مقاله علمی–پژوهشی:

اثر ریزجلبک *Aphanothece halophytica* بر ترکیب اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ناپلیوس آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*)

پریا اکبری*[۱]، زهرا امینی خویی[۲]، الناز عرفانی فر[۲]

*paria.akbary@gmail.com

۱- چابهار، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی، گروه شیلات
۲- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات شیلات آبهای دور چابهار، چابهار، ایران

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۹

چکیده

تحقیق حاضر، به منظور بررسی اثر ریز جلبک (*Aphanothece halophytica*) بر ترکیب اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ناپلیوس آرتمیا ارومیانا به مدت ۳ هفته صورت گرفت. در این مطالعه، سیست‌ها تحت شرایط استاندارد تخم‌گشایی شدند. سپس تعداد ۱۲۰۰۰۰۰ عدد ناپلیوس در یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تیمار آزمایشی و ۳ تکرار (با تعداد ۱۰۰۰۰۰ در هر تکرار) که شامل: میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر ریزجلبک با تراکم سلولی جلبک به‌ترتیب ۲۲×۱۰^{۶}، ۱۶×۱۰^{۶} و ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر و تیمار شاهد (مخمر ۱ گرم به ازای ۱۰۰۰۰ عدد ناپلیوس) بود، مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله، در پایان آزمایش، بیشترین میزان ایکوزاپنتانوئیک اسید (۰/۲۵±۳/۹۹ درصد) و دوکوزاهگزانوئیک اسید (۰/۰۲±۱/۴۴ درصد) در تیمار تغذیه شده با ریزجلبک با تراکم سلولی ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین بیشترین میزان آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سرین، گلیسین، هیستیدین، آرژنین، ترئونین، آلانین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین و مجموع اسیدهای آمینه در تیمار تغذیه شده با ریزجلبک با تراکم سلولی ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$). در کل، نتایج این تحقیق نشان داد که ناپلیوس آرتمیا تغذیه شده با سطوح مختلف این ریزجلبک ترکیب اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه بهتری را در مقایسه با شاهد نشان داد و استفاده از تراکم سلولی ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر جلبک *A. halophytica* در جیره غذایی ناپلئوس آرتمیا توصیه می‌گردد.

لغات کلیدی: آرتمیا ارومیانا، ترکیب اسید چرب ، اسید آمینه، ریزجلبک *Aphanothece halophytica*

*نویسنده مسئول

مقدمه

آرتمیا یکی از غذاهای پرمصرفی است که به عنوان غذای زنده در پرورش لارو آبزیان به‌کار برده شده است. تغذیه لارو آبزیان از ناپلیوس آرتمیا به جای غذای کنسانتره، مرگ و میر آبزیان را کاهش داده و منجر به تسریع رشد و توسعه لارو آبزیان شده است (Prusinska *et al*., 2011).

از آن جایی‌که بیش از ۵۰ درصد ترکیب شیمیایی بدن لارو ماهیان را پروتئین تشکیل می‌دهد، کمیت و کیفیت پروتئین جیره در رشد بهینه لاروها تاثیرگذار است. مهمترین منبع انرژی در مراحل اولیه لاروی از طریق اسید آمینه تامین می‌گردد (Aragao *et al*., 2004). بنابراین، عدم توازن اسیدهای آمینه در جیره غذایی منجر به افزایش اکسیداسیون اسیدهای آمینه و در نتیجه کاهش رشد و بازده تبدیل غذایی ماهی می‌گردد (Saavedra *et al*., 2006). بهترین روش برای جبران کمبود اسیدهای آمینه ضروری استفاده از غذای زنده غنی سازی شده با اسیدهای آمینه ضروری یا اضافه کردن این اسیدهای آمینه به غذای خشک شده است.

آرتمیا به عنوان یکی از منابع غذایی سالم قادر به تامین برخی آنزیم‌هایی است که لارو آبزیان در مراحل اولیه رشد قادر به سنتز آنها نمی‌باشند (Kim *et al*., 2002; Tocher, 2003). جنبه مهم دیگر آرتمیا به دلیل دسترسی و تهیه آسان آن در هر مقدار و زمان مشخص برای پرورش آبزیان می‌باشد (Bengtson *et al*., 1991; Prusinska *et al*., 2011). به رغم مزایای بسیار زیاد، یکی از نقاط ضعف آرتمیا این است که چون فاقد اسیدهای چرب اشباع نشده بلند زنجیره سری ۳ برای مثال، ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید هستند، لذا سعی در غنی سازی آرتمیا به منظور بالا رفتن ارزش غذایی آن شده است (Navarro and Sargent, 1992). یادآور می‌شود، کمبود این اسیدهای چرب ضروری سبب آسیب‌های بافتی، عصبی شدن و اختلال در رفتارهای حرکتی و تغذیه‌ای می‌شود (Sargent *et al*., 1995).

از آن جایی که بدن آبزیان قادر به سنتز این نوع اسیدهای چرب نمی‌باشد، لازم است به جیره غذایی اضافه شوند (Henderson, 1996; Tocher, 2003). به طور همزمان، اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره در تشکیل لیپیدهای غشاء سلولی و در طیف وسیعی از عملکردهای بیولوژیک مانند پروستاگلاندین، پروستاسیکلین، ترومبوکسان و لکوترین‌ها شرکت دارند (Kim *et al*., 2002).

در شروع تغذیه خارجی لارو آبزیان، از آن جایی‌که سیستم ایمنی آنها به‌طور کامل توسعه نیافته است، توانایی هضم پروتئین‌های پیچیده را ندارد ولی لارو به منظور رشد به ذخیره پروتئین نیاز دارد. لذا، حضور کمی و کیفی ذخایر اسید آمینه‌های آزاد در جیره غذایی از اهمیت ویژه‌ای برای لارو آبزیان برخوردار است (Carter and Houlihan, 2001).

ریزجلبک‌ها به دلیل تولید محصولات جانبی از جمله کارتنوئیدها (بتاکاروتن، آستازانتین، کانتازانتین و لوتئین)، سایر رنگدانه‌ها (فیکوسیانین و فیکواریترین)، اسیدهای چرب امگا ۳ و ۶ [ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA)[1]، دوکوزا هگزانوئیک اسید (DHA)[2]]، ویتامین‌ها (توکوفرول‌ها، ویتامین B_{12} و پیش‌ویتامین A)، پلی‌ساکاریدها و پروتئین‌ها و رشد سریع در صنایع مختلف دارویی، غذایی و تولید سوخت زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Bigogno *et al*., 2002؛ حافظیه، ۱۳۸۳).

تاکنون مطالعات زیادی در مورد کاربرد ریزجلبک‌ها در آبزی پروری انجام شده است. برای مثال، استفاده از ریزجلبک اسپیرولینا و کلرلا در تغذیه میگوی آب شیرین (*Macrobranchium reosenbergii*) و میگوی سفید (*Litopenaeus schmitti*) موفقیت‌هایی را به‌دنبال داشته است (Radhakrishnan *et al*., 2014). تحقیقات در این زمینه نشان داده است که برخی جلبک‌ها با تامین اسیدهای چرب ضروری، اثرات مثبتی بر جانوران از نظر فیزیولوژیک اعمال نموده‌اند (Spolaore *et al*., 2006).

احمدی فرد و همکاران (۱۳۸۶) نتایج قابل توجهی در رشد و ترکیب اسیدهای چرب روتیفرهای آب شیرین (*Brachionus calyciflorus*) با استفاده از ریز

[1] Eicosapentaenoic acid, 20:5
[2] Docosahexaenoic acid, 22:6

جلبک‌های آب شیرین کلرلا (*Chlorella* sp.) و سندسموس (*Scenedesmus obliquus*) به‌دست آوردند.

در شروع تغذیه خارجی لارو آبزیان، از آن جایی‌که سیستم ایمنی آنها به‌طور کامل توسعه نیافته است، توانایی هضم پروتئین‌های پیچیده را ندارد، ولی لارو به منظور رشد به ذخیره پروتئین نیاز دارد. لذا حضور کمی و کیفی ذخایر اسید آمینه‌های آزاد در جیره غذایی از اهمیت ویژه‌ای برای لارو آبزیان برخوردار است (Carter and Houlihan, 2001). از آن جایی که ریزجلبک *Aphanothece halophytica* از دسته ریز جلبک‌هایی است که به‌راحتی کشت شده، با توجه به شرایط اقلیمی چابهار انتخاب شده، دارای رشد زیاد بوده و از نظر مقدار اسیدهای چرب دارای ۳/۲۷ درصد EPA و ۶/۳۳ درصد DHA و مجموع اسیدهای آمینه ۲/۷۹ میلی‌گرم بر گرم وزن جلبک می‌باشد (امینی خوئی و همکاران، ۱۳۹۸)، لذا به عنوان یکی از گونه‌های مهم جلبکی برای تامین اسیدهای چرب ضروری و اسیدهای آمینه آبزیان می‌توان آن را مد نظر قرار داد.

از این رو، این تحقیق، با هدف بررسی اثر سطوح مختلف ریزجلبک *Aphanothece halophytica* بر ترکیب اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ناپلیوس آرتمیا ارومیانا انجام شده است.

مواد و روش ها

کشت ریزجلبک *Aphanothece halophytica*

ابتدا تمام ابزار آلات شیشه ای و فلزی در داخل آون ۱۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرارداده شدند. سپس برای سترون نمودن محیط‌های کشت جلبک از دستگاه اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد با فشار ۱/۶ اتمسفر و از محیط کشت F/2 برای استفاده شد. شرایط محیطی مطلوب برای رشد این ریزجلبک، نور سفید تک رنگ با روشنایی ۲۰۰۰ لوکس و درجه حرارت ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸-۷/۵ در نظر گرفته شد. ریزجلبک رشد یافته پس از گذشت ۱۰ روز در حالی‌که در انتهای مرحله رشد لگاریتمی و در اوج ارزش غذایی و تراکم بود، برای غنی سازی ناپلیوس آرتمیا مورد استفاده قرار گرفت.

سپس پس از ۱۵ روز، قبل از استفاده برای غنی‌سازی آرتمیا، سه غلظت مختلف از این جلبک به ترتیب ۱، ۱:۲و ۱:۳ تهیه شد سپس با کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر کدورت ۰/۶۰۱، ۰/۳۲۴ و ۰/۲۱۹ قرائت شد (Andesen, 2005)

آماده سازی ناپلیوس آرتمیا و تیماربندی

پس از تخم گشایی سیست آرتمیا طبق شرایط کشت استاندارد (شوری ۳۵-۳۰ گرم در لیتر، دمای ۲۶-۲۵ درجه سانتی‌گراد، pH ۸/۵-۷، نور ۲۰۰۰ لوکس)، ناپلی ها با استفاده از رفتار نورگرایی مثبت از پوسته‌ها جداسازی شدند. سپس تعداد ۱۲۰۰۰۰۰ عدد ناپلیوس (مرحله اینستار II) در یک طرح کاملا تصادفی به ۴ تیمار با ۳ تکرار (با تعداد ۱۰۰۰۰۰ در هر تکرار) تقسیم شدند. گروه شاهد با ۱ گرم پودر مخمر نانوایی (*Saccharomyces cerevisiae*) به ازاء ۱۰۰۰۰ عدد ناپلیوس و تیمارهای آزمایشی با میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر ریز جلبک *A. halophytica* که به‌ترتیب عبارت بودند از: تیمار ۱ (تراکم ریز جلبک *A. halophytica* ۲۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر)، تیمار ۲ (تراکم ریز جلبک *A. halophytica* ۱۶×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) و تیمار ۳ (تراکم ریز جلبک *A. halophytica* ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر) در ظروف پلاستیکی استوانه‌ای- مخروطی ۲ لیتری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شوری ۳۰ گرم در لیتر، به‌مدت ۳ هفته تغذیه شدند (منافی‌فر، ۱۳۸۰).

سنجش ترکیب اسیدهای چرب

مقدار ۲۰۰-۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه ریزجلبک درون ظرف شیشه ای درب دار ریخته شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از محلول حاوی $H_۲SO_۴$ ۲/۵ درصد و متانول ۹۸ درصد (v/v،۴۰/۱) به هر ظرف نمونه اضافه گردید و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از سرد شدن در دمای اتاق، ۵۰۰ میکرولیتر هگزان با ۱/۵ میلی‌لیتر NaCl ۹ درصد مخلوط گردید و به نمونه اضافه شده تا اسید چرب متیل استر استخراج گردد (Pérez *et al*., 2017). پس از سانتریفیوژ نمونه

(۱۰ دقیقه با ۴۰۰۰ دور در دقیقه)، بخش رویی محلول (شامل هگزان) جداسازی شده و برای تعیین پروفایل اسید چرب به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق گردید (AOAC, 2000; Pérez *et al*., 2017). برای جداسازی و شناسایی انواع اسیدهای چرب، از دستگاه کروماتوگرافی مدل Unicam ۴۶۰۰ (مستقر در شرکت میزان سنجش پاسارگاد تهران) استفاده شد. ستون این دستگاه از نوع Bp ×۱۰ به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۱ میلی‌متر بود آشکارساز دستگاه از نوع FID و گاز حاصل از دستگاه هلیوم بود. فشار گاز هیدروژن ۳۰ میلی‌لیتر بر ثانیه، اکسیژن ۳۰۰ میلی‌لیتر بر ثانیه، دمای آشکارساز Detector ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، دمای Injector ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ستون ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. ۱ میکرولیتر از عصاره مورد نظر با سرنگ هامیلتون به دستگاه تزریق گردید با عبور گازی هلیوم و حرارت تدریجی، استرهای متیله اسیدهای چرب که به صورت بخار درآمدند، یکی پس از دیگری از ستون خارج شدند و منحنی رسم شد و زمان بازداری مربوط به هر اسید چرب با منحنی مربوط به اسیدهای چرب استاندارد و زمان بازداری مقایسه شد و بدین ترتیب، نوع و میزان اسید چرب (بر حسب درصد کل اسیدهای چرب) تعیین گردید.

سنجش ترکیب اسید آمینه

جهت سنجش ترکیب اسیدهای آمینه از روش Lindroth و Mopper (۱۹۷۹) با کمی تغییر استفاده گردید. ابتدا ۰/۱ گرم آرتمیا خشک شده از هر تکرار تیمار در دستگاه فریز درایر (Operon-۷۰۱۲، کشور کره جنوبی) به لوله هضم اضافه و ۷/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ نرمال به آن اضافه شد و پس از خارج کردن هوای داخل لوله با گاز نیتروژن، در داخل آون با دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و سپس حجم اسید موجود در لوله تا حجم ۲۵ میلی‌لیتر با آب خالص رقیق گردید و با فیلترهای سر سرنگی ۰/۴۵ میکرونی محلول فیلتر شده و ۱۰ میکرولیتر از این محلول فیلتر شده در ظروف شیشه‌ای ریخته شد و تحت شرایط خلاء قرار گرفته و در ۳۰ نهایت در داخل یخچال قرار گرفت. پس از مرحله هضم، برای مرحله اشتقاق، ۱۰ میکرولیتر بافر استات به لوله هضم حاوی اسید آمینه خشک شده اضافه شده و بعد از مخلوط کردن مجدداً ۴۹۰ میکرولیتر بافر استات به مخلوط اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه انکوباسیون گردید و سپس بافر بورات و ۱۰۰ میکرولیتر محلول OPA (o-phthaldialdehyde) اضافه شده و پس از ۲ دقیقه انکوباسیون، ۵۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۰/۷۵ مولار به ترکیب اضافه شده تا واکنش متوقف شد و نهایتاً ۲۰ میکرولیتر از ترکیب نهایی با سرنگ مخصوص به دستگاه HPLC (۱۲۹۰ infinity کشور انگلیس) به مشخصات ستون (۴×۱۰۰ mm OPA specific column RP۱۸) و دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد تزریق گردید.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها (سه تکرار برای هر تیمار) از طریق آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (one way ANOVA) و مقایسه میانگین بین تیمارها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌دار ۵ درصد استفاده گردید. با استفاده از تست کولموگراف اسمیرنوف نرمال بودن داده‌ها و از تست لون برابری واریانس‌ها و تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها با نرم افزار SPSS ویرایش ۱۹ صورت گرفت و جهت محاسبات آماری از نرم افزار Excel ویرایش ۲۰۱۰ استفاده گردید.

نتایج

در جدول ۱ ترکیب اسیدهای چرب (کل درصد اسیدهای چرب) تیمارهای مختلف در پایان دوره آزمایش ارائه شده است. بیشترین میزان مریستیک اسید (۱/۹۷±۰/۳۶ درصد)، پالمیتیک اسید (۱۹/۲۹±۰/۰۹ درصد) و استئاریک اسید (۴/۸۴±۰/۱۴ درصد) و مجموع اسیدهای چرب اشباع شده در شاهد که فقط با مخمر تغذیه شده بودند، مشاهده گردید که اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد ($P<0/05$).

جدول ۱: ترکیب اسیدهای چرب (درصد کل اسیدهای چرب) کل تیمارهای مورد مطالعه

Table 1: Composition of fatty acids (percentage of total fatty acids) of all studied treatments

اسیدهای چرب	تیمارها			
	شاهد (۱ گرم مخمر به ای ۱۰۰۰۰ ناپلیوس)	تراکم سلولی ریز جلبک ۲۲×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر	تراکم سلولی ریز جلبک ۱۶×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر	تراکم سلولی ریز جلبک ۱۳×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر
C۱۴:۰	۱/۹۷ ± ۰/۳۶ a	۱/۴۸ ± ۰/۲۰ b	۱/۵۰ ± ۰/۴۰ b	۱/۰۰ ± ۰/۱ c
C۱۵:۰	۰/۰ ± ۰/۰ c	۱/۲۰ ± ۰/۰۹ a	۱/۲۰ ± ۰/۰۹ a	۰/۷۳ ± ۰/۰۵ b
C۱۶:۰	۹/۲۹ ± ۰/۰۹ a	۱/۱۱ ± ۰/۰۷ d	۳/۸۰ ± ۰/۰۹ b	۲/۸۵ ± ۰/۱۲ c
C۱۷:۰	۰/۹۹ ± ۰/۰۷ c	۰/۰ ± ۰/۰۰ d	۳/۳۷ ± ۰/۱۴ a	۲/۳۱ ± ۰/۱۵ b
C۱۸:۰	۴/۸۴ ± ۰/۱۴ a	۴/۰۱ ± ۰/۰۷ b	۴/۲۹ ± ۰/۳۵ b	۳/۹۸ ± ۰/۱۳ b
C۲۰:۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰
C۲۲:۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰
SFA*	۱۷/۰۹± ۰/۳۳a	۷/۸۰ ± ۰/۲۵d	۱۴/۱۶ ± ۰/۶۹b	۱۰/۸۷ ± ۰/۴۷c
C۱۶:۱n	۷/۰۴ ± ۰/۱۴d	۷/۴۳ ± ۰/۱۵c	۱۲/۰۲ ± ۰/۰۶b	۱۳/۹۳ ± ۰/۰۶a
C۱۸:۱n-۹	۰/۰ ± ۰/۰ d	۰/۶۹ ± ۰/۰c	۱/۴۹ ± ۰/۴a	۱/۰۶ ± ۰/۴۱b
C۲۰:۱n-۹	۲۷/۶۹ ± ۰/۱۱b	۳۰/۲۸/۱۱ ± ۰/۷۸a	۱۹/۹۰± ۰/۱۳d	۲۱/۰۷± ۰/۴۳c
MUFA**	۳۴/۷۳± ۰/۵۸a	۳۸/۴± ۰/۴۸d	۳۳/۴۱± ۰/۷۴b	۳۶/۰۶± ۰/۶۲c
C۲۰:۳n-۳	۰/۰ ± ۰/۰ c	۰/۰ ± ۰/۰ c	۲/۱۰ ± ۰/۰۱ a	۱/۳۷ ± ۰/۳۶ b
C۱۸:۲n-۶	۲۴/۳۳ ± ۰/۱۴ a	۲۳/۳۹ ± ۰/۱۱ b	۱۶/۹۷ ± ۰/۱۴ c	۱۹/۵۷ ± ۰/۱۳ d
C۱۸:۳n-۳	۲/۵۳ ± ۰/۲۵ b	۱/۲۶± ۰/۳۶ c	۴/۱۳ ± ۰/۸۵ a	۴/۴۱ ± ۰/۳۲ a
C۲۰:۳n-۶	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰	۰/۰ ± ۰/۰
C۲۰:۴n-۶	۰/۰ ± ۰/۰ c	۰/۰ ± ۰/۰ c	۱/۶۸ ± ۰/۳۷ a	۱/۳۹ ± ۰/۳۲ b
C۲۰:۵n-۳	۱/۳۵ ± ۰/۱۷ d	۳/۳۷ ± ۰/۵۸ b	۲/۹۷ ± ۰/۶ c	۳/۹۹ ± ۰/۲۵ a
C۲۲:۴n-۶	۰/۰ ± ۰/۰ b	۲/۳۷ ± ۰/۳۶ a	۰/۰ ± ۰/۰ b	۰/۰ ± ۰/۰ b
C۲۲:۶n-۳	۰/۳۴ ± ۰/۰۶ d	۰/۴۲ ± ۰/۱۶ c	۰/۴۹ ± ۰/۰۱ b	۱/۴۴ ± ۰/۰۲ a
PUFA***	۲۸/۵۵ ± ۰/۵۵ d	۳۰/۸۱± ۰/۲۵ a	۲۸/۳۴± ۰/۳۲ c	۳۲/۱۷± ۰/۲۴ b

مقادیر (میانگین± خطای معیار، حاصل سه تکرار) با حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار ها است. (P<۰/۰۵). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یک‌طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند. * SFA اسید چرب اشباع ** MUFA اسید چرب تک زنجیره غیر اشباع *** PUFA اسید چرب چند زنجیره غیر اشباع (۳ تکرار ار هر تیمار)

همچنین بیشترین میزان اسیدهای چرب تک زنجیره غیر اشباع (۰/۵۸±۷۲/۵۵ درصد) و ایکوزانوئیک اسید (۰/۱۱±۳۷/۶۹ درصد) نیز در تیمار تغذیه شده با مخمر (شاهد) مشاهده شد در حالیکه بیشترین میزان اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره (ایکوزا پنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید) در تیمار تغذیه شده با جلبک با تراکم سلولی ۱۳×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر بیشتر از سایر تیمارها بود و اختلاف معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). و بیشترین میزان لینولنیک اسید نیز در تیمار تغذیه شده با جلبک با تراکم سلولی ۲۲×۱۰^۶ و ۱۶×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را با هم نشان ندادند (p>۰/۰۵). بیشترین میزان مجموع اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره (۰/۲۵±۳۵/۵۹ درصد) در تیمار تغذیه شده با جلبک با تراکم سلولی ۲۲×۱۰^۶ سلول در هر میلی‌لیتر مشاهده شده و اختلاف معنی‌داری را با سایر تیمارها نشان داد (p<۰/۰۵).

در جدول ۲ ترکیب اسیدهای آمینه کل تیمارهای مورد مطالعه ارائه شده است. بیشترین میزان آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سرین، گلیسین، هیستیدین، آرژنین، ترئونین، آلانین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین و مجموع اسیدهای آمینه در تیمار تغذیه شده با ریز جلبک با تراکم سلولی ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر دیده شد و اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$).

جدول ۲: ترکیب اسیدهای آمینه (میلی گرم اسیدآمینه /گرم نمونه) کل تیمارهای مورد مطالعه

Table 2: Amino acid composition (mg amino acid / gram sample) of all studied treatments

اسیدهای آمینه	تیمارها			
	شاهد (اگرم مخمر به ای ۱۰۰۰۰ ناپلیوس)	تراکم سلولی ریز جلبک ۲۲×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر	تراکم سلولی ریز جلبک ۱۶×۱۰^{۶} سلول در هرمیلی لیتر	تراکم سلولی ریز جلبک ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر
آسپارتیک اسید	۰/۱۸ ± ۰/۰۲ d	۰/۵۷ ± ۰/۰۲ b	۰/۳۹ ± ۰/۰۲ c	۰/۶۳ ± ۰/۰۲ a
گلوتامیک اسید	۰/۲۹ ± ۰/۰۱ d	۱/۰۵ ± ۰/۰۳ b	۰/۸۰ ± ۰/۰۹ c	۱/۴۴ ± ۰/۰۳ a
سرین	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ d	۰/۳۷ ± ۰/۰۳ b	۰/۲۳ ± ۰/۰۵ c	۰/۵۶ ± ۰/۰ ۴a
گلیسین	۰/۱۷ ± ۰/۰۲ c	۰/۴۰ ± ۰/۰۵ b	۰/۳۰ ± ۰/۰۹ b	۰/۵۶ ± ۰/۰۴ a
هیستیدین	۰/۱۵ ± ۰/۰۵ b	۰/۲۰ ± ۰/۰۱ b	۰/۱۴ ± ۰/۰۱ b	۰/۲۹ ± ۰/۰۱ a
آرژنین	۰/۱۹ ± ۰/۰۱ d	۰/۵۷ ± ۰/۰۴ b	۰/۳۶ ± ۰/۰۳ c	۰/۷۸ ± ۰/۰۱ a
ترئونین	۰/۱۲ ± ۰/۰۲ b	۰/۱۴ ± ۰/۰۱ b	۰/۱۷ ± ۰/۰۲ b	۰/۲۶ ± ۰/۰۳ a
آلانین	۰/۱۱ ± ۰/۰۱c	۰/۳۰ ± ۰/۰۱b	۰/۲۴ ± ۰/۰۵b	۰/۵۷ ± ۰/۰۳a
پرولین	۰/۳۷ ± ۰/۰۳c	۰/۶۱ ± ۰/۰۷a	۰/۵۳ ± ۰/۰۸a	۰/۴۸ ± ۰/۰۷ab
تیروزین	۰/۱۸ ± ۰/۰۲d	۰/۵۱ ± ۰/۰۲b	۰/۳۰ ± ۰/۰۲c	۰/۶۸ ± ۰/۰۳a
والین	۰/۱۷ ± ۰/۰۲c	۰/۳۰ ± ۰/۰۱b	۰/۲۰ ± ۰/۰۱c	۰/۴۷ ± ۰/۰۳a
متیونین	۰/۰۴ ± ۰/۰۲c	۰/۱۶ ± ۰/۰۲b	۰/۱۸ ± ۰/۰۱b	۰/۲۵ ± ۰/۰۲a
ایزولوسین	۰/۲۵ ± ۰/۰۳ a	۰/۲۶ ± ۰/۰۵ a	۰/۱۳ ± ۰/۰۲ b	۰/۲۷ ± ۰/۰۳ a
لوسین	۰/۲۰ ± ۰/۱۰ c	۰/۳۷ ± ۰/۰۳ b	۰/۱۹ ± ۰/۰۱ c	۰/۵۷ ± ۰/۰۳ a
فنیل آلانین	۰/۸۳ ± ۰/۰۷ a	۰/۵۹ ± ۰/۰۴ b	۰/۶۱ ± ۰/۰۴ b	۰/۸۹ ± ۰/۰۴ a
لیزین	۰/۰۷ ± ۰/۰۱	۰/۱۶ ± ۰/۰۲	۰/۰۵ ± ۰/۱۵	۰/۱۰ ± ۰/۰۱
مجموع	۲/۸۴ ± ۰/۵۵ d	۶/۱۱ ± ۰/۷۶ b	۴/۳۸ ± ۰/۱۲ c	۸/۳۵ ± ۰/۱۲ a

مقادیر (میانگین± خطای معیار، حاصل سه تکرار) با حروف نامشابه در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است. ($P<۰/۰۵$). میانگین داده‌ها بر اساس واریانس یک‌طرفه مورد مقایسه قرار گرفتند (۳ تکرار ار هر تیمار)

بحث

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره (ایکوزا پنتانوییک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید) در تیمار تغذیه شده با ریز جلبک با تراکم سلولی ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر بیشتر از سایر تیمارها بود و بیشترین میزان لینولنیک اسید نیز در تیمار تغذیه شده با ریز جلبک با تراکم سلولی ۱۳×۱۰^{۶} و ۱۶×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر مشاهده شد. عشقی و همکاران (۱۳۹۵) نشان دادند که استفاده از ریز جلبک دونالیلا (*Dunaliella salina*) منجر به افزایش معنی‌دار اسیدهای چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزاهگزانوئیک اسید آرتمیا فرانسیسکانا (*A.franciscana*) در مقایسه با آرتمیای تغذیه شده با سبوس برنج، شد. می‌توان گفت که ترکیب و مقادیر اسیدهای چرب بدن آرتمیا به‌شدت تحت تاثیر کمیت و

کیفیت غذاست و عوامل ژنتیکی تاثیر چندانی بر آن ندارد (Bengston *et al*., 1991).

این موضوع نشان می‌دهد که احتمالاً استفاده از ریزجلبک، در تغذیه آرتمیا می‌تواند جبران کننده مقادیر کم اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره به‌ویژه دوکوزاهگزانوئیک اسید در اکثر گونه‌های آرتمیا باشد (عشقی و همکاران، ۱۳۹۵). به طور کلی، عواملی مانند پایین بودن ارزش غذایی مخمر نانوایی از نظر اسیدهای چرب غیر اشباع و وجود ترکیبات غیر قابل هضم در لایه خارجی دیواره سلولی مخمر از مهم‌ترین عواملی هستند که احتمالاً سبب شدند که آرتمیای تغذیه شده با مخمر کمترین میزان اسیدهای چرب غیر اشباع را از خود نشان دهد (Stottrup and McEvoy, 2003;Marques *et al*.,2004).

مناففر (۱۳۸۰) نشان داد که غنی سازی آرتمیا با ریزجلبک دونالیلا، میزان ایکوزاپنتانوییک اسید را ۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک نسبت به نمونه شاهد افزایش داد که با تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. همچنین Rekhad و همکاران (۲۰۰۷) در غنی سازی آرتمیا با ریزجلبک نانوکلروپسیس *Nannochloropsis salina* نشان دادند که میزان ایکوزاپنتانوییک اسید ۸/۰۵ درصد بود و Zaki و همکاران (۲۰۱۰) میزان اسیدهای چرب غیر اشباع در ریز جلبک‌های *Chlorella salina*، *N.salina* و*D.salina* را به طور میانگین به‌ترتیب ۲/۴۵، ۳/۴۲ و ۱/۳۰ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک گزارش کردند.

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین میزان آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سرین، گلیسین، هیستیدین، آرژینین، ترئونین، آلانین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین و مجموع اسیدهای آمینه در تیمار تغذیه شده با جلبک با تراکم سلولی ۰/۲۱۹ میلی‌گرم بر لینر مشاهده گردید، می‌توان گفت که سطح بالای اسید آمینه آزاد در غذای لارو از اهمیت زیادی برخوردار است و عدم توازن اسیدهای آمینه در جیره غذایی می‌تواند سبب افزایش اکسیداسیون اسیدهای آمینه و در نتیجه کاهش رشد و بازده تبدیل غذایی شود (Saavedra *et al*., 2006). Brown و همکاران (۱۹۹۷) با بررسی خصوصیات غذایی ریزجلبک‌ها بر پرورش آبزیان نشان دادند که ریز جلبک‌های *Chaetoceros muelleri*، *Thalassiosira pseudonana* و *Nannochloris atomus* دارای مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه آسپارتات و گلوتامات (۹/۱ درصد) بودند.

نتایج، به طور کلی نشان داد که استفاده از ریزجلبک *Aphanothece halophytica* منجربه بهبود اسیدهای چرب غیر اشباع بلند زنجیره ایکوزاپنتانوئیک اسید و دوکوزا هگزانوئیک اسید و پروفایل اسیدهای آمینه آرتمیا گردید و بهترین سطح این ریزجلبک جهت غنی سازی آرتمیا ۱۳×۱۰^{۶} سلول در هر میلی‌لیتر به‌دست آمد که می‌تواند استفاده از آرتمیای غنی شده با این گونه ریزجلبک در پرورش لارو ماهی و سخت پوستان به منظور تامین اسیدهای چرب و اسیدهای آمینه ضروری توصیه گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از زحمات کارشناس شرکت سنجش پاسارگاد تهران و ریاست محترم مرکز تحقیقات علوم شیلاتی آبهای دور (چابهار) که امکانات و تجهیزات آزمایشی را فراهم نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

احمدی فرد، ن.، عابدیان کناری، ع.م. و فلاحی، م.، ۱۳۸۶. مقایسه رشد و ترکیب اسید چرب روتیفر آب شیرین *Brachionus calyciflorus* تغذیه شده با دو جلبک سبز *Chlorella* sp. و *Scenedesmus obliquus*. مجله علمی شیلات ایران، ۱۶(۴)، ۱۵-۲۶.

امینی خوئی، ز.، عرفانی فر، ا.، دلوکیان، ا.م.، جدگال، س. و صوفی مقدم،ع.ر.، ۱۳۹۸. تولید بیومس ریزجلبک تک سلولی *Aphanothece halophytica* جداسازی شده از آبهای سواحل دریای عمان و معرفی آن برای بهره برداری در صنعت آبزی پروری، نخستین همایش ملی علوم، صنایع دریایی و توسعه پایدار سواحل مکران، چابهار، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ۱-۵.

حافظیه، م.، ۱۳۸۳. بررسی اثر تغذیه ای کلرلا، کیتوسروس بر نرخ رشد و بازماندگی *Artemia urmiana* ، مجله علمی شیلات ایران، ۱۵(۳)، ۵۵-۶۰.

عشقی، ش.ن.، نوری، ف.، ایمانی، ا. و آق، ن.، ۱۳۹۵. اثرات جایگزینی جلبک دونالیلا *Dunaliella salina* با سبوس گندم و برنج و پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر شاخص‌های رشد، تجزیه تقریبی بدن و ترکیب اسیدهای چرب *A.franciscana* مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۱)، ۲۰۷-۲۱۴.

مناف فر، ر.، ۱۳۸۰. غنی سازی ناپلئوس *Artemia urmiana* با امولسیون اسیدهای چرب و جلبک دونالیلا و بررسی متابولیسم HUFA تحت انکوباسیون سرد. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس. ۳۴۵ صفحه.

Andersen, R.A., 2005. Algal culturing Techniques. Elsevier, Academic Press, USA, 596 P.

AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, the Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 985.29, 991.43. DOI: org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.015.

Aragao, C., Conceicao, L.E.C., Fyhn, H.J. and Dinis, M.T., 2004. Estimated amino acid requirements during early ontogeny in fish with different life styles Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and Senegale sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 242:589-605. DOI: org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.015.

Bengtson, D.A., Léger, P. and Sorgeloos, P., 1991. Use of *Artemia* as a food source for aquaculture. In: Broune, R.A., Sorgeloos, P. and Trotman, C.N.A., (ed) *Artemia* Biology, (Eds). CRC Press, Boca Raton, FL: pp. 255-280.

Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba, S., Vonshak, A. and Cohen, Z., 2002. Lipid and fatty acid composition of the green oleaginous algae *Parietochloris incisa*, the richest plant source of arachidonic acid. *Phytochemistry*, 60(5), 497–503. DOI: org/10.1016/S0031-9422 (02)00100-0.

Brown , M.R., Jeffrey, S.W., Volkman, J.K. and Dunstan, G.A., 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*, 151(1-4): 315-331. DOI: org/10.1016/S0044-8486 (96)01501-3.

Carter, C.G. and Houlihan, D.F., 2001. Protein synthesis. In: Wright, P.A. and Anderson, A.J. (Eds.), Nitrogen Excretion.Academic Press, San Diego, USA, pp. 31–75.

Henderson, R.J., 1996. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archive Animal Nutrition*, 49(1), 5-22. DOI: 10.1080/17450399609381859

Kim, H.J., Myiazaki, M. and Ntambi, J.M., 2002. Dietary cholesterol opposes PUFA-mediated repression of thestearoyl-CoA desaturase-1 gene by SREBP-1 independent mechanism. *Journal of Lipid Research*, 43: 1750-1752. DOI: 10.1194/jlr.M100433-JLR200.

Lindroth P. and Mopper, K., 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence

derivatization with ophthaldialdehyde. *Analytical chemistry*, 51(11), 1667-1674. DOI: org. 10.1021/ ac50047a019.

Marques, A., Bossier, P., Dhont, J. and Sorgeloos, P., 2004. Influence of yeast quality on performance of gnotobiotically-grown *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310 (2): 249-266. DOI: 10.1016/j.jembe.2004.04.009.

Navarro, J.C. and Sargent, J.R., 1992. Behavioural differences in starving *Clupea harengus* L. larvae correlate with body levels of essential fatty acids. *Journal of Fish Biology*, 41(3): 509-513. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1992.tb02678.x.

Pérez, L., Salgueiro, J. L., Maceiras, R., Cancela, Á. and Sanchez, Á., 2017. An effective method for harvesting of marine microalgae: pH induced flocculation. *Biomass and bioenergy*, 97**,** 20-26. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.12.010.

Prusińska, M., Chepurkina, M., Wiszniewski, G., Duda A. and Kolman, R., 2011. Preliminary results of rearing larval Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) fed live enriched feed. In: Zakêœ, Z., Demska-Zakêœ, K. and Kowalska, A., (ed) New species in aquaculture. Reproduction, rearing, prophylactics. (Eds.), IRS, Olsztyn, Polish. pp 45-52.

Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan, P., Seenivasan, C., Shanthi, R. and Muralisankar, T., 2014. Replacement of fishmeal with *Spirulina platensis, Chlorella vulgaris* and *Azolla pinnata* on non-enzymatic and enzymatic antioxidant activities of *Macrobrachium rosenbergii*. *Journal of Basic and Applied Zoology*, 67(2): 25-33. DOI: 10.1016/j.jobaz.2013.12.003.

Rekhad, Ch., 2007. Variation in fatty acid Composition of *Artemia salina* nauplii enriched with microalgae and baker's yeast for Use in larviculture. *Journal of Agriculture Food Chemistry Resource*, 18, 295-389. DOI: 10.1021/jf063654l.

Saavedra M., Conceicao, L.E.C., Pousao-Ferreira, P. and Dinis, M.T., 2006. Amino acid profiles of Diplodus sargus (L., 1758) larvae implications for feed formulation. *Aquaculture*, 261: 587-593. Doi: .org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.016.

Sargent, J.R., Bell, J.G., Henderson, R.J. and Tocher D.R., 1995. Requirement criteria for essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 11, 183-198. DOI: 10.1111/j.1439-0426.1995.tb00018.x

Spolaore, P., Joannis Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A., 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2): 87-96. DOI: 10.1263/jbb.101.87.

Stottrup, J.G. and McEvoy, L.A., 2003. Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell, London, UK, 337P. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.08.016.

Tocher, D., 2003. Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Review Fish Science*, 11(2): 107-184**.** DOI: 10.1080/713610925.

Zaki, M.I., 2010. Comparative study on growth and survival of larval and juvenile *Dicentrachus labrax* rearing on Rotifer and *Artemia* enriched with four different microalgae species. *African Journal of Biotechnology Resource*, 9(24): 3680-3684. DOI: 10.5897/AJB2010.000-3233.

Effect of *Aphanothece halophytica* microalgae on fatty acids and amino acids composition of *Artemia urmiana* nauplius

Akbary P.[1*]; Aminikhoei Z.[2]; Erfanifar E.[2]

[*]paria.akbary@gmail.com

1- Fisheries Group, Marine Sciences Faculty, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran
2- Agricultural Research Educations and Extension Organization (AREEO), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Chabahar Offshore Fisheries Research Center, Chabahar, Iran

Abstract

The present study was conducted to evaluate the effect of different levels of *Aphanothece halophytica* microalgae on the fatty acids and amino acids composition of *Artemia urmiana* nauplius for 3 weeks. Cysts were hatched under identical standard conditions and the experiment was conducted in a completely randomized design with 1200000 of nauplius in 3 trial treatments and 3 replicates (n=100000 in each replicate) included: with 200 mL microalgae with 22 × 10^6, 16× 10^6 and 13× 10^6 cell/mL respectively and control group (1g yeast per 10000 nauplius).The results showed that at the end of experiment, the highest EPA (3.99± 0.25%) and DHA (1.44±0.02 %) was showed in treatments fed with 13× 10^6 cell/mL. Also, the highest Asp, Gli, Ser, Gly, His, Arg, Thr, Ala, Tyr, Val, Met, Ile, Leu and AA was shown in treatments fed with 13× 10^6 cell/mL which showed significant difference compared to other treatments ($P<0.05$) Overall, the results of the present study revealed that *A. urmiana* nauplius fed with different levels of *A. halophytica* microalgae showed better fatty acid and amino acid composition than to control group, and use of 13× 10^6 cell/mL *A. halophytica* algae could suggest for *A. urmiana* nauplius.

Keywords: *Artemia urmiana*, Fatty acid composition, Amino acid, *Aphanothece halophytica* algae

[*]Corresponding author