14(1) 329-338, Spring 2022

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

The effect of sea cucumber chloroform extract (*Holothuria Parva*) on the prevention of bacterial disease caused by *Vibrio harveyi* and changes in safety factors and survival rate in white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Mahboubeh Hasanzade [1], Amir Hoshang Bahri [*1], Del Aram Nokhbeh Zare [1], Mohammad Afsharnasab [2], Maryam Mirbakhsh [2]

[1] Department of Fisheries, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran
[2] Iranian Fisheries Research Institute, Agricultural Research Education and Extention Organization, Tehran, Iran

Key Words
Chloroform extract
Sea cucumber
Vibrio harveyi
Safety factors
White leg Shrimp

Abstract

Introduction: This study aimed to investigate the effect of extracted chloroform from sea cucumber (*Holothuria Parva*) on the survival of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) exposed to *Vibrio harveyi* and to evaluate changes in immune factors during the experimental period.

Materials & Methods: Sea cucumber samples were collected from the tidal zone of Dayyer county in Bushehr province. Shrimps with an average weight of 10±1 g were collected from culture ponds and kept in 33 aquariums containing 100 liters of water with a salinity of 40 ppt.

Results: The results showed that the survival rate in treatments 1, 2, and 3 with consumption of the extracted chloroform was 100%. PO had a significant difference in treatments 1, 2, and 3 with negative and positive control groups. POD had a significant difference in treatments 1, 2, and 3 with the positive control group. THC was significantly different in treatments 1 and 2 with the positive control group and treatment 3 with the negative control group. TPP was significantly different in treatment 1 with positive and negative control groups, in treatment 2 with the negative control group, and treatment 3 with negative and positive control groups. SOD was significantly different in treatment 1 with positive and negative control groups, and in treatments 2 and 3 with negative control groups.

Conclusion: According to the results, the survival rate and safety factors were higher in shrimp fed with extracted chloroform compared to shrimp fed with commercial food.

* Corresponding Author's email: amirbahri52@yahoo.com
Received: 2 January 2021; Reviewed: 5 February 2021; Revised: 8 April 2021; Accepted: 11 May 2021
(DOI): 10.22034/AEJ.2021.284532.2521

مقاله پژوهشی

اثر عصاره کلروفرم خیار دریایی در پیشگیری از بیماری باکتریایی ویبریو هارویی (*Vibrio harveyi*) و تغییرات فاکتورهای ایمنی و بقا در میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*)

محبوبه حسن‌زاده[۱]، امیرهوشنگ بحری*[۱]، دلارام نخبه‌زارع[۱]، محمد افشارنسب[۲]، مریم میربخش[۲]

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

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

کلمات کلیدی

عصاره کلروفرم خیار دریائی
ویبریو هارویی
فاکتورهای ایمنی
میگوی پا سفید غربی

چکیده

مقدمه: هدف از این مطالعه بررسی چگونگی تاثیر عصاره کلروفرم استخراج شده از خیار دریائی (*Holothuria Parva*) بر روی بقای میگو وانامی (*Litopenaeus vannamei*) در معرض باکتری *Vibrio harveyi* و بررسی تغییرات فاکتورهای ایمنی در طول دوره آزمایش بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خیار دریایی از منطقه جزر و مدی شهرستان دیر در استان بوشهر جمع‌آوری شد. میگوهایی نیز با وزن متوسط ۱۰±۱ گرم از استخرهای پرورشی جمع‌آوری شده و در ۳۳ آکواریوم حاوی ۱۰۰ لیتر آب با شوری ppt ٤۰ نگه‌داری شدند.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان بقا در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ با مصرف عصاره کلروفرمی ۱۰۰ درصد بود. PO در تیمارهای۱، ۲ و ۳ دارای تفاوت معنی‌داری با گروه‌های شاهد منفی و مثبت بود. POD در تیمارهای ۱ ، ۲ و ۳ دارای تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مثبت بود. THC در تیمارهای ۱ و ۲ با گروه شاهد مثبت و در تیمار ۳ با گروه شاهد منفی دارای تفاوت معنی‌دار بود. TPP در تیمار ۱ با گروه‌های شاهد مثبت و منفی، در تیمار ۲ با گروه شاهد منفی، و در تیمار ۳ با گروه‌های شاهد منفی و مثبت دارای تفاوت معنی‌دار بود. SOD در تیمار ۱ با گروه‌های شاهد مثبت و منفی، و در تیمار ۲ و ۳ با گروه شاهد منفی دارای تفاوت معنی‌داری بود.

نتیجه‌گیری و بحث: براساس نتایج حاصل شده، میزان بقا و فاکتورهای ایمنی در میگوهای تغذیه شده با عصاره کلروفرم در مقایسه با میگوهای تغذیه شده با غذای تجاری بالاتر بود.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: amirbahri52@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳ دی ۱۳۹۹؛ تاریخ داوری: ۱۷ بهمن ۱۳۹۹؛ تاریخ اصلاح: ۱۹ فروردین ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ اردیبهشت ۱٤۰۰

(DOI): 10.22034/AEJ.2021.284532.2521

مقدمه

آبزی‌پروری ازجمله فعالیت‌های تولید غذا می‌باشد که توسعه آن مستقیماً از فشار بر ذخایر آبزیان دریایی و اقیانوسی کاسته و با توجه به کمبود پروتئین جانوری جهت تأمین نیاز مصرفی بشر، تولیدات آبزیان می‌تواند نقش بسیار مهمی را در فراهم کردن یک منبع سالم پروتئین جانوری و ارزان قیمت داشته باشد. با توجه به رکود صنعت صیادی و افزایش تقاضای جمعیت برای محصولات شیلاتی، آبزی‌پروری به‌عنوان صنعتی است که بیش‌ترین پتانسیل را برای تولید ماهی و پاسخ به تقاضای در حال رشد غذای شیلاتی با کیفیت و سالم دارد (۱). میگوی وانامی با نام علمی *Litopenaeus vannamei* و نام عمومی میگوی پاسفید، بومی سواحل غربی آمریکای لاتین در اقیانوس آرام، از پرو در جنوب تا مکزیک در شمال پراکنده است. از اواخر دهه ۱۹۹۰، این گونه در مقیاس تجارتی با موفقیت در آسیا پرورش یافته است. اندازه میگوی وانامی حداکثر ۲۳ سانتی‌متر و طول کاراپاس (CL) حداکثر ۹ سانتی‌متر می‌باشد (۲). پرورش میگوی سفید غربی در تراکم‌های بسیار بالا و تا ۱۵۰ قطعه در مترمربع مقدور است و در شرایط بسته و تحت کنترل می‌توان تراکم را تا ۴۰۰ قطعه در مترمربع افزایش داد. در مقایسه با سایر گونه‌های رایج پرورشی نیاز به غذاهایی با پروتئین کم‌تر (۲۰ تا ۳۵ درصد) دارد. بیش‌ترین میانگین تولید میگوی وانامی با کنترل بالای بهداشتی-ویروسی و در سیستم مدار بسته فوق متراکم تا ۶۳ تن در هکتار گزارش شده است (۳). بیماری‌های آبزیان و معضلات بهداشتی آنان یکی از چالش‌های اصلی در تولید آبزیان به‌خصوص در صنعت پرورش میگو به‌شمار می‌رود. به‌طوری که سالیانه میلیون‌ها دلار خسارت از جانب بیماری‌ها به پرورش‌دهندگان میگو وارد می‌شود و یکی از مشکلات اساسی در توسعه این صنعت به حساب می‌آید. تاکنون حدود ۲۰ بیماری ویروسی، ۴ بیماری باکتریایی، ۳ بیماری قارچی و تعدادی بیماری انگلی در سخت‌پوستان به‌خصوص میگو گزارش شده است که موجب وارد آمدن خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو می‌شوند. شناخت ارتباط میان میگو، محیط و عوامل بیماری‌زا نقشی بسیار مهم در بررسی بیماری‌های میگو داشته و اساس مدیریت صحیح در تکثیر و پرورش این سخت‌پوست می‌باشد (۳، ۴). با توجه به این که درمان اختصاصی برای برخی بیماری‌های میگو (عمدتاً بیماری‌های ویروسی) وجود ندارد، در سال‌های اخیر استراتژی‌های متعددی برای افزایش رشد و بازماندگی میگوها توسعه یافته است به نحوی که به‌صورت هم‌زمان موجب کاهش بروز بیماری‌ها و اثرات مخرب بر محیط زیست شود. ازجمله این استراتژی‌ها می‌توان به بهبود شرایط محیطی، ذخیره‌سازی پست لاروهای عاری از بیماری (SPF) و افزایش مقاومت میگوها به عوامل بیماری‌زا به‌وسیله محرک‌های سیستم ایمنی اشاره کرد (۵، ۶ و ۷). باکتری *Vibrio harveyi* به‌عنوان پاتوژن اصلی جنس ویبریو است که تحت شرایط مساعد (شرایط استرس‌زا در میگو) می‌تواند میگوهای خانواده پنائیده را تحت تأثیر قرار دهد (۸). برخی از ترکیبات بیماری‌زای باکتریایی شامل محصولات خارج سلولی (پروتئیناز سیستئین، فسفولیپاز و همولیزین)، لیپوپلی‌ساکارید، عوامل باکتریوفاژ و باکتریوسین می‌باشند (۹). بیماری‌زایی *V. harveyi* وابسته به سویه باکتری است و نشان‌دهنده تعامل سینرژیک بین عوامل فردی و همراه یعنی توانایی آبگریزی، تشکیل بیوفیلم، بقا در مخاط پوست ماهی و سرم، فعالیت‌های پروتئولیتیک، همولیتیک و سمیت سلولی ECPها می‌باشد (۱۰، ۱۱). خیارهای دریایی گروه بزرگی از آبزیان را تشکیل می‌دهند که فعالیت‌های بیولوژیک آن‌ها شامل خاصیت ضد سرطانی، ضدویروس، ضدانعقاد، ضدفشار خون، ضدالتهاب، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد تصلب شرائین، ضد تومور و تسریع در بهبود زخم می‌باشد. دلیل وجود این خواص در خیار دریایی را می‌توان به حضور موادی مانند ترکیباتی با ساختار شیمیایی گلیگو ترپنوئید، کندروکتین سولفات، پلی ساکارید سولفاته، گلیکوپروتئین، گلیکواسفنگولیپید و اسیدهای چرب ضروری در گلوکزآمینوگلیکان (GAGs) خیار دریایی نسبت داد (۱۲). تاکنون مطالعات متعددی در ارتباط با استخراج ترکیبات از خیار دریایی و دیگر موجودات جهت بهبود بیماری‌های آبزیان ازجمله میگو صورت گرفته است (۵، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ و ۱۷). عموماً مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان سنتی بیماری‌های میگو مورد استفاده قرار می‌گیرند. به‌دلیل این‌که برای درمان در استخرهای پرورش میگو باید به‌میزان بسیار زیادی از مواد شیمیایی استفاده شود و استفاده متعدد از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز موجب مقاومت میکروبی و ورود آنتی‌بیوتیک در بافت میگو می‌شود. کاربرد این روش‌ها دارای مشکلات عدیده‌ای است، به‌طوری که مقاومت میکروبی در مراکز تکثیر و مزارع پرورش آبزیان تبدیل به یک مشکل جهانی شده است و محققین زیادی توجهات خود را به این امر معطوف نموده‌اند (۱۸، ۱۹ و ۲۰). بیومولکول‌های استخراج شده از موجودات آبزی، ویژگی‌های زیست‌فعال قدرتمندی دارند. تلاش‌های به‌عمل آمده برای توسعه داروهای دریایی، منجر به کشف موادی با خواص ضدسرطان، آنتی‌بیوتیک، تنظیم کننده رشد، همولایتیک، ضدانعقاد، ضد درد، ضد اسپاسم، کاهنده یا فزاینده فشار خون و حتی عوامل ضد ایدز گردیده است. تا به امروز تقریباً ۱۶۰۰۰ محصول دریایی از موجودات دریایی کشف شده است (۲۱). در این مطالعه فرض بر این بود که عصاره کلروفرم استخراج شده از خیار دریائی در پیشگیری از بیماری باکتریایی ناشی از ویبریو هارویی و تغییرات فاکتورهای ایمنی و بقا موثر می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه بررسی چگونگی تاثیر عصاره کلروفرم استخراج شده از خیار دریائی بر روی بقای میگوهای در معرض باکتری ویبریو هارویی و

بررسی تغییرات فاکتورهای ایمنی اندازه‌گیری شده در در طول دوره آزمایش می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری خیار دریایی و آماده‌نمودن جیره غذایی حاوی عصاره خیار دریایی: نمونه‌های خیار دریایی (*H. parva*) در تیر ماه ۱۳۹۶ با اندازه‌های متوسط ۱۵-۱۰ سانتی‌متر از منطقه جزر و مدی سواحل روستای اولی شهرستان دیر، واقع در استان بوشهر جمع‌آوری شد و با نگه‌داری در کیسه‌های پر از یخ به آزمایشگاه اکولوژی واقع در مرکز مطالعات دانشگاه خلیج فارس بوشهر منتقل گردید. خیارهای دریایی از مواد خارجی تمیز شده و قسمت‌های نکروز شده برداشت گردید. نمونه‌ها از قسمت مخرج به سمت دهان برش داده شدند و لوله گوارشی آن‌ها پاکسازی شد. سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. برای شناسایی خیار دریایی، به اندازه ۱ سانتی‌مترمربع از بافت اپیدرم به‌وسیله اسکالپل جدا گردید و درون فالکون حاوی ۵ میلی‌لیتر آب ژاول قرار داده شد. پس از گذشت زمان ۲۰ دقیقه، رسوب سفیدرنگی در انتهای فالکون جمع شد که با کمک سمپلر، ۱ قطره از رسوب را روی لام پخش نموده و با میکروسکوپ ۱۰ و ۴۰ استخوان‌چه‌ها مشاهده شدند که با کلید شناسایی FAO مطابقت داده شد (۲۲، ۲۳).

روش تهیه عصاره کلروفرمی: عصاره کلروفرمی با خشک کردن خیارهای دریائی با دستگاه فریز درایر (خشک کن انجمادی) و عصاره‌گیری به‌وسیله دستگاه روتاری انجام شد (۱۵). خیارهای دریایی پس از خروج از فریز به قطعات کوچک‌تری تبدیل گردیدند. سپس به‌مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر قرار داده شد (۲۴). سپس خیارهای دریایی خشک شده به‌وسیله آسیاب برقی پودر گردیدند و برای به‌دست آوردن عصاره بافت خیار دریایی از روش خیساندن استفاده شد. بدین‌صورت که پودر خیار دریایی به نسبت ۴۰۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۰۰ گرم بافت، در حلال ۹۴٪ کلروفرم قرار داده شد و سپس به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و روی شیکر قرار گرفت. سپس عصاره از کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) عبور داده شد و در نهایت، تحت شرایط خلاء با استفاده از دستگاه روتاری (تقطیر در خلأ دوار) در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد (جهت جلوگیری از خراب شدن مواد متشکله حساس به گرما) تغلیظ گردید. بعد از به‌دست آمدن عصاره خیار دریایی، ترکیبات شیمیایی آن توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC-MS) شناسایی و تعیین درصد گردید (۲۵).

تعیین MIC به‌روش In vitro: MIC به‌منظور بررسی خواص ضدباکتریایی با استفاده از روش رقیق کردن در محیط مایع (Broth Macrodilution Method) به‌شرح زیر انجام گرفت. سویه باکتری ویبریو هارویی (PTCC:1755) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران به‌صورت لیوفیلیزه تهیه شد. سپس کشت اولیه به‌صورت خطی بر روی محیط TSA نمکی داده شد و به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد با توجه به‌میزان سرعت رشد باکتری در انکوباتور قرار داده شد تا از کلونی‌های تک به‌منظور انجام آزمایش استفاده شود. پس از رشد کلنی‌های باکتری بر روی پلت، آن‌ها را از انکوباتور خارج نموده و با استفاده از آنس (نیدل) از کلونی‌های تک ایجاد شده به محیط مایع TSB نمکی (۲/۵ درصد نمک) در لوله‌های آزمایش وارد نموده، این کار تا یکسان شدن کدورت محیط براث با کدورت محیط نیم‌مک فارلند معادل $1/5\times10^8$ CFU/m باکتری (۰/۵ میلی‌لیتر کلرور باریوم دهیدراته ۱٪ و ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۱٪) تکرار گردید. سپس سر تمام لوله‌ها بسته شدند و به‌مدت ۲۴ ساعت و در حرارت ^{o}c ۳۰ و در انکوباتور قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت لوله‌های آزمایش از انکوباتور خارج شده و کدورت آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. لوله کنترل که فاقد ترکیبات فعال بیولوژیک بود بسیار کدر شده، زیرا باکتری‌ها در آن فرصت رشد را داشته‌اند. برای ادامه کارسایر لوله‌ها با لوله مذکور به‌صورت چشمی مقایسه شد. این آزمایش برای هر عصاره با سه بار تکرار انجام شد. سپس از عصاره کلروفرمی خیار دریایی استریل با غلظت‌های ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌منظور تعیین میزان MIC و MBC استفاده شد. به‌دلیل عدم نتیجه و عدم ممانعت از رشد، غلظت‌های بالاتر ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵).

آماده نمودن جیره غذایی حاوی عصاره خیار دریایی: برای تهیه غذای مورد استفاده در آزمایش از غلظت‌های مختلف عصاره *H. Parva* (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد. ابتدا غذای ۴۰۰۴ شرکت هوواراش تهیه گردید و توسط آسیاب مجدد پودر شد. غلظت‌های تعیین شده به هر کیلوگرم غذا افزوده گردیده و مجدداً با افزودن ژلاتین و آب به غذا و عبور آن از دستگاه چرخ گوشت با اندازه چشمه ۱/۵ میلی‌متر و قراردادن در دمای ۶۰ درجه به‌مدت ۶ ساعت، پس از خشک شدن آن توسط دست به‌دقت خرد شده و در کیسه‌های نایلونی تا زمان آزمون مواجهه در یخچال نگه‌داری شدند.

آماده کردن باکتری ویبریو هارویی: ویبریو هارویی با شماره کلکسیونی (PTCC:1755) و ثبت در بانک ژن به‌شماره (NCBI: Gu 974342.1) که از میگوهای پرورشی استان بوشهر جداسازی و ثبت شده است به‌عنوان گونه باکتری بیماری‌زا برای میگو مورد استفاده در

این آزمون انتخاب گردید. ابتدا باکتری به‌منظور تهیه کلنی (پرگنه) تک در محیط TSA با ۲/۵٪ نمک برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس از کلنی مورد نظر به چند لوله حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت TSB با ۲/۵٪ نمک برای ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و در انکوباسیون شیکردار کشت داده شد. لوله‌های حاوی محیط‌های کشت را در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده تا باکتری‌ها رسوب نمایند. مایع رویی که محیط کشت می‌باشد خارج گردید و سپس به‌منظور شستشو و خارج نمودن محیط کشت و مواد متابولیکی باکتریایی موجود در محیط، ۱۰ میلی‌لیتر نرمال سایلین استریل به هر یک از لوله‌ها افزوده شد و مجدداً با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوز انجام شد. این مرحله ۲ بار تکرار شد. به رسوب باقی‌مانده از مرحله دوم شستشو مجدداً با توجه به‌میزان پلت چسبیده شده ته هر یک از لوله نرمال سایلین افزوده شد و به‌وسیله شیکر لوله شیک داده شد تا توده باکتری چسبیده به ته لوله در نرمال سایلین حل شود. کل محلول باکتری به‌دست آمده از این روش را در یک لوله فالکون ۱۰۰ میلی‌لیتری استریل ریخته و توسط اسپکتوفوتومتر و نمودار استاندارد مک فارلند غلظت آن را تعیین نموده و سپس محاسبه گردید که چه حجمی از محلول می‌تواند غلظت ایجادکننده بیماری (۳×۱۰^{۸} cfu/ml) را در هر یک از آکواریم‌های مواجهه با توجه به حجم آب ایجاد نماید.

تهیه میگوهای سفید غربی، مرحله سازگاری و انجام تحقیق: میگوهای مورد آزمایش جهت انجام پروژه از خرداد ۱۳۹۶ به تعداد ۱۰۰۰ قطعه میگو با وزن متوسط ۱±۱۰ گرم از استخرهای پرورشی جمع‌آوری شدند و پس از بررسی فاکتورهای کیفی و بهداشتی انتخاب شده و به‌وسیله تانک مجهز به سیستم هوادهی پخش‌کننده جمع‌آوری شده و به آزمایشگاه پژوهشکده میگوی کشور واقع در بوشهر منتقل گردیدند. میگوهای مورد آزمایش جهت بررسی بیماری‌های مهم غربالگری (HPV، WSSV، MBV و TSV) و به‌لحاظ بیماری باکتریائی ویبریوزیس مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام این آزمایش از ۳۳ آکواریوم ۱۵۰ لیتری حاوی ۱۰۰ لیتر آب با شوری ۴۰ ppt استفاده شد (با کنترل منفی و مثبت برای همه تیمارها). حجم آبگیری مفید برای هر یک از این مخازن ۲۰۰۰ لیتر بود و جهت انجام آزمایش با ۱۵۰۰ لیتر آب، آبگیری شدند. آب ورودی پس از آبگیری و ذخیره شدن و عبور از استخر رسوب‌گیر و فیلتر شنی قبل از ورود به سالن، با ۱۰ ppm کلر ضدعفونی شد و سپس مورد مصرف در پروژه قرار گرفت. هم‌چنین روزانه تعویض آب به‌میزان ۱۰ الی ۱۵٪ انجام شد. پارامترهای دما، pH و اکسیژن محلول آب روزانه در دو نوبت صبح و عصر و شوری آب یک‌بار در روز در نوبت صبح، به‌وسیله دستگاه مولتی‌پارامتر اندازه‌گیری و ثبت گردید. دوره نوری در داخل سالن‌های پرورش از طریق استفاده از لامپ‌های فلورسنت به‌صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی تنظیم گردید. ابتدا میگوهای سفید غربی موردنیاز به‌مدت ۳ تا ۵ روز در شرایط آزمایشگاهی سازگار شدند. بعد از مرحله سازش، غربالگری میگوها برای عدم وجود ویروس‌های IMNV، IHHNV، BP، YHV، HPV، MBV، TSV، WSSV و باکتری‌های ویبریو با استفاده از PCR انجام شد. میگوها برای مواجهه مطابق با تیماربندی با غذاهای حاوی عصاره کلروفرمی به‌مدت ۱۰ روز مورد تغذیه قرار داده شدند. سپس میگوهای تغذیه شده را با باکتری ویبریو هارویی در غلظت ۳×۱۰^{۸} مواجهه داده شدند. این کار برای تیمارها تکرار شده و میگوها به‌مدت ۲۰ روز نگه‌داری گردیدند.

اندازه‌گیری فاکتورهای ایمنی میگو: علائم بالینی و تلفات از روز اول ثبت شدند و تا ۲۰ روز کلیه پارامترهای آب ثبت و نسبت به نمونه‌گیری از همولنف و نمونه‌برداری برای بررسی فاکتورهای Total hemocyte count (THC)، Total protein plasma (TPP)، Phenoloxidase (PO) activity و Superoxide dismutase (SOD) activity مورد نظر در روزهای ۳، ۵، ۹، ۱۵ و ۲۵ طی دوره آزمایش اقدام گردید (۲۶، ۲۷).

اندازه‌گیری بقا و میزان رشد میگوها: اندازه‌گیری درصد بقا میگوها براساس روش Zhou و همکاران محاسبه گردید (۲۸):

۱۰۰× (تعداد کل میگو/ تعداد میگوی مرده)= درصد مرگ و میر

درصد مرگ و میر – ۱۰۰ = درصد بقا

آنالیز آماری: به‌منظور مقایسه آماری نتایج به‌دست آمده، از نتایج آزمون‌ها در گروه‌های مختلف آزمایش و شاهد از تست One way ANOVA و سرخط Tukey Honest Significant Difference (HSD) استفاده شد. در همه آزمون‌های آماری سطح معنی‌دار بودن P<۰/۰۵ درنظر گرفته شد. آزمون‌های Post-hoc در مواردی که نتایج ANOVA معنی‌دار بود، با استفاده از آزمون LSD انجام شد.

نتایج

میزان بقا در تیمارهای مختلف: بیش‌ترین میزان بقا در تیمارهای ۱ و ۲ و ۳ به‌میزان ۱۰۰ و کم‌ترین در تیمار شاهد مثبت به‌میزان ۳۴/۲±۰۷/۱۰ در روز بیست و پنجم مشاهده شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد که مصرف عصاره کلروفرم باعث گردیده است که میگوهای تیمارهای ۱، ۲ و ۳ مواجهه شده با باکتری در مقایسه با تیمار شاهد مثبت که عصاره‌ای مصرف نکرده‌اند (ولی با باکتری مواجهه شده‌اند)، بازماندگی به‌میزان ۱۰۰٪ باشد (جدول ۱).

مقایسه شاخص فعالیت آنزیم فنل اکسیداز (PO): نتایج فاکتور ایمنی PO میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی حاوی عصاره کلروفرمی

خیار دریایی *H. Parva* در برابر باکتری *V. harveyi* در جدول ۲ ارائه شده است. میزان PO در تیمار ۱ در روزهای اول و سوم دارای اختلاف معنی‌داری با شاهد منفی است(P<۰/۰۵).در تیمار ۲ تنها در روزهای پانزدهم و بیست و پنجم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد منفی مشاهده شد(P<۰/۰۵).در تیمار ۳ در روز پانزدهم تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد منفی و مثبت وجود داشت (P<۰/۰۵)، ولی در بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) (جدول ۲).

مقایسه شاخص فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD): میزان POD در تیمار ۱ از روز سوم تا روز بیست و پنجم دارای تفاوت معنی‌داری با هر دو گروه شاهد منفی و مثبت بود (P<۰/۰۵). در تیمار ۲ در روزهای اول، سوم و نهم تفاوت معنی‌داری با هر دو گروه شاهد منفی و مثبت مشاهده شد (P<۰/۰۵)، درحالی‌که در روزهای پانزدهم و بیست و پنجم تنها با گروه شاهد منفی اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار ۳ میزان POD در روزهای اول، سوم، پنجم و نهم تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد مثبت داشت (P<۰/۰۵)، ولی در روز پانزدهم و بیست و پنجم تفاوت معنی‌داری را با هر دو گروه شاهد منفی و مثبت نشان داد (P<۰/۰۵) (جدول ۳).

مقایسه شاخص میزان هموسیت کل خون (THC): میزان THC در تیمار ۱ در تمام روزها دارای اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مثبت بود (P<۰/۰۵). در تیمار ۲ در تمام روزها به‌جز روز بیست و پنجم میزان THC اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مثبت داشت (P<۰/۰۵).در تیمار ۳ در تمام روزها به‌جز روز پانزدهم و بیست و پنجم اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد منفی مشاهده شد (P<۰/۰۵) (جدول ۴).

مقایسه شاخص میزان پروتئین پلاسما (TPP): میزان TPP در تیمار ۱ در روزهای اول، سوم، پنجم و نهم تفاوت معنی‌داری را با هر دو گروه شاهد منفی و مثبت نشان داد (P<۰/۰۵)، درحالی‌که در روزهای پانزدهم و بیست و پنجم تنها با گروه شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). در تیمار ۲ میزان TPP در تمام روزها تفاوت معنی‌داری را با گروه شاهد منفی نشان داد (P<۰/۰۵). میزان TPP در تیمار ۳ در روزهای اول و سوم دارای اختلاف معنی‌داری با هر دو گروه شاهد منفی و مثبت بود (P<۰/۰۵) و در سایر روزهای آزمایش تنها اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد منفی وجود داشت (P<۰/۰۵) (جدول ۵).

مقایسه شاخص فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD): در تیمار ۱ میزان SOD در تمام روزهای آزمایش دارای اختلاف معنی‌داری با هر دو گروه شاهد مثبت و منفی بود(P<۰/۰۵).هم‌چنین در تیمار ۲ و ۳ میزان SOD در تمام روزها دارای اختلاف معنی‌داری تنها با گروه شاهد منفی بود (P<۰/۰۵) (جدول ۶).

جدول ۱: نتایج درصد بازماندگی میگوهای وانامی تغذیه شده با عصاره کلروفرم در تیمارهای مختلف

تیمار	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز پانزدهم	روز بیست و پنجم
شاهد منفی	۱۰۰± ۰/۰۰ ^{a}	۱۰۰±۰/۰۰ ^{d}	۱۰۰±۰/۰۰ ^{e}	۱۰۰±۰/۰۰ ^{e}	۱۰۰± ۰/۰۰ ^{e}	۱۰۰± ۰/۰۰ ^{e}
شاهد مثبت	۱۰۰ ±۰/۰۰ ^{a}	۶۴/۱±۴۴/۸۱ ^{a}	۴۸/۱±۸۹/۸۱ ^{a}	۳۷/۲±۰۴/۱۰ ^{a}	۳۵/۱±۵۶/۸۱ ^{a}	۳۴/۲±۰۷/۱۰ ^{a}
تیمار ۱	۱۰۰± ۰/۰۰ ^{a}	۸۰/۰۰±۱/۸۱ ^{b}	۵۷/۷۸±۱/۸۱ ^{b}	۵۲/۵۹±۲/۷۷ ^{b}	۵۳/۳۳±۱/۸۱ ^{b}	۵۳/۳۳±۱/۸۱ ^{b}
تیمار ۲	۱۰۰± ۰/۰۰ ^{a}	۸۹/۶۳±۲/۰۹ ^{c}	۸۴/۴۴±۱/۸۱ ^{d}	۸۴/۴۴±۱/۸۱ ^{d}	۸۴/۴۴±۱/۸۱ ^{d}	۸۴/۴۴±۱/۸۱ ^{d}
تیمار ۳	۱۰۰± ۰/۰۰ ^{a}	۹۳/۳۳±۱/۸۱ ^{c}	۷۱/۱۱±۱/۸۱ ^{c}	۶۵/۹۳±۲/۱۰ ^{c}	۶۵/۹۳±۲/۱۰ ^{c}	۶۵/۹۳±۲/۱۰ ^{c}

حروف یکسان به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایشی است.

جدول ۲: نتایج PO در میگوی وانامی تغذیه شده با عصاره کلروفرم در تیمارهای مختلف

PO	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز پانزدهم	روز بیست و پنجم
شاهد منفی	۳۷۶/۸۸ ± ۸/۲۵ ^{a}	۳۹۴/۱۱ ±۵/۹۷ ^{a}	۳۹۰/۱۴± ۸/۳۳ ^{a}	۴۰۶/۱۱۷±۹/۵۲ ^{a}	۳۹۲/۱۰ ± ۹/۹۸ ^{ab}	۳۸۱/۶۰ ±/۱۲/۱۲ ^{a}
شاهد مثبت	۳۳۲/۹۳ ±۹/۲۴ ^{b}	۲۴۴/۵۲ ±۹/۳۹ ^{b}	۲۰۷/۲۰±۹/۸۶ ^{b}	۲۰۴/۳۶±۹/۸۶ ^{b}	۲۲۱/۹۷±۷/۲۰ ^{a}	۲۴۱/۴۰±۱۰/۲۷ ^{b}
تیمار ۱	۳۹۳/۵۱±۱۲/۱۷ ^{a}	۴۱۵/۸۲±۱۱/۲۲ ^{a}	۴۶۱/۶۲±۷/۷۵ ^{cd}	۴۳۴/۶۲±۱۱/۳۴ ^{ac}	۴۴۴/۲۸±۴/۸۹ ^{ab}	۴۱۲/۷۹±۶/۶۴ ^{c}
تیمار ۲	۴۳۳/۷۶±۷/۱۵ ^{c}	۴۷۷/۷۲±۸/۷۳ ^{c}	۴۹۶/۶۴±۱۰/۷۹ ^{d}	۴۵۳/۰۰±۱۴/۰۳ ^{ac}	۴۴۵/۰۲±۱۴/۰۳ ^{b}	۴۴۰/۳۵±۹/۰۲ ^{c}
تیمار ۳	۴۳۹/۰۰±۳/۷۵ ^{c}	۴۷۳/۶۳±۵/۴۲ ^{c}	۴۵۳/۲۳±۱۱/۴۶ ^{c}	۴۴۲/۷۷±۵/۱۸ ^{ac}	۴۴۷/۱۳±۵/۰۹ ^{b}	۴۳۲/۴۳±۵/۰۰ ^{c}

حروف یکسان به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایشی است.

جدول ۳: نتایج POD در میگوی وانامی تغذیه شده با عصاره کلروفرم در تیمارهای مختلف

POD	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز پانزدهم	روز بیست و پنجم

شاهد منفی	۵/۸۱± ۰/۱۴[a]	۵/۷۳±۰/۱۸[a]	۵/۸۱±۰/۱۳ [b]	۵/۷۵±۰/۲۳ [b]	۵/۸۴±۰/۲۰ [a]	۵/۸۸±۰/۲۱ [a]
شاهد مثبت	۵/۸۰ ±۰/۲۰ [a]	۵/۳۶±۰/۱۰ [a]	۵/۱۷±۰/۲۶ [a]	۵/۰۹±۰/۲۶ [a]	۵/۵۲±۰/۲۹ [a]	۵/۷۵±۰/۱۴ [a]
تیمار ۱	۵/۹۷±۰/۱۲ [a]	۵/۸۱±۰/۱۹ [a]	۵/۹۲±۰/۲۸ [b]	۵/۸۴±۰/۱۵ [b]	۶/۰۱±۰/۱۷ [a]	۶/۰۳±۰/۲۲ [a]
تیمار ۲	۶/۷۷±۰/۱۱ [b]	۷/۹۸±۰/۲۵ [b]	۷/۷۵±۰/۰۹ [c]	۷/۳۶±۰/۱۱ [c]	۶/۸۱±۰/۱۱ [b]	۶/۸۲±۰/۰۸ [b]
تیمار ۳	۶/۷۳±۰/۰۸ [b]	۷/۲۳±۰/۲۳ [c]	۷/۴۱±۰/۰۲[c]	۷/۰۵±۰/۰۳ [c]	۶/۸۵±۰/۰۳ [b]	۶/۸۸±۰/۰۲ [b]

حروف یکسان به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایشی است.

جدول ۴: نتایج THC در میگوی وانامی تغذیه شده با عصاره کلروفرم در تیمارهای مختلف

THC	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز پانزدهم	روز بیست و پنجم
شاهد منفی	۲۱/۰۷±۰/۸۷ [a]	۲۰/۹۶±۱/۰۱ [b]	۱۹/۱۰±۰/۶۲ [b]	۲۱/۸۱±۰/۴۲ [b]	۲۱/۱۷±۱/۲۴ [b]	۲۱/۱۰±۰/۸۳ [b]
شاهد مثبت	۲۱/۶۴±۱/۲۷ [a]	۱۴/۳۱±۰/۷۹ [a]	۱۳/۱۰±۰/۶۵ [a]	۱۱/۲۵±۰/۶۵ [a]	۱۱/۸۱±۰/۴۶ [a]	۱۵/۲۵±۱/۰۳ [a]
تیمار ۱	۲۵/۴۸±۱/۱۵ [a]	۳۳/۱۸±۰/۷۰ [c]	۳۸/۴۳±۱/۱۹ [c]	۳۹/۷۹±۱/۶۹ [c]	۳۱/۵۱±۲/۱۵ [c]	۲۹/۰۹±۱/۳۲ [c]
تیمار ۲	۳۳/۴۵±۲/۴۳ [b]	۳۸/۱۹±۱/۳۹ [d]	۵۰/۵۱±۰/۸۴[d]	۴۷/۶۶±۰/۵۸ [d]	۴۲/۳۰±۰/۵۸ [d]	۳۵/۴۹±۲/۲۰[d]
تیمار ۳	۳۶/۴۱±۰/۶۳ [b]	۵۱/۵۲±۱/۴۴ [e]	۶۱/۶۷±۱/۳۱ [e]	۶۷/۳۵±۰/۳۸ [e]	۴۵/۶۰±۱/۶۸ [d]	۳۸/۵۶±۰/۴۳ [d]

حروف یکسان به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایشی است.

جدول ۵: نتایج TPP در میگوی وانامی تغذیه شده با عصاره کلروفرم در تیمارهای مختلف

TPP	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز پانزدهم	روز بیست و پنجم
شاهد منفی	۳۸/۱۵±۲/۰۰ [a]	۳۷/۳۷±۲/۲۸ [b]	۳۷/۳۹±۱/۶۰ [a]	۳۷/۹۶±۲/۹۹ [b]	۳۸/۰۸±۰/۹۷ [b]	۳۸/۶۲±۱/۷۹ [b]
شاهد مثبت	۴۶/۵۵±۲/۴۱[b]	۲۵/۶۹ ±۱/۸۹ [a]	۲۲/۸۳±۰/۹۴ [a]	۲۳/۴۸±۰/۹۴ [a]	۲۶/۵۵±۱/۰۴ [a]	۲۷/۸۸±۰/۷۲ [a]
تیمار ۱	۵۳/۲۶±۲/۰۰ [b]	۶۹/۵۴±۳/۷۸ [c]	۸۱/۲۶±۵/۹۳ [b]	۸۳/۶۹±۵/۰۳ [c]	۵۹/۷۵±۲/۴۸ [c]	۵۲/۹۲±۱/۸۳ [c]
تیمار ۲	۷۹/۴۰±۳/۰۹ [c]	۹۱/۰۴±۰/۸۴ [d]	۱۲۰/۴۷±۲/۰۳ [b]	۱۱۶/۳۸±۱/۴۴ [d]	۷۹/۳۷±۱/۴۴ [d]	۷۹/۵۸±۳/۳۱ [d]
تیمار ۳	۴۱/۸۷±۲/۱۴ [d]	۱۲۳/۹۴±۴/۴۹ [e]	۱۴۷/۳۳±۴/۸۷ [c]	۱۶۲/۴۷±۴/۲۶ [e]	۸۹/۶۶±۵/۷۹ [d]	۷۸/۲۷±۵/۸۲ [d]

حروف یکسان به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایشی است.

جدول ۶: نتایج SOD در میگوی وانامی تغذیه شده با عصاره کلروفرم در تیمارهای مختلف

SOD	روز اول	روز سوم	روز پنجم	روز نهم	روز پانزدهم	روز بیست و پنجم
شاهد منفی	۵۳۵/۱۹±۷/۴۵ [b]	۵۳۳/۸۴±۵/۱۸ [b]	۵۳۵/۹۳±۵/۱۶ [b]	۵۳۴/۶۴±۶/۰۶ [b]	۵۳۶/۴۰±۸/۵۸ [b]	۵۳۷/۱۶±۸/۴۲ [b]
شاهد مثبت	۳۹۶/۷۱±۱۳/۳۸ [a]	۳۶۴/۴۷±۱۵/۲۶ [a]	۳۵۳/۵۷±۱۲/۹۸ [a]	۳۴۷/۷۸±۱۲/۹۸ [a]	۳۷۷/۹۰±۱۲/۸۵ [a]	۳۹۵/۴۴±۵/۰۰ [a]
تیمار ۱	۹۴۶/۵۵±۸/۹۹ [c]	۱۲۲۵/۴۳±۱۴/۳۱ [c]	۱۴۳۰/۶۸±۱۲/۳۰ [c]	۱۴۷۶/۵۲±۱۴/۵۰ [c]	۱۰۵۴/۵۶±۱۱/۰۳ [c]	۹۳۱/۶۷±۱۳/۳۶ [c]
تیمار ۲	۱۳۹۱/۴۲±۱۳/۴۶ [d]	۱۵۹۵/۲۴±۱۴/۶۸ [d]	۲۱۲۶/۳۶±۱۰/۹۳ [d]	۲۰۵۲/۳۲±۱۶/۰۵ [d]	۱۴۰۳/۹۱±۱۶/۰۵ [d]	۱۴۰۰/۵۶±۱۰/۶۱ [d]
تیمار ۳	۱۵۴۰/۳۷±۹/۸۶ [e]	۲۱۸۱/۷۹±۱۲/۶۳ [e]	۲۵۹۳/۶۶±۱۰/۱۵ [e]	۲۸۵۳/۶۰±۱۲/۸۳ [e]	۱۵۸۱/۰۴±۶/۰۷ [e]	۱۵۴۷/۳۳±۵/۴۷ [e]

حروف یکسان به معنی عدم وجود اختلاف معنی‌دار و حروف متفاوت به معنی اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایشی است.

بحث

در مطالعه حاضر اثر ضدباکتری عصاره‌های کلروفرمی استخراج شده‌از خیار دریایی *H. Parva* بر روی باکتری ویبریو هاروی *V. harveyi* در میگوی وانامی مورد بررسی قرار گرفت. تاکنون تحقیقات محدودی بر روی خاصیت ضدباکتریایی خیار دریایی بر روی باکتری ویبریو هاروی انجام گردیده است. بیش‌تر مطالعات بر روی سایر باکتری‌های انجام گردیده است که اکثراً خاصیت ضدباکتری عصاره‌های کلروفرمی خیار دریایی را تائید نموده‌اند. براساس Abraham و همکاران، سطوح مختلف عصاره‌های *A. miliaris*، *H. atra* و *H. scabra* بر باکتری‌های اشرشیا کلای، انتروکوکوس، کلبسیلا پنئومونا، سودوموناس آئروژینس، سالمونلا تیفی، استافیلوکوکوس اورئوس و ویبریو هاروی و *Aspergillus sp* اثر بازدارندگی موثری دارند، ولی این عصاره‌ها بر باکتری *Bacillus* sp. موثر نبودند (۲۹). در تحقیقی که توسط Mokhlesi و همکاران بر روی عصاره‌های اتیل استات، متانول و آب- متانول استخراج شده از اندام‌های داخلی، مایع سلومی و دیواره سلولی خیار دریایی *Bohadschia marmorata* در خلیج فارس انجام شد، اثر ضدمیکروبی مشاهده نشد (۳۰). نتایج تحقیقات Farjami و همکاران نشان داد که عصاره متانولی

استخراج شده از خیار دریایی گونه *H. Leucospilota* بر روی باکتری اشرشیاکلای هیچ‌گونه اثری از خود نشان نمی‌دهد، اما عصاره کلروفرمی و ان‌هگزانی در غلظت‌های ۲ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از رشد باکتری مذکور جلوگیری می‌کند (۱۵). مطالعه Shadi و Oujifard نشان داد که عصاره‌های اتانولی و متانولی خیار دریایی *H. Parva* دارای اثر بازدارندگی علیه باکتری‌های *Escherichia coli*، *Vibrio alginolyticus* و *Staphylococcus aureus* است (۱۷). خیار دریایی دارای سیستم ایمنی ذاتی است که یک منبع بالقوه به‌منظور کشف پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشد. در نتیجه خیار دریایی به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات با خاصیت ضدمیکروبی در نظر گرفته می‌شود که گزینه خوبی برای سنتز ترکیبات پزشکی، دارویی و آنتی‌بیوتیک می‌باشد (۳۱). ممکن است که اثر ضدباکتری عصاره‌های خیار دریایی به‌دلیل تجمعی از چندین ترکیب زیست‌فعال باشد. مکانیسم اثر عصاره‌ها به احتمال فراوان براساس تاثیر عصاره‌ها بر روی دیواره و غشا می‌باشد که با تضعیف عمل ممانعت کنندگی غشا و دیواره باکتری مذکور موجب نفوذ عصاره به‌داخل سلول و متلاشی شدن سلول می‌شود (۱۵). یکی از آنزیم‌هایی که در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفت، آنزیم فنل‌اکسیداز (PO) می‌باشد. در مطالعه حاضر نیز عصاره کلروفرمی خیار دریایی موجب فعال‌کردن سیستم proPO شده و میزان PO در T2 آزمایش در طی روز پنجم (۴۹۶/۶۴±۱۰/۷۹) در همولنف میگوها افزایش یافت. سیستم پروفنل اکسیداز (proPO) یکی از اجزا مهم سیستم دفاعی میگوها می‌باشد. این سیستم به‌ویژه در شناسایی اجزا غیرخودی نقش بسیار اساسی دارد. آنزیم فنل‌اکسیداز (PO) از مهم‌ترین آنزیم‌هایی است که در زمان فعال شدن سیستم proPO ایجاد گردیده و نقش اساسی در پروسه ملانیزه شدن ناشی از مواجهه با ذرات و یا پاتوژن‌های خارجی دارد (۳۲). فعال‌شدن این آنزیم توسط تعداد زیادی از تحریک‌کننده‌های سیستم ایمنی شامل پپتید و گلیکان (۳۳)، بتاگلوکان (۳۳، ۱۴) و لیپوپلی‌ساکارید (۳۴، ۵) انجام می‌گیرد. نتایج حاصل از این تحقیق با تحقیق صورت گرفته توسط Chen و همکاران مطابقت ندارد، زیرا آن‌ها متوجه شدند با استفاده از عصاره جلبک گراسیلاریا تنیستپتات در میگوی سفید غربی برخی از فاکتورهای ایمنی شبیه PO فعال هستند (۳۵)، ولی در مواجهه با استرس میزان آن‌ها کاهش می‌یابد. فاکتور مؤثر دیگر آنزیم پراکسیداز (POD) موجود در پلاسما بوده که به شدت به مولکول‌های رادیکال آزاد اکسیژن (ROS) ارتباط داشته و در زمان فاگوسیتوز یکی از مهم‌ترین واکنش‌های دفاعی در برابر هجوم پارتیکل‌های خارجی می‌باشد (۳۶). میزان POD در T2 آزمایش در طی روز سوم (۷/۹۸±۰/۲۵) دارای بیش‌ترین مقدار بود. POD نقش بسیار مهمی در مسمومیت ناشی از اکسیژن و دفاع ایمنی در میگو دارد (۳۷). ارگانل‌های پراکسیدزم حاوی رادیکال‌های آزاد اکسیژن، POD و کاتالاز بوده که می‌توانند موجب حفاظت سلول‌ها از تغییر مواد تغییر دهنده سلول‌ها نظیر H_2O_2، آب غیرسمی و رادیکال‌های اکسیژن آزاد باشند (۳۸). Yan و همکاران گزارش نمودند که آنزیم پراکسیداز به‌طور مشخص در ارگانل‌های خاصی به‌نام پراکسیدزم موجود در کبد، قلب و آبشش قرار دارند. هم‌چنین POD در لیپیدهای اطراف کبد نیز وجود دارد (۳۹). این محققان نشان دادند که در میگوهای آلوده نیز میزان POD در کبد، قلب و آبشش وجود داشته است، ولی میزان آن در بافت‌های چربی اطراف کبد کاهش می‌یابد. در تحقیق حاضر میزان POD در سلول‌های اصلی این آنزیم، با مصرف عصاره کلروفرمی در تیمارها افزایش یافت. این نتایج با تحقیقات Yan و همکاران (۳۹) و Wang و همکاران (۳۸) هم‌خوانی دارد. فعالیت آنزیم پراکسیداز در پلاسما به‌طور نزدیکی به‌میزان ROS در عمل فاگوسیتوز دخالت دارد که موجب حذف پاتوژن‌ها می‌شود (۴۰، ۳۶). این آنزیم نیز نقش بسیار حساسی در دفاع بدن میگو و سیستم ایمنی میگو داشته و در عفونت‌زدایی بسیار تأثیر دارد (۱۶). ارگانل‌های حاوی پراکسیدیزم حاوی تعداد زیادی مولکول‌های اکسیداز، POD و کاتالاز بوده که می‌توانند سلول‌ها را از ترکیبات آسیب‌رسان شبیه H_2O_2 توسط واکنش‌های اکسیداسیون به سلول‌های آب و اکسیژن تجزیه نمایند (۳۸). در مطالعه حاضر میزان هموسیت (THC) به‌طور معنی‌داری در تیمار ۳ میگوهای تغذیه شده با عصاره کلروفرم در مواجهه با باکتری ویبریو هاروی (T3) در روز نهم ۶۷/۳۵±۰/۳۸ افزایش یافته است. این یافته به این معنی است که بافت‌های تولید کننده سلول‌های لنفاوی تحریک شده و میزان سلول‌های لنفاوی در میگو افزایش یافته است. هموسیت نقش مهمی در ایمنی میگو داشته و میزان هموسیت در گردش خون یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده در سلامتی میگوها می‌باشد (۴۱).

در مطالعه Cheng و همکاران پلی‌ساکاریدهای شبیه گلوکان موجود در دیواره قارچ‌ها، مخمرها و آلژینات سدیم دارای تأثیرات مثبتی در پیشگیری از بیماری‌های ویبرویوسیس و لکه سفید در میگو بودند و میزان هموسیت کل در میگوی وانامی بعد از ده روز تغذیه با مخمر ساکارومایسیس سروزیه به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است، به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان THC برای تیمار T1 در روز ۲۵ آزمایش ثبت گردیده است (۴۲). نتایج حاصله از تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات انجام شده توسط Balasubramanian و همکاران (۴۳)، Lin و همکاران (۴۴) و Wongprasert و همکاران (۴۵) بروی جلبک گراسیلاریا هم‌خوانی دارد. میزان پروتئین کل پلاسما (TPP) نیز شبیه همولنف کل (THC) یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده سلامتی میگوها بوده و با تغییر سلامتی میگو تغییر می‌کند (۴۶). در مطالعه حاضر میزان TPP در تیمار ۳ (در روز نهم) میگوهایی تغذیه شده با عصاره

کلروفرم (۴/۲۶±۱۶۲/۴۷) بالاتر از سایر تیمارها بود. براساس گزارش Chen و Cheng تغییر در میزان TPP در تیمار به اندازه، سن، جنس، وضعیت تغذیه و شرایط محیطی بستگی دارد (۴۷). پروتئین کل پلاسما یکی از مهم‌ترین پارامترهای دفاعی در میگو می‌باشد، زیرا تعداد زیادی از الگوهای شناسایی رسپتورها (PRRs) شبیه متصل کننده‌های پروتئین گرم منفی، لیپوپلی‌ساکارید یا متصل کننده‌های پروتئینی بتا ۱ و ۳ گلوکان، پروتئین حاوی تیواستر، پروتئین مرتبط با فیبرینوژن که در همولنف و هپاتوپانکراس یافت می‌شوند مرتبط با TPP هستند (۴۸). به‌نظر می‌رسد افزایش میزان TPP در همولنف ناشی از مصرف عصاره کلروفرم بوده که موجب افزایش میزان PRRS در همولنف گردیده و این فاکتورها می‌توانند در محافظت میگوها در مقابل با بیماری ویبریو هاروی موثر باشند. میزان پروتئین پلاسمای کل نیز به‌عنوان یک شاخص تعیین کننده سلامتی میگوها مورد توجه قرار می‌گیرد (۴۶، ۴۹). براساس گزارش Wang و Wang، افزایش TPP ناشی از افزایش الگوهای شناسایی گیرنده‌ها (PRPs) مثل پروتئین شناسایی پپتیدو گلیکان (PGRPs)، پروتئین شناسایی باکتری‌های گرم منفی (GNBP)، پروتئین شناسایی لیپوپلی‌ساکارید (LGBPs) بوده که این پروتئین‌ها را می‌توان در همولنف و یا هپاتوپانکراس جدا نمود (۴۸). افزایش میزان TPP ناشی از پروتئین‌های غشا خارجی باکتری ویبریو آلژینولیتیکوس تزریق‌شده به میگوهای ببری سیاه به‌میزان ۱۰ تا ۳۰ میکروگرم بر وزن بدن میگو دارد (۵۰). براساس مطالعه Subramanian و Philip، میزان آنزیم‌های آلکالین فسفاتاز، فاکتورهای ایمنی TPP و THC در میگوهای تغذیه شده با بتا گلوکان افزایش یافته و این فاکتورها بقا بیش‌تری در میگو را به‌دنبال دارند (۵۱). یکی از آنزیم‌های مؤثر دیگر در واکنش‌های دفاعی میگوها آنزیم سوپراکسیداز دیسموتاز (SOD) می‌باشد که به‌طور وسیعی در بافت‌های هوازی و غیرهوازی پدید می‌آید. این آنزیم نیز در بررسی سلامتی میگوها مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. هم‌چون TPP، میزان SOD در تیمار ۳ (در روز نهم) میگوهایی تغذیه شده با عصاره کلروفرم (۱۲/۸۳±۲۸۵۳/۶۰) دارای بیش‌ترین مقدار در مقایسه با سایر تیمارها بود. نتایج تحقیق Chang و همکاران (۵۲) و Pacheco و همکاران (۵۳) با نتایج حاصل از تحقیق حاضر هم‌خوانی داشته و نشان می‌دهد که مصرف محرک‌های سیستم ایمنی موجب افزایش SOD در میگو شده است. SOD یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان می‌باشد که به‌طور وسیعی در بافت‌ها هوازی و غیرهوازی پراکنده است (۳۹). میگوهایی که با پاتوژن مواجهه داده می‌شوند، سیستم ایمنی با فعالیت فاگوسیتوزیس و شکل گرفتن میزان زیادی گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) که در فاگوسیتوز دخالت دارند مواجهه می‌شوند (۵۴). گونه‌های اکسیژن فعال شامل O_2، H_2O_2، OH و $1O_2$ بوده که در میگو شکل گرفته و نقش مهمی در ایمنی میگو دارند (۵۵). حذف سریع و مؤثر گونه‌های اکسیژن فعال جهت حیات و زنده ماندن میگوها لازم است. این فعالیت در میگو با سیستم آنتی‌اکسیدانی انجام می‌گیرد که شامل SOD می‌باشد (۵۶). در مطالعه حاضر بررسی مصرف عصاره کلروفرم استخراج شده در تیمارهای مختلف نشان‌دهنده افزایش میزان بقا و هم‌چنین بهبود فاکتورهای ایمنی در میگوهای تغذیه شده با عصاره‌های مصرف شده در مقایسه با میگوهای تغذیه شده با غذای تجاری بود و روند تغییرات بین تیمارهای مورد بررسی دارای تفاوت معنی داری بود ($P<0/05$).

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نویسندگان از زحمات کلیه همکاران و هم‌چنین معاونت تحصیلات تکمیلی دانشگاه آزاد بندرعباس که در طول انجام این مطالعه کمال مساعدت را داشتند، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. **Lebel, L., Mungkung, R., Gheewala, S.H. and Lebel, P., 2010.** Innovation cycles, niches and sustainability in the shrimp aquaculture industry in Thailand. Environmental Science and Policy. 13(4): 291-302.
2. **Rebouças, R.H., de Sousa, O.V., Lima, A.S., Vasconcelos, F.R., de Carvalho, P.B. and dos Fernandes Vieira, R.H.S., 2011.** Antimicrobial resistance profile of Vibrio species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil. Environmental Research. 111(1): 21-24.
3. **Bachère, E., 2000.** Shrimp immunity and disease control. Aquaculture. 191(1-3): 3-11.
4. **Xiong, J., Dai, W. and Li, C., 2016.** Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: the guidelines from an ecological perspective. Applied Microbiology and Biotechnology. 100(16): 6947-6954.
5. **Takahashi, Y., Kondo, M., Itami, T., Honda, T., Inagawa, H., Nishizawa, T., Gen-Ichiro, S. and Yokomizo, Y., 2000.** Enhancement of disease resistance against penaeid acute viraemia and induction of virus-inactivating activity in haemolymph of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*, by oral administration of *Pantoea agglomerans* lipopolysaccharide (LPS). Fish and Shellfish Immunology. 10: 555-558 .
6. **Chotigeat, W., Tongsupa, S., Supamataya, K. and Phongdara, A., 2004.** Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. Aquaculture. 233(1-4): 23-30.
7. **Supamattaya, K., Kiriratnikom, S., Boonyaratpalin, M. and Borowitzka, L., 2005.** Effect of a Dunaliella extract on growth performance, health condition, immune response and disease resistance in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture. 248(1-4): 207-216.
8. **Rungrassamee, W., Klanchui, A., Maibunkaew, S. and Karoonuthaisiri, N., 2016.** Bacterial dynamics in intestines of the black tiger shrimp and the Pacific white shrimp during *Vibrio harveyi* exposure. Journal of Invertebrate Pathology. 133: 12-19.

pretreatment on drying rate and rehydration properties of Chilean sea cucumber (*Athyonidium chilensis*). Food and Bioproducts Processing. 123: 284-295.

25. **Sinurat, E., Saepudin, E., Peranginangin, R. and Hudiyono, S., 2016.** Immunostimulatory activity of brown seaweed-derived fucoidans at different molecular weights and purity levels towards white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Applied Pharmaceutical Science. 6(10): 82-91.
26. **Huang, Y., Yin, Z., Weng, S., He, J. and Li, S., 2012.** Selective breeding and preliminary commercial performance of Penaeus vannamei for resistance to white spot syndrome virus (WSSV). Aquaculture. 364: 111-117.
27. **Afsharnasab, M., Kakoolaki, S. and Mohammadidost, M., 2016.** Immunity enhancement with administration of *Gracilaria corticata* and *Saccharomyces cerevisiae* compared to gamma irradiation in expose to WSSV in shrimp, in juvenile *Litopenaeus vannamei*: A comparative study. Fish and Shellfish Immunology. 56: 21-33.
28. **Zhou, X.X., Wang, Y.B. and Li, W.F., 2009.** Effect of probiotic on larvae shrimp (*Penaeus vannamei*) based on water quality, survival rate and digestive enzyme activities. Aquaculture. 287(3-4): 349-353.
29. **Abraham, T.J., Nagarajan, J. and Shanmugam, S.A., 2002.** Antimicrobial substances of potential biomedical importance from holothurian species. Indian Journal of Marine Sciences. 31(2): 161-164.
30. **Mokhlesi, A., Saeidnia, S., Gohari, A., Shahverdi, A.R., Mollazadeh-Moghaddam, K. and Es' haghi, N., 2011.** Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of *Bohadschia marmorata*, a sea cucumber from north coastal of Persian Gulf. Pharmacology Online. 3: 1029-1038.
31. **Shakouri, A., Shoushizadeh, M.R. and Nematpour, F., 2017.** Antimicrobial activity of sea cucumber (*Stichopus variegatus*) body wall extract in Chabahar Bay, Oman Sea. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products. 12(1): 1-5.
32. **Hernhdez-Lopez, J., Golkxs-Galwin, T. and Vargas-Albores, F., 1996.** Activation of the Prophenoloxidase System of the Brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). Comparative Biochemistry and Physiology. 113(1): 61-66 .
33. **Cerenius, L. and Söderhäll, K., 2004.** The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. Immunological Reviews. 198(1): 116-126.
34. **Lorenzo, S., De Guarrini, S., Smith, V.J. and Ferrero, E.A., 1999.** Effects of LPS injection on circulating haemocytes in crustaceans in vivo. Fish and Shellfish Immunology. 9: 31-50 .
35. **Chen, Y.Y., Chen, J.C., Tseng, K.C., Lin, Y.C. and Huang, C.L., 2015.** Activation of immunity, immune response, antioxidant ability, and resistance against Vibrio alginolyticus in white shrimp *Litopenaeus vannamei* decrease under long-term culture at low pH. Fish and Shellfish Immunology. 46(2): 192-199.
36. **Le Moullac, G. and Haffner, P., 2000.** Environmental factors affecting immune responses in Crustacea. Aquaculture. 191(1-3): 121-131.
37. **Liu, X., Hao, J., Shan, X., Zhang, X., Zhao, X., Li, Q., Wang, X., Cai, C., Li, G. and Yu, G., 2016.** Antithrombotic activities of fucosylated chondroitin sulfates and their depolymerized fragments from two sea cucumbers. Carbohydrate Polymers. 152: 343-350.
38. **Wang, D.L., Zuo, D., Wang, L.M., Sun, T., Wang, Q. and Zhao, Y.L., 2012.** Effects of white spot syndrome virus infection on immuno-enzyme activities and ultrastructure in

9. **Austin, B. and Zhang, X.H., 2006.** *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. Letters in Applied Microbiology. 43(2): 119-124.
10. **Won, K.M. and Park, S.I., 2008.** Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea. Aquaculture. 285(1-4): 8-13.
11. **Darshanee Ruwandeepika, H.A., Sanjeewa Prasad Jayaweera, T., Paban Bhowmick, P., Karunasagar, I., Bossier, P. and Defoirdt, T., 2012.** Pathogenesis, virulence factors and virulence regulation of vibrios belonging to the *Harveyi clade*. Reviews in Aquaculture. 4(2): 59-74.
12. **Bordbar, S., Anwar, F. and Saari, N., 2011.** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - a review. Marine drugs. 439(10): 1761-1805.
13. **Prasetio, E., Sudianto, A., Rozik, M., Nurdiyani, R., Sanusi, E., Nursyam, H. and Fariedah, F., 2013.** Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) by intramuscular administration of the outer membrane protein *Vibrio alginolyticus*. Springer Plus. 2(1): 1-8.
14. **Bai, N., Gu, M., Zhang, W., Xu, W. and Mai, K., 2014.** Effects of β-glucan derivatives on the immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against white spot syndrome virus infection. Aquaculture. 426-427: 66-73 .
15. **Farjami, B., Nematollahi, M.A., Noradi, Y., Irajian, G. and Nazemi, M. 2014.** Study of antibacterial effect of the extracts of the sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) of Persian Gulf on the Escherichia coli. Iranian Journal of Medical Microbiology. 8(1): pp: 27-33.
16. **Li, K.; Liu, L.; Clausen, J.H.; Lu, M. and Dalsgaard, A., 2016.** Management measures to control diseases reported by tilapia (*Oreochromis* spp.) and whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farmers in Guangdong, China. Aquaculture. 457: 91-99.
17. **Shadi, A. and Oujifard, A., 2019.** Antibacterial, cytotoxic and hemolytic activity of *Holothuria parva* sea cucumber from north Persian Gulf. International Journal of Environmental Science and Technology. 16(10): 5937-5944.
18. **Tsoumas, A., Alderman, D.J. and Rodgers, C.J., 1989.** *Aeromonas salmonicida*: development of resistance to 4-quinolone antimicrobials. Journal of Fish Diseases. 12(5): 493-507.
19. **Song, J.C. and Sung, C.S.P., 1993.** Fluorescence studies of diaminodiphenyl sulfone curing agent for epoxy cure characterization. Macromolecules. 26(18): 4818-4824.
20. **Mahasneh, I.H.S.A.N., Jamal, M., Kashashneh, M. and Zibdeh, M., 1995.** Antibiotic activity of marine algae against multi-antibiotic resistant bacteria. Microbios. 83: 23-26.
21. **Bhakuni, D.S. and Rawat, D.S., 2005.** Bioactive metabolites of marine algae, fungi and bacteria. Bioactive marine natural products. 1-25.
22. **Kelman, D., Kashman, Y., Rosenberg, E., Kushmaro, A. and Loya, Y., 2006.** Antimicrobial activity of Red Sea corals. Marine Biology. 149(2): 357-363.
23. **Dabbagh, A.R., Sedaghat, M.R., Rameshi, H. and Kamrani, E., 2011.** Breeding and larval rearing of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* Brandt (*Holothuria vegabunda* Selenka) from the northern Persian Gulf, Iran. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 31: 35-38.
24. **Tamarit-Pino, Y., Batías-Montes, J.M., Segura-Ponce, L.A., Díaz-Álvarez, R.E., Guzmán Meza, M.F. and Quevedo-León, R.A., 2020.** Effect of electrohydrodynamic

gills of *Cherax quadricarinatus*. Fish and Shellfish Immunology. 32: 645-650 .

39. **Yan, X., Jie, A., Jing-Qiu, S., Ya-Dong, Y. and Jun-Qiang, Y., 2010.** Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase in different tissues of *Litopenaeus vannamei*. Acta Hydrobiologica Sinica. 34(2): 402-409.

40. **Le Moullac, G., Soyez, C., Saulnier, D., Ansquer, D., Avarre, J.C. and Levy, P., 1998.** Effect of hypoxic stress on the immune response and the resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. Fish and Shellfish Immunology. 8: 621-629.

41. **Xiong, J., Dai, W. and Li, C., 2016.** Advances, challenges, and directions in shrimp disease control: the guidelines from an ecological perspective. Applied Microbiology and Biotechnology. 100(16): 6947-6954.

42. **Cheng, Y.H., Lee, D.N., Wen, C.M. and Weng, C.F., 2004.** Effects of β-glucan supplementation on lymphocyte proliferation, macrophage chemotaxis and specific immune responses in broilers. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 17(8): 1145-1149.

43. **Balasubramanian, G., Sarathi, M., Rajesh Kumar, S. and Sahul Hameed, A.S., 2007.** Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. Aquaculture. 263: 1-15.

44. **Lin, T., Xing, J., Jiang, J., Tang, X. and Zhan, W., 2011.** β-glucan-stimulated activation of six enzymes in the haemocytes of the scallop *Chlamys farreri* at different water temperatures. Aquaculture. 315: 213-221.

45. **Wongprasert, K., Rudtanatip, T. and Praiboon, J., 2014.** Immunostimulatory activity of sulfated galactans isolated from the red seaweed *Gracilaria fisheri* and development of resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp. Fish & shellfish immunology. 36(1): 52-60.

46. **Yoganandhan, K., Thirupathi, S. Sahul Hameed, A.S., 2003.** Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture. 221(1-4): 1-11.

47. **Chen, J.C. and Cheng, S.Y., 1993.** Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonieus* based on sex, size and moulting cycle. Comparative Biochemistry and Physiology. 106B: 293-296 .

48. **Wang, X.W. and Wang, J.X., 2013.** Pattern recognition receptors acting in innate immune system of shrimp against pathogen infections. Fish & Shellfish Immunology. 34: 981-989.

49. **Vogan, C.L. and Rowley, A.F., 2001.** Effects of shell disease syndrome on the hemocytes and humoral defenses of the edible crab, *Cancer pagurus*. Aquaculture. 205: 237-252 .

50. **Maftuch, M., Prasetio, E., Sudianto, A., Rozik, M., Nurdiyani, R., Sanusi, E., Nursyam, H., Fariedah, F., Marsoedi, M. and Murachman, M., 2013.** Improvement of innate immune responses and defense activity in tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fab.) by intramuscular administration of the outer membrane protein Vibrio alginolyticus. SpringerPlus. 2(1): 432-439.

51. **Subramanian, S. and Philip, R., 2013.** Identification of haematological markers in shrimp health assessment from the immune profile of *Fenneropenaeus indicus* on β-1, 3-glucan administration and white spot syndrome virus challenge. Aquaculture international. 21(5): 1169-1184.

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

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

54. **Mohankumar, K. and Ramasamy, P., 2006.** White spot syndrome virus infection decreases the activity of antioxidant enzymes in *Fenneropenaeus indicus*. Virus Research. 115: 69-75.

55. **Wu, C.C., Chang, Y.P., Wang, J.J., Liu, C.H., Wong, S.L., Jiang, C.M. and Hsieh, S.L., 2015.** Dietary administration of *Gynura bicolor* (Roxb. Willd.) DC water extract enhances immune response and survival rate against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in white shrimp *Litopeneaus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 42(1): 25-33.

56. **Zhang, Q., Li, F., Wang, B., Zhang, J., Liu, Y., Zhou, Q. and Xiang, J., 2007.** The mitochondrial manganese superoxide dismutase gene in Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*: cloning, distribution and expression. Developmental & Comparative Immunology. 31(5): 429-440.