University of Guilan with collaboration of Iranian Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 10, No. 1, 2024, pages: 43-55
DOI: 10.22124/janb.2024.27503.1244

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effects of using different levels of dietary chitosan on some immune indices and antioxidant defense system in Vannamei shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Saeed Dayani, Valiollah Jafari*, Roghieh Safari, Seyed Hossein Hoseinifar
Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran

Received 22 December 2023 Revised 09 March 2024 Accepted 11 March 2024

KEYWORDS

Chitosan
Immunity
Immunoglobulin
Antioxidant
White leg shrimp

ABSTRACT

Introduction: Aquaculture aims to provide stable environmental conditions for fish to be able to grow and protect it from stress and diseases. To guarantee a sustainable yield of fish species, well-balanced diets should be considered. For this purpose, diets supplemented with feed additives have won the interest of researchers who are concerned with the aquaculture field, the most important of which is chitosan, a cationic biopolymer, derived from the alkaline deacetylation of chitin; a natural polymer found in the exoskeletons of insects, crustaceans and fungal cell walls. Therefore, the purpose of this study was to examine the effects of using dietary chitosan in some immune indices and antioxidant defence system in Vannamei shrimp, *Litopenaeus vannamei*.

Materials and Methods: For this purpose, 180 pieces of Vannamei shrimp with an average weight of about 4 g were prepared and kept for 2 weeks to adapt to the test conditions. We prepared 4 groups, each with three repetitions, including the basal diet of zero (control), 1 g (treatment 1 = T_1), 2 g (T_2) and 4 g (T_3) chitosan per kilogram of feed in a completely randomized design for 8 weeks. At the end of the trial, samples were randomly taken from the rearing tanks and hemolymph indices including serum biochemical, immune and antioxidant indices were measured.

Results and Discussion: According to the results, immune indices such as lysozyme and immunoglobulin increased significantly compared to the control group ($p<0.05$). So that in case of lysozyme, the highest amount was recorded in T_2 (by adding 2 g/kg chitosan), while in immunoglobulin, the highest amount was observed in T_1. Serum antioxidant activity such as superoxide dismutase (in T_1 and T_2) and catalase (in T_1, T_2 and T_3) increased

significantly compared to the control group ($p<0.05$). Also, the results of the serum biochemical analyses exhibited that only ALP enzyme recorded a significant difference ($p<0.05$), so that the highest value was observed in T_3. According to the results, there was no significant difference ($p>0.05$) in ALT and AST enzymes among treatments. So that the highest amounts of these two enzymes were observed in T_2 and the control group, respectively.

Conclusion: The results of this study indicate the positive effects of chitosan on immune indices in Vannamei shrimp. Therefore, it is possible to recommend using chitosan as a natural and immune stimulant for culture of *L. vannamei*.

*Corresponding author: V.jafari.sh110@gmial.com

دانشگاه گیلان با مشارکت انجمن آبزی‌پروری ایران

تغذیه آبزیان

سال دهم، شماره اول، فروردین ۱۴۰۳، صفحات ۵۵-۴۱

DOI: 10.22124/janb.2024.27503.1244

"مقاله پژوهشی"

اثرات به‌کارگیری سطوح مختلف کیتوزان در جیره غذایی بر عملکرد برخی از شاخص‌های ایمنی و دفاع ضد اکسایشی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

سعید دیانی، ولی الله جعفری*، رقیه صفری، سید حسین حسینی فر

گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۱

کلمات کلیدی

کیتوزان

ایمنی

ایمونوگلوبین

آنتی‌اکسیدانی

میگوی وانامی

چکیده

هدف از انجام این تحقیق، مشاهده اثرات به کارگیری کیتوزان بر عملکرد شاخص‌های ایمنی و دفاع ضد اکسایشی در میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) بود. به این منظور، تعداد ۱۸۰ قطعه میگوی وانامی با میانگین وزن حدود ۴ گرم تهیه و به‌مدت ۲ هفته برای سازگاری با شرایط آزمایش نگهداری شدند. این پژوهش با ۴ گروه که هر گروه سه تکرار، شامل جیره پایه صفر (شاهد)، ۱ گرم (تیمار ۱)، ۲ گرم (تیمار ۲) و ۴ گرم (تیمار ۳) کیتوزان به ازای کیلوگرم خوراک به صورت طرح کاملا تصادفی، به مدت ۸ هفته انجام شد. در انتهای دوره، شاخص‌های ایمنی و ضد اکسایشی سرم اندازه‌گیری شدند. شاخص‌های ایمنی از قبیل لایزوزیم و ایمونوگلوبولین سرم افزایش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشتند ($p<0/05$)؛ به‌طوری‌که در مورد آنزیم لایزوزیم بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۲ و در مورد ایمونوگلوبولین بیشترین مقدار در تیمار ۱ مشاهده شد. فعالیت ضد اکسایشی سرم از قبیل سوپراکسید دیسموتاز (در تیمارهای ۱ و ۲) و کاتالاز (در تیمارهای ۱، ۲ و ۳) نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/05$). همچنین، نتایج سنجش شاخص‌های بیوشیمیایی سرم نشان داد که فقط در مورد آنزیم ALP تیمارها نسبت به گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<0/05$) و بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۳ بود. در آنزیم‌های AST و ALT اختلاف معنی‌دار نبود ($p>0/05$). نتایج این پژوهش حاکی از اثرات مثبت کیتوزان بر شاخص‌های ایمنی در میگوی وانامی است. لذا می‌توان استفاده از کیتوزان را به عنوان محرک ایمنی و طبیعی برای پرورش میگوی وانامی توصیه کرد.

نویسنده مسئول: V.jafari.sh110@gmial.com

مقدمه

صنعت آبزی‌پروری یکی از منابع اصلی تأمین غذای انسان و سریع‌ترین بخش تولید مواد غذایی کشورهای در حال توسعه است و به تأمین تقاضای رو به رشد غذا در سطح جهان کمک می‌کند (Heba and Salem, 2018). با ادامه افزایش تقاضای جهانی برای غذا، آبزی‌پروری به عنوان یک راه حل حیاتی برای کاهش فشار بر ذخایر ماهیان و بوم سازگان دریایی ارائه می‌شود، در حالی که پیش‌بینی می‌شود که در سال‌های آینده به منبع اصلی تأمین نیازهای آبزیان تبدیل شود (Ahmed et al. 2020). به‌رغم رشد قابل توجه، این صنعت همواره با مشکلاتی روبه‌رو بوده است.

در حال حاضر یکی از چالش‌های اصلی در این صنعت بهبود جیره‌های غذایی فرموله شده برای بهینه‌سازی رشد و ارتقای سلامت ماهیان است (Niromand et al. 2011). مشخص شده است که تغذیه نقش مهمی در عملکرد دستگاه ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها ایفا می‌کند. در نتیجه، کیفیت غذا و مدیریت تغذیه بسیار حساس و حائز اهمیت است (Esmaeili Rad et al. 2014). مکمل‌های غذایی همچنین با خاصیت ضد اکسایشی برای به حداقل رساندن یا جلوگیری از آسیب در شرایط تنش و تقویت دستگاه دفاعی و بهبود خصوصیات فیزیولوژیک (Huang et al. 2020; Lobato et al. 2013) به آبزی و آبزی‌پروری پایدار کمک می‌کنند (Rajauria, 2015; Ruiz-Salmon et al. 2020). لذا استفاده از محرک‌های رشد و ایمنی در آبزیان در سال‌های اخیر رشد بی‌سابقه‌ای یافته است (Du et al. 2022). دلیل اساسی و منطقی استفاده از این محرک‌ها کاهش ضریب تبدیل غذایی، افزایش رشد، افزایش تولید، پیشگیری و کنترل بیماری‌ها و دستیابی به محصولی با کیفیت بالاتر است (Sukhoverkhov et al. 2006).

امروزه استفاده از محرک‌های رشد با منشاء طبیعی به‌دلیل عواملی مانند ارزش اقتصادی و کم‌هزینه‌بودن تولید آن‌ها، نداشتن اثرات تخریبی بر محیط زیست (داروهای ارگانیک)، کم‌بودن عوارض جانبی در مقایسه با داروهای شیمیایی و عدم ایجاد مقاومت نسبی عوامل بیماری‌زا به این محرک‌ها منجر شده تا این منابع ارزشمند دارویی از ارزش و جایگاه خاصی در درمان برخوردار باشند (Brichnell and Dalmo, 2005). محرک‌هایی مانند گلوکان (Glucan)، لاکتوفرین (Lactoferin)، کیتین (Chitin) کیتوزان و لوامیزول (Levamisole) باعث تحریک دستگاه ایمنی ماهی و میگو می‌شوند. این محرک‌ها سبب تسهیل عمل یاخته‌های بیگانه-خوار و افزایش فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها می‌شوند (Kakuta and Kurokura, 1995).

فرآورده‌های دریایی منبع مهمی از مواد مغذی بوده که به استفاده از آنها در رژیم غذایی انسان به میزان زیاد توجه شده است. از جمله آن‌ها می‌توان به میگو اشاره کرد که غنی از مجموع اسیدهای چرب چندغیراشباع بلندزنجیره مانند ایکوزاپنتانوئیک و دوکوزاهگزانوئیک است و در جلوگیری از بیماری‌های قلبی نقش دارد (Perashide et al. 2015).

میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) از گونه‌های مهم پرورشی محسوب می‌شود. طبق اعلام سازمان جهانی فائو این میگوی دریایی از نظر اقتصادی مهم‌ترین و دارای بالاترین نرخ تولید، با ۴/۹ میلیون تن در سال ۲۰۱۸ است که بیش از ۵۰٪ از سخت پوستان تولید شده در جهان را شامل می‌شود (FAO, 2020). پراکنش جغرافیایی آن به صورت بومی در آب‌های اقیانوس مرکزی آرام، سواحل مکزیک و آمریکای جنوبی با دمای بالاتر از ۲۰°C در تمام سال است. این میگو به علت مزایای قابل توجه در پرورش به تمام نقاط جهان انتقال یافته است؛ نسبت به شوری‌های مختلف تحمل خوبی داشته و در مقابل بیماری‌های ویروسی مانند IHHN و دیگر عوامل بیماری‌زا مقاومت بالایی دارد. وانامی در ایران گونه اصلی پرورشی در سال‌های اخیر به‌حساب می‌آید. همچنین، یکی از گونه‌های مهم پرورشی در جهان به‌شمار رفته و از سال ۲۰۰۳ به بعد رتبه اول تولید را در بین گونه‌های پرورشی کسب کرده است (Oji fard et al. 2010).

کیتوزان یک پلیمر زیستی کاتیونی است که از استیل‌زدایی قلیایی کیتین به‌دست می‌آید و همچنین، یک پلیمر طبیعی است که در اسکلت بیرونی حشرات، سخت‌پوستان و دیواره یاخته‌ای قارچ‌ها یافت می‌شود (El-Naggar et al. 2022). کیتوزان یکی از محرک‌های رشد و ایمنی مناسب در آبزیان است (Cheba, 2011). حلالیت کیتوزان در آب و دیگر حلال‌های قطبی نسبت به کیتین بیشتر است و دارای خواص زیستی مانند افزایش تحریک و تعدیل ایمنی (Lin

et al. 2011)، ضدتوموری (Keen et al. 2002)، افزایش رشد (Kono et al. 1987) و فعالیت ضدمیکروبی (No et al. 2002) است. همچنین، دارای خواص ضد باکتریایی (Sharma, 2017)، ضد اکسایشی (Chang and Tsai, 2018)، ضد جهش ژنتیکی (Chang et al. 2012)، کاهش چربی خون (Zhang et al. 2012) و بهبود فعالیت‌های دستگاه ایمنی (Harikrishnan et al. 2012) است. علاوه بر این، کیتوزان به‌طور گسترده در مواد غذایی، دارویی و آرایشی استفاده می‌شود (Chena and Chen, 2019). گزارش‌های متعدد درباره اثر کیتوزان بر شاخص‌های رشد (Lin et al. 2011; Lin et al. 2012; Geng et al. 2015; Chena and Chen, 2019) شاخص‌های خونی آبزیان (Lin et al. 2012; Maqsood et al. 2010) و شاخص ضد اکسایشی (Bhoopathy et al. 2021; Brol et al. 2021) وجود دارد. برای مثال، تحقیقات انجام شده بر روی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) (Gopalakannan and Arul, 2006; Esmaeili Rad et al. 2014) کفشک زیتونی (*Parallichthys olivaseus*) (Cha et al. 2008) و کپور روهو (*Labeo rohita*) (Aathi et al. 2013) نشان داده است که استفاده از کیتوزان منجر به بهبود عملکرد رشد می‌شود. همچنین، Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که تجویز خوراکی کیتوزان در ماهی هامور صخره‌ای (*Epinephelus bruneus*) منجر به افزایش معنی‌دار تعداد گلبول‌های قرمز خون، تعداد گلبول‌های سفید، هماتوکریت و هموگلوبین می‌شود.

تقویت دستگاه ایمنی بدن و استفاده از محرک‌های ایمنی به‌خصوص در گونه‌های با ارزش اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکرد محققان است (Esmaeili Rad et al. 2014). لذا به نظر می‌رسد یکی از گزینه‌ها با توجه به شرایط کشور، استفاده از کیتوزان استحصالی از پوسته میگو (به عنوان یکی از محرک های ایمنی) است. هدف از این تحقیق، بررسی سطوح مختلف کیتوزان بر ایمنی ذاتی و برخی از شاخص‌های ضداکسایشی میگوی وانامی به عنوان یکی از گونه‌های با ارزش اقتصادی است.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش

این پژوهش به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب سه تیمار آزمایشی به همراه یک تیمار شاهد بدون افزودنی در سه تکرار طراحی شد. کیتوزان مورد استفاده در این تحقیق با نام تجاری سیگما تهیه و با بررسی منابع سطوح تعیین شده برای تعیین تیمارهای آزمایشی به شرح زیر بود (Niu et al. 2013): کیتوزان لازم با درجه استیل‌زدایی ۹۰٪ و جرم مولکولی متوسط به مقادیر ۱ گرم (تیمار ۱)، ۲ گرم (تیمار ۲) و ۴ گرم (تیمار ۳) در هر کیلوگرم خوراک تجاری شرکت کیان دانه پارس (ترکیبات تقریبی خوراک: ۳۸٪ پروتئین، ۷٪ چربی، ۱۴٪ خاکستر و ۱۰٪ رطوبت) با ترازوی دیجیتال (دقت ۰/۰۱ گرم) وزن شد. سپس، سطوح مشخص کیتوزان همراه با ۰/۷۵ گرم ژلاتین و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به ازای هر کیلوگرم خوراک حل، جداگانه به سطح غذا افشانه و به‌طور مرتب هم زده شدند. پس از خشک شدن در دمای اتاق، جمع‌آوری و در نایلون‌های مجزا نگهداری شدند (تیمار شاهد تنها با ژلاتین افشانه شد). در نهایت، میگوها به مدت ۸ هفته از جیره حاوی سطوح مختلف کیتوزان تغذیه شدند.

تغذیه و زیست سنجی میگوها

تعداد ۱۸۰ میگوی وانامی با میانگین وزنی حدوداً ۴ گرم از یک مزرعه پرورشی واقع در لاین ۲ سایت میگو گمیشان (مزرعه شماره ۴ شرکت مروارید سفید آشوراده) به سالن ونیروی شرکت آبزی‌فرآور صدر گلستان واقع در استان گلستان، شهرک صنعتی بندرترکمن منتقل شدند. میگوها بعد از انتقال برای سازگاری به مدت دو هفته با جیره شاهد تغذیه شده و بعد از مرحله سازگاری در ابتدای آزمایش، زیست‌سنجی میگوها انجام شد. میگوها به‌طور تصادفی در ۱۲ مخزن ۱۵۰ لیتری با تراکم نگهداری ۱۵ عدد در هر مخزن و ۳ تکرار ذخیره شدند. قبل از ذخیره‌سازی، مخازن توسط مواد ضدعفونی‌کننده مانند هیپوکلریت سدیم کاملاً ضدعفونی، و سپس با آب شستشو داده شدند. هر یک از مخازن با حجم

۱۲۰ لیتر آب لب‌شور دریای خزر که از پالاهای ریز عبور داده شده بودند، پر شد و هر دو روز یکبار در صورت نیاز تا ۱۰٪ آب آن از طریق سیفون کردن برای برداشت مدفوع و دیگر مواد باقیمانده تعویض می‌شدند. برای هوادهی و تأمین اکسیژن در هر یک از مخازن ۱ عدد سنگ هوا (که به منبع هواده متصل است) نصب شد. آزمایش در یک سالن سرپوشیده با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۸ هفته انجام شد. میگوها روزانه ۳ مرتبه (ساعت ۸، ۱۶ و ۲۴) و با نرخ غذادهی روزانه حدوداً ۳٪ وزن کل بدن تغذیه شدند. روزانه باقیمانده جیره هر مخزن قبل از غذادهی بعدی از طریق سیفون کردن جمع‌آوری، و نرخ مرگ و میر در هر مخزن ثبت، و در پایان ۵۶ روز آزمایش، درصد بازماندگی میگوها محاسبه شد.

سنجش شاخص‌های همولنف و آنزیم‌های سرمی میگوها

در پایان دوره پرورش، میگوها به‌طور تصادفی از مخازن پرورشی صید شدند تا برخی از شاخص‌های همولنف در آنها سنجش شود. به این منظور، همولنف از سینوس شکمی هر میگو با استفاده از سر سوزن G۲۵ و سرنگ یک میلی‌لیتری خارج، و سپس در اپندورف‌های کوچک که حاوی ۰/۴ میلی-لیتر از محلول ضد انعقاد Alsever (۱۱۵ میلی‌مول گلوکز، ۳۳۶ میلی‌مول NaCl، 27 میلی‌مول سیترات سدیم و ۹ میلی‌مول EDTA با pH برابر با ۷) بود، تخلیه شد. همولنف به‌مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و لایه بالایی برای بررسی میزان آنزیم‌ها و شاخص‌های ایمنی در آزمایشگاه تشخیص طبی با استفاده از روش بیورت و توسط کیت‌های تشخیصی (پارس آزمون، ایران) استفاده شد. برای اندازه‌گیری آنزیم‌های ALT و AST از روش IFCC و در طول موج ۳۴۰ nm استفاده و برای اندازه‌گیری ALP از روش DGKC (استاندارد انجمن بیوشیمی آلمان) و در طول موج ۴۰۵nm استفاده شد (Hai and Fotedar, 2009).

سنجش شاخص‌های ایمنی

فراسنجه‌های ایمونوگلوبولین (Siwicki and Anderson, 1993) و لایزوزیم با استفاده از روش Demers و Bayne (۱۹۹۷) بر اساس تجزیه باکتری گرم مثبت *Micrococcus luteus* سنجش شد.

بررسی فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی

سطح آنزیم‌های ضد اکسایشی شامل سوپر اکسید دیسموتاز (SOD) و کلتالاز (CAT) با استفاده از کیت‌های تجاری (زول بیو آلمان) به روش فتومتریک و طبق روش پیشنهاد شده توسط شرکت تولیدکننده کیت اندازه‌گیری شد (Vijayabaskar et al. 2012).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به برخی از شاخص‌های رشد، ایمنی و دستگاه دفاع ضد اکسایشی برای بررسی نرمال بودن با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شدند. سپس، با استفاده از آزمون واریانس یک‌طرفه درسطح اطمینان ۹۵٪ سنجش، و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. نرم‌افزار آماری SPSS برای آزمون‌ها و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل ترسیم شدند.

نتایج

فعالیت شاخص‌های بیوشیمیایی سرم

نتایج مربوط به شاخص‌های بیوشیمیایی سرم از قبیل (AST،ALP و ALT) در جدول ۱ ارائه شده است. پس از هشت هفته تغذیه با کیتوزان، نتایج حاکی از افزایش معنی-دار آنزیم ALP در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ بود ($p<۰/۰۵$) و بیشترین مقدار در تیمار ۲ (۲ گرم کیتوزان در کیلوگرم خوراک) مشاهده شد. در آنزیم ALT بین تیمارها افزایش معنی‌دار مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$)، ولی بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۲ بود. نتایج مربوط به آنزیم AST در هیچ‌یک از گروه‌ها اختلاف معنی‌دار نشان نداد، ولی بیشترین مقدار در گروه شاهد مشاهده شد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۱ مقایسه شاخص‌های بیوشیمیایی سرم (میانگین ± انحراف معیار) با استفاده از کیتوزان در *Litopenaeus vannamei* طی ۸ هفته.

Table 1 Comparison of serum biochemical indices (mean ± standard deviation) using chitosan in *Litopenaeus vannamei* during 8 weeks.

Parameters	Control	1	2	4
ALP (IU/L)	35.06 ± 0.057[a]	60.92 ± 4.57[b]	68.63 ± 1.26[b]	91.29 ± 3.98[c]
ALT (IU/L)	24.36 ± 1.84[b]	13.60 ± 0.97[a]	28.80 ± 4.25[b]	21.52 ± 2.25[a]
AST (IU/L)	5.62 ± 0.09	3.30 ± 0.00	5.29 ± 0.76	4.63 ± 0.76

Different letters indicate significant differences between groups ($p<0.05$).

شاخص‌های ایمنی

نتایج حاصل از اثر کیتوزان بر فعالیت لایزوزیم و ایمونوگلوبولین کل میگوی وانامی پس هشت هفته تغذیه به ترتیب در جدول ۲ نمایش داده شده است. نتایج حاصل از این پژوهش بیان‌گر افزایش معنی‌دار فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای ۱ و ۲ نسبت به گروه شاهد بود (p<۰/۰۵). همچنین، در مورد ایمونوگلوبولین کل، بین تیمارها و گروه شاهد اختلاف معنی‌دار ثبت شد (p<۰/۰۵) و بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۱ بود.

فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی

نتایج مربوط به شاخص‌های ضد اکسایشی در تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف کیتوزان پس از هشت هفته تغذیه در جدول ۳ ارائه شده است. اثر سطوح مختلف کیتوزان در جیره غذایی میگوی وانامی بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز سرم در تیمارهای ۱ و ۲، افزایش معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان داد (p<۰/۰۵). اثر سطوح مختلف کیتوزان در جیره غذایی میگوی وانامی بر فعالیت آنزیم کاتالاز در همه تیمارها، افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشت (p<۰/۰۵). بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۱ بود.

جدول ۲ مقایسه شاخص‌های ایمنی (میانگین ± انحراف معیار) با استفاده از کیتوزان در *Litopenaeus vannamei* طی ۸ هفته.

Table 2 Comparison of immune indices (mean ± standard deviation) using chitosan in *Litopenaeus vannamei* during 8 weeks.

Parameters	Control	1	2	4
Immunoglobulin (mg/dL)	36.15 ± 0.20[a]	40.05 ± 0.37[d]	38.95 ± 0.14[c]	37.31 ± 0.06[b]
Lysozyme (u/mL)	5.70 ± 0.05[a]	8.05 ± 0.31[b]	8.38 ± 0.08[b]	6.16 ± 0.14[a]

Different letters indicate significant differences between groups ($p<0.05$).

جدول ۳ مقایسه شاخص‌های ضد اکسایشی (میانگین ± انحراف معیار) با استفاده از کیتوزان در *Litopenaeus vannamei* طی ۸ هفته.

Table 3 Comparison of Antioxidant indices (mean ± standard deviation) using chitosan in *Litopenaeus vannamei* during 8 weeks.

Parameters	Control	1	2	4
CAT (IU/L)	10.10 ± 0.17[a]	12.60 ± 0.17[c]	12.15 ± 0.20[c]	11.15 ± 0.20[b]
SOD (IU/L)	60.86 ± 0.43[a]	66.10 ± 0.23[b]	67.15 ± 0.20[c]	60.00 ± 0.11[a]

Different letters indicate significant differences between groups ($p<0.05$).

بحث

هدف آبزی‌پروری پایدار فراهم کردن شرایط محیطی مناسب برای رشد ماهی و محافظت در برابر استرس و بیماری‌هاست. برای این منظور، جیره‌های مکمل با افزودنی‌های خوراک مورد توجه محققانی که به حوزه آبزی‌پروری اهمیت می‌دهند، جلب شده است که از مهم‌ترین آنها می‌توان به نانوذرات کیتوزان و کیتوزان اشاره کرد (El-Naggar et al. 2022). کیتوزان به عنوان محرک ایمنی در برخی گونه‌های آبزیان آثار مثبت و معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه نشان داده است. حضور پپتیدهای مختلف مانند لایزوزیم، پادتن، عوامل کمپلمان و عوامل دیگر تجزیه‌کننده در سرم خون به عنوان خط اولیه دفاعی نقش مهمی در پیش‌گیری از بیماری‌های عفونی و تقویت ایمنی غیراختصاصی دارد (Harikrishnan et al. 2012).

نتایج حاصل از تغییرات شاخص‌های ایمنی در بین تیمارهای مختلف نشان داد که تیمارهای ۱ و ۲ به‌ترتیب در آنزیم ایمونوگلوبولین و لایزوزیم بیشترین اختلاف معنی‌دار را نسبت به دیگر گروه‌ها و گروه شاهد نشان داد، که با نتایج به دست آمده از تحقیق انجام شده بر روی هامور صخره‌ای تغذیه‌شده با ۱٪ و ۲٪ کیتوزان (Harikrishnan et al. 2012)، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ۰/۲۵٪ کیتوزان (Tafi et al. 2013)، کپور روهوی تغذیه شده با ۱۰ گرم کیتوزان در هر کیلوگرم غذا (Aathi et al.2013) و کپور معمولی تغذیه شده با ۲٪ کیتوزان (Kono et al. 1987) همخوانی داشت. نتایج مطالعه دیگری نشان داد که کیتوزان اثرات مثبت روی لوچ ماهی (*Misgurnus anguillicadatus*) با توجه به تحریک‌کنندگی دستگاه ایمنی دارد و می‌توان از آن به عنوان یک مکمل غذایی استفاده کرد (Chena and Chen, 2019). Maqsood و همکاران (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که استفاده از ۲٪ کیتوزان در جیره غذایی ماهی کپور معمولی منجر به افزایش فعالیت دستگاه ایمنی غیر اختصاصی، کاهش مرگ‌ومیر و افزایش رشد ماهی در شرایط استرس شد. در تحقیقی دیگر با بررسی اثر تجویز خوراکی کیتوزان بر شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی ماهی کپور روهو مشخص شد که استفاده از ۱۰ گرم کیتوزان بر کیلوگرم غذا منجر به افزایش لایزوزیم سرم خون می‌شود (Aathi et al. 2013). در مطالعه دیگری که به بررسی اثر کیتوزان روی میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) پرداخت، مشخص شد که کیتوزان به مقدار ۴ گرم به عنوان محرک دستگاه ایمنی نسبت به کیتین عمل می‌کند (Niu et al. 2013). این موضوع نشان می‌دهد که کیتوزان نیز همانند دیگر محرک‌های ایمنی تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر پاسخ‌های ایمنی در آبزیان دارد. هر چند که دلیل کاهش پاسخ‌های ایمنی در ماهیان هنگام استفاده از مقادیر زیاد و طولانی محرک‌های ایمنی به صورت خوراکی، هنوز به طور دقیق مشخص نشده است، اما با وجود این، احتمالاً در چنین شرایطی یک واکنش منفی در ماهیان در مقابل تحریک خودتنظیمی ایمنی بدن ایجاد شده و باعث برگشت پاسخ‌های ایمنی به جایگاه اول آن می‌شود. بنابراین، استفاده از مقادیر زیاد و به مدت طولانی از محرک‌های ایمنی باعث کاهش اثر آنها می‌شود (Sakai, 1998) و شاید دلیل تأثیر کمتر تیمار ۳ (۴ گرم کیتوزان) در این تحقیق نسبت به تیمارهای ۱ و ۲ نیز همین امر باشد و احتمالاً کیتوزان در دستگاه گوارش آبزیان تأثیر خود را بر هضم و جذب مواد غذایی در مقادیر کمتر، بهتر نشان می‌دهد (Gopalakannan and Arul, 2006).

ظرفیت ضداکسایشی کل، نشان دهنده فعالیت تمام ضداکسایش‌های موجود در بدن است که در مواجهه با هر گونه عوامل مضر یا مفید، میزان هر کدام از آنها ممکن است افزایش یا کاهش یابد. همچنین ممکن است مقدار برخی از این ضداکسایش‌ها به دلیل فعال شدن ضداکسایش‌های سطح اول تغییر نکند. میزان آنزیم‌های ضد اکسایشی کاتالاز و سوپراکسیددیسموتاز در تیمار ۱ و ۲ دارای بیشترین اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه شاهد بود. این افزایش ممکن است به دلیل فعال شدن مسیر ضداکسایشی در اثر اضافه‌کردن کیتوزان به جیره غذایی میگو باشد، زیرا کیتوزان به دلیل داشتن خواص ضداکسایشی قادر به فعال‌سازی مسیر ضد اکسایشی، آنزیمی و غیرآنزیمی است (Wang et al. 2024).

گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می دهد کیتوزان می‌تواند سبب افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی در خوک (Niu et al. 2013)، گاوهای شیری (Li et al. 2015) و

ماهی قزل‌آلا (Tafi et al. 2014) شود که همسو با نتایج به‌دست آمده از این پژوهش است. همچنین، Bhoopathy و همکاران در سال ۲۰۲۱ گزارش کردند که خوراک غنی شده میگو با کورکومین و نانوذرات کیتوزان (CSNPs) به عنوان یک حامل دارویی (Cur-CSNPs) ممکن است برای تقویت آبزیان در برابر استرس اکسایشی مفید باشد. مکانسیم احتمالی اثرات ضداکسایشی کیتوزان، توانایی مهار بالای رادیکال‌های آزاد (۸۳/۴٪)، به‌دلیل وجود گروه‌های یون آمونیوم (NH_3^+) موجود در ساختار کیتوزان است (Xing et al. 2005). گروه‌های آمین (NH_3) کیتوزان و یون‌های هیدروژن (H^+) در محلول‌های اسیدی واکنش داده و یون آمونیوم (NH_3^+) شکل می‌گیرد. رادیکال‌های آزاد که مولکول‌هایی بسیار ناپایدارند، با یون هیدروژن واکنش می‌دهند و سپس به شکل پایداری تغییر می‌یابند (Xie et al. 2001; Xing et al. 2005; Fenga et al. 2008).

در این آزمایش، سطوح ۱ و ۲ گرم کیتوزان با افزایش فعالیت آنزیم‌های ضد اکسایشی SOD و CAT، سبب کاهش سطح سرمی آنزیم‌های کبدی شد. مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد کیتوزان از طریق اعمال اثرات ضداکسایشی و حفاظت از اکسیدشدن چربی‌ها و جلوگیری از تخریب بافت کبد، به طور معنی‌دار سبب کاهش آزادسازی آنزیم‌های کبدی و سرازیری آنها به جریان خون می‌شود (Subhapradha et al. 2014; Rezaei Koochacksaraei et al. 2020). با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به نظر می‌رسد، مصرف خوراکی کیتوزان در میگوی وانامی در سطوح استفاده شده ۱ و ۲ گرم می‌تواند سبب بهبود وضعیت ضداکسایشی و افزایش توان عملکردی دستگاه ایمنی شود.

منابع

Aathi, K., Ramasubramanian, V., Uthayakumar, V. Munirasu, S. 2013. Effect of supplemented diet on survival, growth, hematological, biochemical and immunological responses of Indian major. Carp *Labeo rohita*. International Research Journal of Pharmacy 4: 141-147.

Ahmed, I., Reshi, Q.M., Fazio, F. 2020. The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review. Aquaculture International 28: 869-899. DOI: 10.1007/s10499-019-00501-3

Bhoopathy, S., Inbakandan, D., Rajendran, T., Chandrasekaran, K., Kasilingam, K., Gopal, D. 2021. Curcumin loaded chitosan nanoparticles fortify shrimp feed pellets with enhanced antioxidant activity. Materials Science & Engineering C 120. DOI: 10.1016/j.msec.2020.111737.

Brol, J., Müller, L., Cordeiro, E., Prates, A., Silva, B., Farias, D., Pedrosa, V., Antonio, L., Pinto, A, Roberto, T., Cadaval, S. Borges, M., Wasielesky, W., Ventura-Lima, J. 2021. Dietary chitosan supplementation in *Litopenaeus vannamei* reared in a biofloc system: Effect on antioxidant status facing saline stress, Aquaculture 454. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737034

Brichnell, I., Dalmo, R.A. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. Fish and Shellfish Immunology 19: 457-472. DOI: 10.1016/j.fsi.2005.03.008.

Bai, S.C. 2001. Requirements of L-ascorbic acid in a viviparous marine teleost, Korean rockfish, *Sebaster schlegeli* (*Hilgendorf*). In: Ascorbic Acid in Aquatic Organisms; Dabrowski K. (Ed.); CRC press; 69-85.

Chang, S.H., Wu, C.H., Tsai, G.J. 2018. Effects of chitosan molecular weight on its antioxidant and antimutagenic properties. Carbohydrate Polymers 181: 1026-1032. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.11.047.

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

110-118. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2008.01.025.

Cheba, B.A. 2011. Chitin and chitosan: Marine biopolymers with unique properties and versatile applications. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry 6: 149-153.

Chang, Y.P., Liu, C.H., Wu, C.C., Chiang, C. M., Lian, J.L., Hsieh, S.L. 2012. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to Vibrio alginolyticus in Pacific white shrimps (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. Fish and Shellfish Immunology 32: 284-290. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.11.017

Chena, J., Chen, L. 2019. Effects of chitosan-supplemented diets on the growth performance, nonspecific immunity and health of loach fish (*Misgurnus anguillicadatus*). Carbohydrate Polymers 255. DOI: 10.1016/j.carbpol.2019.115227.

Clerton, P., Troutaud, D., Verlhac, V., Gabaudan, J., Deschaux, P. 2001. Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte functions: effect on gut and on head kidney leucocytes. Fish and Shellfish Immunology 11: 1-13. DOI: 10.1006/fsim.2000.0287.

Demers, N.E., Bayne, C.J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Developmental and Comparative Immunology 21: 363-373. DOI: 10.1016/S0145-305X(97)00009-8.

Du, Y., Hu, X., Miao, L., Chen, J. 2022. Current status and development prospects of aquatic vaccines. Frontiers in Immunology 13: 1-21. DOI: 10.3389/fimmu.2022.1040336

FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture. DOI: 10.4060/ca9229en.

El-Naggar, M., Medhat, F., Taha, A. 2022. Applications of chitosan and chitosan nanoparticles in fish aquaculture. Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries 26: 23-43. DOI: 10.21608/ejabf.2022.213365.

Esmaeili Rad, A., Alishahi, M., Ghorbanpour M.M., Zarei, M. 2014. The effects of oral administration of extracted chitosan from white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) on hematological and growth indices in common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Veterinary Research 69: 385-393. DOI: 10.22059/jvr.2014.52281.

Feng, T.Y., Du, J., Li, J. Hu, Y., Kennedy, J.F. 2008. Enhancement of antioxidant activity by irradiation. Carbohydrate Polymers 73: 126-132. DOI: 10.1016/j.carbpol.2007.11.003.

Geng, X., X. Dong, B., Tan, Q., Yang, S., Chi, Liu, H., Liu, X. 2011. Effects of dietary chitosan and bacillus subtilis on the growth performance nonspecific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. Fish and Shellfish Immunology 31: 400-406. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.06.006.

Goldenfarb, P.B., Bowyer, F.P., Hall, T., Brosious, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory the microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology 56: 35-39. DOI: 10.1093/ajcp/56.1.35.

Gopalakannan, A., Arul, V. 2006. Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds. Aquaculture 255: 179-187. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.01.012.

Hai, N. V., Fotedar, R. 2009. Comparison of the effects of the prebiotics and the customized probiotics (*Pseudomonas synxantha* and *P. aeruginosa*) on the culture of juvenile western king prawns (*Penaeus latisulcatus* Kishinouye).

Aquaculture 289: 310-316. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2009.02.001.

Heba, M., Abdel-Ghany and Mohamed El-S. Salem, 2018. Effects of dietary chitosan supplementation on farmed fish; a review. Reviews in Aquaculture 12: 438-452. DOI: https://doi.org/10.1111/raq.12326.

Huang, Q.C., Zhang, S., Du, T., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., Yang, Y.Z., Dong, X.H., Tan, B.P. 2020. Effects of dietary vitamin E on growth, immunity and oxidation resistance related to the Nrf2/Keap1 signaling pathway in juvenile *Sillago sihama*. Animal Feed Science and Technology 262: 114403. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2020.114403.

Harikrishnan, R., Kim, J., Balasundaram, C., Heo, M. 2012. Immunomodulatory effects of chitin and chitosan enriched diets in *Epinephelus bruneus* against *Vibrio alginolyticus* infection. Aquaculture 326: 46-52. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.034.

Jiang, G., Yua, R., Zhoua, M. 2004. Modulatory effects of ammonia-N on the immune system of Penaeus japonicus to virulence of white spot syndrome virus. Aquaculture 241: 61-75. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.08.020.

Kakuta, I., Kurokura, H. 1995. Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritan*s inflection of red seabream. Journal of Fish Pathology 30: 289-290.

Kono, M., Matsui, T., Shimizu, C. 1987. Effects of chitin, chitosan and cellulose as diet supplements on the growth of cultured fish. Nippon Suisan Gakkaishi 53: 125-129. DOI: 10.2331/suisan.53.125.

Li, T., Na, R., Yu, P., Shi, B.L., Yan, S.M., Zhao, Y.G., Xu, Y.Q. 2015. Effects of dietary supplementation of chitosan on immune and antioxidative function in beef cattle. Czech Journal of Animal Science 60: 38-44. DOI: 10.17221/7910-CJAS.

Lin, S., Pan, Y., Luo, L. Luo, L. 2011. Effects of dietary b-1, 3-glucan, chitosan or raffinise on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). Fish and shellfish Immunology 31: 788-794. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.07.013.

Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L, Luo, L., Pan, Y. 2012. Effects of dietary chitosan oligosaccharidesand *Bacillus ciagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). Aquaculture 342: 36-41. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.02.009.

Lobato, R.O., Nunes, S.M., Wasielesky, W., Fattorini, D., Regoli, F., Monserrat, J.M., Ventura-Lima, J. 2013. The role of lipoic acid in the protection against of metallic pollutant effects in the shrimp *Litopenaeus vannamei* (*Crustacea, Decapoda*). Comparative Biochemistry and Physiology 165A: 491-497. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.03.015.

Manni, L., Ghorbel-Bellaaj, O., Jellouli, K., Younes, I., Nasri, M. 2010. Extraction and characterization of chitin, chitosan, and protein hydrolysates prepared from shrimp waste by treatment with crude protease from bacillus cereus SV1. Applied Biochemistry and Biotechnology 162: 345-357. DOI: 10.1007/s12010-009-8846-y.

Maqsood, S., Singh, P., Samoon, M.H. Balange, A.K. 2010. Effects of dietary chitosan on nonspecific immune response and growth of *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. International Aquatic Research 2: 77-85.

Misra, C.K., Kumar, D.B., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P. 2006. Effect of long-term administration of dietary â-glucan on immunity, growth and survival of, *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture 255: 82-94. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.12.009.

Niu, J., Lin, H.Z., Jiang, S.G., Chen, X., Wu, K.C., Liu, Y.J. Wang, S., Tian, L. 2013.

Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of *Penaeus monodon*. Aquaculture 372-375: 1-8. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.10.021.

Niu, J., Liu, Y.J., Lin, H.Z., Mai, K.S., Yang, H.J., Liang, G.Y. 2011. Effect of dietary chitosan on growth and stress tolerance of postlarval (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Nutrition 17: 406-412. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2010.00775.x.

Niroomand, M., Sajadi, M., Yahyavi, M., Asadi, M. 2011. Effects of dietary Betaine on growth, survival, body composition and resistance of fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under environmental stress. Iranian Scientific Fisheries Journal 20: 135-146. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.109982 (In Persian).

No, H., Park, N.Y., Lee, S.H., Meyers S.P. 2002. Antibacterial activity of chitosan and chitosan oligomers with different molecular weights. International Journal of Food Microbiology 74: 65-72. DOI: 10.1016/s0168-1605(01)00717-6.

Oujifard, A., Abedian, A., Hosseini, A and Yeganeh, V. 2010. Effect of dietary inulin on the growth performance, muscle chemical composition and some hemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone, 1931). Journal of New Technologies in Aquaculture Development 4: 26-38 (In Persian).

Parashideh, N., Alizadeh Doughikollaee, E., Mohhamadi, M. 2015. Effect of icing time on the quality of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Food Science and Technology 12: 1-12 (In Persian).

Qin, C., Du, Y., Xiao, L., Li, Z., Gao, X. 2002. Enzymic preparation of water-soluble chitosan and their antitumor activity. International Journal of Biological Macromolecules 31: 111-117. DOI: 10.1016/s0141-8130(02)00064-8.

Rajauria, G. 2015. Seaweeds: a sustainable feed source for livestock and aquaculture. In: Tiwari, B., Troy, D. (Eds.), Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications., seaweed sustainability. Elsevier. 389-420. DOI: 10.1016/B978-0-12-418697-2.00015-5.

Rezaei Koochacksaraei, R., Dastar, B., Samadi, F., Ebrahimi, P. 2020. Investigating of antioxidant protective effects of shrimp shells extracted chitosan in broiler chickens. Poultry Science Journal 8: 77-81. DOI: 10.22069/psj.2020.17409.1530.

Ruiz-Salmon, I., Margallo, M., Laso, J., Villanueva-Rey, P., Marino, D., Quinteiro, P., Dias, A.C., Nunes, M.L., Marques, A., Feijoo, G., Moreira, M.T., Loubet, P., Sonnemann, G., Morse, A., Cooney, R., Clifford, E., Rowan, N., M´endez-Paz, D., Iglesias-Parga, X., Anglada, C., Martin, J.C., Irabien, A., Aldaco, R. 2020. Addressing challenges and opportunities of the European seafood sector under a circular economy framework. Current Opinion in Environmental Science & Health 13: 101-106. DOI: 10.1016/j.coesh.2020.01.004.

Sakai, M. 1998. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172: 63-92. DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00436-0.

Sharma, S. 2017. Enhanced antibacterial efficacy of silver nanoparticles immobilized in a chitosan nanocarrier. International Journal of Biological Macromolecules 104: 1740-1745. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.043.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. 1993. Nonspecific defense mechanisms assay in fish: II. Potential killing activity of neutrophils and macrophages, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin level in serum. Fish

Disease Diagnosis and Prevention Methods. Wydawnictwo Instytutu Rybactwa Strodladowego, Olsztyn, Poland. 10: 105-111.

Sukhoverkhov, F.M. 2006. The effects of cobalt, vitamin, tissue preparations and antibiotics on carp production. Available online at: http://www.fao.com.

Subhapradha, N., Saravanan, R., Ramasamy, P., Srinivasan, A., Shanmugam, V., Shanmugam, A. 2014. Hepatoprotective effect of β-Chitosan from Gladius of *Sepioteuthis lessoniana* against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in Wistar rats. Applied Biochemistry and Biotechnology 172: 9-20. DOI: 10.1007/s12010-013-0499-1.

Tafi, A.A., Meshkini, S., Tokmechi, A. 2014. Study of effects of chitosan on some immune responses of rainbow trout and enhance resistance against *Aeromonas hydrophila* challenge. Journal of Animal Research 26: 468-477.

Venkat, H.K., Narottam, P.S., Kamal, K.J. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus* based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Aquaculture Research 35: 501-507. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2004.01045.x.

Vijayabaskar, P., Vaseela, N., Thirumaran, G. 2012. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. Chinese Journal of Natural Medicines 10: 0421-0428. DOI: 10.1016/S1875-5364(12)60082-X.

Wang, Z.H., Yan, Y., Zhang, Z.H., Li, C.H., Mei, L., Hou, R., Liu, X., Jiang, H. 2024. Effect of chitosan and its water-soluble derivatives on antioxidant activity. Polymers 16, 867. DOI: 10.3390/polym16070867.

Xing, R., Yu, H., Liu, S., Zhang, W., Zhang, Q., Li, Z., Li, P. 2005. Antioxidative activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. Bioorganic and Medicinal Chemistry 13: 1387-1392. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.11.002.

Xie, W., Xu, P., Liu, Q. 2001. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. Bioorganic and Medical Chemistry Letters 11: 1699-1701. DOI: 10.1016/s0960-894x(01)00285-2.

Zhang, W., Zhang, J., Jiang, Q., Xia, W. 2012. A comparative study on hypolipidemic activities of high and low molecular weight chitosan in rats. International Journal of Biological Macromolecules 51: 504-508. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.06.018.