



University of Guilan

University of Guilan with collaboration of Iranian
Aquaculture Society

Aquatic Animals Nutrition

Vol. 11, No. 1, 2025, pages: 1-17
DOI: 10.22124/janb.2025.29579.1271



RESEARCH PAPER

OPEN ACCESS

Effect of diet containing the purple coneflower, *Echinacea purpurea* extract and powder on innate immune-antioxidant factors in the hemolymph of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* under pH stress

Morteza Raoofi, , Arash Akbarzadeh, Ahmad Noori, Mohammad Niroomand, Leila Abdoli
Department of Fisheries, Faculty of Marine Sciences and Technology, University of Hormozgan,
Hormozgan, Bandar Abbas, Hormozgan, Iran

Received 20 January 2025

Revised 14 March 2025

Accepted 17 March 2025

Published online 19 May 2025

KEYWORDS ABSTRACT

Antioxidants
pH stress
Echinacea purpurea
Hemolymph
Shrimp

Introduction: One of the novel approaches in stress management and health improvement in aquatic organisms is the use of dietary supplements with immune-boosting properties. Purple coneflower, *Echinacea purpurea*, as one of the medicinal plants, due to its phenolic compounds, glycosides, alkaloids, and antioxidant, anti-inflammatory, and immune-boosting properties, can be used as a natural supplement to improve immune system performance and resistance against environmental stresses in aquaculture. Research in aquatic species has shown that the use of medicinal plant including *E. purpurea* can have positive effects on the physiological status, immunity, and health of aquatic organisms when faced with environmental stresses and diseases. In this study, the effects of a diet containing purple coneflower extract and powder on hematological and immune-antioxidant factors of the hemolymph of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) under pH stress were investigated.

Materials and Methods: Shrimp were fed with diets containing different concentrations of purple coneflower extract (0.25%, 0.5%, and 1%) and powder (0.25%, 5% and 10%) for 68 days. Subsequently, the performance of blood and immune-antioxidant factors in the hemolymph, including total and differential hemocyte counts and the activity of enzymes such as lysozyme, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase were evaluated after exposure to acidic (pH 4.5) and alkaline (pH 9.5) stress conditions for 24 hours.

Results and Discussion: Under acidic and alkaline pH conditions, the total hemocyte count was significantly lower than in the control group in different treatments except for treatment containing 0.25% extract of purple coneflower ($P < 0.05$). The large granular cells did not show significant difference among

treatments in response to acidic pH stress ($P>0.05$), however, they were significantly lower than the control group in different treatments except for treatment containing 0.25% extract of purple coneflower in response to alkaline pH stress ($P<0.05$). Additionally, the results showed that under acidic and alkaline pH stress conditions, the semigranular and hyaline cells and the activity of lysozyme, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase, did not show significant differences compared to the control group at lower doses of extract and higher doses of purple coneflower ($P>0.05$). However, with an increase in extract dosage and a decrease in powder dosage, the immune-antioxidant factors in the shrimp's hemolymph were reduced compared to the control group.

The results of this study indicate that purple coneflower, at certain concentrations, led to changes in the hemolymph immune-antioxidant response under acidic and alkaline pH conditions, resulting in a reduction in hemocyte counts and then activity of immune-antioxidant enzymes. The results showed that the plant, at some doses, was not effective in regulating the immune-antioxidant response of shrimp under acidic and alkaline pH conditions.

Conclusion: The results of this study indicated that different concentrations of purple coneflower extract and powder can affect the immune-antioxidant system of shrimp in response to pH stress. The treatment with 0.25% the purple coneflower extract exhibited the most positive effect on shrimp immunity in response to pH stress, where hemocyte counts and immune-antioxidant enzyme activity in this treatment did not differ significantly from the control group under both acidic and alkaline pH stress. This positive effect is likely due to the presence of active metabolites, especially active polyphenolic compounds and polysaccharides, in the purple coneflower extract. When using the purple coneflower as a natural supplement in shrimp feeding, their concentrations should be carefully managed to prevent negative impacts on the immune system.

*Corresponding author: arash@hormozgan.ac.ir





"مقاله پژوهشی"

تأثیر جیره حاوی پودر و عصاره اتانولی گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بر فاکتورهای ایمنی غیر اختصاصی-ضد اکسایشی همولنف میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با استرس pH

مرتضی رئوفی، آرش اکبرزاده، احمد نوری، محمد نیرومند، لیلا عبدلی
گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، هرمزگان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۲/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۷ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۲/۲۹

کلمات کلیدی

چکیده

گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) بدلیل دارا بودن ترکیبات فنولی، پلی ساکاریدها و آلکالوئیدها به عنوان یک مکمل طبیعی در بهبود عملکرد دستگاه ایمنی و مقاومت در برابر استرس های محیطی در آبی پروری قابل استفاده است. در این تحقیق، تأثیر جیره های حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل بر عملکرد دستگاه ایمنی-ضد اکسایشی همولنف میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با استرس pH بررسی شد. میگوها به مدت ۶۸ روز با جیره هایی شامل غلظت های مختلف عصاره (۰/۱٪، ۰/۵٪، ۰/۲۵٪) و پودر (۰/۱٪، ۰/۵٪، ۰/۲۵٪) این گیاه تغذیه شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در معرض pH اسیدی (۴/۵) و قلیایی (۹/۵) قرار گرفتند. در pH اسیدی و قلیایی، تعداد کل هموسیت ها به جز در تیمار حاوی ۰/۲۵٪ عصاره، در دیگر تیمارها به طور معنی داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). یاخته های گرانولار بزرگ در پاسخ به استرس pH اسیدی تفاوت معنی دار بین تیمارها نشان ندادند ($P > 0.05$)، اما در پاسخ به استرس pH قلیایی، به جز تیمار ۰/۲۵٪ عصاره، در دیگر تیمارها به طور معنی داری کمتر از گروه شاهد بودند ($P > 0.05$). همچنین، در شرایط استرس pH اسیدی و قلیایی، یاخته های نیمه گرانولار و هیالین و فعالیت آنزیم های لایزوزیم، سوپراکسید دیسموتاز، گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در غلظت های پایین تر عصاره و بالاتر پودر تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشتند ($P > 0.05$)، اما با افزایش غلظت عصاره و کاهش پودر، فاکتورهای ایمنی-ضد اکسایشی نسبت به گروه شاهد کاهش یافتند ($P > 0.05$). تیمار حاوی ۰/۲۵٪ عصاره سرخارگل بیشترین تأثیر مثبت را در پاسخ ایمنی میگو به استرس pH نشان داد، به طوری که در مواجهه با استرس pH اسیدی و قلیایی تعداد هموسیت ها و فعالیت آنزیم های ایمنی-ضد اکسایشی در این تیمار تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشت. این تأثیر مثبت احتمالاً به دلیل وجود متابولیت های مؤثر به خصوص پلی فنول ها و پلی ساکاریدهای عصاره گیاه سرخارگل است.

مقدمه

صنعت پرورش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) با چالش‌های مختلفی در زمینه بهینه‌سازی فرمول جیره غذایی (Rahman et al. 2017; Al Eiss et al. 2022) و وجود بیماری‌ها (Delphino et al. 2022; Geetha et al. 2022) روبه‌روست که ممکن است بر پایداری، کارایی، سودآوری و بهره‌وری تولید تأثیر منفی بگذارد. از آنجا که میگوها در مراحل مختلف زندگی خود نیاز به سطوح خاصی از مواد مغذی دارند، بهینه‌سازی فرمول جیره غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. این مراحل شامل لاروی، پست لاروی، جوانی، نیمه‌بالغ و بالغ است (Fox et al. 2001). به‌طور سنتی، برای دستیابی به رشد بهینه، از خوراک ماهی (FM) برای تأمین نیازهای تغذیه‌ای خاص میگوها استفاده می‌شود که انرژی نسبتاً بالایی را در هر واحد وزن تأمین می‌کند (Fox et al. 2004; Miles and Chapman, 2006).

استرس‌های محیطی، از جمله تغییرات شدید pH آب، ممکن است به‌طور قابل توجهی بر سلامت، رشد و بقای این گونه اثر منفی بگذارند (Yu et al. 2020). تغییرات ناگهانی pH آب ناشی از فعالیت‌های انسانی، کشاورزی، یا تغییرات طبیعی در محیط زیست آبی، ممکن است منجر به اختلالات فیزیولوژیک، کاهش ایمنی، و حتی مرگ‌ومیر در میگوها شود (Kathyayani et al. 2019). لذا، یافتن راهکارهایی برای تقویت مقاومت میگوها در برابر چنین استرس‌هایی از اهمیت بالایی برخوردار است.

یکی از رویکردهای نوین در مدیریت استرس و بهبود سلامت در آبزیان، استفاده از مکمل‌های غذایی با خواص تقویت‌کنندگی ایمنی است (Ciji et al. 2021). گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی با خواص متعدد شناخته شده است. این گیاه به‌خصوص به‌دلیل خصوصیات ضداکسایشی، ضدالتهابی و تقویت‌کننده دستگاه ایمنی توجه زیادی از سوی پژوهشگران را جلب کرده است (Miroshina and Poznyakovskiy, 2023). مواد فعال موجود در سرخارگل مانند ترکیبات فنولی، گلیکوزیدها و آلکالوئیدها به‌طور خاص برای تقویت پاسخ ایمنی شناخته می‌شوند و

می‌توان آن را به‌عنوان یک مکمل طبیعی در بهبود عملکرد دستگاه ایمنی استفاده کرد (Thomsen et al. 2010; Medina-Beltrán et al. 2012; Akbary et al. 2019).

مطالعات پیشین در زمینه استفاده از سرخارگل در جیره غذایی آبزیان، نتایج امیدوارکننده‌ای را نشان داده‌اند. تحقیقات نشان داده‌اند که افزودن عصاره یا پودر سرخارگل به جیره غذایی ماهی‌ها ممکن است منجر به افزایش پاسخ ایمنی، بهبود عملکرد رشد، و کاهش میزان مرگ‌ومیر ناشی از عوامل استرس‌زا شود (Gong et al. 2022). با وجود این، تحقیقی در مورد تأثیر گیاه سرخارگل بر میگوی سفید غربی، به‌خصوص در شرایط استرس ناشی از تغییرات pH، انجام نشده است. استرس pH یکی از چالش‌های اساسی در پرورش میگوها محسوب می‌شود. تغییرات شدید pH ممکن است موجب ایجاد شرایط نامساعد اسمزی، اختلال در فرآیندهای متابولیک و افزایش تولید رادیکال‌های آزاد شود که در نهایت منجر به ضعف دستگاه ایمنی و کاهش بهره‌وری تولید می‌شود (Cargnin and João, 2024). لذا، بررسی تأثیر استفاده از مکمل‌های غذایی گیاهی مانند سرخارگل در کاهش اثرات منفی این نوع استرس، ممکن است زمینه‌ساز راهکارهایی مؤثر برای بهبود سلامت و افزایش بازدهی در صنعت پرورش میگو باشد. مطالعه حاضر با هدف بررسی تأثیر جیره حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل بر مقاومت میگوی سفید غربی در برابر استرس pH طراحی شده است. فرض بر این است که افزودن این مکمل‌ها به جیره غذایی می‌تواند با تقویت دستگاه ایمنی ذاتی، بهبود عملکرد ضداکسایشی و کاهش اثرات مخرب استرس اکسایشی ناشی از تغییرات pH، منجر به افزایش نرخ بقا، بهبود رشد، و کاهش آسیب‌های بافتی در میگوها شود. تحقیقات مشابه در دیگر گونه‌های آبزیان نیز نشان داده‌اند که استفاده از عصاره گیاهان دارویی، از جمله گیاه سرخارگل، ممکن است اثرات مثبتی بر بهبود وضعیت فیزیولوژیک، ایمنی و سلامت آبزیان در مواجهه با استرس‌های محیطی و بیماری‌ها داشته باشد. به خصوص، مطالعات متعدد بر روی انواع مختلف ماهیان و میگوها نشان داده است که گیاهان دارویی مانند گیاه سرخارگل می‌توانند با تقویت پاسخ ایمنی غیر اختصاصی و افزایش توان دفاعی آبزیان در برابر پاتوژن‌ها و استرس‌های

صاف شده تا عصاره خالص حاصل شود. محلول صاف شده پس از رسوب‌گیری، با دستگاه روتاری در شرایط خلأ عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل در ظروف شیشه‌ای تمیز و استریل ریخته شده و در فریزر در دمای 18°C - نگهداری و ذخیره شد (Petrova et al. 2023).

تیمارهای آزمایشی

در این تحقیق، جیره‌های غذایی شامل هفت تیمار و سه تکرار بود. تیمارها شامل گروه شاهد که فاقد عصاره و پودر گیاه سرخارگل بود و شش تیمار اصلی شامل سه تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره این گیاه (به ترتیب ۰/۵٪، ۲/۵٪، ۵٪ و ۱٪) و سه تیمار دیگر با مقادیر متفاوت پودر گیاه سرخارگل شامل ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪ بود. جیره‌های آزمایشی با استفاده از نرم افزار جیره نویسی Lindo بالانس و مطابق جدول ۱ فرموله و تهیه شدند. مواد مورد نیاز جیره به صورت آسیاب شده از شرکت هرمز دام واقع در ایسین استان هرمزگان تهیه شد. پس از الک کردن مواد، اجزای خشک جیره با روغن ماهی، روغن سویا و آب در دستگاه همزن مخلوط شده (برای جیره حاوی عصاره، عصاره رقیق شده با آب مقطر نیز به مواد جیره اضافه شد) و سپس با استفاده از دستگاه پلت‌ساز نیمه صنعتی (ساخت چین مدل Maxim TYPE Y1000) در کارگاه تهیه غذای میگو واقع در تیاب شمالی استان هرمزگان، پلت‌ها با اندازه متناسب با دهان میگو ساخته شدند. پس از خشک شدن، جیره‌های غذایی در کیسه‌های پلاستیکی ضخیم بسته‌بندی، شماره‌گذاری و سپس در دمای 4°C نگهداری شدند.

محیطی، بهبود قابل توجهی در رشد، بازده تغذیه‌ای و کاهش میزان بیماری‌ها داشته باشند (Medina-Beltrán et al. 2019; Fierro-Coronado et al. 2012). لذا هدف از انجام تحقیق حاضر، بررسی تأثیر جیره حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل بر فاکتورهای ایمنی ذاتی آنتی‌اکسیدانی و خونی همولنف میگوی سفید غربی در مواجهه با استرس pH می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره و پودر گیاه سرخارگل

گلبرگ گیاه سرخارگل از تأمین‌کننده معتبر "آدینه سبز" خریداری و پس از انجام عملیات پاک‌سازی، در محیطی سایه‌دار و در دمای اتاق (25°C) به مدت دو هفته خشک شد تا از تخریب ترکیبات فعال آن جلوگیری شود. پس از فرآیند خشک کردن، گیاه با استفاده از آسیاب برقی به پودر نرم تبدیل شدند. در نهایت، پودر حاصل از فرآیند آسیاب از طریق الک با مش ۶۰ عبور داده شد تا اندازه ذرات به طور یکنواخت تنظیم شود (Miroshina and Poznyakovskiy, 2023).

برای تهیه عصاره اتانولی، پودر گیاه سرخارگل با اتانول ۷۰٪ با نسبت مناسب مخلوط شد، به طوری که نسبت حجمی گیاه به حلال برابر با ۱:۱۰ (یک قسمت گیاه به ده قسمت حلال) شد. تا پودر گیاه به طور کامل در حلال غوطه‌ور شود. درب ظرف را محکم بسته و در محیطی تاریک و خنک به مدت ۵ روز نگهداری شد. در طی این مدت، ظرف به طور روزانه تکان داده شد تا فرایند استخراج به بهترین نحو انجام شود. پس از پایان مدت زمان استخراج، مخلوط از طریق صافی مناسب

جدول ۱ اجزای جیره‌های آزمایشی حاوی مقادیر مختلف پودر و عصاره گیاه سرخارگل (*Echinacea purpurea*) جهت تغذیه میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*).

Table 1 Ingredients of experimental diets supplemented with different doses of purple coneflower *Echinacea purpurea* powder and extract for feeding of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

Diets	Treatments						
Ingredients (g/kg)	Control	2.5% powder	5% powder	10% powder	0.25 extract	0.5% extract	1% extract
Sardine fish meal	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0
Moto fish meal	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0	150.0
Soybean meal	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0	190.0
Wheat meal	170.0	170.0	170.0	170.0	170.0	170.0	170.0
Corn Gluten	62.5	46.9	31.3	0.0	60.0	59.0	56.0
Rice meal	37.5	28.1	18.7	0.0	37.5	36.0	34.0
Wheat Gluten	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0
Corn Gluten	64.0	64.0	64.0	64.0	64.0	64.0	64.0
Bentonit	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Binder	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Premix	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Fish oil	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0	40.0
Soybean Oil	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
<i>E. purpurea</i> powder	0.0	25.0	50.0	100.0	0.0	0.0	0.0
<i>E. purpurea</i> extract	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	5.0	10.0

¹Permixon (Daniran Shiraz Company, Iran): vitamin (A, D₃, E, K₃-Stab, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂, H₂, C-Stay) inositol, L-carnitine, lysine, methionine, antioxidant, phosphate, betaine, multi-enzyme, iron, zinc, selenium, cobalt, copper, manganese and iodine

شرایط آزمایش

در این تحقیق، از حوضچه‌های پرورشی ۳۰۰ لیتری برای انجام آزمایش تغذیه و تست استرس استفاده شد. در ابتدا، حوضچه‌های ۳۰۰ لیتری با استفاده از آب و مواد ضدعفونی‌کننده مناسب مانند کلرین ۵٪ به مدت ۳۰ دقیقه شستشو داده شدند و سپس با آب تمیز به‌طور کامل آبکشی شدند تا هیچ‌گونه بقایای مواد ضدعفونی‌کننده در حوضچه‌ها باقی نماند. در مرحله بعدی، حوضچه‌ها با آب فیلترشده و ضدعفونی شده دریا پر شده و فراسنجه‌های آب به‌دقت تنظیم شدند تا شرایط فیزیولوژیک مورد نیاز برای پرورش میگوها تأمین شود.

در این مطالعه، تعداد ۱۰۵۰ عدد میگوی سالم از نظر ظاهری با وزن متوسط اولیه 0.5 ± 0.39 گرم از یک کارگاه معتبر در سیریک هرمزگان تهیه شدند. میگوها به مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر آبزیان بندر کلاهی منتقل شدند. برای جلوگیری از ایجاد استرس و شوک ناشی از تغییرات ناگهانی در شرایط محیطی، میگوها ابتدا به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در کیسه‌های هوادهی روی سطح آب حوضچه‌ها قرار گرفتند تا دما و شرایط آب داخل کیسه با محیط مخزن تطبیق یابد. پس از اطمینان از سازگاری کامل با شرایط محیطی، تعداد ۵۰ عدد میگو به هر یک از ۲۱ حوضچه‌های ۳۰۰ لیتری آزمایش (هفت تیمار و سه تکرار) منتقل و در آنجا ذخیره‌سازی شدند (Moghadam et al. 2022).

تغذیه میگوها با استفاده از خوراک تجاری متناسب با اندازه و مرحله رشد آنها آغاز شد. برنامه تغذیه شامل ۳ تا ۴ وعده غذایی در روز بود و میزان غذا به‌گونه‌ای تنظیم می‌شد که تمامی آن در مدت ۳۰ دقیقه مصرف شود. میگوها به مدت ۱۰ روز در شرایط آزمایشگاهی تحت سازگاری قرار گرفتند تا برای مراحل بعدی تحقیق آماده شوند (Zhu et al. 2022). به‌منظور حفظ کیفیت محیط پرورشی، فراسنجه‌های آب از جمله شوری، pH، دما و اکسیژن محلول به‌طور روزانه اندازه‌گیری و کنترل می‌شدند تا از تغییرات نامطلوب محیطی جلوگیری شود. سپس میگوها در طی ۶۸ روز پرورش، روزانه به‌میزان ۵٪ وزن بدن در سه نوبت و در فواصل زمانی ۶ ساعته در ساعات ۸ صبح، ۱۴ بعد از ظهر و ۲۰ عصر با جیره‌های آزمایشی غذادهی شدند و هر روز، تعویض آب به‌میزان ۵۰٪

انجام شد. فراسنجه‌های آب شامل دمای $28 \pm 2^\circ\text{C}$ ، شوری 1 ± 35 ppt، پی اچ 7.5 و اکسیژن 0.5 ± 0.5 mg/L بودند. در پایان دوره تغذیه، ۳۰ عدد میگو از هر تیمار غذایی در ۳ تکرار (۱۰ میگو در هر مخزن) برای بررسی استرس‌های pH اسیدی و قلیایی استفاده شد. برای استرس pH اسیدی با اضافه کردن تدریجی اسید کلریدریک به آب تا $\text{pH} = 4.5$ و برای استرس pH قلیایی از اضافه کردن تدریجی هیدروکسید سدیم به آب تا $\text{pH} = 9.5$ استفاده شد. میگوها در هر یک از آزمایش‌های استرس به مدت ۲۴ ساعت در معرض این استرس‌ها قرار گرفتند.

همولنف‌گیری و شمارش کل و افتراقی هموسیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی

در پایان هر یک از استرس‌های pH اسیدی و قلیایی، سه میگو از هر حوضچه با روش توضیح داده شده توسط Niroomand و همکاران (۲۰۲۰) همولنف‌گیری شدند. برای همولنف‌گیری از سرنگ انسولین یک میلی‌لیتری و حاوی ۰/۲ میلی‌لیتر ماده ضد انعقاد (شامل ۱۰ میلی‌مول Tris-HCl، ۲۵۰ میلی‌مول ساکارز و ۱۰۰ میلی‌مول سیترات سدیم) با $\text{pH} = 7.6$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. سپس به‌میزان ۰/۲ میلی‌لیتر همولنف (به نسبت ۱:۱ همولنف با محلول ضدانعقاد) از هر میگو گرفته شد. محتویات سرنگ به داخل یک ویال ۱/۵ میلی‌لیتری استریل منتقل و توسط سانتریفیوژ پلاسما از یاخته‌های خونی جدا شد. فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی همولنف شامل فعالیت لایزوزیم، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکاتایون پراکسیداز (GPX) و کاتالاز (CAT) در پلاسما با استفاده از دستگاه اتوآنالیزور بیوشیمیایی و کیت‌های استاندارد تخصصی، سنجش شدند. همچنین، از لام نئوبار و لامل سنگی و توسط میکروسکوپ مدل (Nikon Eclipse E200) با بزرگ‌نمایی ۴۰X برای شمارش کل هموسیت‌های همولنف استفاده شد. برای شمارش افتراقی هموسیت که شامل یاخته‌های هیالین، نیمه-گرانولار و گرانولار بزرگ است، از روش رنگ‌آمیزی می-گرانوالد گیمسا (May-Grünwald Giemsa) استفاده شد و شمارش افتراقی هموسیت‌ها با میکروسکوپ با

گیاه سرخارگل در شکل ۱ مشاهده می‌شود. در شرایط pH اسیدی، میزان همولوسیت کل در تمامی تیمارها به غیر از تیمار حاوی ۰/۲۵٪ عصاره گیاه سرخارگل به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). میزان یاخته‌های گرانولار بزرگ^۱ در هیچ‌یک از تیمارها تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نشان نداد ($P < 0/05$). همچنین تأثیر pH اسیدی بر یاخته‌های نیمه‌گرانولار^۲ نشان داد که به‌غیر از تیمار حاوی ۰/۵٪ عصاره گیاه سرخارگل تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نشان ندادند ($P < 0/05$). همچنین نتایج تأثیر pH اسیدی بر یاخته‌های هیالین^۳ همولنف میگوی سفید غربی نشان داد که میزان این یاخته‌ها در همه گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره و پودر گیاه سرخارگل به جز تیمار حاوی ۰/۲۵٪ عصاره و ۰/۱۰٪ پودر به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$).

بزرگنمایی X ۱۰۰ انجام شد (Baniesmaeili et al. 2023).

سنجش آماری داده‌ها

برای ارزیابی نرمال بودن داده‌ها، از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده شد. پس از آن، برای بررسی همگنی واریانس‌ها، آزمون Levene مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه، برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون One-Way ANOVA و آزمون Tukey در سطح اطمینان ۰/۹۵ استفاده شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۴ انجام شد و نتایج به‌صورت میانگین همراه با انحراف معیار گزارش شدند.

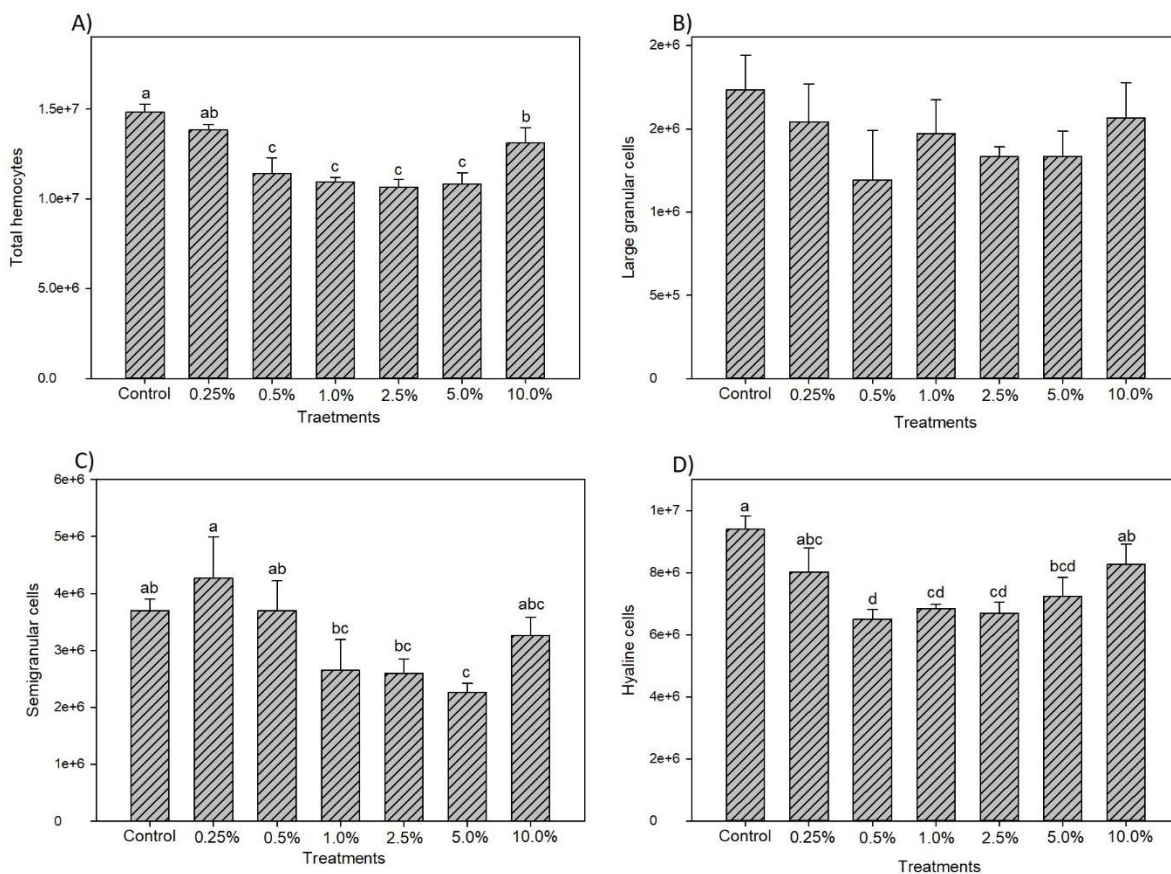
نتایج

تأثیر شرایط استرس pH اسیدی بر هموسیت‌های همولنف میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره و پودر

³- Hyaline Cells

¹- Large Granular Cells

²- Semigranular Cells

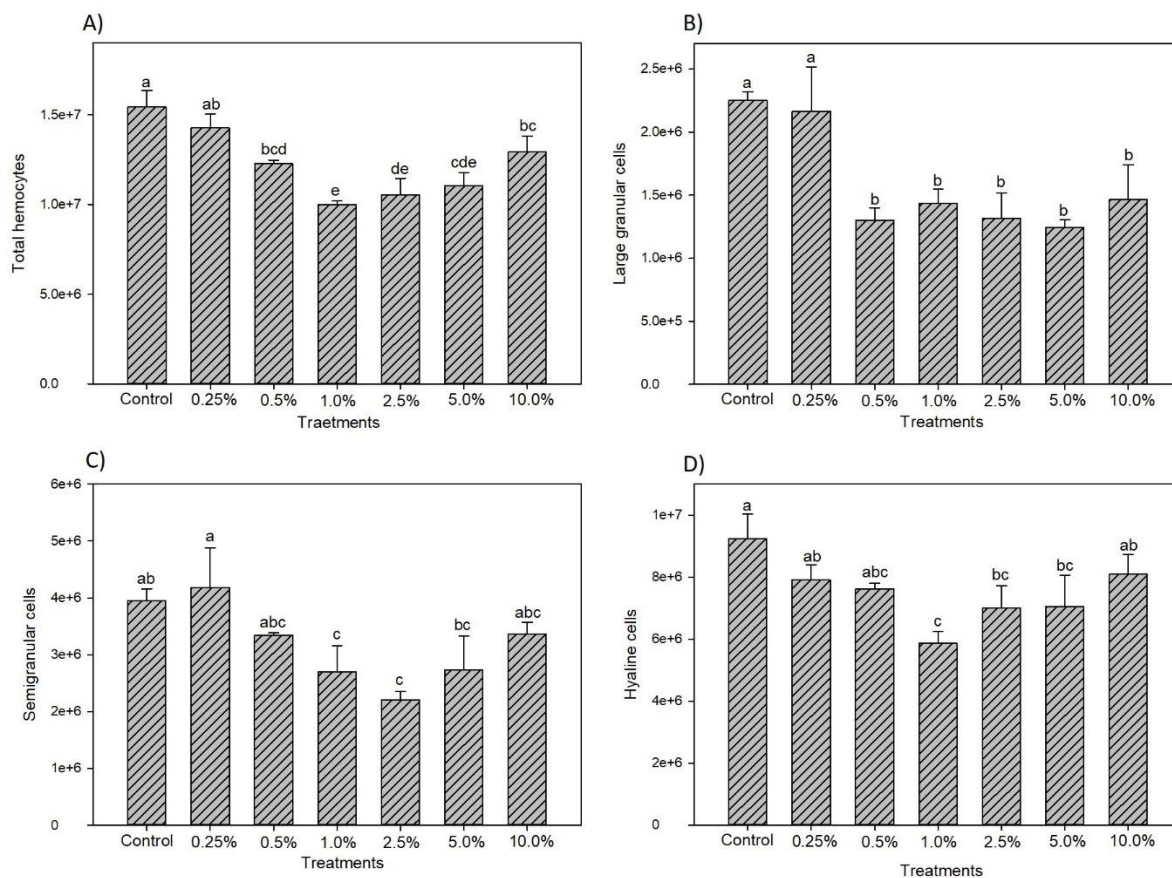


شکل ۱ تأثیر تیمارهای مختلف حاوی گیاه سرخارگل (شاهد، عصاره‌ها با غلظت‌های ۰/۲۵٪، ۰/۵٪، ۱٪ و پودر با غلظت‌های ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪) بر تعداد انواع هموسیت‌ها در میگوی *Litopenaeus vannamei* در شرایط pH اسیدی. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیر یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey در سطح معنی داری ۵٪ است.

Fig 1 The effect of different treatments containing purple coneflower (control, extracts at concentrations of 0.25%, 0.5%, and 1%, and powder at concentrations of 2.5%, 5%, and 10%) on the hemocyte types of *Litopenaeus vannamei* under acidic pH conditions. Values are presented as mean $\pm$ standard deviation. Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test at the 5% significant level.

معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$). همچنین در pH قلیایی تعداد یاخته‌های نیمه‌گرانولار و هیالین در میگوهای تغذیه شده با جیره‌های حاوی ۱٪ عصاره و ۲/۵٪ پودر به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0/05$).

نتایج تأثیر شرایط استرس pH قلیایی بر هموسیت‌های همولف میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل در شکل ۲ آورده شده است. میزان هموسیت کل و یاخته‌های گرانولار بزرگ در تمامی تیمارها به‌غیر از تیمار حاوی ۲/۵٪ عصاره گیاه سرخارگل به‌طور

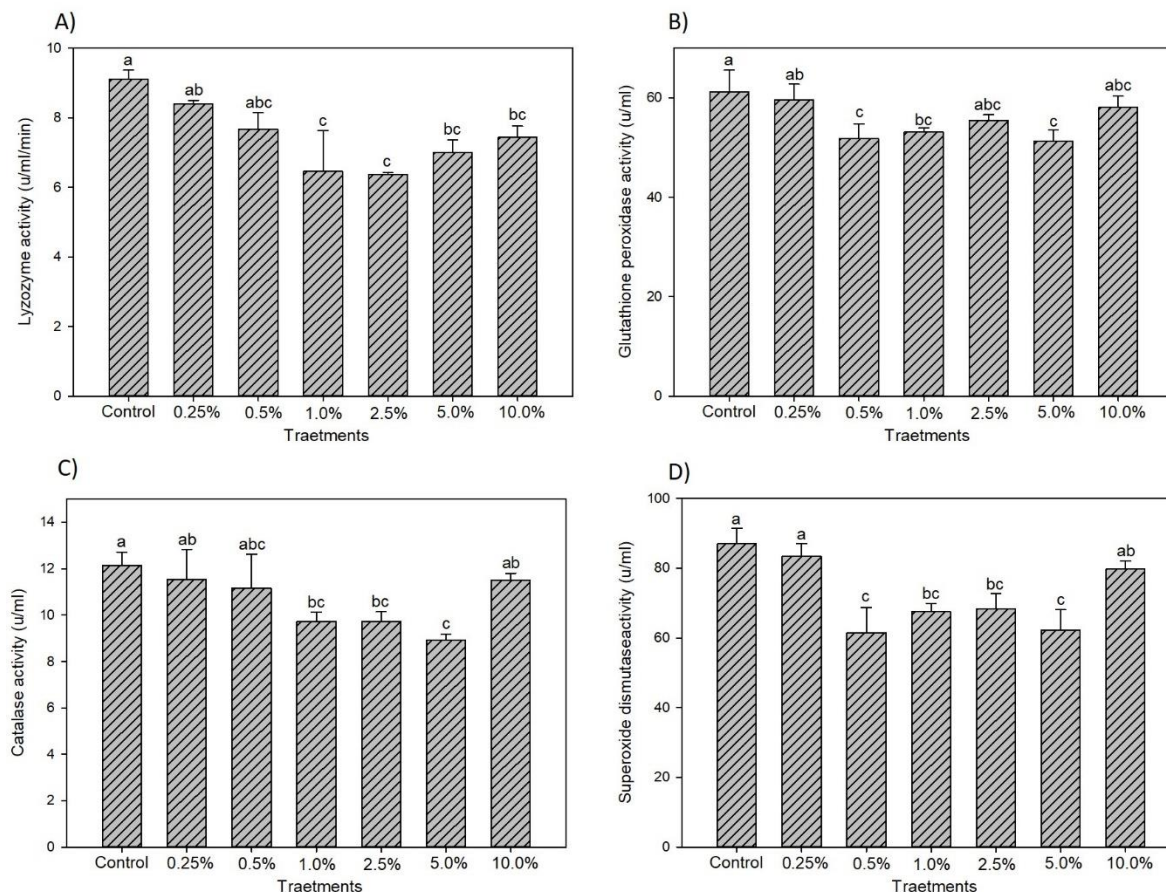


شکل ۲ تأثیر تیمارهای مختلف حاوی گیاه سرخارگل (شاهد، عصاره‌ها با غلظت‌های ۰/۲۵٪، ۰/۵٪، و ۱٪ و پودر با غلظت‌های ۲/۵٪، ۵٪، و ۱۰٪) بر تعداد انواع هموسیت‌ها در میگوی *Litopenaeus vannamei* در شرایط pH قلیایی. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیر یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۵٪ است.

Fig 2 The effect of different treatments containing purple coneflower (control, extracts at concentrations of 0.25%, 0.5%, and 1%, and powder at concentrations of 2.5%, 5%, and 10%) on the hemocyte types of *Litopenaeus vannamei* under alkaline pH conditions. Values are presented as mean $\pm$ standard deviation. Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test at the 5% significant level.

معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). همچنین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای حاوی ۰/۵٪، ۱٪ عصاره و ۲/۵٪ و ۵٪ پودر گیاه سرخارگل به‌طور معنی‌دار کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). تأثیر pH اسیدی بر فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که گروه‌های عصاره ۱٪ و پودر گیاه سرخارگل در سطوح ۲/۵٪ و ۵٪ به‌طور معنی‌داری از گروه شاهد کمتر بود ($P < 0.05$).

تأثیر شرایط استرس pH اسیدی بر فعالیت آنزیم‌های ایمنی - ضد اکسایشی همولنف میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل در شکل ۳ مشاهده می‌شود. در شرایط pH اسیدی، فعالیت آنزیم لایزوزیم در تمامی تیمارها به‌غیر از تیمارهای عصاره ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ گیاه سرخارگل به‌طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در تیمارهای حاوی ۰/۵٪، ۱٪ عصاره و ۵٪ پودر گیاه سرخارگل به‌طور

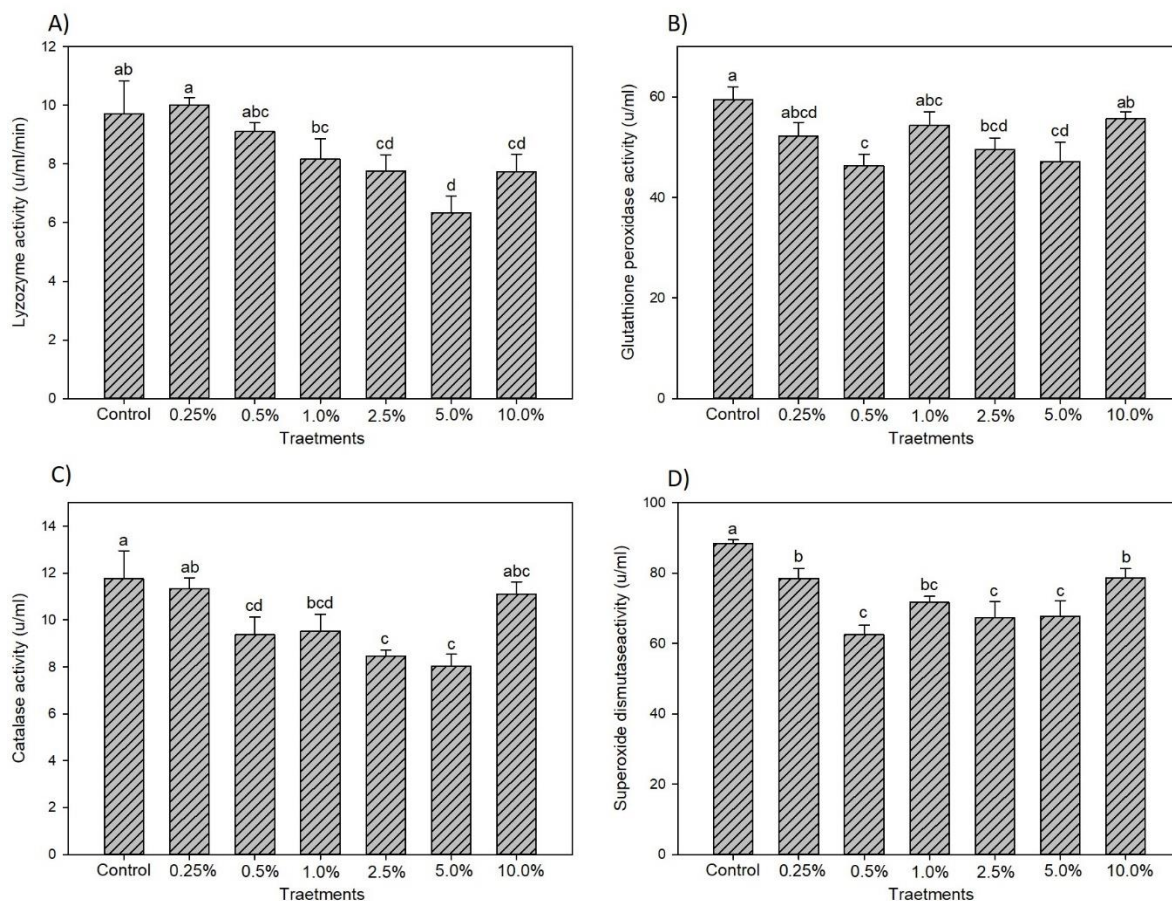


شکل ۳ تأثیر تیمارهای مختلف حاوی گیاه سرخارگل (شاهد، عصاره‌ها با غلظت‌های ۰/۲۵٪، ۰/۵٪، ۱٪ و پودر با غلظت‌های ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪) بر فعالیت آنزیم‌های ایمنی-آنتی اکسیدانی همولنف در میگوی *Litopenaeus vannamei* در شرایط pH اسیدی. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیر یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۵٪ است.

Fig 3 The effect of different treatments containing purple coneflower (control, extracts at concentrations of 0.25%, 0.5%, and 1%, and powder at 2.5%, 5%, and 10%) on the immune-antioxidant factors of hemolymph in *Litopenaeus vannamei* under acidic pH conditions. Values are presented as mean $\pm$ standard deviation. Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test at the 5% significant level.

تأثیر pH قلیایی بر فعالیت آنزیم کاتالاز نشان داد که فعالیت این آنزیم در همه تیمارها به غیر از تیمارهای عصاره ۰/۲۵٪ و پودر ۱۰٪ گیاه سرخارگل به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). نتایج تأثیر pH قلیایی بر فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در همولنف میگوی سفید غربی نشان داد که میزان فعالیت این آنزیم در همه گروه‌های تغذیه شده با سطوح مختلف عصاره و پودر گیاه سرخارگل به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$).

نتایج تأثیر شرایط استرس pH قلیایی بر فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی همولنف میگوی سفید غربی تغذیه شده با جیره حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل در شکل ۴ آورده شده است. در شرایط pH قلیایی نیز فعالیت آنزیم لایزوزیم در تمامی تیمارها به غیر از تیمارهای عصاره ۰/۲۵٪ و ۰/۵٪ گیاه سرخارگل به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). فعالیت آنزیم گلوکاتایون پراکسیداز در تیمارهای حاوی ۰/۵٪ عصاره و ۲/۵٪ و ۵٪ پودر گیاه سرخارگل به طور معنی‌داری کمتر از گروه شاهد بود ($P < 0.05$). همچنین



شکل ۴ تأثیر تیمارهای مختلف حاوی گیاه سرخارگل (شاهد، عصاره‌ها با غلظت‌های ۰/۲۵٪، ۰/۵٪، ۱٪ و پودر با غلظت‌های ۲/۵٪، ۵٪ و ۱۰٪) بر فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی همولنف در میگوی *Litopenaeus vannamei* در شرایط pH قلیایی. مقادیر به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار ارائه شده‌اند. حروف غیر یکسان روی ستون‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار بر اساس آزمون Tukey در سطح معنی‌داری ۵ درصد است.

Fig 4 The effect of different treatments containing purple coneflower (control, extracts at concentrations of 0.25%, 0.5%, and 1%, and powder at 2.5%, 5%, and 10%) on the immune-antioxidant factors of hemolymph in *Litopenaeus vannamei* under alkaline pH conditions. Values are presented as mean $\pm$ standard deviation. Different letters above the bars indicate significant differences based on Tukey's test at the 5% significant level.

اکسایشی و آسیب به باخته‌ها باشد (Hong et al. 2020). با توجه به خصوصیات ضد اکسایشی، ضد التهابی و تقویت‌کننده دستگاه ایمنی گیاه سرخارگل (Miroshina and Poznyakovskiy, 2023)، در تحقیق حاضر اثرات سطوح مختلف پودر و عصاره گیاه سرخارگل بر عملکرد فاکتورهای ایمنی ذاتی-ضد اکسایشی همولنف میگوی سفید غربی در مواجهه با استرس pH ارزیابی شد. با توجه به احتمال وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای در پودر گیاه سرخارگل،

بحث

استرس‌های محیطی، مانند تغییرات در pH، تأثیرات قابل توجهی بر فیزیولوژی و ایمنی میگوهای پرورشی دارند. تغییرات pH به خصوص در محیط‌های اسیدی یا بازی می‌تواند تأثیرات زیادی بر روی هموسیت‌ها، که بخش مهمی از دستگاه ایمنی میگوها هستند، بگذارد. در شرایط استرس pH، تعداد کل هموسیت‌ها (THC) ممکن است کاهش یابد، و این کاهش ممکن است به دلیل افزایش استرس

در این تحقیق هم تأثیر پودر و هم تأثیر عصاره این گیاه ارزیابی و مقایسه شد.

نتایج نشان داد که غلظت پودر و عصاره گیاه سرخارگل تأثیر قابل توجهی بر تعداد هموسیت‌های کل و انواع زیرمجموعه آن در مواجهه با استرس‌های ناشی از pH های اسیدی و قلیایی داشتند. جیره شاهد (بدون عصاره یا پودر) بالاترین تعداد هموسیت‌های کل و انواع زیرمجموعه آن را نشان داد، در حالی که در جیره‌های حاوی عصاره یا پودر گیاه سرخارگل کاهش معنی‌دار در تعداد هموسیت‌ها در پاسخ به استرس‌های pH اسیدی و قلیایی در بعضی از تیمارها مشاهده شد. این نتایج نشان می‌دهد که گیاه سرخارگل در برخی غلظت‌ها منجر به تغییر پاسخ ایمنی همولنف در شرایط pH اسیدی و قلیایی شده و منجر به کاهش تعداد هموسیت‌ها شده است. بررسی تأثیر جیره‌های حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل بر تعداد هموسیت‌های میگوی سفید غربی نشان داد که این گیاه در برخی دوزها نتوانسته است نقش مؤثری در تنظیم پاسخ ایمنی میگو در شرایط pH اسیدی و قلیایی ایفا کند. هرچند که در شرایط pH اسیدی و قلیایی، تعداد هموسیت‌های کل به‌غیر از تیمار ۰/۲۵٪ عصاره در بقیه تیمارها تعداد هموسیت‌های کل به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. مطالعات نشان می‌دهد که کاهش pH به نفع استرس اکسایشی و آسیب به هموسیت‌ها می‌شود. یکی از تحقیقاتی که به این موضوع پرداخته است، نشان داده است که کاهش pH منجر به تغییرات قابل توجهی در تعداد و نوع هموسیت‌ها می‌شود. در شرایط pH اسیدی، تعداد THC ممکن است کاهش یابد و این کاهش ممکن است به دلیل افزایش استرس اکسایشی و آسیب به یاخته‌ها باشد (Hong et al. 2020). همچنین، محققان مشاهده کرده‌اند که pH پایین ممکن است بر عملکرد هموسیت‌ها در دفاع ایمنی تأثیر بگذارد و منجر به کاهش فعالیت‌های بیگانه‌خواری و تولید عوامل ضدباکتریایی شود (Al Mutawa et al. 2020). تأثیر مثبت گیاه سرخارگل بر پاسخ ایمنی در ماهیان به اثبات رسیده است. در ماهی تیلپایی نیل (*Oreochromis niloticus*) استفاده از عصاره گیاه سرخارگل موجب بهبود شاخص‌های ایمنی در روده ماهی شد (Abdel Rahman et al. 2018). همچنین، در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

(*Oncorhynchus mykiss*) استفاده از ۲/۵ و ۵٪ پودر گیاه سرخارگل اثرات مثبتی بر شاخص‌های خون‌شناختی داشت (Oskoi et al. 2012). در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) نیز جیره حاوی ۱٪ عصاره گیاه سرخارگل موجب افزایش یاخته‌های خونی شد (Alinezhad, 2019). همچنین نتایج شمارش افتراقی نشان داد که تعداد یاخته‌های گرانولار بزرگ در مواجهه با استرس pH اسیدی تفاوتی بین تیمارها نداشت، اما در شرایط pH قلیایی تعداد این یاخته‌ها در تیمارهای حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت. این نتایج نشان‌دهنده آن است که شرایط استرس pH اسیدی تأثیر کم‌تری در کاهش یاخته‌های گرانولار بزرگ در تیمارهای حاوی عصاره و پودر گیاه سرخارگل دارد.

تغییرات در pH محیط همچنین ممکن است باعث تغییر در ترکیب و فعالیت آنزیم‌های ضداکسایش هموسیت‌ها شود. در شرایط pH اسیدی، فعالیت آنزیم‌هایی مانند سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز ممکن است کاهش یابد، که نشان‌دهنده کاهش توانایی دفاعی میگوها در برابر استرس اکسایشی است (Wang et al. 2019). همچنین، کاهش pH ممکن است به تغییر در محتوای مالون‌آلدئید و دیگر محصولات اکسایشی منجر شود، که تأثیر منفی بر سلامت و عملکرد هموسیت‌ها دارد (Yang et al. 2022). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در شرایط استرس pH اسیدی و قلیایی، فعالیت آنزیم‌های لایزوزیم، سوپراکسید دیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز و کاتالاز در دوزهای پایین‌تر عصاره و دوزهای بالاتر پودر سرخارگل تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند، اما با افزایش دوز عصاره و کاهش دوز پودر، فاکتورهای ایمنی-ضداکسایشی در همولنف میگو در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافتند. این نتایج منطبق با نتایج به دست آمده از یاخته‌های نیمه‌گرانولی و هیالین هموسیت‌های همولنف میگو در پاسخ به استرس pH بود. مطالعات قبلی نیز نشان می‌دهد که تغییرات pH ممکن است منجر به استرس اکسیداتیو و کاهش تعداد هموسیت‌ها شود، که به‌نوبه خود بر پاسخ‌های ایمنی تأثیر می‌گذارد (Qiu et al. 2011). در تحقیقاتی که در آبزیان انجام شده، مشاهده شده است که استفاده از گیاه سرخارگل موجب بهبود دستگاه ضداکسایشی

تأثیر جیره‌های حاوی مقادیر مختلف گیاه سرخارگل در میگوی سفید غربی دچار تغییر شدند. در این شرایط، عصاره با غلظت‌های پایین‌تر و همچنین پودر گیاه سرخارگل در غلظت‌های بالاتر اثرات کم‌تری بر کاهش تعداد هموسیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی میگو داشت. همچنین، استرس pH اسیدی در مقایسه با استرس pH قلیایی تأثیر کمتری بر هموسیت‌های میگو گذاشت. این نتایج نشان می‌دهند که غلظت‌های مختلف عصاره و پودر گیاه سرخارگل می‌توانند به‌طور معنی‌دار بر پاسخ ایمنی میگو تأثیر بگذارند. تیمار حاوی ۰/۲۵٪ عصاره سرخارگل بیش‌ترین تأثیر مثبت را در پاسخ ایمنی میگو به استرس pH نشان داد، به‌طوری‌که در مواجهه با استرس pH اسیدی و قلیایی تعداد هموسیت‌ها و فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی میگو در این تیمار تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت. این تأثیر مثبت احتمالاً به‌دلیل وجود متابولیت‌های مؤثر به‌خصوص ترکیبات پلی‌فنولی و پلی‌ساکاریدهای موجود در عصاره گیاه سرخارگل است (Oniszczuk, et al. 2019; Hou et al. 2020). این مطالعه همچنین بر اهمیت تنظیم pH در محیط‌های پرورش میگو تأکید می‌کند، زیرا تغییرات نامناسب pH ممکن است به کاهش سلامت و عملکرد ایمنی میگوها منجر شود. همچنین، گیاه سرخارگل را می‌توان به‌عنوان یک مکمل طبیعی در تغذیه میگوها استفاده کرد، ولی باید غلظت‌های آن به‌دقت مدیریت شوند تا از تأثیرات منفی بر دستگاه ایمنی ذاتی جلوگیری شود.

منابع

- Abdel Rahman, A.N., Khalil, A.A., Abdallah, H.M., El-Hady, M. 2018. The effects of the dietary supplementation of *Echinacea purpurea* extract and/or vitamin C on the intestinal histomorphology, phagocytic activity, and gene expression of the Nile tilapia. *Fish & Shellfish Immunology* 82: 312-318. DOI: 10.1016/j.fsi.2018.08.024.
- Akbary, P., Kakoolaki, S. 2019. Growth, hematological, innate immune responses of *Mugil cephalus* fed with *Echinacea*

در ماهیان شده است. در ماهی حوض (*Carassius auratus*) فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوکاتایون ردوکتاز در سرم در پاسخ به مکمل گیاه سرخارگل در جیره افزایش یافت. همچنین محتوای رادیکال هیدروکسیل و مالون‌دی‌آلدهید با افزودن گیاه سرخارگل به جیره کاهش یافت که نشان‌دهنده نقش مثبت این گیاه در پاسخ ضد اکسایشی آبزیان است (Tang et al. 2014). گیاه سرخارگل اثرات زیستی متعددی از جمله فعالیت محرک ایمنی و ضد اکسایشی دارد. فعال‌ترین ترکیبات سرخارگل پلی‌فنول‌ها هستند که شامل مشتقات caftaric acid, chlorogenic acid, cynarin, echinacoside and cichoric acid است. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که خوراک آبزیان با افزودن گیاه سرخارگل توان بالقوه بالایی برای تبدیل شدن به یک منبع خوب از حذف‌کننده‌های رادیکال‌های طبیعی، برای مثال پلی‌فنول‌ها و مواد مغذی دارد. همچنین، ثابت شده است که فرآیند اکستروژن جیره با دمای بالا، ترکیبات ضد اکسایشی فنولیک موجود در گیاه سرخارگل و محصول نهایی را غیرفعال نمی‌کند. خوراک آبزیان با افزودن سرخارگل ممکن است به‌عنوان یک مکمل تغذیه‌ای در پیشگیری از بیماری‌های آبزیان ناشی از استرس اکسایشی استفاده شود (Oniszczuk et al. 2019).

نتایج این تحقیق نشان داد که در مواجهه با استرس pH اسیدی و قلیایی تعداد هموسیت‌های کل و همچنین تعداد انواع مختلف هموسیت‌ها (گرانولار بزرگ، نیمه گرانولار و هیالین) و نیز فعالیت آنزیم‌های ایمنی-ضد اکسایشی تحت

purpurea-supplemented diet against *Photobacterium damsela* infections. *International Journal of Environmental Science and Technology* 16: 325-334. DOI: 10.1007/s13762-017-1578-6

- Al Eissa, A., Chen, P., Brown, P.B., Huang, J.Y. 2022. Effects of feed formula and farming system on the environmental performance of shrimp production chain from a life cycle perspective. *Journal of Industrial Ecology* 26: 2006-2019. DOI: 10.1111/jiec.13370.
- Al Mutawa, M.Y., Ayaad, T.H., Shaurub, E.H. 2020. Hemocyte profile,

- phagocytosis, and antibacterial activity in response to immune challenge of the date fruit stalk borer, *Oryctes elegans*. Invertebrate Survival Journal 17: 147-162. DOI: 10.25431/1824-307X/isj. v0i0.147-162.
- Alinezhad, S. 2019. Effects of diets containing dry extracts of *Achillea millefolium*, *Mentha piperita* and *Echinacea purpurea* on growth, hematological and immunological indices in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). Iranian Journal of Aquatic Animal Health 5: 1-16. DOI: 10.29252/ijaah.5.1.1.
- Baniesmaeili, Y., Akbarzadeh, A., Abdollahi, F., Niroomand M. 2023. Effectiveness of dietary *Moringa oleifera* leaf powder and extract in the Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Iranian Journal of Fisheries Sciences 22: 547-565. DOI: 10.22092/ijfs.2023.129278.
- Cargnin, J.M.R., João, J.J. 2024. Biological denitrification and physico-chemical treatment for removing contaminants and toxicity in wastewater generated by shrimp farming. International Journal of Environmental Science and Technology 21: 6287-6296. DOI: 10.1007/s13762-023-05424-4.
- Ciji, A., Akhtar, M.S. 2021. Stress management in aquaculture: A review of dietary interventions. Reviews in Aquaculture 13: 2190-2247. DOI: 10.1111/raq.12565.
- Delphino, M.K., Laurin, E., Patanasatienkul, T., Rahardjo, R.B., Hakim, L., Zulfikar, W.G., Burnley, H., Hammell, K.L., Thakur, K. 2022. Description of biosecurity practices on shrimp farms in Java, Lampung, and Banyuwangi, Indonesia. Aquaculture 556: 738277. DOI:10.1016/j.aquaculture.2022.738277.
- Fierro-Coronado, J.A., Luna-González, A., Cáceres-Martínez, C.J., Ruiz-Verdugo, C.A., Escamilla-Montes, R., Diarte-Plata, G., Flores-Miranda, M.D.C., Álvarez-Ruiz, P. Peraza-Gómez, V. 2019. Effect of medicinal plants on the survival of white shrimp (*Penaeus vannamei*) challenged with WSSV and *Vibrio parahaemolyticus*. Latin American Journal of Aquatic Research 47: 377-381. DOI: 10.3856/vol47-issue2-fulltext-20.
- Fox, J.M., Lawrence, A.L., Smith, F. 2004. Development of a low-fish meal feed formulation for commercial production of *Litopenaeus vannamei*. Avances En Nutrición Acuicola. <https://nutricionacuicola.uanl.mx/index.php/acu/article/view/199>
- Fox, J.M., Treece, G.D., Sanchez, D.R. 2001. Shrimp nutrition and feed management. Methods for improving shrimp farming in Central America. University of Central America Press, Managua, Nicaragua, 65-90.
- Geetha, R., Avunje, S., Solanki, H.G., Priyadharshini, R., Vinoth, S., Anand, P.R., Ravisankar, T., Patil, P.K. 2022. Farm-level economic cost of *Enterocytozoon hepatopenaei* (EHP) to Indian *Penaeus vannamei* shrimp farming. Aquaculture 548: 737685. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.737685.
- Gong, H., Qin, Z., Chen, Z., Li, J., Chang, Z., Li, J., Chen, P. 2022. Effects of dietary tannic acid on growth, digestion, immunity and resistance to ammonia stress, and intestinal microbial community in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Fishes 7: 327. DOI: 10.3390/fishes7060327.
- Hong, Y., Yin, H., Huang, Y., Huang, Q., Yang, X. 2020. Immune response to abamectin-induced oxidative stress in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Ecotoxicology and Environmental Safety 188: 109889. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109889.
- Hou, R., Xu, T., Li, Q., Yang, F., Wang, C., Huang, T., Hao, Z. 2020. Polysaccharide

- from *Echinacea purpurea* reduce the oxidant stress *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Biological Macromolecules 149: 41-50. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.129.
- Kathyayani, S.A., Poornima, M., Sukumaran, S., Nagavel, A., Muralidhar, M. 2019. Effect of ammonia stress on immune variables of Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* under varying levels of pH and susceptibility to white spot syndrome virus. Ecotoxicology and Environmental Safety 184: 109626. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109626.
- Medina-Beltrán, V., Luna-González, A., Fierro-Coronado, J.A., Campa-Córdova, Á.I., Peraza-Gómez, V., del Carmen Flores-Miranda, M., Rivera, J.N.G. 2012. *Echinacea purpurea* and *Uncaria tomentosa* reduce the prevalence of WSSV in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultured under laboratory conditions. Aquaculture 358: 164-169. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2012.06.030
- Miles, R.D., Chapman, F.A. 2006. The benefits of fish meal in aquaculture diets. DOI: 10.32473/edis-fa122-2006
- Miroshina, T., Poznyakovskiy, V. 2023. *Echinacea purpurea* as a medicinal plant: characteristics, use as a biologically active component of feed additives and specialized foods. In E3S Web of Conferences 380: 01005. EDP Sciences. DOI: 10.1051/e3sconf/202338001005.
- Moghadam, H., Sourinejad, I., Johari, S.A. 2022. Dietary turmeric, curcumin and nanoencapsulated curcumin can differently fight against salinity stress in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture Research 53: 3127-3139. DOI: 10.1111/are.15825.
- Niroomand, A., Akbarzadeh, A., Ebrahimi, S.A., Sobhani, Sheikahmadi, A. 2020. Effects of dietary black cumin seed meal on growth performance, blood biochemistry and fatty acid composition of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Nutrition 26: 1072-1082. DOI: 10.1111/anu.13065.
- Oniszczyk, T., Oniszczyk, A., Gondek, E., Guz, L., Puk, K., Kocira, A., Kusz, A., Kasprzak, K., Wójtowicz, A. 2019. Active polyphenolic compounds, nutrient contents and antioxidant capacity of extruded fish feed containing purple coneflower *Echinacea purpurea* (L.) Moench. Saudi Journal of Biological Sciences 26: 24-30. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.11.013.
- Oskoi, S.B., Kohyani, A.T., Parseh, A., Salati, A.P., Sadeghi, E. 2012. Effects of dietary administration of *Echinacea purpurea* on growth indices and biochemical and hematological indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Fish Physiology Biochemical 38: 1029-1034. DOI: 10.1007/s10695-011-9587-8
- Petrova, A., Ognyanov, M., Petkova, N., Denev, P. 2023. Phytochemical characterization of purple coneflower roots, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. and their extracts. Molecules 28: 3956. DOI: 10.3390/molecules28093956.
- Qiu, J., Wang, W.N., Wang, L.J., Liu, Y.F., Wang, A.L. 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. Comparative Biochemistry and Physiology 154C: 36-41. DOI: 10.1016/j.cbpc.2011.02.007.
- Rahman, R.A., Kendall, G., Ramli, R., Jamari, Z., Ku-Mahamud, K.R. 2017. Shrimp feed formulation via evolutionary algorithm with power heuristics for handling constraints. Complexity 2017: 7053710. DOI: 10.1155/2017/7053710.
- Tang, X.L., Fu, J.H., Li, Z.H., Fang, W.P., Yang, J.Y., Zou, J.X. 2016. Effects of a dietary administration of purple coneflower (*Echinacea purpurea*) on

- growth, antioxidant activities and 8 miRNAs expressions in crucian carp (*Carassius auratus*). *Aquaculture Research* 47: 1631-1638. DOI: 10.1111/are.12624
- Thomsen, M.O., Fretté, X., Christensen, L.P., Grevsen, K. 2010. The impact of cultivation techniques on bioactive compounds in the aerial parts of *Echinacea purpurea*. 28th International Horticultural Congress (IHC). Lisboa, Portugal, p 70.
- Wang, Z., Qu, Y., Yan, M., Li, J., Zou, J., Fan, L. 2019. Physiological responses of Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* to temperature fluctuation in low-salinity water. *Frontiers in Physiology* 10: 1025. DOI: 10.3389/fphys.2019.01025
- Wang, Z., Zhou, J., Li, J., Zou, J., Fan, L. 2020. The immune defense response of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to temperature fluctuation. *Fish & Shellfish Immunology* 103: 103-110. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.04.053.
- Yang, Y., Xu, W., Jiang, Q., Ye, Y., Tian, J., Huang, Y., Du, X., Li, Y., Zhao, Y., Liu, Z. 2022. Effects of low temperature on antioxidant and heat shock protein expression profiles and transcriptomic responses in crayfish (*Cherax destructor*). *Antioxidants* 11: 1779. DOI: 10.3390/antiox11091779
- Yu, Q., Xie, J., Huang, M., Chen, C., Qian, D., Qin, J.G., Chen, L., Jia, Y., Li, E. 2020. Growth and health responses to a long-term pH stress in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Reports* 16: 100280. DOI: 10.1016/j.aqrep.2020.100280
- Zhu, Y., Lao, F., Pan, X., Wu, J. 2022. Food protein-derived antioxidant peptides: Molecular mechanism, stability and bioavailability. *Biomolecules* 12: 1622. DOI: 10.3390/biom12111622.