فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۳۷، جلد ۱۰، شماره۲، بهار ۹۶، صفحه ۳۷ تا ۵۱

بررسی اثر مکمل غذایی جلبک گراسیلاریا(*Grasilaria pygmaea*) بر روی فاکتورهای خونی ماهی سی‌باس آسیایی(*Lates calcarifer*)

نرجس تنگستانی[۱]، وحید مرشدی[۲]، **محمود نفیسی بهابادی**[۳]، مریم عضدی [۴]، آناهیتا فرهودی[۵]، ابراهیم ستوده[۶]

۱-دانش آموخته کارشناسی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ایران.

۲-استادیار پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ایران.

۳-دانشیار پژوهشکده خلیج فارس و دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ایران. **nafisi2002@gmail.com**

٤-دانشجوی دکتری دانشکده شیلات، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس. ایران.

۵-پژوهشگر پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ایران.

٦-استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۹ تاریخ پذیرش:۹٦/۱/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: در آبزی پروری، جلبک ها به منظور افزایش ایمنی و بازماندگی در ماهیان تجاری مورد استفاده قرار می گیرند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات جایگزینی ماکروجلبک گراسیلاریا با آرد ماهی در جیره غذایی و تاثیر آن روی فاکتورهای خونی ماهی سی باس آسیایی(*Lates calcarifer*) می باشد.

روش کار: برای این منظور ۱۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۲۸ گرم به صورت کاملاً تصادفی با ۳ تکرار و ۳ تیمار در ۱۵ تانک فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری(۱۰ عدد ماهی به ازای هر تانک) توزیع شدند. ماهیان به مدت ٤۰ روز با جیره حاوی ۳، ٦ و ۹ درصد پودر جلبک گراسیلاریا به ازای هر کیلو گرم غذا و گروه کنترل مثبت و کنترل منفی(هر دو فاقد جلبک) تغذیه گردیدند. در پایان آزمایش از سیاهرگ ساقه ی دمی ماهیان خونگیری انجام و شاخص های خونی اندازه گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جایگزینی ماکروجلبک در جیره غذایی ماهی سی باس آسیایی بر روی فاکتورهای خونی ماهی شامل هموگلوبین، هماتوکریت و درصد افتراقی گلبول های سفید تاثیر معنی داری ندارد. اما در تیمار ۳٪ جایگزینی جلبک اختلاف معنی داری در تعداد گلبول سفید، میزان لیزوزیم و پروتئین کل مشاهده گردید($P\leq ۰/۰۵$).

نتیجه گیری: به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جایگزینی جلبک(*Gracilaria pygmaea*) در سطح سه درصد باعث افزایش چشم گیری در میزان گلبول سفید و لیزوزیم نسبت به گروه شاهد گردیده است و مقدار پرتئین در سطح سه و شش درصد افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است.

واژه های کلیدی: جایگزینی، جلبک گراسیلاریا، پارامترهای خونی، پاسخ ایمنی، ماهی سی باس(*Lates calcarifer*).

مقدمه

امروزه با توجه به افزایش روز افزون جمعیت جهانی تقاضا برای غذاهای دریایی افزایش یافته است و از طرفی پرورش ماهی یکی از صنایع مورد توجه در تولید غذای مورد نیاز بشر می باشد؛ به طوری که از سال ۱۹۹۰ رشد فزاینده ای داشته و انتظار می رود که این روند در دهه میلادی حاضر نیز ادامه داشته باشد. ماهی سی باس آسیایی از ماهیان با ارزش دریایی بوده که با نام باراموندی در کشورهای حوزه آسیا و اقیانوس آرام شناخته می شود و در دمای اپتی مم ۳۰-۲۸ درجه سانتی گراد زیست می کند. سازش پذیری با غذای دستی، تکثیر در شرایط اسارت، تحمل در شوری های مختلف، نرخ رشد سریع و قیمت بالای محصول در بازار به واسطه کیفیت بالای گوشت از عواملی است که ماهی سی باس را به یک گونه مناسب برای آبزی پروری تبدیل کرده است (۳۴، ۲۷، ۲۱، ۲). جلبک های دریایی ترکیبات زیستی فعالی مانند فوکوئیدان ها، فلوتانن ها و پلی فنل-

های جلبکی دارند که به عنوان ترکیبات آنتی ویروسی، آنتی باکتریال، آنتی اکسیداتیو مورد توجه قرار گرفته‌اند، هم چنین دارای ترکیباتی از قبیل کاروتنوئید، فیبر، پروتئین، اسیدهای چرب ضروری، ویتامین و مواد معدنی می باشند(۳۶). جلبک گراسیلاریا از خانواده Gracilariaceae و رده Rhodophyta می باشد. این جلبک در سرتاسر جهان پراکنش داشته، که اغلب در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مشاهده می شوند(۶). گونه(*Gracilaria pygmaea*) همه ساله در ناحیه پایین جزر و مدی در سواحل استان بوشهر دیده می شود. از طرفی بیش از ۵۰٪ غذای آبزیان را پودر ماهی تشکیل می دهد که به دلیل گرانی آن و عدم دستیابی به پودر ماهی با کیفیت در کشور و اجبار به واردات، افزایش قیمت تمام شده غذا و در نهایت قیمت تمام شده محصول تولیدی را موجب می شود(۲۶،۸). بنابراین هر گونه جایگزین نمودن این ماده گران قیمت حتی در درصدهای پایین نیز می تواند تاثیر معنی داری در کاهش قیمت غذا و محصول تولیدی و از طرفی افزایش سطح سلامت و بازماندگی را به همراه داشته باشد. در سال‌های گذشته به همین منظور تلاش هایی از سوی محققین صورت گرفته است(۱۵). خون به عنوان یک بافت سیال و سهل الوصول، یکی از مهم ترین مایعات بیولوژیک بدن بوده است که ترکیبات آن تحت تاثیر حالات مختلف فیزیولوژیک، دستخوش نوسان و تغییر می-گردد(۴). یکی از روش های بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی ماهیان تعیین شاخص های خون شناسی است که نسبت به روش های دیگر ساده تر و کم هزینه تر می باشد(۶). عوامل مختلفی نظیر جیره غذایی از عوامل تاثیر گذار بر پارامترهای خونی هستند(۳۲، ۱۲). مکانیسم های دفاعی ایمنی غیراختصاصی، ساختاری و واکنشی بوده و با پیشگیری از اتصال و هجوم یا تکثیر میکروب بر روی بدن یا درون بافت ها از طریق سدهای فیزیکی و شیمیائی موجب حفاظت می شوند. آنتی ژن بیماری زا در صورت غلبه بر خط اول دفاعی، با سیستم دفاعی مایعات بدن(کمپلمان ها، ترانسفرین، آنتی پروتئاز، لیزوزیم، اینترفرون و پروتئین فاز حاد) با سیستم دفاعی سلولی لوکوسیت ها(ماکروفاژها، نوتروفیل ها و لنفوسیت ها) مواجه خواهد شد(۳۴). انواع گلبول سفید ماهیان شامل لنفوسیت ها، مونوسیت ها(ماکروفاژها)، ترومبوسیت ها، گرانولوسیت ها، همگی سلول های فاگوسیتی هستند که بیشترین نقش را در فاگوسیتوز، ماکروفاژها بر عهده دارند(۱۴، ۱۳، ۱۱) و می تواند در وضعیت ایمنی و افزایش بازماندگی ماهی نقشی موثر داشته باشند(۱). بنابراین خون شناسی اهمیت فراوانی در تشخیص اختلالات و بیماری ها دارد. پارامترهای خونی به عنوان شاخصی برای تعیین وضعیت ایمنی آبزی به شمار می آید. بنابراین برای مقایسه ی تاثیر رژیم های غذایی متفاوت بر ایمنی بدن ماهی، می توان شاخص های خونی را مورد بررسی قرار داد(۱۳). مطالعات زیادی تاثیرات افزودن ماکرو و میکروجلبک ها را در جیره ی غذایی ماهی ها مورد بررسی قرار داده اند. به عنوان مثال نتایج چله مال دزفول نژاد و همکاران(۳) در استفاده از جلبک اسپیرولینا بر روی ماهی پنگوسی(*Pangasius hypophtalamus*) نشان داد که افزودن جلبک اسپیرولینا به جیره باعث افزایش در مقدار هموگلوبین گردیده است. تحقیقات Ragaza و همکاران(۲۹) مشخص نمود که تیمار مکمل تغذیه ای جلبک دریایی قرمز(*Denticulatum eucheuma*) بر روی ماهی فلاندر ژاپنی(*Paralichthys olivaceus*) اختلاف معنی داری در هموگلوبین و هماتوکریت باعث نگردیده است. نتایج تحقیق زمان نژاد و همکاران(۷) نشان داد استفاده از جلبک سارگاسوم(*Sargassum illicifolium*) بر روی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) باعث افزایش ایمنی و افزایش در میزان گلبول

سفید گردیده است. نتایج مطالعه سلیقه زاده و همکاران نشان دادند که مکمل تغذیه ای اسپیرولینا در سطح ۱۰٪ باعث افزایش ایمنی ماهی بنی(*Mesopotamichthys sharpeyi*) می شود(۹). از آن جا که تاکنون در خصوص اثرات جایگزینی ماکرو جلبک‌های دریایی بر پارامترهای خون شناسی و ایمنی ماهی سی باس آسیایی(*Lates calcarifer*) گزارشی منتشر نشده است. بنابراین تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر سطوح مختلف ماکروجلبک گراسیلاریا در جیره، بر شاخص های خونی و ایمنی ماهی سی باس انجام گرفت.

مواد و روش ها

محل اجرای این تحقیق، پژوهشکده خلیج فارس واقع در دانشگاه خلیج فارس بوشهر بود. بچه ماهیان مورد استفاده در این پژوهش از یک مرکز خصوصی تکثیر و پرورش ماهیان دریایی واقع در شهر دلوار به بخش تکثیر و پرورش ماهیان دریایی پژوهشکده خلیج فارس منتقل شدند. مراحل عملی و اجرایی این تحقیق از مرداد ماه تا شهریور ماه ۱۳۹۴ انجام گردید. برای شروع کار۱۵۰ قطعه بچه ماهی سی باس آسیایی(*Lates calcarifer*) به مدت ۱۵ روز در تانک‌های ذخیره با شرایط آزمایش و غذای کنستانتره سازگاری پیدا کردند. با شروع دوره‌ی ۴۰ روزه‌ی آزمایش، تعداد ۱۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزن اولیه ۱/۵ ± ۲۸ گرم در یک طرح کاملاً تصادفی بین ۱۵ تانک فایبر گلاس مدور ۳۰۰ لیتری که به صورت کاملاً تصادفی بین تیمارها توزیع شد(۱۰ قطعه ماهی به ازاء هر تانک). غذادهی به ماهیان تیمار شاهد و سایر تیمارها دو بار در روز و در ساعت های ۱۰ و ۱۷ تا حد سیری ظاهری انجام گردید. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب شامل دما با استفاده از دماسنج جیوه ای و اکسیژن محلول با استفاده از اکسی متر(WTW مدل oxi320/set)، pH متر (WTW مدل B3223/set 1) و شوری در طول مدت آزمایش به صورت روزانه اندازه گیری و به ترتیب ۲±۳۴ درجه سانتی گراد، ۵۰ ٪ اشباع، ۸/۱ و ۵۴ گرم در لیتر ثبت شد. دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بود. جلبک استفاده شده در این آزمایش یک گونه از جلبک های دریایی اقتصادی شناسایی شده در کشور که دارای زی توده غالب سواحل جنوب کشور از گروه جلبک های قرمز از منطقه جمع آوری و پس از شستشو درون سینی هایی پخش گردید(به این طریق سطح را گسترش داده تا سریع تر خشک شود) و به مدت۲۴ ساعت در سایه خشک شد. سپس محصول را جمع و در درون Oven در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک و سپس با آسیاب کردن پودر گراسیلاریا به دست آمد(۳۱). پودر جلبک را در درصدهای مختلف در جیره غذایی، پودر ماهی به صورت ذیل جایگزین گردید. تیمار اول با جیره حاوی ۳٪ جلبک به جای پودر ماهی، تیماردوم با جیره حاوی ۶٪ جلبک به جای پودر ماهی، تیمار سوم با جیره حاوی ۹٪ جلبک به جای پودر ماهی، تیمار چهارم، کنترل مثبت(فاقد پودر سویا) و تیمار پنجم کنترل منفی(پودر ماهی و پودر سویا) که هر دو فاقد جلبک بودند، تهیه شد(۳۰). اقلام مختلف غذایی(جدول ۱) را مخلوط و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد در آون خشک و بعد از ۲۴ ساعت، غذا را خرد و برای استفاده ماهیان در یخچال نگهداری شدند. عملیات خونگیری در پایان دوره آزمایش، ۴۰ روز پس از استفاده از غذای حاوی پودر جلبک، با استفاده از ماده بیهوشی دوفنوکسی اتانول و در شرایط یکسان برای آن‌ها انجام گرفت. سپس از هر تانکر به طور کاملاً تصادفی ۴ قطعه ماهی انتخاب(از بین ۱۰ قطعه ماهی از هر تانکر) و نمونه خونی از سیاهرگ ساقه دمی با استفاده از سرنگ و سر سوزن شماره ۲۱ انجام و خون به ویال های حاوی تیوسولفات سدیم ریخته و برای جلوگیری از لخته شدن به مدت ۵ دقیقه تکان داده شدند و به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۳- درجه سانتی گراد

نگهداری شده و بلافاصله فاکتور خونی WBC، هموگلوبین و درصد هماتوکریت محاسبه شد. درصد هماتوکریت با سانتریفیوژ میکروهماتوکریت با سرعت ۷۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه محاسبه شد(۳۲) و مقدار هموگلوبین هر نمونه خون به روش سیان مونت هموگلوبین مورد سنجش قرار گرفت(۲۲). برای شمارش گلبول سفید از پیست های حبابدار(ملانژور) سفید استفاده و با استفاده از لام نئوبار شمارش انجام شد(۱۸). شمارش افتراقی گلبول های سفید پس از گسترش خونی بر روی لام صورت گرفت(۲۱). پس از جداسازی سرم میزان فعالیت لیزوزیم سرم در انتهای آزمایش با استفاده از روش کدورت سنجی اندازه گیری گردید(۲۳). مقدار پروتئین تام سرم با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون به روش فتومتریک اندازه گیری شد(۲۴). تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version 15.1) تحت سیستم عامل Windows انجام و توزیع نرمال داده ها از طریق آزمون(Kolmogrove-Smirnove) انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین مقادیر هر یک از متغییرها از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون Tukey در سطح معنی داری ۰/۰۵ استفاده شد. برای سنجش ترکیب غذا (آنالیز تقریبی غذا) شامل سنجش رطوبت، خاکستر، چربی خام و پروتئین خام از روش AOAC استفاده گردید(۱۹). مقادیر رطوبت بر اساس اختلاف وزن حاصل از قرار دادن نمونه ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به دست آمد. برای تعیین خاکستر، ۰/۵ گرم از نمونه که قبلاً در فریز درایر مدل Operon-Model:OPRFDU 7012 خشک شده، در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت سوزانده شد. برای اندازه گیری پروتئین خام از روش کلدال(Kjeldahl method) با ضریب تبدیل ۶/۲۵ محاسبه می‌شود. مقدار چربی با روش soxtec و به کمک دستگاه soxtec system مدل 2050foss ساخت کشور سوئد اندازه گیری شد. از کلروفرم برای اندازه‌گیری چربی استفاده گردید(۱۹).

جدول ۱- اجزا و ترکیب هر یک از جیره های آزمایشی مورد استفاده در تغذیه ماهی سی باس آسیایی

ترکیبات جیره‌های آزمایشی(درصد)	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم	تیمار پنجم
آرد ماهی	۴۱	۳۸	۳۵	۵۴	۴۴
آرد سویا	۱۵	۱۶/۳۵	۱۹/۳۰	۰	۱۴/۳۰
گلوتن گندم	۱۲	۱۲	۱۲	۱۱/۹	۱۱/۹
آرد گندم	۴/۲۰	۵/۲	۰	۱۰	۵/۳۵
روغن ماهی	۶/۸۰	۶/۸۰	۶/۸۰	۶/۲۵	۶/۷
روغن سویا	۶/۸۰	۶/۸۰	۶/۸۰	۶/۲۵	۶/۷
پودرماکروجلبک گراسیلاریا	۳/۰۰	۶/۰۰	۹/۰۰	۰	۰
مخلوط ویتامین	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
مخلوط مواد معدنی	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
پودر اسکوئید	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵
آنتی اکسیدان	۲	۲	۲	۲	۲
ژلاتین	۵	۵	۵	۵	۵

تیماراول: ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی

نتایج

اثرات جایگزینی ماکروجلبک بر فاکتورهای خونی شامل تعداد گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و نتایج شمارش افتراقی گلبول های سفید در نمودارهای۱ تا ۱۰ ارائه شده است. درصد هماتوکریت بین تیمارهای مختلف آزمایش و گروه های کنترل تفاوت معنی داری

نشان نداد(P>۰/۰۵)، با این حال بیشترین درصد میزان هماتوکریت در تیمار اول(۳٪ جایگزینی)(۰/۸±۳۱/۶۶) و کم ترین آن در تیمار چهارم(کنترل مثبت) (۱/۶۴±۲۵/۸۳) مشاهده شد. هموگلوبین در بین تیمارهای مختلف جایگزینی ماکروجلبک و گروه های شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد(P>۰/۰۵)، با این حال بیشترین میزان هموگلوبین(۰/۴۸±۱۶/۸) در تیمار اول(۳٪ جایگزینی) و کمترین میزان آن(۰/۵۳± ۱۴/۳۷) در تیمار سوم(۹٪ جایگزینی) مشاهده شد. تعداد گلبول-های سفید تحت تاثیر جایگزینی ماکروجلبک جیره قرار گرفت به صورتی که تعداد گلبول های سفید در تیمار اول(۳/۶۹± ۵۲۸۳۳/۳۳) به صورت معنی داری بالاتر از تیمارچهارم(کنترل مثبت)(۶/۹۸±۲۷۸۰۰)بود(P<۰/۰۵). در شمارش افتراقی گلبول های سفید در تیمارهای مختلف آزمایش تفاوت معنی داری بین درصد لنفوسیت ها مشاهده نشد(P>۰/۰۵)، کمترین میزان لنفوسیت در تیمار پنجم(کنترل منفی)(۲/۲۹±۷۶/۴۰) و بیشترین میزان آن در تیمار دوم(۶٪ جایگزینی)(۱±۷۹) مشاهده گردید. در بین نوتروفیل، مونوسیت، بازوفیل و ائوزینوفیل نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد(P>۰/۰۵). پاسخ ایمنی تحت تاثیر جایگزینی ماکروجلبک جیره قرار گرفت به صورتی که میزان لیزوزیم در تیمار اول(۰/۵۶±۳۴) به صورت معنی داری بالاتر از تیمار چهارم(کنترل مثبت)(۰/۵۷±۳۰) بود(P<۰/۰۵). علاوه بر این میزان پروتئین در تیمار دوم(۰/۰۵± ۳/۸) به صورت معنی داری بالاتر از تیمار چهارم(کنترل مثبت)(۰/۵۷±۳۰) مشاهده گردید(P<۰/۰۵).

بحث و نتیجه گیری

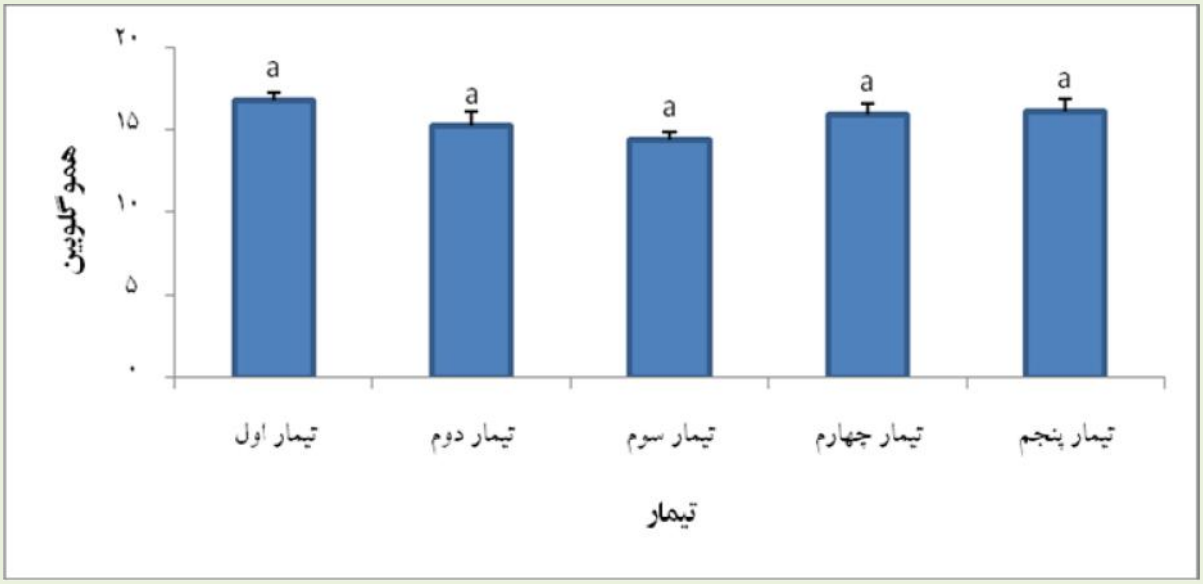
یافته های مطالعه حاضر نشان داد جایگزینی ۳٪ پودر جلبک باعث افزایش معنی داری در تعداد گلبول سفید در ماهی سی باس آسیایی شده است. که دلیل آن را می-توان وجود رنگ دانه های کاروتنوئیدی در جلبک دانست که باعث تحریک نوتروفیل و ماکروفاژها به تولید لیزوزیم در خون می گردد(۹، ۷). تعدادی از محققین مطالعاتی را در مورد تاثیر جلبک بر روی پارامترهای خونی انجام داده اند از جمله Abdel–Tawwab و همکاران(۱۶) در تغذیه ماهی تیلاپیا با جلبک اسپیرولینا گزارش دادند که تعداد گلبول های سفید اختلاف معنی داری را بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد نشان داده است. هم چنین زمان نژاد و همکاران(۷) در استفاده از سه سطح ۵، ۷/۵ و ۱۰ گرم درکیلوگرم جلبک سارگاسوم (*Sargassum illicifolium*) در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Onchorhynchus mykiss*) بیشترین تعداد گلبول‌های سفید را در تیمار ۱۰ گرم در کیلوگرم جلبک گزارش کردند. افزایش معنی داری در تمام تیمارهای جایگزینی جلبک نسبت به تیمار شاهد در تعداد گلبول سفید را مشاهده کردند که مشابه تحقیق حاضر بود. با این حال در نتایج این محققین درصد افتراقی گلبول های سفید بین تیمارهای جایگزینی جلبک و گروه شاهد اختلاف معنی دار مشاهده شد که در تضاد با نتایج مطالعه حاضر می باشد. چله مال دزفول نژاد و همکاران با استفاده از جلبک اسپیرولینا در جیره غذایی ماهی پنگوسی(*Pangasius hypophtalamus*) گزارش دادند که تعداد گلبول های سفید اختلاف معنی داری را بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد نشان نداد که مشابه تیمار ۶ و ۹ درصد جایگزینی در تحقیق حاضر می باشد(۲).

جدول ۲- مقادیر آنالیز تقریبی جیره های مورد آزمایش در ماهی سی باس آسیایی در تیمارهای مختلف آزمایشی

مقادیر آنالیز (درصد)	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم	تیمار پنجم
پروتئین	۴۶/۶۴	۴۵/۴۴	۴۵/۵۰	۴۷/۹۸	۴۷/۶۰
چربی	۱۷/۹۰	۱۷/۶۷	۱۷/۴۵	۱۷/۷۶	۱۷/۹۴
خاکستر	۱۹/۰۰	۲۱/۰۰	۱۹/۰۰	۱۵/۹۰	۱۴/۶۰
رطوبت	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰

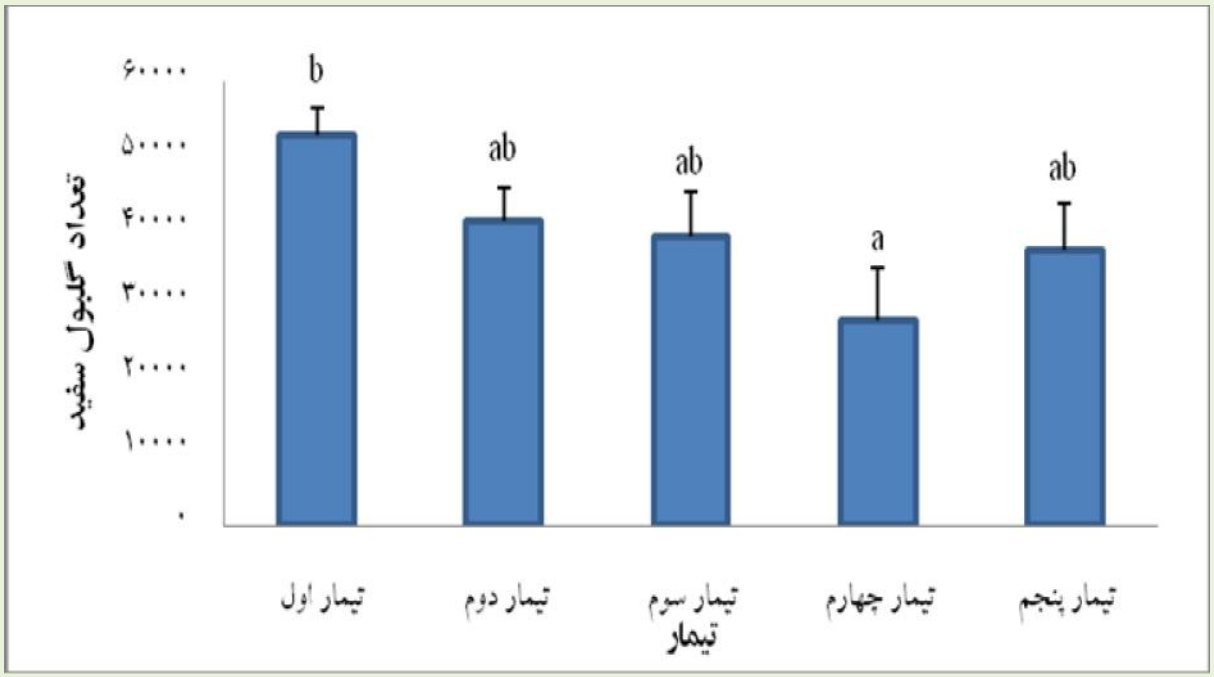
نمودار ۱- تغییرات میانگین هماتوکریت(درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



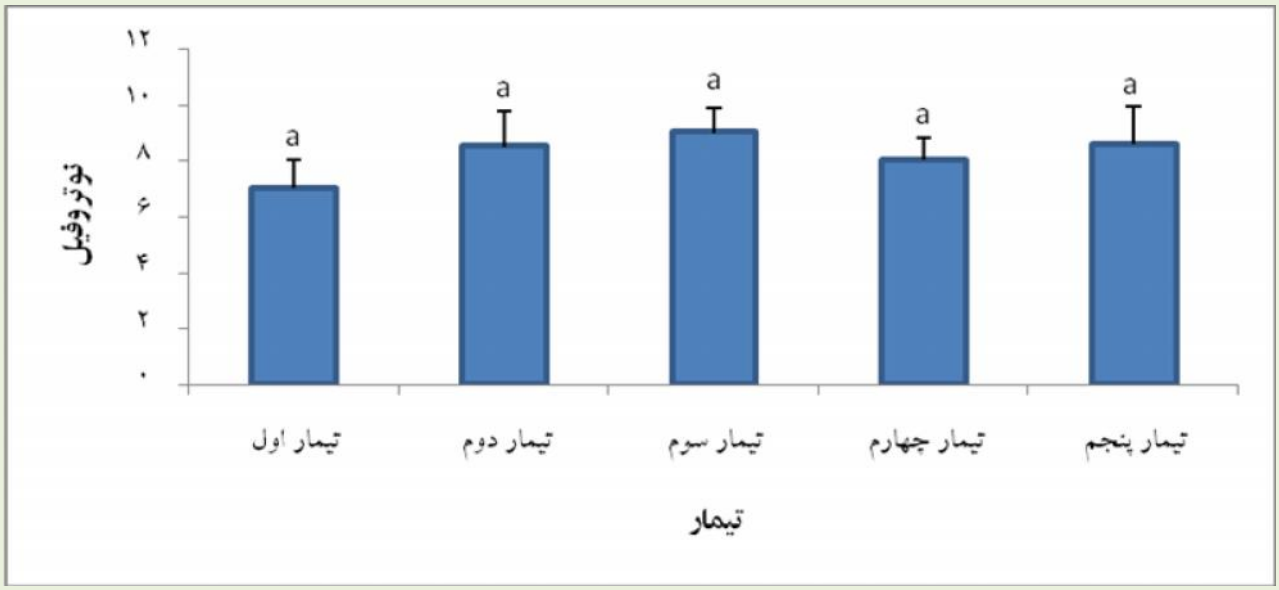
نمودار ۲- تغییرات میانگین هموگلوبین (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



نمودار ۳: تغییرات میانگین گلبول سفید (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی

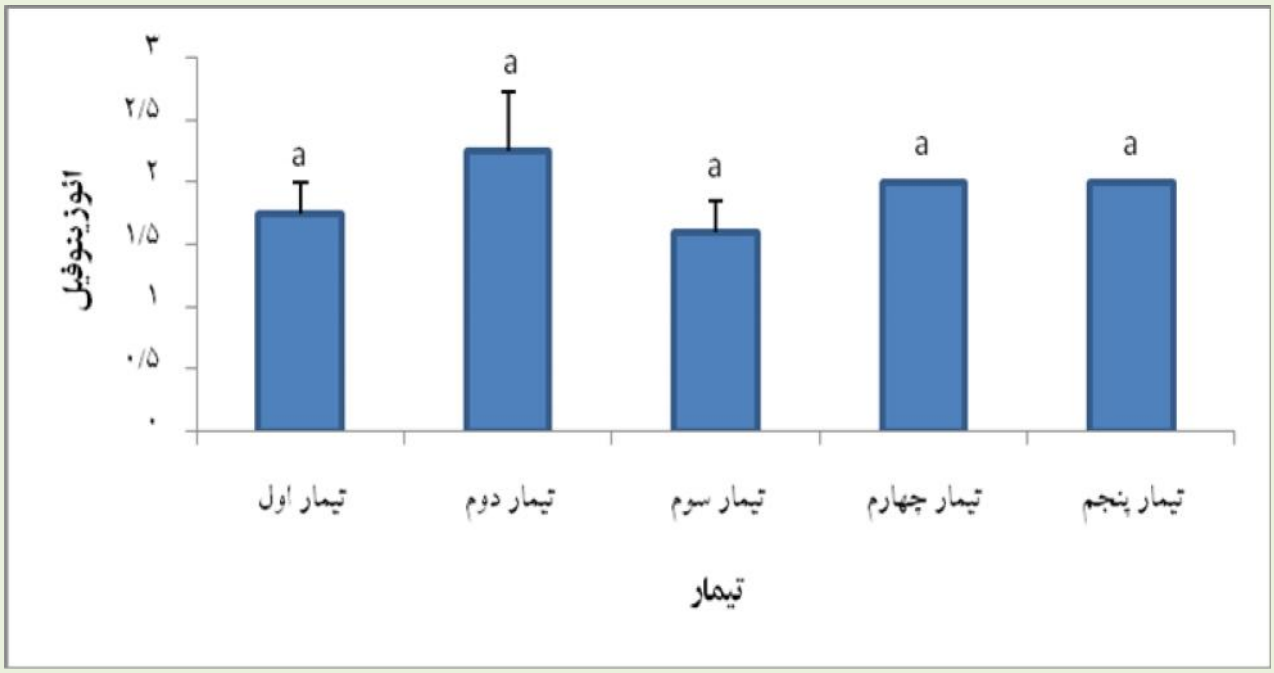


نمودار ٤: تغییرات میانگین نوتروفیل (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی

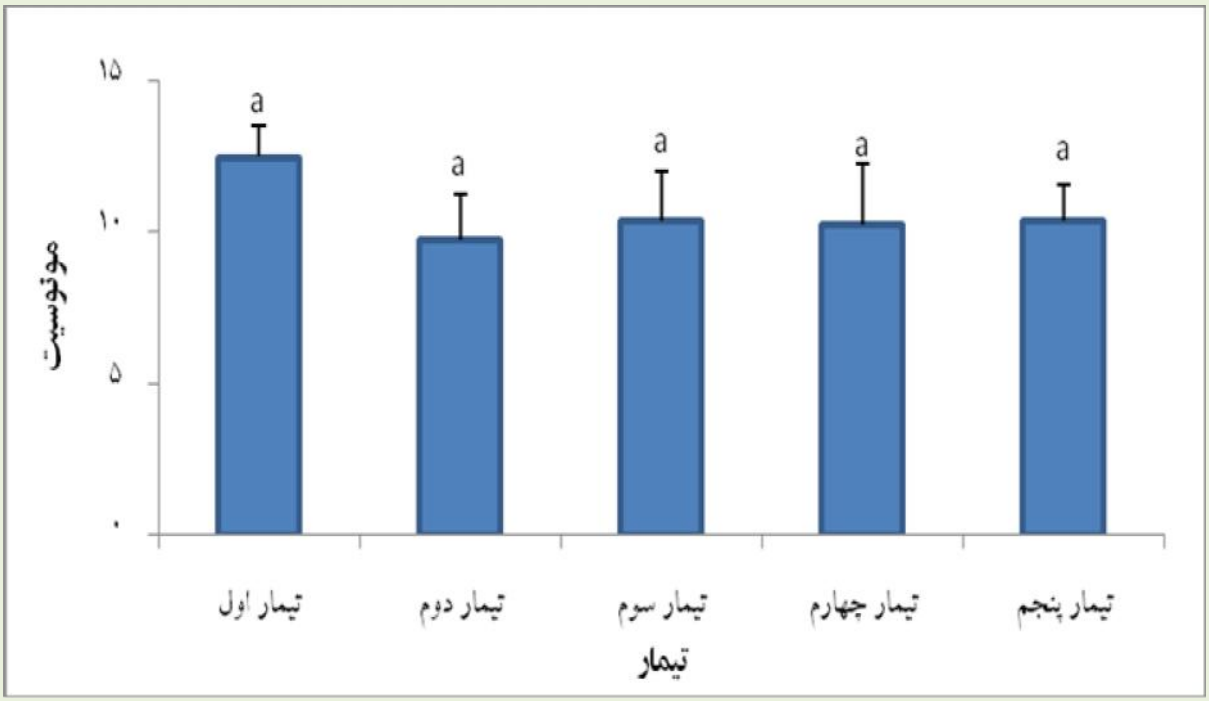
نمودار ۵- تغییرات میانگین لنفوسیت (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



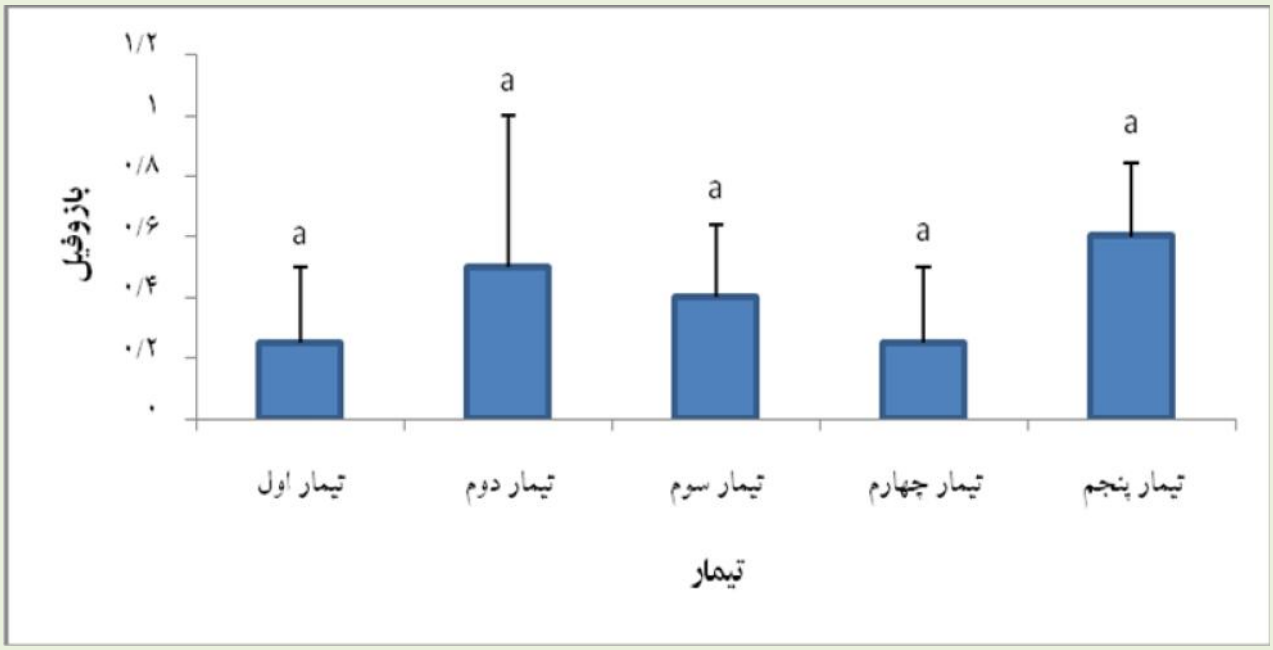
نمودار ٦- تغییرات میانگین ائوزینوفیل (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



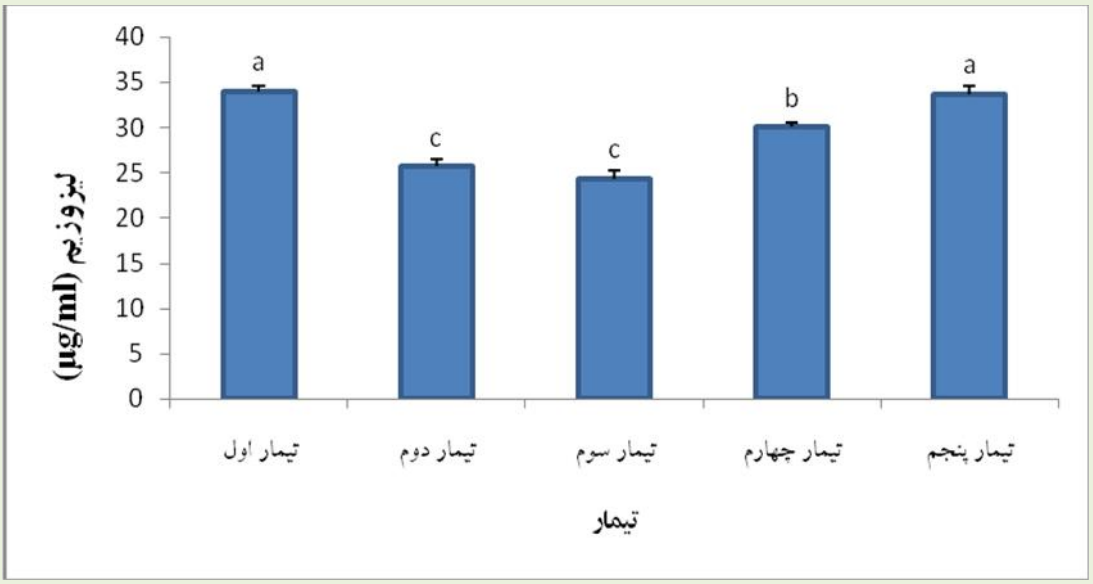
نمودار ۷- تغییرات میانگین مونوسیت (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



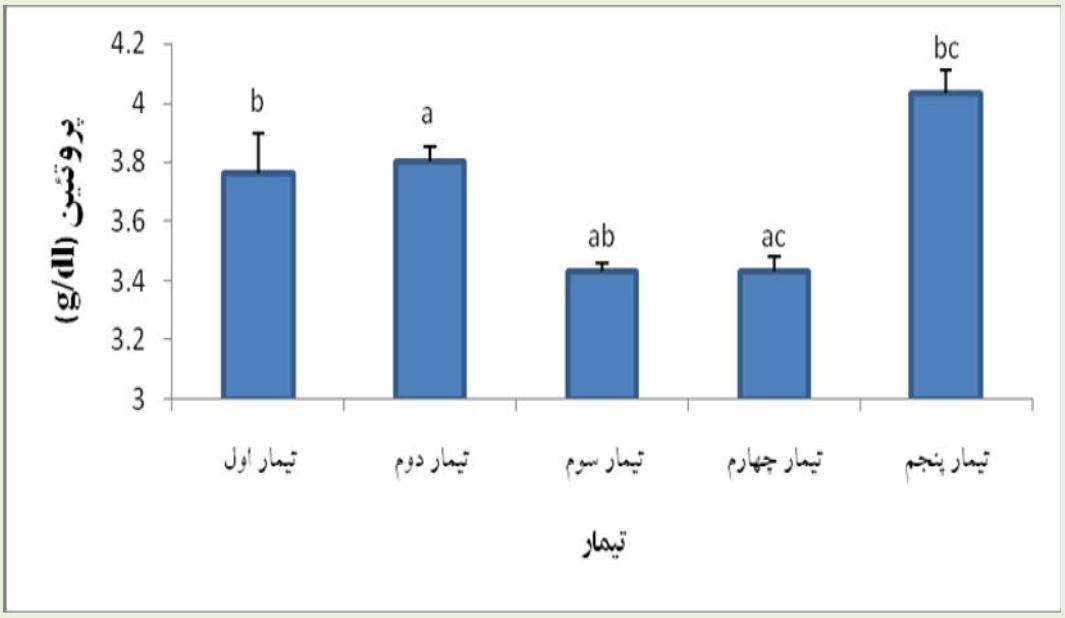
نمودار ۸-تغییرات میانگین بازوفیل (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



نمودار ۹- تغییرات میانگین لیزوزیم (µg/ml) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی



نمودار ۱۰-تغییرات میانگین پروتئین (g/dl) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ٤٠ روز.

تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمارپنجم: کنترل منفی

در مطالعه حاضر غلظت هموگلوبین با افزایش مقدار گراسیلاریا در جیره غذایی نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی داری مشاهده نشد که با نتایج Mustafa و همکاران، Andrews و همکاران، سلیقه زاده و همکاران مشابه بود که با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره غذایی اختلاف معنی داری در میزان هموگلوبین مشاهده نکردند(۲۸، ۱۷، ۹). برخلاف نتایج تحقیق حاضر، چله مال دزفول نژاد و همکاران در تغذیه ماهی پنگوسی با سطوح مختلف جلبک اسپیرولینا نشان دادندکه افزودن این جلبک به جیره تاثیر چندانی بر فعالیت خونسازی

نداشته است؛ اما باعث افزایش در مقدار هموگلوبین گردیده است که این مسئله را می تواند به دلیل وجود کلروفیل در جلبک اسپرولینا عنوان کرد(۲). برخی محققین در بسیاری از موارد از کلروفیل به عنوان خون سبز یاد می کنند زیرا شباهت بسیار زیادی با هموگلوبین خون انسان دارد. تاثیر اسپیرولینا در افزایش مقدار هموگلوبین به دلیل تبدیل کلروفیل به هموگلوبین است که دستیابی به آن بسیار بهتر از آهن است(۳). در مطالعه حاضر درصد هماتوکریت با افزایش نسبی پودر جلبک در جیره نسبت به گروه شاهد بیشتر شد اما بین تیمارها اختلاف معنی داری نشان نداد. مشابه نتایج تحقیق حاضر، Ragaza و همکاران در استفاده از جلبک دریایی قرمز(*Eucheuma denticulatum*) بر روی ماهی کفشک زیتونی(*Paralichthys olivaceus*) گزارش دادند که افزودن جلبک به جیره باعث اختلاف معنی داری در هموگلوبین و هماتوکریت نگردیده است(۲۹). در تضاد با نتایج تحقیق حاضر Kim و همکاران در مطالعه بر روی اثرات جلبک اسپیرولینا در طوطی ماهی(*Fasciatus oplegnthus*) مشاهده کردند که افزایش جلبک اسپیرولینا در جیره این ماهیان باعث افزایش میزان هماتوکریت شده است که می تواند ناشی از اثرات این جلبک و ترکیبات موجود در آن بر مراکز خونسازی بدن و بافت های هماتوکریت بوده و باعث افزایش تولید هموگلوبین و گلبول های قرمز خون و متعاقباً افزایش هماتوکریت گردد(۲۵). هم چنین در مطالعه Mustafa و همکاران و سلیقه زاده و همکاران با افزایش سطح اسپیرولینا کاهش درصد هماتوکریت را مشاهده کردند(۲۸، ۹). بررسی تاثیر جلبک گراسیلاریا بر روی سلول های خونی در این آزمایش و مقایسه آن ها با تحقیق های مشابه سایر محققین بیان گر این موضوع است که تفاوت ها و تشابه هایی بین نتایج این آزمایش و نتایج سایر محققین می تواند به عوامل محیطی، گونه ی ماهی، شرایط آزمایش درصد استفاده از جلبک در جیره نسبت داده شود. لیزوزیم یک آنزیم تجزیه کننده ی قوی موجود در خون و بافت های لنفوئید ماهیان است. این آنزیم دارای نقش زیادی درپاسخ ایمنی ماهی بوده و یکی از مهم ترین فاکتورها در مقاومت طبیعی ماهیان محسوب می شود(۳۳). فعالیت لیزوزیم در انتهای آزمایش در تیمار ۳ درصد از بالاترین میزان برخوردار بود و اختلاف معنی داری با گروه شاهد داشت. مشابه با نتایج تحقیق حاضر را می توان در آزمایش چله مال دزفول نژاد و همکاران مشاهده کرد که در همه ی تیمارهای حاوی جلبک، در مقایسه با گروه شاهد دارای روند افزایشی بود(۲). بیشترین مقدار فعالیت لیزوزیم در تیمارهای حاوی پودر جلبک مشاهده گردید و اختلاف معنی داری بین ماهیان گروه شاهد و همه گروه های تیماری وجود داشت. در تحقیق زمان نژاد و همکاراندر همه ی تیمارها فعالیت لیزوزیم با افزایش مقدار جلبک افزایش یافت(۷). هرگونه تغییر در سطح پروتئین تام پلاسما می تواند به عنوان یک شاخص بالینی در پایش سلامت سیستم ایمنی، کبد و کلیه مورد استفاده قرار گیرد(۱۰). عوامل متعددی بر ایمنی تأثیرگذار هستند و آن ها را دستخوش تغییرات می کنند، که از جمله ی این عوامل میتوان تغذیه ی ماهی را نام برد(۱۲). میزان پروتئین تام در پایان آزمایش تحقیق حاضر اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و سایر تیمارها نشان داد. نتیجه ی مطالعه ی حاضر با نتایج به دست آمده از برخی مطالعات مشابه است به عنوان مثال Andrews و همکاران(۱۷)، Mustafa و همکاران(۲۸) و Tawwab-Abdel همکاران(۱۶) با افزایش سطح اسپیرولینا در جیره‌ی غذایی مشاهده کردند که میزان پروتئین تام دارای اختلاف معنی داری نسبت به گروه کنترل بود. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که استفاده از جلبک(*Gracilaria pygmaea*) در جیره غذایی ماهی

سی باس آسیایی بر روی فاکتورهای خونی ماهی شامل هموگلوبین و هماتوکریت تاثیر معنی داری ندارد اما در سطح ۳٪ می تواند باعث افزایش تعداد گلبول های سفید در ماهی سی باس آسیایی شود و تاثیر مثبت بر پاسخ ایمنی ماهی سی باس آسیایی دارد، به طوری که میزان پروتئین در سطح ۶ درصد و میزان لیزوزیم در سطح ۳ درصد افزایش معنی داری نسبت به گروه شاهد داشته است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با مساعدت و پشتیبانی پژوهشکده خلیج فارس و معاونت پژوهشی دانشگاه خلیج فارس بوشهر و همکاری پرسنل این مجموعه انجام شده است که بدین وسیله از تلاش این عزیزان قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

۱–احمدی فر، ا.، جلالی، م.ع.، سوداگر، م.، آذری تاکامی، ق.، محمدی زرج آباد.، ا.ا. ۱۳۹۰. اثرات آکواک آرگوسان (*Aguavac ergosan*) بر میزان رشد، بازماندگی و شاخص های مربوط به خون در فیل ماهیان جوان (*Huso huso*). مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، شماره ۱۶; ۸۰-۷۲.

۲– چله مال دزفول نژاد، چ.، جهانگیری زاده، م.، مصباح، م.، جواهری بابلی، م. ۱۳۹۱. تاثیر تغذیه با اسپیرولینا (*spirulina Platenis*) بر فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی در ماهی پنگوسی(*Pangusius hypophtalamus*). مجله محیط زیست جانوری، شماره۲; ۳۳-۲۵.

۳–حامدی، ش.، رحیمی، ر.، نفیسی بهابادی، م.، عضدی، م. ۱۳۹۴. تاثیر سطوح مختلف شوری بر شاخص های خون شناسی ماهی سی باس آسیایی(*Lates calcarifer*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، شماره پیاپی ۳۰(۸); ۳۳-۲۱.

٤–خواجه، غ.، پیغان، ر. ۱۳۸۶. بررسی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Onchorhynchus mykiss*)پرورش یافته در استخرهای خاکی، مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۲(۳); ۲۰۳-۱۹۷.

۵–ربیعی، ر.، اسدی، م.، نژاد ستاری، ط.، مجد، ا.، سهرابی پور، ج. ۱۳۸۶. بررسی تنوع گونه‌ای جلبک‌ها در رویشگاه جلبک قرمز(*Gracilaria salicornia*) در سواحل قشم. مجله پژوهش و سازندگی، ۶۶; ۹۲-۸۵.

٦–رحیمی بشر، م.، تهرانی فرد، ا.، قاسمی نژاد، ا.، علیپور.، فلاح چای، م. ۱۳۸۶. تعیین برخی از فاکتورهای خونی ماهی سفید دریای خزر(*Rutilus frissii kutum*) در مراحل مختلف رشد گنادی. مجله علوم زیستی، ۳; ۵۶-۴۵.

۷–زمان نژاد، ن.، عمادی، ح.، حسین زاده صحافی، ا. ۱۳۹۴. بررسی اثر تغذیه ای جلبک (*Sargassum illicifoli*) بر تغییرات سطوح ایمونوگلوبولین (IgM) و لیزوزیم در ماهی قزل آلارنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*). مجله پژوهش علوم و فنون دریایی، ۱۰(۴);۷۰-۵۹.

۸–سراجیان، ش.، زمینی، ع.ع.، یوسفیان، م.، سعید، ع.ا.، جعفری، ع. ۱۳۸۶. بررسی مقایسه ای سطوح برخی هورمون-های استروئیدی جنسی سرم خون در مولدین نارس و بالغ کفال طلایی دریایی خزر(*Liza auratus*). مجله شیلات، ۳; ۶۰-۵۱.

۹–سلیقه زاده، ر.، یاوری، و.، موسوی، م.، ذاکری، ز. ۱۳۹۳. اثر مکمل جلبک اسپیرولینا (*SpirulinaPlatenis*) بر برخی فاکتورهای خونی، ایمنی و بیوشیمیایی سرم ماهی بنی (*Mesopotamichthys Sharpeyi*). مجله دامپزشکی ایران، دوره ۱۰(۲);۴۶-۴۰.

۱۰–سلطانی، م. ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران، ۲۶۲صفحه.

۱۱–شهیدی یا ساقی، ا.، مازندرانی، م.، قربانی حسن سرایی، آ.، قربانی، ر.، سلیمانی، ن. ۱۳۸۷. اندازه گیری مقادیر طبیعی برخی فاکتورهای سرم خون (الکترولیت و غیرالکترولیت) تاسماهی ایرانی. مجله شیلات، شماره ۱; ۳۲-۲۵.

۱۲–محمودی، ن.، عبدی، ح.، فلاحتکار، ب. ۱۳۸۹. تاثیر سطوح مختلف نوکلئوتید جیره بر شاخص های هماتولوژی و

بیوشیمیایی خون ماهی کپور معمولی(*Cyprinus carpio*). مجله علوم و فنون دریایی، دوره ۹(۳); ۴-۱۲.

۱۳–محمدی، م.، تجری، م. شانسی، ن.، کلنگی میاندره، ح.، عظیمی، ع.، هاشمی رستمی، م. ۱۳۹۱. نوسانات شوری بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون بچه تاس ماهی انگشت قد(*Acipenser persicus*) ایرانی. مجله توسعه آبزی پروری. سال ۶(۲); ۷۹-۶۷.

۱٤–وثوقی، غ.، شاهسونی، د. ۱۳۷۶. بررسی فاکتورهای خونی ماهی حوض. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۲(۴); ۷۰-۶۱.

۱۵–نفیسی بهابادی، م.، محمود زاده، ه.، سلطانی، م.، احمدی، م.ر. ۱۳۸۰. جایگزینی آرد ضایعات کشتارگاهی طیور به جای آرد ماهی در جیره غذایی مرحله پرواری ماهی قزل آلای رنگین کمان در آب لب شور. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶(۲);۴۰-۳۳.

16. Abdel– Tawwab, M., Mohammad, H., Ahmad Yasser, M., Abdel, H. (2008). Use of Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter *Oreochromis niloticus*(L) fry challenged with pathogenic (*Aeromonas hydrophila*). International Symposium on Tilapia in Aquaculture Cairo, 1015-1032.

17. Andrews, S.R., Sahu, N.p., Pal, A.K., Mukherjee, S.C., Kumar S. (2011). Yeast and Spirulina in diets for (*Labeo rohita)* fingerlings affect haemato immunological responses and survival following*(Aerominas hydropila*) challenge. Research in Veterinary Science, 91; 103-109.

18.AOAC. (2005). Official Method of Analysis 17th (end), Washington. DC: Association of Official Analytical Chemists.

19. Barros, M.M., Lim, C., Klesius, P.H. (2002). Effect of iron supplementation to cottonseed meal diets on growth performance of channel catfish, (*Ictalurus punctatus)*. Aquacalture, 10; 65 -86.

20. Blaxhall, P.C., Daisley, K.W. (1983). Routine hematological methods for use fish with blood. Journal of Fish Biology, 5; 771-781.

21. Boonyaratpalin, M., Suraneiranat, P., Tunpibal, T. (1998). Replacement of fishmeal with various types of Soybean products in diets for Asian seabass (*Lates calcarifer)*. Aquaculture, 161; 67–78.

22. Drobkin, D.R. (1945). Crystallographic and optical properties of human hemoglobin: a proposal for the standardization of hemoglobin. American Journal of the Medical Sciences, 209; 268-270.

23. Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assays. In techniques in fish immunology (ed. By J.S. Stolen, T.C. Fletcher, D.P. Anderson, B.S. Roberson, W.B. Van Muiswinkel). USA, SOS publications, Fair Haven, NJ, 101-103.

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

25. Kim, S.S., Rahimnejad, S, Kim, R.W., Lee, K.L. (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.

26. Lovell, R.T. (2002). Diet and fish husbandry, In: J.E. Halver, R.W. Hardy (Eds). Fish Nutrition, Academic Press, San Diego, 703–754.

27. Mathew, G. (2009). Taxonomy, identification and biology of Seabass(*Lates calcarifer*). National Training on 'Cage Culture of Seabass. CMFRI, 14- 23.

28. Mustafa, M.G., Takeda, T., Umino, T., Wakamasu, S., Nakagawa, H. (1994). Effects of Ascophllum 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.

29. Ragaza, J.A., Koshio, Sh., Mamauag, R.E., Ishikawa, M., Yokoyama, S., S Villamor, Sh. (2015). Dietary supplemental effects of red seaweed(*Eucheuma denticulatum)* on growth performance, carcass composition and blood chemistry of juvenile Japanese flounder,(*Paralichthys olivaceus)*. Aquaculture Research, 46; 647–657.

30. Rehulka, J. (2000). Influence of astaxanthin on growth rate. Condition and some blood indices of rainbow- trout. Aquaculture, 190; 27-47.

31. Rios, F.S., Kalinin, A.L., Rantin, F.T. (2002). The effects of long term food deprivation on respiration and haemato long of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. Journal of fish Biology, 61; 85-95.

32. Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172; 63-92.

33. Singh, R.K. (2000). Growth, survival and production of (*Lates calcarifer)* in a seasonal rain-fed coastal pond of the Konkan region, Aquaculture, 8; 55-60.

34. Shapawi, R., Zamry A.A. (2016). Response of Asian seabass, *Lates calcarifer* juvenile fed with different seaweed-based diets, Journal of Applied Animal Research, 44; 121-125.

35. Trono, J.R., Gavino, C. (1997). Field guide and Atlas of the Seaweed. Resources of The Philippines. 306.

36. Whyte, S.K. (2007). The innate immune response of finfish; A review of current knowledge. Fish and Shellfish Immunology, 23; 1127-1151.

Effects of Partial Substitution of Macro Algae *Gracilaria pygmaea* with Fish Meal on Some Blood of Asian Sea Bass *(Lates calcarifer*)

N. Tangestani[1], V. Morshedi[2], M. **Nafisi Bahabadi**[3], M. azodi[4], A. Farhodi[5], E. sotoudeh[6]

1.Bsc Graduated of Fisheries, University of Persian Gulf, Bushehr. Iran.

2.Associate Professor of Institute of Persian Gulf and Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Persian Gulf, Bushehr.Iran.

3.Assistant Professor of Institute of Persian Gulf, University of Persian Gulf, Bushehr. Iran.

nafisi2002@gmail.com

4.Research of Institute of the Persian Gulf, Persian Gulf University, Bushehr. Iran.

5.PhD student, the Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas. Iran.

6.Assistant Professor of Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Persian Gulf, Bushehr. Iran.

Received:2016.10. 12 **Accepted: 2017.14. 4**

Abstract

Inroduction & Objective: In aquaculture, algae to increase immunity and survival of fish used commercially. The purpose of this study was to evaluate the effects of replacing fish meal with Grasilaria macroalgae in the diet and its effect on blood factors in Asian Sea bass (*Lates calcarifer*).

Material and Methods: For this purpose, 150 pieces of fish with an average weight of 28 grams perfectly with 3 replications and 3 treatments in the 15, 300-liter fiberglass tanks (10 fish per tank) were distributed. Fish for 40 days with a diet containing 3, 6 and 9 percent macroalgae powder Grasilaria per kg of food and two groups of positive and negative controls (both no algae) were fed. At the end of the experiment the fish Caudal vein collected blood samples and blood parameters were measured.

Results: The results of the present study showed that the replacement of macroalgae in the diet of Asian Sea bass on fish blood factors including hemoglobin, hematocrit and differential percentage of white blood cells have no significant effect. But, at the treatment of 3% replacement of macroalgae were observed significant different in levels of white blood cells count, lysozyme and total protein amount (P <0.05).

Conclusion: The results of this study showed that replacement of macroalgae (*Gracilaria pygmaea*) at level of 3 percent have resulted in significantly increase in the white blood cells and lysozyme than the control group and the amount of total protein at the 3 and 6 percent had a significant increase compared to the control group.

Keywords: Replacement, Seaweed, Blood Parameters, Immune Response**,** Fish Sea Bass (*Lates calcarifer)*