تاثیر هیدروژن پراکسید برپایه کلوئید نقره بر کپسول زدایی و تخم گشایی سیست (*Artemia urmiana*)

رضوان موسوی ندوشن و سحر فرحناک*

گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۳

چکیده

مطالعه حاضر با هدف تعیین مناسب‌ترین دوز هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره برای انجام فرآیند کپسول زدایی کیست آرتمیای دریاچه اورمیه (*Artemia urmiana*) برای دست‌یابی به بیشرین درصد تخم گشایی انجام شد. ۵ گروه انتخاب شد و به هر کدام ۱ گرم کیست اضافه شده و در معرض دوزهای ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲ و ۵ درصد از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه، ۱، ۲ و ۵ دقیقه و ۵ میلی لیتر مایع سفیدکننده خانگی و آب خالص (گروه شاهد) به منظور مقایسه با این محلول برای فرآیند کپسول زدایی قرار داده شدند. هر تیمار سه تکرار داشت. پس از کپسول زدایی، سیست ها با تراکم ۱ گرم در هر لیتر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۵ppt به مدت ۴۸ ساعت تحت شرایط تخم گشایی قرار گرفتند. پس از گذشت ۴۸ ساعت از انکوباسیون ۹۹ درصد تخم گشایی در دوز ۰/۵ درصد از محلول هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره، در کیست های کپسول زدایی شده با استفاده از مایع سفیدکننده خانگی ۹۷ درصد تخم گشایی و در کیست های شاهد ۹۴ درصد تخم گشایی مشاهده شد. بر اساس آزمون آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف آماری معنی داری بین تیمارها بدست آمد. بنابراین نتایج این مطالعه پیشنهاد می‌نماید که با قرار دادن کیست ها در دوز ۰/۵ درصد از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره، به مدت ۳۰ ثانیه می‌توان به بهترین میزان تخم گشایی کیست آرتمیا اورمیانا دست‌یافت.

واژگان کلیدی: سیست آرتمیا، کپسول زدایی ، هیدروژن پراکسید ، کلوئید نقره،تخم گشایی

***نگارنده پاسخگو: farahnaksahar22@yahoo.com**

مقدمه

آرتمیا یا میگوی آب شور از جمله آبزیانی است که از دیر زمان به دلیل دارا بودن ارزش غذایی بالا، کاربرد همه جانبه ای در صنعت آبزی پروری دارد. یکی از مهم‌ترین کاربردهای آرتمیا استفاده از آن به عنوان غذای زنده آبزیان است که در مرحله نوزادی بسیاری از ماهیان، میگوها و خرچنگ‌های آب‌شور و شیرین ضروری است (Bengtson *et al.*, 1991; Ahmadi *et al.*, 1990).

استفاده از روش‌های مختلف همانند کپسول زدایی پوسته کیست آرتمیا، باعث ایجاد تفاوت در ارزش‌های غذایی آن‌ها می‌گردد. فرآیند کپسول زدایی کیست های آرتمیا یکی از مهم‌ترین اقدامات روند تخم گشایی و استفاده از آرتمیا در امر آبزی‌پروری محسوب می‌شود (Tunsutapanich, 1979). در ضمن ناپلیوس هایی که از کیست های پوسته زدایی شده حاصل می‌گردند، محتوای انرژی و وزن فردی بالاتری نسبت به ناپلی اینستار یک معمولی دارند و می‌توانند به‌عنوان یک منبع پرانرژی برای ماهی و میگو در نظر گرفته شوند. از دیگر مزایای کپسول زدایی کیست آرتمیا، ضدعفونی شدن آن‌ها و احتیاج کمتر به نور در زمان تخم گشایی می‌باشد(Trecee, 2000).

Saygi در سال ۲۰۰۳ با انجام فرایند کپسول زدایی با استفاده از محلول هیدروژن پراکسید به دنبال افزایش درصد تخم گشایی در کیست های آرتمیای بکرزا در ازمیر بوده است. هم راستا با این موضوع Van Stappen و همکاران در سال۱۹۹۸ به بررسی اثرات آزمایش هیدروژن پراکسید در کیست های آرتمیا در مناطق جغرافیایی مختلف پرداخته اند. همچنین مطالعاتی نیز در زمینه ی بهبود مشخصات تخم گشایی کیست های آرتمیای مناطق مختلف در نتیجه فرآیند کپسول زدایی انجام شده است (Van Stappen *et al.*, 1998). هدف از انجام تحقیق حاضر، کپسول زدایی کیست آرتمیا به وسیله هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره و احتمال افزایش میزان تخمه گشایی در مقایسه با سایر ترکیبات رایج در فرآیند کپسول زدایی است.

مواد و روش ها

تحقیق حاضر از اوایل فصل زمستان سال ۱۳۹۳ تا اواخر فصل بهار ۱۳۹۴ شمسی انجام شده است. کیست *(Artemia urmiana)* به‌صورت بسته‌بندی ۱۰۰ گرمی از مرکز تحقیقات آرتمیای اورمیه در استان آذربایجان غربی با مشخصات تعداد کیست خشک در هر گرم ۱۸۰ تا ۲۳۰ هزار عدد، میانگین قطر هر کیست ۲۵۰ میکرومتر و تخم‌گشایی ۹۰ درصد خریداری شد (مرکز تحقیقات اورمیه آذربایجان غربی،۱۳۹۳). از ۲۱ عدد بطری آب معدنی ۱/۵ لیتری به عنوان زوک استفاده گردید، به این ترتیب که بطری‌های آب معدنی از ته برش داده شد و از طریق درب سوراخ شده، شلنگ هوا وارد بطری‌ها گردید. .برای محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره پنج تیمار از دوزهای ۰/۵ ، ۰/۷۵ ، ۱ ، ۲ و ۵ درصد، برای مایع سفید کننده خانگی غلظت ۵ میلی لیتر و آب به عنوان گروه شاهد انتخاب گردید. برای هر آزمایش ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در هر انکوباتور(، مقدار ۱ گرم کیست به ازای هر لیتر آب اضافه شد.(Trecee, 2000). برای تنظیم غلظت اکسیژن مناسب و ایجاد جریان آب درون بطری‌ها از سه عدد پمپ هوا HAILEA استفاده شد. از سنگ نمک برای شوری آب در زوک های ۱/۵ لیتری که با حجم ۱ لیتر از آب پر شده بودند استفاده شد. میزان شوری ۳۵ppt برای تخم‌گشایی ثابت نگه داشته شد Hedayati & (Bagheri, 2010) و تنظیم pH با اضافه کردن سود سوزآور (NaOH) 40 درصد انجام شد. برای تنظیم دما، زوک ها را در آکواریوم به حجم ۲۵ لیتر قرار داده و پس از آبگیری آکواریوم از یک بخاری ترموستات دار برای تنظیم دما در ۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پس از تنظیم دما کلیه زوک‌ها با استفاده از لامپ مهتابی ۴۰ وات، تحت نور ۲۰۰۰ لوکس قرار گرفتند (Sorgeloos *et al.*,1977).

تهیه محلول کپسول زدایی

مایع هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره با غلظت های ۰/۵ ، ۰/۷۵ ، ۱ ، ۲ و ۵ درصد آماده شد و همینطور از ۵ میلی لیتر مایع سفیدکننده خانگی، ۰/۱۵ گرم NaOH، ۱۰ میلی لیتر آب، ۰/۱ درصد سدیم تیوسولفات استفاده گردید. در تمام مراحل آزمایش آب به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد.

در ابتدا کیست ها به مدت ۱ ساعت در ظروف شیشه ای به حجم ۱/۵ لیتر در دمای اتاق با آب لوله کشی برای انجام عمل هیدراته شدن قرار داده شدند. در طول این مدت، هوادهی به صورت ملایم صورت گرفت تا از ته‌نشین شدن کیست ها و چسبیدن آن‌ها جلوگیری به عمل آید. پس از انجام مرحله هیدراته شدن، کیست ها برای عمل کپسول زدایی بر اساس Vanhaecke و Sorgeloos (۱۹۸۳) در محلول کپسول زدا از مایع هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره با غلظت های اشاره شده به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۵ ثانیه، ۱، ۲ و ۵ دقیقه قرار داده شدند (جدول ۱). سپس برای هر غلظت یک گرم کیست هیدراته شده به یک لیتر آب در زوک به حجم ۱/۵ لیتر اضافه شد.(Trecee, 2000). در طول فرآیند کپسول زدایی با لوله‌ای شیشه‌ای کیست ها به‌طور مداوم هم زده می‌شد، با توجه به گرمازا بودن واکنش برای جلوگیری از افزایش دما چند قطعه یخ به ظرف حاوی محلول کپسول زدا و کیست ها اضافه شد. با تغییر رنگ کیست ها از قهوه‌ای به خاکستری فرآیند کپسول زدایی متوقف شده و کیست ها از الک با چشمه ۱۲۵ میکرون عبور داده شدند، سپس با آب شیر آبکشی شده و به زوک ها انتقال یافتند. در تمام مراحل آزمایش گروه شاهد در ۳ تکرار برای مقایسه در نظر گرفته شد (Trecee, 2000).

جدول۱ - غلظت های مختلف از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره جهت روش اول

تمیار	محلول کپسول زدای پراکسید هیدروزن بر پایه کلوئید نقره	مدت قرار گیری در محلول کپسول زدا
T1	آب (شاهد)	-
T2	**۰/۵٪** از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره	۳۰ ثانیه
T3	۰/۷۵ ٪ از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره	۴۵ ثانیه
T4	۱٪ از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره	۱ دقیقه
T5	۲٪ از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره	۲ دقیقه
T6	۵٪ از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره	۵ دقیقه

برای کپسول زدایی کیست های هیدراته شده در روش دوم، در ظرف شیشه‌ای حاوی ۵ میلی لیتر مایع سفیدکننده خانگی، ۰/۱۵ گرم سود (NaOH) در ۱۰ میلی لیتر آب به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. با توجه به گرمازا بودن واکنش برای جلوگیری از افزایش دما چند قطعه یخ به ظرف حاوی محلول کپسول زدا و کیست ها اضافه گردید. با تغییر رنگ سیست ها از قهوه‌ای به نارنجی فرآیند کپسول زدایی متوقف شد. سپس کیست ها در سه مرحله آبکشی شدند، به‌طوری‌که ابتدا از الک با چشمه ۱۲۵ میکرون عبور داده شده و سپس با آب شیر شسته شدند، آنگاه به‌منظور غیرفعال کردن کلر با استفاده از تیوسولفات ۰/۱ درصد شسته شده و در نهایت دوباره

آبکشی شدند. آبکشی به‌گونه‌ای صورت گرفت که دیگر بوی کلر استشمام نمی شد (Trecee,2000). پس از انجام مراحل اشاره شده، کیست های پوسته زدایی شده به زوک ها انتقال داده شدند. در تمام مراحل آزمایش آب به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد و هر گروه دارای سه تکرار بود.

شمارش و نمونه گیری

پس از خاموش کردن پمپ هوا با استفاده از منبع نور با توجه به نور گرا بودن ناپلیوس ها از هر انکوباتور ۳ نمونه

$$\%H= (N \times 100) (N+E+U)^{-1}$$

درصد تخم گشایی: (H %)، ناپلیوس ها : (N)،
جنین‌ها : (E) و کیست های مرحله چتری : (U)

تجزیه وتحلیل داده ها

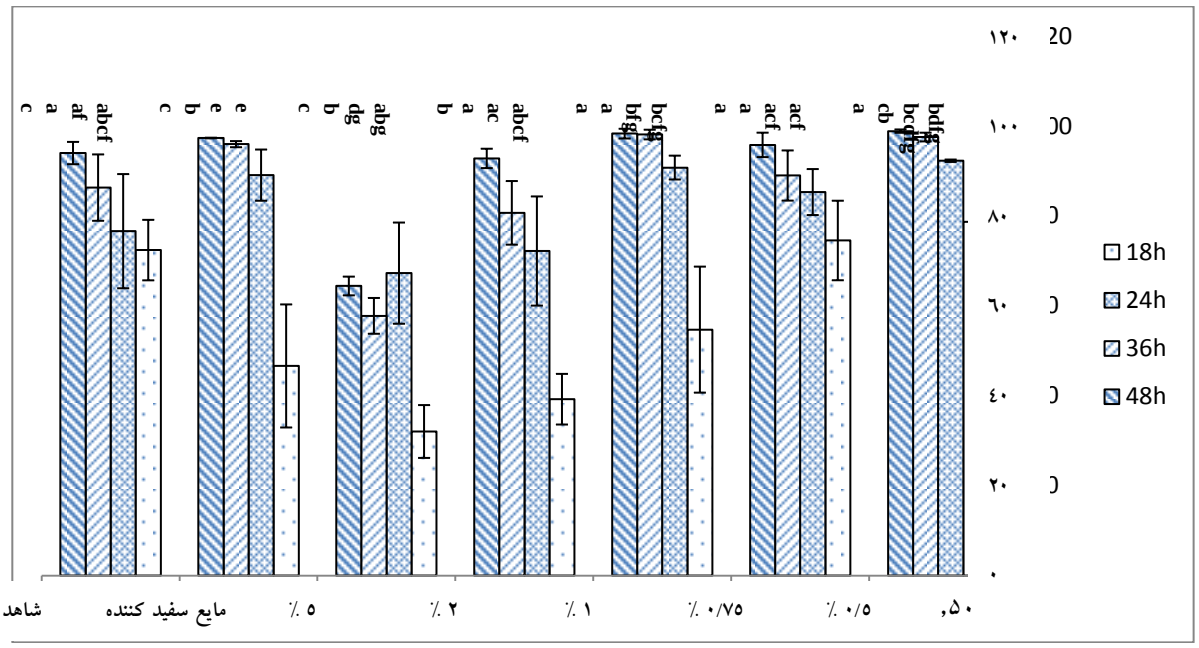
برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ استفاده گردید. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها، اختلاف بین تیمارها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون LSD تعیین گردید.

نتایج

در بررسی انجام‌شده با استفاده از غلظت های متفاوت هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره و در مقایسه با شاهد و مایع سفید کننده خانگی مشخص شد که بیشترین درصد تخم‌گشایی کیست آرتمیا اورمیانا در دوز ۰/۵ درصد از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره به میزان ۹۹ درصد، در پایان زمان انکوباسیون (۴۸ ساعت) بوده است(جدول۲). کمترین درصد تخم‌گشایی به میزان ۶۴ درصد، در زمان ۴۸ ساعت پس از انکوباسیون در غلظت ۵ درصد بدست آمد($P < ۰/۰۵$). درگروه شاهد و محلول سفید کننده خانگی بیشترین درصد تخم گشایی پس از گذشت ۴۸ ساعت و پایان زمان انکوباسیون به ترتیب ۹۷ درصد(در شاهد) و ۹۴ درصد (در تیمار مایع سفید کننده خانگی) بدست آمد (شکل۱). همچنین بر اساس نتایج آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، اختلاف آماری معنی‌داری در بین درصدهای تخم‌گشایی در بیشتر تیمارها مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$).

به میزان ۱ میلی‌لیتر به وسیله پیپت برداشته و به پلت انتقال داده شد. برای تسهیل در امر شمارش ناپلیوس ها از آب گازدار به میزان ۱ میلی‌لیتر به منظور تثبیت نمونه‌ها استفاده شد. سپس تعداد ناپلیوس ها (N)، جنین‌ها (E) و سیست های مرحله چتری (U) به‌طور جداگانه شمارش شدند.

برای تعیین درصد تخم‌گشایی از روش Van Stappen در سال ۱۹۹۶ استفاده شد.



شکل ۱- **مقایسه درصد تخم گشایی کیست (*Artemia urmiana*) در زمان‌های مختلف**

(حروف مشابه نشانه عدم تفاوت تیمارها با یکدیگرند و حروف متفاوت نشانه تفاوت معنی دار آماری می باشد)

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که در تمام طول زمان انکوباسیون در کلیه تیمار ها استفاده دوزهای ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲ و ۵ درصد از هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره و تیمارهای مایع سفیدکننده خانگی و آب خالص روند افزایشی در درصد تخم‌گشایی و فراوانی ناپلیوس ها وجود داشت و بدیهی است که باگذشت زمان انکوباسیون از فراوانی جنین‌ها و کیست های مرحله چتری کاسته و درصد تخم‌گشایی و فراوانی ناپلیوس ها افزایش خواهد یافت. با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده از کمترین دوز مصرفی از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره با غلظت ۰/۵ درصد به مدت ۳۰ ثانیه، بیشترین درصد تخم گشایی را به میزان ۹۹ درصد در پایان زمان انکوباسیون نشان داد. مصرف غلظت ۵ درصد از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره به مدت ۵ دقیقه کمترین درصد تخم گشایی را به میزان ۶۴ درصد در مقایسه با سایر تیمارها درپایان زمان انکوباسیون یا به عبارتی ۴۸ ساعت نشان داده است. همچنین بیشترین درصد تخم گشایی در شاهد و مایع سفید کننده خانگی در پایان زمان انکوباسیون به ترتیب ۶۴ درصد و ۹۷ درصد بوده است.

در مطالعه Falahtkar و همکاران (۲۰۰۹) بهترین درصد تخم‌گشایی با استفاده از محلول ۳۲ درصد سدیم هیپوکلریت ۷۹ درصد در کیست های آرتمیای دریاچه مهارلو به دست آمد. هم راستا با تحقیق حاضر Vanheackeو Sorgeloos (۱۹۹۸) تأکید کردند که درصد تخم‌گشایی در دو غلظت ۳ درصد در ۳ دقیقه و ۵ درصد در ۵ دقیقه، درصد تخم‌گشایی در کیست آرتمیا اورمیانا بین ۱۰ تا ۲۲ درصد در زمان ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون بوده است و آزمایش در محدوده ۵ درصد در ۵ دقیقه از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید اثر مثبت برجسته‌ای در درصد تخم‌گشایی (۸۰٪)کیست های دریاچه ارومیه، قزاقستان، سانفرانسیسکو آمریکا و سیست ونگ تائو ویتنام نشان داده است. در تحقیق حاضر، قرارگیری در غلظت ۵ درصد از هیدروژن پراکسید به‌طورکلی

برای هر یاخته حیوانی مرگبار تشخیص داده شد. این نتایج با روش ۳ درصد در ۱۵ دقیقه از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید Bogavota و Shmakova در سال ۱۹۸۰ مطابقت نشان می دهد. از سوی دیگر نتایج تحقیق Treece در سال ۲۰۰۰ این موضوع را که فرآیند کپسول زدایی باعث افزایش درصد تخم‌گشایی می‌شود را تائید نمود و همچنین در این تحقیق مشخص شد که در طی فرآیند کپسول زدایی، لایه آلوئلی کیست آرتمیا حل می شود و لایه کوتیکولی خارجی وظیفه محافظت از جنین در مقابل نفوذ مولکول‌های بزرگ‌تر از مولکول CO_2 را بر عهده دارد و لایه کوتیکول جنینی در طی انکوباسیون به غشای تخم‌گشایی تبدیل می‌شود. بنابراین می‌توان بیان نمود که علت کاهش تخم‌گشایی در دوز ۵ درصد از بین رفتن لایه محافظ کوتیکول خارجی و کوتیکول جنینی و آسیب جنین می‌باشد. همچنین واکنش‌های شیمیایی موجود هنگامی‌که کیست های آرتمیا در معرض هیدروژن پراکسید باشند احتمالاً چند برابر و پیچیده خواهند شد.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که مصرف محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره در مقایسه با سایر مواد کپسول زدایی مورد استفاده در تحقیقات گذشته در سطح ایران و جهان بالاترین درصد تخم‌گشایی را در کیست آرتمیا اورمیانا به میزان ۹۹ درصد با پایین‌ترین دوز از محلول کپسول زدای هیدروژن پراکسید بر پایه کلوئید نقره(۰/۵ درصد) طی ۳۰ ثانیه را داشته است.

Effect of hydrogen peroxide based on silver colloid on decapsulation of Urmia Lake Artemia cysts (*Artemia urmiana*) to achieve the best hatching rate

Mosavi Nadoushan,R., Farahnak,S.

This study aimed to determine the most appropriate dose of hydrogen peroxide based on silver colloid for the decapsulation of Urmia Lake Artemia cysts (*Artemia urmiana*), to achieve the best hatching rate. The cysts were exposed to doses of 0.5, 0.75, 1, 2 and 5% of hydrogen peroxide based on colloidal silver for 30 seconds, 45 seconds, 1, 2 and 5 minutes and 5 ml bleach and pure water (as control) were used to compare the process of decapsulation with the test solutions. After decapsulation, 1 gram of cysts per liter were hatchedat 30 ° C for 48 hours under conditions of 35 ppt salinity. After 48 hours of incubation, 99% hatching rate at a dose of 0.5 % solution of hydrogen based on colloid silver, 97% in bleach solution and 94 % in the control cysts was observed. According to the results of the statistical analysis, ANOVA, significant difference was found between the results of test treatments. The results of this study suggest that, best performance of hatching rate in *Artemia urmiana* cysts can be achieved, by putting the cysts in a solution with a dose of 0.5% of hydrogen peroxide based on silver colloid.

Keywords:

Artemia cysts,hatching rate, decapsulation,hydrogen peroxide based on silver colloid.

منابع

Ahmadi, M.R., Leibrovitz, H. & Simpson, K.L. 1990. Nutrient composition of the Iranian brine shrimp (*Artemia Urmiana*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 95(2):225-228.

Bengtson, D.A., Leger, P.H. & Sorgeloos, P. 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. Artemia Biology. CRC press Inc. Bocaraton, Florida, U.S.A.

Bogatova, I.B. & Shmakova, Z.I. 1980. Activation of diapausing eggs of *Artemia salina*. *Gidrobiologicheskii Zhurnal*, 16(3):108-110.

Falahtkar, B., Safarpour amlashi, A., Nazari, s., Karimi, N., Fazel, A., Monsef Rad, S.F. & Nagafi, M. 2009. Effect of different cyst densities on the hatching of the partenogenetic *Artemia* cysts from Maharloo Lake. Artemia 2009, International symposium / work shop on the Biology and Distribution of Artemia desember 13-14, Urmiana, Iran.

Hedayati, A. & Bagheri, T. 2010. Effect of some physiochemical parameters on hatching ability in cyst of Artemia Urmiana. *World Journal of Zoology*, 5(4): 295-297.

Saygi, Y. 2003. Effect of hydrogen peroxide, cold storage and decapsulation on the hatching success of *Artemia* cysts. *The Israeli journal of Aquaculture*, 55(2): 107-113.

Sorgeloos, P., Bossuyt, E., Lavina, E., Baeza Mesa, M. & Persoone, G. 1977. Decapsulation of *Artemia* cysts: a simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. *Aquaculture* 12:311–315.

Treece, G.D. 2000. *Artemia* production for marine larval fish culture. SARC Publication No. 702.

Tunsutapanich, A. 1979. Cyst production of *Artemia salina* in salt ponds in Thailand. FAO/UNDP/THA/75/008.

Van Stappen, G. 1996. Use of *Artemia* cysts. In: manual on the production and use of live food for aquaculture, P. Lavanse & P. Sorgeloos (Eds). FAO Fisheries Technical paper. Rome.

Van Stappen, G., Lavens, P. & Sorgeloos, P.1998. Effects of hydrogen peroxide treatment in *Artemia* cysts of different geographical origin. *Archive for Hydrobiology, Special Issues Advanced Limnology*, 52:281-296.

Vanhaecke, P. & Sorgeloos, P. 1983. International study on *Artemia*. XIX. Hatching data for ten commercial sources of brine shrimp cysts and re-evolution of the “hatching efficiency” concept. *Aquaculture*, 30(1/4):43- 52.