

## بررسی آثار ارگوسان و ویبرو ماکس بر رشد و بقای پست لاروهای میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*)

امیر هوشنگ بحری<sup>۱\*</sup>، قباد آذری تاکامی<sup>۲</sup>، امین کیوان<sup>۱</sup> و غلامحسین وثوقی<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۶/۳/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۲۹)

### چکیده

محرك‌های ایمنی یکی از راه‌های مهم برای جلوگیری از بیماری به شمار می‌روند. ترکیب واکسیناسیون و مواد محرک سیستم ایمنی، می‌تواند توانایی واکسن‌ها را در رابطه با پیشگیری از ابتلا به بیماری‌ها و شاخص‌های رشد و بقا در میگو، افزایش دهد. در این تحقیق آثار مجزا و توأم ارگوسان و واکسن ویبروماکس روی فاکتورهای رشد مانند طول کل، افزایش وزن خشک و میزان بقا در سه مرحله پست لاروی PL<sub>1</sub>، PL<sub>5</sub> و PL<sub>15</sub> میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) بررسی شد. خوراندن واکسن به میگوها از طریق غنی‌سازی ناپلی آرتمیا (*Artemia franciscana*) صورت پذیرفت. اثر ارگوسان (تیمار ۱) و واکسن ویبروماکس (تیمار ۲) هرکدام در یک تیمار به صورت مجزا و در تیمار دیگر، به صورت توأم (تیمار ۳) به علاوه یک تیمار شاهد، جهت مقایسه مورد آزمایش قرار گرفت. با در نظر گرفتن ۴ تیمار و ۳ تکرار برای هر یک از آنها، ۱۲ سطل یکسان استفاده شد که به مقدار ۱۰ لیتر آبگیری و با تراکم ۱۰۰ لارو مرحله زوای یک در لیتر ذخیره‌سازی گردید. لاروهای مورد آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به مدت ۲۵ روز، تغذیه شدند. دوره آزمایش از مرحله زوای یک تا PL<sub>15</sub> بود که در پایان روز ۱۲، ۱۶ و ۲۵ جهت زیست‌سنجی و تعیین میزان بقا بررسی شدند. نتایج نشان داد که بیشترین مقدار طول کل به میلی‌متر در مراحل PL<sub>1</sub>، PL<sub>5</sub> و PL<sub>15</sub> در تیمار ۳ به ترتیب برابر (۵/۲۶، ۶/۴۵ و ۱۸/۴۱) و با اختلاف اندکی از آن، در تیمار ۱ به ترتیب برابر (۵/۲۸، ۶/۳۲ و ۱۷/۹۴) بود که نسبت به تیمار شاهد (۴/۹۱، ۶/۰۹ و ۱۷/۳۶) در سطح  $P < 0.05$  دارای تفاوت معنی‌داری بوده و تیمار ۲ (۵/۱۱، ۶/۰۷ و ۱۷/۴۴) و تیمار شاهد دارای تفاوت معنی‌داری نبودند ( $P > 0.05$ ). بیشترین مقدار وزن خشک پست لاروها در روزهای ۱۲، ۱۶ و ۲۵ در تیمار ۳ به ترتیب (۰/۲۹۶، ۰/۸۹۰ و ۲/۹۴۰ میلی‌گرم) بوده که در مقایسه با تیمار شاهد (۰/۲۱۶، ۰/۶۴۰ و ۲/۸۸۵) دارای تفاوت معنی‌داری بودند ( $P < 0.05$ ). بیشترین مقدار بقا به درصد نیز در تیمار ۳ (۷۷/۳۳، ۷۶/۳۳ و ۸۰/۶۷) محاسبه گردید که نسبت به تیمار شاهد (۵۷، ۵۷/۳۳ و ۵۹/۶۷) تفاوت معنی‌داری داشتند. به هر حال استفاده از این دو فراورده در یک برنامه غذایی مطلوب از مرحله زوای یک تا PL<sub>12</sub> توانست با بالابردن مقاومت و ایمنی در پست لاروها و به دنبال آن افزایش بقا و رشد میگوها، منجر به تولید پست لاروهای مناسب جهت معرفی به استخرهای پرورشی گردد.

واژه‌های کلیدی: پست لارو، غنی‌سازی، ارگوسان، واکسن ویبروماکس، میگوی سفید هندی، آرتمیا

۱. به ترتیب دانشجوی دکترای شیلات و اعضای هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

۲. استاد بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دام‌پزشکی، دانشگاه تهران

\*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: amirbahri52@yahoo.com

## مقدمه

در ۲۰ سال گذشته، همراه با رشد سریع صنعت پرورش میگو، اهمیت بهداشت و هم‌چنین عوامل بیماری‌زا مشخص گردیده است. طبق نظر لایتنر و ردمن بیش از ۲۰ گونه ویروسی، از میگوهای بیمار، مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. چندین گونه از باکتری‌ها نیز تشخیص داده شده‌اند که با عفونت‌های سیستمیک یا مرگ و میر میگوها در ارتباط بوده‌اند. گونه‌های ویبریو مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای میکروبی برای میگو هستند. آنها میکروب‌های آبزی بوده که به طور گسترده در آب‌های شیرین، مصب‌ها و محیط‌های دریایی، پراکنده‌اند و عموماً در تخم سراهای پرورش میگو، رسوبات و استخرهای پرورش میگو مشاهده می‌شوند (۱۵).

محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی می‌باشند که با افزایش عملکرد سلول‌های فاگوسیتیک و فعالیت باکتری‌کشی (Cytotoxic) و نیز با تولید آنتی‌بادی موجب تحریک پاسخ ایمنی می‌گردند (۱۶). در حقیقت این مواد گلبول‌های سفید را فعال می‌کنند. چنین موادی نه تنها، مقاومت موجود را نسبت به بیماری‌های عفونی بیشتر می‌کنند، بلکه خطر شیوع بیماری را کم می‌کنند (۱۵).

تحقیقات در زمینه مواد محرک سیستم ایمنی در حال توسعه بوده و در حال حاضر مواد زیادی در صنعت آبزی‌پروری استفاده می‌شوند. اثر تحریک‌کنندگی گلوکان، کیتین (Chitin)، لاکتوفرین (Lactoferrin) و لوامیزول (Levamisole) برای ماهی و میگو گزارش شده است. هم‌چنین فاکتورهای غذایی مثل ویتامین C, B، هورمون رشد و پرولاکتین به عنوان محرک ایمنی گزارش شده‌اند. این محرک‌ها، علاوه بر افزایش عملکرد فاگوسیتوزی و افزایش فعالیت باکتری‌کشی، هم‌چنین به عنوان سلول‌کشنده طبیعی کمپلمان، لیزوزیم و پاسخ آنتی‌بادی را تحریک می‌کنند (۱۶). اثر تحریک‌کنندگی آلژینیک اسید یا ارگوسان در ماهی و میگو گزارش گردیده است (۱۴). از دیگر فواید محرک‌های ایمنی کاهش مرگ و میر، نسبت به پاتوژن‌های فرصت‌طلب، کاهش مرگ و میر آبزیان جوان و

افزایش مقاومت در برابر پارازیت‌ها بوده است. در نتیجه نرخ زنده ماننی را افزایش می‌دهند (۱۱). برای مثال تنظیم سیستم ایمنی در قزل‌آلای رنگین‌کمان با تزریق صفاقی ارگوسان مشاهده شد (۹، ۱۰ و ۱۳).

از مزایای مهم دیگر ارگوسان کاهش مرگ و میر مربوط به شیوع بیماری‌های قابل پیش‌بینی همراه با تغییرات فصلی در کیفیت و دمای آب، تراکم و دستکاری آبی (صید، رقم‌بندی و حمل و نقل آبی) می‌باشد (۱۷) زیرا هرگونه استرس بیش از حد موجب تضعیف مقاومت آبی در برابر عوامل ناخواسته شده و نهایتاً ممکن است، نرخ بقا را کاهش دهد (۷).

محرک‌های سیستم ایمنی موادی هستند که گلبول‌های سفید خون را فعال می‌کنند. برخی از محرک‌های ایمنی لئوسیت‌ها را فعال می‌کنند که نهایتاً عوامل فعال‌کننده ماکروفاژ را می‌سازند (۱۵). البته میزان لئوسیت‌ها به تغییرات درجه حرارت آب بستگی دارد به طوری که در فصول سرد سال سطوح لیزوزیم و درصد لئوسیت‌ها افزایش معنی‌داری را نشان داده است (۵). بنابراین ترکیبات فعال ارگوسان، تکثیر لئوسیت‌ها، ماکروفاژها، تولید سیتوکین و لیزوزیم را افزایش می‌دهند (۱۷).

در تحقیقی، آلژینات به عنوان محرک و تنظیم‌کننده ایمنی به صورت کپسوله مورد مصرف آرتمیا قرار گرفت و سپس به لارو هالیبوت *Hippoglossus hippoglossus* خورانده شد و سبب افزایش مقاومت در برابر بیماری ویبریوزیس گردید (۱۸).

عملیات واکسیناسیون موفق و مؤثر در میگوی ببری سیاه (*Penaeus monodon*) و میگوی کوروما (*P. japonicus*) علیه بیماری ویبریوزیس با واکسن تهیه شده از ویبریو کشته شده با فرمالین به ترتیب توسط ایتمی و همکاران و تونیس و همکاران گزارش گردیده است (۸ و ۲۱). عملیات واکسیناسیون توسط گونه‌های مختلف ویبریو (که توسط فرمالین کشته شده بودند) ثابت نمود که حدود ۵۰ روز پس از عملیات واکسینه کردن، علیه بیماری ویبریوزیس مؤثر بوده است (۹). سانگ و همکاران نشان دادند میگوهای ببری که در حمام محلول باکترین حاصل از باکتری *V. vulnificus* به مدت ۲ ساعت و

آلژینات جهان از *Ascophyllum nodosum* و *Macrocystis pyrifera* عصاره گیری می شود. (۱۲). در پستانداران آلژینات و آلژینیک اسید، اثرات بیولوژیکی مهمی مثل افزایش دفع کلسترول و پذیرش گلوکز (۱۱)، جلوگیری از تکثیر سلول های ماهیچه ای صاف، سرکوب کردن تکثیر سلول های فیروبلاست و تشکیل کلاژن در پوست و جلوگیری از آزادسازی هیستامین از ماهیچه دارد (۱۰).

آکواک ارگوسان (Aquavac Ergosan) یک محصول کاملاً طبیعی است و به عنوان یک افزودنی خوراکی پذیرفته شده است. تنظیم کننده ها و تحریک کننده های دستگاه ایمنی می توانند نقش مهمی در آبی پروری داشته باشند. استفاده از آنها سبب افزایش پاسخ ایمنی غیراختصاصی و بهبود پاسخ ایمنی اختصاصی علیه عوامل بیماری زای مختلف می گردد. ضمن آنکه می تواند پاسخ ایمنی را در حیواناتی که دستگاه ایمنی آنها ضعیف و یا در حال تکمیل است (بچه ماهی، میگوها) افزایش دهد. آکواک ویبروماکس (Aquavac Vibromax) نیز، یک محصول امولسیونه بی خطر، با استفاده آسان و مؤثر می باشد که از طریق خوراکی با استفاده از ناپلی آرتیمیا به عنوان یک ناقل یا واسط، داده می شود (۱۷).

روش جدید استفاده از واکسن آکواک ویبروماکس (غنی سازی با ناپلی آرتیمیا) اولین واکسن از نوع خود است که در سطح تجاری قابل استفاده بوده که با استفاده از یک برنامه تغذیه ای مطلوب و شرایط بهداشتی مناسب، میزان بقا و رشد میگوهای پرورشی را افزایش داده و شرایط بهداشتی را بهبود می بخشد (۱۷). این تحقیق، اولین پژوهش در مورد میگو و این واکسن همراه با ارگوسان در ایران است که هدف از آن ایجاد مقاومت و ایمنی در لارو میگوهای پرورشی و رفع نگرانی های ناشی از خسارات اقتصادی بیماری های ویروسی و عفونی در استان های سواحل جنوبی ایران بوده است.

از آنجائی که پرورش میگو در مراحل لاروی و پست لاروی بسیار حساس و مهم بوده و اغلب، تلفات عمده ای در این مراحل دیده می شود، لذا به دلیل امکان بروز بیماری، عدم

غلظت ۱ میلی گرم در لیتر غوطه ور بوده اند، نسبت به آنهایی که در گروه های شاهد بوده اند از رشد بهتری برخوردار گردیدند (۱۹).

نتایج مشابه، در میگوهایی که در محلول سوسپانسیون گلوکان با غلظت ۰/۵، ۱ و ۲ میلی گرم بر لیتر غوطه ور بوده اند، به دست آمده و حاکی از آن است که مقادیر فوق نسبت به غلظت های کمتر مثل ۰/۲۵ میلی گرم بر لیتر و گروه های شاهد، رشد بسیار بهتری داشته اند (۲۰).

بونیا راتپالین و همکاران گزارش نمودند که میگوهای ببری مورد تغذیه، با غذای مکمل حاوی پپتیدوگلیکان (PG) رشد بهتر و ضریب تبدیل غذایی (FCR=Food Conversion Ratio) بهتری را نسبت به آنهایی که با غذای معمولی تغذیه شدند، داشته اند (۶). آثار مدت زمان تغذیه با جیره غذایی حاوی بتا-گلوکان حاصل از مخمر و آلژینیک اسید (ارگوسان) در ماهی سی باس نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار در فاکتورهای رشد، بقا و ضریب تبدیل غذایی بین گروه تیمار و شاهد در دوره کوتاه مدت (۱۵ روز جیره حاوی ۰/۵ درصد ارگوسان و ۰/۱ درصد بتاگلوکان) بود. ولی در بررسی بلند مدت (۲۴۰ روز پس از پایان ۴ سیکل تغذیه از ارگوسان) اگرچه، ضریب رشد ویژه، اختلافات زیادی در طی دوره آزمایش نشان داده است (ضریب رشد ویژه تا اندازه ای در ماهی تیمار بالاتر بود) ولی این اختلاف، همانند سایر فاکتورها معنی دار، نبوده است (۵). در ماهی Dentex dentex و ماهی آزاد اطلس نیز، استفاده از ارگوسان در درجه حرارت ۱۴ درجه سانتی گراد بیشترین رشد را نشان داده است. بنابراین مواد محرک ایمنی در طی فصول سرد که درجه حرارت آب پایین بوده و ماهی تغذیه نمی کند می تواند اثر مثبتی داشته باشد (۵).

آلژینیک اسید یا ارگوسان از چندین جنس جلبک قهوه ای مثل *Ascophyllum*، *Laminaria*، *Macrocystis* می تواند مشتق شود (۱۷). ارگوسان مورد استفاده در این پژوهش محتوی یک درصد آلژینیک اسید از جنس *Laminaria digitata* یا *Ascophyllum nodosum* است. بنا بر نظر لوئیس مهم ترین

در ظروف ویژه‌ای (بطری‌های ۱/۵ لیتری) جداگانه نگه‌داری شده و تا مرحله دوم دگرذیسی (Instar II) جهت غنی شدن با واکسن نگه‌داری شدند. تراکم آنها در این زمان به ۱۰۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ عدد در لیتر رسید. بدین ترتیب ۱۲-۱۰ ساعت بعد از تخم‌گذاری واکسن مورد نظر به میزان ۱ میلی‌لیتر به هر لیتر از ظروف حاوی سوسپانسیون ناپلی‌ها افزوده گردید (۱۷).

مابقی سیستم‌های کپسول‌زدائی شده در ظروف دیگری تخم‌گذاری گردید. با این تفاوت که هیچ‌گونه واکسنی به آن اضافه نشد. از ناپلی‌های حاصل از این سیستم‌ها جهت تغذیه سایر تیمارهایی که از واکسن بی بهره بودند نظیر تیمار کنترل (شاهد) و تیمار ارگوسان استفاده گردید.

معمولاً سیستم‌ها پس از ۱۸-۱۴ ساعت تخم‌گذاری گردیده و همان‌طور که ذکر شد ۱۲-۱۰ ساعت پس از آن، یعنی در دومین مرحله دگرذیسی به مدت حداقل ۱/۵ ساعت و حداکثر ۶ ساعت مورد غنی‌سازی قرار گرفتند (۱۷) تا آرتمیایا حداکثر جذب را انجام داده و جهت تغذیه لاروهای میگوی تیمار اثر واکسن (تیمار ۲) و اثر واکسن + ارگوسان (تیمار ۳) مورد تغذیه قرار گیرند.

این عمل در طی زمان آزمایش به طور روزانه انجام گرفت تا همواره آرتمیای تازه در اختیار پست لاروها قرار داده شود. بدین ترتیب در انتهای عملیات غنی‌سازی ناپلی‌های آرتمیای پس از صید توسط تورهای ۴۰۰ میکرونی مخروطی تنظیفی با آب شیرین کاملاً شسته شده (۳) و سپس به میزان مورد نیاز در اختیار لاروها قرار گرفتند (۱۷).

### ۳- پرورش لاروهای میگوی سفید هندی

جهت فراهم نمودن لاروهای مورد نیاز ۵ مولد ماده پرورشی جفت‌گیری کرده (اسپریم دار) با وزن متوسط ۴۰ گرم که براساس صفات ظاهری در مرحله ۴ رسیدگی جنسی بودند (۱)، انتخاب گردیدند و بعد از انجام مراحل تخم‌ریزی، لاروهای حاصل تا مرحله پروتوزوا (Protozoa I) در تانک‌های ۳۰۰ لیتری و در اطاق تخم‌ریزی نگه‌داری شده و آنگاه به سطل‌های ۲۰ لیتری

رشد کافی و تولید کم محصول در شرایط کنونی کشور، یکی از مواردی که می‌تواند به افزایش رشد و بقای پست لاروهای میگو کمک نماید، در نظر گرفتن مواد بالای برنده ایمنی و مقاومت است. با توجه به موارد ذکر شده در این پژوهش سعی گردید با فرض اضافه کردن مواد مورد آزمایش به غذا و دارا بودن خواص مورد نظر، اهدافی شامل رشد بیشتر، بقای بالاتر و افزایش تولید به دست آید.

به عبارتی مشاهده گردد که آیا ارگوسان و واکسن اضافه شده به آب و آرتمیای غنی شده در مراحل پرورش لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی، سبب افزایش فاکتورهای رشد و بقا خواهد شد یا تأثیر معنی‌داری نخواهد داشت و در ادامه میانگین تکرارهای هر تیمار بایکدیگر مقایسه شد. در ضمن نتایج این پژوهش بدون تردید به کاهش استفاده از مواد شیمیایی و داروها در آبی پروری کمک نموده و تولیدات با کیفیت مناسب‌تری را از نظر سلامت تغذیه‌ای برای مصرف‌کنندگان ارائه خواهد نمود.

## مواد و روش‌ها

### ۱- محل اجرای آزمایش

این پژوهش در کارگاه تکثیر میگوی هرمز لارو در طول جغرافیایی "۱۸/۲، ۰۱، ۵۷" و عرض جغرافیایی "۱۱/۶، ۴۸، ۲۶" وابسته به بخش خصوصی واقع در ۳۵ کیلومتری شهرستان میناب (بخش کوهستک) در استان هرمزگان انجام شد.

### ۲- غنی‌سازی آرتمیای با واکسن ویرو ماکس

در این آزمایش از سیستم آرتمیای فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) عمل‌آوری شده در شرکت Inve تایلد استفاده گردید. روزانه ۲۰ گرم سیستم که هر گرم آن حاوی ۲۷۰۰۰۰ عدد سیستم بود به وسیله ترازوی با دقت ۰/۰۱ گرم، توزین گردیده و به وسیله آب دریای فیلتر شده با شوری ۳۰ ppt، pH ۷-۷/۵ و دمای °C ۳۰-۲۹ کپسول‌زدایی گردید (۴). حدود نیمی از ناپلی‌های حاصله پس از تخم‌گذاری،

تا مرحله مایزیس I هیچ‌گونه تعویض آبی صورت نپذیرفت و هوادهی نیز به طور دائم از طریق سیستم هوادهی مرکزی و با نصب شیلنگ‌های ویژه و سنگ هوا در هر طرف جهت تعلیق یک‌نواخت (۴)، انجام گرفت. با شروع مرحله مایسیس روزانه حدود ۳۰ درصد آب تعویض گردید که به مرور زمان این مقدار افزایش یافت و در نهایت به حدود ۷۰ درصد رسید (۲ و ۳).

#### ۴- بررسی عملکرد رشد و بقای پست لاروها

در این مرحله، فاکتورهای رشد شامل طول کل (فاصله نوک روستروم تا انتهای تلسون برحسب میلی‌متر)، و وزن خشک (برحسب میلی‌گرم)، هم‌چنین درصد بقای پست لاروها در مراحل PL1 و PL5 و PL15 بر اساس ذخیره‌سازی اولیه لاروها مورد سنجش قرار گرفت. لازم به ذکر است که از هر تکرار ۲۰ لارو به صورت تصادفی برداشت شده و شاخص‌های رشد در آنها محاسبه گردید (۲).

جهت اندازه‌گیری طول کل از میکرومتر چشمی و کولیس استفاده گردید. سنجش وزن خشک نیز بدین صورت بود که پس از سنجش طول کل، آنها را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۵۵ درجه قرار داده و پس از آن در روز بعد در دسیکاتور گذاشته و آنگاه با ترازوی حساس با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم با مارک Startorius, 210 S, Model: BL ساخت آلمان نسبت به توزین آنها اقدام گردید و سپس میانگین ۲۰ نمونه اشاره شده بر اساس میلی‌گرم محاسبه گردید (۲ و ۳).

در طول دوره آزمایش، میزان دما، اکسیژن محلول، شوری و pH به صورت روزانه در ۲ نوبت ساعت ۸ صبح و ساعت ۸ شب اندازه‌گیری و ثبت گردید. که تمام این موارد توسط دستگاه چندمنظوره شامل اکسیژن متر، pH متر، شوری‌سنج و ترمومتر دیجیتال Multi 340i/SET با مارک (WTW) ساخت آلمان انجام گرفت.

که جهت آزمایش تهیه شده بودند، منتقل شدند (۳). برای این منظور یک روز قبل از شروع آزمایش و ذخیره‌سازی لاروها، کلیه ظروف با آب فیلتر شده دریا، آبگیری شد. واحدهای آزمایشی با آب با شوری ۳۲-۳۰ قسمت در هزار که هوادهی دائمی در آنها برقرار بود به میزان ۱۰ لیتر آبگیری شده و به نسبت ۱۰۰ زوا در لیتر ذخیره‌سازی گردیدند (۱، ۲ و ۳). در این زمان، لاروها به طور یکسان ۶ نوبت در روز با جلبک *Chaetoceros sp.* (جیره غذایی پایه یکسان در کلیه تیمارها) تغذیه شدند. ناگفته نماند که در انتهای مراحل ناپلیوس تا مرحله زوا I به هر ظرف در هر نوبت غذایی، ۱۰ میلی‌لیتر از محلول کشت جلبکی (کتوسروس) که به شکوفایی پلانکتونی رسیده بود اضافه شد و در مراحل بعدی این میزان به ۲۰ میلی‌لیتر در هر نوبت رسید. تراکم جلبکی تقریباً  $10^6 \times 2$  بود (۱). پس از مرحله مایزیس I (Mysis I) تا PL15 کم کم ناپلی آرتمیا به همراه غذای کنستانتره به غذای لاروها و سپس پست لاروها اضافه گردید. میزان غذایی با ناپلی آرتمیا در مراحل اولیه ۴-۳ ناپلی به ازای هر پست لارو در هر نوبت بود و در مراحل بعدی به ۱۰-۸ ناپلی به ازای هر لارو افزایش یافت (۱). هم‌چنین با توجه به نوع تیمارها، ارگوسان و واکسن، به صورت جداگانه و توأم بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد (۱۷).

مقادیر مورد نظر ارگوسان و واکسن بر اساس دستورالعمل مؤسسه تولید کننده (Schering-Plough) در دوران لاروی از مرحله زوای II تا PL1 به لاروها و هم‌چنین به مدت ۱۰ روز از زمان PL2 تا PL12 به پست لاروها خورانده شد (۱۷). هم‌چنین سعی گردید تا از بروز استرس قبل و بعد از واکسیناسیون جلوگیری شده، میگوها در شرایط بهداشتی خوب نگه‌داری شوند و در کل دوره پرورش از خوراک خوب و بالانس شده تغذیه کنند. غذای پایه PL، از نوع Epac classic و ترکیب آن شامل ۴۵٪ پروتئین، ۷٪ چربی، ۳٪ فیبر و ۱۰٪ رطوبت بوده که به میزان ۲۰-۵ گرم به ازای هر ۱۰۰۰۰۰ پست لارو در روز و حداقل ۴ بار مورد استفاده قرار گرفت (۱).

## ۵- تجزیه و تحلیل آماری

در این آزمایش تعداد ۱۲ عدد سطل ۲۰ لیتری با توجه به وجود چهار تیمار و سه تکرار برای این آزمایش انتخاب و استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به ترتیب زیر ایجاد و اجرا گردید.

۱- تیمار شاهد: لاروهایی که با روش جاری اکثر تخم سرهای میگو، مورد تغذیه قرار گرفتند.

۲- تیمار ۱ (ارگوسان): لاروهایی که به جیره غذایی آنها ارگوسان به میزان ۰/۵ درصد جیره و ۴ مرتبه در روز اضافه گردید.

۳- تیمار ۲ (واکسن و بیروماکس): لاروهایی که به وسیله آرتمیای غنی شده با واکسن (هر ۱۰۰ میلی لیتر واکسن جهت مصرف روزانه یک میلیون پست لارو) در جیره غذایی پایه خود مورد تغذیه قرار گرفتند.

۴- تیمار ۳ (ارگوسان + واکسن): لاروهایی که از آرتمیای غنی شده با واکسن به همراه ارگوسان در جیره غذایی خود بهره‌مند بودند.

داده‌های اندازه‌گیری شده با آنالیز واریانس یکطرفه (One Way- ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و سپس توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن، مقایسه میانگین‌ها در سطح آماری ۹۵٪ صورت گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از برنامه‌های SPSS و EXCEL انجام گردید.

## نتایج

۱- میانگین طول کل پست لاروها (برحسب میلی‌متر) در بین تیمارها و در مراحل مختلف PL در جدول ۱ ارائه شده است.

در مرحله PL<sub>1</sub> میزان طول کل پست لاروها دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بودند (P<۰/۰۵). بیشترین طول کل در این مرحله، مربوط به تیمار ۱ بوده که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری دارد. هم‌چنین مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن، نشانگر آن است که اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای ۱، ۲ و ۳ وجود ندارد. کمترین طول کل پست لاروها در تیمار شاهد بوده

که با تیمار ۲ یا گروه میگوهای واکسینه شده اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

با مقایسه اثر تیمارها بر طول کل پست لاروها در مرحله PL<sub>5</sub> نسبت به تیمار شاهد، میزان طول کل پست لاروها دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می‌باشند (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار برای طول کل در این مرحله، مربوط به تیمار ۳ بوده که با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت. هم‌چنین مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن، مؤید آن است که تفاوت معنی‌دار بین تیمار ۲ و تیمار شاهد وجود ندارد (P>۰/۰۵).

در مرحله PL<sub>15</sub> نیز مشخص گردید که میزان طول کل پست لاروها (برحسب میلی‌متر) در بین تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری با یکدیگر هستند. بیشترین مقدار برای طول کل مربوط به تیمار ۳ بوده که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری است.

۲- میانگین وزن خشک پست لاروها (برحسب میلی‌گرم) در بین تیمارها و مراحل مختلف PL در جدول ۱ آورده شده است.

مقایسه اثر تیمارها بر وزن خشک پست لاروهای مرحله PL<sub>1</sub>، نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار (P<۰/۰۵) در میزان وزن خشک پست لاروها (برحسب میلی‌گرم) در بین تیمارهای آزمایشی است. بر این اساس بیشترین مقدار وزن خشک به دست آمده مربوط به تیمار ۳ بوده که نسبت به سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری است. در ضمن مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن، مؤید آن است که تفاوت معنی‌داری بین تیمار شاهد و تیمار ۲ وجود ندارد.

در مرحله PL<sub>5</sub> نیز میزان وزن خشک پست لاروها (برحسب میلی‌گرم) در بین تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنی‌داری با یکدیگر می‌باشند (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار به دست آمده مربوط به تیمار ۳ بوده که نسبت به سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت.

در مرحله PL<sub>15</sub> نیز میزان وزن خشک پست لاروها (برحسب میلی‌گرم) در بین تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری

جدول ۱. مقایسه میانگین شاخص‌های رشد و بقا در پست لاروهای میگوی سفید هندی در تیمارهای مختلف

PL5-PL15 (میانگین ±SD)	PL1-PL5 (میانگین ±SD)	ZOA1-PL1 (میانگین ±SD)	مراحل مختلف تیمارهای مورد مقایسه در هر شاخص	
۱۷/۳۶±۰/۲۹ <sup>c</sup>	۶/۰۹±۰/۱۷ <sup>b</sup>	۴/۹۱±۰/۰۷ <sup>b</sup>	تیمار شاهد	طول کل (mm)
۱۷/۹۴±۰/۱۷ <sup>b</sup>	۶/۳۳±۰/۱۱ <sup>ab</sup>	۵/۲۸±۰/۱۲ <sup>a</sup>	تیمار ۱ (ارگوسان)	
۱۷/۴۴±۰/۱۷ <sup>c</sup>	۶/۰۷±۰/۱۷ <sup>b</sup>	۵/۱۱±۰/۱۴ <sup>ab</sup>	تیمار ۲ (ویبروماکس)	
۱۸/۴۱±۰/۰۴ <sup>a</sup>	۶/۴۵±۰/۱۲ <sup>a</sup>	۵/۲۶±۰/۱۷ <sup>a</sup>	تیمار ۳ (ارگوسان+ویبروماکس)	وزن خشک (mg)
۲/۸۸±۰/۱۳ <sup>a</sup>	۰/۶۴±۰/۰۷ <sup>bc</sup>	۰/۲۲±۰/۰۱ <sup>c</sup>	تیمار (شاهد)	
۲/۹۴±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۰/۷۴۵±۰/۰۱ <sup>b</sup>	۰/۲۶±۰/۰۱ <sup>b</sup>	تیمار ۱ (ارگوسان)	
۲/۵۷±۰/۰۴ <sup>b</sup>	۰/۶۱±۰/۰۳ <sup>c</sup>	۰/۲۳±۰/۰۱ <sup>bc</sup>	تیمار ۲ (ویبروماکس)	بقا (%)
۲/۹۴±۰/۱۶ <sup>a</sup>	۰/۸۹±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۰/۳±۰/۰۱ <sup>a</sup>	تیمار ۳ (ارگوسان+ویبروماکس)	
۵۹/۶۷±۴/۷۳ <sup>b</sup>	۵۷/۳۳±۱/۵۳ <sup>b</sup>	۵۷±۶/۵۶ <sup>b</sup>	تیمار شاهد	
۷۲/۳۳±۵/۵۱ <sup>ab</sup>	۶۳/۳۳±۴/۵۱ <sup>b</sup>	۷۲±۶/۵۶ <sup>a</sup>	تیمار ۱ (ارگوسان)	
۶۲/۳۳±۶/۰۳ <sup>b</sup>	۶۲/۰۰±۱۱/۱۴ <sup>b</sup>	۵۷/۶۷±۱۰/۰۲ <sup>b</sup>	تیمار ۲ (ویبروماکس)	
۸۰/۶۷±۶/۰۳ <sup>a</sup>	۷۶/۳۳±۴/۰۴ <sup>a</sup>	۷۷/۳۳±۳/۰۶ <sup>a</sup>	تیمار ۳ (ارگوسان+ویبروماکس)	

(میانگین ± انحراف معیار. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌دار هستند و حروف همانند تفاوت آماری معنی‌دار ندارند (P < ۰/۰۵)).

(تعداد تکرار در هر گروه n=۳ می باشد).

در مرحله PL<sub>15</sub> نیز اختلاف معنی‌داری (P < ۰/۰۵) بین تیمارها وجود دارد. بیشترین مقدار درصد بقا مربوط به تیمار ۳ بوده که نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۲ تفاوت معنی‌داری داشت ولی با تیمار ۱ در یک گروه قرار می‌گیرد. تیمارهای ۲ و شاهد نسبت به هم تفاوت معنی‌داری نداشتند (P > ۰/۰۵).

### بحث و نتیجه‌گیری

بالاتر بودن شاخص‌های مورد بررسی در مراحل اولیه پرورش نوزادان میگو (مرحله زوآ II تا PL1) در تیمارهای مورد آزمایش نسبت به تیمار شاهد نشان‌دهنده اثر مثبت استفاده از ارگوسان و ویبروماکس بر رشد و باز ماندگی لاروها در شرایط این آزمایش بوده و می‌تواند نشان‌دهنده ضعف سیستم ایمنی بدن در افراد تیمار شاهد باشد. اگر چه بقای پایین لاروهای میگو در مراحل زوآ به اندازه کوچک آنها نسبت داده می‌شود (۲ و ۳). در مرحله

با یکدیگر می‌باشند. بیشترین مقدار برای وزن خشک مربوط به تیمار ۳ بوده که فقط تیمار ۲ با سایر تیمارها دارای تفاوت معنی‌داری است.

۳- میانگین درصد بقای پست لاروها در بین تیمارها و مراحل مختلف PL در جدول (۱) ارائه گردیده است.

میانگین درصد بقای پست لاروهای تیمارهای مختلف در مرحله PL<sub>1</sub>، نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (P < ۰/۰۵) و نتایج این آزمون، بیشترین میزان بقا را به تیمار ۳ نسبت داده که با تیمار شاهد و تیمار ۲ دارای تفاوت معنی‌دار (P < ۰/۰۵) بوده لیکن با تیمار ۱ تفاوت معنی‌داری نداشت.

در مرحله PL<sub>5</sub> نیز بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (P < ۰/۰۵). به گونه‌ای که بیشترین میانگین درصد بقا، مربوط به تیمار ۳ بوده که با تیمار شاهد و تیمارهای ۱ و ۲ تفاوت معنی‌داری دارد.

PL<sub>1</sub> تا PL<sub>5</sub> نیز بیشترین رشد و بقا مربوط به تیمار ۳ (واکسن + ارگوسان) بوده و تفاوت آن با تیمار شاهد در سطح  $P < 0/05$  معنی دار بود. بدین معنی که پست لاروهای تغذیه شده با ارگوسان به همراه ویبروماکس، بقای بالاتری نسبت به آنهایی که جیره‌های غذایی غنی نشده مصرف نموده‌اند (شاهد) نشان دادند که این مورد تأیید یافته‌های مرحله قبلی می‌باشد. به طوری که از مرحله زوآ II تا PL<sub>1</sub> و هم‌چنین PL<sub>1</sub> تا PL<sub>5</sub> بیشترین طول کل و وزن خشک در تیمارهای ۳ و ۱ آزمایش، دیده شد حال آن‌که این دو تیمار تفاوت معنی‌داری را با یکدیگر نشان ندادند، در حالی که تفاوت آنها با تیمار شاهد که مورد غنی‌سازی قرار نگرفت، معنی‌دار بود ( $P < 0/05$ ). هم‌چنین در پایان دوره یعنی PL<sub>15</sub> نتایج مشابه کسب گردید، یعنی بیشترین مقدار طول کل و وزن خشک مربوط به تیمار ۳ بوده که نسبت به تیمار شاهد و نیز تیمار ۲ تفاوت معنی‌داری داشت. علت این امر غنی‌سازی آرتمیا با واکسن و ارگوسان بوده، به علاوه این‌که اندازه مناسب‌تر و در صد بقا بالاتر لاروها در این دو تیمار قابل ذکر است. یعنی پست لاروهای که از نظر رشد وضعیت بهتری داشتند، بقای بیشتری را نیز نشان دادند. بنابراین در این مرحله از رشد میگوها (از مرحله PL<sub>2</sub> به بعد) به علت اینکه خاصیت پالایش‌گری میگوها از بین می‌رود و میگوها کم‌کم حالت شکارچی به خود می‌گیرند، افزودن واکسن به غذای زنده می‌تواند درصد بقا را بالا برد. در راستای این تحقیق نتایج یک آزمایش فارمی دیگری که در مزرعه‌ای واقع در استان بوشهر توسط نگارنده روی پست لاروهای میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) مورد تغذیه با واکسن + ارگوسان در مراحل PL<sub>1</sub>, PL<sub>5</sub>, PL<sub>15</sub> انجام گرفت، نشان داد که فاکتورهای رشد و بقا تمام تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ( $P < 0/01$ ). هم‌چنین در آزمایش جداگانه دیگری که واکسن تنها از طریق آب و غوطه‌وری لارو میگوها در آن استفاده گردید باز هم بقاء لاروها بیشتر از گروه شاهد بود که این امر تا حدود زیادی می‌تواند به علت تغذیه میگوها از آرتمیاهایی

باشد که در محیط پرورشی میگو به واکسن آغشته شده بودند. در این تحقیق کلیه پارامترهای کیفی آب در دامنه مطلوب جهت تکثیر و پرورش پست لاروی میگوی سفید هندی قرارداد شد. دامنه تغییرات دما، ۲۹/۸-۳۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۵/۷-۶/۲ میلی‌گرم بر لیتر، pH ۸/۲۰-۸/۳۲ و شوری ۳۱/۹-۳۲/۱ قسمت در هزار بود. نتایج نشان داد که افزودن ارگوسان و واکسن تأثیری بر پارامترهای کیفی آب از جمله اکسیژن محلول، شوری، دما و pH نداشته است. البته به دست آمدن چنین نتایجی چندان غیرمنتظره نبود، چرا که به طور دائمی و ثابت، هوادهی در ظروف پرورشی لاروی هاوپست لاروها انجام می‌شد.

مونتر و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه‌ای که بر روی میگوی سفید غربی داشته‌اند به این نتیجه رسیدند که اثر واکسن و ارگوسان به صورت توأم، اثر بخشی بهتری داشته که زمان تجویز واکسن را از مراحل PL<sub>4</sub> تا PL<sub>14</sub> عنوان نمودند یعنی در حین استفاده از واکسن، ارگوسان نیز به پست لاروها خورانده می‌شد که با یافته‌های این تحقیق مطابقت خوبی داشت (۱۴). یعنی با توجه به خاصیت همیاری (Synergistic) ارگوسان با واکسن، تیمار مربوطه، از درصد بقا و شاخص‌های رشدی بالاتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بوده است. در بررسی دیگری، مونتر و همکاران در سال ۲۰۰۵ گزارش کرد که اضافه کردن ارگوسان به جیره غذایی باعث پوست اندازی میگوی سفید بالغ بعد از ۱۵ روز شد. به طوری که ۵/۰ درصد ارگوسان در جیره غذایی توانست باعث افزایش وزن و طول شده و هم‌بستگی معنی‌داری بین رشد و مقدار ارگوسان مشاهده شد (۱۴). دست آوردهای پژوهش حاضر نیز در تایید آن می‌باشد.

گومز-گیل و همکاران با اشاره به قابلیت آرتمیا جهت غنی‌سازی با دو گونه از باکتری‌های ویبریو عنوان نموده‌اند که این امر به شدت به نوع باکتری مورد استفاده، زمان در معرض قرار دادن آرتمیا با باکتری و وضعیت باکتری (زنده یا مرده بودن آن) بستگی داشته و در نهایت سبب افزایش رشد و درصد بقا پست



واکسن، که موجب افزایش شاخص‌های رشد و درصد بقا در پست لاروهای میگوی سفید هندی شده و تلفات در این تیمار نسبت به بقیه کاهش معنی‌داری داشت.

۲- برای تغذیه پست لاروهای میگوی سفید هندی از مرحله PL<sub>12</sub> تا PL<sub>12</sub> به جهت اندازه بزرگ‌تر آنها استفاده از آرتمیای غنی شده با واکسن به همراه ارگوسان، مناسب‌تر بوده و باعث افزایش رشد و بقای آنها گردید.

۳- کارایی ارگوسان به صورت مجزا در پرورش پست لاروهای میگوی سفید هندی به مراتب بیشتر از تیمار اثر واکسن بود.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات بی دریغ گروه دارو گستر به دلیل در اختیار قرار دادن مواد مورد آزمایش و تأمین بودجه و نیز مسئولان مرکز تکثیر هرمز پست لارو آقایان مهندس سردار زاده و مهندس هراجی و کلیه پرسنل زحمتکش مرکز و جناب آقای دکتر قاسمی و هم‌چنین سازمان دام‌پزشکی استان هرمزگان که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، قدردانی می‌گردد.

لاروهای میگو گردیده است (۶). به هر حال گذشته از قابلیت غنی‌سازی آرتمیای با واکسن، نکته‌ای که بیش از همه در آزمایش مرحله دوم (مرحله پست لاروی) جلب توجه نمود بقای بیشتر گروه واکسینه شده نسبت به گروه شاهد بود که این امر به دلیل تغذیه مستقیم میگوها با واکسن تجمع یافته در بدن آرتمیای غنی‌سازی شده است.

هم‌چنین قابل ذکر است که همواره بین میزان رشد و بقای پست لاروها در بین تیمارهای مختلف، ارتباط مستقیمی دیده شد، بدین ترتیب که با افزایش فاکتورهای رشد، بر مقدار درصد بقا نیز افزوده گردید.

### نتیجه‌گیری

۱- از آنجا که پست لارو میگوها، همواره در مواجهه با گونه‌هایی از عوامل فرصت طلب و اختصاصی بیماری‌زا مانند ویروس لکه سفید و عوامل باکتریایی از قبیل گونه‌های *Vibrio* و *Pseudomonas* می‌باشند. استفاده از واکسن و ارگوسان به عنوان مکمل تغذیه لاروهای میگو، توصیه می‌شود، بویژه تیمار ارگوسان به صورت ترکیب با آرتمیای غنی شده با

### منابع مورد استفاده

۱. ضیائی نژاد، س. ۱۳۸۲. تاثیر باکتری‌های باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد، بازماندگی و تغییرات آنزیم‌های گوارشی مراحل لاروی و پست لاروی میگوی سفید هندی. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
۲. یحیوی، م. ۱۳۸۴. بررسی تغذیه لاروی میگوی سفید هندی از روتیفر غنی شده با ویتامین C و اسیدهای چرب غیر اشباع (DHA,EPA) و تأثیر آن روی فاکتورهای رشد، بازماندگی و استرس‌های محیطی. رساله دکتری شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات.
۳. یحیوی، م، ق. آذری و غ. وثوقی. ۱۳۸۵. بررسی مقاومت به استرس‌های شوری و فرمالین در پست لاروهای میگوی سفید هندی تغذیه شده از روتیفرهای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع (DHA,EPA) و ویتامین C. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی ۴(۲): ۵۱۹ - ۵۳۱.
4. Azari Takami, G., H. Mahmoodzadeh and Z. Grailou. 2001. Survey of the stability of n-3 highly unsaturated fatty acids following enrichment of Artemia by various oil and subsequent starvation. International Workshop on Artemia , Urmia, Iran, 12 – 15 May 2001, PP: 13 – 14.
5. Bagni, M., N. Marino, M. Finoina , G. Abelli, L. Scapiogliati , G. Tiscar and G. Marino. 2004. Short and long term effect of dietary yeast B- glucan (Macrogard) and algenic acid (Ergosan) preparation on immune response in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Fish & Shellfish Immunol. 311-325pp.
6. Boonyaratpalin, M., K. Supamataya and Y. Toride. 1995. Effect of peptidoglycan (PG) on growth, survival, immune

- responses and tolerance to stress in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, In: Shariff. M., Subasighe, R.P., Arthur, J. R. (Eds), Diseases in Asian Aquaculture. Vol. 11. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. PP: 469-477.
7. George, I. and N. Teroki. 1999. Fish Immune System Organism, Pathogen and Environment. Academic Press., USA.
  8. Itami, T., Y. Takahashi and Y. Nakamura. 1989. Efficiency of vaccination against vibriosis in cultured kuruma prawns *Penaeus japonicus*. J. Aquatic Anim. Health 1:238-242.
  9. Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Eguse and M. Kondo. 1993. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes oral administration of  $\beta$ -1, 3 glucan (schizophyllan). PP: 375-378.
  10. Kawada, A., N. Hiura, S. Tajima and H. Takahara. 1999. Alginate oligosaccharides stimulate VEGF- mediated growth and migration of human endothelial cell. Arch. Derm. Res. 291:542-547.
  11. Kimura, Y., K. Watabe and H. Okuda. 1996. Effect of soluble sodium alginate on cholesterol excretion and glucose tolerance in rats. I. Ethnopharmacol. 54: 47-54.
  12. Lewis, j. G., N. F. Stanley and G. G. Guist. 1990. Commercial Production and Applications of Algal Hydrocolloids. Cambridge University Press, UK.
  13. Miles, D. J. C., J. Polchana, J. Lillet, S. Kanchanakhan, K. D. Thompson and A. Dams. 2001. Immunostimulation of striped snake head (*Channa striata*) against epizootic ulcerative syndrome. Aquaculture 195:1-15.
  14. Montero, R. A., D. Mcintosh, R. Sanchez and I. Felores. 2005. Immunostimulation of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) following dietary administration of Ergosan. J. Invertebrate Patol. 91: 188-194.
  15. Raa, J. 2000. The Use of Stimulants in Fish and Shellfish Feeds. University of Troms, Norway.
  16. Sakai, M. 1998. Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture 172: 63-92.
  17. Schering plough animal health aquaculture corporation. 2005. Union, New Jersey. Brief about Aquavac Ergosan and Aquavac Vibromax Vaccine. (www.spaquaculture.com).
  18. Skjermo, J. and Q. Bergh. 2004. High-M alginate immunostimulation of Atlantic halibut (*Hippolossus hippolossus*) larvae using Artemia for delivery increase resistance against vibriosis. Aquaculture 238:107-113.
  19. Sung, H. H., Y. L. Song and G. H. Kou. 1991. Potential uses of bacterin to prevent shrimp vibriosis. Fish and Shellfish Immunol. 1:311-312.
  20. Sung, H.H., G.H. Kou and Y.L. Song. 1994. Vibriosis resistance induced by glucan treat shrimp (*Penaeus monodon*) via immunostimulation. J. Crust. Biol.16: 279-285.
  21. Teunissen, O.S.P. R. Faber, G.H.R. Booms, T.Latscha and J.H. Boon. 1998. Influence of vaccination on vibriosis resistance of the giant black tiger shrimp *penaeus monodon* (Fabricius). Aquaculture 164: 359-366.