

"مقاله پژوهشی"

اثر عصاره‌های آبی و استونی برگ درخت گردو ایرانی (*Juglans regia*) بر شاخص‌های رشد و بقا در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مقابله با باکتری ویبریو هاروی

صدف فروزانی^۱، مازیار یحیوی^{۱*}، مریم میربخش^۲، علیرضا سالارزاده^۱، بابک قائدنیا^۲

۱- گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۸

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات عصاره استونی و آبی برگ درخت گردو ایرانی بر عملکرد شاخص‌های رشد در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بود. جهت انجام این پژوهش ۴۰ روزه، شاخص‌های رشد و بازمانی میگوی سفید غربی در ۱۰ تیمار مورد بررسی قرار گرفت. ۶ تیمار که بعد از آلودگی با ویبریو هاروی (*Vibrio hareyi* IS 01 PTTC 1755) تحت تیمار ۳۰۰ mg/kg، ۲۰۰، ۱۰۰، ۳۰۰ و ۲۰۰ عصاره آبی برگ درخت گردو ایرانی و ۱۰۰ mg/kg عصاره استونی برگ درخت گردو ایرانی قرار گرفتند. ۲ تیمار کنترل منفی (تیمار بدون دریافت عصاره) و ۲ تیمار کنترل مثبت (تیمار دریافت‌کننده باکتری ویبریو هاروی و بدون دریافت عصاره) نیز جهت مقایسه تغییرات رشد و بازمانی در نظر گرفته شد. جهت انجام این پژوهش ۴۸۰ عدد میگوی سفید غربی با متوسط وزن 11 ± 0.59 گرم که با استفاده از آزمایش PCR عاری از بیماری (SPF) تشخیص داده شدند در تانک‌های ۳۰۰ لیتر نگهداری شدند. نتایج نشان داد که افزودن عصاره‌ها به صورت معنی‌داری باعث افزایش کارایی پروتئین در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل مثبت شد ($p \leq 0.05$). همچنین بر ضریب تبدیل مواد غذایی در روزهای ۲۰ و ۴۰ تأثیر مثبت گذاشته است ($p \leq 0.05$) و این تأثیر در عصاره استونی بیشتر از عصاره آبی می‌باشد ($p \leq 0.05$). دو شاخص وزن و طول در عصاره‌های آبی و استونی نسبت به گروه‌های کنترل افزایش معنی‌داری را نشان دادند ($p \leq 0.05$) اما در شاخص طول کاراپاس هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری در میان تیمارها دیده نشد ($p \geq 0.05$). در پایان دوره نگهداری، شاخص بازماندگی در تیمار ۱۰۰ mg/kg عصاره آبی و استونی به نسبت به گروه‌های دیگر و کنترل مثبت بالاتر بود ($p \leq 0.05$). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن عصاره‌های استونی و آبی برگ گردوی ایرانی به صورت معنی‌داری باعث افزایش کارایی پروتئین، شاخص تبدیل مواد غذایی، شاخص وزن، طول و شاخص بازماندگی شده است و بالاترین بهبود رشد در شرایط مقابله با باکتری در تیمار ۳۰۰ mg/kg عصاره آبی و استونی برگ درخت گردو ایرانی اندازه‌گیری شد.

کلمات کلیدی: میگوی سفید غربی، شاخص‌های رشد، برگ گردو، عصاره آبی، عصاره استونی.

مقدمه

صنعت آبرزی پروری یکی از بخش‌های مهم تولید غذا در جهان با سریع‌ترین میزان رشد سالانه می‌باشد که با توجه به کاهش صید جهانی، نقش این صنعت در تولید غذا اهمیت بیشتری یافته است و حدود ۴۶/۵ درصد از سرانه‌ی مصرف آبریان در جهان را تامین می‌کند (Zuo et al., 2018). وضعیت تغذیه‌ای یکی از عوامل موثر بر توانایی موجود در مقابله با عوامل تنش‌زا و بیماری‌زا است این موضوع به‌خصوص در میگو در مراحل اولیه پرورش لارو و در هنگام شروع تغذیه فعال، یکی از مهمترین مشکلات این صنعت است (Bruinsma, 2017). که با مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای شیمیایی همراه است. استفاده بیش از حد از این مواد اثرات نامطلوبی نظیر مقاوم شدن پاتوژن به آنتی بیوتیک، ماندگاری اثر داروها در بدن آبرزی و انتقال آنها به انسان در هنگام تغذیه شده است که این موضوع در کنار آلودگی محیط زیست باعث شده است راه کارهایی مانند استفاده از مکمل های طبیعی مد نظر قرار گیرد (Barman et al., 2013).

محرک های رشد و ایمنی که منشأ گیاهی دارند، مزیت های متعددی نسبت به محرک‌های رشد و ایمنی مصنوعی دارند که از این مزیت‌ها می‌توان به در دسترس بودن، آسیب کمتر برای محیط زیست و جانور و امکان تولید در سطح وسیع با قیمت پایین اشاره نمود (Poonkodi et al., 2016). در دو دهه اخیر موفقیت‌های زیادی در استفاده از گیاهان هم به عنوان مکمل رشد و هم به عنوان محرک ایمنی در صنعت آبرزی پروری حاصل شده است. گیاهان با بهبود دفاع غیراختصاصی و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و استرس‌زا ضمن بهبود سیستم ایمنی، بهره‌برداری از

مواد غذایی مصرفی توسط آبرزی را نیز افزایش می‌دهد (حاجی‌پور و همکاران، ۱۴۰۱، De Silva et al., 2018); *Juglans regia* یا درخت گردو، درختی برگ‌ریز در بلوچستان، شمال ایران، قفقاز، هیمالیا، ارمنستان و مناطق معتدل است که دارای اثرات باکتری‌کشی (Moori Bakhtiari et al., 2016) و ضد قارچی (Clark et al., 1990) است. ترکیبات فنلی موجود در برگ گردو اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها هستند که شامل بتاستواسترو، آسکوربیک اسید، فولیک اسید، گالیک اسید، جوگلون، رجبولون، کوئرستین پنتوزید، کوئرستین گزیلوزید، مشتق‌های کامپفرو و کوئرستین تری آلفا ال آرابینوزید است (قیاسی و همکاران، ۱۴۰۱؛ Calcabrini et al., 2017; Anjum et al., 2017). از جمله مطالعات انجام شده بر روی برگ درخت گردو می‌توان به استفاده از برگ درخت گردو به عنوان ضد باکتری در برابر *Propionibacterium Acnes* (Sharafati Chaleshtori et al., 2010)، ضد باکتری‌های بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia ruckeri*, *Streptococcus iniae*, *Staphylococcus aureus* در ماهیان (Tulabi dezfuli and Soleimani, 2016)، ضد باکتری *Aeromonas hydrophila* (آئروموناس هیدروفیلا) (Rahimi et al., 2019)، و نیز مطالعه ترکیبات زیست و آنتی‌اکسیدانی فعال درخت گردو (Fernandez- Agullo et al., 2020) اشاره کرد. برگ درخت گردو به دلیل فراوانی، در دسترس بودن و امکان تهیه‌ی ارزان آن بدون این‌که به درخت آسیب برساند، در صورت مؤثر بودن، می‌تواند جانشین مناسبی

ساقه جدا گردیده و بعد از شستشو با آب، در شرایط طبیعی محیط و در سایه بر روی نوارهای نایلونی پهن و تمیز قرار در دمای آزمایشگاه و در مجاورت جریان هوا خشک^۴ گردید (Chegeni *et al.*, 2016) پس از خرد کردن گیاه^۵ با دستگاه آسیاب و با الک چشمه ۴۰۰ میکرون به صورت پودر درآمده همچنین با توجه به اینکه یکی از عوامل اثرگذار در تعادل بین حلال و حل شونده اندازه ذرات می‌باشد عمل آسیاب کردن در چندین مرتبه صورت گرفته تا ریزترین پودر از برگ‌های گیاه مربوطه حاصل آید، در ادامه، عصاره گیاه^۶ از نمونه‌های آماده شده ۱۰۰ گرمی پودر خشک برگ درخت گردو ایرانی در ۵۰۰ میلی لیتر حلال (آب، استون) با کمک روش روتاری انجام شد (Shrafati-chaleshtori *et al.*, 2009).

چالش باکتریایی: در این مطالعه از سوش باکتری ویبریو هاروی (Vibrio hareyi IS 01 PTTC 1755) با شناسه ثبت در بانک جهانی ژن (GU 974342, 1) که پیش‌تر توسط پژوهشکده میگو جداسازی و خالص‌سازی گردیده بود برای چالش و بررسی بازماندگی استفاده شد. مراحل آماده کردن جیره غذای میگو موردنظر همانند بخش‌های عمل‌آوری خوراک به روش پلت در کارخانه‌ها غذا سازی اجرا شد (Gomes *et al.*, 2018) جیره‌های تهیه شده با توجه به وزن بیوماس هر تانک (Kaur *et al.*, 2019) و اندازه مناسب پلت برای میگوهای مورد مطالعه به قطعات کوچک‌تر خرد گردید و بعد از خشک شدن کامل درون کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و تهویه مناسب تا زمان استفاده (به

برای داروهای سنتتیک و غیرسنتتیک گردد (Nakajima *et al.*, 2017). از این رو هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات عصاره برگ درخت گردو ایرانی بر عملکرد شاخص‌های رشد در میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) بود.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در پژوهشکده میگوی ایران در شهر بوشهر در تابستان ۱۳۹۷ و در آزمایشگاه‌های میکروبیولوژی و شیمی (ISO/IEC 17025) انجام شد. تعداد ۴۸۰ عدد میگو سفید غربی جوان^۱ (SPF) که توسط آزمایش‌های پی سی آر دو مرحله‌ای^۲، عدم آلودگی آن‌ها به عفونت‌های اخطار کردنی OIE مورد تأیید قرار گرفته بود و با وزن 11 ± 0.59 گرم از مزارع پرورش میگو به سالن سرپوشیده در پژوهشکده میگو بوشهر منتقل گردید. ۳۰ تانک ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۰۰ لیتر آب دریا با شوری ۳۹/۰۵ گرم بر لیتر برای ۱۰ تیمار (۶ تیمار که بعد از آلودگی با ویبریو هاروی دریافت کننده درصدهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی و استونی درخت گردو، ۲ تیمار کنترل مثبت حاوی باکتری و بدون دریافت عصاره و ۲ تیمار کنترل منفی بدون دریافت عصاره گردو و عاری از باکتری) در نظر گرفته شد. در هر تانک ۱۶ عدد میگو قرارگرفت (Pott *et al.*, 2018). قبل از تیمار بندی به مدت ۷ روز دوره خوپذیری (آداپتاسیون) شد و استرس‌زدایی انجام شد (Osińska *et al.*, 2020).

آماده‌سازی گیاه^۳: برگ‌های تازه درخت گردو ایرانی از شهر شیراز جمع‌آوری شده، سپس برگ‌ها از

⁴ drying
⁵ grinding
⁶ extraction

¹ Specific Patogen Free
² Nested PCR
³ Pretreatment

سطح دقت ۹۵ درصد و بررسی بین دو یا چند متغیر با استفاده از آزمون جی ال ام^۵ و همچنین با استفاده از نرم افزار سس ورژن ۶۹/۲ صورت گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از اثر عصاره آبی برگ گردوی ایرانی بر شاخص‌های رشد در گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. در روز ۲۰، تیمارهای دریافت کننده عصاره‌های آبی و استونی برگ گردوی ایرانی نسبت به گروه کنترل مثبت و منفی به صورت معنی‌داری از نرخ رشد بالاتری برخوردار بودند ($p \leq 0/05$) (جدول ۱). کمترین نرخ رشد در تیمار کنترل مثبت اندازه‌گیری شد ($p \leq 0/05$). همچنین نتایج نشان می‌دهند با افزایش سطح عصاره‌های آبی و استونی از ۱۰۰ به ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، شاخص‌های رشد نسبی، نرخ رشد ویژه، نرخ کارایی پروتئین افزایش و ضریب تبدیل غذایی کاهش یافت ($p \leq 0/05$).

نتایج حاصل از جدول ۲ نشان می‌دهد که میگوهای که غذای حاوی عصاره‌های با غلظت‌های ۱۰۰ mg/kg، ۲۰۰ و ۳۰۰ را دریافت کرده‌اند بهتر از گروه کنترل مثبت عمل کرده‌اند ($p \leq 0/05$). بالاترین وزن در تیمار ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره آبی و بدون اختلاف معنی‌دار با کنترل منفی اندازه‌گیری شد ($p \geq 0/05$). کمترین وزن در تیمار کنترل مثبت اندازه‌گیری شد ($p \leq 0/05$).

مدت ۲ هفته یکبار) نگهداری و مصرف شد بعد از گذشت زمان مربوطه سازگاری و عادت‌دهی پست لاروها با جیره کنترل و محیط تانک‌ها، غذادهی با جیره‌های حاوی غلظت‌های مختلف برگ درخت گردو ایرانی به میزان ۳ مرتبه در روز (۸ صبح و ۱ ظهر و ۸ شب) انجام گردید (Otta et al., 2018).

در دوره‌ی پرورش وزن کل میگوها با ترازوی دیجیتالی با دقت یک‌صدم گرم و طول کل و طول کاراپاس در مطالعه‌ی Huang و همکاران (۲۰۰۰) افزایش طول کاراپاس به عنوان شاخص رشد ذکر شده است) با استفاده از خط کش میلی‌متری ثبت گردید. میزان مرگ‌ومیر نیز در هر تانک به صورت روزانه بررسی و ثبت می‌گردید. در رابطه با بررسی شاخص‌های رشد (افزایش وزن بدن، افزایش طول بدن، افزایش طول حلقه‌ای کاراپاس، درصد بقاء) در تیمارهای موردنظر با توجه به محاسبات Bay (۲۰۰۱) انجام گردید (Al Bloushi, 2018). زیست‌سنجی ۱ در طول دوره ۴۰ روزه در سه زمان اول دوره (روز صفر)، میان‌دوره (روز ۲۰) و پایان دوره (روز ۴۰) انجام گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

بعد از جمع‌آوری داده‌ها فاکتورهای میزان بازماندگی و عملکرد رشد (وزن کل، طول کل، طول کاراپاس) و شاخص‌های سلامتی در گروه شاهد با گروه تیمار، مقایسه و تجزیه و تحلیل آماری آن با نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۱، با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه^۳ و مقایسه میانگین‌ها پس از آزمون توکی^۴ در

¹ Biometry

² SPSS21

³ ANOVA One Way

⁴ TOKEY

⁵ General linear model (GLM)

⁶ SAS2/9

جدول ۱: مقایسه شاخص های رشد در گروه‌های تیمار شده با عصاره آبی برگ گردوی ایرانی

وزن (gr)				جیره حاوی عصاره آبی و استونی برگ گردوی ایرانی (mg/kg).		
نرخ رشد نسبی	نرخ رشد ویژه (درصد بر روز)	نرخ کارایی پروتئین	ضریب تبدیل غذایی			
۲۷۳/۵±۵۷/۶ ^a	۲/۰±۱۳/۴۷ ^a	۲/۰±۵۵/۴۹ ^a	۱/۰±۸۲/۱۴ ^a	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)		
۲۱۵/۷±۱۳/۱۵ ^b	۱/۰±۷۴/۱۲ ^b	۲/۰±۱۷/۱۲ ^b	۱/۰±۱۲/۶۱ ^b	آبی	۲۰ روز	
۲۰۹/۱±۷۱/۲۱ ^b	۱/۰±۳۱/۱۲ ^c	۲/۰±۰۶/۴۱ ^b	۱/۰±۵۱/۴۳ ^c	استونی		
۲۱۹/۱±۶۷/۰۹ ^b	۱/۰±۶۷/۷۱ ^b	۲/۰±۱۱/۰۷ ^b	۱/۰±۲۳/۱۷ ^{cb}	آبی		
۲۰۶/۵±۳۲/۹۸ ^b	۱/۰±۵۸/۱۸ ^{bc}	۲/۰±۱۶/۵۴ ^b	۱/۰±۴۱/۳۹ ^c	استونی		
۲۲۳/۰±۱۴/۱۲ ^b	۱/۰±۸۴/۰۸ ^{bc}	۲/۰±۴۸/۶۷ ^a	۱/۰±۲۹/۴۱ ^c	آبی	۳۰۰	
۲۱۶/۰±۱۱/۳۹ ^b	۱/۰±۶۳/۱ ^{bc}	۲/۰±۱۴/۷۷ ^c	۱/۰±۵۰/۶۹ ^c	استونی		
۷۶/۱±۰۷/۰۴ ^c	۰/۰±۸۳/۵۴ ^d	۲/۰±۵۳/۱۸ ^a	۱/۰±۰۲/۱۲ ^b	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)		
۴۸۶/۱±۵۷/۴۳ ^d	۳/۰±۰۹/۴۳ ^e	۳/۰±۹۱/۰۸ ^d	۲/۰±۱۹/۳۱ ^c	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)		
۴۲۳/۲±۱۷/۱ ^e	۲/۰±۸۱/۱۳ ^{ae}	۳/۰±۵۶/۷۱ ^e	۱/۰±۱۶/۰۲ ^{bc}	آبی	۴۰ روز	
۳۱۸/۲±۱۷/۱ ^f	۲/۰±۱۶/۸۷ ^a	۳/۰±۲۱/۵۹ ^f	۱/۰±۶۷/۲۹ ^a	استونی		
۴۶۹/۵±۵۷/۶ ^g	۲/۰±۹۵/۴۳ ^{ae}	۳/۰±۸۶/۴۸ ^d	۱/۰±۲۱/۲۵ ^c	آبی		
۳۴۲/۰±۱۱/۹ ^h	۲/۰±۴۱/۹۱ ^f	۳/۰±۳۹/۸۸ ^f	۱/۰±۷۰/۴۱ ^a	استونی		
۴۶۵/۲±۱۱/۳۲ ^g	۲/۰±۶۷/۴۳ ^g	۳/۰±۷۹/۹۱ ^d	۱/۰±۱۷/۶۱ ^{bc}	آبی	۳۰۰	
۳۸۱/۱±۲۷/۱۹ ⁱ	۲/۰±۳۷/۲۲ ^f	۳/۰±۲۵/۶۶ ^f	۱/۰±۵۹/۳۴ ^c	استونی		
۲۶۳/۵±۵۷/۶ ^a	۲/۰±۰۱/۴۳ ^a	۳/۰±۰۱/۰۹ ^e	۰/۰±۹۲/۵۶ ^b	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)		
*مقادیر نشان گذاری شده با حروف یکسان در یک ستون فاقد اختلاف معنی \pm SD mean ارایه شده است. مقادیر در این جدول به صورت دار در سطح ۵ درصد می باشند.						

جدول ۲: وزن (گرم) میگوهای سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف عصاره آبی و استونی گردوی ایرانی

وزن (gr)			گروه‌ها	
روز ۴۰	روز ۲۰	روز ۰		
۱۷/۰±۰۴/۶۶ ^e	۱۴/۰±۲۱/۳۴ ^b	۱۵/۱±۷۱/۲۱ ^a	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	
۱۶/۲±۲۴/۱۳ ^a	۱۶/۲±۱۱/۱۲ ^{ac}	۱۵/۱±۲۵/۲۱ ^{ab}	۱۰۰	عصاره آبی (mg/kg)
۱۶/۰±۲۱/۱۵ ^a	۱۵/۱±۱۹/۰۳ ^a	۱۴/۱±۹۶/۳۱ ^b	۲۰۰	
۱۷/۱±۱۳/۲۹ ^e	۱۴/۰±۱۳/۵۱ ^b	۱۵/۱±۴۱/۸۹ ^a	۳۰۰	
۱۵/۱±۸۴/۱۰ ^a	۱۴/۰±۳۸/۱۵ ^b	۱۴/۰±۳۲/۳۳ ^b	۱۰۰	عصاره استونی (mg/kg)
۱۵/۱±۴۰/۳۲ ^a	۱۵/۱±۲۱/۱۷ ^{ab}	۱۵/۱±۰۶/۳۱ ^b	۲۰۰	
۱۴/۱±۱۲/۱۵ ^b	۱۴/۱±۱۷/۶۱ ^b	۱۴/۰±۰۱/۴۶ ^b	۳۰۰	
۱۳/۲±۰۷/۱۳ ^{bd}	۱۲/۰±۱۲/۱۱ ^d	۱۵/۲±۶۷/۱۹ ^a	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)	

* مقادیر در این جدول بصورت $(\text{mean} \pm \text{SD})$ ارایه شده است. مقادیر نشان گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

همچنین نتایج تاثیرات عصاره آبی بر رشد طولی میگوهای لیتوپنوس و انامی در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد طول کل میگوها در روز ۴۰ در گروه کنترل برابر با $17/37 \pm 3/13$ cm بوده که در مقایسه با تیمارهای حاوی با غلظت‌های مختلف از عصاره گردوی ایرانی، با تفاوت معنی‌دار بالاتر بود ($p \leq 0/05$). بعد از تیمار کنترل منفی، تیمار ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره استونی بالاترین طول را داشت و سایر تیمارهای عصاره آبی و استونی برگ گردو طول کل پایین‌تری داشتند ($p \leq 0/05$).

جدول ۳: طول کل (سانتی متر) میگوهای سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف عصاره آبی برگ گردوی ایرانی

طول کل (سانتی متر)			گروه‌ها	
روز ۴۰	روز ۲۰	روز ۰		
$17/3 \pm 3/13^b$	$13/0 \pm 85/58^a$	$13/0 \pm 31/55^a$	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	
$13/0 \pm 85/50^a$	$13/0 \pm 75/45^a$	$13/0 \pm 58/35^a$	۱۰۰	عصاره آبی (mg/kg)
$13/0 \pm 83/54^a$	$13/0 \pm 55/53^a$	$13/0 \pm 33/85^a$	۲۰۰	
$13/0 \pm 57/50^a$	$15/3 \pm 35/14^c$	$13/0 \pm 85/44^a$	۳۰۰	
$14/1 \pm 45/31^a$	$14/0 \pm 65/41^a$	$14/1 \pm 12/05^a$	۱۰۰	عصاره استونی (mg/kg)
$14/1 \pm 16/7^a$	$14/0 \pm 51/81^a$	$14/1 \pm 65/32^a$	۲۰۰	
$15/1 \pm 17/18^c$	$14/1 \pm 12/08^a$	$13/1 \pm 98/41^a$	۳۰۰	
$11/0 \pm 73/58^d$	$15/3 \pm 33/53^c$	$13/0 \pm 8/47^a$	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)	

* مقادیر در این جدول بصورت ($\text{mean} \pm \text{SD}$) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

نتایج جدول ۴ نشان داد که در پایان دوره‌ی آزمایش، طول کارپاس تحت تاثیر افزودن عصاره آبی و استونی قرار نگرفت و میزان این شاخص در روز ۴۰ نگهداری، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای دارای عصاره آبی و استونی و کنترل مثبت و منفی وجود نداشت ($p \geq 0/05$).

جدول ۴: نتایج حاصل از طول کاراپاس (سانتی متر) میگوهای سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف عصاره آبی گردوی ایرانی

طول کاراپاس (سانتی متر)			گروه‌ها
روز ۰	روز ۲۰	روز ۴۰	
۴/۰±۳۷/۱۱ ^a	۴/۰±۳۵/۲۴ ^a	۴/۰±۳۷/۲۱ ^a	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)
۴/۰±۲۴/۴۸ ^a	۴/۰±۱۷/۱۸ ^a	۴/۱±۱۵/۱۳ ^{ab}	عصاره آبی ۱۰۰
۴/۰±۱۵/۲۵ ^a	۴/۰±۱/۲۴ ^a	۳/۱±۹۸/۲۷ ^b	۲۰۰
۴/۰±۳۷/۱۱ ^a	۴/۰±۱۶/۱۲ ^a	۴/۰±۳۷/۳۰ ^{ab}	۳۰۰
۴/۰±۳۰/۲۱ ^a	۴/۰±۰۲/۲۱ ^a	۱±۴/۳۲ ^{ab}	عصاره استونی ۱۰۰
۴/۰±۳۱/۲۳ ^a	۴/۰±۱۰/۱۴ ^a	۳/۲±۰۸/۲۷ ^b	۲۰۰
۴/۰±۳۸/۲۱ ^a	۴/۰±۲۹/۲۳ ^a	۴/۰±۱۹/۲۲ ^{ab}	۳۰۰
۴/۰±۳۹/۶۵ ^a	۴/۰±۳۰/۳۱ ^a	۴/۰±۲۱/۲۰ ^{ab}	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)

* مقادیر در این جدول بصورت (mean ± SD) ارائه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۰/۰۵ درصد می‌باشند.

با گروه کنترل نشان دادند و تنها گروه عصاره آبی ۱۰۰ mg/kg، ۱۰۰ mg/kg، ۳۰۰ mg/kg استونی و گروه کنترل مثبت تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها نمایش داد ($p \leq 0/05$). در زمان ۴۸ ساعت بعد از مواجهه با باکتری تنها گروه‌های تیمار حاوی mg/kg ۱۰۰ استونی و ۳۰۰ آبی تفاوت معنی‌داری نسبت به دیگر تیمارها نشان نداد و بقیه گروه‌ها میزان تلفات معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل منفی نشان دادند ($p \leq 0/05$) (جدول ۵).

چالش بین میگوها با باکتری ویبریو هاروی لومینوسنس (Vibrio hareyi IS 01 PTTC 1755) در ۱۱ روز انتهایی پرورش انجام شد که نتایج آن در جداول ۵، ۶ و ۷ آورده شده است. در زمان صفر و ۶ ساعت بعد از مواجهه با باکتری در تمام تیمارها هیچگونه تلفاتی وجود نداشت ($p \geq 0/05$). در زمان ۱۲ ساعت بعد از مواجهه تیمار حاوی mg/kg ۲۰۰ آبی و mg/kg ۳۰۰ عصاره استونی دارای اختلاف معنی‌دار با دیگر تیمارها بوده اند ($p \leq 0/05$). در زمان ۲۴ ساعت بعد از مواجهه با باکتری تیمارها اختلاف معنی‌داری را

جدول ۵: نتایج حاصل از درصد بازماندگی میگوهای سفید غربی تیمار شده با عصاره آبی و استونی برگ گردوی ایرانی پس از گذشت ۰ الی ۴۸ ساعت.

جیره حاوی	زمان سپری شده پس از مواجهه (ساعت)				
عصاره گردوی ایرانی (mg/kg)	میانگین میزان بازماندگی (درصد) در هر تکرار				
	۰	۶	۱۲	۲۴	۴۸
کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a
آبی	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$92/3 \pm 33/5^{bc}$
استون ی	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	$95/66 \pm 3/78^{ab}$
آبی	0 ± 100^a	0 ± 100^a	$93/2 \pm 33/08^b$	$93/3 \pm 33/74^{ab}$	$86/2 \pm 66/51^c$
استون ی	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	$96/3 \pm 33/74^{ab}$	$86/2 \pm 66/51^{bc}$
آبی	0 ± 100^a	0 ± 100^a	$95/3 \pm 66/79^{ab}$	$95/3 \pm 66/78^{ab}$	$95/3 \pm 66/78^{ab}$
استون ی	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	$86/2 \pm 66/51^{bc}$	$86/2 \pm 66/51^c$
کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)	0 ± 100^a	3 ± 98^a	$93/3 \pm 33/74^{ab}$	$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$88/2 \pm 33/70^{bc}$

* مقادیر در این جدول به صورت (mean \pm SD) ارائه شده است. مقادیر نشان گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی

دار در سطح ۵ درصد می باشند.

معنی دار آماری را از لحاظ میزان بازماندگی نشان داده اند ($p \leq 0/05$). (جدول ۶).

در روز چهارم بعد از مواجهه تیمارها با باکتری فقط تیمار mg/kg ۱۰۰ استونی با $95/66 \pm 3/78$ درصد بازماندگی اختلاف معنی داری را به خود اختصاص نداده است. در روز پنجم و ششم نیز تنها تیمار mg/kg ۱۰۰ استونی با $95/66 \pm 3/78$ درصد بازماندگی اختلاف معنی داری را به خود اختصاص نداده است ($p \leq 0/05$). در روز هفتم همه گروهها با کنترل منفی اختلاف

جدول ۹: نتایج حاصل از درصد بازماندگی میگوهای سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف عصاره آبی گردوی ایرانی پس از گذشت ۴ الی ۷ روز.

زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)				جیره حاوی عصاره‌های گردوی ایرانی (mg/kg)	
میانگین میزان بازماندگی (درصد) در هر تکرار					
روز چهارم	روز پنجم	روز ششم	روز هفتم		
0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	
$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$92/3 \pm 33/5^{bc}$	آبی	۱۰۰
$95/66 \pm 3/78^{ab}$	$95/66 \pm 3/78^{ab}$	$95/66 \pm 3/78^{ab}$	$91/66 \pm 3/51^b$	استونی	
$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	آبی	۲۰۰
$86/2 \pm 66/70^{bc}$	$86/2 \pm 66/70^{bc}$	$86/2 \pm 66/70^{bc}$	$86/2 \pm 66/70^{bc}$	استونی	
$91/3 \pm 66/78^b$	$91/3 \pm 66/78^b$	$91/3 \pm 66/78^b$	$91/3 \pm 66/78^b$	آبی	۳۰۰
$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	استونی	
$88/2 \pm 33/70^{bc}$	$86/3 \pm 66/55^d$	$81 \pm 3/5^d$	$78/67 \pm 3/10^d$	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)	

* مقادیر در این جدول بصورت (mean \pm SD) ارایه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

در روزهای هشتم تا یازدهم تمامی گروه‌های با کنترل مثبت اختلاف معنی دار آماری را داشتند (جدول ۱۰). بررسی‌های بیشتر نشان می‌دهد که در پایان روز ۱۱ عصاره آبی و استونی ۱۰۰ mg/kg با درصد زنده مانعی به ترتیب $92/3 \pm 33/5$ و $91/66 \pm 3/51$ به صورت معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر و کنترل مثبت داشتند که نشان می‌دهد که این عصاره‌ها باعث بقاء بیشتر میگوها شده است.

جدول ۱۰: نتایج حاصل از درصد بازماندگی میگوهای سفید غربی تغذیه شده با جیره‌های حاوی مقادیر مختلف عصاره آبی گردوی ایرانی پس از گذشت ۸ الی ۱۱ روز.

زمان سپری شده پس از مواجهه (روز)				جیره حاوی عصاره‌های گردوی ایرانی (mg/kg)	
میانگین میزان بازماندگی (درصد) در هر تکرار					
روز هشتم	روز نهم	روز دهم	روز یازدهم		
0 ± 100^a	0 ± 100^a	0 ± 100^a	2 ± 95^a	کنترل منفی (بدون دریافت عصاره)	
$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$92/3 \pm 33/5^{bc}$	$92/1 \pm 33/25^{bc}$	$92/3 \pm 33/5^b$	آبی	۱۰۰
$91/66 \pm 3/51^b$	$91/66 \pm 3/51^b$	$91/66 \pm 3/51^b$	$91/66 \pm 3/51^b$	استونی	
$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$83/33 \pm 2/08^c$	$83/33 \pm 2/08^c$	آبی	۲۰۰
$86/2 \pm 66/70^{bc}$	$86/2 \pm 66/70^{bc}$	$86/2 \pm 66/70^{bc}$	$86/2 \pm 66/70^{bc}$	استونی	
$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	آبی	۳۰۰
$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$86/2 \pm 66/51^c$	$83/33 \pm 2/08^c$	استونی	
$78/67 \pm 3/10^d$	$68 \pm 2/94^d$	$63/33 \pm 2/14^c$	$50 \pm 1/41^c$	کنترل مثبت (ویبریو هاروی و بدون عصاره)	

* مقادیر در این جدول به صورت (mean \pm SD) ارایه شده است. مقادیر نشان‌گذاری شده با حروف یکسان فاقد اختلاف معنی دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

بحث

در این مطالعه از عصاره‌های برگ گردوی ایرانی، برای زیست‌سنجی و بازماندگی میگوهای لیتوپنئوس و انامی استفاده شد. با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه تاثیر این گیاه بر روی شاخص‌های رشد ماهی و یا میگو و یا سایر موجودات انجام نشده است، جهت بررسی و تجزیه و تحلیل نتایج از پژوهش‌های مشابه استفاده شده است. نتایج حاصل نشان داد افزودن عصاره به ترکیب غذایی میگوی سفید غربی موجب ایجاد روندی افزایشی در شاخص افزایش وزن (WG) و نرخ رشد ویژه (SGR) در مقایسه با جیره گروه کنترل شد. بیشترین افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در جیره حاوی ۳۰۰ mg/kg عصاره آبی گردوی ایرانی مشاهده شد. در بررسی نرخ کارایی پروتئین نیز عصاره آبی ۳۰۰ mg/kg به صورت معنی‌داری در روزهای ۲۰ و ۴۰ تاثیر مثبتی بر کارایی پروتئین گذاشت. همچنین افزودن عصاره آبی و استونی بر شاخص تبدیل مواد غذایی در روزهای ۲۰ و ۴۰ مطالعه تاثیر مثبتی داشت. مطالعات گوناگون بر گونه‌های مختلف مبین اثرات مثبت و در برخی گونه‌های دیگر حاکی از موثر بودن عصاره برگ گردو در جیره بر شاخص‌های رشد جانداران است. بلو و همکاران (۲۰۱۳) بیان نمودند که افزودن عصاره‌ی برگ گردو به جیره میگوی پا سفید غربی (در مرحله پست لارو ۱۵) به مدت ۱۶ هفته تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های افزایش وزن و نرخ رشد ویژه نسبت به گروه کنترل نداشته است (Bello et al., 2013).

علت احتمالی افزایش در شاخص‌های افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در پژوهش ذکر شده و همچنین تیمار حاوی برگ گردو در تحقیق حاضر را می‌توان به وجود فلاونوئیدها است که باعث جذب آبی‌پروری به غذا و

تحریک اشتها و ترشح آنزیم‌های گوارشی، متعادل نمودن فلور باکتری روده و در نتیجه بهبود هضم و افزایش مصرف غذا می‌شود، نسبت داد (Talpurand, Ikhwanuddin, 2012; Platel and Srinivasan, 2004; Khalil et al., 2001). همچنین در میگوهای که غذای حاوی عصاره‌ها را دریافت کرده‌اند شاخص وزن و طول بهتر از گروه کنترل بود.

مطالعات نشان داده است که استرس در موجودات آبی می‌تواند باعث کاهش وزن شود (Anderson et al., 2003). عصاره گردو حاوی فلاونوئیدهایی مثل ژوگلون بوده که با تحریک ترشح انسولین از پانکراس موجب افزایش گلوکز خون شده و به عنوان عامل ضد استرس عمل کرده (Sahu et al., 2007; Srinivasan, 2005) و با بهبود ذخیره انرژی، وزن و طول میگوها در مقایسه با شاهد افزایش یافته است (Dall et al., 1990). در مطالعه حاضر افزایش طول کارپاس در اثر افزایش رشد اتفاق نیافته است. Huang و همکاران (۲۰۰۰) بیان نمودند که میگو با در اختیار داشتن غذای کافی و با کیفیت می‌تواند طول کارپاس بهتری داشته باشد. با توجه به عدم افزایش طول کارپاس در تیمارهای دریافت کننده عصاره برگ گردو، نظر می‌رسد که این عصاره بر افزایش کیفیت جیره‌ی غذایی تاثیر مثبتی نداشت. البته لازم به ذکر است که Wang و همکاران (۲۰۰۴) بیان نمودند که رشد در میگو ارتباط مستقیمی با مصرف غذا، هضم و جذب آن دارد، درحالی‌که افزایش طول کارپاس بر اثر ترشح هورمون اتفاق می‌افتد که می‌تواند توجیه نتایج مطالعه‌ی حاضر باشد.

افزودن عصاره آبی و استونی گردوی ایران به صورت معنی‌داری باعث افزایش کارایی پروتئین در

معنی‌داری نسبت به گروه‌های دیگر و کنترل مثبت داشتند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن عصاره‌های استونی و آبی برگ گردوی ایرانی به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش کارایی پروتئین، شاخص تبدیل مواد غذایی، شاخص وزن، طول و شاخص بازماندگی شده است.

سپاسگزاری

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

منابع

۱. حاجی‌پور، م.، زمینی، ع.، ولی‌پور، ع.، ۱۴۰۱. تاثیر افزودن اکالپیتوس (*Eucalyptus globules*) و آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) به جیره غذایی بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بر شاخص‌های رشد، بقا و فلور میکروبی روده. نشریه توسعه آبی-پروری، ۱۶، ۸۷-۷۷.
۲. قیاسی، م.، بینائی، م.، قائدینا، ب.، فارابی، س.م.، علوی، ا.، ۱۴۰۱. ارزیابی اثر اسانس اکالپیتوس (*Eucalyptus globules*) بر شاخص‌های رشد، خون، ایمنی و افزایش مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در ماهیان کپور پرورشی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبی‌پروری، ۱۶، ۱۳۱-۱۱۹.

3. Akomolafe, S.F., Oboh, G., 2017. Walnut leaf extract acts as a fertility agent in male Wistar albino rats—A search for herbal male fertility enhancer. Journal of

گروه‌های تیمار شده نسبت به گروه کنترل مثبت شد که در این میان عصاره آبی ۳۰۰ mg/kg بالاترین کارایی را بر روی نرخ بازده پروتئین داشت. Akomolafe و همکاران (۲۰۱۷) با افزودن عصاره برگ گردو به جیره غذایی موش به این نتیجه رسیدند که در تیمارهای تغذیه شده با جیره حاوی برگ گردو، درصد باروری، نرخ بازده پروتئین و نرخ بازده تبدیل غذایی نسبت به گروه کنترل بهبود یافته بود.

به نظر می‌رسد که عصاره برگ گیاهان به‌عنوان یک ماده‌ی غذایی با طعم و بوی تحریک‌کننده در غذا می‌تواند با تحریک ویژگی‌های تغذیه‌ای در آبزیان باعث جذب میگوی پا سفید غربی به غذا شود. ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ی برگ گردو به‌وسیله تحریک سیستم عصبی باعث افزایش ترشح آنزیم‌های هپاتوپانکراس و گوارشی می‌گردد (Sreenivasamurthy and Krishnamurthy, 1959).

همچنین این ترکیبات با افزایش فعالیت دستگاه گوارشی موجب کاهش زمان عبور غذا شده و تخلیه آن را از دستگاه گوارش سرعت بخشیده و اشتهای آبی را برای دریافت غذا افزایش می‌دهند. به نظر می‌رسد که افزایش بالاتر از ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سطح عصاره‌ی گردو در جیره‌ی غذایی می‌تواند موجب اثرات منفی در شاخص‌های رشد در میگوی پا سفید غربی گردد که احتمالاً به دلیل تشدید بو و طعم تند عصاره است (Mesalhy Aly et al., 2008). عصاره‌ی گردو با اثرگذاری بر آنزیم‌های کبدی و به‌خصوص پروتئازها باعث بهبود کارایی هضم و جذب پروتئین‌های جیره شد. در پژوهش حاضر مشخص شد که در پایان دوره آزمایش، عصاره آبی و استونی ۱۰۰ mg/kg با درصد زنده مانی بیشتر به صورت

- shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in Korean markets as a source of *Aeromonas* spp. harboring antibiotic and heavy metal resistance genes. *Microbial Drug Resistance*, 24, 1587–1598.
13. Fernandez-Agullo, A., Castro-Iglesias, A., Freire, M.F., Gonazlez-Alvarez, J., 2020. Optimization of the Extraction of Bioactive Compounds from Walnut (*Juglans major* 209 x *Juglans regia*) Leaves: Antioxidant Capacity and Phenolic Profile. *Antioxidants*, 9, 1-14.
 14. Gomes, F., Martins, N., Barros, L., Rodrigues, M.E., Oliveira, M.B.P.P., Henriques, M., Ferreira, I.C.F.R., 2018. Plant phenolic extracts as an effective strategy to control *Staphylococcus aureus*, the dairy industry pathogen. *Industrial Crops and Products*, 112, 515–520.
 15. Kaur, M., Kumar, M., Singh, D., Sachdeva, S., Puri, S.K., 2019. A sustainable biorefinery approach for efficient conversion of aquatic weeds into bioethanol and biomethane. *Energy Conversion and Management*, 187, 133–147.
 16. Mouri Bakhtiari, N.; Jamshidian, J., Khalafi, E., 2016. Effect of *Juglans regia* L. Stem Bark Hydroalcoholic Extract on Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 11(1), 29095-290101.
 17. Nakajima, T., Aratani, S., Yagishita, N., Fujita, H., 2017. Antiobesity Agent Containing Walnut Extract. *Patent Publication*, 47, 134–139.
 18. Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Niestępski, S., Konopka, I., 2020. Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381, 121-221.
 19. Otta, S.K., Praveena, P.E., Raj, R.A., Saravanan, P., Priya, M.S., Amarnath, C.B., Bhuvaneswari, T., Panigrahi, A., Ravichandran, P., 2018. *Pythium insidiosum* as a new opportunistic fungal pathogen for Pacific white shrimp, Complementary and Integrative Medicine, 15, 112-120.
 4. Al Bloushi, A.I.H., 2018. Effect of Stocking Density Using Tilapia *Oreochromis niloticus* on Aquaponic System and Cultivation of Cherry Tomato *Solanum Lycopersicum* under Uae Condition. *Biology*, 12, 131-144.
 5. Anjum, S., Gani, A., Ahmad, M., Shah, A., Masoodi, F., Shah, Y., Gani, A., 2017. Antioxidant and antiproliferative activity of walnut extract (*Juglans regia* L.) processed by different methods and identification of compounds using GC/MS and LC/MS technique. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, 127- 156.
 6. Barman, D., Nen, P., Mandal, S.C., Kumar, V., 2013. Immunostimulants for aquaculture health management. *Journal of Marine Science. Research and Development*, 3(3), 1-11.
 7. Bello, O., Olaifa, F., Emikpe, B., Ogunbanwo, S., 2013. Potentials of walnut (*Tetracarpidium conophorum* Mull. Arg) leaf and onions (*Allium cepalinn*) bulb extracts as antimicrobial agents for fish. *African Journal of Microbiology Research*, 52, 195–220.
 8. Bruinsma, J., 2017. World agriculture: towards 2015/2030: an FAO study. *Routledge*. p. 139.
 9. Calcabrini, C., De Bellis, R., Mancini, U., Cucchiarini, L., Stocchi, V., Potenza, L., 2017. Protective effect of *Juglans regia* L. walnut extract against oxidative DNA damage. *Plant foods for human nutrition*, 72, 192–197.
 10. Chegeni, A.S., Ezatpour, B., Mohebbali, M., Mahmoudvand, H., Zibaei, M., Ebrahimzadeh, F., Rashidipour, M., Babaei, N., Dokhaharani, S.C., 2016. Effect of peel and leaf extract of walnut (*Juglans regia* L.) on Cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in BALB/c Mice. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 9, 2490–2495.
 11. Clark, A.M., Jurgens, T.A., Hufford, C.D., 1990. Antimicrobial activity of juglone. *Phytotherapy Research*, 4 (1), 1–14
 12. De Silva, B.C., Hossain, S., Dahanayake, P.S., Heo, G.-J., 2018. Frozen white-leg

- Litopenaeus vannamei*. Indian Journal of Geo Marine Sciences, 90, 1036-1041.
20. Poonkodi, A., Padmavathy, P., Srinivasan, A., Shakila, R., Anand, T., 2016. Water quality characteristics of *Litopenaeus vannamei* shrimp culture systems in Thoothukudi district. Journal of Experimental Zoology India, 19, 195–200.
 21. Pott, A., Otto, M., Schulz, R., 2018. Impact of genetically modified organisms on aquatic environments: Review of available data for the risk assessment. Science of the Total Environment, 635, 687–698.
 22. Rahimi, R., Mohseni Si Sakht, P., Hashemi, G., 2019. Study of antibacterial effect of walnut flower against bacterial *Aeromonas hydrophila* in vitro. Journal of Aquaculture Development, 11, 45-51.
 23. Shrafati-chalesshtori, F., Sharafati-chalesshtori, R., Shakerian, A., Momtaz, H., 2009. Detection of Mycobacterium Paratuberculosis using polymerase chain reaction (PCR) in cow raw milk samples in shahre-kord. Medical Laboratory Journal, 3, 1123 –1212.
 24. Sharafati Chaleshtori, R., Sharafati chaleshtori, F., Sharafati chaleshtori, A., Rafieian, M., 2010. Antibacterial Effects of Ethanolic Extract of Walnut Leaves (*Juglans Regia*) on Propionibacterium Acnes. Journal of Advances in Medical and Biomedical Research, 18 (71), 42-49.
 25. Tulabi dezfuli, Z., Soleimani, B., 2016. Invitro effect of *Juglans regia* li. stem bark hydroalcoholic extract on some bacterial pathogens of fish. Iranian Veterinary Journal, 2, 103-108.
 26. Zuo, H., Yuan, J., Niu, S., Yang, L., Weng, S., He, J., Xu, X., 2018. A molting-inhibiting hormone-like protein from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* is involved in immune responses. Fish and shellfish immunology, 72, 544–551.