تاثیر تغذیه با اسپیرولینا (*Spirulina platensis*) بر فاکتورهای خونی و سیستم ایمنی در ماهی پنگوسی (*Pangasius hypophtalamus*)

- **مژده چله‌مال دزفول نژاد**: دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، صندوق پستی: ۱۹۱۵
- **مرضیه جهانگیری‌زاده***: دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، صندوق پستی: ۱۹۱۵
- **مهرزاد مصباح**: دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، صندوق پستی: ۱۳۵
- **مهران جواهری بابلی**: دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اهواز، صندوق پستی: ۱۹۱۵

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۱

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی تاثیر تغذیه با اسپیرولینا بر سیستم ایمنی ماهی پنگوسی (*Pangasius hypophthalmus*) انجام شد.به این منظور۱۱۲ عدد ماهی پنگوسی با وزن متوسط ۸±۲۱ گرم بصورت کاملاً تصادفی در ۵ آکواریوم شیشه‌ای توزیع شدند. برای این تحقیق پودر اسپیرولینا در قالب ٤ تیمار(۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰درصد) به جیره‌ی پایه اضافه شد و یک تیمار بعنوان شاهد (تیمار۱) با جیره‌ی پایه مورد تغذیه قرار گرفت. طول دوره‌ی غذا دهی ۳۵ روز و روزانه ۵ مرتبه به میزان ۳ درصد وزن کل توده‌ی زنده در نظر گرفته شد. در انتهای دوره از۵۰ عدد ماهی (۱۰ عدد از هر تیمار) از طریق ورید ساقه دمی (Caudal vein) خونگیری شد و پارامترهای خونشناسی شامل: شمارش کلی و تفریقی گلبولهای سفید به روشهای متداول آزمایشگاهی اندازه‌گیری گردید. از میان فاکتورهای مورد بررسی شمارش کلی گلبولهای سفید، مونوسیت و ائوزینوفیل تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($P\geq0.05$). تعداد نوتروفیل افزایش معنی‌داری (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) در سایر تیمارها نسبت به گروه شاهد داشت.از نظر تعداد لنفوسیت تفاوت معنی‌داری بین گروه شاهد و سایر تیمارها مشاهده گردید و بیشترین تعداد لنفوسیت در گروه شاهد دیده شد. بطور کلی می توان نتیجه گرفت که تیمارهای مورد استفاده از اسپیرولینا در این تحقیق تاثیرچندانی بر ایمنی اختصاصی ماهی پنگوسی (*P. hypophtalamus*) ندارد اما تعداد نوتروفیل‌ها را افزایش خواهد داد. افزایش تعداد نوتروفیل نشان دهنده‌ی تاثیر اسپیرولینا را بر فعالیت فاگوسیتوز و بهبود ایمنی غیراختصاصی در این گونه می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسپیرولینا، ماهی پنگوسی گیاهخوار، سیستم ایمنی

*پست الکترونیکی نویسنده مسئول: Marziye_Jz@Yahoo.com

مقدمه

استفاده از مواد محرک ایمنی در جیره‌ی ماهیان در سالهای اخیر رو به افزایش است. محرکهای ایمنی که در جیره‌ی ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرند با تحریک ایمنی غیراختصاصی سبب مقاومت عمومی در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماریزا می‌شوند. در حالیکه مواد آنتی ژنیک مانند باکترین‌ها و واکسن‌ها، ایمنی اختصاصی را تامین می‌کنند (۳۱).

هورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر ترکیبات شیمیایی با وجود تاثیر مثبت، دارای عوارض جانبی، اثرات مخرب زیست محیطی، قیمت بالا و ایجاد باکتری‌های مقاوم می‌باشند لذا گرایش به محرک‌های ایمنی بیشتر شده است. استفاده از اسپیرولینا به جای استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، سبب کاهش آلودگی آب،کاهش هزینه‌های درمان و افزایش کارآیی سیستم‌های پرورش خواهد شد.

ماهی پنگوسی گیاهخوار فاقد فلس بوده و دارای پوستی لیز و براق می‌باشند. در این ماهی بینایی به بیش از ۱۰ درصد تجاوز نمی‌کند و راهنمای اصلی برای یافتن غذا حس بویایی و گیرندهای حسی واقع در ناحیه سبیلک‌ها می‌باشد (۱۱).

دمای مناسب برای این ماهی ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتیگراد (۲۷ درجه سانتیگراد) است. اسیدیته مناسب آب ۶/۵ تا ۷/۵ و سختی ۲ تا ۲۹ درجه برای این ماهی مناسب است (۱۱).

تغذیه‌ی ابتدایی این گونه، کرمهای خونی و قرص‌های غذایی مخصوص گربه ماهیان می‌باشد. با افزایش سن برای تغذیه‌ی آنها از میگو به همراه اسفناج استفاده می‌شود و در نهایت می‌توان از قرص‌های غذایی که مواد اولیه‌اش از گیاهان باشد، استفاده کرد.

مطالعات متعددی در زمینه استفاده از اسپیرولینا به منظور تاثیر بر رشد و بازماندگی، رنگ و ایمنی در انسان، حیوانات و آبزیان انجام شده است (۱۷).

Belay (۲۰۰۲) اسپیرولینا را بعنوان یک جیره غذایی معرفی کردند و تاثیر آن را بر رشد و بازماندگی- ایمنی و بر بافت‌های مختلف حیوانات مورد بررسی قرار دادند.

Duncan و Klesius (۱۹۹۶) تاثیر اسپیرولینا را بر ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی *Channel catfish* بررسی کردند.

Jittanoonta (۱۹۹۹) به ایمنی ناشی از مصرف اسپیرولینای خشک تایلندی دست یافتند.

Mahesh و همکاران (۲۰۰۵) خاصیت ضد ویروسی اسپیرولینا در برابر Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) را شناسایی کردند.

با توجه به بررسی مطالعات قبلی مشخص گردید که اسپیرولینا باعث تحریک سیستم ایمنی خواهد شد. تاکنون گزارشی پیرامون پارامترهای خونشناسی و تاثیر اسپیرولینا بر سیستم ایمنی *Pangasius hypophtalamus* که یک ماهی آکواریومی گیاهخوارست در ایران انتشار نیافته است و از سوی دیگر با توجه به گران بودن ماهیان زینتی، تقویت سیستم ایمنی آنها به منظور افزایش نرخ بازماندگی از اهمیت زیادی برخوردار است، لذا در این پژوهش به تاثیرتغذیه با اسپیرولینا بر سیستم ایمنی این گونه پرداخته شد تا بتوان از نتایج آن در دیگر ماهیان زینتی و در سطح کارگاههای ماهیان پرورشی نیز استفاده نمود.

مواد و روشها

تعداد ۱۱۲ ماهی پنگوسی با متوسط وزن اولیه‌ی ۸±۲۱ گرم از فروشندگان ماهی‌های زینتی خریداری گردید و بطور تصادفی در ۵ تانک به تعداد ۲۰ ماهی در هر تانک توزیع و بصورت کاملاً تصادفی به ۵ تیمار تقسیم‌بندی شدند (۴).

غذای اصلی ماهی‌ها، بیومار سایز ۲/۹ (محصول شرکت فرانسه) بود. این غذا بصورت پلت شده و با سایز ۲/۹ خریداری شد. اسپیرولینا در بسته‌بندی‌های ۴۵۰ گرمی محصول کشور تایلند از پژوهشکده‌ی میگوی بوشهر تهیه گردید. غذا بصورت هفتگی تهیه شده بود. وزن کل توده زنده‌ی هر گروه در ابتدای هر هفته محاسبه و ۳ درصد وزن کل بعنوان وزن بیومار مورد نیاز در نظر گرفته شد. این مقدار بیومار بترتیب با ۲/۵ (تیمار ۲) و ۵ (تیمار ۳) و ۷/۵ (تیمار ۴) و ۱۰ (تیمار ۵) درصد وزن بیومار، اسپیرولینا به صورت خشک مخلوط شد.

درجه حرارت یکی از فاکتورهای مهم در نگهداری ماهی پنگوسی می‌باشد لذا درجه حرارت با کمک هیترهای ترموستات‌دار در ۲۸ درجه سانتیگراد نگه‌داری شد.

pH آب در حد ۸، ثابت نگه‌داری شد. اکسیژن مورد نیاز از طریق هوا و سنگهای هواده که درون آکواریوم قرار داده شده بودند، تأمین گردید. به دلیل یکسان بودن تمام شرایط برای همه‌ی آکواریوم‌ها اکسیژن محلول برای همه‌ی آنها یکسان بود. در طول دوره‌ی آزمایش میانگین اکسیژن برای تمام آکواریوم‌ها

معادل ۸- ۹/۵ ppm بود.

بعد از پایان دوره‌ی ۳۵ روزه‌ی آزمایشی، خونگیری در ۳ روز انجام شد. پس از بیهوش نمودن ماهی‌ها توسط MS222 (۱۴۰میلی‌گرم در لیتر به مدت ۵ دقیقه)، خونگیری از ساقه‌ی دمی انجام شد. از هر تیمار ۱۰ نمونه برای سنجش فاکتورهای هماتولوژی بطور تصادفی انتخاب گردید. با استفاده از سرنگ‌های انسولین هپارینه شده خونگیری انجام و نمونه‌های خون به میکروتیوب‌هایی که حاوی ۲۰ میکرولیتر هپارین بود، منتقل گردیدند. میکروتیوب‌ها شماره‌گذاری و برای انجام آزمایشات خونشناسی در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری فاکتورهای خونی بترتیب زیر عمل شد (۱):

شمارش کلی گلبول‌های سفید

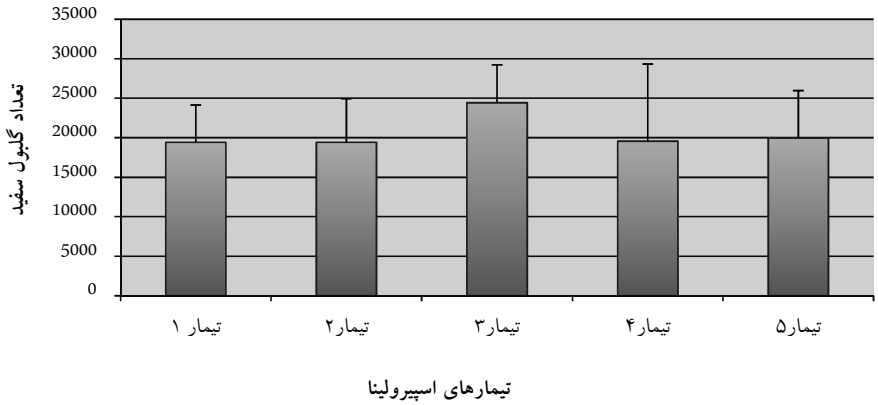
به روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار انجام شد (۳۴).

شمارش تفریقی گلبول‌های سفید

برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید اقدام به تهیه‌ی گسترش خون گردید. برای این کار و قبل از مخلوط نمودن نمونه با هپارین یک قطره خون روی لام ریخته شد و اقدام به تهیه‌ی گسترش خون گردید. گسترش‌های تهیه شده با الکل متیلیک تثبیت گردیدند و سپس با استفاده از رنگ گیمسا به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و پس از پایان رنگ‌آمیزی و شستشوی لام و خشک شدن گسترش با عدسی روغنی تعداد ۱۰۰ سلول سفید مورد شمارش و درصد هر یک از سلولها محاسبه و ثبت گردید (۳).

نتایج

نمودار ۱ میانگین تعداد گلبول سفید در تیمارهای مختلف اسپیرولینا را نشان می‌دهد. همانگونه که در این نمودار مشخص است تعداد گلبول‌های سفید در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است و در گروه ۵ درصد بیشترین تعداد گلبول سفید مشاهده می‌شود. مطابق جدول ۱ در میانگین تعداد گلبولهای سفید بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P\geq0.05$).



نمودار ۱: میانگین گلبول سفید (سلول/میکرولیتر) در ماهی پنگوسی *P. hypophtalamus* تغذیه شده باتیمارهای مختلف اسپیرولینا در پایان ۳۵ روز (Mean ±SD)

نوتروفیل

همانگونه که در جدول ۱ آمده است تعداد نوتروفیل در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است و بیشترین تعداد نوتروفیل در تیمار ۲ قابل مشاهده است. میانگین تعداد نوتروفیل میان گروه شاهد و سایرگروهها دارای اختلاف معنی‌داری است ($P\leq 0.05$).

لنفوسیت

بیشترین میزان لنفوسیت در گروه شاهد وجود دارد. مطابق جدول ۱ در میانگین تعداد لنفوسیت میان گروه شاهد با سایر گروهها اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P\leq 0.05$).

ائوزینوفیل

بیشترین میزان ائوزینوفیل در گروه شاهد وجود دارد و از نظر میانگین تعداد ائوزینوفیل، بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P\geq 0.05$) (جدول ۱).

مونوسیت

تعداد مونوسیت در سایر تیمارها نسبت به گروه شاهد کمتر است و در میانگین تعداد مونوسیت بین گروه شاهد و سایر گروهها اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P\geq 0.05$) (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین شمارش تفریقی گلبولهای سفید در ماهی پنگوسی *P. hypophtalamus* تغذیه شده با تیمارهای مختلف اسپیرولینا در پایان ۳۵ روز (Mean ±SD)

تیمارها	شاهد (تیمار ۱)	۲/۵ درصد اسپیرولینا (تیمار ۲)	۵ درصد اسپیرولینا (تیمار ۳)	۷/۵ درصد اسپیرولینا (تیمار ٤)	۱۰ درصد اسپیرولینا (تیمار ۵)
نوتروفیل (درصد)	۲۳/۷۷±۳/۹٦^{a}	٤٦/۷۵±۵/۸۲^{c}	٤۲/۲۱±۸/۷۷^{b,c}	۴۲/۵۰±٤/۷۹^{b,c}	۳٦/۱٤±۱۰/۳٦^{b}
لنفوسیت (درصد)	٦۷/۰۰±۹/۷۲^{c}	٤۷/۱٤±٤/۹۲^{a}	۵۲/۷۸±۷/۹۲^{a,b}	٤۸/۲۵±٦/۳۲^{a}	۵٦/۱٤±۱۱/۱۲^{b}
ائوزینوفیل(درصد)	۷/۲۲±۵/۵٤^{a}	٤/٦٤±۱/۸٦^{a}	٤/۰۰±۱/۵۹^{a}	٦/۹۱±٤/۱۸^{a}	۵/۵۰±۲/٤۲^{a}
مونوسیت(درصد)	۳/٦۰±۱/۹٤^{a}	۲/۳۰±۱/۳۳^{a}	۲/۵۷±۱/۱٦^{a}	۲/۷۷±۱/۲۰^{a}	۳/۳۳±۰/۸۱^{a}

حروف لاتین نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن اختلاف بین تیمارهاست.

بحث

شاخص‌های خونی مهمترین پارامتر در تکامل وضعیت فیزیولوژیک ماهی‌هاست. تغییر شاخص‌های خونی تحت تاثیر گونه، سن، بلوغ جنسی و وضعیت سلامت موجود قرار دارد (۱۳، ۲۱، ۳۷ و ۳۹).

شاخص‌های خونی ارتباط نزدیکی با شرایط زیست محیطی جانور دارد و بیان می‌شود که محیطی که موجود در آن زندگی می‌کند بر فاکتورهای خونی آن تأثیرگذار است (۳۵).

سنجش هوموگرام یک موجود شامل تعیین تعداد کل گلبولهای قرمز (RBC)، تعداد کل گلبول‌های سفید (WBC)، هماتوکریت (PCV)، غلظت هموگلوبین (Hb)، اندیس‌های گلبولی (MCV,MCHC,MCH) و شمارش تفریقی گلبول‌های سفید است (۹).

هدف از این تحقیق بدست آوردن اطلاعات پایه در ارتباط با تأثیر اسپیرولینا بر سیستم ایمنی ماهی *Pangasius hypophtalamus* است. تعیین اثر اسپیرولینا بر سیستم ایمنی این ماهی می‌تواند اطلاعات مفیدی را فراهم آورد که در مطالعات دیگر مانند بررسی بیماری‌های مختلف و راههای پیشگیری و درمان آنها در این ماهی مورد استفاده قرار بگیرد.

بررسی تاثیر اسپیرولینا بر سیستم ایمنی در این آزمایش و مقایسه‌ی آنها با تحقیق‌های مشابه محققین داخلی و خارجی مشخص می‌کند که تفاوت‌ها و تشابه‌های میان نتایج این تحقیق با نتایج سایر محققین وجود دارد. عوامل محیطی، گونه‌ی ماهی، شرایط آزمایش و بسیاری از عوامل دیگر می‌تواند عامل بوجود آمدن بسیاری از این تفاوت‌ها باشد.

گلبول سفید

مطابق آنچه که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود در نتیجه‌ی افزودن اسپیرولینا به جیره‌ی غذایی ماهی در این تحقیق تعداد گلبولهای سفید در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است و در تیمار ۳ بیشترین تعداد گلبول سفید مشاهده می‌شود. Vonshak (۱۹۹۷) بیان می‌کند که این افزایش تعداد گلبول‌های سفید می‌تواند ناشی از وجود فیکوسیانین در اسپیرولینا باشد اما از آنجایی که در میانگین تعداد گلبول‌های سفید بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P\leq0.05$). لذا از نتایج بدست آمده از این تحقیق می‌توان بیان کرد که تغذیه با اسپیرولینا در این گونه از ماهی آکواریومی تاثیر چندانی در ایمنی ماهی نخواهد داشت.

Gopalakannan و Arul (۲۰۰۶) تاثیر کیتین، کیتوزان و لوامیزول را بر ایمنی و جلوگیری از آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا *A. hydrophila* درکپور معمولی *Cyprinus carpio* مورد بررسی قرار دادند و عنوان کردند که از میان ۳ ماده‌ی افزوده شده به جیره‌ی پایه‌ی کپور معمولی، فقط کیتین باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید شد و دو ماده‌ی دیگر افزایش قابل توجهی را در تعداد گلبول‌های سفید ایجاد نکردند.

Promya و Chitmanat (۲۰۱۱) تاثیر اسپیرولینا را بر رشد، کیفیت گوشت و قابلیت تحریک کنندگی سیستم ایمنی African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) انگشت قد را مورد مطالعه قرار دادند و بیان داشتند گروهی که ۵ درصد اسپیرولینا به جیره‌ی آنها افزوده شده بود در مقایسه با گروهی که ۳ درصد اسپیرولینا دریافت کردند تعداد گلبول سفید بیشتری تولید کرده بودند.

Alishahi و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر آلوئه‌ورا را بر ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی *Cyprinus carpio* مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند آلوئه‌ورا سبب افزایش تعداد گلبول سفید خواهد شد.

Nakono و همکاران (۲۰۰۳) تأثیر بیولوژیکی کاروتونوئید در ماهی‌ها را مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که هم اسپیرولینا و هم کلادوفرا دارای کاروتونوئید می‌باشند که از طریق کاهش استرس می‌تواند سلامت ماهی و توانایی مبارزه با عفونت‌ها را افزایش دهند.

Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر اسپیرولینا را بعنوان یک محرک رشد و ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد مطالعه قرار دادند و در تحقیقات خود به این نتیجه دست یافتند که جیره‌ای که حاوی ۲/۵-۱۰ درصد اسپیرولینا است سبب افزایش تعداد گلبول‌های سفید در *Oreochromis niloticus* خواهد شد و تعداد آنها در محدوده‌ی $۳/۲۹-۴/۲\times۱۰^{۵}$ سلول در میکرولیتر قرار دارد. کمترین تعداد گلبول سفید در گروه شاهد و تعداد آن $۳/۳۱۳\times۱۰^{۵}$ سلول در میکرولیتر بود. آنها همچنین بیان کردند بیشترین درصد میزان افزایش تعداد گلبول‌های سفید در گروه‌ی که ۱۰ د اسپیرولینا به جیره‌ی آنها افزوده شده بود قابل مشاهده است.

Selvaraj و همکاران (۲۰۰۵) تاثیر مخمر گلوکان را بر نرخ بازماندگی و ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی در *Cyprinus carpio* بررسی کردند و بیان نمودند که تزریق این ماده سبب افزایش تعداد گلبول سفید در ماهی کپور معمولی خواهد شد.

Osman و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر مخمر نان *Saccharomyce scerevisae* را بر رشد، بازماندگی و سیستم ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد آزمایش قرار دادند. آنها معتقدند که افزودن مخمر نان سبب افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید در این ماهی خواهد شد.

Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۸) تاثیر مخمر نان *Saccharomyces cerevisae* را بر سیستم ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد بررسی قرار دادند و دریافتند که افزودن این ماده سبب افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید در این ماهی خواهد شد. آنها بیان داشتند که افزایش تعداد گلبول سفید می‌تواند در نتیجه‌ی تغذیه پیوسته با کیتین باشد که می‌تواند خود یک نوع استرس برای ماهی محسوب شود. آنها خاطر نشان کردند که تغییر دما، بیماری‌های ویروسی و باکتریایی و تراکم جمعیت می‌تواند سبب ایجاد استرس در ماهی و در نتیجه افزایش تعداد گلبول‌های سفید شود.

Tatina و همکاران (۲۰۱۰) تاثیر ویتامین E و C را بر فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی در starlet (*Acipencer ruthenus*) بررسی کردند و افزایش تعداد گلبول سفید تاسماهی

را بدنبال استفاده از این ویتامین‌ها بعنوان محرک ایمنی گزارش نمودند.

Ortuno و همکاران (۲۰۰۱) تأثیر مقادیر بالای ویتامین E و C را بر ایمنی طبیعی *Sparus aurata* بررسی کردند و در نتایج خود بیان داشتند که مصرف ویتامین E و C بصورت هم زمان سبب افزایش فعالیت انفجار تنفسی در گلبول‌های سفید بخش قدامی کلیه خواهد شد .

Mulero و همکاران (۱۹۹۸) تاثیر ویتامین E یا C را بر فاگوسیتوز در *Sparus aurata* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مصرف این ویتامین‌ها سبب افزایش مهاجرت گلبول‌های سفید و فاگوسیتوز خواهد شد در حالیکه انفجار تنفسی (Repiratory Burst) تنها در صورتی افزایش پیدا خواهد کرد که این دو ویتامین بصورت توأم مورد استفاده قرار گیرند.

Parasad و Priyanka (۲۰۱۱) تاثیر عصاره‌ی *Garsinio gummi-gutta* (اکالیپتوس) با غلظت ۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم غذا را بر فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسما و پارامترهای خونی *P. hypophtalamus* مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از کار آنها نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید در همه‌ی گروهها نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا کرده است اما بیشترین تعداد گلبول سفید در تیمار ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مشاهده شد.

نوتروفیل

نوتروفیل‌ها مانند ماکروفاژها سلولهای فعال فاگوسیتیک هستند. آنزیم‌های لیتیک و مواد ضد میکروبی نوتروفیل‌ها به صورت دانه‌های اولیه و ثانویه‌اند. دانه‌های بزرگتر و غلیظ Azorophil یک نوع لیزوزیم بود که دارای پراکسیداز، لیزوزیم و انواعی از آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند. دانه‌های کوچکتر ثانویه دارای کلاژناز، لاکتوفرین و لیزوزیم می‌باشند. هر دو نوع دانه‌های اولیه و ثانویه به فاگوزوم متصل می‌شوند و شبیه ماکروفاژها، محتویات آنها را تجزیه و هضم می‌کنند. فاگوسیتوز سلولی فرآیند خنثی‌سازی، کشتن و هضم میگروارگانیسم‌های بیماریزا می‌باشد. در فاگوسیتوز، سلول فاگوسیت کننده طی فرآیند انفجار تنفسی رادیکالهای آزاد تولید می‌کنند که برای باکتری‌ها سمی است. در نوتروفیل نسبت به ماکروفاژها فعالیت انفجار تنفسی گسترده‌تر است (۲).

نتایج حاصل از این تحقیق مطابق جدول ۱حاکی از آن است که تعداد نوتروفیل در همه‌ی گروه‌ها نسبت به گروه شاهد افزایش یافته است و بیشترین تعداد نوتروفیل در تیمار ۲ قابل مشاهده است. تعداد نوتروفیل میان گروه شاهد و سایرگروهها دارای اختلاف معنی‌داری است ($P< 0.05$).

چندین گزارش مبنی بر این موضوع وجود دارد که وقتی پروبیوتیک‌ها به صورت خوراکی مورد استفاده قرار بگیرند سبب افزایش فاگوسیتوز توسط نوتروفیل‌ها در آبزیان خواهند شد (۱۹، ۲۰، ۲۷ و ۳۰).

Yuan-Kun Lee و همکاران (۲۰۰۲) فعالیت فاگوسیتوز در سلولهای خونی و ایجاد مقاومت در میگوی *Penaeus merguiensis* به دنبال تغذیه با اسپیرولینا مورد مطالعه قرار دادند و مشاهده کردند مصرف اسپیرولینا فعالیت فاگوسیتوزی سلولهای خونی را افزایش داده و این در نتیجه‌ی فعال کردن هومئوسیت‌هاست. سلول‌های فاگوسیت فعال شده هم توانایی بیشتری در بلعیدن عوامل بیگانه دارند و هم سرعت فاگوسیتوز آنها افزایش پیدا خواهد کرد.

Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۸) تأثیر اسپیرولینا را به عنوان یک محرک رشد و ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد مطالعه قرار دادند و عنوان کردند که بیشترین میزان نوتروفیل در گروه شاهد دیده شده است که با افزایش میزان اسپیرولینا (از ۲/۵ تا ۱۰درصد) در جیره، تعداد این سلول‌ها کاهش می‌یابد.

Ispir و Yonar (۲۰۰۷) تاثیر لوامیزول را بر فعالیت فاگوسیتوز در Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykis*) بررسی کردند و بیان نمودند که ۱۴روز بعد از مصرف این ترکیب، تولید رادیکال‌های اکسیداتیو، فعالیت فاگوسیتوز در نوتروفیل و تولید آنیون‌های سوپر اکسید افزایش پیدا خواهد کرد. لذا بیان کردند که لوامیزول می‌تواند سبب افزایش ایمنی غیراختصاصی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شود.

لنفوسیت

نقش مواد محرک عمدتاً بالا بردن ایمنی غیراختصاصی است. وظیفه‌ی لنفوسیت‌ها تولید آنتی بادی در برابر آنتی ژن‌ها می‌باشد، لذا در ایمنی اختصاصی نقش دارند. سیستم ایمنی ماهی به علت کارایی بیشتر سیستم ایمنی غیراختصاصی نسبت به ایمنی اختصاصی (نسبت به حیوانات خونگرم) تاثیر مواد محرک ایمنی را بیشتر نشان می‌دهد. مطابق آنچه که در جدول

۱ مشاهده می‌شود در بررسی که در زمینه‌ی تأثیر اسپیرولینا بر ماهی پنگوسی گیاهخوار انجام شد بیشترین میزان لنفوسیت در گروه شاهد مشاهده گردید به نحوی که میان گروه شاهد با سایر گروهها اختلاف معنی‌داری دیده شد ($P\leq 0.05$).

Duncan و Klesius (۱۹۹۹) تاثیر اسپیرولینا را بر ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی در *Channel catfish* مورد مطالعه قرار دادند و گزارش نمودند که اسپیرولینا فقط سبب افزایش پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی خواهد شد و تاثیری بر ایمنی اختصاصی ندارد.

Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۸) اسپیرولینا را با ۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به جیره‌ی غذایی تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* اضافه کردند و بیان نمودند که بین تیمارهای ۲/۵ تا ۱۰ درصد اختلاف معنی‌داری در تعداد لنفوسیت‌ها مشاهده نگردید و کمترین میزان لنفوسیت در گروه شاهد دیده شده است (۸۴/۴ درصد).

ائوزینوفیل

همواره مقدار ائوزینوفیل‌ها در پاسخ‌های ایمنی افزایش پیدا می‌کند. در ارتباط با عمل فاگوسیتوزی، ائوزینوفیل‌ها نسبت به نوتروفیل‌ها ضعیف‌تر عمل می‌کنند و قدرت باکتری‌کشی آنها کمتر است. اگرچه ائوزینوفیل‌ها به یکسری عوامل و فاکتورهای شیمیایی مثل موادی که از باکتری بوجود می‌آید همچنین محصولاتی که از کمپلمان بوجود می‌آید، پاسخ می‌دهند ولی در ارتباط با عواملی که از سلولهای مثلاً بازوفیل ترشح می‌شود مثل هیستامین، حساسیت بیشتری دارند.

میزان ائوزینوفیل‌ها تا ۵ درصد هم می‌تواند در خون وجود داشته باشند. این میزان ممکن است در اثر عواملی مثل آلرژی، وجود انگل و غیره بیشتر از ۵ درصد و حتی تا ۱۰ درصد و بیشتر هم بشود. براساس نتایج حاصل از تحقیقی که انجام شد مطابق جدول ۱ بیشترین میزان ائوزینوفیل در گروه شاهد دیده شد که البته این افزایش معنی‌دار نبود ($P<0.05$).

Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۸) نیز تأثیر اسپیرولینا را به عنوان یک محرک رشد و ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد مطالعه قرار دادند در نتیجه‌ی تحقیقات خود عنوان کردند که بیشترین میزان ائوزینوفیل در گروه شاهد دیده شده است که با افزایش میزان اسپیرولینا (از ۲/۵ تا ۱۰درصد) در جیره، تعداد این سلول‌ها کاهش می‌یابد.

مونوسیت

در نتایج حاصل از پژوهشی که انجام شد مطابق آنچه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود تعداد مونوسیت در سایر تیمارها نسبت به گروه شاهد کمتر است. میانگین تعداد مونوسیت در گروه شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>0.05$).

Abdel-Tawwab و همکاران (۲۰۰۸) نیز تاثیر اسپیرولینا را به عنوان یک محرک رشد و ایمنی در *Oreochromis niloticus* مورد مطالعه قرار دادند در نتیجه‌ی تحقیقات خود عنوان کردند که بیشترین میزان مونوسیت در گروه شاهد دیده شده است که با افزایش میزان اسپیرولینا (از ۲/۵ تا ۱۰درصد) در جیره، تعداد این سلول‌ها کاهش می‌یابد.

Selvaraj و همکاران (۲۰۰۵) تاثیر مخمر گلوکان را بر نرخ بازماندگی و ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی در *Cyprinus carpio* بررسی کردند و بیان کردند که تزریق این ماده سبب افزایش تعداد مونوسیت در *Cyprinus carpio* خواهد شد.

در این تحقیق با توجه به اینکه اسپیرولینا سبب افزایش معنی‌داری در تعداد نوتروفیل شده است می‌توان نتیجه گرفت که این جلبک سبب تحریک فعالیت فاگوسیتوز در ماهی پنگوسی و در نتیجه بهبود سیستم ایمنی غیر اختصاصی این ماهی خواهد شد. اما همانگونه که در نتایج هم نشان داده شد این جلبک تاثیری در ایمنی اختصاصی ماهی پنگوسی گیاهخوار ندارد.

منابع

۱-علیشاهی، م.؛ سلطانی، م.؛ مصباح،م. و اسمعیلی‌راد، ا.، ۱۳۹۰. تاثیر تجویز خوراکی گیاه خارمریم روی پاسخ‌های ایمنی کپور معمولی. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۶، شماره ۳ ، صفحات ۲۵۵ تا ۲۶۳ .

۲-لیلوی، ه. و رعایایی، م.، ۱۳۸۱. ایمنی شناسی. چاپ اول. انتشارات سایه هور. ۱۹۱ صفحه.

۳-نظیفی، س.، ۱۳۷۶. هماتولوژی و بیوشیمی بالینی پرندگان. (گردآوری و تدوین). چاپ اول، انتشارات دانشگاه شیراز، شماره ۲۷۲، ۹۰ صفحه.

4-Abdel-Tawwab, M.; Azza, M. Abdel-Rahman and Nahla, E.M.I., 2008. Evaluation of commercial live bakers' yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for fry Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) challenged in situ with *Aeromonas hydrophila.* Aquaculture, 5P.

5-Abdel-Tawwab, M.; Mohammad H. Ahmad; Yasser M. Abdel-Hadi and Medhat E.A. Seden, 2008. Use of Spirulina (*Arthrospira platensis*) as a growth and immunity promoter for Nile tilapia, *Oreochromis Niloticus* (L.) fry challenged with pathogenic *Aeromonas hydrophila.* 8st International Symposium on Tilapia in Aquaculture.

6-Alishahi, M.; Ranjbar, M.M.; Ghorbanpour, M.; Peyghan, R.; Mesbah, M. and Razi Jalali, M., 2010. Effects of dietary *Aloe vera* on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio).* Inter. J. Vet. Res. Vol. 4, No. 3, pp.189-195.

7-Bely, A., 2002. The potential Application of Spirulia as a nutritional and therapeutic supplement in health management. The Journal of American Nutraceutical Association (JANA), Vol. 5, No. 2, pp.27-48.

8-Blaxhall, P.C., 1972. The haematological assessment of the health of the freshwater fish. A review of selected literature. J. Fish Biol., 4:593–604.

9-Campbell, T.W., 2004. Hematology of lower vertebrates. *In*: Proceedings of the 55th Annual Meeting of the American College of Veterinary Pathologists Pathologists (ACVPC) & 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Pathology (ASVCP). ACVP and ASVCP, USA.

10-Duncan, P.L. and Klesius P.H., 1996. Effects of feeding Spirulina on specific and non-specific immune responses of channel catfish. J. Aquat. Animal Health, 8:308-313.

11-www.fishbase.com.

12-Gatlin, D.M. III. 2002. Nutrition and fish health. *In*: (J.E. Halver & R.W. Hardy eds). Fish Nutrition. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp.671-702.

13-Golovina, N.A., 1996. Morphofunctional characteristics of the blood of fish as objects of aquiculture. Doctoral Thesis. Moscow, Russia. 53P.

14-Gopalakannan, R. and Arul, V., 2006. Immun-omodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture, 255:179–187.

15-Hrubec, T.C., Smith, S.A. and Robertson, J.L., 2001. Age related in hematology and chemistry values of hybrid striped bass chrysops *Morone saxatilis*. Vet. Clin. Pathol., Vol. 30, No. 1, pp.8–15.

16-Ispir, U. and Yonar, M.E., 2007. Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Firat University, Fisheries Faculty, Department of Fish Diseases, 23119 Elazig, Turkey.

17-Jaime-Ceballos B.; Hernandez-Llamas A.; Garcia T.; Perez-Jar L. and Villareal H., 2006. Substitution of *Chaetoceros mulleri* by *Spirulina platensis* meal in diets for *Litopenaeus schmitti* larvae. Aquaculture, 266:215-220.

18-Jittanoonta, P., 1999. Food safety on utilization of solar-dried Thai Spirulina. The Kasetsart Journal, Vol. 33, No. 2, pp.277-283.

19-Li, P. and Gatlin III, D.M., 2005. Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for subadult hybrid striped bass (*Morone chrysops*×*M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. Aquaculture, 248:197–205.

20-Li, P. and Gatlin, D.M., 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic GroBiotick™ AE influence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture, 231: 445–456.

21-Luskova, V., 1997. Annual cycles and normal values of haematological parameters in fishes. Acta Sc. Nat. Brno., Vol. 31, No. 5, 70P.

22-Mahesh Babe, S.; Gopalaswuny, G. and Chandramohan, N., 2005. Identification of an antiviral principle in Spirulina plutensis against Bombgn mori nuclear polyhedrosis virus (BmNPV0. IndianJ. Biotechnol., 4:384-388.

23-Mulero, Victoriano, Angeles Esteban, M. and Meseguer, Jose Â., 1998. Effects of *in vitro* addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. Vet. Immunol. Immunopathol.,

24-Nakono, T.; Yamaguchi, T.; Sato M. and Iwama, G.K., 2003. Biological effects of carotenoids in fish. pp.1–15. International Seminar "Effective Utilization of Marine Food Resource", Songkhla, Thailand, 18 December, 2003.

25-Osman, H.A.M.; Taghreed, B.; Soliman, W.E.; Maather, M., 2010. Influence of Beaker's yeast on growth and survival of *O. niloticus.* Nat. Sci., Vol. 8, No. 3, pp.96-103.

26-Ortuno, J.; Cuesta, A.; Angeles Estabane, M. and Meseguer, J., 2001. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosage on gilthed seabream (*Sparus Aurata* L.) Innate Immune System. Vet. Immunol. Immunopathol., 79:167-180.

27-Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Satoh, S. and Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 243: 241–254.

28-Pasarad, G. and Priyanka, G.L., 2011. Effect of fruit rind extract of Garcinia *Gummi-Gutta* on haematology and plasma biochemistry of catfish *Pangasinodon hypophtalamus*. Asian J. Biochemist., Vol. 6, No. 3, pp.240-251.

29-Promya, J. and 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*). Int. J. Agr. Biol., Vol. 13, No. 1, pp.77-82.

30-Rengpipat, S.; Rukpratanporn, S.; Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P., 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquaculture, 191: 271–288.

31-Sakai, M., 1999. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture, 172:63-92.

32-Selvaraj, V.; Sampath, K. and Sekar, V., 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immun., 19:293e-306.

33-Tatina, M.; Bahmani, M.; Soltani; Abtahi, B. and Gharibkhani, M., 2010. Effect of different levels of dietry vitamin C and E on some of hematological and biochemical parameter of Starlet (*Acipencer ruthenus*). J. Fish. Aqua. Sci., pp.1-11.

34-Thrall, M.A., 2004. Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Whiliams & Wilkins ,USA., pp.241,277-288,402.

35-V´azquez, G. Rey and Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue Cell, 39:151–160.

36-Vonshak, A., 1997. *Spirulina platensis* (Arthospira): Physiology, cell biology and biotechnology. Taylor and Francis, London, UK. 540P.

37-Vosylien´e, M.Z., 1999. The effect of heavy metals on hematological indices of fish. Acta Zool. Litvanica Hydrobiol., Vol. 9, No. 2, pp.76–82.

38-Yuan-Kun Lee; Pei-Fern Chew; Boon-Seng Soh and Lai Yee Tham, 2003. Enhancing phagocytic activity of hemocytes and disease resistance in the prown, Penaeus merguiensis by feeding Spirlina platensis. J. Appl. Phycol., Vol. 15, No. 4, pp.279-258.

39-Zhiteneva, L.; Poltavceva, T.G. and Rudnickaja, O.A., 1989. Atlas of normal and pathological cells in the blood of fish. Rostov-on-Don, 112P.