University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 9, No. 4, 2024, pages: 65-85
DOI: 10.22124/janb.2024.25815.1223

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Production of *Arthrospira platensis* algae to increase production efficiency and enhance immune system of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* against *Aeromonas hydrophila*

Hoseein Adineh
Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Gonbad Kavos University, Gonbad Kavos, Golestan, Iran

Received 02 November 2023 Revised 19 December 2023 Accepted 21 December 2023

KEYWORDS

Spirulina algae
Ctenopharyngodon idella
Growth performance
Non-specific immunity
Bacterial disease

ABSTRACT

Introduction: Spirulina is a unicellular and filamentous blue-green algae that has gained considerable popularity in the health food industry and increasingly as a protein and vitamin supplement to aquaculture diets. It has long been used as a dietary supplement by people living beside the alkaline lakes, where it is naturally found. Spirulina has been used as a complementary dietary ingredient of feed for fish, shrimp and poultry. Among the various species of Spirulina, the blue green algae, *Spirulina platensis* has drawn more attention because it shows a high nutritional content characterized by 70% protein content and by the presence of minerals, vitamins, amino acids, essential fatty acids, etc. Spirulina is used because of its bioactive compounds that are able to enhance fish growth, protect against diseases, strengthen the immune system, stimulate hunger and enhance feed consumption, reduce stress and improve digestion by increasing secretion of different digestive enzymes. It also exhibits antimicrobial and antiviral properties. In the present study, we examined the effect of blue-green algae *Spirulina platensis* biomass on growth performance, secretions of digestive enzymes, blood physiological indices and resistance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* infected with *Aeromonas hydrophila*.

Materials and methods: The production of live spirulina algae was done in Arka Algae Hyrcanian Company, Golestan Province, in a greenhouse environment with 2 long pools with dimensions of 12 m long, 2.5 m wide and 50 cm height. To enrich the pool, salt at the rate of 15 g/L, sodium bicarbonate at 16 g/L, and Zaruk culture medium were used according to

the manufacturer's instructions. Then, 10 to 14 days after the storage of the initial stock, when the depth of the visible Secchi disc was about 2 cm, the harvesting operation was performed from the pool. To prepare the basic diet, items were prepared and ration balance was done with the UFFDA software. Chemical composition (protein, fat and ash) of formulated diet was measured according to AOAC method. Two hundred and forty fish (7.86 ± 0.47 g) were randomly distributed in 12 tanks (20 fish per 50 L). Also, together with the consumption of basic food (protein 32.29% and energy 3984.80 kcal/kg), different levels of spirulina algae were added with a concentration of 4×10^4, 5×10^4 and 6×10^4 cells/mL (S1, S2 and S3, respectively) and basic food without algae (C), daily to rearing tanks for 60 days. At the end of the test period, growth and nutritional performance, digestive enzyme activities, blood serum antibacterial activity against *Aeromonas hydrophila* bacteria, immune and antioxidant factors, and blood indices were measured. One-Way ANOVA test was used for data analysis and Duncan's multiple range test to check the difference in means ($p<0.05$).

Results: The growth of fish in the treatments containing spirulina was significantly higher and the feed conversion ratio was lower compared to the control treatment. Highest protease and lipase activities were observed in S2 and S3 treatments, respectively. The highest blood serum immune response (lysozyme, complement and total immunoglobulin) was observed in S2 and S3 treatments. The lowest and highest concentrations of superoxide dismutase and malondialdehyde were obtained in the control. Bactericidal activity of fish serum was significantly higher in S2 and S3 treatments. The highest white and red blood cells, hemoglobin and hematocrit were observed at S3 treatment; meanwhile, the lowest value was obtained in the control.

Conclusion: In general, physiological parameters such as growth efficiency, digestive secretions, immunity and bactericidal activity of blood serum were improved in grass carp fed with live spirulina algae with a density of 5×10^4 and 6×10^4 cells/mL.

*Corresponding author: adineh.h@gonbad.ac.ir; adineh.h@gmail.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال نهم، شماره چهارم، دی ۱۴۰۲، صفحات ۸۵-۶۵

DOI: 10.22124/janb.2024.25815.1223

"مقاله پژوهشی"

تولید جلبک زنده اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) برای افزایش کارایی تولید و تقویت دستگاه ایمنی ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) در برابر باکتری آئروموناس هیدروفیلا

حسین آدینه

گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۳۰

چکیده

جلبک اسپیرولینا به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال به عنوان تقویت کننده رشد و ایمنی برای آبزیان استفاده می‌شود. در مطالعه حاضر اثرات زی‌توده جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر عملکرد رشد، ترشح آنزیم‌های گوارشی، شاخص‌های فیزیولوژیک خون و مقاومت ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) در مواجهه با بیماری ناشی از آئروموناس هیدروفیلا بررسی شد. ماهی‌ها (۰/۴۷ ± ۷/۸۶ گرم) به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن (۲۰ ماهی در ۵۰ لیتر) توزیع شدند. علاوه بر غذای پایه (پروتئین ۳۲/۲۹٪ و انرژی ۳۹۸۴/۸ کیلوکالری/کیلوگرم) از سطوح مختلف جلبک اسپیرولینا با غلظت‌های ۴×۱۰^{۴}، ۵×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۴} یاخته در میلی‌لیتر (به ترتیب S1، S2 و S3) و غذای پایه بدون جلبک (C) به‌صورت روزانه به‌مدت ۶۰ روز به مخازن پرورش اضافه شد. رشد ماهی در تیمارهای حاوی اسپیرولینا به‌طور معنی دار بیشتر و ضریب تبدیل غذایی کمتر از گروه شاهد بود. بیشترین فعالیت پروتئاز و لیپاز به‌ترتیب در تیمارهای S2 و S3 مشاهده شد. بیشترین پاسخ ایمنی سرم خون (لایزوزیم، کمپلمان و ایمونوگلوبولین کل) در تیمارهای S2 و S3 مشاهده شد. کمترین و بیشترین غلظت سوپراکسید دیسموتاز و مالون دی آلدهید در گروه شاهد به‌دست آمد. فعالیت باکتری‌کشی سرم ماهی در تیمارهای S2 و S3 به‌طور معنی‌دار بیشتر بود. بالاترین تعداد گلبول‌های سفید و قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت در تیمار S3 بود، در این میان کمترین مقدار در تیمار شاهد به دست آمد. به طور کلی، فراسنجه های فیزیولوژیک از جمله کارایی رشد، ترشحات گوارشی، ایمنی و فعالیت باکتری‌کشی سرم خون در ماهی آمور تغذیه شده با جلبک زنده اسپیرولینا با تراکم ۵×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۴} سلول/ میلی‌لیتر (به ترتیب S2 و S3) بهبود یافت.

کلمات کلیدی

جلبک

اسپیرولینا

آمور

عملکرد رشد

ایمنی

غیراختصاصی

بیماری

باکتریایی

نویسنده مسئول: adineh.h@gonbad.ac.ir; adineh.h@gmail.com

مقدمه

در آبزی‌پروری، ماهیان اغلب با تغییرات ناگهانی در دمای محیط، انتقال، ذخیره‌سازی (تراکم)، غذا و کاهش کیفیت آب و عفونت‌های باکتریایی و ویروسی روبه‌رو می‌شوند. این عوامل محیطی مضر می‌توانند توازن بین ماهیان و محیط آن‌ها را برهم‌زده و موجب پاسخ‌های استرسی در ماهیان شوند. استرس اثرات اساسی بر آسایش و بازدهی در ماهیان پرورشی دارد و با کاهش رشد، رفتار غیرعادی و تضعیف دستگاه ایمنی در ارتباط است (Aksakal et al. 2011). همچنین، تنش سبب نقص فیزیولوژیک می‌شود. بنابراین، در بدن یک سامانه دفاع ضداکسایشی وجود دارد که آسیب ناشی از رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد. کاهش کارکرد دستگاه ضداکسایشی و عدم تعادل در میزان تولید رادیکال-های آزاد و دستگاه دفاع ضداکسایشی بدن شرایط را برای بروز تنش اکسیداتیو فراهم می‌کنند (Maritim et al. 2003).

یکی از روش‌های افزایش مقاومت در برابر استرس‌های محیطی و بیماری‌ها، استفاده از ترکیبات زیست فعال با خاصیت ضداکسایشی مانند ریز جلبک سبز-آبی اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) است. به همین دلیل، به-کارگیری جلبک اسپیرولینا به صورت زنده در محیط پرورش و پودری در جیره غذایی توجه روزافزون صنعت آبزی‌پروری را به خود جلب کرده است. اسپیرولینا یکی از جلبک‌های پرمصرف است که به دلیل داشتن حدود ۵۰ تا ۷۰٪ پروتئین، ویتامین‌ها به خصوص ویتامین کوبالامین، مواد معدنی، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب ضروری مانند گاما-لینولنیک اسید، پلی‌ساکاریدها، فیکوبیلی پروتئین‌ها، رنگدانه‌های ضداکسایشی مانند بتاکاروتن (Ceballos et al. 2005; Peiretti and Meineri, 2008; Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009)، و به دلیل عدم وجود سلولز در ترکیبات ساختاری خود و مقدار پایین اسید نوکلئیک به راحتی هضم و جذب می‌شود و می‌توان آن را به‌عنوان غذای بچه ماهیان در دوره پرورش استفاده کرد. این جلبک نه تنها مانع تکثیر یاخته‌ای ویروس‌ها می‌شود، بلکه باعث تقویت توانایی بدن برای تولید یاخته‌های خونی جدید می‌شود، به طوری که استفاده از جلبک اسپیرولینا باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت بخش‌های مهم دستگاه ایمنی مثل یاخته‌های بنیادی مغز استخوان، ماکروفاژها (تعداد یاخته‌ها و قدرت بیگانه‌خواری)، یاخته‌های T (لنفوسیت‌ها)، یاخته‌های NK (سیتوتوکسیک‌های غیر اختصاصی)، طحال و تیموس می‌شود (Tongsiri et al. 2010; Shahbazi and Bolhassani, 2016).

مطالعات داخلی منتشر شده در خصوص اثرات استفاده از جلبک اسپیرولینا را می‌توان به مطالعه اثر افزودن جلبک اسپیرولینا و مولتی آنزیم ناتوزیم بر عملکرد رشد، بازماندگی و شاخص‌های خونی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Farhadi et al. 2023)، اثر پلی‌ساکاریدهای محلول در آب حاصل از ریزجلبک اسپیرولینا بر عملکرد رشد، ترکیب بدن و پاسخ ایمنی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) (Valipour et al. 2022)، تأثیر مکمل غذایی لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا بر شاخص‌های رشد و ایمنی جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*) (Sadeghi Goghari et al. 2021)، و اثر پودر اسپیرولینا بر رشد، بازماندگی، کاروتنوئید کل ماهیان پیش مولد و پرورش در مرحله نوزادی ماهی گورامی کوتوله (*Trichogaster lalius*) (Biabani Asrami et al. 2017) اشاره کرد. همچنین، در این راستا مطالعات خارجی منتشر شده را می‌توان به به‌کارگیری اسپیرولینا زنده به عنوان محرک رشد و ایمنی برای ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) (Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009)، استفاده از رژیم غذایی حاوی اسپرولینا بر بهبود رشد، آنزیم‌های گوارشی و ضداکسایشی و پاسخ ایمنی ماهی آمور (*Ctenopharyngodon idella*) (Faheem et al. 2022)، اثرات فردی و ترکیبی مکمل غذایی *Spirulina platensis* و *Bacillus licheniformis* بر عملکرد رشد، ظرفیت ضداکسایشی، ایمنی ذاتی، بیان ژن و مقاومت ماهی قرمز (*Carassius auratus*) به بیماری ناشی از *Aeromonas hydrophila* (Yousefi et al. 2022)، نقش مکمل‌های غذایی حاوی اسپیرولینا و بتائین بر رشد، خون‌شناسی، فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم، وضعیت ضداکسایشی، پاسخ‌های ایمنی و مقاومت به بیماری در ماهی تیلاپیای نیل (Awad et al. 2022) اشاره کرد. ماهی آمور یا کپور علفخوار یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی آب شیرین در جهان است که برای کنترل علف-های هرز در رودخانه‌ها، استخرهای پرورش ماهی و مخازن استفاده می‌شود (Frimodt, 1995)، از این‌رو، پرورش این گونه در استخرهای پرورشی، دریاچه‌های مصنوعی، کانال‌های آبیاری و آبگیرهای طبیعی به عنوان یک منبع مهم تولید پروتئین محسوب می‌شود

(Agami and Waisel, 1988). ماهی آمور به علت خصوصیات منحصر به‌فرد مانند رشد سریع و تولید کم هزینه و پربازده، یکی از ماهیان بازارپسند برای پرورش در آب شیرین در بسیاری از نقاط جهان است. این ماهی نقش مهمی را در صنعت آبزی‌پروری ایفا می‌کند، به‌طوری‌که تولید سالیانه آن در جهان ۵۷۹۲ هزار تن در سال ۲۰۲۰ شده است (FAO, 2023). این ماهی در بیش از ۱۰۰ کشور جهان از جمله کشورهای آسیای شرقی و آمریکای شمالی و اروپا به عنوان ماهی خوراکی مصرف شده و یک گونه مناسب برای کنترل زیستی پلانکتون‌های گیاهی و گیاهان آبزی است (Mitchell and Kelly, 2006; Chen et al. 2009).

تحقیقات مختلفی درباره استفاده از پودر جلبک اسپیرولینا در جیره غذایی انواع آبزیان منتشر شده است، اما در پژوهش حاضر از زی‌توده جلبک سبز-آبی اسپیرولینا در محیط پرورش ماهی آمور استفاده شد. از این‌رو، هدف از اجرای این تحقیق، بررسی تأثیر سطوح مختلف زی‌توده جلبک سبز-آبی اسپیرولینا بر بهبود عملکرد رشد، تقویت دستگاه ایمنی ماهی آمور و مقاوم‌سازی در برابر بیماری باکتریایی ناشی از آئروموناس هیدروفیلا بود.

مواد و روش‌ها

شرایط نگهداری ماهی آمور

تعداد ۲۴۰ قطعه بچه‌ماهی آمور به آزمایشگاه شیلات دانشگاه گنبد انتقال یافت و به‌مدت ۱۴ روز با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند. ماهیان با میانگین وزن ۰/۴۷ ± ۷/۸۶ گرم به طور تصادفی در ۴ تیمار آزمایشی (هر یک با ۳ تکرار) جایابی شدند. در مجموع، تعداد ۱۲ مخزن پلاستیکی مدور با حجم ۵۰ لیتر آبگیری و در هر مخزن تعداد ۲۰ قطعه ماهی قرار داده شد. در دوره سازگاری با محیط آزمایشگاه ماهی‌ها با غذای پایه بدون هیچ‌گونه افزودنی به میزان ۳٪ وزن بدن و در ۳ نوبت (۸ صبح، ۱۲ و ۱۷ عصر) غذادهی شدند. دمای آب در محدوده بین ۲۶ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد، دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، هر روز بعد از غذادهی، عمل سیفون کردن آب نسبت به خارج کردن مدفوع بچه ماهیان و غذای باقی مانده انجام شد.

تولید جلبک زنده اسپیرولینا در شرایط گلخانه

تولید جلبک زنده اسپیرولینا در شرکت آرکاجلبک هیرکانیان به شرح زیر انجام شد. گلخانه‌ای با مساحت ۱۲۰ مترمربع (۱۵ × ۸ متر) دارای ۲ استخر با ابعاد ۱۲ متر درازا، ۲/۵ متر پهنا و ۵۰ سانتی‌متر ارتفاع بود. برای آبگیری استخر از آب لوله‌کشی کلرزدایی شده در استخرهایی با عمق آبگیری ۳۰ سانتی‌متر استفاده شد. برای غنی‌سازی استخر از نمک به میزان ۱۵ گرم در لیتر، جوش شیرین به‌میزان ۱۶ گرم در لیتر و محیط کشت زاروک حاوی ترکیبات (جدول ۱) بر اساس دستورالعمل شرکت تولیدکننده استفاده شد. از استوک اولیه جلبک محلول به میزان ۱:۱۰ (۱ لیتر استوک در ۱۰ لیتر آب کلرزدایی شده) در استخرها استفاده و شرایط محیطی همچون دمای محیط گلخانه در محدوده ۳۲ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد، pH اولیه حدود ۸/۵ تا ۹ نگهداری شد. از نور طبیعی غیرمستقیم خورشید استفاده شد. برای گردش آب استخر، همزن پارویی مکانیکی به‌طور مداوم به کار گرفته شد. ۱۰ تا ۱۴ روز پس از ذخیره‌سازی استوک اولیه زمانی‌که عمق رؤیت سشی-دیسک حدود ۲ سانتی‌متر شد، عملیات برداشت از استخر انجام شد. برای استفاده از جلبک در مخازن پرورش ماهی، بعد از ۱۰ روز از کشت جلبک که به مرحله رشد سریع وارد شدند، با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (Sigma, Germany) با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه طی ۵ دقیقه جمع‌آوری، و سپس جلبک‌ها تا زمان تغذیه ماهی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به دلیل رشته‌ای بودن جلبک و عدم امکان شمارش، تراکم یا چگالی یاخته به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۸۰ نانومتر و بر اساس معادله رگرسیون خطی برآورد شد (Nogueira et al. 2018):

$$CD\ (trichomes/mL) = [(OD + 0.127)/0.179].10$$

جدول ۱ ترکیبات شیمیایی محیط کشت (زاروک) بکارگرفته شده برای پرورش جلبک اسپیرولینا

Table 1 Chemical composition of culture medium (Zaruk) used for growing spirulina algae

Chemical composition	g/L
$NaHCO_3$	16.8
K_2HPO_4	0.5
$NaNO_3$	2.5
K_2SO_4	1
NaCl	1
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
$CaCl_2.2H_2O$	0.04
$FeSO_4.7H_2O$	0.01
EDTA	0.08
H_3BO_3	2.86
$MnCl_2.4H_2O$	1.81
$ZnSO_4.4H_2O$	0.222
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.01777
$CuSO_4.5H_2O$	0.079

طرح آزمایش

برای تهیه غـذای پایـه (جدول ۲) تـوسط نـرم افزار جیره-نویسی UFFDA بالانس جیره انجام و با تهیه اقلام غذایی و مخلوط آنها پس از تهیه خمیر و عبور از چرخ گوشت در برابر پنکه برای خشک شدن نیز قرار داده شد. سنجش ترکیبات شیمیایی (پروتئین، چربی و خاکستر) غذای فرموله شده به روش AOAC (۱۹۹۰) انجام شد. در این آزمایش به همه تیمارهای آزمایشی علاوه بر غذای پلت از ۴ سطح جلبک زنده اسپیرولینا شامل غلظت‌های ۴×۱۰^۴، ۵×۱۰^۴ و ۶×۱۰^۴ یاخته در میلی‌لیتر (به ترتیب S1، S2 و S3) و غذای پایه بدون جلبک (C) (Shan and Lin, 2014) به‌صورت روزانه به‌مدت ۶۰ روز استفاده شد.

جدول ۲ اجزای تشکیل‌دهنده و ترکیبات شیمیایی جیره

Table 2 Ingredients and chemical composition of diet

Ingredients	g/kg diet	Ingredients	g/kg diet
Fish meal	100	Lysine	4
Meat meal	100	Methionine	4
Soybean meal	300	Molasses	10
Wheat flour	220	Antifungal	2
Wheat bran	100	Dicalcium phosphate	1
Corn flour	140	Vitamin premix	2.5
Fish oil	7	Mineral premix	2.5
Soybean oil	7		
Proximate Composition			
Dry matter	89.50		
Crude protein	32.29		
Crude lipid	5.92		
Crude ash	7.02		
Energy (kcal/kg)	3984.80		

عملکرد رشد و تغذیه

پایان دوره تغذیه با زی‌توده جلبک اسپیرولینا، وزن کل با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ و درازای کل با استفاده از تخته زیست سنجی با دقت ۰/۱ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد تا شاخص‌هایی چون افزایش وزن (WG, g)، نرخ رشد ویژه (SGR, %/day)، ضریب چاقی (CF)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و کارایی تبدیل غذا (FCE, %) بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شود (Adineh et al. 2021):

$$WG\ (g) = Wf - Wi$$

Wi: وزن اولیه (گرم)؛ Wf: وزن نهایی (گرم)

$$SGR\ (\%/day) = [(L_nWf - L_nWi) / t] \times 100$$

Wi: وزن اولیه (گرم)؛ Wf: وزن نهایی (گرم)؛ t: روزهای پرورش

$$CF = (Wf / TL^3) \times 100$$

Wf: وزن نهایی (گرم)؛ TL: طول کل (سانتی‌متر)

$$FCR = F / WG$$

F: وزن خشک غذای مصرفی (گرم)؛ WG: افزایش وزن تر (گرم)

$$FCE\ (\%) = (WG / F) \times 100$$

سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی

برای تخلیه مواد اضافی از روده ماهیان به‌مدت ۲۴ ساعت قطع غذادهی انجام شد. از هر تکرار ۳ قطعه ماهی (۹ قطعه از هر تیمار) به‌طور تصادفی صید و محوطه شکم با الکل ضدعفونی شد. سپس روده از بدن جدا و توسط سرم فیزیولوژی شست‌وشو شد. نمونه‌های هر تکرار درون میکروتیوب‌های استریل درب دار قرار داده شد و سپس در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان سنجش آنزیم-های گوارشی آمیلاز، لیپاز و پروتئاز ذخیره‌سازی شدند. برای انجام سنجش، نمونه‌ها با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم و سپس به نسبت وزنی-حجمی (۱ به ۹) محلول بافر همگن شدند (Cahu et al. 1999). برای تهیه عصاره آنزیمی، ابتدا بافر ساخته شد که به این منظور ۱۰۰ میلی‌مولار Tris-Hcl، ۰/۱ میلی‌مولار EDTA، ۰/۱٪ Triton در pH ۷/۸ همگن شدند (Rungruangsak-Torrissen et al. 2002). نمونه‌ها در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجه-سانتی‌گراد قرار داده شد که در نهایت مایع رویی به دست آمده به‌عنوان عصاره آنزیمی برای سنجش جدا شد. فعالیت آنزیم آمیلاز با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی و فعالیت آنزیم لیپاز به روش آنزیمی، کالریمتری با استفاده از کیت-های آزمایشگاهی شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده، آمیلاز و پروتئاز بر اساس روش ورتینگتون (Worthington, 1993) و فعالیت لیپاز با هیدرولیز ۰/۵ میلی‌مولار از p-nitrophenyl myristate، ۰/۲۵ میلی-مولار از 2-methoxy ethanol، ۵ میلی‌مولار از sodium cholate و ۰/۲۵ مولار بافر Tris/Hcl سنجش شد (Iijima et al. 1998).

فعالیت ضدباکتریایی سرم خون به باکتری آئروموناس هیدروفیلا

بررسی قدرت باکتری‌کشی سرم از روش گزارش شده Kajita و همکاران (۱۹۹۰) و همچنین Barnes و همکاران (۲۰۰۳) با کمی اصلاح استفاده شد. به این منظور ابتدا کشت باکتری آئروموناس هیدروفیلا در محیط TBS به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و سپس یاخته‌های باکتریایی توسط دستگاه سانتریفوژ (هرمیل مدل Z 216 MK ساخت کشور آلمان) در دامنه ۳۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه جمع‌آوری و با افزودن مقداری بافر فسفات سدیم استریل به آن‌ها جذب نوری سوسپانسیون حاصله در طول موج ۵۴۶ نانومتر برابر ۱ تنظیم شد. سپس تعداد باکتری به‌میزان 10^5 باکتری در میلی‌لیتر در ژلاتین ورونال بافر استریل (حاوی ۰/۵ میلی‌مول/میلی‌لیتر یون کلسیم و ۰/۱۵ میلی‌مول/میلی‌لیتر یون منیزیم برابر پی‌اچ ۷/۵) تنظیم شد. سوسپانسیون باکتریایی حاصل به نسبت ۱:۱ با سرم ترکیب شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با حرکت ملایم گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۵ میکرولیتر از مخلوط سرم و باکتری در محیط کشت TSA در سه تکرار کشت داده شد. محیط‌های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد گرمخانه‌گذاری شده و سپس به کمک دستگاه کلونی کانتر، تعداد پرگنه‌های باکتریایی رشد یافته بر روی محیط کشت شمارش شد. نتایج به صورت متوسط تعداد باکتری شمارش شده در هر سه تکرار برای هر نمونه گزارش شد.

سنجش شاخص‌های ایمنی و ضداکسایشی

پایان دوره تغذیه برای سنجش شاخص‌های خونی از هر تکرار به‌طور تصادفی ۳ قطعه ماهی صید شد. برای جداسازی سرم، لوله‌های سرم شناسی فاقد ماده ضد انعقاد

به مدت یک ساعت در یخچال با دمای ۴ درجه نگهداری و پس از ته‌نشین شدن لخته، در دستگاه سانتریفیوژ یخچال-دار با سرعت ۵۰۰۰ دور در ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (Adineh et al. 2021). در نهایت سرم از لخته جدا، و به تیوب‌های جدید منتقل شد و تا زمان شروع آزمایش‌های مربوط به بررسی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم خون در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پروتئین و گلوکز سرم خون با استفاده از کیت تشخیصی شرکت پارس آزمون بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد (Borges et al. 2004). فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP)، آمینوترانسفراز (AST)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) سرم با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون (کرج، ایران) و با دستگاه سنجش بیوشیمیایی خودکار تعیین شدند. میزان ایمونوگلوبولین کل توسط کیت مخصوص به‌روش کدورت-سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. برای تعیین میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش مرسوم استفاده شد (Ellis, 1990). مقدار ۲۵ میکرولیتر به پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای شکل الایزا افزوده شد. سپس مقدار ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی *Micrococcus lysodeikticus* در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم در لیتر در ۰/۵ مولار بافر فسفات با پی‌اچ ۶/۲ اضافه شد. با استفاده از دستگاه الایزاریدر Bio-Tek آمریکا جذب نوری اولیه در طول‌موج ۵۳۰ nm قرائت و پس از یکساعت نگهداری در دمای اتاق، مجدداً جذب نوری اندازه‌گیری شد. هر واحد از فعالیت لایزوزیم بر اساس کاهش جذب (۰/۰۰۱ در دقیقه) تعیین شد. فعالیت مکمل alternative (ACH_{50}) به روش Sunyer و Tort (۱۹۹۵) تعیین شد. به این منظور فعالیت مکمل بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش اندازه‌گیری شد. گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید-منیزیوم-ژلاتین ورنال شسته شده و تعداد یاخته‌های آن به کمک لام نئوبار در هر میلی لیتر بافر ۲×۱۰^{۸} یاخته در میلی‌لیتر تنظیم شد. ابتدا جذب نوری لیز ۱۰۰٪ گلبول‌های قرمز خرگوش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون فوق به ۳/۴ میلی لیتر آب مقطر تعیین و سپس نمونه‌های سرم ۱۰۰ برابر با بافر فوق، رقیق شده و حجم‌های متفاوتی از آن در لوله آزمایش استریل تهیه و حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سرانجام به همه لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه و مخلوط فوق در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه قرار داده شده و در پایان به هر کدام از لوله‌ها ۳/۱۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۸۵٪ کلرید سدیم افزوده شد. سپس لوله‌ها در ۱۶۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و جذب نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴ نانومتر قرائت شد.

برای آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز (SOD)، ابتدا در حضور هیدروژن پراکساید (H_2O_2) فرآیند اتواکسیداسیون پیروگالول بررسی شد. در طی این فرآیند از سطح آنزیم سوپر اکساید دیسموتاز موجود در سرم کاسته شد. سپس سنجش با دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۴۲۰ نانومتر انجام شد (Marklund and Marklund, 1974). فعالیت مالون دی‌آلدئید بر اساس روش استاندارد در طول موج ۵۳۵ نانومتر سنجش شد (Baluchnejadmojarad et al. 2010).

شاخص‌های خونی ماهی آمور

برای سنجش شاخص‌های خون شناختی ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک زنده اسپیرولینا، ماهیان به مدت ۲۴ ساعت قطع غذادهی شدند. نمونه‌های خون از ۳ ماهی از هر مخزن (۹ ماهی از هر تیمار) با استفاده از سرنگ که با هپارین آغشته شده بود، از ساقه دمی ماهی گرفته شد. سپس خون در میکروتیوپ حاوی هپارینه (۱۰ میکرولیتر به ازای ۰/۵ میلی‌لیتر خون) ریخته و طی کمتر از ۲۴ ساعت شاخص‌های خون‌شناسی اندازه‌گیری شد. برای شاخص‌های خون‌شناسی مانند تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و قرمز (RBC) با استفاده از لام هموسیتومتر نئوبار، درصد هماتوکریت (HCT) به روش استاندارد میکروهماتوکریت، غلظت هموگلوبین (Hb) به روش سیانو-مت هموگلوبین (Feldman, 2000) اندازه‌گیری شد و برای ضرایب گلبولی (MCV، MCH و MCHC) از فرمول‌های زیر استفاده شد (Lee et al. 1998):

$$MCV= (HCT/RBC)\times10$$
$$MCH= (Hb/RBC)\times10$$

MCHC= (Hb/RBC)×100

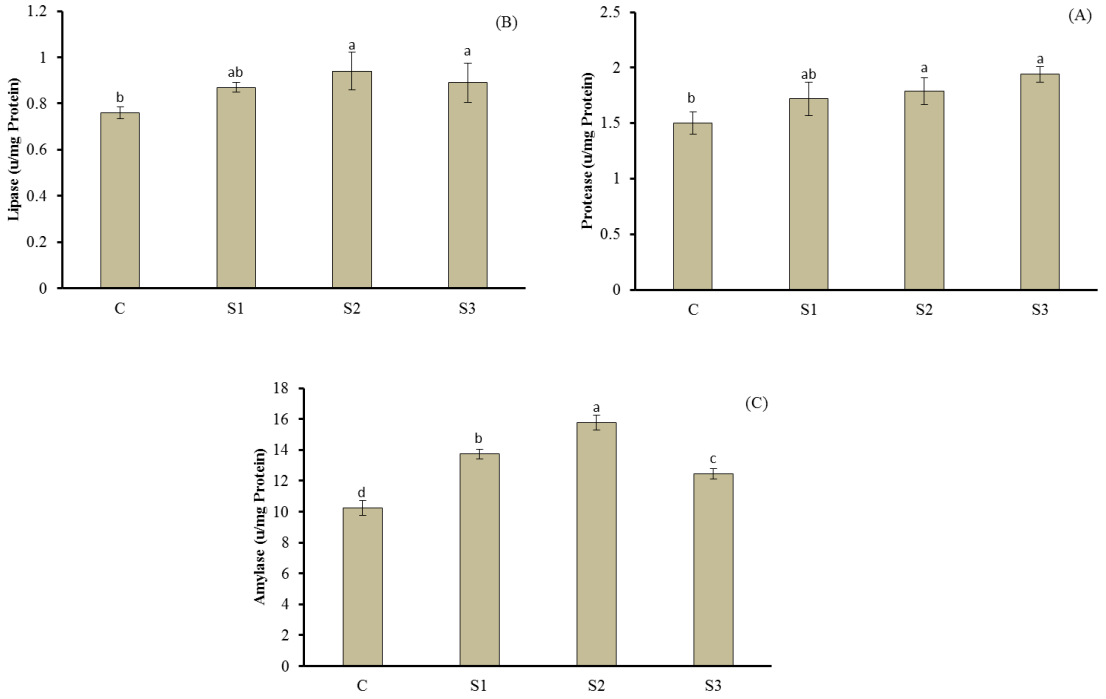
برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت‌ها) نیز گسترش خونی روی لام‌های شیشه‌ای معمولی تهیه و به روش گیمسا رنگ‌آمیزی و نتایج بر حسب درصد به‌دست آمد (Pathiratne and Rajapakshe, 1998).

تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون شاپیرو-ویلک (Shapiro-Wilk Test) بررسی شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آنالیز واریانس یکطرفه (One-way ANOVA) و برای بررسی اختلاف میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ (p<۰/۰۵) استفاده شد. رسم نمودارها در محیط Excel و تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS انجام شد.

نتایج

تجزیه و تحلیل عملکرد رشد و تغذیه ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک زنده اسپیرولینا در جدول ۳ آورده شده است. در پایان دوره تغذیه با جلبک زنده اسپیرولینا، بیشترین وزن نهایی، وزن به دست آمده و نرخ رشد ویژه در تیمارهای S2 و S3 مشاهده شد. ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای تغذیه‌ای با جلبک زنده اسپیرولینا در مقایسه با تیمار شاهد به کمترین حد خود رسید (p<۰/۰۵). بیشترین کارایی تبدیل غذا در تیمارهای S2 و S3 به دست آمد، در حالی که کمترین مقدار کارایی در تیمار شاهد به ثبت رسید (p<۰/۰۵). سنجش آنزیم‌های گوارشی ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک زنده اسپیرولینا در شکل ۱ آورده شده است. غلظت آنزیم پروتئاز در تیمارهای S2 و S3 در مقایسه با تیمار شاهد افزایش معنی‌دار آماری داشت (p <۰/۰۵). غلظت آنزیم لیپاز بین تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری داشت، به طوری که بیشترین آن در تیمارهای S2 و S3 و کمترین آن در تیمار شاهد به دست آمد. بر اساس نتایج به دست آمده بیشترین و کمترین غلظت آمیلاز به ترتیب در تیمارهای S2 و شاهد به دست آمد.



شکل ۱ ترشحات آنزیم‌های گوارشی ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف زیست توده جلبک اسپیرولینا.

حروف غیرمشابه بر روی هر ستون نشان از اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایش است (p<۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی با غلظت‌های ۱۰^۴ × ۴، ۱۰^۴ × ۵ و ۱۰^۴ × ۶ یاخته در میلی‌لیتر (به ترتیب S1، S2 و S3) و شاهد با غذای پایه بدون جلبک (C).

Figure 1 Secretions of digestive enzymes of *C. idella* fed with different levels of spirulina algae biomass. Different letters on each column indicate a significant difference between experimental

treatments ($p<0.05$). Experimental treatments with concentrations of 4×10^4, 5×10^4 and 6×10^4 cells/mL (S1, S2 and S3, respectively) and basic food without algae (C).

سنجش آماری شاخص‌های ایمنی سرم خون ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک زنده اسپیرولینا در جدول ۴ آمده است. فعالیت لایزوزیم در تیمار S2 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). ایمونوگلوبین کل و فعالیت کمپلمان در تیمارهای S2 و S3 در مقایسه با تیمارهای شاهد C و S1 افزایش معنی‌دار آماری داشت (p<۰/۰۵). کمترین غلظت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز و بیشترین غلظت آنزیم مالون دی‌آلدئید در تیمار شاهد به دست آمد.

قدرت باکتری‌کشی سرم خون ماهی آمور تغذیه شده با جلبک زنده اسپیرولینا در شکل ۲ آمده است. بر اساس نتایج به دست آمده قدرت باکتری‌کشی سرم خون در تیمارهای S3 و S2 (به ترتیب ۵/۸۲ ± ۱۰۴/۸۹ و ۵/۵۶ ± ۹۸/۹۶ تعداد پرگنه در میلی لیتر) در مقایسه با تیمار شاهد C (۴/۷۹ ± ۶۶/۰۵ تعداد پرگنه در میلی‌لیتر) افزایش معنی‌داری داشت.

نتایج فراسنجه‌های خونی در جدول ۵ آورده شده است. تعداد گلبول‌های سفید، تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت و نوتروفیل افزایش معنی‌دار آماری در تیمار S3 در مقایسه با تیمار شاهد C داشت (p<۰/۰۵). مقادیر MCV، MCH و MCHC بین تیمارهای مختلف آزمایشی اختلاف آماری معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). در تیمار تغذیه‌ای S3 بیشترین مقدار نوتروفیل و کمترین مقدار مونوسیت به دست آمد. لنفوسیت بین تیمارهای آزمایشی اختلاف آماری داشت (p<۰/۰۵)، به طوری که بیشترین و کمترین آن به ترتیب در تیمارهای S1 و C به دست آمد.

جدول ۳ عملکرد رشد و تغذیه ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف زیست توده جلبک اسپیرولینا

Table 3 Growth and feeding performance of *C. idella* fed with different levels of spirulina algae biomass

	Control without algae (C)	4×10^4 (S1)	5×10^4 (S2)	6×10^4 (S3)
Initial weight (g)	7.88 ± 0.5	7.75 ± 0.39	7.82 ± 0.67	8.01 ± 0.33
Final weight (g)	14.35 ± 1.11^{b}	15.39 ± 1.25^{ab}	16.41 ± 1.31^{a}	16.28 ± 0.96^{a}
Weight gain (g)	6.47 ± 1.23^{b}	7.64 ± 1.05^{ab}	8.58 ± 1.60^{a}	8.27 ± 0.94^{a}
Weight gain (%)	82.85 ± 19.44^{b}	98.63 ± 12.77^{ab}	111.57 ± 29.56^{a}	99.15 ± 21.77^{a}
Specific growth rate (%/day)	0.99 ± 0.16^{b}	1.14 ± 0.1^{ab}	1.23 ± 0.22^{a}	1.18 ± 0.10^{a}
Food conversation rate	2.1 ± 0.38^{a}	1.75 ± 0.25^{b}	1.56 ± 0.29^{b}	1.57 ± 0.19^{b}
Food conversion efficiency (%)	48.94 ± 9.34^{b}	57.9 ± 7.91^{ab}	65.72 ± 12.32^{a}	64.18 ± 7.49^{a}

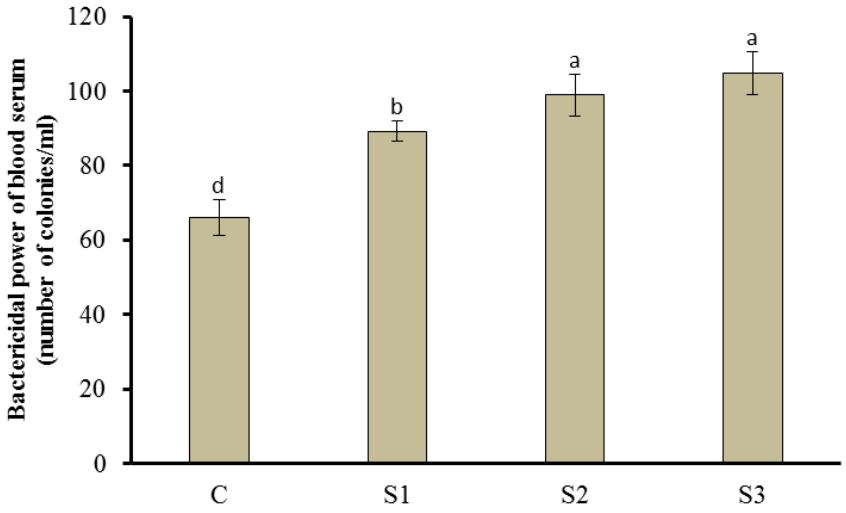
Non-similar letters in each row indicate a statistically significant difference between experimental treatments ($p<0.05$).

جدول ۴ فراسنجه های ایمنی خون ماهی آمور تغذیه شده با زی توده جلبک اسپیرولینا به‌مدت ۶۰ روز

Table 4 Blood immune parameters of *C. idella* fed with spirulina algae biomass for 60 days

	Control without algae (C)	4×10^4 (S1)	5×10^4 (S2)	6×10^4 (S3)
Lysozyme activity (u/mL/min)	28.35 ± 0.66^{c}	$29.83 \pm 0.55b^{c}$	35.33 ± 1.12^{a}	31.25 ± 0.93^{b}
Total immunoglobulin (mg/mL)	15.48 ± 0.35^{b}	15.92 ± 0.17^{b}	16.80 ± 0.26^{a}	17.30 ± 0.76^{a}
Complement activity (u/mL)	123.70 ± 1.42^{b}	124.44 ± 0.77^{b}	131.41 ± 1.15^{a}	129.62 ± 1.34^{a}
Superoxide dismutase (U/mL)	57.81 ± 0.56^{d}	60.03 ± 0.89^{c}	69.71 ± 1.16^{b}	83.26 ± 0.33^{a}
Malondialdehyde (µmol/L)	171.89 ± 3.20^{a}	163.30 ± 3.07^{b}	142.26 ± 2.61^{d}	148.72 ± 1.41^{c}

Non-similar letters in each row indicate a statistically significant difference between experimental treatments ($p<0.05$).



شکل ۲ قدرت باکتری‌کشی سرم خون ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف زیست توده جلبک اسپیرولینا. حروف غیرمشابه بر روی هر ستون نشان از اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای آزمایش است (p<۰/۰۵). تیمارهای آزمایشی با غلظت‌های ۴ × ۱۰^۴، ۵ × ۱۰^۴ و ۶ × ۱۰^۴ یاخته در میلی‌لیتر (بترتیب S1، S2 و S3) و شاهد با غذای پایه بدون جلبک (C).

Figure 2 Bactericidal power of blood serum of *C. idella* fed with different levels of spirulina algae biomass. Different letters on each column indicate a significant difference between experimental treatments ($p<0.05$). Experimental treatments with concentrations of 4×10^4, 5×10^4 and 6×10^4 cells/mL (S1, S2 and S3, respectively) and basic food without algae (C).

جدول ۵ شاخص‌های خون‌شناسی ماهی آمور تغذیه شده با سطوح مختلف زیست توده جلبک اسپیرولینا به‌مدت ۶۰ روز

Table 5 Hematological indices of *C. idella* fed with different levels of spirulina algae biomass for 60 days

	Control without algae (C)	4×10^4 (S1)	5×10^4 (S2)	6×10^4 (S3)
WBC ($\times 1000/mm^3$)	2.74 ± 0.24^c	3.82 ± 0.20^b	3.96 ± 0.22^b	4.53 ± 0.22^a
RBC ($\times 10000/mm^3$)	1.43 ± 0.03^c	1.56 ± 0.03^{bc}	1.63 ± 0.15^b	1.82 ± 0.11^a
Hemoglobin (g/dL)	6.33 ± 0.18^c	6.69 ± 0.19^b	6.88 ± 0.12^b	7.21 ± 0.11^a
Hematocrit (%)	29.27 ± 0.68^c	30.74 ± 0.79^b	31.48 ± 1.60^{ab}	32.20 ± 0.77^a
MCV (fL)	192.66 ± 3.67	192.00 ± 1.27	193.49 ± 0.70	189.03 ± 2.35
MCH (pg/cell)	42.44 ± 0.51	41.92 ± 0.82	42.83 ± 0.87	42.28 ± 1.06
MCHC (g/dL)	21.57 ± 1.33	22.40 ± 1.45	22.33 ± 0.61	22.41 ± 1.11
Neutrophil (%)	10.80 ± 1.39^c	14.24 ± 1.25^{ab}	12.78 ± 0.37^{bc}	15.67 ± 0.87^a
Lymphocyte (%)	71.99 ± 2.04^c	85.67 ± 1.37^a	82.16 ± 1.92^b	84.56 ± 1.47^{ab}
Monocyte (%)	5.43 ± 0.35^a	4.00 ± 0.11^b	4.50 ± 0.45^b	3.28 ± 0.35^c

Dissimilar letters in each row indicate statistically significant differences ($p<0.05$).

بحث

جلبک اسپیرولینا با داشتن مقادیر بالای پروتئین، مواد معدنی، اسیدهای آمینه، لیپیدها و ویتامین‌ها (Geffroy and Simon, 2013) و به دلیل عدم وجود سلولز در ترکیب ساختاری خود و مقدار پایین اسید نوکلئیک به‌راحتی مورد هضم و جذب در بدن قرار می‌گیرد. همچنین، جلبک اسپیرولینا به دلیل داشتن فیکوسیانین، فنوئیک اسیدها، توکوفرول‌ها، افزایش هضم چربی‌ها و جلوگیری از اکسیداسیون چربی‌ها می‌شود (Yeganeh et al. 2015). از این رو در تحقیق حاضر تیمارهای حاوی جلبک زنده به خصوص تیمارهای S2 و S3 در مقایسه با تیمار شاهد دارای عملکرد بهتری بودند. بیشتر تحقیقات تمرکز بر به کارگیری پودر جلبک اسپیرولینا در جیره غذایی آبزیان دارد، درحالی که در تحقیق حاضر از جلبک زنده اسپیرولینا در جیره غذایی ماهی آمور استفاده شد. اگرچه مقایسه به کارگیری جلبک اسپیرولینا به صورت پودری در جیره غذایی (Nasrollahzadeh et al. 2014; Zhang et al. 2020; Mohammadiazarm et al. 2021;

Faheem et al. 2022) و مایع زنده در محیط پرورش (این مطالعه) از نظر شکلی متفاوت است، اما هدف هر دو روش استفاده از جلبک، اثبات فواید استفاده از جلبک اسپیرولینا برای آبزیان است. در همین راستا گزارش شد که به کارگیری پودر ریزجلبک اسپیرولینا در جیره غذایی ماهی زبرای دانیو (*Danio rerio*) بر شاخص ضریب تبدیل غذایی تأثیری نداشت و ۱٪ از آن مکمل منجر به بهبود عملکرد رشد شد (Beiranvand et al. 2015). در تحقیقی ۳٪ پودر جلبک اسپیرولینا به دلیل افزایش شاخص‌های رشد در مرحله پیش مولدی و ۱۰٪ برای دوران نوزادی ماهی گورامی کوتوله به‌عنوان بهترین تیمارها معرفی شدند (Biabani Asrami et al. 2017). بر اساس گزارش‌های منتشر شده، استفاده از پودر جلبک اسپیرولینا در جیره غذایی انواع آبزیان به‌میزان زیاد باعث بهبود رشد و بقا می‌شود (Lu et al. 2008; Zhang et al. 2020). در همین باره، جایگزینی پودر اسپیرولینا در جیره غذایی و تأثیر آن در رشد بچه ماهی نورس سفید (*Rutilus frisii kutum*) نشان داد که استفاده از سطوح مختلف پودر اسپیرولینا در مقایسه با تیمار شاهد وضعیت مطلوبی نداشت (Nasrollahzadeh et al. 2014). همچنین Lu و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند که استفاده از پودر اسپیرولینا آثار قابل توجهی در فرایند سوخت و ساز، رشد و بقای نوزاد و بچه ماهی تیلاپیا داشته است.

در تحقیقی اثرات پودر اسپیرولینا بر عملکرد رشد، ترکیب بدن، فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) ارزیابی شد و نشان داد که پودر اسپیرولینا در سطح ۵۵ گرم بر کیلوگرم جیره می‌تواند به عنوان یک افزودنی طبیعی خوراکی برای بهبود عملکرد رشد، فراسنجه‌های تغذیه و فعالیت آنزیم گوارشی پروتئاز نسبت به تیمار شاهد استفاده شود (Mohammadiazarm et al. 2021). ماده خشک اسپیرولینا در حدود ۶۰ تا ۷۰٪ پروتئین دارد که غنی از ویتامین B، پیش‌ساز ویتامین A و مواد معدنی به خصوص آهن است (Belay, 2002). مطالعه تطبیقی اثر بتاکاروتن و فیکوسیانین رژیم غذایی استخراج شده از جلبک اسپیرولینا بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و آنزیم‌های روده در ماهی تیلاپیای نیل نشان از افزایش وزن و کاهش ضریب تبدیل غذایی در جیره فیکوسیانین بود و همچنین، هر دو تیمار بتاکاروتن یا فیکوسیانین به طور قابل توجهی باعث بهبود آنزیم‌های گوارشی روده در مقایسه با رژیم غذایی شاهد شدند، به طوری که بالاترین مقادیر کیموتریپسین، تریپسین، لیپاز و آمیلاز در ماهی‌های تغذیه شده با فیکوسیانین مشاهده شد (Hassaan et al. 2021).

ارزیابی شاخص‌های خونی و بیوشیمیایی بسیاری از جانوران از جمله ماهیان اطلاعات ارزشمندی درباره سلامت آنها در شرایط زیستی مختلف ارائه می‌دهد (Bani and Haghi Vayghan, 2011). امروزه اسپیرولینا به‌صورت گسترده در صنعت آبزی‌پروری به‌عنوان محرک ایمنی استفاده می‌شود (Promya and Chitmanat, 2011; Watanuki et al. 2006). در مطالعه حاضر، فعالیت لایزوزیم در تیمار S2 مصرف کننده جلبک زنده اسپیرولینا افزایش معنی‌دار آماری داشت. در همین خصوص گزارش شد که استفاده از پودر جلبک اسپیرولینا (۱۰۰ گرم در کیلوگرم) و لاکتوفرین (۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) به‌تنهایی و به صورت ترکیبی منجر به افزایش غلظت لایزوزیم در مقایسه با تیمار شاهد شده است (Sadeghi Goghari et al. 2021). لایزوزیم یکی از مهمترین آنزیم‌های ضدباکتریایی در ایمنی ذاتی علیه عوامل عفونی است (Saurabh and Sahoo, 2008) که در طیف وسیعی از مهره‌داران از جمله ماهیان و سخت‌پوستان وجود دارد و به‌عنوان عامل ضدباکتریایی نامیده می‌شود. در پژوهش حاضر، غلظت ایمونوگلوبین کل و فعالیت کمپلمان در تیمارهای S2 و S3 در مقایسه با دیگر تیمارهای آزمایشی افزایش معنی‌داری داشت. ایمونوگلوبولین‌ها نقش مهمی را در ایمنی همورال ایفا می‌کنند که به‌عنوان ایمنی اکتسابی ماهیان توسط لنفوسیت‌های B ترشح می‌شوند. سنجش غلظت ایمونوگلوبین کل سرم خون ماهیان تغذیه شده با جلبک زنده اسپیرولینا در تیمارهای S2 و S3 نشان افزایش توان ایمنی بود. همسو با نتایج حاضر، افزایش فعالیت‌های لایزوزیم، ACH50 و ایمونوگلوبین‌کل در مطالعات انجام شده بر استفاده از جلبک اسپیرولینا به صورت پودر در جیره غذایی آبزیان و استفاده از جلبک زنده اسپیرولینا توسط دیگر محققان مشاهده شده است (Sakai, 2006; Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009; Yousefi et al. 2022; Faheem et al. 2022).

آنزیم ضداکسایشی سوپراکسید دیسموتاز (SOD) جزء آنزیم‌های مهمی است که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS)

و سم‌زدایی H_2O_2 نقش دارد. همچنین آنزیم مالون دی آلدئید (MDA) اغلب به‌عنوان نشانگر زیستی پراکسیداسیون لیپیدی استفاده می‌شود.

افزایش فعالیت‌های SOD سرم خون (به خصوص تیمار S3) ماهیان تغذیه شده با سطوح مختلف جلبک زنده اسپیرولینا نشان‌دهنده بهبود ظرفیت ضداکسایشی است. نتایج حاضر از نظر افزایش SOD و کاهش فعالیت MDA با یافته‌های مطالعات قبلی در ماهیانی که با جلبک اسپیرولینا تغذیه شده بود، مطابقت کامل دارد (Sheikhzadeh et al. 2019; Xia et al. 2021; Faheem et al. 2022). اسپیرولینا منبع غنی از ترکیبات فعال زیستی مانند کاتچین‌ها، فیکوبیلی-پروتئین‌ها، آلوفیکوسیانین، و زانتوفیل و فیکوسیانین‌هاست که به‌نظر می‌رسد با فعالیت ضداکسایشی آن مرتبط باشد (Takeuchi et al. 2002; Wang et al. 2007). کاتچین‌ها توانایی چسبیدن به یون‌های فلزی، حذف گونه-های فعال اکسیژن و تولید آنزیم‌های ضداکسایشی را دارند (Bernatoniene and Kopustinskiene, 2018). به‌طور مشابه، فیکوسیانین و آلوفیکوسیانین دارای خواص ضداکسایشی هستند (Ángeles Esteban, 2012). وجود این اجزای زیست فعال در اسپیرولینا ممکن است مسئول بهبود وضعیت ضداکسایشی در ماهی آمور باشد.

بیماری *Aeromonas hydrophila* یکی از شایع‌ترین بیماری‌های باکتریایی برای ماهیان گرمابی از جمله ماهی آمور در آب شیرین است (Jiravanichpaisal et al. 2009) که باعث کاهش رشد و تضعیف دستگاه ایمنی و در نتیجه، مرگ و میر مزمن می شود (Swaminathan et al. 2004). بیماری‌زایی *A. hydrophila* به دلیل تولید اندوتوکسین‌ها و همولیزین است و باعث سندرم اولسراتیو اپیزوتیک می‌شود (Rigney et al. 1978). این بیماری منجر به شیوع گسترده سپتی سمی و مرگ و میر بالا در صنعت پرورش ماهی کپور می‌شود (Liu et al. 2015; Song et al. 2014). بیشتر مطالعات بیماری تمرکز به میزان تلفات ماهی در شرایط استرس با بیماری باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا داشته‌اند، در حالی که در مطالعه حاضر سرم خون ماهی آمور در برابر این بیماری در محیط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج به‌دست آمده از این قدرت باکتری‌کشی سرم خون ماهی نشان داد که تیمارهای S2 و S3 در مقایسه با تیمار شاهد دارای قدرت باکتری‌کشی بیشتری است. همسو با تحقیق حاضر، در خصوص اثرات جلبک زنده اسپیرولینا بر مقاومت ماهی تیلاپیای نیل در برابر بیماری آئروموناس هیدروفیلا پژوهشی منتشر شد که نشان از افزایش جمعیت باکتری و افزایش تلفات در تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای تغذیه شده با جلبک زنده اسپیرولینا بود (Abdel-Tawwab and Ahmad, 2009). محرک‌های ایمنی قادر به افزایش قدرت دفاعی و خنثی کردن فعالیت پاتوژن‌های فرصت طلب بوده و از این‌رو باعث بهبود رشد و کاهش مرگ و میر در سرتاسر دوره تولید در آبزیان می‌شوند و بنابراین، به صورت گسترده در مزارع به منظور مدیریت سلامت استفاده می‌شوند (Wijendra and Pathiratne, 2007).

فراسنجه‌های خونی تحت تأثیر عوامل زیست‌محیطی، غذا و تغذیه، تراکم ذخیره‌سازی، روش پرورش و غیره قرار می-گیرند (Fanouraki et al. 2007). بنابراین، سنجش فراسنجه‌های خونی ماهیان یکی از ابزارهای مناسب برای بررسی سلامت و ایمنی است. در پژوهش حاضر بین تیمارهای آزمایشی تعداد گلبول‌های سفید، قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت تفاوت معنی‌دار آماری وجود داشت. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق به‌وضوح تأثیر مثبت جلبک زنده اسپیرولینا را بر وضعیت سلامت بچه ماهی آمور مورد آزمایش نشان می‌دهد. بیشتر تحقیقات تأثیر مثبت اسپیرولینا بر فراسنجه‌های خون شناختی انواع گونه‌های آبزیان مانند ماهی تیلاپیا (Terry et al. 2000; Abdel Tawwab and Ahmad, 2009; Andrews et al. 2011; Ragap et al. 2012)، گربه ماهی آفریقایی (Promya and Chitmanat, 2011)، ماهی کاتلا (Krishnaveni et al. 2013)، ماهی کوی (Ansarifard et al. 2017) و میگوی وانامی (Yong-Chin et al. 2010) را تأیید می‌کند. افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، هموگلوبین و هماتوکریت خون ماهی آمور با افزایش غلظت جلبک زنده اسپیرولینا ممکن است به دلیل وجود ترکیبات آهن، ویتامین‌های گروه B (به‌خصوص B_{12})، ویتامین‌های A و E بالای موجود در اسپیرولینا باشد. از عوامل اساسی در تولید گلبول‌های قرمز و هموگلوبین وجود آهن و ظرفیت ضداکسایشی بالا در جلبک اسپیرولیناست. وجود ترکیبات Phycocyanobilin از جمله Phycocyanin، Allophycocyanin و Phycoerythrin با خاصیت ضداکسایشی در اسپیرولینا اساساً مسئول فعالیت‌های ضداکسایشی هستند. این رنگدانه‌ها با حذف رادیکال‌های پراکساید در بدن از سرعت

هیدرولیز شدن گلبول‌های قرمز به وسیله اکسیدان‌ها می‌کاهند و قابلیت جذب آهن را به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند. افزایش تعداد گلبول‌های سفید و درصد افتراقی خون با افزایش غلظت جلبک زنده اسپیرولینا در آب محیط پرورش ماهی آمور ناشی از تحریک دستگاه ایمنی ماهی به‌علت مواد زیست فعال موجود در ریزجلبک اسپیرولینا است. از این‌رو، اسپیرولینا علاوه بر تحریک دستگاه ایمنی به شدت باعث تقویت توان تولید یاخته‌های خونی جدید می‌شوند (Yong-Chin et al. 2010; Tongsiri et al. 2010; Shahbazi and Bolhassani, 2016). افزایش تعداد نوتروفیل‌ها در نتیجه مصرف این محرک گیاهی، وابسته به بتاگلوکان‌هایی است که قادر به تشخیص گیرنده های ویژه‌ای بر روی گلبول های سفید خون هستند (Andrews et al. 2009). زمانی که این گیرنده‌ها توسط گلوکان‌ها اشغال شوند، فعالیت گلبول‌های سفید در احاطه کردن، کشتن و هضم کردن باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر می‌شود که همه این عوامل موجب بهبود دستگاه دفاعی میزبان می‌شوند (Andrews et al. 2009).

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده روزانه از جلبک زنده اسپیرولینا با تراکم ۵×۱۰^{۴} و ۶×۱۰^{۴} یاخته/ میلی‌لیتر در تیمارهای S2 و S3 در محیط پرورش ماهی آمور به‌طور معنی‌دار باعث بهبود عملکرد رشد، تحریک آنزیم‌های گوارشی، افزایش فراسنجه‌های ایمنی و مقاومت در برابر استرس باکتری آئروموناس هیدروفیلا سرم خون شد.

تشکر و قدردانی

این طرح با همکاری شرکت آرکاجلبک هیرکانیان (گنبد کاووس، گلستان) در دانشگاه گنبد کاووس اجرا شد. از مسئولین این شرکت به دلیل همکاری در تولید جلبک زنده اسپیرولینا و همچنین، از همکارانی که در اجرای این طرح در دانشگاه گنبد کاووس یاری کردند، کمال تشکر را دارم.

منابع

Abdel-Latif, H.M., El-Ashram, S., Sayed, A.E.D.H., Alagawany, M., Shukry, M., Dawood, M.A., Kucharczyk, D. 2022. Elucidating the ameliorative effects of the cyanobacterium Spirulina (*Arthrospira platensis*) and several microalgal species against the negative impacts of the aquatic contaminants in freshwater fish: A review. Aquaculture 554: 738155. doi: 10.1016/j.aquaculture.2022.738155

Abdel-Tawwab, M., Ahmad, M.H. 2009. Live Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research 40: 1037-1046. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02195.x

Adineh, H., Naderi, M., Nazer, A., Yousefi, M., Ahmadifar, E. 2021. Interactive effects of stocking density and dietary supplementation with nano selenium and garlic extract on growth, feed utilization, digestive enzymes, stress responses, and antioxidant capacity of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Journal of the World Aquaculture Society, 52: 789-804. doi: 10.1111/jwas.12747.

Adineh, H., Naderi, M., Yousefi, M., Khademi Hamidi, M., Ahmadifar, E. Hoseini, S.M. 2021. Dietary licorice (*Glycyrrhiza glabra*) improves growth, lipid metabolism, antioxidant and immune responses, and resistance to crowding stress in common carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture Nutrition 27: 417-426. doi: 10.1111/anu.13194.

Agami, M., Waisel, Y. 1988. The role of fish in distribution and germination of seeds of the submerged macrophytes *Najas marina* L. and *Ruppia maritima* L. Oecologia 76: 83-88.

Aksakal, E., Ekinci, D., Erdoğan, O., Beydemir, Ş., Alım, Z., Ceyhun, S.B. 2011. Increasing stocking density causes inhibition of metabolic–antioxidant enzymes and elevates mRNA levels of heat shock protein 70 in rainbow trout. Livestock Science 141: 69-75. doi: 10.1016/j.livsci.2011.07.006.

Amer, S.A. 2016. Effect of *Spirulina platensis* as feed supplement on growth performance, immune response and

antioxidant status of mono-sex Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Benha Veterinary Medical Journal 30: 1-10. doi: 10.21608/BVMJ.2016.31332.

American Public Health Association (APHA). 1998. In: Clescert, L., Greenberg, A., Eaton, A. (Eds.), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th edition. Washington, USA.

Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., Kumar, S. 2009. Haematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research 41: 61-69. doi: 10.1111/j.1365-2109.2009.02304.x.

Andrews, S.R., Sahu, N., Pal, A., Mukherjee, S., Kumar, S. 2011. Yeast extract, brewer's yeast and spirulina in diets for *Labeo rohita* fingerlings affect haemato-immunological responses and survival following *Aeromonas hydrophila* challenge. Research in Veterinary Science 91: 103-109. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.08.009.

Ángeles Esteban, M. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. International scholarly research notices. doi: 10.5402/2012/853470.

Ansarifard, F., Rajabi Islami, H., Shamsaie Mehrjan, M., Soltani, M. 2017. The effect of dietary supplement spirulina (*Arthrospira platensis*) on the immune system and blood biochemical factors of koi fish (*Cyprinus carpio carpio*). Iranian Scientific Fisheries Journal 26: 23-32. doi: 10.22092/isfj.2017.113519.

AOAC, B.A.M. 1990. Association of official analytical chemists. Official methods of analysis, Washington DC, 12.

Awad, L.Z., El-Mahallawy, H.S., Abdelnaeim, N.S., Mahmoud, M.M., Dessouki, A.A., ElBanna, N.I. 2022. Role of dietary *Spirulina platensis* and betaine supplementation on growth, hematological, serum biochemical parameters, antioxidant status, immune responses, and disease resistance in Nile tilapia. Fish and Shellfish Immunology, 126: 122-130. doi: 10.1016/j.fsi.2022.05.040.

Baluchnejadmojarad, T., Roghani, M., Mafakheri, M. 2010. Neuroprotective effect of silymarin in 6-hydroxydopamine hemi-parkinsonian rat: involvement of estrogen receptors and oxidative stress. Neuroscience letters 480: 206-210. doi: 10.1016/j.neulet.2010.06.038.

Bani, A., Haghi Vayghan, A. 2011. Temporal variations in haematological and biochemical indices of the Caspian kutum, *Rutilus frisii kutum*. Ichthyological Research 58: 126-133.

Barnes, A.C., Young, F.M., Horne, M.T., Ellis, A.E. 2003. *Streptococcus iniae*: serological differences, presence of capsule and resistance to immune serum killing. Diseases of Aquatic Organisms 53: 241-247. doi: 10.3354/dao053241

Beiranvand, M., Ghaeni, M., Velayatzadeh, M. 2015. Impact of *Spirulina* sp. on growth and food intake in *Danio rerio* Hamilton, 1822. Nova Biologica Reperta 2: 207-215. doi: 10.21859/acadpub.nbr.2.3.207.

Belay, A. 2002. The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. Journal of American Nutraceutical Assoc 5: 27-48.

Bernatoniene, J., Kopustinskiene, D.M. 2018. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. Molecules 23: 965. doi: 10.3390/molecules23040965.

Biabani Asrami, M., Sudagar, M., Mazandarani, M., Yousefi, S. 2017. The effect of Spirulina on growth, survival, carotenoids pre-broodstock and larviculture in dwarf gourami (*Trichogaster lalius*). Journal of Fisheries Science and Technology 6: 21-35. doi: 20.1001.1.23225513.1396.6.1.1.3.

Biabani Asrami, M., Sudagar, M., Mazandarani, M., Yousefi, S. 2017. The effect of Spirulina on growth, survival, carotenoids pre-broodstock and

larviculture in dwarf gourami (*Trichogaster lalius*). Journal of Fisheries Science and Technology 6: 21-35.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F. 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundia (*Rhamdia quelen*). Fish Physiology and Biochemistry 30: 21-25. doi: 10.1007/s10695-004-5000-1.

Cahu, C.L., Zambonino-Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall, M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171: 109-119. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00428-1.

Carneiro, W.F., Castro, T.F.D., Reichel, T., de Castro Uzeda, P.L., Martínez-Palacios, C.A., Murgas, L.D.S. 2022. Diets containing *Arthrospira platensis* increase growth, modulate lipid metabolism, and reduce oxidative stress in Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) exposed to ammonia. Aquaculture 547: 737402. doi: 10.1016/j.aquaculture.2021.737402.

Chen, Q., Wang, C.H., Lu, G., Song, X., Xu, J.W., Yang, Q.L., Li, S.F. 2009. Analysis of genetic variation in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) from native and colonized regions using ISSR markers. Biochemical Systematics and Ecology 3: 549-555. doi: 10.1016/j.bse.2009.08.002.

Ellis, A.E. 1990. Lysozyme Assays: In Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., Van Muiswinkel, W.B. (Eds.). Techniques in Fish Immunology. Fair Haven. NJ: SOS Publications, 101-103.

Faheem, M., Jamal, R., Nazeer, N., Khaliq, S., Hoseinifar, S.H., Van Doan, H., Paolucci, M. 2022. Improving growth, digestive and antioxidant enzymes and immune response of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) by using dietary *Spirulina platensis*. Fishes, 7: 237. doi: 10.3390/fishes7050237.

Fanouraki, E., Divanach, P., Pavlidis, M. 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). Aquaculture 265: 294-304. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.01.006.

FAO 2023. FAO yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2018. Rome, Italy: FAO.

Farhadi, M., Imanpoor, M., Safari, R. 2023. Effect of dietary *Spirulina platensis* and Natuzyme Multi-enzyme on growth performance, survival and hematological parameters in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics, 12: 171-186. doi: 10.22069/japu.2023.20352.1680.

Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jian, N.C. 2000. Schalm's veterinary hematology, 3rd edition. Lippincott Williams and Wilkins publication, Philadelphia, USA, 32-36.

Frimodt, C. 1995. Multilingual illustrated guide to the world's commercial warmwater fish. Fishing News Books, Osney Mead, Oxford, England. 215 p.

Geffroy, B., Simon, O. 2013. Effects of a *Spirulina platensis* based diet on zebrafish female reproductive performance and larval survival rate. Société Française D'ichtyologie 37: 31-38.

Hassaan, M.S., Mohammady, E.Y., Soaudy, M.R., Sabae, S.A., Mahmoud, A.M., El-Haroun, E.R. 2021. Comparative study on the effect of dietary β-carotene and phycocyanin extracted from *Spirulina platensis* on immune-oxidative stress biomarkers, genes expression and intestinal enzymes, serum biochemical in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish and Shellfish Immunology 108: 63-72. doi: 10.1016/j.fsi.2020.11.012.

Iijima, N., Tanaka, S., Ota, Y. 1998. Purification and characterization of bile salt activated lipase from the hepatopancreas of red sea bream (*Pagrus major*). Journal of Fish Physiology and Biochemistry, 18: 59-69. doi: 10.1023/A:1007725513389.

Jaime-Ceballos, B., Villarreal, H., Garcia, T., Jar, L.P., Alfonso, E. 2005. Effect of *Spirulina platensis* meal as feed additive

on growth, survival and development in *Litopenaeus schmitti* shrimp larvae. Revista de Investigaciones Marinas 26: 235-241.

Jiravanichpaisal, P., Roos, S., Edsman, L., Liu, H., Söderhäll, K. 2009. A highly virulent pathogen, *Aeromonas hydrophila*, from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Journal of Invertebrate Pathology 101: 56-66. doi: 10.1016/j.jip.2009.02.002.

Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S., Kobayash, M. 1990. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish Pathology 25: 93-98. doi: 10.3147/jsfp.25.93.

Karadal, O., Güroy, D., Türkmen, G. 2017. Effects of feeding frequency and Spirulina on growth performance, skin coloration and seed production on kenyi cichlids (*Maylandia lombardoi*). Aquaculture International 25: 121-134.

Khanzadeh, M., Esmaeili Fereidouni, A., Seifi Berenjestanaki, S. 2016. Effects of partial replacement of fish meal with *Spirulina platensis* meal in practical diets on growth, survival, body composition, and reproductive performance of three-spot gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Pallas, 1770). Aquaculture International 24: 69-84. doi: 10.1007/s10499-015-9909-4.

Krishnaveni, R., Palanivelu, K., Velavan, S., 2013. Effects of probiotics and *Spirulina* supplementation on haemato-Immunological function of *Catla catla*. International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture 3:4:176-181.

Lee, R.G., Foerster, J., Jukens, J., Paraskevas, F., Greer, J. P., Rodgers, G. M. 1998. Wintrobe's-Clinical Hematology, 10th ed., Lippincott Williams & Wilkins, New York.

Liu, L., Gong, Y.X., Zhu, B., Liu, G.L., Wang, G.X., Ling, F. 2015. Effect of a new recombinant *Aeromonas hydrophila* vaccine on the grass carp intestinal microbiota and correlations with immunological responses. Fish and Shellfish Immunology 45: 175-183. doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.043.

Lu, J., Satoh, H., Takeuchi, T. 2008. Development of models of threshold and efficient algal densities for larval and juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* on raw Spirulina. Aquaculture 285: 249-254. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.08.039.

Mabrouk, M.M., Ashour, M., Labena, A., Zaki, M.A., Abdelhamid, A.F., Gewaily, M.S., Ayoub, H.F. 2022. Nanoparticles of *Arthrospira platensis* improves growth, antioxidative and immunological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and its resistance to *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture Research 53: 125-135. doi: 10.1111/are.15558.

Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology 17: 24-38. doi: 10.1002/jbt.10058.

Marklund, S., Marklund, G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry 47: 469-474.

Mitchell, A.J., Kelly, A.M. 2006. The public sector role in the establishment of grass carp in the United States. Fisheries 31: 113-121. doi: 10.1577/1548-8446(2006)31[113:TPSRIT]2.0.CO;2.

Mohammadiazarm, H., Maniat, M., Ghorbanijezeh, K., Ghotbeddin, N. 2021. Effects of spirulina powder (*Spirulina platensis*) as a dietary additive on Oscar fish, *Astronotus ocellatus*: Assessing growth performance, body composition, digestive enzyme activity, immune-biochemical parameters, blood indices and total pigmentation. Aquaculture Nutrition 27: 252-260. doi: 10.1111/anu.13182.

Nasrollahzadeh, A., Noveyrian, H., Khoshkholgh, M., Mosapour Shajani, M., Shakourian, M. 2014. The effects of *Spirulina platensis* levels in diet on growth indices and chemical body

composition of Kutum fry (*Rutilus frisii kutum*). Fisheries 67: 445-453. doi: 10.22059/Jfisheries.2014.52420.

Nogueira, S.M.S., Souza Junior, J., Maia, H.D., Saboya, J.P.S., Farias, W.R.L. 2018. Use of *Spirulina platensis* in treatment of fish farming wastewater. Revista Ciência Agronômica 49: 599-606. doi: 10.5935/1806-6690.20180068.

Olvera-Novoa, M.A., Domínguez-Cen, L.J., Olivera-Castillo, L., Martínez-Palacios, C.A. 1998. Effect of the use of the microalga *Spirulina maxima* as fish meal replacement in diets for tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), fry. Aquaculture Research 29: 709-715. doi: 10.1046/j.1365-2109.1998.29100709.x.

Pathiratne, A., Rajapakshe, W. 1998. Hematological Changes associated with the *Epizootic Ulcerative* Syndrome in the Asian Cichlid Fish, *Etroplus suratensis*. Asian Fisheries Science 11: 203-212.

Peiretti, P.G., 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. doi: 10.1016/j.livsci.2008.04.017.

Plaza, I., Garcia, J. L. and Villarroel, M. 2018. Effect of spirulina (*Arthrospira platensis*) supplementation on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth and stress responsiveness under hypoxia. Spanish Journal of Agricultural Research 16: 0606-0606. doi: 10.5424/sjar/2018161-11698.

Promya, J., Chitmanat, C. 2011. The effects of *Spirulina platensis* and Cladophora algae on the growth Performance, meat quality and immunity stimulating capacity of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). International Journal of Agriculture and Biology 13: 77-82.

Ragap, H.M., Khalil, R.H., Mutawie, H.H., 2012. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Pharmaceutical Science 2: 26-31.

Rigney, M.M., Zilinsky, J.W., Rouf, M.A. 1978. Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* in red leg disease in frogs. Current Microbiology 1: 175-179.

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygard, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U. 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 644-654. doi: 10.1002/jsfa.1089.

Sadeghi Goghari, S., Paykan Heyrati, F., Dorafshan, S. 2021. Effect of dietary lactoferrin and algae spirulina powder on some growth and immunity parameters of female zebrafish (*Danio rerio*). Veterinary Research & Biological Products 34: 121-128. doi: 10.22092/vj.2020.343081.1726.

Saurabh, S., Sahoo, P.K. 2008. Lysozyme: an important defense molecule of fish innate immune system. Aquaculture Research 39: 223-239. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x.

Shahbazi, S., Bolhassani, A. 2016. Immunostimulants: types and functions. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases 4: 45-51.

Shan, X., Lin, M. 2014. Effects of algae and live food density on the feeding ability, growth and survival of miiuy croaker during early development. Aquaculture 428: 284-289. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.03.021.

Sheikhzadeh, N., Mousavi, S., Khani Oushani, A., Firouzamandi, M., Mardani, K. 2019. *Spirulina platensis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: Effects on growth, fillet composition, and tissue antioxidant mechanisms. Aquaculture International 27: 1613-1623. doi: 10.1007/s10499-019-00412-3.

Song, X., Zhao, J., Bo, Y., Liu, Z., Wu, K., Gong, C. 2014. *Aeromonas hydrophila* induces intestinal inflammation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): an

experimental model. Aquaculture 434: 171-178. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.08.015.

Sunyer, J.O., Tort, L. 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. Veterinary Immunology and Immunopathology 45: 333-345.

Swaminathan, T.R., Rathore, G., Abidi, R., Kapoor, D. 2004. Detection of *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction. Indian Journal of Fisheries 51: 251-254.

Takeuchi, T., Lu, J.U.N., Yoshizaki, G., Satoh, S. 2002. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fisheries Science 68: 34-40. doi: 10.1046/j.1444-2906.2002.00386.x.

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.

Terry, C.H., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Haematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* hybrid). Veterinary Clinical Pathology 29: 7-12. doi:10.1111/j.1939-165X.2000.tb00389.x.

Tongsiri, S., Mang-Amphan, K., Peerapornpisal, Y. 2010. Effect of replacing fishmeal with Spirulina on growth, carcass composition and pigment of the Mekong giant catfish. Asian Journal of Agricultural Sciences 2: 106-110.

Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. Developmental and Comparative Immunology 35: 1366-1375. doi: 10.1016/j.dci.2011.07.002.

Valipour, A., Abedian Kenari, A., Tabarsa, M. 2022. Effect of water-soluble polysaccharides extracted from microalga (*Spirulina platensis*) on growth performance, body composition and immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Fisheries Science and Technology 11: 199-217.

Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J., Hu, Q. 2007. Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. Food Chemistry 105: 36-41. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.03.054.

Watanuki, H., Ota, K., Tassakka, A.C.M. A., Kato, T., Sakai, M. 2006. Immunostimulant effects of dietary Spirulina platensis on carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture 258: 157-163. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.05.003.

Wijendra, G.D.N.P., Pathiratne, A. 2007. Evaluation of immune responses in an Indian carp, *Labeo rohita* (Hamilton) fed with levamisole incorporated diet. Journal of Science of the University of Kelaniya 3: 17-28.

Worthington, C.C. 1993. Worthington Enzyme Manual. Enzymes and related Biochemicals Worthington Chemical. New Jersey, USA, 730 p.

Wu, Q., Liu, L., Miron, A., Klímová, B., Wan, D., Kuča, K. 2016. The antioxidant, immunomodulatory, and anti-inflammatory activities of Spirulina: an overview. Archives of Toxicology 90: 1817-1840. doi: 10.1007/s00204-016-1744-5.

Xia, Y., Liu, C., Fei, S., Liu, H., Han, D., Jin, J., Xie, S. 2021. *Arthrospira platensis* additive enhances the growth performance and antioxidant response in hybrid yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*♀ × *Pelteobagrus vachelli*♂). Aquaculture Reports 20: 100721. doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100721.

Yeganeh, S., Teimouri Keramat, M., Amirkolaie. A. 2015. Dietary effects of *Spirulina platensis* on hematological and serum biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research in Veterinary Science 101: 84-88. doi: 10.1016/j.rvsc.2015.06.002.

Yong-Chin, L., Carina Miranda, T., ChienLun, H., Wen-Ching, T., JiannChu, C. 2010. White shrimp *Litopenaeus vannamei* that had received the hot-water

extract of *Spirulina platensis* showed earlier recovery in immunity and upregulation of gene expressions after pH stress. Fish and Shellfish Immunology 29: 1092-1098. doi: 10.1016/j.fsi.2010.09.002

Yousefi, M., Ahmadifar, M., Mohammadzadeh, S., Kalhor, N., Esfahani, D.E., Bagheri, A., Ahmadifar, E. 2022. Individual and combined effects of the dietary *Spirulina platensis* and *Bacillus licheniformis* supplementation on growth performance, antioxidant capacity, innate immunity, relative gene expression and resistance of goldfish, *Carassius auratus* to *Aeromonas hydrophila*. Fish and Shellfish Immunology 127: 1070-1078. doi: 10.1016/j.fsi.2022.07.015.

Zhang, F., Man, Y.B., Mo, W.Y., Wong, M.H. 2020. Application of Spirulina in aquaculture: A review on wastewater treatment and fish growth. Reviews in Aquaculture 12: 582-599. doi: 10.1111/raq.12341.