DOI: 10.22055/IVJ.2020.244345.2293
DOR: 20.1001.1.17356873.1401.18.2.1.1

اثرات سطوح متفاوت رنگدانه‌ی لیکوپن بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمونولوژیک و آنزیمی همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849)

محمد اتفاق‌دوست[1*] و حمید علاف‌نویریان[2]

[1] دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

[2] دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران

دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۳۰

چکیده

رنگدانه‌ی لیکوپن با توجه به برخورداری از طولانی‌ترین زنجیره‌ی هیدروکربنی در بین کاروتنوئیدها با یازده پیوند دوگانه از مهم‌ترین رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تأثیرگذاری مطلوب بر فرآیندهای مرتبط با ایمنی می‌باشد. بنابراین، مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی تأثیرات رنگدانه‌ی لیکوپن بر شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی و آنزیم‌های همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق انجام پذیرفت. در این پژوهش، ۲۲۵ قطعه میگو با وزن متوسط ۰/۰۷±۱/۴۰ گرم به وسیله‌ی پنج تیمار غذایی و سه تکرار شامل مقادیر مختلف لیکوپن صفر (شاهد)، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم لیکوپن در کیلوگرم جیره به مدت ۵۶ روز، غذادهی گردیدند. در پایان دوره‌ی پرورشی، پس از جمع‌آوری همولنف میگوهای مورد مطالعه، شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی و آنزیم‌های همولنف نمونه‌ها به وسیله‌ی کیت‌های آزمایشی، دستگاه خوانشگر الایزا و میکروسکوپ نوری مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی و آنزیمی همولنف میگوها، تحت تأثیر سطوح مختلف رنگدانه لیکوپن قرار گرفتند. با افزایش مقادیر لیکوپن جیره‌ی غذایی شاخص‌های بیوشیمیایی آلبومین و پروتئین کل همولنف میگوها، به طور معنی‌داری افزایش پیدا نمود در حالی که میزان کورتیزول کاهش یافت. شاخص‌های ایمنی همچون تعداد هموسیت کل، سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و سلول‌های هیالین نیز با افزایش لیکوپن جیره، افزایش معنی‌داری پیدا نمود. آنزیم‌های همولنف، همچون لیزوزیم و فنول اکسیداز در تیمارهای حاوی رنگدانه‌ی لیکوپن بیش‌تر از تیمار شاهد بود در حالی که در آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز کاهش معنی‌داری مشاهده گردید و آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر سطوح متفاوت رنگدانه لیکوپن قرار نگرفت. در نهایت، یافته‌های به دست آمده از این پژوهش نشان داد که افزایش سطوح لیکوپن جیره‌ی غذایی موجب بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی و آنزیمی همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق شد و افزودن میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از این رنگدانه به جیره‌ی غذایی با هدف بهبود شاخص‌های اشاره شده این میگو پیشنهاد گردید.

کلمات کلیدی: کاروتنوئیدها، همولنف، ایمنی، لیکوپن، میگوی رودخانه‌ای شرق

مقدمه

میگوی رودخانه‌ای شرق (*Macrobrachium nipponense*) در زمره گونه‌های مهم و اقتصادی میگوهای خانواده‌ی آب شیرین پالامونیده (Palaemonidae) و جنس بازوبلند (*Macrobrachium*) محسوب می‌گردد و تشخیص

*نویسنده مسئول: محمد اتفاق‌دوست، دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه سرا، ایران
E-mail: ettefaghdoost@phd.guilan.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

گونه‌ی میگوهای جنس مذکور نسبت به سایر میگوهای متعلق به آب شور خانواده پنائیده (Penaeidae) از طریق بهره‌مندی بازوهای طویل در دومین جفت از بازوهای راه-روی و علاوه بر آن قرار گرفتن پوسته بند دوم شکمی بر روی پوسته اولین و دومین بند شکمی صورت می‌گیرد (Fu et al. 2004). این میگو در حدود ۲۰ درصد از سرعت رشد و بازماندگی بالاتری در مرحله‌ی لاروی نسبت به میگوی غول پیکر آب شرین (*Macrobrachium rosenbergii*) بهره‌مند می‌باشد، علاوه بر آن توانمندی تحمل و سازگاری دماهای پایین در فصل زمستان را نیز برخوردار است. میگوی رودخانه‌ای شرق با توجه بهره-مندی از خصوصیات مهمی همچون توانایی سازگاری یافتن و میزان بقای قابل ملاحظه در مقابل تغییرات درجه‌ی حرارت زیستگاه‌ها (به ویژه دماهای کم)، راندمان رشد بهینه در شرایط طبیعی، سهولت تکثیر و تولید مثل، وجود تنوع زیاد در شرایط پرورش (سیستم‌های نیمه متراکم و متراکم، استخر، قفس، مزارع برنج به صورت چند گونه‌ای و غیره) همین طور بازدهی و صرفه اقتصادی قابل توجه به دلیل دارا بودن طول کم مدت دوره پرورشی (میانگین در حدود ۸۰ روز) در مقایسه با سایر گونه میگوهای پرورشی، عامل مؤثر معرفی و انتقال این میگو به دیگر کشورهای جهان گردید (Kutty 2005, Sun et al. 2016). میگوی آب شیرین رودخانه‌ای شرق در کشور ایران افزون بر تالاب انزلی و بخش‌های جنوبی دریای خزر، در بیشتر رودخانه‌ها و آبگیرهای نواحی شمال شرق و غرب کشور نیز زیست می-کند (De Grave & Ghane 2006). این گونه به دلیل آن که به طور ویژه‌ای در آب شیرین تخم‌ریزی می‌نماید و پتانسیل بالایی که به لحاظ آبزی‌پروری برخوردار است و همچنین با توجه به ویژگی‌هایی که پیش‌تر بدان اشاره گردید، می‌تواند گونه‌ای مناسب با هدف آبزی‌پروری مطلوب در نواحی بهره‌مند از منابع آبی شیرین، کم‌شور و لب‌شور محسوب شود (New & Nair 2012). مطالعاتی که تاکنون در کشور ایران بر روی تغذیه و رشد میگوی رودخانه‌ای شرق انجام پذیرفته است بیانگر این امر است که این گونه از غذای کنسانتره خشک به خوبی استفاده می‌کند و دارای بازماندگی بالا، رشد مطلوب و سریعی در مدت زمانی کوتاه می‌باشد و همچنین گزارش‌هایی از پرورش توام این میگو با برنج نیز توسط پژوهشگران به ثبت رسیده است (Ettefaghdoost et al. 2015, Ettefaghdoost & Alaf Noveirian 2017, Bayrami et al. 2018, Ettefaghdoost et al. 2018). به همین سبب لزوم توجه ویژه به مباحث مرتبط با آبزی‌پروری این میگو، برخوردار از اهمیت بالایی می‌باشد و به کارگیری از جیره‌ی غذایی بهینه و اختصاصی، موجب تسریع رشد مطلوب این گونه در شرایط پرورشی می‌گردد. به دلیل آن که بهبود عملکرد رشد و ایمنی موضوعی مهم محسوب می‌شود که همواره باید مورد توجه قرار گیرد، بنابراین پژوهشگران بر این باور هستند که افزایش راندمان ایمنی و همچنین تکثیر و پرورش میگو به ترکیب‌بندی جیره‌ی غذایی مورد استفاده و مواد مغذی افزودنی به آن وابستگی بسیاری دارد. به علت اهمیت قابل ملاحظه رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در مرحله‌ی تغذیه و پرورش آبزیان به منظور ایجاد رشد مناسب، بهبود ایمنی و عملکرد تغذیه‌ای، افزایش رنگ-پذیری آن‌ها با هدف بازارپسندی بیشتر و بازماندگی بالاتر در مقابل تنش‌های محیطی، زمینه‌ساز افزایش مقدار تقاضاها به منظور بهره‌گیری از این رنگدانه‌ها در محصولات مورد استفاده در آبزی‌پروری شده است (Mahfuzur et al. 2018). از آن جایی که کشور ایران جزو ۱۰ کشور تولید کننده بزرگ گوجه فرنگی محسوب می‌گردد که با میانگین تولید حدود ۴ میلیون تن از این محصول در سال، دارای جایگاه ششمین کشور برتر تولید کننده‌ی گوجه فرنگی در جهان است. در نتیجه با توجه به سهولت دسترسی و توانایی بهره‌گیری مناسب از ضایعات حاصل از کارخانه-های ساخت رب گوجه فرنگی (شامل پوست، پالپ، دانه و غیره) در کشور جهت استخراج رنگدانه لیکوپن، می‌توان آن را منبع طبیعی ارزان قیمت جهت تولید این رنگدانه برای مصارف تغذیه آبزیان برشمرد (Fatemi et al. 2018). با توجه به این موضوع، تحقیقات بسیاری مرتبط با مبحث مورد اشاره بر روی آبزیان صورت گرفته است که می‌توان به پژوهش‌های Chuchird و همکاران در سال ۲۰۱۵، Cheng و Wu در سال ۲۰۱۹ و همچنین Weilong و

همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره کرد. لذا به دلیل ویژگی‌های قابل توجهی که در ارتباط با اهمیت آبزی‌پروری میگوی رودخانه‌ای شرق بیان گردید، ضرورت ایجاب می‌نمود تا در ارتباط افزودنی‌های جیره‌ی غذایی این گونه پژوهش بیشتری صورت پذیرد تا بتوان به یک جیره‌ی غذایی تجاری اختصاصی و بهینه با هدف آبزی‌پروری مطلوب آن دست یافت. در نتیجه در مطالعه‌ی کنونی سعی گردید به بررسی اثرات رنگدانه‌ی کاروتنوئیدی لیکوپن بر روی برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی غیر اختصاصی میگوی رودخانه‌ای شرق به عنوان یک گونه برخوردار از پتانسیل بهینه اقتصادی و قابلیت پرورش مناسب در منابع مختلف آب شیرین کشور ایران پرداخته شود.

مواد و روش کار

میگو و شرایط پرورش

مطالعه‌ی کنونی در تابستان سال ۱۳۹۸ به مدت زمان ۵۶ روز انجام پذیرفت. نمونه‌های میگوی مورد پژوهش، به وسیله‌ی تله و همچنین تور با محدوده وزن ۱–۱/۵ گرم و طول کل حدود ۵ سانتی‌متر از رودخانه‌ی سیاه درویشان (طول و عرض جغرافیایی '۳۰ °۴۹ شرقی؛ '۲۵ °۳۷ شمالی، ارتفاع از سطح دریا ۱۵– متر، صومعه‌سرا، استان گیلان، ایران) که از جمله نواحی مهم زیست این میگو در بخش‌های جنوبی دریای خزر می‌باشد، صید و به محل آزمایش منتقل گردیدند. میگوها به مدت زمان ۱۴ روز در مخزن ۷۰۰ لیتری با هدف سازگاری یافتن با شرایط فیزیکی و شیمیایی آب، مورد نگهداری قرار گرفتند و در طی مدت زمان مورد اشاره با جیره‌ی غذایی پایه میگوی رودخانه‌ای شرق (پروتئین ۴۵ درصد، چربی ۵ درصد، خاکستر ۱۴ درصد، رطوبت ۱۰– ۹ درصد، انرژی ۱۸ کیلوژول در گرم، قطر ۱ میلی‌متر) بر اساس مقدار اشتها تغذیه شدند (Ettefaghdoost et al. 2018). پس از طی دوره‌ی تطابق، میگوها زیست سنجی و با میانگین وزن ۰/۰۷±۱/۴۰ گرم و طول کل ۰/۳۲±۵ سانتی‌متر، جداسازی شدند و به طور کاملاً تصادفی بین ۱۵ آکواریوم شیشه‌ای به تعداد ۱۵ نمونه در هر آکواریوم تقسیم گردیدند. حجم آبگیری مورد استفاده برای تیمارها، ۶۰ لیتر و منبع آب به بهره گرفته شده برای آکواریوم‌ها آب شهری بود که پیش از به کارگیری در مخازن پرورشی، به منظور کلرزدایی در آن به شکل مداوم هوادهی در طول مدت زمان ۲۴ ساعت، انجام پذیرفت. هوادهی در آکواریوم‌های نگهداری میگو در کل طول دوره‌ی آزمایش به طور پیوسته با استفاده از سنگ هوا که به هواده مرکزی دانر (AP-100، نیویورک، آمریکا) اتصال یافته بود، انجام گرفت. آب آکواریوم‌های پرورشی به صورت یک روز در میان پیش از غذادهی به مقدار یک‌سوم ظرفیت آن و در زمان زیست‌سنجی تمام ظرفیت آن مورد تعویض قرار گرفت و با آب کلرزدایی شده جایگزین گردید. تنظیم طول دوره‌ی نوری در دوره‌ی پرورش به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تعبیه شد که به وسیله‌ی لامپ فلورسنت با رنگ سفید صورت گرفت.

ساخت جیره و طراحی آزمایش

تنظیم جیره‌های آزمایشی بر طبق جیره‌ی پایه میگوی رودخانه‌ای شرق با بهره‌گیری از برنامه‌ی جیره‌نویسی لیندو (نسخه ۱۰، ایلینوی، آمریکا) انجام گرفت. پس از تهیه گردیدن بخش‌های مختلف اقلام غذایی جیره فرآیند ساخت جیره‌های غذایی انجام گرفت، در ابتدا مواد اولیه‌ی توسط آسیاب مولینکس (AR1044، پاریس، فرانسه) به طور کامل پودر و پس از آن به کمک الک ۱۰۰ میکرونی غربال شدند تا زمانی که نمونه‌ای یکنواخت به دست آمد و در صورت وجود ناخالصی از آن جداسازی گردید. مواد اولیه مورد نیاز برای تهیه‌ی جیره‌های آزمایشی با استفاده از ترازوی دیجیتال، مورد توزین قرار گرفتند و همه‌ی اجزای جیره با دقت به مدت زمان ۱۰ تا ۱۵ دقیقه با همدیگر مخلوط شدند. در نهایت به مخلوط حاصل شده، میزان ۳۰ درصد ماده‌ی خشک، آب مقطر نیز افزوده شد. مخلوط‌های اولیه غذایی تهیه شده، به دستگاه اکسترودر مایانگ (HSH10، جیانگسو، چین) وارد گردیدند و جیره‌های نهایی با اندازه‌ای در حدود ۱ میلی‌متر از آن‌ها تولید شد. در نهایت به جیره‌های آماده شده، پس از حل نمودن پودر لیکوپن ۱۰ درصد شرکت آدونیس دارو (تهران، تهران،

ایران) در آب مقطر توسط همزن مغناطیسی INTLLAB™ (MS-500، کوالالامپور، مالزی)، بر جیره‌های آزمایشی اسپری گردید. بعد از خشک شدن نمونه‌های غذایی، جیره‌های فراهم آمده در دمای ۱۶- درجه‌ی سانتی‌گراد فریزر مورد نگهداری قرار گرفتند. به دلیل حساسیت رنگدانه لیکوپن به نور و دما، جیره‌های مصرفی روزانه در یخچال (دمای حدود ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) و درون ظروف و پلاستیک تیره رنگ، نگهداری شدند. تیمارهای آزمایشی شامل پنج جیره‌ی غذایی با سطوح مختلف رنگدانه‌های کاروتنوئیدی صفر (بدون رنگدانه یا شاهد)، لیکوپن (سطوح ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم رنگدانه در کیلوگرم جیره) بر حسب جیره‌ی غذایی پایه مورد مطالعه‌ی میگوی رودخانه‌ای شرق بود که در آن نمونه‌های میگو به مدت زمان ۸ هفته در پنج تیمار آزمایشی و سه تکرار، تغذیه گردیدند. غذادهی به آن‌ها در چهار نوبت (ساعات ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰) به صورت دستی و به اندازه‌ی سه درصد غذادهی با احتساب میانگین وزن توده زنده انجام گرفت (Ettefaghdoost et al. 2015, Ding et al. 2017, Ettefaghdoost & Alaf Noveirian 2017). اقلام غذایی و تجزیه‌ی تقریبی جیره‌های غذایی استفاده گردیده برای پرورش میگوی رودخانه‌ای شرق در پژوهش حاضر، در Table 1 آورده شده است (AOAC 2016).

Table 1: Composition and proximate analysis of experimental diets for the oriental river prawn

Lycopene (mg/kg)					
	control	50	100	150	200
Ingredients (%)					
Fish meal[1]	30	30	30	30	30
Soy meal	30	30	30	30	30
Wheat meal	7	7	7	7	7
Corn meal	7	7	7	7	7
Casein[2]	16	16	16	16	16
Vitamin premix[3]	2	2	2	2	2
Mineral premix[4]	2	2	2	2	2
Cholesterol[5]	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamin C[6]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Dicalcium phosphate[7]	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Filler (CMC) premix[8]	5.2	5.195	5.19	5.185	5.18
Carotenoid pigment (Lycopene)[9]	0	0.005	0.01	0.015	0.02
Proximate composition (dry matter basis)					
Moisture (%)	9.43	9.62	9.59	9.32	9.17
Crude protein (%)	44.86	44.71	44.57	44.61	44.85
Crude lipid (%)	4.88	5.19	4.63	4.49	4.80
Fiber (%)	2.79	2.91	2.84	2.78	2.69
Ash (%)	14.66	14.83	14.36	14.29	14.47
Nitrogen-free extract (%)	32.81	32.36	33.60	33.83	33.19
Gross energy (KJ/g)[10] (%)	18.23	18.38	18.19	18.12	18.05
Total carotenoids (mg/kg)	4.52	51.89	108.06	155.77	198.41

[1] Mazandaran Animal and Aquatic Feed (Sari, Mazandaran, Iran).
[2] Quelab Laboratories Inc. (Montreal, Quebec, Canada)
[3] The Science Laboratories (Qazvin, Qazvin, Iran) – Each 1000 g premix contained; 1600000 IU retinol, IU 400000 calciferol, 40 g alpha tocopherol, 2 g menadione, 6 g thiamine, 8 g riboflavin, vitamin g 12 niacin, 40 g pantothenic acid, 4 g pyridoxine, 2 g f 60 g ascorbic acid, 240 mg biotin, 20 g inositol, 20 g butyl hydroxytoluene
[4] The Science Laboratories (Qazvin, Qazvin, Iran) – Each 1000 g mineral premix contained; 20 iron, 60 g zinc, 4000 mg selenium, 2000 mg cobalt, 5000 mg copper, 4000 mg manganese, 80 mg iodine, 80,000 mg choline chloride
[5] Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
[6] The Science Laboratories (Qazvin, Qazvin, Iran) – Each 1000 g vitamin C contained; 500 g Stay-C
[7] The Arastaban Company (Amol, Mazandaran, Iran)
[8] The Kimia Tehran Acid Company (Tehran, Tehran, Iran)
[9] The Adonis Daru Company (Tehran, Tehran, Iran)
[10] Gross energy calculation based on; Protein (16.7 KJ/g), Lipid (37.6 KJ/g), Carbohydrate (16.7 KJ/g)

فرآیند همولنف‌گیری

در انتهای دوره‌ی آزمایش، نمونه‌گیری از همولنف میگوهای تغذیه گردیده با سطوح مختلف رنگدانه کاروتنوئیدی لیکوپن انجام پذیرفت. در ابتدا بعد از قطع غذادهی به مدت زمان ۲۴ ساعت و قرار گرفتن نمونه‌ها با مدت زمان ۱۵ دقیقه در تشت دارای یخ خشک (دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) به منظور جلوگیری از بروز استرس و کاهش تحرک میگوها، از هر تکرار به طور کاملاً تصادفی تعداد ۵ عدد میگو انتخاب و جهت نمونه‌گیری همولنف با استفاده از سرنگ انسولین (۱ میلی‌لیتر) دارای سر سوزن شماره ۲۶ G که درون سرنگ جهت جلوگیری از انعقاد با ۰/۴ میلی‌لیتر محلول ضد انعقاد آلزور (۱۱۵ میلی‌مول گلوکز، ۲۷ میلی‌مول سیترات سدیم، ۳۳۶ میلی‌مول سدیم کلرید، ۹ میلی‌مول اتیلن دی آمین ترا استیک اسید، pH: ۷/۳) با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و نسبت ۱:۱ آغشته شده بود، انجام گرفت. برای انجام این کار، نوک سوزن سرنگ مورد استفاده را در ناحیه‌ی سینوس شکمی (پاهای اول و دوم شنا در کنار طناب عصبی شکمی) با زاویه مورب ۴۵ درجه در زیر لایه‌ی قشری پوسته به آرامی فرو گردید و از هر نمونه به میزان حداکثر همولنف (حدود ۰/۴ میلی‌لیتر و ۵ درصد وزن بدن میگو) اخذ و پس از آن سرنگ‌های نمونه‌گیری، تکان داده شد تا همولنف میگو با محلول ضد انعقاد کاملاً مخلوط شود. بخشی از این همولنف‌های نمونه‌گیری شده به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های ایمنی سلولی به میکروتیوب‌هایی که معادل حجم آن از بافر فرمالین ۱۰ درصد استفاده گردیده بود، منتقل شدند و در تا زمان سنجش، در یخچال با دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد نگهداری قرار گرفتند. بخش دیگر نمونه‌های همولنف اخذ شده تا مرحله‌ی آنالیز نمونه‌ها، نمونه‌های اخذ شده تا مرحله‌ی آنالیز نمونه‌ها، در میکروتیوب‌های جداگانه و در فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد Esco Lexicon® (UUS 668A-1، تورنتو، کانادا) نگهداری گردیدند. میکروتیوب‌های حاوی نمونه پس از انتقال از فریزر ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد به محل آزمایشگاه با دمای اتاق (درجه حرارت حدود ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد) فرآیند یخ‌زدایی انجام گرفت و سپس به وسیله‌ی دستگاه ورتکس (Vortex) دنا تجهیز (R_3، تهران، ایران) در مدت زمان ۲۰-۳۰ ثانیه نمونه‌ها به طور کامل همگن و برای انجام آنالیزهای مورد نظر به کار گرفته شد (Zhao et al. 2016, Kuo et al. 2019, Liu et al. 2019, Xu et al. 2019).

تعیین شاخص‌های بیوشیمیایی

مقدار آلبومین به روش بروموکروزول سبز و اندازه‌گیری پروتئین کل پلاسما با روش بیوره، توسط کیت‌های آزمایشی پارس آزمون (کرج، البرز، ایران) در طول موج ۵۴۶ نانومتر بر حسب گرم در دسی‌لیتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. سنجش میزان کورتیزول به روش الایزا، به وسیله‌ی کیت Monobind (AccuBind® ELISA، ایلینوی، ایالات متحده آمریکا) و همچنین دستگاه خوانشگر الایزا BioTek® (ELx800™، ورمونت، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۴۵۰ نانومتر بر حسب نانوگرم بر میلی‌لیتر انجام گرفت (Sadat Hoseini Madani et al. 2018, Stalin et al. 2019).

تعیین شاخص‌های سلولی همولنف

تعداد هموسیت کل توسط لام هموسیتومتر (نئوبار با حجم ۰/۱ میلی‌متر مکعب) انجام پذیرفت که به جهت انجام این آزمایش، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه توسط سمپلر روی لام قرار داده شد و پس از قرار گرفتن لامل سنگی (Hemocytometer coverslip) بر روی آن در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰× لنز شیئی (شمارش سلول‌های موجود در چهار مربع بزرگ در چهار گوشه صفحه مدرج) بررسی گردید و برای سنجش شمارش افتراقی هموسیت‌ها، شامل سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و هیالین، در ابتدا به جهت تهیه‌ی گسترش، ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه همولنف را بر روی لام ریخته و لام

دیگری را با زاویه‌ی مورب ۴۵ درجه بر روی لام دارای قطره‌ی همولنف کشیده تا آن قطره روی لام کاملاً پخش شود. بعد از آماده نمودن گسترش همولنف و خشک گردیدن آن‌ها، با هدف تثبیت نمودن نمونه‌ها به مدت زمان ۳۰ ثانیه درون الکل متیلیک خالص وارد شدند و پس از آن به منظور رنگ‌آمیزی از روش مای-گرانوالد گیمسا (May-Grünwald Giemsa) و رنگ گیمسا ۱۰ درصد استفاده گردید. بعد از شستشوی لام‌ها با آب دوبار تقطیر، آن‌ها در دمای اتاق خشک گردیدند و از گسترش‌های تهیه شده به وسیله‌ی میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی۴۰× با توجه به اندازه و تعداد گرانول‌های سیتوپلاسم، نسبت هسته به سیتوپلاسم و همچنین رنگ‌بندی سیتوپلاسم سلول‌ها بررسی دقیق صورت گرفت و محاسبه این شاخص‌ها بر اساس 10^5× سلول در میلی‌لیتر انجام پذیرفت (Kuo et al. 2019, Liu et al. 2019, Xu et al. 2019).

تعیین شاخص‌های آنزیمی همولنف

اندازه‌گیری فعالیت لیزوزیم با بهره‌گیری از روش کدورت سنجی و دستگاه BioTek® (ELx800™، ورمونت، ایالات متحده آمریکا) انجام پذیرفت. بر طبق آن، ۱۵ میکرولیتر از نمونه همولنف به همراه ۱۳۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری (*Micrococcus lysodeikticus* ATCC No.) Sigma 4698، سنت لوئیس، ایالات متحده آمریکا) به عنوان سوبسترا در بافر ۰/۲ مولار سدیم فسفات Sigma(P. 4417، سنت لوئیس، ایالات متحده آمریکا) با میزان pH ۶/۲، در چاهک‌های میکروپلیت مخلوط شد و بررسی جذب نوری نمونه‌ها در دمای ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (زمان‌های ۱ و ۵ دقیقه پس از مخلوط سازی) و طول موج ۴۵۰ نانومتر، انجام پذیرفت. یک واحد فعالیت آنزیم لیزوزیم، بر اساس میزان آنزیمی که در طول موج و دمای بیان شده، مقدار کاهشی که در جذب سلول‌های باکتری معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه ایجاد می‌کند، بر حسب واحد بین‌المللی در دقیقه در میلی-لیتر تعریف گردید (Cha et al. 2008). اندازه‌گیری میزان فنول اکسیداز با روش طیف سنجی به وسیله‌ی دستگاه BioTek® (ELx800™، ورمونت، ایالات متحده آمریکا) در طول موج ۴۹۰ نانومتر و شکل‌گیری رنگدانه‌ی قرمز دوپاکروم (DOPA-chrome) بر اساس واحد بین المللی در دقیقه در میلی‌گرم پروتئین انجام پذیرفت. میزان آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز بر اساس روش فدراسیون بین المللی شیمی بالینی و طب آزمایشگاهی (IFCC) و بدون افزودن Pyridoxal-5-phosphate در طول موج ۳۴۰ نانومتر، آلکالین فسفاتاز بر اساس روش استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان (DGKC) در طول موج ۴۰۵ نانومتر به وسیله‌ی کیت‌های پارس آزمون (کرج، البرز، ایران) بر حسب واحد بین المللی در لیتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند (Cheng & Wu 2019, Xu et al. 2019).

نتایج

شاخص‌های بیوشیمیایی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق در Table 2 آورده شده است. همان طور از نتایج مشخص است، با افزایش سطوح لیکوپن جیره‌ی غذایی شاخص‌های آلبومین و پروتئین کل همولنف میگوها، به طور معنی‌داری افزایش پیدا نمود در حالی که میزان کورتیزول میگوهای تغذیه شده با رنگدانه‌ی لیکوپن کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند ($P<0/05$).

Table 2: Comparison of mean (±standard deviation) biochemical parameters of the oriental river prawn fed with different lycopene levels (mg/kg diet) at the during of culture period

Parameters	Lycopene (mg/kg)					One- way ANOVA		
	Control	50	100	150	200	F	d.f.	P-value
Albumin (g/dl)	1.14±0.03^{d}	1.28±0.04^{c}	1.37±0.01^{b}	1.42±0.02^{a}	1.44±0.03^{a}	62.841	4	0.000
Total protein (g/dl)	3.83±0.08^{e}	5.39±0.14^{c}	4.97±0.22^{d}	6.24±0.10^{b}	6.47±0.15^{a}	214.277	4	0.000
Cortisol (ng/ml)	12.53±0.21^{a}	8.75±0.19^{d}	10.24±0.28^{b}	9.32±0.05^{c}	8.40±0.42^{d}	96.599	4	0.000

Means with different letters indicate significant differences between various rows (P< 0.05).

شاخص‌های ایمنی سلولی

یافته‌های به دست آمده از بررسی شاخص‌های ایمنی میگوها در Table 3 بیان گردیده است که در آن شاخص-های تعداد هموسیت کل، سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و همچنین سلول‌های هیالین تیمارهای تغذیه شده با سطوح متفاوت رنگدانه لیکوپن افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند که بیشترین میزان این شاخص ها در تیمار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم رنگدانه لیکوپن و کمترین میزان آن‌ها در تیمار شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵).

Table 3: Comparison of mean (±standard deviation) immunological parameters of oriental river prawn fed with different lycopene levels (mg/kg diet) at the during of culture period

Parameters	Lycopene (mg/kg)					One- way ANOVA		
	Control	50	100	150	200	F	d.f.	P-value
Total hemocyte count (×10^{5} cells/ml)	89.40±1.93^{d}	107.64±2.80^{c}	121.08±1.65^{b}	133.87±2.64^{a}	132.05±1.23^{a}	260.147	4	0.000
Granular cells (×10^{5} cells/ml)	8.81±1.40^{d}	12.72±1.69^{c}	15.25±2.47^{b}	19.82±2.22^{a}	19.30±1.28^{a}	44.645	4	0.000
Semi-granular cells (×10^{5} cells/ml)	37.39±1.23^{d}	43.24±2.47^{c}	50.62±1.29^{b}	54.57±1.83^{a}	51.66±1.73^{a}	84.340	4	0.000
Hyaline cells (×10^{5} cells/ml)	44.46±1.72^{d}	50.74±3.23^{c}	54.40±2.67^{b}	58.19±2.58^{a}	57.64±2.50^{a}	522.367	4	0.000

Means with different letters indicate significant differences between various rows (P< 0.05).

شاخص‌های آنزیمی همولنف

نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنزیم‌های همولنف میگوهای آزمایشی در Table 4 اشاره شده است. میزان آنزیم‌های لیزوزیم و فنول اکسیداز در تیمارهای حاوی رنگدانه لیکوپن به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار بدون رنگدانه بود. لیکن شاخص‌های آنزیمی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵)، در حالی که که آنزیم آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر سطوح مختلف رنگدانه لیکوپن قرار نگرفت (P>۰/۰۵).

Table 4: Comparison of mean (±standard deviation) enzymatic hemolymph parameters of oriental river prawn fed with different lycopene levels (mg/kg diet) at the during of culture period

Parameters	Lycopene (mg/kg)					One- way ANOVA		
	Control	50	100	150	200	F	d.f.	P-value
Lysozyme (U/min/ml)	9.45±0.30^{d}	11.49±0.16^{c}	14.09±0.33^{b}	14.50±0.25^{ab}	14.58±0.20^{a}	245.142	4	0.000
Phenoloxidase (U/min/mg protein)	0.48±0.03^{d}	0.51±0.02^{cd}	0.55±0.02^{bc}	0.59±0.01^{ab}	0.61±0.03^{a}	17.244	4	0.000
Alanine aminotransferase (U/L)	21.94±2.05^{a}	18.16±1.27^{b}	16.71±1.25^{b}	14.36±1.05^{c}	12.10±1.37^{c}	25.484	4	0.000
Aspartate aminotransferase (U/L)	73.66±1.12^{a}	69.88±0.95^{b}	69.10±0.68^{b}	66.19±1.42^{c}	65.17±0.87^{c}	35.671	4	0.000
Alkaline phosphatase (U/L)	148.25±1.98	149.19±1.86	148.35±1.07	149.24±1.89	152.02±2.05	2.137	4	0.151
Lactate dehydrogenase (U/L)	637.73±2.76^{a}	629.13±1.93^{b}	620.24±1.62^{c}	619.51±2.74^{cd}	612.51±2.69^{d}	19.242	4	0.000

Means with different letters indicate significant differences between various rows (P< 0.05).

بحث

رنگدانه‌ی لیکوپن به دلیل برخورداری از طولانی‌ترین زنجیره‌ی هیدروکربنی در میان کاروتنوئیدها با یازده پیوند دوگانه (حدود ۲۰۴۸ ترکیب هندسی) از مهمترین رنگدانه-های کاروتنوئیدی به لحاظ خاصیت آنتی‌اکسیدانی و تأثیرگذاری مناسب بر فرآیندهای مرتبط با ایمنی می‌باشد که به همین دلیل یک ریز مغذی اصلی و مهم در جیره‌ی غذایی آبزیان به شمار می‌آید که همچون سایر کاروتنوئیدها به صورت زیستی در میگوها تشکیل نمی‌گردد و در نتیجه میگوها باید آن‌ها را از طریق رژیم غذایی خود، دریافت نمایند ولی با این وجود میگوها و به طور کلی سخت‌پوستان از قابلیت تبدیل رنگدانه‌های کاروتنوئیدی به یکدیگر برخوردار می‌باشند (Mao et al. 2017). از جمله دیگر نقش‌های قابل ملاحظه رنگدانه‌های کاروتنوئیدی همچون افزایش کارآیی ایمنی غیر اختصاصی، افزایش میزان تحمل در مقابل استرس ناشی از نوسانات فیزیکوشیمیایی آب، محافظت نمودن از بافت‌های مختلف در برابر نور فرابنفش، سرعت بخشیدن به رشد و بلوغ جنسی و همچنین نقش مؤثر به عنوان یک آنتی‌اکسیدان بسیار کارآمد را اشاره نمود (Galasso et al. 2017). در مطالعه‌ی حاضر شاخص‌های بیوشیمیایی همچون آلبومین و پروتئین کل همولنف میگوها، به طور معنی‌داری در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف رنگدانه‌ی لیکوپن افزایش پیدا نمود در حالی که میزان کورتیزول به طور معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد از خود کاهش نشان داد که نتایج حاصل از این پژوهش با مطالعه Cheng و Wu در سال ۲۰۱۹ دارای مطابقت بود که با آزمایش اثر سطوح مختلف رنگدانه‌ی آستازانتین بر روی شاخص پروتئین کل همولنف خرچنگ قرمز (*Procambarus clarkii*) با میانگین وزنی ۷/۱۵ گرم و به مدت ۸ هفته، افزایش معنی‌داری را در این شاخص بیوشیمیایی در تیمارهای تغذیه شده با آستازانتین نسبت به تیمار شاهد، مشاهده نمودند. همچنین Beygi Kaleshtari و همکاران در سال ۲۰۱۹ نیز به نتایج مشابهی دست یافتند، زیرا در آزمایش ایشان با بررسی اثر مقادیر مختلف پودر هویج حاوی رنگدانه بتاکاروتن بر روی شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی ۵۰ گرم و به مدت ۶۰ روز، به این نتیجه رسیدند که با افزایش مقادیر آن در جیره‌ی غذایی، شاخص‌های بیوشیمیایی پروتئین کل به طور معنی‌داری افزایش یافت ولی میزان کورتیزول کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان داد. از جمله دلایل به

دست آمدن نتایج مشابه بیان شده را می‌توان اثرگذاری مثبت رنگدانه‌های کاروتنوئیدی همچون لیکوپن بر فعالیت‌های سوخت و سازی و همچنین کاهش استرس‌های محیطی همانند تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب و استرس اکسیداتیو اشاره نمود (Zhi et al. 2018, Cheng & Wu 2019). در پژوهش کنونی با افزایش مقادیر رنگدانه‌ی لیکوپن جیره‌ی غذایی، شاخص‌های ایمنی همانند تعداد هموسیت کل و سلول‌های گرانولار، نیمه گرانولار و هیالین به طور معنی-داری افزایش پیدا نمود که این نتایج با آزمایش Chuchird و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر اثرات رنگدانه‌ی آستازانتین بر روی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین ۴/۴۵ گرم در مدت ۶۰ روز به این نتیجه دست یافتند که با افزایش سطوح آستازانتین جیره‌ی غذایی، شاخص‌های ایمنی میگوهای مطالعه شده همچون تعداد هموسیت کل همولنف به طور معنی‌داری نسبت به تیمار بدون رنگدانه افزایش نشان داد، دارای همخوانی بود. همچنین نتایج مشابهی در تحقیقات Flores و همکاران در سال ۲۰۰۷ با بررسی سطوح متفاوت رنگدانه آستازانتین (صفر، ۴۰، ۸۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) بر شاخص‌های مذکور بر روی پست لارو میگوی پاسفید غربی، Wang و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر تأثیرات مقادیر مختلف آستازانتین به مدت ۶۰ روز در میگوی ژاپنی (*Marsupenaeus japonicus*) با میانگین وزن ۱/۴۱ گرم، Weilong و همکاران در سال ۲۰۱۹ بر اثر سطوح مختلف رنگدانه‌ی آستازانتین روی میگوی ژاپنی با میانگین وزن ۲/۸ گرم، حاصل گردید. در واقع تشابه یافته‌های به دست آمده از مطالعات مختلف اشاره شده، بیانگر نقش قابل توجه رنگدانه‌های کاروتنوئیدی در بهبود وضعیت فرآیندهای مرتبط با ایمنی غیر اختصاصی و افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای محیطی همانند باکتری‌ها و همچنین بالا بردن میزان تحمل در مقابل شرایط استرس محیطی می‌باشد، در حالت کلی افزایش تعداد هموسیت کل در سخت‌پوستان به عنوان شاخصی برای مقاومت در برابر بیماری‌ها محسوب می‌گردد (Chuchird et al. 2015, Zhi et al. 2018, Cheng & Wu 2019). در این مطالعه میزان آنزیم-های لیزوزیم و فنول اکسیداز در تیمارهای شامل رنگدانه لیکوپن به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار بدون رنگدانه بود. در ارتباط با این موضوع، تحقیقات Alishahi و همکاران در سال ۲۰۱۵ با بررسی اثرات مقادیر مختلف آستازانتین بر روی ماهی اسکار (*Astronotus ocellatus*) در مدت ۵۰ روز به این نتیجه رسیدند که با افزایش مقادیر آستازانتین جیره‌ی غذایی، در میزان آنزیم لیزوزیم افزایش معنی‌داری مشاهده گردید و همچنین Cheng و Wu در سال ۲۰۱۹ در ارتباط با اثر آستازانتین بر روی آنزیم لیزوزیم همولنف خرچنگ قرمز، نتایج مشابهی حاصل شد که با یافته‌های به دست آمده از مطالعه‌ی کنونی، همخوانی دارد. آنزیم‌های لیزوزیم و فنول اکسیداز از جمله مهمترین شاخص‌های ایمنی غیر اختصاصی سخت پوستان محسوب می‌گردد که تأثیر قابل توجهی بر از بین بردن باکتری‌ها (به ویژه از نوع گرم–مثبت) ایفا می‌نماید. که در واقع میزان فعالیت این آنزیم‌ها نشانه‌ای از عملکرد مناسب ایمنی و سلامت این آبزیان به شمار می‌آید (Zhang et al. 2015, Zhi et al. 2018). با بررسی نتایج این مطالعه با یافته‌های مشابه بیان شده، می‌توان این طور نتیجه گرفت که افزایش سطوح فعالیت این آنزیم‌ها در نمونه‌های مطالعه شده بیانگر نقش مؤثر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی همچون لیکوپن بر روی قابلیت ایمنی غیر اختصاصی این میگو می‌باشد. در این پژوهش آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینوترانسفراز و لاکتات دهیدروژناز با افزایش سطوح لیکوپن جیره‌ی غذایی کاهش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد از خود نشان دادند، در حالی که که آنزیم آلکالین فسفاتاز تحت تأثیر سطوح مختلف رنگدانه لیکوپن قرار نگرفت. این نتایج با مطالعه‌ی Cheng و Wu در سال ۲۰۱۹ دارای مشابهت بود که تحقیق ایشان با افزایش سطوح آستازانتین جیره‌ی غذایی در خرچنگ قرمز، این شاخص‌ها کاهش معنی‌داری از خود نشان دادند. آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز از جمله مهمترین انتقال دهنده‌های آمینواسیدها می‌باشند و نقش مهمی در

متابولیسم پروتئین‌ها ایفا می‌کنند. تغییر در میزان این آنزیم-ها نشانه‌ای از وضعیت فیزیولوژیک سلول‌های کبدی است و در حالت معمول سطح پایینی از میزان آن‌ها مشاهده می-گردد و در صورتی که سلول‌های کبدی دچار آسیب‌های جدی شوند، میزان بالایی از آنزیم‌های بیان شده به همولنف وارد می‌گردند. در واقع نتایج مشابه مذکور با مطالعه‌ی حاضر در ارتباط با کاهش معنی‌دار این آنزیم‌ها در همولنف تحت تأثر سطوح رنگدانه‌ی لیکوپن، نشان دهنده‌ی نقش قابل ملاحظه‌ی این رنگدانه همانند سایر رنگدانه‌های کاروتنوئیدی بر روی وضعیت سلامت سلول‌های هپاتوپانکرانس میگوی مورد مطالعه می‌باشد (Lim et al. 2018, Cheng & Wu 2019).

در نهایت، نتایج به دست آمده از مطالعه‌ی کنونی نشان داد که افزایش سطوح لیکوپن جیره‌ی غذایی موجب بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف و ایمنی غیر اختصاصی میگوی رودخانه‌ای شرق گردید که نشان دهنده‌ی اهمیت قابل ملاحظه‌ی رنگدانه‌ی لیکوپن در افزایش عملکرد بهنیه-ی فرآیندهای سوخت و ساز سلولی و تأثیرگذاری مطلوب بر فرآیندهای مرتبط با ایمنی می‌باشد. در نتیجه با مشاهده و ارزیابی یافته‌های حاصل شده، افزودن مقادیر این رنگدانه کاروتنوئیدی تا سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم لیکوپن به جیره‌ی غذایی با هدف بهبود شاخص‌های بیوشیمیایی، ایمنی و آنزیمی همولنف این میگو، پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از تمامی عزیزانی که در انجام مراحل این پژوهش یاری رساندند، تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

بدین وسیله نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

منابع مالی این تحقیق به صورت شخصی توسط نویسندگان تأمین گردیده است.

منابع

Alishahi, M.; Karamifar, M. & Mesbah, M. (2015). Effects of astaxanthin and *Dunaliella salina* on skin carotenoids, growth performance and immune response of *Astronotus ocellatus*. Aquaculture international, 23(5): 1239-1248.

AOAC. (2016). Official Methods of Analysis, 20th Ed. (Editor: Dr. George W. Latimer, Jr.) Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC. USA. P: 3172.

Bayrami, A.; Allaf Novirian, H.; Afshar Mohammadian, M.; Asadi Sharif, E.; Ghorbani, F. et al. (2018). Interactive effects of combined cropping of rice and shrimp (*Macrobrachium nipponense*). Aquatics Physiology and Biotechnology, 5(4): 91-111.

Beygi Kaleshtari, A.; Hosseini, S.V.; Farhangi, M. & Rafiee, G. (2019). Replacement of carrot powder with synthetic astaxanthin in the rainbow trout diet: effect on the growth performance and blood parameters. Journal of Aquatic Animals Nutrition, 5(1): 59-70. (in Persian)

Cha, S.H.; Lee, J.S.; Song, C. B. & Lee, K. J. (2008). Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the Oliver flounder, *Paralichthys olivaceus*, Aquaculture, 278: 110-118.

Cheng, Y. & Wu, S. (2019). Effect of dietary astaxanthin on the growth performance and nonspecific immunity of red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. Aquaculture, 512: 734341.

Chuchird, N.; Rorkwiree, P. & Rairat, T. (2015). Effect of dietary formic acid and astaxanthin on the survival and growth of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. SpringerPlus, 4(1): 440.

De Grave, S. & Ghane, A. (2006). The establishment of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849) in Anzali Lagoon, Iran. Aquatic Invasions, 1(4): 204-208.

Ding, Z.; Kong, Y.; Zhang, Y.; Li, J.; Cao, F.; Zhou, J. et al. (2017). Effect of feeding frequency on growth, body composition, antioxidant status and mRNA expression of immunodependent genes before or after ammonia-N stress in juvenile oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. Fish and shellfish immunology, 68: 428-434.

Etefaghdost, M.; Haghighi, H. & Alaf Noveirian, H. (2015). The effect of different feeding frequency on growth indices, survival and body composition of Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849). Iranian Scientific Fisheries Journal, 24(1): 83-95. (in Persian)

Ettefaghdoost, M. & Alaf Noveirian, H. (2017). The effect of different feeding rates on growth indices, feed conversion ratio and body composition of Oriental River prawn *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849). Iranian Scientific Fisheries Journal, 25(5): 97-112. (in Persian)

Ettefaghdoost, M.; Alaf Noveirian, H. & Falahatkar, B. (2018). Growth performance, feed efficiency and whole-body chemical composition of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*, fed different dietary protein to lipid ratio. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 17(3): 585-602.

Flores, M.; Díaz, F.; Medina, R.; Re, A.D. & Licea, A. (2007). Physiological, metabolic and haematological responses in white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) juveniles fed diets supplemented with astaxanthin acclimated to low-salinity water. Aquaculture research, 38(7): 740-747.

Fatemi, M.; Azadi, H.; Rafiaani, P.; Taheri, F.; Dubois, T.; Van Passel, S. et al. (2018). Effects of supply chain management on tomato export in Iran: application of structural equation modeling. Journal of Food Products Marketing. 24(2):177-195.

Fu, H.; Gong, Y.; Wu, Y.; Xu, P. & Wu, C. (2004). Artificial interspecific hybridization between *Macrobrachium* species. Aquaculture, 232(1-4): 215-223.

Galasso, C.; Corinaldesi, C. & Sansone, C. (2017). Carotenoids from Marine Organisms: Biological Functions and Industrial Applications. Antioxidants, 6(4): 96.

Kuo, H.-W.; Lin, D.-W. & Cheng, W. (2019). Transient enhancement of immune resistance functions in *Litopenaeus vannamei* through a low-dose octopamine injection. Fish and shellfish immunology, 84: 532-540.

Kutty, M.N. (2005). Towards sustainable freshwater prawn aquaculture–lessons from shrimp farming, with special reference to India. Aquaculture Research, 36(3): 255-263.

Lim, K.C.; Yusoff, F.M.; Shariff, M. & Kamarudin, M.S. (2018). Astaxanthin as feed supplement in aquatic animals. Reviews in Aquaculture, 10(3): 738-773.

Liu, K.-F.; Kuo, H.-W.; Chang, C.-C. & Cheng, W. (2019). The intracellular signaling pathway of octopamine upregulating immune resistance functions in *Penaeus monodon*. Fish and shellfish immunology, 92: 188-195.

Mahfuzur, R.; Lutzu, G.A.; Alam, A.; Sarker, P.; Chowdhury, M.K.; Parsaeimehr, A. et al. (2018). Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. Journal of Applied Phycology, 30(1): 197-213.

Mao, X.; Guo, N.; Sun, J. & Xue, C. (2017). Comprehensive utilization of shrimp waste based on biotechnological methods: A review. Journal of Cleaner Production, 143: 814-823.

New, M.B. & Nair, C.M. (2012). Global scale of freshwater prawn farming. Aquaculture Research, 43(7): 960-969.

Sadat Hoseini Madani, N.; Adorian, T.J.; Ghafari Farsani, H. & Hoseinifar, S.H. (2018). The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. Aquaculture Research, 49(5): 1926-1933.

Stalin, A.; Suganthi, P.; Mathivani, S.; Broos, K.; Gokula, V.; Sadiq Bukhari, A. et al. (2019). Effect of cobalt-60 gamma radiation on total hemocyte content and biochemical parameters in *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). International journal of radiation biology, 95(6): 753-763.

Sun, S.; Fu, H.; Ge, X.; Zhu, J.; Gu, Z. & Xuan, F. (2016). Identification and comparative analysis of the oriental river prawn (*Macrobrachium nipponense*) microRNA expression profile during hypoxia using a deep sequencing approach. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 17: 41-47.

Wang, W.; Ishikawa, M.; Koshio, S.; Yokoyama, S.; Hossain, M.S. & Moss, A.S. (2018). Effects of dietary astaxanthin supplementation on juvenile kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Aquaculture, 491: 197-204.

Weilong, W.; Ishikawa, M.; Koshio, S.; Yokoyama, S.; Dawood, M.A.; Hossain, M.S. et al. (2019). Effects of dietary astaxanthin and vitamin E and their interactions on the growth performance, pigmentation, digestive enzyme activity of kuruma shrimp (*Marsupenaeus japonicus*). Aquaculture Research, 50(4): 1186-1197.

Xu, Z.; Guan, W.; Xie, D.; Lu, W.; Ren, X.; Yuan, J. et al. (2019). Evaluation of immunological response in shrimp *Penaeus vannamei* submitted to low temperature and air exposure. Developmental and Comparative Immunology, 100:103413.

Zhang, F.; Wei, J.; Li, Q.; Jiang, R.; Yu, N.; Qin, J. et al. (2015). Effects of perfluorooctane sulfonate on the immune responses and expression of immune-related genes in Chinese mitten-handed crab *Eriocheir sinensis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 172: 13-18.

Zhao, W.; Wang, Z.; Yu, Y.; Qi, Z.; Lü, L.; Zhang, Y. et al. (2016). Growth and antioxidant status of oriental river prawn *Macrobrachium nipponense* fed with diets containing vitamin E. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 34(3): 477-483.

Zhi, W.; Cai, C.-f.; Cao, X.-m.; Zhu, J.-m.; He, J.; Wu, P. et al. (2018). Supplementation of dietary astaxanthin alleviated oxidative damage induced by chronic high pH stress, and enhanced carapace astaxanthin concentration of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. Aquaculture, 483: 230-237.

Received: 18.08.2020
Accepted: 21.10.2020

Vol. 18, No. 2, Summer, 2022 **Original Article**

DOI: 10.22055/IVJ.2020.244345.2293
DOR: 20.1001.1.17356873.1401.18.2.1.1

The effects of different levels of lycopene pigment on biochemical, immunological and enzymatic hemolymph parameters of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849)

Mohammad Ettefaghdoost[1*] and Hamid Alaf Noveirian[2]

[1] PhD Student, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran
[2] Associate professor, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran

Received: 18.08.2020 Accepted: 21.10.2020

Abstract

Lycopene pigment is one of the most important carotenoids in terms of antioxidant functions and desirable effect on immune-related processes due to the longest hydrocarbon chain among carotenoids with eleven double bonds. Therefore, the present study was aimed to evaluate the effects of lycopene pigment on biochemical, immunity and enzymatic hemolymph parameters of the oriental river prawn. In this research, two hundred and twenty-five prawns with mean weight of 1.40±0.07 gram were fed by five dietary treatments and three replications including different levels of lycopene zero (control), 50, 100, 150 and 200 milligrams lycopene per kilogram diet for fifty-six days. At the end of the culture period, after collecting the hemolymph of the studied prawns, biochemical, immunity and hemolymph enzymes parameters of the samples were evaluated by experimental kits, ELISA reader instrument and optical microscope. The results of the study showed that the biochemical, immunity and enzymatic parameters of prawn hemolymph were affected by different levels of lycopene pigment. With increasing dietary lycopene levels, the biochemical indices of albumin and total protein of prawn hemolymph increased significantly while cortisol levels decreased. Immunity parameters such as total hemocyte count, granular cells, semi-granular cells and hyaline cells, also increased significantly with increasing dietary lycopene. Hemolymph enzymes such as lysozyme and phenol oxidase were higher in treatments containing lycopene pigment than control treatment, while alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and lactate dehydrogenase were significantly reduced and alkaline phosphatase were not affected by different levels of lycopene pigment. Finally, the findings of this study showed that increasing dietary lycopene levels improved the biochemical, immunity and enzymatic hemolymph parameters of the oriental river prawn and adding 200 milligrams per kilogram of this pigment to the diet was suggested to improve the parameters that mentioned of this prawn.

Key words: Carotenoids, Hemolymph, Immunity, Lycopene, Oriental river prawn

[*] **Corresponding Author**: Mohammad Ettefaghdoost**,** PhD Student, Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Sowmeh Sara, Iran
E-mail: ettefaghdoost@phd.guilan.ac.ir

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).