

افزودن آنتی بیوتیک و تزریق اکسیژن به مایع سلومیک و تأثیر آن بر نگهداری کوتاه مدت تخمک لقاح نیافته ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*)

*مازیار اکبرآبادی^۱، شعبانعلی نظامی^۲، حسین خارا^۱ و فرشاد رحمتی^۱

^۱دانشجوی دوره کارشناسی ارشد گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

^۲استادیار گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶۷/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۲۰

چکیده

در این مطالعه با دو آزمایش، اثر آنتی‌بیوتیک و اکسیژن بر قدرت لقاح پذیری تخمک لقاح نیافته ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) در طی نگهداری کوتاه مدت انجام گرفت. در آزمایش اول به تخمک‌ها چهار غلظت آنتی‌بیوتیک، بدون آن که اکسیژنی به آنها اضافه شود، نگهداری شد. در آزمایش دوم به منظور سنجش اثر اکسیژن و آنتی‌بیوتیک بر نگهداری تخمک، ۳ غلظت آنتی‌بیوتیک شامل غلظت ۱ (۲۵۰ IU penicillin + ۲۵۰ µg streptomycin)، غلظت ۲ (۲ IU penicillin + ۲۵۰ µg streptomycin) و غلظت ۳ (۵۰۰ IU penicillin + ۵۰۰ µg streptomycin) به ازای هر میلی‌لیتر مایع سلومیک به آنها اضافه گردید. سپس مخلوط تخمک و مایع سلومیک به کیسه‌های پلاستیکی ریخته شده و با تزریق اکسیژن خالص به کیسه‌ها، در یخچال با دمای ۲-۳ درجه نگهداری گردید. فرایند لقاح در روزهای صفر (شاهد)، ۴، ۸ و ۱۲ بعد از تخم‌کشی انجام پذیرفت. بر اساس نتایج حاصله، با گذشت زمان، کاهش قدرت لقاح دیده شد. در آزمایش اول بین روز صفر، ۴ و ۸ تفاوت معنی‌داری در چشم‌زدگی و تخم‌گشایی مشاهده شد. در آزمایش دوم در روز ۴ نگهداری، غلظت صفر آنتی‌بیوتیک باعث کاهش معنی‌داری در لقاح‌پذیری نسبت به گروه شاهد شد. بالاترین چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در روز صفر، مشاهده شد. بر خلاف غلظت صفر دو غلظت دیگر آنتی‌بیوتیک (غلظت ۱ و غلظت ۲) تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و نیز با یکدیگر نداشتند. در غلظت ۳ آنتی‌بیوتیک تفاوت کمی در ارتباط با درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی قابل مشاهده بود. در روز ۸ نگهداری نیز نتایج تقریباً مشابه روز ۴ بود. در روز ۱۲ نگهداری، درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی با غلظت صفر آنتی‌بیوتیک بسیار پائین بود. با وجود این، دو غلظت ۱ و ۲ به ترتیب با ۷۷/۶۱ و ۶۲/۵۹ درصد چشم‌زدگی، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند و غلظت ۳ تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت. همچنین در مقایسه با تیمار بدون اکسیژن (۷/۱۱ درصد چشم‌زدگی)، تزریق اکسیژن قدرت لقاح‌پذیری تخمک‌ها را تا ۶۰/۴۴ درصد افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: اکسیژن، آنتی‌بیوتیک، تخمک لقاح نیافته، ماهی آزاد دریای خزر، نگهداری کوتاه‌مدت

مقدمه

نیاز، یک عامل مهم در موفقیت لقاح مصنوعی در مزارع تکثیر و پرورش ماهی آزاد می‌باشد، به طوری که دستیابی به فنی که بتوان تخمک‌های استحصالی ماهی ماده را به مدت کوتاه و یا بلند مدت نگهداری نمود از مطالب مهم مورد نیاز در صنعت تکثیر این ماهی محسوب می‌شود. اگرچه موفقیت‌های بسیاری در زمینه نگهداری اسپرم به صورت منجمد به دست آمده، ولی در مورد تخمک این

با کاهش شدید ذخایر طبیعی ماهیان در طی چند دهه اخیر، تکثیر و پرورش مصنوعی آبزیان به خصوص آزماهیان جهت تأمین نیاز پروتئینی در سطح کاملاً وسیعی در جهان در حال انجام می‌باشد. دسترسی به اسپرم و تخمک با کیفیت مناسب و به مقدار کافی در زمان مورد

* - مسئول مکاتبه: maziar.akbarabadi@yahoo.com

سلول‌های جنسی در حال نگهداری آسیب وارد نماید (۸) که با افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها در غلظت مناسب به مایع سلومیک، می‌توان قدرت لقاح‌پذیری تخمک‌ها را افزایش داد (۱ و ۴).

تخمک‌ها برای انجام فعالیت‌های متابولیسمی خود احتیاج به اکسیژن دارند. این اکسیژن در داخل بدن ماهی از طریق مویرگ‌ها و انتشار اکسیژن به داخل مایع سلومیک تأمین می‌شود (۵). به نظر می‌رسد در خارج از بدن و در محیط بسته، تخمک‌ها در اثر خفگی کیفیت خود را از دست می‌دهند. با توجه به نتایج بدست آمده از محیط‌های نگهدارنده تخمک در مطالعات قبلی (۱۰ و ۱۱)، در دسترس بودن مایع سلومیک و همچنین مشکل بودن ساخت محلول مصنوعی در شرایط کارگاهی، در این مطالعه تخمک ماهی آزاد در مایع سلومیک نگهداری شد تا روشی کاربردی جهت نگهداری کوتاه مدت تخمک در محیط خارج از بدن ماهی به بخش اجرا ارائه گردد. بنابراین این تحقیق با اهداف (۱) بررسی امکان نگهداری تخمک، خارج بدن ماهی و در داخل مایع سلومیک، (۲) بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک بر مدت زمان ماندگاری تخمک در مایع سلومیک (۳) بررسی اثر افزودن اکسیژن بر محیط نگهداری بر مدت زمان نگهداری تخمک انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مولدین: این تحقیق در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان کلاردشت، انجام پذیرفت. برای انجام این تحقیق چهار قطعه مولد ماده برای آزمایش در نظر گرفته شد و قبل از شروع آزمایش طول و وزن مولدین اندازه‌گیری شد. این مولدین دارای طولی بین ۴۷ الی ۵۲ سانتی‌متر و وزن ۱۹۰۰ تا ۲۱۰۰ گرم بود.

جمع‌آوری تخمک و مایع سلومیک: برای جمع‌آوری تخمک، مولدین ماده به وان‌های پلاستیکی منتقل و به وسیله ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ماده بیهوش کننده MS ۲۲۲ بیهوش گردیدند. سپس مولدین بیهوش شده با آب تمیز شسته شده و پس از خشک کردن بدن به وسیله حوله،

موفقیت اندک بوده است. یکی از دلایل آن پاره شدن غشاء بر اثر به وجود آمدن بلورهای یخی طی انجماد می‌باشد.

در هنگام نگهداری اسپرم چون حجم سلول کوچک است، می‌توان به راحتی به وسیله مواد شیمیایی آب را از اسپرم خارج نمود و به این وسیله از انجماد آب درون سلولی و به وجود آمدن پارگی در غشاء بر اثر بلورهای یخی جلوگیری نمود. ولی در مورد تخمک‌ها که اندازه‌ای نسبتاً درشت دارند، جذب آب درون سلولی به راحتی امکان‌پذیر نیست. همچنین گزارش شده که مواد نگهدارنده در مقابل سرما که در انجماد اسپرم مورد استفاده قرار می‌گیرند، در هنگام استفاده در تخمک ایجاد سمیت زیادی می‌کنند که برای بقای تخمک مضر می‌باشند (۱۷ و ۱۸). با توجه به مشکلات انجماد تخمک، نگهداری کوتاه مدت تخمک در دمای بالای صفر درجه و برای اهداف اعمال دستکاری‌های ژنتیکی، انتقال تخمک بین کارگاه‌ها به جای خود مولدین و در شرایطی که به جنس نر دسترسی وجود ندارد، مورد توجه قرار گرفته است. عوامل متعددی بر نگهداری تخمک تأثیرگذار است که از مهمترین آنها به دما، عوامل عفونی و اکسیژن می‌توان اشاره کرد. در خانواده آزاد ماهیان، تخمک پس از فرآیند اوولاسیون (تخمک‌گذاری) از لایه‌های فولیکولی جدا شده و در محوطه شکمی در مایع لزجی به نام مایع سلومیک یا مایع تخمدانی شناور می‌شود و بسته به شرایط دمایی می‌توانند حداقل به مدت یک هفته قدرت لقاح خود را حفظ نمایند (۱۶). زمانی که تخمک در دماهای پایین نگهداری می‌شود، متابولیسم کمتری داشته و بدون تغییر قابل توجهی در کیفیت می‌توان آن را به مدت چند روز نگهداری کرد، ولی افزایش درجه حرارت نگهداری، تأثیر منفی روی مدت زمان نگهداری می‌گذارد (۹).

عفونت‌های باکتریایی نیز یکی دیگر از عوامل محدودکننده نگهداری تخمک آزاد ماهیان در مایع سلومیک می‌باشد. باکتری‌ها علاوه بر مصرف اکسیژن می‌توانند موادی از خود ترشح کنند که به دیواره

به آزمایشگاه منتقل و در محیط کشت Nutrient Agar و به مدت ۴۸ ساعت کشت داده می‌شد.

فرآیند لقاح و انکوباسیون تخم‌ها: قبل از انجام لقاح، اسپرم از ۶ مولد نر استحصال شد و کیفیت آنها از نظر داشتن تحرک با میکروسکوپ نوری مورد امتحان قرار گرفت و اسپرم مولدینی که دارای تحرک مطلوبی نبودند، حذف گردید. سپس برای عمل لقاح ابتدا ۱۰ گرم تخمک برای هر تکرار (۳ تکرار برای هر تیمار) برداشته شد و مایع سلومیک همراه آن جدا گردید. سپس به آن محلول لقاخ اضافه گردید. محلول لقاخ مصرفی، محلول لقاخی بیلارد (۱۲۵ میلی‌مول کلرید سدیم، ۳۰ میلی‌مول گلیسین، ۲۰ میلی‌مول تریس هیدروکلرید در $\text{pH}=9$) بود که به نسبت ۱:۲ (تخمک: محلول لقاخی) استفاده شد (۱۴). بلافاصله میزان ۳۰۰ میکرولیتر اسپرم به وسیله میکروسپلر برداشته و به تخمک‌ها اضافه شد. این مخلوط به مدت ۲-۳ دقیقه به هم زده شد، سپس تخم‌ها مورد شستشو قرار گرفته و به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه به حال خود رها شدند تا فرآیند جذب آب کامل شود. لقاح در روزهای صفر، چهار، هشت و دوازدهم بعد از تخم‌کشی انجام پذیرفت.

تخم‌ها پس از جذب آب به انکوباتور منتقل و تا مرحله چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در سبدهایی که برای هر تیمار و تکرار شماره‌گذاری شده بودند، نگهداری شد. در این تحقیق از انکوباتورهای کالیفرنایی استفاده شد. در داخل هر ترف کالیفرنایی ۳ عدد سینی فایبرگلاسی و در داخل هر سینی هم تعداد ۹ عدد سبد پلاستیکی قرار داشت. این سبدها به‌طور تصادفی در سینی‌ها توزیع شده بودند و در فواصل یک روزه برای جلوگیری از قارچ‌زدگی از مالاشیت گرین ۱ میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

دمای آب سالن انکوباسیون ۸-۹ درجه سانتی‌گراد بود. از چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به‌عنوان مقیاسی از قدرت لقاح‌پذیری استفاده گردید (۷). پس از مرحله چشم‌زدگی، تعداد تخم‌های سفید و چشم زده شمارش

تخمک‌های رسیده با فشار به شکم ماهی خارج شدند. تخمک‌های هر مولد در ظرف‌های جداگانه‌ای جمع‌آوری گردید. تخم‌کشی با دقت زیاد انجام شد تا از اختلاط مواد زاید (ادرار، مدفوع، خون و موکوس) با تخمک و مایع سلومیک جلوگیری شود. در هنگام تخم‌کشی، مایع سلومیک ماهیان نیز در ظروف جداگانه‌ای جمع‌آوری شد تا به‌عنوان ماده نگهدارنده تخمک در این تحقیق استفاده شود.

روش نگهداری

آزمایش اول: در آزمایش اول که آزمایش مقدماتی بود تخمک‌ها به نسبت ۱:۲ (تخمک: مایع سلومیک) با هم مخلوط گردیده و آنتی‌بیوتیک به آنها اضافه شود در داخل ظروف یکبار مصرف به ابعاد 10×20 سانتی‌متر منتقل گردید. سپس این ظروف در داخل یخچال با دمای ۲-۳ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در این تیمار اکسیژنی به ظروف اضافه نشد.

آزمایش دوم: در آزمایش دوم به‌منظور سنجش اثر اکسیژن و آنتی‌بیوتیک بر نگهداری تخمک، تخمک‌ها به نسبت ۱:۲ (تخمک: مایع سلومیک) با هم مخلوط گردیده و به ۴ قسمت مساوی تقسیم شدند. سپس ۴ غلظت آنتی‌بیوتیک شامل غلظت صفر (بدون آنتی‌بیوتیک)، غلظت ۱ (IU streptomycin + ۲۵۰ penicillin) و غلظت ۲ (IU streptomycin + ۵۰۰ penicillin) و غلظت ۳ (streptomycin ۷۵۰ + ۷۵۰ penicillin) به ازای هر میلی‌لیتر مایع سلومیک به آنها اضافه گردید. سپس مخلوط تخمک و مایع سلومیک به کیسه‌های پلاستیکی zip kip به ابعاد 18×31 سانتی‌متر ریخته شد و با اکسیژن خالص پر گردید و در آنها بسته شد و به یخچال با دمای ۲-۳ درجه منتقل گردید. روزانه یکبار در پلاستیک‌ها باز شده و دوباره اکسیژن جدید به آنها تزریق می‌شد.

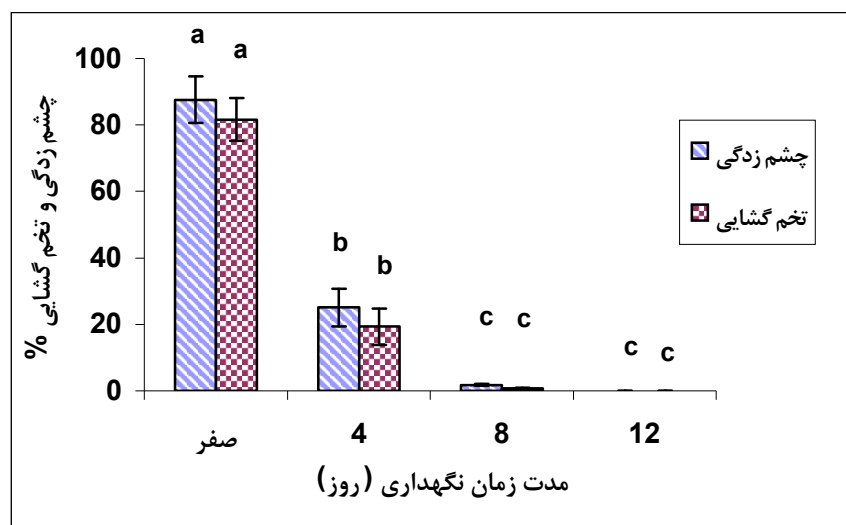
آزمایشات میکروبیولوژی: همزمان با روزهای انجام لقاح از مایع سلومیک نمونه برداری (۱ میلی‌لیتر از هر ظرف) و در داخل ویال‌های ۱/۵ سی‌سی جهت کشت باکتریایی

نتایج

آزمایش اول: در نتایج این آزمایش مشاهده شد که با گذشت زمان درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی کاهش می‌یابد و از ۸۷/۵۸ درصد چشم‌زدگی و ۸۱،۶۴ درصد تخم‌گشایی در روز صفر به حدود صفر درصد در روزهای ۸ و ۱۲ نگهداری می‌رسد. با توجه به کاهش چشم‌زدگی و تخم‌گشایی با افزایش زمان نگهداری، تفاوت‌های موجود بین روزهای صفر و ۴ با یکدیگر معنی‌دار بود ($P < 0/05$) و با افزایش زمان نگهداری تا روزهای ۸ و ۱۲، چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به‌طور معنی‌داری نسبت به روزهای صفر و ۴ کاهش یافت ($P < 0/05$) (شکل ۱).

شدند. سپس با تقسیم تعداد تخم‌های چشم‌زده به کل تخمک‌های استفاده شده برای فرآیند لقاح و ضرب حاصل در ۱۰۰، درصد چشم‌زدگی محاسبه گردید. پس از تخم‌گشایی نیز برای محاسبه درصد تخم‌گشایی، تعداد لاروهای هچ شده به کل میزان تخمک‌های استفاده شده در فرآیند لقاح تقسیم و سپس عدد حاصل در ۱۰۰ ضرب شد (۱۵).

روش آماری: داده‌های درصدی به داده‌های نسبی ($0 \leq P \leq 1$) تبدیل شدند. سپس برای نرمال‌سازی داده‌ها از فرمول $\text{ArcSin}\sqrt{P}$ استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس استفاده گردید. برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین تیمارها از آزمون چند دامنه توکی و T-test استفاده شد. سطح معنی‌داری در آزمون‌ها، بالا ۵ درصد تعیین شده بود (۲۰).

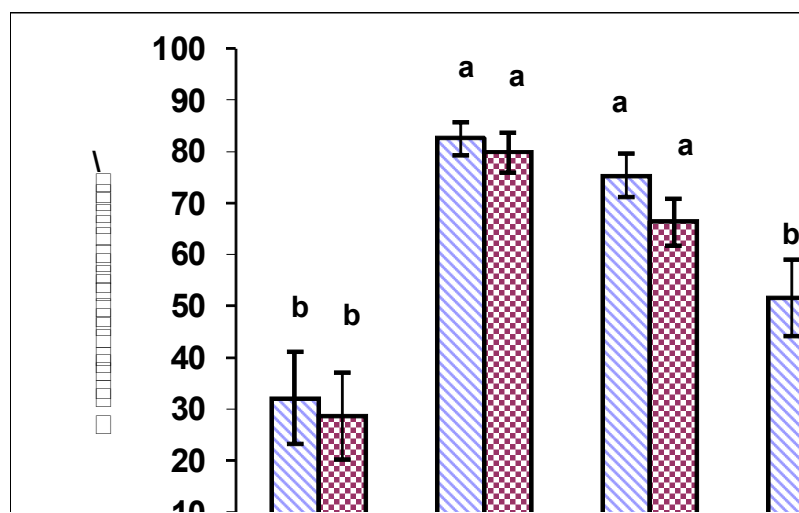


شکل ۱- اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش اول

ولی تفاوت معنی‌داری در درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی بین دو غلظت آنتی‌بیوتیک (غلظت‌های ۱ و ۲) مشاهده نشد ($P > 0/05$) و در بین غلظت‌های ۱ و ۳ تفاوت بیشتری قابل مشاهده بوده و در کل بین غلظت‌های ۱ و ۲ با غلظت صفر و ۳ تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P < 0/05$) (شکل ۲).

آزمایش دوم

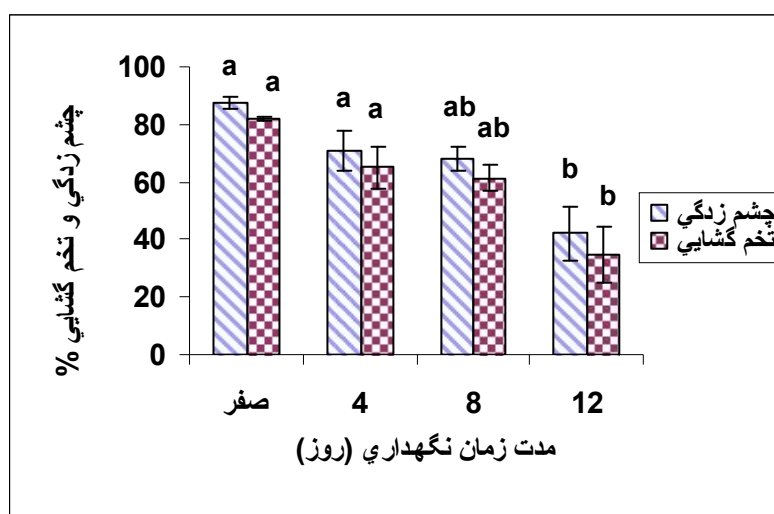
اثر آنتی‌بیوتیک بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: در این آزمایش ۴ غلظت آنتی‌بیوتیک به محیط نگهدارنده تخمک اضافه شد. نتایج حاصل نشان داد که درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در تیمارهایی که حاوی آنتی‌بیوتیک بود بالاتر از تیمار بدون آنتی‌بیوتیک (غلظت صفر) بود و تفاوت آنها کاملاً معنی‌دار بود ($P < 0/05$).



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف آنتی بیوتیک بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش دوم

نگهداری (۴، ۸ و ۱۲) با روز صفر مشاهده شد ($P < 0/05$). درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی دو روز ۴ و ۸ تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، ولی با افزایش زمان نگهداری تا ۱۲ روز کاهش معنی‌داری در آنها دیده شد.

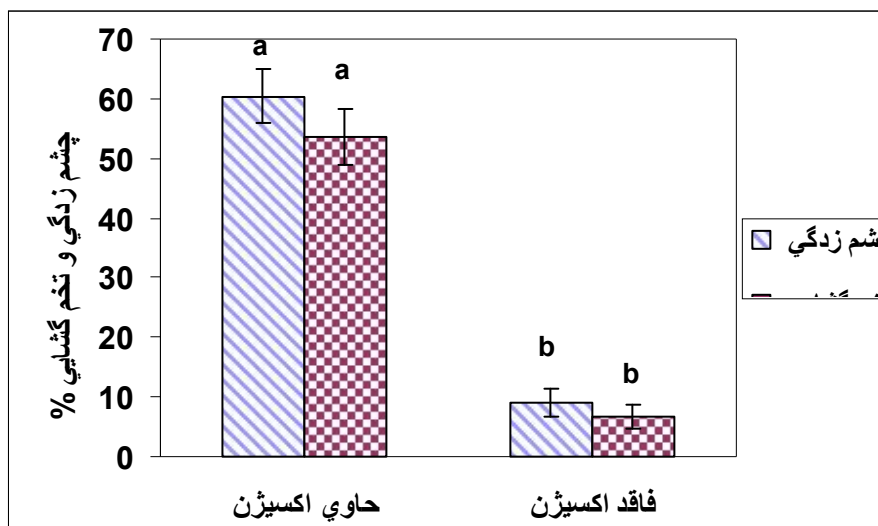
اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: همان‌طوری که در شکل ۳ نشان داده شده است با گذشت زمان، درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی کاهش پیدا می‌کند و روند نزولی را تا روز ۱۲ نشان می‌دهد. همچنین تفاوت کاملاً معنی‌داری بین سه روز



شکل ۳- اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش دوم

۵۳/۴۴ درصد در تیمارهای حاوی اکسیژن به شکل معنی‌داری ($P < 0/05$) بالاتر از تیمارهای فاقد اکسیژن با ۷/۱۱ و ۴/۹۰ درصد می‌باشد (شکل ۴).

اثر تزریق اکسیژن بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: تزریق اکسیژن در داخل محیط نگهدارنده تخمک، قدرت لقاح پذیری تخمک را افزایش داده است، به‌طوری که درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به‌ترتیب با ۶۰/۴۴ و



شکل ۴- اثر تزریق اکسیژن بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده

چشم زدگی و تخم گشایی تقریباً تفاوت قابل مشاهده بود. در روز ۸ نگهداری نیز نتایج تقریباً مشابه روز ۴ بود، ولی در روز ۱۲ نگهداری، درصد چشم زدگی و تخم گشایی تخمک های نگهداری شده با غلظت صفر آنتی بیوتیک، کاهش خیلی زیادی پیدا کرده و به ترتیب ۱/۰۹ چشم زدگی و ۰/۸۳ تخم گشایی را نشان داد. با وجود این، در دو غلظت ۱ و ۲ هنوز تخمک ها کیفیت مناسبی داشته و به ترتیب با ۷۷/۶۱ و ۶۲/۵۹ درصد چشم زدگی، تفاوت معنی داری با گروه شاهد نداشتند ($P > 0/05$)، ولی غلظت ۳ تفاوت معنی داری با گروه شاهد داشت ($P < 0/05$).

بحث و نتیجه گیری

اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک: معمولاً افت کیفیت تخمک ها در داخل بدن ماهی با گذشت زمان و در نتیجه پیشرفت فرآیند فرآیند فوق رسیدگی اتفاق خواهد افتاد. در نگهداری تخمک خارج بدن ماهی با افزایش زمان نگهداری، علائم و تغییراتی در تخمک پدید می آید که مشابه علائم ایجاد شده در فرآیند فوق رسیدگی می باشد (۱۲).

نتایج آزمایشات میکروبیولوژی: نتایج حاصل از آزمایشات میکروبیولوژی نیز نشان داد که در روز صفر هیچ گونه باکتری در مایع سلومیک نبوده است. با افزایش مدت زمان نگهداری، باکتری فقط در تیمارهایی که بدون آنتی بیوتیک نگهداری شده بودند، مشاهده شد و در روز ۱۲ به حداکثر مقدار خود رسید، ولی سه غلظت دیگر آنتی بیوتیک از رشد باکتری جلوگیری کرده و تفاوتی با یکدیگر نداشتند.

اثر متقابل آنتی بیوتیک و مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: بالاترین چشم زدگی و تخم گشایی در روز صفر مشاهده شد، ولی با گذشت زمان در هر چهار غلظت آنتی بیوتیک کاهش قدرت لقاح دیده شد (جدول ۱). در روز ۴ نگهداری، تخمک های نگهداری شده با غلظت صفر آنتی بیوتیک، افت کاملاً محسوسی را در چشم زدگی و تخم گشایی نسبت به گروه کنترل نشان دادند و تفاوت آنها معنی دار بود ($P < 0/05$). بر خلاف غلظت صفر، دو غلظت ۱ و ۲ آنتی بیوتیک تفاوت معنی داری با گروه شاهد و نیز با یکدیگر نداشتند ($P > 0/05$) و در غلظت ۳ آنتی بیوتیک، در درصد

جدول ۱- اثر متقابل آنتی بیوتیک و مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش دوم

مدت زمان نگهداری (روز)	غلظت آنتی بیوتیک	چشم زدگی %	تخم گشایی %
صفر (کنترل)	-	۸۷/۵۸ ± ۲/۱۹ ^a	۸۱/۶۴ ± ۰/۶۷ ^a
۴	غلظت صفر	۳۸/۴۱ ± ۱۲/۲۲ ^{bcd}	۳۵/۹ ± ۱۳/۵۰ ^{cde}
	غلظت ۱	۸۹/۷ ± ۲/۸۴ ^a	۸۸/۶۸ ± ۳/۵ ^a
	غلظت ۲	۸۴/۸۷ ± ۳/۸ ^a	۷۶/۷۲ ± ۵/۰۳ ^{ab}
	غلظت ۳	۷۰/۶۶ ± ۱۱/۳۱ ^{ab}	۵۸/۷۴ ± ۱۴/۱ ^{abcd}
۸	غلظت صفر	۵۶/۹۳ ± ۱/۸۹ ^{abc}	۴۹/۶۴ ± ۵/۷۲ ^{bcd}
	غلظت ۱	۸۰/۲۶ ± ۵/۴۹ ^a	۷۵/۹۴ ± ۷/۶۲ ^{ab}
	غلظت ۲	۷۸/۶۰ ± ۱/۷ ^a	۶۹/۱۷ ± ۱/۱۶ ^{abc}
	غلظت ۳	۶۳/۵۶ ± ۶/۴۱ ^{abc}	۵۰/۷۱ ± ۷/۵۱ ^{bcd}
۱۲	غلظت صفر	۱/۰۹ ± ۰/۵۴ ^f	۰/۸۳ ± ۰/۴۹ ^g
	غلظت ۱	۷۷/۶۱ ± ۷/۲۱ ^a	۷۵/۰۹ ± ۷/۳۶ ^{ab}
	غلظت ۲	۶۲/۵۹ ± ۸/۳۴ ^{abc}	۵۳/۲۷ ± ۹/۲۵ ^{abcd}
	غلظت ۳	۲۷/۹۴ ± ۴/۶۵ ^{cde}	۹/۴۱ ± ۳/۶۹ ^{efg}

در داخل ستون‌ها مقادیری که حروف مشابه دارند در سطح ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

نکته دیگری که باید به آن اشاره کرد این که حجم تخمک نگهداشته شده در دو مطالعه اخیر کم بوده (حدود ۱۰ میلی‌لیتر) در حالی که در این مطالعه حجم تخمک بیشتر بوده (۱۲۰ میلی‌لیتر) و نتایج بهتری نسبت به آنها در روز ۱۲ بدست آمده است. یعنی در روز ۱۲ با توجه به غلظت دو، آنتی‌بیوتیک همراه با اکسیژن درصد چشم زدگی و تخم‌گشایی بالا را ارتقاء می‌دهد.

اثر آنتی‌بیوتیک بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: گزارش شده است عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل محدودکننده نگهداری تخمک آزاد ماهیان در مایع سلومیک می‌باشد (۹). بر اساس نتایج حاصل از کشت باکتری در تحقیق حاضر، در نمونه‌های بدون آنتی‌بیوتیک باکتری (کوکسی‌های گرم مثبت) رشد کرده بود ولی در نمونه‌های حاوی آنتی‌بیوتیک در همه غلظت‌ها هیچ‌گونه باکتری مشاهده نشد. همچنین درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در تیمارهای حاوی آنتی‌بیوتیک به مراتب بالاتر بود.

به نظر می‌رسد این باکتری‌ها علاوه بر مصرف اکسیژن محیط برای فرآیندهای متابولیسمی خود و رقابت با تخمک، می‌توانند آنزیم‌های خارج سلولی از خود ترشح

بنابراین با افزایش زمان نگهداری کیفیت تخمک‌ها افت خواهد کرد که این افت کیفیت در تخمک‌ها را می‌توان با درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی مورد ارزیابی قرار داد. در مطالعات گذشته مایع سلومیک و محلول‌های مصنوعی مانند محلول کورتلند که دارای ترکیب یونی مشابه مایع سلومیک آزاد ماهیان است، به‌عنوان یک ماده نگهدارنده برای نگهداری تخمک آزاد ماهیان استفاده شده است (۷ و ۱۰). زمان نگهداری در محیط‌های مصنوعی معمولاً بسیار کوتاه بوده است. برای مثال تخمک قزل‌آلا به‌مدت ۱۰-۵ دقیقه (۶)، ۲ روز (۷)، ۳ روز (۴)، ۴ روز (۲) و تخمک ماهی آزاد دریای خزر به‌مدت ۵ روز (۱۰) نگهداری شده است. ولی تخمک لقاح نیافته قزل‌آلا به‌طور موفقیت‌آمیزی در داخل مایع سلومیک برای زمان‌های طولانی نگهداری شده است. نیک سیرت و همکاران تا ۹ روز و Niksirat و همکاران و Komrakova و همکاران تا ۱۵ روز تخمک قزل‌آلا را با موفقیت نگهداشتند. در مطالعه حاضر نیز در هر دو آزمایش مشابه مطالعات قبلی، با گذشت زمان افت کیفیت دیده شد و درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد ولی این افت در آزمایش اول نسبت به آزمایش دوم شدیدتر بود.

کنند که به دیواره سلول‌های جنسی در حال نگهداری آسیب وارد نموده و باعث کاهش لقاح‌پذیری آنها شود (۸).

در مطالعه‌ای، تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در داخل مایع سلومیک نگهداری شد که بعد از ۹ روز تخمک‌ها خاصیت لقاح خود را در محیط فیلتر نشده بر اثر طغیان عوامل عفونی از دست دادند، ولی در محیط فیلتر شده هنوز ۶۰-۵۰ درصد از تخمک‌ها دارای خاصیت لقاح بودند (۴).

همچنین اسپرم گربه‌ماهی کانالی در محیط استریل کیفیت خود را به مدت ده روز حفظ کرده ولی در فضای غیراستریل کیفیت اسپرم پس از سه روز کاملاً از بین رفته بود (۸)، لذا افزودن آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های مناسب به مایع سلومیک جهت جلوگیری از رشد باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است. در این آزمایش ۲ غلظت آنتی‌بیوتیک (کم و زیاد) به محیط نگهدارنده تخمک اضافه شده بود که هر دو غلظت از رشد باکتری جلوگیری کرد و توانایی لقاح‌پذیری تخمک‌ها تفاوت معنی‌داری با همدیگر نداشتند بنابراین افزودن آنتی‌بیوتیک ضروری بوده ولی منطقی است که از غلظت کمتر (غلظت ۱) استفاده شود.

همچنین گزارش شده است اضافه کردن آنتی بیوتیک به میزان ۱۰۰ IU پنی‌سیلین و ۰/۱ میلی‌گرم استرپتومایسین به ازاء هر میلی‌لیتر تخمک در طی نگهداری کوتاه مدت لقاح‌پذیری را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است (۱) که نتایج تحقیق حاضر نیز مؤید نتایج مطالعات قبلی می‌باشد.

اثر اکسیژن بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده:

تخمک‌ها برای انجام فعالیت‌های متابولیسمی خود احتیاج به اکسیژن دارند. این اکسیژن در داخل بدن ماهی از طریق مویرگ‌ها و انتشار اکسیژن به داخل مایع سلومیک تأمین می‌شود (۵) ولی در خارج از بدن ماهی این نیاز تنفسی باید تأمین شود. مطالعات گذشته نشان داده است که نگهداری تخمک در ظروف دربسته به خصوص در موقع نقل و انتقال باعث خفگی تخمک‌ها می‌شود. برای مثال

تخمک‌های لقاح نیافته آزاد ماهی Sockeye که در ظروف در بسته و در دمای ۹-۸ درجه قرار گرفتند، به علت بسته بودن در ظرف به سرعت قابلیت زنده مانی خود را از دست می‌دهند، و پس از ۲/۵ روز، ۵۰ درصد و در روز هفتم تنها یک درصد از تخم‌ها به چشم‌زدگی می‌رسند (۱۹). به‌منظور جلوگیری از این امر Komrakova و Holtz در سال ۲۰۰۳ از غشاهای نیمه تراوا به‌عنوان درپوش ظروف نگهداری تخمک استفاده کرده و به محیط نگهداری، اکسیژن مرطوب تزریق کردند و تخمک قزل‌آلای را به مدت ۱۵ روز با ۶۰ درصد چشم‌زدگی نگهداشتند. همچنین Billard در سال ۱۹۸۱ اسپرم قزل‌آلای را در زیر اکسیژن اتمسفر نگهداشته و در روز پنجم نتایج مشابه گروه شاهد به‌دست آورد. در تحقیق حاضر نیز تیمارهایی که اکسیژن دریافت کردند، درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به مراتب بالاتری نسبت به تیمار بدون اکسیژن داشتند. به نظر می‌رسد تزریق روزانه اکسیژن نیاز اکسیژنی تخمک‌ها را در خارج از بدن و در محیط بسته تأمین کرده و از خفگی آنها جلوگیری می‌کند. بنابراین نتایج این تحقیق نیز مؤید نتایج محققین قبلی می‌باشد.

به‌طور کلی مایع سلومیک محیط مناسبی برای نگهداری تخمک ماهی آزاد بوده که می‌توان با افزودن آنتی بیوتیک حداقل با غلظت ۱ (۲۵۰ IU penicillin + ۲۵۰ µg streptomycin) و تزریق اکسیژن به‌صورت روزانه، تخمک این ماهی را به مدت حداقل ۱۲ روز نگهداشته و نتایج مناسبی به‌دست آورد. همچنین این روش ساده بوده و در شرایط کارگاهی و بدون نیاز به تکنولوژی خاص قابل اجرا می‌باشد.

سپاسگزاری

از همکاری و مساعدت کارکنان مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت که در اجرای این تحقیق را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- ۱- نیکسیرت، ح.، سروی مغانلو، ک.، مجازی امیری، ب.، پاشازانوسی، ع. و میارنعمی، م.، ۱۳۸۵. نگهداری تخمک لقاح نیافته قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در محیط‌های مایع تخمدانی. مجله منابع طبیعی ایران، جلد ۵۹، شماره ۱، صفحات ۱۸۹ تا ۱۹۷.
2. Azuma, T., Ohta, H., Oda, S., Muto, K., Yada, T. and Unuma, T. 2003. Changes in Fertility of rainbow trout eggs retained in coelom, Fisheries Science. 69, 131-136.
3. Billard, R., 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 23, (1-4), 287-293.
4. Bonnet, E., Jalabert, B. and Bobe, J. 2003. A 3-day in vitro storage of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) unfertilized eggs in coelomic fluid at 12C, doesn't affect developmental success. *Cybium*. 27 (1), 47-51.
5. Craik, J.C.A., 1985. Egg quality and egg pigment content in salmonid fishes. Aquaculture. 47, 61-88.
6. Erdhal, A.W., Cloud, J.G., and Graham, E.F. 1987. Fertility of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Gametes: gametes viability in artificial media. Aquaculture 60, 323-332.
7. Goetz, F.W. and Coffman, M.A. 2000. Storage of unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in artificial media. Aquaculture 184, 267-276.
8. Jenkins, J.A. and Tiersch, T.R. 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. J. World Aquacult. Soc. 28, 282-288.
9. Jensen, J.O.T. and Alderdice, D.F. 1984. Effect of temperature on short-term storage of eggs and sperm of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Aquaculture 37, 251-265.
10. Niksirat, H., Sarvi, K., Majazi Amiri, B.M., Karami, M. and Hatef, A. 2007a. *In vitro* storage of unfertilized ova of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in artificial media. Animal Reproduction Science 100, 356-363.
11. Niksirat, H., Sarvi, K., Majazi, Amiri, B.M. and Hatef, A. 2007b. Effects of storage duration and storage media on initial and post-eyeing mortality of stored ova of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 262(2-4), 528-531.
12. Kjorsvik, E., Mangor Jensen, A. and Holmefjord, T. 1990. Egg quality in fishes. Advances in Marine Biology 26, 71-113.
13. Komrakova, M.Y. and Holtz, W., 2003. Suitability of a semi permeable membrane to cap storage vials for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs. Proceeding of 26th Annual larval Fish Conference. pp. 445 - 448.
14. Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A., 1995. A uniform method for cryopreservation of semen of the salmonid fishes *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Salmo trutta fario* L., *Salmo trutta f. lacustris* L. *Coregonus* sp. Aquacult. Res. 26, 801-807.
15. Sarvi K., Niksirat, H., Amiri, B.M., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R. and Bakhtiyari, M. 2006. Cryopreservation of semen from the endangered caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture 256 (1-4), 564-569.
16. Springate, J.R.C., N.R., Elliott, J.A.K. and Hudson, D.L. 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eyeing, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 43, 313-322.
17. Stoss, J., 1983. Fish gametes preservation and spermatozoon physiology. In: Hoar WS, Randall DJ, Donaldson EM (Eds). Fish Physiology, Vol. IX b. Academic Press, New York 305-350.

18. Stoss, J., Donaldson, E.M. 1983. Studies on cryopreservation of eggs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture 31, 51-65.
19. Withler, F.C., and Humphreys, 1967. Duration of fertility of ova and sperm of Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and pink (*O. gorbuscha*) salmon J. Fish Res. Board Can. 24 (7), 1573-1578.
20. Zar, J.H. 1999. Biostatistical Analysis. Fourth Edition. Northern Illinois University 732 p.

The effects of antibiotic and oxygen to the celomic fluid on fertility and hatching of unfertilized ova of Caspian salmon (*Salmo trutta caspius*)

*M. Akbarabadi¹, Sh. Nezami², H. Khara² and F. Rahmati¹

¹MS Student, Dept. of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

²Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Abstract

The effects of antibiotics and oxygen on the fertilizing capacity of unfertilized ova of (*Salmo trutta caspius*) during storage were studied in two separate experiments. In the first experiment, egg batches were stored without oxygen. In the second experiment, egg batches were stored in the presence of two concentrations of antibiotics (1: 250IU penicillin +250µg streptomycin and 2: 500 IU penicillin + 500µg streptomycin and 3: 750 IU penicillin +750µg streptomycin per ml of celomic fluid) and then were transferred to plastic bags with sufficient oxygen content and kept at (2-3C) using domestic refrigerator. The fertilizing assays were carried out at 0 (control), 4, 8, and 12 days post storage. The results of the present study revealed that the fertilizing capacity of stored eggs decreased with the passage of time. In the first experiment there was no significant difference between eggs fertilized after 4 days of storage compared to control (day 0), but after 8 days of storage a significant difference was observed. In the second experiment, the fertilizing capacity of egg batches stored for 4 days without antibiotics showed significant reduction compared to control. The highest fertilizing capacity of hatching was observed in day 0. Unlike concentration 0, other two concentrations (1 and 2) had no significant difference with control and each other. There was little difference in concentration 3 in fertilizing and hatching percentage. The result in day 8 of maintenance was similar to day 4. Fertilizing and hatching percentage in day 12 of maintenance with antibiotic 0 concentrations was very low. In spite of this, there was no significant difference in fertilizing percentage between two concentrations of 1 and 2 (77.61, 62.59) respectively with control and observed significant difference in concentration 3 with control. Also, injection of oxygen showed significant positive effects on fertility of eggs (60.44% eyeing rate) compared to egg batches stored without oxygen (7.11%).

Keywords: Oxygen; Antibiotic; Unfertilized ova; *Salmo trutta caspius*; Short-term storage

* Corresponding author; maziar.akbarabadi@yahoo.com