



## تاثیر عصاره‌ی آبی جلبک (*Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) بر برخی شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758))

اسماعیل کرمی، مهرزاد مصباح، طراوت ملایم رفتار\*، نکاور محمدیان، سید صمد حسینی، مرضیه نظری

گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

نوع مقاله:	چکیده
پژوهشی	در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آبی جلبک ( <i>Sargassum angustifolium</i> (Agardh, 1820) بر برخی شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی کپور معمولی، به صورت کاملاً تصادفی در ۴ تیمار (گروه شاهد فاقد عصاره‌ی جلبک، ۱٪ عصاره جلبک، ۱۰٪ عصاره‌ی جلبک و ۵۰٪ عصاره‌ی جلبک) تقسیم شدند. خون‌گیری در روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ صورت گرفت. شاخص‌های خون‌شناسی از جمله شمارش کلی و تفریقی گلبول‌های سفید، شمارش کلی گلبول‌های قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، اندیس‌های گلبولی (MCHC, MCH, MCV) و انفجار تنفسی (NBT) اندازه‌گیری شد. در پایان آزمایش اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف در میزان هماتوکریت، نسبت هموگلوبین گلبولی (MCHC) (%، تعداد کل گلبول‌های قرمز، انفجار تنفسی (NBT)، هتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت دیده نشد ( $p > 0.05$ ). اما اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف در میزان هموگلوبین، شمارش کلی گلبول‌های سفید، حجم متوسط گلبولی (MCV) و وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، مشاهده شد ( $p < 0.05$ ). یافته‌های حاصل از بررسی حاضر نشان داد که عصاره‌ی جلبک ( <i>Sargassum angustifolium</i> (Agardh, 1820) در غلظت‌های مورد استفاده می‌تواند بر برخی فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی اثر گذار باشد.
تاریخچه مقاله: دریافت: ۹۴/۰۵/۱۷ اصلاح: ۹۴/۰۷/۰۸ پذیرش: ۹۴/۰۸/۰۱	
کلمات کلیدی: شاخص‌های خونی عصاره‌ی آبی کپور معمولی	

### مقدمه

جلبک‌ها به عنوان منبعی غنی از ترکیبات مفید و فعال زیستی محسوب می‌شوند. تاکنون از جلبک‌های پر سلولی، ترکیبات زیستی متعدد و با گستره‌ی کاربردی متنوعی از جمله اثرات آنتی بیوتیکی، ضد ویروسی، ضد قارچی و سرطانی شناسایی و مشتق شده است. بسیاری از متابولیت‌های اولیه و یا ثانویه جلبک‌ها می‌توانند به مواد فعال مورد نیاز صنایع دارویی تبدیل شوند (Choudhury et al., 2005; Tüney et al., 2006; Barsanti and Gualtieri, 2006). این منبع پرارزش بیولوژیکی دارای کاربردهای گوناگونی است که استفاده از جلبک‌ها به عنوان غذا و دارو بیش از سایر جنبه‌ها، نظر انسان را به خود جلب کرده است (Dhargalkar and Verlecar, 2009; Rajasulochana et al., 2009).

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [Taravat.fishery@gmail.com](mailto:Taravat.fishery@gmail.com)

کاروتنوئید، فیبر و اسیدهای چرب ضروری هستند (Kotnala et al., 2009). همچنین به واسطه‌ی داشتن پلی ساکاریدهای ارزشمندی مانند آگار، کاراژینان و آلژینات از ارزش و اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار هستند (Taskin et al., 2007; Kanjana et al., 2011). جلبک‌ها در سه گروه اصلی سبز، قرمز و قهوه‌ای طبقه‌بندی می‌شوند (Mimica-Dukie et al., 2010). جلبک قهوه‌ای سارگاسوم، از جلبک‌های بسیار معروف سواحل جنوب ایران می‌باشد. این جلبک در سواحل صخره‌ای جنوب کشور، اواخر پاییز و اوایل زمستان به حداکثر رویش خود می‌رسد (Farbodnia, 1997; Kianmehr, 1990). پارامترهای خونی در ماهیان ممکن است تحت تأثیر عوامل فیزیولوژیکی و یا عوامل خارجی مختلفی نظیر جیره‌ی غذایی دچار تغییر شوند (Rios et al., 2002; Nespola and Rosenmann, 2002). از طرفی برخی مطالعات نشان داده است که استفاده از جلبک‌های خشک شده، به عنوان محرک ایمنی در صنعت آبزی پروری، باعث بهبود پاسخ‌های فیزیولوژیک نسبت به استرس و بیماری می‌شود (Jaime-Ceballos et al., 2005). ماهی کپور معمولی با نام علمی *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) یکی از گونه‌های خانواده Cyprinidae و یکی از فراوان‌ترین گونه‌های موجود در آب شیرین می‌باشد. ماهی کپور معمولی به دلیل گسترش فراوان در سراسر آسیا و اغلب بخش‌های اروپا و در برخی کشورهای آفریقا و آمریکای لاتین مورد بررسی قرار می‌گیرد (Lee et al., 2012). این گونه به دلیل مقاومت زیاد در برابر نوسان‌های محیطی و استفاده از طیف وسیعی از مواد غذایی قابل دسترس، یکی از گونه‌های مهم پرورشی در ایران نیز محسوب می‌شود (Salehi, 2003). متأسفانه مطالعات کمی در ایران روی خواص این منابع ارزشمند در آبزیان و ماهیان پرورشی انجام گرفته است و لذا در این تحقیق به بررسی تاثیر عصاره‌ی آبی جلبک *Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) بر برخی شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی پرداخته شده است.

## مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴۰ قطعه ماهی کپور معمولی، با میانگین وزنی  $16/45 \pm 78/99$  گرم (انحراف معیار  $\pm$  وزن)، از مزارع پرورش ماهی شهرستان شوشتر تهیه و به آزمایشگاه تحقیقاتی بخش بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، منتقل شدند. ماهی‌ها به منظور تطابق با شرایط آزمایشگاه، به مدت دو هفته در آکواریوم‌های تمیز و کاملاً ضدعفونی شده با حجم ۱۵۰ لیتر نگهداری شدند. جهت هوادهی و تأمین اکسیژن در هر یک از آکواریوم‌ها یک عدد سنگ هوا که به منبع هواده متصل بود، نصب گردید و تنها در نوبت‌های غذادهی، هوادهی موقتاً قطع و سپس مجدداً برقرار می‌شد. میزان درجه حرارت در آکواریوم‌ها در طی مدت آزمایش ثابت بود. جهت اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیوشیمیایی آب، میزان اکسیژن با استفاده از دستگاه اکسیژن متر (HACH-sension1) به صورت روزانه و pH آب به صورت هفتگی با استفاده از دستگاه پی‌اچ متر (SUNTEX-TS1) اندازه‌گیری شد. تعویض آب به میزان ۲۰٪ حجم آب هر ۴۸ ساعت، یکبار انجام می‌شد. غذادهی ماهی‌ها در طول مدت سازگاری به میزان ۲٪ وزن بدن، در دو نوبت با غذای کنسانتره تجاری (بیومار ساخت کشور فرانسه)، انجام شد. ماهی‌ها پس از طی دوره‌ی سازگاری، به صورت کاملاً تصادفی در ۴ تیمار و سه تکرار (هر تکرار شامل ۲۰ قطعه بچه ماهی) تقسیم شدند. به این ترتیب، تیمار اول به عنوان گروه شاهد فاقد عصاره‌ی جلبک، تیمار دوم دارای ۱٪ عصاره جلبک، تیمار سوم ۱۰٪ عصاره‌ی جلبک و تیمار چهارم ۵۰٪ عصاره‌ی جلبک انتخاب شد و در هر تکرار ۲۰ قطعه ماهی کپور معمولی قرار داده شد. جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) از منطقه بین جزرومدی سواحل بوشهر جمع‌آوری و داخل کیسه‌های پلاستیکی در کنار یخ به آزمایشگاه بهداشت آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال داده شدند. نمونه‌ها در آزمایشگاه به منظور جدا کردن هر گونه شن و ماسه و سایر ضایعات و مواد ناخواسته، چند بار با آب تمیز و تصفیه شده شهری و سپس با آب مقطر دو بار تقطیر، در سبدهای پلاستیکی شستشو داده و در نهایت با آب مقطر استریل، آبکشی شدند. جلبک‌های شسته شده به مدت یک هفته در شرایط سایه خشک شدند (Singaravelu et al., 2007). نمونه‌های خشک شده با استفاده از دستگاه خردکن، به شکل پودر در آورده شدند. به منظور تهیه عصاره، ۱۰ گرم از پودر خشک شده جلبک با ۱۰۰ سی سی آب مقطر دوبار تقطیرشده در داخل ارنل مایر ۵۰۰ سی سی همراه با مگنت، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بر روی هیتر جوشانده شد، سپس محلول

حاصل به مدت ۲۵ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ rpm دوار سانتریفیوژ گردید و محلول رویی با استفاده از کاغذ صافی واتمن NO.1، فیلتر و عصاره‌ی به دست آمده در یخچال نگهداری شد. بعد از هر بار تعویض آب، غلظت عصاره‌ی جلبک مدنظر در هر آکواریوم مجدداً تنظیم می‌شد. در فواصل زمانی روزهای ۱، ۳، ۷ و ۱۴ از هر تیمار در هر مرحله تعداد ۹ قطعه ماهی به صورت تصادفی، از آکواریوم خارج و جهت بررسی فاکتورهای خونی نمونه برداری شدند. به منظور خونگیری ابتدا ماهیان با استفاده از عصاره‌ی گل میخک به میزان ۳۰۰ ppm بیهوش شده، سپس از ناحیه ساقه‌ی دمی با استفاده از سرنگ‌های هیپارینه خونگیری شدند. سرم خون با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ (ROTOFIX 32 A ساخت شرکت Hettich آلمان) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه جدا شده و سپس در میکروتیوپ‌های حاوی ۲۰ میکرولیتر ماده ضد انعقاد هیپارین به منظور انجام آزمایشات خون شناسی جمع آوری گردید. سپس پارامترهای هماتولوژیکی شامل هماتوکریت (PVC)<sup>۱</sup>، هموگلوبین (Hb)<sup>۲</sup>، تعداد کل گلبول‌های سفید (TWBC)<sup>۳</sup>، تعداد کل گلبول‌های قرمز (TRBC)<sup>۴</sup>، حجم متوسط گلبولی (MCV)<sup>۵</sup> (فمتولیترا)، وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)<sup>۶</sup> (پیکوگرم)، نسبت هموگلوبین گلبولی (MCHC)<sup>۷</sup> و درصد هتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت اندازه‌گیری گردید (Feldman *et al.*, 2000). شمارش کلی گلبول‌های سفید و قرمز به روش دستی (با استفاده از لام هماسیتومتر یا نتوبار) و با رقیق کردن خون، به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق کننده نات هریک، صورت گرفت (Thrall, 2004). شمارش تفریقی انواع گلبول‌های سفید (هتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت) پس از تهیه گسترش و رنگ آمیزی با رنگ گیمسا صورت پذیرفت. جهت تعیین هماتوکریت نمونه‌های خون جمع آوری شده در لوله‌های موئین به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. مقدار هموگلوبین نیز توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (مدل Milton roy) با استفاده از معرف درابکین (K3Fe(CN)6 ۲۰۰ میلی گرم، KCN ۵۰ میلی گرم، H2KO4P ۱۴۰ میلی گرم، دترجنت غیر یونی ۱ میلی لیتر، آب دوار تقطیر شده ۱ لیتر) به دست آمد. همچنین اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) و غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از فرمول‌های استاندارد موجود محاسبه گردید (Thrall, 2004).

تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی متر مکعب) / ۱۰ × هماتوکریت (درصد) = MCV

هماتوکریت (در صد) / هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) × ۱۰ = MCHC

تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی متر مکعب) / هموگلوبین (گرم در دسی لیتر) × ۱۰ = MCH

جهت ارزیابی انفجار تنفسی (NBT)، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هیپارینه در داخل میکروتیوب قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی متیل فرم‌آمید اضافه شد. پس از سانتریفوژ نمودن نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Geng *et al.*, 2012). جهت آنالیز داده‌های به دست آمده از نرم افزار SPSS ۱۶ استفاده گردید. داده‌های مربوط به سنجش فاکتورهای مختلف به صورت میانگین ± انحراف استاندارد (Mean ± SD)، بیان شده‌اند. ابتدا از آزمون Leven statistic test برای همگن بودن انحراف معیار اطلاعات استفاده شد. پس از اطمینان از هموژنیتی انحراف معیار داده‌ها، از آنالیز واریانس یکطرفه برای بررسی تفاوت میانگین تیمارها استفاده و میانگین داده‌ها در سطح معنی دار ۰/۰۵ با استفاده از تست توکی با هم مقایسه شدند.

<sup>1</sup> Packed cell volume

<sup>2</sup> Hemoglobin

<sup>3</sup> Total white blood cell

<sup>4</sup> Total Red blood cell

<sup>5</sup> Mean corpuscular volume

<sup>6</sup> Mean corpuscular hemoglobin

<sup>7</sup> Mean corpuscular hemoglobin concentration

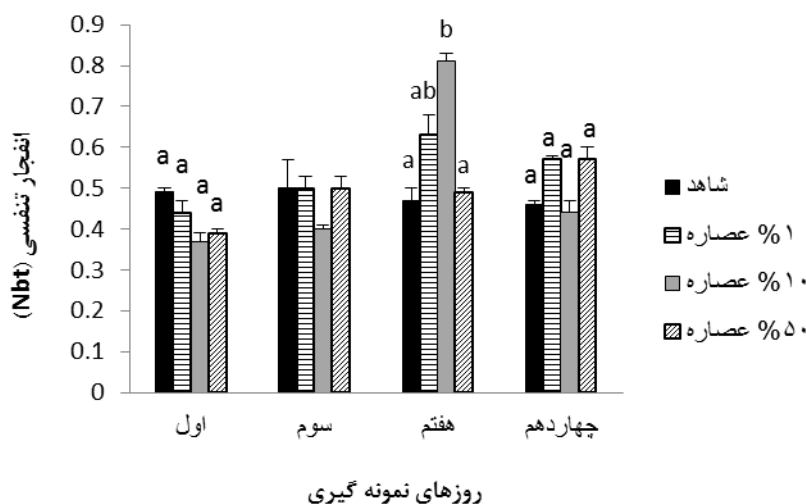
نتایج

هیچگونه مرگ و میری در طول دوره‌ی آزمایش مشاهده نشد و ماهی‌ها هیچ علائم قابل مشاهده‌ای از تنش (به عنوان مثال فعالیت زیاد) نشان ندادند. میانگین دمای آب در طول دوره‌ی آزمایش  $28 \pm 0.9$  درجه سانتیگراد و pH معادل  $7.3 \pm 0.1$  و همچنین میانگین اکسیژن  $6.5 \pm 0.85$  بود. نتایج مربوط به درصد هماتوکریت، میزان هموگلوبین، شمارش کلی گلبول‌های قرمز، حجم متوسط گلبولی (MCV) (فمتولیتتر)، وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) (پیکوگرم)، نسبت هموگلوبین گلبولی (MCHC) (%، شمارش کلی گلبولهای سفید، هتروفیل، لنفوسیت، مونوسیت و انفجار تنفسی (NBT) ماهی کپور معمولی مواجه شده با درصد‌های مختلف عصاره‌ی جلبک *Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) در جدول‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است. در پایان آزمایش نتایج حاصل از آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف در میزان هماتوکریت، نسبت هموگلوبین گلبولی (MCHC) (%، تعداد کل گلبول‌های قرمز، انفجار تنفسی (NBT)، هتروفیل، لنفوسیت و مونوسیت نشان نداد ( $p > 0.05$ ). اما اختلاف معنی داری بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف در میزان هموگلوبین، شمارش کلی گلبولهای سفید، حجم متوسط گلبولی (MCV)، وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

جدول ۱. نتایج حاصل از نمونه‌گیری روز اول شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی در مواجهه با عصاره جلبک *Sargassum angustifolium*

شاهد	۱٪ عصاره	۱۰٪ عصاره	۵۰٪ عصاره
هماتوکریت (PCV)	$47.4 \pm 1.52^c$	$34 \pm 2.32^{ab}$	$45.85 \pm 1.052^{bc}$
تعداد کل گلبولهای قرمز ( $\times 10^6$ TRBC)	$2.1 \pm 0.99^a$	$1.9 \pm 0.35^c$	$1.74 \pm 0.73^{ab}$
حجم متوسط گلبولی (فمتولیتتر) MCV	$258.33 \pm 12.05^b$	$121.21 \pm 21.13^a$	$229.56 \pm 30.33^b$
وزن متوسط هموگلوبین گلبولی (پیکوگرم) MCH	$39.38 \pm 6.15^{ab}$	$34.99 \pm 5.49^a$	$51.81 \pm 6.99^b$
نسبت هموگلوبین گلبولی (MCHC) (%)	$17.81 \pm 6.15^a$	$29.84 \pm 6.44^b$	$23.15 \pm 1.33^{ab}$
تعداد کل گلبولهای سفید ( $\times 10^3$ TWBC)	$12.5 \pm 4.15^a$	$21.8 \pm 2.1^a$	$18.6 \pm 3.25^b$
هتروفیل (Het)	$3.66 \pm 2.73$	$18.33 \pm 5.46$	$19 \pm 5.58$
لنفوسیت (Lym)	$96.33 \pm 2.73$	$81.66 \pm 5.46$	$81 \pm 5.58$
مونوسیت (Mon)	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$	$0 \pm 0$

\*تعداد نمونه ۶ قطعه در هر گروه. اطلاعات بر اساس (خطای استاندارد  $\pm$  میانگین) آورده شده است. حروف غیرمشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح  $0.05$  با تیمار شاهد است.



شکل ۱. مقایسه نتایج میزان انفجار تنفسی (Nbt) در تیمارهای مختلف عصاره‌ی آبی جلبک *Sargassum angustifolium* در زمان‌های نمونه‌گیری. حروف غیرمشابه در هر روز اختلاف معنی دار را نشان می‌دهد. سایر روزها تفاوت معنی داری نداشتند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شده است.

جدول ۲. نتایج حاصل از نمونه‌گیری روز سوم شاخص‌های خونی ماهی کپور در مواجهه با عصاره جلبک *Sargassum angustifolium*

شاهد	عصاره ۱٪	عصاره ۱۰٪	عصاره ۵۰٪
هماتوکریت (PCV)	۳۹/۳۳±۲/۷۷	۴۹/۲±۵/۳۳	۳۹±۸/۲۵
تعداد کل گلبولهای قرمز (TRBC) ×10 <sup>6</sup>	۱/۵۰±۰/۵	۱/۴۲±۰/۸	۱/۴۲±۰/۷۷
حجم متوسط گلبولی MCV (فمتولیترا)	۲۵۸/۳۳±۱۰/۳۳	۲۹۲/۴۵±۴۳/۸۷	۱۷۸/۵۹±۲۲/۹۲
وزن متوسط هموگلوبین گلبولی MCH (پیکوگرم)	۳۹/۳۸±۹/۰۵ <sup>ab</sup>	۵۵/۵۹±۱۵/۹۴ <sup>b</sup>	۳۳/۱۱±۱۲/۷۷ <sup>a</sup>
نسبت هموگلوبین گلبولی MCHC (%)	۱۷/۸۱±۴/۰۱	۱۷/۷±۲/۶۴	۱۶/۴۶±۴/۳۳
تعداد کل گلبولهای سفید (TWBC) ×10 <sup>3</sup>	۱۲/۵±۳/۴۴ <sup>a</sup>	۲۱/۸± ۵/۳۶ <sup>c</sup>	۱۸/۶±۱/۱ <sup>a</sup>
هتروفیل (Het)	۳/۷۷±۵/۶۶	۴/۵±۱/۷۳	۵±۲/۳
لنفوسیت (Lym)	۹۳/۱۷±۳/۷۷	۹۷±۲/۶۸	۹۶/۶۶±۳/۱۴
مونوسیت (Mon)	۰±۰	۰±۰	۰±۰

\*تعداد نمونه ۶ قطعه در هر گروه. اطلاعات بر اساس (خطای استاندارد ± میانگین) آورده شده است. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است.

جدول ۳. نتایج حاصل از نمونه‌گیری روز هفتم شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی در مواجهه با عصاره جلبک *Sargassum angustifolium*

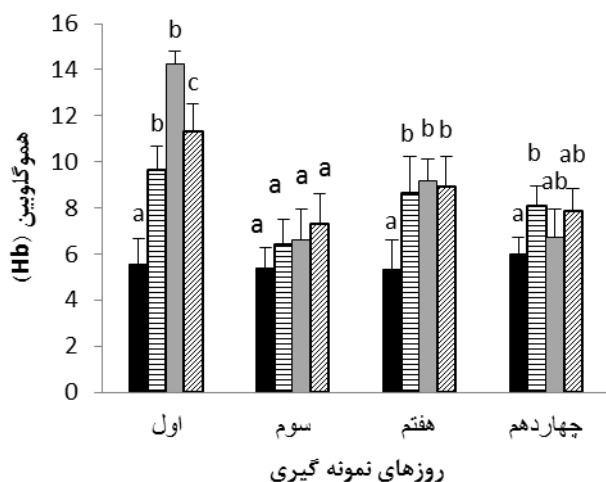
شاهد	عصاره ۱٪	عصاره ۱۰٪	عصاره ۵۰٪
هماتوکریت (PCV)	۴۵/۶±۳/۴۳ <sup>ab</sup>	۳۹/۵±۶/۵۵ <sup>a</sup>	۴۷/۵±۷/۳۳ <sup>b</sup>
تعداد کل گلبولهای قرمز (TRBC) ×10 <sup>6</sup>	۱/۵۳±۰/۹ <sup>a</sup>	۱/۶۷±۰/۳۵ <sup>b</sup>	۱/۴۲±۰/۹ <sup>a</sup>
حجم متوسط گلبولی MCV (فمتولیترا)	۲۵۸/۳۳±۷/۱ <sup>ab</sup>	۲۲۰/۶۲±۲۲/۶۴ <sup>a</sup>	۳۰۲/۲۳±۲۱/۵۹ <sup>bc</sup>
وزن متوسط هموگلوبین گلبولی MCH (پیکوگرم)	۳۹/۳۸±۷/۷۷ <sup>a</sup>	۶۱/۰۸±۱۱/۹۸ <sup>b</sup>	۶۰/۱۷±۷/۵۸ <sup>b</sup>
نسبت هموگلوبین گلبولی MCHC (%)	۱۷/۸۱±۳/۵۵ <sup>a</sup>	۲۶/۲۱±۴/۸۸ <sup>b</sup>	۱۹/۸۴±۳/۰۲ <sup>ab</sup>
تعداد کل گلبولهای سفید (TWBC) ×10 <sup>3</sup>	۱۲/۵±۲/۰۱ <sup>a</sup>	۲۱/۸±۵/۱۵ <sup>b</sup>	۱۸/۶±۳/۷۷ <sup>b</sup>
هتروفیل (Het)	۳/۶۶± ۴/۸	۴/۰±۹/۱۲	۳/۶۶±۸/۶۱
لنفوسیت (Lym)	۹۷/۰±۳/۳۹	۸۶/۳۳±۴/۱۵	۸۶/۳۳±۸/۶۹
مونوسیت (Mon)	۰/۳±۰/۵۳ <sup>a</sup>	۰±۰ <sup>a</sup>	۰±۰ <sup>a</sup>

\*تعداد نمونه ۶ قطعه در هر گروه. اطلاعات بر اساس (خطای استاندارد ± میانگین) آورده شده است. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است.

جدول ۴. نتایج حاصل از نمونه‌گیری روز چهاردهم شاخص‌های خونی ماهی کپور معمولی در مواجهه با عصاره جلبک *Sargassum angustifolium*

شاهد	عصاره ۱٪	عصاره ۱۰٪	عصاره ۵۰٪
هماتوکریت (PCV)	۴۵/۶±۷/۶	۴۰/۴±۲/۵۵	۳۹±۲/۷۷
تعداد کل گلبولهای قرمز (TRBC) ×10 <sup>6</sup>	۱/۴±۰/۳۲	۱/۳۵±۰/۵	۱/۳۵±۰/۳۵
حجم متوسط گلبولی MCV (فمتولیترا)	۲۵۸/۳۳±۷/۹ <sup>a</sup>	۲۹۱/۴۸±۲۱/۴۵ <sup>ab</sup>	۳۱۰/۱±۲۳/۸ <sup>ab</sup>
وزن متوسط هموگلوبین گلبولی MCH (پیکوگرم)	۳۹/۳۸±۶/۳۵ <sup>a</sup>	۵۶/۹۵±۶/۱۷ <sup>b</sup>	۶۳/۵۷±۱۱/۶۳ <sup>b</sup>
نسبت هموگلوبین گلبولی MCHC (%)	۱۷/۸۱±۳/۰۱	۲۲/۶۸±۵/۹۷	۲۰/۴۴±۴/۷
تعداد کل گلبولهای سفید (TWBC) ×10 <sup>3</sup>	۱/۱۶±۱/۴۱ <sup>a</sup>	۱/۴۵±۶/۳۶ <sup>a</sup>	۱/۳۶±۲/۷۴ <sup>a</sup>
هتروفیل (Het)	۳/۶۱±۳/۱	۵/۶۶±۲/۲۵	۶±۲/۶۸
لنفوسیت (Lym)	۹۶/۷۷±۲/۰۱	۹۳/۶۶±۱/۳۶	۹۳/۳۳±۱/۸۶
مونوسیت (Mon)	۰±۰	۱/۶۶±۰/۵۷	۰/۶۶±۰

\*تعداد نمونه ۶ قطعه در هر گروه. اطلاعات بر اساس (خطای استاندارد ± میانگین) آورده شده است. حروف غیر مشابه در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۰/۰۵ با تیمار شاهد است.



شکل ۲. مقایسه نتایج میزان هموگلوبین (Hb) در تیمارهای مختلف عصاره‌ی آبی جلبک *Sargassum angustifolium* در زمان‌های نمونه‌گیری. حروف غیرمشابه در هر روز اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد. سایر روزها تفاوت معنی‌داری نداشتند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شده است.

### بحث

در صنعت آبزی‌پروری، موفقیت‌های زیادی در استفاده از گیاهان دارویی در دو دهه‌ی اخیر حاصل شده است. در این صنعت، داروهای با منشأ گیاهی با اهداف مختلفی کاربرد دارند که از آن جمله می‌توان به تحریک سیستم ایمنی ماهی و سایر آبیان پرورشی اشاره کرد (Bisignano *et al.*, 2001). شاخص‌های خونی مهمترین پارامتر در تکامل وضعیت فیزیولوژیکی ماهی‌ها هستند. تغییر شاخص‌های خونی تحت تأثیر گونه، سن، بلوغ جنسی و وضعیت سلامت موجود قرار دارد (Blaxhall, 1972; Bielek and Strauss, 1993; Golovina, 1996; Hrubec *et al.*, 2001; Watanuki *et al.*, 2006). در مطالعه‌ی حاضر، اختلاف معنی‌داری در میزان هماتوکریت بین تیمارهای مختلف در پایان آزمایش مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ) هرچند میزان این شاخص در تیمارهای حاوی عصاره‌ی جلبک کمتر از گروه شاهد بود. نتایج ما مشابه نتایج Mustafa و همکاران (1994) بود که با افزایش سطح اسپیروولینا کاهش درصد هماتوکریت را مشاهده کردند. Kim و همکاران (2013)، در تحقیقی که روی اثرات حمایتی جلبک اسپیروولینا در طوطی ماهی (*Oplegnathus fasciatus*) انجام دادند، گزارش کردند که افزودن جلبک اسپیروولینا در جیره‌ی این ماهیان باعث افزایش میزان هماتوکریت شده است. آنها بیان نمودند که افزایش مقادیر پارامترهای ذکر شده می‌تواند ناشی از اثرات این جلبک و ترکیبات موجود در آن بر مراکز خونساز بدن و بافت هماتوپویتیک<sup>۸</sup> بوده و باعث افزایش تولید هموگلوبین و گلبولهای قرمز خون و متعاقباً افزایش هماتوکریت گردد. علت تفاوت‌های موجود می‌تواند عوامل محیطی، گونه‌ی ماهی و شرایط آزمایش باشد. میزان هموگلوبین در این پژوهش، در تیمارهای حاوی عصاره‌ی جلبک بیشتر از گروه شاهد بود اما تنها در تیمار ۱٪ عصاره‌ی جلبک به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. در مطالعه‌ی Saligheh zadeh و همکاران (2013) اثر مکمل غذایی جلبک اسپیروولینا بر برخی از فاکتورهای خونی، ایمنی و بیوشیمیایی سرم ماهی بنی *Mesopotamichthys sharpeyi* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که میزان هموگلوبین در گروه‌هایی که تحت تغذیه با اسپیروولینا بودند نسبت به گروه شاهد افزایش یافته ولی این افزایش معنی‌دار نبود. جلبک‌های قهوه‌ای دارای مقادیر بالای کلروفیل هستند. در بسیاری از موارد از کلروفیل به عنوان خون‌سبز یاد می‌کنند زیرا شباهت بسیار زیادی به هموگلوبین خون انسان دارد. افزایش مقدار هموگلوبین شاید به دلیل تبدیل کلروفیل به هموگلوبین است که دستیابی زیستی آن بسیار بهتر از آهن است (Russell *et al.*, 2011) و یا احتمالاً به دلیل اینکه بخش زیادی از پلی ساکاریدهای موجود در گونه‌های مختلف جنس سارگاسوم توسط نوعی قند به نام فوکوز (یک نوع پلی ساکارید سولفات) و سایر پلی ساکاریدهای سولفات تشکیل شده است، نسبت داد (FAO, 2003). مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از عصاره‌ی آبی

<sup>8</sup> Hematopoietic

جلبک *Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) در غلظت ۱۰٪ سبب افزایش معنی دار میزان گلبول سفید در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود. Kanimozhi و همکاران (2013) که اثر ایمنی زایی عصاره‌ی جلبک *Sargassum whitti* را علیه باکتری *Pseudomonas fluorescense* در ماهی *Mugil cephalus* بررسی کردند، افزایش میزان گلبول‌های سفید را در تیمارهای تحت عصاره نسبت به گروه شاهد مشاهده کردند. مطالعه‌ی Alishahi و همکاران (2012) نشان داد که تغذیه کپور معمولی با ارگوسان، لوامیزول و عصاره‌ی گیاهی (سرخارگل، کندر و آویشن) تنها سبب افزایش میزان گلبول سفید در تیمارهای تغذیه شده با سرخارگل و ارگوسان گردید و سایر تیمارها تفاوتی با گروه شاهد نشان ندادند. همچنین در گزارش Harikrishnan و همکاران (2003) آمده است که عصاره‌ی آبی گیاه *Azadirachta indica* سبب افزایش میزان گلبول سفید در ماهیان کپور معمولی آلوده شده به باکتری آئروموناس هیدروفیلا می‌شود. این افزایش در میزان گلبول سفید شاید ناشی از تاثیر این جلبک به عنوان یک ماده‌ی افزایش دهنده‌ی تحریک ایمنی باشد زیرا جلبک‌های قهوه‌ای عموماً دارای ویتامین C بیشتری نسبت به سایر ماکروجلبک‌ها (سبز و قرمز) هستند (Cruz-Suarez et al., 2008). همچنین بخش زیادی از پلی ساکاریدهای آن‌ها قند فوکوز و سایر پلی ساکاریدهای سولفات‌ه تشکیل شده است (FAO, 2003) که به شدت تحریک کننده‌ی سیستم ایمنی هستند (Lee et al., 1995). در مورد میزان لنفوسیت، منوسیت و هتروفیل تفاوت معنی‌داری در پایان آزمایش در بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). نتایج مطالعه‌ی حاضر با نتایج تحقیق Rezaei و همکاران (2012) که برخی پارامترهای رشد و خون‌شناسی گربه ماهی پنگوسی *Pangasianodon hypophthalmus* با افزودن عصاره‌ی گیاه مریم گلی به جیره بررسی کردند، مطابقت دارد. بر خلاف مطالعه‌ی حاضر، Fazlolahzadeh و همکاران (2011) افزایش درصد لنفوسیت و کاهش درصد نوتروفیل را در ماهی قزل آلا‌ی رنگین کمان تغذیه شده با پودر سیر نشان دادند. میزان شاخص MCV در پایان آزمایش، در تیمارهای مواجه شده با عصاره‌ی جلبک بیشتر از گروه شاهد بود و در تیمار ۱۰٪ نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی‌داری وجود داشت ( $p < 0.05$ ). میزان شاخص MCH نیز در تیمارهای ۱٪ و ۵۰٪ به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود ( $p < 0.05$ ). ولی در میزان MCHC بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). تحقیقات مشابه، نتایج موافق و متناقضی داشته اند به طوریکه Ekanem و Yusuf (2008)، تغییر در میزان این فاکتورها و Harikrishnan و همکاران (2003)، عدم تغییر این فاکتورها را گزارش دادند. در خصوص تعداد گلبول قرمز در پایان آزمایش تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مختلف و گروه شاهد مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ). Alishahi و همکاران (2010) در مطالعه‌ی اثر عصاره‌ی آلوئه ورا بر ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی در ماهی کپور معمولی را مورد بررسی قرار دادند و تفاوت معنی‌داری در تعداد گلبول‌های قرمز مشاهده نکردند که با مطالعه‌ی حاضر همخوانی دارد. تولید اکسیژن در فرایند فاگوسیتوزی خون، انفجار تنفسی نامیده می‌شود (Neumann et al., 2001). در این تحقیق نتایج فعالیت انفجار تنفسی در پایان آزمایش، با وجود افزایش در تیمارهای ۱٪ و ۵۰٪ عصاره‌ی جلبک، اختلاف معنی داری را بین گروه شاهد و تیمارهای مختلف آزمایش نشان نداد ( $p > 0.05$ ). Rezaei و همکاران (2012) با مطالعه‌ی برخی پارامترهای رشد و خون‌شناسی گربه ماهی پنگوسی *Pangasianodon hypophthalmus* با افزودن عصاره‌ی گیاه مریم گلی به جیره، تفاوت معنی داری در میزان انفجار تنفسی بین تیمارهای مختلف مشاهده نکردند. Pratheepa و همکاران (2010) در بررسی تأثیر عصاره‌ی برگ گیاه *Aegle marmelos* بر فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی، افزایش میزان انفجار تنفسی را در مقایسه با تیمار شاهد گزارش کردند. همچنین Kanimozhi و همکاران (2013) اثر ایمنی زایی عصاره جلبک *Sargassum whitti* را علیه باکتری *Pseudomonas fluorescense* در ماهی *Mugil cephalus* بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که میزان انفجار تنفسی در تیمار ۱٪ نسبت به تیمارهای ۰/۵٪، ۱/۵٪ و شاهد به طور معنی داری بیشتر است. علت این تفاوت‌ها منبع عصاره‌ی پلی ساکارید، غلظت پلی ساکارید، روش استفاده و زمان در معرض قرارگیری در نظر گرفته می‌شود (Kanimozhi et al., 2013). یافته‌های حاصل از بررسی حاضر نشان داد که عصاره‌ی جلبک *Sargassum angustifolium* در غلظت‌های مورد استفاده می‌تواند بر برخی فاکتورهای خونی ماهی کپور معمولی اثر گذار باشد. از این رو به نظر می‌رسد که می‌توان از عصاره‌ی آبی جلبک *Sargassum angustifolium* (Agardh, 1820) به عنوان عاملی موثر بر بهبود فاکتورهای خونی در ماهیان استفاده کرد. از آنجا که در طی این آزمایش میزان گلبول‌های سفید در تیمارهای

مواجه شده با عصاره آبی این جلبک، افزایش یافته است لذا پیشنهاد می‌شود اثر این عصاره بر فاکتورهای ایمنی مورد بررسی قرار گیرد.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق با استفاده از امکانات دانشکده‌ی دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفته است. در این خصوص از مسئولان محترم دانشگاه خصوصاً بخش آبیان دانشکده‌ی دامپزشکی تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

- Alishahi, M., Ranjbar, M.M., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M., Razi jalali, M. 2010. Effects of dietary Aloe vera on some specific and nonspecific immunity in the common carp (*Cyprinus carpio*). Iran. Journal of Veterinary Medicine. 4: 189-195.
- Alishahi, M., Soltani, M., Mesbah, M., Zargar, A. 2012. Immunostimulatory and growth stimulation effects of Ergosan, Levamisole and herbal extracts in *Cyprinus carpio*. Journal of Veterinary Research. 67(2): 135-142. (in Persian)
- Barsanti, L., Gualtieri, P. 2006. Algae anatomy, biochemistry and biotechnology. New York: Taylor and Francis Group.
- Bielek, E., Strauss, B. 1993. Ultra structure of the granulocyte of the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: morphogenesis and comparison to other leucocytes. Journal of Morphology. 218: 29-41.
- Bisignano, G., Laganà, M.G., Trombetta, D. 2001. In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. EMS Microbiology Letters. 1(20): 9-13.
- Blaxhall, P.C. 1972. The haematological assessment of the health of freshwater fish: A review of selected literature. Journal of Fish Biology. 4: 593-604.
- Choudhury, S., Sree, A., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., Bapuji, M. 2005. In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. Asian Fisheries Science. 18: 285-94.
- Cruz-Suarez Tapia Salazar, M., Nieto Lopez, M., Rique, D. 2008. A review of effects of macroalgae in shrimp feeds and co-culture. Program of Mariculture, University of Mexico. pp. 304-333.
- Dhargalkar, V.K., Verlecar, X.N. 2009. Southern ocean seaweed: A resource for exploration in food and drugs. Aquaculture. 287: 229-242.
- Ekanem, J.T., Yusuf, O.K. 2008. Some biochemical and haematological effects of black seed (*Nigella sativa*) oil on *Trypanosoma brucei*-infected rats. African Journal of Biotechnology. 4(3): 153-157.
- FAO. 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Papers No. 441. ISSN 0429-9345. FAO. Rome.
- Farbodnia, T. 1997. Algae Biology. Urmia University. 222 p. (in Persian)
- Fazlolahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S., Seifi, S. 2011. Effect of garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of ALT and AST of Rainbow trout in temperature stress. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 5(9): 84-90.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C. 2000. Schalm's Veterinary Hematology. 5<sup>th</sup> edition. Lippincott Williams & Wilkins. pp. 1120-1124.
- Geng, X., Dong, X-H., Tan, B-P., Yang, Q-H., Chi S-Y., Liu, H-Y. 2012. Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Aquaculture Nutrition. 18(1): 46-55.
- Golovina, N.A. 1996. Morph functional characteristics of the blood of fish as objects of aquiculture. PhD. thesis. Moscow. 53 p.
- Harikrishnan, R., Nisha, R.M., Balasundaram, C. 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. Aquaculture. 221: 41-50.
- Hrubec, T.C., Smith, S.A., Robertson, J.L. 2001. Age related in hematology and chemistry values of hybrid striped bass *Chrysops morone saxatilis*. Veterinary Clinical Pathology. 30: 8-15.



- Jaime-Ceballos, B., Villarreal, H., Garcia, T., Perez-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(3): 235-241.
- Kanimozhi, S., Krishnaveni, M., Deivasigmani, B., Rajasekar, T., Priyadarshni, P. 2013. Immunostimulation effects of *Sargassum whitti* on *Mugil cephalus* against *Pseudomonas fluorescens*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2(7): 93-103
- Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B., Wongprasert, K. 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & Shellfish Immunology*. 30: 389-396.
- Kianmehr, H. 1990. Basics of Algae Biology. Jahad Daneshgahi Publications of Mashhad. 251 p. (in Persian)
- Kim, S.S., Rahimnejad, S., Kim, K.W., Lee, K.J. 2013. Partial Replacement of fish meal with *Spirulina pacifica* in Diets for parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 13: 197-204.
- Kotnala, S., Garg, A., Chatterji, A. 2009. Screening for the presence of antimicrobial activity in few Indian seaweeds. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 32(1): 69-75.
- Lee, B., Duong, C.N., Cho, J., Lee J., Kim, K., Seo Y., Kim, P., Choi, K., Yoon, J. 2012. Toxicity of citrate-capped silver Nanoparticles in Common Carp (*cyprinus carpio*). *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012: 1-14.
- Lee, H.S., Jin, S.H., Kim, H.S., Ryu, B.H. 1995. Characteristic properties of fucoidan sulphate purified from Gompi, *Ecklonia stolonifera*. *Korean Journal of Food Science Technology*. 27(5): 716-723.
- Mimica-Dukie, N., Bugarin, D., Grbovic, S., Mitic-Culafic, D., Vukovic-Gacic, B., Orcic, D. 2010. Essential oil of *Myrtus communis* L. As a potential antioxidant and antimutagenic. *Molecules*. 15(4): 2759-70.
- Mustafa, M.G., Takeda, T., Umino, T., Wakamatsu, S., Nakagawa, H. 1994. Effects of *Ascophyllum* and *Spirulina* meal as feed additives on growth performance and feed utilization of red Sea bream, *Pagrus major*. *Journal of the Faculty of Applied Biological Sciences*. 33: 125-132.
- Nespolo, R.F., Rosenmann, M. 2002. Intraspecific allometry of haematological parameters in *Basilichthys australis*. *Journal of Fish Biology*. 60: 1358-1362.
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, J., Ainsworth, A.J., Belosevic, M. 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology*. 25: 807-825.
- Pratheepa, V., Ramesh, S., Sukumaran, N. 2010. Immunomodulatory effect of *Aegle marmelos* leaf extract on freshwater fish *Cyprinus carpio* infected by bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Pharmaceutical Biology*. 48(11): 1224-1239.
- Rajasulochana, P., Dhamotharan, R., Krishnamoorthy, P., Murugasan, S. 2009. Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. *Marsland Press Journal of American Science*. 5(3): 20-25.
- Rezaei, M.H., Sourinejad, I., Soltanian, S., Yousefzadi, M. 2012. Study of some growth and hematology indices of catfish *Pangasianodon hypophthalmus* after diet supplementation with *Salvia macrosiphon* extract. *Journal of Aquatic Ecology*. 2(2): 43-28. (in Persian)
- Rios, F.S., Kalinin, A.L., Rantin, F.T. 2002. The effects of long-term food deprivation on respiration and haematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Fish Biology*. 61: 85-95.
- Russell, P., Hertz, P., McMillan, B. 2011. Biology: the dynamic science. volume 2. 2<sup>nd</sup> edition. United States. 1363 pp.
- Salehi, H. 2003. Market perspective on cultured carp products in Iran. *Asia Pacific Conference on Aquaculture*, Bangkok. Thailand. 45 p.
- Saligheh zadeh, R., Yavari, V., Moosavi, S.M., Zakeri, M. 2013. Effects of dietary supplement spirulina algae (*Spirulina platensis*) on some blood, Immunity parameters and serum biochemical in binni fish *Mesopotamichthys sharpeyi*. *Iranian Veterinary Journal*. 10(2): 40-46. (in Persian)

- Singaravelu, G., Arockiamary, J.S., Ganesh Kumar, V., Govindaraju, K. 2007. A novel extracellular synthesis of monodisperse gold nanoparticles using marine alga, *Sargassum wightii* Greville. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 57: 97-101.
- Taskin, E., Ozturk, M., Kurt, O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). *African Journal of Biotechnology*. 6(24): 2746-2751.
- Thrall, M.A. 2004. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins, New York. 402 p.
- Tüney, I., Cadirci, B.H., Ünal, D., Sukatar, A. 2006. Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (izmir, Turkey). *Turkish Journal of Biology*. 30: 171-175.
- Watanuki, H.K., Ota, A.C., Malin, A.R., Tassakka, T., Kato, M.S. 2006. Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*. 258: 157-163.