فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال نهم، شماره چهارم، زمستان ۱۴۰۰

مقاله پژوهشی

اثرات پلی‌ساکارید فوکوئیدان استخراج شده از جلبک دریایی *Cystoseira trinodis* (C. Agardh, 1820) بر پاسخ‌های ایمنی میگوی وانامی *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

راضیه صالح‌پور[۱]، نرگس امراللهی بیوکی[۲]*، مهدی محمدی[۳]، عقیل دشتیان نسب[۴]، پدرام ابراهیم‌نژاد[۵]

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۴۰۰

چکیده

مطالعه حاضر، به منظور استفاده از جلبک دریایی خلیج فارس (جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis*) و همچنین استخراج پلی‌ساکارید فوکوئیدان به عنوان یک مکمل محرک ایمنی بر بهبود و ارتقای برخی شاخص‌های ایمنی میگوی وانامی انجام گرفت. از این رو، تعداد ۵۰۰ قطعه میگو، با میانگین وزنی ۸ گرم، به صورت طرح پایه کاملا تصادفی در چهار تیمار با سه تکرار (۱۲ وان) تقسیم و به مدت ۳۰ روز با جیره‌های غذایی حاوی صفر، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد فوکوئیدان تغذیه شدند. نتایج نشان داد که تیمارهای فوکوئیدان تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های مورد سنجش داشتند (P<۰/۰۵). شاخص‌های ایمنی از جمله تعداد سلول‌های هیالین، گرانولار و هموسیت کل، آنیون سوپراکسید، فعالیت آنزیم‌های فنول اکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در گروه‌های تغذیه شده با جیره غذایی حاوی سطوح مختلف فوکوئیدان بویژه ۰/۴ درصد در مقایسه با شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)، در حالی که مقدار مالون دی‌آلدهید کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). به طور کلی با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان اظهار داشت که فوکوئیدان استخراج شده از جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis* در سطوح بالاتر بویژه ۰/۴ درصد عملکرد بهتری در بهبود شاخص‌های ایمنی داشته است. از این رو، این ترکیب زیست فعال می‌تواند به عنوان محرک ایمنی به جیره غذایی میگو وانامی توصیه شود.

واژگان کلیدی: *فوکوئیدان، آنزیم آنتی‌اکسیدان، میگوی پاسفید، جلبک قهوه‌ای، خلیج فارس.*

۱- دکتری زیست‌شناسی دریا، گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.
۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
۴- استادیار پژوهشکده تحقیقات میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بوشهر، ایران.
۵- دانشیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران، ساری، ایران.
* نویسنده مسئول: amrollahi@hormozgan.ac.ir

مقدمه

امروزه توسعه پرورش میگو به عنوان بخش مهمی از صنعت آبزی‌پروری در سراسر جهان به شمار می‌رود. بویژه میگوی وانامی (میگوی پاسفید غربی، *Litopenaeus vannamei*) یک گونه مهم و اقتصادی در آبزی‌پروری است که به علت بازدهی بالا، رشد سریع و سازگاری گسترده با شرایط پرورش، بیش از ۴۲ درصد از کل تولید میگو را به خود اختصاص داده است (MOA, 2016). اگرچه در سال‌های اخیر صنعت میگو به سرعت پیشرفت کرده است، اما مزرعه‌داران با چالش‌هایی مانند دستیابی به افزایش نرخ رشد و کاهش شیوع بیماری روبه‌رو هستند (Niu et al., 2011). از این رو، معمولا در غذای جانوران آبزی قابل پرورش از آنتی‌بیوتیک‌ها برای کنترل بیماری‌های عفونی و همچنین بهبود بقا و رشد استفاده می‌شود. با این حال، به کارگیری آنتی‌بیوتیک به دلیل مقاومت دارویی و تجمع مواد شیمیایی در بافت‌های آبزیان که احتمالا برای سلامت عمومی خطرناک است، مورد انتقادات گسترده قرار گرفته است (Lin et al., 2011). بنابراین، استفاده از مکمل‌های غذایی سالم در بهبود پاسخ ایمنی و محافظت از میگوها در برابر شیوع عوامل بیماری‌زا کاملا ضروری به نظر می‌رسد (Immanuel et al., 2012; Liu et al., 2020). در دهه‌های اخیر، تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی با منشا طبیعی و دریایی به عنوان یک تکنیک فراسودمند برای ارتقای پاسخ ایمنی و مقاومت گونه‌های مختلف میگو در برابر بیماری پیشنهاد شده است (Immanuel et al., 2012; Sivagnanavelmurugan et al., 2015). یکی از غنی‌ترین منابع متابولیت‌های دریایی با خاصیت تحریک‌کننده سیستم ایمنی و تغذیه‌ای، جلبک‌های دریایی بویژه جلبک‌های دریایی قهوه‌ای است که گونه‌های مختلفی از جمله *Cystoseira trinodis* از خانواده Sargassaceae را شامل می‌شود (Guiry and Guiry, 2013). این گونه جلبکی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان از جمله خلیج فارس و دریای عمان و غیره به فراوانی یافت می‌شود که دارای ارزش‌های اکولوژیکی و اقتصادی بالایی در مناطق بین جزر و مدی است. بسیاری از پژوهشگران استفاده از تکنیک‌های غنی‌سازی با عصاره جلبک دریایی و مشتقات پلی‌ساکاریدی مانند پپتیدوگلیکان (Itami et al., 1998)، لیپوپلی‌ساکارید (Takahashi et al., 2000)، گلوکان (Chang et al., 2003)، سدیم آلژینات (Cheng et al., 2005) و

فوکوئیدان (Sivagnanavelmurugan et al., 2012) را در راستای تقویت سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها در میگوها مورد بررسی و پژوهش قرار داده‌اند.

فوکوئیدان مشتق شده از جلبک‌های قهوه‌ای نوعی پلی‌ساکارید سولفاته است که عمدتا از α-L- فوکوز و گروه‌های استر سولفاته تشکیل شده است (Bilan et al., 2006). این ترکیب به عنوان یک مکمل غذایی برای تقویت سیستم ایمنی در برابر عوامل بیماری‌زا مانند WSSV، عفونت‌های ویبریوز و غیره، با توجه به سمیت سلولی پایین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده شده است (Cabello, 2006). به عنوان مثال، Traifalgar و همکاران (۲۰۰۹، ۲۰۱۰) نشان دادند که فوکوئیدان استخراج شده از *Undaria pinnatifida* باعث بهبود مقاومت در برابر عفونت ویبریوز در *Penaeus monodon* و *Marsupenaeus japonicus* می‌شود. Immanuel و همکاران (۲۰۱۲) از فوکوئیدان استخراج شده از *Sargassum wightii* برای کنترل WSSV در میگوهای *P. monodon* استفاده کردند. Sivagnanavelmurugan و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که فوکوئیدان مشتق شده از *S. wightii*، شاخص‌های ایمنی، مقاومت در برابر *Vibrio parahaemolyticus* را در *P. monodon* افزایش داد. در سال بعد، Sivagnanavelmurugan و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که مقاومت در برابر *V. parahaemolyticus* در پست‌لاروهای *P. monodon* پس از تغذیه با ناپلی آرتمیای غنی شده با فوکوئیدان به دست آمده از *S. wightii* افزایش یافت. بنابراین، با توجه به موارد یاد شده در بالا، مطالعه حاضر برای اولین بار در ایران، با هدف بررسی تاثیر فوکوئیدان استخراج شده از ماکروجلبک دریایی قهوه‌ای خلیج فارس *Cystoseira trinodis* بر روی شاخص‌های ایمنی از جمله تعداد هموسیت‌ها و فعالیت‌های مختلف آنزیم‌های مرتبط با ایمنی در میگوی وانامی که با رژیم غذایی غنی شده با غلظت‌های مختلف فوکوئیدان تغذیه شدند، صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و آماده‌سازی نمونه‌های جلبک

ماکروجلبک‌های قهوه‌ای گونه *Cystoseira trinodis* از نواحی بین جزر و مدی در پایین‌ترین نقطه جزر در فصل بهار سال ۱۳۹۷ از سواحل خلیج فارس در استان بوشهر به صورت پیمایش میدانی و تصادفی بر اساس کلید شناسایی سیستماتیک جمع‌آوری شد (Guiry

and Guiry, 2013). ماکرو جلبک‌های دریایی جمع‌آوری شده به وسیله دست با آب دریا شستشو داده شدند تا باقی‌مانده‌های شن و ماسه و غیره از آنها زدوده شود. سپس نمونه‌ها با کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دریایی پژوهشکده خلیج فارس بوشهر منتقل و با آب شهری شستشو داده شدند تا دیگر باقی‌مانده‌های نمکی از بین برود. نمونه‌های جلبکی پاک‌سازی شده در شرایط سایه به صورت آویزان بر روی طناب و هوادهی با پنکه خشک و بعد با آسیاب برقی خرد و پودر شدند.

استخراج فوکوئیدان از ماکروجلبک

برای استخراج ترکیب زیست‌فعال فوکوئیدان، ۲۰ گرم پودر خشک جلبک در یک لیتر اتانول ۸۵ درصد حل شد (با کمک شیکر مغناطیسی) و برای حذف پروتئین‌ها و رنگ‌دانه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از شست‌وشو با استون، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۵۰۰۰rpm سانتریفیوژ (32PO، Hettich، آلمان) شدند. سپس رسوب به دست آمده در دمای اتاق خشک شد. ۵ گرم از زی‌توده خشک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر روی شیکر حل و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد. دوباره مراحل استخراج تکرار شد و سپس عصاره در دور ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. شد. مایع رویی با کلرید کلسیم ($CaCl_2$) ۱ درصد مخلوط شد و محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای رسوب آلژینات قرار داده شد. محلول سپس در دور ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی جمع‌آوری شد. مایع رویی به طور کامل با اتانول ۹۹ درصد مخلوط شد تا غلظت نهایی اتانول به ۳۰ درصد برسد. سپس محلول به مدت ۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محلول به دست آمده سپس در دور ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. به مایع رویی اتانول ۹۹ درصد اضافه شد تا غلظت نهایی اتانول به ۷۰ درصد برسد و سپس محلول به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فوکوئیدان از طریق فیلتر کردن محلول با غشای نیلون (۰/۴۵ میکرومتر) به دست آمد و محصول با اتانول ۹۹ درصد و استون شست‌وشو داده شد (Yang et al., 2008). از این رو، برای خالص‌سازی فوکوئیدان استخراج شده به روش رفلاکس عمل شد. سپس به منظور تبدیل پلی‌ساکاریدها به منوساکاریدها، فوکوئیدان خالص شده مورد هیدرولیز قرار گرفت. برای این کار، ۲۰ میلی‌گرم فوکوئیدان

خالص شده با اسیدسولفوریک ۲ مولار در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه هیدرولیز شد. ماده هیدرولیز شده با سود (NaOH) ۶ مولار خنثی شد و سپس برای بررسی بیشتر فریز درای (Alpha، Christ، آلمان) شد (Immanuel et al., 2012).

آماده‌سازی جیره

مواد لازم برای ساخت جیره که از کارخانه هووراش واقع در بوشهر تهیه شد، به صورت خلاصه در جدول شماره ۱ آورده شده است. مواد اولیه مورد استفاده با آسیاب برقی آسیاب و از الک با چشمه ۵۰ میکرومتر عبور داده شد. برای

جدول ۱: ترکیب جیره غذایی در تیمارهای مختلف فوکوئیدان

مواد تشکیل‌دهنده (٪)	سطوح فوکوئیدان (٪)			
	۰ (شاهد)	۰/۱	۰/۲	۰/۴
پودر ماهی	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
گلوتن گندم	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
پودر گندم	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
روغن سویا	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
روغن ماهی	۲/۵	۲/۵	۲/۵	۲/۵
فسفولیپیدهای سویا	۲	۲	۲	۲
ژلاتین	۲	۲	۲	۲
مکمل ویتامینی*	۱	۱	۱	۱
مکمل معدنی	۱	۱	۱	۱
کولین کلراید	۱	۱	۱	۱
سلولز	۱۸	۱۷/۹	۱۷/۸	۱۷/۶
فوکوئیدان	**۰**	**۰/۱**	**۰/۲**	**۰/۴**

*: مکمل ویتامینی (میلی‌گرم در کیلوگرم جیره غذایی) شامل: ۳۲ میلی‌گرم ویتامین A؛ ۱۰ میلی‌گرم ویتامین K_3؛ ۴۵ میلی‌گرم ریبوفلاوین؛ ۲۰ میلی‌گرم پیرودوکسین هیدروکلرید؛ ۲۵ میلی‌گرم تیامین؛ ۰/۱ میلی‌گرم ویتامین B_{12}؛ ۲۰ میلی‌گرم فولیک اسید؛ ۱/۲میلی‌گرم بیوتین؛ ۱۲۰ میلی‌گرم ویتامین E؛ ۸۰۰ میلی‌گرم اینوزیتول؛ ۶۰ میلی‌گرم کلسیم پانتوتینات؛ ۲۰۰ میلی‌گرم نیکوتینیک اسید؛ ۵ میلی‌گرم ویتامین D.

آماده‌سازی جیره غذایی، ابتدا مواد جامد با هم مخلوط شد و سپس با روغن مخلوط و در نهایت به آن آب اضافه شد تا خمیر یکدستی به دست آید. به منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، فوکوئیدان با غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد به جیره غذایی پایه فرموله شده افزوده و به صورت یکنواخت مخلوط شد (Chang et al., 2018). پس از ساخت جیره غذایی، با دستگاه پلت‌سازی جیره به پلت متناسب با دهان میگو (۲mm) تبدیل شد. سپس پلت‌ها در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد و بعد از خشک شدن در ظروف پلاستیکی قرار داده شدند و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شدند.

اعمال تیمارهای جیره غذایی فوکوئیدان

تعداد ۵۰۰ میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) جوان ۸ گرمی از مزرعه پرورش میگو واقع در دلوار بوشهر تهیه شد. ابتدا میگوها به ۴ وان ۱ تنی پلی‌اتیلن انتقال داده شدند و پس از طی مراحل سازگاری (به مدت دو هفته) با شرایط محل انجام پژوهش، میگوها به صورت طرح آزمایشی کاملا تصادفی با یک متغیر فوکوئیدان در چهار سطح با سه تکرار توزیع شدند. قابل ذکر است که این تیمارها در ۱۲ وان ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی با حجم ۲۵۰ لیتر توزیع شدند. آب مورد نیاز وان‌های پرورشی از آب دریا پمپاژ شد و پس از فیلتر شدن مورد استفاده قرار گرفت. هر روز صبح ۱ ساعت بعد از غذادهی، ۵۰ درصد از آب وان‌های آزمایشی از طریق سیفون کردن تعویض شد. هوادهی هر مخزن با دو سنگ هوا انجام شد. دوره نوری نیز تحت شرایط طبیعی قرار داشت (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ روشنایی). ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب مانند دما (۳۱-۲۷ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن (۵±۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر)، pH (۷/۸±۰/۰۲) و شوری (۴۳ppt-۴۰) روزانه در طول دوره پرورش با استفاده از دستگاه مولتی‌متر (MESU LAB، چین) اندازه‌گیری شد. غذادهی به صورت دستی و بر اساس وزن بدن (Van Wyk et al., 1999)، روزانه سه وعده در ساعت‌های ۶، ۱۴ و ۱۸ به ترتیب با ۳۰، ۳۰ و ۴۰٪ غذای پلتی آماده‌سازی شده، انجام می‌گرفت (Sivagnanavelmurugan et al., 2014). هنگام غذادهی، غذا از یک ساعت قبل از یخچال برای مصرف میگوها بیرون آورده می‌شد.

سنجش شاخص‌های ایمنی

بعد از ۳۰ روز تغذیه با جیره غذایی غنی شده با فوکوئیدان، شاخص‌های ایمنی شامل شمارش تعداد کل هموسیت‌ها، سلول‌های هیالین و گرانولار، آنیون سوپراکسید، فعالیت فنول اکسیداز، سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز و مقدار مالون دی‌آلدهید اندازه‌گیری شد.

جمع‌آوری همولنف

قبل از نمونه‌برداری، میگوها به مدت ۲۴ ساعت غذادهی نشدند و سپس ۵۰۰ میکرولیتر همولنف به طور جداگانه از ۹ میگو از هر تیمار (شاهد و سه گروه تغذیه شده با جیره غذایی غنی شده با فوکوئیدان) به صورت جداگانه از سینوس شکمی واقع در قاعده اولین قسمت شکمی به وسیله سرنگ انسولین استریل ۱ میلی‌لیتری با سرسوزن شماره ۲۵ که حاوی ۵۰۰ میکرولیتر محلول ضدانعقاد (۳۰ میلی‌مولار تری‌سدیم سیترات، ۰/۳۴ مولار کلرید سدیم، ۱۰ میلی‌مولار EDTA با pH ۷/۵۵ و اسمولالیته ۷۸۰ میلی‌اسمول در کیلوگرم) بود جمع‌آوری شد. همولنف به دست آمده به دو قسمت تقسیم شد. از یک قسمت برای شمارش هموست کل و سلول‌های گرانولار و هیالین استفاده شد. باقیمانده همولنف نیز در دور ۴۶۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد و سپس مایع رویی و رسوب در یک لوله استریل جداگانه جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد تا برخی از شاخص‌های ایمنی اندازه‌گیری شود.

شمارش سلول‌های همولنف

یک قطره مخلوط همولنف- محلول ضدانعقاد روی لام هموسیتومتر (نئوبار، آلمان) برای شمارش هموسیت کل، سلول‌های هیالین و گرانولار (شامل نیمه گرانولار) قرار داده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری (Optika، ایتالیا) به صورت تعداد در میلی‌لیتر شمارش شدند.

آنیون سوپراکسید

اندازه‌گیری آنیون‌های سوپراکسید با استفاده از کاهش نیترو بلو تیترازولیوم به فورمازون مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از همولنف رقیق شده با سه تکرار در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه‌ای که با ۱۰۰ میکرولیتر محلول پلی-L- لیزین (۰/۲ درصد) به منظور بهبود چسبندگی پوشش داده

شده بود، ریخته شد. میکروپلیت‌ها در دور ۸۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، به رسوب باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر زیموزان اضافه شد و اجازه داده شد تا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق واکنش دهد. در نهایت جذب نوری آنیون سوپراکسید در طول موج ۶۳۰ نانومتر با سه تکرار با استفاده از الایزا ریدر (Elx800، Biotec، آمریکا) اندازه‌گیری شد (Huynh et al., 2011).

فعالیت فنول اکسیداز

فعالیت کل فنول اکسیداز با اسپکتروفتومتر از طریق ثبت تشکیل دوپاکروم که از L-دی‌هیدروکسی فنیل‌آلانین تولید می‌شود، اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، ۵۰۰ میکرو لیتر لیتر از همولنف رقیق شده از هر لوله در دور ۸۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد، رسوب شستشو داده شد و دوباره به آرامی در ۵۰۰ میکرو لیتر بافر سیترات- کاکودیلات (۱۰ میلی‌مولار سدیم کاکودیلات، ۴۵۰ میلی‌مولار سدیم کلرید و ۱۰۰ میلی‌مولار تری‌سدیم سیترات در pH ۷) حل شد و سپس دوباره در دور ۸۰۰g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب در ۱۰۰ میکرولیتر بافر کاکودیلات حل شد. سوسپانسیون سلولی (۱۰۰ میکرو لیتر) در یک لوله قرار داده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۶-۲۵ درجه سانتی‌گراد با ۵۰ میکرولیتر تریپسین انکوبه شد. ۵۰ میکرولیتر L-دی‌هیدروکسی فنیل‌آلانین به آن اضافه و سپس ۸۰۰ میکرولیتر بافر کاکودیلات بعد از ۵ دقیقه اضافه شد. جذب نوری در طول‌موج ۴۹۰ نانومتر برای اندازه‌گیری فعالیت فنول اکسیداز توسط الایزا ریدر خوانده شد (Kitikiew et al., 2013).

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز

فعالیت سوپراکسید دیسموتاز همولنف میگو توسط توانایی آن برای مهار واکنش‌های وابسته به رادیکال سوپراکسید با استفاده از کیت تجاری (ZellBio، GmbH، آلمان) طبق دستور العمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش (۱/۷ میلی‌لیتر) حاوی گزانتین (۰/۰۵ میلی‌مولار) و ۲- (۴- یودوفنیل)- ۳-۴-نیتروفنول)- ۵- فنیل تترازولیوم کلرید (۰/۰۲۵ میلی‌مولار) در ۵۰ مولار CAPS (pH ۱۰/۲) و EDTA (۰/۹۴ میلی‌مولار) بود. در حضور

گزانتین اکسیداز (۸۰ واحد در لیتر، ۲۵۰ میکرولیتر)، از گزانتین سوپراکسید و اسید اوریک تولید شد. سپس، رادیکال سوپراکسید با ۲- (۴- یودوفنیل)- ۳-۴- نیتروفنول)- ۵- فنیل تترازولیوم کلرید برای تولید رنگ فورمازان قرمز واکنش داد. جذب نوری در طول موج ۵۰۵ نانومتر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد و میزان واکنش از خوانش جذب ۳ دقیقه و ۳۰ ثانیه بعد از اضافه کردن گزانتین اکسیداز توسط الایزا ریدر تخمین زده شد. یک واحد سوپراکسید دسموتاز برای مهار میزان کاهش گزانتین تا ۵۰ درصد تعریف شد. فعالیت ویژه به عنوان واحد در میلی‌لیتر سوپراکسید دیسموتاز بیان شد (Biagini et al., 1995).

فعالیت کاتالاز

فعالیت کاتالاز در همولنف میگو با اندازه‌گیری میزان تبدیل پراکسید هیدروژن به آب در طول موج ۴۱۲ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و واحد به عنوان مقدار آنزیم مورد نیاز در هر میلی‌لیتر همولنف برای کاهش ۱ میکرومولار پراکسید هیدروژن در یک دقیقه تحت شرایط سنجش تعیین شد. فعالیت آنزیم به صورت واحد در میلی‌لیتر بیان شد (Sun et al., 2018).

گلوتاتیون پراکسیداز

یک واحد فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز به عنوان مقدار آنزیم در میلی‌لیتر همولنف تعریف شد که غلظت GSH را در طول موج ۴۱۲ نانومتر با استفاده از پراکسید هیدروژن به عنوان سوبسترا در سیستم واکنش با ۱ میکرومول GSH در دقیقه با یک کیت تجاری (ZellBio، آلمان) کاهش داد. فعالیت آنزیم به صورت واحد در میلی‌لیتر بیان شد (Paglia and Valentine, 1967).

فعالیت مالون دی‌آلدهید

فعالیت مالون دی‌آلدهید در همولنف با استفاده از آزمایش اسید تیوباربیتوریک مشخص شد که توسط Ohkawa و همکاران (۱۹۷۹) توصیف شده است. تجزیه هیدروپراکسید لیپید با اسید تیوباربیتوریک متراکم شده و ترکیبات قرمز در طول موج ۵۳۲ نانومتر تولید شد و سطح پراکسید لیپید به صورت نانومول در میلی‌لیتر بیان شد.

سنجش آماری

برای بررسی آماری داده‌ها، ابتدا نرمال بودن داده‌ها توسط آزمون Kolmogorov-

Smirnov ارزیابی شد. سپس برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون تحلیل واریانس رویه GLM و برای مقایسه میانگین بین تیمارها به از آزمون Tukey در سطح اطمینان ۹۵ درصد (P<۰/۰۵) استفاده شد.

نتایج

بررسی سطوح مختلف فوکوئیدان به دست آمده از جلبک قهوه‌ای *Cystoseira trinodis* در جیره غذایی میگوی وانامی اثر معنی‌داری را در تعداد سلول‌های هیالین و گرانولار، هموسیت کل، فعالیت آنزیم‌های فنول اکسیداز و سوپراکسید دسموتاز (P>۰/۰۱) و همچنین فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و مقدار مالون دی‌آلدهید (P>۰/۰۵) نشان داد (جدول ۲ و شکل‌های ۱ تا ۶).

شمارش سلول‌های همولنف

با توجه به جدول ۲، بیشترین درصد سلول‌های هیالین و گرانولار و هموسیت کل (به ترتیب ۱۳۲×۱۰^۵، ۳۸/۸×۱۰^۵ و ۱۷۰/۳×۱۰^۵ سلول در میلی‌لیتر) مربوط به تیمار ۰/۴ درصد فوکوئیدان بود که نسبت به دو تیمار دیگر فوکوئیدان اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۱). همچنین، هر سه این شاخص‌ها در هر سه تیمار فوکوئیدان نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۱).

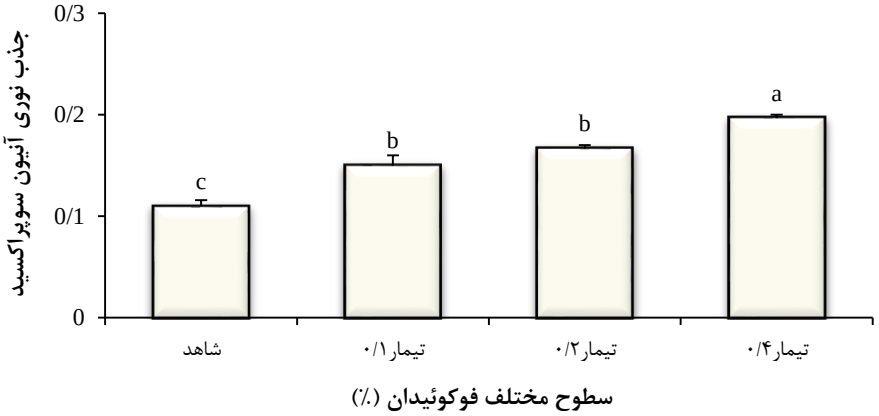
آنیون سوپراکسید و فعالیت فنول اکسیداز

فعالیت آنزیم فنول اکسیداز و آنیون سوپراکسید به طور قابل توجهی تحت تاثیر مکمل فوکوئیدان قرار گرفتند (P<۰/۰۱؛ شکل‌های ۱ و ۲).

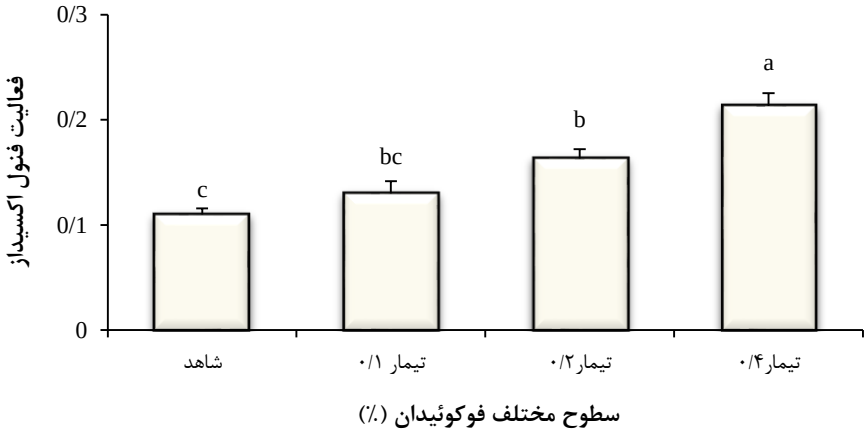
جدول ۲: مقایسه اثرات سطوح مختلف فوکوئیدان بر تغییرات تعداد سلول‌های هیالین و گرانولار و هموسیت کل میگوی وانامی (میانگین ± انحراف معیار)

نوع سلول	سطوح مختلف تیمار فوکوئیدان			
	شاهد	۰/۱ درصد	۰/۲ درصد	۰/۴ درصد
هیالین (×۱۰^۵/mL)	۹۱/۰±۱/۰۰ d	۱۱۴/۰±۱/۰۰ c	۱۱۹/۶±۱/۴۵ b	۱۳۲/۰±۱/۱۵ a
گرانولار (×۱۰^۵/mL)	۲۵/۰±۱/۱۵ c	۲۸/۶±۰/۶۶ bc	۳۰/۶±۱/۲۰ b	۳۸/۳±۱/۶۶ a
هموسیت کل (×۱۰^۵/mL)	۱۱۶/۰±۲/۰۸ c	۱۴۲/۶±۱/۴۵ b	۱۵۰/۳±۰/۸۸ b	۱۷۰/۳±۲/۷۲ a

وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۱: میزان جذب نوری آنیون سوپراکسید در طول موج ۶۳۰ نانومتر در میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف فوکوئیدان در جیره غذایی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

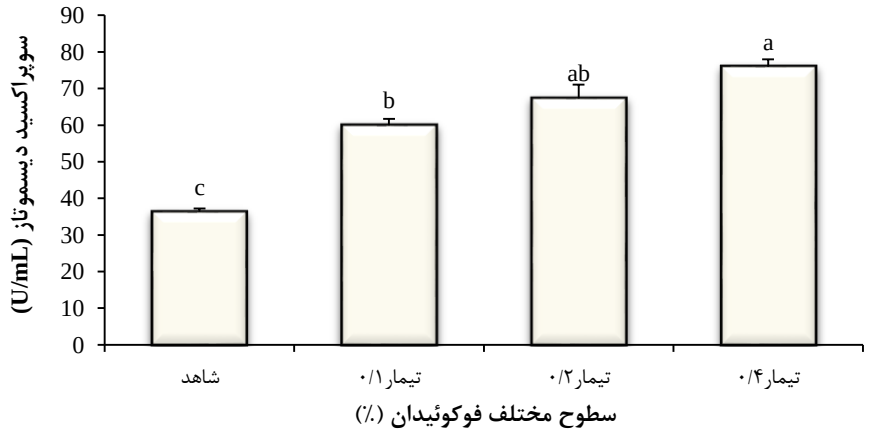


شکل ۲ : فعالیت فنول اکسیداز (جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر) در میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف فوکوئیدان در جیره غذایی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

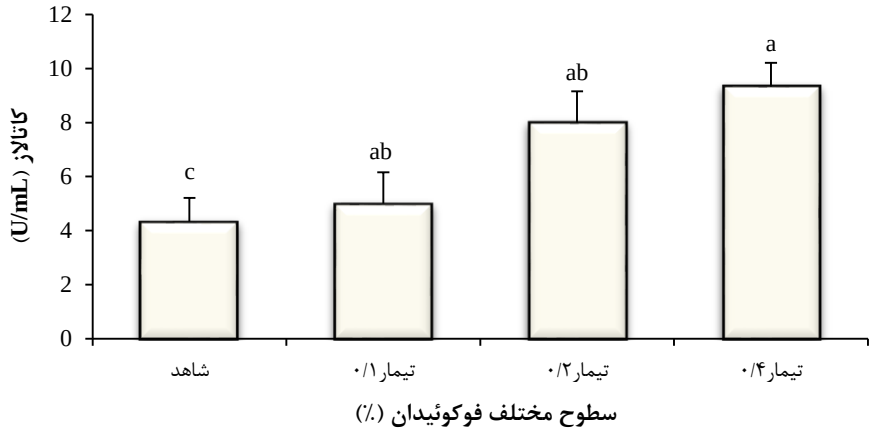
فعالیت آنزیم فنول اکسیداز در سه گروه تغذیه شده با جیره غذایی غنی شده با ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۴ درصد فوکوئیدان به ترتیب ۰/۱۳، ۰/۱۶ و ۰/۲۱ بود که به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد (۰/۱۰) بود (P<۰/۰۱). از طرفی جیره غذایی حاوی مکمل فوکوئیدان در سطوح مختلف باعث افزایش معنی‌دار مقدار آنیون سوپراکسید در گروه‌های تیمار شده نسبت به میگوهای گروه شاهد بود و بالاترین مقدار در میگوهای تغذیه شده با فوکوئیدان در غلظت ۰/۴ درصد ثبت شد (P<۰/۰۱).

فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و محتوای مالون دی‌آلدهید

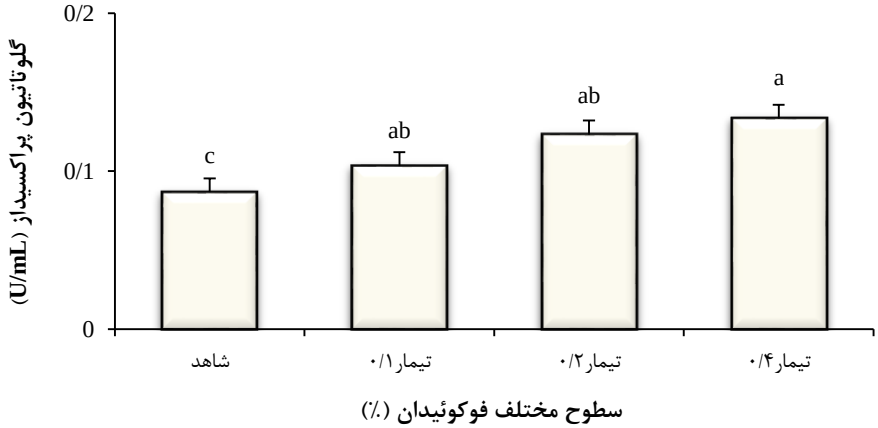
فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و مالون دی‌آلدهید تیمارهای مختلف در شکل‌های ۳ تا ۶ نشان داده شده است. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز در همولنف میگوهای تغذیه شده با مکمل فوکوئیدان به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد افزایش یافت، در حالی که مقدار مالون دی‌آلدهید همولنف کاهش معنی‌داری را در گروه‌های تیمار نسبت به گروه شاهد نشان داد (P<۰/۰۵). از طرفی، بیشترین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دسموتاز (۷۶ واحد در میلی‌لیتر)، کاتالاز (۹/۳۳ واحد در میلی‌لیتر) و گلوتاتیون پراکسیداز (۰/۱۳ واحد در میلی‌لیتر) و کمترین مقدار مالون دی‌آلدهید (۱/۶۶ نانومول در میلی‌لیتر) در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی غنی شده با ۰/۴ درصد فوکوئیدان مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها داشت (P<۰/۰۱).



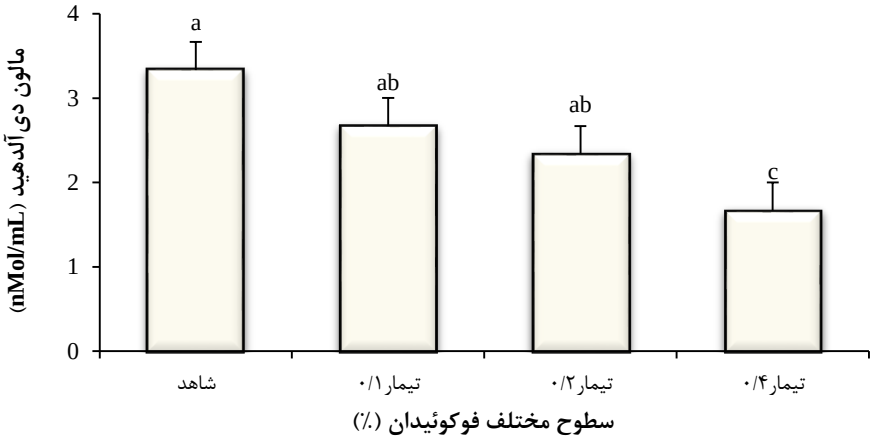
شکل ۳: فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف فوکوئیدان در جیره غذایی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۴: فعالیت کاتالاز در میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف فوکوئیدان در جیره غذایی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۵: فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف فوکوئیدان در جیره غذایی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۶: میزان مالون دی‌آلدهید در میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف فوکوئیدان در جیره غذایی (میانگین ± انحراف معیار). وجود حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بحث

پلی‌ساکاریدهای جدا شده از جلبک‌ها به دلیل طیف گسترده‌ای از خواص درمانی و سمیت نسبتا کم، توجه زیادی را در آبزی‌پروری، زیست‌پزشکی و غیره به خود جلب کرده است (Cabello, 2006; Liu et al., 2020). فوکوئیدان به عنوان یک پلی‌ساکارید سولفاته طبیعی با خواص تقویت‌کننده سیستم ایمنی بسیار خوب بر روی پستانداران، ماهی‌ها و میگوها شناخته شده است (Mandal et al., 2007; Immanuel et al., 2012; Mir et al., 2017). در حال حاضر، ارزیابی مقاومت به بیماری در صنعت آبزی‌پروری مهم است، فعالیت آنتی‌اکسیدان و عامل ایمنی شاخص خوبی برای بررسی وضعیت ایمنی بدن و مقاومت در برابر بیماری در آبزیان است (Lin et al., 2011; Kitikiew et al., 2013; Cantelli et al., 2019). گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) مولکول‌های واکنش‌پذیر هستند که شامل یون‌های اکسیژن و پراکسیدها می‌شوند و یک مکانیسم دفاعی علیه عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌کند. اما مقادیر بیش از حد ROS می‌تواند بر ساختار و پایداری پروتئین‌های عملکردی، اسیدهای چرب اشباع نشده و اسیدهای نوکلئیک تاثیر بگذارد و با آسیب اکسیداتیو به سیستم ایمنی جاندار، حساسیت به عوامل

بیماری‌زا را در میگو افزایش دهد (Yu, 1994). از این رو، سلامت موجودات آبزی به تعادل بین تولید ROS و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز بستگی دارد که از سلول‌های جانوری در برابر رادیکال‌های آزاد محافظت می‌کنند (Liu et al., 2007). سوپراکسید دسموتاز باعث تبدیل آنیون سوپراکسید به هیدروژن پراکسید یا اکسیژن مولکولی می‌شود (Hayyan et al., 2016). از طرفی آنزیم کاتالاز تبدیل هیدروژن پراکسید به آب و اکسیژن مولکولی را کاتالیز می‌کند (Yang et al., 2015). آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز هیدروپراکسیدهای لیپیدی و هیدروژن پر اکسیدهای آزاد را به آب تبدیل می‌کند (Bhabak and Mugesh, 2010). یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که مکمل غذایی فوکوئیدان به طور موثری باعث بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در همولنف، از جمله سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز شده است. علاوه بر این، کاهش غلظت مالون دی‌آلدهید که محصول نهایی پراکسیداسیون لیپید است و به عنوان بیومارکر برای اندازه‌گیری سطح استرس اکسیداتیو در جانور استفاده می‌شود، با تغذیه جیره غذایی حاوی مکمل فوکوئیدان در این مطالعه مشاهده شد. به طور مشابهی، پلی‌ساکاریدهای *Astragalus* (در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۴ و ۱ گرم در کیلوگرم) باعث کاهش مقدار مالون دی‌آلدهید و افزایش فعالیت سوپراکسید دسموتاز بعد از ۳۰ روز در میگو شد (Chang et al., 2018). علاوه بر این، فعالیت سوپراکسید دسموتاز و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در همولنف میگوی *Fenneropenaeus merguiensis* تغذیه شده با مکمل غذایی دارای ۱ گرم در کیلوگرم پلی‌ساکارید به دست آمده از *Enteromorpha* بعد از ۴۲ روز افزایش یافت، در حالی که محتوای مالون دی‌آلدهید همولنف کاهش یافت (Liu et al., 2020). از طرف دیگر، Pacheco و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که β-۱، ۳ گلوکان باعث افزایش فعالیت کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در میگوی *Farfantepenaeus californiensis* می‌شود.

سخت‌پوستان هیچ حافظه ایمنی ندارند و به سیستم ایمنی ذاتی خود برای حفاظت در برابر عفونت‌های بیماری‌زا و دیگر عوامل خارجی که زندگی آن‌ها را تهدید می‌کند، متکی هستند (Sarathi et al., 2007). با توجه به نقش مهم هموسیت‌ها در ایمنی سلولی سخت‌پوستان، شمارش هموسیت کل اغلب شاخصی برای

ارزیابی وضعیت ایمنی میگو است. هموسیت‌ها را می‌توان به سه دسته سلول شامل سلول‌های هیالین، سلول‌های نیمه گرانولار و سلول‌های گرانولار بر اساس حضور گرانول‌های سیتوپلاسمی، تقسیم کرد. سلول‌های هیالین بیشتر در فاگوسیتوز دخالت دارند در حالی که سلول‌های نیمه گرانولار و سلول‌های گرانولار در اینکپسوله کردن و آزادسازی سیستم پروفنول اکسیداز درگیر هستند (Jiravanichpaisal et al., 2006). سیستم پروفنول اکسیداز که به وسیله آنزیم سرین پروتئیناز فعال می‌شود باعث ایجاد مکانیسم‌های دفاعی مانند چسبندگی سلولی، فاگوسیتوز، اینکپسوله کردن ذرات، ملانیزه کردن، فعالیت ضدباکتریایی و پاک‌سازی باکتری، فعالیت ضدویروسی و غیره در میگو می‌شود (Jiravanichpaisal et al., 2006; Amparyup et al., 2013).

مطالعات مختلفی بر روی شاخص‌های ایمنی همولنف در میگوهایی که پلی‌ساکاریدهای جلبکی را دریافت کرده‌اند، گزارش شده است. برای مثال، Immanuel و همکاران (۲۰۱۲) یک افزایش معنی‌دار در تعداد کل هموسیت‌ها، غلظت آنیون سوپراکسید و فعالیت آنزیم فنول اکسیداز میگوی *P. monodon* تغذیه شده با غلظت‌های مختلف فوکوئیدان به دست آمده از *S. wightii* (۰/۱و ۰/۳ درصد) مشاهده کردند. به طور مشابهی Chen و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که کاراژینان (با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ گرم در کیلوگرم) باعث افزایش قابل توجهی در تعداد کل هموسیت‌ها، سلول‌های گرانولار و هیالین، غلظت آنیون سوپراکسید و فعالیت فنول اکسیداز میگوی *L. vannamei* بعد از ۳ هفته شد. از این رو، احتمال داده می‌شود که فوکوئیدان ممکن است باعث تحریک سلول‌های پیش‌ساز هموسیت و همچنین مرگ هموسیت‌های مسن در بافت هماتوپویتیک شود که در نهایت منجر به تکثیر هموسیت‌های جوان و عملکردی در گروه‌های تغذیه شده با مکمل فوکوئیدان نسبت به گروه شاهد شود (Kitikiew et al., 2013; Chen et al., 2014). همچنین افزایش دیگر شاخص‌های ایمنی و آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در میگوهای دریافت‌کننده مکمل فوکوئیدان می‌تواند باعث بهبود دفاع ایمنی و وضعیت سلامت میگو شود، از این رو به میگو در حفاظت از بیماری‌های مختلف و استرس کمک می‌کند (Chen et al., 2004).

در مجموع، نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن سطوح مختلف فوکوئیدان به جیره غذایی میگوی وانامی، موجب بهبود شاخص‌های

ایمنی شامل سلول‌های هیالین، گرانولار و هموسیت کل، آنیون سوپراکسید، فعالیت آنزیم فنول اکسیداز، مالون دی‌آلدهید و همچنین فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) همولنف شد. از این رو، می‌توان بیان داشت که با افزایش سطوح فوکوئیدان در جیره غذایی از ۰/۱ تا ۰/۴ درصد روندی صعودی در بهبود عملکرد شاخص‌های ایمنی دیده شد. بنابراین، می‌توان استفاده از فوکوئیدان استخراج شده از جلبک دریایی خلیج فارس *C. trinodis* را به عنوان یک محرک ایمنی طبیعی برای بهبود پاسخ‌های ایمنی در فرمولاسیون جیره غذایی میگو پیشنهاد کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله صمیمانه، از همکاری و حمایت مالی شرکت شهرک‌های صنعتی استان بوشهر از پروژه تحقیقاتی شماره ۷۲۹۴، دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه هرمزگان و همچنین پژوهشکده خلیج فارس تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

Amparyup P., Charoensapsri W. and Tassanakajon A. 2013. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. Fish and Shellfish Immunology, 34(4): 990–1001.

Bhabak K.P. and Mugesh G. 2010. Functional mimics of glutathione peroxidase: Bioinspired synthetic antioxidants. Accounts of Chemical Research, 43(11): 1408–1419.

Biagini G., Sala D. and Zini I. 1995. Diethyldithiocarbamate, a superoxide dismutase inhibitor, counteracts the maturation of ischemic-like lesions caused by endothelin-1 intrastriatal injection. Neuroscience Letters, 190(3): 212–216.

Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E. and Usov A.I. 2006. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus serratus* L. Carbohydrate Research, 341(2): 238–245.

Cabello F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: A growing problem for human and animal health and for the environment. Environmental Microbiology, 8(7): 1137–1144.

Cantelli L., Goncalves P., Guertler C., Kayser M., Pilotto M.R., Barracco M.A. and Perazzolo L.M. 2019. Dietary supplementation with sulfated polysaccharides from *Gracilaria birdiae* promotes a delayed immunostimulation in marine shrimp challenged by the white spot syndrome virus. Aquaculture International, 27(2): 349–367.

Chang C.F., Su M.S., Chen H.Y., and Liao I.C. 2003. Dietary β-1, 3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 15(4): 297–310.

Chang Z.Q., Ge Q.Q., Sun M., Wang Q., Lv H.Y. and Li J. 2018. Immune responses by dietary supplement with *Astragalus* polysaccharides in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, 24(2): 702–711.

Chen G.F., Huang J. and Song X.L. 2004. General situation of the immunological capability of shrimp. Journal of Fisheries of China, 28: 209–215.

Chen Y.Y., Chen J.C., Lin Y.C., Putra D.F., Kitikiew S., Li C.C. 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.

Cheng W., Liu C.H., Kuo C.M. and Chen J.C. 2005. Dietary administration of sodium alginate enhances the immune ability of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. Fish and Shellfish Immunology, 18(1): 1–12.

Guiry M.D. and Guiry G.M. 2013. Algae Base. Galway: World-Wide Electronic Publication. Retrieved March 11, 2021, National University of Ireland, from http://www.algaebase.org.

Hayyan M., Hashim M.A. and AlNashef I.M. 2016. Superoxide ion: Generation and chemical implications. Chemical Reviews, 116(5): 3029–3085.

Huynh T.G., Yeh S.T., Lin Y.C., Shyu J.F., Chen L.L. and Chen J.C. 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 31(2): 286–293.

Immanuel G., Sivagnanavelmurugan M., Marudhupandi T., Radhakrishnan S. and Palavesam A. 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). Fish and Shellfish Immunology, 32(4): 551–564.

Itami T., Asano M., Tokushige K., Kubono K., Nakagawa A., Takeno N. and Takahashi Y. 1998. Enhancement of disease resistance of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. Aquaculture, 164(4): 277–288.

Jiravanichpaisal P., Lee B.L. and Soderhall K. 2006. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. Immunobiology, 211(4): 213–236.

Kitikiew S., Chen J.C., Putra D.F., Lin Y.C., Yeh S.T. and Liou C.H. 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. Fish and Shellfish Immunology, 34(1): 280–290.

Lin Y.C., Yeh S.T., Li C.C., Chen L.L., Cheng A.C. and Chen J.C. 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot

syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 31(6): 1239–1246.

Liu W.C., Zhou S.H., Balasubramanian B., Zeng F.Y., Sun C.B. and Pang H.Y. 2020. Dietary seaweed (*Enteromorpha*) polysaccharides improves growth performance involved in regulation of immune responses, intestinal morphology and microbial community in banana shrimp *Fenneropenaeus merguiensis*. Fish and Shellfish Immunology, 104(6): 202–212.

Liu Y., Wang W.N., Wang A.L., Wang J.M. and Sun R.Y. 2007. Effects of dietary vitamin E supplementation on antioxidant enzyme activities in *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) exposed to acute salinity changes. Aquaculture, 265(4): 351–358.

Mandal P., Mateu C.G., Chattopadhyay K., Pujol C.A., Damonte E.B. and Ray B. 2007. Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 18(3): 153–162.

Mir I.N., Sahu N.P., Pal A.K. and Makesh M. 2017. Synergistic effect of l-methionine and fucoidan rich extract in eliciting growth and non-specific immune response of *Labeo rohita* fingerlings against *Aeromonas hydrophila*. Aquaculture, 479 (1): 396–403.

MOA (Fisheries Bureau, Ministry of Agriculture) .2016. China Fishery Statistics Yearbook 2016. China Agriculture Press, China. 155P.

Niu J., Liu Y.J., Lin H.Z., Mai K.S., Yang H.J., Liang G.Y. and Tian L.X. 2011. Effects of dietary chitosan on growth, survival and stress tolerance of postlarval shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition, 17(2): 406–412.

Ohkawa H., Ohishi N. and Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analytical Biochemistry, 95(2): 351–358.

Pacheco R., Ascencio F., Zarain M., Gomez G. and Campa Á. 2011. Enhancement of superoxide dismutase and catalase activity in juvenile brown shrimp, *Farfantepenaeus californiensis* (Holmes, 1900), fed b-1.3 glucan vitamin E, and b-carotene and infected with white spot syndrome virus. Latin American Journal of Aquatic Research, 39(3): 534–543.

Paglia D.E. and Valentine W.N. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 70(1): 158–169.

Sarathi M., Ahmed V.I., Venkatesan C., Balasubramanian G., Prabavathy J. and Hameed A.S. 2007. Comparative study on

immune response of *Fenneropenaeus indicus* to *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Aquaculture, 271(1): 8–20.

Sivagnanavelmurugan M., Karthik Ramnath G., Jude Thaddaeus B., Palavesam A. and Immanuel G. 2015. Effect of *Sargassum wightii* fucoidan on growth and disease resistance to *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus monodon* post-larvae. Aquaculture Nutrition, 21(6): 960–969.

Sivagnanavelmurugan M., Marudhupandi T., Palavesam A. and Immanuel G. 2012. Antiviral effect of fucoidan extracted from the brown seaweed, *Sargassum wightii*, on shrimp *Penaeus monodon* postlarvae against white spot syndrome virus. Journal of the World Aquaculture Society, 43(5): 697–706.

Sivagnanavelmurugan M., Thaddaeus B.J., Palavesam A. and Immanuel G. 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology, 39(2): 439–449.

Sun Y., Li M., Mitra S., Hafiz Muhammad R., Debnath B., Lu X. and Qiu D. 2018. Comparative phytochemical profiles and antioxidant enzyme activity analyses of the southern highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) at different developmental stages. Molecules, 23(9): 1–14.

Takahashi Y., Kondo M., Itami T., Honda T., Inagawa H., Nishizawa T., and Yokomizo Y. 2000. Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). Fish and Shellfish Immunology, 10(6): 555–558.

Traifalgar R.F., Kira H., Thanh Tung H., Raafat Michael F., Laining A., Yokoyama S. and Corre V. 2010. Influence of dietary fucoidan supplementation on growth and immunological response of juvenile *Marsupenaeus japonicas*. Journal of the World Aquaculture Society, 41(2): 235–244.

Traifalgar R.F., Serrano A.E., Corre V., Kira H., Tung H.T., Michael F.R. and Koshio S. 2009. Evaluation of dietary fucoidan supplementation effects on growth performance and vibriosis resistance of *Penaeus monodon* postlarvae. Aquaculture Science, 57(2): 167–174.

Van Wyk P., Davis-Hodgkins M., Laramore C.R., Main K.L., Mountain J. and Scarpa J. 1999. Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems. Harbor Branch Oceanographic Institution, USA. 220P.

Yang C., Chung D. and You S. 2008. Determination of physicochemical properties of sulphated fucans from sporophyll of *Undaria pinnatifida* using light scattering technique. Food Chemistry, 111(2): 503–507.

Yang H.T., Yang M.C., Sun J.J., Guo F., Lan J.F., Wang X.W. and Wang J.X. 2015. Catalase eliminates reactive oxygen species and influences the intestinal microbiota of shrimp. Fish and Shellfish Immunology, 47(1): 63–73.

Yu B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiological Reviews, 74(1): 139–162.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 9, No. 4, Winter 2022

Research Paper

Effects of fucoidan polysaccharide extracted from seaweed *Cystoseira trinodis* (C. Agardh, 1820) on immune responses of vannamei shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931)

Razieh Salehpour[1], Narges Amrollahi Biuki[2]*, Mehdi Mohammadi[3], Aghil Dashtiannasab[4], Pedram Ebrahimnejad[5]

Received: January 2021 Accepted: June 2021

Abstract

The present study was performed in order to use the seaweed of the Persian Gulf (brown algae *Cystoseira trinodis*) and also the extraction of fucoidan polysaccharide as an immunostimulant supplementation to improve and enhance some immune parameters of vannamei shrimp. Therefore, 500 shrimp with average weight of 8g were divided into four treatments in triplicate (12 tanks) in a completely randomized design and were fed with diets containing 0, 0.1, 0.2 and 0.4% of fucoidan for 30 days. Results showed a significant effect of fucoidan treatments on the measured parameters ($P<0.05$). The immune parameters including the number of hyaline, granular and total homocyte cells, superoxide anion, phenoloxidase, superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the groups fed with diets containing different levels of fucoidan, especially 0.4% indicated a significant increase compared to the control ($P<0.05$), while the amount of malondialdehyde showed a significant decrease compared to the control ($P<0.05$). In general, according to the results of the present study, it can be stated that fucoidan extracted from brown algae *Cystoseira trinodis* had better performance on improve immune parameters. Therefore, this bioactive compound can be recommended as an immunostimulant in the diet of white leg shrimp.

Key words: *Fucoidan, Antioxidant Enzyme, White Leg Shrimp, Brown Algae, Persian Gulf.*

1- Ph.D. in Marine Biology, Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
2- Associate Professor in Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.
3- Assistance Professor in Department of Biotechnology, Persian Gulf Research Institute, University of Persian Gulf, Bushehr, Iran.
4- Assistance Professor in Iran Shrimp Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Bushehr, Iran.
5- Associate Professor in Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

*Corresponding Author: amrollahi@hormozgan.ac.ir