ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی وضد باکتریایی پروتیئن‌های همولنف میگوی رودخانه‌ای شرق (*Macrobrachium nipponenes*)

- **کتایون کریم‌زاده*:** گروه بیولوژی دریا، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران، صندوق پستی: **1616**
- **عسگر زحمتکش:** بخش شیلات، مرکز تحقیقات کشاورزي و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزي، رشت، ایران، صندوق پستی: **41635-3394**

تاریخ دریافت: فروردین 1396 تاریخ پذیرش: تیر 1396

چکیده

امروزه با توجه به اهمیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در پیشگیری از بیماری‌های قلبی و عروقی و نیز سرطان‌ها، گرایش به استفاده از ترکیبات طبیعی زیست فعال افزایش یافته است. این تحقیق، بر روی 220 عدد میگو رودخانه‌ای شرق جمع‌آوری شده طی بهار سال 1394 از آب‌های دریای خزر صورت گرفت. جمع‌آوری همولنف از جنس‌های نر و ماده به‌صورت مجزا به‌کمک سرنگ انسولین از ناحیه شکمی انجام شد. پس از جداسازی پروتئین‌ها، فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها به‌روش انتشار چاهک در آگار بر روی 5 سویه باکتریایی مورد بررسی قرار گرفت. همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی آن نیز به روش‌های مهار رادیکال‌های DPPH، هیدروکسیل، پراکسید هیدروژن و قدرت احیاکنندگی اندازه‌گیری گردید. بیش‌ترین و کم‌ترین هاله بازدارندگی با قطرهای 18/27±0/2و 10±0/14 میلی‌متر در کشت باکتری‌های *Vibrio cholerae ogava* و *Escherichia coli* مشاهده شد. اثر ضدباکتریایی همولنف بر علیه سویه‌های باکتری‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (p<0/05). بیش‌ترین فعالیت مهاری رادیکال‌های DPPH ، هیدروکسیل و نیز قدرت کاهندگی برای همولنف جنس نر در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب برابر با 88/2، 57/6 و 29/2 درصد به‌دست آمد و کم‌ترین فعالیت مهاری رادیکال‌های آزاد در همولنف جنس ماده ثبت گردید به‌طوری‌که اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت مهاری DPPH و قدرت کاهندگی در دو جنس نر و ماده با یکدیگر مشاهده شد (p<0/05). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که پروتئین‌های همولنف از توانایی مهار رادیکالی و آنتی‌باکتریایی مناسبی برخوردارند و در صورت کار آزمایی بالینی می‌تواند جهت مصارف دارویی و مکمل غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: همولنف، انتشار از دیسک، رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی

مقدمه

در سال‌های اخیر توجه زیادی به مطالعه ترکیبات طبیعی و کاربرد دارویی آن‌ها شده است. در بین بی‌مهرگان، سخت‌پوستان از پتانسیل بالایی جهت دستیابی به مواد طبیعی با ویژگی‌های درمانی برخوردارند (Youqin و همکاران، 2016؛ Kim و همکاران، 2007) چنان‌که‌در بسیاری از مطالعات انجام شده‌تاکنون، خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی آن‌ها شناسایی شده است (Kiran و همکاران، 2014؛ Tincu و Taylor، 2004). با این‌حال هنوز تحقیقات درخصوص مواد طبیعی استخراج شده و اثرات سلامت آن‌ها جهت تعیین خواص ترکیبات ناشناخته جدید و اثرات سلامت آن‌ها در حال انجام‌است. پپتیدهای ضدمیکروبی(AMPs:Anti-microbial peptides) از اجزای اصلی سیستم دفاعی ذاتی بسیاری از بی‌مهرگان از قبیل سخت‌پوستان می‌باشند که‌نقش‌مهمی در حفاظت آن‌ها در برابر هجوم میکروب‌ها دارند (Zhao و همکاران، 2016). همولنف سخت‌پوستان، حاوی پپتیدهای ضدمیکروبی قوی در برابر باکتری‌های بیماری‌زای انسانی است. این پروتئین‌ها نقش مهمی در مهار رادیکال‌ها، فعالیت آنیون سوپراکسید دسموتاز، ملانیزه شدن (Melanisation) فاگوستیوز و فعالیت کشندگی سلول به‌عهده دارند (Tincu و Taylor، 2004). در سخت‌پوستان حذف میکروارگانیسم‌های مهاجم از سیستم گردش خون توسط هموسیت‌ها (از طریق فاگوستیوز و در نهایت با کشتن مولکول‌های سلولی) و به‌وسیله فاکتورهای ضدمیکروبی محلول در پلاسما انجام شده است (Smith و Chisholm، 2001).

شناسائی پپتیدهای خطی و حلقوی با خواص سیتوتوکسیک، ضدمیکروبی و مسدودکننده‌های کانال یونی و فعالیت‌های آنتی اکسیدانی از موجودات دریایی رو به افزایش می‌باشد (Youqin و همکاران، 2016) مطالعات زیادی درخصوص اهمیت پپتیدهای

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: karimzadehkathy@yahoo.co.uk

ضدمیکروبی به‌عنوان ترکیباتی با خواص ضدمیکروبی، آنتی-اکسیدانی و سیتوکسیک در سیستم دفاعی سخت‌پوستان وجود دارد (Soundarapandian و همکاران، 2014؛ Smith و Chisholm، 2001) به‌طوری‌که‌فعالیت‌ضدباکتری‌و آنتی‌اکسیدانی‌در پلاسما و هپاتوپانکراس گونه *Hemarus americanus* (Veeruraj و همکاران، 2008) و پروتئین‌های هموسیت در خرچنگ ساحلی *Carsinus maenas* مشاهده شده است (Rameshkurmar و Aravindhan، 2009). امروزه گسترش بیماری‌های مرتبط با رادیکال‌های آزاد عوارض نامطلوبی را به‌دنبال داشته که می‌تواند منجر به بروز بیماری‌هایی مانند سرطان شوند (Sumalatha و همکاران، 2016). دستیابی به منابع جدید طبیعی آنتی‌اکسیدانی به جهت امنیت بالاتر آن‌ها نسبت به ترکیبات سنتتزی همواره مورد توجه بوده است. میگوها علاوه بر مصرف غذایی انسان، دارای ترکیبات زیست فعال با خواص متفاوت بیولوژیک نظیر خواص آنتی‌اکسیدانی هستند. میگوی رودخانه‌ای شرق *M. nipponense* در بسیاری از رودخانه‌ها و تالاب‌های شمال‌شرق و غرب کشور یافت می‌شود. این گونه از جمعیت مناسبی در سواحل جنوبی دریای خزر به‌ویژه در تالاب انزلی نیز برخوردار است (De'Grave و Chane، 2006). میگوی رودخانه‌ای علی‌رغم برخورداری از اندازه کوچک، به لحاظ داشتن رشد سریع در مرحله لاروی نسبت به میگوي *Macrobrachium rosenbergii* و تحمل دمای پایین در فصل زمستان، گونه مناسبی جهت آبزی-پروری در آب‌های لب‌شور، کم شور و شیرین به‌شمار می‌رود (نویریان و همکاران، 1393). از آن‌جایی‌که تاکنون مطالعه‌ای بر روی شناسایی ویژگی‌های زیست فعالی پروتئین‌های همولنف آن در دست نمی‌باشد و در گزارش‌های علمی، اطلاعات جامعی درخصوص ویژگی‌های ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌ها وجود ندارد، لذا این تحقیق با هدف بررسی و شناسایی خواص مهار رادیکال آزاد با ویژگی‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های همولنف در دو جنس نر و ماده میگوی رودخانه‌ای شرق انجام شد. همچنین فعالیت ضدمیکروبي این پروتئین‌ها در برابر برخي از باکتري‌های بیماري‌زا نیز مورد بررسي قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه میگو: در این مطالعه 220 قطعه از میگوی رودخانه-ای ظاهراً سالم با طول تقریبی 4/7±0/12 سانتی‌متر و میانگین وزنی 2/8±0/1 گرم طی بهار سال 94 از تالاب انزلی به کمک تله تاشو صید گردید. نمونه‌ها به آزمایشگاه بیولوژی مرکز آموزش شیلات میرزا کوچک خان در رشت منتقل شدند و در داخل مخزن با هوادهی کامل نگه‌داری گردیدند.

جمع‌آوری همولنف و جداسازی پروتئین: همولنف توسط سرنگ انسولین با سر سوزن شماره 26 از سینوس شکمی میگوها، به تفکیک جنسیت جمع‌آوری گردیده و در میکروتیوب-هایی که حاوی بافر سیترات سدیم با pH برابر 4/6 بودند، منتقل شدند. سپس سانتریفیوژ نمونه‌ها در 10 هزار rpm به‌مدت 10 دقیقه در دمای 4˚C انجام گرفت. مایع‌رویی به‌دست آمده، جمع‌آوری شده و جهت آنالیزهای بعدی در درجه حرارت 4˚C نگه‌داری گردید. به‌منظورجداسازی پروتئین‌های همولنف، ابتدا به آن‌ها آمونیم سولفات 75 درصد افزوده گردید. سپس نمونه‌ها در 15هزار rpm در دمای 4˚C در به‌مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند سوسپانسیونی از رسوب به‌دست آمده توسط نمک بافر استات (50 میلی‌مولار با pH=5) تهیه گردید (Hajirasouli و Pazooki، 2014). مقدار پروتئین محلول به‌روش برادفورد به-کمک استاندارد سرم آلبومین گاوی تعیین گردید (Bradford، 1976).

تهیه سویه‌های میکروبی استاندارد: خواص ضدمیکروبی پروتئین‌های همولنف روی 5 سویه باکتریایي ازجمله *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)، *Bacillus subtilis* (ATCC 465)، *Escherichia coli* (ATCC 25922)، *Klebsiella pneumonia* (ATCC 10031) و *Vibrio cholerae ogava* (ATCC14035) مورد بررسی قرار گرفت. کشت‌های خالص این باکتری‌ها از مرکز پژوهش‌های علمی‌صنعتی ایران تهیه‌و تازمان مطالعه در دمای یخچال نگه‌داری شد.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی به‌روش انتشار چاهک در آگار: فعالیت ضدباکتریایی پروتئین‌های همولنف با روش انتشار دیسک انجام شد (Chodsang و همکاران، 2012؛ Baure و همکاران، 1996). روز قبل از انجام آزمایش، از کشت مادر هر یک از باکتری‌ها، مقداری به محیط مولر هینتون برات (muller- hinton- Broth) افزوده گردید و به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری شدند. سوسپانسیونی باکتری‌ها با غلظت 0/5 مک فارلند. ($1/5 \times 10^8$) در نرمالین سالین 85 درصد تهیه گردیده و توسط سواب کتان استریل به‌صورت چمنی در پلیت حاوی محیط کشت مولر هینتون کشت داده شدند. بلافاصله دیسک‌های استریل توسط پنس استریل شده بر روی پلیت‌ها با فاصله مناسب از دیواره و از یکدیگر قرار داده شدند. 20 میکرولیتر همولنف (با غلظت 50 میکروگرم بر میلی‌لیتر) توسط سمپلر روی دیسک‌ها ریخته شد. از دیسک-های آماده آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین (25 میکروگرم/دیسک) و جنتامایسین (10 میکروگرم/دیسک) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به‌صورت وارونه در دمای 37- 35 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند ناحیه مهار شد (هاله عدم رشد) باکتری توسط کولیس ورینه با دقت اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum inhibitory concentration: MIC) وحداقل غلظت کشندگی (Minium bacteridal concentration: MBC): با استفاده از روش رقت لوله‌ای، حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی پروتیئن همولنف در هر دو جنس نر و ماده میگو تعیین گردید (Rios و همکاران، 1988). برای هر غلظت و هر باکتری از یک سری لوله آزمایش 9 تایی استفاده شد (یک لوله برای کنترل مثبت، یک لوله برای کنترل منفی و 7 لوله باقی‌مانده برای تهیه رقت‌های مختلف). ابتدا 9 میلی‌لیتر محلول نوترینت براث به لوله‌ها اضافه شد و استریل گردید. یک میلی‌لیتر از پروتیئن همولنف به لوله اول اضافه شد و پس از هموژن کردن، 1 میلی-لیتر از محلول هموژن به لوله دوم اضافه شد و تا لوله هفتم ادامه یافت. به تمام لوله‌ها به‌جز کنترل مثبت (محیط و همولنف)، 10 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک فارلند اضافه شد. در نهایت لوله‌های تلقیح شده برای 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. آخرین لوله‌ای که در آن

هیچ کدورتی مشاهده نشد به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. جهت تعیین مقدار MBC، از تمامی لوله‌هایی که در آن‌ها عدم رشد مشاهده شده بود، مقدار معینی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. محیط کشت‌های تلقیح شده به‌مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس کم‌ترین غلظتی از پروتیئن همولنف که در آن رشد باکتری مشاهده نشد به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد.

تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل: فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین همولنف براساس روش Prieto و همکاران (1999) تعیین شد. برای تهیه معرف آنتی‌اکسیدانی محلولی با مخلوط واکنش 7/45 میلی‌لیتر اسیدسولفوریک 0/6 مولار، 0/1 گرم سولفات سدیم و 1/23 گرم مولبیدات آمونیم که به حجم نهایی 250 میلی‌لیتر با آب مقطر رسانده شده بود، آماده گردید. 0/1 میلی‌لیتر از همولنف (جنس‌های نر و ماده) با غلظت‌های مختلف (20،40،60،80 و 100 میکرولیتر) توسط معرف آنتی-اکسیدانی تهیه شده به حجم 1 میلی‌لیتر رسانده گردید. بلانک شامل آب مقطر واسید گالیک به‌عنوان استاندارد استفاده شد. میزان جذب در طول موج 695 نانومتر قرائت گردید و فعالیت آنتی-اکسیدانی کل بر حسب درصد با توجه به افزایش جذب نمونه‌ها گزارش گردید.

تعیین مقدار مهار رادیکال پراکسید هیدروژن: میزان قدرت مهار رادیکال پراکسید هیدروژن با روش Govindarajan و همکاران (2003) تعیین گردید. ابتدا محلول پراکسید هیدروژن 10 میلی‌مولار توسط بافر نمکی فسفات (PBS) با pH برابر 7/4 تهیه شد. 1 میلی‌لیتر از همولنف (جنس‌های نر و ماده) باغلظت-های مختلف (20،40،60،80 و 100 میکروگرم برلیتر) با 2 میلی‌لیتر از محلول پراکسید هیدروژن مخلوط گردید. اسید اسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. جذب نمونه در طول موج 230 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر UU- (Jenwey, UK visible) در حضور بلانک (فاقد هیدروژن پراکسید) پس از 10 دقیقه نگه‌داری در دمای 37° قرائت شد درصد پراکسید هیدروژن مهار شده از رابطه (1) محاسبه گردید:

رابطه (1) $(A_0-A_1/A_0)\times100$= درصد مهاری H_2O_2

که درآن A_0 میزان جذب کنترل، A_1 میزان جذب نمونه می‌باشد.

تعیین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل: فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل توسط روش Chung و همکاران (1997) اندازه‌گیری شد. 2 میلی‌لیتر از همولنف با غلظت‌های مختلف (20،40،60،80 و 100 میکروگرم برلیتر در بافر فسفات 0/1 مولار با pH برابر 7/4) به مخلوط واکنشی که شامل 2 میلی‌لیتر از سولفات آهن 7 آبه ($FeSO_4, 7H_2O$) با مولاریته 10 میلی‌مولار، 0/2 میلی‌لیتر EDTA (10 میلی‌مولار) و 0/2 میلی‌لیتر داکسی ریبوز (10 میلی‌مولار) افزوده شد. حجم نهایی واکنش توسط بافر فسفات به 4/8 میلی‌لیتر رسانده شده و سپس 0/2 میلی‌مولار پراکسید هیدروژن (10 میلی‌مولار) به آن افزوده گردید. پس از نگه‌داری به‌مدت 4 ساعت در تاریکی، 1 میلی‌لیتر تری-کلرواستیک اسید 2/8 درصد به‌همراه تیوباربیتوریک اسید 1 درصد افزوده شده در حمام آب جوش به‌مدت 10 دقیقه قرار گرفت. میزان جذب در طول موج 532 نانومتر قرائت گردید و میزان مهار رادیکال هیدروکسیل از رابطه (2) تعیین شد:

رابطه (2) $(A_0-A_1/A_0)\times100$= درصد مهاری رادیکال هیدروکسیل

که درآن A_0 میزان جذب کنترل، A_1 میزان جذب نمونه می‌باشد. از اسید اسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تعیین فعالیت مهار ردیکال آزاد DPPH: سنجش فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (1- diphenyl 1-2- Picrylhydrazyl) DPPH به‌روش Shimada و همکاران (1992) انجام گرفت. محلول DPPH با غلظت 0/1 میلی‌مولار در اتانل تهیه گردید. 1 میلی‌لیتر از همولنف با غلظت‌های بین 20 تا 100 میکروگرم بر لیتر با 1 میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط گردید. مخلوط در تاریکی به‌مدت 30 دقیقه در 25 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از 30 دقیقه میزان جذب در طول موج 517 نانومتر توسط اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

لازم به ذکر است که درکنترل، اتانول به‌جاي همولنف و در بلانک، محلول DPPH 0/1 میلی‌مولار اتانولی استفاده شد. در نهایت، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH طبق رابطه (3) محاسبه گردید:

رابطه (3) $1-(A_s-A_0/A)\times100$= درصد مهار رادیکال آزادDPPH

که در آن As جذب همولنف، A_0جذب بلانک و A جذب کنترل می‌باشد. از اسید گالیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

آنالیز آماری: جهت آنالیز داده‌ها از برنامه SPSS ویرایش 19 استفاده گردید. در ابتدا نرمال بودن داده‌ها با آزمون (گلموگروف اسمیرنوف) تست گردید به‌دلیل نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) برای مقایسه میانگین مقادیر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی استفاده شد. جهت جداسازی گروه‌های همگن از آزمون توکی در سطح آزمون 5% و نرم‌افزار Excel2010 برای پردازش داده‌ها و رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

بررسی فعالیت ضدباکتریایی به‌روش انتشار چاهک در آگار: نتایج حاصل از آزمایش نفوذ انتشاری پروتئین‌های جدا شده از همولنف دو جنس نر و ماده میگوی رودخانه‌ای در جدول 1 آورده شده است. پروتئین‌های همولنف میگوی رودخانه‌ای در هر دو جنس نر و ماده، بیش‌ترین قطر هاله عدم رشد را در برابر باکتری‌های ویبریو سروتایپ اگاوا، باسیلوس سوبتلیس و استافیلوکوکوس اورئوس نشان دادند. در حالی‌که باکتری‌های کلبسیلا پنومونه و اشریشیا کلی به پروتیئن همولنف مقاوم‌تر بوده-اند. آنالیز آماری نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد بین هاله عدم رشد در همه باکتری‌ها در حضور همولنف و شاهد بود.

جدول1: میانگین قطر هاله عدم رشد پروتیئن همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای (*M. nipponense*) بر میکروارگانیسم‌ها

باکتری	پروتیئن همولنف جنس نر (50 میکروگرم بر میلی‌لیتر)	پروتیئن همولنف جنس ماده (50 میکروگرم بر میلی‌لیتر)
S. aureus	16/17±0/2 aB	14/28±0/34 bB
B. subtilis	16/54±0/38 bB	15/45±0/76 bA

E. coli	12/36±0/26 bC	11/51±0/16 bC
K. pneumoniae	13/18±0/15 bC	12/43±0/37 bC
V. cholerae ogava	18/27±0/2 aA	16/38±0/73 bA

(حروف غیر همنام نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان 95 درصد است. حروف کوچک اختلاف در ردیف و حروف بزرگ اختلاف در ستون را نشان می‌دهند)

در جدول 2 میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری در اثر استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین و جنتامایسین بر روی باکتری‌های بیماری‌زای انسانی آورده‌شده است. طبق مقادیر استاندارد موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و کلینیکی (CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute)، می‌توان بیان داشت که باکتری‌های استافیلوکوکوس، باسیلوس سوتیلیس و کلبسیلا پنومونه نسبت به آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین حساس بودند. اماباکتری‌های استافیلو کوکوس، اشریشیا کلی و ویبریو کلره آگاوا نسبت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین مقاوم بودند.

روش رقت لوله‌ای MIC وMBC: جدول 3 حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی پروتیئن همولنف در جنس نر و ماده میگوی رودخانه‌ای را نشان می‌دهد. حداقل غلظت ممانعت کنندگی و کشندگی مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سابتیلیس بود. بیش‌ترین میزان حداقل غلظت ممانعت کنندگی از رشد مربوط به اشریشیا کلی بود و اثر کشندگی روی این باکتری مشاهده نشد.

جدول2: میانگین قطر هاله عدم رشد (برحسب میلی‌متر) دیسک‌هاي حاوي آنتی‌بیوتیک‌هاي مختلف بر روي باکتري‌هاي استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سوبتیلیس، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونه و ویبریو کلره آگاوا

دیسک‌هاي آنتی‌بیوتیک	باکتری					CLSI		
	S. aureus	*B. subtilis*	*E.coli*	*K. pneumoniae*	*V.cholerae ogava*	S	I	R
آموکسی‌سیلین (25 میکروگرم/دیسک)	15/32±0/15 a	18/62±0/25 a	10/74±0/14c	16/56±0/1a	11/5±0/12c	≥14	12-13	≤11
جنتامایسین (10 میکروگرم/دیسک)	11/15±0/25 c	19/10±0/3a	8/30±0/34d	12/85±0/1b	7/76±0/1d	≥15	13-14	≤12

حروف کوچک غیرهمنام در هر ردیف تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان 95 درصد را نشان می‌دهد.

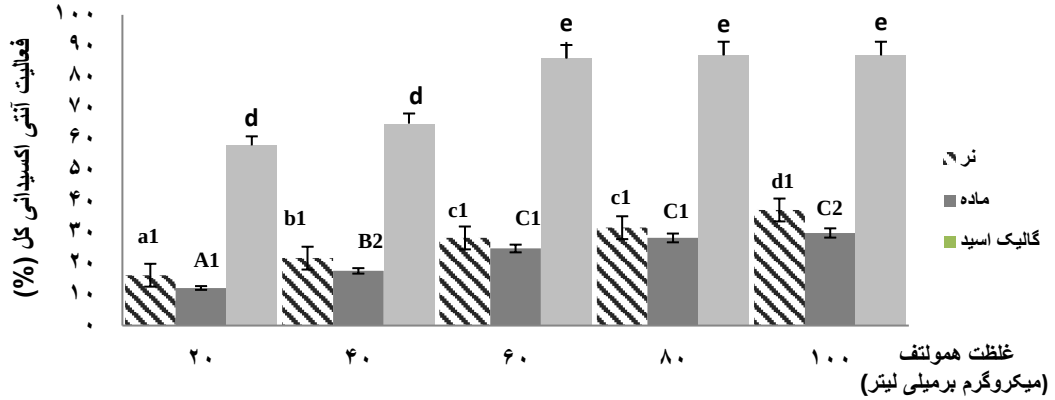
جدول3: حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی از رشد وحداقل غلظت‌کشندگی پروتیئن همولنف در جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای

باکتری	پروتیئن همولنف (جنس نر)		پروتیئن همولنف (جنس ماده)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
	(میکروگرم/میلی‌لیتر)			
S. aureus	10	-	5	10
B. subtilis	5	10	10	-
E.coli	40	-	20	-
K. pneumoniae	20	-	10	20
V.cholerae ogava	10	30	10	20

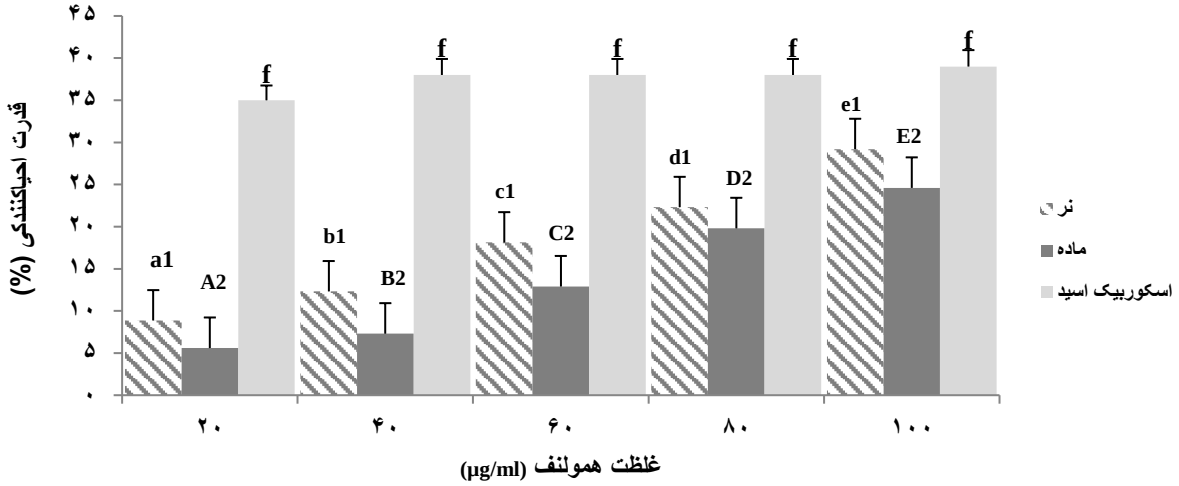
جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی همولنف دو جنس نر و ماده میگوی رودخانه‌ای (*M. nipponense*) از ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی مختلف (فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاکنندگی، مهار رادیکال پراکسید هیدروژن حذف رادیکال هیدروکسیل و حذف رادیکال‌های آزاد DPPH) استفاده شد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل: بیش‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در همولنف جنس نر با میزان 37 درصد در غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین مقدار آن حدود 12/1% در غلظت20 میکروگرم بر میلی‌لیتر از همولنف جنس ماده مشاهده گردید (شکل 1). اختلاف معنی‌داری در میزان فعالیت آنتی-اکسیدانی کل همولنف در دو جنس و نیز با اسیدگالیک(شاهد)در غلظت‌های‌مختلف‌ثبت گردید ($P<0/05$).

قدرت احیاءکنندگی: قدرت احیاءکنندگی غلظت‌های مختلف همولنف در دو جنس نر و ماده میگوی رودخانه‌ای در شکل 2 آورده شده است. در این سنجش قدرت احیای کلرید آهن سه ظرفیتی به کلرید آهن دو ظرفیتی اندازه‌گیری می‌شود. همولنف در جنس نر از قدرت احیاکنندگی بیش‌تری نسبت به جنس ماده برخوردار می‌باشد. اختلاف معنی‌داری بین اسید اسکوربیک هر دو جنس مشاهده شد. در غلظت‌های مختلف در همولنف مشاهده شد ($P<0/05$).



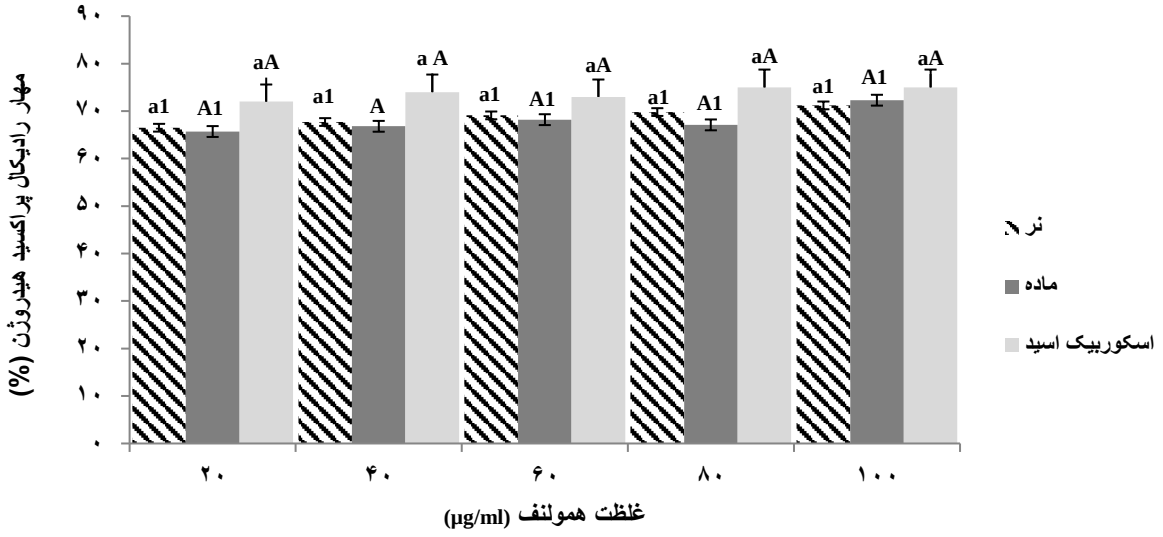
شکل1: فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت‌های مختلف همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای *M.nipponense*
اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف ناهمنام نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده و اعداد ناهمنام نشان‌دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار است.



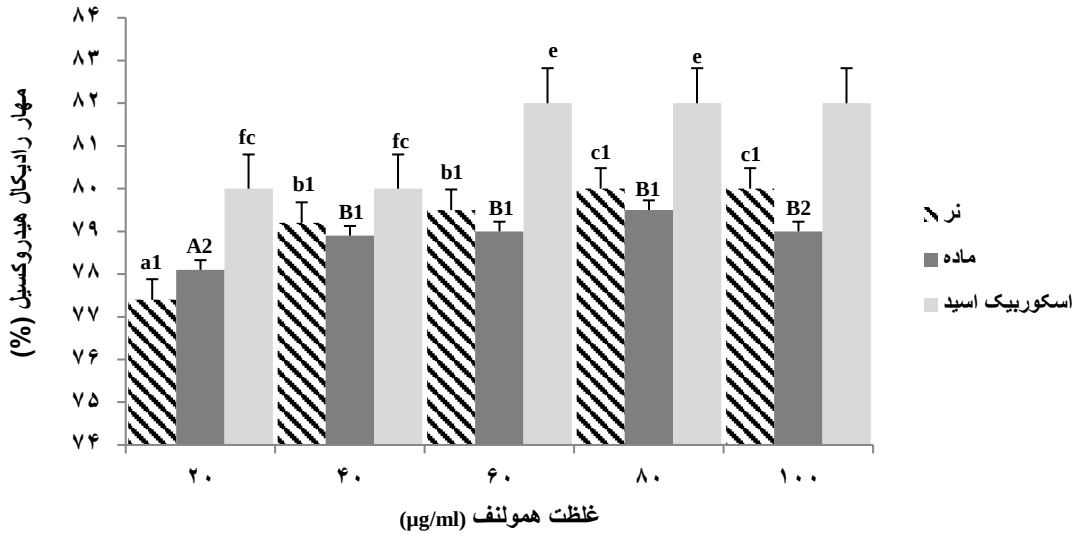
شکل2: قدرت احیاءکنندگی در غلظت‌های مختلف همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای *M.nipponense*
اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف ناهمنام نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده و اعداد ناهمنام نشان‌دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار است.

میزان مهار رادیکال پراکسید هیدروژن: تفاوت معنی‌داری در میزان مهار رادیکال پراکسید هیدروژن در همولنف در دو جنس نر و ماده در غلظت‌های مختلف با شاهد مشاهده نگردید ($P>0/05$). همولنف در هر دو جنس از فعالیت مهار رادیکال پراکسید هیدروژن نسبتاً بالایی برخوردار بودند. اسیداسکوربیک نیز مهار رادیکال پراکسید هیدروژن برابر 74 درصد نشان داد (شکل 3).

میزان مهار رادیکال هیدروکسیل: میزان فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل توسط اسید اسکوربیک برابر با 81 درصد بود (شکل4). در میزان این ویژگی آنتی اکسیدانی در بین همولنف جنس نر و ماده در غلظت‌های 20 و 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید ($P<0/05$).

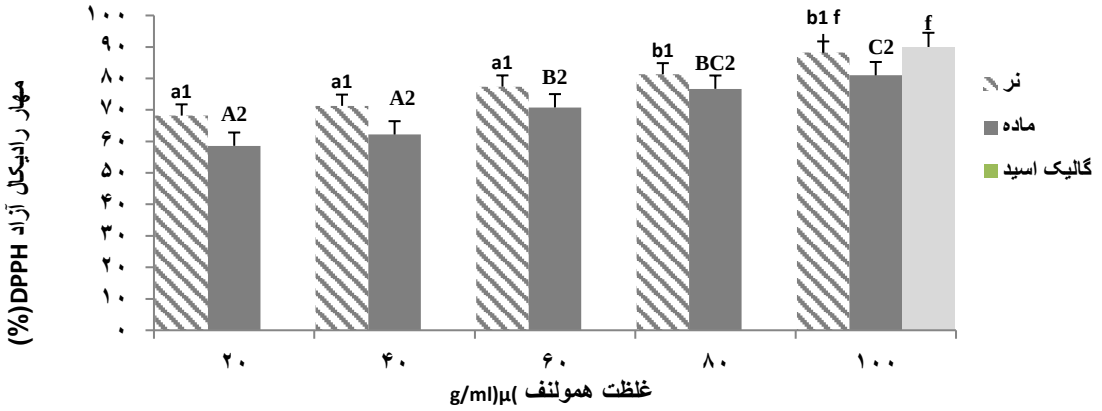


شکل3: مهار رادیکال پراکسید هیدروژن در غلظت‌های مختلف همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای *M.nipponense*
اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف ناهمنام نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده و اعداد ناهمنام نشان‌دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیماراست.



شکل4: فعالیت مهار رادیکال هیدوکسیل در غلظت‌های مختلف همولنف جنس‌های نر و ماده میگوی رودخانه‌ای *M.nipponense*
اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف ناهمنام نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده و اعداد ناهمنام نشان‌دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار است.

میزان مهار رادیکال DDPH: از مقایسه بین غلظت‌های مختلف در دو جنس نر و ماده، همولنف در جنس نر (غلظت 100 میکروگرم بر میلی‌لیتر) مقدار قابل توجهی رادیکال آزاد را مهار می‌کندو همولنف در جنس ماده در غلظت 20 میکروگرم کم‌ترین مقدار درصد مهار رادیکال DDPH را نشان داد (شکل 5). تفاوت معنی‌داری بین مقادیر مختلف همولنف در دو جنس نر و ماده مشاهده شد ($P<0/05$).



شکل5: فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد DPPH در غلظت های مختلف همولنف جنس های نر وماده میگوی رودخانه ای *M.nipponense*
اعداد بر حسب میانگین سه تکرار بیان شده است (انحراف معیار± میانگین)، حروف ناهمنام نماینده تفاوت میانگین در هر جنس در تیمارهای مختلف بوده و اعداد ناهمنام نشان‌دهنده اختلاف در جنس‌های نر و ماده در هر تیمار است.

بحث

سخت‌پوستان ازجمله بی‌مهرگانی می‌باشند که غنی از پپتیدهای فعال، با خواص ضدباکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و درمانی به‌شمار می‌روند (Ravichandran و همکاران، 2010). در همولنف میگوی رودخانه‌ای *M.nipponense* در هر دو جنس اثر ضدمیکروبی نسبتاً بالایی در برابر باکتری‌های ویبریو سروتایپ اگاوا، باسیلوس سابتلیس واستافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. این داده‌ها با مطالعات Hoq و همکاران (2013) و Maharani و همکاران (2013)، شباهت داشت به‌طوری‌که آن‌ها اثر همولنف خرچنگ *Scylla serrata* و *Doclea cravis* را بر رشد استافیلوکوکوس بیش‌تر از اشریشیا کلی گزارش نمودند. فعالیت ضد میکروبی همولنف را بر ضد سویه‌های استافیلوکوکوس ارئوس و استرپتوکوکوس موتانس در میگو *Macrobrachium rosenbergii* نیز مشاهده شده شده است (Ravichandran و همکاران، 2010). براساس مطالعات صورت گرفته تاکنون همولنف سخت‌پوستان از فعالیت ضدمیکروبی نسبتاً بالایی در برابر بسیاری از باکتریای‌ها و قارچ‌های بیماری‌زا برخوردار بوده است که این عملکرد می‌تواند ناشی از برهم کنش بین ترکیبات همولنف به‌ویژه پروتئین‌ها با اسیدهای آمینه با بارمثبت (کاتیونی) دارای بار منفی سطح غشای سلول‌های پاتوژن باشد (Anbuchezhian و همکاران، 2009). در مطالعه حاضر پروتئین‌های همولنف میگو آب شیرین خواص ضدمیکروبی قابل توجهی نسبت به باکتری‌های مورد آزمایش نشان دادند که این نتایج با تحقیقات انجام شده بر روی همولنف میگو *Macrobrachium rosenbergii* مطابقت داشته و باکتری‌ها حساسیت مشابهی به سویه‌های باکتریایی نشان دادند (Ravichandran و همکاران ، 2010). اما در مطالعات Mahrani و همکاران (2013) خواص ضدمیکروبی همولنف خرچنگ عنکبوتی (*Doclea cravis*) برعلیه باکتری‌های گرم مثبت کم‌تر از باکتری‌های گرم منفی گزارش شده است. به‌هر حال وجود غشای محافظ در اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌تواند منجر به حمایت باکتری به‌ویژه بخش‌های حساس داخلی آن در برابر ترکیبات ضدمیکروبی گردد (Hajirasouli و Pazooki، 2014).

در سال‌های اخیر اهمیت ترکیبات ضداکسیدان در جلوگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، التهاب‌های مزمن و نیز پیری زودرس به‌خوبی شناخته شده است. این ترکیبات قادر به حذف رادیکال‌های آزاد که منجر به تخریب سیستم زیستی می‌گردند، هستند (Govindarajalu و همکاران، 2016؛ Soundarpandian و همکاران، 2014). در مطالعه حاضر ترکیبات ضداکسیدانی در همولنف میگو آب شیرین *M.nipponense*قادرند که مولیبدات شش (VI) را به مولیبدات پنج (V) تبدیل نمایند که اساس سنجش آنتی اکسیدانی کل قرار می‌گیرد. در مطالعات Sivaperumal و همکاران (2013) افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در پپتید همولنف خرچنگ *Ocypode macrocera* مشاهده شده است. در این بررسی نیز افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به غلظت در همولنف جنس نر میگوی آب شیرین *M.nipponense* مشاهده گردید و همولنف در این جنس از مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری نسبت به همولنف درجنس ماده برخوردار بود. تفاوت آشکار شده در مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی همولنف در میان جنس‌های نر و ماده، می‌تواند ناشی از اختلاف در میزان ترکیبات شیمیایی همولنف (نوع و مقدار اسیدهای آمینه)، نرخ متابولیسم، چرخه زندگی و اندازه موجود باشد (Kiran و همکاران، 2014). چنان‌که فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی از قبیل سوپراکسید دسموتاز (SOD) در همولنف جنس ماده سخت‌پوست گاماروس (*Gammarus pulex*) کم‌تر از جنس نر آن گزارش شده است (Gismondi و همکاران، 2012). از ویژ گی‌های آنتی‌اکسیدانی دیگری که در این تحقیق استفاده شد توانایی احیاءکنندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدان بود. قدرت احیاءکنندگی همولنف جهت تبدیل آهن 3 ظرفیتی به آهن 2 ظرفیتی و تشکیل رنگ سبز آبی اساس این سنجش است. افزایش قدرت احیاءکنندگی با افزایش غلظت در همولنف خرچنگ *Charybdis lucifera* گزارش شده است (Soundarapandian و همکاران، 2014). در میگوی آب شیرین نیز افزایش غلظت در همولنف هر دو جنس منجر به افزایش قدرت احیاءکنندگی گردید. بنابراین می‌توان افزایش قدرت احیاءکنندگی همولنف را به خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن تعمیم داد. رادیکال‌های هیدروکسیل

از گونه‌های واکنش‌زا اکسیژنی (Reactive oxygen species) می‌باشد که در سیستم بیولوژیک حضور دارند. این رادیکال‌ها قادر به تخریب مولکول‌های سیستم زیستی می‌باشند، آن‌ها به DNA متصل می‌شوند و با تخریب و قطعه قطعه نمودن DNA در واکنش‌های سرطان‌زایی، جهش‌زایی و سمیت سلولی دخالت می‌نمایند (Gismondi و همکاران، 2012). در این مطالعه همولنف میگوی آب شیرین (100 میکروگرم بر میلی‌گرم) فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل قابل قبولی نسبت به اسید اسکوربیک نشان داد. مهار رادیکال هیدروژن نسبتاً بالایی در همولنف خرچنگ *Ocypoda macrocera* ثبت شده است. فعالیت مهاری مشاهده شده از همولنف می‌تواند نشان دهنده توانایی آن در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها باشد و به نظر می‌رسد یک عامل مهاری قوی برای گونه‌های اکسیژنی باشد (Sivaperumal و همکاران، 2013). فعالیت آنتی‌اکسیدانی با ویژگی مهار رادیکال پراکسید هیدروژن به‌وسیله همولنف خرچنگ *Ocypoda macrocera* و همولنف خرچنگ عنکبوتی *Doclea cravis* مشاهده شده است که نشان‌دهنده قدرت بالای همولنف در این سخت‌پوستان در حذف رادیکال پراکسید هیدروژن می‌باشد (Mahrani و همکاران، 2013؛ Sivaperumal و همکاران، 2013). در این مطالعه نیز میزان حذف رادیکال پراکسید هیدروژن توسط همولنف میگوی آب شیرین در هر دو جنس نسبتاً بالا بود که بیش‌ترین میزان مهار رادیکال پراکسید هیدروژن در غلظت 100 میکرو گرم بر میلی‌لیتر از همولنف به‌دست آمد. بنابر این همولنف می‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان خوب جهت مهار رادیکال‌های آزاد پراکسید هیدروژن به‌کار رود.

مکانیسم حذف رادیکال‌های آزاد توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان قبل از حمله به سیستم‌های زیستی از طریق انتقال هیدروژن و یا انتقال الکترون و سپس انتقال پروتون همراه می‌باشد (Sumalatha و همکاران، 2016). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قادرند با انتقال یک الکترون، رادیکال DPPH راحذف نمایند که از این روش جهت بررسی ترکیبات ضداکسیدانی با منشا طبیعی و هم منشا سنتتزی استفاده می‌شود و می‌تواند معیاری از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در اختیار قرار دهد (Ponnosamy و همکاران، 2016).

در همولنف بسیاری از سخت‌پوستان مانند خرچنگ شنی *Callinectes sapidus* (Sulmaltha و همکاران، 2016) خرچنگ *Scylla Serrata* (Hoq و همکاران، 2003) و نیز در جنس *Ocypode macrocera* (Ravichandran و همکاران، 2010) و خرچنگ شنی *Carcinus maenas* (Priya و همکاران، 2015) توانایی خوبی برای مهار رادیکال DPPH گزارش شده است.

در مطالعه حاضر نیز همولنف میگوی رودخانه‌ای در جنس نر از قدرت دهندگی اتم هیدروژن بیش‌تری نسبت به جنس ماده برخوردار می‌باشد. تفاوت مشاهده شده در همولنف جنس نر و ماده در اهدای اتم هیدروژن جهت پایداری رادیکال می‌تواند متاثر از نرخ فعالیت متابولیکی متفاوت در دو جنس نر و ماده باشد (Ponnosamy و همکاران، 2016؛ Gismondi و همکاران، 2012). چنان‌که افزایش تولید آنیون‌های سوپراکسید میتوکندریایی و افزایش نرخ فعالیت متابولیک و در نتیجه تولید گونه‌های واکنش‌زای اکسیژنی در جنس نر خرچنگ *Carcinus maenas* نسبت به جنس ماده گزارش شده است (Priya و همکاران، 2015).

با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه، پروتئین‌های همولنف میگوی رودخانه‌ای از خاصیت ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی برخوردار بودند. توانایی نسبتاً بالای این پروتئین‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد، امکان استفاده از آن‌ها را به‌عنوان یک ترکیب موثر و جایگزین با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتزی، می‌تواند فراهم سازد که این امر مستلزم مطالعات تکمیلی بیش‌تر درخصوص شناسایی ترکیبات موثر و مطالعه تاثیر هریک از اجزای سازنده همولنف بطور جداگانه می باشد.

منابع

1. **علاف‌نویریان، ح.؛ خوش‌خلق، م.ج. و موسی‌پورشاجانی، م.، 1393.** اثر سطوح مختلف چربی بر عوامل رشد و ترکیبات لاشه میگوي رودخانه‌اي شرق *Macrobrachium nipponense* (De Haan,1984) در مرحله جوانی. فصلنامه علمی پژوهشی محیط زیست جانوري. سال 6، شماره 2، صفحات 97 تا 104.
2. **Anbuchezhian, R.M.; Ravichandran, S.; Rameshkumar, G. and Ajithkumar, T.T., 2009.** Influence of crab haemolymph on clinical pathogens. Advances in Biological Research. Vol. 3, No. 3-4, pp: 104-109.
3. **Baure, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, M.J.C. and Turck, M., 1996.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 45, pp: 493-449.
4. **Bradford, M.M., 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol. 72, pp: 248-254.
5. **Chisholm, J.R.S. and Smith, V.J., 1992 .**Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. Journal of the Marine Biological Association UK. Vol. 72, pp: 529-542.
6. **Chodsang, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Hara, K.; Yoshida, A. and Liang, X., 2012.** Low molecular weight trypsin from hepatopancreas of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): characteristics & biochemical properties. Journal of Food Chemistry. Vol. 134, pp: 351-358.
7. **Chung, S.K.; Osawa, T. and Kawakishi, S., 1997.** Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 61, pp: 118-123.
8. **De'Grave, S. and Ghane, A., 2006.** The establishment of the Oriental River Prawn, Macrobrachium nipponense (de Haan, 1849) in Anzali Lagoon, Iran. Aquatic Invasions. Vol. 1, No. 4, pp: 204-208.
9. **Gismondi, E.; Beisel, J.N. and Cossu-Leguille, C., 2012a.** Influence of gender and season on reduced glutathione concentration and energy reserves of *Gammarus roeseli*. Environmental Research. Vol. 118, pp: 47–52.
10. **Govindarajan, R.; Rastogi, S.; Vijayakumar, M.; Shirwaikar, A. and Rawat, A.K.S., 2003.** Studies on the Antioxidant Activities of *Desmodium gangeticum*. Biological and Pharmaceutical Bulletin. Vol. 26, pp: 1424-1427.
11. **Govindarajalu, J.; Anand, M.; Chelladurai, G. and Kumaraguru, A., 2016.** Bioactive potential of some economically important marine gastropods along the Gulf of Manner region, southeast coast of India, Journal of Coastal Life Medicine. Vol. 4, No. 8, pp: 608-611.
12. **Hajirasouli, M. and Pazooki, J., 2014.** Antimicrobial potential of haemolymph and hepatopancreas of portunussegnis crabs. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Vol. 6, No. 8, pp: 601-603.

13. **Hoq, M.I.; Seraj, M.U. and Chowdthury, S., 2003.** Isolation and characterisation of antimicrobial peptides from the mud crab Scylla serrate. Pakistan Journal of Biological Science. Vol. 6, pp: 1345-1353.

14. **Kim, J.K.; Kraemer, G.P.; Neefus, C.; DChung. I.K. and Yarish, C., 2007.** Development and biologicalactivities of marine derived bioactive peptides. Review J Functional Foods. Vol. 2, No. 1, pp: 1-9.

15. **Kiran, N.; Siddiqui, G.; Khan, A.N.; Ibrar, K. and Tushar, P., 2014.** Extraction and screening of bioactive compounds with antimicrobial properties from selected species of mollusc and crustacean. Journal of Clinical Cell Immunology. Vol. 5, pp: 1-5.

16. **Maharani, V.; Sivasankar, P.; Sundaramanickam, A.; Vijayalakshmi, S. and Balasubramanian, T., 2013.** Antimicrobial and Antioxidant Effect of Hemolymph Protein from Spider Crab (*Doclea cravis*, Rathbun, 1925) Inventi Rapid: Pharmaceutical Biotechnology and Microbiology. Vol. 1, No. 2, pp: 1-5.

17. **Ponnusamy, K.; Kamala, K.; Munilkumar, S. and Pa, A.K., 2016.** Antioxidant Properties from Tissue Extract of Cephalopods around Madras Atomic Power Station, Kalpakkam Coast. International Journal of Pharmaceutical Research and Health Sciences. Vol. 4, No. 2, pp: 1086-1091.

18. **Prieto, P; Pineda, M. and Aguilar, M., 1999.** Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex, specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry. Vol. 269, pp: 337-341.

19. **Priya, E.R.; Kohilam, R. and Ravichandran S., 2015.** Antimicrobial Activity from the Hem lymph of the Hermit Crab *Clibanarius clibanarius* (Herbst 1791). World Journal of Fish and Marine Science. Vol. 7, No. 4, pp: 263-267.

20. **Rameshkurmar, G.S.; Ravichandran, M.; Kaliyavarathan, G. and Ajithkumar, T.T., 2009.** Antimicrobial peptide from the crab, Thalamitacrenata (Latreille, 1829). World Journal of Fish and Marine Science. Vol. 1, No. 2, pp: 74-79.

21. **Ravichandran, S.; Jeyalakshmi, S.; Sudha, S. and Anbuchezhian, R., 2010.** Antimicrobial peptides from the haemolymph of the prawn Macrobrachium rosenbergii. Journal of the Bangladesh Pharmceutical Society (BDPS). Vol. 5, pp: 62-67.

22. **Ravichandran, S.; Sivasubramanian, K. and Anbuchezhian, R.M., 2010.** Antimicrobial activity the hemolymph of crab *Ocypoda macrocera*. Journal of World Applied Science. Vol. 11, pp: 578-581.

23. **Rios, J.L.; Recio, M.C. and Villar, A., 1988.** Screening methods of natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. Journal of Ethnopharmacology. Vol. 23, No. 2-3, pp: 127-149.

24. **Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K. and Nakamura, T., 1992.** Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agricult Food Chem. Vol. 40, pp: 945-948.

25. **Sivaperumal, P.; Kamala, K.; Natarajan, E. and Dilipan E., 2013.** Antimicrobial peptide from crab haemolypmh of *Ocypoda macrocera* (Milne Edwards's 1852 with reference to antioxidant: a case study. International Journal of Pharm Pharm Sci .Vol. 5, No. 2, pp: 719-727.

26. **Smith V.J. and Chisholm, J.R., 2001.** Antimicrobial protein in crustaceans. Journal of Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 484, pp: 95-112.

27. **Soundarapandian, P.; Shyamalendu, R. and Varadharajan, D., 2014.** Antioxidant Activity in Hard and Soft Shell Crabs of *Charybdis lucifera* (Fabricius, 1798), Journal of Aquatic Research Development .Vol. 5, pp: 1-7.

28. **Sumalatha, D.; Maltha, A.; Jayanthi, J. and Ragunathan, M.G., 2016.**Antioxidant property of the crude peptide extracts of a fresh water crab *Oziotelphusa senex senex*. International Journal of Pharmaceutical and Biological Sciences. Vol. 7, No. 3, pp: 202-207.

29. **Tincu, J.A. and Taylor, S.W., 2004.** Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. Antimicrobial agents and chemotherapy. Vol. 48, No. 10, pp: 3645-3654.

30. **Veeruraj, A.; Ravichandran, S. and Rameshkuma, G., 2008.** Antibacterial activity of crab hemolymph on clinical pathogens. Journal of Trends in Applied Sciences Research. Vol. 3, pp: 174-181.

31. **Youqin, K.; Liqiao, C. and Zhili, D., 2016.** Molecular Cloning, Characterization, and mRNA Expression of Hemocyanin Subunit in Oriental River Prawn *Macrobrachium nipponense*. International Journal of Genomics. Vol. 4, pp: 1-9.

32. **Zhao, D.; Song, S.; Wang, Q.; Zhang, X.; Hu, S.and Chen, L., 2009.** Discovery of immune-related genes in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) by expressed sequence tag analysis of haemocytes. Aquaculture. Vol. 287, No. 3-4, pp: 297-303.