University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 7, No. 4, 2022, pages: 81-94
DOI: 10.22124/janb.2022.22126.1166

Effects of Spirulina microalgae (*Spirulina* sp.) and acidifier citric acid on the hematological and immune indices in common carp fry, *Cyprinus carpio*

Hossein Sabetmand*[1], Hamid Faghani Langroudi[1], Abasali Zamini[2], Babak Tizkar[3]

1- Department of Fisheries, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Mazandaran, Iran
2- Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Guilan, Iran
3- Aquatics and Fisheries Research Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Guilan, Iran

Received 30 April 2021 Revised 12 November 2021 Accepted 15 November 2021

KEYWORDS

Acidifier
Spirulina
Immune system
Blood
Common carp

ABSTRACT

The study was designed to evaluate the effects of spirulina algae and the acidifying impacts of citric acid on the variation of hematological and immune indices in common carp, *Cyprinus carpio*. The study was completely random in design with nine treatments, 3 replicates and the control, which included using basic diet without any additives. The treatments included T_1: basic diet supplemented with 0.5% citric acid; T_2: basic diet supplemented with 0.1% citric acid; T_3: basic diet supplemented with 0.2% spirulina extract; T_4: basic diet supplemented with 0.3% spirulina extract; T_5: basic diet supplemented with 0.2% spirulina extract and 0.05% citric acid; T_6: basic diet supplemented with 0.3% spirulina extract and 0.01% citric acid; T7: basic diet supplemented with 0.2% spirulina extract and 0.01% citric acid; and T8: basic diet supplemented with 0.3% spirulina extract and 0.05% citric acid. For this purpose, 270 juvenile carp fish (mean weight: 11.35 ± 1.21 g) were fed with the experimental diets for 8 weeks. At the end of the trials, the number of white blood cells (WBCs), red blood cells (RBCs), Hb, HCT, differential white cells (lymphocyte, eosinophil, neutrophil and monocytes) were measured. The mean volume of red blood cells (MHC), mean concentration of cellular hemoglobin (MEHC) and immune indices of fish blood including Lysozyme, GM, and immunoglobulin were also measured. The results indicated significant differences in certain blood factors (i.e., HCT, neutrophil and lymphocyte) between experimental diet groups and the control ($p < 0.05$). In addition, certain immune indices in the experimental groups were at healthier levels than those in the control ($p < 0.05$). Finally, the study showed that spirulina algae combined with citric acid acidifier could enhance the body immune system of juvenile carp fish.

*Corresponding author: hoseinsabetmand@gmail.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال هفتم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۰، صفحات ۹۴-۸۱

DOI: 10.22124/janb.2022.22126.1166

"مقاله پژوهشی"

تأثیر ریزجلبک اسپیرولینا (*Spirulina* sp.) و اسید سیتریک بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه‌ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

حسین ثابت مند*[۱]، حمید فغانی لنگرودی[۱]، عباسعلی زمینی[۲]، بابک تیزکار[۳]

۱- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، مازندران

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، گیلان

۳- بخش شیلات، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، گیلان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۰ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴

چکیده

این تحقیق برای تعیین میزان اثربخشی جلبک اسپیرولینا و اسیدی‌کننده اسیدسیتریک بر شاخص‌های خونی و ایمنی ماهی کپور انجام شد. طراحی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار و ۳ تکرار، شامل تیمار شاهد (جیره غذایی پایه بدون افزودنی)؛ تیمار ۱، جیره پایه مکمل شده با ۰/۰۵٪ اسیدسیتریک؛ تیمار ۲، جیره پایه مکمل شده با ۰/۱٪ اسید سیتریک؛ تیمار ۳، جیره پایه مکمل شده با ۰/۲٪ جلبک اسپیرولینا؛ تیمار ۴، جیره پایه مکمل شده با ۰/۳٪ جلبک اسپیرولینا؛ تیمار ۵، جیره پایه مکمل شده با ۰/۲٪ جلبک اسپیرولینا و ۰/۰۵٪ اسید سیتریک؛ تیمار ۶، جیره پایه مکمل شده با ۰/۳٪ جلبک اسپیرولینا و ۰/۱٪ اسید سیتریک؛ تیمار ۷، جیره پایه مکمل شده با ۰/۲٪ جلبک اسپیرولینا و ۰/۱٪ اسید سیتریک؛ و تیمار ۸ ، شامل جیره پایه مکمل شده با ۰/۳٪ جلبک اسپیرولینا و ۰/۰۵٪ اسید سیتریک طراحی شد. تعداد ۲۷۰ قطعه بچه‌ماهی کپور (۱/۲۱ ± ۱۱/۳۵ گرم) به مدت ۸ هفته با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. در انتهای آزمایش شاخص‌های خونی و ایمنی اندازه‌گیری شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده مقدار هموگلوبین، هماتوکریت، نوتروفیل و لنفوسیت شاهد و تیمارهای غذایی اختلاف معنی‌دار داشتند ($p < ۰/۰۵$). همچنین، همه شاخص‌های ایمنی (بجز تیمار ۱ در شاخص IgM) در تیمارهای غذایی نسبت به شاهد از وضعیت بهتری برخوردار بودند ($p < ۰/۰۵$). در خاتمه این تحقیق نشان داد که جلبک اسپیرولینا در ترکیب با اسیدی کننده اسید سیتریک می‌تواند باعث بهبود دستگاه ایمنی بچه ماهیان کپور شود.

کلمات کلیدی

اسیدی فایر

اسپرولینا

دستگاه ایمنی

خون

کپور معمولی

نویسنده مسئول: hoseinsabetmand@gmail.com

مقدمه

ماهی کپور معمولی یکی از باارزش‌ترین ماهیان پرورشی دنیاست (Khajepour et al. 2012). این گونه با توجه به کیفیت مناسب گوشت و ارزش مناسب پروتئین (FAO, 2014)، ترکیب اصلی ماهیان پرورشی گرمابی را در کشور تشکیل می‌دهد (آمار نامه شیلات ایران). در سال‌های اخیر با توجه به افزایش تولید این گونه در واحد سطح، بحث تغذیه، فراسنجه‌های رشد بهینه این گونه بسیار حائز اهمیت بوده و تلاش برای بهبود کیفیت رشد و لاشه و همچنین، افزایش مقاومت این‌گونه به بیماری‌های شایع کپور مثل HCV با توجه به محدود شدن استفاده از داروهای شیمیایی و تولیدات آبزی‌پروری (Soltani et al. 2018) در حال انجام است.

همچنین، روند روبه‌رشد پرورش متراکم کپور در استخرهای خاکی بروز بیماری‌ها و آسیب‌های جدی به گونه کپور بسیار محتمل است. لذا استفاده از مواد طبیعی و مناسب برای تقویت دستگاه ایمنی ماهیان به منظور جلوگیری از بیماری‌ها در شرایط پرورش متراکم، نقش بسیار مهمی در صنعت آبزی‌پروری دارد (Stet et al. 2003; Soltani et al. 2018).

امروزه ترکیبات پلی‌ساکاریدی استخراج‌شده از منابع مختلف برای دستگاه ایمنی در حیوانات شناخته‌شده استفاده می‌شوند که در اصطلاح علم داروشناسی به‌عنوان اصلاح‌کننده‌های زیستی شناخته می‌شوند (Aramli et al. 2015). برای مثال، ترکیب گلوکانی که از دیواره مخمر *ساکارومایسیس سرویزیه* با نام تجاری ماکروگراد استخراج می‌شود، به‌عنوان محرک دستگاه ایمنی در بسیاری از آبزیان پرورشی شناخته شده است (Meena et al. 2013). این ماده در دزهای مختلف اثرات قابل‌توجهی بر دستگاه ایمنی، فراسنجه‌های خونی و عملکرد رشد گونه‌های مختلف ماهی از جمله: ماهی اسکار (یزدی و همکاران، ۱۳۹۳) باس دریایی (Bagni et al. 2005)، قزل آلای رنگین کمان (Badzohreh et al. 2012)، و کپور معمولی (Falco et al. 2012; Pionnier et al. 2014) داشته است.

جلبک اسپیرولینا از جلبک‌های سبز-آبی بسیار باارزش است (Zhang et al. 2008) که حاوی مقادیر زیادی پروتئین، اسیدهای چرب ضروری (گاما، اسید لینولینک)، پلی‌ساکاریدهای فیکوبیلی، کاروتنوئیدهای مختلف، ویتامین‌های B و A و مواد معدنی است (Peiretti et al. 2008). از این ماده در سالیان اخیر به‌عنوان طعم‌دهنده غذا (Watanuki et al. 2006) و محرک دستگاه ایمنی (Ahmadifar et al. 2009) استفاده می‌شود. این ماده با دارابودن مقادیر متنابهی از کاروتنوئیدها با افزایش دستگاه کمپلمان و لایزوزیم باعث افزایش سطوح بیگانه خواری بدن شده و از این طریق باعث افزایش سطح ایمنی بدن و مقاومت آبزی در مقابل بیماری‌ها می‌شوند (Magnadóttir et al. 2006). در تحقیق Adel و همکاران (۲۰۱۶) نشان داده شد که در جیره‌های غذایی ساخته شده با ۱۰٪ جلبک اسپیرولینا در غذای فیل‌ماهی (*Huso huso*)، دستگاه ایمنی و مقاومت ماهی به برخی از بیماری‌های باکتریایی افزایش یافته است. همچنین، اثرات مفید این جلبک در جیره کپور معمولی بر دستگاه ایمنی و رشد توسط Watanuki و همکاران (۲۰۰۶) گزارش شد. ترکیبات مختلف از اسیدهای آلی در بدن بسیاری از جانوران و گیاهان به طور طبیعی موجود است (Celik et al. 2003). این اسیدها که معمولاً طی فرایند تخمیر میکروبی در بدن موجودات زنده تولید می‌شوند، در دستگاه گوارش بدن جانوران با حفظ pH مناسب، سبب بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی شده و مقدار جذب مواد غذایی را در دستگاه گوارش افزایش می‌دهند (Eidelsburger, 1998). اسیدی‌کننده‌ها ترکیبی از اسیدهای آلی و نمک‌ها هستند که شامل اسید فرمیک، پروپیونیک، استیک، بوتیریک، سیتریک، لاکتیک، مالیک، سوربیک و نمک‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم بوده و امروزه در تغذیه دام و طیور و اخیراً در آبزیان استفاده می‌شوند (Defoirdt et al. 2009). ثابت شده است که اسیدی‌کننده‌ها به همراه نمک‌های موجود در آن‌ها باعث افزایش شاخص‌های رشد و سلامتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (سلیمانی ایرایی و همکاران، ۱۳۹۱) (Pandey and Satoh. 2008; سیم دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Hossain et al. 2007)، هیبرید تیلاپیای قرمز و نیل (*Oreochromis mossambicus* × *O.niloticus*) (Ng et al. 2009) و فیل ماهی (Khajepour and hossini, 2012) شده است. این تحقیق در نظر دارد تا با استفاده از ترکیب ریزجلبک اسپیرولینا و اسیدی‌کننده اسید

سیتریک در جیره کپور معمولی اثرات این مواد را بر دستگاه ایمنی و شاخص‌های خونی ماهی کپور بررسی کند.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در محیط بسته و آزمایشگاهی مرکز آموزش صنایع شیلاتی میرزا کوچک واقع در شهر صنعتی رشت و در آکواریوم‌هایی به ابعاد ۶۰ × ۴۰ × ۳۰ سانتی‌متر انجام شد. به این منظور تعداد ۲۷۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی به متوسط وزن ۱/۲۱ ± ۱۱/۳۵ و درازای ۰/۸ ± ۷/۳ از کارگاه بخش خصوصی تهیه شد. به‌منظور همسان‌سازی عملیات تحقیق، بچه ماهیان تهیه‌شده از یک جفت مولد نر و ماده تهیه شده بود.

پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، برای سازگاری، ماهیان به مدت یک هفته در داخل وان ۲۰۰۰ لیتری با جیره‌های غذایی شاهد تغذیه شدند. تمامی آکواریوم‌ها به پمپ هوا مجهز بودند. برای بررسی اثرات آرد اسپیرولینا و محلول اسیدی‌کننده، ۹ تیمار و برای هر تیمار ۳ تکرار به شرح زیر در نظر گرفته شد:

تیمار شاهد: بدون آرد اسپیرولینا و اسید سیتریک در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۱: ۰/۵ گرم اسیدسیتریک در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۲: ۱ گرم اسیدسیتریک در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۳: ۲ گرم آرد اسپیرولینا در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۴: ۳ گرم آرد اسپیرولینا در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۵: ۲ گرم اسپیرولینا + ۰/۵ گرم اسیدسیتریک در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۶: ۳ گرم اسپیرولینا + ۱ گرم اسید سیتریک در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۷: ۲ گرم اسپیرولینا + ۱ گرم اسید سیتریک در کیلوگرم جیره غذایی؛

تیمار ۸: ۳ گرم اسپیرولینا + ۰/۵ گرم اسید سیتریک در کیلوگرم جیره غذایی.

برای ساختن غذاهای تیمار از جیره غذایی بچه‌ماهی کپور که توسط کارخانه وحدت گیلان با شرح جدول ۱ تهیه شده بود، استفاده شد.

برای افزودن آرد جلبک و محلول اسیدی‌کننده بر اساس تیمارهای طراحی‌شده، ابتدا جیره پایه به کمک چرخ‌گوشت خوردشده و سپس بر اساس مقادیر متناسب آرد جلبک، با آن مخلوط و محلول اسیدی‌کننده بر روی غذا افشانه شد.

شرایط دما و اکسیژن برای تمامی آکواریوم‌ها در طی آزمایش یکسان بود. فراسنجه‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل اکسیژن و دما با استفاده از دستگاه اکسی‌متر (OXI3230B/SET) سه بار در روز، pH با استفاده از دستگاه pH meter مدل (PH330i/SET) یک‌بار در روز و میزان نیتریت و آمونیاک غیریونیزه (بر حسب میلی‌گرم در لیتر) هفته‌ای یک‌بار سنجش شد. در طی دوره آزمایش شرایط هوادهی آکواریوم‌ها ثابت بود. مقدار روشنایی و تاریکی بر اساس ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی در نظر گرفته شد (Biswas et al. 2010). میانگین غلظت اکسیژن محلول، pH، نیتریت و آمونیاک غیریونیزه به ترتیب برابر mg/L ۷/۲، ۷/۹، mg/L ۰/۰۲ و mg/L ۰/۰۸ بود.

برای حذف غذای خورده نشده و مدفوع ماهیان و جلوگیری از آلودگی، روزانه در دو مرحله کف آکواریوم‌ها با شیلنگ مخصوص سیفون شدند. ماهیان روزانه دو بار و به مدت هشت هفته تا حد سیری با غذای تیمار تغذیه شدند.

برای تعیین شاخص‌های ایمنی و خونی در انتهای دوره تغذیه، خون‌گیری از ماهیان به‌طور تصادفی از هر تکرار ۱۰ ماهی و از ناحیه دمی (Caudal vasculature) پس از بی‌هوشی در عصاره گل میخک (۱۱۵۰ mg/L) انجام شد (محمدی ارانی، ۱۳۹۵) نمونه‌های خونی استحصال‌شده پس از سانتریفیوژ و تهیه سرم برای ارسال به آزمایشگاه در یخچال ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس، به‌وسیله دستگاه سانتریفیوژ (Labofuge, Heraeus Sepatch, Germany) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سرم جدا شده با سمپلر در تیوپ‌های اپندروف در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای اندازه‌گیری لیزوزیم، از روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) و برای سنجش ایمونوگلوبولین (IgM) از روش ایمونوتوربیدی‌متری (Won- Seok et al. 2013) استفاده شد.

فراسنجه‌های خونی شامل گلبول قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، هماتوکریت (Hct)، تعداد گلبول‌های سفید (WBC).

شمارش گلبول‌های سفید افتراقی (ائوزینوفیل، لنفوسیت، نوتروفیل و مونوسیت)، متوسط حجم گلبول قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) در خون اندازه‌گیری شدند (Klontz, 1994).

برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین (IgM) از روش ایمونوتوربیدی‌متری (Immuno turbidimetric) و دستگاه اسپکتروفتومتر (2100-VIS, UNICO, USA) با طول موج ۳۴۰ نانومتر استفاده شد (سقا و سروش‌نیا، ۱۳۸۲; Khoshbavar-Rostami et al. 2007). همچنین، برای اندازه‌گیری سطوح لیزوزیم در سرم خون با استفاده از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodeikticus* (سیگما) و با کمک روش نورسنجی و دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد (Ellis, 1990).

برای تعیین غلظت ایمونوگلوبولین کل از روش شرح داده‌شده توسط (Amar et al. 2004; Siwicki and Anderson, 2010) استفاده شد. برای اندازه‌گیری ترکیبات مواد مغذی جیره از روش‌های استاندارد (AOAC, 1995) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تحقیق از طرح آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی Completely Randomized Design (CRD) در سه تکرار برای هر تیمار استفاده شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف اسمیرنوف، برای تجزیه‌وتحلیل داده‌ها، از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و برای تعیین معنی‌دار بودن آزمایش‌ها از روش دانکن در سطح ۵ ٪ استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS20 و Excel انجام شد.

نتایج

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که مقدار WBC، RBC، MCV، MCH، MCHC در خون ماهیان در تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار نداشته است (p>۰/۰۵). این نتایج همچنین بیانگر وجود اختلافاتی در میزان Hb (هموگلوبین) و Hct (هماتوکریت) خون ماهیان در تیمارهای مختلف بوده است (p<۰/۰۵؛ جدول ۲). در این بین تیمار ۶ (۰/۳ ٪ اسپرولینا + ۰/۰۱ ٪ اسید سیتریک) بیش‌ترین مقدار هماتوکریت و هموگلوبین را داشتند (p<۰/۰۵؛ جدول ۲) و کمترین مقدار هماتوکریت و هموگلوبین در تیمار ۱ (۰/۰۵ ٪ اسپیرولینا) مشاهده شد (p<۰/۰۵؛ جدول ۲).

در بین گلبول‌های سفید اختصاصی به‌غیراز میزان ائوزینوفیل (p>۰/۰۵)، مقدار نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت در بین تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار نشان داد (p< ۰/۰۵؛ شکل ۱). کمترین مقدار نوتروفیل و مونوسیت در تیمار ۱ (۰/۰۵ ٪ اسپیرولینا) و بیش‌ترین مقدار نوتروفیل در تیمار ۳، ۶ و ۷ مشاهده شد (p<۰/۰۵).

جدول ۳ نتایج بیانگر شاخص‌های ایمنی مورد اندازه‌گیری ماهیان در تیمارهای مختلف است. این جدول نشان می‌دهد که تیمارهای ۲، ۴، ۶، ۸ بیش‌ترین مقدار IgM را نسبت به تیمارهای دیگر داشتند و همچنین مقدار ایمونوگلوبین در تیمارهای ۳، ۴، ۸ نسبت به دیگر تیمارها بیشتر بود (p<۰/۰۵).

لیزوزیم در تیمارهای ۳، ۴، ۷، ۸ بیش‌ترین مقدار را نسبت به دیگر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵).

جدول ۱ ترکیب اقلام مختلف در جیره غذایی.

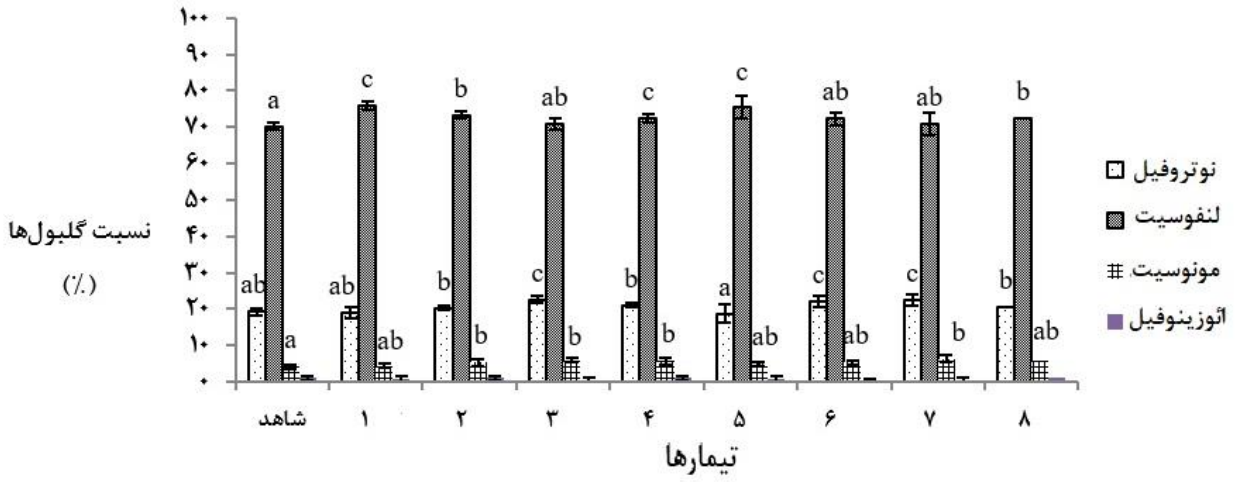
اقلام غذایی (٪)	تیمارهای آزمایشی								
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷	تیمار ۸
آرد گندم	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵	۳۵
کنجاله سویا	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
کنجاله ذرت	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
گلوتن ذرت	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
پودر ماهی	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵	۱۵
روغن ماهی	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵	۵
مکمل معدنی	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
مکمل ویتامین	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
سبوس برنج	۱۴	۱۳/۹	۱۳/۹	۱۳/۸	۱۳/۷۰	۱۳/۷۵	۱۳/۶۵	۱۳/۷۰	۱۳/۷۵
پودر جلبک اسپیرولینا	-	-	-	۰/۲	۰/۳	۰/۲	۰/۳	۰/۲	۰/۳
اسید سیتریک	-	۰/۵	۰/۱	-	-	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱	۰/۰۵
پروتئین خام (٪)	۳۵	۳۵	۳۴/۸	۳۵/۲	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۲	۳۵/۲	۳۵/۳
چربی خام (٪)	۱۱/۱	۱۱/۱	۱۱/۱	۱۱/۱	۱۱/۲	۱۱/۱	۱۱/۲	۱۱/۲	۱۱/۳
فیبر (٪)	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
خاکستر (٪)	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴
کلسیم (٪)	۳/۱	۳/۱	۳/۱	۳/۲	۳/۲	۳/۳	۳/۲	۳/۳	۳/۲
فسفر (٪)	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۰/۹
رطوبت (٪)	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴	۱۴

جدول ۲ میانگین شاخص‌های خونی(mean ± SD) در تیمارهای مختلف.

شاخص‌های خونی	تیمارهای آزمایشی								
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷	تیمار ۸
گلبول سفید (تعداد × ۱۰ ۳ در mm^3)	۵۱۲ ± ۱۷	۵۱۶ ± ۲۵	۷۲۶ ± ۳۵	۷۵۳ ± ۱۱۲	۷۲۶ ± ۴۷	۵۴۶ ± ۳۵	۶۳۶ ± ۷۵	۷۸۶ ± ۳۵	۷۴۰ ± ۸۵
گلبول قرمز (تعداد × ۱۰ ۳ در mm^3)	۱۴۰۶۱ ± ۶۲۵	۱۴۰۱۶ ± ۸۲۵	۱۵۴۶۶ ± ۲۵۱	۱۱۳۳۳ ± ۸۴۲	۱۵۰۶۶ ± ۹۸۶	۱۴۴۳۳ ± ۹۰۱	۱۶۵۰۰ ± ۷۵۴	۱۵۴۳۳ ± ۶۵۰	۱۵۲۳۳ ± ۵۶۸
هموگلوبین (g/dL)	۴/۹۳ ± ۰/۲۸^{a}	۵/۲۵ ± ۰/۲۵^{a}	۵/۷ ± ۰/۱۰^{bc}	۶/۰۳ ± ۰/۱۵^{cd}	۵/۵۷ ± ۰/۲۹^{ab}	۵/۴۳ ± ۰/۳۱^{ab}	۶/۲۳ ± ۰/۱۵^{d}	۵/۷ ± ۰/۲۶^{bc}	۵/۶۷ ± ۰/۱۵^{abc}
هماتوکریت (٪)	۲۶/۹۵ ± ۰/۲۸^{a}	۲۷ ± ۰/۰۰۱^{a}	۲۸/۳۳ ± ۰/۵۸^{abc}	۳۰ ± ۰/۰۱^{cd}	۲۷/۶۷ ± ۱/۱۵^{ab}	۲۷/۶۷ ± ۱/۵۳^{ab}	۳۱/۳۳ ± ۰/۵۸^{d}	۲۹ ± ۰/۰۱^{bc}	۲۸/۳ ± ۰/۵۸^{abc}
حجم متوسط گلبول‌های قرمز (fl)	۱۸۹/۷۲ ± ۳/۹۵	۱۹۲/۶۷ ± ۴/۵۱	۱۸۳ ± ۱/۷۳	۱۸۴/۳۳ ± ۳/۵۱	۱۸۳/۶۷ ± ۴/۱۶	۱۹۱/۳۳ ± ۲/۰۸	۱۹۰ ± ۵/۵۷	۱۸۷/۶۷ ± ۶/۶۶	۱۸۵/۳۳ ± ۵/۱۳
میزان متوسط هموگلوبین (pg)	۳۷/۹۵ ± ۸/۱۲	۳۷/۵۳ ± ۰/۴۶	۳۶/۸۰ ± ۰/۱۰	۳۷/۳۳ ± ۰/۴۷	۳۶/۹۳ ± ۰/۵۵	۳۷/۶۰ ± ۰/۳۶	۳۷/۷۷ ± ۰/۸۵	۳۷/۵۳ ± ۰/۴۶	۳۷/۱۷ ± ۰/۳۸
میانگین غلظت هموگلوبین (g/dL)	۱۹/۹۹ ± ۰/۲۹	۱۹/۴۷ ± ۰/۲۳	۲۰/۱۳ ± ۰/۲۳	۲۰/۱ ± ۰/۱۷	۲۰/۱ ± ۰/۱۷	۱۹/۶ ± ۰/۰۰	۱۹/۹ ± ۰/۱۷	۱۹/۶۳ ± ۰/۶۴	۱۹/۹۷ ± ۰/۱۷

جدول ۳ میانگین شاخص‌های ایمنی(mean ± SD) در تیمارهای مختلف.

فراسنجه¬های ایمنی	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	تیمار ۶	تیمار ۷	تیمار ۸
IgM (mg/dL)	۳۱/۲۸ ± ۳/۹۵^{a}	۳۲/۳۳ ± ۴/۹۳^{a}	۴۱ ± ۵/۲۹^{b}	۴۸/۶۷ ± ۴/۰۴^{c}	۴۱/۳ ± ۱/۵۳^{b}	۴۱ ± ۳/۶۱^{b}	۴۱/۶۷ ± ۳/۰۶^{b}	۴۶/۶۷ ± ۲/۵^{bc}	۴۰/۶۷ ±۱/۵۳^{b}
ایمونوگلوبین (mg/mL)	۱۴/۰۶ ± ۰/۲۷^{a}	۱۵/۲۳ ± ۰/۳۱^{ab}	۱۵/۹۷ ± ۰/۳۲^{c}	۱۶/۶۷ ± ۰/۱۵^{d}	۱۶/۴ ± ۰/۱۵^{d}	۱۵/۱۷ ± ۰/۳۲^{b}	۱۵/۶۳ ± ۰/۱۵^{bc}	۱۷/۲ ± ۰/۳^{e}	۱۶/۶۳ ± ۰/۱۵^{d}
لیزوزیم (u/mL/min)	۳۰/۱ ± ۲/۰۶^{b}	۲۹/۳ ± ۲/۰۸^{b}	۲۷/۳ ± ۲/۵۲^{b}	۳۰/۳ ± ۲/۰۸^{b}	۲۹ ± ۱^{b}	۲۸ ± ۰/۰۰۲^{b}	۲۶ ± ۳/۴۶^{b}	۳۲/۳۳ ± ۳/۰۶^{b}	۳۳ ± ۱/۷۳^{b}



شکل ۱ میانگین (mean ± SD) درصد گلبول‌های سفید اختصاصی در تیمارهای مختلف.

بحث

امروزه صنعت آبزی‌پروری به دنبال راه‌حل‌های جدید برای افزایش بهره‌وری در تولید آبزیان است. یکی از مهم‌ترین راه‌های رسیدن به این هدف، بهبود جیره‌های غذایی با هدف رشد بهتر و افزایش مقاومت ماهیان در مقابل بیماری‌ها و شرایط متراکم است (Song et al. 2014). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که افزودن مکمل‌های آرد اسپیرولینا و اسیدی‌کننده توانسته است باعث بهبود دستگاه ایمنی ماهی کپور پرورشی شود. شاخص‌های خونی ماهیان یکی از اصلی‌ترین شاخص‌های بررسی شرایط فیزیولوژیک و همچنین، پایداری و یا عدم پایداری دستگاه ایمنی است. تحقیقات انجام شده نشان داده است که برخی از مکمل‌های زیستی مثل اسپیرولینا و اسیدی‌کننده نقش مهمی در آبزی‌پروری داشته و کارایی تغذیه، عملکرد رشد و مقاومت ماهیان را در مقابل بیماری‌ها بهبود می‌بخشد (Nakai et al. 2003). در همین راستا، محققان دیگر (Baruah et al. 2007) نقش اسیدی‌کننده و آنزیم فیتاز را در بهبود نرخ رشد ماهی کپور هندی (*Labeo rohit*) گزارش کرده‌اند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده توسط Sudagar و همکاران (۲۰۱۰)، افزودن اسیدسیتریک به میزان ۱۵ گرم در کیلوگرم جیره فیل‌ماهی باعث بهبود رشد ویژه و شاخص وضعیت و کاهش ضریب تبدیل غذایی شد. در تحقیقی دیگر (Abdel-Tawwab et al. 2009) با جایگزین‌کردن آرد جلبک اسپیرولینا با آرد ماهی باعث افزایش رشد تیلاپیای نیل شدند.

البته مطالعات دیگری نیز دال بر بی‌اثر بودن و حتی اثرات منفی جلبک اسپیرولینا بر عملکرد رشد و دستگاه ایمنی ماهیان انجام شد. Teimouri و همکاران (۲۰۱۳) با گنجاندن سطح ۱۰ تا ۲۰ ٪ آرد جلبک اسپیرولینا در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی گورامی سه‌خال (*Trichogster trichopterus*) گزارش کردند که این ماده منجر به هیچ تغییری در میزان رشد و بهبود دستگاه ایمنی این ماهیان نشد.

در تحقیق حاضر نتایج نشان داد که افزودن مکمل‌های مورداستفاده در جیره‌ها تغییری در تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) ایجاد نمی‌کند، ولی میزان هماتوکریت (HCT) و هموگلوبین (Hb) تیمار ۶ (۰/۳ ٪ اسپیرولینا + ۰/۵ ٪ اسیدی‌کننده) نسبت به دیگر تیمارها و شاهد بیشتر بود، و نسبت به بعضی از تیمارها اختلاف معنی‌دار داشت.

ازآنجا که میزان هماتوکریت خون، نشان‌دهنده تعداد و اندازه یاخته‌های قرمز خونی است (Siwicki and Anderson, 2010) لذا تغییر ایجاد شده در بین تیمار ۶ و ۳ که از مقادیر مختلفی آرد اسپیرولینا در آن استفاده شده، باعث بهبود کارآیی ظرفیت خونی و اکسیژن‌رسانی در ماهیان این تیمار شده است.

تعداد و نوع گلبول‌های سفید یکی از شاخص‌های اصلی و بسیار مهم در نشان‌دادن شرایط تنش، تغذیه نامناسب، عوامل آلودگی محیط‌زیست و بیماری‌هاست (کاظمی و همکاران،

۱۳۸۹). در تحقیق حاضر مقدار گلبول‌های سفید نوع نوتروفیل و لنفوسیت نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان داد و در این حال، در بین تیمارهای مختلف، تیمار ۵ (اسپیرولینا ۰/۳ ٪ + اسید سیتریک ۰/۰۵ ٪) بیشترین مقدار لنفوسیت دیده شد. این نتایج نشان داد که جیره ترکیبی اسپیرولینا و اسیدسیتریک در تیمار ۵ با افزایش معنی‌دار نسبت به لنفوسیت‌ها باعث افزایش سطح ایمنی ماهیان تیمار می‌شود. این امر یک عامل مؤثر در افزایش دستگاه ایمنی ماهیان محسوب می‌شود.

در مطالعه انجام شده توسط Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) بر روی شاخص‌های ایمنی ماهی *Astronatus ocellatus* نتایج مشابهی شبیه به تحقیق حاضر به دست آمد که در آن تحقیق نیز ترکیبات اسپیرولینا و اسیدسیتریک در افزایش سطوح ایمنی و گلبول‌های سفید افتراقی مؤثر واقع شدند.

نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق موافق با نتایج به‌دست‌آمده توسط Reda و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ماهی تیلاپیای نیل بود. نتایج آنها نشان داد که افزودن اسیدسیتریک به جیره ماهیان تیمار باعث افزایش درصد گلبول‌های سفید افتراقی نسبت به شاهد می‌شود، ولی در بین تیمارهای مختلف استفاده‌شده در این تحقیق، تیمارهایی که در آن‌ها از ترکیب اسپیرولینا و اسیدسیتریک استفاده شده بود، مقادیر بالاتری از لنفوسیت و مونوسیت داشتند. سلیمانی و همکاران (۱۳۹۱) نیز چنین نتایجی را روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۶ نوع اسید آلی تأیید کردند.

شاخص‌های IgM و کمپلمان یکی از اصلی‌ترین پاسخ‌های ایمنی ذاتی در موجودات است (Sumpter, 1997). IgM به همراه کمپلمان (AcH) یک سازوکار دفاعی غیراختصاصی بسیار ارزشمند و قوی برای حفاظت ماهیان در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا و تنش‌زا است (Muller-Eberhard, 1988).

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد (جدول ۳) که مقدار IgM در تمامی تیمارها نسبت به شاهد بیشتر بوده و در بین تیمارهای استفاده‌شده تیمار ۳ (اسپیرولینای ۰/۳٪) بیش‌ترین مقدار IgM را داشته است که نشان می‌دهد اسپیرولینا با کمترین غلظت خود در تیمار و بدون ترکیب با اسیدسیتریک توانسته است سطح ایمنی ماهیان تیمار را افزایش دهد. این نتایج توسط Pourkazemi و همکاران (۲۰۰۶) بر روی فیل‌ماهی دریای خزر گزارش شد، اگرچه بعضی از محققان اثر اسپیرولینا را بر افزایش دستگاه ایمنی سخت‌پوستان مانند میگوی سفید یا غربی (*L.vannamei*) بی‌تأثیر دانسته‌اند (Hanel et al. 2007).

لیزوزیم نیز از آنزیم‌های مهم خونی است که دارای خواص ضدباکتریایی و ضدویروسی است (Sahu et al. 2007). این آنزیم با شکستن دیواره باکتری‌ها باعث تخریب و عدم تکثیر یاخته‌ای آن‌ها می‌شود (Sitja-Bobadilla et al. 2008) مقدار لیزوزیم تیمارهای تحقیق حاضر نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و این امر نشان داد که مکمل‌های اسپیرولینا و اسید استیک توانسته‌اند باعث افزایش مقدار این آنزیم در خون ماهیان شوند. Jaleel و همکاران (۲۰۱۵) در مطالعه‌ای که روی ماهیان انگشت‌قد کوی داشتند، نتیجه گرفتند که زئولیت و مکمل‌های معدنی باعث افزایش سطوح آنزیم ایمونوگلوبین در ماهیان می‌شوند. نتایج تحقیق حاضر نیز بیانگر تغییرات معنی‌داری در سطح ایمونوگلوبین ماهیان تیمار نسبت به شاهد بود و در این بین تیمار ۷ (اسپیرولینا ۰/۲ ٪ + اسید سیتریک ۰/۱ ٪) بیش‌ترین مقدار سطح ایمونوگلوبین را در بین تیمارهای دیگر نشان داد. این نتیجه با نتایج به‌دست‌آمده توسط یزدی و همکاران (۱۳۹۳) بر روی ماهی اسکار به اثبات رسیده است. آن‌ها نیز پی بردند که با استفاده از مکمل اسپیرولینا در جیره غذایی ماهی اسکار، سطوح ایمونوگلوبین ماهیانی که با جیرهٔ ۴ ٪ اسپیرولینا تغذیه کرده بودند، نسبت به شاهد بهبود یافته بود. در خاتمه، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از مکمل‌های اسپرولینا و اسیدسیتریک به‌صورت انفرادی و ترکیبی باعث بهبود دستگاه ایمنی ماهی کپور خواهد شد و در این بین، اختلافی بین جیره‌های انفرادی از اسپیرولینا و اسیدسیتریک در جیره‌های ترکیبی مشاهده نشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که مراتب تقدیر و تشکر خود را از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی گیلان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن برای همکاری و مساعدت در انجام این تحقیق اعلام کنند.

منابع

سقا، ح.ر.، سروش‌نیا، م. ۱۳۸۲. تجهیزات و فراورده‌های آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. ۲۶۸۷ صفحه.

سلیمانی ایرایی، م.، سجادی، م.، کرامت امیرکلایی، ع.، فرحی، ا.، کریم‌زاده، ص. ۱۳۹۱. اثرات سطوح مختلف مکمل اسیدهای آلی بر کارایی رشد، ترکیبات لاشه و شاخص‌های خونی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). بهره‌برداری و پرورش آبزیان ۳: ۱۴-۱.

محمدی‌ارانی، م. ۱۳۹۵. بررسی اثرات اسانس میخک (*Eugenia caryophyllata*) بر بیهوشی بچه تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)، تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران ۲۲: ۱۹۲-۱۸۸.

یزدی، م.، سلطانی، م.، میرزایی، ر.، رجبی اسلامی، ه. ۱۳۹۳. اثر بتاگلوکان (ماکرو گارد) بر برخی از شاخص‌های ایمنی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*). علوم و فنون شیلات ۳: ۹۲-۸۷.

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, H.M. 2009. Live *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research 40: 1037-1046.

Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M. Dawood, M.A. 2016. Effects of dietary Spirulina platensis on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). Fish & Shellfish Immunology 56: 436-444.

Ahmadifar, E., Takami, G.A., Sudagar, M. 2009. Growth performance, survival and immunostimulation, of beluga (*Huso huso*) juvenile following dietary administration of alginic acid (Ergosan). Pakistan Journal of Nutrition 8: 227-232.

Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Mesbah, M., Razi Jalali, M. 2010. Effects of dietary Aloe Vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Veterinary Medicine 4: 189-195.

Amar, E.C., Kiron,V, Satoh, S., Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish and Shellfish Immunology 16: 527-537.

AOAC. 1995. Official Methods for Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 14th edition. Arlington, VA, 1141.Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation International Journal of the Bioflux Society 3: 311-316.

Aramli, M.S**.,** Kamangar, B. Nazari, R.M. 2015. Effects of dietary β-glucan on the growth and innate immune response of juvenile Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Fish & Shellfish Immunology 47: 606-610.

Badzohreh, G.R., Soltani, M., Hoseini, G.R.S., Bahabadi, M.N. 2012. Effects of β-glucan on the growth, survival, and the efficacy of anti-*Streptococcus iniae* vaccine in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Journal of Veterinary Research 67: 11-17.

Bagni, M., Romano, N., Finoia, M.G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P.G. and Marino, G. 2005. Short and long-term effects of a dietary yeast β-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish & Shellfish Immunology 18: 311-325.

Baruah, K., Sahu, N.P., Pal, A.K., Jain, K.K., Debnath, D., Mukherjee, S.C. 2007. Dietary microbial phytase and citric acid

synergistically enhances nutrient digestibility and growth performance of *Labeo rohita* (Hamilton) juveniles at sub-optimal protein level. Aquaculture Research. 38 109-120.

Biswas, A., Seoka, M., Inagaki, H., Takii, K. 2010. Reproduction, growth and stress response in adult red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel) exposed to different photoperiods at spawning season. Aquaculture Research 41: 519-527.

Celik, K., Ersoy, I.E., Uzatici, A., Erturk, M. 2003. The using of organic acids in California turkey chicks and its effects on performance before pasturing. International Journal of Poultry Science 2: 446-448.

Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J., Deschaux, P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology 11: 1-13.

Defoirdt, T., Boon, N., Sorgeloos, P., Verstraete, W. Bossier, P. 2009. Short-chain fatty acids and poly-b hydroxyalkanoates: (New) Biocontrol agents for a sustainable animal production. Biotechnology Advances 27: 680-685.

Edgard c, A., Viswanath K., Shuichi S., Nobuaki O., Takeshi W. 2000. Effects of dietary βcarotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science 66: 1068-1075.

Eidelsburger, U. 1998. Feeding short-chain organic acids to pigs. In: Garnsworthy, P.C., Wiseman, J. 1998. Recent advances in animal nutrition, Nottingham University Press. Nottingham 93-106.

Ellis, A., Lysozyme A. 1990. In: Stolen JS, Fletcher DP, Anderson BS, Robertson, BS, editors. Techniques in fish immunology. Fair Haven, NJ, USA: SOS Publication 101-103.

Falco, A., Frost, P., Miest, J., Pionnier, N., Irnazarow, I. Hoole, D. 2012. Reduced inflammatory response to *Aeromonas salmonicida* infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fed with β-glucan supplements. Fish & Shellfish Immunology 32: 1051-1057.

Hanel, H., Broekman, D., de, Graaf, S. Schnack, D. 2007. Partial replacement of fishmeal by lyophilized powder of the microalgae Spirulina platensis in pacific white shrimp diets. The Open Marine Biology Journal 1: 1- 5.

Hossain, M.R., Pandey, A. Satoh, S. 2007. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in red sea bream (*Pagrus major*). Fisheries Science 73: 1309-1317.

Jaleel, M.A., Musthafa, M.S., Ali, A.J., Mohamed, M.J. Arun Kumar, M. 2015. Studies on the growth performance and immune response of Koi carp fingerlings (*Cyprinus carpio koi*) fed with azomite supplemented diet. Journal of Biology and Nature 4: 160-169.

Khajepour, F. Hosseini, S. 2012. Citric acid improves growth performance and phosphorus digestibility in beluga (*Huso huso*) fed diets where soybean meal partly replaced fish meal. Animal Feed Science and Technology 171: 68-73.

Khoshbavar, A., Soltani, M., Hassan, H. 2007. Immune responses of great sturgeon (*Huso huso*) to *Aeromonas hydrophila* bacterin. Journal of Fish Biology 70: 1931-1938.

Klontz, G.W. 1994. Fish hematology. In: Techniques in fish immunology. Edited by Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Rowley, A.F., Kelikoff, T.C., Kaatari, S.L., Smith, S.A. SOS Publications. Fair Haven, New Jersey, USA. 3: 121-132.

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology 20: 137-151.

Meena, K., Das, P., Kumar, S., Mandal, C., Prusty, K., Singh, K. Mukherjee, C. 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). Fish Physiology and Biochemistry 39: 431-457.

Muller-Eberhard, J. 1988. Molecular organization and function of the complement system. Annual Review of Biochemistry 57: 321-347.

Nakai, S.A. Siebert, K.J. 2003. Validation of bacterial growth inhibition models based on molecular properties of organic acid. International Journal of Food Microbiology 86: 249-255.

Ng, W.K., Koh, C.B., Sudesh, K. Siti-Zahrah, A. 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, (*Oreochromis* sp.) and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture. 13: 1490-1500.

Pandey, A. Satoh, S. 2008. Effects of organic acids on growth and phosphorus utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries science 74: 867-874.

Peiretti, P., Meineri, G. 2008. Effects of diets with increasing levels of Spirulina platensis on the performance and apparent digestibility in growing rabbits. Livestock Science 118: 173-177.

Pionnier, N., Falco, A., Miest, J., Shrive, K., Hoole, D. 2014. Feeding common carp *Cyprinus carpio* with β-glucan supplemented diet stimulates C-reactive protein and complement immune acute phase responses following PAMPs injection. Fish and Shellfish Immunology 39: 285-295.

Pourkazemi, M. 2006. Caspian Sea sturgeon conservation and fisheries: past present and future. Journal of Applied Ichthyology 22:12-16.

Reda, R.M., Mahmoud, R., Selim, K.M., El-Araby, I.E. 2016. Effects of dietary acidifiers on growth, hematology, immune response and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunology 50: 255-262.

Sahu, S., Das, B., Mishra, B., Pradhan J., Sarangi, N. 2007. Effect of Allium sativum on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. Journal of Applied Ichthyology 23: 80-86.

Sitja-bobadilla A., Palenzuela O., Alvarez-Pellitero, P. 2008. Immune response of turbot, *Psetta maxima* (L.) (Pisces: Teleostei), to formalin-killed scuticociliates (Ciliophora) and adjuvanted formulations. Fish and Shellfish Immunology 24: 1-10.

Siwicki, K., Anderson, P. 2010. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Disease diagnosis and prevention methods, FAO project GCP/INT/JPA, IFI, Olsztyn, Poland 105-112.

Soltani, M., Lymbery, A., Song, K., Hosseini Shekarabi, P. 2018. Adjuvant effects of medicinal herbs and probiotics for fish vaccines. Reviews in Aquaculture 4: 1325-1341.

Stet, J., Kruiswijk, P., Dixon, B. 2003. Major histocompatibility lineages and immune gene function in teleost fishes: the road not taken. Critical Reviews in Immunology 23: 441-471.

Sudagar, M., Hosseinpoor, Z., Hosseini, A. 2010. The use of citric acid as attractant in diet of grand sturgeon (*Huso huso)* fry and its effects on growing factors and survival rate. AACL Bioflux 4: 311-316.

Sumpter, P. 1997. The endocrinology of stress. Fish Stress and Health in Aquaculture 819: 95-118.

Teimouri, M., Amirkolaie, A.K., Yeganeh, S. 2013. Effect of Spirulina platensis meal as a feed supplement on growth performance and pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Journal of Fish and Marine Sciences 5: 194-202.

Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, C., Kato, T., Sakai, M. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, (*Cyprinus carpio*). Aquaculture 258: 157-163.

Zhang, J., Guan, J., Yang, F., Liu, H., Cheng, X., Li, S. 2008. Qualitative and quantitative analysis of four species of Curcuma rhizomes using twice development thin layer chromatography. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 8: 1024-1028.

Won-Seok, H., Yu-Ri, K., Eun-Young, K., Sungchul, C.B., In-Soo, K. 2013.Effects of dietary probiotic, *Lactococus lactis* Subsp. lactis 12, Supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthyo livaceus*). Aquaculture 376-379: 20-24.