

"مقاله پژوهشی"

اثر شوک‌های حرارتی بر میزان بقا و پاسخ‌های ایمنی میگوی آب شیرین رودخانه‌ای *Macrobrachium nipponense* (De Haan, 1849)

بابک تیزکار^{*}، محمد رهاننده^۱، افشار ذوقی شلمانی^۱

۱- بخش شیلات، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۵/۲۳

چکیده

این تحقیق به منظور تعیین شدت تغییرات هورمونی و سیستم ایمنی بدن میگوی آب شیرین رودخانه‌ای (*Macrobrachium nipponense*) در مواجهه با تنش‌های حرارتی (گرمایی و سرمایی) انجام گردید. به این منظور تعداد ۸۰ قطعه میگوی با متوسط وزن 1.0 ± 0.3 گرم از تالاب انزلی تهیه و در آزمایشگاه پس از طی دوره استراحت، تحت تنش‌های حرارتی گرمایی (از 15°C تا 22°C) و سرمایی (از 15°C تا 8°C) طی مدت ۳۵ دقیقه قرار گرفت. در فواصل هر شوک، آنزیم‌های کبدی (AST و ALT) و هورمون کورتیزول به همراه گلوکز همولنف اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در اثر تنش حرارتی (گرمایی و سرمایی) میزان گلوکز، ALT، AST و هورمون کورتیزول به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p < 0.05$). میگوها به جهت جبران تنش‌های ایجادشده سطوح هورمونی و آنزیم‌های کبدی خود را به همراه گلوکز در همولنف افزایش می‌دهند ($p < 0.05$). در جریان برگشت به شرایط طبیعی (ریکاوری)، سرعت برگشت آنزیم‌های کبدی و کورتیزول در تنش گرمایی سریع‌تر از تنش سرمایی بود ($p < 0.05$). این تحقیق نشان داد که پاسخ سیستم ایمنی و سطوح هورمون کنترل‌کننده تنش (کورتیزول) در تنش گرمایی عملکرد مناسب‌تری دارد.

کلمات کلیدی: تنش، آنزیم، کورتیزول، گلوکز، *Macrobrachium nipponense*

مقدمه

یکی از سیاست‌های اصولی سازمان شیلات ایران، ایجاد تنوع بیولوژیک زیادتر در مورد گونه‌های آبزیان پرورشی است. در حال حاضر در کشورهای پیشرفته مصارف آبزیان به‌طور چشمگیر افزایش و گسترش یافته در حالی که در کشور ما با همه تلاش‌های انجام گرفته، صنعت شیلات هنوز تا رسیدن به سطوح قابل قبول تولید و مصرف فاصله زیادی دارد، از این‌رو بسترهای پرورش برخی گونه‌های آبزیان در آب‌های داخل فراهم می‌باشد که اهمیت چندانی به آن‌ها داده نشده است، از جمله انواع گونه‌های میگوی آب شیرین از گونه‌های مهم آب شیرین، میگوی رودخانه‌ای (*Macrobrachium nipponense*) است که در سطح جهانی جایگاه تجاری و پرورشی بالایی دارد و در حوزه آبی کشور در استان‌های شمالی به فراوانی یافت می‌گردد (Michael et al., 2012). اهمیت گونه میگوی رودخانه‌ای برای پرورش به علت دارا بودن کمترین نیازهای زیستی و ایستادگی بسیار بالا در برابر انواع نوسانات فیزیکی و شیمیایی و شرایط آب‌وهوایی، رژیم غذایی گوناگون و همه‌چیزخواری، تولید در تراکم بالا، چرخه زادآوری کوتاه و طبیعی، روش‌های پرورش آسان و کم‌هزینه می‌تواند مورد توجه باشد (FAO, 2014). افزون بر آن میگوی رودخانه‌ای و فرآورده‌های حاصل از آن بخش قابل قبولی از غذای انسان را در کشورهای مورد پرورش تشکیل می‌دهد، ضمن آنکه می‌توان از آن برای تهیه خوراک دام، طیور و سایر آبزیان نیز استفاده کرد (FAO, 2014). نوسانات زیست‌محیطی مرتبط با تغییرات آب و هوایی فصول دارای اهمیت عمده‌ای در تنظیم و شروع فعالیت‌های بیولوژیکی و رفتاری در آبزیان و

موجودات زنده هستند. دما یکی از مهم‌ترین عوامل فیزیکی مؤثر بر موجودات زنده بوده و تأثیرات بیولوژیکی پیچیده‌ای را در موجودات آبی ایجاد می‌کند (Ponce-Palafox, 1997). تغییر دما اثرات فیزیولوژیکی بسیار قابل توجهی در فرآیندهای زیستی یک موجود دارد. اثر تغییر حرارت بر میزان مصرف اکسیژن برای کلیه فعالیت‌های متابولیکی یک جانور ثابت شده است (Hu et al., 2008). دما یکی از عمده‌ترین عوامل مؤثر زیست‌محیطی بر رشد سخت‌پوستان است (Packer and Garvin, 1998). نتایج تحقیقات انجام شده نشان داده است که با افزایش دما نرخ رشد در بسیاری از گونه‌های سخت‌پوستان افزایش می‌یابد (Montagna, 2011). اثر تنش‌های حرارتی و دمای سازگاری در میگوی آب شیرین رودخانه‌ای، در سراسر آب‌های شیرین چین، (از شمال چین تا تایوان) ژاپن و ویتنام بررسی شده است (Wang et al., 2000). استفاده از روش‌های علمی، شیوه‌های مطمئن و قابل‌اعتمادی برای تجزیه و تحلیل سریع وضعیت سلامت میگوها در شرایط تنش‌های محیطی است که هنوز در میان بسیاری از پرورش‌دهندگان میگو غیرمعمول است. در سیستم‌های پرورشی مشکلات بهداشتی و درمانی معمولاً بسیار دیر و در مراحل پیشرفته آسیب‌رسانی از طریق کاهش رشد میگوها، رفتار غیرطبیعی و یا حتی مرگ قابل مشاهده است. این وضعیت تا حدودی به دلیل اطلاعات محدودی است که بر روی تغییرات فیزیولوژیکی و ایمنولوژی میگوهای در اسارت و نیز مدیریت و شرایط زیست‌محیطی تنش‌زای آن‌ها وجود دارد. شیوه‌های پرورش اغلب باعث تنش در این جانور شده از جمله عوامل فیزیکی (تغییرات دما)، بیولوژیکی (عوامل

(ستاری، ۱۳۸۱). میزان تغییرات هورمون کورتیزول و تغییرات میزان متابولیسم کربوهیدرات‌ها در بدن یکی از مهمترین شاخص‌های شدت تنش در بدن موجودات عالی است (Santo *et al.*, 1996). با توجه به حضور و ماندگاری میگوی آب شیرین رودخانه‌ای در آب‌های داخلی کشور (De Grave and Ghane, 2006) و تغییرات شدید حرارتی در آب‌های دریاچه‌ای نقاط مختلف کشور، ضروری است تا میزان بقای این میگو به نوسانات حرارتی بررسی و پاسخ‌های ایمنی ناشی از این تغییرات مورد تحلیل واقع شود. این تحقیق در نظر دارد میزان تغییرات پاسخ‌های ایمنی این میگو را در مواجهه با تنش‌های حرارتی بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

این تحقیق بر اساس آزمایش زیست‌سنجی (Bioassay) انجام گرفت. در این روش به منظور بررسی میزان اثرات شوک‌های حرارتی بر عملکرد آنزیم‌های کبدی و تغییرات گلوکز خون میگوی آب شیرین رودخانه‌ای، تعداد ۸۰ قطعه میگوی مورد نظر (نر و ماده) با میانگین وزنی $1/5 \pm 0/3$ گرم، با کمک تله‌های مخروطی، از تالاب انزلی صید و به آزمایشگاه منتقل و در وان پلاستیکی با ابعاد $200 \times 100 \times 40$ سانتی‌متر به مدت یک هفته نگهداری شدند. در داخل وان از قبل تعداد ۲۰ عدد آجر سوراخ‌دار به جهت کاهش فشارهای تنش ناشی از حمل‌ونقل قرار داده شده بود. در مدت یک هفته میگوها با غذای خمیری حاصل از غذای پروراری کپور ماهیان تغذیه شدند. در طول مدت نگهداری میگوها در وان، روی مخزن با پارچه تیره پوشانده شده بود. میزان دما، اکسیژن محلول و نور

تغذیه‌ای (یا عفونی)، شیمیایی (کیفیت آب) که در نتیجه می‌تواند سبب کاهش مقاومت و ایمنی و تسریع‌کننده عفونت‌ها و بیماری‌ها در میگوها شود. در این میان تغییرات ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی، شوری و دمای آب ممکن است تأثیرات زیادی در میزان تحمل میگوها و نیز بر متابولیسم رشد و پوست‌اندازی و زنده ماندن آن‌ها داشته (Wang *et al.*, 2016) و احتمالاً بر سیستم ایمنی بدنشان نیز تأثیرگذار است (Taylor *et al.*, 2003). یکی از مهمترین راه‌های بررسی پاسخ‌های ایمنی به تنش‌ها مطالعات خون‌شناسی است (Stentiford *et al.*, 2003). تغییرات آنزیم‌های کبدی بهترین و سریع‌ترین راه برای تعیین شدت تنش‌های وارده و آلاینده‌های زیست‌محیطی است (Moore, 2014; Wang *et al.*, 2006). تغییرات آنزیم‌های کبدی شرایط نامطلوب محیط داخلی سلول‌های بدن را سریع‌تر از پارامترهای دیگر نشان می‌دهند، لذا جهت تعیین میزان تنش وارد شده بر موجودات آبی و نظارت بر پاسخ‌های تنشی آبریان از تغییرات ایجاد شده در آنزیم‌های کبدی مثل آلانین آمینو ترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینو ترانسفراز (AST) استفاده می‌شود (Banaee *et al.*, 2008). یکی از مهم‌ترین هورمون‌های مقابله‌کننده با تنش در بدن مهره‌داران عالی، هورمون کورتیزول است که در زمان مواجهه با تنش ترشح شده و در جهت حذف خسارت‌های ناشی از تنش با افزایش متابولیسم بدن در راستای تولید انرژی ترشح شده و باعث افزایش سوخت‌وساز و افزایش اولیه گلوکز خون می‌شود (Tizkar *et al.*, 2020). این هورمون کورتیکواستروئیدی که از بافت فوق کلیوی ترشح می‌گردد باعث افزایش گلوکز خون یا همولنف و تجزیه گلیکوژن‌های سلولی در بافت‌ها می‌شوند

به آکواریوم‌ها به اندازه‌ای بود که هر ۵ دقیقه ۱ درجه سانتی‌گراد بر دمای آب افزوده می‌شد. درجه حرارت آب آکواریوم با دماسنج الکلی اندازه‌گیری شد. مشابه روش قبل از میگوها نمونه‌برداری از همولنف انجام گرفت. زمان‌های نمونه‌برداری به ترتیب در زمان شروع شوک، دمای ۲۲ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد و یک ساعت پس از پایان شوک بود.

آزمایش دامنه تحمل حرارتی

جهت تعیین میزان تحمل میگوها به تغییرات ناگهانی درجه حرارت و بررسی رفتارهای حرکتی و میزان بقای، تعداد ۳۶ قطعه میگو در دو آکواریوم با ابعاد ۱۰۰×۵۰×۴۰ سانتی‌متری قرار داده شده و مورد آزمایش قرار گرفتند (دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۵ میلی‌گرم در لیتر و نور ۸۰ لوکس). در آزمایش اول در فاصله زمانی ۳ دقیقه دمای آب از ۲۲ درجه سانتی‌گراد با کمک آب سرد به ۸ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت و در آزمایش دوم در همین مدت زمانی با کمک آب گرم دمای آب به ۳۵ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و رفتار میگوها در پایان شوک‌ها مورد بررسی واقع شد.

اندازه‌گیری آنزیم‌های کبدی

سنجش آنزیم‌های کبدی شامل آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) به روش رنگ‌سنجی سینتیک و آنزیم آلکالین فسفاتاز (ALP) به روش آنزیماتیک سینتیک انجام شد (Shahsavani *et al.*, 2010).

در این مدت به ترتیب ۱۵ درجه سانتی‌گراد، ۵/۵ میلی‌گرم در لیتر و ۸۰ لوکس بود.

شوک حرارتی سرمایی

تعداد ۲۰ قطعه میگو از مخزن نگهداری اولیه به صورت تصادفی انتخاب و در یک آکواریوم ۱۰۰×۵۰×۴۰ سانتی‌متری برای مدت ۲ روز نگهداری شدند. شرایط نگهداری میگوها در این آکواریوم شبیه به مخزن قبلی بود (دما، اکسیژن محلول، نور و تراکم). جهت ایجاد شوک حرارتی سرمایی از آب یخ صفر درجه سانتی‌گراد استفاده شد. به استفاده از آب یخ به ازای هر ۵ دقیقه یک درجه سانتی‌گراد از دما کاسته شد. قبل از شروع کاهش دما از ۵ میگو با سرنگ انسولین نمونه همولنفاز زیر کاراپاس گرفته شد و در داخل تیوپ‌های پلی پروپیلین قرار داده و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کاهش دما با آب یخ تا دمای ۱۲ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و در این دما از ۵ میگوی دیگر نمونه همولنف برداشت و نگهداری شد. سپس کاهش دما تا ۸ درجه سانتی‌گراد ادامه یافت و در این دما نیز از همولنف ۵ میگوی دیگر نمونه‌برداری شد. به منظور بررسی نوسانات فاکتورهای مورد بررسی در همولنفیک ساعت پس از اتمام شوک سرمایی (رسیدن دما به ۸ درجه سانتی‌گراد) از همولنف ۵ میگوی باقی‌مانده نمونه‌گیری شد.

شوک حرارتی گرمایی

تعداد ۲۰ عدد میگو در آکواریومی با ابعاد مشابه آزمایش قبلی نگهداری شد. پس از مدت ۲ روز جهت اعمال شوک حرارتی گرمایی از آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید. مقدار آب گرم افزوده‌شده

اندازه‌گیری کورتیزول و گلوکز

نمونه همولنف هپارینه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ (Hettich, Tuttlingen, Germany) با ۳۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پلاسمای جدا شده جهت اندازه‌گیری میزان کورتیزول و گلوکز در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کورتیزول با واحد ng/ml و با استفاده از کیت تشخیص آزمایشگاهی Radim (Pomezia, Roma, Italy) و روش ایمنی سنجی آنزیمی در دو تکرار (Barry *et al.*, 1993) و میزان گلوکز به روش آنزیمی و با کمک کیت سنجش گلوکز (پارس آزمون، ایران) با دو تکرار برحسب (mg/dl) مورد سنجش قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌ها پس از ثبت در نرم‌افزار Excel با نرم‌افزار SPSS20 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. قبل از بررسی داده‌ها نرمال بودن آنها با استفاده از آزمون کولموگراف-اسمیرنوف مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها مورد بررسی، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و جهت تفکیک گروه‌های مورد بررسی از آزمون دانکن استفاده شد. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار ارائه شدند.

نتایج

آزمایش شوک کاهش دما

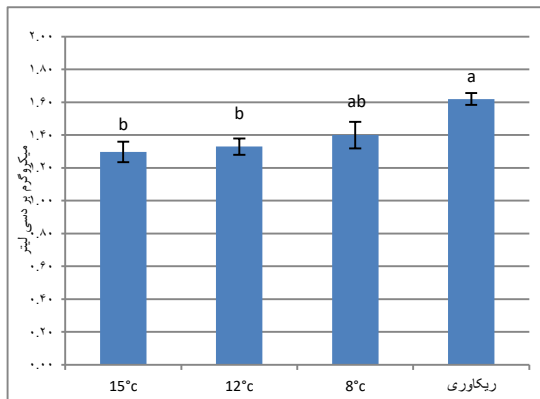
با اعمال شوک سرمایی مقدار گلوکز در همولنف میگوهای مورد بررسی روند صعودی به خود گرفت بطوری‌که در دمای ۱۲ و ۸ درجه سانتی‌گراد این افزایش دیده شد؛ اگرچه میزان آن اختلاف معنی‌داری

را با قبل از شوک از خود نشان نداد ($p \geq 0.05$). روند افزایش غلظت گلوکز در میگوهای تحت تنش تا زمان ریکاوری ادامه داشته به نحوی که میزان آن یک ساعت پس از اعمال آخرین شوک در بیشترین میزان خود دیده شد ($p < 0.05$) (شکل الف)

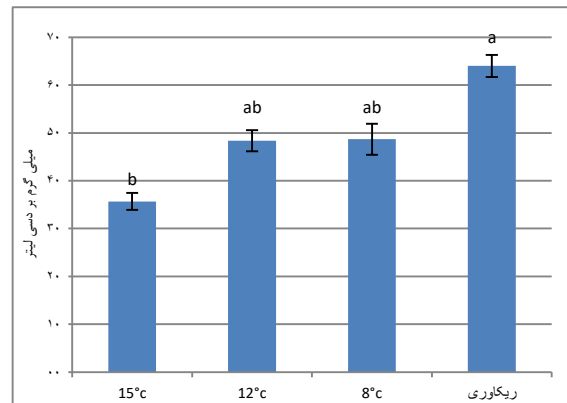
همچنین سطح آسپارات آمینوترانسفراز (AST) با ایجاد شوک سرمایی و پایین آوردن دما به میزان معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). البته نتایج نشان داد که میزان این آنزیم برعکس شوک افزایش دمایی در پایان مرحله ریکاوری به حد قبل از شوک برگشت و همچنان در سطح بالاتری نسبت به شروع زمان شوک سرمایی قرار گرفت ($p < 0.05$) (شکل ب)

سطح آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) پس از اعمال شوک سرمایی افزایش معنی‌داری یافته و میزان این آنزیم در همولنف تا پایان مرحله ریکاوری به سطح قبلی برگشت ($p < 0.05$) (شکل ج).

میزان سطح کورتیزول در شوک سرمایی نیز به مانند شوک گرمایی با یک روند افزایشی در شوک‌ها همراه بود ولی شدت افزایش میزان کورتیزول نسبت به شوک‌های حرارتی کمتر بود. نتایج نشان داد که میزان سطح کورتیزول در همولنف میگوهای تحت تنش در اولین و دومین شوک سرمایی اختلاف معنی‌داری را با سطح اولیه ایجاد نکردند ($p \geq 0.05$). در پایان مرحله ریکاوری سطح میزان کورتیزول به میزان قابل توجهی افزایش یافته بود ($p < 0.05$) (شکل د).



شکل ۱ د: میانگین غلظت هورمون کورتیزول در دماهای مختلف و زمان ریکآوری

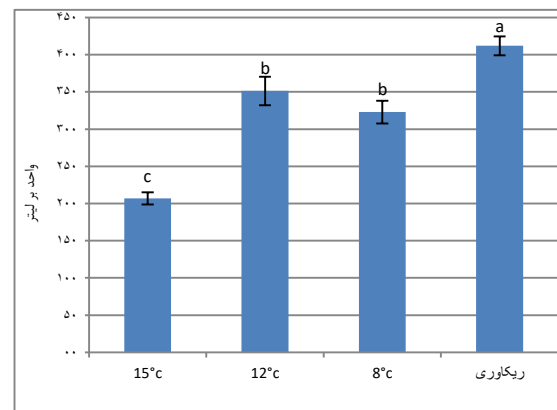


شکل ۱ الف: میانگین غلظت گلوکز در دماهای مختلف و زمان ریکآوری

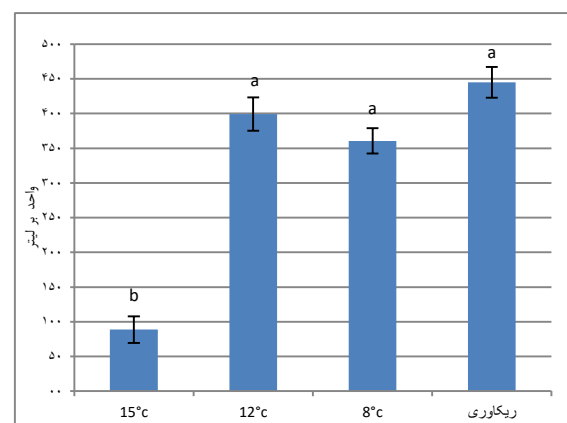
آزمایش شوک افزایش دما

نتایج نشان داد که با افزایش دما و وارد شدن شوک دمایی فاکتورهای مرتبط با تنش در میگوهای تحت آزمایش در سطح معنی دار دچار تغییر شده‌اند به طوری که میانگین گلوکز در همولنف میگوهای در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد بین $35/67 \pm 3/06$ (mg/dl) بوده که با افزایش دما به ۲۲ درجه سانتی‌گراد میزان آن به طور معنی داری افزایش یافته و به $50/5 \pm 10/61$ (mg/dl) رسید ($p < 0/05$). با فرایند افزایش دما از ۲۲ به ۲۸ درجه سانتی‌گراد روند افزایش سطح گلوکز ادامه داشت ($p \geq 0/05$) و در یک ساعت پس از پایان شوک (ریکآوری) مقدار گلوکز در سطح قبلی باقی مانده و تغییر چندانی نداشت ($p \geq 0/05$) (شکل ۲ الف).

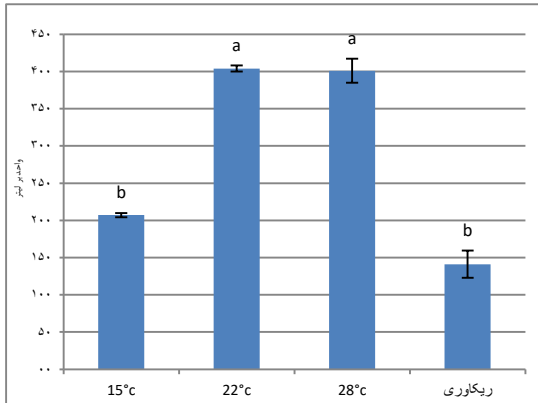
همچنین سطح آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) با ایجاد شوک و بالا بردن دما در سطح معنی داری ($p < 0/05$) افزایش یافته و با ادامه افزایش دما به ۲۸ درجه سانتی‌گراد ثابت ماند. با انتقال میگوها به مخازن برگشتی جهت بازیابی و ریکآوری مقدار سطح (AST) در همولنف مجدداً به سطح اولیه و قبل از شوک برگشت (شکل ۲ ب).



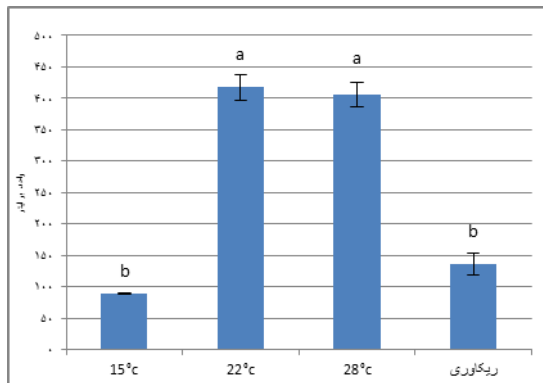
شکل ۱ ب: میانگین غلظت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در دماهای مختلف و زمان ریکآوری



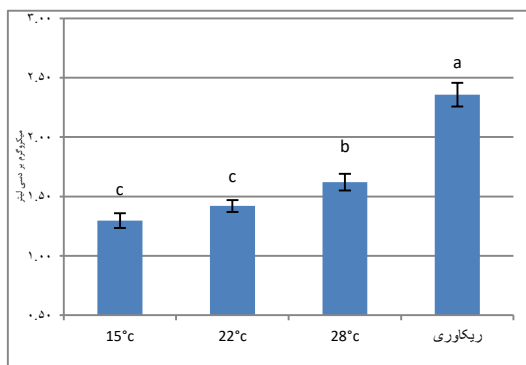
شکل ۱ ج: میانگین غلظت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در دماهای مختلف و زمان ریکآوری



شکل ۲ ب: میانگین غلظت آنزیم آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) در دماهای مختلف و زمان ریکاوری



شکل ۲ ج: میانگین غلظت آنزیم آلانین آمینوترانسفراز (ALT) در دماهای مختلف و زمان ریکاوری

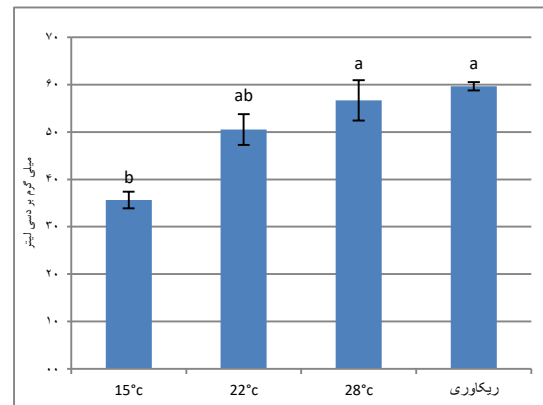


شکل ۲ د: میانگین غلظت هورمون کورتیزول در دماهای مختلف و زمان ریکاوری

نتایج مشاهدات رفتاری در شوک‌های گرمایی و سرمایی نشان داد که در شوک‌های گرمایی، شنای میگوها سریع‌تر و با افزایش دما این رفتار شدیدتر

افزایش میزان سطح آلانین آمینوترانسفراز (ALT) پس از افزایش دما و اعمال شوک اولیه قابل توجه بود ($p < 0.05$). این افزایش در شوک دوم بسیار ناچیز بوده و سطح آنزیم (ALT) در شوک دوم افزایش معنی‌داری نسبت به شوک اول نداشت ($p \geq 0.05$). با اتمام زمان شوک و برگشت میگوها به حوضچه‌های آرامش، مقدار (ALT) مجدداً کاهش معنی‌داری پیدا کرده و به سطح اولیه برگشت کرد (شکل ۲ ج).

با افزایش میزان تنش گرمایی میزان هورمون کورتیزول در همولنف رو به افزایش گذاشت ولی افزایش میزان این هورمون در اولین تنش (دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد) نسبت به سطح اولیه (شروع زمان تنش) معنی‌دار نبود ($p \geq 0.05$). با افزایش میزان تنش میزان این هورمون به طور معنی‌داری افزایش یافت و این افزایش حتی تا پایان مرحله ریکاوری نیز ادامه داشت ($p < 0.05$) (شکل ۲ د).



شکل ۲ الف: میانگین غلظت گلوکز در دماهای مختلف و زمان ریکاوری

زیستی) در محیط‌های پرورش و طبیعی باشد (Charmantier *et al.*, 1989; Charmantier and Lignot *et al.*; Soyez, 1994; Lignot *et al.*, 1997, 1999; Lignot *et al.*, 2000). گلوکز خون یکی از شاخص‌های مهم و اصلی بررسی اندازه‌گیری میزان تنش ناشی از عوامل تنش‌زای محیطی است (Webster Chung and; Chang *et al.*, 1998; *et al.*, 1996 Zmora, 2010).

در این تحقیق مشاهده شد که با ایجاد تنش‌های حرارتی (گرمایی و سرمایی) سطح گلوکز خون به طور معنی‌داری افزایش یافته و روند این افزایش تا پایان مرحله ریکاوری نیز ادامه داشته است به طوری که در هر دو تنش ایجاد شده بیشترین سطح گلوکز خون در زمان ریکاوری ثبت گردید. مقدار افزایش سطح گلوکز در مرحله ریکاوری در هر دو تنش به یک اندازه بود. بالا بودن سطح گلوکز در خون یکی از راهکارهای اصلی افزایش انرژی سلولی در مقابله با تنش‌ها است (Walker *et al.*, 2007). این نتیجه و نتایج به دست آمده توسط Pörtner و همکاران (۱۹۸۹)، Wang و همکاران (۲۰۰۶) نیز تأیید شده است. هنگامی که یک موجود زنده تحت تأثیر تنش‌های شیمیایی، فیزیکی، یا بیولوژیکی قرار گیرد، کاهش ناگهانی اکسیژن به همراه تأثیر مستقیم آن عامل می‌تواند واکنش‌های غیرطبیعی اکسیداتیوی در فرآیند متابولیسم هوازی ایجاد کند (Peterson *et al.*, 2004). این امر باعث تولید مقادیر زیادی اکسیژن رادیکال یا اکسیژن فعال می‌شود که این عوامل به سرعت روی موجود زنده تأثیر گذاشته و باعث آسیب‌های جدی بر چربی‌ها، پروتئین‌ها و هیدرات‌های کربن بافت می‌شود (Yu, 1994).

آسپاراتات آمینوترانسفراز (AST) یک آنزیم سوپراکسیداتیو کبدی است که اختصاصاً جهت پاک‌سازی رادیکال‌های سوپر اکسید اکسیژنی از کبد

می‌شد ولی در شوک‌های سرمایی، میگوها فاقد تحرک معمول و با اعمال شوک دوم دارای جهش‌های ناگهانی شدند، در بعضی از میگوها حالت‌های برگشت به پشت (شبهه به حالت غش و بی‌حالی کامل) در آن‌ها دیده شد. برگشت میگوها به حالت عادی در شوک‌های گرمایی سریع‌تر بود. در پایان آزمایش هیچ میگوی تلف نشده و میگوها به طبیعت برگشت داده شدند.

بحث

میگوی آب شیرین رودخانه‌ای که از سال ۱۳۷۱ وارد حوزه آبی شمال ایران گزارش شده است امروز به‌عنوان یک گونه ثابت در آب‌های شیرین دریاچه‌ای، رودخانه و حتی مزارع پرورش ماهیان گرم آبی استان‌های شمالی محسوب می‌شود. اگرچه بعضی از پرورش‌دهندگان ماهی در ایران از این موجود به‌عنوان موجودات مزاحم در استخرهای پرورش ماهی یاد می‌کنند ولی نقش این گونه در اکوسیستم‌های آبی و به‌خصوص تالاب انزلی هنوز به‌خوبی مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار نگرفته است. این موجودات علاوه بر اثرات منفی بر روی جمعیت نوزاد برخی از ماهیان، خود می‌توانند توسط ماهیان بزرگ‌تر مورد شکار قرار گرفته و زنجیره غذایی مناسبی را در اکوسیستم‌های آب شیرین این نواحی فراهم آورند (ذوقی شلمانی و همکاران، ۱۳۹۶).

عوامل بسیاری زیادی در زندگی میگوهای آب شیرین مؤثرند؛ تغییرات فیزیکی و شیمیایی آب (دما و اکسیژن)، عوامل بیولوژیکی (تغذیه‌ای یا عفونی) می‌تواند باعث کاهش مقاومت و سطوح ایمنی میگوها شوند. تأثیر عوامل تنش‌زای محیطی بر روی میگوها می‌تواند به‌عنوان یکی از شاخص‌های طبیعی (نشانگر

کبد یا هپاتوپانکراس است (Shisheian and Saeedi, 2007).

روند افزایش آنزیم‌های کبدی در این تحقیق برخلاف نتایج به‌دست‌آمده برای ماهیان (Ranjan et al., 2020) و پستانداران (Giannini et al., 2005)، روند افزایش سطوح آنزیم‌های کبدی بسیار سریع‌تر بود.

با اعمال شوک‌های حرارتی روند افزایش سطح آنزیم ALT در همولنف همانند آنزیم AST بود و مقدار این آنزیم نسبت به شروع زمان تنش افزایش قابل توجهی داشت. نتایج این تحقیق بیانگر افزایش معنی‌دار سطح آنزیم آلانین آمینو ترانس فراز در فاصله شوک‌های اول و دوم گرمایی و سرمایی بود. این مسئله به این معنی است که با توجه به اثرات ناشی از شوک‌های حرارتی، هپاتوپانکراس میگوها جهت جبران خسارت‌های سلولی ناشی از تنش‌های حرارتی، سطح آنزیم فوق را در همولنف افزایش داده است. محمدی و همکاران (۱۳۹۵) چنین نتیجه‌ای را تأیید کردند. افزایش میزان آنزیم‌های ALT و AST در هر دو تنش سرمایی و گرمایی مشاهده گردید. یک ساعت پس از پایان تنش (زمان ریکاوری) میزان این آنزیم‌ها در تنش گرمایی مجدداً به سطح اولیه برگشت، ولی در تنش سرمایی میزان هر دو آنزیم در پایان زمان ریکاوری در همان سطح زمان تنش باقی ماند و روند نزولی پیدا نکرد. علت این امر می‌تواند سرد بودن آب و کندی فعالیت‌های متابولسمی بدن میگوها در شوک سرمایی باشد. Defeng و همکاران (۲۰۲۱) نتایج مشابهی را در تنش‌های ناشی از آب سرد روی میگوی پارس سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) به دست آوردند و مشاهده کردند که روند تولید آنزیم‌های کبدی در اثر تنش‌های

تولید می‌شود و نقش حفاظتی را برای بافت‌های مهم بدن ایجاد می‌کند (Pörtner et al., 1998)، هرچقدر مقدار آسپاراتات آمینوترانسفراز بالاتر باشد می‌توان نتیجه گرفت که مقادیر رادیکال‌های سوپر اکسید نیز بالاتر بوده و سرعت عامل تنش‌زا در سطوح بالاتری قرار دارد (Wang et al., 2006). در این تحقیق نیز مشاهده شد که در اثر ایجاد تنش حرارتی در محیط زندگی میگوهای مورد بررسی، مقدار آسپاراتات آمینوترانسفراز روند افزایشی داشته و در تمام مدت طول تنش (گرمایی و سرمایی) مقدار این آنزیم در بالاترین سطح خود در بدن میگو قرار گرفت. با این تفاوت که در تنش گرمایی پس از پایان تنش و قرار گرفتن میگوها در محیط آرامش مقدار این آنزیم به سطح قبل از تنش برگشت، ولی در تنش سرمایی در پایان ریکاوری هنوز سطح این آنزیم بالا بوده و به سطح قبل از تنش نرسید. این نتایج به‌دست‌آمده توسط (Wang et al., 2006) نیز تأیید شده است. این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقاتی که توسط وفادار نژاد و همکاران (۱۳۹۷) روی ماهیان آمور (*Ctenopharyngodon idella*) که تحت تأثیر غلظت‌های بالای نانو اکسید روی قرار گرفته بودند نیز تأیید شد. در این تحقیق مشخص گردید که پس از قرار گرفتن بچه ماهیان آمور در معرض غلظت‌های بالا از نانو اکسید روی، میزان آنزیم‌های کبدی (AST) و (ALT) به شدت افزایش یافت.

آلانین آمینوترانس فراز (ALT) یکی از آنزیم‌های کبدی است که در انتقال یک گروه آمین از یک آمینواسید دیگر شرکت دارد. فعالیت آلانین آمینوترانسفراز در مهره‌داران و بی‌مهرگان نظیر سخت‌پوستان نشانگر ضعف یا آسیب در عملکرد عادی

ناشی از آب سرد روی میگوهای مورد بررسی نسبت به شرایط معمول کندتر بوده است.

محققین بسیاری تأیید کرده‌اند که در اثر تنش‌های مختلف محیطی در ماهیان و سخت‌پوستان، غلظت هورمون کورتیزول در فواصل زمانی متفاوتی دچار تغییر می‌گردد (قائد نیا و همکاران ۱۳۹۹ و Liu et al., 2007). هورمون کورتیزول باعث تغییرات شیمیایی در هماتولوژی خون و یا همولنف می‌شود (Tizkar et al., 2020). که یکی از اصلی‌ترین آن‌ها تغییر در میزان گلوکز خون است (Aispuro-Hernandez et al., 2008). Pan و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که با توجه به نقش انرژی‌زایی گلوکز در بدن و نیاز مبر بدن جانداران در شرایط تنش، به ATP، هورمون کورتیزول به همراه کاتکولامین‌ها با تأثیر بر کبد یا هیپوتوپانکراس، باعث القای گلیکولیز یا گلوکونئوزنریز شده و در نتیجه میزان گلوکز پلاسما افزایش می‌یابد. در این تحقیق نیز هم‌زمان با ایجاد تنش حرارتی، میزان گلوکز به همراه هورمون کورتیزول افزایش نشان داد؛ که البته در تنش گرمایی به همان دلیلی که قبلاً اشاره شد (سرعت بیشتر فعالیت‌های متابولیکی) افزایش غلظت کورتیزول همراه با افزایش گلوکز در پلاسما، به سرعت در اولین تنش مشاهده گردید، ولی در تنش سرمایی، روند افزایش سطح کورتیزول و گلوکز پلاسما کندتر بود و میزان کورتیزول و گلوکز اگرچه در طول تنش روند افزایشی داشت ولی اختلاف معنی‌داری را با زمان شروع تنش نشان نداد. این در حالی است که هر دو فاکتور گلوکز و کورتیزول در زمان ریکاوری همچنان بالا بود و اختلاف معنی‌داری را با زمان قبل از تنش نشان می‌داد، البته لازم به ذکر است که میزان کورتیزول و گلوکز پلاسما در زمان ریکاوری تنش

گرمایی، همچنان بالا بود و اختلاف معنی‌داری را با زمان قبل از تنش نشان داد. نتایج کلی این تحقیق بیانگر آن بود که تنش‌های حرارتی می‌توانند باعث تغییرات سریع در خصوصیات هورمونی و سیستم ایمنی میگوها شوند و شدت این تغییرات در تنش‌های گرمایی، بیشتر از تنش‌های سرمایی بود و همین امر باعث گردید تا اثر تنش‌های سرمایی روی میگوهای تحت آزمایش مخرب‌تر باشد؛ به نحوی که این اثرات در رفتارهای ظاهری میگوهای تحت مطالعه نیز مشاهده شده و در تنش‌های شدید سرمایی باعث وارونه شدن میگوها گردید که این حالت در تنش‌های گرمایی مشاهده نگردید. لذا می‌توان نتیجه گرفت که به علت پاسخ‌های ایمنی مناسب‌تر و سرعت ترشح هورمون کورتیزول در تنش گرمایی، میگوها در این تنش آسیب‌های کمتری نسبت به تنش سرمایی دیده باشند.

سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می‌دانیم که از زحمات تمام کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نماییم.

منابع

۱. ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی‌شناسی (۱) تشریح و فیزیولوژی، چاپ اول، انتشارات نقش مهر، با همکاری دانشگاه گیلان، ۶۵۹ صفحه.
۲. ذوقی شلمانی، الف.، پاتیمار، ر.، جعفریان، ح.، عبدالملکی، ش.، تیزکار، ب.، ۱۳۹۶. پراکنش و فراوانی میگوی غیربومی آب شیرین (*Macrobrachium nipponens*) در تالاب

9. Chang, C.C., Tsai, K.W., Hsiao, N.W., Chang, C.Y., Lin, C.L., Watson, R .D., Lee, C.Y., 2010. Structural and functional comparisons and production of recombinant crustacean hyperglycemic hormone (CHH) and CHH-like peptides from the mud crab, *Scyllaolivacea*, General and comparative endocrinology, 167(1), 68-76 .
10. Charmantier, G., Bouaricha, N., Charmantier-Daures, M., Thuet, P., Trilles, J., 1989. Salinity tolerance and osmoregulatory capacity as indicators of the physiological state of penaeid shrimps. Eur. Aquat. Soc. Spec. Publ, 10, 65-66 .
11. Charmantier, G., Soyeux, C., 1994. Effect of molt stage and hypoxia on osmoregulatory capacity in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 178(2), 233-246 .
12. Chung, J. S., Zmora, N., 2010. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus*—the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. FEBS journal, 275(4), 693-704.
13. De Grave, S., Ghane, A., 2006. The establishment of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*(de Haan), in Anzali Lagoon, Iran. Aquatic Invasions, 4, 204-208.
14. FAO, 2014. Fishery statistics yearbook. Catches and landings. The state of food insecurity in the world, Retrieved Feb. 2014. FAO, Rome, Italy. ISBN: 978-92-5-108275-1.
15. Giannini, E.G., Testa, R., Savarino, V., 2005. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. CMAJ. Feb 1; 172(3): 367–379.
16. Hu, Y., Tan, B., Mai, K., Ai, Q., Zheng, S., Cheng, K., 2008. Growth and body composition of juvenile white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed different ratios of dietary protein to energy. Aquaculture Nutrition, 14(6), 499-506.
17. Lignot, J.H., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1997. Effect of an organophosphorus
انزلی و ارتباط آن با برخی عوامل محیطی.
اکویولوژی تالاب، ۹(۳)، ۹۱-۱۰۳.
۳. قائدینا، بابک، میربخش، م.، ذریه زهرا، س.، ۱۳۹۹.
تاثیر جیره حاوی پروبیوتیک *Bacillus subtilis*
بر شاخص های سلامتی، عملکرد سیستم ایمنی
و پیشگیری از بیماری لکه سفید در میگوی پاش سفید
غربی. توسعه آبنزی پروری، ۱۴(۳)، ۳-۱۴.
۴. وفادارنژاد، م.، قرایی، الف.، میردادهریجانی، ج.،
میری، م.، ۱۳۹۷. تعیین غلظت تحت کشنده
(LC50) نانو اکسید مس در ماهی
آمور (*Ctenopharyngodon idella*) و تأثیر آن بر
شاخص های خونی و فعالیت آنزیم های کبدی.
مجله منابع طبیعی ایران، شیلات، ۱(۷۱)، ۲۱-۱۱.
5. Aispuro-Hernandez, E., Garcia-Orozco, K. D., Muhlia-Almazan, A., Del-Toro-Sánchez, L., Robles-ánchez, R. M., Hernández, J., González-Aguilar, G., Yepiz-Plascencia, G., & Sotelo-Mundo, R. R., 2008. Shrimp thioredoxin is a potent antioxidant protein. Comparative Biochemistry and Physiology C-harmacology Toxicology and Endocrinology, 148, 94-99.
6. Banaee, M., Mirvaghefi, A.R., Rafiee, G.R., Mojazi Amiri, B., 2008. Effect of sublethal diazinon concentrations on blood plasma biochemistry. International Journal Environmental Research 2, 189-198.
7. Barry, T.P., Lapp, A.F., Kayes, T.B., Malison, J.A., 1993. Validation of an ELISA for measuring cortisol in fish and comparison of stress responses of rainbow trout and lake trout. Aquaculture, 117, 351-363.
8. Chang, E.S., Keller, R., Chang, S.A., 1998. Quantification of Crustacean Hyperglycemic Hormone by ELISA in Hemolymph of the Lobster, *Homarus americanus*, Following Various Stresses. General and comparative endocrinology, 111(3), 359-366.

26. Peterson, B.C., Small, B.C., 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Domestic Animal Endocrinology*, 26, 231-240.
27. Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A., Ross, L.G., 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. *Aquaculture*, 157(1), 107-115.
28. Pörtner, H.O., Hardewig, I., Sartoris, F., Van Dijk, P., 1989. Energetic aspects of cold adaptation: critical temperatures in metabolic, ionic and acid-base regulation. *Cold ocean physiology*, 88-120
29. Ranjan A., Srivastava, P.P., Jain, K.K., Muralidhar, P.A., 2020. Comparative evaluation of metabolic enzymes activities in different tissues of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) fingerlings reared at ambient and higher temperature. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19(2) 893-903.
30. Santos, M.A., Pacheco, M., 1996. *Anguilla Anguilla L.* Stress biomarkers recovery in clean water and secondary treated pulp mill effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 96-100.
31. Shahsavani, D., Mohri, M., Gholipour Kanani, H., 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in *Acipenser stellatus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36, 39-43.
32. Shisheian, B., Saeedi, F., 2007. *Medical Hematology*. Daneshjoo publication. 344 P. (In Persian).
33. Stentiford, G.D., Longshaw, M., Lyons, B.P., Jones, G., Green, M., Feist, S.W., 2003. Histopathological biomarkers in estuarine fish species for the assessment of biological effects of contaminants. *Marine Environmental Research*, 55, 137-159.
34. Taylor, D.L., Collie, J.S., 2003. Effect of temperature on the functional response and foraging behavior of the sand shrimp, *Crangon septem spinosa*, preying on juvenile winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine Ecology Progress Series*, 263, 217-234.
- insecticide, fenitrothion, on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp, *Penaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology*, 128(2), 307-316.
18. Lignot, J.H., Cochard, J., Soyeux, C., Lemaire, P., Charmantier, G., 1999. Osmoregulatory capacity according to nutritional status, molt stage and body weight in *Penaeus stylirostris*. *Aquaculture*, 170(1), 79-92 .
19. Lignot, J.H., Spanings-Pierrot, C., Charmantier, G., 2000. Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1), 209-245.
20. Liu, M.Y., Cai, J.X. and Tzeng, C.S., 2007. Molecular Systematics of the freshwater prawn genus *Macrobrachium* Bate, 1868 (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) inferred from mtDNA sequences, with emphasis on East Asian species. *Zoological Studies* 46(3), 272-289.
21. Michael, B., New, C., Mohanakumaran, N., 2012. Global scale of freshwater prawn farming. *Aquaculture Research*, 43, 960-969.
22. Montagna, M.C., 2011, Effect of temperature on the survival and growth of freshwater prawns *Macrobrachium borellii* and *Palaemonetes argentine* (Crustacea, Palaemonidae). *Iheringia Série Zoológica*, 101: 233-238.
23. Moore, M.N., 2006. Do nanoparticles present ecological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 32, 967-976.
24. Packer, R.K., Garvin, J.L., 1998. Seasonal differences in activity of perch, *Perca flavescens*, gill ATPase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 120(4), 777-783.
25. Pan, C. H., Chien, Y. H., & Hunter, B., 2003. The resistance to ammonia stress of *Penaeus monodon* Fabricius juvenile fed diets supplemented with astaxanthin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 297, 107-118.

35. Tizkar, B., Seidavi, A., Ponce-Palafox, J.T., Pourashoori, P., 2014. The effect of astaxanthin on resistance of juvenile prawns, *Macrobrachium nipponense* (Decapoda: Palaemonidae) to physical and chemical stress. *Revista de Biología Tropical*, 62 (4), 1331-1341.
36. Wang, W.N., Liang, H., Wang, A.L., Chen, T., Zhang, S.E., Sun, R.Y., 2000. Effect of pH and Zn²⁺ on subcultured muscle cells from *Macrobrachium nipponense*. *Methods in cell science*, 22(4), 277-284.
37. Wang, W.N., Wang, A.L., Liu, Y., Xiu, J., Liu, Z.B., Sun, R.Y., 2006. Effects of temperature on growth, adenosine phosphates, ATPase and cellular defense response of juvenile shrimp, *Macrobrachium nipponense*. *Aquaculture*, 256(1), 624-630.
38. Wang, T., Long, X., Cheng, Y., Liu, Z., Yan, S., 2014. The potential toxicity of coppernanoparticles and copper sulphate on juvenile *Epinephelus coioides*. *Aquatic Toxicology*, 152, 96-104.
39. Wang, G., Robertson, L.M., Wringe, B.F., McGaw, I.J., 2016. The Effect of Temperature on Foraging Activity and Digestion in the American Lobster *Homarus americanus* (Decapoda: Nephropsidae) Feeding on Blue mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of Crustacean Biology*, 36, 138-146.
40. Webster, S., 1996. Measurement of crustacean hyperglycaemic hormone levels in the edible crab *Cancer pagurus* during emersion stress. *Journal of Experimental Biology*, 199(7), 1579-1585.
41. Welker, T.L., Lim, C., Yildirim-Askoy, M., Kelsius, P.H., 2007. Effect of buffered and unbuffered tricainemethanesulfonate (MS-222) at different concentrations on the stress responses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, Rafinesque. *Journal of Applied Aquaculture*, 19, 1-18.
42. Yu, B.P., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 74(1), 139 .