



University of Hormozgan

Journal of Aquatic Ecology

ISSN Print: 2322-2751 ISSN Online: 2980-9355

Homepage: <https://jae.hormozgan.ac.ir>



Biological and Economic Effects of Bermuda Grass (*Cynodon dactylon*) Extract on Growth Performance, Immuno-Antioxidant Responses, Survival under WSSV Challenge, and Cost-Benefit Outcomes in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

Malahat Badrouj¹, Alireza Salarzadeh¹✉, Maziar Yahyavi¹, Ehsan Kamrani²

1. Department of Fishery, Bandar Abbas Campus, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.

2. Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and Technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 12 September 2025

Accepted: 27 October 2025

Published: 12 May 2026

✉Corresponding Author:

reza1375bandar@yahoo.com

Keywords:

Cynodon dactylon extract,
Litopenaeus vannamei,
White Spot Syndrome Virus,
Growth performance,
Innate immunity,
Antioxidant status.

ABSTRACT

The farming of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, represents a major component of global aquaculture and contributes significantly to food security and coastal economies worldwide. However, outbreaks of White Spot Syndrome Virus (WSSV) remain one of the most serious biological challenges affecting this industry, often causing severe mortality and substantial economic losses. In this context, the present study evaluated the biological and economic effects of dietary supplementation with Bermuda grass, *Cynodon dactylon*, extract in shrimp culture. Shrimp were fed diets containing graded levels of the extract (0, 200, 400, 800, and 1200 mg kg⁻¹) for 42 days prior to experimental WSSV challenge. The results demonstrated that dietary supplementation with Bermuda grass extract significantly improved growth performance, innate immune responses, antioxidant capacity, and post-challenge survival in a dose-dependent manner ($p < 0.05$). Quadratic regression analysis identified the biological optimum inclusion range at approximately 900–1100 mg kg⁻¹, whereas economic evaluation indicated that 800 mg kg⁻¹ provided the highest return on investment (ROI). Overall, the findings suggest that dietary supplementation with Bermuda grass extract at 800–1000 mg kg⁻¹ can be considered an effective and economically sustainable strategy for improving health status, growth performance, disease resistance, and production profitability in *L. vannamei* culture systems.



Publisher: University of Hormozgan

EXTENDED ABSTRACT

Introduction

The rapid intensification of aquaculture production of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, has substantially increased global shrimp output but has also heightened susceptibility to infectious diseases, particularly White Spot Syndrome Virus (WSSV), which can cause catastrophic mortalities within a few days (FAO, 2024; Islam *et al.*, 2022). Increasing environmental concerns and restrictions on the use of chemical therapeutics have stimulated interest in phytogetic feed additives with immunostimulatory, antioxidant, and antimicrobial properties (Wang *et al.*, 2024; Ghosh *et al.*, 2023). Bermuda grass, *Cynodon dactylon*, contains high levels of phenolic and flavonoid compounds and has shown potential for enhancing innate immunity and oxidative balance in aquatic animals (Savadi *et al.*, 2020). Although previous studies have suggested beneficial effects of this plant against WSSV infection (Tomazelli Júnior *et al.*, 2016), information regarding optimal dietary inclusion levels and economic feasibility under commercial farming conditions remains limited. Therefore, the objectives of the present study were to: (i) evaluate the dose-dependent effects of dietary *C. dactylon* extract on growth performance, feed utilization, immune response, and antioxidant status of shrimp; (ii) determine resistance to WSSV following experimental challenge; and (iii) assess the economic efficiency of supplementation under commercial production conditions in Iran.

Materials and Methods

A 42-day feeding trial was conducted at a commercial shrimp farm in southern Iran (Kalah–Minab). The experiment was performed using 500-L fiberglass tanks containing 400 L of seawater, each stocked with 80 juvenile shrimp (initial body weight approximately 2–3 g). The study followed a completely randomized design consisting of five dietary treatments with three replicates per treatment. Water quality parameters remained within optimal ranges throughout the trial, including salinity ($41.0 \pm 0.6\text{‰}$), temperature ($29.1 \pm 0.8^{\circ}\text{C}$), pH (8.05 ± 0.15), and dissolved oxygen ($5.8 \pm 0.4 \text{ mg L}^{-1}$).

Five isonitrogenous ($\sim 40\%$ crude protein) and isolipidic ($\sim 8\%$ lipid) experimental diets were prepared containing 0, 200, 400, 800, or 1200 mg kg^{-1} ethanolic extract of *C. dactylon*. The aerial parts of the plant were extracted using 70% ethanol, concentrated under vacuum, freeze-dried, and standardized based on total phenolic content. The extract was top-coated onto feed pellets using food-grade ethanol and 1% soy lecithin to improve coating stability. Shrimp were fed to apparent satiation four times daily, and feeding rates were adjusted biweekly. Growth performance indicators included final body weight, weight gain, specific growth rate (SGR), feed conversion ratio (FCR), and survival.

For immune and antioxidant analyses, hemolymph samples were collected from six shrimp per tank to measure total hemocyte count (THC), lysozyme activity, phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and malondialdehyde (MDA). Protein concentrations were normalized using the Bradford method.

Following the feeding period, 20 shrimp from each tank were challenged with WSSV in a biosafety level-2 facility through intramuscular injection of 20 μL viral inoculum ($\sim 10^6$ – 10^7 copies mL^{-1} , VP28 qPCR confirmed). Mortality was monitored for 10 days, and relative percent

survival (RPS) was calculated. Economic analyses were performed using current Iranian feed ingredient and shrimp market prices. Benefit-cost ratio (BCR) and return on investment (ROI) were calculated to evaluate economic performance. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's HSD test ($\alpha = 0.05$), and quadratic regression models were applied to estimate optimal supplementation levels.

Results

Water quality parameters did not differ significantly among treatments and remained within suitable ranges for shrimp culture, indicating that observed differences were primarily related to dietary supplementation. All diets containing *C. dactylon* extract significantly improved growth performance compared to the control group ($p < 0.05$). Final body weight increased from approximately 9.2 g in the control treatment to 12.5–12.7 g in shrimp receiving 800–1200 mg kg⁻¹ extract. Similarly, SGR increased from 2.41% day⁻¹ in the control to approximately 2.98% day⁻¹ in the higher inclusion groups, while FCR improved from approximately 1.85 to 1.33. The best overall biological performance was generally observed at 800 mg kg⁻¹ supplementation. Immune and antioxidant responses improved in a dose-dependent manner. Shrimp fed diets containing 800–1200 mg kg⁻¹ extract exhibited significantly higher THC, lysozyme activity, PO activity, SOD, and CAT levels than the control group ($p < 0.05$), whereas MDA concentrations decreased significantly, indicating reduced oxidative stress and enhanced antioxidant defense capacity.

Following WSSV challenge, cumulative survival increased markedly from approximately 42.5% in the infected control group to 73–74% in shrimp receiving 800–1200 mg kg⁻¹ extract, corresponding to an RPS of approximately 53–54% ($p < 0.05$). These findings suggest that dietary supplementation enhanced shrimp resistance to WSSV through improved innate immunity and oxidative stress regulation. Quadratic regression analyses demonstrated strong dose–response relationships for major biological indicators ($R^2 > 0.97$). Estimated biological optima ranged between approximately 900 and 1100 mg kg⁻¹ depending on the evaluated parameter, including SGR (~1009 mg kg⁻¹), minimum FCR (~986 mg kg⁻¹), maximum PO and SOD activities (~1050–1100 mg kg⁻¹), and minimum MDA concentration (~1029 mg kg⁻¹). Nevertheless, a biological performance plateau was observed between 800 and 1200 mg kg⁻¹, indicating diminishing returns at higher inclusion levels.

Economic analysis showed that although feed costs increased moderately with higher extract inclusion, supplementation at 800 mg kg⁻¹ provided the highest economic return, with a benefit-cost ratio of approximately 2.83 and ROI of approximately 182%. Increasing supplementation to 1200 mg kg⁻¹ did not produce additional economic advantages due to higher additive costs.

Conclusion

The present study demonstrated that dietary supplementation with *C. dactylon* extract at 800–1000 mg kg⁻¹ significantly enhances growth performance, feed efficiency, innate immunity, antioxidant capacity, and resistance to WSSV infection in *L. vannamei* cultured under high-

salinity conditions (40–42‰). Although biological optimization analyses indicated an optimal inclusion level close to 1000 mg kg⁻¹, economic modeling identified 800 mg kg⁻¹ as the most cost-effective supplementation level under current production conditions in Iran. Therefore, an operational inclusion range of 800–1000 mg kg⁻¹ is recommended to improve productivity, disease resistance, and profitability in commercial shrimp farming systems. Future studies should incorporate molecular immune markers, histopathological analyses, multisite validation across different salinity regimes, and sensitivity analyses under varying market conditions to further refine the economically optimal inclusion level.

اثرات زیستی و اقتصادی عصاره پنجه‌مرغی (*Cynodon dactylon*) بر رشد، پاسخ‌های ایمنی-آنتی‌اکسیدانی، بقاء در چالش WSSV و نتایج هزینه-فایده میگوی سفید غربی

Litopenaeus vannamei (Boone, 1931)

ملاحت بادروج^۱، علیرضا سالارزاده^{۱*}، مازیار یحیوی^۱، احسان کامرانی^۲

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

۲. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران.

اطلاعات مقاله

چکیده

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۶/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۰۵

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۱۲/۰۵

*نویسنده مسئول:

reza1375bandar@yahoo.com

کلیدواژه‌ها:

عصاره گیاه پنجه مرغی،

میگوی سفید غربی،

ویروس لکه سفید،

شاخص‌های رشد،

ایمنی ذاتی،

وضعیت آنتی اکسیدانی.

صنعت پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) به‌عنوان یکی از ارکان اصلی آبریز پروری جهان، نقشی حیاتی در امنیت غذایی و اقتصاد ساحلی دارد؛ با این حال، شیوع ویروس لکه سفید (WSSV) همچنان بزرگ‌ترین چالش زیستی این صنعت محسوب می‌شود و تلفات سنگینی به همراه دارد. در این راستا، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات زیستی و اقتصادی عصاره گیاه پنجه‌مرغی (*Cynodon dactylon*) در جیره غذایی میگو انجام شد. میگوها طی یک دوره ۴۲ روزه با سطوح مختلف عصاره (۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) تغذیه شدند و سپس در معرض چالش ویروسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزودن عصاره به‌صورت وابسته به غلظت، شاخص‌های رشد، ایمنی ذاتی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود داده و نرخ بقا پس از آلودگی ویروسی را به‌طور معنی‌داری افزایش داد ($P < 0.05$). مدل‌سازی رگرسیون درجه دوم، محدوده بهینه زیستی را ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ میلی‌گرم و تحلیل اقتصادی سطح ۸۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم را به‌عنوان گزینه بهینه از نظر بازده سرمایه (ROI) معرفی کرد. در نتیجه، استفاده از عصاره گیاه پنجه‌مرغی در محدوده ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم می‌تواند راهکاری کارآمد و اقتصادی برای ارتقای سلامت، رشد و سودآوری در پرورش میگوی وانامی باشد.



ناشر: دانشگاه هرمزگان.

مقدمه

پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در دهه اخیر به یکی از ارکان اصلی رشد صنعت جهانی آبزی پروری تبدیل شده است. مطابق گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO, 2024)، در سال ۲۰۲۲ برای نخستین بار، تولیدات آبزی پروری از صید دریایی پیشی گرفت؛ این دستاورد، نیاز به مداخلات تغذیه‌ای کارآمد، پایدار و مقرون به صرفه را برای افزایش بهره‌وری و تاب‌آوری سامانه‌های پرورشی برجسته می‌سازد. در مقابل این روند، Islam و همکاران (۲۰۲۲) یادآور می‌شوند که ویروس لکه سفید (WSSV) همچنان تهدیدی ساختاری با توان بیماری‌زایی بالا است که می‌تواند ظرف چند روز تلفات سنگینی ایجاد کند؛ بنابراین، ترکیب اقدامات زیست‌امنیتی (Biosecurity) با مداخلات تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی مؤثر بر ایمنی ذاتی میزبان، رویکردی عملیاتی و کارآمد برای کاهش خطر بروز بیماری در سامانه‌های پرورش محسوب می‌شود.

در این زمینه، افزودنی‌های گیاه‌زاد (فیتوژنیک‌ها/فیتوبیوتیک‌ها) به عنوان جایگزین‌های طبیعی برای ترکیبات شیمیایی، با شواهد روزافزون از کارایی زیستی مطرح شده‌اند. Wang و همکاران (۲۰۲۴) نشان می‌دهند که این ترکیبات از مسیرهایی چون تعدیل میکروبیوتای روده، بهبود هضم و تحریک شاخص‌های ایمنی، می‌توانند رشد و وضعیت سلامت را ارتقا دهند؛ با این حال، موفقیت آن‌ها به غلظت، ماتریس خوراک و شرایط پرورشی وابسته است. در سطح گونه هدف، Lee و همکاران (۲۰۲۴) نیز در یک کارآزمایی روی *L. vannamei* نشان داده‌اند که یک فرمولاسیون فیتوژنیک می‌تواند شاخص‌های عملکردی و ایمنی را بهبود دهد و قابلیت کاربرد در مقیاس مزرعه را داشته باشد.

گیاه پنجه‌مرغی (*Cynodon dactylon*) به دلیل پروفایل غنی از ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، به عنوان منبعی با ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی شناخته می‌شود (Mozafari et al., 2018; Singh et al., 2021). در تأیید این موضوع، پژوهش Savadi و همکاران (۲۰۲۰) نشان داد که عصاره ریزوم این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی معنی‌داری است. این ویژگی، پتانسیل کاربرد آن را به عنوان یک افزودنی خوراک عملکردی در آبزی پروری برجسته می‌سازد، چرا که می‌تواند به بهبود توازن اکسیداتیو و پشتیبانی از سیستم ایمنی ذاتی در آبزیان کمک کند. به صورت اختصاصی در میگو، Tomazelli Junior و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که عصاره *C. dactylon* قادر است پیامدهای بیماری لکه سفید را در *L. vannamei* تعدیل کند. در سطح شواهد ترکیبی، Ghosh و همکاران (۲۰۲۳) نیز در یک مقاله مروری بر گیاهان مؤثر بر ویروس سندرم لکه سفید که یکی از مرگبارترین عوامل بیماری‌زا در صنعت پرورش میگو محسوب می‌شود، ظرفیت تعدیل‌کنندگی سیستم ایمنی (ایمونومدولاسیون) ترکیبات گیاه‌زاد را برجسته کرده‌اند. آن‌ها همچنین بر ضرورت استانداردسازی پروتکل‌های آزمایشی و «تعیین غلظت بهینه» برای کاربرد صنعتی این نتایج تأکید کرده‌اند.

ارزیابی پاسخ‌های فیزیولوژیک مستلزم انتخاب مجموعه‌ای از شاخص‌های معتبر و کارآمد است. برای ایمنی ذاتی، این شاخص‌ها شامل شمار کل هموسیت‌ها (THC)، فعالیت لیزوزیم و فعالیت فنول اکسیداز (PO)؛ و برای وضعیت اکسیداتیو، شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، کاتالاز (CAT) و مالون دی‌آلدئید (MDA) است. مطالعات اخیر تأیید کرده‌اند که این شاخص‌ها نسبت به تغییرات تغذیه‌ای در میگوی *L. vannamei* حساس بوده و معیاری قابل اتکا برای ارزیابی وضعیت سلامت این جاندار ارائه می‌دهند (Weerathunga et al., 2021; Eissa et al., 2023).

فراتر از اثربخشی زیستی، متغیر اقتصادی تعیین‌کننده پذیرش صنعتی یک افزودنی است. Samat و همکاران (۲۰۲۴) خاطرنشان می‌کنند که ارزیابی هم‌زمان شاخص‌های اقتصادی، نظیر نسبت فایده به هزینه، بازگشت سرمایه و تحلیل حساسیت برای تصمیم‌سازی در سامانه‌های تولیدی، به‌ویژه در شرایط نوسان قیمت نهاده‌ها، ضروری است. از این رو، تعیین «غلظت بهینه» باید هم از منظر پاسخ‌های زیستی و هم از منظر اقتصادی مدنظر قرار گیرد.

بر این مبنا، مطالعه حاضر سه هدف مکمل شامل: نخست، برآورد رابطه غلظت-پاسخ برای عملکرد رشد و شاخص‌های ایمنی-آنتی‌اکسیدانی پیش از چالش؛ دوم، سنجش عملکرد در شرایط چالش کنترل‌شده با بیماری لکه سفید؛ و سوم، کمی‌سازی پیامدهای اقتصادی هر تیمار. نوآوری این پژوهش در رویکرد یکپارچه آن نهفته است که برای نخستین بار، ارزیابی غلظت-پاسخ بیولوژیکی

را با تحلیل‌های مهندسی اقتصاد خوراک ترکیب می‌کند؛ رویکردی که انتظار می‌رود به ارائه توصیه‌های کاربردی و مقیاس‌پذیر در سطح مزرعه منجر شود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در دو مرحله اصلی اجرا گردید. مرحله نخست، شامل پرورش و مواجهه آزمایشی با ویروس سندرم لکه سفید، در مرکز بازاری ذخایر آبزیان خلیج فارس (کارگاه کلاهی، میناب) و مرحله دوم، مشتمل بر آنالیزهای آزمایشگاهی، در پژوهشگاه اکولوژی خلیج فارس به انجام رسید. کلیه مراحل اجرایی پژوهش با رعایت کامل دستورالعمل‌های اخلاقی کار با حیوانات و ضوابط ایمنی زیستی صورت پذیرفت و پروتکل مربوط به کار با عامل ویروسی، پیش از آغاز آزمایش، به تأیید سازمان دامپزشکی کشور رسید. این مطالعه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی اجرا شد که در آن هر مخزن به عنوان یک واحد آزمایشی مستقل محسوب گردید.

میگوهای سفید غربی (*L. vannamei*) با میانگین وزنی اولیه ۲ تا ۳ گرم، پس از یک دوره سازگاری ۷ روزه، در مخازن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری (با حجم کارکرد ۴۰۰ لیتر) با تراکم ۸۰ قطعه بر مخزن نگهداری شدند. هوادهی پیوسته با استفاده از یک دستگاه دمنده (Roots Blower, USA) برقرار بود. در طول دوره آزمایش، پارامترهای فیزیوشیمیایی آب به صورت روزانه پایش و در محدوده بهینه برای پرورش میگوی وانامی حفظ گردید. مقادیر ثبت‌شده (میانگین $\pm$ انحراف معیار) به شرح زیر است:

- دما: 29.0 ± 0.8 °C ، سنجش با دستگاه مولتی‌پارامتر (YSI ProDSS)
- شوری: 41.0 ± 0.6 ‰ ، سنجش با رفرکتومتر (ATAGO MASTER-S28M)
- pH: 8.05 ± 0.15 ، سنجش با pH متر (Hanna HI9811-5)
- اکسیژن محلول: 5.8 ± 0.4 mg L⁻¹ ، سنجش با دستگاه مولتی‌پارامتر (YSI ProDSS)
- نیتروژن آمونیاکی کل (TAN): 0.22 ± 0.05 mg L⁻¹ ، سنجش با اسپکتروفتومتر (Hach DR3900)

محدوده مطلوب پارامترها بر اساس توصیه‌های Ariadi و همکاران (۲۰۲۳) تنظیم شد.

در این پژوهش، پنج جیره غذایی هم‌نیتروژن (پروتئین خام تقریبی ۴۰ درصد) و هم‌انرژی (چربی خام تقریبی ۸ درصد) طراحی و تولید گردید. این جیره‌ها حاوی سطوح افزایشی از عصاره اتانولی گیاه *C. dactylon* شامل صفر (گروه شاهد)، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک بودند. دامنه غلظت‌های مورد استفاده بر اساس مطالعات پیشین در زمینه کاربرد ترکیبات فیتوژنیک در تغذیه میگو انتخاب گردید (Eldessouki et al., 2022). هر تیمار آزمایشی در سه تکرار (مخزن) ارزیابی شد.

برای تهیه عصاره، بخش‌های هوایی گیاه *C. dactylon* پس از خشک‌سازی در سایه، به پودر تبدیل شد. استخراج با استفاده از اتانول ۷۰ درصد (به نسبت وزنی به حجمی ۱:۱۰) به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق و با استفاده از شیکر اوربیتالی صورت پذیرفت. محلول حاصل پس از صاف‌شدن، توسط دستگاه تبخیرکننده چرخان (Heidolph Hei-VAP Advantage; Heidolph, Germany) تغلیظ و سپس با دستگاه خشک‌کن انجمادی (Christ Alpha 1-4 LDplus; Martin Christ, Germany) به پودر عصاره خشک تبدیل گردید. به‌منظور استانداردسازی، محتوای فنول تام (TPC) عصاره با روش Folin-Ciocalteu و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu UV-1800; Shimadzu, Japan) در طول موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد.

برای تولید خوراک، ابتدا مواد اولیه (جدول ۱) آسیاب‌شده و از الک با چشمه ۵۰۰ میکرومتر عبور داده شدند و سپس به‌طور کامل مخلوط گردیدند. در مرحله بعد مخلوط حاصل با دستگاه پلت‌ساز (CPM Century; CPM, USA) به پلت‌هایی با قطر ۲ میلی‌متر تبدیل شد. عصاره گیاهی به روش روکش‌دهی (Top-coating) به خوراک افزوده شد؛ بدین منظور، مقادیر مشخصی از عصاره در اتانول خوراکی حل و به‌صورت یکنواخت بر روی پلت‌های سرد اسپری گردید. پس از تبخیر کامل حلال، یک لایه نازک از لسیتین سویا (۱ درصد) به عنوان پوشش نهایی و عامل محافظ بر روی پلت‌ها پاشش شد. پایداری خوراک در آب از طریق سنجش درصد افت ماده خشک پس از ۲ ساعت غوطه‌وری، طبق روش تشریح‌شده توسط Yuan و همکاران (۲۰۲۱)، ارزیابی شد. ترکیب اجزای تشکیل‌دهنده و آنالیز تقریبی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. فرمولاسیون و ترکیب شیمیایی تقریبی جیره‌های آزمایشی (مقادیر بر حسب گرم بر کیلوگرم ماده خشک) به منظور هم‌ارزی ارزش غذایی تیمارها، افزایش سطح عصاره با کاهش متناظر آرد گندم به عنوان پرکننده (filler) جبران گردید.

ترکیبات (g kg ⁻¹)	شاهد (۰)	CD۲۰۰	CD۴۰۰	CD۸۰۰	CD۱۲۰۰
آرد ماهی	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
کنجاله سویا	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰	۳۰۰
گلوتن ذرت	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰	۸۰
آرد گندم	۲۰۰	۱۹۹/۸	۱۹۹/۶	۱۹۹/۲	۱۹۹/۰
پودر اسکویت/جاذب	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰	۵۰
روغن ماهی	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
روغن سویا	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
لسیتین سویا	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰	۲۰
پرمیکس ویتامینی ^۱	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
پرمیکس معدنی ^۲	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
بایندر (گندم/آلجینات)	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
بتائین	۲	۲	۲	۲	۲
بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) (mg kg ⁻¹)	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰
عصاره پنجه مرغی (<i>C. dactylon</i>)	۰	۰/۲	۰/۴	۰/۸	۱/۲
جمع	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰
پروتئین خام (درصد)	۴۰/۲	۴۰/۱	۴۰/۲	۴۰/۱	۴۰/۲
چربی خام (درصد)	۸/۱	۸/۰	۸/۰	۸/۱	۸/۰
خاکستر (درصد)	۱۰/۱	۱۰/۲	۱۰/۱	۱۰/۱	۱۰/۲
فیبر خام (درصد)	۳/۱	۳/۰	۳/۱	۳/۰	۳/۱

^۱ پرمیکس ویتامینی به گونه‌ای فرموله شد که مقادیر زیر را در هر کیلوگرم خوراک تأمین نماید: ویتامین A، ۲۰،۰۰۰ واحد بین‌المللی (IU)؛ ویتامین D₃، ۲،۰۰۰ واحد بین‌المللی (IU)؛ ویتامین E، ۲۰۰ میلی‌گرم؛ ویتامین K₃، ۲۰ میلی‌گرم؛ مجموع ویتامین‌های گروه B، ۱۰۰ میلی‌گرم و ویتامین C، ۱،۰۰۰ میلی‌گرم.

^۲ ترکیب پرمیکس معدنی در هر کیلوگرم خوراک عبارت بود از: ۱۰۰ میلی‌گرم روی (Zn)، ۱۰۰ میلی‌گرم آهن (Fe)، ۳۰ میلی‌گرم منگنز (Mn)، ۱۰ میلی‌گرم مس (Cu)، ۰.۵ میلی‌گرم سلنیوم (Se) و ۱.۵ میلی‌گرم ید (I).

در طول دوره پرورش ۴۲ روزه، میگوها چهار نوبت در روز (ساعات ۰۷:۰۰، ۱۱:۰۰، ۱۷:۰۰ و ۲۱:۰۰) تا حد سیری ظاهری تغذیه شدند. به منظور تنظیم جیره روزانه، زیست‌سنجی میگوها در هر تکرار به صورت دو هفته یک‌بار با استفاده از ترازوی دیجیتال دقیق (Kern PCB) انجام گرفت.

در پایان دوره، شاخص‌های عملکرد رشد شامل افزایش وزن (Weight Gain, WG)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب تبدیل غذایی (FCR) و درصد بقا (Survival Rate) محاسبه شدند. برای محاسبه SGR و FCR از روابط استاندارد زیر استفاده گردید:

– نرخ رشد ویژه (Specific Growth Rate, SGR):

$$SGR (\%/day) = 100 \times [(\ln W_f - \ln W_i)] / t$$

در رابطه (۱)، W_f وزن نهایی میانگین، W_i وزن اولیه میانگین و t مدت زمان دوره پرورش (روز) است.

- ضریب تبدیل غذایی (Feed Conversion Ratio, FCR) رابطه (۲):

(۲) $FCR = \text{کل خوراک مصرف‌شده (گرم)} / \text{افزایش زیست‌توده (گرم)}$

کیفیت فیزیکی و پایداری خوراک، که از عوامل تأثیرگذار بر کارایی مصرف خوراک و ضریب تبدیل آن محسوب می‌شود، مطابق با روش‌های استاندارد مورد توجه قرار گرفت. (Yuan et al., 2021)

در پایان دوره پرورش (روز ۴۲)، از هر مخزن به‌صورت تصادفی حداقل شش قطعه میگو انتخاب و به‌منظور سنجش شاخص‌های ایمنی و آنتی‌اکسیدانی از آن‌ها نمونه‌برداری انجام شد. استخراج همولف از ناحیه سینوس شکمی میگوها با استفاده از سرنگ محتوی محلول ضدانعقاد انجام گرفت. برای اندازه‌گیری شمارش کل هموسیت‌ها (THC)، از لام هموسایتومتر (Neubauer Improved؛ Marienfeld، آلمان) و میکروسکوپ نوری (Olympus؛ Olympus CX23، ژاپن) بهره‌گیری شد.

برای ارزیابی شاخص‌های ایمنی هومورال، فعالیت آنزیم لیزوزیم به روش توربیدیمتری و با استفاده از سوبسترای *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, USA) سنجیده شد. فعالیت آنزیم فنول‌اکسیداز (PO) نیز با سوبسترای L-DOPA (Sigma-Aldrich, USA) اندازه‌گیری گردید. وضعیت آنتی‌اکسیدانی همولف از طریق سنجش فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) و همچنین غلظت مالون‌دی‌آلدئید (MDA) با استفاده از کیت‌های تجاری معتبر (ZellBio GmbH, Germany) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده ارزیابی شد.

به‌منظور نرمال‌سازی نتایج آنزیمی، غلظت پروتئین کل در نمونه‌های همولف با روش Bradford و با استفاده از کیت تجاری (Bio-Rad, USA) تعیین گردید. کلیه سنجش‌های اسپکتروفتومتری بر روی دستگاه میکروپلیت‌ریدر (BioTek Synergy HTX; Agilent BioTek, USA) قرائت شدند. روش‌های به کار رفته برای سنجش این شاخص‌ها، با پروتکل‌های استاندارد و معتبر در پژوهش‌های نوین ایمنی‌شناسی سخت‌پوستان مطابقت داشت (Eissa et al., 2023).

پس از اتمام دوره ۴۲ روزه تغذیه، به‌منظور ارزیابی مقاومت اکتسابی میگوها، یک چالش تجربی با ویروس WSSV طراحی گردید. بدین منظور، تعداد ۲۰ قطعه میگو از هر مخزن به‌صورت تصادفی به یک واحد پرورشی ایزوله (سالن چالش) با سیستم هوادهی مستقل برای هر مخزن منتقل شدند.

مایه تلقیح ویروسی (اینوکولوم) از طریق همگن‌سازی بافت میگوهای که آلودگی آن‌ها پیش‌تر تأیید شده بود، در آزمایشگاه دامپزشکی استان هرمزگان تهیه شد. هویت و تیترو ویروس در اینوکولوم تهیه‌شده، با استفاده از روش Real-time PCR (دستگاه ABI StepOnePlus, Applied Biosystems) و کیت TaqMan با هدف قرار دادن ژن VP28، تأیید و تعیین گردید. غلظت ویروسی مورد استفاده در این مطالعه بر اساس چارچوب‌های متداول برای مدل‌های چالشی که توسط Cox و همکاران (۲۰۲۴) مرور شده است، انتخاب شد.

آلوده‌سازی تجربی از طریق تزریق داخل عضلانی حجم ۲۰ میکرولیتر از اینوکولوم ویروسی انجام شد. غلظت تزریق به‌گونه‌ای تنظیم شد که تیترو نهایی در محدوده تقریبی 10^6 الی 10^7 نسخه ژنومی بر میلی‌لیتر قرار گیرد. این غلظت، مطابق با مشاهدات Kim و همکاران (۲۰۲۳)، قادر است در گروه شاهد مثبت، طی ۱۰ الی ۱۲ روز به تلفات بالایی منجر شود. گروه‌های آزمایشی شامل گروه شاهد منفی (دریافت‌کننده بافر استریل)، شاهد مثبت (تغذیه شده با جیره شاهد و آلوده به ویروس) و گروه‌های تیمار (تغذیه شده با جیره‌های حاوی عصاره و آلوده به ویروس) بودند.

پس از تزریق عامل بیماری‌زا، تلفات به صورت روزانه و به مدت ۱۰ روز پایش و ثبت گردید. در انتهای این دوره، شاخص درصد بقای نسبی (Relative Percent Survival, RPS) با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد:

$$RPS (\%) = \left[\frac{\text{درصد تلفات در گروه تیمار}}{\text{درصد تلفات در گروه شاهد مثبت}} - 1 \right] \times 100 \quad (3)$$

کلیه پسماندهای زیستی و لاشه‌های حاصل از این مرحله، مطابق با اصول ایمنی زیستی، پیش از دفع، از طریق اتوکلاو و کلرزی سترون‌سازی شدند.

به منظور ارزیابی توجیه اقتصادی و سودآوری تیمارهای آزمایشی، یک تحلیل هزینه-فایده در سطح هر تکرار به عنوان واحد محاسباتی انجام پذیرفت. در این تحلیل، مجموع هزینه‌های تولید (Total Costs; TC) از جمع «هزینه خوراک» و «هزینه‌های متغیر» (شامل نیروی انسانی و انرژی) محاسبه گردید. هزینه خوراک بر مبنای قیمت جاری خوراک پایه (کد ۴۰۰۲) به مبلغ ۹۵۸'۶۴۰ ریال بر کیلوگرم، به علاوه «هزینه افزودن عصاره» برای هر تیمار، برآورد شد. هزینه افزودن عصاره نیز بر اساس حجم خالص اتانول مصرفی برای استخراج و قیمت آن (۷'۰۰۰'۰۰۰ ریال بر لیتر) محاسبه شد.

درآمد ناخالص (Total Revenue, TR) برای هر تکرار، از حاصل ضرب زیست‌توده نهایی تولیدشده (Bi به کیلوگرم) در قیمت فروش جاری هر کیلوگرم میگو (P)، مطابق با رابطه (۴) محاسبه گردید. در این مطالعه، قیمت فروش معادل ۳'۰۰۰'۰۰۰ ریال به ازای هر کیلوگرم در نظر گرفته شد.

$$TR = Bi \times P \quad (4)$$

برای ارزیابی و مقایسه سودآوری تیمارها، شاخص‌های کلیدی زیر محاسبه گردیدند:

- نسبت سود به هزینه (Benefit-Cost Ratio, BCR): این شاخص از تقسیم درآمد ناخالص (TR) بر کل هزینه‌ها (Total Costs, TC) مطابق با رابطه (۵) به دست آمد.

$$BCR = TR / TC \quad (5)$$

- بازده سرمایه‌گذاری (Return on Investment, ROI): این شاخص به صورت درصد و با استفاده از رابطه (۶) محاسبه شد.

$$ROI (\%) = \left[\frac{TR - TC}{TC} \right] \times 100 \quad (6)$$

شایان ذکر است که کلیه قیمت‌ها بر حسب ریال و منطبق بر بازه زمانی اجرای پژوهش در نظر گرفته شدند.

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، ابتدا پیش‌فرض‌های آزمون‌های پارامتریک شامل نرمال بودن توزیع داده‌ها (توسط آزمون شاپیرو-ویلک) و همگنی واریانس‌ها (توسط آزمون لوین) مورد ارزیابی قرار گرفت. سپس، برای مقایسه میانگین شاخص‌های عملکرد رشد، ایمنی و وضعیت آنتی‌اکسیدانی بین تیمارهای مختلف، از تحلیل واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار، مقایسه میانگین‌ها با بهره‌گیری از آزمون تعقیبی توکی (Tukey's HSD) در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام پذیرفت.

به منظور بررسی الگوی پاسخ شاخص‌ها به سطوح مختلف عصاره و برآورد غلظت بهینه، از مدل رگرسیون چندجمله‌ای درجه دوم استفاده گردید. تمامی تحلیل‌های آماری با بهره‌گیری از نرم‌افزار R (نسخه ۴.۳.۱) و نرم‌افزاری مرتبط emmeans و survival اجرا شدند.

نتایج

نتایج مربوط به عملکرد رشد و کارایی خوراک در جدول ۲ ارائه شده است. افزودن عصاره *C. dactylon* به جیره غذایی، تأثیر معنی داری بر وزن نهایی، نرخ رشد ویژه (SGR) و ضریب تبدیل خوراک (FCR) داشت ($p < 0.05$). به طور مشخص، تیمار ۸۰۰ با ثبت بالاترین مقدار نرخ رشد ویژه و پایین ترین مقدار ضریب تبدیل خوراک، بهترین عملکرد را از خود نشان داد. هرچند، مقایسه میانگین ها حاکی از آن بود که تفاوت این تیمار با تیمار ۱۲۰۰ CD از نظر آماری معنی دار نبود ($p > 0.05$). همچنین، نرخ بقا در تمامی تیمارهای دریافت کننده عصاره به طور معنی داری بالاتر از گروه شاهد بود ($p < 0.05$).

جدول ۲. تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon* بر شاخص های عملکرد رشد و کارایی خوراک میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) طی یک دوره ۴۲ روزه (مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار؛ $n=3$).

شاخص ها	شاهد (+)	CD۲۰۰	CD۴۰۰	CD۸۰۰	CD۱۲۰۰
وزن نهایی (g)	$9/2 \pm 0/3^d$	$10/5 \pm 0/4^c$	$11/6 \pm 0/5^b$	$12/5 \pm 0/4^a$	$12/7 \pm 0/6^a$
SGR (% روز ⁻¹)	$2/41 \pm 0/05^d$	$2/63 \pm 0/04^c$	$2/80 \pm 0/06^b$	$2/95 \pm 0/05^a$	$2/98 \pm 0/04^a$
FCR	$1/85 \pm 0/07^a$	$1/65 \pm 0/05^b$	$1/48 \pm 0/06^c$	$1/35 \pm 0/04^d$	$1/33 \pm 0/05^d$
بقا (%)	$82/3 \pm 2/1^c$	$87/1 \pm 1/8^b$	$90/5 \pm 2/0^a$	$91/2 \pm 1/5^a$	$91/5 \pm 1/7^a$

*حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار است ($p < 0.05$).

تمامی شاخص های ایمنی و آنتی اکسیدانی در تیمارهای حاوی عصاره، بهبود معناداری نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($p < 0.05$). جدول ۳ نشان می دهد که شمارش کل هموسیت ها (THC)، فعالیت لیزوزیم و فنول اکسیداز (PO) و همچنین فعالیت آنزیم های SOD و CAT به صورت وابسته به غلظت افزایش یافتند. در مقابل، سطح مالون دی آلدئید (MDA) کاهش یافت. در تمام این شاخص ها، بهترین پاسخ در تیمارهای ۸۰۰ و ۱۲۰۰ CD مشاهده شد که اختلاف آماری معنی داری با یکدیگر نداشتند.

جدول ۳. تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon* بر شاخص های ایمنی و وضعیت آنتی اکسیدانی در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) (مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار؛ $n=3$).

شاخص ها	شاهد (+)	CD۲۰۰	CD۴۰۰	CD۸۰۰	CD۱۲۰۰
THC (10^6 cells mL ⁻¹)	$2/5 \pm 0/1^a$	$2/9 \pm 0/1^c$	$3/3 \pm 0/1^b$	$3/6 \pm 0/1^a$	$3/7 \pm 0/1^a$
لیزوزیم (U mL ⁻¹)	$12/5 \pm 0/4^d$	$14/2 \pm 0/5^c$	$15/8 \pm 0/6^b$	$16/9 \pm 0/5^a$	$17/1 \pm 0/6^a$
PO (U mg ⁻¹ protein)	$0/85 \pm 0/04^d$	$0/96 \pm 0/03^c$	$1/12 \pm 0/05^b$	$1/25 \pm 0/04^a$	$1/28 \pm 0/05^a$
SOD (U mg ⁻¹ protein)	$45/2 \pm 1/5^d$	$50/1 \pm 1/4^c$	$56/3 \pm 1/6^b$	$61/4 \pm 1/5^a$	$62/1 \pm 1/7^a$
CAT (U mg ⁻¹ protein)	$18/5 \pm 0/6^d$	$20/2 \pm 0/5^c$	$22/8 \pm 0/6^b$	$24/5 \pm 0/5^a$	$24/8 \pm 0/5^a$
MDA (nmol mg ⁻¹ protein)	$5/2 \pm 0/2^a$	$4/6 \pm 0/2^b$	$3/9 \pm 0/2^c$	$3/4 \pm 0/1^d$	$3/3 \pm 0/2^d$

*حروف غیرهمسان در هر ردیف نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار است ($p < 0.05$).

نتایج حاصل از مواجهه آزمایشی با ویروس بیماری لکه سفید نشان داد که نرخ بقا در تمام تیمارهای تغذیه شده با عصاره، به طور معنی داری بالاتر از گروه شاهد مثبت بود ($p < 0.05$). مطابق با داده های مندرج در جدول ۴، بیشترین درصد بقای نسبی (RPS) در تیمارهای حاوی ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره مشاهده گردید که از نظر آماری، تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند.

جدول ۴. نرخ بقای تجمعی و درصد بقای نسبی (RPS) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) پس از ۱۰ روز چالش با ویروس لکه سفید (WSSV).

تیمار	بقاء (%)	RPS (%)
شاهد (+)	$42/5 \pm 2/3^d$	-
CD۲۰۰	$55/2 \pm 2/5^c$	$22/2 \pm 1/8^c$

۴۰/۲ ± ۲/۱ ^b	۶۵/۸ ± ۲/۷ ^b	CD ^{۴۰۰}
۵۳/۲ ± ۲/۳ ^a	۷۳/۴ ± ۲/۰ ^a	CD ^{۸۰۰}
۵۴/۴ ± ۲/۲ ^a	۷۴/۱ ± ۲/۱ ^a	CD ^{۱۲۰۰}

*حروف غیرهمسان در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار است ($p < 0.05$).

بر اساس نتایج ارزیابی اقتصادی (جدول ۵)، افزودن عصاره *C. dactylon* به جیره، علی‌رغم افزایش قیمت تمام‌شده خوراک، به دلیل بهبود چشمگیر در ضریب تبدیل غذایی و نرخ بقا، در نهایت منجر به افزایش سودآوری گردید. در این میان، تیمار حاوی ۸۰۰ میلی‌گرم عصاره در کیلوگرم (CD^{۸۰۰}) با ثبت بالاترین بازده سرمایه‌گذاری (ROI) و نسبت سود به هزینه (BCR)، به عنوان گزینه بهینه اقتصادی شناسایی شد.

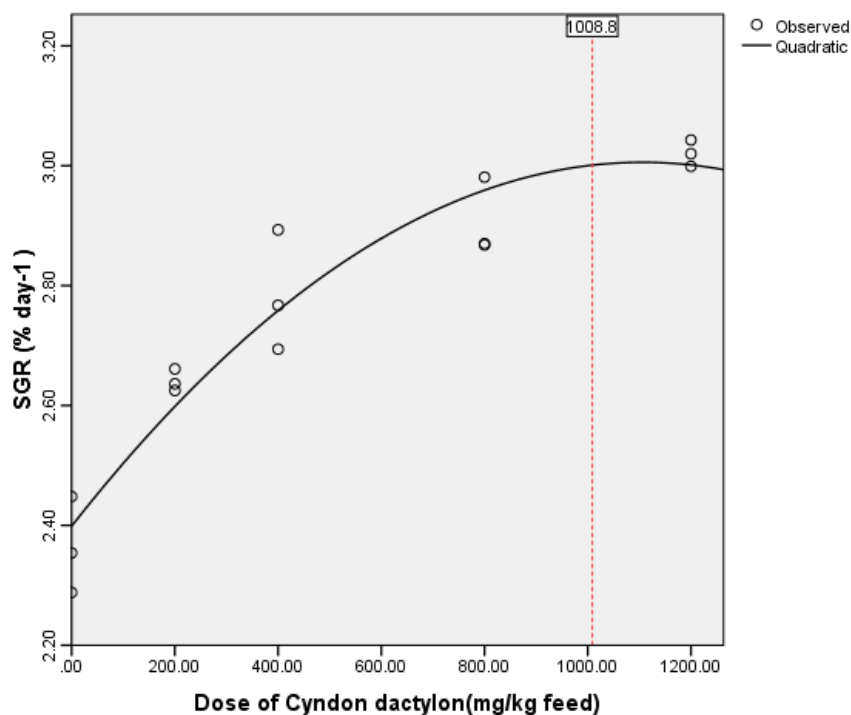
اگرچه تیمار ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم (CD^{۱۲۰۰}) نیز عملکرد اقتصادی مطلوبی در مقایسه با تیمار شاهد داشت، اما هزینه بالاتر افزودنی در این سطح، برتری اقتصادی قابل‌توجهی برای آن نسبت به تیمار CD^{۸۰۰} ایجاد نکرد. لازم به ذکر است که تحلیل هزینه بر مبنای قیمت عصاره محاسبه شد که با در نظر گرفتن پارامترهای استخراج (نسبت حلال به ماده اولیه ۱:۱۰، اتانول ۷۰٪، بازیافت حلال ۹۰٪ و بازده استخراج ۸٪) برآورد گردید؛ بر این اساس، هزینه افزودن ۸۰۰ میلی‌گرم عصاره به هر کیلوگرم خوراک حدود ۴۹'۰۰۰ ریال بود.

جدول ۵. تحلیل شاخص‌های کلیدی اقتصادی میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) تغذیه‌شده با سطوح مختلف عصاره *C. dactylon* در پایان دوره ۴۲ روزه پرورش.

تیمار	غلظت (mg/kg)	مصرف خوراک (kg)	قیمت جیره (ریال/کیلو)	هزینه کل خوراک (ریال)	برداشت (kg)	درآمد (ریال)	سود خالص (ریال)	BCR	ROI (%)
شاهد (۰)	۰	۰/۷۵۱	۹۵۸۶۴۰	۷۱۹۵۵۲	۰/۶۰۶	۱۸۱۷۱۸۴	۱۰۹۷۶۳۲	۲/۵۲۵	۱۵۲/۵
CD ^{۲۰۰}	۲۰۰	۰/۸۷۷	۹۷۰۸۹۰	۸۵۱۶۷۱	۰/۷۳۲	۲۱۹۴۹۲۰	۱۳۴۳۲۴۹	۲/۵۷۷	۱۵۷/۷
CD ^{۴۰۰}	۴۰۰	۰/۹۴۷	۹۸۳۱۴۰	۹۳۰۹۹۷	۰/۸۴۰	۲۵۱۹۵۲۰	۱۵۸۸۵۲۳	۲/۷۰۶	۱۷۰/۶
CD ^{۸۰۰}	۸۰۰	۰/۹۶۱	۱۰۰۷۶۴۰	۹۶۸۵۴۴	۰/۹۱۲	۲۷۳۶۰۰۰	۱۷۶۷۴۵۶	۲/۸۲۵	۱۸۲/۵
CD ^{۱۲۰۰}	۱۲۰۰	۰/۹۷۰	۱۰۳۲۱۴۰	۱۰۰۱۶۱۱	۰/۹۳۰	۲۷۸۸۹۲۰	۱۷۸۷۳۰۹	۲/۷۸۴	۱۷۸/۴

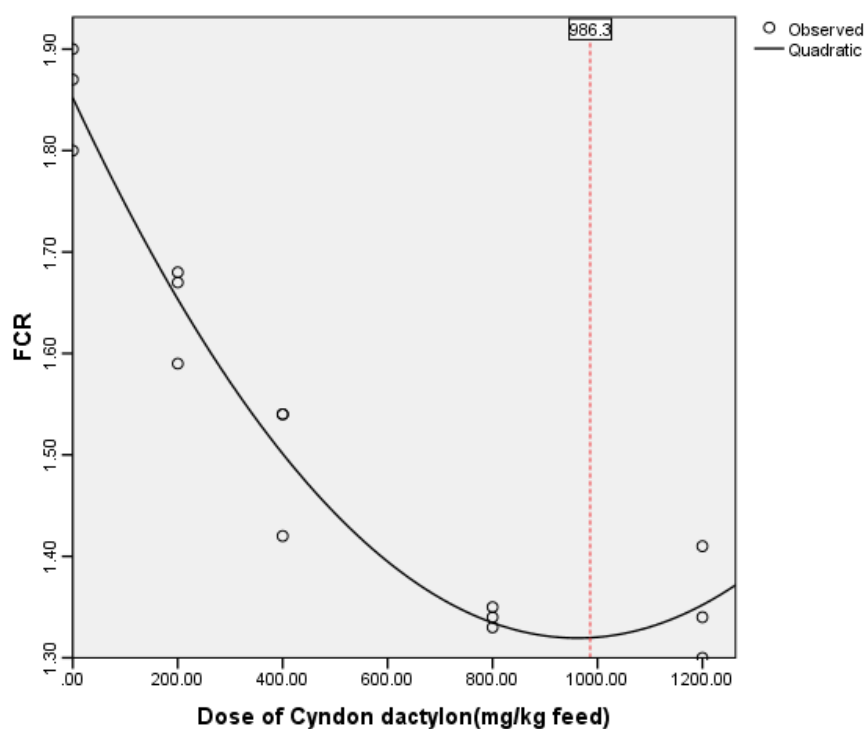
در این پژوهش، به منظور تعیین سطح بهینه عصاره، پاسخ‌های مربوط به شاخص‌های رشد، کارایی خوراک، زنده‌مانی و همچنین متغیرهای بیوشیمیایی مرتبط با استرس اکسیداتیو و ایمنی، با مدل رگرسیون درجه دوم ($y = a + bx + cx^2$) برازش داده شدند، سپس سطح بهینه هر شاخص محاسبه گردید.

نتایج حاصل از مدل‌سازی نشان داد که سطح بهینه برای اغلب شاخص‌های مورد ارزیابی در محدوده تقریبی ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک قرار دارد (شکل‌های ۱ تا ۶). این محدوده با نتایج مشاهده‌شده در تیمارهای CD^{۸۰۰} تا CD^{۱۲۰۰} که در آن‌ها پاسخ‌های فیزیولوژیک به سطح حداکثری یا حداقلی (بسته به ماهیت شاخص) خود رسیده بودند، مطابقت کامل داشت.



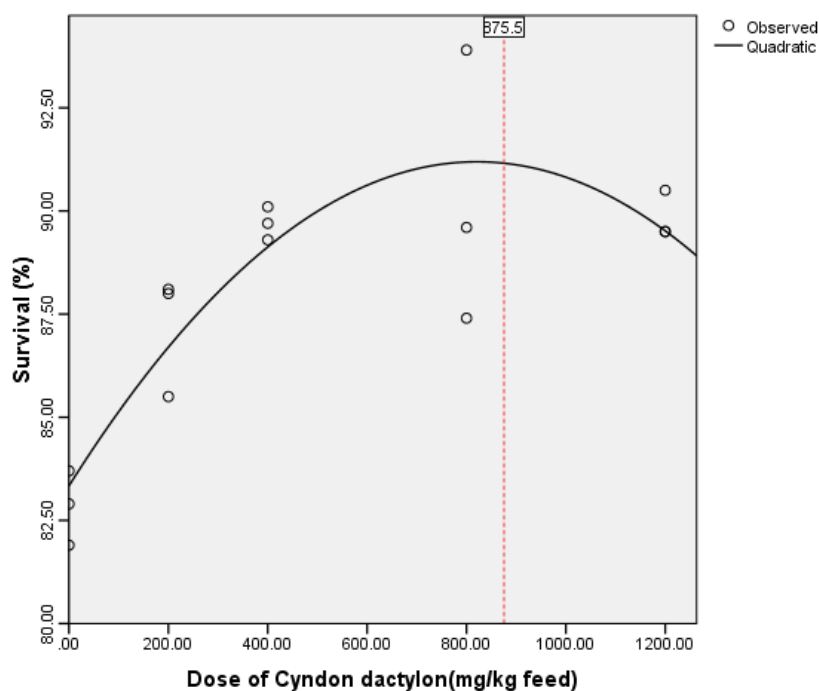
شکل ۱. منحنی غلظت-پاسخ نرخ رشد ویژه (SGR) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) برازش شده با مدل رگرسیون درجه دوم در پاسخ به سطوح مختلف عصاره *C. dactylon*.

روند تغییرات نرخ رشد ویژه با افزایش غلظت عصاره، الگویی صعودی تا رسیدن به نقطه بهینه (رأس منحنی) و سپس کاهش ملایم را نشان داد. بر اساس مدل رگرسیون درجه دوم، سطح بهینه زیستی برای شاخص نرخ رشد ویژه برابر با ۱۰۰۸/۸ میلی گرم بر کیلوگرم برآورد شد ($R^2 = ۰/۹۹۳$). نتایج تیمارهای CD۸۰۰ تا CD۱۲۰۰، وقوع حداکثر پاسخ زیستی را در این بازه تأیید می‌کنند.



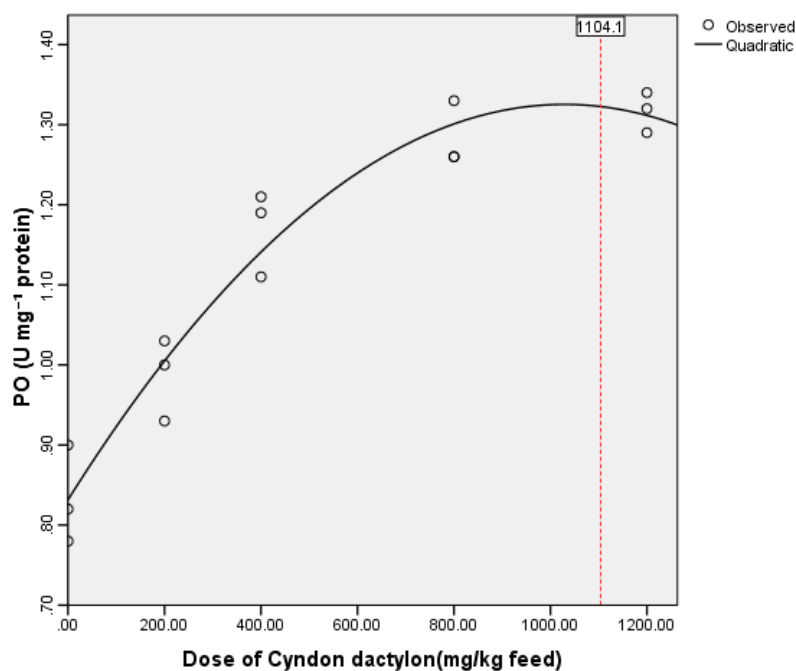
شکل ۲. منحنی غلظت-پاسخ ضریب تبدیل غذایی (FCR) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) برازش شده با مدل رگرسیون درجه دوم تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon*.

با افزایش غلظت عصاره تا نقطه بهینه، مقدار ضریب تبدیل غذایی کاهش معنی‌داری نشان داد و پس از آن، روندی افزایشی اما ملایم را طی کرد. غلظت بهینه برای دستیابی به کمترین ضریب تبدیل غذایی، معادل $986/3$ میلی گرم بر کیلوگرم برآورد گردید ($R^2 = 0/992$). نتایج تیمارهای CD_{800} تا CD_{1200} نیز این الگو را تأیید می‌کنند.



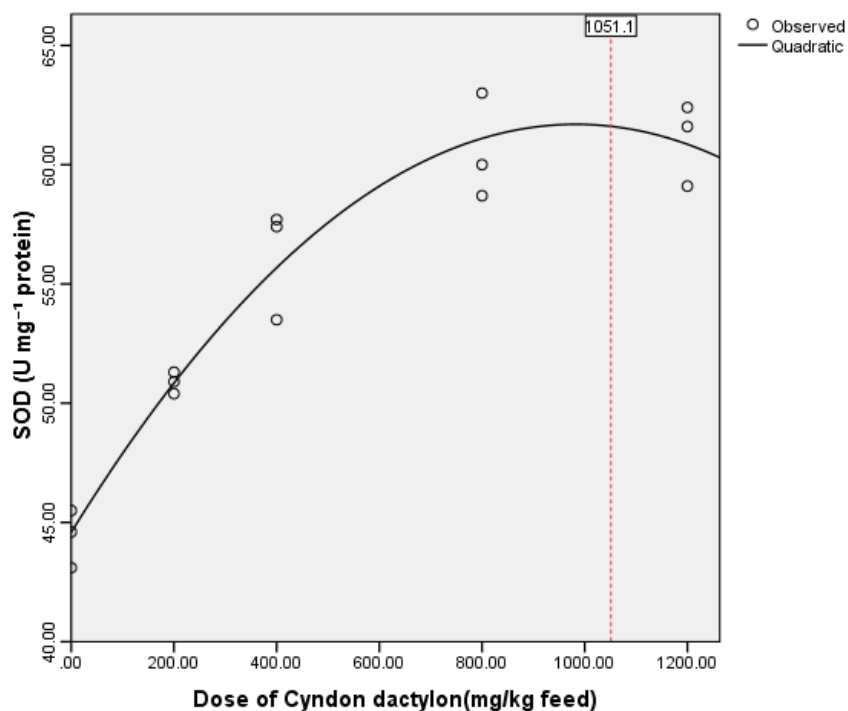
شکل ۳. منحنی غلظت-پاسخ نرخ زنده‌مانی (%) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) برازش شده با مدل رگرسیون درجه دوم تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon*.

نرخ زنده‌مانی با افزایش غلظت عصاره، روندی صعودی تا نزدیکی رأس منحنی از خود نشان داد. غلظت بهینه برای بیشینه زنده‌مانی، معادل ۸۷۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم برآورد شد ($R^2 = ۰/۹۷۰$). این مقدار با بالاترین نرخ زنده‌مانی مشاهده‌شده در تیمارهای دارای غلظت متوسط تا بالا مطابقت دارد و مؤید پاسخ زیستی مناسب در این بازه است.



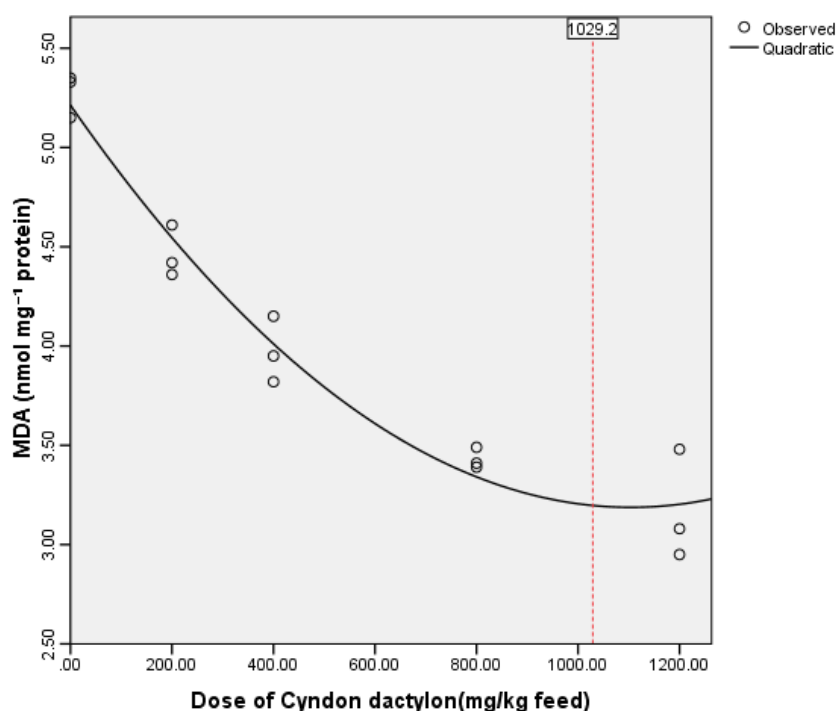
شکل ۴. منحنی غلظت-پاسخ فعالیت آنزیم فنول اکسیداز (PO) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*)، برازش شده با مدل رگرسیون درجه دوم تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon*.

فعالیت آنزیم PO با افزایش غلظت عصاره روندی صعودی داشت و در غلظت ۱۱۰۴/۱ میلی گرم بر کیلوگرم به حداکثر مقدار خود رسید ($R^2 = 0.996$). پایداری این پاسخ در غلظت های بالاتر، به ویژه در محدوده تیماری CD۸۰۰ تا CD۱۲۰۰ نیز قابل مشاهده بود که بیانگر اثربخشی پایدار عصاره در تحریک سیستم ایمنی است.



شکل ۵. منحنی غلظت-پاسخ فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز (SOD) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) برازش شده با مدل رگرسیون درجه دوم تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon*.

فعالیت آنزیم SOD با افزایش غلظت عصاره روندی افزایشی داشت و در غلظت ۱۰۵۱/۱ میلی گرم بر کیلوگرم به بیشینه مقدار خود رسید ($R^2 = ۰/۹۹۶$). پس از این نقطه، کاهش تدریجی در میزان فعالیت آنزیم مشاهده شد که بیانگر الگوی کلاسیک پاسخ غلظت-اثر در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی است.



شکل ۶. منحنی غلظت-پاسخ غلظت مالون دی‌آلدئید (MDA) در میگوی سفید غربی (*L. vannamei*)، برازش شده با مدل رگرسیون درجه دوم تحت تأثیر سطوح مختلف عصاره *C. dactylon*.

غلظت مالون دی‌آلدئید با افزایش غلظت عصاره کاهش یافت و در غلظت ۱۰۲۹/۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم به حداقل مقدار خود رسید ($R^2 = 0.997$). پس از آن، روندی افزایشی مشاهده شد. این الگو بیانگر کاهش استرس اکسیداتیو در محدوده بهینه مصرف عصاره و اثربخشی آن در بهبود وضعیت آنتی‌اکسیدانی میگو است.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن عصاره گیاه *C. dactylon* به جیره میگوی سفید غربی (*L. vannamei*) در دامنه شوری ۴۲–۴۰ گرم بر لیتر، به صورت وابسته به غلظت، منجر به بهبود عملکرد رشد، کارایی خوراک و وضعیت ایمنی-آنتی‌اکسیدانی گردید. این بهبود، افزایش نرخ بقا پس از مواجهه با ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) را در پی داشت. به طور مشخص، تیمار حاوی 800 mg kg^{-1} عصاره (CD_{800})، مطلوب‌ترین توازن را میان شاخص‌های زیستی و اقتصادی نشان داد. اگرچه افزایش سطح عصاره به 1200 mg kg^{-1} (CD_{1200}) بهبود جزئی برخی شاخص‌ها را به همراه داشت، اما از منظر اقتصادی، مزیت قابل ملاحظه‌ای نسبت به تیمار CD_{800} ایجاد ننمود. بر اساس برازش مدل رگرسیون درجه دوم، غلظت بهینه زیستی برای اکثر شاخص‌های مورد بررسی در محدوده ۹۰۰–۱۰۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خوراک برآورد گردید. این محدوده، نقطه حداکثر پاسخ برای نرخ رشد ویژه (SGR)، بقا، فعالیت فنول‌اکسیداز (PO) و سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و همچنین نقطه حداقل برای ضریب تبدیل خوراک (FCR) و مالون دی‌آلدئید (MDA) را شامل می‌شود. این برآورد با پدیده «سقف پاسخ» که در سطوح ۸۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم مشاهده شد، مطابقت دارد.

بهبود معنی‌دار شاخص نرخ رشد ویژه (SGR) و کاهش هم‌زمان ضریب تبدیل خوراک (FCR) در تیمارهای حاوی عصاره، که بهترین عملکرد آن در سطح CD_{800} مشاهده شد، بیانگر آن است که عصاره *C. dactylon* قادر به ارتقای کارایی بهره‌برداری از خوراک است. این یافته‌ها با سازوکارهایی که Wang و همکاران (۲۰۲۴) برای ترکیبات فیتوژنیک تشریح کرده‌اند، شامل بهبود

هضم و جذب، تعدیل میکروبیوتای روده و اثرات آنتی اکسیدانی، هم خوانی دارد. مشاهده «کاهش بازدهی فزاینده» با افزایش غلظت از سطح ۸۰۰ به ۱۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، از منظر تغذیه کاربردی قابل پیش بینی است؛ زیرا با نزدیک شدن به سطح بهینه، محدودیت های فیزیولوژیک یا اشباع مسیرهای بیوشیمیایی بروز می کند. همچنین، احتمال تأثیر بر خوش خوراکی یا تغییرات فیزیکی پلت خوراک نیز مطرح است؛ نکته ای که Yuan و همکاران (۲۰۲۱) نیز در خصوص ارتباط کیفیت فیزیکی خوراک با مصرف به آن اشاره کرده اند.

افزایش معنی دار شمارش کل هموسیت ها (THC)، فعالیت لیزوزیم و فنول اکسیداز (PO) در تیمارهای دریافت کننده عصاره، مؤید تقویت سیستم دفاعی ذاتی میگو است. فعال سازی مسیر پروفنول اکسیداز (proPO) و افزایش فعالیت لیزوزیم، که هر دو در پاک سازی بیمارگرها نقش کلیدی دارند، می تواند آستانه مقاومت در برابر عفونت را پیش از مواجهه افزایش دهد. این تفسیر با مکانیسم های تعدیل سیستم ایمنی در میگوها که توسط Boonchuen و همکاران (۲۰۲۱) گزارش شده، سازگار است. این امر با توجه به گزارش Savadi و همکاران (۲۰۲۰) مبنی بر فعالیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قابل توجه ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی در *C. dactylon*، قابل توجیه است.

افزایش فعالیت آنزیم های سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)، توأم با کاهش غلظت مالون دی آلدئید در تیمارهای حاوی عصاره، نشان دهنده بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی و مهار پراکسیداسیون لیپیدی است. این پدیده که می توان از آن به عنوان «آمادگی آنتی اکسیدانی» یاد کرد، با منطق پیشگیری از آسیب های بافتی و حفظ عملکرد هموسیت ها مطابقت داشته و یک عامل کلیدی در محدود سازی آسیب های ناشی از عفونت ویروس لکه سفید محسوب می شود؛ موضوعی که Ghosh و همکاران (۲۰۲۳) نیز در مرور خود بر آن تأکید کرده اند. کاهش شاخص MDA، با بهبود نرخ بقای میگوها پس از چالش ویروسی هم بستگی مستقیم داشت و نقطه حداقل آن در مدل رگرسیون، در غلظت تقریبی ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم برآورد شد.

افزایش معنی دار نرخ بقا و درصد بقای نسبی (RPS) در تیمارهای CD۴۰۰ تا CD۱۲۰۰، که به اوج خود در سطوح CD۸۰۰ و CD۱۲۰۰ رسید، تأیید کننده این فرضیه است که تقویت وضعیت پایه ایمنی و آنتی اکسیدانی پیش از مواجهه با بیمارگر، پیامدهای بیماری را به شکل مؤثری تعدیل می کند. این یافته با گزارش های متعدد پیشین در خصوص اثربخشی ترکیبات فیتوژنیک هم راستا است؛ برای نمونه، Lee و همکاران (۲۰۲۴) بهبود شاخص های ایمنی و پیامدهای بیماری را با یک فرمولاسیون گیاهی گزارش کرده اند و پیش از آن نیز، Tomazelli Júnior و همکاران (۲۰۱۶) اثر تعدیلی عصاره *C. dactylon* را بر پیامدهای ویروس لکه سفید نشان داده بودند. از منظر پاتوبیولوژی، ویروس لکه سفید علاوه بر سرکوب سیستم ایمنی، از طریق القای استرس اکسیداتیو نیز موجب آسیب می شود؛ بنابراین، تقویت هم زمان پاسخ های ایمنی و ظرفیت آنتی اکسیدانی یک مکانیسم دفاعی جامع برای بهبود نرخ بقا فراهم می آورد. چارچوب های مدل چالش و غلظت گذاری مورد استفاده در این پژوهش نیز با رویکردهای استاندارد که توسط Cox و همکاران (۲۰۲۴) و Kim و همکاران (۲۰۲۳) توصیف شده اند، مطابقت دارد.

برآزش رگرسیون درجه دوم نشان داد که پاسخ شاخص ها به افزایش غلظت عصاره، از یک الگوی غیرخطی پیروی می کند. رأس منحنی ها غالباً در محدوده ۱۰۵۰-۹۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم قرار گرفت که این برآورد آماری با برتری عملکردی مشاهده شده در تیمار CD۸۰۰ و رسیدن به «سقف پاسخ» در تیمار CD۱۲۰۰ کاملاً منطبق است. این یافته ها حاکی از وجود یک «محدوده غلظت بهینه» است که در آن، تعادل میان مزایای بیوشیمیایی و محدودیت های فیزیولوژیک برقرار می شود. چنین الگوی پاسخ به غلظت، در مطالعات مرتبط با افزودنی های فیتوژنیک پدیده ای متداول است؛ امری که Eissa و همکاران (۲۰۲۳) نیز بر اهمیت آن برای دستیابی به حداکثر اثربخشی تأکید کرده اند.

تحلیل اقتصادی نشان داد که تیمار CD۸۰۰ دارای بالاترین نسبت سود به هزینه (BCR) و بازگشت سرمایه (ROI) بود. اگرچه تیمار CD۱۲۰۰ در برخی شاخص های زیستی اندکی برتر بود، اما به دلیل هزینه بالاتر جیره، مزیت اقتصادی بیشتری ایجاد

نکرد. این استدلال اقتصادی با چارچوب‌های استاندارد تحلیل هزینه-فایده در آبی‌پروری که توسط Samat و همکاران (۲۰۲۴) پیشنهاد شده است، مطابقت دارد. بر این اساس، توصیه کاربردی حاصل از این پژوهش، استفاده از عصاره گیاه پنجه مرغی در محدوده غلظت ۸۰۰-۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در خوراک میگوی وانامی است.

هرچند مطالعه حاضر جنبه‌های متعددی را پوشش داد، دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد. هزینه نهایی تولید عصاره در مقیاس تجاری، هزینه‌های نیروی انسانی، انرژی و استهلاک تجهیزات را نیز شامل خواهد شد. لذا، انجام تحلیل حساسیت اقتصادی با قیمت‌های واقعی بازار توصیه می‌گردد. همچنین، برای درک عمیق‌تر سازوکارهای مولکولی، ارزیابی بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با مسیرهای ایمنی و مطالعات بافت‌شناسی می‌تواند به پژوهش‌های آتی افزوده شود؛ موضوعی که Ghosh و همکاران (۲۰۲۳) نیز بر آن تأکید ورزیده‌اند. از آنجا که این آزمایش در شوری بالا انجام شد، تعمیم نتایج به سایر شرایط پرورش مستلزم انجام آزمون‌های تکمیلی است، همان‌گونه که Ariadi و همکاران (۲۰۲۳) نیز در راهنمای خود به اهمیت شرایط محیطی اشاره کرده‌اند.

نتیجه‌گیری

برآیند نتایج زیستی (بهبود رشد، کاهش ضریب تبدیل غذایی و ارتقاء دفاع ایمنی-آنتی‌اکسیدانی) و اقتصادی (شاخص‌های مطلوب BCR و ROI) این پژوهش، حاکی از آن است که عصاره گیاه *C. dactylon* در محدوده غلظت ۸۰۰ الی ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، افزودنی خوراکی کارآمد و دارای توجیه اقتصادی برای بهبود عملکرد پرورش و افزایش مقاومت میگوی پا سفید غربی در برابر بیماری ویروسی لکه سفید (WSSV) است. در راستای کاربرد صنعتی این یافته‌ها، اقداماتی نظیر استانداردسازی کیفی عصاره، تضمین توزیع یکنواخت و همگن آن در خوراک و ارزیابی عملکرد در مقیاس نیمه‌صنعتی، به عنوان گام‌های ضروری آتی مطرح می‌گردند.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاری‌های ارزشمند کارکنان «مرکز بازسازی ذخایر آبیان خلیج فارس (کارگاه کلاهی، میناب)» در اجرای مراحل پرورش و چالش با ویروس سندرم لکه سفید (WSSV) ابراز می‌دارند. همچنین از پشتیبانی فنی «پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس (بندرعباس)» در انجام تمامی سنجش‌های آزمایشگاهی (THC، لیزوزیم، PO، SOD، CAT و MDA) تشکر و قدردانی می‌شود. بدین وسیله از کارشناسان واحد مولکولی برای تیتراژ ویروس با روش Real-time PCR و از کلیه تکنسین‌های مزرعه و آزمایشگاه که در پایش کیفیت آب و آماده‌سازی جیره‌ها مساعدت نمودند، کمال تشکر به عمل می‌آید.

References

- Ariadi, H., Azril, M., and Mujtahidah, T., 2023. Water quality fluctuations in shrimp ponds during dry and rainy seasons. *Croatian Journal of Fisheries*, 81, 127–137. <https://doi.org/10.2478/cjf-2023-0014>
- Boonchuen, P., Jaree, P., Somboonviwat, K., and Somboonwiwat, K., 2021. Regulation of shrimp prophenoloxidase activating system by lva-miR-4850 during bacterial infection. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82881-2>
- Cox, N., De Swaef, E., Corteel, M., Van Den Broeck, W., Bossier, P., Nauwynck, H. J., and Dantas-Lima, J. J., 2024. Experimental Infection Models and Their Usefulness for White Spot Syndrome Virus (WSSV) Research in Shrimp. *Viruses*, 16(5), 813. <https://doi.org/10.3390/v16050813>

- Eissa, E.-S. H., Elbahnaswy, S., El-Baz, A. H., El-Haroun, E., Ashour, M., Mansour, A. T., Saadony, S., El-Saeed, A. F., Kabary, H., Jastaniah, S. D., Alaidaroos, B. A., Shafi, M. E., Abd El-Hack, M. E., Eissa, M. E. H., and Eldessouki, E. A., 2023. Effects of dietary commercial phytobiotic “Sanacore® GM” on Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) growth, immune response, redux status, intestinal health, and disease resistance against *Fusarium solani*. *Aquaculture International*, 32(3), 3041–3060. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01310-5>
- Eldessouki, E. A. A., Diab, A. M., Selema, T. A. M. A., Sabry, N. M., Abotaleb, M. M., Khalil, R. H., El-Sabbagh, N., Younis, N. A., and Abdel-Tawwab, M., 2022. Dietary astaxanthin modulated the performance, gastrointestinal histology, and antioxidant and immune responses and enhanced the resistance of *Litopenaeus vannamei* against *Vibrio harveyi* infection. *Aquaculture International*, 30(4), 1869–1887. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00876-w>
- FAO. 2024. The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action. Rome: FAO. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
- Ghosh, A. K., Panda, S. K., and Luyten, W., 2023. Immunomodulatory activity of plants against white spot syndrome virus (WSSV) in shrimp culture: A review. *Aquaculture International*, 31, 1743–1774. <https://doi.org/10.1007/s10499-023-01051-5>
- Islam, S. I., Mou, M. J., Sanjida, S., and Mahfuj, S., 2022. A review on molecular detection techniques of white spot syndrome virus: Perspectives of problems and solutions in shrimp farming. *Veterinary Medicine and Science*, 9(2), 778–801. Portico. <https://doi.org/10.1002/vms3.979>
- Kim, M. J., Kim, S. H., Kim, J. O., Lee, T. K., Jang, I. K., and Choi, T. J., 2023. Efficacy of WSSV VP28-expressing *Chlorella vulgaris* as an oral vaccine. *Viruses*, 15(10), 2010. <https://doi.org/10.3390/v15102010>
- Lee, Y. S., Umam, K., Kuo, T. F., Yang, Y. L., Feng, C. S., and Yang, W. C., 2024. Functional and mechanistic studies of a phytogenic formulation, Shrimp Best, in growth performance and vibriosis in whiteleg shrimp. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-62436-x>
- Mozafari, A. A., Vafae, Y., and Shahyad, M., 2018. Phytochemical composition and in vitro antioxidant potential of *Cynodon dactylon* leaf and rhizome extracts as affected by drying methods and temperatures. *Journal of Food Science and Technology*, 55(6), 2220–2229. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3139-5>
- Samat, N., Goh, K. H., and See, K. F., 2024. Application of cost–benefit analysis to aquaculture production systems: A review. *Aquaculture*, 587, 740816. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2024.740816>
- Singh, V., Singh, A., Singh, I. P., and Kumar, B. D., 2021. Phytomedicinal properties of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. (Durva) in its traditional preparation and extracts. *Phytomedicine Plus*, 1(1), 100020. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100020>
- Savadi, S., Vazifedoost, M., Yazdanbanah, H., and Zarinkamar, F., 2020. Phytochemical and antimicrobial/antioxidant activity of *Cynodon dactylon* extract. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 5946541. <https://doi.org/10.1155/2020/5946541>

- Tomazelli Junior, O., Kuhn, F., Mendonça Padilha, P. J., Mota Vicente, L. R., Winckler da Costa, S., Corrêa da Silva, B., Dias Schleder, D., Boligon, A. A., Scapinello, J., Nunes Nesi, C., Dal Magro, J., and De Lamo Castellví, S., 2016. Effect of *Cynodon dactylon* extract on white spot virus-infected *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture International*, 25(3), 1107–1122. <https://doi.org/10.1007/s10499-016-0101-2>
- Wang, J., Deng, L., Chen, M., Che, Y., Li, L., Zhu, L., Chen, G. and Feng, T., 2024. Phytogenic feed additives as natural antibiotic alternatives. *Animal Nutrition*, 17, 244–264. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.01.012>
- Weerathunga, V., Lee, S. Y., Kumar, S., Bayen, S. and Cheung, S. G., 2021. Impacts of pH on the fitness and immune system of Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*). *Frontiers in Marine Science*, 8, 748837. <https://doi.org/10.3389/fmars.2021.748837>
- Yuan, Y., Lawrence, A. L., Chehade, S. B., Jensen, K. E., Barry, R. J., Fowler, L. A., Makowsky, R., Powell, M. L. and Watts, S. A., 2021. Feed intake as an estimation of attractability in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 532, 736041. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736041>