مجله شیلات
سال چهارم، شماره اول، بهار 89

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

*مازیار اکبرآبادی[1]، شعبانعلی نظامی[2]، حسین خارا[2] و فرشاد رحمتی[1]

[1]دانشجوی دوره کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، [2]استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان

چکیده

در این مطالعه با دو آزمایش، اثر آنتی‌بیوتیک و اکسیژن بر قدرت لقاح پذیری تخمک لقاح نیافته ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta cacpius*) 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، 3 غلظت آنتی‌بیوتیک شامل غلظت 1 (250µg streptomycin +250 IU penicillin)، غلظت 2 (500µg streptomycin+500IU penicillin) و غلظت 3 (750µg streptomycin +750 IU penicillin) 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 3-2 درجه نگهداری گردید. فرایند لقاح در روزهای صفر (شاهد)، 4، 8 و 12 بعد از تخم‌کشی انجام پذیرفت. بر اساس نتایج حاصله، با گذشت زمان، کاهش قدرت لقاح دیده شد. در آزمایش اول بین روز صفر، 4 و 8 تفاوت معنی‌داری در چشم‌زدگی و تخم‌گشایی مشاهده شد. در آزمایش دوم در روز 4 نگهداری، غلظت صفر آنتی‌بیوتیک باعث کاهش معنی‌داری در لقاح‌پذیری نسبت به گروه شاهد شد. بالاترین چشم زدگی و تخم گشایی در روز صفر، مشاهده شد. بر خلاف غلظت صفر دو غلظت دیگر آنتی‌بیوتیک (غلظت 1 و غلظت 2) تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل و نیز با یکدیگر نداشتند. در غلظت 3 آنتی‌بیوتیک تفاوت کمی در ارتباط با درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی قابل مشاهده بود. در روز 8 نگهداری نیز نتایج تقریباً مشابه روز 4 بود. در روز 12 نگهداری، درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی با غلظت صفر آنتی‌بیوتیک بسیار پائین بود. با وجود این، دو غلظت 1 و 2 به‌ترتیب با 77/61 و 62/59 درصد چشم‌زدگی، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند و غلظت 3 تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت. همچنین در مقایسه با تیمار بدون اکسیژن (7/11 درصد چشم‌زدگی)، تزریق اکسیژن قدرت لقاح‌پذیری تخمک‌ها را تا 60/44 درصد افزایش داد.

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

مقدمه

با کاهش شدید ذخایر طبیعی ماهیان در طی چند دهه اخیر، تکثیر و پرورش مصنوعی آبزیان به‌خصوص آزاماهیان جهت تأمین نیاز پروتئینی در سطح کاملاً وسیعی در جهان در حال انجام می‌باشد. دسترسی به اسپرم و تخمک با کیفیت مناسب و به‌مقدار کافی در زمان مورد نیاز، یک عامل مهم در موفقیت لقاح مصنوعی در مزارع تکثیر و پرورش ماهی آزاد می‌باشد، به‌طوری‌که دستیابی به فنی که بتوان تخمک‌های استحصالی ماهی ماده را به‌مدت 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 به‌صورت منجمد به‌دست آمده، ولی در مورد تخمک این موفقیت اندک بوده است. یکی از دلایل آن پاره شدن

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

Archive of SID
www.SID.ir

غشاء بر اثر به وجود آمدن بلورهـای یخـی طـی انجمـاد می‌باشد.

در هنگام نگهداری اسپرم چون حجم سـلول کوچـک است، می‌توان به راحتی به وسیله مواد شـیمیایی آب را از اسپرم خارج نمود و به ایـن وسـیله از انجمـاد آب درون سلولی و به وجود آمدن پارگی در غشاء بر اثـر بلورهـای یخی جلوگیری نمود. ولی در مورد تخمک‌ها که اندازه‌ای نسبتاً درشت دارند، جـذب آب درون سـلولی بـه راحتـی امکـان‌پـذیر نیسـت. همچنـین گـزارش شـده کـه مـواد نگهدارنده در مقابـل سـرما کـه در انجمـاد اسـپرم مـورد استفاده قرار می‌گیرند، در هنگام استفاده در تخمک ایجـاد سمیت زیادی می‌کنند که برای بقای تخمک مضر می‌باشند (17 و 18). بـا توجـه بـه مشـکلات انجمـاد تخمـک، نگهداری کوتاه مدت تخمک در دمای بالای صفر درجه و برای اهداف اعمال دستکاری‌های ژنتیکی، انتقـال تخمـک بین کارگاه‌ها به جای خود مولدین و در شـرایطی کـه بـه جنس نر دسترسی وجود ندارد، مورد توجـه قـرار گرفتـه است. عوامل متعددی بر نگهداری تخمک تأثیرگذار است که از مهمتـرین آنهـا بـه دمـا، عوامـل عفـونی و اکسـیژن می‌توان اشاره کرد. در خانواده آزاد ماهیان، تخمک پس از فرآیند اوولاسیون (تخمک‌گذاری) از لایه‌هـای فولیکـولی جدا شده و در محوطه شکمی در مایع نیمه لزجی به نـام مایع سلومیک یا مایع تخمدانی شناور می‌شود و بسـته بـه شرایط دمایی می‌توانند حداقل به‌مدت یـک هفتـه قـدرت لقاح خود را حفـظ نمایـد (16). زمـانی کـه تخمـک در دماهای پایین نگهداری می‌شود، متابولیسم کمتری داشته و بدون تغییر قابل توجهی در کیفیت می‌توان آن را به مدت چند روز نگهـداری کـرد، ولـی افـزایش درجـه حـرارت نگهداری، تاثیر منفی روی مدت زمان نگهداری می‌گـذارد (9).

عفونـت‌هـای باکتریـایی نیـز یکـی دیگـر از عوامـل محدودکننـده نگهـداری تخمـک آزاد ماهیـان در مـایع سلومیک می‌باشد. باکتری‌ها عـلاوه بـر مصـرف اکسـیژن می‌تواننـد مـوادی از خـود ترشـح کننـد کـه بـه دیـواره سلول‌های جنسی در حال نگهداری آسیب وارد نماید (8) که با افزودن آنتی‌بیوتیک‌ها در غلظـت مناسـب بـه مـایع سلومیک، می‌توان قدرت لقاح‌پذیری تخمک‌ها را افـزایش داد (1 و 4).

تخمک‌ها برای انجام فعالیـت‌هـای متابولیسـمی خـود احتیاج به اکسیژن دارند. این اکسیژن در داخل بدن مـاهی از طریـق مـویرگ‌هـا و انتشـار اکسـیژن بـه داخـل مـایع سلومیک تأمین می‌شود (5). به نظر می‌رسد در خـارج از بدن و در محیط بسته، تخمک‌هـا در اثـر خفگـی کیفیـت خود را از دست می‌دهند. با توجه به نتایج بدست آمده از محیط‌های نگهدارنده تخمـک در مطالعـات قبلـی (10 و 11)، در دسترس بودن مایع سلومیک و همچنـین مشـکل بودن ساخت محلول مصنوعی در شرایط کارگاهی، در این مطالعه تخمک ماهی آزاد در مایع سلومیک نگهداری شـد تا روشی کاربردی جهت نگهداری کوتاه مدت تخمک در محیط خارج از بدن مـاهی بـه بخـش اجـرا ارائـه گـردد. بنابراین این تحقیق با اهداف، 1) بررسی امکان نگهـداری تخمک، خارج بدن ماهی و در داخل مـایع سـلومیک، 2) بررسی تأثیر آنتی‌بیوتیک برمدت زمان مانـدگاری تخمـک در مایع سلومیک 3) بررسی اثر افزودن اکسیژن بر محـیط نگهداری برمدت زمان نگهداری تخمک انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مولدین: این تحقیق در مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیـان کلاردشت، انجام پذیرفت. برای انجام ایـن تحقیـق چهـار قطعه مولد ماده برای آزمایش در نظر گرفته شد و قبـل از شروع آزمایش طول و وزن مولدین اندازه‌گیری شد. ایـن مولدین دارای طولی بـین 47 الـی 52 سـانتی‌متـر و وزن 1900 تا 2100 گرم بود.

جمع‌آوری تخمک و مایع سـلومیک: بـرای جمـع‌آوری تخمک، مولدین ماده به وان‌هـای پلاسـتیکی منتقـل و بـه وسیله 100 میلی‌گرم در لیتر مـاده بیهـوش کننـده 222 MS بیهوش گردیدند. سپس مولدین بیهوش شده بـا آب تمیز شسته شده و پس از خشک کـردن بـدن بـه وسـیله

Archive of SID

www.SID.ir

حوله، 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 1:2 (تخمک: مایع سلومیک) با هم مخلوط گردیده و آنتی‌بیوتیک به آنها اضافه شود در داخل ظروف یکبار مصرف به ابعاد 20×10سانتی‌متر منتقل گردید. سپس این ظروف در داخل یخچال با دمای 3-2 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 1:2 (تخمک: مایع سلومیک) با هم مخلوط گردیده و به 4 قسمت مساوی تقسیم شدند. سپس 4 غلظت آنتی‌بیوتیک شامل غلظت صفر (بدون آنتی‌بیوتیک)، غلظت 1 (IU penicillin+250 streptomycin 250µg) و غلظت 2 (500µg streptomycin+500IU penicillin) و غلظت 3 (750 µg + 750IU penicillin streptomycin) به ازای هر میلی‌لیتر مایع سلومیک به آنها اضافه گردید. سپس مخلوط تخمک و مایع سلومیک به کیسه‌های پلاستیکی zip kip به ابعاد 31×18 سانتی‌متر ریخته شد و با اکسیژن خالص پر گردید و در آنها بسته شد و به یخچال با دمای 3-2 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 (1 میلی‌لیتر از هر ظرف) و در داخل ویال‌های 1/5 سی‌سی جهت کشت باکتریایی به آزمایشگاه منتقل و در محیط کشت Nutrient Agar و به مدت 48 ساعت کشت داده می‌شد.

فرآیند لقاح و انکوباسیون تخم‌ها: قبل از انجام لقاح، اسپرم از 6 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 10گرم تخمک برای هر تکرار (3 تکرار برای هر تیمار) برداشته شد و مایع سلومیک همراه آن جدا گردید. سپس به آن محلول لقاء اضافه گردید. محلول لقاح مصرفی، محلول لقاحی بیلارد (125 میلی‌مول کلرید سدیم، 30 میلی‌مول گلیسین، 20 میلی‌مول تریس هیدروکلرید در pH=9) بود که به نسبت 1:2 (تخمک: محلول لقاحی) استفاده شد (14). بلا فاصله میزان 300 میکرولیتر اسپرم به وسیله میکروسمپلر برداشته و به تخمک‌ها اضافه شد. این مخلوط به مدت 3-2 دقیقه به‌هم زده شد، سپس تخم‌ها مورد شستشو قرار گرفته و به‌مدت 45-30 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 کالیفرنیایی استفاده شد. در داخل هر تراف کالیفرنیایی 3 عدد سینی فایبرگلاسی و در داخل هر سینی هم تعداد 9 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 1 میلی‌گرم در لیتر استفاده شد.

دمای آب سالن انکوباسیون 9-8 درجه سانتی‌گراد بود. از چشم‌زدگی و تخم‌گشایی به‌عنوان مقیاسی از قدرت لقاح‌پذیری استفاده گردید (7). پس از مرحله

Archive of SID

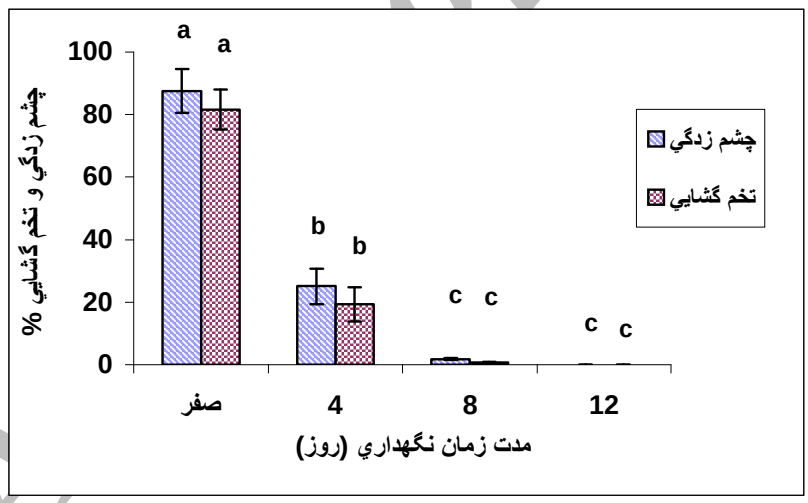
www.SID.ir

چشم‌زدگی، تعداد تخم‌های سفید و چشم زده شمارش شدند. سپس با تقسیم تعداد تخم‌های چشم زده به کل تخمک‌های استفاده شده برای فرآیند لقاح و ضرب حاصل در 100، درصد چشم‌زدگی محاسبه گردید. پس از تخم‌گشایی نیز برای محاسبه درصد تخم گشایی، تعداد لاروهای هچ شده به کل میزان تخمک‌های استفاده شده در فرآیند لقاح تقسیم و سپس عدد حاصل در100 ضرب شد (15).

روش آماری: داده‌های درصدی به داده‌های نسبتی ($0 \leq P \leq 1$)تبدیل شدند. سپس برای نرمال‌سازی داده‌ها از فرمول $\mathrm{ArcSin}\sqrt{P}$ 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 5 درصد تعیین شده بود (20).

نتایج

آزمایش اول: در نتایج این آزمایش مشاهده شد که با گذشت زمان درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی کاهش می‌یابد و از 87/58 درصد چشم‌زدگی و 81.64 درصد تخم‌گشایی در روز صفر به حدود صفر درصد در روزهای 8 و 12 نگهداری می‌رسد. با توجه به کاهش چشم‌زدگی و تخم‌گشایی با افزایش زمان نگهداری، تفاوت‌های موجود بین روزهای صفر و 4 با یکدیگر معنی‌دار بود ($P<0/05$) و با افزایش زمان نگهداری تا روزهای 8 و 12، چشم زدگی و تخم گشایی به‌طور معنی‌داری نسبت به روزهای صفر و 4 کاهش یافت ($P<0/05$) (شکل 1).



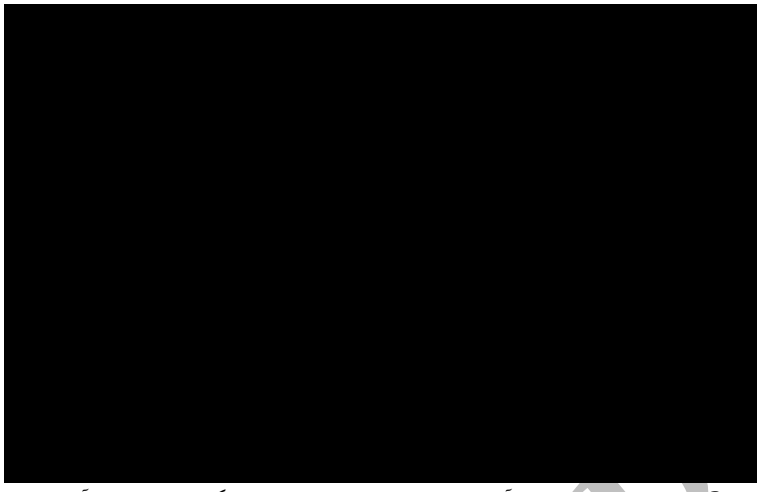
شکل 1- اثرمدت زمان نگهداری برقدرت لقاح تخمک نگهداری شده درآزمایش اول

آزمایش دوم:

اثر آنتی بیوتیک بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: در این آزمایش 4 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 ($P<0/05$)، ولی تفاوت معنی‌داری در درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی بین دو غلظت آنتی‌بیوتیک (غلظت‌های 1 و 2) مشاهده نشد ($P>0/05$) و در بین غلظت‌های 1 و 3 تفاوت بیشتری قابل مشاهده بوده و در کل بین غلظت‌های 1 و 2 با غلظت صفر و 3 تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($P<0/05$) (شکل 2).

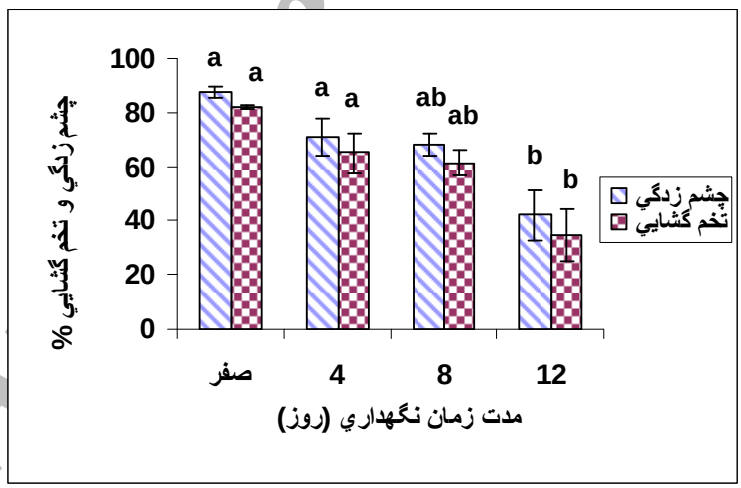
Archive of SID

www.SID.ir



شکل 2- اثرغلظت های مختلف آنتی بیوتیک بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش دوم

اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: همان‌طوری که در شکل 3 نشان داده شده است با گذشت زمان، درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی کاهش پیدا می‌کند و روند نزولی را تا روز 12 نشان می‌دهد. همچنین تفاوت کاملاً معنی‌داری بین سه روز نگهداری (4، 8 و12) با روز صفر مشاهده شد ($P<0/05$). درصد چشم‌زدگی و تخم گشایی دو روز 4 و 8 تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند، ولی با افزایش زمان نگهداری تا 12 روز کاهش معنی‌داری در آنها دیده شد.

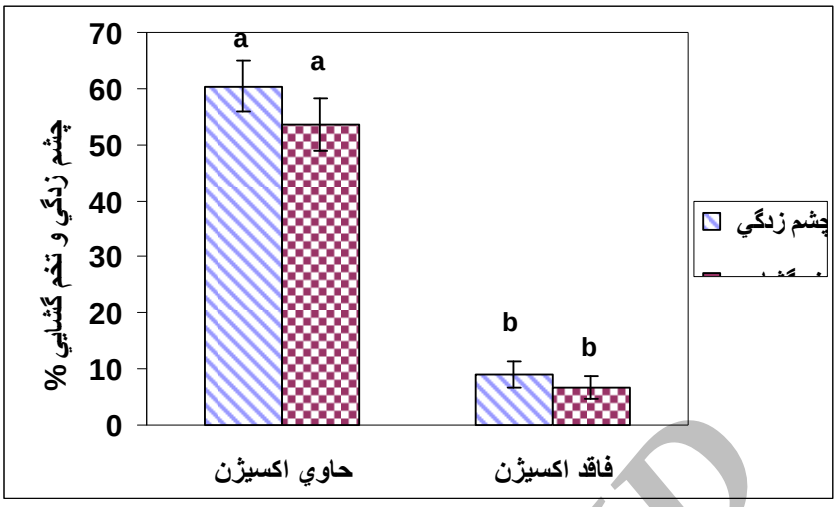


شکل 3- اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش دوم

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 60/44 و 53/44 درصد در تیمارهای حاوی اکسیژن به شکل معنی‌داری ($P<0/05$) بالاتر از تیمارهای فاقد اکسیژن با 7/11 و 4/90 درصد می باشد (شکل 4).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل 4- اثر تزریق اکسیژن بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده

نتایج آزمایشات میکروبیولوژی: نتایج حاصل از آزمایشات میکروبیولوژی نیز نشان داد که در روز صفر هیچ‌گونه باکتری در مایع سلومیک نبوده است. با افزایش مدت زمان نگهداری، باکتری فقط در تیمارهایی که بدون آنتی‌بیوتیک نگهداری شده بودند، مشاهده شد و در روز 12 به حداکثر مقدار خود رسید، ولی سه غلظت دیگر آنتی‌بیوتیک از رشد باکتری جلوگیری کرده و تفاوتی با یکدیگر نداشتند.

اثر متقابل آنتی‌بیوتیک و مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده: بالاترین چشم‌زدگی و تخم‌گشایی در روز صفر مشاهده شد، ولی با گذشت زمان در هر چهار غلظت آنتی‌بیوتیک کاهش قدرت لقاح دیده شد (جدول 1). در روز 4 نگهداری، تخمک‌های نگهداری شده با غلظت صفر آنتی‌بیوتیک، افت کاملاً محسوسی را در چشم‌زدگی و تخم‌گشایی نسبت به گروه کنترل نشان دادند و تفاوت آنها معنی‌دار بود ($P<0/05$). بر خلاف غلظت صفر، دو غلظت 1 و 2 آنتی‌بیوتیک تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد و نیز با یکدیگر نداشتند ($P>0/05$) و در غلظت 3 آنتی‌بیوتیک، در درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی تقریباً تفاوت قابل مشاهده بود. در روز 8 نگهداری نیز نتایج تقریباً مشابه روز 4 بود، ولی در روز 12 نگهداری، درصد چشم‌زدگی و تخم‌گشایی تخمک‌های نگهداری شده با غلظت صفر آنتی‌بیوتیک، کاهش خیلی زیادی پیدا کرده و به‌ترتیب 1/09 چشم زدگی و 0/83 تخم‌گشایی را نشان داد. با وجود این، در دو غلظت 1 و 2 هنوز تخمک‌ها کیفیت مناسبی داشته و به‌ترتیب با 77/61 و 62/59 درصد چشم‌زدگی، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند ($P>0/05$)، ولی غلظت 3 تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P<0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

اثر مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک: معمولاً افت کیفیت تخمک‌ها در داخل بدن ماهی با گذشت زمان و در نتیجه پیشرفت فرآیند فوق رسیدگی اتفاق خواهد افتاد. در نگهداری تخمک خارج بدن ماهی با افزایش زمان نگهداری، علائم و تغییراتی در تخمک پدید می‌آید که مشابه علائم ایجاد شده در فرآیند فوق رسیدگی می‌باشد (12).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 1- اثر متقابل آنتی بیوتیک و مدت زمان نگهداری بر قدرت لقاح تخمک نگهداری شده در آزمایش دوم

مدت زمان نگهداری (روز)	غلظت آنتی‌بیوتیک	چشم زدگی٪	تخم گشایی٪
صفر (کنترل)	-	87/58 ±2/19[a]	81/64± 0/67[a]
4	غلظت صفر	38/41± 12/22[bcd]	35/9± 13/50[cde]
	غلظت 1	89/7± 2/84[a]	88/68±3/5[a]
	غلظت 2	84/87± 3/7[a]	76/72± 5/03[ab]
	غلظت 3	70/66±11/31[ab]	58/74± 14/1[abcd]
8	غلظت صفر	56/93± 1/89[abc]	49/64± 5/72[bcd]
	غلظت 1	80/26± 5/49[a]	75/94± 7/62[ab]
	غلظت 2	78/60±1/7[a]	69/17± 1/16[abc]
	غلظت 3	63/56± 6/41[abc]	50/71± 7/51[bcd]
12	غلظت صفر	1/09± 0/54[f]	0/83± 0/49[g]
	غلظت 1	77/61± 7/21[a]	75/09± 7/36[ab]
	غلظت 2	62/59± 8/34[abc]	53/27± 9/25[abcd]
	غلظت 3	27/94±4/65[cde]	9/41± 3/69[efg]

در داخل ستون‌ها مقادیری که حروف مشابه دارند در سطح 5 درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

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 آزادماهیان است، به‌عنوان یک ماده نگهدارنده برای نگهداری تخمک آزادماهیان استفاده شده است (7 و 10). زمان نگهداری در محیط‌های مصنوعی معمولاً بسیار کوتاه بوده است. برای مثال تخمک قزل‌آلا به‌مدت 10-5 دقیقه (6)، 2 روز (7)، 3 روز (4)، 4 روز (2) و تخمک ماهی‌آزاد دریای خزر به‌مدت 5 روز (10) 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 9 روز و Niksirat و همکاران و Komrakova و همکاران تا 15 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. نکته دیگری که باید به آن اشاره کرد این که حجم تخمک نگهداشته شده در دو مطالعه اخیر کم بوده (حدود 10 میلی‌لیتر) در حالی‌که در این مطالعه حجم تخمک بیشتر بوده (120 میلی‌لیتر) و نتایج بهتری نسبت به آنها در روز 12 بدست آمده است. یعنی در روز 12 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 (9). 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

Archive of SID

www.SID.ir

کنند که به دیواره سلول‌های جنسی در حال نگهداری آسیب وارد نموده و باعث کاهش لقاح‌پذیری آنها شود (8).

در مطالعه‌ای، تخمک ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در داخل مایع سلومیک نگهداری شد که بعد از 9 روز تخمک‌ها خاصیت لقاح خود را در محیط فیلتر نشده بر اثر طغیان عوامل عفونی از دست دادند، ولی در محیط فیلتر شده هنوز 60-50 درصد از تخمک‌ها دارای خاصیت لقاح بودند (4).

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 (8)، لذا افزودن آنتی‌بیوتیک در غلظت‌های مناسب به مایع سلومیک جهت جلوگیری از رشد باکتری از اهمیت بالایی برخوردار است. در این آزمایش 2 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 1) استفاده شود.

همچنین گزارش شده است اضافه کردن آنتی بیوتیک به میزان 100IU پنی‌سیلین و 0/1 میلی‌گرم استرپتومایسین به ازاء هر میلی‌لیتر تخمک در طی نگهداری کوتاه مدت لقاح پذیری را به‌طور معنی‌داری افزایش داده است (1) 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 تامین می‌شود (5) 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 9-8 درجه قرار گرفتند، به علت بسته بودن در ظرف به سرعت قابلیت زنده مانی خود را از دست می‌دهند، و پس از 2/5 روز، 50 درصد و در روز هفتم تنها یک درصد از تخم‌ها به چشم‌زدگی می‌رسند (19). به‌منظور جلوگیری از این امر Komrakova و Holtz در سال 2003 از غشاهای نیمه تراوا به‌عنوان درپوش ظروف نگهداری تخمک استفاده کرده و به محیط نگهداری، اکسیژن مرطوب تزریق کردند و تخمک قزل‌آلا را به‌مدت 15 روز با 60 درصد چشم‌زدگی نگهداشتند. همچنین Billard در سال 1981 اسپرم قزل‌آلا را در زیر اکسیژن اتمسفر نگهداشته و در روز پنجم نتایجی 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 1 (250IU penicillin+ 250µg streptomycin) و تزریق اکسیژن به‌صورت روزانه، تخمک این ماهی را به مدت حداقل 12 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.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

1- نیک‌سیرت، ح.، سروی‌مغانلو، ک.، مجازی‌امیری، ب.، پاشازانوسی، ع. و میارنعیمی، م.، 1385. نگهداری تخمک لقاح نیافته قزل‌آلای رنگین‌کمان *(Oncorhynchus mykiss)* در محیط‌های مایع تخمدانی. مجله منابع طبیعی ایران، جلد59، شماره 1، صفحات 189 تا 197.

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 gairdne*ri). 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, NewYork 305-350.

Archive of SID

www.SID.ir

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 Hamphreys., 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. Northen Illinois University 732 p.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Fisheries
Vol. 4, No. 1, Spring 2010

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

***M. Akbarabadi[1], Sh. Nezami[2], H. Khara[2] and F. Rahmati[1]**
[1]MS Student, Dept. of Fisheris, Islamic Azad University, Lahijan Branch, [2]Assistant Prof.,
Dept. of Fisheris, Islamic Azad University, Lahijan Branch

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 and3: 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 resolute 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; Antibioticl; Unfertilized ova; *Salmo trutta caspius*; Short-term storage

Archive of SID

* Corresponding Author; Email: maziar.akbarabadi@yahoo.com

www.SID.ir