بررسی سطوح اسیدهای چرب غیراشباع (HUFA) آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) بالغ در غنی سازی شده با غلظت‌های مختلف اسید چرب (SPARI SELCO)

احترام محمدی[1]، محمد خلیل پذیر[1*]

1-پژوهشکده میگوی کشور، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی (AREO)، بوشهر، ایران.
*آدرس الکترونیکی نویسنده مسئول:dr.pazir@gmail.com

مقدمه

اسیدهای چرب غیر اشباع نقش مهمی در فعالیت های زیستی و فیزیولوژیکی آبزیان ایفاء می کنند به گونه ای که با شرکت در ساختار غشائی سلول و حفظ خاصیت ارتجاعی آن موجب افزایش سنتز هورمون ها در غدد درون ریز می گردند (جواهری بابلی، 1386). ترکیبات شیمیایی آرتمیا می تواند نیازهای غذایی گونه مختلف آبزی را فراهم نماید (Watanabe *et al*., 1980). لذا اسیدهای چرب ایکوزاپنتاانوئیک اسید (EPA[1])، دوکوزاهگزانوئیک اسید (DHA[2])، لینولئیک اسید (Linoleic acid)، لینولنیک اسید (Linolenic acid) و آراشیدونیک اسید (Arachidonic acid) مهمترین ترکیبات ضروری جیره موجودات دریایی می باشند (Watanabe, 1993). بیشتر گونه های آرتمیا آب شور قادر به بیوسنتز اسیدهای چرب غیر اشباع فوق نیستند به گونه ای که میزان EPA و DHA در ناپلی آرتمیا فرانسیسکانا به ترتیب 8/5 و 0 (میلی گرم درگرم وزن خشک) بوده که می توان با غنی سازی این کمبود را بر طرف کرد (Agh & Sorgeloos, 2005). از فواید غنی سازی در آرتمیا جوان و بالغ مدت کوتاه غنی سازی است به گونه ای که مقادیر کمتری از ماده غنی ساز استقرار یافته در روده آرتمیا، از طریق الحاق به سلولهای بافت روده خنثی می شوند (Smith *et al*., 2002) از این رو استفاده از مواد غنی ساز در آرتمیا جوان و بالغ موجب می‌شود که سطوح اسیدهای چرب موجود در ساختار آنها با نیازهای آبزیان سازگاری پیدا نماید (Smith, 1999). از این رو با توجه به گسترش فرآیند غنی سازی در صنعت آبزی پروری در این مطالعه سعی شد تا با تعیین غلظت مناسب از ماده غنی ساز Spari Selco از یک سو کمبود اسیدهای اسیدهای چرب غیراشباع HUFA آرتمیای بالغ گونه فرانسیسکانا برطرف شود و از سوی دیگر با تعیین غلظت مناسب ماده غنی ساز از به هدر رفتن آن جلوگیری به عمل آید.

روش‌ها

این مطالعه در ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه واقع در 25 کیلومتری شهرستان بوشهر انجام شد. به منظور آماده سازی آب در ابتدا بعد از ذخیره سازی آب دریا در استخر آرامش و فیلتر نمودن آن توسط فیلترهای شنی، از کلر جامد (شرکت شیمی دارو) به میزان 20 قسمت در میلیون جهت ضد عفونی آب دریا استفاده شد. سپس با استفاده از آب شیرین شوری آب دریا از 42 قسمت در هزار به 32 – 30 قسمت در هزار رسانده شد (پذیر و همکاران، 1387).

1-Eicosapentaenoic acid
2-Docosahexaenoic acid

شکوفایی سیست و ذخیره سازی ناپلی آرتمیا

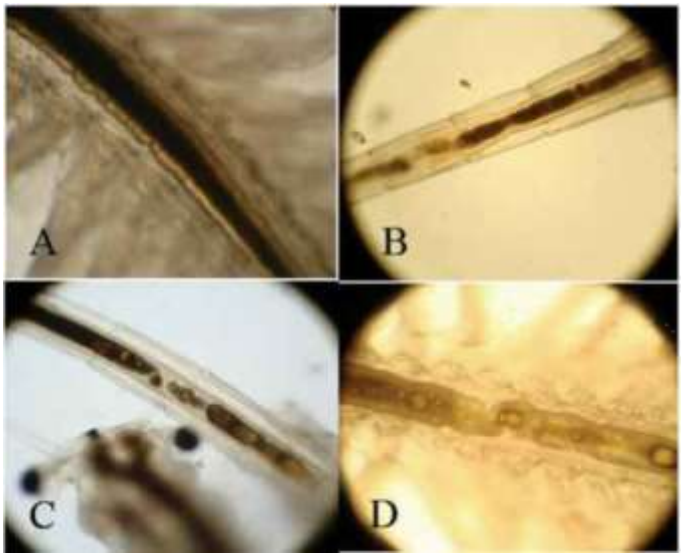
بمنظور شکوفایی سیست‌های آرتمیا در هر لیتر 3 – 5/2 گرم سیست فرآوری شده (INVE) در زوک های 100 لیتری آبگیری با آب 32–30 قسمت در هزار ذخیره سازی شد. کلیه فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب از قبیل درجه حرارت آب، اکسیژن محلول در آب، نور و pH به ترتیب بر روی 29–27 درجه سانتیگراد، 6-5 میلیگرم در لیتر، 2000 – 1500 لوکس و 8- 7 واحد ثابت باقی ماندند (Tamaru *et al*., 1999). پس از 24 ساعت از زمان شکوفایی سیست ها و گذراندن مراحل ناپلئوس، ناپلی‌های اینستار II با تراکم 8 -7 ناپلی در میلی لیتر در تانکهای 4 تنی فایبرگلاس ذخیره سازی شدند (شکل 1) (Teresita *et al*., 2005).

تغذیه ناپلی آرتمیا

تغذیه ناپلی‌های آرتیما از روز دوم تا روز چهارم با استفاده از محلول سبوس برنج انجام شد (D'Agostino, 1980) در ادامه از روز پنجم تا انتهای روز پانزدهم با جلبک تک سلولی *Tetrasalmis suecica* کشت داده شده در محیط کشت بیرونی TMRL با تراکم 200 هزار سلول در هر میلی لیتر تغذیه گردیدند (شکل 2) (Teresita *et al*., 2005). دوره پرورش آرتمیا بالغ 14 روز به طول انجامید.

غنی سازی آرتمیاهای بالغ

غنی سازی آرتمیا با استفاده از ماده غنی ساز SPARI SELCO شرکت INVE Aquaculture Nutrition صورت گرفت، بدین منظور غنی سازی در ظروف 20 لیتری و در دمای 28 درجه سانتی گراد با استفاده از غلظت‌های 5/0، 1 و 2 گرم صورت پذیرفت که پس از تهیه سوسپانسیون یکنواخت از ماده غنی ساز از هر کدام از غلظت‌های تهیه شده 4 میلی لیتر جهت غنی سازی 10000 آرتمیا بالغ استفاده شد (Sylvester *et al*., 2002). غنی سازی آرتمیاهای بالغ به مدت 3 ساعت بطول انجامید که پس از اتمام این کار و جدا نمودن آنها از محیط غنی سازی توسط صافی‌های میکرونی، بمنظور حذف امولسیون‌های چربی از روی بدن آنها به آرامی با آب دریا و سپس با آب شیرین شستشو داده شدند (شکل 1) (Naessens *et al*., 1997).



شکل 2: شکل 1: A: آرتمیا بالغ قبل از غنی سازی؛ B: آرتمیا بالغ غنی شده با غلظت 0/5 گرم در لیتر؛ C: آرتمیا بالغ غنی شده با غلظت 1 گرم در لیتر؛ D: آرتمیا بالغ غنی شده با غلظت 2 گرم در لیتر

اندازه گیری اسیدهای چرب غیر اشباع

از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) Agilent-6890 بمنظور اندازه گیری اسیدهای چرب غیر اشباع موجود در آرتمیاهای بالغ غنی شده استفاده گردید. 1 میکرولیتر از نمونه استری با استفاده از سرنگ به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق شد سپس دمای اولیه ستون روی 160 درجه سانتی گراد تنظیم شد که پس از 10 دقیقه، دمای ستون با سرعت 2 درجه سانتی گراد در دقیقه به دمای 180 درجه رسانده شد و به مدت 75 دقیقه دما در این درجه حرارت باقی ماند. در این روش از گاز هلیم (با خلوص 99/999 درصد) به عنوان گاز حامل و گاز هیدروژن به عنوان سوخت، ازت (با خلوص 99/9 درصد) به عنوان گاز کمکی و هوای خشک استفاده شد. از مقایسه زمان بازداری کروماتوگرام های نمونه مجهول با کروماتوگرام های بدست آمده از محلول استاندارد اسیدهای چرب متیل استر، اسیدهای چرب موجود در بافت آرتمیا شناسایی شدند و نتایج به صورت میلی گرم در گرم درصد ماده خشک گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل

در پایان با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (version 18)، آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) و آزمون Tukey's HSD داده‌های بدست آمده مورد تجزیه و تحلیل آماری در سطح اعتماد 95 درصد قرار گرفتند تا تفاوت آماری بین آنها مشخص گردد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از آزمایشات اندازه گیری میزان اسیدهای چرب غیراشباع در تیمارهای مختلف نشان داد که میزان اسید چرب میریستیک (C14:0) و میریستولیک (C14:1n5) در تیمارهایی که از غلظت‌های 0/5، 1 و 2 گرم در لیتر اسید چرب غیراشباع (HUFA) استفاده کرده بودند نسبت به آرتمیا بالغ غنی نشده بطور معنی داری بیشتر بود ($p<0.05$). همچنین نتایج حاکی از آن است که مقادیر اسیدهای چرب فوق بطور معنی داری در تیمارهای 1 و 2 گرم در لیتر نسبت به تیمار 0/5 گرم در لیتر بیشتر می‌باشد ($p<0.05$). این در حالی بود که با وجود بیشتر بودن میزان این اسیدهای چرب در آرتمیاهای بالغ غنی شده با غلظت 2 گرم در لیتر نسبت به آرتمیاهای بالغ غنی شده با غلظت 1 گرم در لیتر هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد (جدول 1) ($p>0.05$).

جدول 1: مقادیر اسیدهای چرب غیر اشباع در آرتمیا بالغ غنی شده با غلظت‌های 0/5، 1 و 2 گرم ماده غنی ساز Spari Selco (میانگین±میانگین انحراف معیار) (در هر ردیف حروف غیر مشابه نشاندهنده معنی دارد بودن و حروف مشابه نشاندهنده معنی دار نبودن است)

اسید چرب غیراشباع		میلیگرم در گرم وزن خشک			
		غنی نشده صفر گرم	غنی شده با غلظت 0/5 گرم	غنی شده با غلظت 1 گرم	غنی شده با غلظت 2 گرم
C14:0	میرستیک اسید	0/476±0/004^{c}	0/669±0/05^{b}	0/872±0/45^{a}	0/905±0/445^{a}
C14:1n5	میریستولیک اسید	0/145±0/00^{c}	0/177±0/015^{b}	0/484±0/005^{a}	0/579±0/046^{a}
C16:0	پالمیتیک اسید	15/027±0/395^{b}	21/841±1/084^{a}	17/834±0/339^{b}	16/801±0/166^{b}
C16:1n7	پالمیتولئیک اسید	3/378±0/089^{a}	3/392±0/244^{a}	2/633±0/029^{b}	2/630±0/167^{b}
C18:0	استئاریک اسید	12/557±0/108^{b}	14/203±0/283^{b}	14/753±0/377^{a}	13/591±1/134a
C18:1n9	اولئیک اسید	23/541±0/084^{b}	23/567±0/326^{b}	25/294±0/209^{a}	24/266±0/217^{a}
C18:1n7	واکسینیک اسید	12/437±0/112^{a}	9/795±0/088^{c}	11/801±0/146^{b}	11/754±0/789^{b}
C18:2n6	لینولئیک اسید	2/774±0/202^{d}	3/791±0/380^{c}	4/565±0/261^{b}	5/293±0/11^{a}
C18:3n3	آلفا لینولنیک اسید	0/851±0/01^{c}	0/926±0/102^{c}	1/326±0/177^{b}	2/616±0/528^{a}
C20:0	آراشیدیک اسید	0/238±0/003^{c}	0/467±0/01^{b}	0/733±0/021^{b}	1/218±0/067^{a}

میلیگرم در گرم وزن خشک

اسید چرب غیراشباع		غنی نشده صفر گرم	غنی شده با غلظت 0/5 گرم	غنی شده با غلظت 1 گرم	غنی شده با غلظت 2 گرم
C18:3n6	گاما لینولنیک اسید	0/849±0/015^{b}	1/432±0/239^{a}	1/368±0/268^{a}	1/355±0/237^{a}
C18:4n3	استاریدونیک اسید	0/962±0/021^{c}	2/086±0/293^{a}	1/598±0/212^{b}	1/711±0/123^{b}
C22:0	بهنیک اسید	0/426±0/088^{d}	0/540±0/022^{c}	0/647±0/019^{b}	0/751±0/019^{a}
C20:3n6	دی گاما لینولنیک اسید	0/530±0/002^{d}	1/346±0/309^{c}	2/131±0/036^{b}	3/820±0/381^{c}
C20:3n3	ایکوساتریئونیک اسید	0/52±0/040^{d}	2/538±0/016^{b}	3/384±0/111^{a}	1/357±0/055^{c}
C20:4n6	آراشیدونیک اسید	0/332±0/013^{c}	0/477±0/033^{b}	0/499±0/048^{b}	0/566±0/016^{a}
C20:5n3	ایکوزاپانتوتنیک اسید	0/371±0/010^{d}	0/735±0/089^{c}	1/678±0/152^{b}	4/317±0/546^{a}
C22:5n6	دوساپنتاتئونیک اسید	0/016±0/364^{d}	0/051±0/267^{b}	0/039±0/369^{c}	0/071±0/511^{a}
C22:5n3	دوکوساپنتاتونیک اسید	0/557±0/059^{c}	0/448±0/163^{d}	0/123±0/042^{b}	0/202±0/043^{a}
C22:6n3	دکوساهگزازونیک اسید	0/0±0/00^{c}	1/167±0/155^{b}	1/285±0/064^{b}	2/384±0/118^{a}
C24:0	لینکوسریک اسید	0/379±0/005^{a}	0/345±0/052^{a}	0/391±0/046^{a}	0/340±0/019^{a}
Σ n-3	مجموع اسیدهای چرب امگا 3	1/894±0/612^{d}	2/828±0/887^{c}	4/289±1/333^{b}	9/317±2/983^{a}
Σ n-6	مجموع اسیدهای چرب امگا 6	3/955±1/560^{d}	5/7±2/181^{c}	6/432±2/561^{b}	7/214±2/936^{a}
Σ SFA	مجموع اسیدهای چرب اشباع	29/109±2/845^{d}	38/065±3/822^{a}	35/23±3/320^{b}	33/606±3/064^{c}
Σ MUFA	مجموع اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند یگانه	40/021±5/245^{c}	46/711±5/179^{a}	43/596±5/641^{b}	40/586±5/396^{c}
Σ HUFA	مجموع اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند دوگانه	7/242±0/216^{d}	12/459±0/327^{c}	14/604±0/408^{b}	22/335±0/519^{a}
DHA/EPA	ایکوزاپنتاانوئیک اسید ودوکوزاهگزانوئیک اسید	0^{c}	1/59^{a}	0/765^{b}	0/55^{b}

اسیدهای چرب EPA، DHA و DPA در آرتمیاهایی که از غلظت 2 گرم در لیتر اسید چرب غیراشباع (HUFA) استفاده کرده بودند نسبت به تیمار شاهد و تیمارهای 1 و 0/5 گرم در لیتر بطور معنی داری بیشتر بود ($p<0.05$). از سوی دیگر علیرغم بیشتر بودن میزان اسید چرب DHA در تیمار 1 گرم در لیتر نسبت به 0/5 گرم در لیتر هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p>0.05$).

بررسی نتایج مجموع اسیدهای چرب غیراشباع امگا 3 (Σ n-3)، اسیدهای چرب غیر اشباع امگا 6 (Σ n-6) و اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند چند گانه (Σ HUFA) در آرتیماهای بالغ غنی شده با غلظت 2 گرم در لیتر بطور معنی داری بیشتر از غلظت‌های 0/5، 1 گرم در لیتر و آرتمیا بالغ غنی نشده بود ($p<0.05$). این در حالی بود که مجموع اسیدهای چرب اشباع (Σ SFA) آرتمیاهای بالغ غنی نشده بطورمعنی داری کمتر از آرتمیاهای غنی شده با غلظت‌های 0/5، 1 و 2 گرم در لیتر بود ($p<0.05$). گفتنی است که نتایج حاکی از بیشتر بودن میزان این فاکتور در آرتمیاهای غنی شده با غلظت 0/5 گرم در لیتر بود ($p<0.05$). در

رابطه با مجموع اسیدهای چرب غیر اشباع با پیوند یگانه (Σ MUFA) مشاهده شد که میزان این اسیدهای چرب در غلظت 0/5 گرم در لیتر بطور معنی داری از سایر تیمارها بود ($p<0.05$). از سوی دیگر نتایج نشان داد که نسبت DHA به EPA بطور معنی داری در آرتمیاهای بالغ غنی با غلظت 0/5 گرم در لیتر بیشتر از آرتمیاهای بالغ غنی نشده و آرتمیاهای بالغ غنی شده با غلظت‌های 1 و 2 گرم در لیتر بود ($p<0.05$). از سوی دیگر با وجود بیشتر بودن این نسبت در آرتمیا بالغ غنی شده با غلظت 1 گرم در لیتر نسبت به آرتمیاهای بالغ غنی شده با غلظت 2 گرم در لیتر هیچگونه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p>0.05$).

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه بیانگر این مطلب بود که میزان اسیدهای چرب غیراشباع (HUFA) در آرتمیاهای غنی شده با غلظت‌های 1 و 2 گرم در لیتر نسبت به آرتمیاهای غنی شده با غلظت 0/5 گرم در لیتر بطورمعنی داری بیشتر بود ($p<0.05$). از سوی دیگر میزان علیرغم پائین بودن نسبت DHA/EPAدر آرتمیاهای غنی شده با غلظت 2 گرم در لیتر لیکن میزان اسیدهای چرب غیراشباع (HUAF) همانند لینولنیک اسید، لینولئیک اسید، آراشیدونیک اسید، EPA، DHA، Σ n-3، Σ n-6 و Σ HUFA در آرتمیاهای بالغ غنی شده با غلظت 2 گرم در لیتر نسبت به آرتمیاهای بالغ غنی شده با غلظت 1 گرم در لیتر بطور معنی داری بیشتر بود ($p<0.05$). لذا با توجه به مطالب فوق و نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر مناسبترین غلظت ماده غنی ساز Spari Selco جهت غنی سازی آرتمیاهای بالغ 15 روزه با تراکم 10 قطعه در هر میلی لیتر به مدت 3 ساعت 2 گرم در لیتر می‌باشد.

منابع

1. پذیر، م. خ.؛ متین فر، ع. و زنده بودی، ع. 1387. بررسی تأثیر آرتمیا بالغ غنی شده با اسیدهای چرب غیراشباع (HUFA) بر شاخص تولید مثلی میگوی سفید غربی. مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. 70 صفحه.
2. جواهری، م.؛ متین فر،ع. و کیوان، ا. 1386. بررسی تاثیر ناپلیوس آرتمیای غنی شده با اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره و ویتامین C بر رشد، بقا و مقاومت لارو ماهی آزاد دریای خزر. دانشنامه دکتری، دانشکده کشاورزی منابع طبیعی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران.صفحات 13- 8.
3. Tamaru, C.S., 1999. Enrichment of Artemia for Use in Freshwater Ornamental Fish Production. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture, Publication #133.
4. 3. Teresita, D.N.J.M. & Leticia G.R., 2005. Biomass production and nutritional value of *Artemiasp*. (Anostraca: Artemiidae) in Campeche, Mexico. Rev. Biol. Trop. Vol. 53, 447-454
5. D'Agostino, A.S., 1980. The vital requirements of *Artemia*, physiology and nutrition. *In*: Persoon, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), The Brine Shrimp Artemia, Vol. 2. Physiology, Biochemistry, Molecular Biology, Universa Press, Wetteren, pp. 55-82.
6. Naessens, E., Lavens, P., Gomez, L., Browdy, C.L., Mcgovernhopkins, K., Spencer, A.W., Kawahigashi, D. and Sorgeloos, P., 1997. Maturation performance of Penaeus vannamei co-fed Artemia biomass preparations. Aquaculture 155, 87–101.
7. Watanabe, T., Oowa, F., Kitajima, C. and Fujita, S., 1980. Relationship between dietary value of brine shrimp*Artemia salina* and their content of w3 highly unsaturatedfatty acids. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46: 35-41.
8. Watanabe, T.,1993. Importance of docosahexaenoic acid marine larval fish. J. World Aquaculture soc., 24:152-161.
9. Agh, N. & Sorgeloos, P., 2005. Handbook of Protocols and Guidelines for Culture and

Enrichment of Live Food for Use in Larviculture. Laboratory of Aquaculture and *Artemia* Reference Center University of Ghent, Ghent, Belgium. 60p.

10. Smith, G.G., 1999. Effects of temperature during embryonic development on thecharacteristics of Jasus edwardsii phyllosoma. Thesis, University of Tasmania, pp. 58.
11. Smith, G.G., Ritar, A.J., Phleger, Ch. F., Nelson, M.N., Mooney, B., Nichols, P.D. and Hart, P.R., 2002. Changes ingut content and composition of juvenile Artemia afteroil enrichment and during starvation. Aquaculture,208: 137-158.