Archive of SID

شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

صفحات ۱۵۴-۱۴۵

بررسی غلظتهای مختلف یونهای سدیم و پتاسیم بر شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase و شاخص‌های کیفی لارو در مراحل مختلف لاروی میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*)

کامران رضایی توابع[1]*، غلامرضا رفیعی[2]

۱. استادیار گروه مهندسی شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران

۲. استاد گروه مهندسی شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۲/۱۳

چکیده

در مراحل اولیهٔ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین دستگاه تنظیم اسمزی هنوز شکل نگرفته است و تنظیم اسمزی و یونی بدن عمدتاً مربوط به فعالیت‌های آنزیم Na/K-ATPase با مصرف ATP می باشد. به همین دلیل در چرخهٔ زیست طبیعی، مراحل لاروی باید در آبهای لب‌شور نزدیک مناطق مصبی با شرایط مشابه اسمزی ایزوتونیک بدن لارو با حداقل مصرف ATP و حداکثر بازماندگی سپری شود. این تحقیق با هدف بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف سدیم و پتاسیم در آب مرکز تکثیر، بر شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase، شاخص کیفی لارو (LCI) و بازماندگی در مراحل ۱، ۴، ۷ و ۱۱ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین انجام گردید. برای این تحقیق، از ترکیب پایهٔ آب لب‌شور مصنوعی نیو (شوری ۱۲ گرم در لیتر) استفاده شد و دو آزمایش در مخازن ۱۰۰ لیتری با تراکم اولیهٔ ۲۰۰ لارو در لیتر انجام گردید. در آزمایش اول، چهار تیمار ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پتاسیم با استفاده از نمک کلرید پتاسیم و در آزمایش دوم، چهار تیمار ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم با استفاده از نمک کلرید سدیم هر کدام با سه تکرار فراهم شد. بر اساس نتایج به دست آمده، کیفیت لارو میگوی بزرگ آب شیرین بر اساس شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase شاخص بهتری نسبت به شاخص کیفی لارو و بازماندگی لاروها می‌باشد. نتایج نشان داد که شرایط ایزوتونیک و حداقل فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل ۱ و ۴ لاروی و مراحل ۷ و ۱۱ لاروی به ترتیب ۴۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم و ۱۵۰ میلی‌گرم درلیتر پتاسیم برای هر چهار مرحلهٔ لاروی می‌باشد.

واژگان کلیدی: میگوی بزرگ آب شیرین، آنزیم Na/K-ATPase، دورهٔ لاروی، تنظیم اسمزی، ایزوتونیک

* نویسنده مسئول مکاتبه تلفن ۰۹۱۷۷۰۷۰۱۶۶ Email: krtavabe@ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱. مقدمه

چرخهٔ زیست طبیعی میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) منحصربه‌فرد بوده و علی‌رغم اینکه بیشتر مراحل زیستی این گونه در آب شیرین رودخانه‌ها و مناطق بالادست سپری می‌شود، دورهٔ لاروی آن وابسته به آب لب‌شور بوده و در طبیعت در فصل تولیدمثل مولدین جهت تخم‌ریزی به مناطق مصبی مهاجرت می‌کنند. زیرا در مراحل اولیهٔ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین، دستگاه تنظیم اسمزی هنوز شکل نگرفته است (Wickins and Bread, 1974; New, 2002) و مراحل لاروی باید در آبهای لب‌شور نزدیکی مناطق مصبی با شرایط مشابه اسمزی ایزوتونیک بدن لارو سپری شود. در شرایط طبیعی، زیست مساعد لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین در شوری ۱۲ گرم در لیتر انجام می‌گیرد (New, 2002). نیو در سال ۲۰۰۵ از طریق سازمان فائو دستورالعملی برای تهیه آب لب‌شور مصنوعی ۱۲ گرم در لیتر برای مراکز تکثیر و دورهٔ لاروی این گونه ارائه نموده است که پایه اصلی نمک‌های مورد استفاده برای رسیدن به شوری مورد نظر عناصر کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسیم می‌باشد (New, 2005). اجرای این دستورالعمل در مراکز تکثیر موفقیت چندانی نداشت و مشکل اصلی این دستورالعمل عدم نیازسنجی مناسب لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین به این عناصر می باشد و خود محقق معتقد است که بهترین سطح هر عنصر در ترکیب آب لب شور ارائه شده برای رشد لاروها شناخته نشده است (New, 2004).

به‌طور طبیعی مراکز تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین در مناطقی احداث می‌شوند که آب لب‌شور مناطق مصبی در دسترس باشد که این امر توسعهٔ این مراکز را محدود می‌کند؛ به همین دلیل در چند سال اخیر تولید انبوه لارو این گونه در شرایط آزمایشگاهی و تفریخ‌گاه‌ها بیش از سایر گونه‌های آبزیان مورد توجه قرار گرفته است. محدودیت توسعهٔ مراکز تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین در مناطق مصبی، آلودگیهای آب در این مناطق، غلظت‌های یونی متفاوت در نقاط مختلف مصب‌ها، هزینه‌های حمل و نقل پست لاروهای تولید شده از مراکز تکثیر در مناطق مصبی به مراکز پرورشی و تلفات زیاد پست‌لاروها در این پروسهٔ حمل و نقل از مشکلات اساسی احداث و توسعهٔ مراکز تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین در نزدیکی مصب‌ها است و از این رو توسعهٔ مراکز تکثیر این گونه در مناطق دور از مصب‌ها و در مجاورت مراکز پرورشی اهمیت زیادی دارد. اولین گام در توسعهٔ این مراکز شناخت ترکیبات معدنی آب لب‌شور مناسب برای این مراکز جهت تولید آب لب‌شور مصنوعی با پارامترهای کیفی مناسب است. مدیریت کیفیت آب و تهیه آب لب‌شور با کیفیت مناسب، مهم‌ترین اقدام مؤثر در مراکز تکثیر و تولید لارو میگوی بزرگ آب شیرین بیان شده است (New, 2002; New 2004; Nahn, 2009). مهم‌ترین پارامتر کیفیت آب لب‌شور در مراکز تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین، ترکیب نمک‌های معدنی و یونی (آنیون‌ها و کاتیون‌ها) در آن می‌باشد (Wilder *et al.*, 1998; New, 2002; Cheng *et al.*, 2003; Yen and Bart, 2008). آنیون‌ها و کاتیون‌های موجود در آب از موارد مهم و مورد نیاز لارو میگوی آب شیرین است که به دو صورت انتقال فعال و انتشار ساده از طریق آبشش و سطح پوست (بعد از پوست‌اندازی) در ارتباط با مایع همولنف درون بدن لاروها هستند و از این طریق ارتباط ایزوتونیک و تنظیم اسمزی بدن لاروها انجام می‌شود (Rainbow, 1997; Cheng *et al.*, 2003; Augusto *et al.*, 2009; Huong *et al.*, 2010).

امروزه جمع‌آوری لارو میگوی بزرگ آب شیرین از محیط طبیعی برای پرورش نیمه‌متراکم و متراکم اقتصادی نیست و بهترین روش برای تهیه لارو و پست لارو، استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی برای تولید انبوه لارو در تفریخ‌گاه‌ها است (Menasveta and Piyatiratitivokul, 1980). طی چند دههٔ اخیر مطالعات زیادی با هدف افزایش زنده‌مانی و کیفیت لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین انجام شده است که این مطالعات عموماً در دو زمینهٔ تغذیه مناسب لاروها و مدیریت کیفیت آب تفریخ‌گاه‌ها انجام شده است. از سال ۱۹۸۰ سازمان فائو در راستای سیاست تولید پروتئین از سیستم‌های آبزی‌پروری و کاهش فشار بر منابع آبزیان دریایی با اقدامات ترویجی سعی در توسعهٔ تکثیر و پرورش گونه میگوی بزرگ آب

www.SID.ir

Archive of SID

شیرین در کشورهای استوایی و نیمه استوایی کرده است، اما همواره نیاز به آب لب‌شور با کیفیت و ترکیب مناسب یونی در مرحله لاروی، اصلی‌ترین مشکل توسعهٔ مراکز تکثیر و تولید لارو این گونه مطرح شده است (New, 2000; Cavalli *et al.*, 2001; New, 2004). از آنجایی‌که بازماندگی و کیفیت لاروهای تولید شده به کیفیت و ترکیب مواد یونی و معدنی آب لب‌شور مورد استفاده در این مراکز بستگی دارد، بنابراین تهیه آب لب‌شور مصنوعی مورد نیاز این مراکز مهم‌ترین مسئله از دیدگاه اقتصادی و موفقیت در تکثیر و پرورش این گونه می‌باشد.

در طول دورهٔ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین، لاروها بایستی در مواردی که فشار اسمزی در محیط اطراف کاهش پیدا می‌کند، قادر به حفظ حجم آب میان بافتی، جلوگیری از خروج یونها از بدن و جذب یونهای موردنیاز بدن از آب محیط اطراف باشند. در میگوی بزرگ آب شیرین، بعد از تفریخ تخم، اولین مرحلهٔ لاروی زوآ تا حدود دو روز قادر به زیست و بقاء در محیط آب شیرین است که این امر نشاندهنده توانایی بالای تنظیم اسمزی لاروهای این مرحله است. این گونه همچنین زمانی که در معرض دامنهٔ تغییرات زیاد شوری قرار می‌گیرد، توانایی زیادی در تنظیم عناصر بیشینه از خود نشان می‌دهد (Stern *et al.*, 1987; Fungo-Smith *et al.*, 1995; Wilder *et al.*, 1998). مطالعات نشان داده است که با توجه به عدم شکل‌گیری دستگاه تنظیم اسمزی در مراحل اولیهٔ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین، تنظیم اسمزی در مراحل اولیهٔ لاروی با استفاده از آنزیم Na/K-ATPase بر اساس ذخایر ATP موجود در بدن لارو انجام می‌گیرد (Wilder *et al.*, 2009). وقتی که در سخت‌پوستان شوری آب محیط اطراف کمتر از غلظت ایزوتونیک بدن می‌شود، میزان فعالیت این آنزیم جهت جذب یون‌ها از محیط اطراف افزایش می‌یابد (Lucu and Towle, 2003). محققین نشان داده‌اند که در سخت‌پوستان این آنزیم با تبادل سه یون Na^+ از داخل سلول با دو یون K^+ از خارج از غشای سلول و با صرف انرژی از طریق هیدرولیز ATP تنظیم یون‌های سدیم و پتاسیم را انجام می‌دهد (Santos *et al.*, 2007). بنابراین، بهترین غلظت سدیم و پتاسیم در آب لب شور مرکز تکثیر که شرایط ایزوتونیک با آب میان‌بافتی بدن لارو داشته باشد، باعث حداقل فعالیت این آنزیم و حداکثر ذخیرهٔ ATP در بدن لارو و بهبود کیفیت لارو خواهد شد. این تحقیق تأثیر غلظت‌های مختلف یون‌های سدیم و پتاسیم در آب لب‌شور مصنوعی بر شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase با هدف دستیابی به بهترین غلظت این یون‌ها در آب لب شور مرکز تکثیر انجام گردید.

۲. مواد و روشها

تهیه لارو: لاروهای موردنیاز این تحقیق از مولدین با سن ۱±۷ ماه و وزن ۶±۳۵ گرم تهیه شدند. بعد از لارو ریزی، برای جداسازی لاروها از مولدین، از یک سیستم گردشی آب استفاده گردید. سیستم طراحی شده دارای سه مخزن شامل دو مخزن استوانه‌ای و یک مخزن مکعبی بود که مخزن مکعبی با حجم ۳۰۰ لیتر محل نگهداری مولدین و دو مخزن استوانه‌ای با حجم ۱۸۰ لیتر، یکی برای محل تجمع لاروها با سیستم جذب نوری لاروها با نصب توری چشمه ریز در محل خروجی آب و دیگری به‌عنوان بیوفیلتر بودند. غذادهی مولدین با غذاهای تجاری با دو نوبت غذادهی صبح و عصر در حد اشتها انجام گردید. تخم‌گشایی بعد از ۳-۲ روز از زمان انتقال مولدین دارای تخم‌های تیره رنگ بر روی پاهای شنا به مخزن نگهداری مولدین انجام گردید. لاروها با استفاده از جریان گردشی آب و جذب به سمت منبع نور در مخزن مربوط به لاروها جمع آوری شدند. خروجی آب مخزن تجمع لاروها به مخزن بیوفیلتر، دارای توری استوانه‌ای شکل در وسط مخزن با چشمه‌های ۱۵۰ میکرومتر بودند که مانع از خروج لاروها می‌گردید. در این مخزن، لاروهای تجمع‌یافته با استفاده از سطل‌های دارای الک، جداسازی و بعد از شمارش به واحدهای آزمایش منتقل شدند.

۱.۲. تیمارهای آزمایش

سیستم واحدهای آزمایش شامل ظروف ۱۰۰ لیتری با تراکم ۲۰۰ لارو در لیتر بود. هوادهی مخازن به‌صورت استفاده از هواده متمرکز و دمای آب (۲۸ درجه سانتی‌گراد) نیز با استفاده از بخاری

www.SID.ir

Archive of SID

ترموستات‌دار در اتاقک آزمایش انجام شد. نور با شدت ۱۰۰۰ لوکس روشنایی برای ۱۲ ساعت در روز جهت زیست مساعد لاروها تنظیم گردید (Nhan *et al.*, 2009). برای رفع کلر موجود در آب از فیلتر زغالی و تیوسولفات سدیم استفاده شد. غذادهی لاروها نیز با ناپلی آرتمیا (*Artemia franciscana*) سویهٔ دریاچهٔ گریت لیک با تراکم ۱۵-۱۰ عدد ناپلیوس در میلی‌لیتر در دو نوبت صبح و عصر انجام گردید. این تحقیق در دو آزمایش و هر کدام از آزمایش‌ها با چهار تیمار غلظتی سدیم و پتاسیم با سه تکرار در هر تیمار انجام گردید. جهت تنظیم ترکیبات نمکی و یونی پایه در تیمارهای آزمایش، از فرمول آب لب شور مصنوعی نیو (New, 2004) با شوری ۱۲ گرم در لیتر استفاده شد. سپس در آزمایش اول، چهار تیمار ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پتاسیم با استفاده از نمک کلرید پتاسیم و در آزمایش دوم، چهار تیمار ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم با استفاده از نمک کلرید سدیم فراهم شد. تنظیم شوری با شوری‌سنج مدل 85D شرکت YSI انجام شد و اندازه‌گیری پارامترهای مختلف شیمیایی آب در طول تحقیق با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل DR2700 شرکت HACH انجام گردید.

ارزیابی شاخص‌های کیفی لارو: شاخص‌های بازماندگی، شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase و شاخص وضعیت لارو (LCI)[1] جهت ارزیابی تأثیر تیمارهای مختلف غلظتی سدیم و پتاسیم بر کیفیت لاروها به‌صورت زیر استفاده گردید:

۲.۲. درصد بازماندگی لارو

درصد بازماندگی لارو بر اساس دستورالعمل (New, 2004) انجام گردید. بر اساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مورد مطالعه در مراحل لاروی ۱، ۴، ۷ و ۱۱ نمونه‌برداری و با شمارش حجمی درصد بازماندگی لاروها ارزیابی گردید.

۳.۲. شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase

اندازه‌گیری شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین بر اساس روش Wilder و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از کیتهای اندازه‌گیری ATP با نام تجاری ATPlite تهیه شده از شرکت PerkinElmer کشور آمریکا و همچنین قرائت نمونه‌ها نیز با استفاده از دستگاه پلیت ریدر مدل MPR-0020 شرکت PerkinElmer کشور آمریکا انجام گردید.

۳.۲. شاخص وضعیت لارو (LCI)

شاخص وضعیت لارو، یک شاخص کاربردی و مهم برای ارزیابی کیفی لارو میگوی بزرگ آب شیرین است. Tayamen و Brown (۱۹۹۹) این شاخص را با ارزیابی ۲۰ مورد وضعیت کیفی ظاهری لارو و امتیازدهی بصورت اختصاصی برای لارو میگوی بزرگ اب شیرین ارائه کردند. برای این شاخص در مراحل لاروی ۱، ۴، ۷ و ۱۱ از هر تیمار ۳۰ قطعه لارو انتخاب گردید و شاخص وضعیت آنها طبق فرمول Tayamen و Brown (۱۹۹۹) به‌صورت زیر محاسبه گردید:

$$LCI = \Sigma P. (10N)-1$$

در این فرمول: P = امتیاز ثبت شده برای هر لارو

۴.۲. آنالیزهای آماری

قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیر-ویلک[2] بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها از آنالیز تجزیه واریانس یک طرفه استفاده شد. مقایسه میانگین تیمارهای مختلف (با سطح معنی‌داری $P \leq ۰/۰۵$) با آزمون دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام شد.

۳. نتایج

نتایج این تحقیق در دو آزمایش مجزا در تیمارهای مختلف غلظتی سدیم و پتاسیم مربوط به بازماندگی لاروها، شاخص کیفی لارو و شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل مختلف لاروی ثبت گردید. میانگین مهم‌ترین پارامترهای فیزیکوشیمیایی

[1] Larval Condition Index

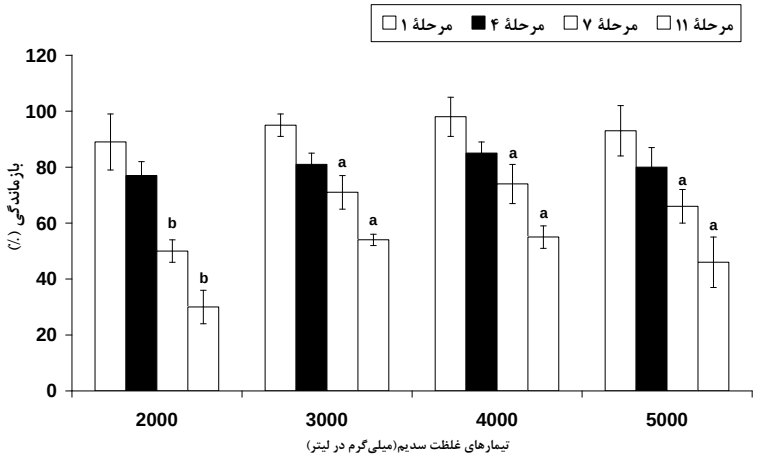
[2] Shapiro-Wilk

www.SID.ir

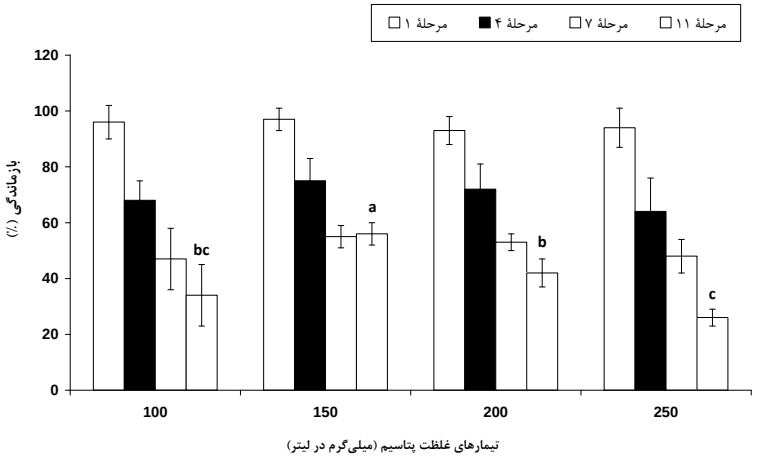
Archive of SID

آب مخـازن و تیمـارهای پرورش لاروها در طول دورۀ آزمایش شـامل درجه حرارت، pH، اکسـیژن محلول، آمونیاک و نیتریت به ترتیب ۰/۵±۲۸ درجه سـانتی گـراد، ۰/۳±۷، ۰/۴±۵/۶ مـیلی‌گرم در لیتر، ۰/۱> مـیلـی‌گـرم در لـیـتـر و ۰/۸> میلی‌گرم در لیتر انـدازه‌گیری و ثبت گردید. با توجه به دما و شـرایط کیفی آب، دورۀ لاروی در آزمایش ۲±۲۷ روز و زمان مشاهدۀ اولین پست‌لارو۱ در آزمایش‌ها در روز بیست و چهارم بود.

نمودار ۱ و ۲ به ترتیب نتایج درصـد بازماندگی لاروهـا در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف غلظت‌های سـدیم و پتاسـیم را نشـان می‌دهد. درصد بازماندگی لاروها در مراحل اول و چهارم لاروی تفاوت معنی‌داری را در بین تیمـارهـای مختلف غلظـت‌های سـدیم نشـان نداد و در مراحل هفتم و یازدهم، تیمار ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سـدیم تفـاوت معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) و پایین‌تری را نسـبت به سـایر تیمارها نشان داد (نمودار ۱). در تیمارهای مختلف غلظت‌های پتاسیم، درصد بازماندگی لاروها در مراحل اول، چهارم و هفتم تفاوت معنی‌داری نشـان ندادند ($P\geq$۰/۰۵) و فقط در مرحلـۀ یـازدهم لاروی تفـاوت بین تیمـارهـا معنی‌دار و تیمـارهـای ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر پتـاسـیم به ترتیب بیشـترین و کمترین بازماندگی لاروها را نشان دادند (نمودار ۲).



نمودار ۱. درصد بازماندگی لارو در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف غلظت‌های سدیم (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در هر مرحلۀ لاروی بیانگر تفاوت معنی دار ($P\leq$۰/۰۵) می‌باشد.



نمودار ۲. درصد بازماندگی لارو در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف غلظت‌های پتاسیم (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در هر مرحلۀ لاروی بیانگر تفاوت معنی دار ($P\leq$۰/۰۵) می‌باشد.

[۱] First postlarvae appearance

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج مربوط به شاخص کیفی لارو در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف غلظت‌های سدیم و پتاسیم، در جداول ۱ و ۲ ارائه گردیده است. شاخص کیفی لارو در مرحلهٔ اول لاروی در هر دو آزمایش مربوط به تیمارهای مختلف غلظت‌های سدیم و پتاسیم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. اما در سایر مراحل لاروی، شاخص کیفی لارو در بین تیمارها دارای تفاوتی معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) و بهترین شاخص کیفی لارو در تیمارهای غلظت‌های مختلف سدیم، در تیمارهای ۳۰۰۰ و ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر (جدول ۱) و در تیمارهای غلظت‌های مختلف پتاسیم، در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر (جدول ۲) ثبت گردید.

جدول ۱. شاخص کیفی لارو (میانگین ± انحراف معیار) در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف سدیم. مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) می‌باشد.

تیمارهای غلظت	شاخص کیفی لارو (LCI) در مراحل مختلف دورهٔ لاروی			
سدیم	مرحلهٔ ۱	مرحلهٔ ۴	مرحلهٔ ۷	مرحلهٔ ۱۱
۲۰۰۰	۱/۸۵±۰/۰۹	۱/۶۶±۰/۰۳^{b}	۱/۶±۰/۰۴^{b}	۱/۵۲±۰/۰۶^{b}
۳۰۰۰	۱/۸۳±۰/۱۷	۱/۷۴±۰/۰۳^{a}	۱/۷۱±۰/۰۴^{a}	۱/۶۶±۰/۱۱^{ab}
۴۰۰۰	۱/۸۸±۰/۱۴	۱/۷۵±۰/۰۶^{a}	۱/۷۴±۰/۰۲^{a}	۱/۷±۰/۰۶^{a}
۵۰۰۰	۱/۸۷±۰/۲۲	۱/۷±۰/۰۹^{ab}	۱/۶۴±۰/۰۳^{b}	۱/۵۸±۰/۰۷^{b}

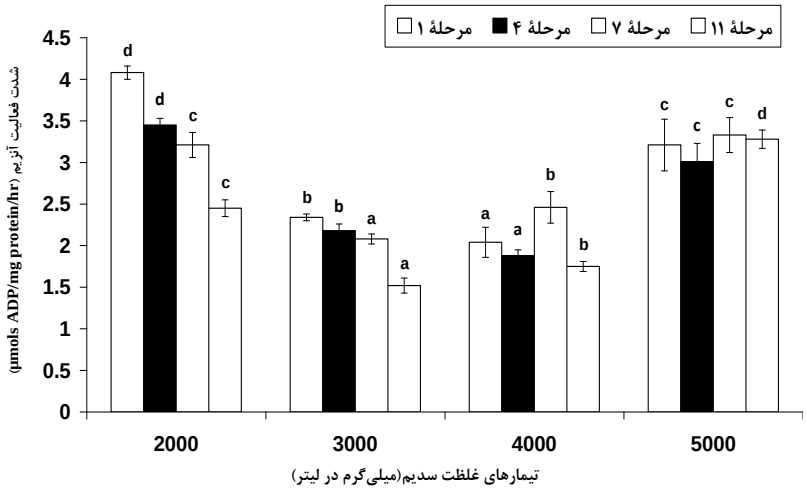
جدول ۲. شاخص کیفی لارو (میانگین ± انحراف معیار) در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف پتاسیم. مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در هر ستون بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) می‌باشد.

تیمارهای غلظت	شاخص کیفی لارو (LCI) در مراحل مختلف دورهٔ لاروی			
پتاسیم	مرحلهٔ ۱	مرحلهٔ ۴	مرحلهٔ ۷	مرحلهٔ ۱۱
۱۰۰	۱/۸۷±۰/۰۷	۱/۸۴±۰/۰۵^{a}	۱/۶۸±۰/۰۵^{b}	۱/۵۶±۰/۰۵^{c}
۱۵۰	۱/۹۱±۰/۰۹	۱/۸۵±۰/۰۴^{a}	۱/۷۸±۰/۰۳^{a}	۱/۷۴±۰/۰۵^{a}
۲۰۰	۱/۸۵±۰/۱	۱/۸۵±۰/۰۳^{a}	۱/۷±۰/۰۳^{b}	۱/۶۴±۰/۰۲^{b}
۲۵۰	۱/۸۵±۰/۱۳	۱/۷۴±۰/۰۵^{b}	۱/۶۶±۰/۰۷^{b}	۱/۴۴±۰/۰۶^{d}

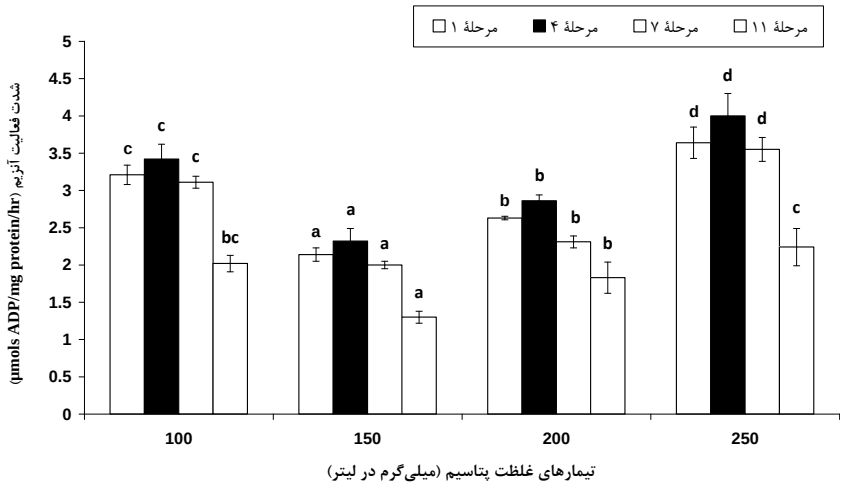
نمودار ۳ و ۴ نتایج مربوط به شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase را در مراحل اول، چهارم، هفتم و یازدهم لاروی نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که شرایط ایزوتونیک با حداکثر ذخیرهٔ ATP با حداقل فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل ۱ و ۴ لاروی و مراحل ۷ و ۱۱ لاروی به ترتیب در تیمارهای ۴۰۰۰ و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم می‌باشد (نمودار ۳). در بین تیمارهای مختلف غلظت‌های پتاسیم در هر چهار مرحلهٔ لاروی، کمترین ($P\leq ۰/۰۵$) شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase با حداکثر ذخیرهٔ ATP در بدن لاروها در تیمار ۱۵۰ میلی‌گرم درلیتر مشاهده گردید (نمودار ۴).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳. شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف غلظت‌های سدیم (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در هر مرحلهٔ لاروی بیانگر تفاوت معنی دار (P≤۰/۰۵) می‌باشد.



نمودار ۴. شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل مختلف لاروی در تیمارهای مختلف غلظت‌های پتاسیم (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون گروهی بوده و حروف متفاوت در هر مرحلهٔ لاروی بیانگر تفاوت معنی دار (P≤۰/۰۵) می‌باشد.

۴. بحث و نتیجه گیری

بیشترین ترکیبات یونی و نمکی موجود در آب لب‌شور مراکز تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین، مربوط به یون‌های دو ظرفیتی کلسیم و منیزیم و یون‌های تک ظرفیتی سدیم و پتاسیم می‌باشد. از دیدگاه زیست‌شناسی، یون‌های دوظرفیتی عمدتاً در پوست‌اندازی و یون‌های تک ظرفیتی در تنظیم اسمزی و یونی آب میان‌بافتی سخت‌پوستان تأثیر مستقیم دارد (Pequeux, 1995). میگوی بزرگ آب شیرین در روند تکاملی سخت‌پوستان از آب‌های شور دریا به طرف آبهای شیرین بینابین میگوهای دریایی و خرچنگ‌های دراز قرار دارد (VanHook and Patel, 2008) و لاروهای این گونه بعد از تفریخ، قادر به زنده‌مانی زیادی در آب شیرین نیستند، زیرا سیستم تنظیم اسمزی در آنها هنوز شکل نگرفته است و باید در محیطی مشابه مناطق مصبی قرار گیرند که از نظر اسمولالیتی و ترکیب یونی مشابه اسمولالیتی و ترکیب یونی آب میان‌بافتی لارو باشد (Houng *et al.*, 2004). بنابراین، در آب مورد استفادا مراکز تکثیر میگوی آب شیرین، فقط شوری آب مهم نیست بلکه مهم‌تر از آن ترکیب نمک‌های

www.SID.ir

Archive of SID

موجود در آن است. در این تحقیق با توجه به شرایط زیست طبیعی لاروها در مناطق مصبی، برای تهیهٔ آب لب شور مرکز تکثیر از ترکیب پایهٔ آب لب‌شور مصنوعی نیو (New, 2004) (شوری ۱۲ گرم در لیتر) استفاده شد و سپس تیمارهای مختلف غلظتی یون‌های تک ظرفیتی سدیم و پتاسیم با استفاده از نمک‌های کلرید سدیم و کلرید پتاسیم برای سنجش شرایط کیفی و فیزیولوژیکی لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج این تحقیق نشان داد که در بیشتر مراحل اولیهٔ لاروی، شاخص بازماندگی در تیمارهای مختلف غلظت‌های پتاسیم و منیزیم فاقد تفاوت معنی‌دار اما شاخص کیفی لارو و شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase معنی‌دار بود و تفاوت‌ها را در کیفیت لاروها بهتر نشان دادند. در سخت‌پوستان اصطلاح "کیفیت لارو" عموماً به شرایط فیزیولوژیک لارو برمی‌گردد که این امر در بازماندگی، تکوین و رشد در دوره لاروی تأثیر مستقیم می‌گذارد (Racotta *et al.*, 2003). بازماندگی و کیفیت لارو میگوی بزرگ آب شیرین در مراکز تکثیر مستقیماً به حفظ فاکتورهای کیفی آب و شرایط تغذیه‌ای بستگی دارد (Armstrong *et al.*, 1976). لاروهای میگوهای آب شیرین نسبتاً مقاوم بوده و در بیشتر مواقع لاروها با کیفیت پایین از بین نمی‌روند و علی‌رغم درصد بازماندگی بالاو در مرحلهٔ پرروشی دورهٔ پرورش و هزینه‌های پرورش را به شدت بالا می‌برند. بنابراین، ارزیابی کیفیت لاروها بر اساس شاخص شرایط کیفی لارو و شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase تفاوت‌ها در شرایط فیزیولوژیک و کیفیت لاروها را بهتر نشان می‌دهد. بر اساس نتایج این تحقیق، تفاوت‌ها در شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در شاخص شرایط کیفی لارو تأثیر گذار و قابل مشاهده است اما در بازماندگی لاروها به‌خصوص در مراحل اولیهٔ لاروی قایل مشاهده نیست.

بر اساس نتایج به دست آمده کمترین فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در شرایط ایزوتونیک بدن لارو که باعث ذخیرهٔ ATP بدن لارو می‌شود، در مراحل اولیهٔ لاروی در مراحل ۱ و ۴ در تیمار ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم مشاهده شد اما در مراحل پایانی دورهٔ لاروی در مراحل ۷ و ۱۱ در تیمار ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم به‌دست آمد. وقتی که در سخت‌پوستان شوری آب محیط اطراف کمتر از غلظت ایزوتونیک بدن یا بیشتر از غلظت ایزوتونیک بدن باشد، میزان فعالیت این آنزیم جهت تنظیم یون‌ها در آب میان بافتی تغییر می‌کند (Lucu and Towle, 2003). همچنین نشان داده شده است که فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در تنظیم اسمزی سخت‌پوستان و به‌خصوص سخت‌پوستانی که یوری‌هالین[۱] هستند اهمیت زیادتری دارد و فعالیت این آنزیم باعث جذب و عبور یون‌های تک‌ظرفیتی از طریق لامل‌های آبششی یا سطح پوست می‌شود (Wilder *et al.*, 2000). این آنزیم با تبادل سه یون Na^+ از داخل سلول با دو یون K^+ از خارج از غشای سلول و با صرف انرژی از طریق هیدرولیز ATP تنظیم یونی را در آب میان‌بافتی انجام می‌دهد (Santos *et al.*, 2007). در میگوی بزرگ آب شیرین، در مراحل انتهایی دورهٔ لاروی دستگاه تنظیم اسمزی شکل می‌گیرد (New, 2004) و به نظر می‌رسد با تشکیل سیستم تنظیم اسمزی نقش آنزیم Na/K-ATPase و شدت فعالیت آن کمتر می‌شود. از طرفی دیگر نیز در مراحل انتهایی دورهٔ لاروی ترجیح اسمزی میگوی بزرگ آب شیرین تغییر کرده و موجود محیط آب شیرین رودخانه را به محیط لب‌شور مصبی ترجیح می‌دهد.

بر عکس سدیم که در مراحل مختلف لاروی حداقل شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase تغییر می‌کند، در خصوص پتاسیم این روند ثابت بوده و غلظت بهینهٔ پتاسیم برای تمام مراحل لاروی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. به نظر می‌رسد در میگوی بزرگ آب شیرین، شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase عمدتاً تحت تأثیر غلظت یون سدیم در محیط اطراف و مستقل از غلظت یون پتاسیم می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که بیشترین فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در سخت‌پوستان درست قبل از پوست‌اندازی و بعد از پوست‌اندازی اتفاق می‌افتد (Towle *et al.*, 1976). این امر

[۱] Euryhaline

www.SID.ir

Archive of SID

به‌خصوص در دورهٔ لاروی که توالی پوست‌اندزی بالاست اهمیت بسیار زیادی دارد. محققین تأثیر شوری آب محیط اطراف را بر میزان فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در گونه‌های میگوی پا سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) (Palacios *et al.*, 2004) و گونهٔ میگوی آب شیرین آمازون (*Macrobrachium amazonicum*) (Leon *et al.*, 2012) نشان داده‌اند. اما نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در گونهٔ *M. rosenbergii* میزان فعالیت این آنزیم در مراحل مختلف لاروی تحت تأثیر غلظت‌های متفاوت سدیم و پتاسیم می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل اول و دوم لاروی میگوی بزرگ آب شیرین افزایش می‌یابد (Houng *et al.*, 2004) که نتایج به‌دست آمده مشابه نتایج تحقیق حاضر است. به‌طور کلی بر اساس نتایج به دست آمده، کیفیت لارو میگوی بزرگ آب شیرین بر اساس شدت فعالیت آنزیم Na/K-ATPase شاخص بهتری نسبت به شاخص کیفی لارو و بازماندگی لاروها می‌باشد. نتایج نشان دادکه شرایط بهینهٔ ایزوتونیک و حداقل فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در مراحل اولیهٔ لاروی در مراحل ۱ و ۴ در تیمار ۴۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم بود اما در مراحل پایانی دورهٔ لاروی در مراحل ۷ و ۱۱ در تیمار ۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر سدیم به‌دست آمد، در حالی‌که غلظت بهینهٔ پتاسیم و حداقل فعالیت آنزیم Na/K-ATPase برای تمام مراحل لاروی ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد.

۵. تقدیر و تشکر

بدینوسیله از دکتر مایکل فرینسکو از مرکز توسعهٔ علوم شیلاتی دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی و مهندس محمد مهدی شعیری کارشناس ارشد پژوهشی مرکز تکثیر و پرورش میگوی بزرگ آب شیرین قصرشیرین بخاطر راهنمایی‌های فنی صمیمیانه تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. این تحقیق در قالب طرح پژوهشی شماره ۲۶۷۱۳۱/۱/۱ با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده است.

References

Armstrong, D.A., Stephenson, M.J., Knight, A.W., 1976. Acute toxicity of nitrite to larvae of the giant Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture* 9, 39-46.

Augusto, A., Pinheiro, A.S., Greene, L.J., Laure, H.J., McNamara, J.C., 2009. Evolutionary transition to freshwater by ancestral marine Palaemonids: evidence from osmoregulation in a tide pool shrimp. *Aquatic Biology* 7, 113-122.

Cavalli, R.O., Lavens, P., Sorgeloos, P., 2001. Reproductive performance of *Macrobrachium rosenbergii* females in captivity. *Journal of the World Aquaculture Society* 32, 60-67.

Cheng, W., Liu, C.H., Cheng, C.H., Chen, J.C., 2003. Osmolality and ion balance in giant river prawn *Macrobrachium rosenbergii* subjected to changes in salinity: role of sex, *Aquaculture Research* 34, 555-560.

Funge-Smith, S.J., Taylor, A.C., Whitley, J., Brown, J.H., 1995. Osmotic and ionic regulation in the giant Malaysian fresh water prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man), with special reference to strontium and bromine. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 110, 357-365.

Houng, D.T.T., Wang, T., Bayley, M., Phuong, N.T., 2010. Osmoregulation, growth and moulting cycles of the giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) at different salinities. *Aquaculture Research* 41, 135-143.

Huong, D.T.T., Jayasankar, V., Jasmani, S., Saido-Sakanaka, H., Wigginton, A.J., Wilder, M.N., 2004. Na/K-ATPase activity during larval development in the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of salinity on survival rates. *Fisheries Science* 70, 518-520.

Leone, F., Masui, D., Souza Bezerra, T., Garçon, D., Valenti, W., Augusto, A., McNamara, J., 2012. Kinetic Analysis of Gill (Na^+,K^+)-ATPase Activity in Selected Ontogenetic Stages of the Amazon River Shrimp, *Macrobrachium amazonicum* (Decapoda, Palaemonidae): Interactions at ATP- and Cation-Binding Sites. *The Journal of Membrane Biology* 245, 201-215.

Lucu, Č., Towle, D.W., 2003. Na^+K^+-ATPase in gills of aquatic crustacea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 135, 195-214.

Menasveta, P., Piyatiratitivokul, S., 1980. A comparative study on larviculture techniques for the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). *Aquaculture* 20, 239-

www.SID.ir

Archive of SID

249.

New, M.B., 2000. Commercial freshwater prawn farming around the world. In: New, M.B., Valenti, W.C. (Eds.), Freshwater prawn culture: the farming of *Macrobrachium rosenbergii*. Blackwell Science. Oxford, England, pp. 290–325.

New, MB., 2002. Farming Freshwater Prawns a Manual for Culture of the Giant River Prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). FAO publication. Rome, 212 p.

New, MB., 2004. Farming freshwater Prawns a manual for culture of the giant river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Aquaculture* 231, 597-600.

New, M.B., 2005. Freshwater prawn farming: global status, recent research and a glance at the future. *Aquaculture Research* 36, 210-230.

Nhan, D.T., Wille, M., Hung, L.T., Sargeloos, P., 2009. Compersion of reproductive performance and offspring quality of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) broodstock from different regions. *Aquaculture* 298, 36-42.

Palacios, E., Bonilla, A., Luna, D., Racotta, I.S., 2004. Survival, Na+/K+-ATPase and lipid responses to salinity challenge in fed and starved white pacific shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. *Aquaculture* 234, 497-511.

Pequeux, A., 1995. Osmotic regulation in crustacean. *Journal of Crustacean Biology* 15, 1-60.

Racotta, I.S., Palacios, E., Ibarra, A.M., 2003. Shrimp larval quality in relation to broodstock condition. *Aquaculture* 227, 107-130.

Rainbow, P.S., 1997. Ecophysiology of trace metal uptake in Crustaceans. *Esturine, Coastal and Shelf Science* 44, 169-175.

Santos, L.C.F., Belli, N.M., Augusto, A., Masui, D.C., Leone, F.A., McNamara, J.C., Furriel, R.P.M., 2007. Gill (Na^+,K^+)-ATPase in diadromous, freshwater palaemonid shrimps: Species-specific kinetic characteristics and α-subunit expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 148, 178-188.

Stern, S., Borut, A., Cohen, D., 1987. Osmotic and ionic regulation of the prawn *Macrobrachium rosenbergii* (DeMan). *Comparative Biochemistry and Physiology* 86A, 373-379.

Tayamen, M., Brown, J.H., 1999. A condition index for evaluating larval quality of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man 1879). *Aquaculture Research* 30, 917-922.

Towle, D.W., Palmer, G.E., Harris, J.L. III, 1976. Role of gill Na^+/K^+-dependent ATPase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *Journal of Experimental Zoology* 196, 315–322.

VanHook, A.M., Patel, N.H., 2008. Crustaceans. *Current Biology* 18, R547-R550.

Wickins, J.F., Bread, T.W., 1974. Observations on the breeding and growth of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (De Man) in the laboratory. *Aquaculture* 3, 159-174.

Wilder, M.N., Ikuta, K., Atmomarsono, M., Hatta, T., Komuro, K., 1998. Changes in osmotic and ionic concentrations in the hemolymph of *Macrobrachium rosenbergii* exposed to varying salinities and correlation to ionic and crystalline composition of the cuticle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 119, 941-950.

Wilder, M.N., Thi Thanh Huong, D., Atmomarsono, M., Hien, T.T.T., Quoc Phu, T., Yang, W.-J., 2000. Characterization of Na/K-ATPase in *Macrobrachium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 125, 377-388.

Wilder, M.N., Huong, D.T.T., Jasmani, S., Jayasankar, V., Kaneko, T., Aida, K., Hatta, T., Nemoto, S., Wigginton, A., 2009. Hemolymph osmolality, ion concentrations and calcium in the structural organization of the cuticle of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: Changes with the molt cycle. *Aquaculture* 292, 104-110.

Yen, P.T., Bart, A.N., 2008. Salinity effects on reproduction of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture* 280, 124-128.

www.SID.ir