فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال دهم، شماره دوم، تابستان ۱۴۰۱

مقاله پژوهشی

تاثیر تراکم بر کارایی و برخی فراسنجه‌های آنتی‌اکسیدانی همولنف میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در سیستم بیوفلاک

مریم ایرانی[۱]، هومن رجبی اسلامی[۲]*، محمود نفیسی بهابادی[۳]، سیدپژمان حسینی شکرابی[۴]

تاریخ دریافت: آذر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۴۰۱

چکیده

پژوهش حاضر به منظور بررسی تاثیر تراکم ذخیره‌سازی بر برخی از شاخص‌های کارایی و فعالیت فراسنجه‌های بیوشیمیایی همولنف میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در سیستم بیوفلاک طراحی شد. پست‌لاروهای سی روزه میگو برای این منظور با تراکم‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ قطعه در متر مکعب (با سه تکرار) در دوازده مخزن پلی‌اتیلنی با حجم کاری ۲۰۰ لیتر و حاوی بیوفلاک توزیع و برای نه هفته با کمک غذای دستی تا حد سیری تغذیه شدند و در انتها شاخص‌های کارایی، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و برخی فراسنجه‌های استرس میگو مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان داد افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک تاثیر معنی‌داری در میزان رشد داشت و منجر به کاهش وزن نهایی، نرخ رشد روزانه و کارآیی تغذیه شد. با این وجود، میزان زی‌توده تولید شده میگوهای پاسفید غربی با افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک افزایش یافت و در تراکم ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب به حدود ۱/۷ برابر بیشتر از میزان آن در تراکم ۱۰۰ قطعه میگو در متر مکعب رسید. این در حالی است که فراسنجه‌ها مربوط به دفاع آنتی‌اکسیدانی شامل سطح فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز همراه با افزایش تراکم تا ۳۰۰ قطعه در متر مکعب در سیستم بیوفلاک افزایش یافت. میزان کورتیزول و سطح گلوکز همولنف نیز یک روند کاهشی را با افزایش تراکم تا ۳۰۰ قطعه میگو در متر مکعب نشان داد. بنابراین تراکم ۳۰۰ قطعه میگو در متر مکعب در شرایطی که هدف تولید بیشترین میزان زی‌توده باشد برای تولید در سیستم فوق‌متراکم بیوفلاک قابل توصیه خواهد بود، در حالی که تراکم ۱۰۰ قطعه میگو در متر مکعب می‌تواند برای تولید میگو به منظور عرضه به بازار مفید باشد.

واژگان کلیدی: *میگوی وانامی، نرخ رشد روزانه، زی‌توده، کورتیزول.*

۱- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- دانشیار گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- دانشیار گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران.
۴- استادیار گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول: rajabi.h@srbiau.ac.ir

مقدمه

پرورش متراکم و فوق متراکم میگوها به طور فزآینده‌ای در سراسر دنیا به عنوان روشی برای توسعه آبزی‌پروری در حال گسترش است. با این وجود توسعه آبزی‌پروری نیازمند تامین مقدار زیادی مواد غذایی با کیفیت مناسب برای تامین خوراک آبزیان پرورشی خواهد بود. از آنجا که تهیه خوراک معمولا بیشترین هزینه را در آبزی‌پروری به خود اختصاص می‌دهد، مدیریت تغذیه یکی از مهم‌ترین اقداماتی است که تحت تاثیر شرایط مالی و محدودیت‌های محیط زیستی در سیستم‌های تولید متراکم مطرح است (Xu et al., 2020). مدیریت خوب تغذیه علاوه بر بهبود رشد و تولید میگو با راندمان غذایی بالا منجر به حداقل رسیدن تاثیرات پرورش بر کیفیت آب می‌شود (Tacon et al., 2013).

سیستم بیوفلاک یکی از فن‌آوری‌های دوستدار محیط زیست در صنعت آبزی‌پروری است که به صورت استفاده از تجمع باکتری‌ها، ریزجلبک‌ها یا تک‌یاخته‌ها به همراه ذرات آلی تعریف می‌شود. این سیستم نوین تولید آبزیان قادر است اهداف مختلفی همچون بهبود کیفیت آب، تصفیه پسآب و پیشگیری از بیماری را در سیستم‌های آبزی‌پروری متراکم دنبال کند (Khanjani and Sharifinia, 2020). به عبارت دیگر، بیوفلاک یک فرآیند همزیستی بین آبزی، باکتری‌های هتروتروف و دیگر گونه‌های میکروبی در آب است که همیاری زیستی این ریزموجودات زنده شرایط آب را برای استفاده دوباره آماده می‌سازد (Poersch et al., 2021a). همچنین، ترکیبات تولید شده در اثر فعالیت باکتریایی می‌تواند یک مکمل غذایی مهم در رژیم غذایی میگو باشد که به هضم و حفظ پروتئین کمک کند (Chen et al., 2020; Mishraa et al., 2020). نیاز به تعویض کم آب که می‌تواند تا عدم تعویض آب نیز پیش برود نیز شرایطی را فراهم می‌آورد که علاوه بر مزایای زیست‌محیطی ناشی از عدم ورود مواد دفعی بتوان میگو را فارغ از خطرات بیماری‌های عفونی پرورش داد (El-Sayed, 2021; Panigrahi et al., 2021).

میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در حال حاضر پیشروترین گونه پرورشی سخت‌پوستان است که پرورش آن در مناطق بسیاری از سواحل غربی آمریکای جنوبی تا کشورهای جنوب شرقی آسیا در حال انجام است (Poersch et al., 2021b; Taukhid et al., 2021). ویژگی‌هایی مانند رشد سریع در شرایط اسارت، تحمل بالا به تغییر شرایط

محیطی موجب شده که بتوان این گونه را در شرایط و سیستم‌های متنوعی پرورش داد (Briggs et al., 2004). پرورش در سیستم‌های مداربسته در سالیان اخیر مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته و نتایج مثبت فراوانی را نیز در مقایسه با استخرهای خاکی برای پرورش گونه‌های مختلف خانواده Penaeidae به همراه داشته است (Menaga and Felix, 2020; Suantika et al., 2020; El-Sayed, 2021). سیستم‌های پرورش متراکم معمولا تراکمی بین ۶۰ تا ۱۵۰ قطعه آبزی در هر متر مکعب دارند که می‌توانند به ۴۰۰ قطعه در متر مکعب در شرایط کنترل شده مداربسته نیز برسد (Bardera et al., 2021). البته معایبی برای آبزیان در شرایط متراکم و فوق متراکم وجود دارد که از آن جمله می‌توان به احتمال انتقال بیماری، رقابت برای غذا و محدودیت فضای زیستی اشاره کرد که می‌تواند موفقیت روش‌های متراکم پرورش میگوها را با خطر مواجه سازد (De Costa et al., 2016). تغییرات شرایط فیزیولوژیکی بدن به شکلی که موجب اختلاط در فرآیندهای طبیعی زندگی شود نیز از دیگر مواردی است که می‌تواند سلامت آبزیان را در تراکم بالای نگهداری به خطر بیندازد (Battisti et al., 2020; Poli et al., 2021).

پژوهش‌های مختلفی در رابطه با تاثیر تراکم بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب و میزان تولید میگو در سیستم بیوفلاک شده است، هرچند که مطالعات کمی در رابطه با تاثیر شرایط مختلف تراکمی بر فراسنجه‌های بیوشیمیایی آبزیان پرورشی و بویژه سخت‌پوستان انجام پذیرفته است. Liu و همکاران (۲۰۱۷) برای نمونه به بررسی تاثیر تراکم بر ایمنی میگوی پاسفید غربی در مقابل *Vibrio harveyi* در سیستم بیوفلاک پرداختند و نشان دادند که میزان فعالیت سیستم کمپلمان و فعالیت لیزوزیمی این میگو با افزایش تراکم کاهش می‌یابد. این در حالی است که Cardona و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که استفاده از سیستم بیوفلاک می‌تواند پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن‌های ضدمیکروبی را در میگوی آبی اقیانوس آرام (*Litopenaeus stylirostris*) بهبود بخشد. همچنین Andrade و همکاران (۲۰۱۵) بیان کردند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی ماهی کفشک (*Solea senegalensis*) تحت تاثیر تراکم قرار نگرفت، در حالی که یافته‌های پژوهش Shourbela و همکاران (۲۰۲۱) نشان داد فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و

گلوتاتیون رداکتاز در ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) به شکل معنی‌داری با افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک افزایش می‌یابد. Castex و همکاران (۲۰۰۹) دریافتند که دفاع آنتی‌اکسیدانی میگو پاسفید غربی پس از تغذیه با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* افزایش می‌یابد در حالی که Kim و همکاران (۲۰۱۵) نشان دادند که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در میگوی چینی (*Fenneropenaeus chinensis*) پس از تغذیه با پروبیوتیک در سیستم بیوفلاک به شکل معنی‌داری کاهش می‌یابد. این پژوهش‌ها نشان می‌دهد گونه‌های مختلف در شرایط متفاوت آزمایشی یه شکل متفاوت به تراکم پاسخ می‌دهند و از قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی و فرآیندهای تنظیمی مختلفی برخوردار هستند. پژوهش حاضر برای بررسی تاثیر تراکم در سیستم بیوفلاک بر برخی شاخص‌های رشد و فراسنجه‌های بیوشیمیایی همولنف میگوی پاسفید غربی طراحی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه پست‌لاروها و سازگاری با شرایط پرورشی

پست‌لاروهای بیست روزه میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) از یک مرکز تکثیر میگو در استان بوشهر تهیه و به مدت ۱۰ روز در یک مخزن ۴۰۰۰ لیتری با شرایط آزمایشی سازگار شدند. این مخزن با آب دریایی پر شد که از بخش عمیق خلیج بوشهر پمپاژ شده، از فیلتر شنی عبور یافته و با اشعه فرابنفش گندزدایی شده بود. آب به طور مداوم با استفاده از یک دمنده از طریق سنگ‌های هوا اکسیژن‌رسانی می‌شد. میگوها در طول دوره سازگاری با خوراک تجاری مخصوص میگو (کد ۴۰۰۲، هووراش، ایران) برای چهار وعده در روز (ساعت‌های ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰) تا حد سیری ظاهری تغذیه شدند.

طراحی آزمایش

این آزمایش در ۱۲ مخزن پلی‌اتیلنی با سطح مقطع مخروطی، عمق آبگیری ۴۵ سانتی‌متر و حجم ۲۰۰ لیتر کاری انجام شد. تمام مخازن با آب دریای سترون شده به همان ترتیبی که در بالا توضیح داده شد، پر شدند. دو لیتر (یک درصد) از آب مخازن پس از ۲۴ ساعت تخلیه و با آبی پر شد که پیش از این با کمک ملاس، آرد گندم، خوراک تجاری و کود برای تشکیل بیوفلاک آماده شده بود. نسبت C:N (کربن به نیتروژن) به منظور تقویت فعالیت باکتری‌های هتروتروف برای تشکیل بیوفلاک و

حذف مواد دفعی میگوها، برابر ۱۵:۱ تنظیم شد (Panigrahi et al., 2019). منبع نیتروژن شامل باقیمانده خوراک و ضایعات نیتروژنی تولید شده از تغذیه میگو بود و منبع کربن ملاس نیشکری بود که روزانه در ساعت ۱۲:۰۰ برای حفظ نسبت بهینه کربن به نیتروژن به وان‌ها اضافه می‌شد. این مطالعه به مدت نه هفته به طول انجامید.

پست‌لاروهای سی روزه (PL_{30}) که زوائد بدنی آنها از نظر ظاهری در شرایط خوبی قرار داشت با وزن مشابه (۰/۰۸±۰/۳۰ گرم) در ابتدای آزمایش درجه‌بندی و به صورت کاملا تصادفی به مخازن آزمایشی انتقال داده شدند. مخزن‌ها به صورت کاملا تصادفی به چهار تیمار با تراکم‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب و هر تیمار با سه تکرار، تقسیم شدند. تغذیه میگوها چهار بار در روز با کمک خوراک تجاری حاوی ۳۸ درصد پروتئین خام، ۹ درصد چربی خام، ۳ درصد فیبر و ۱۴ درصد خاکستر (هووراش، ایران) مطابق با الگوی توضیح داده شده در دور سازگاری در ساعت‌های ۸:۰۰، ۱۲:۰۰، ۱۶:۰۰ و ۲۰:۰۰ صورت پذیرفت. نرخ تغذیه اولیه برای ۸ درصد زی‌توده تخمینی تعیین و سپس روزانه بر اساس مصرف خوراک مشاهده شده در سینی‌های غذادهی به شکلی تنظیم شد تا میگوها ظرف دو ساعت غذا را مصرف کنند و این اطمینان حاصل شود که غذا به طور کامل خورده شده است. مقدار غذای مصرفی نیز برای محاسبه عملکرد رشد ثبت شد.

مخازن در طول آزمایش بدون تعویض آب به کار خود ادامه دادند و تنها آب شیرین برای جبران آب از دست رفته در اثر تبخیر اضافه می‌شد. آب مخازن پرورشی از طریق یک سیستم یکپارچه هوادهی به کمک دمنده‌ای با هفت اسب بخار به صورت دائمی هوادهی می‌شد. هوارسانی به هر مخزن توسط سه سنگ هوا صورت می‌گرفت که در کف آنها قرار گرفته بودند. بالای مخازن با توری پوشانده شده بود تا از فرار میگو جلوگیری شود. دوره نوری با استفاده از لامپ فلورسنت برابر ۱۲ ساعت روشنایی با شدت ۶۰۰ لوکس و ۱۲ ساعت تاریکی حفظ شد. دمای آب با استفاده از بخاری‌های غوطه‌ور در هر مخزن برابر ۳۸ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. میزان نیتروژن آمونیاکی کل با کمک یک اسپکتروفتومتر قابل حمل (DR2800، Hach Company، آمریکا) به صورت هفتگی اندازه‌گیری شد تا امکان تنظیم سطح نیتروژن به کربن فراهم آید.

نمونه‌برداری، زیست‌سنجی و اندازه‌گیری فراسنجه‌های همولنف

آب مخازن در پایان دوره ۹ هفته‌ای و ۲۴ ساعت پس از آخرین تغذیه تخلیه شد و میگوهای زنده در هر مخزن شمارش و برای تعیین میزان بازماندگی (SR)، وزن نهایی (FW)، نرخ رشد روزانه (DGC) و کارایی تغذیه‌ای (FER) توزین شدند. شاخص‌های رشد شامل DGC، FER و SR به کمک رابطه‌های ۱ تا ۳ محاسبه شد (Qiao et al., 2018).

رابطه ۱:

$$\mathbf{DGC\ (\%/day) = [(\sqrt[3]{BW_f} - \sqrt[3]{BW_i}) / T] \times 100}$$

BW_f: وزن نهایی (گرم)؛ BW_i: وزن اولیه (گرم)؛ T: زمان پرورش (روز).

رابطه ۲:

$$\mathbf{FER = WG / FI}$$

WG: وزن کسب شده (گرم)؛ FI: غذای مصرفی (گرم).

رابطه ۳:

$$\mathbf{SR\ (\%) = (N_f / N_i) \times 100}$$

N_f: تعداد نهایی میگوها؛ N_i: تعداد اولیه میگوها.

تعداد ۱۰ قطعه میگو پس از توزین از هر مخزن به طور تصادفی انتخاب و برای ۱۰ دقیقه قبل از نمونه‌برداری در تشت حاوی یخ خشک با دمای چهار درجه سانتی‌گراد برای کاهش استرس قرار داده شدند. نمونه‌های همولنف با استفاده از یک سرنگ استریل یک میلی‌لیتری با کمک سوزن ۲۵ حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محلول ضد انعقاد (تری سدیم سیترات ۳۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۰/۳۴ مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار و گلوکز ۰/۱۲ مولار؛ pH ۷/۵۵) از سینوس شکمی در پایه اولین قطعه شکمی جمع‌آوری شد (Xu and Pan, 2013). در ادامه، نمونه‌های همولنف درون لوله‌های اپندورف ریخته شد و تا زمان آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف به وسیله دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمیایی (AE-600F، Erma Inc.، ژاپن) توسط کیت‌های تشخیصی تجاری (پارس‌آزمون، ایران) اندازه‌گیری شد. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز (SOD) همولنف بر اساس توانایی آن در مهار تشکیل نیتریت از هیدروکسی آمونیوم در حضور مولدهای اکسیژن (گزانتین و گزانتین اکسیداز) ارزیابی شد. به طور خلاصه، مخلوط واکنش (۱/۷ میلی‌لیتر) حاوی ۲- (۴- یدوفنیل)-۳-(۴-نیتروفنول)-۵- فنیل تترازولیوم کلرید (INT) ۰/۰۲۵ میلی‌مولار و گزانتین ۰/۰۵ میلی‌مولار حل شده در N- سیکلوهگزیل-۳-آمینو پرویک اسید (CAPS، pH ۱۰/۲) ۵۰

میلی‌مولار و اتیلن دی‌آمین تترا استیک اسید (EDTA) ۰/۹۴ میلی‌مولار بود. رادیکال‌های سوپراکسید در حضور گزانتین اکسیداز (۸۰ واحد در لیتر، ۲۵۰ میلی‌لیتر) از گزانتین تولید و سپس با INT واکنش دادند تا رنگ قرمزی تولید شود. برای تشخیص بازدارندگی واکنش، چگالی نوری در ۵۰۵ نانومتر بررسی شد و سرعت واکنش با خواندن جذب در ۳۰ ثانیه و ۳ دقیقه پس از افزودن گزانتین اکسیداز برآورد شد. یک واحد سوپراکسید دیسموتاز به صورت مقدار آنزیم مورد نیاز برای مهار ۵۰ درصدی در سرعت کاهش گزانتین یک میلی‌لیتر از مخلوط واکنش تعریف و به صورت واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بیان شد (Biagini et al., 1995).

فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) همولنف بر اساس کاهش پراکسید هیدروژن (H_2O_2) و طیف گسترده‌ای از پراکسیدهای آلی (R-OOH) به الکل‌های پایدار مربوطه (R-OH) و آب در واکنش آنزیمی برآورد شد. محلول گلوتاتیون رداکتاز تازه تهیه شده (۲/۴ واحد در میلی‌لیتر در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۰) به بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار (pH ۷/۰)، EDTA ۰/۵ میلی‌مولار، سدیم ازاید ۱/۰ میلی‌مولار، آب اکسیژنه ۰/۱۵ میلی‌مولار و نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید فسفات (NADPH) ۰/۱۵ میلی‌مولار اضافه شد. فعالیت آنزیم بر اساس مصرف NADPH در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با اندازه‌گیری شدت نوری در ۳۴۰ نانومتر پس از افزودن ۱ میلی‌مولار گلوتاتیون تعیین شد (Flohe and Gunzler, 1984).

سنجش فعالیت کاتالاز (CAT) به روش رنگ‌سنجی و اسپکتروفتومتری پراکسید هیدروژن که کمپلکس پایداری را با مولیبدات آمونیوم $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ تشکیل می‌دهد، در ۴۰۵ نانومتر انجام شد. میزان ۵۰ میکرولیتر همولنف به ۱ میلی‌لیتر مخلوط حاوی ۶۵ میکرومول در میلی‌لیتر آب اکسیژنه در ۶۰ میلی‌مول در لیتر بافر فسفات با pH ۷/۴ اضافه و به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. واکنش آنزیمی با افزودن ۱ میلی‌لیتر مولیبدات آمونیوم ۳۲/۴ میلی‌مولار متوقف شد و کمپلکس زرد مولیبدات و پراکسید هیدروژن در ۴۰۵ نانومتر در برابر معرف خالی اندازه‌گیری شد. یک واحد آنزیم کاتالاز به صورت مقدار آنزیمی سنجیده شد که یک میکرومول پراکسید هیدروژن در دقیقه را تحت شرایط فوق تجزیه کند و به صورت واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر بیان شد (Goth, 1991).

میزان گلوکز و پروتئین کل با استفاده از روش آنزیمی رنگ‌سنجی به وسیله دستگاه دستگاه اتوآنالایزر بیوشیمیایی و کیت‌های تشخیصی تجاری (پارس‌آزمون، ایران) تعیین شد. سطح کورتیزول همولنف نیز بر اساس روش غیرمستقیم سنجش ایمونوسوربنت مرتبط با آنزیم (ELISA) به کمک دستگاه الیزاریدر (ELX800، BioTek، آمریکا) و کیت تشخیصی (RE52061 Cortisol ELISA Kit، IBL International، سوئیس) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، میکروپلت‌های پیش تیمار شده با دی‌سوکسینیمیدیل سوبرات با مقدار مشخصی از ترکیب سرم گاوی و استر فعال ۳-کربوکسی متیل اکسیم پیش تیمار شده با کورتیزول پوشانده شد. رقابت پس از انکوباسیون و انسداد با آلبومین سرم گاوی با افزودن نمونه‌ها و آنتی‌بادی آنتی‌کورتیزول تولید شده در خرگوش آغاز شد. پراکسیداز متصل شده به IgG ضدخرگوش به عنوان آنتی‌بادی دوم اضافه و سپس با ارتوفنیلن دی‌آمین دی‌هیدروکلرید (OPD) به عنوان سوبسترا انکوبه شد. واکنش با ۰/۱ مولار هیدروکلرید متوقف و جذب در ۴۵۰ نانومتر با الیزاریدر اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد خطی نیز از حد پایین حساسیت سنجش (۰/۳ نانوگرم در میلی‌لیتر) تا حدود ۳۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ترسیم شد (Tintos et al., 2006).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۳ برای ویندوز (IBM SPSS، آمریکا) انجام شد. هنگامی که نرمال بودن (Shapiro-Wilk Test) و همگنی (Levene Test) واریانس‌ها برای هر گروه داده تایید شد، داده‌های عملکرد زیستی میگو در تراکم‌های مختلف با استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هر جا که تفاوت معنی‌داری در تیمارها مشاهده شد، از آزمون چندگانه Tukey HSD برای مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف استفاده شد. تفاوت‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار در نظر گرفته شدند و نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد بیان شد.

نتایج

یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد نرخ بقای میگوها پس از نه هفته نگهداری در تراکم‌های مختلف دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر است (جدول ۱). اگرچه هیچ تلفاتی در نگهداری

میگو با تراکم ۱۰۰ قطعه در متر مکعب دیده نشد، افزایش تراکم به ۴۰۰ قطعه در متر مکعب موجب کاهش نرخ بقای میگوها به ۸۷/۹۲±۲/۵۳ درصد شد که به شکل معنی‌داری کمتر از تیمار ۱۰۰ قطعه میگو در متر مکعب بود (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری نیز در وزن نهایی میگوها بین تیمارهای مختلف آزمایشی مشاهده شد به طوری که میگوها در تراکم ۱۰۰ قطعه در متر مکعب دارای وزن بالاتری در انتهای نه هفته آزمایش بودند. این در حالی بود که میانگین وزن نهایی میگوها با افزایش تراکم به صورت معنی‌داری کاهش یافت و به کمترین میزان در زمانی رسید که با تراکم ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب نگهداری می‌شدند (P<۰/۰۵). نرخ رشد روزانه میگوها نیز الگوی مشابهی را نشان داد به شکلی که بالاترین نرخ رشد روزانه در تراکم ۱۰۰ قطعه میگو در متر مکعب و پایین‌ترین میزان آن در تراکم ۴۰۰ قطعه در متر مکعب ثبت شد (P<۰/۰۵).

کارایی تغذیه‌ای میگوها از ۲/۰۳±۰/۰۶ در زمانی که تراکم میگوها ۱۰۰ قطعه در متر مکعب بود نیز به شکل معنی‌داری کاهش یافت و به ۰/۸۷±۰/۰۳ در زمانی رسید که میگوها در تراکم ۴۰۰ قطعه در متر مکعب نگهداری می‌شدند (P<۰/۰۵). این در حالی است که میزان زی‌توده کل در هر متر مکعب مخزن پرورشی از ۱/۷۴±۰/۰۵ کیلوگرم در تیمار ۱۰۰ میگو در متر مکعب به شکل معنی‌داری افزایش یافت و به ۳/۰۵±۰/۲۱ کیلوگرم در تیمار ۴۰۰ میگو در متر مکعب رسید (P<۰/۰۵).

جدول ۱: عملکرد رشد و کارایی غذایی میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) پس از نه هفته نگهداری در تراکم‌های مختلف (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=۹)

شاخص‌ها	تراکم در متر مکعب			
	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰
نرخ بقا (درصد)	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰ [a]	۹۲/۵۰±۱/۴۴ [b]	۹۱/۶۳±۳/۴۷ [b]	۸۷/۹۲±۲/۵۳ [c]
وزن نهایی (گرم)	۱۷/۴۲±۰/۵۱ [d]	۱۱/۸۱±۰/۳۰ [c]	۱۰/۳۸±۰/۶۹ [b]	۸/۷۰±۰/۵۹ [a]
نرخ رشد روزانه (درصد روزانه)	۳/۰۵±۰/۰۴ [c]	۲/۵۵±۰/۰۳ [b]	۲/۴۰±۰/۰۸ [ab]	۲/۲۰±۰/۰۷ [a]
کارایی تغذیه‌ای	۲/۰۳±۰/۰۶ [d]	۱/۳۸±۰/۰۲ [c]	۱/۲۴±۰/۰۴ [b]	۰/۸۷±۰/۰۳ [a]
زی‌توده کل (کیلوگرم در متر مکعب)	۱/۷۴±۰/۰۵ [a]	۲/۱۸±۰/۰۴ [b]	۲/۸۴±۰/۰۹ [c]	۳/۰۵±۰/۲۱ [c]

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

تغییرات بیوشیمیایی همولنف میگوها پس از نه هفته نگهداری در تراکم‌های مختلف در جدول ۲ نمایش داده شده است. این یافته‌ها نشان داد که سطح فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در میگوها با افزایش تراکم به شکل معنی‌داری افزایش یافت و به بالاترین میزان در زمانی رسید که با تراکم ۳۰۰ قطعه در هر متر مکعب نگهداری می‌شدند (P<۰/۰۵)، هرچند که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت این آنزیم بین تیمارهای نگهداری با تراکم ۲۰۰ و ۳۰۰ قطعه در متر مکعب به دست نیامد (P>۰/۰۵). سطح فعالیت آنزیم کاتالاز نیز با الگویی مشابه افزایش یافت و به بالاترین مقدار در تراکم ۳۰۰ قطعه در متر مکعب رسید. این در حالی بود که بالاترین میزان فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز نیز در تراکم ۲۰۰ قطعه در متر مکعب ثبت شد که البته اختلاف معنی‌داری با مقدار این آنزیم در تراکم ۳۰۰ قطعه در متر مکعب نداشت (P>۰/۰۵).

پروتئین کل همولنف از پایین‌ترین سطح ۲/۴۰±۰/۰۵ گرم در لیتر در تراکم ۱۰۰ قطعه میگو در متر مکعب به ۲/۷۴±۰/۰۵ گرم در لیتر در تراکم ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب رسید.

جدول ۲: تغییرات بیوشیمیایی همولنف میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) پس از نه هفته نگهداری در تراکم‌های مختلف (میانگین ± خطای استاندارد؛ n=۹)

شاخص‌ها	تراکم در متر مکعب			
	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۴۰۰
سوپراکسید دیسموتاز (واحد در میلی‌لیتر)	۵/۶۱±۰/۱۸ a	۸/۸۲±۰/۴۱ b	۹/۲۱±۰/۳۴ b	۷/۰۴±۰/۱۶ ab
کاتالاز (واحد در میلی‌لیتر)	۱۴/۷۳±۱/۷۵ a	۲۰/۷۷±۰/۵۸ b	۲۰/۹۰±۰/۴۰ b	۱۳/۶۰±۰/۴۴ a
گلوتاتیون پراکسیداز (واحد در میلی‌لیتر)	۰/۹۲±۰/۰۴ a	۲/۱۳±۰/۱۷ b	۲/۰۶±۰/۰۹ b	۱/۴۲±۰/۰۶ a
پروتئین کل (گرم در لیتر)	۲/۴۰±۰/۰۵ a	۲/۶۹±۰/۰۸ ab	۲/۷۴±۰/۰۵ b	۲/۵۳±۰/۰۷ ab
گلوکز (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۲۲۳/۰۰±۱۳/۲۳ b	۱۸۵/۰۰±۱/۱۵ a	۱۸۲/۰۱±۵/۱۳ a	۲۱۱/۳۳±۳/۱۸ ab
کورتیزول (نانوگرم در میلی‌لیتر)	۴۲/۳۳±۳/۷۶ c	۲۸/۰۰±۳/۴۶ ab	۱۹/۳۳±۱/۴۵ a	۳۴/۰۰±۲/۳۱ bc

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

پایین‌ترین سطح گلوکز و کورتیزول همولنف نیز با مقادیر ۵/۱۳±۱۸۲/۰۱ میلی‌گرم در دسی‌لیتر و ۱/۴۵±۱۹/۳۳ نانوگرم در میلی‌لیتر در زمان نگهداری با تراکم ۳۰۰ قطعه میگو در متر مکعب به دست آمد که به شکل معنی‌داری کمتر از مقادیر مربوط به هر یک از این متغیرها در تیمار شاهد بود (P<۰/۰۵).

بحث

استفاده از فناوری بیوفلاک در شرایطی که صنعت پرورش میگو با مشکلات مختلف بویژه در زمینه بیماری‌ها و کمبود آب مواجه شده است، می‌تواند یک راهکار مفید و قابل توجه برای مقابله با چنین شرایطی فراهم آورد (Cardona et al., 2015). پژوهش‌های مختلفی به مطالعه تاثیر تراکم بر بقا و رشد گونه‌های مختلف سخت‌پوستان پرداخته‌اند (Krummenauer et al., 2011; Bardera et al., 2021; Da Silveira et al., 2022) که اغلب آنها بیانگر یک ارتباط منفی بین رشد آبزیان با افزایش تراکم هستند (Liu et al., 2017). نتایج پرورش میگوی پاسفید غربی پرورش یافته در سه تراکم مختلف شامل ۹۰، ۱۳۰ و ۱۸۰ قطعه در متر مکعب در آب شیرین نشان داد که نرخ رشد و بقای میگوها با افزایش تراکم کاهش یافت و بالاترین تراکم منجر به رشد آلومتریک منفی شد (Araneda et al., 2008). یافته‌های مشابهی نیز در رابطه با نگهداری خرچنگ چنگال‌دار چینی (*Eriocheir sinensis*) و میگوی علفی چینی (*Palaemonetes sinensis*) به دست آمد به طوری که نرخ رشد ویژه و بقا به شکل معنی‌داری در این گونه‌ها با افزایش تراکم کاهش معنی‌داری یافت (Li et al., 2007; Dong et al., 2018). یافته‌های پژوهش حاضر نیز در تایید یافته‌های بالا نشان داد که وزن نهایی میگوها با افزایش تراکم نگهداری کاهش یافت و به کمترین میزان خود در تیمار نگهداری ۴۰۰ قطعه میگو در هر متر مکعب رسید.

نرخ رشد روزانه یکی از فراسنجه‌هایی است که بیانگر شرایط رشد آبزیان در شرایط پرورشی است. یافته‌های پژوهش حاضر گرچه نشان داد نرخ رشد روزانه به تدریج کاهش یافت و از ۰/۰۴±۳/۰۵ درصد در روز در تراکم نگهداری ۱۰۰ قطعه در متر مکعب به ۰/۰۷±۲/۲۰ درصد در روز در تراکم ۴۰۰ قطعه در متر مکعب رسید. این در حالی است که مقدار این شاخص در کمترین میزان نیز بیش از مقادیر مشابه به دست آمده در دیگر پژوهش‌ها روی میگوی پاسفید غربی بود (Dewi et al., 2021;

Klongklaew et al., 2021; Xue et al., 2021) که این مطلب می‌تواند به دلیل تامین پروتئین مورد نیاز از طریق باکتری‌های مفید در سیستم بیوفلاک مورد استفاده در پژوهش حاضر باشد که به شکل مناسبی نیازهای میگوهای آزمایشی را تامین کرده است.

بررسی میزان زی‌توده کل تولید شده در هر یک از مخازن پرورشی نتایجی متفاوت از نرخ رشد روزانه را نشان داد به شکلی که بیشترین میزان زی‌توده تولید شده در تیمار ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب ثبت شد که به شکل معنی‌داری بیش از میزان زی‌توده تولید شده در تراکم نگهداری ۱۰۰ قطعه میگو در متر مکعب بود. یافته‌های این پژوهش نشان داد استفاده از سیستم بیوفلاک علاوه بر حذف استفاده مداوم از آب برای تولید به دلیل عدم تعویض آب در طول نه هفته پرورش، می‌تواند میزان تولید میگوی پاسفید غربی را بیش از ۱/۷ برابر افزایش دهد که این مطلب می‌تواند ناشی از انجام هوادهی شدید و تامین نیاز پروتئینی از منابع باکتریایی در کنار تاثیر پروبیوتیکی آنها در حفظ سلامت دستگاه گوارش میگوی پاسفید غربی باشد. با این وجود وزن نهایی میگوها در تراکم بالاتر به شکل معنی‌داری در مقایسه با کمترین تراکم کاهش یافت. بنابراین می‌توان استفاده از سیستم بیوفلاک بدون تعویض آب را دست کم برای پرورش میگو تا مرحله نوجوانی توصیه کرد تا از این طریق زی‌توده مناسب را برای مراحل پرواری در سیستم‌های مداربسته و یا مزارع سنتی پرورش میگو تامین کرد.

تفاوت معنی‌داری در نرخ بقای میگوی پاسفید غربی در پژوهش حاضر مشاهده شد. هرچند تلفاتی در تراکم نگهداری ۱۰۰ قطعه میگو در هر متر مکعب ثبت نشد، افزایش تراکم به ۴۰۰ قطعه در متر مکعب منجر به کاهش بازماندگی به ۲/۵۳±۸۷/۹۲ درصد شد. هم‌نوع‌خواری یکی از ویژگی‌های رفتاری میگوها است که می‌تواند نرخ بقای میگوها را با افزایش تراکم و به دلیل کاهش فضای زیستی کاهش دهد (Romano and Zeng, 2017). یافته‌های مشابهی نیز در مورد میگوی ببری قهوه‌ای (*Penaeus esculentus*) به دست آمده است، به طوری که افزایش تراکم به ۵۰۰ قطعه در متر مکعب منجر به کاهش بقا تا حدود ۶۰ درصد شد (Liu et al., 2017).

میگوها همچون دیگر سخت‌پوستان فاقد سیستم ایمنی اختصاصی بوده، برای محافظت از خود در برابر شرایط نامساعد محیطی وابسته به ساز و کارهای مختلف مرتبط با ایمنی غیراختصاصی هستند (Bateman, 2021).

امروزه این فرضیه بیان شده است که سیستم بیوفلاک با تقویت ایمنی غیراختصاصی موجب می‌شود تا میگو بهتر بتواند در مقابل استرس‌های محیطی یا عفونت‌های باکتریایی و ویروسی مقاومت کند (Cardona et al., 2015). پژوهشگران مختلفی در سالیان اخیر نشان دادند که سیستم بیوفلاک قادر است ایمنی غیراختصاصی میگوی پاسفید غربی را تقویت کند (Xu and Pan, 2013; Kim et al., 2014). پژوهش‌های مربوط به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در این بین توجه بیشتری را به خود معطوف کرده است، چرا که جانوران آبزی بیشتر از گروه‌های دیگر جانوری به استرس‌های اکسیداتیو ناشی از فشار عوامل بیماری‌زا و اختلالات محیطی حساس هستند (Wang et al., 2021). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز با افزایش تراکم نگهداری تا ۳۰۰ قطعه در متر مکعب افزایش یافت. بالاترین فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز نیز در میگوهایی دیده شد که در تراکم ۲۰۰ قطعه در متر مکعب نگهداری شده بودند که البته اختلاف معنی‌داری را با فعالیت این آنزیم در همولنف میگوهای نگهداری شده در تراکم ۳۰۰ قطعه در متر مکعب نشان نداد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک می‌تواند منجر به افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی میگوها از طریق (الف) افزایش ذخیره ویتامین‌های محلول در چربی و کارتنوئیدها در بافت میگوها ناشی از مصرف بیشتر بیوفلاک (Ju et al., 2008) و (ب) تقویت فعالیت آنزیم‌های گوارشی و در نتیجه افزایش تجمع آنتی‌اکسیدان‌های خوراکی در بدن میگوها شود (Xu and Pan, 2013). با این وجود اظهار نظر دقیق در این مورد نیازمند پژوهش‌های بیشتر در زمینه شناسایی باکتری‌های موجود در بیوفلاک و تجمع آنتی‌اکسیدان‌های مربوطه در بدن میگو است.

سطح پروتئین همولنف یکی از شاخص‌هایی است که مقدار آن نقش مهمی در شرایط فیزیولوژیک سخت‌پوستان دارد و در فرآیندهایی مانند انتقال اکسیژن و پاسخ به استرس‌های محیطی همچون تغییرات شوری، کمبود اکسیژن و البته پوست‌اندازی تاثیرگذار است (Perazzolo et al., 2002; Arcos et al., 2003; Lorenzon et al., 2008). یافته‌های پژوهش حاضر نشان داد میزان پروتئین کل همولنف میگو یک روند افزایشی با افزایش میزان تراکم تا ۳۰۰ قطعه در متر مکعب در سیستم بیوفلاک داشت که می‌تواند برابر توضیحات

پیشین به بهبود سیستم ایمنی و افزایش رشد میگوی پاسفید غربی ختم شود.

روندی کاهشی در میزان کورتیزول و گلوکز همولنف میگوی پاسفید غربی با افزایش تراکم تا ۳۰۰ قطعه در متر مکعب در پژوهش حاضر به دست آمد. اطلاعات اندکی درباره ارتباط بین سطح کورتیزول همولنف میگوها با شرایط استرس‌زای محیطی وجود دارد (Yong et al., 2020). کورتیزول در آبزیان منجر به فعال شدن فرآیندهای گلیکوژنولیز و گلوکونئوژنز می‌شود که به دنبال آن موجب افزایش سطح قند خون برای مقابله با شرایط نامساعد خواهد شد (Li et al., 2022). روند کاهشی مشابهی در پژوهش حاضر بین سطح گلوکز و کورتیزول همولنف میگوی پاسفید غربی با افزایش تراکم آنها در سیستم بیوفلاک به دست آمد. با این وجود، افزایش تراکم به ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب منجر به افزایش همزمان سطح کورتیزول و گلوکز همولنف شد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک تا سطحی مشخص می‌تواند استرس ناشی از نگهداری در شرایط پرورشی میگوی پاسفید غربی را به دلیل ایجاد رفتارهای دسته‌جمعی (Schooling Behavior) کاهش دهد (Bardera et al., 2019).

یافته‌های پژوهش حاضر در مجموع نشان داد که افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک تاثیر معنی‌داری در میزان رشد و فراسنجه‌های بیوشیمیایی همولنف میگوی پاسفید غربی داشت و منجر به کاهش وزن نهایی، نرخ رشد روزانه و کارآیی تغذیه آنها شد. با این وجود، میزان زی‌توده تولید شده میگوهای پاسفید غربی با افزایش تراکم در سیستم بیوفلاک افزایش یافت و در تراکم ۴۰۰ قطعه میگو در متر مکعب به بیش از ۱/۷ برابر در تراکم ۱۰۰ قطعه در متر مکعب رسید. این در حالی است که فراسنجه‌ها مربوط به دفاع آنتی اکسیدانی شامل سطح فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز همراه با افزایش تراکم تا ۳۰۰ قطعه میگو در متر مکعب در سیستم بیوفلاک افزایش یافت که می‌تواند ناشی از افزایش مصرف بیوفلاک به ازای هر میگو در تراکم‌های بالاتر باشد. میزان کورتیزول و سطح گلوکز همولنف نیز یک روند کاهشی را با افزایش تراکم تا ۳۰۰ قطعه میگو در متر مکعب نشان داد. این یافته‌ها نشان داد تراکم نگهداری ۳۰۰ قطعه میگو در متر مکعب در شرایطی که هدف تولید بیشترین میزان زی‌توده باشد برای تولید در سیستم فوق‌متراکم بیوفلاک قابل توصیه خواهد بود، در حالی که استفاده از تراکم ۱۰۰

قطعه میگو در متر مکعب با توجه به وزن نهایی میگوها تنها پس از نه هفته و کارایی غذایی بالای ۲ برای تولید میگو به منظور عرضه به بازار مفید است.

منابع

Andrade T., Afonso A., Perez-Jimenez A., Oliva-Teles A., De Las Heras V., Mancera J.M., Serradeiro R. and Costas B. 2015. Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. Aquaculture, 438: 6–11.

Araneda M., Perez E.P. and Gasca-Leyva E. 2008. White shrimp *Penaeus vannamei* culture in freshwater at three densities: Condition state based on length and weight. Aquaculture, 283(1-4): 13–18.

Arcos G.F., Ibarra A.M., Vazquez-Boucard C., Palacios E. and Racotta I.S. 2003. Haemolymph metabolic variables in relation to eyestalk ablation and gonad development of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquaculture Research, 34(9): 749–755.

Bardera G., Owen M.A., Facanha F.N., Alcaraz-Calero J.M., Alexander M.E. and Sloman K.A. 2021. The influence of density and dominance on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) feeding behaviour. Aquaculture, 531: 1–12 (735949).

Bardera G., Usman N., Owen M., Pountney D., Sloman K.A. and Alexander M.E. 2019. The importance of behaviour in improving the production of shrimp in aquaculture. Reviews in Aquaculture, 11(4): 1104–1132.

Bateman K.S. 2021. Viruses affecting crustaceans. P: 305–340. In: Hurst C.J. (Ed.). Studies in Viral Ecology. John Wiley and Sons, USA.

Battisti E.K., Rabaioli A., Uczay J., Sutili F.J. and Lazzari R. 2020. Effect of stocking density on growth, hematological and biochemical parameters and antioxidant status of silver catfish (*Rhamdia quelen*) cultured in a biofloc system. Aquaculture, 524: 1–13 (735213).

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.

Briggs M., Funge-Smith S., Subasinghe R. and Phillips M. 2004. Introductions and Movement of *Penaeus vannamei* and *Penaeus stylirostris* in Asia and the Pacific. RAP Publication, Thailand. 92P.

Cardona E., Saulnier D., Lorgeoux B., Chim L. and Gueguen Y. 2015. Rearing effect of biofloc on antioxidant and antimicrobial

transcriptional response in *Litopenaeus stylirostris* shrimp facing an experimental sub-lethal hydrogen peroxide stress. Fish and Shellfish Immunology, 45(2): 933–939.

Castex M., Lemaire P., Wabete N., and Chim L. 2009. Effect of dietary probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp *Litopenaeus stylirostris*. Aquaculture, 294(3-4): 306–313.

Chen M., Chen X.Q., Tian L.X., Liu Y.J. and Niu J. 2020. Beneficial impacts on growth, intestinal health, immune responses and ammonia resistance of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed dietary synbiotic (mannan oligosaccharide and *Bacillus licheniformis*). Aquaculture Reports, 17: 1–11 (100408).

Da Silveira L.G.P., Rosas V.T., Krummenauer D., Poersch L.H., and Wasielesky Jr. W. 2022. Comparison between horizontal and vertical substrate in shrimp super-intensive culture in bioflocs system. Aquacultural Engineering, 96: 1–7 (102218).

De Costa F.P., De Farias Gomes B.S.F., Pereira S.D.N.A. and De Fatima Arruda M.D.F. 2016. Influence of stocking density on the behaviour of juvenile *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). Aquaculture Research, 47: 912–924.

Dewi N.R., Huang H.T., Wu Y.S., Liao Z.H., Lin Y.J., Lee P.T. and Nan F.H. 2021. Guava (*Psidium guajava*) leaf extract enhances immunity, growth, and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* in white shrimp *Penaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 118: 1–10.

Dong J., Zhao Y.Y., Yu Y.H., Sun N., Li Y.D., Wei H., Yang Z.Q., Li X.D. and Li L. 2018. Effect of stocking density on growth performance, digestive enzyme activities, and nonspecific immune parameters of *Palaemonetes sinensis*. Fish and Shellfish Immunology, 73: 37–41.

El-Sayed A.F.M. 2021. Use of biofloc technology in shrimp aquaculture: A comprehensive review, with emphasis on the last decade. Reviews in Aquaculture, 13(1): 676–705.

Flohe L. and Gunzler W.A. 1984. Assays of glutathione peroxidase. Methods in Enzymology, 105: 114–120.

Goth L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clinica Chimica Acta, 196(2-3): 143–151.

Ju Z.Y., Forster I., Conquest L. and Dominy W. 2008. Enhanced growth effects on shrimp

(*Litopenaeus vannamei*) from inclusion of whole shrimp floc or floc fractions to a formulated diet. Aquaculture Nutrition, 14(6): 533–543.

Khanjani M.H. and Sharifinia M. 2020. Biofloc technology as a promising tool to improve aquaculture production. Reviews in Aquaculture, 12(3): 1836–1850.

Kim M.S., Min E., Kim J.H., Koo J.K. and Kang J.C. 2015. Growth performance and immunological and antioxidant status of Chinese shrimp, *Fennerpenaeus chinensis* reared in bio-floc culture system using probiotics. Fish and Shellfish Immunology, 47(1): 141–146.

Kim S.K., Pang Z., Seo H.C., Cho Y.R., Samocha T. and Jang I.K. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. Aquaculture Research, 45(2): 362–371.

Klongklaew N., Praiboon J., Tamtin M. and Srisapoome P. 2021. Chemical composition of a hot water crude extract (HWCE) from *Ulva intestinalis* and its potential effects on growth performance, immune responses, and resistance to white spot syndrome virus and yellowhead virus in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fish and Shellfish Immunology, 112: 8–22.

Krummenauer D., Peixoto S., Cavalli R.O., Poersch L.H. and Wasielesky Jr. W. 2011. Superintensive culture of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in a biofloc technology system in southern Brazil at different stocking densities. Journal of the World Aquaculture Society, 42(5): 726–733.

Li X., Dong S., Lei Y. and Li Y. 2007. The effect of stocking density of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* on rice and crab seed yields in rice–crab culture systems. Aquaculture, 273(4): 487–493.

Li X., Han T., Zheng S. and Wu G. 2022. Hepatic glucose metabolism and its disorders in fish. P: 207–236. In: Wu G. (Ed.). Recent Advances in Animal Nutrition and Metabolism. Springer Nature, Switzerland.

Liu G., Zhu S., Liu D., Guo X. and Ye Z. 2017. Effects of stocking density of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone) on immunities, antioxidant status, and resistance against *Vibrio harveyi* in a biofloc system. Fish and Shellfish Immunology, 67: 19–26.

Lorenzon S., Giulianini P.G., Libralato S., Martinis M. and Ferrero E.A. 2008. Stress effect of two different transport systems on the physiological profiles of the crab *Cancer pagurus*. Aquaculture, 278(1-4): 156–163.

Menaga M. and Felix S. 2020. Comparison of water exchange rate, feed economics and nutritional composition of aerobic microbial floc in indoor and outdoor culture of *Penaeus vannamei*. P: 49–62. In: Felix S., Samocha T. and Menaga M. (Eds.). Vannamei Shrimp Farming. CRC Press, UK.

Mishraa J.K., Samochaa T.M., Patnaika S., Speed M., Gandya R.L. and Alid A.M. 2020. Intensive nursery system for the Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, under limited discharge condition. P: 159–180. In: Felix S., Samocha T. and Menaga M. (Eds.). Vannamei Shrimp Farming. CRC Press, UK.

Panigrahi A., Esakkiraj P., Das R.R., Saranya C., Vinay T.N., Otta S.K. and Shekhar M.S. 2021. Bioaugmentation of biofloc system with enzymatic bacterial strains for high health and production performance of *Penaeus indicus*. Scientific Reports, 11(1): 1–13.

Panigrahi A., Sundaram M., Chakrapani S., Rajasekar S., Syama Dayal J. and Chavali G. 2019. Effect of carbon and nitrogen ratio (C:N) manipulation on the production performance and immunity of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) in a biofloc-based rearing system. Aquaculture Research, 50(1): 29–41.

Perazzolo L.M., Gargioni R., Ogliari P. and Barracco M.A. 2002. Evaluation of some hemato-immunological parameters in the shrimp *Farfantepenaeus paulensis* submitted to environmental and physiological stress. Aquaculture, 214(1-4): 19–33.

Poersch L., Brunson J., Gaona C.A., Stokes A., Richardson J., Pitts K. and Leffler J. 2021a. Pacific white shrimp, red drum, and tilapia integrated in a biofloc system: Use of tilapia as a consumer of total suspended solids. Journal of the World Aquaculture Society, 52(6): 1168–1177.

Poersch L.H., Magalhaes V., Lara G., Chaves F., Wasielesky W. and Foes G.K. 2021b. Comparative strategies for intensive shrimp production in ponds using biofloc technology system in Southern Brazil: Water quality, zootechnical performance and economic viability for *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research, 52: 3713–3722.

Poli M.A., Martins M.A., Pereira S.A., Jesus G.F.A., Martins M.L., Mourino J.L.P. and Do Nascimento Vieira F. 2021. Increasing stocking densities affect hemato-immunological parameters of Nile tilapia reared in an integrated system with Pacific

white shrimp using biofloc technology. Aquaculture, 536: 1–14 (736497).

Qiao G., Zhang M., Li Y., Xu C., Xu D.H. and Zhao Z. 2018. Biofloc technology (BFT): An alternative aquaculture system for prevention of Cyprinid herpesvirus infection in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*). Fish and Shellfish Immunology, 83: 140–147.

Romano N. and Zeng C. 2017. Cannibalism of decapod crustaceans and implications for their aquaculture: A review of its prevalence, influencing factors, and mitigating methods. Reviews in Fisheries Science and Aquaculture, 25(1): 42–69.

Shourbela R.M., Khatab S.A., Hassan M.M., Van Doan H. and Dawood M.A. 2021. The effect of stocking density and carbon sources on the oxidative status, and nonspecific immunity of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared under biofloc conditions. Animals, 11(1): 1–13 (184).

Suantika G., Situmorang M.L., Saputra F.I., Putri S.L.E., Putri S.P., Aditiawati P. and Fukusaki E. 2020. Metabolite profiling of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* from super-intensive culture in closed aquaculture systems: A recirculating aquaculture system and a hybrid zero water discharge-recirculating aquaculture system. Metabolomics, 16(4): 1–11.

Tacon A.G., Jory D. and Nunes A. 2013. Shrimp feed management: Issues and perspectives. On-farm feeding and feed management in Aquaculture, 583: 481–488.

Taukhid I., Tampangallo B.R., Tahe S. and Undu M.C. 2021. The application of progressive systems in high density vannamei shrimp culture. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 860(1): 1–16 (012022).

Tintos A., Miguez J.M., Mancera J.M. and Soengas J.L. 2006. Development of a microtitre plate indirect ELISA for measuring cortisol in teleosts, and evaluation of stress responses in rainbow trout and gilthead sea bream. Journal of Fish Biology, 68(1): 251–263.

Wang Z., Zhang Y., Yao D., Zhao Y., Tran N.T., Li S., Ma H. and Aweya J.J. 2021. Metabolic reprogramming in crustaceans: A vital immune and environmental response strategy. Reviews in Aquaculture, 14(3): 1094–1119.

Xu W., Xu Y., Su H., Hu X., Xu Y., Li Z., Wen G. and Cao Y. 2020. Effects of feeding frequency on growth, feed utilization, digestive enzyme activity and body composition of *Litopenaeus vannamei* in biofloc-based zero-exchange intensive systems. Aquaculture, 522: 1–14 (735079).

Xu W.J. and Pan L.Q. 2013. Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. Aquaculture, 412: 117–124.

Xue S., Ding J., Li J., Jiang Z., Fang J., Zhao F. and Mao Y. 2021. Effects of live, artificial and mixed feeds on the growth and energy budget of *Penaeus vannamei*. Aquaculture Reports, 19: 1–6 (100634).

Yong A.S.K., Mok W.Y., Tamrin M. L. M., Shapawi R. and Kim Y.S. 2020. Effects of dietary nucleotides on growth, survival and metabolic response in whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei* against ammonia stress condition. Aquaculture Research, 51(6): 2252–2260.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 10, No. 2, Summer 2022

Research Paper

Effect of density on performance and some hemolymph antioxidant parameters of white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in a biofloc system

Maryam Irani[1], Houman Rajabi Islami[2]*, Mahmoud Nafisi Bahabadi[3], Seyed Pezhman Hosseini Shekarabi[4]

Received: December 2021 Accepted: May 2022

Abstract

The present study was designed to investigate the effect of density on some performance and activity of hemolymph biochemical parameters of white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Thirty-day-old larvae (PL30) were distributed at densities of 100, 200, 300 and 400m^{-3} (in triplicate) in twelve polyethylene tanks with working volume of 200L containing bioflocks and fed ad libitum using artificial feed for 9 weeks. At the end of experiment, performance indicators, antioxidant enzymes activities and some of the stress parameters were determined. The results showed that an increase in the shrimp density under the biofloc system had a significant effect on the performance leading to the declined final weight, daily growth rate and feeding efficiency ratio. However, the amount of white-leg shrimp biomass increased with increasing density and reached to more than 1.7 folds higher under the density of 400 shrimp m^{-3} compared to those reared under the density of 100 shrimp m^{-3}. The antioxidant defense parameters including the superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities were enhanced with increasing the shrimp density in the biofloc system up to 300 shrimp m^{-3}. Cortisol and glucose levels of the hemolymph also showed a decreasing trend with increasing density up to 300 shrimp m^{-3}. Findings of the present study illustrated that stocking density of 300 shrimp m^{-3} will be recommended for shrimp production under biofloc system in a condition where the goal is to produce the maximum biomass production, while stocking density of 100 shrimp m^{-3} could be the best density for maximizing the final weight and feed efficiency.

Key words: *Vannamei Shrimp, Daily Growth Coefficient, Biomass, Cortisol*.

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Associate Professor in Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Associate Professor in Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Persian Gulf University, Bushehr, Iran.
4- Assistant Professor in Department of Fisheries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author: rajabi.h@srbiau.ac.ir