بررسی کارایی واکسن ویبروماکس خوراکی برافزایش مقاومت به استرسهای شوری و فرمالین در پست لاروهای میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*)

امیرهوشنگ بحری[1]*

چکیده

این پژوهش در کارگاه تکثیر هرمز لارو واقع در بخش کوهستک شهرستان میناب در سال ۱۳۸۵ صورت گرفت و کوشش شد کارایی واکسن ویبروماکس و میزان بازماندگی تست های استرس شوری و فرمالین در مراحل پست لاروی PL1 ,PL5 و PL15 میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*) بررسی شود. اثر واکسن ویبروماکس از طریق غوطه وری (تیمار ۲)و غنی سازی ناپلی های آرتمیا (*Artemia franciscana*) (تیمار ۳) وگروه شاهد (تیمار ۱) ، جهت مقایسه بررسی گردیدند. این تحقیق در قالب یک طرح کاملا تصادفی ، اجرا شد و مقایسه میانگین هااز طریق آزمون دانکن صورت پذیرفت. با در نظر گرفتن۳تیمار و ۳ تکرار برای هر یک از آنها ،۹ سطل یکسان بکار گرفته شد که به مقدار ۱۰ لیتر آبگیری و با تراکم ۱۰۰ لارو مرحله زوای یک در لیتر ذخیره سازی گردیدند. .دوره آزمایش از مرحله زوای یک تاPL15 بودکه در پایان روز ۱۲ ،۱۶ و۲۵ میزان بقا بررسی شدند.نتایج نشان دادکه بیشترین مقداربازماندگی به درصد برای تست استرس شوری ۱۰ قسمت در هزار در مراحل PL1، PL5 و PL15در تیمار۳ (۶۸/۰۰، ۷۲/۳۳و۷۵/۶۷) بود که نسبت به تیمار شاهد(۴۸/۳۳، ۴۶/۶۷و ۵۳/۳۳)و تیمار ۲ (۶۰/۰۰ ،۶۱/۳۳ و ۶۴/۶۷) در سطح$P < ۰/۰۵$ دارای تفاوت معنی داری بوده است.بیشترین مقدار بازماندگی به درصد برای تست استرس شوری ۲۰ قسمت در هزار در تیمار ۳ بترتیب در مراحل مذکور(۸۴/۰۰،۸۰/۰۰و۸۶/۰۰)بدست آمد که در مقایسه با تیمار شاهد(۶۵/۰۰ ،۶۵/۳۳ و ۶۶/۰۰)در سطح$P< ۰/۰۵$دارای تفاوت معنی داری بودندو برای تست استرس فرمالین ۱۰۰ قسمت در میلیون نیز در تیمار۳ (۸۱/۳۳ ،۷۶/۰۰ و۸۳/۳۳)محاسبه گردید که نسبت به تیمار شاهد (۵۶،۵۲/۳۳ و۵۸/۶۷)و تیمار ۲ (۷۳/۳۳ ،۶۸/۳۳ و۶۹/۶۷)در سطح $P< ۰/۰۵$ تفاوت معنی داری داشتند.

واژگان کلیدی: پست لارو،غنی سازی، واکسن ویبروماکس، میگوی سفید هندی، آرتمیا.

مقدمه

یکی از روش های مناسب جهت ارزیابی کیفیت پست لاروها در میگوهای خانواده پنائیده که در تخم سراها امکان پذیر است، استفاده از تست‌های استرس محیطی از جمله استرس‌های شوری و فرمالین می‌باشد(۸). تاکارت و همکاران در سال ۱۹۸۹ استفاده

۱- عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر عباس
*-نویسنده مسئول amirbahri52@yahoo.com

از تست‌های استرس را به عنوان یک ابزار در ارزیابی کیفیت پست لارو ماهیان و سخت پوستان پیشنهاد نمودند(۹).عده ای نیز گزارش کرده اند که پست لاروهایی که در شرایط تست‌های استرس، بازماندگی بیشتری از خود نشان می دهند دارای کیفیت بهتر می باشند(۳و٤)، به عنوان مثال، مطالعات فراوانی شامل جیره های غذایی با مقادیر فراوان اسیدهای چرب غیر اشباع بلندزنجیره جهت بازماندگی بالاتر پست لاروها در تست های استرس در مرحله پست لاروی گزارش و پیشنهاد شده است(۳و۹).

افزایش ایمنی غیر اختصاصی در میگوها، آنها را نسبت به طیف وسیعی از توانایی دفاعی تأمین نموده که می بایست بطور مؤثری آنها را در مقابل عفونتهای ناشی از عوامل بیماری زا، مصون دارد . استفاده خوراکی ، حمام دادن و تزریق مواد محرکه ایمنی ، از قبیل باکتری ویبریو، بتا گلوکان[1] و پپتید وگلیکان[2] به میگوها ، می تواند، مقاومت آنها را در مقابل آلودگی های میکروبی افزایش دهد(٦).

تحقیقات در زمینه مواد محرک سیستم ایمنی در حال توسعه است و مواد زیادی در حال حاضر در صنعت آبزی پروری استفاده می‌شود. اثر تحریک کنندگی گلوکان، کیتین[3]، لاکتوفرین[4] و لوامیزول[5] 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 محرک ها، علاوه بر افزایش عملکرد فاگوسیتوزی و افزایش فعالیت باکتری کشی، همچنین فعالیت سلول های کشنده طبیعی کمپلمان، لیزوزیم و پاسخ آنتی بادی را تحریک می‌کنند(۵).

آستانه مقاومت میگوهایی که توسط گلوکان تغذیه گردیدند، به مقدار نسبی، نسبت به استرس ها از قبیل صید، انتقال و حمل و نقل و مقدار آمونیاک (۱۵ppm در مدت ٢٤ ساعت)، افزایش مقاومت داشته است(۷).گر چه روشن نیست که چرا گلوکان تحمل میگوها را نسبت به استرس ها افزایش می‌دهد، اما می‌تواند به میگوها کمک نماید که نسبت به عوامل بیماریزا حساسیت کمتری داشته باشد و بطورقطع می‌تواند، برای صنعت پرورش میگو مفید باشد(۷).

واکسن ویبروماکس[6] نیز یک محصول امولسیونه بی خطراست که از طریق غنی سازی ناپلی آرتمیا می تواند به آسانی به تغذیه پست لاروهای میگو برسد.

اطلاعات موجود از چند بررسی نشان میدهد که استفاده از محرک های ایمنی به تنهایی یا بصورت ترکیبی با باکتری های ضعیف شده، منجر به افزایش پاسخ ایمنی و مقاومت نسبت به بیماری های باکتریائی در میگو خواهد شد (۲).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 رشد کافی و تولید کم محصول در شرایط کنونی کشور، یکی از مواردی که می تواند به افزایش رشد و بازماندگی پست لاروهای میگو کمک نماید، دقت در رساندن مواد افزایش دهنده ایمنی و مقاومت در تغذیه میگو ها است که با افزایش فاکتورهای رشد نیز همراه است. با توجه به موارد ذکر شده در این پژوهش سعی گردید با فرض اضافه کردن واکسن مورد آزمایش به غذای زنده و دارا بودن خواص مورد نظر، اهدافی شامل رشد بیشتر، بازماندگی ودر صد بقاء بالاتر و افزایش تولید بدست آید، که نتایج قابل قبول در مدت تحقیق حاصل گردید.

مواد وروشها

۱- محل اجرای آزمایش

این پژوهش در کارگاه تکثیر هرمز لارو وابسته به بخش خصوصی واقع در ۳۵ کیلومتری شهرستان میناب

1 -β glucan
2 -Peptidoglycan
3- Chitin
4 -Lactoferin
5 -Levamisole

6- Vibromax

(بخش کوهستک) و ۱۲۵ کیلومتری شهرستان بندرعباس بر روی پست لاروهای میگوی سفید هندی پرورشی، اجرا شد.

۲- غنی سازی آرتمیا با واکسن ویبرو ماکس

برای این منظور از سیست آرتمیای فرانسیسکانا(*Artemia franciscana)* ساخت شرکت Inve تایلند استفاده گردید.

حدود نیمی از ناپلی های حاصله پس از تخم گشایی در ظروف ویژه ای جداگانه نگهداری شده و تا مرحله Instar II جهت غنی شدن با واکسن نگهداری شدند. تراکم آنها در این زمان به مقدار ۱۰۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰۰ عدد در لیتر رسید(۱). بدین ترتیب ۱۲-۱۰ ساعت بعداز تخم گشایی واکسن موردنظر به میزان ۱ میلی لیتر به ظروف حاوی سوسپانسیون آرتمیای بالغ افزوده گردید(٦).

نیمی دیگر از سیست های کپسول زدائی شده در ظروف سیلندری شکل دیگری تخم گشایی گردید.بااین تفاوت که هیچگونه واکسنی به آن اضافه نشد. از ناپلی‌های حاصل از این سیست ها جهت تغذیه سایر تیمارهایی که از واکسن بی بهره بودند نظیر تیمار کنترل استفاده گردید.

این عمل در حین آزمایش بطور روزانه انجام گرفت تا همواره آرتمیای تازه در اختیار پست لاروها قرار داده شود. همچنین سعی گردید تا از بروز استرس قبل و بعد از واکسیناسیون جلوگیری شده ، میگوها در شرایط بهداشتی خوب نگهداری شده و نیز از خوراک خوب و متعادل در کل دوره پرورش برخوردار باشند.

۳- پرورش پست لاروهای میگوی سفید هندی

برای این منظور تعداد ۵ مولد ماده پرورشی جفت گیری کرده (اسپرم دار) با وزن متوسط ٤۰گرم که براساس سلامت ظاهری در مرحله ٤ رسیدگی جنسی بودند، انتخاب گردیدند و بعد از انجام مراحل تخم ریزی، لاروهای حاصل تا مرحله زوآ I در همان تانک های ۳۰۰ لیتری در اطاق تخم ریزی نگهداری شده و آنگاه به سطل های ۲۰ لیتری که جهت آزمایش تهیه شده بودند، منتقل شدند (۱). برای این منظور یک روز قبل از شروع آزمایش و ذخیره سازی لاروها، کلیه ظروف با آب فیلتر شده دریا ، آبگیری شدند. این آب با شوری ۳۲-۳۰ قسمت در هزار که توسط سنگ هوا، هوادهی دائمی در آنها برقرار بود به میزان ۱۰ لیتر آبگیری شده و به نسبت ۱۰۰ لارو در لیتر ذخیره سازی گردیدند.

در این زمان، لاروها بطور یکسان ٦ نوبت در روز با جلبک *Chaetocerous* تغذیه می شدند. پس از مرحله مایسیس I تا PL15 کم کم ناپلی آرتمیا به همراه غذای کنسانتره به غذای لاروها و سپس پست لاروها اضافه گردید.

مقادیر مورد نظر واکسن بر اساس دستورالعمل (Schering-plough) در دوران لاروی ازمرحله زوآی II تا PL1 و همچنین به مدت ۱۰ روز اززمان PL2 تا PL12 به پست لاروها خورانده شد (٦).

٤-تستهای استرس

در مراحل سه گانه PL1، PL5 وPL15 جهت بررسی کیفیت و قوی بودن پست لاروهای تیمارهای مختلف نسبت به تیمار شاهد آنها را تحت تست های استرس شوری ۱۰ و ۲۰ قسمت در هزار و همچنین فرمالین ۱۰۰ قسمت درمیلیون قرار داده ودرصد بازماندگی آنها محاسبه گردید. بدین منظور ۵۰ پست لارو از هر تکرار مربوط به تیمارخاص بصورت تصادفی برداشت گردید و در سطل های ۵ لیتری که تا ۱ لیتر آبگیری شده بود به ترتیب برای هر تیمار، ۳ تکرار در زمان ٦۰ دقیقه بر اساس نوع استرس، درنظر گرفته شد که در پایان زمان نامبرده، درصد بازماندگی محاسبه گردید.

۵- آنالیز آماری

در این آزمایش مقدار ۹ عدد سطل ۲۰ لیتری با توجه به وجود سه تیمار و سه تکرار برای این آزمایش

انتخاب و استفاده شد که در قالب یک طرح کاملاً تصادفی ایجاد و اجرا گردید.

درصدبازماندگی پست لاروها در تست های استرس فرمالین خالصppm ۱۰۰وشوری ppt ۱۰ وppt ۲۰ ابتدا تحت آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) قرار گرفته و سپس توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن، مقایسه میانگین‌ها صورت گرفت و وجود یا عدم وجود اختلاف معنی داردر سطح ۰/۰۵ تعیین گردید. سرانجام کلیه تجزیه و تحلیل داده‌ها برای داده های بدست آمده با استفاده از برنامه‌های SPSS ۱۲ و EXCEL انجام گردید.

نتایج

درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست های استرس، در مراحل PL1،PL5 وPL15

۱- درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست استرس شوری۱۰ قسمت در هزار

میانگین درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست استرس شوری۱۰ قسمت در هزار در مدت زمان ۶۰ دقیقه درمراحل وتیمارهای مختلف در جدول (۱) ارائه شده است.

۲- درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست استرس شوری۲۰ قسمت در هزار

میانگین درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست استرس شوری۲۰ قسمت در هزار در مدت زمان ۶۰ دقیقه در مراحل و تیمارهای مختلف در جدول (۱) ارائه گردیده است.

۳- درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست استرس فرمالین خالص ۱۰۰ قسمت در میلیون

میانگین درصد بازماندگی پست لاروها در اثر تست استرس فرمالین خالص ۱۰۰ قسمت در میلیون در زمان ۶۰ دقیقه درمراحل وتیمارهای مختلف در جدول (۱) ارائه گردیده است.

جدول شماره۱ - مقایسه میانگین درصد بقاء پست لاروهای میگوی سفید هندی در تیمارهای مختلف ناشی از تست استرس شوری‌های مختلف و مواجهه با فرمالین در مدت ۶۰ دقیقه

نوع استرس تیمارهای مورد مقایسه در هر شاخص	مراحل مختلف	ZOA_1-PL_1 (انحراف استاندارد± میانگین)	PL_1-PL_5 (انحراف استاندارد± میانگین)	PL_5-PL_{15} (انحراف استاندارد± میانگین)
شوری۱۰ppt	تیمار ۱(شاهد)	۴۸/۳۳ ± ۲/۵۲ c	۴۶/۶۷ ± ۴/۱۶ c	۵۳/۳۳ ± ۵/۰۳ c
	تیمار۲	۶۰/۰۰ ± ۲/۰۰ b	۶۱/۳۳ ± ۶/۱۱ b	۶۴/۶۷ ± ۳/۰۶ b
	تیمار۳	۶۸/۰۰ ± ۴/۰۰ a	۷۲/۳۳ ± ۳/۰۶ a	۷۵/۶۷ ± ۲/۰۸ a
شوری۲۰ppt	تیمار ۱(شاهد)	۶۵/۰۰ ± ۳/۰۰ c	۶۵/۳۳ ± ۶.۴۳ b	۶۶/۰۰ ± ۳/۶۱ c
	تیمار۲	۷۶.۳۳ ± ۳/۷۹ b	۷۳/۰۰ ± ۱/۷۳ ab	۷۳/۰۰ ± ۱/۷۳ b
	تیمار۳	۸۴/۰۰ ±۱/۰۰ a	۸۰/۰۰ ± ۲/۰۰ a	۸۶/۰۰ ± ۲/۶۵ a
فرمالین خالص۱۰۰ ppm(٪)	تیمار ۱(شاهد)	۵۲/۳۳ ± ۲/۰۸ c	۵۶/۰۰ ± ۳/۴۶ b	۵۸/۶۷±۳/۰۶ c
	تیمار۲	۷۳/۳۳ ± ۴/۵۱ b	۶۸/۳۳±۶/۵۱ a	۶۹/۶۷±۲/۰۸ b
	تیمار۳	۸۱/۳۳ ± ۳/۰۶ a	۷۶/۰۰± ۳/۴۶ a	۸۳/۳۳±۵/۰۳ a

(میانگین±انحراف معیار)سطوح اختلاف توسط حروف c،b،a نشان داده شده است۰

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق در تست استرس فرمالین ۱۰۰ قسمت در میلیون و تست شوری ۱۰ و۲۰قسمت در هزار درمرحله PL1 بیشترین بازماندگی در تیمار۳وجود داشته که تفاوت آنها با تیمار ۱(شاهد) معنی دار بود . علت این امر غنی سازی آرتمیا با واکسن بوده، بعلاوه اینکه اندازه مناسبتر ودر صد باز ماندگی بالاتر لاروها در این تیمار قابل ذکر است. همانطور که نتایج این تحقیق نشان داد ،لاروهایی که ازنظر رشد وضعیت بهتری داشتند، در برابر تستهای فرمالین نیز مقاومت بهتری را از خودنشان دادند(۱).

همچنین در تست استرس فرمالین وشوری ،با افزایش سن پست لاروها ، میزان باز ماندگی آنهاافزایش یا فته است. به طور کلی باز ماندگی تیمارها در مرحله PL15بیشتر از PL5 و به دنبال آن ،PL5 بیشتر از PL1 بوده است .

در این مرحله از رشد میگوها (از مرحله PL2 به بعد) به علت اینکه خاصیت پالایش گری میگوها از بین رفته و میگوها کم کم حالت شکارچی به خود می‌گیرند، بنابراین افزودن واکسن به غذای زنده می‌تواند اثرات مستقیم بهتری به بازماندگی و مقاومت در برابر تنش‌های اسمزی داشته باشد.

نتایج این پژوهش نشان داد که تغذیه لاروهای میگوی سفید هندی با غذاهای زنده که از طریق واکسن، غنی سازی گردیده ، موجب افزایش مقاومت پست لاروها در برابر استرس‌های شوری و فرمالین می‌گردد، که این مورد در هر سه مرحله PL1 و PL5 و PL15 به چشم می‌خورد. در تست استرس فرمالین و همچنین شوری ۱۰ و ۲۰ قسمت در هزار که در مراحل سه گانه PL1 و PL5 و PL15 انجام شد بیشترین بازماندگی در تیمار ۳ و پس از آن در تیمار ۲ مشاهده گردید .

تیمار شاهد نیز به علت غنی نشدن ناپلی آرتمیاهای مورد تغذیه با واکسن، دارای کمترین درصد بازماندگی در این مراحل بودندو بطور کلی تفاوت معنی داری درسطح ۰/۰۵ بین تیمارهای آزمایش دیده شد. (P< ۰/۰۵)

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از زحمات بیدریغ گروه دارو گستر به دلیل در اختیار قرار دادن مواد مورد آزمایش و تامین بودجه و نیز مسئولان مرکز تکثیر هرمز لارو آقایان مهندس سردار زاده ومهندس هراجی و کلیه پرسنل زحمتکش مرکز و همچنین سازمان دامپزشکی استان هرمزگان که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، قدردانی می گردد.

منابع

۱- آذری تاکامی، ق . طبیعی، ا . شکوری، م. آق، ن. (۱۳۸۳): تاثیر اسیدهای چرب بلند زنجیره امگا ۳ در افزایش مقاومت بچه میگوهای سفید هندی در برابر تنش اسمزی. مجله منابع طبیعی ایران جلد ۵۷ شماره ۳ : صفحه ٤٥٥ – ٤٦٦

2- Montero rocha, A., Mcintosh ,D., Sanchez-merino, R, and Felores,i., (2005): Immunostimulation of white shrimp *(Litopenaeus vannamei)* following dietary administration of Ergosan . Journal of Invertebrate Pathology 91 (2006) ,188-194 pp.

3- Rees , J . F . , Cure , K . ,Piyatiratitivorakul , S . , Sorgeloos , P . and Menasveta , P. , (1994): Highly unsaturated fatty acid requirements of *Penaeus monodon* postlarvae : An experimental approach based on Artemia enrichment . Aquaculture , 122 : 193 – 207

4- Samocha , T . M . , Guajardo , H . , Lawrence , A . L . , Castille , F . L . , Speed , M . ; Mckee , D . A . and Page , K . I . , (1998) : A simple stress test for *Penaeus vannamei* postlarvae . Aquaculture 165 : 233 – 242 .

5- Sakai, M., (1998) : Current research status of fish immunostimulants , Aquaculture 172 (1999) ,63-92pp.

6- Schering, plough animal health Aquaculture Corporation., (2005): Union, newjersey .Brifes about Aquavac Ergosan and Aquavac Garvetil vaccine. (www. Spaquaculture.com) .

7- Song , Y.L ,J.J. Liu, L.C. Chan and H.H. Sung., (1997): Glucan – induced disease resistance in tiger shrimp *(penaeus monodon)*. In Fish vaccinology (R.Gudding , A , Lillehaug, P.J. Midtlyng and F. Brown , eds.), Deve Biol Stavd. Basel , Karger , 90 : 413 – 421.

8- Tackaert , W. , Abelin , P. , Leger , P. and Sorgeloos , P . ,(1992):Stress resistance as a criterium to evaluate quality of postlarval shrimp reared under different feeding procedures . In : Pessoa , J . (Ed.), proc . III simposio Brasileiro sobre cultivo de camarao , MCR Aquaculture , Brasil , pp . 393 – 403 .

9- Tackaert , W . , Abelin , P . , Dhert , P . ,Leger , P . ,Grymonpre , D . , Bombeo , R . and Sorgeloos , P . ,(1989): Stress resistance in postlarval penaeid shrimp reared under different feeding procedures . Aquaculture 89 . World Aquaculture Society , LosAngeles , pp . 1 – 15 .