

مقاله پژوهشی

بررسی شاخص‌های همولنف و ایمنی ذاتی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) تغذیه شده با عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای و پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis* IS0)

پریا اکبری^{۱*}، اشکان اژدری^۲

DOI: 10.22124/japb.2025.28719.1555

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۴۰۳

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۳

چکیده

این پژوهش با هدف ارزیابی تأثیر عصاره آبی ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای و باکتری *Bacillus subtilis* IS0 بر شاخص‌های همولنف و ایمنی غیراختصاصی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مورد بررسی قرار گرفت. ۲۴۰۰ قطعه پست‌لارو با میانگین وزنی 29 ± 0.87 میلی‌گرم با تراکم ۱۰۰ قطعه در ۸ گروه (با سه تکرار) ذخیره‌سازی شدند. گروه شاهد از جیره غذایی فاقد عصاره ترکیبی ماکرو جلبک (MPE) و پروبیوتیک تک‌سل (P) و بقیه گروه‌ها به ترتیب از جیره غذایی حاوی ۱۵ گرم در کیلوگرم MPE، پروبیوتیک ۱ درصد (P_۱)، ۲ درصد (P_۲)، ۳ درصد (P_۳) و ترکیب عصاره ماکرو جلبک‌ها و پروبیوتیک (MPE+P_۱، MPE+P_۲، MPE+P_۳) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. نتایج نشان داد که بیشترین تعداد کل هموسیت در گروه‌های تغذیه شده با MPE+P_۲ و MPE+P_۳ به ترتیب $15/10 \pm 0.36$ و $15/36 \pm 0.35$ میلیون در میلی‌لیتر مشاهده شد که با بقیه گروه‌های آزمایشی و شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$). استفاده همزمان عصاره و غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های گرانولار، نیمه‌گرانولار و هیالین نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی شد که بیشترین تعداد این سلول‌ها در گروه‌های تغذیه شده با MPE+P_۲ و MPE+P_۳ مشاهده شد ($P < 0.05$). بیشترین میزان پروتئین ($111/47 \pm 9/21$) میلی‌گرم در میلی‌لیتر و کمترین میزان گلوکز ($9/0 \pm 0.91$) میلی‌گرم در دسی‌لیتر در گروه تغذیه شده با MPE+P_۲ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی نشان داد ($P < 0.05$). نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده همزمان عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای و پروبیوتیک تک‌سل ۲ درصد، باعث بهبود شاخص‌های همولنف و سیستم ایمنی ذاتی در میگوی سفید غربی شد.

واژگان کلیدی: عصاره ترکیبی ماکرو جلبک، پروبیوتیک تک‌سل، میگوی سفید غربی، همولنف، ایمنی ذاتی.

- ۱- استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.
- ۲- دکتری بهداشت آبزیان، مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، چابهار، ایران.

* نویسنده مسئول: paria.akbary@gmail.com

مقدمه

عوامل میکروبی میزبان و یا تعادل میکروبی محیط به دست می‌آید (Merrifield et al., 2010; Butt et al., 2021). استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری یک مفهوم نسبتاً جدید در دو دهه گذشته است. با توجه به اثرات کاهنده بیماری‌های باکتریایی توسط پروبیوتیک‌ها استفاده از آنها در آبی‌پروری به سرعت رو به گسترش است (Butt et al., 2021). مصرف غذاهای حاوی باکتری‌های زنده، قدیمی‌ترین و گسترده‌ترین روش برای افزایش تعداد باکتری‌های مفید در روده است (Merrifield et al., 2010). پروبیوتیک‌های خوراکی میکروارگانیسم‌هایی هستند که از طریق غذا به دستگاه گوارش معرفی می‌شوند و می‌توانند به نفع میکروفلور روده و همچنین سلامت میزبان فعالیت کنند. همچنین بیشترین پروبیوتیک مورد استفاده در سخت‌پوستان به جنس *Bacillus* تعلق دارد (Farzanfar, 2006). به طور کلی گونه‌های *Bacillus* مورد آزمایش در پرورش میگوها بر اساس فعالیت‌های ضد میکروبی خود درباره سویه‌های بیماری‌زای *Vibrio* و طبق آزمایش‌های آنتاگونیسم آزمایشگاهی انتخاب شده‌اند (Rengpipat et al., 1998; Decamp, 2008; Liu et al.,

در سال‌های اخیر آنتی‌بیوتیک‌ها نگرانی‌های زیادی را در مصرف‌کنندگان آبزیان به وجود آورده است که همین امر منجر به ممنوعیت استفاده آنها از سوی اتحادیه اروپا شده است. از این رو، مطالعات بسیاری برای یافتن جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها در جهت کاهش مصرف آنها صورت گرفته است (Munaei et al., 2014). یکی از موثرترین روش‌هایی که می‌تواند به ارتقا و بهبود سلامتی و عملکرد سیستم ایمنی آبزیان کمک کند. استفاده از افزودنی‌های غذایی است که در بسیاری از موارد این افزودنی‌ها فاقد ارزش غذایی هستند و توانایی تغییر ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی جیره غذایی، عملکرد پاسخ‌های ایمنی و رشد را در موجودات آبی دارند (Castillo et al., 2014).

جستجو برای روش‌های جایگزین، راه را برای توسعه و استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان عامل موثری برای سلامت و بهداشت مدیریت در آبی‌پروری هموار کرد که با ارتقا در وضعیت سلامت، عملکرد رشد، مصرف بهینه غذا، مقاومت در برابر بیماری‌ها، پاسخ به عوامل استرس‌زا یا توان عمومی بدن، موجب بهره‌بردن میزبان می‌شود و این اثرات از طریق بهبود

روش برای کنترل عوامل بیماری‌زا در مقایسه با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها است (Ghaednia et al., 2020).

از طرفی، مطالعات اخیر نشان داده است که جلبک‌های دریایی به دلیل در دسترس بودن، هزینه پایین و ارزش غذایی بالا، پتانسیل افزوده شدن به خوراک آبزیان را به عنوان مکمل غذایی دارد (Kazemi et al., 2018). جلبک‌های دریایی دارای مقادیر زیادی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و انواع کارتنوئیدها هستند و بیشتر جلبک‌های دریایی را به عنوان مواد کاربردی با ارزش بالا مورد استفاده قرار می‌دهند (Pereira, 2012). از مهم‌ترین منابع زیستی و طبیعی کشور که ارزش اقتصادی و کاربردهای شیلاتی بسیاری دارد، وجود جلبک‌های دریایی است که از استعدادهای بالقوه سواحل جنوبی کشور محسوب می‌شوند (Rabiei et al., 2007). افزایش رشد و بهبود سلامتی، ارتقا سیستم ایمنی و بهبود طبیعی فلور روده و معده از فواید استفاده از عصاره‌های جلبکی به عنوان افزودنی‌های غذایی به جیره است (Chojnacka et al., 2012).

مطالعات متعددی در ارتباط با بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های همولف و ایمنی ذاتی سخت‌پوستان صورت گرفته است، به عنوان

2010; Zokaeifar et al., 2012; Lim et al., 2019). در حال حاضر بزرگ‌ترین بخش از بازار مواد غذایی فراسودمند، از میان غذاهایی که با هدف بهبود تعادل و فعالیت میکروبی فلور روده تهیه شده‌اند، ارائه می‌شود. پرورش میگو یک فعالیت تولیدی و اقتصادی است که کاهش هزینه‌ها می‌تواند بر افزایش سودآوری آن اثرگذار باشد. از آنجایی که بیشترین هزینه‌های پرورش میگو به ترتیب شامل غذا به میزان ۶۰ تا ۷۰ درصد و تامین لارو حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد است، در مجموع حدود ۷۰ تا ۸۵ درصد کل هزینه عملیات پرورش را شامل می‌شود. از جمله نقش‌های پروبیوتیک‌ها در آبی‌پروری، کاهش ضریب تبدیل غذایی (FCR) و افزایش بازماندگی است (Tacon et al., 2002; Xue et al., 2016; Adel et al., 2017). با وجود این که آبی‌پروری در ایران یکی از محورهای توسعه استان‌های شمالی و جنوبی کشور محسوب می‌شود، ولی کاربرد و توسعه پروبیوتیک‌ها در صنعت آبی‌پروری در مقایسه با کشورهای دیگر ناچیز است. از آن جهت که کنترل بیماری‌ها نیاز به اقدامات نوینی دارد که مقرون به صرفه، موثر و سازگار با محیط زیست باشد، استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنعت پرورش آبزیان به عنوان بهترین، ارزان‌ترین و موثرترین

میگوهای تغذیه شده با وعده‌های ماکرو جلبک به طور معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. از این رو، مطالعه حاضر به بررسی تاثیر عصاره آبی ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای (*Nizimuddin*، *Sargassum ilicifolium*) و *Padina australis zanardini* و *Cystoseira indica* به میزان ۱۵ گرم در کیلوگرم جیره و سطوح مختلف باکتری *Bacillus subtilis* (پروبیوتیک تک‌سل) بر شاخص‌های همولنف و ایمنی ذاتی میگوی سفید غربی پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری ماکرو جلبک‌ها و تهیه مخلوط

ماکرو جلبک‌ها

ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای شامل *Sargassum ilicifolium*، *Nizimuddin zanardini* و *Padina australis* در آذرماه ۱۴۰۲ از سواحل چابهار (دریا بزرگ و تیس) هنگام جزر جمع‌آوری و پس از حمل به آزمایشگاه مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار، با آب شیرین چندین بار شستشو شدند تا موجودات اپی‌فیت و گل و لای آن کاملاً از بین برود. سپس در سایه و در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) خشک شدند. پس از آسیاب

مثال پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بچه شاه‌میگوی آب شیرین (*Vaezi et al.*، *Astacus leptodactylus* 2018)، باکتری‌های پروبیوتیکی تجاری و بومی (*Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis*) در جیره غذایی میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) (Abdollahi Arpanahi et al., 2019)، پروبیوتیک تجاری از گونه‌های باکتری *Bacillus* به نام *SANOLIFE®PRO-W* (شامل *B. subtilis* و *B. licheniformis*) در محیط آب میگوهای سفید غربی (Monier et al., 2023). از طرفی مطالعاتی در ارتباط با بررسی اثر عصاره ماکرو جلبک‌ها بر شاخص‌های همولنف و ایمنی ذاتی میگوی سفید غربی صورت گرفته است (Zhang et al., 2023). به عنوان مثال Zhang و همکاران (۲۰۲۳) با بررسی اثرات ۹ گونه ماکرو جلبک بومی در سواحل گرمسیری چین بر رشد و عملکرد سلامت فیزیولوژیکی میگوهای سفید غربی نشان دادند که ظرفیت دفاع ایمنی (شمارش کل هموسیت، انفجارهای تنفسی فاگوسیتوز، سیستم پروفنل اکسیداز، فعالیت هماگلوتنین و فعالیت‌های ضدباکتریایی و باکتریولیتیک)

تهیه جیره‌های غذایی حاوی عصاره ترکیبی و پروبیوتیک تک‌سل

به منظور تهیه جیره‌های حاوی عصاره ترکیبی و پروبیوتیک تک‌سل (*Bacillus subtilis*)، ابتدا مقدار غذای کنسانتره (فرادانه، ایران؛ ۲۸ درصد پروتئین، ۹ درصد چربی، ۲۵ درصد فیبر و ۹ درصد رطوبت) برای کل دوره (۸ هفته) برای هر تیمار محاسبه شد. سپس با درصد مشخص آب مقطر و روغن (۱:۱) عصاره به جیره اسپری و در مجاورت دمای اتاق خشک شد. همچنین برای تهیه جیره‌های آزمایشی حاوی باکتری *Bacillus subtilis* ISO (با نام تجاری تک‌سل، تک‌ژن زیست، ایران) با غلظت $10^{12} \times 2/5$ سلول در گرم و جیره‌های آزمایشی حاوی عصاره و پروبیوتیک تک‌سل از روش Wache و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. به این ترتیب که ۱، ۲ و ۳ گرم پروبیوتیک تک‌سل به ازای هر ۱۰۰ گرم جیره و عصاره جلبک (۱۵ گرم در کیلوگرم) با روغن ماهی مخلوط شد. سپس سوسپانسیون پروبیوتیک-جلبک و روغن بر روی غذا اسپری و در مجاورت دمای اتاق خشک شد. سپس برای مصرف در کل دوره آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

کردن هر یک از ماکروجلبک‌ها توسط آسیاب برقی، پودر مخلوط از چهار گونه ماکروجلبک (۱:۱:۱:۱) آماده شد و تا زمان استفاده بعدی در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Choi et al., 2014, 2015).

آماده‌سازی عصاره ترکیبی ماکروجلبک‌ها

برای تهیه عصاره آبی، از مخلوط ماکروجلبک‌ها (سه تکرار)، مقدار ۵ گرم پودر ترکیبی با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه به‌خوبی تکان داده شد. سپس درب ظروف بسته شد و به مدت ۷۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. سپس محلول رویی با دقت جمع‌آوری و پس از عبور از کاغذ صافی (کاغذ واتمن شماره ۱)، با استفاده از دستگاه تبخیرکننده چرخان (IKA، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت تغلیظ شد. در نهایت عصاره به دست آمده، در ظرف پتری تمیز زیر هود لامینار قرار گرفت تا بقیه حلال باقی‌مانده تبخیر شد و به شکل جامد درآمد. ترکیب به دست آمده تا زمان استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Chouhury et al., 2005). عصاره ترکیبی ماکروجلبک‌ها به عنوان افزودنی خوراک در جیره‌های غذایی آزمایشی استفاده شد.

تهیه میگو و تیماربندی

تعداد ۲۴۰۰ قطعه پستلارو میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از مرکز تکثیر اژدر میگو (شهرستان کنارک، استان سیستان و بلوچستان) خریداری و به وسیله کیسه‌های دوجداره (حاوی دو سوم هوا و یک سوم آب) به مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار، انتقال داده شد. به منظور سازگاری با شرایط آزمایشگاهی، میگوها به مدت یک هفته در دو مخزن ۳۰۰ لیتری با هوادهی مداوم نگهداری شدند. پس از سازگاری، پستلاروها با میانگین وزنی 29 ± 0.87 میلی‌گرم به طور تصادفی با تراکم ۱۰۰ قطعه در ۲۴ مخزن پلاستیکی ۶۰ لیتری توزیع شدند (۸ تیمار با سه تکرار). هوادهی مداوم و تعویض روزانه ۳۰ درصد آب هر یک از مخازن در این مرحله نیز انجام گرفت. گروه‌های مورد مطالعه به شرح جدول ۱ بودند که در چهار نوبت در روز (ساعت ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰) به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند (Akbari et al., 2020). در طول دوره آزمایش شرایط فیزیکوشیمیایی آب شامل دما (با دماسنج جیوه‌ای با دقت ۰/۱ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (با اکسیژن‌سنج دیجیتال، DO-1609، TECPEL، تایوان)، شوری (با شوری‌سنج، Hanna H198310، Instruments، آمریکا) و pH (به روش الکتریکی با pH سنج دیجیتال، PHT-3140، Ebro، آلمان) به طور روزانه اندازه‌گیری شد.

جدول ۱: تیمارهای آزمایشی در مطالعه حاضر

تیمار	نوع جیره
شاهد	جیره غذایی فاقد عصاره ترکیبی ماکرو جلبک (MPE) و پروبیوتیک تک‌سل (P)
MPE	جیره غذایی حاوی ۱۵g/kg عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها
P _۱	جیره غذایی حاوی ۱٪ پروبیوتیک تک‌سل
P _۲	جیره غذایی حاوی ۲٪ پروبیوتیک تک‌سل
P _۳	جیره غذایی حاوی ۳٪ پروبیوتیک تک‌سل
MPE+P _۱	جیره غذایی حاوی عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها + غلظت ۱٪ پروبیوتیک تک‌سل
MPE+P _۲	جیره غذایی حاوی عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها + غلظت ۲٪ پروبیوتیک تک‌سل
MPE+P _۳	جیره غذایی حاوی عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها + غلظت ۳٪ پروبیوتیک تک‌سل

میانگین دمای آب 30 ± 2 درجه سانتی‌گراد، اکسیژن $8/2 \pm 0/5$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، pH $7/5$ و شوری $35 \pm 0/47$ گرم در لیتر، در طول دوره آزمایش ثابت نگه داشته شد.

سنجش تعداد کل هموسیت و شمارش افتراقی هموسیت‌ها

نمونه‌گیری از همولنف همه گروه‌ها در پایان دوره آزمایش صورت گرفت. حدود ۱۰ دقیقه قبل از همولنف‌گیری برای کاهش استرس و تحرک، میگوها در آب تشت حاوی یخ خشک با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. همچنین به منظور جلوگیری از انعقاد همولنف میگوها از محلول خنک ضدانعقاد حاوی ۱۰ میلی‌مول Tris-HCL، ۲۵۰ میلی‌مول ساکارز و ۱۰۰ میلی‌مول سیترات سدیم با pH $7/6$ به نسبت مساوی استفاده شد. با توجه به سرعت انعقاد همولنف میگو، ابتدا سرنگ ۱ میلی‌لیتری انسولین به میزان $0/4$ میلی‌لیتر از ماده ضدانعقاد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد پر شد و سپس نوک سرنگ در ناحیه بین پاهای اول و دوم و از کنار طناب عصبی شکمی با زاویه ۴۵ درجه تنها به زیر کوتیکول (لایه قشری پوسته) اندکی فشار داده و اقدام به همولنف‌گیری ($0/4$ میلی‌لیتر) شد. بعد از گرفتن همولنف، بلافاصله محتویات

درون سرنگ به درون یک میکروتیوب استریل منتقل شد و تا مرحله سنجش شاخص‌ها به تانک ازت مایع (دمای -196 - درجه سانتی‌گراد) منتقل شد (Yang et al., 2014).

برای تعیین هموسیت کل (Total Hemocyte Count: THC)، ابتدا نمونه‌ها در دمای اتاق یخ‌زدایی و با دستگاه ورتکس (Velp، آمریکا) به مدت ۲۰ تا ۳۰ ثانیه همگن شدند. از هر نمونه همولنف حاوی ضدانعقاد، ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و با حجم برابر از بافر فرمالین (۱۰ درصد) برای ۳۰ دقیقه تثبیت شد و سپس شمارش کلی هموسیت توسط لام نتوبار (Fortuna، آلمان) و میکروسکوپ نوری (POL-EKO، لهستان) صورت پذیرفت. پس از شمارش، مقدار هموسیت کل (THC) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Song et al., 2003; Jiang et al., 2004).

رابطه ۱:

$$THC (mL^{-1}) = (H_c / 5) \times 10^5$$

Hc: تعداد سلول‌های هموسیت شمارش شده.

برای شمارش افتراقی هموسیت‌ها (Different Hemocyte Count: DHC) گسترش‌های تهیه شده از همولنف به روش Gimsa-May Grunwad رنگ‌آمیزی شد و

سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (Ghaednia et al., 2011). برای اندازه‌گیری پروتئین پلاسما کل (Total Plasma Protein: TPP) از روش Liu و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد. این روش که بر اساس تبدیل Cu^{+2} به Cu^{+} در شرایط قلیایی و واکنش مس قلیایی با پروتئین‌ها و احیای فسفومولیبدات توسط تیروزین و تریپتوفان پروتئین‌ها استوار است، در اثر ایجاد کمپلکس پروتئین با معرف فولین رنگ آبی ایجاد می‌شود که شدت رنگ به مقدار اسیدهای آمینه حلقوی بستگی دارد. سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر (Dynamica, XB-10، انگلستان) میزان جذب نوری در طول موج ۷۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با منحنی استاندارد مقایسه و میزان پروتئین محلول نمونه تعیین شد.

سنجش شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی

نیمی از نمونه‌های همولنف به همراه محلول ضدانعقاد ذخیره شده در تانک ازت مایع برای سنجش شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌ها پس از یخ‌زدایی در دمای اتاق، ابتدا در ۶۰۰۰ دور در دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (یونیورسال، سه‌پند، ایران) شدند.

سپس قسمت رویی آنها به کمک سمپلر جدا و برای سنجش شاخص‌های ایمنی مورد استفاده قرار گرفت (Yang et al., 2014).

سنجش فعالیت لیزوزیم سرم نمونه‌ها، بر اساس روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) صورت گرفت. به این ترتیب که ابتدا ۱۷۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich، آمریکا) (معادل مقدار ۰/۳۷۵ گرم در میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم با مولاریته ۰/۰۵ و pH ۶/۲) با ۲۵۰ میکرولیتر از هر نمونه مخلوط و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. میزان جذب نوری پس از ۱۵ و ۱۸۰ ثانیه به روش اسپکتروفتومتری و در طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. سپس تفاوت جذب نوری بین اولین و دومین مرحله نورسنجی ثبت شد و نتایج به دست آمده بر حسب واحد در میلی‌لیتر به کمک رسم منحنی استاندارد با استفاده از رقت‌هایی بر مبنای لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ (Sigma-Aldrich، آمریکا) تهیه شده و در بافر فسفات سدیم محاسبه شد (رقت اولیه ۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد). همچنین از بافر فسفات سدیم به عنوان بلانک استفاده شد.

سنجش پروتئین کل با استفاده از روش رنگ‌سنجی، با استفاده از کیت بیوشیمیایی

(پارس‌آزمون، ایران) و با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر بیوشیمیایی (Mindray, BS-200، چین) صورت گرفت (Sandeepa and Ammani, 2015). سنجش گلوکز بر اساس آزمون آنزیمی (گلوکز اکسیداز و پراکسیداز) صورت گرفت (Trinder, 1969).

یک‌طرفه (One-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی شد و برای رتبه‌بندی آنها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. برای تمامی شاخص‌ها برای هر گروه سه بار تکرار صورت گرفت و مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شد.

نتایج

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌های آماری با استفاد از نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۹ انجام شد. ابتدا نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف و برابری واریانس‌ها با آزمون لون بررسی شد. سپس معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها با آزمون تحلیل واریانس

شمارش کلی و افتراقی هموسیت‌ها

سنجش شاخص‌های ایمنی میگوی سفید غربی، شامل تعداد کل هموسیت، سلول‌های گرانولار، سلول‌های نیمه‌گرانولار و سلول‌های هیالین، در گروه‌های مورد آزمایش در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲: تعداد کل و ترکیب افتراقی هموسیت‌های میگوی سفید غربی بعد از ۶۰ روز تغذیه با جیره‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (میانگین $\pm$ انحراف معیار، سه تکرار)

شاخص	تعداد کل هموسیت‌ها ($\times 10^6/\text{mL}$)	سلول‌های گرانولار ($\times 10^6/\text{mL}$)	سلول‌های نیمه‌گرانولار ($\times 10^6/\text{mL}$)	سلول‌های هیالین ($\times 10^6/\text{mL}$)
شاهد	$6/30 \pm 0/40^f$	$1/70 \pm 0/02^f$	$3/84 \pm 0/05^f$	$0/75 \pm 0/10^f$
MPE	$7/23 \pm 0/20^e$	$1/95 \pm 0/05^e$	$4/41 \pm 0/12^e$	$0/86 \pm 0/02^e$
P _۱	$7/50 \pm 0/26^e$	$2/02 \pm 0/07^e$	$4/57 \pm 0/16^e$	$0/90 \pm 0/07^e$
P _۲	$10/73 \pm 0/66^d$	$2/89 \pm 0/17^d$	$6/54 \pm 0/40^d$	$1/28 \pm 0/03^d$
P _۳	$12/33 \pm 0/34^c$	$3/34 \pm 0/09^c$	$7/55 \pm 0/20^c$	$1/48 \pm 0/04^c$
MPE+P _۱	$13/06 \pm 0/30^b$	$3/52 \pm 0/08^b$	$7/97 \pm 0/18^b$	$1/56 \pm 0/03^b$
MPE+P _۲	$15/36 \pm 0/35^a$	$4/14 \pm 0/09^a$	$9/37 \pm 0/21^a$	$1/84 \pm 0/04^a$
MPE+P _۳	$15/10 \pm 0/36^a$	$4/07 \pm 0/09^a$	$9/21 \pm 0/50^a$	$1/81 \pm 0/04^a$

حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

تغذیه شده با جیره $MPE+P_2$ و $MPE+P_3$ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با گروه‌های آزمایشی دیگر نشان دادند ($P<0/05$)، اما بین این دو گروه اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P>0/05$).

در جدول ۳ میزان پروتئین کل، گلوکز و لیزوزیم میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های مختلف در پایان دوره آزمایش ارائه شده است. اضافه کردن همزمان عصاره ترکیبی ماکرو جلبک و غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث افزایش معنی دار میزان لیزوزیم و پروتئین و کاهش معنی دار میزان گلوکز در مقایسه با گروه شاهد شد ($P<0/05$). بیشترین میزان پروتئین ($111/47 \pm 9/21$ میلی گرم در میلی لیتر) و کمترین میزان گلوکز ($9/0 \pm 0/91$ میلی گرم در دسی لیتر) در گروه تغذیه شده با $MPE+P_2$ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی نشان داد ($P<0/05$). بیشترین میزان لیزوزیم در گروه‌های تغذیه شده با $MPE+P_2$ و $MPE+P_3$ مشاهده شد که اختلاف معنی داری را با هم نشان ندادند ($P>0/05$).

تیمارهای تغذیه شده با جیره‌های مختلف باعث افزایش تعداد هموسیت کل، سلول‌های گرانولار، سلول‌های نیمه گرانولار و سلول‌های هیالین در مقایسه با گروه شاهد شدند و اختلاف معنی داری را با گروه شاهد نشان دادند ($P<0/05$). بیشترین تعداد هموسیت کل در گروه‌های تغذیه شده در تیمارهای $MPE+P_2$ و $MPE+P_3$ به ترتیب با $15/36 \pm 0/35$ و $15/10 \pm 0/36$ میلیون سلول در هر میلی لیتر مشاهده شد که با بقیه گروه‌های آزمایشی و گروه شاهد اختلاف معنی داری داشت ($P<0/05$). کمترین تعداد کل هموسیت‌ها در گروه شاهد ($6/30 \pm 0/09$ میلیون در میلی لیتر) مشاهده شد. با افزایش غلظت پروبیوتیک در گروه‌های تغذیه شده تنها با پروبیوتیک تک‌سل، تعداد هموسیت کل نیز افزایش یافت و اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان دادند ($P<0/05$). استفاده همزمان عصاره آبی ترکیبی ماکرو جلبک و غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث افزایش معنی دار تعداد سلول‌های گرانولار، سلول‌های نیمه گرانولار و سلول‌های هیالین نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی شد که بیشترین تعداد این سلول‌ها در گروه‌های

جدول ۳: میزان پروتئین کل، گلوکز و لیپوزیم میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های غذایی مختلف در پایان دوره آزمایش (میانگین $\pm$ انحراف معیار، سه تکرار)

شاخص	پروتئین کل (mg/mL)	گلوکز (mg/dL)	لیپوزیم (U/mg protein)
شاهد	۶۶/۹۹ $\pm$ ۱/۰۵ ^e	۴۷/۷۶ $\pm$ ۱/۵۲ ^a	۵/۴۰ $\pm$ ۰/۳۶ ^d
MPE	۷۰/۳۶ $\pm$ ۳/۵۴ ^{ef}	۴۱/۰۰ $\pm$ ۱/۷۴ ^a	۶/۲۰ $\pm$ ۰/۳۶ ^d
P _۱	۷۴/۷۰ $\pm$ ۱/۷۰ ^{def}	۳۶/۶۶ $\pm$ ۱/۱۵ ^b	۶/۵۳ $\pm$ ۰/۵۰ ^d
P _۲	۷۶/۷۰ $\pm$ ۳/۴۴ ^{de}	۳۱/۰۰ $\pm$ ۱/۷۳ ^c	۸/۵۰ $\pm$ ۰/۴۳ ^c
P _۳	۸۰/۷۰ $\pm$ ۱/۰۰ ^d	۲۶/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ ^d	۹/۰۶ $\pm$ ۰/۱۱ ^c
MPE+P _۱	۹۲/۳۷ $\pm$ ۱/۵۳ ^c	۱۶/۳۳ $\pm$ ۱/۵۲ ^e	۱۱/۶۶ $\pm$ ۱/۵۲ ^b
MPE+P _۲	۱۱۱/۴۷ $\pm$ ۹/۲۱ ^a	۹/۰۰ $\pm$ ۱/۰۰ ^f	۱۸/۳۳ $\pm$ ۱/۵۲ ^a
MPE+P _۳	۹۹/۳۵ $\pm$ ۱/۱۶ ^b	۱۶/۳۳ $\pm$ ۱/۵۲ ^e	۱۹/۶۶ $\pm$ ۲/۰۸ ^a

حروف نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار هستند ($P < ۰/۰۵$).

میزان لیپوزیم و پروتئین کل در گروه‌های تغذیه شده با MPE و P_۱ اختلاف معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند ($P > ۰/۰۵$). همچنین میزان لیپوزیم و گلوکز در گروه تغذیه شده با MPE اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند ($P > ۰/۰۵$).

بحث

سیستم ایمنی در سخت‌پوستان شامل واکنش‌های سلولی و هومورال بوده که به طور عمده‌ای وابسته به خون یا همولنف است. واکنش‌های سلولی شامل ذره‌خواری، تشکیل کپسول و برآمدگی کوچک از میکروارگانیسم‌ها و انگل‌ها و تخریب آنها به وسیله مولکول‌های میکروپکس است. از سوی دیگر واکنش‌های هومورال شامل چندین مولکول محلول همچون لکیتین‌های پلاسما، ترکیبات سیستم پروفنل اکسیداز (proPO)، پپتیدهای ضد میکروبی و پروتئین‌های درگیر شده در انعقاد همولنف است که در ترکیب با واکنش‌های سلولی، جانور را در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کند (Perazzolo et al., 2002).

در مطالعه حاضر پروبیوتیک تک‌سل *Bacillus subtilis* ISO با سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد جیره باعث افزایش معنی‌داری هموسیت کل، تعداد سلول‌های گرانولار، نیمه‌گرانولار و

هیالین شد. بیشترین تعداد هموسیت‌ها به ترتیب در سلول‌های نیمه‌گرانولار، گرانولار و هیالین مشاهده شد. Abdollahi Arpanahi و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی اثر پروبیوتیک بومی و تجاری بر روی میگوی سفید غربی نشان دادند که تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک تجاری بیشترین میزان هموسیت کل، تعداد سلول‌های نیمه‌گرانولار، گرانولار و هیالین را داشتند. همچنین Ghaednia و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی اثر پروبیوتیک تک‌سل *B. subtilis* بر روی هموسیت میگوی سفید غربی نتایج همسویی را با نتایج مطالعه حاضر به دست آوردند. مطالعات نشان می‌دهد که هموسیت در میگوی سفید غربی نقش مهمی در پاسخ‌های ایمنی میزبان ایفا می‌کند (Ghaednia et al., 2011). این افزایش معنی‌دار در تعداد هموسیت در گروه تغذیه شده با پروبیوتیک تک‌سل می‌تواند نشان‌دهنده اثر بسیار مثبت پروبیوتیک بر سیستم همولنف میگوی سفید غربی باشد. در میگو سلول‌های هیالین مسئول روند فاگوسیتوز (بیگانه‌خواری) هستند. سلول‌های نیمه‌گرانولار اساساً در روند کپسوله کردن میکروارگانیسم‌های مهاجر شرکت می‌کنند و همچنین سلول‌های گرانولار بزرگ به عنوان ذخیره‌گاه اصلی در فعالیت سیستم پروفنل اکسیداز عمل می‌کنند (Jiravanichpaisal et al., 2006). مطالعات نشان می‌دهد که سلول‌های نیمه‌گرانولار و گرانولار در پاسخ به عوامل بیماری‌زا از جمله عوامل مولکولی مانند پپتیدوگلیکان‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدهای موجود در دیواره باکتری‌ها با آزاد کردن ترکیبات سیستم پروفنل اکسیداز آمین (تولید ملانین، چسبندگی سلولی، کپسوله کردن و روند فاگوسیتوز) در واکنش‌های هومورال و سیستم دفاعی بی‌مهرگانی مانند سخت‌پوستان نقش ایفا می‌کنند (Yeh et al., 2010; Sudaryono et al., 2018). بنابراین با افزایش قابل توجه در تعداد هموسیت‌های کل در میگوهای سفید غربی تغذیه شده با P_1 , P_2 , P_3 , $MPE+P_2$ و $MPE+P_3$ در مقایسه با گروه شاهد می‌توان نتیجه گرفت که سیستم ایمنی میگو نیز در تغذیه با پروبیوتیک و استفاده همزمان پروبیوتیک و عصاره ماکرو جلبک قدرت بیشتری یافته است. Eidi Ghaleghazi و همکاران (۲۰۲۱) با بررسی تاثیر مکمل غذایی عصاره آب داغ جلبک قهوه‌ای *Sargassum ilicifolium* بر برخی شاخص‌های ایمنی همولنف در میگوی سفید غربی نشان دادند که تعداد هموسیت‌های کل، سلول‌های گرانولار، نیمه‌گرانولار و هیالین در تیمار ۰/۵ درصد نسبت به گروه شاهد

افزایش معنی‌داری را نشان داد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. در مطالعه Ghaednia و همکاران (۲۰۱۱)، تاثیرات اندکی از عصاره *Sargassum glaucescens* بر تعداد هموسیت‌های میگوی هندی (*Fenneropenaeus indicus*) مشاهده شد. افزایش تعداد هموسیت‌ها در بسیاری از این مطالعات مرتبط با تاثیرات میتوژنیکی آنتی‌اکسیدان‌ها و لیپوپلی‌ساکاریدها است (Cheng, 2019; Su et al., 2020). می‌توان گفت که مطالعه حاضر نشان داد که بهبود قابل توجهی در نشانگرهای ایمنی در گروه‌های تغذیه شده با $MPE+P_2$ و $MPE+P_3$ نسبت به گروه شاهد و گروه‌های مورد آزمایش دیگر وجود داشت که نشان می‌دهد یک مخلوط پروبیوتیک و عصاره ترکیبی ماکرو جلبک ممکن است به طور مثبت بر ایمنی در همولنف میگوی سفید غربی تاثیر بگذارد (Monier et al., 2023). نتایج بسیاری از مطالعات صورت گرفته بر روی تاثیر محرک جلبک تاییدکننده یافته‌های این پژوهش است (Tayag et al., 2010; Yeh et al., 2010; Sudaryono et al., 2018). همچنین می‌توان گفت سطح و نوع ترکیبات موجود در عصاره می‌تواند در میزان هموسیت تاثیرگذار باشد که در این پژوهش بررسی نشده است. همچنین مقادیر هموسیت کل در این مطالعه روند تغییرات کمتری را نسبت به مطالعات مشابه دارد که احتمالا به دلیل تفاوت در برخی شاخص‌های فیزیوشیمیایی آب مانند دما و شوری است (Ghaednia et al., 2011). از این رو، تعیین دقیق مکانیسم اثر عصاره آبی ترکیبی ماکرو جلبک بر تعداد سلول‌های همولنف نیازمند مطالعات تکمیلی است.

شاخص‌های بیوشیمیایی مختلفی وجود دارند که معمولا به عنوان پاسخ فیزیولوژیکی در میگو ارزیابی می‌شوند. گلوکز و پروتئین به عنوان شاخص‌های متابولیتی پلاسما هستند که به میزان بسیار زیادی تحت تاثیر استرس دستکاری و حمل و نقل، استرس محیطی، تغییرات فصلی، وضعیت تغذیه‌ای و بلوغ جنسی قرار دارند (Yu et al., 2008; Morshedi et al., 2015). در این مطالعه، نتایج به دست آمده از بررسی گلوکز نشان داد که اضافه کردن همزمان عصاره ترکیبی ماکرو جلبک و غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث کاهش معنی‌دار میزان گلوکز در مقایسه با گروه شاهد شد و کمترین میزان گلوکز $9/01 \pm 1/00$ گرم در دسی‌لیتر) در گروه تغذیه شده با $MPE+P_2$ مشاهده شد. Salehpour و همکاران (۲۰۲۲) با اضافه کردن فوکوئیدان استخراج

به عنوان نشانگرهای مناسب به منظور ارزیابی ایمنی و فیزیولوژیکی در جانوران از جمله سخت‌پوستان مد نظر هستند (Xue and Renault, 2000). همچنین لیزوزیم دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت را هیدرولیز می‌کند و نقش مهمی در مقاومت در برابر عفونت‌های میکروبی و انگلی در آبزیان دارد (Qiu et al., 2023). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اضافه کردن همزمان عصاره ترکیبی ماکروجلبک و غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث افزایش معنی‌دار میزان لیزوزیم در مقایسه با گروه شاهد شد و بیشترین میزان لیزوزیم در گروه‌های تغذیه شده با $MPE+P_2$ ($18/33 \pm 1/52$) واحد در میلی گرم پروتئین و $MPE+P_3$ ($19/66 \pm 2/08$) واحد در میلی گرم پروتئین مشاهده شد. هم راستا با نتایج این پژوهش، افزودن پروبیوتیک تک‌سل *B. subtilis* به محیط آب میگوی سفید غربی منجر به افزایش فعالیت لیزوزیم در مقایسه با گروه شاهد شد (Monier et al., 2023). همچنین در مطالعه‌ای دیگر، استفاده از *B. subtilis* AQAHBS001 منجر به افزایش میزان لیزوزیم در میگوی سفید غربی شد (Kewcharoen and Srisapoome, 2019). از طرفی Akbary و Aminikhoie (۲۰۱۸)

شده از ماکروجلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinidadis* به جیره غذایی میگوی سفید غربی نشان دادند که میزان گلوکز در میگوهای تغذیه شده با فوکوئیدان کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد. می‌توان گفت گلوکز یکی از شاخص‌های استرس است که سطح پایین آن در میگوهای تغذیه شده با استفاده همزمان ماکروجلبک و پروبیوتیک تک‌سل نشان‌دهنده مقاومت بالاتر آنها در برابر استرس‌های شایع در شرایط آزمایشگاهی و شرایط نامناسب فیزیولوژی آنها است (Barton, 2002; Meshkini and Tafi, 2016). این امر به‌ویژه در آبی‌پروری مهم است، جایی که عوامل استرس‌زای محیطی می‌توانند بر سلامت و رشد میگو تاثیر منفی بگذارند. با کاهش استرس، استفاده همزمان ماکروجلبک و پروبیوتیک تک‌سل می‌تواند به جمعیت‌های میگو کمک کند و در نهایت منجر به افزایش بقا و بهره‌برداری بیشتر شود.

آنزیم‌های ایمنی ضروری در میگو، آنزیم‌های لیزوزیم و پروفنل اکسیداز هستند که به پاسخ ایمنی ذاتی کمک می‌کنند (Monier et al., 2023). این آنزیم‌ها نه تنها به عنوان نشانگر زیستی برای ارزیابی شرایط زیست‌محیطی و استرسی کاربرد دارند (Liu et al., 2004)، بلکه

al., 2006; Aguirre-Guzman et al., 2009). Salehpour و همکاران (۲۰۲۲) با اضافه کردن فوکوئیدان استخراج شده از ماکرو جلبک قهوه‌ای *C. trinodis* به جیره غذایی و Chen و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی کاراژینان به روش غوطه‌وری در میگوی سفید غربی نشان دادند که میزان پروتئین در میگوهای تغذیه شده با فوکوئیدان و میگوهای قرار گرفته در مجاورت کاراژینان، افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان دادند. در مطالعه دیگر، میزان پروتئین کل در میگوهای سفید غربی تغذیه شده با ۱۰^۵ و ۱۰^۸ سلول در میلی‌لیتر با دو سویه باکتری *B. subtilis* افزایش معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد نشان داد (Zokaeifar et al., 2012) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت. می‌توان گفت که افزایش پروتئین کل در میگوهای تغذیه شده با استفاده همزمان عصاره ترکیبی ماکرو جلبک به همراه پروبیوتیک احتمالاً با بهبود رشد از طریق تجمع پروتئین در ارتباط است (Chen et al., 2014). از طرف دیگر، با توجه به این که سیستم ایمنی میگو بر اساس پروتئین‌های مختلف سازمان یافته است، افزایش پروتئین کل نشان‌دهنده تاثیر

با بررسی اثر عصاره ماکرو جلبک *Ulva rigida* بر ایمنی میگوی سفید غربی نشان دادند که میزان لیزوزیم در میگوی تغذیه شده با ۱ و ۱/۵ گرم در کیلوگرم عصاره افزایش یافت. می‌توان گفت که ظرفیت تحریکی عصاره محلول در آب مرتبط با پلی‌ساکارید عصاره است. نتیجه بسیاری از مطالعات نشان می‌دهد که ساختار پلی‌ساکاریدهای ماکرو جلبک‌ها بسته به گونه متفاوت است و می‌تواند تحت تاثیر متغیرهای محیطی تغییر یابد که همه این عوامل می‌توانند در فعالیتهای زیستی آن تاثیر بگذارند (Vatsos and Rebours, 2015; Akbary and Aminikhoie, 2018).

سطح بالای پروتئین پلاسما با پاسخ ایمنی ذاتی مرتبط است و در ارزیابی وضعیت سلامت جانوران مهم است، زیرا بر تنظیم واکنش‌های التهابی و پاسخ عفونت‌ها عمل می‌کند (Chen et al., 2014). در مطالعه حاضر، بالاترین سطح پروتئین در گروه تغذیه شده با MPE+P_۲ (۱۱۴/۴۷±۹/۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی نشان داد. میگو مانند سخت‌پوستان دیگر به سیستم ایمنی ذاتی خود وابسته است که عمدتاً شامل پروتئین‌ها و اجزای آنزیمی است (Pascual et

مثبت جیره غذایی بر وضعیت ایمنی است (Yu et al., 2008).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده همزمان عصاره آبی ترکیبی ماکرو جلبک و غلظت‌های مختلف پروبیوتیک تک‌سل باعث افزایش معنی‌دار تعداد سلول‌های گرانولار، نیمه‌گرانولار و هیالین نسبت به گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی شد و بیشترین تعداد این سلول‌ها در گروه‌های تغذیه شده با $MPE+P_2$ و $MPE+P_3$ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های آزمایشی دیگر نشان دادند، اما بین این دو گروه اختلاف معنی‌دار نبود. بیشترین میزان پروتئین و کمترین میزان گلوکز در گروه تغذیه شده با $MPE+P_2$ مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری را با گروه شاهد و دیگر گروه‌های آزمایشی نشان داد. در نهایت، استفاده از همزمان عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌های قهوه‌ای و غلظت ۲ درصد پروبیوتیک ($MPE+P_2$)، به منظور بهبود شاخص‌های همولنف و سیستم ایمنی میگوی سفید غربی توصیه می‌شود. هر چند مطالعات

دقیق‌تری در مورد مکانیسمی که پروبیوتیک *B. subtilis* و عصاره ترکیبی ماکرو جلبک توسط آنها پاسخ‌های ایمنی را در میگوی سفید غربی افزایش می‌دهند، می‌تواند درک بهتری را ایجاد کند. این می‌تواند شامل مطالعات مولکولی برای روشن کردن عملکرد فیزیولوژی میگو در برابر این مکمل باشد. از طرفی انجام مطالعات تطبیقی با سویه‌های دیگر یا ترکیبات پروبیوتیک به همراه این عصاره ترکیبی ماکرو جلبک‌ها می‌تواند به تشخیص بهترین فرمولاسیون برای بهبود سلامت میگو و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا کمک کند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات شیلات آب‌های دور چابهار و کارشناس محترم آزمایشگاه نمونه آزموی تهران تشکر و قدردانی می‌گردد. حمایت مالی این طرح (۳-۷۸-۱۲۵۱-۰۴۸-۰۲۰۴۵۶) از موسسه تحقیقات شیلات تهران صورت گرفت.

منابع

- Abdollahi Arpanahi D., Jafaryan H., Soltani M., Naderi Samani M. and Hasanpour Fatahi A. 2019.** Comparison of commercial and indigenous *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*) effects on some immune responses and serum enzymes activity in white leg shrimp post-larvae (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Veterinary Research*, 74(1): 84–92. doi: 10.22059/jvr.2017.221169.2543
- Adel M., El-Sandy A.F.M., Yeganeh S., Dadar M. and Giri S.S. 2017.** Effect of potential probiotic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* on growth performance, intestinal microbiota, digestive enzyme activities, and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9: 150–156. doi: 10.1007/s12602-016-9235-9
- Aguirre-Guzman G., Sanchez-Martinez J.G., Campa-Cordova A.I., Luna-Gonzalez A. and Ascencio F. 2009.** Penaeid shrimp immune system. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 39(3): 205–215. doi: 10.56808/2985-1130.2175
- Akbary P. and Aminikhoei Z. 2018.** Effect of polysaccharides extracts of algae *Ulva rigida* on growth, antioxidant, immune response and resistance of shrimp, *Litopenaeus vannamei* against *Photobacterium damsela*. *Aquaculture Research*, 49(7): 2503–2510. doi: 10.1111/are.13710
- Akbary P., Adeshina I. and Jahanbakhshi A. 2020.** Growth performance, digestive enzymes, antioxidant activity and immune responses of *Litopenaeus vannamei* fed with *Jania adhaerens* J.V. supplemented diet against *Photobacterium damsela* infection. *Animal Feed Science and Technology*, 270: 114696–11473. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114696
- Barton B.A. 2002.** Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3): 517–525. doi: 10.1093/icb/42.3.517
- Butt U.D., Lin N., Akhter N., Siddiqui T., Li S. and Wu B. 2021.** Overview of the latest developments in the role of probiotics, prebiotics and synbiotics in shrimp aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology* 114: 263–281. doi: 10.1016/j.fsi.2021.05.003
- Castillo S., Rosales M., Pohlenz C. and Gatlin D.M. 2014.** Effects of organic acids on growth performance and digestive enzyme activities of juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*,

- 433: 6–12. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.05.038
- Chen Y.Y., Chen J.C., Lin Y.C., Putra D.F., Kitikiew S., Li C.C., Hsieh J.F., Liou C.H. and Yeh S.T. 2014.** Shrimp that have received carrageenan via immersion and diet exhibit immunocompetence in phagocytosis despite a post-plateau in immune parameters. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(2): 352–366. doi: 10.1016/j.fsi.2013.12.004
- Cheng Y. 2019.** The growth performance and nonspecific immunity of red swamp crayfish *Procambarus clarkia* affected by dietary *Rhodiola rosea* polysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 93: 796–800. doi: 10.1016/j.fsi.2019.08.046
- Choi Y.H., Kim K.W., Han H.S., Nam T.J. and Lee B.J. 2014.** Dietary *Hizikia fusiformis* glycolprotein-induced IGF I and IGF-BP3 associated somatic growth, polyunsaturated fatty acid metabolism and immunity in juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 167: 1–6. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.09.011
- Choi Y.H., Lee B.J. and Nam T.J. 2015.** Effect of dietary inclusion of *Pyropia yezoensis* extract on biochemical and immune responses of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 435: 347–353. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.010
- Chojnacka K.W., Agnieszka S., Zuzanna W. and Lukazy T. 2012.** Biologically active compounds in seaweed extracts- The prospects for the application. *The Open Conference Proceedings Journal*, 3(22): 20–28.
- Chouhury S., Sree A., Mukherjee S.C., Pattnik P. and Bapuji M. 2005.** In vitro antibacterial activity of extracts of selected marine algae and mangroves against fish pathogens. *Asian Fish Science*, 18: 85–94. doi: 10.3390/app12031148
- Decamp O., Moriarty D.J.W. and Lavens P. 2008.** Probiotics for shrimp larviculture: Review of field data from Asia and Latin America. *Aquaculture Research*, 39: 334–338. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x
- Eidi Ghaleghazi F., Noori A. and Hosseinifar S.H. 2021.** The effects of dietary supplementation of *Sargassum ilicifolium* hot-water extract on some haemolymph physiological parameters of white leg shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture Sciences*, 9(1): 1–14.
- Ellis A.E. 1990.** Lysozyme assays. P: 101–103. In: Stolen J.S., Fletcher T.C., Anderson D.P., Roberson B.S. and Van Muiswinkel W.B. (Eds.). *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publications, USA.

- Farzanfar A. 2006.** The use of probiotics in shrimp aquaculture. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 48: 149–15.
- Ghaednia B., Mehrabi M.R., Mirbakhsh M., Yeganeh V., Hoseinkhezri P., Garibi G. and Ghaffar Jabbari A. 2011.** Effect of hot water extract of brown seaweed *Sargassum glaucescens* via immersion route on immune responses of *Fenneropenaeus indicus*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 10(4): 616–630. doi: 10.22092/IJFS.2018.114168
- Ghaednia B., Mirbakhsh M. and Zorrieh Zahra M.J. 2020.** Effect of *Bacillus subtilis* IS02 in food on health, immunity indexes and prevention against white spot disease in *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquaculture Development*, 14(3): 87–99.
- Jiang G., Yu R. and Zhou M. 2004.** Modulatory effects of ammonia -N on the immune system of *Penaeus japonicus* to virulence of white spot syndrome virus. *Aquaculture*, 241: 61–75. doi: 10.1016/j.aquaculture.2007.12.019
- Jiravanichpaisal P., Lee B.L. and Soderhall K. 2006.** Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211: 213–236. doi: 10.1016/j.imbio.2005.10.015
- Kazemi M., Abediankenari A. and Rabiei R. 2018.** Effect of marine macroalgae on growth performance and immune response in rainbow trout fingerlings. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 7(1): 9–16.
- Kewcharoen W. and Srisapoom P. 2019.** Probiotic effects of *Bacillus* spp. from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on water quality and shrimp growth, immune responses, and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* (AHPND strains). *Fish and Shellfish Immunology*, 94: 175–189. doi: 10.1016/j.fsi.2019.09.013
- Lim S.Y., Loo K.W. and Wong W.L. 2019.** Synergistic antimicrobial effect of a seaweed-probiotic blend against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(3): 906–917. doi: 10.1007/s12602-019-09616-8
- Liu K.F., Chiu C.H., Shiu Y.L., Cheng W. and Liu C.H. 2010.** Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28(5-6): 837–844. doi: 10.1016/j.fsi.2010.01.012
- Liu S., Jiang X., Hu X., Gong J., Hwang H. and Mai K. 2004.** Effects of temperature on non-

- specific immune parameters in two scallop species: *Argopecten irradians* (Lamarck 1819) and *Chlamys farreri* (Jones & Preston 1904). *Aquaculture Research*, 35: 678–682. doi: 10.1111/j.1365-2109.2004.01065.x
- Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Bogwald J., Castex M. and Ringo E. 2010.** The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302: 1–18. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.02.007
- Meshkini S. and Tafi A.A. 2016.** Presentation and usage of immunostimulators in aquaculture. *Agricultural and Natural Resources Engineering*, 46(12): 50–55. doi: 10.1016/j.fsi.2005.03.008
- Monier M.N., Kabary H., Elfeky A., Saadony S., El-Hamed N.N.B., Abd Eissa M.E.H. and Eissa E.S.H. 2023.** The effects of *Bacillus* species probiotics (*Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) on the water quality, immune responses, and resistance of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) against *Fusarium solani* infection. *Aquaculture International*, 31: 3437–3455. doi: 10.1007/s10499-023-01136-1
- Morshedi V., Nafisi Bahabadi M., Azodi M., Modaresi M. and Cheraghi S. 2015.** Effects of dietary probiotic (*Lactobacillus plantarum*) on body composition, serum biochemical parameters and liver enzymes of Asian sea bass (*Lates calcarifer*). *Journal of Marine Science and Technology*, 14(2): 1–14. doi: 10.22113/jmst.2015.8579
- Munaei W., Yuhana M. and Widanarnin W. 2014.** Effect of micro-encapsulated synbiotic at different frequencies for luminous vibriosis control in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Microbiology Indonesia*, 8(2): 73–80.
- Pascual C., Sanchez A., Zenteno E., Cuzon G., Gabriela G., Brito R., Gelabert R., Hidalgo E. and Rosas C. 2006.** Biochemical, physiological, and immunological changes during starvation in juveniles of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 251(2-4): 416–429. doi: 10.1016/j.aquaculture.2005.06.001
- Perazzolo L.M., Gargioni R., Ogliari P. and Barracco M.A.A. 2002.** Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. *Aquaculture*, 214: 19–33. doi: 10.1016/S0044-8486(02)00137-0
- Pereira L. 2012.** A review of the nutrient composition of selected edible seaweeds. P: 15–47. In: Pomin V.H. (Ed.). *Seaweed: Ecology, Nutrient Composition*

- and Medicinal Uses. Nova Science, USA.
- Qiu Z., Xu Q., Li S., Zheng D., Zhang R., Zhao J. and Wang T. 2023.** Effects of probiotics on the water quality, growth performance, immunity, digestion, and intestinal flora of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in the biofloc culture system. *Water*, 15: 1211–1220. doi: 10.3390/w15061211
- Rabiei R., Asadi M., Sohrabipour J., Nejadstari T. and Majd A. 2007.** Algae species diversity of *Gracilaria salicornia* on the Persian Gulf Coast-Qeshm Island. *Journal of Research Construction*, 20(2): 43–57.
- Rengpipat S., Phianphak W., Piyatiratitivorakul S. and Menasaveta P. 1998.** Effects of a probiotic bacterium in black tiger shrimp *Penaeus monodon* survival and growth. *Aquaculture*, 167: 301–313. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00305-6
- Salehpour R., Amrollahi Biuki N., Mohammadi M., Dashtiannasab A., Ebrahimnejad P. and Ghasemi A. 2022.** Evaluation of growth performance and biochemical parameters of western white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) fed with fucoidan enriched diet. *Journal of Marine Science and Technology*, 21(4): 41–54. doi: 10.22113/jmst.2021.268814.2412
- Sandeepa M.G. and Ammani K. 2015.** Effect of probiotic bacterium on growth and biochemical parameters of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6(2): 2871–2875. doi: 10.1016/j.aqrep.2023.101873
- Song L., Yu I., Lien W. and Huang C. 2003.** Haemolymph parameters of *Litopenaeus vannamei* infected with Taura syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*, 14: 317–331. doi: 10.1006/fsim.2002.0440
- Su C., Fan D., Pan L., Lu Y., Wang Y. and Zhang M. 2020.** Effects of Yu-Ping-Feng polysaccharides (YPS) on the immune response, intestinal microbiota, disease resistance and growth performance of *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 105: 104–116. doi: 10.1016/j.fsi.2020.07.003
- Sudaryono A., Chilmawati D. and Susilowati T. 2018.** Oral administration of hot-water extract of tropical brown seaweed, *Sargassum cristaefolium*, to enhance immune response, stress tolerance, and resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 49: 877–888. doi: 10.1111/jwas.12527
- Tacon A., Cody J., Cnquest L., Divakaran S., Forster I. and Decamp O. 2002.** Effect of culture

- system on the nutrition and growth performance of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) fed different diets. *Aquaculture Nutrition*, 8: 121–137. doi: 10.1046/j.1365-2095.2002.00199.x
- Tayag C.M., Lin Y.C., Li C.C., Liou C.H. and Chen J.C. 2010.** Administration of the hot-water extract of *Spirulina platensis* enhanced the immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 764–773. doi: 10.1016/j.fsi.2010.01.023
- Trinder P. 1969.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry*, 6: 24–27. doi: 10.1177/000456326900600108
- Vaezi M., Esmaili Feridooni A., Manaffar R. and Amini K. 2018.** Effects of probiotic (*Pediococcus acidilactici*) on hematological parameters, immunological responses and digestive enzymes of *Astacus leptodactylus* juveniles. *Aquatic Physiology and Biotechnology*, 6(3): 35–60. doi: 10.22124/japb.2018.8702.1197
- Vatsos I.N. and Rebours C. 2015.** Seaweed extracts as antimicrobial agents in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 27(5): 2017–2035. doi:10.1007/s10811-014-0506-0
- Wache Y., Auffray F., Gatesoupe F.J., Zambonino J., Gayet V. and Labbe L. 2006.** Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry. *Aquaculture*, 258: 470–478. doi: 10.1016/j.aquaculture.2006.04.002
- Xue M., Wen C., Liang H., Ding M., Wu Y. and Li X. 2016.** In vivo evaluation of the effects of commercial *Bacillus* probiotics on survival and development of *Litopenaeus vannamei* larvae during the early hatchery period. *Aquaculture Research*, 47: 1661–1669. doi: 10.1111/are.12719
- Xue Q. and Renault T. 2000.** Enzymatic activities in European flat oyster, *Ostrea edulis*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, hemolymph. *Journal of Invertebrate Pathology*, 76: 155–163. doi: 10.1006/jipa.2000.4965
- Yang C., Chen N., Lu L., Chen S. and Lai C. 2014.** Effect of mushroom beta glucan on immune and haemocyte response in shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Aquaculture Research Development*, 5(6): 1–5 (1000275). doi: 10.3390/antiox11112282
- Yeh S.T., Lin Y.C., Huang C.L. and Chen J.C. 2010.** White shrimp *Litopenaeus vannamei* that received the hot-water extract of

Gracilaria tenuistipitata showed protective innate immunity and up-regulation of gene expressions after low-salinity stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 887–894. doi: 10.1016/j.fsi.2010.02.005

Yu M.C., Li Z.J., Lin H.Z., Wen G.L. and Ma S. 2008. Effects of dietary *Bacillus* and medicinal herbs on the growth, digestive enzyme activity, and serum biochemical parameters of the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 16: 471–480. doi: 10.1007/s10499-007-9159-1

Zhang Z., Shi X., Wu Z., Wu W., Zhao Q. and Li E. 2023.

Macroalgae improve the growth and physiological health of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture Nutrition*, 2023: 1–8 (8829291). doi: 10.1155/2023/8829291

Zokaeifar H., Balcazar J.L., Saad C.R., Kamarudin M.S., Sijam K., Arshad A. and Nejat N. 2012. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33(4): 683–689. doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.027



Research Paper

Examination of the hemolymph indices and innate immunity of the western white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed with a combined extract of brown macroalgae and single-cell probiotic (*Bacillus subtilis* IS0)

Paria Akbary^{1*}, Ashkan Ajdari²

DOI: 10.22124/japb.2025.28719.1555

Received: October 2024

Accepted: February 2025

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of the aqueous extract combination of brown macroalgae and the bacterium *Bacillus subtilis* IS0 on the hemolymph indices and non-specific immunity of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). A total of 2400 post-larvae with an average weight of 29 ± 0.87 mg were stocked at a density of 100 individuals in 8 groups (with three replicates). The control group received a diet without the combined macroalgae extract (MPE) and single cell probiotic (P), while the other groups were fed diets containing 15g/kg MPE, 1% (P₁), 2% (P₂) and 3% (P₃) probiotics and combinations of the macroalgae extract with the probiotic (P₁+MPE, P₂+MPE and P₃+MPE) for a period of 60 days. The results showed that the highest total hemocyte count was observed in the groups fed with P₂+MPE and P₃+MPE, at 15.36 ± 0.35 and $15.10 \pm 0.36 \times 10^6$ /mL, respectively, which were significantly different from the other experimental groups and control ($P < 0.05$). The simultaneous use of an aqueous extract of macroalgae with different concentrations of single-cell probiotics significantly increased the number of granular, semi-granular and hyaline cells compared to the control group and other experimental groups. The highest counts of these cells were found in the groups fed with P₂+MPE and P₃+MPE, showing a significant difference from the other experimental groups ($P < 0.05$). The highest protein level (111.47 ± 9.21 mg/mL) and the lowest glucose level (9.0 ± 0.91 mg/dL) were observed in the group fed P₂+MPE, showing a significant difference compared to the control and other experimental groups ($P < 0.05$). The results of this study demonstrated that the simultaneous use of the combined extract of brown macroalgae and 2% single-cell probiotic improved hemolymph indices and innate immune system in white shrimp.

Key words: Macroalgae Combined Extract, Single-cell Probiotic, *Litopenaeus vannamei*, Hemolymph, Innate Immunity.

1- Professor in Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
2- Ph.D. in Aquatic Health, Offshore Fisheries Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute (IFMRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Chabahar, Iran.

*Corresponding Author: paria.akbary@gmail.com