

University of Guilan

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 Sabetmand¹, Hamid Faghani Langroudi*¹, Abasali Zamini², Babak Tizkar³

1- Department of Fisheries, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Tonekabon, Iran

2- Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

3- Aquatics and Fisheries Research Department, Guilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Rasht, Iran

Received 30 April 2021

Revised 12 November 2021

Accepted 15 November 2021

KEYWORDS ABSTRACT

Acidifier

Spirulina

Immune system

Blood

Common carp

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 T₁: basic diet supplemented with 0.5% citric acid; T₂: basic diet supplemented with 0.1% citric acid; T₃: basic diet supplemented with 0.2% spirulina extract; T₄: basic diet supplemented with 0.3% spirulina extract; T₅: basic diet supplemented with 0.2% spirulina extract and 0.05% citric acid; T₆: 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: hamid_faghani1@yahoo.com



دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان



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

DOI: 10.22124/janb.2022.22126.1166

"مقاله پژوهشی"

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

حسین ثابت مندا^۱، حمید فغانی لنگرودی*^۱، عباسعلی زمینی^۲، بابک تیزکار^۳

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۲۴

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۰

کلمات کلیدی

چکیده

این تحقیق برای تعیین میزان اثربخشی جلبک اسپیرولینا و اسیدی کننده 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.

مقدمه

ماهی کپور معمولی یکی از باارزش‌ترین ماهیان پرورشی دنیا است (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 این گونه به بیماری‌های شایع کپور مثل HCV با توجه به محدود شدن استفاده از داروهای شیمیایی و تولیدات آبی‌پروری (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 آبی‌پروری دارد (Stet et al. 2003; Soltani et al. 2018).

امروزه ترکیبات پلی‌ساکاریدی استخراج شده از منابع مختلف برای دستگاه ایمنی در حیوانات شناخته شده 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 قابل توجهی 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)، قزل‌آلای 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 دارا بودن 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 آبی 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 رنگین کمان (سلیمانی ایرایی و همکاران، ۱۳۹۱) (Pandey and Satoh. 2008; Sime دریایی قرمز (*Pagrus major*) (Hossain et al. 2007)، هیبرید تیلایپای 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

برای افزودن آرد جلبک و محلول اسیدی کننده بر اساس تیمارهای طراحی شده، ابتدا جیره پایه به کمک چرخ گوشت خورده شده و سپس بر اساس مقادیر متناسب آرد جلبک، با آن مخلوط و محلول اسیدی کننده بر روی غذا افزوده شد.

شرایط دما و اکسیژن برای تمامی آکواریومها در طی آزمایش یکسان بود. فراسنجه‌های فیزیوشیمیایی آب شامل اکسیژن و دما با استفاده از دستگاه اکسی متر (OXI3230B/SET) سه بار در روز، pH با استفاده از دستگاه pH meter مدل (PH330i/SET) یکبار در روز و میزان نیتريت و آمونیاک غیر یونیزه (بر حسب میلی گرم 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، نیتريت و آمونیاک غیر یونیزه به ترتیب برابر $7/2$ ، $7/9$ ، $0/2$ mg/L و $0/8$ mg/L 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 (1150 mg/L) انجام شد (محمدی ارانی، ۱۳۹۵) نمونه‌های خونی استحصال شده 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 ایمونوتوربیدی متری (Won- Seok et al. 2013) استفاده شد.

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

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 $60 \times 40 \times 30$ سانتی‌متر انجام شد. به این منظور تعداد ۲۷۰ قطعه بچه‌ماهی کپور معمولی به متوسط وزن $1/21 \pm 11/35$ و درازای $0/8 \pm 7/3$ از کارگاه بخش خصوصی تهیه شد. به‌منظور همسان‌سازی عملیات تحقیق، بچه ماهیان تهیه شده 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 اسیدی کننده، 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.

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 ایمونوتوربیدیتری (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 (CRD) Completely Randomized Design در سه تکرار برای هر تیمار استفاده شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با روش کولموگروف اسمیرنوف، برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، از آزمون واریانس یک‌طرفه ANOVA و برای تعیین معنی‌دار بودن آزمایش‌ها از روش دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. تجزیه و تحلیل 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 ($p > 0.05$). این نتایج همچنین بیانگر وجود اختلافاتی در میزان Hb (هموگلوبین) و Hct (هماتوکریت) خون ماهیان در تیمارهای مختلف بوده است ($p < 0.05$; جدول ۲). در این بین تیمار ۶ (۰/۳٪ اسپرولینا + ۰/۱٪ اسید سیتریک) بیش‌ترین مقدار هماتوکریت و هموگلوبین را داشتند ($p < 0.05$; جدول ۲) و کمترین مقدار هماتوکریت و هموگلوبین در تیمار ۱ (۰/۰۵٪ اسپرولینا) مشاهده شد ($p < 0.05$; جدول ۲).

در بین گلبول‌های سفید اختصاصی به‌غیراز میزان ائوزینوفیل ($p > 0.05$)، مقدار نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت در بین تیمارهای مختلف، اختلاف معنی‌دار نشان داد ($p < 0.05$; شکل ۱). کمترین مقدار نوتروفیل و مونوسیت در تیمار ۱ (۰/۰۵٪ اسپرولینا) و بیش‌ترین مقدار نوتروفیل در تیمار ۳، ۶ و ۷ مشاهده شد ($p < 0.05$).

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 ($p < 0.05$).

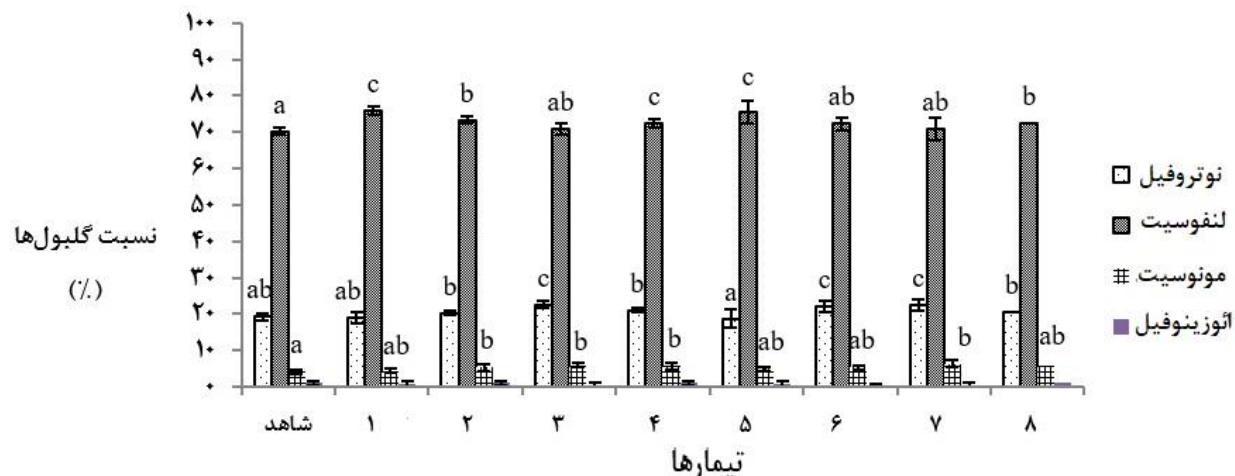
لیزوزیم در تیمارهای ۳، ۴، ۷، ۸ بیش‌ترین مقدار را نسبت به دیگر تیمارها نشان داد ($p < 0.05$).

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

تیمارهای آزمایشی									
تیمار ۸	تیمار ۷	تیمار ۶	تیمار ۵	تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	شاخص‌های خونی
۷۴۰ ± ۸۵	۷۸۶ ± ۳۵	۶۳۶ ± ۷۵	۵۴۶ ± ۳۵	۷۲۶ ± ۴۷	۷۵۳ ± ۱۱۲	۷۲۶ ± ۳۵	۵۱۶ ± ۲۵	۵۱۲ ± ۱۷	گلبول سفید (تعداد × ۱۰ ^۳ در mm ^۳)
۱۵۲۳۳ ± ۵۶۸	± ۶۵۰ ۱۵۴۳۳	± ۷۵۴ ۱۶۵۰۰	۱۴۴۳۳ ± ۹۰۱	۱۵۰۶۶ ± ۹۸۶	۱۱۳۳۳ ± ۸۴۲	۱۵۴۶۶ ± ۲۵۱	۱۴۰۱۶ ± ۸۲۵	۱۴۰۶۱ ± ۶۲۵	گلبول قرمز (تعداد × ۱۰ ^۳ در mm ^۳)
± ۰/۱۵ ^{abc} ۵/۶۷	۵/۷ ± ۰/۲۶ ^{bc}	۶/۲۳ ± ۰/۱۵ ^d	۵/۴۳ ± ۰/۳۱ ^{ab}	۵/۵۷ ± ۰/۳۹ ^{ab}	۶/۰۳ ± ۰/۱۵ ^{cd}	۵/۷ ± ۰/۱۰ ^{bc}	۵/۲۵ ± ۰/۲۵ ^a	۴/۹۳ ± ۰/۲۸ ^a	هموگلوبین (g/dL)
± ۰/۵۸ ^{abc} ۲۸/۳	۲۹ ± ۰/۰۱ ^{bc}	± ۰/۵۸ ^d ۳۱/۳۳	± ۱/۵۳ ^{ab} ۲۷/۶۷	± ۱/۱۵ ^{ab} ۲۷/۶۷	۳۰ ± ۰/۰۱ ^{cd}	± ۰/۵۸ ^{abc} ۲۸/۳۳	۲۷ ± ۰/۰۰۱ ^a	± ۰/۲۸ ^a ۲۶/۹۵	هماتوکریت (/)
± ۵/۱۳ ۱۸۵/۳۳	± ۶/۶۶ ۱۸۷/۶۷	۱۹۰ ± ۵/۵۷ ۳۷/۷۷	± ۲/۰۸ ۱۹۱/۳۳	± ۴/۱۶ ۱۸۳/۶۷	± ۳/۵۱ ۱۸۴/۳۳	± ۴/۵۱ ۱۸۳ ± ۱/۷۳	± ۴/۵۱ ۱۹۲/۶۷	± ۳/۹۵ ۱۸۹/۷۲	حجم متوسط گلبول‌های قرمز (fl)
۳۷/۱۷ ± ۰/۳۸	۳۷/۵۳ ± ۰/۴۶	± ۰/۸۵ ۳۷/۷۷	۳۷/۶۰ ± ۰/۳۶	۳۶/۹۳ ± ۰/۵۵	۳۷/۳۳ ± ۰/۴۷	۳۶/۸۰ ± ۰/۱۰	۳۷/۵۳ ± ۰/۴۶	۳۷/۹۵ ± ۸/۱۲	میزان متوسط هموگلوبین (pg)
۱۹/۹۷ ± ۰/۱۷	۱۹/۶۳ ± ۰/۶۴	۱۹/۹ ± ۰/۱۷	۱۹/۶ ± ۰/۰۰	۲۰/۱ ± ۰/۱۷	۲۰/۱ ± ۰/۱۷	۲۰/۱۳ ± ۰/۲۳	۱۹/۴۷ ± ۰/۲۳	۱۹/۹۹ ± ۰/۲۹	میانگین غلظت هموگلوبین (g/dL)

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

تیمار ۸	تیمار ۷	تیمار ۶	تیمار ۵	تیمار ۴	تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	فراسنجه-های ایمنی
۴۰/۶۷ ± ۱/۵۳ ^b	۴۶/۶۷ ± ۲/۵ ^{bc}	۴۱/۶۷ ± ۳/۰۶ ^b	۴۱ ± ۳/۶۱ ^b	۴۱/۳ ± ۱/۵۳ ^b	۴۸/۶۷ ± ۴/۰۴ ^c	۴۱ ± ۵/۲۹ ^b	۳۲/۳۳ ± ۴/۹۳ ^a	۳۱/۲۸ ± ۳/۹۵ ^a	IgM (mg/dL)
۱۶/۶۳ ± ۰/۱۵ ^d	۱۷/۲ ± ۰/۳ ^c	۱۵/۶۳ ± ۰/۱۵ ^{bc}	۱۵/۱۷ ± ۰/۳۲ ^b	۱۶/۴ ± ۰/۱۵ ^d	۱۶/۶۷ ± ۰/۱۵ ^d	۱۵/۹۷ ± ۰/۳۳ ^c	۱۵/۲۳ ± ۰/۳۱ ^{ab}	۱۴/۰۶ ± ۰/۲۷ ^a	ایمونوگلوبین (mg/mL)
۳۳ ± ۱/۷۳ ^b	۳۲/۳۳ ± ۳/۰۶ ^b	۲۶ ± ۳/۴۶ ^b	۲۸ ± ۰/۰۲ ^b	۲۹ ± ۱ ^b	۳۰/۳ ± ۲/۰۸ ^b	۲۷/۳ ± ۲/۵۲ ^b	۲۹/۳ ± ۲/۰۸ ^b	۳۰/۱ ± ۲/۰۶ ^b	لیزوزیم (u/mL/min)



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

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 (*Trichogaster 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 مورد استفاده 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.

از آنجا 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 کارایی 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 (کازمی و همکاران،

بحث

امروزه صنعت آبی‌پروری به دنبال راه‌حل‌های جدید برای افزایش بهره‌وری در تولید آبزبان 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 آبی‌پروری 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 rohita*) 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 جایگزین کردن آرد جلبک اسپیرولینا با آرد ماهی باعث افزایش رشد تیلاپپای نیل شدند.

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 جیره ۴٪ اسپیرولینا تغذیه کرده بودند، نسبت به شاهد بهبود یافته بود. در خاتمه، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از مکمل‌های اسپیرولینا 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.

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 تیلاپپای 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

(*Oncorhynchus mykiss*) بهره‌برداری و پرورش

آبزیان ۳: ۱-۱۴.

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

منابع

سقا، ح.ر.، سروش‌نیا، م. ۱۳۸۲. تجهیزات و فرآورده‌های

آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر. ۲۶۸۷ صفحه.

سلیمانی ایرانی، م.، سجادی، م.، کرامت‌امیرکلایی، ع.، فرحی،

ا.، کریم‌زاده، ص. ۱۳۹۱. اثرات سطوح مختلف مکمل

اسیدهای آلی بر کارایی رشد، ترکیبات لاشه و

شاخص‌های خونی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان

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 (*Oncorhynchus 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 β carotene 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., Hosseinpour, 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. *AAACL 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, *Lactococcus lactis* Subsp. *lactis* 12, Supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys livaceus*). *Aquaculture* 376-379: 20-24.