفی برداشته و خونگیری از آنها صورت گرفت.

جهت خونگیری ابتدا ماهیان بوسیله عصاره گل میخک

در پایان دوره به منظور بررسی پارامترهای

هماتولوژی از هر تیمار ۱۰ عدد بچه ماهی آزاد را بطور

گلوبولین با استفاده از فرمول آلومین - پروتیین = (g/dl) گلوبولین محاسبه گردید (Kumar et al., 2005). برای اندازه گیری مقدار کلسترول کل، تری گلیسرید و گلوکز از کیت های تجاری پارس آزمون و بوسیله دستگاه اتوآنالایزر در طول موج ۵۴۶ نانومتر استفاده شد. میزان لیزوزیم سرم توسط روش کدورت سنجی (Turbidometric) بررسی شد (Ellis, 1990). برای اندازه گیری کمپلمانهای C₃ و C₄ در سرم خون از روش Immuno turbidometric استفاده شد (Tang et al., 2008). کیت های تجاری پارس آزمون برای این سنجش مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه گیری فعالیت سیستم کمپلمان از روش الیزا غیر مستقیم (Indirect Elisa) استفاده گردید از کیت تجاری (Wiensa comple300 total complement functional screen kit, Sweden) برای اندازه گیری فعالیت همولایتیک سرم (ACH50) استفاده شد. برای اندازه گیری غلظت ایمنوگلوبولین کل سرمی از روش Immuno turbidometric استفاده شد (Tang et al., 2008). اساس این روش بر تعیین غلظت IgM از طریق اندازه گیری فتومتریک واکنش بین آنتی بادی های حساس شده بر علیه IgM موجود در کیت و آنتی ژن IgM موجود در سرم می باشد. روش های متفاوتی برای اندازه گیری رادیکالهای آزاد اکسیژن وجود دارد که در این مطالعه از روش Agarwal (Chemiluminescence assay) استفاده گردید.

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی Completely Randomized Design برنامه ریزی و اجرا شد. تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ استفاده گردید. ابتدا شرط نرمال بودن داده ها با Kolmogorov-Smirnov و

به مقدار ۵۰ میلی گرم در لیتر بیهوش شدند. خونگیری به دلیل کوچک بودن ماهی با قطع ساقه دمی انجام شد. نمونه های جمع آوری شده به دو قسمت تقسیم شدند، یک قسمت به لوله های اپندورف حاوی هپارین (U/L) (۵۰۰) برای آزمایشات خونشناسی و قسمت دوم به لوله های اپندورف فاقد هپارین برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و ایمنی انتقال داده شد (Andrew et al., 2011). میکروتیوب ها تا زمان استفاده بر روی یخ نگهداری و فوراً به آزمایشگاه منتقل گردید. برای شمردن گلبولهای قرمز و سفید از لام هموسیتومتر یا نتوبار بر اساس روش Blaxhall و Daisley (۱۹۷۳) استفاده گردید. برای اندازه گیری مقدار هموگلوبین خون از روش سیان مت هموگلوبین (Houston, 1990) (Cyanmethemoglobin) استفاده گردید. از روش میکروهماتوکریت برای اندازه گیری مقدار هماتوکریت استفاده شد (Subhadra et al., 2006). برای محاسبه اندیس های خونی، میانگین حجم یک گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین یک گلبول قرمز (MCH)، میانگین درصد غلظت هموگلوبین در یک گلبول قرمز (MCHC) از فرمول های زیر استفاده شد (Lewis and Dacie, 2001).

(تعداد گلبول قرمز بر حسب میلیون در mm³) / مقدار

هماتوکریت = MCV(fl)

(تعداد گلبول قرمز بر حسب میلیون در mm³) / مقدار

هموگلوبین = MCH(pg/cell)

(مقدار هماتوکریت) / (مقدار هموگلوبین) = MCHC(g/dl)

پروتیین کل (روش Tietz, 1986, Modi-biuret) و آلومین (روش Bromocresol green binding, Doumas et al., 1997) با استفاده از کیت تشخیصی شرکت Zieschem اندازه گیری شد و نهایتاً میزان

همگنی واریانس ها بوسیله آزمون Leven آزمایش گردید. سپس با آزمون آنالیز واریانس One Way Anova وجود تفاوت معنی دار در داده های بدست آمده در سطح احتمال ۵ درصد بررسی گردید. برای مقایسه میانگین ها در صورت همگنی واریانس ها از آزمون چند دامنه ای دانکن (Duncan Multiple Range Tests) استفاده گردید.

نتایج

شاخص های هماتولوژی

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۲، میزان اسپیرولینای جیره بر پارامترهای هماتولوژی بچه ماهیان آزاد دریای خزر از جمله تعداد گلبولهای قرمز، تعداد گلبولهای سفید، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین، لنفوسیت، نوتروفیل و اندیس های خونی تاثیر معنی دار داشته است. تعداد گلبولهای سفید، درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین خون، درصد افتراقی گلبولهای سفید، تعداد لنفوسیتها و نوتروفیل ها بچه ماهیان آزاد دریای خزر هم با افزایش سطح اسپیرولینا روند افزایشی نشان دادند بطوریکه کمترین عدد مربوط به تیمار شاهد و بیشترین عدد مربوط به تیمار ۸ درصد بود.

جدول ۲: نتایج پارامترهای هماتولوژی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف اسپیرولینا

پارامترهای هماتولوژی	شاهد	۲درصد	۴درصد	۶درصد	۸درصد
RBC($\times 10^6$)	0.77±0.17 ^{a*}	1.22±0.055 ^c	1.25±0.16 ^{cd}	1.27±0.088 ^d	1.12±0.15 ^b
WBC (cell/ml)	9316±3521/6 ^a	10100±1649/24 ^b	11800±2415/78 ^c	13500±2458/45 ^d	15400±2256/54 ^e
Hct (%)	24/66±1/98 ^a	35/83±1/94 ^b	37/17±1/83 ^c	37/66±0/81 ^c	37/83±5/26 ^c
Hb (g/dl)	4/32±0/61 ^a	7/95±0/36 ^{bc}	7/59±0/75 ^b	8/16±0/31 ^c	8/9±0/51 ^d
LYM (% of WBC)	85/5±3/39 ^a	89/5±1/76 ^b	92/66±7/28 ^c	98/16±1/16 ^d	98/66±0/81 ^d
Neu (% of WBC)	1/16±0/75 ^a	1/16±0/73 ^a	1/33±0/81 ^a	1/67±0/81 ^c	1/5±0/83 ^b
MCV (fl)	280/81±6/96 ^a	298/76±25/03 ^{ab}	300/98±26/45 ^b	332/15±17/8 ^c	337/21±12/2 ^c
MCH (pg)	52/37±1/3 ^a	56/1±1/72 ^a	61/23±4/18 ^a	64/57±2/3 ^{ab}	80/13±6/7 ^b
MCHC (%)	17/63±1/77 ^a	19/98±0/71 ^b	20/4±1/18 ^b	21/68±1/04 ^b	23/78±2/13 ^c

*حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد می باشد.

پروتیین های سرم و سایر شاخص های

بیوشیمیایی

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۳، سطوح اسپیرولینای جیره بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون بچه ماهیان آزاد دریای خزر بجز میزان آلومین اثر معنی دار داشته است ($P < 0/05$). میزان پروتیین کل و گلوبولین با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره تا ۶ درصد کاهش و سپس در تیمار ۸ درصد افزایش یافت. میزان آلومین

خون نیز با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره روند کاهش داشته ولی بین تیمارها اختلاف معنی دار نبوده است. از نظر سایر فاکتورهای بیوشیمیایی خون، گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید نیز بین تیمارها اختلاف معنی دار بوده است ($P < 0/05$). میزان تری گلیسرید، کلسترول و گلوکز خون با افزایش سطح اسپیرولینا بطور معنی داری کاهش نشان داد.

جدول ۳: نتایج سنجش پروتئینها و سایر شاخص های بیوشیمیایی سرم بچه ماهیان آزاد دریای خزر را نسبت به سطوح مختلف اسپیرولینا

شاخص های بیوشیمیایی	شاهد	۲ درصد	۴ درصد	۶ درصد	۸ درصد
پروتئین کل (g/dl)	۲/۶±۰/۴ ^{a*}	۲/۶±۰/۴ ^a	۲/۸±۰/۷ ^b	۳/۱±۰/۳ ^c	۴/۳±۰/۵ ^d
آلبومین (g/dl)	۱/۸±۰/۳ ^a	۱/۸±۰/۳ ^a	۱/۷±۰/۱ ^a	۲±۰/۳ ^a	۲±۰/۲ ^a
گلوبولین (g/dl)	۰/۸±۰/۱ ^a	۰/۸±۰/۱ ^a	۱/۱±۰/۲ ^b	۱/۱±۰/۳ ^b	۲/۳±۰/۳ ^c
گلوکز (mg/dl)	۱۷۲/۵±۱۶/۳ ^e	۱۷۶±۷/۸ ^d	۱۲۱/۵±۱۲/۳ ^b	۱۳۳/۱±۱۵/۹ ^c	۹۴/۵±۸/۲ ^a
کلسترول (mg/dl)	۴۳۸/۶±۴۵/۱ ^d	۴۱۲/۵±۴۷/۳ ^c	۴۰۱/۴±۲۶/۲ ^b	۳۴۶/۸±۴۲/۲ ^a	۳۹۴/۸±۲۱/۶ ^b
تری گلیسرید (mg/dl)	۳۶۹/۹±۵/۳ ^e	۳۵۶/۴±۴/۵ ^d	۳۲۶/۹±۴۵/۸ ^c	۳۲۲/۷±۵۸/۹ ^b	۲۵۳/۸±۶۱/۴ ^a

*حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد می باشد.

شاخص های ایمنی

پارامترهای ایمنی ارزیابی شده در این تحقیق شامل Igm, C₃, C₄، رادیکال آزاد اکسیژن، فعالیت همولیتیک کمپلمان و آنزیم لیزوزیم بود که بر اساس نتایج جداول ۴ و ۵، فعالیت آنزیم لیزوزیم، کمپلمان های C₃، C₄،

ACH50، رادیکال آزاد اکسیژن و ایمونو گلوبولین بطور معنی داری تحت تاثیر سطوح اسپیرولینای جیره قرار گرفتند (P<۰/۰۵). بطوریکه بیشترین میزان این پارامترها در تیمار ۸ درصد و کمترین میزان در تیمار شاهد مشاهده شده است.

جدول ۴: نتایج سنجش آنزیم لیزوزیم در بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف اسپیرولینا

آنزیم لیزوزیم	شاهد	۲ درصد	۴ درصد	۶ درصد	۸ درصد
بعد از ۱۵ ثانیه (μg/ml)	۱/۴۴±۰/۸۲ ^a	۴/۳±۰/۷۵ ^b	۴/۹۵±۰/۳۲ ^c	۷/۳۳±۰/۲۲ ^d	۵/۸۷±۰/۹۳ ^e
بعد از ۱۸۰ ثانیه (μg/ml)	۶/۲۲±۰/۳۵ ^a	۶/۳۲±۰/۳۸ ^a	۶/۷۱±۰/۲۸ ^b	۸/۵۹±۱/۰۶ ^c	۷/۹۵±۰/۴۴ ^d

*حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد می باشد.

جدول ۵: نتایج سنجش فاکتورهای ایمنی در بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف اسپیرولینا

شاخص های ایمنی	شاهد	۲ درصد	۴ درصد	۶ درصد	۸ درصد
C ₃ (μg/ml)	۲۱/۱±۳/۳ ^a	۲۲/۳±۴/۰ ^{ab}	۲۳/۴±۲/۵ ^b	۲۵/۷±۳/۲ ^c	۳۵/۷±۶/۹ ^d
C ₄ (μg/ml)	۱۳/۹±۳/۶ ^a	۱۴/۷±۲/۷ ^a	۱۵/۰±۲/۴ ^a	۱۹/۲±۱/۸ ^b	۲۰/۸±۱/۵ ^b
ACH50 (unit/ml)	۲۲۰/۱±۳/۸۷ ^a	۲۲۵/۱۶±۴/۹۵ ^b	۲۲۸/۲۳±۷/۱۴ ^c	۲۳۴/۳۳±۸/۷۳ ^d	۲۴۷±۴/۷۷ ^e
Igm (ng/ml)	۱۸۳/۴±۲۵/۴ ^a	۱۸۳/۷±۲۱/۷ ^a	۱۹۴/۶±۱۹/۲ ^b	۳۲۱/۵±۱۳/۶ ^c	۳۳۴/۵±۲۵/۸ ^d
O ⁻ (RLU/s)	۳۸۴/۹۶±۲۱/۰۵ ^a	۴۰۱/۵±۱۹/۳۸ ^b	۴۱۵/۵±۲۹/۷۳ ^c	۴۲۹/۲۸±۲۳/۳۱ ^d	۴۷۱/۰۳±۲۳/۷۷ ^e

*حروف متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح پنج درصد می باشد.

بحث

بررسی‌های هماتولوژی یا خون‌شناسی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را جهت نظارت، کنترل و پیش‌وضعیت سلامت و شرایط فیزیولوژیک آبزیان پرورشی فراهم سازد. بر اساس نتایج مطالعه حاضر بین همه تیمارهای آزمایشی از نظر تعداد گلبولهای قرمز، گلبولهای سفید، هماتوکریت، هموگلوبین، لنفوسیت‌ها، نوتروفیل‌ها و اندیس‌های گلبول قرمز تفاوت معنی‌دار وجود داشت. بیشترین تعداد گلبولهای قرمز و سفید و همچنین درصد افتراقی گلبولهای سفید به جز نوتروفیل در تیمار دارای ۸ درصد اسپیرولینا مشاهده گردید و از نظر اندیسهای گلبول قرمز با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره میزان این اندیسها بصورت معنی‌داری افزایش یافت. نتایج بدست آمده در این تحقیق به وضوح تاثیر مثبت اسپیرولینا را بر وضعیت سلامت بچه ماهیان دریای خزر مورد آزمایش نشان می‌دهد. محققان مختلفی چون Abdel Tawwab روی ماهی تیلاپیا و در سال ۲۰۰۹، Krishnaveni در ماهی کاتلا در سال ۲۰۱۳، Salehi Farsani روی ماهی اوزون برون در سال ۲۰۱۶، Andrews و همکاران در سال ۲۰۱۱، Terry در سال ۲۰۰۰ روی تیلاپیا، Promya and Chitmanat در سال ۲۰۱۱ در گربه ماهی آفریقایی، Yong-Chin در سال ۲۰۱۰ در میگوی وانامی، Ibrahem در سال ۲۰۱۳ در تیلاپیای نیل، Ragap در سال ۲۰۱۲ و در ماهی تیلاپیای نیل و بسیاری دیگر از محققان تاثیر مثبت اسپیرولینا را بر پارامترهای هماتولوژی انواع گونه‌های آبزیان تایید نمودند. از آنجایی که گلبول قرمز آزاد ماهیان حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای چرب بلند زنجیره غیر اشباع و مقدار اندکی آلفا توکوفرول (ویتامین E) هستند، یکی از محل‌های اصلی تولیدی

رادیکالهای آزاد می‌باشند که برخی از این اکسیدان‌ها می‌تواند اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر اشباع را در فسفولیپیدهای غشای گلبول قرمز آغاز کنند. در نتیجه تغییر کیفیت (یکپارچگی و اندازه) و کمیت (تعداد) آنها می‌تواند به عنوان شاخصی برای استرس اکسیداتیو باشد (Hamre et al., 1997). افزایش تعداد گلبولهای قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در خون بچه ماهیان آزاد دریای خزر با افزایش سطح اسپیرولینا می‌تواند به دلایل مختلفی از جمله ترکیبات آهن، ویتامین گروه B بویژه B₁₂، ویتامین A و E بالای موجود در اسپیرولینا باشد. آهن موجود در این ریز جلبک به راحتی قابل هضم و جذب است و از فاکتورهای اساسی جهت ساخت هموگلوبین و گلبول قرمز می‌باشد. علت دیگر افزایش پارامترهای خونشناسی مربوط به گلبول قرمز می‌تواند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه اسپیرولینا باشد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالای اسپیرولینا به علت میزان قابل توجه رنگدانه‌ها بویژه Phycocyanobilin‌ها از جمله Phycocyanin، Allophycocyanin و Phycoerythrin در آن می‌باشد که اساساً مسئول فعالیتهای آنتی‌اکسیدانی در بدن هستند. این رنگدانه‌ها مسئول حذف رادیکال‌های پراکساید در بدن می‌باشند و از سرعت همولیز شدن گلبولهای قرمز بوسیله اکسیدانها می‌کاهند و همچنین قابلیت جذب آهن را بطور معنی‌داری افزایش می‌دهند. این تئوری تایید شده که رنگدانه آبی یا فیکوسیانین کمپلکس‌های محلولی با آهن تشکیل می‌دهند و قابلیت جذب زیستی آنرا افزایش می‌دهد. قابلیت جذب آهن موجود در اسپیرولینا دو برابر آهن منابع گیاهی و حیوانی است. علاوه بر این اسپیرولینا حاوی ۱/۱ درصد کلروفیل است که با این میزان یکی از غنی‌ترین منابع کلروفیل در طبیعت است.

شرایط موجود زنده و تغییرات شرایط سلامت تحت تاثیر عوامل داخلی و خارجی را منعکس می کند. از پروتئین های سرم خون برای ارزیابی وضعیت تغذیه، عملکرد کبد و سلامتی استفاده می شود. پروتئین های سرم خون یکی از مهمترین ترکیبات پلاسما و یک سیستم نسبتاً مطمئن بوده که شرایط موجود زنده و تغییرات شرایط سلامت تحت تاثیر عوامل داخلی و خارجی را منعکس می کند. آلومین ها فراوانترین پروتئین موجود در سرم هستند و وظیفه آن ها حفظ فشار اسمزی در آبیان، حمل هورمونهای تیروئید، اسیدهای چرب آزاد، بیلی روبین های غیر متصل و داروها می باشد. همچنین به عنوان یک مخزن متحرک اسیدهای آمینه برای سنتز پروتئین ها عمل می کنند. در هنگام بیماری، سوء تغذیه، استرس و ... میزان آلومین خون کاهش می یابد. از آلومین برای ارزیابی وضعیت تغذیه، عملکرد کبد و سلامتی استفاده می شود. کاهش سطح آلومین در خون ممکن است نشان دهنده ذخیره ناکافی پروتئین بدن باشد. میزان گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید پلاسما متناسب با میزان کاتابولیسم پروتئین و گلابیکوزنولایزیز نوسان دارد (Andersen *et al.*, 1994). مقادیر گلوکز سرم اغلب به عنوان یک نشانگر غیر اختصاصی از استرس بکار می رود. در مطالعه حاضر با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره، سطوح گلوکز، تری گلیسرید و کلسترول خون بصورت معنی داری کاهش می یابد. نتایج تحقیق محققان مختلفی در زمینه تاثیر اسپیرولینا بر میزان گلوکز، تری گلیسرید و کلسترول خون با نتیجه این تحقیق مطابقت دارد (Andrews *et al.*, 2011; Salehi farsani, *et al.*, 2016., Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009; Hernandez, 2012). نوع اسیدهای چرب مصرفی بر

در بسیاری از موارد از کلروفیل به عنوان خون سبز یاد می کنند زیرا شباهت بسیار زیادی به هموگلوبین خون انسان دارد. تاثیر اسپیرولینا در افزایش مقدار هموگلوبین به دلیل تبدیل کلروفیل به هموگلوبین است که دستیابی زیستی آن بسیار از آهن بالاتر و موثر تر است (Oliva-Teles *et al.*, 2001). افزایش تعداد کل گلبولهای سفید و درصد افتراقی آنها با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره نیز ناشی از تحریک سیستم ایمنی ماهی به علت مواد فعال زیستی موجود در این ریزجلبک است. اسپیرولینا یک ماده مقوی و قدرتمند برای سیستم ایمنی محسوب می گردد. دانشمندان علم داروشناسی تایید نمودند که اسپیرولینا نه تنها می تواند باعث تحریک سیستم ایمنی گردد، شدیداً باعث تقویت توان تولید سلول های خونی جدید نیز می گردد (Henrikson, 1998; Watanuki *et al.*, 2006; Yong-Chin *et al.*, 2010; Tongsiri *et al.*, 2016; Shahbazi and Bolhassani, 2016). بر اساس نتایج این تحقیق میزان کل پروتئین های سرم، آلومین ها و گلوبولین ها با افزایش سطح اسپیرولینا افزایش یافت بطوریکه بیشترین میزان در تیمار ۸ درصد و کمترین در تیمار شاهد بوده است. در میزان آلومین علی رغم روند افزایشی بین تیمارها تفاوت معنی دار نبوده ولی از نظر گلوبولین ها بین تیمارها تفاوت معنی دار وجود داشته است. محققان متعددی که در زمینه تاثیر اسپیرولینا بر پارامترهای خون شناسی مطالعاتی انجام داده اند افزایش میزان پروتئین کل سرم، آلومین و گلوبولین را در سطوح بالاتر اسپیرولینا تایید می نمایند (Andrews *et al.*, 2011; Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009; Hernandez, 2012; Schaperclaus *et al.*, 1992; Duncan *et al.*, 1996; Zeinab A.K, 2015). پروتئین های سرم خون یکی از مهمترین ترکیبات پلاسما و یک سیستم نسبتاً مطمئن بوده که

میزان تری گلیسرید و کلسترول خون اثر معنی دار دارد. اساسی ترین اسید چرب اسپیرولینا که در بقیه منابع غذایی کمیاب است، گاما لینولنیک است. گاما لینولنیک اسید پیش ساز پروستاگلاندین ها است و اثر ویژه ای بر کنترل میزان کلسترول خون دارد و به عنوان یک عنصر ساختاری باعث رشد سلولی سریع می گردد. در این مطالعه جهت سنجش وضعیت ایمنی بچه ماهیان آزاد دریای خزر تغذیه شده با سطوح مختلف ریز جلبک اسپیرولینا از فاکتورهای لیزوزیم، کمپلمان C3 و C4، ایمونوگلوبولین، رادیکال آزاد اکسیژن و فعالیت همولیتیک عامل کمپلمان استفاده گردید. سطوح بالای این پارامترها فاکتوری مطلوب در پرورش ماهی به حساب می آید زیرا باعث افزایش توان مقابله ماهی با عوامل پاتوژن در شرایط متراکم پرورش که بصورت مداوم در معرض حجم بالایی از عوامل بیماریزا بویژه باکتریها هستند، می باشد. نتایج تحقیق حاضر نیز در مورد تاثیر اسپیرولینا بر فعالیت لیزوزیم و سیستم عامل مکمل یا کمپلمان، و فعالیت همولیتیک عامل مکمل (ACH50) توسط محققان مختلفی چون Ragap در سال ۲۰۱۲ در تیلایپای نیل، Watanuki در سال ۲۰۰۶ در ماهی کپور معمولی، سلیقه زاده و همکاران در سال ۱۳۹۴ در ماهی بنی، Andrews در سال ۲۰۱۱ در کپور روهو، Ibrahem در سال ۲۰۱۳ در تیلایپای نیل، Promya and Chitmanat در سال ۲۰۱۱ در گربه ماهی، Abdel Tawwab در سال ۲۰۰۹ در تیلایپای نیل، Shimaא در سال ۲۰۱۶ در تیلایپای نیل، Kim در سال ۲۰۱۳ در کفشک ماهی، Krishnaveni در سال ۲۰۱۳ در کاتلا، Salehi Farsani در سال ۲۰۱۶ در ماهی اوزون برون تایید گردید. در همه این مطالعات با افزایش سطح اسپیرولینا میزان این

شاخص ها بطور معنی داری افزایش یافت. ایمونوگلوبولین ها نیز یکی دیگر از ارکان ایمنی اختصاصی در ماهیان به شمار می آیند. افزایش فعالیت سیستم کمپلمان و ایمونوگلوبولین ها تحت تاثیر ریزجلبک ها توسط محققان مختلفی مانند Shimaא در سال ۲۰۱۶ روی تیلایپای نیل، Krishnaveni در سال ۲۰۱۳ روی ماهی کپور کاتلا، Ragap در سال ۲۰۱۲ روی ماهی تیلایپای نیل تایید شده است. بالا بودن سطوح C3 و C4 بیانگر سلامتی ماهی است. زیاد بودن فعالیت کمپلمان سرم در ماهیهای تغذیه شده با جلبک اسپیرولینا میتواند به علت وجود رنگدانه های کاروتنوئیدی موجود در جلبک اسپیرولینا خصوصاً بتاکاروتن باشد که منجر به افزایش فعالیت کمپلمانهای C3 و C4 گردید. در مجموع می توان گفت لیزوزیم، آنتی بادی ها و عامل کمپلمان مانع چسبیدن و تشکیل کلنی میکروارگانسیم های بیماریزا و ممانعت از عفونت و بیماریزایی می شود. رادیکالهای آزاد اکسیژن (O_2)، (H_2O ، O) از جمله موادی هستند که با فعالسازی ماکروفاژها تولید آنها افزایش یافته و توان فاگوسیتی و پینوسیتی آنها را افزایش می دهد. امروزه می توان با اندازه گیری هر کدام از این فاکتورها میزان فعالسازی ماکروفاژها را تعیین کرد. در این تحقیق نیز با افزایش سطح اسپیرولینای جیره میزان رادیکال آزاد اکسیژن در خون بچه ماهیان آزاد دریای خزر بطور معنی داری افزایش می یابد. مطالعات مختلفی در مورد تاثیر مثبت محرکهای ایمنی اعم از پروبیوتیک ها و ریز جلبکها و ... بر میزان رادیکالهای آزاد اکسیژن که نشان دهنده افزایش تحریک فعالسازی سلولهای ماکروفاژی و نتیجتاً افزایش فعالیت سیستم اکسیداز و تولید محصولات پراکسیدی است، صورت گرفته است. تاثیر اسپیرولینا بر

نتایج بررسی سطوح مختلف اسپیرولینا بر فاکتورهای خونشناسی و ایمنی بچه ماهی آزاد دریای خزر نشان داد که ریزجلبک اسپیرولینا در بهبود فاکتورهای ایمنی و خونشناسی این گونه ارزشمند موثر است. جایگزین نمودن ۸-۶ درصد از پودر ماهی جیره با ریز جلبک اسپیرولینا بدون هیچگونه اثر جانبی بر ماهیان مورد آزمایش، بهترین عملکرد فاکتورهای ایمنی و خونشناسی را در بچه ماهیان آزاد دریای خزر ایجاد نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از شرکتهای داروسازی دام و طیور ارس تابان و وارس بازار جهت تامین مواد اولیه مورد نیاز برای جیره سازی و همچنین شرکت تعاونی چندمنظوره نیاک جهت تامین مکان مورد نیاز انجام پروژه اعلام می دارد.

منابع

1. Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H., 2009. Live spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture Research*, 40:1037-1046.
2. Andrews, S.R., Sahu, N., Pal, A., Mukherjee, S., 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.
3. Andersen, H.J., Pellet, L., Tappel, A., 1994. Hemichrome formation, lipid proxidation, enzyme inactivation and protein degradation as indexes of oxidative damage in homogenate of chicken kidney and liver. *Chem. Biol. Interact*, 93:155-169

فعالیت فاگوسیتوزی موجودات زنده نیز توسط محققان مختلفی مانند Abdel-Tawwab و Ahmad در سال ۲۰۰۹ در تیلایای نیل، Dunkan و همکاران در سال ۱۹۹۶ در گربه ماهی آفریقایی، Qureshi و همکاران در سال ۱۹۹۶ روی گربه ماهی، Watanuki و همکاران در سال ۲۰۰۶ روی ماهی کپور معمولی، Kim و همکاران در سال ۲۰۱۳ در ماهی کفشک، Andrews و همکاران در سال ۲۰۱۱ روی کپور روهو، Ibrahem در سال ۲۰۱۳ در تیلایای نیل، Ragap در سال ۲۰۱۲ روی تیلایای نیل تایید شده است. اسپیرولینا علاوه بر کاروتنوئیدها دارای رنگدانه های دیگری به نام Phycocyanobilin ها از جمله Phycocyanin، Allophycocyanin و Phycoerythrin نیز می باشد که اساساً مسئول فعالیت های آنتی اکسیدانی در بدن می باشند. این رنگدانه ها مسئول حذف رادیکال های پراکساید در بدن می باشند و به همراه پلی ساکاریدهای سولفات و پیتیدو گلیکانهای موجود در ساختار اسپیرولینا مسئولیت تحریک و افزایش سطح ایمنی ماهی را از روش های مختلف ایمنی غیر اختصاصی (سلولی و همورال) از جمله تحریک مراکز ساخت گلبولهای سفید (گرانولوسیت ها، منوسیت ها، ماکروفاژها) و افزایش تعداد آنها در خون و فعالسازی آنها، افزایش ترشح و سطح فعالیت لیزوزیم، تقویت سیستم عامل مکمل یا کمپلمان، افزایش ترشح و تولید سیتوکین ها، اینترفرون ها، ایکوزانوئید ها (ترومبوکسان ها، پروستاگلاندین ها، لکوترین ها)، پروتیین فاز حاد و ... و ایمنی اختصاصی همورال (تولید آنتی بادی) شامل ایمونوگلوبولین ها و سلولی (لنفوسیت های B و T) و همچنین باعث بیان ژن های ترشح سیتوکین (عامل کنترل عمل ماکروفاژها و منوسیت ها) می شوند.

- (*Arthrospira platensis*) in Growth, Immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to infection. Journal of Agricultural Science, 5: 6.
16. Jafari, S.M.A., Rabbani, M., Emtiazjoo, M., Piryaei, F., 2014. Effect of dietary *Spirulina platensis* on fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillet. Aquaculture international, 22:1307-1315.
 17. Kalbassi, M.R., Dorafshan, S., Tavakolian, T., Khazab, M., Abdolhay, H., 2006. Karyological analysis of endangered Caspian salmon, *Salmo trutta caspius* (Kessler, 1877). Aquaculture Research, 37: 1341-1347.
 18. Khanzadeh, M., Fereidouni, A.E., Berenjestanaki, S.S., 2016. Effects of partial replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*). Aquaculture international, 24:69-84.
 19. Kim, S.S., Rahimnejad, S., Kim, K. W., Lee, K. J., 2013. Partial replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 197-204.
 20. Krishnaveni, R., Palanivelu, K., Velavan, S., 2013. Effects of probiotics and *Spirulina* supplementation on haemato-immunological function of *Catla catla*. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture, 3:4:176-181.
 21. Kumar, S., Sahu, N.P., Pal, A.K., Dharitri, C., Sona, Y., Mukherjee, S.C., 2005. Effect of dietary carbohydrate on haematology, respiratory burst activity and histological changes in *L. rohita* juveniles. Fish & Shellfish Immunology, 19:331-344.
 22. Lewis, S.M., Dacie, J.P., 1967. The aplastic anaemia-paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. Br J Haematol, 13: 236-251
 23. Lin, H., Chen, X., Yang, Y., Wang, J., Huang, X., Huang, Z., Zhou, C., Wang, Y., Yu, W., Qi, C., 2016. Effect of different levels of *Spirulina platensis* dietary supplementation on the growth, body color,
 4. Becker, E., 2007. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology advances, 25:207-210.
 5. Belay, A., Kato, T., Ota, Y., 1996. *Spirulina* (*Arthrospira*): potential application as an animal feed supplement. Journal of Applied Phycology, 8: 303-311.
 6. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. Journal of fish biology, 5: 6,771-781.
 7. Cao, S.P., Zou, T., Zhang, P.Y., Han, D., Jin, J.Y., Liu, H.K., Yang, Y.X., Zhu, X.M., Xie, S.Q., 2018. Effects of dietary fishmeal replacement with *Spirulina platensis* on the growth, feed utilization, digestion and physiological parameters in juvenile gibel carp (*Carassis auratus gibelio* var. CAS III). Aquaculture Research, 49: 1320-1328.
 8. Doumas, B.T., Peters, Jr. T., 1997. Serum and urine albumin: a progress report on their measurement and clinical significance. Clinica Chimica Acta, 258:1:3-20.
 9. Duncan, P.L., Klesius, P.H., 1996. Effects of feeding *Spirulina* on specific and non-specific immune responses of channel catfish. Journal of Aquaculture Animal Health, 8:308-313.
 10. Ellis, A.E., 1999. Lysozyme Assays. Techniques in Fish Immunology, 101-103.
 11. Gogoi, S., Mandal, S., Patel, A., 2018. Effect of dietary *Wolffia arrhiza* and *Spirulina platensis* on growth performance and pigmentation of Queen loach *Botia dario* (Hamilton, 1822). Aquaculture Nutrition, 24, 285-291.
 12. Hernandez, S.P., 2005. Responsible use of antibiotics in aquaculture. Food and agriculture organization of the United Nations, FAO fisheries technical, paper 469.
 13. Henrikson, R., 1998. Earth food *Spirulina*. California/USA. Ronore Enterprises, 180 p
 14. Houston, A.H., 1980. Components of the haematological response of fishes to environmental temperature change: A review. In "Environmental Physiology of Fishes" (Ali, M. A., ed.) pp. 241-298. Plenum, New York.
 15. Ibrahim, M.D., Mohamed, F.M., Marwa, A.I., 2012. The role of *Spirulina platensis*

31. Ravi, M., Sai Lata, D., Syed A, Solomon F D P., 2010. The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. Nutrition and Dietary Supplements
32. Qureshi, M. A., Ali, R. A., 1996. *Spirulina platensis* exposure enhances macrophage phagocytic function in cats. Immunopharm. Immunotoxicol, 18(3): 457-463.
33. Salehi-Farsani, A., Soltani, M., Kamali, A., Shamsaie, M., 2014. Effect of immune motivator Macrogard and *Spirulina platensis* on some growth, carcass and biochemical indices of stellate sturgeon *Acipenser stellatus*. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society 7:3.
34. Sarker, P., Gamble, M., Kelson, S., Kapuscinski, A., 2016. Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) show high digestibility of lipid and fatty acids from marine *Schizochytrium* sp. and of protein and essential amino acids from freshwater *Spirulina* sp. feed ingredients. Aquaculture nutrition, 22, 109-119.
35. Sedgwick, S.D., 1995. Trout farming handbook, 5th edn. FishingNews Books, Alden Press, Oxford
36. Shahbazi, S., Bolhassani, A., 2016. Immunostimulants: Types and Functions. J Med Microbiol Infec Dis, 4(3-4): 45-51.
37. Shima, A. Amer., 2016. Effect of *Spirulina platensis* as feed supplement on growth performance, immune response and antioxidant status of mono-sex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Benha Veterinary medical journal, 30: 1:1- 10.
38. Schaperclaus, W., Kulow, H., Schreckenbach, K., 1992. Fish Disease. A.A. Balkema, Rotterdam, the Netherlands.
39. Subhadra, B., Lochmann, R., Rawles, S., Chen, R., 2006. Effect of dietary lipid source on the growth, tissue composition and hematological parameters of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture, 255(1): 210-22.
40. Tan, C.Y., Galaz, G.B., Shapawi, R., 2017. Effects of dietary inclusion of *Spirulina* digestion, and immunity of *Trachinotus ovatus*. Israeli Journal of Aquaculture, 68:1285-1294.
24. Li, P., Gatlin, D.M., 2004. Dietary brewer yeast and prebiotic Grobiotic-A influence growth performance, immune responses and resistances of hybrid striped bass to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture, 231:445-456
25. Mustafa, M.G and Nakagawa, H., 1995. A review: dietary benefits of algae as an additive in fish feed. The Israeli journal of aquaculture, Bamidgeh, 47:155-162.
26. 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*. J. Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ, 33:125-132. Oliva-Teles, A., and Gonçalves, P. 2001. Partial replacement of fishmeal by brewer's yeast. *Saccaromyces cerevisiae* in diets for sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles Aquaculture. 202: 269-278.
27. Palmegiano, G.B., Gai, F., Daprà, F., Gasco, L., Pazzaglia, M., Peiretti, P.G., 2008. Effects of Spirulina and plant oil on the growth and lipid traits of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) fingerlings. Aquaculture research, 39: 587-595.
28. Promya, J., 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.
29. Rajabi Islami, H., Arab, N., Assare, R., Rastravan, M.I., Ebtokari, R., 2016. Blood parameters of Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) fingerlings affected by dietary L-ascorbyl-2-polyphosphate. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 15(3): 1167-1186.
30. Ragap, H.M., Khalil, R.H., Mutawie, H.H., 2012. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 2 (2): pp. 26-31.

- of the Mekong giant catfish. Asian Journal of Agricultural Sciences, 2, 106-110.
47. Velasquez, S.F., Chan, M.A., Abisado, R.G., Traifalgar, R.F.M., Tayamen, M.M., Maliwat, G.C.F., Ragaza, J.A. .,2016. Dietary Spirulina (*Arthrospira platensis*) replacement enhances performance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of applied phycology, 28: 1023-1030.
 48. Watanuki, H., Ota, K., Malina, A.S., Kato, T and Sakai, M., 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture, 258:157-163.
 49. Yong-Chin, L., Carina Miranda, T., Chien-Lun, H., Wen-Ching, T., Jiann-Chu,C.,2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and up-regulation of gene expressions after pH stress. Fish & Shellfish Immunology, 29:1092-1098.
 50. Zeinab, A.K., Aly, M.S., Faiza, A., Fatma, E.M., 2015. Effect of *Spirulina platensis* and *Lactobacillus rhamnosus* on growth and biochemical performance of Nile Tilapia(*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci, 4(4): 747-763.
 - meal on growth and hematological parameters of cultured Asian sea bass, *Lates calcarifer*. Borneo Journal of Marine Science and Aquaculture, 1: 1-6.
 41. Tang, H.G., Wu, T.X., Zhao, Z.Y., Pan, X.D ., 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Journal of Zhejiang University Science, 9:684-690.
 42. Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., Yeganeh, S., 2013. The effects of *Spirulina platensis* meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 396:14-19.
 43. Teimouri, M., Yeganeh, S., Amirkolaie, A.,2016. The effects of *Spirulina platensis* meal on proximate composition, fatty acid profile and lipid peroxidation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. Aquaculture Nutrition, 22: 559-566.
 44. Terry, C.H., Cardinale, J.L and Smith, S.A., 2000. Haemotology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis hybrid*). Vet. Clin. Pathol, 29:7-12.
 45. Tietz,N.W.,1986.Textbook of Clinical Chemistry, W.B. Saunders, Philadelphia, PA .
 46. Tongsiri, S., Mang-Amphan, K., Peerapornpisal, Y., 2010.Effect of replacing fishmeal with Spirulina on growth, carcass composition and pigment