

"مقاله پژوهشی"

تأثیر ریز جلبک *Nannochloropsis oculata* غنی شده با مکمل های تغذیه ای ال-کارنتین و ال-آرژنین بر پروفیل اسیدهای چرب و برخی پارامترهای رشد و بلوغ در *Artemia franciscana*

امیر مجتبی ستوده^۱، امیر هوشنگ بحری^{۱*}، علیرضا سالارزاده^۱

۱- گروه شیلات، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۲۴

چکیده

ارزش غذایی و ویژگی های خاص آرتمیا سبب گردیده که به عنوان یک غذاومدل بیولوژیک در آبرزی پروری استفاده شود. مکمل ال-کارنتین موجب تحریک اکسیداسیون اسیدهای چرب، افزایش احتباس نیتروژن و مقاومت استرس های محیطی و مکمل تغذیه ای ال-آرژنین در سنتز پروتئین، نیتریک اسید و هورمون رشد بر رشد و بقا موثر هستند. در این تحقیق تأثیر ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* غنی شده با مکمل های ال-کارنتین و ال-آرژنین بر رشد، استرس محیطی، همواری مطلق و پروفایل اسید چرب در آرتمیا فرانسسیکانا بررسی گردید. این مکمل ها به صورت مجزا با دوزهای ۰، ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر اعمال شدند. سیست آرتمیا در شرایط خاص تفریح و ناپلیوس ها با تغذیه از ریز جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* با دو فرم غنی شده و بدون غنی سازی (تیمار کنترل) جداگانه در ۳۰ روز تغذیه گردید. تمام نتایج با یکدیگر مقایسه و نشان داد که بیشترین اسید چرب اشباع (SFA) در تیمار تغذیه غنی با ال-کارنتین ۱۰ میلی گرم در لیتر و کمترین آن مربوط به تیمار کنترل بود. بالاترین درصد تلفات شوک آمونیاکی مربوط به تیمار غنی با ۱ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر ال-کارنتین بود، که با تیمار کنترل اختلاف معنی داری نشان داد ($p < 0/05$) و کمترین آن مربوط به تیمار ۱ میلی گرم در لیتر ال-کارنتین و تیمار کنترل دیده شد. در شوک هیپوکسی بالاترین درصد تلفات در تیمار تغذیه با ال-کارنتین ۱ و ال-آرژنین ۱ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین آن در تیمار تغذیه با ال-کارنتین ۱۰ میلی گرم در لیتر مشاهده شد که همگی با تیمار کنترل اختلاف معنی دار نشان دادند ($p < 0/05$). در مولدین بالغ آرتمیا، کمترین شاخص های کیفی مربوط به تیمار تغذیه با ال-کارنتین در تمامی دوزها به جز دوز ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر آن و بالاترین آن مربوط به تیمار تغذیه از ال-آرژنین به جز دوز ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به همراه دوز ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ال-کارنتین بود، که با تیمار کنترل اختلاف معنی دار نشان دادند ($p < 0/05$). بیشترین مقدار همواری مطلق مربوط به تیمار تغذیه ای غنی با ال-آرژنین ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین آن تیمار کنترل بود، که نشان از تأثیر مثبت هر دو مکمل بر افزایش همواری مطلق دارد. در مجموع نتایج نشان داد استفاده از مکمل های تغذیه ای ذکر شده با میکرو جلبک *نانوکلروپسیس اکولاتا* در تغذیه آرتمیا فرانسسیکانا در دوزهای مشخص می تواند در افزایش تولید و کیفیت در صنعت آبرزی پروری موثر باشد. بنابراین با توجه به شرایط استرس محیطی، بهبود عملکرد همواری و حصول شاخص کیفی بالاتر می توان از دوزهای بهینه هر کدام از مکمل ها استفاده نمود.

کلمات کلیدی: آرتمیا فرانسسیکانا، *نانوکلروپسیس اکولاتا*، ال-کارنتین، ال-آرژنین، پروفایل اسیدهای چرب، همواری

مقدمه

طی دو دهه گذشته آرتمیا یا همان میگوی آب شور بسیار مورد توجه پرورش دهندگان آبزیان در زمینه مباحث نوین قرار گرفته و پیوسته تحت عنوان ماده غذایی بدون جایگزین در مراکز پرورش میگو و ماهیان دریایی کاربرد ویژه دارد (Sorgeloos *et al.*, 2001). استفاده از آرتمیا برای تغذیه انواع آبی از سال ۱۹۳۹ آغاز شده است. عواملی مانند فیلترکنندگی غیرانتخابی آرتمیا سبب گردیده از تمام مواد غذایی و غیر غذایی که از نظر اندازه قابلیت ورود به دهان را داشته باشد، تغذیه و در نتیجه از آن می‌توانیم تحت عنوان ناقل انواع مواد غذایی - ویتامین‌ها (Watanabe *et al.*, 1983) و مواد دارویی مانند انواع آنتی‌بیوتیک‌ها (Dixon *et al.*, 1995) و انواع مختلف واکسن‌ها (Campbell *et al.*, 1993) از طریق تکنیک غنی‌سازی نام ببریم. بهبود کیفیت این غذای زنده مهم از طرفی نیز به نحوه تغذیه مطلوب آن بستگی دارد. در این میان می‌توان به انواع میکروجلبک‌ها به‌عنوان غذای طبیعی و مطلوب مورد نیاز آرتمیا اشاره نمائیم. ریز جلبک‌ها یا همان فیتوپلانکتون‌ها قادرند با کمک املاح معدنی محیط، نور خورشید و گاز دی‌اکسید کربن مواد مغذی تولید و در خود ذخیره و طی فرایند فتوسنتز اکسیژن را در محیط آزاد نمایند (Priyadarshani and Roth, 2012). در سال‌های اخیر، میکروارگانسیم‌های فوتوتروفیک اکسیژنیک مانند سیانوباکتریوم و ریز جلبک‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. زیرا مدل‌های ایده آلی برای بسیاری از کاربردها هستند. آنها با کمترین مقدار مواد مغذی مانند نور، شکر، دی‌اکسید کربن، ازت، پتاسیم و فسفر به سرعت شکوفا می‌شوند (Behera, 2015). جلبک‌های

سبز از قبیل نانوکلوپسیس اکولاتا کاربردهای بیوشیمیایی، دارویی و مصارف دامی بعنوان پلانکتون زنده دارند (Shah and Abdulla, 2018). تأثیر سازنده ریزجلبک نانوکلوپسیس اکولاتا بر روند رشد مراحل مختلف چرخه زندگی برخی زئوپلانکتون‌ها و دوره لاروی گونه‌هایی از آبزیان به اثبات رسیده است (Gihan *et al.*, 2020). استفاده از تکنیک‌های غنی‌سازی ریز جلبک‌ها توسط انواع مکمل‌های غذایی مانند ال-کارنتین و ال-آرژنین می‌تواند کمک زیادی به افزایش ارزش غذایی آنها جهت بهتر شدن کیفیت بافت آرتمیا نماید. نقش مکمل ال-کارنتین در افزایش هماوری مولدین نر و ماده در ماهی تیلاپیا نیز به اثبات رسیده است (Fath El Bab *et al.*, 2019). ال-کارنتین به عبارتی نوعی پروویتامین بوده و از چندین جهت حائز اهمیت است. از آن جمله می‌توان این ماده را تحت عنوان افزایش‌دهنده رشد سبب متابولیسم چربی شده و در نتیجه باعث صرفه‌جویی در مصرف پروتئین جیره غذایی می‌گردد. با جذب اسیدهای چرب در ساختار بدن، موجود زنده در برابر استرس ناشی از انباشتگی آمونیاک محیط آبی و نوسانات دمایی مقاوم‌تر و پروتئین بالاتری حاصل می‌گردد (Dai *et al.*, 2018). ال-آرژنین با افزایش عملکرد پروتئین میوزین در آبزیان توسط کاهش حرارت در آن نقش کاربردی در صنعت آبی پروری ایفا می‌کند (Tong *et al.*, 2020). همچنین عدلو و همکاران (۱۳۹۵)، با استفاده از تکنیک غنی‌سازی آرتمیا توسط اسیدهای چرب MUFA، PUFA، HUFA سبب افزایش کیفیت تغذیه‌ای آن جهت استفاده بعنوان غذای زنده در جیره میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) گردید. با توجه به مطالب فوق هدف از مطالعه حاضر

عملیات تفریخ، رهاسازی و پرورش آرتمیا

جهت انجام این بخش از عملیات آزمایشگاهی سیستم آرتمیا فرانسیسکانا از بندر جاسک تهیه شد. تعداد ناپلیوس برای هر لیتر آب ۵۰۰ عدد در نظر گرفته شد (Sorgeloos, 1996). به ازای هر زوک ۴۰ لیتری ۲۰۰۰۰ عدد رهاسازی شد (در مجموع ۱۰۸۰۰۰۰ ناپلیوس). پس از دکپسوله کردن سیستم در زوک تفریخ ۱۰ لیتری، بعد از ۳۶ ساعت ناپلیوس‌های حاصل به زوک‌های ۴۰ لیتری با شوری نمک دریایی ۳۲ گرم در لیتر، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شدت نوری ۲۵۰۰ لوکس منتقل شدند.

تهیه و شمارش سلولی استوک میکروجلبک‌ها

در تحقیق حاضر بعد از تهیه استوک میکروجلبک نانوکروپسیس اکولاتا اقدام به کشت آن گردید. استوک‌ها از فایکولب مرکز تکثیر و بازسازی ذخایر آذربایجان خلیج فارس بندر شهید کلاهی شهرستان میناب تهیه شدند. مقدار استوک ۱ لیتر بود، که بعد از تهیه و درب‌بندی به دور از تابش مستقیم نور بلافاصله به فایکولب آزمایشگاه غذای زنده دانشگاه آزاد اسلامی بندرعباس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. در آزمایشگاه اقدام به هوادهی متوسط در شدت نور ۲۰۰۰ لوکس فلوروسنت نمودیم. شمارش سلول جلبکی استوک مورد نظر زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی لنز ۴۰ و توسط لام نئوبار (هموسیتومتر) انجام شد. در نتیجه تعداد نهایی $9/5 \times 10^6$ سلول در میلی‌لیتر برای استوک نانوکروپسیس اکولاتا بدست آمد.

بررسی بهبود شاخص‌های رشد، عملکرد تولید مثلی و هماوری و نیز بهبود عملکرد پروفایل اسیدهای چرب در آرتمیا فرانسیسکانای تغذیه شده توسط ریزجلبک نانوکروپسیس اکولاتا غنی شده با مکمل‌های ال-آرژنین و ال-کارنتین در سلولهای میکروجلبکی و بدست آوردن دوز صحیح عملکردی بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر متقابل جیره غذایی و بستر محل زیست کرم‌ها، سه جیره غذایی با سطوح پروتئینی ۲۰، ۲۵، ۳۰ و دو بستر خاکی شامل ۱- هوموس (خاک هوموس) و ۲- خاک ترکیبی ۷۰ به ۳۰ هوموس و خاک پیت ماس در نظر گرفته شد. این تحقیق در قالب طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با ۶ تیمار و از هر تیمار ۳ تکرار اجرا گردید.

طرح آزمایش

این تحقیق در دو بازه زمانی ۸۶ روزه در زمستان‌های ۱۳۹۵ و ۱۳۹۶ در آزمایشگاه غذای زنده آذربایجان و فایکولب دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندرعباس، آزمایشگاه سنجش آلودگی زیر مجموعه اداره کل حفاظت محیط زیست استان هرمزگان و آزمایشگاه کنترل کیفی دانشگاه تهران انجام شد. این تحقیق در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با ۸ تیمار تغذیه-ای آرتمیا از ریزجلبک نانوکروپسیس اکولاتا (NCh) ترکیب شده با دوزهای ۱، ۱۰، ۱۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر ال-کارنتین (LC) و ال-آرژنین (LA) و یک تیمار کنترل (NCh B) (مجموعاً ۹ تیمار) (هر تیمار با ۳ تکرار) در نظر گرفته شد. برای این منظور از ۲۷ زوک استفاده شد (خامه چین و همکاران، ۱۳۹۲).

بوده که این کار توسط شمارش روزانه سلولهای جلبکی حاصل گردید.

غنی سازی ریز جلبک با مکمل ها

غنی سازی میکرو جلبک های نانو کلروپسیس اکولاتا با مکمل های غذایی ال- کارنتین و ال- آرژنین با چهار دوز متفاوت ۱، ۱۰۰، ۱۰۰۰، ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر بصورت جداگانه برای هر ریز جلبک صورت پذیرفت. برای این منظور اقدام به تهیه رقت های سریالی برای مکمل ها نمودیم. ابتدا از ال- کارنتین خالص ۱۰۰۰۰۰ میلی گرم در ارلن محتوی ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده تا به دوز ۱۰۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر (۱۰۰۰۰۰ ppm) برسد. در ادامه ۱۰۰ میلی گرم از این حجم در ارلن حاوی ۹۰۰ میلی لیتر آب مقطر وارد نموده تا دوز ۱۰۰۰۰ میلی گرم در لیتر حاصل گردد. این مراحل را بصورت متوالی تا رسیدن به دوز ۱۰ میلی گرم در لیتر ادامه داده و در مجموع ۴ ارلن یک لیتری از رقت های ۱، ۱۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰۰۰۰ ال- کارنتین حاصل گردید. برای تهیه رقت های سریالی ال- آرژنین نیز دقیقاً همین عملیات انجام شد. جهت کشت جلبکی روزانه از ارلن هایی که کشت و انبوه سازی استوک در آنها صورت پذیرفته، نمونه ای تهیه و شمارش سلولی انجام گرفت. زمانیکه تعداد سلول نانو کلروپسیس به عدد 9×10^6 (فاز ایستایی) رسید، اقدام به غنی نمودن آنها با غلظت های متفاوت مکمل های تعیین شده نمودیم.

شروع تغذیه فعال آرتیمیا

بعد از رهاسازی ناپلیوس های تازه تفریخ شده به زوک ها به میزان ۵۰ ناپلی در هر میلی لیتر (ضیائی نژاد، ۱۳۹۳)، بعد از ۸ ساعت و جذب کیسه زرده و شنا فعال

فرمول محاسبه تعداد سلول جلبک بر روی لام نئوبار (هموسیتمتر) با ۲۵ مربع:

تعداد کل سلولها در ۲۵ مربع = تعداد سلولها در ۵ مربع بصورت تصادفی $5 \times$

تعداد سلولهای جلبکی در ۱ میلی لیتر نمونه (محیط کشت یا زوک) = $10^4 \times$ تعداد کل سلول در ۲۵ مربع (Haran, 1992).

کشت و پرورش میکرو جلبک ها

جهت کشت جلبکی از محیط کشت گیلارد (Guillard's/f/2)، شامل ۳ میلی لیتر ویتامین- مواد مغذی (به ازای هر لیتر ترکیب آب و جلبک) و ۱ میلی لیتر سیلیکات (به ازای هر لیتر ترکیب آب و جلبک) استفاده شد. آب مورد استفاده جهت محیط کشت گیلارد آب دریا تصفیه شده بود، که از پژوهشکده اکولوژی خلیج فارس بندرعباس تهیه گردید. سپس توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱/۵ درجه سانتی-گراد و فشار ۲ اتمسفر بمدت ۲۰ دقیقه استریل شد. شوری آب دریا در زمان انجام تحقیق ۴۲ گرم در لیتر اندازه گیری شد. رقیق سازی املاح آن با افزودن مکرر آب مقطر اتوکلاو شده و چک کردن توسط شوری سنج به دفعات انجام شد. در نهایت شوری به ۲۷ گرم در لیتر رسانده شد، که معادل میزان شوری استوک اولیه تهیه شده از مرکز بود. کشت جلبکی در ۲ ارلن ۴ لیتری برای هر میکرو جلبک بصورت جداگانه به تناسب ۱۰ درصد استوک و ۹۰ درصد آب دریا و محیط کشت انجام گرفت. دمای محیط پس از پایان این بخش از عملیات ۲۵ درجه سانتی گراد و شدت نور $350 \pm$ ۳۵۰ لوکس و دوره نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی (۷ شب تا ۷ صبح تاریکی و ۷ صبح تا ۷ شب روشنایی) در نظر گرفته شد. مدت در نظر گرفته شده برای هر گروه جلبکی زمان رسیدن تا فاز ایستایی

استرس آمونیاکی

جهت محاسبه شوک استرس آمونیاکی در پایان دوره پرورش ۲۰ آرتمیا از هر زوک توسط تورپلانکتون‌گیر با چشمه ۵۰ میکرومتر خارج و به بطری‌های شفاف ۱ لیتری منتقل شدند. آرتمیاها در معرض غلظت کشنده ۲ میلی‌گرم در لیتر آمونیاک قرار گرفتند. عمل هوادهی متوسط همراه با درب بندی کامل انجام شد و پس از ۴۸ ساعت میزان تلفات ثبت گردید (Mugnier and Justou, 2004).

$$T = S/D \times 100$$

T=درصد تلفات

S=تعداد تلفات

D=تعداد کل نمونه‌ها

شاخص کیفیت (Ojolic et al., 1995)

$$K = W/L3 * 100$$

K=شاخص کیفیت

W=وزن ماهی (گرم)

L=طول ماهی (سانتی‌متر)

هماوری مطلق

هماوری مطلق از تقسیم تعداد کل تخمک‌های خارج شده بر وزن کل محاسبه شد (Biswas, 1993).

$$F = N/G$$

F=هماوری مطلق

N=میانگین تعداد تخم‌های مولد

G=وزن مولد

تعیین ترکیب اسیدهای چرب

جهت استخراج چربی، مقدار یک گرم از نمونه به درون دکانتور منتقل شد. سپس ۷ میلی‌لیتر متانول به نمونه اضافه شد. دکانتور به مدت ۱ دقیقه بشدت توسط ورتکس تکان داده شد. بعد از آن ۱۴ میلی‌لیتر محلول

صورت‌گرفت (Sorgeloos, 1980). میکروجلبک نانوکلوپسیس اکولاتا غنی شده با ال-کارتین و ال-آرژنین با غلظت‌های متفاوت ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به هر اضافه شد.

مراحل پرورش آرتمیا از ابتدا تا مولد

دوره پرورش از زمان دکپسوله شدن سیست‌ها تا بلوغ کامل و رهاسازی تخمک‌ها ۳۰ روز طول کشید. در انتهای عملیات برخی شاخص‌های رشد، بلوغ، استرس محیطی و اسیدچرب اشباع اندازه‌گیری شدند.

شاخص‌های رشد و بلوغ در آرتمیا فرانسیسکانا

استرس کمبود اکسیژن

جهت محاسبه شوک کمبود اکسیژن در پایان دوره پرورش تعداد ۲۰ عدد آرتمیا از هر زوک توسط تورپلانکتون‌گیر با چشمه ۵۰ میکرومتر خارج به بطری‌های شفاف ۱ لیتری منتقل شدند. بعد از هوادهی شدید تا حد اکسیژن اشباع، جریان هوا قطع شد تا اکسیژن به ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر رسید. سپس درب بطری‌ها محکم بسته شدند تا جریان تبادل هوا فقط با شیلنگ محدود شود. در مدت ۴۸ ساعت با خاموش و روشن کردن مکرر پمپ‌ها میزان اکسیژن در ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر ثابت نگهداری شد. آنگاه ناپلی‌ها شمارش شدند (Mugnier et al., 2008).

$$T = S/D \times 100$$

T=درصد تلفات

S=تعداد تلفات

D=تعداد کل نمونه‌ها

نتایج

تأثیر تغذیه از ریزجلبک نانو کلروپسیس اکولاتا غنی شده با دوزهای متفاوت مکمل‌های غذایی ال-کارنتین و ال-آرژنین بر پروفیل درصد اسیدچرب اشباع آرتمیا فرانسسیسکانا در تیمارهای مختلف در جدول ۱ آورده شده است. در این تحقیق بالاترین میزان اسیدهای چرب اشباع مربوط به تیمار NCh.LC10 و کمترین مقدار مربوط به تیمار کنترل بود ($p < 0/05$).

در جدول ۲ تأثیر میکروجلبک غنی شده با ال-کارنتین و ال-آرژنین بر فاکتورهای تلفات ناشی از شوکهای آمونیاکی و کمبود اکسیژن، میزان هماوری مطلق و شاخص کیفی در آرتمیا فرانسسیسکانا آورده شده است. با توجه به جدول مذکور بالاترین درصد تلفات ناشی از شوک آمونیاکی مربوط به مکمل ال-کارنتین با دوزهای ۱ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین تلفات مربوط به تیمار کنترل و تیمار غنی با ال-آرژنین ۱ میلی گرم در لیتر مشاهده شد ($p < 0/05$). بیشترین تلفات استرس کمبود اکسیژن مربوط به تغذیه از مکمل ال-کارنتین با دوز ۱ میلی گرم در لیتر و کمترین مربوط به تیمار تغذیه از ال-کارنتین با دوز ۱۰ میلی گرم در لیتر بدست آمد ($p < 0/05$). بالاترین مقدار هماوری مطلق مربوط به تغذیه از ال-آرژنین ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و کمترین آن مربوط به تیمار کنترل بود ($p < 0/05$). در بررسی شاخص کیفی در آرتمیای بالغ بالاترین کیفیت مربوط به تیمارهای تغذیه از ال-آرژنین ۱۰۰، ۱۰، ۱ و ال-کارنتین ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر بود ($p < 0/05$).

کلروفورم به آن اضافه و مجدداً بمدت ۱ دقیقه شدیداً تکان داده شد. در ادامه دکانتورها در مکان تاریک و ایزوله بمدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. به منظور استری نمودن چربی از روش Firestone و همکاران ۱۹۹۸ استفاده شد. برای بررسی و شناسایی اسیدهای چرب موجود در نمونه‌ها از دستگاه گاز کروماتوگراف (GC) فیلیپس مجهز به ستون کاپیلاری از نوع SGE BPX70 ($60m \times 0/32mm$ ID $\times 0/25.m$ -film thickness) و آشکارساز یونش شعله‌ای (FID Flame Ionization Detector) استفاده گردید. ۰/۲ میکرولیتر از نمونه استری با استفاده از سرنگ میکرولیتری به دستگاه گاز کروماتوگراف تزریق شد. در این روش از گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد به عنوان گاز حامل و گاز هیدروژن بعنوان سوخت، ازت با خلوص ۹۹/۹ درصد بعنوان گاز کمکی و هوای خشک استفاده شد. از مقایسه زمان بازداری کروماتوگرام‌های بدست آمده از محلول استاندارد اسیدهای چرب متیل استر، اسیدهای چرب موجود در عضله آرتمیا شناسایی شد و نتایج بصورت درصد گزارش گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون واریانس یک طرفه و برای بررسی معنی دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد ($p < 0/05$). همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم افزار Excel انجام گرفت. در پایان نتایج با نرم افزار SPSS مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

جدول ۱: میزان اسیدهای چرب اشباع (میلی گرم در گرم) در تیمارهای مختلف

شاخص تیمار	C18	C17	C16	C15	C14	C12	C10
NCh.B	۶.۸۶۴±۰.۰۵۵ ^d	۲.۳۱۴±۰.۰۰۱ ^b	۱.۸۲۰±۰.۰۰۳ ^a	۱.۲۰۳±۰.۰۰۱ ^d	۱.۰۳۰±۰.۰۰۳ ^e	۴.۶۵۷±۰.۵۶۹ ^e	۱.۲۷۵±۰.۰۰۱ ^a
NCh.LA1	۸.۹۴۲±۰.۰۰۲ ^b	۱.۵۸۷±۰.۰۰۱ ^e	۱.۸۰۰±۰.۰۰۱ ^e	۰.۶۵۴±۰.۰۰۱ ^f	۰.۸۸۵±۰.۰۰۲ ^g	۵.۵۵۹±۰.۰۰۵ ^d	۰.۲۵±۰.۰۰۱ ^g
NCh.LA10	۸.۹۵۰±۰.۰۰۲ ^b	۱.۵۵۳±۰.۰۰۱ ^e	۱.۷۲۱±۰.۰۰۱ ^f	۱.۸۵۵±۰.۰۰۱ ^a	۱.۲۲۲±۰.۰۰۳ ^d	۷.۱۳۵±۰.۰۰۲ ^{ab}	۱.۲۳±۰.۰۰۱ ^b
NCh.LA100	۹.۲۸۵±۰.۳۴۴ ^b	۰.۶۸۱±۰.۰۰۱ ^f	۱.۸۳۹±۰.۵۷۹ ^d	۰.۴۵۵±۰.۰۰۲ ^h	۱.۷۷۲±۰.۰۰۲ ^b	۷.۳۲۶±۰.۰۲۵ ^a	۰.۲۲±۰.۰۰۱ ^h
NCh.LA1000	۷.۹۱۲±۰.۰۰۲ ^c	۱.۹۸۹±۰.۰۰۵ ^c	۱.۹۰۲±۰.۰۰۲ ^c	۱.۸۵۳±۰.۰۰۱ ^a	۰.۸۰۱±۰.۰۰۲ ^h	۶.۱۱۷±۰.۰۰۳ ^c	۰.۶۶±۰.۰۰۲ ^f
NCh.LC1	۸.۱۴۱±۰.۰۰۹ ^c	۲.۰۳۶±۰.۰۰۱ ^c	۱.۸۰۸±۰.۰۰۳ ^c	۱.۸۲۹±۰.۰۰۲ ^b	۰.۸۰۱±۰.۰۰۲ ^h	۵.۴۴۴±۰.۰۰۲ ^b	۰.۸۳±۰.۰۰۱ ^e
NCh.LC10	۹.۶۶۰±۰.۰۰۲ ^a	۲.۸۵۲±۰.۰۱۱ ^a	۲.۱۲۱±۰.۰۰۱ ^a	۰.۸۲۷±۰.۰۲۵ ^e	۱.۴۰۳±۰.۰۰۲ ^c	۷.۲۳۳±۰.۰۰۱ ^a	۰.۹۶±۰.۰۰۱ ^d
NCh.LC100	۹.۱۶۶±۰.۷۶۳ ^b	۱.۸۸۷±۰.۰۰۱ ^d	۱.۹۶۶±۰.۰۰۲ ^b	۱.۲۲۲±۰.۰۰۲ ^c	۲.۵۴۶±۰.۰۰۲ ^a	۶.۸۵۳±۰.۰۰۱ ^b	۱.۰۹±۰.۰۰۲ ^c
NCh.LC1000	۹.۰۵۷±۰.۰۰۲ ^b	۰.۵۹۸±۰.۰۰۱ ^g	۱.۸۰۰±۰.۰۰۲ ^e	۰.۵۶۶±۰.۰۰۱ ^g	۰.۹۴۵±۰.۰۰۲ ^f	۷.۱۲۶±۰.۰۰۱ ^{ab}	۰.۰۵±۰.۰۰۱ ⁱ

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

جدول ۲: تلفات شوکهای آمونیاکی، کمبود اکسیژن، هماوری مطلق و شاخص کیفی در تیمارهای مختلف

شاخص تیمار	شوک آمونیاکی (درصد)	شوک کمبود اکسیژن (درصد)	هماوری مطلق	شاخص کیفی (گرم بر سانتی متر)
NCh.B	۲.۸۸±۱۸.۳۳ ^c	۲.۸۸±۱۶.۶۶ ^{ab}	۲.۵۱±۲.۶۶ ^e	۰.۰۳±۳.۴۹ ^{ab}
NCh.LA1	۲.۸۸±۲۱.۶۶ ^{bc}	۲.۸۸±۱۶.۶۶ ^{ab}	۲.۵۱±۲۱.۶۶ ^a	۰.۰۲±۳.۶۹ ^a
NCh.LA10	۰.۰±۲۵.۰۰ ^b	۲.۸۸±۱۸.۳۳ ^a	۱.۰۰±۱۰.۰۰ ^{bc}	۰.۰۳±۳.۵۲ ^{ab}
NCh.LA100	۲.۸۸±۲۳.۳۳ ^{bc}	۲.۸۸±۱۶.۶۶ ^{ab}	۲.۰۸±۷.۶۶ ^{bc}	۰.۶۲±۳.۷۷ ^a
NCh.LA1000	۲.۸۸±۱۸.۳۳ ^c	۰.۰±۲۰.۰۰ ^a	۱.۵۲±۶.۳۳ ^d	۰.۰۳±۳.۸۰ ^a
NCh.LC1	۲.۸۸±۲۱.۶۶ ^{bc}	۲.۸۸±۱۶.۶۶ ^{ab}	۱.۱۵±۹.۶۶ ^{bc}	۰.۰۵±۳.۷۴ ^a
NCh.LC10	۲.۸۸±۳۱.۶۶ ^a	۲.۸۸±۱۶.۶۶ ^{ab}	۲.۰۸±۱۱.۶۶ ^b	۰.۰۵±۳.۰۴ ^c
NCh.LC100	۲.۸۸±۲۳.۳۳ ^{bc}	۲.۸۸±۱۱.۶۶ ^b	۱.۵۲±۱۰.۳۳ ^{bc}	۰.۰۴±۲.۹۹ ^c
NCh.LC1000	۲.۸۸±۳۱.۶۶ ^a	۲.۸۸±۲۱.۶۶ ^a	۰.۵۷±۴.۶۶ ^{de}	۰.۰۴±۳.۲۱ ^c

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار می باشد ($p < 0.05$).

بحث

در این تحقیق همانطور که بیان شد بالاترین مقدار کل اسید چرب اشباع در تیمار NCh.LC10 و کمترین آنها در تیمارهای شاهد، NCh.LA1 و NCh.LA1000 دیده شد. در اینجا می توان به نقش موثرتر مکمل ال-آرژنین در مقایسه با ال-کارنتین در اکسیداسیون بهتر اسید چرب اشباع با دوزهای مذکور اشاره کرد. Cheragh Birjandi و همکاران (۲۰۱۷) به ارتباط مستقیم بین متابولیسم اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه با مکمل های ال-آرژنین در مولدین اشاره نمودند، که بیانگر نقش قوی این مکمل تغذیه ایی در کاهش اسید چرب در مقایسه با مکمل رقیب است. تحقیقات بعمل آمده توسط ناصری و همکاران (۱۳۹۴) و Srinivasan و همکاران (۲۰۱۴) بیان نمودند که ریزجلبک نانوکلروپسیس اکولاتا حاوی ۳۳ درصد اسید چرب به نوعی ریزجلبک چرب است. حسین پور و همکاران (۱۳۹۹) بیان نمودند که کاربرد مکمل های چربی سوز تغذیه ایی در قزل آلاهی رنگین موجب افزایش پروتئین بدن می شود. Ling و همکاران (۲۰۲۰) با مشاهدات خود بر روی ماهی تیلایپای نیل دریافتند که ترکیب مکمل ال-کارنتین صرفا بر کاهش اسید چرب غیر اشباع (MUFA و PUFA) تأثیر داشته و موجب کاهش اسید چرب اشباع نمی شود.

در مورد تیمارهای در معرض شوک آمونیاکی به جز دو تیمار کنترل و تیمار تغذیه با ال-آرژنین ۱ میلی-گرم در لیتر، سایر تیمارها در پایان دوره پرورشی تلفات نشان دادند، که دلیل آن احتمالا متابولیسم بالا می باشد. نکته مهم اینکه در تیمار غنی با ال-آرژنین ۱ میلی گرم در لیتر تلفاتی مشاهده نگردید، که حاکی از موثر بودن این تیمار در افزایش مقاومت آرتمی به شوک آمونیاکی

(مشابه تیمار کنترل) است. درحالیکه در تیمار تغذیه با ال-کارنتین ۱ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر بالاترین درصد تلفات مشاهده شد، که نشان دهنده نقش این تیمار در کاهش مقاومت به استرس آمونیاکی و افزایش تلفات است.

Noori و همکاران (۲۰۱۱) دریافتند که بچه ماهیان قزل رنگین بعد از تغذیه با تیمارهای مختلف ال-کارنتین، زمانیکه تحت تأثیر استرس های حرارتی و شوری قرار گرفتند، افزایش مقاومتی در برابر استرس های محیطی نسبت به تیمار شاهد و تیمار روغن نشان دادند. Mohseni و همکاران (۲۰۱۴) تأثیر مثبت ال-آرژنین بر اکسیداسیون چربی ها، افزایش آنزیم های اکسیداسیونی Phenoloxidase, superoxide dismutase، همچنین آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی مانند ویتامین C و E و Glutathione در فیل ماهی را بیان نمودند. در تحقیق دیگری حیدری و همکاران ۱۳۹۴ بیان نمودند که افزودن ۱۰۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ال-کارنتین با روغن ماهی موجب بهبود رشد، فعالیت های آنزیمی و افزایش مقاومت به استرس-های محیطی در قزل آلاهی رنگین کمان می شود. Dasilva و همکاران (۲۰۱۸) طی تحقیقی در تیلایپای نیل انگشت قد (*Oreochromis niloticus*)، بر نقش مهم ال-کارنتین بر افزایش بقا این ماهی در مواجهه با استرس های محیطی تأکید نمودند.

مسمومیت و مرگ و میر با آمونیاک به عنوان یکی از استرس های رایج در سیستم های پرورشی شناخته شده است. در این تحقیق، بالاترین میزان تلفات آرتمی تحت تأثیر استرس کمبود اکسیژن مربوط به تیمار ال-آرژنین ۱ و ۱۰۰ میلی گرم در لیتر و ال-کارنتین ۱ میلی گرم در لیتر و کمترین تلفات در تیمار ال-کارنتین ۱۰ میلی گرم

۱۳۹۹. مقایسه اثر ال-کارنیتین و بتائین بر روی روغن‌های ماهی و ذرت در جیره غذایی، و تأثیر آنها بر پروفایل اسیدهای چرب و شاخص‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۵(۳)، ۲۹۹-۲۸۸.

۲. حیدری، ر.، مشکینی، س.، نجدگرامی، ا.ح.، ۱۳۹۴. تأثیر ترکیب ال-کارنیتین و بتائین جیره با منبع روغنی مختلف بر فراسنجه‌های رشد، فعالیت آنزیم گوارشی و مقاومت مقابل استرس‌های محیطی در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی، ۳(۴)، ۸۹-۷۵.

۳. خامه چین، ی.، مناف فر، ر.، توکمه‌چین، ا.، حجتی، و.، ملکی بالاچو، و.، ۱۳۹۲. بررسی تأثیر ال-کارنیتین بر رشد، بقا و بلوغ زودرس *Artemia franciscana* در شرایط آزمایشگاهی. نشریه زیست‌شناسی جانوری، ۳(۴)، ۳۶-۲۹.

۴. ضیایی‌نژاد، س.، ۱۳۹۳. غنی‌سازی آرتیمیا، *Artemia franciscana* با استفاده از پروبیوتیک‌های باکتریایی باسیلوس. نشریه توسعه آبی‌پروری، ۸(۴)، ۶۰-۵۹.

۵. عدلو، م. ن.، سالارزاده، ع. ر.، آق، ن.، بحری، ا.، ۱۳۹۶. تأثیر بیومس آرتیمیای غنی‌شده توسط اسیدهای چرب PUFA، HUFA، و MUFA بر ترکیبات اسیدهای چرب، رشد و شاخص‌های کمی تولید مثلی میگوی سفیدغربی *Litopenaeus vannamei*. توسعه آبی‌پروری، ۱۱(۲)، ۷۹-۹۱.

6. Behera, S., Singh, R., Arora, R., Sharma, N.K., Shukla, M., Kumar, S., 2015. Scope of algae as third generation biofuels. *Frontiers in Bioengineering and*

در لیتر مشاهده شد. طاهری و همکاران (۱۳۹۲) چنین وضعیتی را گزارش نمودند. Chen و همکاران (۲۰۱۷) نیز نتیجه مشابهی را در کپور معمولی مشاهده نمودند. در ارتباط با کمتر بودن هماوری مطلق آرتمیاد ر تیمار کنترل، می‌توان به نقش موثر هر دو نوع مکمل در بهبود تخمک‌زایی در مولد ماده اشاره نمود. Cheragh Birjerdi و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که ال-آرژنین با متابولیسم اسیدهای چرب به ایفای نقش اسیدآمینه جهت بهبود هماوری کمک می‌نماید. همچنین Rudrigues و همکاران (۲۰۱۸) در تحقیقی مشابه در گربه ماهی نقره‌ای (*Rhamdian quelen*) نقش موثر ال-کارنیتین در افزایش باروری مولدین نر آرتیمیا را گزارش نمودند.

با توجه به داده این تحقیق در رابطه با شاخص کیفی آرتیمیا، می‌توان استنباط نمود که تیمارهای ال-آرژنین با دوزهای مختلف کیفیت بافت بهتری به دلیل متابولیسم بیشتر اسید چرب اشباع در مقایسه با ال-کارنیتین نشان می‌دهد. در پژوهش محسنی و همکاران (۱۳۹۶) نقش ال-کارنیتین در بهبود شاخص‌های رشد فیل ماهی گزارش شده است. Shi و همکاران (۲۰۱۷) نیز چنی وضعیتی را در ماهی‌آمور بیان نمودند.

بطور کلی می‌توان گفت ال-آرژنین در تمام شاخص‌ها، به جز تلفات استرس کمبود اکسیژن به عنوان یک مکمل کاربردی عمل می‌کند.

سپاسگزاری

در اینجا از مسول آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر عباس تشکر می‌نمایم.

منابع

۱. حسین پور، م.، مشکینی، س.، نجدگرامی، ا.ح.،

- Mchele, L., Fang, Q., Li, Q., Chen, M., Zhang, Z., 2020. Dietary L-carnitine improves glycogen and protein accumulation in Nile tilapia via increasing lipid-sourced energy supply: An isotope-based metabolic tracking. *Aquaculture Reports*, 17, 126-131.
15. Mohseni, M., Pourkazemi, M., Kazemi, R., Taati, R., 2017. Effects of dietary L-carnitine on growth performance, body composition and antioxidant status of beluga (*Huso huso*) and comparison with Biomar diet. *Iranian Journal Of Fisheries Science*. 26, 171-183.
 16. Noori, K., Farhoomand, P., Ebrazadehim, S., 2011. Effects of chromium methionine supplements on the performance and serum metabolites of broiler chickens. *Journal Food Agriculture and Enviroment*, 9, 292-294.
 17. Priyadarshani, I., Rath, B., 2012. Commercial applications of micro algae A review. *Journal of Algal Biomass*, 12, 89-100.
 18. Rodrigues, M., Souza, M., Zanerato, D., Signor, A., 2018. Supplementation Of L-Carnitine In Diets For Silver Catfish and Its Effects On Reoroductive Aspects. *Boletim Do Insttuto De Pesca*, 45, 409-416.
 19. Shi, X., Sun, J., Yang, Z., Li, X., Ji, H., Li, Y., Chang, Z., Du, Z., Chen, L., 2017. Molecular characterization and nutritional regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) family in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 203, 11-19.
 20. Sorgeloos, P., Dhert, P. and Candreva, P., 2001. Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., on marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200, 147-159.
 21. Tong, S., Zhiyu, X., Wengang, J., Li, Y., Quancai, S., Yuhao, Z., Xiuting, L., 2020. Suppression mechanism of L-arginine in the heat-induced aggregation of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) myosin: The significance of ionic linkage effects and hydrogen bond effects. *Food Hydrocolloids*, 102, 204-211.
 - Biotechnology, 2, 144-153.
 7. Chen, G.F., Liu, Y., Jiang, J., Jiang, W.D., Kuang, S.Y., Tang, L., Tang, W.N., Zhang, Y.A., Zhou, X.Q. and Feng, L., 2015. Effect of dietary arginine on the immune response and gene expression in head kidney and spleen following infection of Jian carp with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 44, 195-202.
 8. Campbell, R.A., Adams, M.F., Tatner, M., Chair, P., 1993. Uptake af *Vibrio anguillarum* vaccine by *Atemia salina* as a potential oral delivery system to fish fry. *Fish and Shelfish Immunology*, 3, 451-459.
 9. Dai, Y.J., Dai, G.-Z., Jiang, X.-Y., Yuan, W.B., Liu., 2018. High-fat-diet-induced inflammation depresses the appetite of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) through the transcriptional regulation of leptin/mammalian target of rapamycin. *Br. J. Nutr.*, 120, 1422-1431.
 10. Dixon, B.A., Poucke, S.O.V., Chair, M., Dehasque, M., Nelis, H.J., Sorgeloos, P., De leenheer, A.P., 1995. Bioencapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. *J. Aquat. Anim. Health*, 7, 42-45.
 11. Fath El-Bab, A., El-Moghazy, M., Mostafa, M., El-Dweny, N., 2019. Role of dietary L-carnitine supplements on improving of reproductive performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23, 589-598.
 12. Haran, M. P., 1992. Monual on shrimp hatechery operation and management (*Penaeus -monodon*). Publ:TASPARC, 114pp.
 13. Gihan, M., Heba S., El-Sayed, Hanan, M.K., Mohamed, A.S., Xianghui, Q., 2020. Comparative study on growth, survival and pigmentation of *Solea aegyptiaca* larvae by using four different microalgal species with emphasize on water quality and nutritional value. *Aquaculture Nutrition*, 27, 615-629.
 14. Ling, Y.I., Dong, L., LuZhe, Y., Jiang, S.,

Investigating the effect of *Nannochloropsis oculata* microalgae enriched with L-Carnitine and L-Arginine nutritional supplements on fatty acid profile and some growth and maturation parameters in *Artemia franciscana*

Sotoodeh, A. M.¹, Bahri, A. H.^{1*}, Salarzade, A. R.¹

1-Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.

Received: 14 March 2024

Accepted: 7 June 2024

Abstract

The nutritional value and special properties of *Artemia* have led to its use as a food and biological model in aquaculture. L-Carnitine supplementation stimulates the oxidation of fatty acids, increases nitrogen retention and resistance to environmental stress, and L-Arginine nutritional supplementation is effective in protein synthesis, nitric acid and growth hormone growth and survival. In this study, the effect of *Nannochloropsis oculata* micro algae enriched with L-carnitine and L-arginine supplements on growth, environmental stress, absolute fecundity and saturated fatty acid profile in *Artemia feransiscana* was investigated. L-carnitine and L-arginine were applied separately at concentrations of 0, 1, 10, 100 and 1000 mg/l. *Artemia* cysts under special hatching conditions and *Napolius* were fed with *N. oculata* microalgae with two states, enriched conditions and without enrichment (control treatment) separately in 30 days. The results were compared and it was shown that the highest saturated fatty acid (SFA) with nutritional treatment L-carnitine 10 mg/l and the lowest was in the control treatment. The highest mortality percentage of ammonia shock was related to rich treatment with 1 and 100 mg/l L-carnitine which showed a significant difference with the control treatment ($p < 0.05$) and the lowest was related to 1 mg/l L-arginine treatment and control treatment. In hypoxia shock, the highest mortality percentage was observed in the diet with L-carnitine 1 and L-arginine 1 and 100 mg/l and the lowest in the diet with L-carnitine 10 mg/l, all of which showed a significant difference with the control treatment ($p < 0.05$). In adult *Artemia* breeders, the lowest quality indicators were related to L-carnitine treatment at all doses except 1000 mg/l and the highest were related to L-arginine treatment except 100 mg/l plus 1000 mg/l. L-carnitine that showed a significant difference with the control treatment ($p < 0.05$). The highest amount of absolute fecundity is related to the nutritional treatment rich in L-arginine 1000 mg/l and the lowest is the control treatment, which shows the positive effect of both supplements on increasing the absolute fecundity. Overall, the results showed that the use of the mentioned nutritional supplements with *N. oculata* microalgae in *A. franciscana* nutrition in specific doses can be effective in increasing production and quality in the aquaculture industry. Therefore, according to the environmental stress conditions, improving the fecundity performance and achieving a higher quality index, the optimal doses of each supplement can be used.

Keywords: *Artemia franciscana*, *Nannochloropsis oculata*, L-carnitine, L-arginine, Saturated fatty acid, Absolute fecundity.

* Corresponding Author: amirbahri52@yahoo.com