15(3) 169-174, Autumn 2023

Journal of Animal Environment

(AEJ)

Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The inhibitory effect of methanolic, acetone, and aqueous extracts of razor clam (*Solen vagina*) on the growth of *Vibrio harveyi* bacteria in post-larvae of Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Shahrzad Foroutan[1], Amir Houshang Bahri[*2], Babak Ghaednia[3], Flora Mohammadizadeh[2], Maryam Mirbakhsh[3]

[1]Department of Fisheries, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran

[2]Department of Fisheries, Marine and Fisheries Technologies Research Center, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran

[3]Iranian Fisheries Science Research Institute, Agriculture Research Education and Organization, Tehran, Iran

Key Words

Razor clam
Extracts
Vibrios
Vannamei shrimp
Acetone extract

Abstract

Introduction: This study was aimed to compare the halo diameter (mm) caused by the lack of bacteria growth (*Vibrio harvey*) in the post-larvae of Vannamei shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under the influence of methanolic, acetone, and aqueous extracts (ppm) of razor clam (*Solen vagina*).

Materials & Methods: Based on the obtained results, the methanolic extract stopped the growth of *Vibrio harvey* bacteria at 450 ppm.

Results: Although the use of this extract stopped the growth of bacteria at a concentration of 450 ppm, the diameter of the created halo was smaller compared to the halo of non-growth caused by antibiotics. Acetone extract prevented the growth of *Vibrio harvey* bacteria at 250 ppm and higher concentrations and created a lack of growth halo with a diameter of 2.8 cm. Also, the aqueous extract did not have any inhibitory effect. The results of the mean comparison test showed that there was a significant difference between different concentrations of methanolic and acetone extracts ($P<0.05$). Also, significant differences were observed between the same effective concentrations of different treatments (250, 300, 350, 400 and 450 ppm) ($P<0.05$).

Conclusion: Methanolic and acetone extracts of *S. vagina* can be used as a bioactive substance to prevent vibriosis in *Litopenaeus vannamei*. However, more studies are suggested to investigate other extracts of this species and their effects.

* Corresponding Author's email: amirbahri52@yahoo.com

Received: 8 August 2022; Reviewed: 10 September 2022; Revised: 12 November 2022; Accepted: 13 December 2022

(DOI): 10.22034/AEJ.2022.374111.2908

مقاله پژوهشی

بررسی اثر بازدارنده عصاره‌های متانولی، استونی و آبی استخراج شده از صدف ملوک (*Solen vagina*) بر رشد باکتری ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*) در پست لاروهای میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

شهرزاد فروتن[۱]، امیرهوشنگ بحری*[۲]، بابک قائدنیا[۳]، فلورا محمدی‌زاده[۲]، مریم میربخش[۳]

[۱] گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران

[۲] گروه شیلات، مرکز تحقیقات فناوری‌های دریایی و شیلاتی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران

[۳] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

کلمات کلیدی

صدف ملوک
استخراج عصاره
ویبریوز
میگوی وانامی
عصاره استونی

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه مقایسه قطر هاله (میلی‌متر) ایجاد شده ناشی از عدم رشد باکتری ویبریو هاروی در پست لاروهای میگو وانامی (*Litopenaeus vannamei*) تحت تاثیر عصاره‌های متانولی، استونی و آبی (میلی‌گرم بر لیتر) استخراج شده از صدف ملوک (*S. vagina*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها: عصاره‌های متانولی، استونی و آبی با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ ppm برای ارزیابی MIC استفاده شدند.

نتایج: براساس نتایج به‌دست آمده، عصاره متانولی استخراج شده از صدف ملوک رشد باکتری ویبریو هاروی را در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر متوقف نمود. اگرچه استفاده از این عصاره سبب توقف رشد باکتری در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر شد، اما قطر هاله ایجاد شده در مقایسه با هاله عدم رشد ناشی از آنتی‌بیوتیک کم‌تر بود. عصاره استونی صدف از رشد باکتری ویبریو هاروی درغلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت‌های بالاتر جلوگیری نمود و در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بیش‌ترین اثر بر توقف رشد باکتری را داشت و هاله عدم رشدی به قطر ۴/۲ میلی‌متر ایجاد نمود. هم‌چنین عصاره آبی فاقد هر گونه اثر بازدارنده‌ای بود. نتایج مربوط به آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و استونی استخراج شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0/05$). هم‌چنین بین غلظت‌های موثر مشابه تیمارهای مختلف (۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) اختلافات معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری: عصاره‌های متانولی و استونی *S. vagina* را می‌توان به‌عنوان یک ماده زیستی فعال برای جلوگیری از بیماری ویبریوز در *Litopenaeus vannamei* استفاده نمودولی‌عصاره استونی بیش‌ترین اثر راداشت. با این‌حال، مطالعات بیش‌تری برای‌بررسی سایرعصاره‌های قابل استخراج از این گونه و اثرات آن‌ها پیشنهاد می‌گردد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: amirbahri52@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۷ مرداد ۱۴۰۱؛ تاریخ داوری: ۱۹ شهریور ۱۴۰۱؛ تاریخ اصلاح: ۲۱ آبان ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: ۲۲ آذر ۱۴۰۱
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.374111.2908

مقدمه

تولید جهانی آبزی‌پروری از دهه ۱۹۵۰ رشد سریع و قابل توجهی داشته است (۱، ۲). *Litopenaeus vannamei* به‌دلیل سرعت رشد و مقاومت در برابر برخی بیماری‌های خاص، به‌طور گسترده پرورش داده می‌شود (۳). عفونت‌های باکتریایی عوامل محدودکننده اصلی در پرورش میگو محسوب می‌شوند که منجر به ضرر اقتصادی گسترده‌ای به مزرعه‌داران می‌گردند (۱). بیماری‌های آبزیان و مشکلات بهداشتی آن‌ها به‌ویژه در صنعت پرورش میگو از چالش‌های اصلی در تولید محصولات آبزی‌پروری است. ویبریوز بیماری باکتریایی عمده در پرورش میگو است (۴). *Vibrio harveyi* پاتوژن اصلی جنس *Vibrio* است که در شرایط مساعد (شرایط استرس‌زا در میگو) می‌تواند بر میگوهای خانواده پناییده تأثیرگذار باشد (۱). بیماری‌زایی *V. harveyi* به سویه باکتریایی بستگی دارد و نشان‌دهنده یک تعامل هم‌افزایی بین عوامل فردی و مرتبط از قبیل آبگریزی، تشکیل بیوفیلم، بقا در مخاط پوست ماهی، سرم، پروتئولیتیک، همولیتیک و سمیت سلولی ECPs است (۵). تراکم باکتری تحت تأثیر مواد مغذی، دما، مقاومت اسمزی، pH و غلظت اکسیژن است که در شرایط بهینه باعث حداکثر رشد گونه‌ها و سویه‌ها می‌شود (۶). باکتری‌ها به‌عنوان یک پاتوژن فرصت طلب می‌توانند به‌دلیل تغییرات ناگهانی دما و شوری منجر به مرگ گونه‌های آبزی شوند (۷، ۸). در طی دو دهه گذشته تلفات انبوه میگو در هچری‌ها و استخرها گزارش شده است (۱، ۲، ۳، ۴). بسیاری از متابولیت‌ها به‌دلیل ساختارهای غیرمعمول و فعالیت‌های زیستی از حیوانات دریایی جداسازی شده‌اند. برخی از این متابولیت‌های زیستی فعال دارای پتانسیل پزشکی زیستی هستند. متابولیت‌های فعال زیستی عمدتاً از اسفنج‌های دریایی، شقایق‌های دریایی، مرجان‌ها، خزه‌ها، نرم‌تنان، خارپوستان، تونیکاتا و سخت‌پوستان جداسازی شده‌اند (۵). کربوهیدرات‌ها و اسیدهای آلی در تمام گیاهان، حیوانات، باکتری‌ها، قارچ‌ها و مخمرها یافت می‌شوند و نقش این ترکیبات در فرآیندهای متابولیک ضروری است (۶). نرم‌تنان به‌طور گسترده در سراسر جهان پراکنده شده‌اند و گونه‌های زیادی در اکوسیستم‌های دریایی و مصب رودخانه‌ها زندگی می‌کنند. در میان بی‌مهرگان دریایی، نرم‌تنان بهترین منبع متابولیت‌های زیستی فعال هستند. ترکیبات زیستی فعال استخراج شده از بسیاری از طبقات نرم‌تنان دارای خواص ضدباکتریایی هستند (۷، ۸). تاکنون، مطالعات متعددی در مورد تأثیر مواد زیستی استخراج شده بر روی ماهی و میگو انجام شده است (۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵). هدف از این مطالعه مقایسه قطرهاله (میلی‌متر) ایجاد شده ناشی از عدم رشد باکتری ویبریو هاروی در پست لاروهای میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) تحت تاثیر عصاره‌های متانولی، استونی و آبی (میلی‌گرم بر لیتر) استخراج شده از صدف ملوک (*S. vagina*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و تهیه عصاره: نمونه‌ای صدف ملوک (*Solen vagina*) از سواحل دلوار واقع در شهرستان تنگستان (استان بوشهر) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها برای حذف زباله‌ها با آب دریا استریل شده شستشو داده شدند. سپس پوسته‌ها شکسته و بدنه‌های نرم خارج شدند. در ادامه نمونه‌ها به قطعات کوچک بریده شدند و به مدت ۷۲ ساعت در هوا خشک (Drying) شدند تا محتوای آب جدا شود(۲۲). نمونه‌های استخراج‌شده حاوی ۱۰ گرم بافت و ۵ میلی‌لیتر استون، متانول و آب بود که سپس همگن شد. بافت‌ها به‌مدت ۳ دقیقه تحت فراصوت (Sonication) قرار گرفتند تا به سرعت بافت‌ها تجزیه شوند و برهمکنش‌های مولکولی افزایش یابد. محتویات سلولی با تجزیه غشای سلولی آزاد شد. نمونه‌ها به‌مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (۱۶). عصاره‌های متانولی (Extraction)، استونی و آبی به‌دست‌آمده با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بر روی مولر- هینتون براث با NaCl ۲ درصد برای ارزیابی MIC (Minimum inhibitory concentration) استفاده شد.

MIC و MBC: روش حداقل غلظت مهاری روشی است که برای تعیین کم‌ترین غلظت عصاره‌های متانولی، استونی و آبی *S. vagina* برای مهار رشد باکتری استفاده می‌شود. هشت غلظت عصاره‌های متانولی، استونی و آبی *S. vagina* (۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور جداگانه در لوله‌های آزمایش به محیط رشد (Muller Hinton Broth) اضافه شد. هر لوله حاوی ۹ میلی‌لیتر محیط کشت و ۱ میلی‌لیتر از هر سه عصاره استخراج شده از *S. vagina* بود. از هر غلظت ۱۰ رقت وجود داشت. این لوله‌ها با *V. harveyi* (۱×۱۰^{۶} کلنی در میلی‌لیتر در هر لوله) تلقیح شدند. به لوله‌ها اجازه داده شد تا در طول یک شب انکوبه شوند. از تست MBC (Minimum bacterial concentration) برای تعیین فعالیت غلظت عصاره‌های متانولی، استونی و آبی *S. vagina* بر روی *V. harveyi* استفاده شد. برای آزمایش MBC از روش پلیت آگار (TSA و TCBS) استفاده شد. غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (نشان‌دهنده MIC) و حداقل دو محلول غلیظ دیگر (۴۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) برای تعیین تعداد کلنی در میلی‌لیتر قابل دوام شمارش شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (۳۶-۲۴ ساعت)

انکوبه شدند. مقدار MBC با مشاهده اولین ناحیه شفاف روی صفحه آگار (که رشد باکتری قابل مشاهده‌ای ندارد) تعیین شد (۱۷).

سنجش آنتی‌باکتریال: در این مطالعه ۷ تیمار و هر کدام با سه تکرار در نظر گرفته شد. ابعاد آکواریوم‌های مورد استفاده ۳۰×۳۰×۵۰ سانتی‌متر بود. تنها متغیر غلظت عصاره صدف بود. در این فرآیند، غلظت عصاره‌های متانولی، استونی و آبی *S. vagina* متفاوت بود. هر آکواریوم حاوی ۶ لیتر آب دریا بود که توسط فیلتر شنی تصفیه می‌شد. در مجموع ۵۰۰۰ پست لارو *L. vannamei* در آکواریوم پرورش داده شد. پس از ۲۴ ساعت، عصاره‌های متانولی، استونی و آبی *S. vagina* با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میلی‌رم بر لیتر به هر تیمار اضافه شدند. تغذیه دو بار در روز انجام شد و آکواریوم‌ها روزانه (بعدازظهر) در طول دوره آزمایش سیفون می‌شدند. ۲۴ ساعت پس از افزودن عصاره، ۱۰ میلی‌لیتر تلقیح باکتری با کدورت ۵ مک فارلند به هر آکواریوم اضافه شد. پست لاروهای مرده با علائم بیماری جمع‌آوری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

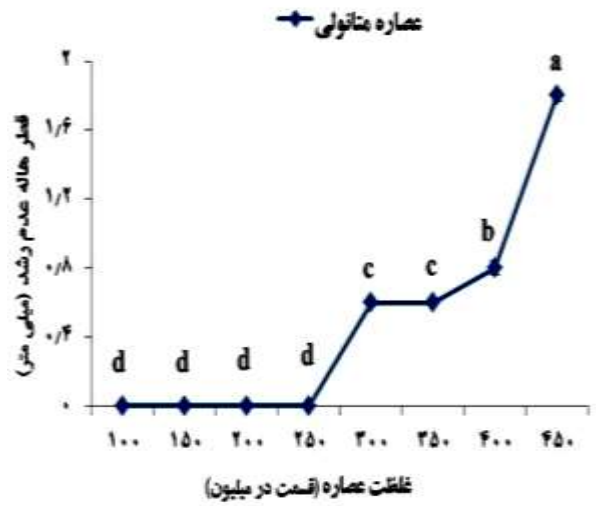
نتایج

نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی بر روی صدف ملوک نشان داد که عصاره استخراجی متانول از این صدف در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد باکتری ویبریو هاروی را متوقف نمود.

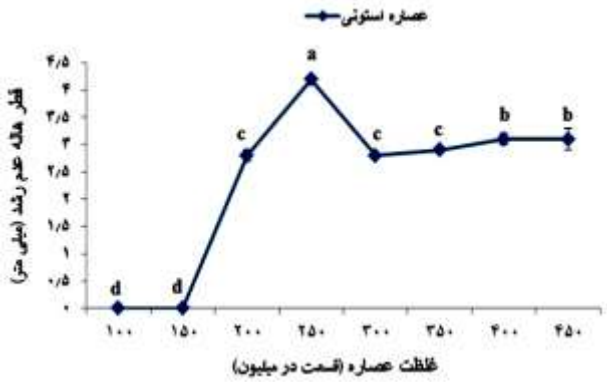
جدول ۱: مقایسه قطر هاله (میلی‌متر) ناشی از عدم رشد باکتری ویبریو هاروی در پست لاروهای میگو وانامی تحت تاثیر عصاره‌های متانولی، استونی و آبی (میلی‌گرم بر لیتر) استخراج شده از صدف ملوک (*S. vagina*)

تیمار	عصاره متانولی	عصاره استونی	عصاره آبی
۱۰۰	۰±۰ ^{Ad}	۰±۰ ^{Ad}	۰±۰ ^{Aa}
۱۵۰	۰±۰ ^{Ad}	۰±۰ ^{Ad}	۰±۰ ^{Aa}
۲۰۰	۰±۰ ^{Ad}	۲/۸±۰/۱ ^{Ac}	۰±۰ ^{Aa}
۲۵۰	۰±۰ ^{Bd}	۴/۲±۰/۰۵ ^{Aa}	۰±۰ ^{Ba}
۳۰۰	۰/۶±۰/۰۲ ^{Bc}	۲/۸±۰/۰۳ ^{Ac}	۰±۰ ^{Ca}
۳۵۰	۰/۶±۰/۰۱ ^{Bc}	۲/۹±۰/۰۵ ^{Ac}	۰±۰ ^{Ca}
۴۰۰	۰/۸±۰/۰۴ ^{Bb}	۳/۱±۰/۱ ^{Ab}	۰±۰ ^{Ca}
۴۵۰	۱/۸±۰/۰۳ ^{Ba}	۳/۱±۰/۲ ^{Ab}	۰±۰ ^{Ca}

حروف کوچک در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای با غلظت‌های مختلف عصاره استخراج شده از صدف ملوک می‌باشد؛ حروف بزرگ در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای با غلظت‌های یکسان در عصاره‌های استخراج شده از صدف ملوک می‌باشد.



شکل ۱: مقایسه قطر هاله (میلی‌متر) ناشی از عدم رشد باکتری ویبریو هاروی در پست لاروهای میگوی وانامی تحت تاثیر عصاره‌های متانولی (قسمت در میلیون) استخراج شده از صدف ملوک (*S. vagina*)



شکل ۲: مقایسه قطر هاله (میلی‌متر) ناشی از عدم رشد باکتری ویبریو هاروی در پست لاروهای میگوی وانامی تحت تاثیر عصاره‌های استونی (قسمت در میلیون) استخراج شده از صدف ملوک (S. vagina)

قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در چاهک با عصاره متانولی در مقایسه با قطر هاله عدم رشد نمونه‌های تست آنتی‌بیوگرام نشان داد که استفاده از این عصاره هر چند در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب توقف رشد باکتری شده است، اما قطر هاله ایجاد شده در مقایسه با هاله عدم رشد ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها ازجمله تتراسایکلین کم‌تر است. عصاره استونی صدف در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت‌های بالاتر از رشد باکتری ویبریو هاروی جلوگیری نمود و هاله عدم رشدی به قطر ۴/۲ میلی‌متر ایجاد نمود. میزان MIC به‌دست آمده به‌روش رقیق‌سازی برای عصاره استونی صدف ملوک برابر ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و میزان MBC به‌دست آمده برابر ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. هم‌چنین عصاره آبی استخراج شده از این صدف در هیچ‌یک

از غلظت‌های مورد آزمایش نتوانست رشد باکتری ویبریو هاروی را متوقف نماید. نتایج مربوط به آزمون مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بین غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی و استونی استخراج شده اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). هم‌چنین بین غلظت‌های موثر مشابه تیمارهای مختلف (۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) اختلافات معنی‌داری مشاهده شد (P<۰/۰۵). عصاره آبی صدف در هیچ‌یک از غلظت‌های مورد بررسی نتوانست رشد باکتری ویبریو هاروی را متوقف کند و هاله عدم رشد ایجاد کند (جدول ۱؛ اشکال ۱ و ۲).

بحث

نرم‌تنان به‌عنوان ارگانیسم تغذیه کننده صافی‌خوار در معرض غلظت‌های مختلف پاتوژن‌هایی مانند باکتری‌ها هستند. مواد ضدمیکروبی مختلفی در نرم‌تنان شناسایی، توصیف و مشخص شده است (۹، ۱۸، ۱۹، ۲۰). سالانه بیش از صد ترکیب ضدمیکروبی جدید از بی‌مهرگان دریایی شبیه به دوکفه‌ای جدا می‌شود که طیف وسیعی از خواص ضدمیکروبی را از خود نشان می‌دهند (۲۱). براساس نتایج این مطالعه، عصاره متانولی استخراج‌شده از صدف ملوک در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد باکتری ویبریو هاروی را متوقف نمود. استفاده از این عصاره هر چند در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سبب توقف رشد باکتری شده است، اما قطر هاله ایجاد شده در مقایسه با هاله عدم رشد ناشی از آنتی‌بیوتیک کم‌تر بود. هم‌چنین عصاره استونی صدف در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت‌های بالاتر از رشد باکتری ویبریو هاروی جلوگیری نمود و هاله عدم رشدی به قطر ۴/۲ میلی‌متر ایجاد نمود. Chellaram و همکاران، فعالیت ضدباکتریایی صدف *Pteria chinensis* را علیه ۱۰ پاتوژن ماهی بررسی نمودند که عصاره استونی فعال‌ترین مهارکننده آن بود (۲۲). Wouter و همکاران، اثر عصاره صدف را بر تولیدزرده میگوی Kuruma (*M. japonicus*) مورد بررسی قرار داد و گزارش داد که این عصاره منبع غنی از کلسترول و استروئیدهای جنسی است که بر روند ویتولوژنز تأثیر می‌گذارد (۲۳). Payam و همکاران، اثرات ضدباکتریایی عصاره‌های استخراج‌شده توسط حلال‌های متانول و ان-هگزان از بافت عضله و گناد خیار دریایی (*Holothuria leucospilota*) را بر علیه باکتری‌های *Lactococcus garvieae* و *Aeromonas hydrophila* بررسی نمودند (۲۴). نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که عصاره ان-هگزانی استخراج‌شده از گناد و عضله خیار دریایی تأثیری بر ممانعت رشد و کشندگی بر روی باکتری‌های ذکر شده ندارد. درحالی‌که، عصاره متانولی استخراج‌شده از گناد و عضله خیار دریایی دارای اثر ممانعت‌کنندگی و کشندگی در دو باکتری لاکتوکوکوس گارویه و آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد. Azizi و همکاران طی یک بررسی ثابت کردند عصاره استخراج شده از جلبک سبز *Ulva fasciata* دارای اثر کشندگی بر روی باکتری *B. subtilis* است (۲۵). Huang و همکاران، گزارش دادند که استفاده از عصاره اتانولی جلبک سارگاسوم در سطوح بهینه ۰/۵ و ۱ ٪ به‌مدت ۱۴ روز به‌طور موثری مقاومت میگو *Fenneropenaeus chinensis* را در برابر ویبریوز بهبود بخشید و فعالیت ایمنی را افزایش داد (۹). Hoa و همکاران، اثر مثبت صدف را بر تغذیه مولدین Penaeus monodon گزارش کردند (۱۳). بنابراین، تکنیک‌های غنی‌سازی و استفاده از عصاره‌های گیاهی و حیوانات دریایی می‌توانند به‌عنوان منابع غذایی برای افزایش مقاومت به بیماری، افزایش میزان بقا و تولید میگو در سیستم‌های آبزی پروری مورد استفاده قرار گیرد. Huynh و همکاران، پاسخ ایمنی *Litopenaeus vannamei* و مقاومت آن به *Vibrio alginolyticus* و سندرم لکه سفید (WSSV) را در نتیجه عصاره جلبک *Sargassum hemiphyllum* بررسی نمودند. میگوهای غوطه‌ور در تیمار حاوی عصاره با غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر ایمنی و مقاومت بیش‌تری در برابر عفونت *V. alginolyticus* داشتند (۱۱). Kanjana و همکاران گزارش دادند که عصاره جلبک *Gracilaria fisheri* می‌تواند برای پیشگیری و درمان *Vibrio harveyi* در میگوهای جوان *P. monodon* استفاده شود (۲۶). هم‌چنین استفاده از عصاره اتانولی آن باعث افزایش قابل توجه تعداد کل هموسیت‌ها و گرانولوسیت‌ها نسبت به میگوی شاهد شده است. براساس مطالعه Sirirustananun و همکاران، میزان بقای میگو (*Litopenaeus vannamei*) تغذیه شده با غذای حاوی عصاره جلبک (*Gracilaria tenuistipitata*) به‌طور قابل توجهی بیش‌تر از میگوهای تغذیه شده با رژیم غذایی کنترل در برابر *V. alginolyticus* و WSSV بود. بنابراین، محققان گزارش دادند که رژیم غذایی حاوی عصاره جلبک (*Gracilaria tenuistipitata*) به‌میزان ۰/۱ گرم در کیلوگرم می‌تواند ایمنی ذاتی میگو را در عرض ۱۴ روز افزایش دهد (۲۷). Manilal و همکاران، گزارش داد که استفاده از عصاره جلبک قرمز *Asparagopsis* در رژیم غذایی باعث افزایش بقا در میگوی جوان آلوده به ویبریوزیس شد (۱۰). Kiran و همکاران، اثر ضدباکتریایی عصاره‌های آب و متانولی گیاه *Perna viridis* و *Nerita albicilla* را بررسی نمودند و گزارش نمودند که عصاره‌های متانولی اثرات ضد باکتریایی بهتری نسبت به عصاره‌های آبی دارند (۸). *P. aeroginosa* به‌شدت توسط عصاره متانولی *Perna viridis* و *Nerita albicilla* (۸۰٪ فعالیت باکتری‌کشی) مهار می‌شود. Haung و همکاران، گزارش نمودند که عصاره استونی استخراج شده از *Lamellidens marginalis* بر ۹ گونه از پاتوژن‌ها مانند *Vibrio anguillarum* و *E. coli* موثر است (۹). Eswar و همکاران، فعالیت ضدباکتریایی عصاره خام دوکفه‌ای‌های

دریایی از جمله *Anadara granosa*، *Placenta pelacenta* و *Pinctada fucata* را ارزیابی کردند. فعالیت ضدباکتریایی بر علیه ۱۰ پاتوژن مانند *Vibrio parahaemolyticus* و *Vibrio cholera* انجام شد. نتایج نشان داد که از عصاره نرم‌تنان می‌توان به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی استفاده کرد (۱۲). Eidi Ghaleh Ghazi و همکاران، اثر تغذیه‌ای عصاره آب گرم جلبک قهوه‌ای *Sargassum ilicifolium* بر برخی از شاخص‌های ایمنی همولنف در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) را بر افزایش پارامترهای آنتی‌اکسیدانی گزارش نمودند (۲۸). هیچ تغییر معنی‌داری در سطوح اسیدفسفاتاز و فنل‌اکسیداز همولنف در میگوهای تغذیه شده با عصاره جلبک داغ مشاهده نشد، اما سطح لیزوزیم و آلکالین فسفاتاز تغییر کرد. Karnjana و همکاران، استفاده از غلظت‌های پایین عصاره اتانولی *Gracilaria fisheri* را در درمان *Vibrio parahaemolyticus* و *V. harveyi* در میگو پیشنهاد کردند (۲۶). Esquer-Miranda و همکاران، گزارش دادند که استفاده از عصاره متانولی *Caulerpa sertularioides* و *Ulva lactuca* می‌تواند برای جلوگیری از *Vibrio parahaemolyticus* و Vibrio alginolyticus در میگو استفاده شود. Huang و همکاران، با بررسی اثرات عصاره *Phyllanthus amarus* (PAE) بر ایمنی، رشد و پاسخ‌های مقاومتی به *Vibrio alginolyticus* در *Litopenaeus vannamei* گزارش نمودند که میگوهای تغذیه شده با PAE نسبت به میگوهایی که با جیره شاهد تغذیه می‌شدند، نرخ بقای بالاتری داشتند (۳۰). Torpee و همکاران، گزارش دادند که استفاده از عصاره خام پروبیوتیک *Rhodobacter sphaeroides* SS15 در رژیم غذایی میگو *Vannamei* باعث افزایش میزان بقای میگوهای در معرض *V. parahaemolyticus* شده است (۱۴). بنابراین نتایج پژوهشگران مختلف تأثیر مثبت عصاره‌های گیاهی و جانوران دریایی را در کنترل ویبریوز در میگوهای مختلف نشان داده است که با نتایج این مطالعه هم‌خوانی دارد. افزایش مقاومت ضدمیکروبی در باکتری‌ها، توسعه روش‌های درمانی جدیدی را که رشد و تکثیر آن‌ها را مهار می‌کند، ضروری کرده است (۳۱). بی‌مهرگان دریایی دارای سیستم ایمنی ذاتی موثری برای دفاع در برابر حملات پاتوژن هستند. پپتیدهای ضدمیکروبی بی‌مهرگان دریایی توسعه نیافته‌اند. بنابراین، چشم‌انداز تحقیقات عمیق‌تر برای به‌دست آوردن پپتیدهای ضدمیکروبی ضروری است (۸). نتایج نشان داد که عصاره متانولی استخراج شده از صدف ملوک در غلظت ۴۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و عصاره استونی در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و غلظت‌های بالاتر، از رشد باکتری ویبریو هاروی جلوگیری می‌نمایند. عصاره استونی در غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر حداکثر فعالیت ضدباکتریایی را نشان داد. هم‌چنین عصاره آبی فاقد هر گونه اثر بازدارنده‌ای بود. بنابراین، عصاره‌های متانولی و استونی *S. vagina* را می‌توان به‌عنوان یک ماده زیستی فعال برای جلوگیری از بیماری ویبریوز در *Litopenaeus vannamei* استفاده نمود. با این حال، مطالعات بیش‌تری برای بررسی سایر عصاره‌های قابل استخراج از این گونه و اثرات آن‌ها پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. **Vandenberghe, J., Verdonck, L., Robles-Arozarena, R., Rivera, G., Bolland, A. and Balladares, M., 1999.** Vibrios associated with *Litopenaeus vannamei* larvae, postlarvae, broodstock, and hatchery probionts. Applied and Environmental Microbiology. 65(6): 2592-2597.
2. **Lavilla-Pitogo, C.R., Leaño, E.M. and Paner, M.G., 1998.** Mortalities of pond-cultured juvenile shrimp, *Penaeus monodon*, associated with dominance of luminescent vibrios in the rearing environment. Aquaculture. 164(1-4): 337-349.
3. **Chrisolite, B., Thiyagarajan, S., Alavandi, S., Abhilash, E., Kalaimani, N. and Vijayan, K., 2008.** Distribution of luminescent Vibrio harveyi and their bacteriophages in a commercial shrimp hatchery in South India. Aquaculture. 275(1-4): 13-19.
4. **Uma, A., Meena, S., Saravanabava, K. and Muralimanohar, B., 2008.** Identification of bacterial pathogens infecting Penaeus monodon, tiger shrimp by 16S rDNA amplification and sequencing.
5. **Bhakuni, D.S. and Rawat, D.S., 2006.** Bioactive marine natural products: Springer Science & Business Media;.
6. **Buchanan, J., 2004.** Missing links? Problem drug use and social exclusion. Probation Journal. 51(4): 387-397.
7. **Anand, T.P., Rajaganapathi, J. and Edward, J., 1997.** Antibacterial activity of marine molluscs from Portonovo region.
8. **Kiran, N., Siddiqui, G., Khan, A., Ibrar, K. and Tushar, P., 2014.** Extraction and screening of bioactive compounds with antimicrobial properties from selected species of mollusk and crustacean. Journal of Clinical & Cellular Immunology. 5(1): 1-5.
9. **Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø.M., Sandsdalen, E. and Styrvold, O.B., 2004.** Antibacterial activities in various tissues of the horse mussel, Modiolus modiolus. Journal of Invertebrate pathology. 85(2): 112-119.
10. **Manilal, A., Selvin, J., Sugathan, S. and Panikkar, M., 2012.** Evaluation of therapeutic efficacy of Indian green alga, *Acrosiphonia orientalis* (*J. agardh*) in the treatment of vibriosis in *Penaeus monodon*. Thalassas An International Journal of Marine Sciences. 28(1): 33-46.
11. **Huynh, T.G., Yeh, S.T., Lin, Y.C., Shyu, J.F., Chen, L.L. and Chen, J.C., 2011.** White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. chinense powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. Fish & Shellfish Immunology. 31(2): 286-293.
12. **Eswar, A., Ramamoorthy, K., Mohanraj, M., Gokulakrishnan, S. and Sankar, G., 2014.** In-vitro antibacterial activity and Brine Shrimp Lethality Test on selected three marine Mollusks from Velar Estuary, Parangipettai. International Journal of Current Research. 6: 9075-9078.
13. **Hoa, N.D., Wouters, R., Wille, M., Thanh, V., Dong, T.K. and Van Hao, N., 2009.** A fresh-food maturation diet with an adequate HUFA composition for broodstock

nutrition studies in black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798). Aquaculture. 297(1-4): 116-121.

14. **Torpee, S., Kantachote, D., Rattanachuay, P., Chiayvareesajja, S. and Tantirungkij, M., 2021.** Dietary supplementation with probiotic *Rhodobacter sphaeroides* SS15 extract to control acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* in cultivated white shrimp. Journal of Invertebrate Pathology. 186: 107585.

15. **Karnjana, K., Soowannayan, C. and Wongprasert, K., 2021.** Ethanolic extract of red seaweed Gracilaria fisheri and furanone eradicate *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* biofilms and ameliorate the bacterial infection 2019 in shrimp. Fish & Shellfish Immunology. 88: 91-101.

16. **Dhinakaran, D.I. and Lipton, A., 2012.** Antimicrobial potential of the marine sponge *Sigmadocia pumila* from the south eastern region of India. World J Fish Mar Sci. 4: 344-348.

17. **Parvekar, P., Palaskar, J., Metgud, S., Maria, R. and Dutta, S., 2020.** The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of silver nanoparticles against Staphylococcus aureus. Biomaterial investigations in dentistry. 7(1): 105-109.

18. **Dorrington, T. and Gomez-Chiarri, M., 2008.** Antimicrobial peptides for use in oyster aquaculture: effect on pathogens, commensals, and eukaryotic expression systems. Journal of Shellfish Research. 27(2): 365-373.

19. **Bulet, P., Stöcklin, R. and Menin, L., 2004.** Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. Immunological reviews. 198(1): 169-184.

20. **Hubert, F., Noël, T. and Roch, P., 1996.** A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). European Journal of Biochemistry. 240(1): 302-306.

21. **Bartlett, T.C., Cuthbertson, B.J., Shepard, E.F., Chapman, R.W., Gross, P.S. and Warr, G.W., 2002.** Crustins, homologues of an 11.5-kDa antibacterial peptide, from two species of penaeid shrimp, *Litopenaeus vannamei* and *Litopenaeus setiferus*. Marine Biotechnology. 4(3): 278-293.

22. **Chellaram, C., Gnanambal, K. and Edward, J., 2004.** Antibacterial activity of the winged oyster *Pteria chinensis* (Pterioida: Pteridae).

23. **Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J. and Sorgeloos, P., 2001.** Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development. Aquaculture. 2(1-2): 1-21.

24. **Payam, B., Soltani, M., Shamsaie Mehrgan, M., Rajabi Islami, H. and Nazemi, M., 2021.** Antibacterial activity of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) extracts on *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila*. Journal of Animal Environment. 13(3): 307-314. (In Persian)

25. **Azizi, R., Motallebi, A., Nazemi, M., Sharifruhani, M. and Afsharnasab, M., 2020.** Survey of antibacterial Properties of Extracts of Green Algae *Ulva fasciata* collected from Persian Gulf. Journal of Animal Environment. 12(3): 469-474. (In Persian)

26. **Kanjana, K., Radtanatip, T., Asuvapongpatana, S., Withyachumnarnkul, B. and Wongprasert, K., 2011.** Solvent extracts of the red seaweed Gracilaria fisheri prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Fish & shellfish immunology. 30(1): 389-396.

27. **Sirirustananun, N., Chen, J.C., Lin, Y., Yeh, S.T., Liou, C.H. and Chen, L.L., 2011.** Dietary administration of a Gracilaria tenuistipitata extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & shellfish immunology. 31(6): 848-855.

28. **Eidi Ghaleghazi, F., Noori, A. and Hosseinifar, S.H., 2021.** The effects of dietary supplementation of Sargassum ilicifolium hot-water extract on some haemolymph physiological parameters of whiteleg shrimp, *Penaeus vannamei*. Aquaculture Sciences. 9(1): 1-14.

29. **Esquer-Miranda, E., Nieves-Soto, M., Rivas-Vega, M.E., Miranda-Baeza, A. and Pi, P., 2016.** Effects of methanolic macroalgae extracts from *Caulerpa sertularioides* and *Ulva lactuca* on *Litopenaeus vannamei* survival in the presence of Vibrio bacteria. Fish & shellfish immunology. 51: 346-350.

30. **Huang, H.T., Lee, P.T., Liao, Z.H., Chen, H.Y. and Nan, F.H., 2020.** Effects of *Phyllanthus amarus* extract on nonspecific immune responses, growth, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 107: 1-8.

31. **Otero-Gonzáiez, A.J., Magalhaes, B.S., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D.A. and Dias, S.C., 2010.** Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. The FASEB journal. 24(5): 1320-1334.