بررسی اثر سطوح مختلف رنگدانه آستاگزانتین در جیره غذایی بر برخی شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی غیر اختصاصی میگوی جوان پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با تنش کاهش شدید اکسیژن

مهرداد فرهنگی*[1]، سمیه احمدی[1]، غلامرضا رفیعی[1]، بابک قاعدنیا[2]، دلارام تقوی[3]

۱. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲. پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر
۳. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان

چکیده

از افزودنی های غذایی متنوعی به منظور افزایش توان ایمنی موجودات استفاده می گردد. در این پژوهش تاثیر استفاده ازسطوح مختلف رنگدانه آستاگزانتین در جیره بر برخی شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی میگوهای جوان پا سفید (*Litopenaeus vannamei*)، مورد بررسی قرار گرفت. آستاگزانتین در چهار سطح ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم به جیره اضافه گردید که بترتیب با عنوان جیره های شماره ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده اند. در طی دوره پرورش، میزان دما (۲ ± ۲۸ درجه سانتیگراد)، اکسیژن محلول (۰/۰۵ ± ۷ میلی در لیتر)، شوری (۱ ± ۴۱ قسمت در هزار) و pH(8/1±0/02) آب محیط پرورش ثبت شد. در پایان دوره پرورش، میگوها در معرض تنش کمبود اکسیژن (کاهش اکسیژن از ۷ به ۱ میلی گرم در لیتر طی ۱۴ ساعت) قرارگرفتند. نتایج موید تفاوت معنی دار شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی در تیمارهای ۳ و ۴ در مقایسه با تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵). بیشترین تعداد هموسیت کل، سلول های هیالینی، سلول های گرانولار کوچک به ترتیب ۳/۳۸ ± ۱۰۵× ۱۳۳/۱۳، ۴/۰۸ ± ۱۰۵× ۸۵/۸۳ و ۱/۰۰ ± ۱۰۵× ۳۰/۳۳ (سلول در میلی لیتر) و فعالیت فاگوسیتوزی ۰/۵۱ ± ۱۶/۶۷ (درصد) و پروتئین پلاسما ۱/۲۴ ± ۱۱۴/۶۲ (میلی گرم در لیتر) در تیمار ۳ و بیشترین سلول¬های گرانولار ۱/۶۵ ±۵ ۱۰× ۱۶/۸ (سلول در میلی لیتر) و گلوکز ۰/۲۳ ± ۱۸/۰۶ (میلی گرم در دسی لیتر) در تیمار ۴ مشاهده شد (P<۰/۰۵). به طورکلی جیره های ۳ و ۴ بیشترین تاثیر را بر شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی غیراختصاصی در میگوهای جوان بر جای گذاشتند.

واژگان کلیدی: میگوی پا سفید، *Litopenaeus vannamei*، آستاگزانتین، تنش شدید کمبود اکسیژن، شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی غیر اختصاصی.

* نویسنده مسوول، پست الکترونیک: medfarhangi@hotmail.com

۱. مقدمه

میگوی پا سفید یکی از گونه های تجاری مهم از گونه های پرورشی پنائیده محسوب می شود (Wyban and Sweeney, 1991). برای دستیابی به موفقیت در پرورش میگو باید به عوامل زیادی توجه داشت. در بسیاری از کشورها، عفونت های باکتریایی و ویروسی، ضررهای جبران ناپذیری را در تولید میگوهای پنائیده وارد کرده است. بیماری های میگو نتیجه ارتباطی پیچیده بین میگو، عامل بیماری زا و محیط زیست می باشد (Lightner and Redman, 1998). تغییرات محیطی باعث ایجاد شرایط تنش زا شده و آسیب پذیری میگو را نسبت به فلور طبیعی باکتریایی در آب شور افزایش می‌دهد (Lee and Wickins, 1992) مجموعه عوامل ایجاد شده باعث کاهش توانایی سیستم ایمنی سخت پوستان می گردد (Moullac and Haffner, 2000). سخت پوستان و بخصوص میگوهای پرورشی به طور مداوم در معرض تغییرات آب و هوایی و فعالیت های پرورشی قرار می گیرند که بر کیفیت فیزیکو- شیمیایی آب اثر می گذارند. تغییرات فیزیکو- شیمیایی آب دریا نیز متابولیسم، رشد، پوست اندازی و بقا میگوها را تحت تاثیر قرار داده (Chen *et al*., 1995) و در نهایت بر سیستم ایمنی اثر می گذارند (Moullac and Haffner, 2000). یکی از این عوامل، کاهش میزان اکسیژن محلول در آب است که فعالیت های متابولیکی را مختل، رشد و دفعات پوست اندازی را کاهش (Allan and Maguire, 1991) و در نهایت باعث مرگ و میر می شود (Madenjian *et al*., 1987). شواهد قابل ملاحظه ای وجود دارد که ارتباط بین تنش و کاهش توان سیستم ایمنی و بیماری را نشان می دهند (Mercier *et al*., 2006). آثار تنش ناشی از کمبود اکسیژن بر توانایی ایمنی سخت پوستان و بخصوص میگوها به اثبات رسیده است (Le Moullac *et al*., 1998). وضعیت تغذیه ای یکی از عوامل موثر بر توانایی موجود در مقابله با عوامل بیماریزا محسوب می شود. کاروتنوئیدها به عنوان آنتی کسیدانت‌های طبیعی نقش مهمی در سلامت موجودات از طریق خنثی سازی رادیکال‌های آزاد تولیدی ناشی از فعالیت طبیعی سلول ها و استرس های محیطی وارد بر آن ها ایفاء می‌کنند (Chew, 1995). آستاگزانتین، مهم ترین رنگدانه کاروتنوئیدی موجود در حیوانات آبزی است (Christiansen and Torrissen, 1997; Guerin *et al*., 2003). این رنگدانه یک ریز مغذی اصلی و مهم در جیره غذایی آبزیان محسوب می شود که عملکردهای زیستی مهمی از جمله جلوگیری از اکسید شدن اسیدهای چرب ضروری غیر اشباع را به عهده دارد. فعالیت آنتی اکسیدانتی آستاگزانتین تقریباً به ترتیب ۱۰ و۱۰۰ برابر بیشتر از بتاکاروتن و آلفا توکوفرول است (Shimidzu *et al*., 1996). آستاگزانتین همچنین حفاظت از اثرات منفی نور ماوراء بنفش، تولید ویتامین A، خاصیت رنگدهی زیستی، رشد و بازماندگی، بهبود رفتارهای تولید مثلی و سیستم ایمنی را کنترل می کند (Torrissen *et al*., 1989; Lorenz and Cysewski, 2000, Higuera-Ciapara *et al*., 2006, Hussein *et al*., 2006، احمدی و همکاران، ۱۳۸۷). پستانداران و بیشتر ماهیان قادر به سنتز کاروتنوئیدهای مورد نیاز خود نیستند و سخت پوستان نیز توانایی محدودی در تبدیل سایر رنگدانه ها به آستاگزانتین دارند. بنابر این، بهتر است که این رنگدانه به طور مستقیم در جیره غذایی آبزیان وارد شود (Meyers, 1977; Guerin *et al*., 2003).

مطالعات انجام شده در رابطه با اثر آستاگزانتین بر افزایش ایمنی میگوی پا سفید در برابر تنش های فیزیکوشیمیایی بخصوص کمبود اکسیژن، بسیار اندک است. در این پروژه سعی بر آن است تا اثر استفاده از سطوح مختلف آستاگزانتین در جیره غذایی بر برخی از شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی غیر اختصاصی میگوی جوان پا سفید در مواجهه با تنش شدید کاهش اکسیژن مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش ها

تهیه جیره ها: از جیره غذایی تجاری ۴۰۰۶ به عنوان جیره پایه برای تیمار شاهد استفاده شد. این جیره از شرکت هووراش بوشهر تهیه گردید. سپس برای تهیه چهار نوع جیره غذایی، آستگزانتین در غلظت های ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم در کیلوگرم به جیره غذایی پایه اضافه شد. روش تهیه جیره بدین صورت بود که برای حل کردن آستاگزانتین، در هر سه نوع جیره از مقادیر یکسان ۷۵ میلی لیتر امولسی فایر (Tween 80) استفاده به عمل آمد. ابتدا آستاگزانتین مورد نیاز را بر حسب سطوح تعیین شده، محاسبه و سپس به امولسی فایر اضافه کرده و پس از بهم زدن، ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر گرم نیز به آن افزوده شد تا آستاگزانتین حل شود. به منظور یکسان بودن جیره ها، به جیره غذایی شاهد نیز ۷۵ میلی لیتر امولسی فایر و ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. سپس محلول های آماده شده به جیره ها اسپری شدند. پس از ۴۸ ساعت جیره ها خشک (Merchie *et al.*, 1998)، جمع آوری و بطور جداگانه در نایلون های شماره گذاری شده بسته بندی و در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از تهیه جیره های غذایی، نمونه برداری از آن ها با استفاده از روش استاندارد صورت گرفت (Lichon, 1996) و سپس میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین خام، چربی خام و انرژی خام آنها تعیین شد (Petterson *et al.*, 1999) (جدول ۱).

جدول ۱. تجزیه تقریبی جیره های آزمایشی (میانگین± خطای استاندارد)

شماره جیره	رطوبت (٪)	خاکستر (٪)	پروتئین خام (٪)	چربی خام (٪)	انرژی خام کیلو کالری بر کیلوگرم
۱	۸/۱۲±۰/۴۱	۱۷/۳۲±۰/۱۴	۳۹/۳۵±۰/۰۱	۹/۰۳±۰/۰۷	۴/۳۸±۰/۰۱
۲	۷/۳۱±۰/۵۱	۱۸/۲۳±۰/۱۲	۳۹/۳±۰/۰۲	۸/۴۵±۰/۱	۴/۴۰±۰/۰۰۵
۳	۸/۲±۰/۳۹	۱۷/۵۵±۰/۱۵	۳۹/۵±۰/۰۱	۸/۸۹±۰/۰۲	۴/۴۳±۰/۰۱
۴	۷/۵۴±۰/۴۵	۱۸/۴۶±۰/۱۳	۳۹/۲۳±۰/۰۱	۸/۹۹±۰/۰۱	۴/۳۸±۰/۰۱

اجرای آزمایش: میگوهای ماده جوان با میانگین وزن ۱۷/۳۹±۰/۰۴ گرم از استخرهای پرورشی خاکی منطقه حله به پژوهشکده میگوی بوشهر منتقل شدند. آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار و ۳ تکرار اجرا شد. در ادامه ۶۰ میگوی پا سفید غربی ماده جوان در ۱۲ مخزن پلاستیکی با تراکم ۵ قطعه در ۱۰۰ لیتر آب پرورش یافتند. آب مورد نیاز از دریا تامین و پس از عبور از فیلتر شنی به مخازن انتقال داده شد. میزان تعویض روزانه آب برای حفظ کیفیت آب ۵۰ درصد بود. هوادهی هر مخزن با دو سنگ هوا انجام می شد که به هواده های مرکزی متصل بودند. دوره نوری نیز متاثر از شرایط نور طبیعی بود. به منظور فراهم آوردن شرایط یکنواخت در طی دوره پرورش، از میان پیراسنجه های فیزیکو- شیمیایی آب، دما (۲ ± ۲۸ درجه سانتیگراد)، اکسیژن محلول (۰/۰۵ ± ۷ میلی گرم در لیتر)، شوری (۱ ± ۴۱ قسمت در هزار) و pH (۰/۰۲ ± ۸/۱) به صورت هفتگی اندازه گیری شدند.

پس از آماده سازی سیستم پرورش به منظور بررسی تاثیر استفاده از سطوح مختلف رنگدانه آستاگزانتین بر برخی شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی غیر اختصاصی، از ۴ نوع جیره غذایی تهیه شده برای تغذیه میگوها استفاده به عمل آمد. قبل از بکار بردن جیره های آزمایشی، ابتدا میگوها به مدت دو هفته با جیره غذایی پایه تغذیه شدند تا ضمن عادت نمودن به جیره غذایی با شرایط پرورشی نیز سازگار شوند. سپس میگوها به مدت ۹ هفته با جیره های غذایی حاوی سطوح مختلف آستاگزانتین تغذیه شدند. تغذیه

به صورت ۱۰۰ درصد مصنوعی و به میزان ۲ درصد وزن بدن میگوها و چهار بار در روز صورت گرفت. هر روز صبح بعد از غذادهی، غذای باقیمانده جمع آوری و مخازن تمیز شدند. در پایان کلیه تیمارها تحت تنش شدید کمبود اکسیژن قرار گرفتند. به این صورت که حجم آب پایین آورده شد و سطح همه مخازن برای کاهش تبادل اکسیژن هوا با نایلون محکم بسته و با استفاده از هواده های تنظیمی، میزان هوادهی به کمترین میزان ممکن کاهش یافت. کاهش اکسیژن به صورت مکرر با استفاده از اکسیژن متر دیجیتالی اندازه گیری گردید. به صورتی که میزان اکسیژن محلول طی ۱۴ ساعت از ۷ به ۱ میلی گرم در لیتر کاهش یافت (Mugnier and Soyez, 2005). **نمونه برداری از همولنف و تهیه پلاسما:** پس از پایان دوره آزمایش برای اندازه گیری شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی، از هر مخزن ۳ قطعه میگو برداشت و همولنف از سینوس شکمی و از بند دوم با استفاده از سرنگ ۱ میلی لیتری استریل حاوی ۰/۹ میلی لیتر آنتی کوآگولانت (محلول اصلاح شده Alsever) برداشت و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و pH ۷/۲ ذخیره گردید. پس از نمونه برداری، محتویات سرنگ به اپندروف مخصوص سانتریفیوژ منتقل شد.

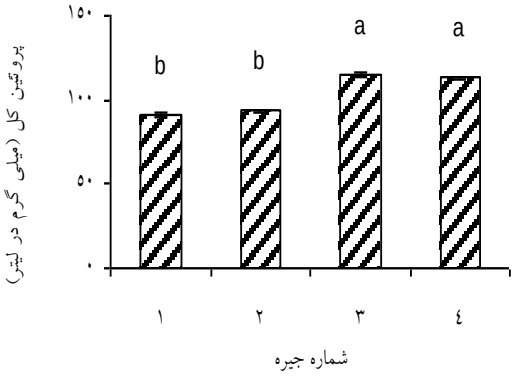
تعیین شاخص های بیوشیمیایی: پس از سانتریفیوژ (g × ۸۰۰ به مدت ۳ دقیقه)، میزان پروتئین کل پلاسما تعیین شد (Bradford, 1976). برای این کار، همه نمونه ها در برابر استاندارد Bovine serum albumin (BSA) (۲۰۰-۰ میلی گرم در میلی لیتر) در سه تکرار اندازه گیری شدند. میزان گلوکز نیز با استفاده از روش هگزوکیناز– گلوکز– ۶ – فسفات دهیدروژناز تعیین گردید (Kunst *et al.*, 1983).

تعیین شاخص های ایمنی شناسی: برای تعیین تعداد هموسیت کل، از هر میگو دو اسمیر از همولنف آسپیره شده تهیه و در مجاورت هوا خشک شد. سپس یک قطره از محلول تهیه شده روی یک Hemocytometer ریخته و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Nikon Photolab, Japan) اندازه گیری گردید (Le Moullac *et al.*, 1997). برای تعیین تابلوهای خونی، اسمیر های تهیه شده از همولنف به روش May Grunwald-Giemsa رنگ آمیزی و با میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 1000X مورد بررسی قرار گرفتند (Le Moullac *et al.*, 1997). برای اندازه گیری فعالیت فاگوسیتوزی، اسلایدها تهیه و با کمک میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی 1000X مورد بررسی قرار گرفتند (Lui and Chen, 2004).

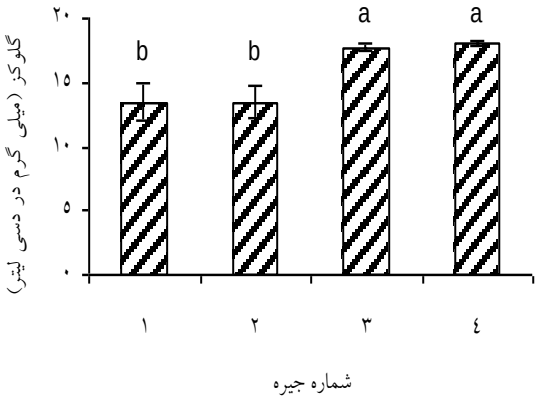
روش های آماری مورد استفاده: برای آنالیز داده ها از روش آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه، استفاده به عمل آمد. داده هایی که به صورت درصد بودند، قبل از انجام آنالیز واریانس با استفاده از روش Arcsin تبدیل گردیدند. برای تعیین اختلاف آماری بین میانگین تیمارها از روش Duncan در سطح معنی دار ۵٪ استفاده شد. انجام کلیه آنالیزهای آماری مورد نیاز با استفاده از نرم افزار SAS (ورژن ۹/۱) صورت گرفت.

۳. نتایج

شاخص های بیوشیمیایی خون: میزان پروتئین کل پلاسما در کلیه تیمار های آزمایشی در میگوها پس از تنش اندازه گیری شد. از این نظر، میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری با میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند ($P<0/05$). ولی جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری با هم نداشتند (نمودار ۱). میزان گلوکز خون در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ تفاوت معنی داری با جیره غذایی ۱ نشان نداد. ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری در مقایسه با جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند ($P<0/05$). با این حال جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری با هم نداشتند (نمودار ۲).

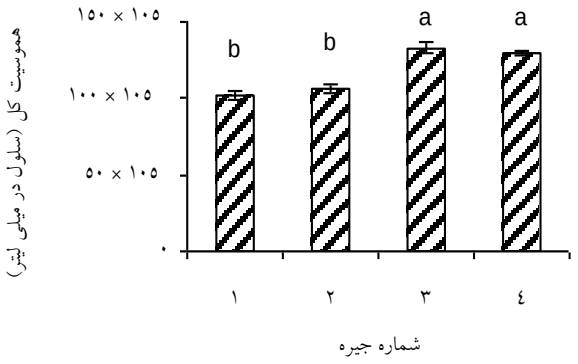


نمودار ۱. مقایسه میزان پروتئین کل میگوها در تیمارهای مختلف (P‹۰/۰۵)

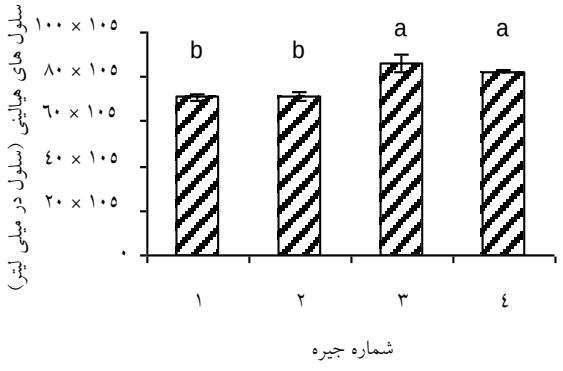


نمودار ۲. مقایسه میزان گلوکز خون میگوها در تیمارهای مختلف (P‹۰/۰۵)

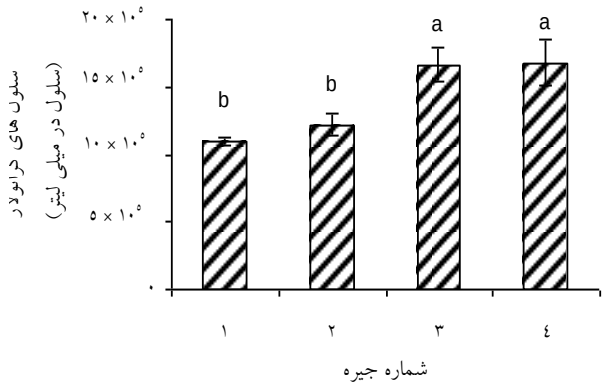
شاخص های ایمنی شناسی: بررسی نتایج مربوط به شاخص های ایمنی نشان داد که پاسخ میگوها در برابر تنش در تیمارهای مختلف متفاوت است. میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ تفاوت معنی داری را درتعداد هموسیت کل نسبت به جیره ۱ نشان ندادند. جیره های غذایی ۳ و ۴ نیز تفاوت معنی داری با هم نداشتند ولی هر دو تفاوت معنی داری را با جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند (P‹۰/۰۵) (نمودار ۳). تعداد سلول های هیالینی در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ اختلاف معنی داری با جیره ۱ نداشت، ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ اختلاف معنی داری را با جیره های ۱ و ۲ نشان دادند (P‹ ۰/۰۵). با این حال جیره های ۳ و ۴ اختلاف معنی داری با هم نداشتند (نمودار ۴). تعداد سلول های گرانولار در میگوهای تغذیه شده با جیره ۲ تفاوت معنی داری با جیره ۱ نداشت ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری نسبت به جیره های غذایی۱ و ۲ نشان دادند (P‹ ۰/۰۵). جیره های غذایی ۳ و ۴ با هم اختلاف معنی داری نداشتند (نمودار ۵). تعداد سلول های گرانولار کوچک در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ تفاوت معنی داری با جیره غذایی ۱ نداشت ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ اختلاف معنی داری در مقایسه با جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند (P‹ ۰/۰۵). با این حال تیمارهای ۳ و ۴ تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۶). میزان فعالیت فاگوسیتوز در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ اختلاف معنی داری با جیره غذایی ۱ نشان نداد ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری را نسبت به جیره های غذایی ۱ و ۲ از خود نشان دادند (P‹ ۰/۰۵). با این حال تیمارهای ۳ و ۴ اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند (نمودار ۷).



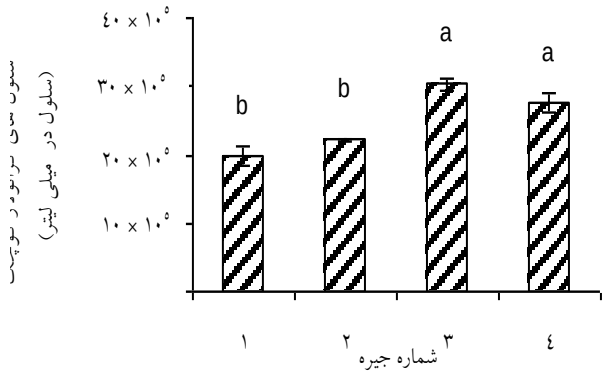
نمودار ۳. مقایسه تعداد هموسیت کل میگوها در تیمارهای مختلف (P< ۰/۰۵)



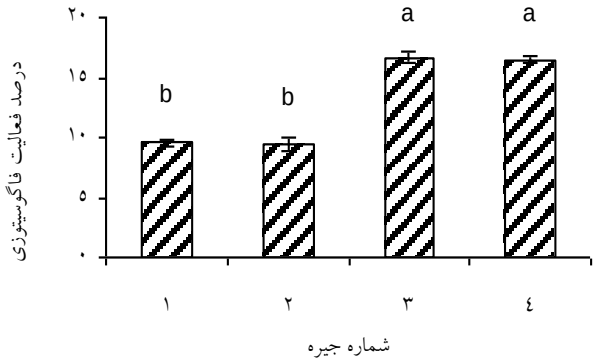
نمودار ۴. مقایسه تعداد سلول های هیالینی میگوها در تیمارهای مختلف (P< ۰/۰۵)



نمودار ۵. مقایسه تعداد سلول های گرانولار میگوها در تیمارهای مختلف (P< ۰/۰۵)



نمودار ۶. مقایسه تعداد سلول های گرانولار کوچک میگوها در تیمارهای مختلف (P< ۰/۰۵)



نمودار ۷. مقایسه میزان فعالیت فاگوسیتوزی میگوها در تیمارهای مختلف (P< ۰/۰۵)

۴. بحث و نتیجه گیری

شاخص های بیوشیمیایی خون: پس از تنش، میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ تفاوت معنی داری از نظر پروتئین کل پلاسما با جیره غذایی ۱ (شاهد) نشان ندادند. ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تغییرات معنی داری را نسبت به جیره ها غذایی ۱ و ۲ نشان دادند. غلظت پروتئین پلاسما در سخت پوستان می تواند تحت تاثیر تغییرات محیطی یا فیزیولوژیکی مثل دما (Chisholm and Smith, 1994; Sánchez *et al*., 2001)، میزان اکسیژن (Engel *et al*., 1993)، شوری (Chen *et al*., 1994)، آمونیاک (Chen and Cheng, 1995) و جیره غذایی (Rosas *et al*., 2000) و ... قرار گیرد. تشکیل بیش از حد رادیکال های آزاد در اثر تنش ناشی از مواجهه با کمبود اکسیژن در واکنش های غیر عادی در مسیر متابولیسم و همچنین تولید پراکسید های چربی دارای گونه های فعال اکسیژن (*ROS*) در اثر اکسیداسیون چربی های موجود در جیره میگو و همچنین اسید های چرب غیر اشباع میگو که در نهایت به دیگر رادیکال های حاوی اکسیژن تجزیه می شوند، باعث حمله به ترکیبات سلولی مثل پروتئین ها شده و در نهایت باعث از بین بردن آنها می شوند (Asada, 1988). همچنین کاهش میزان پروتئین کل پلاسما را می توان به کاهش پروتئین های شرکت کننده در سیستم ایمنی مثل پروتئین های درگیر در شناسایی میکروارگانیسم های مهاجم (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000)، پروتئین های مسئول پروسه انعقاد و سیستم فنول اکسیداز (Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000) و پپتید های ضد میکروبی (Bartlett *et al*., 2002) نسبت داد. از طرف دیگر ممکن است که پروتئین ها برای ترمیم غشاء های سلولی آسیب دیده مورد استفاده قرار گرفته باشند (Pascual *et al*., 2003). با استفاده از آنتی اکسیدانت هایی مثل آستاگزانتین می توان از این پدیده جلوگیری به عمل آورد. همچنین ممکن است کاهش میزان پروتئین کل پلاسما به دلیل استفاده از آن به عنوان منبع انرژی تحت شرایط تنش زای حاکم بر میگوها صورت گرفته باشد (Racotta and Palacios, 1998). با توجه به منابع علمی در دسترس، مطالعه ای در این زمینه یافت نشد.

پس از ایجاد تنش در میگوهای جوان پا سفید، میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ تفاوت معنی داری از نظر میزان غلظت گلوکز خون با تیمار شاهد نشان ندادند. ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تغییرات معنی داری را در مقایسه با جیره های غذایی ۱ و ۲ از خود نشان دادند. افزایش میزان گلوکز در همولنف میگوهای پنائیده یک شاخص شناخته شده در پاسخ به تنش های کوتاه مدت می باشد (Mercier *et al*., 2006). مطالعات زیادی پدیده *Hyperglycemia* را در چندین سخت پوست که در معرض برخی از تنش ها مثل کمبود اکسیژن بافتی (Zou *et al*., 1996; Hall and Ham, 1998)، تغییرات دما و شوری (Chang *et al*., 1998)، افزایش آمونیاک (Racotta and Hernández-Herrera, 2000)، مواجهه با فلزات سنگین (Reddy *et al*., 1996) یا آلاینده های آلی (Reddy *et al*., 1996) قرار گرفته بودند، گزارش کرده اند. این امر یک نوع سازگاری برای میگو ها در برابر تنش و کاهش انرژی محسوب شده و به مرور زمان میزان گلوکز پلاسما و گلیکوژن هپاتوپانکراس را کاهش می دهد. تحت شرایط کمبود اکسیژن بافتی، انرژی اساسا از طریق متابولیسم غیر هوازی تولید می گردد. متابولیسم غیر هوازی میگوی پا سفید از طریق گلیکولیز غیر هوازی فعال می شود و محصول نهایی آن لاکتات است. تحت این شرایط، کاهش کربوهیدرات در هپاتوپانکراس در اثر استفاده از واحد های گلیکوزیل (بصورت گلیکوژن و الیگوساکارید های گلوکز) به عنوان ماده مورد نیاز برای گلیکولیز (Hill *et al*., 1991; Anderson *et al*., 1994) مشاهده می شود. در مطالعه تاثیر رنگدانه آستاگزانتین با غلظت ۸۰ میلی گرم در کیلوگرم جیره در میگوهای جوان پا سفید که در معرض آب با شوری پایین قرار گرفته

بودند، افزایش معنی داری در میزان گلوکز و لاکتات پلاسما در مقایسه با دیگر جیره ها مشاهده شد (Maricela *et al*., 2007).

شاخص های ایمنی شناسی: پس از ایجاد تنش ناشی از کمبود اکسیژن، میگوهایی که از جیره های غذایی ۳ و ۴ تغذیه کرده بودند، افزایش معنی داری را در تعداد هموسیت کل نسبت به جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند. در اثر تنش ناشی از اکسیژن، توانایی سیستم دفاعی میگو کاهش می یابد. Chien و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که تحت استرس ناشی از کاهش اکسیژن، میگوهای ببری جوانی که با جیره غذایی حاوی سطح بالای آستاگزانتین تغذیه شده بودند از میزان بقاء بیشتری در مقایسه با تیمار شاهد برخوردار بودند. در مطالعه آن‌ها، ارتباط نزدیکی بین خصوصیات آنتی اکسیدانتی آستاگزانتین و میزان مقاومت در برابر استرس از طریق افزایش درصد بقاء در میگو به اثبات رسید.

در مطالعه ای اثر کمبود اکسیژن بافتی بر سیستم ایمنی میگوی *P.stylirostris* مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که شاخص های ایمنی از جمله تعداد هموسیت کل کاهش می یابد (Le Moullac *et al*., 1998). تنش های محیطی می توانند فعالیت میتوزی بافت خون ساز را تنظیم (Johnson, 1980) و در نهایت باعث کاهش چرخش هموسیت ها (Hemocyte Turnover) شوند. همچنین در اثر تنش ایجاد شده در میگوی پا سفید، کاهش ناگهانی اکسیژن و واکنش های اکسیژنی غیر عادی در مسیر متابولیسم رخ می دهد که باعث تشکیل بیش از حد رادیکال های آزاد می شود (Ranby and Rabek, 1978). سلول های سیستم ایمنی نسبت به تنش اکسیداتیو و آسیب غشایی به وسیله رادیکال های آزاد بسیار حساسند. زیرا آنها به شدت به ارتباطات سلول به سلول از طریق رسپتور های دیواره سلولی وابسته اند (Hughes, 1999). استفاده از آنتی اکسیدانت های طبیعی در جیره غذایی همچون آستاگزانتین می تواند اثرات ناشی از رادیکال های آزاد را خنثی و نقش مهمی در سلامتی حیوانات ایفاء کند. این نتایج با مطالعه ای که در میگوهای جوان پا سفید در معرض تنش شوری پایین در اثر تغذیه با آستاگزانتین صورت گرفته مطابقت (Maricela *et al*., 2007) و با مطالعه اثر ریز جلبک *Dunaliella* بر رشد، واکنش های ایمنی و مقاومت در برابر بیماری در میگوی ببری سیاه در تناقض است (Supamattaya *et al*., 2005). عصاره این ریز جلبک حاوی بتا کاروتن است. تناقض موجود در این زمینه ممکن است در اثر وجود بتا کاروتن در این جلبک مشاهده شده باشد.

پس از ایجاد تنش ناشی از کمبود اکسیژن، میگوهایی که از جیره های غذایی ۳ و ۴ تغذیه کرده بودند، اختلاف معنی داری از نظر تعداد سلول های هیالینی، تعداد سلول های گرانولار و گرانولار کوچک در مقایسه با جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند. در مطالعه ای که در میگوی *P.stylirostris* صورت گرفت، در شرایط کمبود اکسیژن بافتی (۱ میلی گرم در لیتر اکسیژن به مدت ۲۴ ساعت) این سلول ها کاهش معنی داری از خود نشان دادند (Le Moullac *et al*., 1998). همانطور که قبلا توضیح داده شد، تعداد هموسیت کل شامل سه نوع سلول هیالینی، گرانولار و گرانولار کوچک می باشد. بنابراین با کاهش تعداد هموسیت ها در اثر تنش، تعداد این سلول ها نیز کاهش و رنگدانه آستاگزانتین با خنثی کردن رادیکال های آزاد تولید شده در اثر تنش، باعث افزایش این سلول ها شده است. کاهش تعداد این سلول ها در مواجهه با تنش و افزایش تعداد آنها در اثر استفاده از رنگدانه آستاگزانتین را می توان با دلایل مطرح شده در قسمت تعداد هموسیت کل توجیه کرد.

فعالیت فاگوسیتوزی در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی ۲ افزایش معنی داری در مقایسه با جیره غذایی ۱ نداشت ولی میگوهای تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ تفاوت معنی داری را نسبت به جیره های غذایی ۱ و ۲ نشان دادند. در اثر تنش ناشی از کمبود اکسیژن، فعالیت فاگوسیتوزی

هموسیت ها کاهش می یابد. در مطالعه ای که در میگوی ببری سیاه صورت گرفت، کاهش فعالیت فاگوسیتوزی پس از تنش را به کاهش تعداد هموسیت کل نسبت دادند (Direkbusarakom and Danayadol, 1998). افزایش این فعالیت در میگو پس از تغذیه با رنگدانه آستاگزانتین می تواند علل مختلفی داشته باشدکه از جمله آن ها می توان به جلوگیری از تنش اکسیداتیو و آسیب غشایی هموسیت ها توسط رادیکال های آزاد تولید شده در اثر تنش اشاره نمود. از طرف دیگر در اثر فعالیت فاگوسیتوز برخی از سلول های ایمنی، یکسری رادیکال های آزاد تولید می شوند که این مولکول ها باعث کاهش قدرت دفاعی فاگوسیت ها در برابر عامل مهاجم می گردند (Hughes, 1999). در صورتی که خاصیت آنتی اکسیدانتی سلول مناسب نباشد، این مولکول ها می توانند سریعا با واکنش هایی مثل پراکسیداسیون چربی ها و تخریب غشای سلول به این سلول ها آسیب برسانند. رنگدانه آستاگزانتین یک آنتی اکسیدانت بیولوژیکی قوی است که می تواند تولید رادیکالهای آزاد را متوقف و با تبدیل آنها به ترکیباتی با فعالیت کمتر، از پایداری طولانی آنها جلوگیری نماید (Guerin *et al*., 2003). این توضیح ممکن است افزایش فعالیت سلول های فاگوسیتوز مشاهده شده در این مطالعه را توجیه کند. نتایج بدست آمده از این تحقیق با مطالعاتی که در قزل آلای رنگین کمان تغذیه شده با کاروتنوئید ها و ویتامین های A، C و E در جیره صورت گرفته مطابقت دارد (Amar *et al*., 2001; Amar *et al*., 2004).

با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتایج کلی حاصل از این مطالعه را به صورت زیر جمع بندی کرد. پس از ایجاد تنش ناشی از کمبود اکسیژن، شاخص های بیوشیمیایی و ایمنی میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف آستاگزانتین نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت. میگو های تغذیه شده با جیره های غذایی ۳ و ۴ (جیره هایی که به ترتیب ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی گرم آستاگزانتین در هر کیلوگرم به آنها اضافه شده بود)از این نظر بهترین وضعیت را نشان دادند. با توجه به مطالعات انجام شده و خلاء های اطلاعاتی موجود در این زمینه می توان پیشنهاداتی از قبیل استفاده از منابع گیاهی و جانوری حاوی کاروتنوئیدهای موجود در کشور به دلیل گران بودن رنگدانه های کاروتنوئیدی سنتزی و یافتن دانش و فن آوری خالص سازی این رنگدانه های زیستی و استفاده از کاروتنوئیدها بخصوص آستاگزانتین به عنوان آنتی اکسیدانت موثر برای کاهش دیگر تنشهای فیزیکی، شیمیایی، بیولوژیکی و دستکاری های مربوط به پرورش آنها را، برای انجام مطالعات آتی در دستور کار قرار داد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران و پژوهشکده میگوی کشور در بوشهر انجام گرفت. بدین وسیله از زحمات پرسنل محترم آزمایشگاه شیلات دانشکده منابع طبیعی دانشگاه تهران و پژوهشکده میگوی بوشهر، تشکر و قدردانی به عمل می آید.

منابع

احمدی، س.، فرهنگی، م.، رفیعی، غ.، و قاعدنیا، ب. ۱۳۸۷. اثر سطوح رنگدانه آستاگزانتین بر شاخص های رشد و درصد بازماندگی میگوی پاسفید (*Litopenaeus vannamei*). مجله علوم و فنون دریایی، (۷) : ۱- ۱۲.

Allan, G.L. and Maguire, G.B. 1991. Lethal levels of low dissolved oxygen and effects of short-time oxygen stress on subsequent growth of juvenile *Penaeus monodon*. Aquaculture. 94: 27- 37.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. 2001. Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanism in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquac. Res. 32: 162-173.

Amar, E.C., Kiron, V., Satoh, S. and Watanabe, T. 2004. Enhancement of innate

Christiansen, R. and Torrissen, O. J. 1997. Effect of dietary astaxanthin supplementation on fertilization and egg survival in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture. 153: 51-62.

Direkbusarakom, S. and Danayadol, Y. 1998. Effect of oxygen depletion on some parameters of the immune system in black tiger shrimp *Penaeus monodon*. In: Flegel, T. W. Ed: Advances in Shrimp Biotechnology, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, pp 147–149.

Engel, D.W., Brower, M. and McKenna, S. 1993. Hemocyanin concentrations in marine crustaceans as a function of environmental conditions. Mar. Ecol. Prog. Ser. 93: 235-244.

Guerin, M., Huntley, M.E. and Olaizola, M. 2003. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition. Trends. Biotechnol. 21: 210-216.

Hall, M.R. and Ham, E.H. 1998. The effects of different types of stress on blood glucose in the giant tiger prawn *Penaeus monodon*. J. World. Aquacult. Soc. 29: 290–299.

Higuera-Ciapara, I., Félix-Valenzuela, L. and Goycoolea, F.M. 2006. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. Crit. Rev. Food Sci. 46: 96 -185.

Hill, A.D., Taylor, A.C. and Strang, R.H.C. 1991. Physiological and metabolic responses of the shore crab *Carcinus maenas* L. during environmental anoxia and subsequent recovery. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 150: 31–50.

Hughes, D.A. 1999. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. P. Nutr. Soc.. 58: 79-84.

Hussein, G., Sankawa, U., Goto, H., Matsumoto, K. and Watanabe, H. 2006. Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition. J. Nat. Prod. 69: 443-9.

Johnson, P.T. 1980. Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: A Model for the Decapoda. Praeger, New York, p 440.

Kunst, A., Draeger, B. and Ziegenhorm, J. 1983. UV- methods with hexoquinase and glucose- 6- phosphate dehydrogenase. In: Bergmeyer, H. U. Ed., Methods of Enzymatic Analysis. vol. 6, 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim, pp 163–185.

Lee, D. O. and Wickins, J. F. 1992. Crustacean Farming. Blackwell Scientific Publication, Oxford, UK. pp 392.

Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy P. and Aquacop. 1997. immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shellfish Immunol. 16: 527-537.

Anderson, S.J., Taylor, A.C. and Atkinson, R.J. 1994. Anaerobic metabolism during anoxia in the burrowing shrimp *Calocaris macandreae* Bell (Crustacea: Thalassinidae). Comp. Biochem. Physiol. 108: 515-522.

Asada, K. 1988. Production, scavenging and action of active oxygen. P. N. E. 33:7-12.

Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S. and Warr, G.W. 2002. Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. Mar. Biotechnol. 4: 278–293.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-253.

Chew, B.P. 1995. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. J. Nutr. 125: 1804– 1808.

Chang, E., Keller, R. and Sharon, C. 1998. Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. Gen. Comp. Endocr. 111: .359-366.

Chen, J.C., Chen, C.T. and Cheng, S.Y. 1994. Nitrogen excretion and changes of hemocyanin protein and free amino acids levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. Mar. Ecol. Prog. Ser. 110: 85-94.

Chen, J.C. and Cheng, S.Y., 1995. Hemolymph oxygen content, oxyhemocyanin, protein levels and ammonia excretion in the shrimp *Penaus monodon* exposed to ambient nitrite. Comp. Biochem. Physiol. 164: 530-535.

Chen, J.C., Lin, M.N., Ting, Y.Y. and Lin, J.N. 1995. Survival, haemolymph osmolality and tissue water of *Penaeus chinensis* juveniles acclimated to different salinities and temperature levels. Comp. Biochem. Physiol. 110: 253- 258.

Chisholm, J.R.S. and Smith, V. 1994. Variation of antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. with temperature. J. Mar. Biol. Ass. 74: 979-982.

Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against vibriosis. Fish Shellfish Immunol. 7: 227–234.

Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C. and Levy, P. 1998. Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish Shellfish Immunol. 8: 621–629.

Lichon, M. J. 1996. Sample preparation. In: Handbook of Food Analysis: Ed: Nollet. L. M. L. Vol. 1. Marcel Dekker. New York, pp 1-19.

Lightner, D.V. and Redman, R.M. 1998. Shrimp disease and current diagnostic methods. Aquaculture. 164: 201-220.

Lorenz, R.T. and Cysewski, G.R. 2000. Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. Trends. Biotechnol. 18: 160-167.

Lui, C.H. and Chen, J.C. 2004. Effect of ammonia on the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. Fish Shellfish Immunol. 16: 321-134.

Madenjian, C.M., Rogers, G.L. and Fast, A.W. 1987. Predicting night-time dissolved oxygen loss in prawn pond of Hawaii: Part 1. Evaluation of traditional methods. Aquacult. Eng. 6: 191- 208.

Maricela, F., Fernando, D., Rebeca, M. and Ana, R. 2007. Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. Aquac. Res. 38: 740-747.

Merchie, G., Kontara, E., Lavens, P., Robles, R., Kurmaly, K and Sorgeloos, P. 1998. Effect of vitamin C and astaxanthin on stress and disease resistance of postlarval tiger shrimp, *Penaeus monodon* (Fabricius). Aquac. Res. 29: 579–585.

Mercier, L., Palacios, E., Co'rdova, A'.I.C., Ramírez, D.T., Herrera, R. H. and Racotta, I. S. 2006. Metabolic and immune response in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. Aquaculture. 258: 633-640.

Meyers, S.P. 1977. Using crustacean meals and carotenoid fortified diets. Feedstuffs. 38: 26-27.

Moullac, G.L. and Haffner, P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191: 121-131.

Mugnier, C. and Soyez, C. 2005. Response of the blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* to temperature decrease and hypoxia in relation to molt stage. Aquaculture. 244: 315-322.

Pascual, C., Sánchez, A., Sánchez, A., Vargas-Albores, F., LeMoullac, G. and Rosas, C. 2003. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of an extreme temperature. Aquaculture. 218: 637-650.

Peterson, D.S., Harris, D.J., Rayner, J.C., Blakeney, A.B. and Choct, M. 1999. Methods for the analysis of premium livestock grains. Aust. J. Agric. Res. 50: 775- 787.

Racotta, I.S. and Hernández-Herrera, R. 2000. Metabolic responses of the white shrimp, *Penaeus vannamei*, to ambient ammonia. Comp. Biochem. Physiol. 125: 437-443.

Racotta, I.S. and Palacios, E. 1998. Hemolymph metabolic variables in response to experimental manipulation stress and serotonin injection in *Penaeus vannamei*. J. World. Aquacult. Soc. 29: 351–356.

Ranby, B. Rabek, J.E. 1978. Singlet Oxygen. In: Ranby, B., Rabek, J.E. Eds: Wiley, Chichester, England, pp 331.

Reddy, P.S., Katayayani, R.V. and Fingerman, M., 1996. Cadmium and naphthalene-induced hyperglycemia in the fiddler cab Uca pugilator. Differential modes of action on the neuroendocrine system. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56: 425-431.

Rosas, C., Cuzon, G., Gaxiola, G., Arena, L., Lemaire, P., Soyez, C. and Wormhoudt, A., 2000. Influence of dietary carbohydrate on the metabolism of juvenile *Litopenaeus stylirostris*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 249: 181-198.

Sánchez, A., Pascual, A., Vargas-Alborez, F., Le Moullac, G. and Rosas, C. 2001. Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus vannamei* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. 198: 13-28.

Shimidzu, N., Goto, M. and Miki, W. 1996. Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. Fisheries. Sci. 62: 134–137.

Sritunyalucksana, K. and Söderhäll, K. 2000. The proPO and clotting system in crustaceans. Aquaculture. 191: 53–69.

Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. and Borowitzka, L. 2005. Effect of *Dunaliella* extract on growth

performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 248: 207-216.

Torrissen, O.J., Hardy, R.W. and Shearer, K.D. 1989. Pigmentation of salmonids carotenoid deposition and metabolism. Rev. Aquat. Sci. 1: 209-225.

Vargas-Albores, F. and Yepiz-Plascencia, G. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. Aquaculture. 191: 13–21.

Wyban, J.A. and Sweeney, J.N. 1991. The oceanic institute shrimp manual, intensive shrimp production technology. The Oceanic Institute, Honolulu. HI, USA., 158 P.

Zou, E., Du, N. and Lai, W. 1996. The effects of sever hypoxia on lactate and glucose concentrations in the blood of the chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 114: 105-109.