مقاله پژوهشی

مجله علوم و فنون دریایی | صفحات ۱ تا ۱۱ | دوره ۱۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۹

اثر سطوح متفاوت شوری آب و پروتئین جیره غذایی بر شاخص‌های سلولی همولنف میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) جوان

زهرا معصومی، محمد ذاکری*، وحید یاوری، سید محمد موسوی

گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی، خرمشهر.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲

شناسه دیجیتال (DOI) : 10.22113/jmst.2018.117557.2114

چکیده

در مطالعه حاضر اثر سطوح مختلف پروتئین جیره غذایی و شوری آب بر شاخص‌های سلولی همولنف میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) جوان مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور تعداد ۳۵۰ قطعه میگو با متوسط وزن و طول اولیه ۰/۱۸±۵/۵۵ گرم و ۰/۱۵±۸/۸۱ سانتی‌متر، در ۲۷ مخزن بتنی با ظرفیت ۱۰ تن آب (طول: ۶۰۰ cm، عرض: ۱۷۰ cm و ارتفاع: ۱۰۰ cm) توزیع گردیدند. تیماربندی براساس طرح ماتریکس (۳×۳) شامل سه سطح شوری (۳۵-۳۲ ppt و ۱۵-۱۲، ۳-۰) در سه سطح پروتئین جیره غذایی (۴۵ و ۳۵، ۲۵٪) طراحی شد. غذادهی ۴ بار در روز در حد سیری به مدت ۵۶ روز انجام گردید. در پایان، پارامترهای سلولی شامل: شمارش تعداد کل و تفریقی هموسیت‌ها مورد سنجش قرار گرفت. براساس نتایج، مطلوب‌ترین سطح پروتئین جیره غذایی در تعداد کل هموسیت‌ها و سلول‌های گرانولوسیت، ۳۵٪ و شوری ۳۵-۳۲ ppt مشاهده شد و با عوامل متغیر ارتباط مستقیم داشت. هر چند که تعداد سلول‌های سمی‌گرانولوسیت ارتباط عکس را نشان داد ($P\leq ۰/۰۵$) و همچنین در تعداد سلول‌های هیالونوسیت اثر معنی‌داری نداشتند. بدین ترتیب براساس نتایج کسب شده، سطح ۳۵٪ پروتئین جیره غذایی جهت تغذیه این گونه مناسب‌تر می‌باشد. علاوه بر این، با توجه به استرسی که گونه پا سفید غربی در آب‌های شیرین و لب‌شور متحمل می‌شود، بهترین میزان شوری آب ۳۵-۳۲ ppt بوده و به عنوان مطلوب‌ترین شوری آب جهت پرورش میگوی پا سفید غربی توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: پروتئین، شاخص سلولی، شوری، همولنف، *Litopenaeus vannamei*

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: zakeri.mhd@gmail.com

۱. مقدمه

در بین میگوهای پنائیده، جنس Litopenaeus به خصوص گونه پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از غالب‌ترین گروه‌های پرورشی می‌باشد (Alfaro- Alfaro-Montoya and A. Vega, 2011; Montoya, 2010)، این گونه به علت دارا بودن نرخ رشد سریع و تحمل طیف وسیعی از دما (Zhou *et al*., 2013; Wickins and Lee, 2007)، نیاز به پروتئین کمتر در جیره غذایی نسبت به سایر گونه-های پرورشی (Arshadi *et al*., 2016)، مقاومت بالا در برابر پاتوژن‌های بیماری‌زا (متین‌فر و همکاران، ۱۳۸۶) و قابلیت تحمل محدوده وسیعی از شوری آب ۱-۵۰ ppt (Xie *et al*., 2014; Chong-Robles *et al*., 2014) به گونه‌ای با اهمیت اقتصادی بالا، در صنعت پرورش آبزیان تبدیل شده است (Lin *et al*., 2012). معرفی میگوی پا سفید غربی به صنعت تکثیر و پرورش ایران توسط مؤسسه تحقیقات شیلات در سال ۱۳۸۳ انجام گرفت. این رخداد پس از بروز بیماری لکه سفید در صنعت پرورش گونه سفید هندی (*Penaeus indicus*) صورت پذیرفت. میگوی پا سفید غربی به دلیل داشتن ویژگی‌های فوق الذکر، از سال ۱۳۸۵ در چرخه تولید، جایگزین گونه سفید هندی شد (Afsharnasab *et al*., 2011). در سال ۱۳۸۲ و پس از بروز بیماری لکه سفید میزان تولید گونه سفید هندی در استان بوشهر از ۳۵۸۵ تن به ۴۷۶ تن در سال ۱۳۸۴ رسید. پس از ورود گونه پا سفید غربی، میزان تولید به ۸۴۸۸ تن در سال ۱۳۹۲ رسید. در استان خوزستان نیز که تولیدی برابر ۲۶ تن در سال ۱۳۸۲ داشت پس از وقوع بیماری لکه سفید به تعطیلی مراکز تولیدی در سال ۱۳۸۴ منتهی گردید. اما با معرفی میگوی پاسفید غربی تولید به ۷۷۱ تن در سال ۱۳۹۲ رسید (Statistical Yearbook of the Iranian, 2014).

جهت انجام فعالیت آبزی‌پروری عوامل مختلفی ازجمله آب، مواد غذایی و مکانی که به عنوان محیط پرورشی در نظر گرفته می‌شود، دخیل هستند (Sadeghi and Noruzi, 2007). از میان فاکتورهای فیزیکوشیمیایی، شوری یک عامل محیطی با اهمیت بوده که باعث تغییرات فیزیولوژیکی پیچیده و گسترده در ارگانیسم‌های آبزی می‌شود (An and Choi, 2010) و شناسایی ظرفیت گونه برای مقاومت در برابر تغییرات شوری از الزامات موردنیاز جهت تولید تجاری آبزی‌پروری می‌باشد (Clive, 2009). تغییرات شوری زمانی که خارج از حد تحمل گونه باشد به عنوان عامل استرس عمل می‌نماید (Mohammadi Varsamos *et al*., 2004; Makvandi *et al*., 2012) و در صورت نامساعد بودن سطح آن باعث کاهش ایمنی و در موارد حاد منجر به مرگ میگو می‌گردد (Perazzolo *et al*., 2002).

در بین مواد مغذی، پروتئین از مهم‌ترین و عمده‌ترین مواد مغذی لازم برای رشد و سلامت میگو می‌باشد (Lemos *et al*., 2000; Venero *et al*., 2007). میزان پروتئین جیره غذایی همواره باید در حد بهینه نگهداری شود، چراکه عدم رعایت مقدار متعادل پروتئین، مشکلاتی را برای جاندار ایجاد می‌کند. به عبارت دیگر اگر در جیره غذایی انرژی از حد نیاز کمتر باشد، منجر به کم‌خونی، کاهش پروتئین پلاسما و مختل شدن سلامت جاندار می‌شود (Musavi, 2006). از سوی دیگر افزایش درصد این ماده مغذی در جیره غذایی میزان سوخت‌وساز را افزایش داده (Taboada *et al*.; 1998 Rosas *et al*., 2001) و شاهد کاهش کیفیت آب متعاقب افزایش میزان ترکیبات زائد نیتروژن‌دار و آلودگی محیط پرورشی خواهیم بود (Barbieri, 2009; 2010). همچنین، طبق تحقیقات صورت گرفته از بین متغیرهای زیست‌محیطی، شوری بیشترین تأثیر را بر میزان جذب پروتئین جیره غذایی و سنتز این ماده مغذی در بدن میگوها دارد (Intanai *et al*., 2009). بنابراین، شناخت تأثیر فاکتورهای محیطی به خصوص سطوح مختلف شوری بر فیزیولوژی و تغذیه میگو، کلید

موفقیت در صنعت آبزی‌پروری می‌باشد (Mohammadi Makvandi *et al*., 2012; Boeuf and Payan, 2001).

اگرچه میگوهای خانواده پنائیده یوری هالین هستند، با این وجود تغییرات شوری، کیفیت نامناسب آب و سطوح نامطلوب جیره غذایی منجر به ایجاد استرس و در نتیجه ایجاد شرایطی مناسب برای حضور پاتوژن‌های فرصت طلب می‌گردد (Perazzolo *et al*., 2002). پاسخ به استرس از جمله، استرس ناشی از کیفیت نامطلوب آب یا ترکیب نامناسب جیره غذایی باعث تغییر در ترکیب هموسیت‌های هملونف به عنوان نخستین خط دفاعی سخت‌پوستان می‌شود (Cheng *et al*., 2007; Annies and Rosamma, 2007). همچنین عوامل متعددی از جمله قرار گرفتن تحت تنش‌های محیطی به صورت حاد یا مزمن تعداد آن‌ها را تغییر می‌دهد (Charoensapsri *et al*., 2015; Lorenzon *et al*., 2013). معمولاً هموسیت‌ها در سخت پوستان به صورت هیالینه، نیمه گرانولار و گرانولار مشاهده می‌گردند (Giulianini *et al*., 2007; Battison *et al*., 2003). استرس، سیستم ایمنی و عملکرد متابولیکی میگو را مختل می‌نماید (Annies and Rosamma, 2007). لذا، ایجاد شرایط محیطی مطلوب و جیره غذایی متعادل و مناسب و همچنین مدیریت صحیح باعث مقاوم‌تر شدن میگو از طریق تحریک سیستم ایمنی بدن می‌شود (Lin *et al*., 2013). بنابراین، ضروری به نظر می‌رسد که اثر نوسانات شوری محیط و پروتئین جیره غذایی بر سیستم دفاعی میگوی پا سفید غربی مورد بررسی قرار گیرد.Lin و همکاران (۲۰۱۲) طی بررسی خود روی میگوی پا سفید غربی متوجه شدند که تعداد کل هموسیت‌های در گردش هملونف در میگوهای پرورش یافته در شوری‌های پایین نسبت به میگوهای پرورش یافته در شوری‌های بالاتر کمتر بود. به طور کلی تحقیقات مشابه دیگری نیز پیرامون اثر شوری محیط بر تعداد کل هموسیت‌ها صورت گرفته که در تمام آن‌ها کاهش تعداد هموسیت‌ها در اثر کاهش شوری محیط مشاهده شد (Wang and Chen, 2005; Le Moullac and Haffiner, 2000; 2006). با این حال، تاکنون مطالعه‌ای در ارتباط با اثر نوسانات شوری آب و پروتئین جیره غذایی به صورت توأم بر تغییر تعداد هموسیت‌های هملونف میگوی پا سفید غربی گزارش نشده است. بنابراین هدف از مطالعه حاضر بررسی عوامل متغیر مهم عنوان شده یعنی پروتئین جیره غذایی و شوری آب بر شاخص‌های سلولی هملونف میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

تعداد ۳۵۰ قطعه میگو پا سفید غربی از سایت پرورش میگوی چوئبده آبادان تهیه و به کارگاه تکثیر میگو و ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) جهت انجام تحقیق انتقال یافتند. میگوها ۱۰ روز دوره سازگاری را طی نمودند و روزانه و به تدریج میزان ppt ۲ تغییرات کاهشی و افزایشی شوری محیط تا رسیدن به سطوح مورد آزمایش (۳۵-۳۲ و ۱۵-۱۲، ۳-۰ قسمت در هزار) بر آن‌ها اعمال گردید. در طول مدت سازگاری میگوها با استفاده از غذای ۴۰۰۴ شرکت هوواراش (۳۶٪ پروتئین خام، ۸٪ چربی، ۳٪ فیبر، ۱۴٪ خاکستر و ۱۰٪ رطوبت) در حد سیری و ۴ بار در روز تغذیه شدند. پس از پایان دوره سازگاری، تعداد ۳۲۴ قطعه میگو ابتدا وزن شده و سپس به طور تصادفی درون مخازن آزمایشی به تعداد ۱۲ قطعه میگو با میانگین وزنی و طولی ۵/۵۵±۰/۱۸ گرم و ۸/۸۱±۰/۱۵ سانتی‌متر در ۲۷ مخزن بتنی با ظرفیت ۱۰ تن (طول: ۶۰۰ cm، عرض: ۱۷۰ cm و ارتفاع: ۱۰۰ cm) توزیع گردیدند. در مطالعه حاضر نه تیمار آزمایشی با سه سطح پروتئین جیره غذایی (۴۵ و ۳۵، ۲۵٪) و سه سطح شوری ۳۵-۳۲ و ۱۵-۱۲، ۳-۰ قسمت در هزار از طریق ماتریکس ۳×۳ و هر یک با سه تکرار طراحی گردید (جدول ۱).

جدول ۱. تیمارهای آزمایش

تیمار	۱ (S3/P25)	۲ (S3/P35)	۳ (S3/P45)	۴ (S15/P25)	۵ (S15/P35)	۶ (S15/P45)	۷ (S35/P25)	۸ (S35/P35)	۹ (S35/P45)
مشخصات									
پروتئین (٪)	۲۵	۳۵	۴۵	۲۵	۳۵	۴۵	۲۵	۳۵	۴۵
شوری (قسمت در هزار)	۰-۳	۰-۳	۰-۳	۱۲-۱۵	۱۲-۱۵	۱۲-۱۵	۳۲-۳۵	۳۲-۳۵	۳۲-۳۵

مواد اولیه جیره غذایی شامل: پودر ماهی، پودر کنجاله سویا، پودر سر و دم میگو، پودر اسکوئید، روغن ماهی، آرد گندم، مکمل معدنی، مکمل ویتامینه، کلسترول، لسیتین، همبند و پرکننده بود. کلیه مراحل ساخت خوراک نیز طبق جدول ۲ براساس اصول استاندارد صورت پذیرفت (Zhou *et al.*, 2012). همچنین تغذیه میگوها نیز در طول دوره آزمایش ۴ بار در روز در حد سیری به صورت دستی و در ساعات ۶، ۱۲، ۱۸ و ۲۴ انجام شد (Robertson *et al.*, 1993). پس از هر وعده غذایی مقدار غذای خورده نشده محاسبه و براساس میانگین وزن پلت-های غذا، مقدار دقیق غذای مصرف شده محاسبه گردید (Tuan and Wiliams, 2007).

جدول ۲. اجزای غذایی و آنالیز تقریبی ترکیبات بیوشیمیایی جیره‌های غذایی آزمایشی (n=۳)

آنالیز تقریبی بیوشیمیایی جیره‌ها	جیره ۱ (۲۵٪ پروتئین)	جیره ۲ (۳۵٪ پروتئین)	جیره ۳ (۴۵٪ پروتئین)
پروتئین	۲۷/۳±۱/۱۱	۳۵/۱۷±۱/۱۰	۴۶/۰۲±۱/۱۱
چربی	۸/۹±۰/۴۰	۹/۱±۰/۷۲	۹/۴±۰/۶۳
خاکستر	۹/۱۰±۰/۸۱	۱۱/۴۵±۰/۸۵	۱۴/۳۴±۰/۹۱
رطوبت	۹/۷۰±۰/۱۱	۹/۱۸±۰/۱۰	۹/۰۱±۰/۰۹
کربوهیدرات [۱]	۴۵/۰۰	۳۵/۱۰	۲۱/۲۳
انرژی [۲]	۱/۷۷	۱/۷۹	۱/۸۲

۱- روش محاسبه میزان کربوهیدرات از طریق تفریق مجموع میزان پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت از ۱۰۰ بدست آمد.

۲- انرژی کل از حاصل ضرب اعداد ۰/۰۱۷، ۰/۰۳۹۸ و ۰/۰۲۳۷ (Mj/g) به ترتیب برای کربوهیدرات، چربی و پروتئین محاسبه گردید.

در پایان دوره آزمایش، با استفاده از سرنگ ۲/۵ سی سی از حفره پری‌کاردیال در ناحیه پای دوم شنا (سفالوتوراکس) و از ۳ عدد میگو از هر تکرار اقدام به نمونه‌برداری از همولنف شد (Liu et al., 2014; Samnejhad and Afsharnasab, 2016). بدین منظور در سرنگ‌ها از قبل میزان ۰/۳ سی سی ماده ضد انعقاد (100 mM Sodium citrate، 250mM Sucrose و 10 mM Tric-HCl) کشیده شده بود (Samadi, 2012). سپس همولنف اخذ شده به منظور سنجش پارامترهای سلولی نظیر شمارش کلی

هموسیت‌ها (THC) و شمارش تفریقی هموسیت‌ها (DHC) در یک میکروتیوپ منتقل و معادل حجم آن فرمالین بافر ۱۰٪ اضافه گردید. به منظور بررسی کلی هموسیت‌ها از لام نئوبار و شمارش افتراقی هموسیت-ها با تهیه گسترش از همولنف و مطالعه آن زیر میکروسکوپ نوری جهت تعیین درصد گرانولوسیت‌ها، سمی گرانولوسیت‌ها و هیالونوسیت‌ها هر دو با بزرگنمایی ۱۰× صورت پذیرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها در محیط نرم افزار IBM SPSS Statistics 16 انجام شد. در ابتدا شرط نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro- Wilk بررسی گردید. سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ برای تعیین تفاوت بین تیمارها و آنالیز واریانس دو طرفه (Two way ANOVA) جهت تعیین اختلاف بین اثرات اصلی سطوح متغیرها در سطح احتمال P≤ ۰/۰۵ انجام گردید. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه Duncan استفاده شد.

۳. نتایج

نتایج مربوط به بررسی تغییرات هموسیت‌های همولنف میگوی پا سفید غربی تحت تأثیر سطوح متفاوت شوری محیط و پروتئین جیره غذایی در جدول ۳ آورده شده است. طبق نتایج سطوح ۳۵ درصد پروتئین جیره غذایی و شوری ۳۵-۳۲ قسمت در هزار بیشترین اثر را بر تعداد کل هموسیت‌های همولنف داشتند. سطح ۴۵٪ پروتئین بیشترین میانگین سلول‌های گرانولوسیت را داشت، هر چند که با تعداد این سلول‌ها در سطح ۳۵٪ تفاوت معناداری مشاهده نشد. همچنین شوری ۳۵-۳۲ قسمت در هزار نیز دارای بیشترین اثر گذاری بر این سلول‌ها بود و براساس نتایج آماری میانگین سلول‌های گرانولوسیت همولنف تحت تأثیر برهم‌کنش هر دو عامل متغیر قرار داشت. جیره غذایی حاوی ۲۵ درصد پروتئین نسبت به سطوح دیگر پروتئین مورد آزمایش دارای بیشترین میانگین در تعداد سلول‌های سمی-گرانولوسیت بود. همچنین شوری با سطح ppt ۳-۰ نیز بیشترین اثر گذاری را بر میانگین سلول‌های سمی گرانولوسیت داشت و با سطح ppt ۱۵-۱۲ دارای اختلاف معنی‌داری نبود. طبق آنالیز واریانس دو طرفه دو عامل متغیر و برهم‌کنش آن‌ها میانگین سلول‌های هیالونوسیت را به طور معناداری تحت تأثیر قرار نمی-دهند.

جدول ۳. نتایج آنالیز تعداد هموسیت‌های همولنف میگوی پا سفید غربی (*L.vannamei*) تحت تأثیر سطوح مختلف پروتئین جیره غذایی و شوری آب (میانگین ±خطای استاندارد،n=۳)

میانگین پارامترهای ایمنی همولنف (آزمون واریانس یک طرفه)

تیمار	THC ($\times 10^3$)	DHC		
		GC	SGC	HC
۱ (S3/P25)	۷/۳۰۰۰±۰/۰۰ de	۱۶/۸۳±۰/۷۴ g	۶۷/۵۰±۰/۰۰ a	۱۴/۳۳±۰/۸۰ a
۲ (S3/P35)	۵/۶۰۰۰±۰/۰۰ e	۲۲/۲۸±۱/۲۴ cde	۶۳/۱۲±۱/۱۹ b	۱۱/۸۵±۰/۶۳ ab
۳ (S3/P45)	۸/۰۷۶۷±۰/۳۳ d	۲۰/۰۰±۱/۰۰ ef	۶۷/۵۰±۰/۷۹ a	۱۱/۸۳±۰/۷۴ ab
۴ (S15/P25)	۹/۸۷۷۵±۰/۵۰ c	۱۹/۲۰±۰/۹۶ fg	۶۷/۵۰±۰/۰۰ a	۱۲/۰۰±۱/۲۲ ab
۵ (S15/P35)	۷/۴۶۸۰±۰/۸۳ de	۲۳/۰۰±۰/۶۳ bcd	۶۴/۱۶±۰/۸۳ b	۱۱/۳۳±۰/۴۲ b
۶ (S15/P45)	۵/۹۲۲۵±۰/۵۰ e	۲۱/۰۰±۰/۴۴ def	۶۲/۵۰±۱/۴۴ b	۱۳/۱۶±۱/۱۹ ab
۷ (S35/P25)	۹/۳۲۰۰±۱/۰۰ c	۲۵/۰۰±۱/۰۰ bc	۶۳/۱۲±۰/۶۲ b	۱۲/۳۳±۰/۹۱ ab
۸ (S35/P35)	۲۰/۲۹۴±۰/۳۳ a	۲۵/۸۰±۱/۶۵ b	۶۱/۶۶±۱/۶۶ b	۱۲/۸۰±۰/۹۶ ab

۹ (S35/P45)	۱۲/۷۷۷±۰/۳۳ [b]	۳۱/۲۵±۰/۳۶ [a]	۵۸/۳۳±۰/۸۳ [c]	۱۱/۶۲±۰/۵۹ [ab]
میانگین اثرات اصلی				
۲۵ درصد پروتئین	۸/۸۳۳±۰/۳۶ [c]	۲۰/۳۴±۰/۵۵ [b]	۶۶/۰۴±۰/۵۰ [a]	۱۲/۸۸±۰/۵۰
۳۵ درصد پروتئین	۱۱/۱۲۰±۰/۳۵ [a]	۲۳/۶۹±۰/۵۴ [a]	۶۲/۴۳±۰/۵۰ [b]	۱۱/۹۹±۰/۴۹
۴۵ درصد پروتئین	۸/۹۲۵±۰/۳۶ [b]	۲۴/۰۸±۰/۵۱ [a]	۶۲/۷۷±۰/۴۹ [b]	۱۲/۲۰±۰/۴۶
شوری ۳-۰ ppt	۶/۹۹۲±۰/۳۷ [c]	۱۹/۷۰±۰/۵۲ [b]	۶۶/۰۴±۰/۴۶ [a]	۱۲/۶۷±۰/۴۷
شوری ۱۵-۱۲ ppt	۷/۷۵۶±۰/۳۱ [b]	۲۱/۰۶±۰/۵۵ [b]	۶۴/۷۲±۰/۵۲ [a]	۱۲/۱۶±۰/۵۰
شوری ۳۵-۳۲ ppt	۱۴/۱۳۰±۰/۳۷ [a]	۲۷/۳۵±۰/۵۳ [a]	۶۰/۴۸±۰/۵۰ [b]	۱۲/۲۵±۰/۴۸
آزمون واریانس دو طرفه				
پروتئین	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۴۲
شوری	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۷۲
شوری×پروتئین	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۱۴

*حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف معنی دار بین گروه‌های آزمایشی می‌باشد (P<۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه‌گیری

براساس مطالعات مهم‌ترین عامل زیست محیطی مؤثر بر فیزیولوژی و نحوه تغذیه در آبزیان شوری می‌باشد (Rubio *et al*., 2005; Bagheri *et al*., 2010). همچنین، در هر دو رژیم غذایی طبیعی و فرموله شده، پروتئین بیشترین ماده در جیره غذایی می‌باشد و نقش حیاتی در رشد و تکامل میگو ایفا می‌کند (Sudaryono *et al*., 1995 ; Lemos *et al*., 2000). همچنین بازده جیره غذایی به یکی از اهداف مهم در پرورش آبزیان تبدیل شده است (Gong *et al*., 2012 ; Kause *et al*., 2006). علاوه بر این، بررسی وضعیت فیزیولوژی و سیستم ایمنی میگو برای پیشگیری و کنترل از بیماری بسیار اهمیت دارد (Raico *et al*., 2003). به طور کلی، هموسیت‌ها یکی از خطوط دفاعی میگو می‌باشند و می‌تواند به عنوان نشانگر زیستی بالقوه جهت بررسی و ارزیابی وضعیت سلامت میگو مورد استفاده قرار گیرد (Annies and Rosamma, 2007). تغییرات محیط زیست، سخت پوستان را وادار می‌سازد که وضعیت ایمنی بدن خود را تغییر دهند. این نوسانات اغلب موجب استرس در سخت پوستان شده و در نتیجه قدرت ایمنی بدن کاهش می‌یابد (Le Moullac and Haffner, 2000). بدین جهت ضرورت ایجاب می‌کند که در مورد مواد مغذی انرژی‌زا توأم با شرایط محیطی و اثرات آن‌ها بر سیستم ایمنی این گونه مطالعاتی صورت گیرد.

تنش شوری باعث لیز سلولی و کاهش تعداد هموسیت‌ها می‌شود (Perazzolo *et al*., 2002 ; Pipe and Coles, 1995; Sanchez *et al*., 2001). همچنین به نظر می‌رسد فاصله گرفتن از میزان مطلوب پروتئین جیره غذایی باعث صرف انرژی جهت مقابله با تنش ایجاد شده شود و هموسیت‌های کمتری ساخته شود، به همین دلیل تعداد هموسیت-ها در میگوهای تغذیه شده با سطوح ۲۵ و ۴۵٪ پروتئین در تحقیق حاضر کمتر شده است. Lin و همکاران نیز (۲۰۱۲) طی بررسی خود روی میگوی پا سفید غربی مشاهده نمودند که تعداد کل هموسیت‌های در گردش هملنف در میگوهای پرورش یافته در شوری ۲/۵ و ۵ ppt نسبت به میگوهای پرورش یافته در شوری ۳۵ ppt کمتر بود. به طور کلی تحقیقات فراوانی پیرامون اثر شوری محیط بر تعداد کل هموسیت‌ها صورت گرفته که در تمام آن‌ها کاهش تعداد هموسیت‌ها در اثر کاهش شوری محیط گزارش شد (Wang and Chen, 2005; Le Moullac and Haffiner, 2000; 2006)، که مشابه با نتایج تحقیق حاضر می‌باشند.

سلول‌های گرانولوسیت (GC) ۱۰تا۲۰٪ از هموسیت-های در گردش خون را به خود اختصاص می‌دهند. سلول‌های مذکور دارای فعالیت فاگوسیتوزی بوده و محل ذخیره آنزیم پروفنول اکسیداز است (Aguirre-Guzman *et al*., 2009). مطابق با جدول ۳، درصد سلول‌های گرانولوسیت همولنف تحت تأثیر پروتئین جیره غذایی و شوری آب محیط و برهم‌کنش هر دو عامل قرار گرفت و با افزایش آن‌ها میزان این سلول‌ها نیز افزایش یافت. در مطالعه Lin و همکاران (۲۰۱۲) نیز در میگوهای پا سفید غربی پرورش داده شده در شوری‌های ۲/۵ و ۵ قسمت در هزار، میزان GC پایین‌تری داشتند. همچنین براساس یافته‌های Wang و Chen (۲۰۰۶) نیز در میگوی *P. monodon* میزان سلول‌های GC با کاهش شوری کمتر شده است. به طور کلی استرس‌های محیطی خارج از محدوده تحمل آبزی می‌تواند فعالیت اندامک میتوکندری را تغییر داده و در نتیجه حجم هموسیت‌های در گردش کاهش می‌یابد (Le Moullac and Haffner, 2000; Johnson,1980)، به نظر می‌رسد، شوری پایین در آزمایش حاضر برای گونه شوری پسند مثل میگوی پا سفید غربی و میزان پایین پروتئین جیره غذایی نیز به نوعی عامل استرس زا محسوب شده و منجر به کاهش تعداد سلول‌های گرانولوسیت‌ها می‌شود.

براساس نتایج تحقیق حاضر، مشاهده شد که درصد سلول‌های سمی گرانولوسیت (SGC) با افزایش پروتئین جیره غذایی از ۲۵ به ۳۵٪ کاهش و سپس با افزایش سطح پروتئین از ۳۵ به ۴۵ درصد به طور غیر معناداری افزایش پیدا کرد. همچنین با نوسانات شوری آب و افزایش این فاکتور میزان سلول‌های سمی‌گرانولوسیت روند کاهشی داشت. علاوه بر این، میزان این سلول‌ها تحت تأثیر بر هم‌کنش هر دو عامل متغیر مورد آزمایش نیز قرار گرفت. سلول‌های سمی گرانولوسیت تقریباً ۷۵٪ از هموسیت‌های در گردش را شامل می‌شوند. این سلول‌ها مسئول شناسایی عوامل مهاجم بوده و با یکدیگر تشکیل ندول پروتئینی می‌دهند و باعث فعال سازی سیستم پروفنول اکسیداز می‌شوند (Aguirre- Guzman *et al*., 2009) و هنگامی که میگو در شرایط مناسب محیطی و تغذیه‌ای قرار داشته باشد، تعداد این سلول-ها کم و هیچ استرسی به جاندار وارد نمی‌شود که بخواهد با عامل تنش زا از طریق افزایش سلول‌های سمی‌گرانولوسیت مقابله کند. در حالی که قرار گیری میگو در شرایط استرس‌زای قابل تحمل افزایش میزان سلول‌های SGC را به دنبال خواهد داشت. احتمالاً، با توجه به این که هموسیت‌ها اختصاصی عمل نمی-کنند، میزان پروتئین پایین و بالاتر از حد مطلوب و شوری کم را عامل استرس‌زا شناسایی می‌کنند و جهت مقابله با آن تعدادشان در همولنف افزایش پیدا می‌کند. Wang و Chen (۲۰۰۶) مشاهده نمودند که در میگوی *P. monodon* میزان سلول‌های سمی گرانولوسیت در شوری پایین ۵ و ۱۵ قسمت در هزار کم و با افزایش شوری از ۲۵ به ppt ۳۵ نیز مجدد کاهش یافت. هیالونوسیت‌ها ۵ تا ۱۵ درصد از سلول-های خونی را تشکیل می‌دهند. هیالونوسیت‌ها هیچ فعالیت فاگوسیتوزی ندارند. نقش اصلی این سلول‌ها مرتبط با لخته شدن خون می‌باشد (Aguirre-Guzman *et al*., 2009). بنابراین، تغییرات پروتئین جیره غذایی و شوری آب را عامل مهاجم شناسایی نمی‌کند، در نتیجه تفاوت معناداری نیز در میزان این سلول‌ها مشاهده نمی‌شود. با این حال مشاهده شد که روندی مشابه با روند سلول‌های سمی‌گرانولوسیت دارد. طبق مطالعه Lin و همکاران (۲۰۱۲)، با کاهش شوری به ۲/۵ و ۵ قسمت در هزار میزان سلول‌های هیالونوسیت میگوی پا سفید غربی کاهش یافت. همچنین Wang و Chen (۲۰۰۶) نیز به این نتیجه رسیدند که در میگوی *P. monodon* در شوری کم ۵ و ppt ۱۵ تعداد هیالونوسیت‌ها پایین و علاوه بر این نیز با افزایش شوری از ۲۵ به ۳۵ قسمت در هزار نیز مجدد کاهش پیدا کرد. بدین ترتیب براساس نوع فعالیت این سلول‌ها به دلیل سالم بودن میگوها و عدم

جراحت یا بیماری تعداد این سلول‌ها در نتایج کسب شده در آزمایش حاضر در تیمارهای مختلف تفاوتی مشاهده نگردید. بنابراین، سطوح انتخاب شده برای پروتئین جیره غذایی از نظر ایمنی برای گونه مذکور خطر آفرین نبوده و در دامنه تحمل این میگو می-باشد. هر چند که نتایج نشان داده است که سطح ۳۵٪ پروتئین جیره غذایی از نظر عملکرد ایمنی بهتر بوده است. همچنین بررسی نتایج نشان داد که در صورت عدم وجود پاتوژن‌های بیماری‌زا در محیط زیست، سطوح متفاوت شوری آب نیز برای گونه پا سفید غربی مشکل آفرین نیست. با این حال سطح ۳۵-۳۲ ppt جهت فعالیت بهتر خطوط دفاعی میگو مناسب‌تر می‌باشد. زیرا میگو در استرس نبوده و در صورت هجوم عوامل بیماری‌زا به جاندار آسیب کمتری وارد می‌شود.

سپاسگزاری

از جناب آقایان مهندس نعیم پورمحمد و مرتضی سوری و از مدیریت و کارکنان محترم مرکز تکثیر میگو و ماهیان دریایی بندر امام خمینی (ره) که در فراهم نمودن امکانت انجام این تحقیق نهایت همکاری را مبذول داشتند، قدردانی می‌شود.

منابع

Afsharnasab M., Arefzadeh SA., Mortezaee SR., Dashtiannasab A.and Jorfi E. 2011. Taura Syndrome Virus pathology and molecular studies in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Iran. Journal of Comparative Pathobiology. 8(2): 459-466.

Aguirre-Guzman G., Sanchez-Martinez JG., Campa-Cordova AI., Luna-Gonzalez A. and Ascencio, F. 2009. Penaeid Shrimp Immune System. Thai Journal of Veterinary Medicine. 39(3): 205-215.

Alfaro-Montoya J. 2010. The reproductive conditions of male shrimps, genus Penaeus, sub-genus Litopenaeus (open thelyca penaeoid shrimps). Aquaculture. 300: 1-9.

Alfaro-Montoya J.and Vega L. 2011. The effect of environmental cues and neurotransmitters on male sexuality of the eastern Pacific Penaeus (Litopenaeus) species. Aquaculture. 316: 60-67.

An MI. and Choi CY. 2010. Activity of antioxidant enzymes and physiological responses in ark shell, *Scapharca broughtonii*, exposed to thermal and osmotic stress: Effects on hemolymph and biochemical parameters. Comparative Biochemistry and Physiology. 155 B: 34-42.

Annies J. and Rosamma P. 2007. Acute salinity stress alters the haemolymph metabolic profile of *Penaeus monodon* and reduces immunocompetence to white spot syndrome virus infection. Aquaculture. 272: 87–97.

Arshadi A., Yavari V., Ougifard A. and Mousavi S.M. 2016. Effect of different levels of dietary nucleotide on growth and haemolymph biochemical parameters of female *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during maturation and eyestalk ablation. Journal of Marine Science and Technology. 15(2):115-129.

Bagheri D., Rafiee Gh., MojaziAmiri B., Mirvaghefi A. and Dehghani A. 2010. The effects of salinity on the haemolymph osmolality and ionic level in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Fisheries, Iranian Journal of Natural Resources. 63(3): 161-172.

Barbieri E. 2009. Effects of zinc and cadmium on oxygen consumption and ammonium excretion in pink shrimp (*Farfantepenaeus paulensis*, Pe´rez-Farfante, 1967, Crustacean Ecotoxicology. 18: 312-318.

Barbieri E. 2010. Acute toxicity of ammonia in white shrimp (*Litopenaeus schmitti*) (Burkenroad, 1936, Crustacea) at different salinity levels. Aquaculture. 306: 329–333.

Battison A., Cawthorn R. and Horney B. 2003. Classification of *Homarus americanus* hemocytes and the use of differential hemocyte counts in lobsters infected with Aerococcus viridans var. homari (Gaffkemia). Journal of Invertebrate Pathology. 843: 177-197.

Boeuf G. and Payan P. 2001. How should salinity influence fish growth. Camparative Biochemistry and Physiology. 130: 411-423.

Charoensapsri W., Sangsuriya P., Lertwimol T., Gangnonngiw W., Phiwsaiya K. and Senapin S. 2015. Laminin receptor protein is implicated in hemocyte homeostasis for the whiteleg shrimp *Penaeus* (*Litopenaeus*)

different genetic potential on alternative diets. Journal of Animal Science. 84: 807-817.
Le Moullac G. and Haffner P. 2000. Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191: 121-131.
Lemos D., Ezquerra JM. and Garcia-Carreno FL. 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feed digestibility. Aquaculture. 186: 89-105.
Lin Sh., Lin X., Yang Y., Li F. and Luo L. 2013. Comparison of chelated zinc and zinc sulfate as zinc sources for growth and immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture. 406-407: 79-84.
Lin YC., Chen JC., Li CC., Morni WZ., Shahrir A., Suhaili NA ., KuoYH., Chang YH., Chen LL., Tsui WC., Chenand YY. and Huang CL. 2012. Modulation of the innate immune system in white shrimp *Litopenaeus vannamei* following long-term low salinity exposure. Fish and Shellfish Immunology. 33: 324-331.
Liu H., Tan B., Yang J., Chi S., Dong X. and Yang Q. 2014. Effects of aqueous Na/K and dietary K on growth and physiological characters of the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, reared in low-salt well water. Aquaculture Research. 45: 1-14.
Lorenzon S., Martinis M., Borme D. and Ferrero EA. 2013. Hemolymph parameters as physiological biomarkers for monitoring the effects of fishing and commercial maintenance methods in *Squilla mantis* (Crustacea, Stomatopoda). Fisheries Research. 137: 9-17.
Matinfar A., RamezaniFard E. and Hoghoughipour M. 2008. Impact of temperatures and salinity on growth and survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles. Iranian Journal of Pajouhesh and Sazandegi. 77: 96-104.
Mohammadi Makvandi Z., Kuchanin P. and Pasha Zanusi H. 2012. Effect of salinity on growth and survival (H*ypophthalmichthys molictrix*) finger ling. Journal of Aquaculture and Fisheris. 3(11): 19-26.
Musavi H. 2006. Fish feeding principles (warm water, cold water, shrimp, Acipenseridae, Aquarium). Paplishers of Sanam. 482p.
Perazzolo LM., Gargioni R., Ogliari P. and Barranco MAA. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted *vannamei*. Developmental and Comparative Immunology. 51: 39-47.
Cheng SY., Hsu SW. and Chen JC. 2007. Effect of sulphide on the immune response and susceptibility to Vibrio alginolyticus in the kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology. 22: 16–26.
Chong-Robles J., Charmantier G., Boulo V., Lizárraga-Valdéz J., Enríquez-Paredes L. and Giffard-Mena I. 2014. Osmoregulation pattern and salinity tolerance of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) during post-embryonic development. Aquaculture. 422–423: 261–267.
Clive MJ. 2009. Temperature and Salinity Tolerances of the Tropical Spiny Lobster, *Panulirus ornatus.* Journal of the World Aquaculture Society. 40: 744-752.
FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2011. Online Query Panel: Global Aquaculture Production 1950–2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Fisheries and Aquaculture Department. http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en.
Giulianini PG., Bierti M., Lorenzon S., Battistella S. and Ferrero EA. 2007. Ultrastructural and functional characterization of circulating hemocytes from the freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*: Cell types and their role after in vivo artificial non-self challenge. Micron. 38: 49-57.
Gong H., Jiang D., Alig F. and Lawrence AL. 2012. Effects of dietary protein level and source on the growth and survival of two genetic lines of specific-pathogen-free Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture. 338-341: 118-123.
Intanai I., Taylor EW. and Whiteley NM. 2009. Effects of salinity on rates of protein synthesis and oxygen uptake in the post-larvae and juveniles of the tropical prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Comparative Biochemistry and Physiology. 152 A: 372-378.
Johnson PT. 1980. Histology of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*: A Model for the Decapoda. Praeger, New York, 440 p.
Kause A., Tobin D., Houlihan DF., Martin SAM., Mäntysaari EA., Ritola O. and Ruohonen K. 2006. Feed efficiency of rainbow trout can be improved through selection:

Oxygen consumption and ammonia-N excretion related to protein requirements for growth of white shrimp *Penaeus setiferus* juveniles. Aquaculture Research. 29: 823-833.
Tuan L.A. and Williams KC. 2007. Optimum dietary protein and lipid specifications for juvenile malabar grouper (*Epinephelus malabaricus*). Aquaculture. 267: 129-138.
Varsamos S., Wendelaar Bonga SE., Charmantier G. and Flik G. 2004. Drinking and Na+/K+ ATPase activity during early development of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Ontogeny and short-term regulation following acute salinity changes. Journal of Exprimental Maine. Biology and Ecology. 311: 189-200.
Venero JA., Allen Davis D. and Rouse DB. 2007. Variable feed allowance with constant protein input for the pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* reared under semi-intensive conditions in tanks and ponds. Aquaculture. 269: 490-503.
Wang FI. and Chen, JC. 2006. Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to Photobacterium damselae subsp. Damselae. Fish and Shellfish Immunology. 20: 671-681.
Wang LU. and Chen JC. 2005. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. Fish and Shellfish Immunol. 18: 269-278
Wickins JF. and Lee DO. 2007. Frontmatter, in Crustacean Farming: Ranching and Culture, Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK.
Xie SW., Tian LX., Jin Y., Yang HJ., Liang GY. and Liu YJ. 2014. Effect of glycine supplementation on growth performance, body composition and salinity stress of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* fed low fishmeal diet. Aquaculture. 418 -419: 159-164.
Zhou QC., Zeng WP., Wang HL., Wang T., Wang YL. and Xie FJ. 2012. Dietary arginine requirement of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei.* Aquacalture. 364-365: 252-258.
Zhou QC., Wang YL., Wang HL. and Tan BP. 2013. Dietary threonine requirements of juvenile Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. 392-395: 142-147.
to environmental and physiological stress. Aquaculture. 214: 19-33.
Pipe RK. and Coles JA. 1995. Environmental contaminations in influencing immune function in marine bivalve mollusks. Fish and Shellfish Immunology. 5: 581-595.
Raico E., Lamela L., Silveira R. and Martinez M. 2003. Actividad peroxidasa (POD) en juveniles del camaron *Litopenaeus schmitti.* II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura (CIVA). pp.99-104.
Rosas C., Lopez N., Mercado P. and Martínez E. 2001. Effect of salinity acclimation on oxygen consumption of juveniles of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Crustacean Biology. 21(4): 912-922.
Rubio VC., Sánchez-Vázquez FJ. and Madrid JA. 2005**.** Effects of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. Physiology and Behavior. 85(3): 333-339**.**
Sadeghi N. and Norouzi H. 2007. Reproduction and Culture of Feresh Water Prawn. Rahe Danaee. Tehran. 152 p.
Samadi L. 2012. The effect of garlic extract (*Allium sativum*) on growth and heamolymph parameters in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). M.Sc thesis. Fish culture and fisheries group. Khorramshahr University of Marine Scince and Technology. 79p.
Sanchez A., Pascual C., Vargas-Albores F., LeMoullac G. and Rosas C. 2001. Haemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. Aquaculture. 198: 13-28.
Samnejhad A. and Afsharnasab M. 2016. Study of total hemocyte count and total plasma protein in immune system of freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*). Journal of Marine Science and Technology. 15(1):49-58.
Statistical Yearbook of the Iranian Fisheries Organization 2003-2013. 2014. Iranian Fisheries Organization/ Department of Development and Resources Management/ Office of Management and Budget/ Units for Statistics. 64 p.
Sudaryono A., Hoxey MJ., Kailis SG. and Evans LH. 1995. Investigation of alternative protein sources in practical diets for juvenile shrimp, *Penaeus monodon.* Aquaculture. 134: 313-323.
Taboada G., Gaxiola G., Garcia T., Pedroza R., Sanchez A., Soto LA. and Rosas C. 1998.

The effect of salinity and dietary protein on cellular parameters of hemolymph in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931) juvenile

Masoumi. Z, Zakeri. M*, Yavari. V and Mousavi. S.M

Department, Faculty of Marine Natural Resources, Khorramshahr University on Marine Science and Technology, Khorramshahr.

(DOI): 10.22113/jmst.2018.117557.2114

Abstract

In this study, the effects of different dietary protein and salinity levels on cellular parameters of hemolymph in white leg shrimp (as a part of immune system) of the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juvenile were studied. The number of 350 shrimps with the average weight of 5.55±0.18 g and length of 8.81±0.15 cm were distributed randomly in 27 ten tones (length: 600 cm, width: 170 cm and height: 100 cm) concrete tanks. A 3×3 factorial experimental including three levels of salinity (0-3, 12-15 and 32-35 ppt) and three dietary protein levels (25, 35 and 45%). Experimental shrimps were fed to satiation 4 times a day throughout the experimental 56 days. According to the results cellular parameters like: total hemocytes count (THC) and differential hemocyte count (DHC) were analysed and recorded. The dietary protein levels 35% and salinity of 32-35 ppt had direct positive impact on THC and granular cells (GC). Although the semi granular poisonous cells have been decreased with the increase in both of the experimental variables (P≤ 0/05) and no effected on the agranular cells. So based on the results of this study, the protein diet with the 35% is suggested for *L. vannamei*. Taking in to consideration the results of the study we can say the best water salinity for culture of this species is 32-35 ppt.

Keywords: Dietary protein, Cellular parameter, Hemolymph, Salinity, *Litopeneus vannamei*.

List of tables & figures

Figure 1. Experimental treatments.
Figure 2. Ingredients and proximate composition of experimental diets.
Figure 3. Analysis of Hemolymph Hemocytes of *L.vannamei* reared at different levels of dietary protein and water salinity.

*Correspending author, E-mail: zakeri.mhd@gmail.com