

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

نرجس تنگستانی<sup>۱</sup>، وحید مرشدی<sup>۲</sup>، محمود نفیسی بهابادی<sup>۳</sup>، مریم عضدی<sup>۴</sup>، آناهیتا فرهودی<sup>۵</sup>، ابراهیم ستوده<sup>۶</sup>

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](mailto:nafisi2002@gmail.com)

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

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

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

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۵

### چکیده

زمینه و هدف: در آبی پروری، جلبک‌ها به منظور افزایش ایمنی و بازماندگی در ماهیان تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات جایگزینی ماکرو جلبک گراسیلاریا با آرد ماهی در جیره غذایی و تاثیر آن روی فاکتورهای خونی ماهی سی‌باس آسیایی (*Lates calcarifer*) می‌باشد.

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 ۴۰ روز با جیره حاوی ۳، ۶ 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 ساقه‌ی دمی ماهیان خونگیری انجام و شاخص‌های خونی اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که جایگزینی ماکرو جلبک در جیره غذایی ماهی سی‌باس آسیایی بر روی فاکتورهای خونی ماهی شامل هموگلوبین، هماتوکریت و درصد افتراقی گلبول‌های سفید تاثیر معنی‌داری ندارد. اما در تیمار ۳٪ جایگزینی جلبک اختلاف معنی‌داری در تعداد گلبول سفید، میزان لیزوزیم و پروتئین کل مشاهده گردید (P < 0/05).

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

واژه‌های کلیدی: جایگزینی، جلبک گراسیلاریا، پارامترهای خونی، پاسخ ایمنی، ماهی سی‌باس (*Lates calcarifer*).

### مقدمه

شناخته می‌شود و در دمای اپتی مم ۳۰-۲۸ درجه سانتی‌گراد زیست می‌کند. سازش پذیری با غذای دستی، تکثیر در شرایط اسارت، تحمل در شوری‌های مختلف، نرخ رشد سریع و قیمت بالای محصول در بازار به واسطه کیفیت بالای گوشت از عواملی است که ماهی سی‌باس را به یک گونه مناسب برای آبی‌پروری تبدیل کرده است (۲، ۲۱، ۲۷، ۳۴). جلبک‌های دریایی ترکیبات زیستی فعالی مانند فوکوئیدان‌ها، فلوتانن‌ها و پلی‌فنل-

امروزه با توجه به افزایش روزافزون 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 می‌باشد؛ به طوری که از سال ۱۹۹۰ رشد فزاینده‌ای داشته و انتظار می‌رود که این روند در دهه میلادی حاضر نیز ادامه داشته باشد. ماهی سی‌باس آسیایی از ماهیان با ارزش دریایی بوده که با نام باراموندی در کشورهای حوزه آسیا و اقیانوس آرام

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 (۲۶۸). 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 شیمیایی موجب حفاظت می شوند. آنتی ژن بیماری زا در صورت غلبه بر خط اول دفاعی، با سیستم دفاعی مایعات بدن (کمپلمان ها، ترانسفرین، آنتی پروتاز، لیزوزیم، اینترفرون و پروتئین فاز حاد) با سیستم دفاعی سلولی لوکوسیت ها (ماکروفاژها، نوتروفیل ها و لنفوسیت ها) مواجه خواهد شد (۳۴). انواع گلوبول 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 میکرو جلبک 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 اسپرولینا بر روی ماهی پنگوسی (*Pangasius hypophthalmus*) نشان داد که افزودن جلبک اسپرولینا 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 euclideanum*) 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 آلا ی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) باعث افزایش ایمنی و افزایش در میزان گلوبول

گیری و به ترتیب  $2 \pm 34$  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 مدت ۲۴ 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

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 جلبک های 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 ماکرو جلبک 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 دلووار 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 کار ۱۵۰ قطعه بچه ماهی سی باس آسیایی (*Lates calcarifer*) به مدت ۱۵ روز در تانک های ذخیره با شرایط آزمایش و غذای کنستانتتره سازگاری پیدا کردند. با شروع دوره ی ۴۰ روزه ی آزمایش، تعداد ۱۵۰ قطعه ماهی با میانگین وزن اولیه  $1/5 \pm 28$  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). غذاهای 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 فیزیوشیمیایی آب شامل دما با استفاده از دماسنج جیوه ای و اکسیژن محلول با استفاده از اکسی متر (WTW مدل ox1320/set pH متر (WTW مدل B3223/set 1) و شوری در طول مدت آزمایش به صورت روزانه اندازه

نگهداری شده و بلافاصله فاکتور خونی WBC، هموگلوبین و درصد هماتوکریت محاسبه شد. درصد هماتوکریت با سانتریفیوژ میکروهیاتوکریت 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 حبایدار (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 تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (version 15.1) تحت سیستم عامل Windows انجام و توزیع نرمال داده ها از طریق آزمون (-Kolmogrove

Smirnov) انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین مقادیر هر یک از متغیرها 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 می شود. مقدار چربی با روش soxtec و به کمک دستگاه soxtec مدل 2050foss ساخت کشور سوئد اندازه گیری شد. از کلروفرم برای اندازه گیری چربی استفاده گردید (۱۹).

جدول ۱- اجزا و ترکیب هر یک از جیره های آزمایشی مورد استفاده در تغذیه ماهی سی‌باس آسیایی  
ترکیبات جیره های آزمایشی (درصد) تیمار اول تیمار دوم تیمار سوم تیمار چهارم تیمار پنجم

۴۴	۵۴	۳۵	۳۸	۴۱	آرد ماهی
۱۴/۳۰	۰	۱۹/۳۰	۱۶/۳۵	۱۵	آرد سویا
۱۱/۹	۱۱/۹	۱۲	۱۲	۱۲	گلوتن گندم
۵/۳۵	۱۰	۰	۵/۲	۴/۲۰	آرد گندم
۶/۷	۶/۲۵	۶/۸۰	۶/۸۰	۶/۸۰	روغن ماهی
۶/۷	۶/۲۵	۶/۸۰	۶/۸۰	۶/۸۰	روغن سویا
۰	۰	۹/۰۰	۶/۰۰	۳/۰۰	پودر ماکرو جلبک گراسیلاریا
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	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 اسکونید
۲	۲	۲	۲	۲	آنتی اکسیدان
۵	۵	۵	۵	۵	ژلاتین

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

نتایج شمارش افتراقی گلبول های سفید در نمودارهای ۱ تا ۱۰ ارائه شده است. درصد هماتوکریت بین تیمارهای مختلف آزمایش و گروه های کنترل تفاوت معنی داری

## نتایج

اثرات جایگزینی ماکرو جلبک بر فاکتورهای خونی شامل تعداد گلبول سفید، هموگلوبین، هماتوکریت و

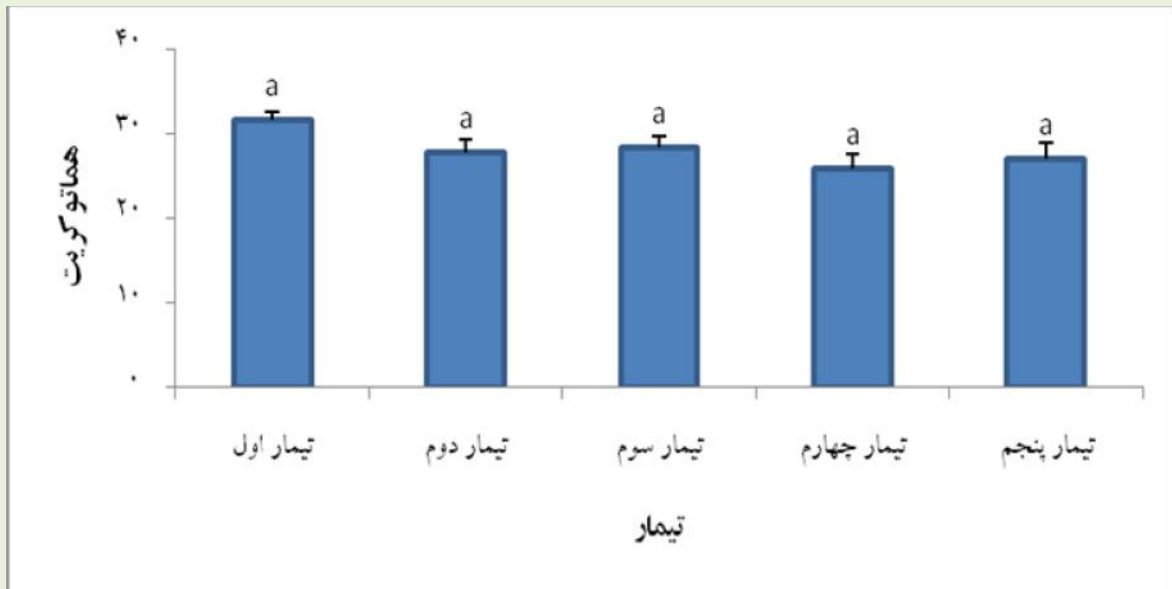
یافته های مطالعه حاضر نشان داد جایگزینی ۳٪ پودر جلبک باعث افزایش معنی داری در تعداد گلبول سفید در ماهی سی باس آسیایی شده است. که دلیل آن را می-توان وجود رنگ دانه های کاروتنوئیدی در جلبک دانست که باعث تحریک نوتروفیل و ماکروفاژها به تولید لیزوزیم در خون می گردد (۹، ۷). تعدادی از محققین مطالعاتی را در مورد تاثیر جلبک بر روی پارامترهای خونی انجام داده اند از جمله Abdel-Tawwab و همکاران (۱۶) در تغذیه ماهی تیلپیا 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 در کیلوگرم جلبک سارگاسوم (*Sargassum illicifolium*) در جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) بیشترین تعداد گلبول های 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 hypophthalmus*) 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).

نشان نداد ( $P > 0.05$ )، با این حال بیشترین درصد میزان هماتوکریت در تیمار اول (۳٪ جایگزینی) ( $31.66 \pm 0.18$ ) و کم ترین آن در تیمار چهارم (کنترل مثبت) ( $25.83 \pm 1.64$ ) مشاهده شد. هموگلوبین در بین تیمارهای مختلف جایگزینی ماکرو جلبک و گروه های شاهد اختلاف معنی داری نشان نداد ( $P > 0.05$ )، با این حال بیشترین میزان هموگلوبین ( $16.8 \pm 0.48$ ) در تیمار اول (۳٪ جایگزینی) و کمترین میزان آن ( $14.37 \pm 0.53$ ) در تیمار سوم (۹٪ جایگزینی) مشاهده شد. تعداد گلبول-های سفید تحت تاثیر جایگزینی ماکرو جلبک جیره قرار گرفت به صورتی که تعداد گلبول های سفید در تیمار اول ( $52833.33 \pm 3.69$ ) به صورت معنی داری بالاتر از تیمار چهارم (کنترل مثبت) ( $27800 \pm 6.98$ ) بود ( $P < 0.05$ ). در شمارش افتراقی گلبول های سفید در تیمارهای مختلف آزمایش تفاوت معنی داری بین درصد لنفوسیت ها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ )، کمترین میزان لنفوسیت در تیمار پنجم (کنترل منفی) ( $76.40 \pm 2.29$ ) و بیشترین میزان آن در تیمار دوم (۶٪ جایگزینی) ( $79 \pm 1$ ) مشاهده گردید. در بین نوتروفیل، مونوسیت، بازوفیل و ائوزینوفیل نیز تفاوت معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). پاسخ ایمنی تحت تاثیر جایگزینی ماکرو جلبک جیره قرار گرفت به صورتی که میزان لیزوزیم در تیمار اول ( $34 \pm 0.56$ ) به صورت معنی داری بالاتر از تیمار چهارم (کنترل مثبت) ( $30 \pm 0.57$ ) بود ( $P < 0.05$ ). علاوه بر این میزان پروتئین در تیمار دوم ( $3/8 \pm 0.05$ ) به صورت معنی داری بالاتر از تیمار چهارم (کنترل مثبت) ( $30 \pm 0.57$ ) مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).

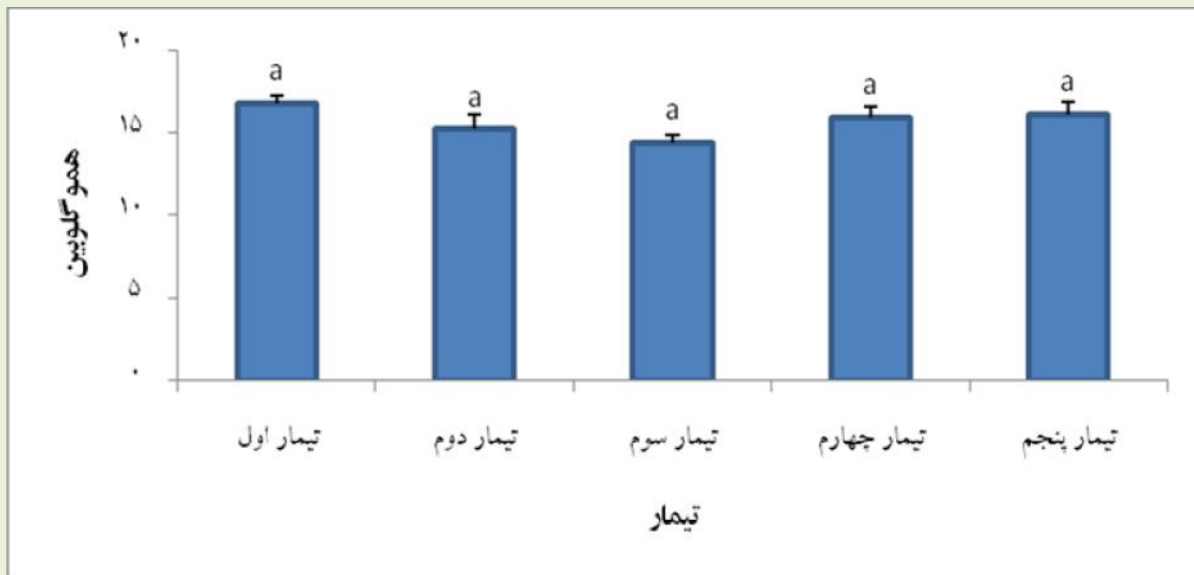
## بحث و نتیجه گیری

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

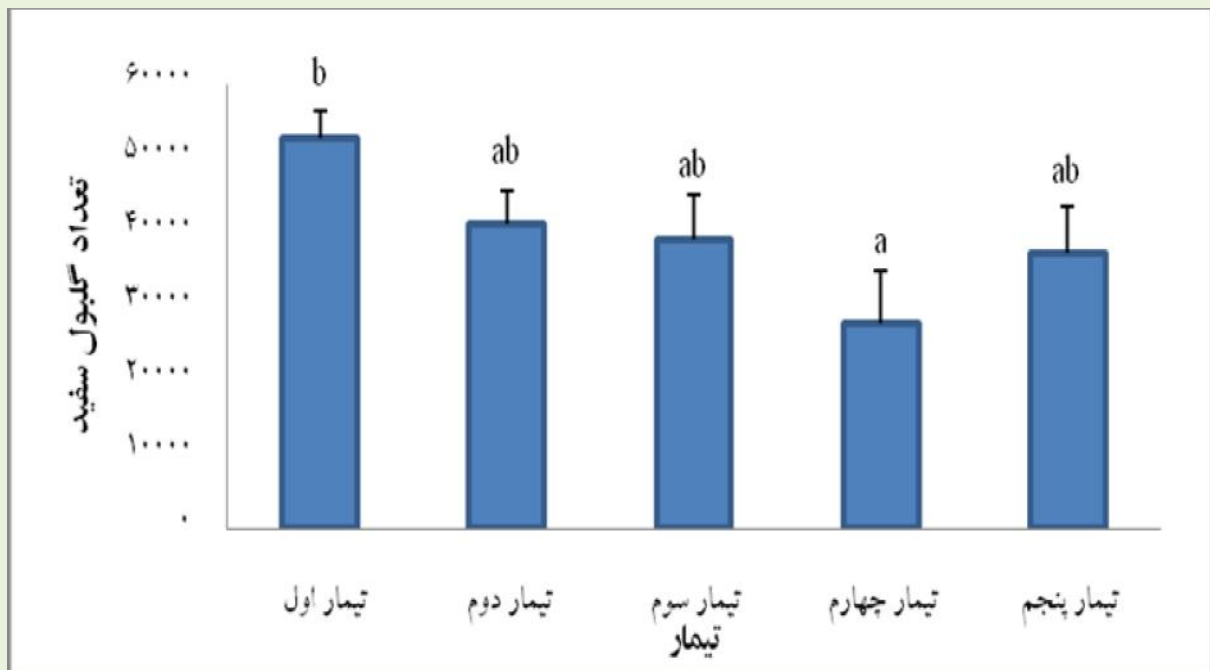
مقادیر آنالیز (درصد)	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم	تیمار پنجم
پروتئین	۴۶/۶۴	۴۵/۴۴	۴۵/۵۰	۴۷/۹۸	۴۷/۶۰
چربی	۱۷/۹۰	۱۷/۶۷	۱۷/۴۵	۱۷/۷۶	۱۷/۹۴
خاکستر	۱۹/۰۰	۲۱/۰۰	۱۹/۰۰	۱۵/۹۰	۱۴/۶۰
رطوبت	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰



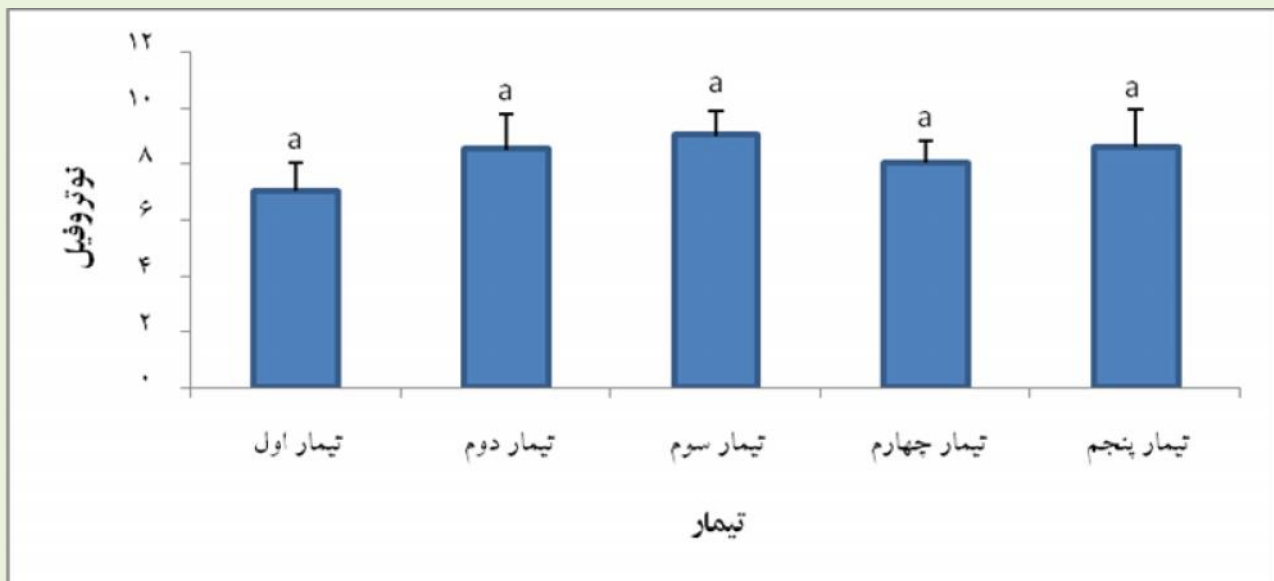
نمودار ۱- تغییرات میانگین هماتوکریت (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی



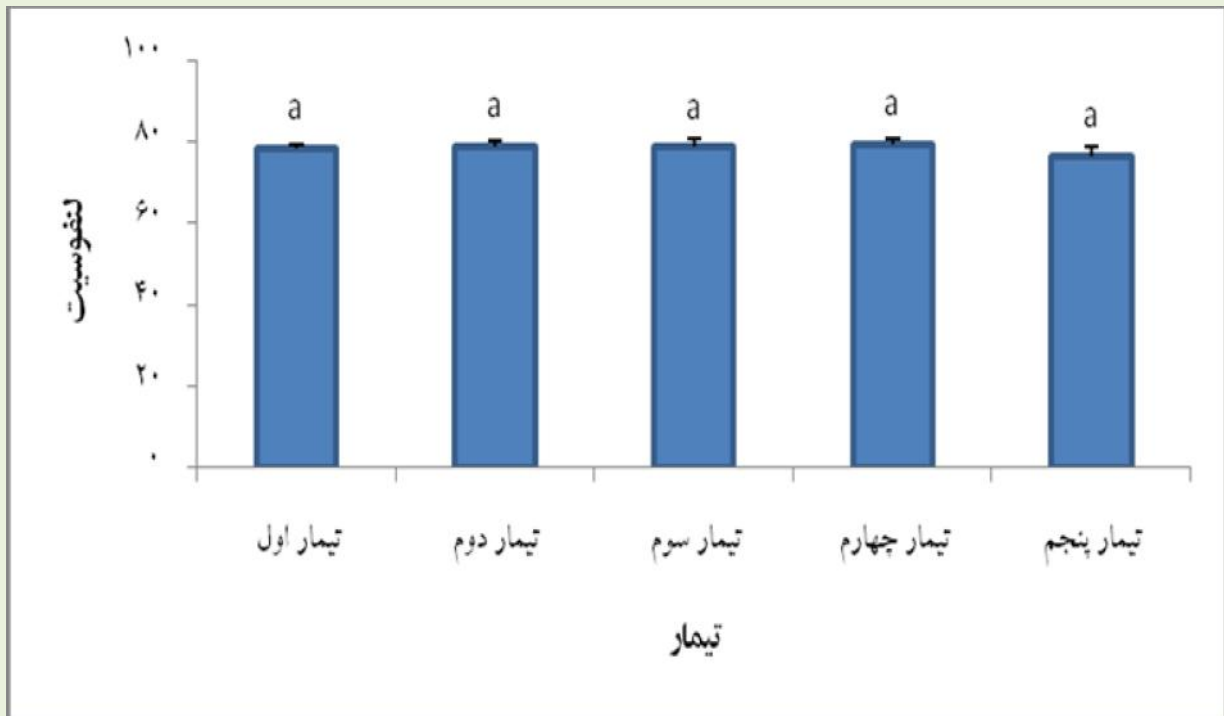
نمودار ۲- تغییرات میانگین هموگلوبین (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی



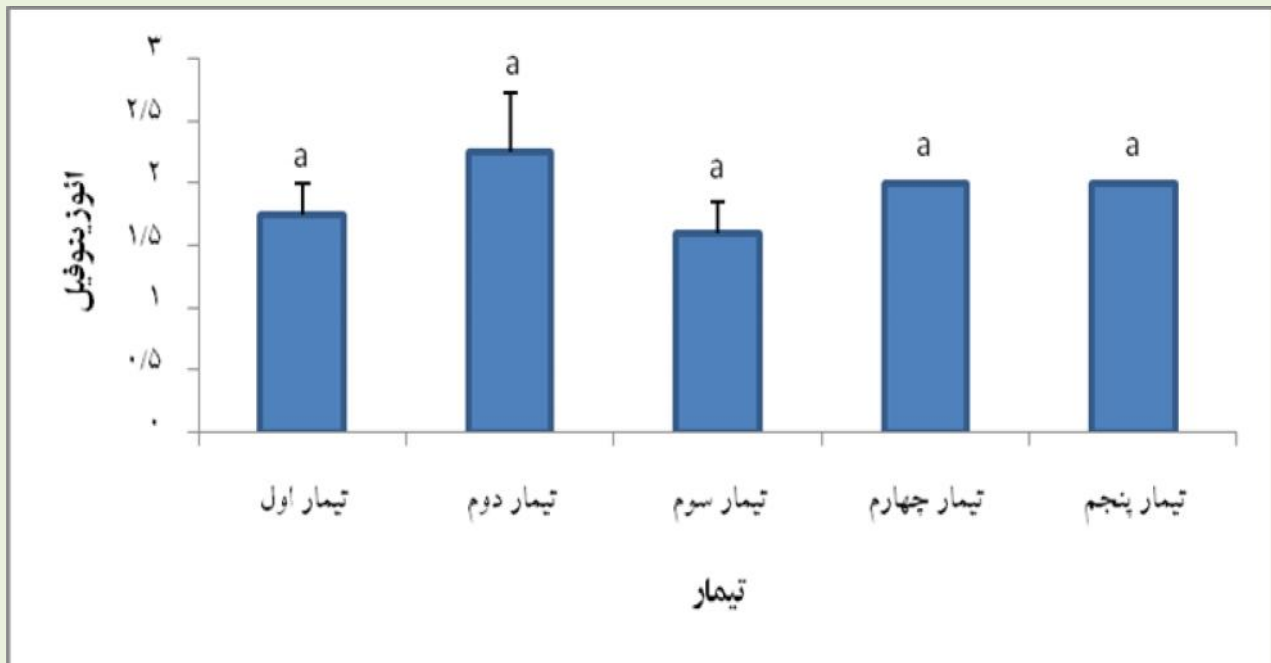
نمودار ۳: تغییرات میانگین گلبول سفید (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی



نمودار ۴: تغییرات میانگین نوتروفیل (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی

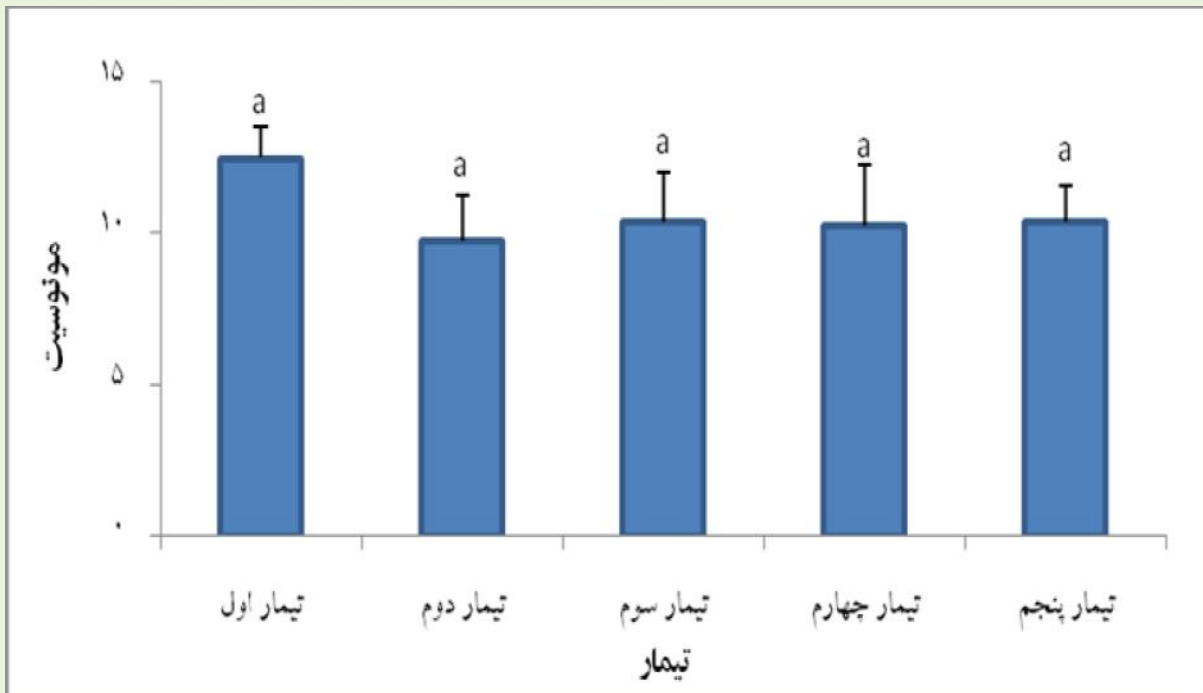


نمودار ۵- تغییرات میانگین لنفوسیت (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی

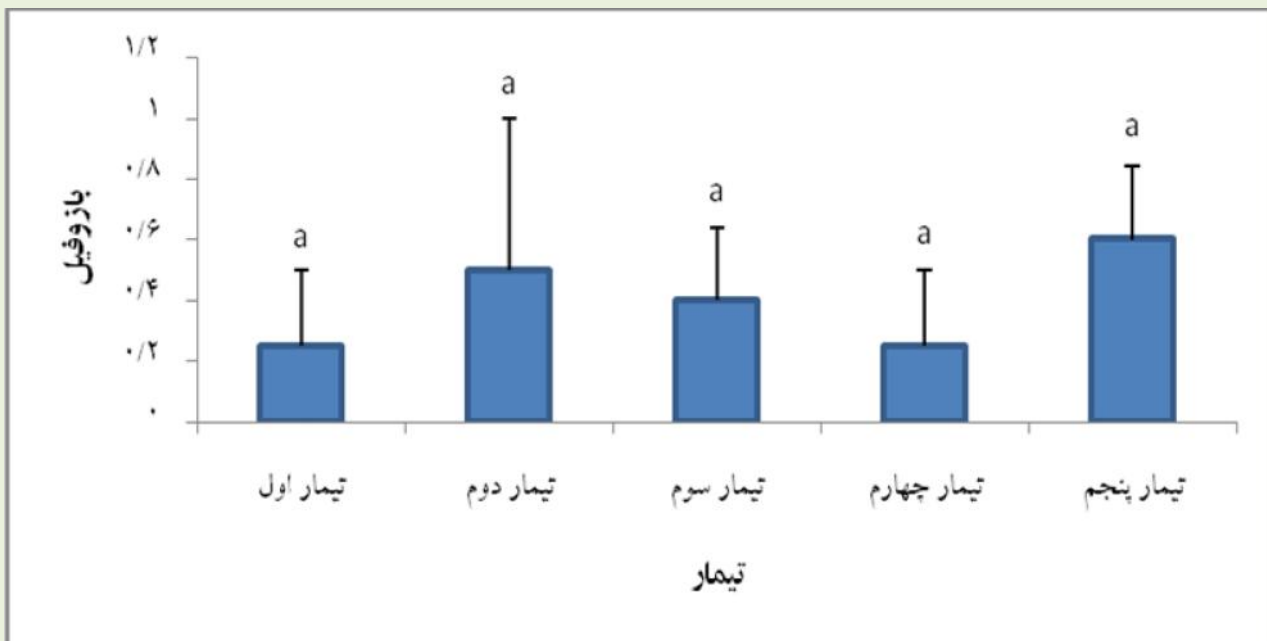


نمودار ۶- تغییرات میانگین آنوزینوفیل (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی

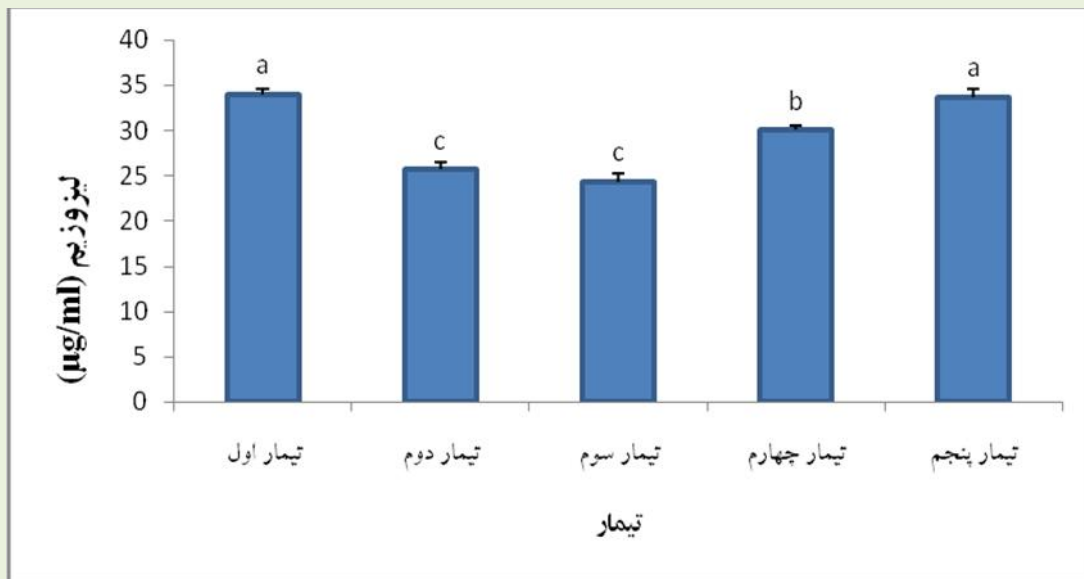




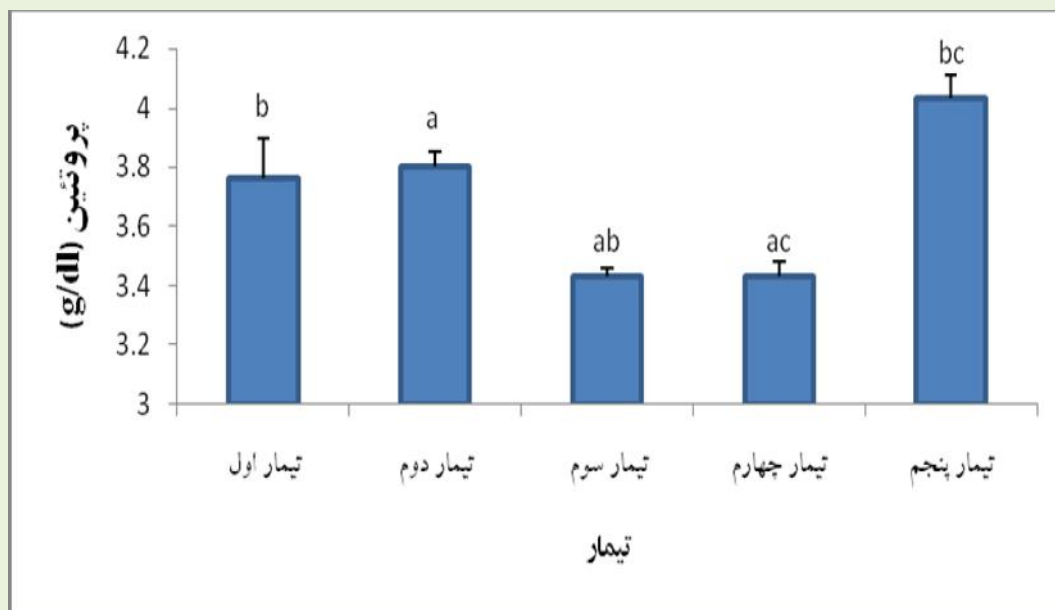
نمودار ۷- تغییرات میانگین مونوسیت (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی



نمودار ۸- تغییرات میانگین بازوفیل (درصد) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی



نمودار ۹- تغییرات میانگین لیزوزیم (µg/ml) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی



نمودار ۱۰- تغییرات میانگین پروتئین (g/dl) در ماهی سی باس آسیایی با تیمارهای مختلف گراسیلاریا در پایان ۴۰ روز. تیمار اول: جایگزینی ۳٪ پودر ماهی، تیمار دوم: جایگزینی ۶٪ پودر ماهی، تیمار سوم: جایگزینی ۹٪ پودر ماهی، تیمار چهارم: کنترل مثبت، تیمار پنجم: کنترل منفی

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 دادند که افزودن این جلبک به جیره تاثیر چندانی بر فعالیت خونسازی

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

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 در پاسخ 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 همکاران در 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 جیره ی 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

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 اسپرولینا 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 اسپرولینا در طوطی ماهی (*Fasciatus oplegnthus*) مشاهده کردند که افزایش جلبک اسپرولینا 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 اسپرولینا 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

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.

۶- 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؛ ۴۵-۵۶.

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 قزل‌آلارنگین 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 هورمون‌های استروئیدی جنسی سرم خون در مولدین نارس و بالغ کفال طلایی دریایی خزر (*Liza auratus*). مجله شیلات، ۳؛ ۶۰-۵۱.

۹- سلیقه زاده، ر.، یاور، و.، موسوی، م.، ذاکری، ز. ۱۳۹۳. اثر مکمل جلبک اسپیرولینا (*Spirulina Platenis*) 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، ۲۶۲ صفحه.

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

سی‌باس آسیایی بر روی فاکتورهای خونی ماهی شامل هموگلوبین و هماتوکریت تاثیر معنی داری ندارد اما در سطح ۳٪ می‌تواند باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید در ماهی سی‌باس آسیایی شود و تاثیر مثبت بر پاسخ ایمنی ماهی سی‌باس آسیایی دارد، به طوری که میزان پروتئین در سطح ۶ درصد و میزان لیزوزیم در سطح ۳

### 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 hypophthalmus*). مجله محیط زیست جانوری، شماره ۲؛ ۳۳-۲۵.

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

۴- خواجه، غ.، پیغان، ر. ۱۳۸۶. بررسی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل‌آلای 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.

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., Rohlf, E.M. Silverman, L.M. (1999). Proteins. In: Burtis CA, Ashwood ER. Editors. *Tietz 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 fasciatus*). *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 (*Euclidean 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.
- 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); ۶۷-۷۹.
- ۱۴- وثوقی، غ.، شاهسونی، د. ۱۳۷۶. بررسی فاکتورهای خونی ماهی حوض. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران*. دوره ۵۲(۴); ۶۱-۷۰.
- 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 پروراری ماهی قزل آلائی رنگین کمان در آب لب شور. *مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران*. دوره ۵۶(۲); ۳۳-۴۰.
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 (*Aeromonas hydrophila*) 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*). *Aquaculture*, 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.

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<sup>1</sup>, V. Morshedi<sup>2</sup>, M. Nafisi Bahabadi<sup>3</sup>, M. azodi<sup>4</sup>, A. Farhodi<sup>5</sup>, E. sotoudeh<sup>6</sup>

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*)