

## بررسی تاثیر اسپیرولینا و گل همیشه‌بهار بر شاخص‌های رشد، ایمنی و مقدار آستاگزانتین در بافت گورخرماهی (*Danio rerio*)

ام البنین سالاری<sup>۱</sup>، فلورا محمدی زاده<sup>۲\*</sup>، امیر هوشنگ بحری<sup>۲</sup>، علیرضا سالارزاده<sup>۲</sup>، مازیار یحیوی<sup>۲</sup>

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

۲- گروه شیلات، مرکز تحقیقات فناوری های دریایی و شیلاتی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران.

### چکیده

در مطالعه حاضر اثر گل همیشه‌بهار و اسپیرولینا، هر کدام به تنهایی و به صورت ترکیب با یکدیگر بر برخی شاخص‌های رشد، ایمنی، بقاء و مقدار آستاگزانتین در بافت گورخرماهی مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۲۰ عدد گورخر ماهی در قالب ۴ تیمار (سه تکرار در هر تیمار با ۳۰ ماهی در هر تیمار)، به صورت تصادفی در اکواریم های ۱۰ لیتری توزیع شدند. جیره شاهد بر اساس جیره غذایی پایه بدون افزودنی، جیره تیمار دوم حاوی ۲۵ گرم پودر اسپیرولینا (SP) بر کیلوگرم خوراک پایه، جیره تیمار سوم حاوی ۲۵ گرم بر کیلوگرم پودر گل همیشه‌بهار (MG) بر خوراک پایه، و جیره تیمار چهارم نیز حاوی ۲۵ گرم بر کیلوگرم پودر گل همیشه‌بهار (MG) و ۲۵ گرم اسپیرولینا (SP+MG) بر کیلوگرم خوراک پایه تهیه شد. در پایان دوره برخی از شاخص‌های ایمنی و آستاگزانتین در بافت بررسی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده تاثیر معنی‌دار اسپیرولینا (SP)، پودر گل همیشه‌بهار (SP+MG) و ترکیب پودر اسپیرولینا و همیشه‌بهار (SP+MG) بر ایمنی و آستاگزانتین می باشد ( $P < 0.05$ ). به ترتیب تیمار SP+MG و MG به طور معنی‌داری باعث افزایش پروتئین کل، لیپوزیم و آستاگزانتین در بافت ماهی شدند و بیشترین مقدار IgM نیز در تیمار MG مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). هرچند که تفاوت معنی‌داری در ارتباط با رشد و بقاء مشاهده نگردید.

**کلید واژه‌ها:** بافت، اسپیرولینا، گل همیشه‌بهار، لیپوزیم، آستاگزانتین

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۱۲/۰۱

\*نویسنده مسئول:

fmoammadi13@gmail.com

### مقدمه

در چند دهه اخیر پرورش ماهیان زینتی به واسطه ارتقاء تجهیزات اکواریمی و افزایش علاقمندی افراد در نگهداری از آنها به عنوان حیوان خانگی به دلیل زیبایی در شکل و رنگ رشد جمشگیری داشته‌است [۲۰، ۱۳]. تولید ماهی‌های زینتی جزء مهمی از صنعت آبی‌پروری است و با بیش از ۷۰۰۰ گونه پرورش به بازار عرضه می شود. از این تعداد، تقریباً ۵۰۰۰ گونه آب شیرین و ۱۸۰۰ گونه دریایی هستند [۳۵، ۲۰]. بزرگترین تولیدکنندگان ماهیان زینتی در ایران استان های تهران، البرز، اردبیل، قزوین و مرکزی می‌باشند [۲]. این صنعت بزرگ با چالش‌هایی نیز مواجه است، بر اساس برخی گزارشات نرخ مرگ و میر در تجارت ماهیان زینتی به طور قابل توجهی متفاوت است و بین ۲ تا ۷۳ درصد متغیر است [۳۷]. این مسئله به طور بالقوه نشان دهنده تحمیل هزینه اقتصادی قابل توجهی بر این صنعت است. ماهیان زینتی، مانند همه حیوانات دیگر در اسارت، در معرض عوامل استرس‌زا هستند که ممکن است به بر سیستم ایمنی، تغذیه و در نتیجه رشد و رنگ پذیری و بقاء آنها تأثیرگذار باشد، با این حال، محدودیت اطلاعات در مورد نیازهای ماهیان زینتی به مواد مغذی منجر به استفاده از داده‌های گونه‌های ماهیان غیرزینتی شده است. همین امر موجب شده‌است که صنعت ماهیان زینتی عملکرد، رنگ‌بندی و میزان بقای ضعیفی را تجربه کند [۲۹]. بنابراین، استفاده از مکمل های غذایی که بتواند عملکرد رشد، سلامت، رنگ‌پذیری و مقاومت در برابر استرس‌های محیطی را در آنها بهبود بخشد، مفید خواهد بود. با این حال تحقیقات کمی در خصوص بهبود عملکرد ماهیان زینتی صورت گرفته است [۳۷].

در ماهی‌های زینتی رنگ به عنوان ابزاری برای جذب جفت و سایر انواع رفتارهای اجتماعی عمل می‌کنند. همچنین الگوی رنگدانه یک عامل کلیدی نشان‌دهنده وضعیت سلامت و کیفیت و بازارپسندی ماهیان زینتی است [۱۲، ۱۹]. رنگ پوست در ماهی‌ها عمدتاً به دلیل وجود سلول های تخصصی در پوست به نام کروماتوفور است. طیف گسترده ای از کاروتنوئیدهای مصنوعی و طبیعی به عنوان مکمل های غذایی در آبی‌پروری برای بهبود رنگ پوست استفاده می‌شود [۲۱، ۱۳]. آستاگزانتین مهمترین رنگدانه کاروتنوئیدی موجود در موجودات آبی است و

برخی عملکردهای زیستی از جمله جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع ضروری، محافظت در برابر اثرات منفی اشعه ماوراء بنفش، شاخص‌های ایمنی و تولیدمثل را کنترل می‌کند [۱۹]. آستاگزانتین مصنوعی نسبتاً گران هستند و نیاز به مواد جایگزین طبیعی دیگری است که بتوان آن را به عنوان منبع آستاگزانتین با قیمتی کاملاً مقرون به صرفه در جیره استفاده کرد. از جمله ترکیبات حاوی این کاروتنوئیدها، اسپیرولینا و گل همیشه بهار هستند [۱۰]. برگ‌ها و ساقه‌های گل همیشه بهار سرشار از کاروتنوئیدها، عمدتاً لوتئین (۸۰٪) و زآگزانتین (۵٪) و بتاکاروتن است. گل همیشه بهار دارای خواص ضد باکتری، ضد قارچ، ضد ویروسی، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب، ضد درد، محافظت از کبد و فلب بهبود زخم و بسیاری از اثرات دیگر است [۳۶]. کاروتنوئیدهای مختلف موجود در این گیاه دارای اثرات تقویت کننده رنگ ماهی است [۱۷]. اسپیرولینا نیز سوبه ای از سیانوباکتری‌ها است که می‌تواند به دلیل مزایای تغذیه‌ای مانند مقادیر بالای پروتئین، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه ضروری، مواد معدنی، اسیدهای چرب ضروری و رنگدانه‌های آنتی‌اکسیدانی مانند کاروتنوئیدها (بتاکاروتن، آستاگزانتین، لوتئین، کریپتوکسانتین و زآگزانتین) در صنعت آبزی‌پروری مورد استفاده قرار گیرد [۴۴]. مطالعات نشان دادند که مکمل‌سازی پودر اسپیرولینا در جیره غذایی ماهی باعث بهبود شاخص‌های رشد و مقدار رنگدانه‌های کاروتنوئیدی می‌گردد [۱۳].

در مطالعه حاضر اثر گل همیشه بهار واسپیرولینا به تنهایی و به صورت ترکیب با یکدیگر بر شاخص‌های رشد، آستاگزانتین، سیستم ایمنی و بقاء گورخرماهی بررسی شده است. گورخرماهی با نام علمی *Danio rerio* ماهی با ارزش زینتی است که علاوه بر استفاده‌های زینتی از آن به عنوان یک ارگانسیم مدل برای تحقیقات زیستی استفاده می‌شود [۱۵، ۲۶].

## مواد و روش‌ها

### ماهی و شرایط پرورش

این آزمایش با انتقال ۱۲۰ عدد گورخرماهی (*Danio rerio*) با میانگین وزن  $0.007 \pm 0.002$  گرم و طول  $0.5 \pm 0.1$  سانتی‌متر از مرکز فروش ماهیان زینتی در بندرعباس خریداری و به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس آغاز شد. ماهی‌ها در طی ۱۴ روز سازگاری با شرایط آزمایشگاه، در اکواریوم‌های ۱۰ لیتری ذخیره‌سازی شده و با غذای تجاری شرکت بیومار (۵۸ درصد پروتئین، ۱۵ درصد چربی، ۰/۵ درصد فیبر، ۲/۵ درصد خاکستر و ۹ درصد رطوبت) تغذیه شدند. در این فاصله، جیره‌های غذایی برای هر تیمار تهیه گردید. جیره اول شامل جیره غذایی پایه شرکت بیومار بدون افزودنی. جیره دوم: حاوی ۲۵ گرم بر کیلوگرم پودر اسپیرولینا (SP) بر خوراک پایه. جیره سوم: حاوی ۲۵ گرم بر کیلوگرم پودر گل همیشه بهار (MG) بر خوراک پایه. جیره چهارم: حاوی ۲۵ گرم پودر گل همیشه بهار (MG) و ۲۵ گرم اسپیرولینا (SP+MG) بر کیلوگرم خوراک پایه بود. در طول دوره آزمایش، تعویض آب روزانه به میزان ۳۰-۱۰ درصد آب مخازن انجام گردید. هوادهی از طریق یک پمپ مرکزی و سنگ‌ها برای همه اکواریوم‌ها به میزان یکسان فراهم شد. در طی دوره آزمایش دمای آب ۲۸ درجه سانتی‌گراد، مقدار pH آب ۷/۳۸، سختی آب ۱۰۴ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم و مقدار اکسیژن ۶/۴۸ میلی‌گرم بر لیتر بود.

### آماده سازی جیره

پودر اسپیرولینای مصرفی در جیره از برند ایرانی آلوگوتب گونه (*Spirulina platensis*) و پودر گل همیشه بهار (*Calendula officinalis*) از داروخانه معتبر گیاهان دارویی با برند زر خریداری گردید و قبل استفاده از الک ۱۰۰ میکرونی عبور داده شد.

تهیه جیره‌های آزمایشی این تحقیق بر اساس اسپری کردن پودر اسپیرولینا و همیشه بهار مطابق تیمارهای ذکر شده به جیره تجاری (شرکت بیومار فرانسه شامل ۵۸ درصد پروتئین، ۱۵ درصد چربی، ۰/۵ درصد فیبر، ۲/۵ درصد خاکستر و ۹ درصد رطوبت) به همراه ۲ درصد ژلاتین بود.

بعد از غنی‌سازی جیره‌ها در داخل آون با دمای ۵۵ درجه خشک گردیده و سپس در داخل ظروف پلاستیکی درب‌دار تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۵] برای جیره شاهد همه مراحل بدون افزودن اسپیرولینا و همیشه‌بهار انجام شد.

### اندازه‌گیری شاخص‌های رشد

اندازه طول و وزن ماهی‌ها برای ارزیابی عملکرد رشد، در آغاز و در پایان آزمایش ثبت شد. همچنین میانگین وزنی ماهی‌ها هر هفته یکبار به منظور تعیین میزان غذای مورد نیاز هر اکواریوم، اندازه‌گیری و مطابق با آن میزان غذای روزانه به میزان ۳ درصد وزن آنها محاسبه گردید. سپس پارامترهای رشد بر اساس فرمولهای مرجع سنجیده شدند [۱۶]. همچنین میزان تلفات در طی دوره برای محاسبه بقاء ثبت گردید.

$$BWI = (Bwf - Bwi) / Bwi \quad \text{درصد افزایش وزن بدن}$$

$Bwi$ : متوسط وزن اولیه در هر تانک       $Bwf$ : متوسط وزن نهایی در هر تانک.

$$S.G.R = (Lnwt - Lnwo) / t \times 100 \quad \text{ضریب رشد ویژه}$$

$Wo$ : میانگین بیوماس اولیه (گرم)       $Wt$ : میانگین بیوماس نهایی (گرم)       $T$ : تعداد روزهای پرورش.

$$FCR = F / (wt - wo) \quad \text{-ضریب تبدیل غذایی}$$

$F$ : مقدار غذای خشک مصرف شده توسط ماهی  $Wo$ : میانگین بیوماس اولیه (گرم)       $Wt$ : میانگین بیوماس نهایی (گرم).

$$CF = (Bw / TL3) \times 100 \quad \text{ضریب چاقی}$$

$Bw$ : میانگین وزن نهایی بدن بر حسب گرم       $TL$ : میانگین طول نهایی بر حسب سانتیمتر       $TF$ : کل خوراک مصرفی هر ماهی.

$$SUR = (FF / IF) \times 100 \quad \text{بقاء}$$

$FF$ : تعداد کل ماهی‌ها در پایان دوره       $IF$ : تعداد کل ماهی‌ها در اول دوره

اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی و آستاگزانتین

در پایان دوره آزمایش برای اندازه‌گیری لیزوزیم، پروتئین کل و  $IgM$  و مقدار آستاگزانتین دریافت گورخرماهی از هر تکرار بافت سه عدد ماهی هموزن‌نایز کرده و درون میکروتیوپ شماره‌گذاری شده، قرارداده و سپس با قرار دادن درون یخ خشک به آزمایشگاه جهت آنالیز منتقل شدند. اندازه‌گیری میزان پروتئین کل با روش بیوره [۹]، لیزوزیم به روش طیف سنجی [۱۷]، مقدار ایمونوگلوبولین  $IgM$  با استفاده از کدورت حاصل از اتصال ایمونوگلوبولین با آنتی‌بادی ضد آن [۳۹] و آستاگزانتین بر اساس روش  $Suhnel$  و همکاران (۲۰۰۹) [۳۸] انجام گردید.

### تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS 26.0 (IBM) استفاده شد. برای بررسی نرمال بودن داده‌ها از آزمون کولوموگروف اسمیرنوف و جهت بررسی همگنی واریانس‌ها از آزمون لون استفاده شد زمانی که داده‌ها واریانس همگن داشتند، از آنالیز واریانس یک‌طرفه برای ارزیابی تفاوت بین تیمارهای استفاده شد. برای تعیین تفاوت بین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. و در نهایت نتایج به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SE) بیان شدند.

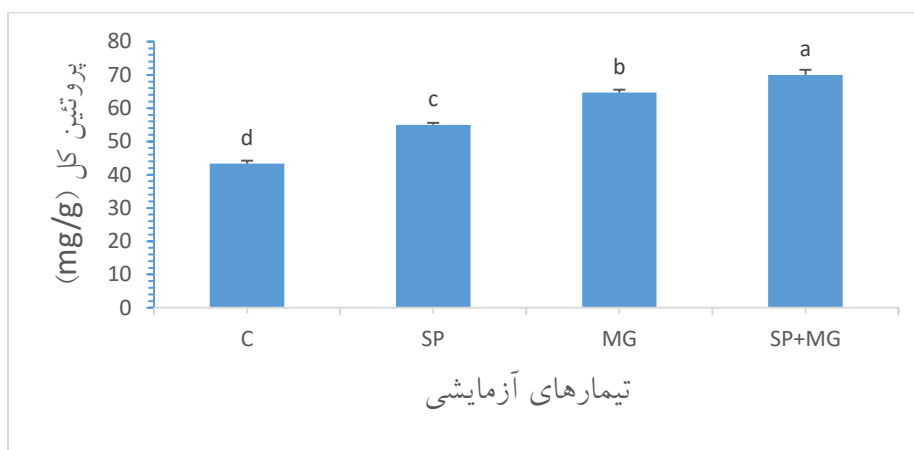
### نتایج

## شاخص‌های رشد

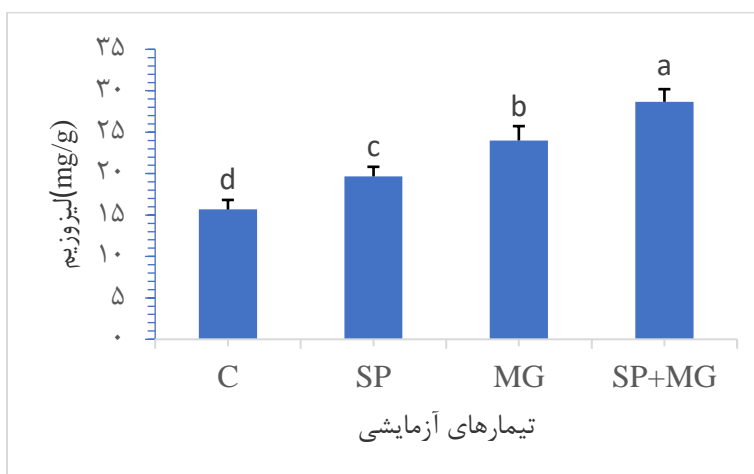
شاخص‌های رشد ماهیان گورخری تغذیه شده با تیمارهای مختلف در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که بین تیمارهای مختلف در شاخص‌های افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، رشد ویژه و بقاء اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0.05$ ). در مجموع نتایج نشان‌دهنده عدم تأثیر اسپیرولینا و همیشه‌بهار با مقادیر مورد آزمایش بر میزان رشد در گورخرماهی می‌باشد.

## شاخص‌های ایمنی

بر اساس نتایج بدست آمده در ارتباط با شاخص‌های ایمنی در بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان پروتئین کل و لیزوزیم بافت در ماهیان تغذیه شده با مکمل SP+MG و کمترین میزان در تیمار کنترل مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). همچنین مقدار این دو شاخص در تیمار MG به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار SP بود ( $P < 0.05$ ) (شکل ۱ و ۲). بنابراین نتایج نشان دادند که افزودن اسپیرولینا و همیشه‌بهار به تنهایی و به صورت ترکیب با یکدیگر بر میزان پروتئین کل و لیزوزیم در گورخر ماهی تأثیرگذار می‌باشند.

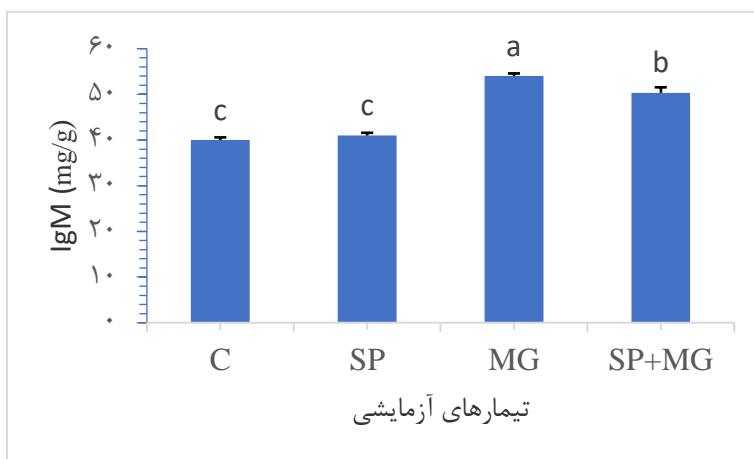


شکل ۱ تغییرات میزان پروتئین کل در بافت گورخر ماهی تحت تأثیر تغذیه با اسپیرولینا (SP)، همیشه‌بهار (MG) و ترکیب اسپیرولینا و همیشه‌بهار (SP+MG). حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در مقادیر شاخص مورد بررسی می‌باشد ( $P < 0.05$ ) (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد).



شکل ۲ تغییرات میزان لیوزیم در بافت گورخر ماهی برا تحت تأثیر تغذیه با اسپیرولینا (SP)، همیشه بهار (MG) و ترکیب اسپیرولینا و همیشه بهار (SP+MG). حروف مشابه بر روی ستون ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در مقادیر شاخص مورد بررسی می باشد ( $P < 0.05$ ) (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد).

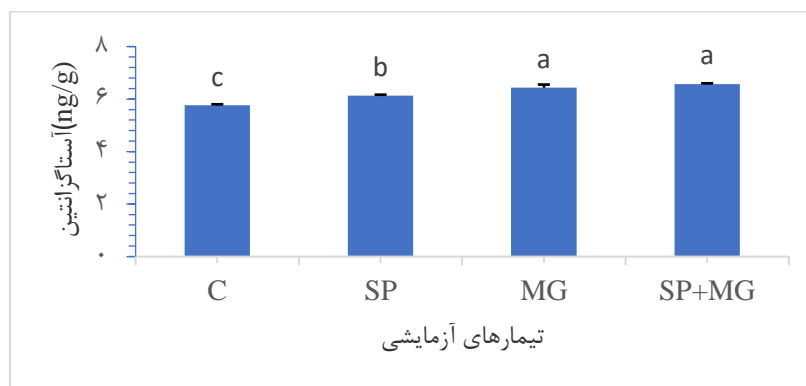
همچنین نتایج شاخص IgM در شکل ۳ نشان داده شده است. کمترین مقدار IgM ( $40 \text{ mg/g}$ ) در تیمار کنترل و SP مشاهده شد و بین این دو تیمار اختلاف معنی داری نبود ( $P < 0.05$ ). بیشترین میزان IgM بر اساس شکل ۳ در مقایسه با گروه کنترل و SP به ترتیب در تیمار MG ( $54 \text{ mg/g}$ ) و تیمار SP+MG ( $50/33 \text{ mg/g}$ ) مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳ تغییرات میزان IgM در بافت گورخر ماهی تحت تأثیر تغذیه با اسپیرولینا (SP)، همیشه بهار (MG) و ترکیب اسپیرولینا و همیشه بهار (SP+MG). حروف مشابه بر روی ستون ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در مقادیر شاخص مورد بررسی می باشد ( $P < 0.05$ ) (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد).

#### آستاگزانتین

روند تغییرات آستاگزانتین نشان دهنده اختلاف معنی دار بین تیمار کنترل با سایر تیمارهای آزمایشی بود ( $P < 0.05$ ). بر اساس نتایج به دست آمده کمترین میزان آستاگزانتین ( $5/77 \text{ ng/g}$ ) در تیمار کنترل مشاهده شد. در بین تیمارهای مختلف بیشترین میزان آستاگزانتین در تیمار MG و تیمار SP+MG مشاهده گردید. همچنین میزان آستاگزانتین اگرچه در تیمار اسپیرولینا نسبت به تیمار MG و تیمار SP+MG کمتر بود، اما به طور معنی داری در مقایسه با تیمار کنترل افزایش داشت ( $P < 0.05$ ).



شکل ۴ تغییرات میزان آستاگزانتین در بافت گورخر ماهی تحت تاثیر تغذیه با اسپیرولینا (SP)، همیشه بهار (MG) و ترکیب اسپیرولینا و همیشه بهار (SP+MG). حروف مشابه بر روی ستون‌ها نشان دهنده عدم اختلاف معنی دادر مقادیر شاخص مورد بررسی می‌باشد ( $P < 0.05$ ) (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد).

## بحث و نتیجه گیری

### شاخص‌های ایمنی

محتوی پروتئین کل سرم در آزمایشات تغذیه‌ای نشان دهنده وضعیت تغذیه‌ای و شاخص سوخت و ساز و فیزیولوژیک ماهی است [۴]، و به طور غیرمستقیم نشان دهنده سطح ایمنی غیراختصاصی در ماهی محسوب می‌شود [۲۸]. افزایش در پروتئین کل سرم، بر اثر استفاده از محرک‌های ایمنی گیاهی و کاهش پروتئین کل تحت تاثیر عوامل تغذیه‌ای و به دلیل رقیق شدن خون و اختلال در سوخت و ساز گزارش شده است [۴]. همچنین لیروزیم نیز از پارامتر مهمی در ایمنی در مهره‌داران و بی‌مهرگان است و میزان آن فاکتور مناسبی جهت ارزیابی توانایی ماهیان در بروز پاسخ‌های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس‌زا محسوب می‌شود. مقادیر این آنزیم در ماهیان مختلف حتی ماهیانی که از یک گونه می‌باشند با توجه به منطقه زیست آنها و نژادشان متغیر است [۴۲]. مواد محرک سیستم ایمنی موجب افزایش فعالیت لیروزیمی می‌شوند. این عمل در اثر افزایش تعداد فاگوسیت‌های ترشح کننده لیروزیم و یا افزایش مقدار لیروزیم سنتز شده در هر سلول است. میزان تغییر در فعالیت لیروزیمی به طور کلی تحت تاثیر توان و قدرت ماده محرکی است که ماهی در معرض آن قرار می‌گیرد [۴۲، ۳۴]. در مطالعه حاضر بیشترین میزان لیروزیم و پروتئین کل به ترتیب در تیمارهای MG+SP، MG و SP مشاهده شد.

در راستای نتایج به دست آمده صادقی گوگری و همکاران (۱۴۰۰) [۴] اثر لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا را به تنهایی و به صورت ترکیبی بر عملکرد رشد و ایمنی جنس ماده گورخر ماهی بررسی کردند. در مطالعه آنها بین پروتئین لاشه تیمار اسپیرولینا و کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. اما میزان لیروزیم در تیمار اسپیرولینا در مقایسه با کنترل افزایش نشان داد. همچنین مطالعات Mohammadiazarm و همکاران (۲۰۲۰) [۲۹] بر ماهی اسکار، M. Al-Zayat (۲۰۱۹) [۲۴] بر ماهی نیل تیلاپیا، Yu و همکاران (۲۰۱۸) [۴۳] بر ماهی هامور مرجانی، Adel و همکاران (۲۰۱۶) [۷] بر روی ماهی خاویاری و Amer (۲۰۱۶) [۸] بر ماهی نیل تیلاپیا نشان دهنده افزایش پروتئین و در بیشتر موارد لیروزیم در اثر افزودن اسپیرولینا در جیره بودند. اطلاعات کافی در ارتباط با اثر گل همیشه بهار بر شاخص‌های پروتئین کل و لیروزیم یافت نشد. از دیگر شاخص‌های ایمنی بررسی شده در این مطالعه IgM بود. ایمونوگلوبولین‌ها از اجزای اصلی پاسخ ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا هستند. از جمله مکانیسم‌های ایمنی هومورال با واسطه IGها، حذف عوامل بیماری‌زا از طریق فاگوسیتوز، خنثی‌سازی توکسین و ویروس، و فعال‌سازی سیستم کمپلمان است. در ماهی‌های استخوانی، سه ایزوتیپ IG توسط سلول‌های B تولید می‌شود: IgM، IgD و IgT/Z. غالب و قدیمی‌ترین ایمونوگلوبولین در ماهی، ترامر کلاس IgM است که به عنوان غالب‌ترین IG در سرم ماهی در نظر گرفته می‌شود [۳۰]. مطالعات بسیار کمی در ارتباط با بررسی اثر گل همیشه بهار بر ایمونوگلوبولین‌ها موجود می‌باشد. در مورد اثر اسپیرولینا، Yu و همکاران (۲۰۱۹) [۴۳] در ماهی هامور مرجانی و ثابت‌مند و همکاران (۱۴۰۰) [۳]، انصاری فرد و همکاران (۱۳۹۶) [۱] در ماهی کپور افزایش ایمونوگلوبولین را در تیمارهای تغذیه شده با اسپیرولینا گزارش کردند. در تحقیق حاضر در تیمار اسپیرولینا به تنهایی تفاوت معنی‌داری در مقایسه با کنترل دیده نشد، که با نتایج Amer (۲۰۱۶) [۸] مطابقت داشت.

در نهایت نتایج حاصل از مطالعه اخیر نشان می‌دهد که افزودن اسپیرولینا و گل همیشه بهار در جیره ماهی گورخری هر کدام به تنهایی و همچنین بصورت ترکیبی بر سیستم ایمنی اثر مثبت دارد و ترکیب آنها با یکدیگر بیشتر موثر است و همچنین MG در مقایسه با اسپیرولینا عملکرد بهتری

را بر سیستم ایمنی نشان می‌دهد. که این اثر مثبت می‌تواند در ارتباط با ترکیبات زیست فعال موجود در آنها باشد که بر سیستم آنتی‌اکسیدانی اثر گذاشته و در نهایت باعث ارتقاء سیستم ایمنی می‌گردد.

### آستاگزانتین

پس از تغذیه با تیمارهای آزمایشی بیشترین مقدار آستاگزانتین در بافت ماهی گورخری تغذیه شده با گل همیشه‌بهار و ترکیب اسپیرولینا و گل همیشه‌بهار مشاهده گردید ( $P < 0.05$ ). همچنین میزان آستاگزانتین در بافت ماهیان تغذیه شده با اسپیرولینا در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌داری بیشتر بود ( $P < 0.05$ ).

نتایج این بخش از مطالعه حاضر هم‌راستا با نتایج حاصل از مطالعات Aprilia و همکاران (۲۰۲۱) [۱۰]، Unprasert و Boonyaratpalin (۱۹۸۹) [۱۴]، Tao Ren و همکاران (۲۰۲۱) [۴۰]، Jorjani و همکاران (۲۰۱۸) [۲۱]، Pailan، همکاران (۲۰۱۵) [۳۱] و Awasthi و همکاران (۲۰۱۴) [۱۱] در بررسی اثر گل همیشه‌بهار و اسپیرولینا بر رنگ‌پذیری بود. همچنین بر اساس نتایج به‌دست‌آمده افزودن گل همیشه‌بهار در جیره ماهیان تأثیر بیشتری بر مقدار آستاگزانتین داشت. نتایج حاصل از افزایش آستاگزانتین با نتایج ایمنی همچون افزایش لیروزیم، پروتئین و IgM بافت هم‌راستا می‌باشد و می‌توان این تاثیر مثبت بر ایمنی را به افزایش آستاگزانتین که خود یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی می‌باشد نسبت داد. زیرا آستاگزانتین مهم‌ترین رنگدانه کاروتنوئیدی موجود در موجودات آبی است [۲۳]. و برخی عملکردهای زیستی از جمله جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع ضروری، محافظت در برابر اثرات منفی اشعه ماوراء بنفش، شاخص‌های ایمنی و تولیدمثل را کنترل می‌کند [۱۹].

### شاخص‌های رشد

رشد و بقا از شاخص‌های مهم در آبی‌پروری به شمار می‌آید [۲۷] و میزان آن در ارتباط مستقیم با خوراک و مکمل‌هایی است که مصرف می‌شود [۱۰]. نتایج مطالعه حاضر اگرچه نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌داری شاخص‌های رشد و بقا در تیمارهای اسپیرولینا و همیشه‌بهار با کنترل بود اما هیچگونه اثر منفی بر رشد را نیز نشان نداد. بر خلاف نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر Li و همکاران (۲۰۲۲) [۲۲] گزارش کردند که، افزودن اسپیرولینا به رژیم غذایی آبزیان به طور قابل توجهی وزن نهایی، سرعت رشد ویژه، ضریب تبدیل پروتئین و ضریب تبدیل غذایی را در آبزیان بهبود میبخشد. اما تأثیر معنی‌داری بر ضریب چاقی ندارد. همچنین نتایج مشابهی از اثر مثبت اسپیرولینا بر رشد در ماهی گویی [۱۳]، ماهی کپور زرد [۴۰]، ماهی اسکار [۲۹]، ماهی نیل تیلاپیا [۲۴]، ماهی هامور مرجانی [۴۳] گزارش شده است. هرچند که در مطالعه‌ای به عدم تأثیر اسپیرولینا بر رشد اذعان شده است [۱۴]، که علت آن را افزایش عوامل ضد تغذیه‌ای در اثر تغذیه با اسپیرولینا دانسته‌اند [۲۹].

در مطالعه‌ای که Jorjani و همکاران (۲۰۱۸) [۲۱] در ارتباط با اثرات سطوح مختلف گل همیشه‌بهار به میزان ۰ (شاهد)، ۰/۵ درصد، ۱/۵ درصد و ۲/۵ درصد بر روی عملکرد رشد گورامی آبی انجام دادند، در عملکرد رشد ماهی و ترکیبات بدن تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند. همچنین نتایج مشابهی در سایر ماهیان در ارتباط با اثر همیشه‌بهار بر رشد گزارش شده است [۳۱] و [۶]. که این نتایج با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مطابقت داشت، همچنین Unprasert و Boonyaratpalin (۱۹۸۹) [۱۴] بیان کردند که پودر گلبرگ همیشه‌بهار ارزش غذایی محدودی دارد و تنها به عنوان منبع رنگدانه عمل می‌کند. در مطالعه دیگری که در خصوص اثر ترکیبی اسپیرولینا و همیشه‌بهار بر روی رشد و بقا انجام شده افزودن ۴ درصد آرد اسپیرولینا و ۰/۶ درصد پودر گل همیشه‌بهار را بر افزایش رشد و بقا موثر دانسته است - [۱۰]. محققین بیان کرده‌اند که افزایش رشد حاصل از اسپیرولینا و همیشه‌بهار می‌تواند در ارتباط با پروتئین، اسید آمینه و اسید چرب ضروری آن و وجود ترکیبات زیست فعال از جمله رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در آنها باشد که اثر آنتی‌اکسیدانی آن ایمنی را افزایش داده و در نهایت منجر به افزایش بیشتر رشد می‌گردند [۲۲، ۲۵، ۳۲].

## نتیجه گیری نهایی

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه نشان دهنده تاثیر مثبت اسپیرولینا (SP)، پودر گل همیشه بهار (MG) و ترکیب پودر اسپیرولینا و همیشه بهار (SP+MG) بر ایمنی و رنگ پذیری ماهی گورخری می باشد. مخصوصاً گل همیشه بهار و تیمار ترکیبی اسپیرولینا و همیشه بهار که عملکرد بهتری را از خود نشان داد. ترکیب اسپیرولینا با گل همیشه بهار و یا گل همیشه بهار به تنهایی به عنوان یک ترکیب نسبتاً ارزان می تواند گزینه خوبی در جیره غذایی گورخر ماهی برای ارتقاء ایمنی باشند. همچنین جایگزین مناسبی برای رنگ‌پذیری ماهیان زینتی به جای استفاده از ترکیبات گران قیمتی همچون آستاگزانتین‌های مصنوعی در جیره خواهد بود. هرچند که برای اظهار نظر دقیق‌تر نیازمند آزمایشات بیشتر بر سایر گونه‌های ماهیان زینتی می باشد.

تشکر و قدردانی:

نویسندگان از مجموعه مدیریتی آزمایشگاه های دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس در فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام مطالعه حاضر قدردانی می نمایند  
تعارض منافع :  
مطالعه حاضر فاقد تعارض منافع می باشد

## منابع :

- انصاری فرد، فاطمه، رجبی اسلامی، هومن، شمسایی مهرجان، مهدی & سلطانی، مهدی. (۱۳۹۶). تاثیر مکمل غذایی اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) بر سیستم ایمنی و فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی (*Cyprinus carpio*) مجله علمی شیلات ایران، ۲۶ (۳): ۲۳-۳۲
- بیرانوند، مجید، قانعی، منصوره & ولایت زاده، محمد. (۱۳۹۴). تاثیر مکمل جلبک اسپیرولینا (*Spirulina sp.*) بر رشد و تغذیه ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio* Hamilton, 1822)، یافته های نوین در علوم زیستی، ۲ (۳): ۲۰۷-۲۱۵
- ثابت مند، حسین، فغانی لنگرودی، حمید، زمینی، عباسعلی، & تیزکار، بابک. (۱۴۰۰). تاثیر ریزجلبک اسپیرولینا (*Spirulina sp.*) و اسید سیتریک بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). تغذیه آبزیان، ۷ (۴): ۸۱-۹۴. doi:۲۰۲۲.۲۲۱۲۶.۱۱۶۶/janb.۱۰.۲۲۱۲۴
- صادقی گوگری، سانار، پیکان حیرتی، فاطمه، & درافشان، سالار. (۱۴۰۰). تاثیر مکمل غذایی لاکتوفرین و پودر جلبک اسپیرولینا بر شاخص‌های رشد و ایمنی جنس ماده ماهی گورخری (*Danio rerio*). تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، ۳۳ (۳): ۱۲۱-۱۲۸. doi:۲۰۲۰.۳۴۳۰۸۱.۱۷۲۶/vj.۱۰.۲۲۰۹۲.۱۲۸
- لطفی، کسری، حسینی شکرابی، سید پژمان، & شمسایی مهرجان، مهدی. (۱۳۹۹). اثر افزودنی پودر فلفل پاپریکا (*Capsicum annum*) بر عملکرد رشد و برخی فاکتورهای ایمنی ماهی زبرا (*Danio rerio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹ (۵): ۶۷-۷۸. doi:۲۰۲۱.۱۲۳۱۶۳/isfj.۱۰.۲۲۰۹۲
- مجد محمدی، سیده حمیده، منوچهری، حامد، محمدی زاده، مهسا & صمد درویشی، خسرو. (۱۳۹۲). اثر عصاره گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) بر ویژگی‌های ایمنی و برخی فاکتورهای خونی ماهی قرمز (*Carassius auratus*)، نشریه تحقیقات منابع طبیعی تجدید شونده، ۴ (۴): ۱-۱۳.
- Adel, M., Yeganeh, S., Dadar, M., Sakai, M. and Dawood, M. A., 2016. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, humoral and mucosal immune responses and disease resistance in juvenile great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1754). *Fish & shellfish immunology*, 56, 436-444. DOI: 10.1016/j.fsi.2016.08.003



8. Amer, S. A., 2016. Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Benha veterinary medical journal, 30(1), 1-10. <http://www.bvmj.bu.edu.eg>
9. Annino, J.S. and R.W. Giese., 1976. Determination of Total Proteins and Albumins in Serum. Clinichem. Principles and Procedures, 4th edition, Little Brown & Company, Boston, Toronto, 188p. p.
10. Aprilia, A. D., Lili, W., Astuty, S. and Grandiosa, R., 2021. The Effect of Addition of Combination of Spirulina Flour and Marigold Flower Meal on Increasing Color Intensity of Swordtail Fish (*Xiphophorus helleri* Heckel, 1848). World Scientific News 160, 217-231.
11. Awasthi, M., Kashyap, A. and Serajuddin, M., 2014. Effect of plant meal as a carotenoid source on the development of pigmentation in Dwarf Gourami, *Colisa lalia* (Hamilton, 1822). Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 84, 1031-1034. Doi:10.1007/s40011-013-0274-7
12. Bano, F., Kashyap, A. and Serajuddin, M., 2020. Effects of different dietary supplementation of plant carotenoids on growth, coloration and behaviour of giant gourami, *Trichogaster fasciata* (Bloch and Schneider, 1801). Iranian Journal of Fisheries Sciences, 19(6), 2770-2789. DOI: 10.22092/ijfs.2020.122739
13. Bisht, M., Kumar, A. and Shah, T. K., 2022. Effect of Spirulina Powder (*Arthrospira platensis*) as a Dietary Additives Ornamental Guppy, *Poecilia Reticulata*: Growth Performance, Survival and Skin Colouration. Aquaculture Studies, 23(2). Doi:10.4194/AQUAST931
14. Boonyaratpalin, M. and Unprasert, N., 1989. Effects of pigments from different sources on colour changes and growth of red *Oreochromis niloticus*. Aquaculture, 79(1-4), 375-380. Doi:10.1016/0044-8486(89)90479-1
15. Briggs, J. P., 2002. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 282(1), R3-R9. Doi:10.1152/ajpregu.00589.2001
16. Desilva, S. D., Anderson, T. A. and Sargent, J. R., 1995. Fish nutrition in aquaculture. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 5(4), 472-473.
17. Ellis, A. E. 1990. Immunity to bacteria in fish. Fish & Shellfish Immunology 9: 291-308.
18. Ezhil, J., Jeyanthi, C. & Narayanan, M., 2008. Marigold as a carotenoid source on pigmentation and growth of red swordtail, *Xiphophorus helleri*. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 8(1), 99-101.
19. Hamrang Omshi, A., Bahri, A., Khara, H. and Mohammadzadeh, F., 2019. The effects of lucantin red, yellow and astaxanthin on growth, hematological, immunological parameters and coloration in the Tiger Oscar (*Astronotus ocellatus* Agassiz, 1831). Iranian Journal of Fisheries Sciences ۱۳ (۴) ۱۸. DOI: 10.22092/ijfs.2019.118801
20. Hoseinifar, S. H., Maradonna, F., Faheem, M., Harikrishnan, R., Devi, G., Ringø, E. & Carnevali, O. 2023. Sustainable Ornamental Fish Aquaculture: The Implication of Microbial Feed Additives. Animals, 13(10), 1583. DOI: 10.3390/ani13101583
21. Jorjani, M., Sharif Rohani, M., Mirhashemi Rostami, A., Ako, H. and Tan Shau Hwai, A., 2019. Pigmentation and growth performance in the blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, fed marigold, Calendula officinalis, powder, a natural carotenoid source. Journal of the World Aquaculture Society, 50(4), 789-799. DOI: 10.1111/jwas.12562
22. Li, L., Liu, H. and Zhang, P., 2022. Effect of spirulina meal supplementation on growth performance and feed utilization in fish and shrimp: a meta-analysis. Aquaculture Nutrition, 2022. Doi:10.1155/2022/8517733
23. Lim, K. C., Yusoff, F. M., Shariff, M. and Kamarudin, M. S., 2018. Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. Reviews in aquaculture, 10(3), 738-773. Doi:10.1111/raq.12200
24. M Al-Zayat, A., 2019. Effect of various levels of Spirulina (*Arthrospira platensis*) as feed supplement on growth performance, feed utilization, immune response and hematology of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries, 23(3), 361-370. DOI: 10.21608/EJABF.2019.54036

25. Maulana, M. R., Junaidi, M. and Setyono, B. D. H., 2021. Combination of Pumpkin Flour (*Cucurbita moschata* D.) and Carrot Flour (*Daucus carota* L.) on The Brightness Color of Koi Fish (*Cyprinus carpio*). *Jurnal Biologi Tropis*, 21(1), 81-88. DOI: 10.29303/jbt.v21i1.2403
26. Meyers, J. R., 2018. Zebrafish: development of a vertebrate model organism. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 16(1), e19.
27. Minabi, K., Sourinejad, I., Alizadeh, M., Ghatrami, E. R. and Khanjani, M. H., 2020. Effects of different carbon to nitrogen ratios in the biofloc system on water quality, growth, and body composition of common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. *Aquaculture International*, 28(5), 1883-1898. Doi: 10.1007/s10499-020-00564-7
28. Ming, J., Xie, J., Xu, P., Ge, X., Liu, W. and Ye, J. 2012. Effects of emodin and vitamin C on growth performance, biochemical parameters and HSP70s mRNA expression of wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih) under high temperature stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 32: 651-661. Doi: 10.1016/j.fsi.2012.01.008
29. Mohammadiazarm, H., Maniat, M., Ghorbanijezeh, K. and 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(1), 252-260. Doi:10.1111/anu.13182
30. Mokhtar, D. M., Zacccone, G., Alesci, A., Kuciel, M., Hussein, M. T. and Sayed, R. K., 2023. Main Components of Fish Immunity: An Overview of the Fish Immune System. *Fishes*, 8(2), 93. Doi: 10.3390/fishes8020093
31. Pailan, G. H., Sardar, P. and Mahapatra, B. K., 2015. Marigold petal meal: a natural carotenoid source for pigmentation in swordtail (*Xiphophorus helleri*). *Animal Nutrition and Feed Technology*, 15(3), 417-425. Doi: 10.5958/0974-181X.2015.00042.6
32. Rosas, V. T., Poersch, L. H., Romano, L. A. and Tesser, M. B., 2019. Feasibility of the use of Spirulina in aquaculture diets. *Reviews in Aquaculture*, 11(4), 1367-1378. Doi:10.1111/raq.12297
33. Sabetmand, H., Faghani Langerudi, H., Zamini, A. and Tizkar, B., 2021. Effects of Spirulina microalgae (*Spirulina* sp.) and acidifier citric acid on the hematological and immune indices in common carp fry, *Cyprinus carpio*. *Aquatic Animals Nutrition*, 7(4), 81-94. Doi: 10.22124/janb.2022.22126.1166
34. Saurabh, S. and Sahoo, P. K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture research*, 39(3), 223-239. Doi:10.1111/j.1365-2109.2007. 01883.x
35. Saxby, A., Adams, L., Snellgrove, D., Wilson, R. W. and Sloman, K. A., 2010. The effect of group size on the behaviour and welfare of four fish species commonly kept in home aquaria. *Applied Animal Behaviour Science*, 125(3-4), 195-205. Doi: 10.1016/j.applanim.2010.04.008
36. Sharma, S. and Kumari, K., 2021. An overview on *Calendula officinalis* Linn. :(Pot Marigold). *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(03 Suppl 2), 13-18. Doi:10.55218/JASR.s2202112302
37. Stevens, C. H., Croft, D. P., Paull, G. C. and Tyler, C. R., 2017. Stress and welfare in ornamental fishes: what can be learned from aquaculture? *Journal of fish biology*, 91(2), 409-428. Doi:10.1111/jfb.13377
38. Suhnel, S., Lagreze, F., Ferreira, J. F., Campestrini, L. H. and Maraschin, M., 2009. Carotenoid extraction from the gonad of the scallop *Nodipecten nodosus* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia: Pectinidae). *Brazilian Journal of Biology*, 69, 209-215. Doi:10.1590/S1519-69842009000100028
39. Tang, H.G., Wu, T.X., Zhao, Z.Y. and Pan, X.D., 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). *Journal of Zhejiang University Science*, 9:684-690. Doi:10.1631/jzus. B0820088
40. Tao Ren, H., jing Zhao, X., Huang, Y. and li Xiong, J., 2021. Combined effect of Spirulina and ferrous fumarate on growth parameters, pigmentation, digestive enzyme activity, antioxidant enzyme activity and fatty acids composition of Yellow River carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Reports*, 21, 100776. Doi: 10.1016/j.aqrep.2021.100776
41. Tlustý, M., 2002. The benefits and risks of aquacultural production for the aquarium trade. *Aquaculture*, 205(3-4), 203-219. Doi: 10.1016/S0044-8486(01)00683-4

42. Verlhac, V., Gabaudan, J., Obach, A., Schuep, W. and Hole, R., 1995. Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143:123-133. Doi: 10.1016/0044-8486(95)01238-9
43. Yu, W., Wen, G., Lin, H., Yang, Y., Huang, X., Zhou, C. and Li, T., 2018. Effects of dietary *Spirulina platensis* on growth performance, hematological and serum biochemical parameters, hepatic antioxidant status, immune responses and disease resistance of Coral trout *Plectropomus leopardus* (Lacepede, 1802). *Fish & shellfish immunology*, 74, 649-655. Doi: 10.1016/j.fsi.2018.01.024
44. Zhang, F., Man, Y. B., Mo, W. Y. and Wong, M. H., 2019. Application of *Spirulina* in aquaculture: A review on wastewater treatment and fish growth. *Reviews in Aquaculture*, 1–18. Doi:10.1111/raq.12341

## Investigating the effect of Spirulina and Marigold on Growth Indicators, Immunity and Astaxanthin Content in Zebrafish (*Danio rerio*) Tissue

Omol Banin Salary<sup>1</sup>, Flora Mohammadizadeh<sup>2\*</sup>, Amirhoushang Bahri<sup>2</sup>, Alireza Salarzadeh<sup>2</sup>, Maziar Yahyavi<sup>2</sup>

1-Department of Fisheries, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.

2-Department of Fisheries, Marine and Fisheries Technologies Research Center, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran .

### ABSTRACT

In this study, the impact of marigold and spirulina, both in isolation and in conjunction with one another, was analyzed on several indicators relating to growth, immunity, survival, and levels of astaxanthin present in zebrafish tissue. 120 zebrafish were randomly allocated to 10 litre aquariums across four different treatment groups (with three replications in each group, each containing 30 fish). The control diet is based on the basic diet, the second treatment diet contains 25 g/kg of spirulina powder (SP) on the basic diet, the third treatment diet contains 25 g/kg of marigold powder (MG) on the basic diet, and the fourth treatment diet It also contains 25 grams of marigold powder (MG) and 25 grams of spirulina (SP+MG)/kg of the basic feed. At the end of the experiment, some immune indicators and astaxanthin were checked in the tissue. The results of this study show the significant effect of spirulina (SP), marigold powder (MG), and the combination of spirulina and marigold powder (SP+MG) on immunity, and astaxanthin. Especially the marigold and the combined treatment of spirulina and marigold showed better performance ( $P<0.05$ ). respectively, SP+MG and MG treatment significantly increased total protein, lysozyme, and astaxanthin in fish tissue, and the highest amount of IgM was observed in MG treatment ( $P<0.05$ ). However, no significant difference was observed in relation to growth and survival.

**KEYWORDS:** Tissue, Spirulina, Marigold, Lysozyme, Astaxanthin.

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 12 oct 2023

Accepted: 4 Feb 2024

ePublished: 20 Feb  
2024

\* Corresponding Author:

Email address: [fmohammadi13@gmail.com](mailto:fmohammadi13@gmail.com)

Tel: 09122270779

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513