نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
ص ۲۲۳-۲۳۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۱۹

بررسی تأثیر تیمارهای آب لب‌شور تهیه‌شده به روش‌های مختلف در شاخص‌های رشد و کیفی مراحل لاروی میگوی بزرگ آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*)

❖ **غلامرضا رفیعی*:** استاد گروه مهندسی شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **کامران رضایی توابع:** فارغ‌التحصیل دورهٔ دکتری رشتهٔ مهندسی شیلات دانشکدهٔ منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
❖ **مایکل فرینسکو:** کارشناس ارشد آبزی‌پروری بخش توسعهٔ علوم شیلات دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی، امریکا
❖ **هری دانیلز:** استاد بخش آبزی‌پروری آبزیان گرمابی دانشکدهٔ زیست‌شناسی دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی، امریکا
❖ **محمد مهدی شعیری:** دانشگاه جامع علمی کاربردی سرپل زهاب، ایران

چکیده

این تحقیق با هدف بررسی تأثیرات آب لب‌شور تهیه‌شده به روش‌های مختلف در شاخص‌های رشد و کیفی مراحل لاروی میگوی بزرگ آب شیرین انجام شد. برای این مطالعه، چهار تیمار آب لب‌شور با شوری ۱۲ گرم در لیتر شامل آب رقیق‌شدهٔ دریا، آب لب‌شور تهیه‌شده با نمک کریستالهٔ دریا، آب لب‌شور مصنوعی با ترکیبات فرمول نیو و آب لب‌شور تهیه‌شده با آب شرب شهری و نمک طعام استفاده شد. شاخص‌های رشد و کیفیت لاروی شامل شاخص مرحلهٔ تکوینی لارو (LSI)، شاخص وضعیت لارو (LCI)، وزن خشک لارو، طول دورهٔ لاروی، میزان تحمل استرس فرمالین (LC50-24 h) و درصد بازماندگی لاروها در تیمارهای مختلف با هم مقایسه شدند. نتایج نشان داد که در منابع آب لب‌شور که دارای توازن غلظت کلسیم و منیزیم نسبت به همدیگرند، لاروها رشد و کیفیت بهتری نشان دادند ($P<0/05$). از طرف دیگر، غلظت یون پتاسیم در بین مراحل زوآ و مایسیس در رشد لاروی اهمیت بسیاری دارد و بالابودن شاخص رشد لاروی در روز دهم در آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو به علت غلظت مناسب پتاسیم در آن است. نتایج نشان داد که آب لب‌شور تهیه‌شده از آب دریا بهترین گزینه برای استفاده در مراکز تکثیر و تولید لارو میگوی بزرگ آب شیرین است و بازدهی آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو تفاوت معنی‌داری را با آب لب‌شور رقیق‌شده با آب دریا و آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا دارد. با توجه به هزینهٔ حمل و نقل آب دریا به مراکز تکثیر برای تولید آب لب‌شور، تولید آب لب‌شور تهیه‌شده با نمک کریستالهٔ دریا در دورهٔ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین در مراکز تفریخ‌گاه پیشنهاد می‌شود.

واژگان کلیدی: تفریخ‌گاه، شاخص مرحلهٔ تکوینی لارو ، شاخص وضعیت لارو، میگوی بزرگ آب شیرین.

* نویسندهٔ مسئول تلفن: ۰۲۶۳۲۲۴۵۹۰۹
Email: ghrafiee@ut.ac.ir

۱.مقدمه

مدیریت مراکز تکثیر یکی از مهم‌ترین بخش‌های فنی و اقتصادی در بحث فناوری تکثیر و پرورش آبزیان شیلاتی است که ارتباط مستقیمی با زیست‌شناسی و چرخهٔ زیستی گونهٔ مورد نظر دارد. به طور طبیعی مراکز تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین در مناطقی احداث می‌شوند که آب شیرین و آب لب‌شور در دسترس باشند و این امر توسعهٔ این مراکز را محدود می‌کند؛ به همین دلیل، به تولید انبوه لارو در شرایط آزمایشگاهی و تفریخ‌گاه‌ها بیش از سایر گونه‌های آبزیان توجه شده است. محققان بیان کرده‌اند که جمع‌آوری لارو میگوی بزرگ آب شیرین از محیط طبیعی، برای پرورش نیمه‌متراکم و متراکم، اقتصادی نیست و بهترین روش تهیهٔ لارو برای این مراکز استفاده از تکنیک‌های آزمایشگاهی برای تولید انبوه لارو در تفریخ‌گاه‌هاست (Menasveta and Piyatiratitivokul, 1980). طی چند دههٔ اخیر مطالعات بسیاری با هدف افزایش زنده‌مانی و کیفیت لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین انجام شده است که این مطالعات عموماً در دو زمینهٔ تغذیهٔ مناسب لاروها و مدیریت کیفیت آب تفریخ‌گاه‌ها انجام شده است. لارو میگوی بزرگ آب شیرین بلافاصله بعد از تخم‌گشایی قادر به تغذیه است و اندازهٔ دهان آن نیز برای گرفتن غذاهای زنده، مانند ناپلی آرتمیا و جلبک‌ها، مناسب است و از این نظر لارو میگوی بزرگ آب شیرین محدودیت و حساسیت بسیاری ندارد؛ با وجود این، تحقیقات بسیاری در زمینهٔ تغذیه و شرایط تغذیهٔ این گونه در مراحل لاروی انجام شده است و این امر تا حدود بسیاری باعث توسعهٔ فناوری تکثیر این گونه در شرایط آزمایشگاهی شده است. از سال ۱۹۸۰ سازمان فائو به منظور سیاست تولید پروتئین از سیستم‌های آبزی‌پروری و کاهش فشار بر منابع آبزیان دریایی با اقدامات ترویجی سعی در توسعهٔ تکثیر و پرورش گونهٔ میگوی بزرگ آب شیرین در کشورهای استوایی و نیمه‌استوایی کرده است، اما همواره نیاز به آب لب‌شور با کیفیت و ترکیب مناسب یونی در مرحلهٔ لاروی، اصلی‌ترین مشکل توسعهٔ مراکز تکثیر و تولید لارو این گونه مطرح شده است (New, 2000; Cavalli *et al*., 2001; New, 2004). زیست مساعد لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین در شوری ۱۲ گرم در لیتر انجام می‌گیرد (New, 2002). مدیریت کیفیت آب و تهیهٔ آب لب‌شور با کیفیت مناسب مهم‌ترین اقدام مؤثر در مراکز تکثیر و تولید لارو میگوی بزرگ آب شیرین بیان شده است (Wickins and Bread, 1974; Juarez *et al*., 1987; New, 2002; New 2004; Nahn, 2009). مهم‌ترین پارامتر کیفیت آب لب‌شور در مراکز تکثیر ترکیب نمک‌های معدنی و یونی (آنیون‌ها و کاتیون‌ها) در آن است (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 شیرین‌اند که به دو صورت انتقال فعال و انتشار ساده از طریق آبشش و سطح پوست (بعد از پوست‌اندازی) با مایع همولنف درون بدن لاروها ارتباط دارند 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). کلسیم و منیزیم نیز دو پارامتر مهم کیفی آب‌اند که در ترکیبات مختلف در رشد و توسعهٔ

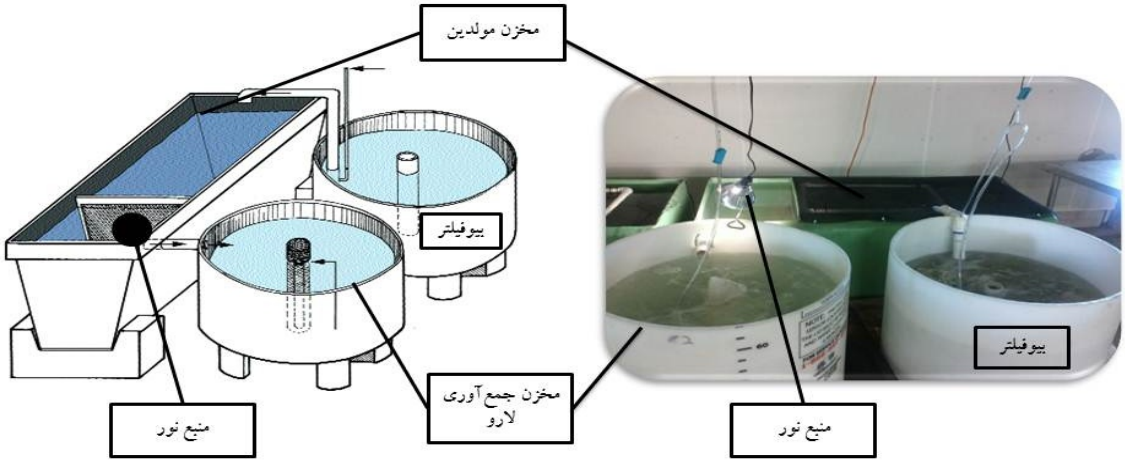
پوستهٔ سخت‌پوستان نقش حیاتی دارند (Mente, 2003) و بایستی با غلظت مناسب در آب در دسترس سخت‌پوستان قرار گیرند. نیاز به آب لب‌شور در مرحلهٔ لاروی باعث روی‌آوردن محققان به تولید آب لب‌شور مصنوعی در سیستم‌های آزمایشگاهی و تکثیر این گونه در شرایط آزمایشگاهی شده است. مطالعات انجام‌شده دربارهٔ تولید لارو میگوی بزرگ آب شیرین در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که زنده‌مانی لاروها پایین بود و لاروها کیفیت مناسبی نداشتند و فناوری تکثیر این گونه در شرایط آزمایشگاهی به خوبی این فناوری در کشورهای مختلف بومی نشده است و همواره تولید لارو با کیفیت مناسب اصلی‌ترین نهادهٔ تکثیر و پرورش این گونه آبزی به شمار می‌رود.

بر خلاف سایر گونه‌های آبزیان، که حدود ۶۰-۴۰ درصد هزینهٔ تولید آنها مربوط به غذادهی و تغذیه است (Wiley,1991)، گونهٔ میگوی بزرگ آب شیرین وضعیتی متفاوت دارد و در ایالات متحدهٔ امریکا فقط ۱۹ درصد هزینه‌های تولید مربوط به غذا و غذادهی است و ۵۲ درصد هزینهٔ تولید مربوط به مدیریت تفریخ‌گاه‌ها، تهیهٔ لارو و پست‌لارو است (Hanson and Sempier, 2007). در کشورهای آسیای جنوب شرقی نیز هزینهٔ بخش مراکز تکثیر بالاست و به طور متوسط ۴۸ درصد بیان شده است (New, 2004)؛ بنابراین، می‌توان بیان کرد که بهینه‌سازی فناوری تکثیر این گونه به منظور کاهش هزینه‌های تولید آبزی‌پروری امری ضروری است. در کشور ما از زمان ورود مولدهای میگوی بزرگ آب شیرین از آسیای جنوب شرقی تاکنون فناوری تکثیر این گونه به‌خوبی در کشور بومی‌سازی نشده است و در حال حاضر فقط در دو استان خوزستان و کرمانشاه تکثیر این گونه انجام می‌شود و پست‌لاروهای تولیدشده برای پرورش در استخرهای خاکی به سایر استان‌ها منتقل می‌شوند. از آنجا که انتقال لاروها و پست‌لاروها به علت حساسیت بالا با تلفات زیاد همراه است، با دستیابی به فناوری مدیریت بهینهٔ کیفی آب لب‌شور، می‌توان در شرایط آزمایشگاهی و تفریخ‌گاه‌ها لاروهای مورد نیاز را تولید کرد و فرایند نقل و انتقال لاروها و تلفات لاروها در این مرحله را برطرف کرد. این امر تأثیر درخور توجهی در کاهش هزینه‌های تولید آبزی‌پروری خواهد داشت. این تحقیق به منظور بهینه‌سازی فناوری تکثیر و تولید لارو میگوی بزرگ آب شیرین در تفریخ‌گاه‌ها انجام شده است و تأثیر تیمارهای مختلف آب لب‌شور با منابع متفاوت در شاخص‌های رشد و کیفیت لارو میگوی بزرگ آب شیرین بررسی و تحلیل می‌شود.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲.تهیهٔ لارو

لاروهای مورد نیاز این تحقیق از ذخیرهٔ مولدین دارای تخم‌های تیره‌رنگ بر روی شکم مرکز تکثیر دریاچهٔ ویلر در ایالت کارولینای شمالی امریکا تهیه شدند. برای جداسازی و تهیهٔ لاروها از مولدین از سیستم گردش آب استفاده شد (شکل ۱). سیستم طراحی‌شده 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 چشمهٔ ریز در محل خروجی آب و دیگری به‌منزلهٔ بیوفیلتر بود. غذادهی مولدین با دانه‌های ۹ میلی‌متری شرکت وست بروک با دو نوبت غذادهی صبح و عصر در حد اشتها انجام شد.



شکل ۱. سیستم مداربستهٔ طراحی‌شده برای جمع‌آوری لارو میگوی بزرگ آب شیرین

تخم‌گشایی بعد از ۳-۲ روز از زمان انتقال مولدین به مخزن نگهداری انجام شد. لاروها با استفاده از جریان ثقلی آب و جذب به سمت منبع نور در مخزن مربوط به لاروها تجمع کردند. خروجی آب مخزن تجمع لاروها به مخزن بیوفیلتر دارای توری استوانه‌ای‌شکل در وسط مخزن با چشمه‌های ۱۵۰ میکرومتر بود که مانع از خروج لاروها می‌شد. در این مخزن، لاروهای تجمع‌یافته با استفاده از سطل‌های دارای الک جداسازی و بعد از شمارش به واحدهای آزمایش منتقل شدند.

۲.۲. تیمارهای آزمایش

سیستم واحدهای آزمایش شامل ظروف ۸ لیتری با تراکم ۱۰۰۰ لارو در هر ظرف بود. واحدهای آزمایش حاوی تیمارهای مختلف آب لب‌شور با شوری ۱۲ گرم در لیتر (سه تکرار برای هر تیمار) بود. هوادهی مخازن به صورت استفاده از هواده متمرکز و دمای آب (۲۹ درجهٔ سانتی‌گراد) نیز با استفاده از بخاری ترموستات‌دار انجام شد. نور با شدت ۱۰۰۰ لوکس روشنایی به مدت ۱۲ ساعت در روز برای زیست مساعد لاروها تنظیم شد (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 بزرگ نمک با تراکم ۱۵-۱۰ عدد ناپلیوس در میلی‌لیتر در دو نوبت صبح و عصر انجام شد.

۳.۲. تهیهٔ آب لب‌شور از منابع مختلف

در این تحقیق تیمارهای مختلف آب لب‌شور برای ارزیابی کیفیت و رشد لاروی در شرایط آزمایشگاهی استفاده شدند. جدول ۱ ویژگی‌های عمومی تیمارهای مختلف آب لب‌شور مورد استفاده در این تحقیق را نشان می‌دهد. تنظیم شوری ۱۲ گرم در لیتر شوری با شوری‌سنج مدل D85 شرکت YSI انجام شد و اندازه‌گیری پارامترهای مختلف شیمیایی آب طی تحقیق با دستگاه اسپکتروفتومتری مدل DR2700 شرکت HACH انجام شد.

جدول ۱. ویژگی‌های عمومی تیمارهای مختلف آب لب‌شور با شوری ۱۲ گرم در لیتر

شمارهٔ تیمار	نوع آب و منشأ تهیه	غلظت کلسیم (ppm)	غلظت منیزیم (ppm)	غلظت سدیم (ppm)	غلظت پتاسیم (ppm)
۱	آب رقیق‌شدهٔ دریا از ایستگاه تحقیقاتی پلمث	۲۹۴	۳۸۸	۴۴۱۵	۱۵۷
۲	آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا	۳۰۸	۴۰۷	۴۶۵۱	۱۶۸
۳	آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو	۱۸۰	۵۰۰	۳۷۵۰	۲۰۰
۴	آب لب‌شور با آب شرب شهری و نمک طعام	۲۴۳	۴۷۶	۴۱۲۰	۱۳۸

۴.۲. شاخص‌های تولیدمثلی مولدین

شاخص درصد نسبت وزن گناد به وزن کل بدن مولدین ماده (GSI)[1] در مرحلهٔ پنجم رسیدگی تخمدان (n=۵) و شاخص درصد نسبت وزن کلاف تخم بعد از تخم‌ریزی به وزن کل مولدین (ESI)[2] (n=۸) به‌منزلهٔ شاخص‌های عمومی تولیدمثلی مولدین ماده بر اساس معادله‌های زیر ارزیابی شدند:

معادله (۱)

ESI = وزن کلاف تخم / وزن بدن مولد × ۱۰۰

معادله (۲)

GSI = وزن تخمدان / وزن بدن مولد × ۱۰۰

۵.۲. شاخص‌های کیفی و رشد لاروی

شاخص‌های زیر برای ارزیابی تأثیر تیمارهای مختلف آب لب‌شور مورد مطالعه در رشد و کیفیت لاروها استفاده شدند:

– وزن خشک لارو

وزن خشک لارو به‌منزلهٔ یک شاخص کیفیت و تکوین لاروی بر اساس دستورالعمل (Nhan *et al.*, 2009) با ترازوی دیجیتالی مدل TR-64 شرکت دنور انجام شد. بر اساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مورد مطالعه ۳۰ قطعه لارو در سه مرحله از لاروهای ۱ ، ۸ و ۱۶ روزه نمونه‌برداری شدند و وزن خشک تعیین شد.

– درصد بازماندگی لارو

درصد بازماندگی لارو بر اساس دستورالعمل (New, 2003) انجام شد. بر اساس این دستورالعمل از تیمارهای مختلف مورد مطالعه ۳۰ قطعه لارو در سه مرحله از لاروهای ۸ ، ۱۸ و ۲۸ روزه نمونه‌برداری شدند و درصد بازماندگی آنها محاسبه شد.

– شاخص مرحلهٔ رشد لارو (LSI)[3]

شاخص رشد لارو یکی از پارامترهای مهم در بررسی رشد لاروی سخت‌پوستان است. در این تحقیق محاسبه و اندازه‌گیری شاخص تکوینی لارو بر اساس دستورالعمل (Uno and Kwon, 1969) انجام شد. در این روش در روزهای ۵، ۱۰ و ۱۵ پرورش لاروی از هر تیمار حداقل ۳۰ قطعه لارو انتخاب شدند و شاخص تکوین لاروی طبق معادله زیر محاسبه شد:

معادله (۳) $LSI = \Sigma Si / N$

در این معادله:

Si = مرحلهٔ تکوین لاروی (i = ۱ تا ۱۱)

N= تعداد لاروهای نمونه‌برداری‌شده

1. Gonadal Somatic Index
2. Egg Clutch Somatic Index
3. Larval Stage Index

– شاخص وضعیت لارو (LCI)[1]

شاخص وضعیت لارو شاخصی کاربردی و مهم برای ارزیابی کیفی لارو میگوی بزرگ آب شیرین است. تایمن و براون (۱۹۹۹) این شاخص را با ارزیابی ۲۰ مورد وضعیت کیفی ظاهری لارو و امتیازدهی به صورت اختصاصی برای لارو میگوی بزرگ آب شیرین ارائه کردند. برای این شاخص در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ دورهٔ لاروی از هر تیمار ۳۰ قطعه لارو انتخاب شدند و شاخص وضعیت آنها طبق معادله تایمن و براون (۱۹۹۹) به صورت زیر محاسبه شد:

$$LCI = \Sigma P.(10N)^{-1} \quad \text{معادله (۴)}$$

در این معادله:

P = امتیاز ثبت‌شده برای هر لارو است.

– استرس محیطی تست فرمالین (LC50-24 h)

میزان تحمل لارو به استرس‌های محیطی از مهم‌ترین شاخص‌های تعیین کیفیت لارو سخت‌پوستان است. در این تحقیق برای تعیین کیفیت لاروهای تولیدشده از استرس محیطی تست فرمالین (LC50-24 h) طبق دستورالعمل (Kitsawat and Chuchot, 1991) استفاده شد. برای تست استرس فرمالین در سه مرحلهٔ ۴، ۷ و ۱۱ تعداد ۳۰ قطعه لارو از هر واحد آزمایش انتخاب شدند و به مدت ۲۴ ساعت غلظت تحت کشندگی ۵۰٪ لاروها ارزیابی شد.

۶.۲. آنالیزهای آماری

قبل از انجام آنالیز واریانس، نرمال‌بودن داده‌ها با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها از آنالیز تجزیه واریانس یک‌طرفه استفاده شد. مقایسهٔ میانگین تیمارهای مختلف (با سطح معنی‌داری $P \leq ۰/۰۵$) با آزمون دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخهٔ ۱۹ انجام شد.

۳. نتایج

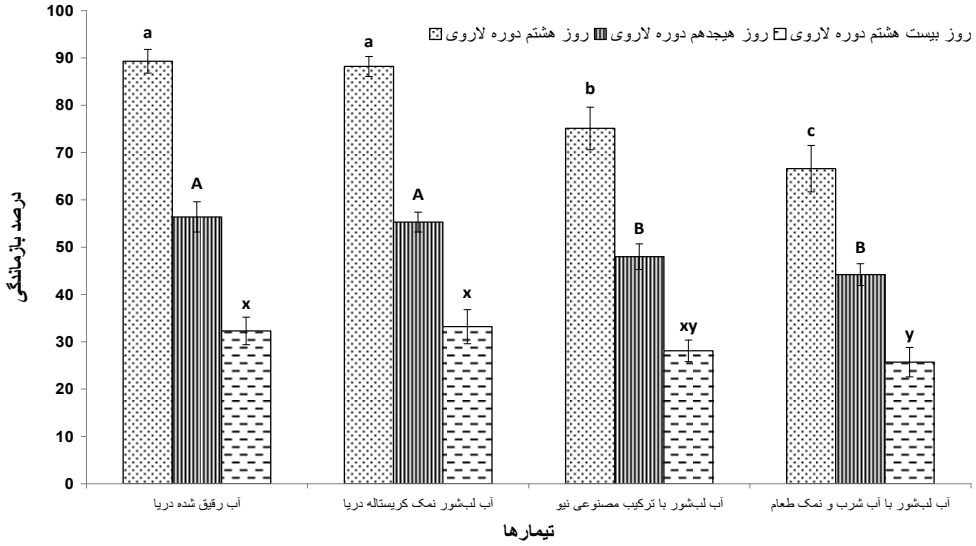
میانگین مهم‌ترین پارامترهای فیزیک‌وشیمیایی آب مخزن مولدین طی دورهٔ تکثیر شامل درجهٔ حرارت، pH، اکسیژن محلول، آمونیاک و نیتریت به ترتیب ۰/۵±۲۸ درجهٔ سانتی‌گراد، ۰/۳±۶/۸، ۰/۴±۵/۸ میلی‌گرم در لیتر، ۰/۱> میلی‌گرم در لیتر و ۰/۸> میلی‌گرم در لیتر اندازه‌گیری و ثبت شد. دورهٔ تولیدمثلی مولدین در این شرایط فیزیک‌وشیمیایی آب و شرایط تغذیه‌ای بیان‌شده در مرکز تکثیر دریاچهٔ ویلر، ۳±۲۹ روز و بازماندگی آنها طی دورهٔ تحقیق ۹۴٪ ارزیابی شد. هماوری نسبی مولدین به طور متوسط ۱۴۰±۹۵۰ تخم به ازای هر گرم وزن بدن مولدین محاسبه شد. شاخص درصد نسبت وزن گناد به وزن کل بدن مولدین (GSI) در مرحلهٔ پنجم رسیدگی تخمدان ۰/۵±۸/۲ درصد و شاخص درصد نسبت وزن کلاف تخم بعد از تخم‌ریزی به وزن کل مولدین (ESI) ۰/۹±۱۱/۳ درصد محاسبه شد.

نمودار ۱ نتایج درصد بازماندگی لاروها طی دورهٔ لاروی را نشان می‌دهد. در هر سه مرحلهٔ ارزیابی، درصد بازماندگی آب لب‌شور رقیق‌شدهٔ دریا و آب لب‌شور نمک حاصل از نمک کریستالهٔ دریا بیشترین مقدار و آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام کمترین مقدار بود و میزان ثبت‌شدهٔ بازماندگی برای آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو حالت بینابین را نشان داد.

1. Larval Condition Index

جدول ۲. ویژگی‌های تولیدمثلی مولدین ماده

پارامتر	انحراف معیار±میانگین
وزن مولدین (گرم)	۴۱±۷
درصد بقای مولدین	٪۹۴
فاصلهٔ بین دو تخم‌ریزی (روز)	۲۹±۳
هماوری نسبی	۹۵۰±۱۴۰
هماوری کل	۴۰۸۵۰±۳۷۴۶
شاخص GSI (٪)	۸/۲±۰/۵
شاخص ESI (٪)	۱۱/۳±۰/۹



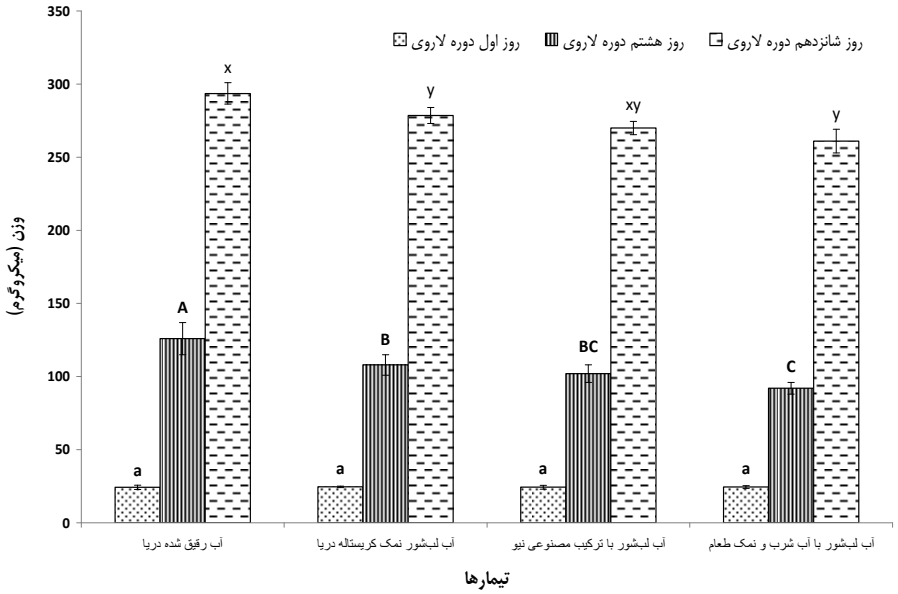
نمودار ۱. درصد بازماندگی لارو در سنین مختلف دورهٔ لاروی در تیمارهای مختلف آب لب‌شور (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون‌گروهی است و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) است.

جدول ۳ نتایج شاخص مرحلهٔ رشد لارو (LSI) را در روزهای پنجم، دهم و پانزدهم دورهٔ لاروی نشان می‌دهد. نتایج میزان این شاخص در روز پنجم و پانزدهم بیشترین میزان را برای تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و در روز دهم برای تیمار آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو نشان داد؛ در حالی که، در روز دهم بیشترین مقدار مربوط به تیمار آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو بود. همچنین، کمترین دورهٔ لاروی برای تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و بیشترین دورهٔ لاروی برای تیمار آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام ثبت شد (جدول ۳).

جدول ۳. طول دورهٔ لاروی و شاخص مرحلهٔ رشد لارو در سنین متفاوت در تیمارهای مختلف آب لب‌شور (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون‌گروهی است و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) است.

پارامتر	تیمارهای مختلف آب لب‌شور			
	آب رقیق‌شدهٔ دریا	آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا	آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو	آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام
شاخص مرحلهٔ رشد لارو در روز پنجم	۴/۱±۰/۳^{a}	۴±۰/۲^{a}	۳/۹±۰/۳^{ab}	۳/۵±۰/۴^{b}
شاخص مرحلهٔ رشد لارو در روز دهم	۶/۹±۰/۶^{AB}	۶/۳±۰/۵^{BC}	۷/۴±۰/۳^{A}	۵/۷±۰/۲^{C}
شاخص مرحلهٔ رشد لارو در روز پانزدهم	۹/۱±۰/۳^{x}	۸/۸±۰/۳^{xy}	۸/۷±۰/۲^{xy}	۸/۲±۰/۵^{y}
دورهٔ لاروی (روز)	۱۹/۳±۱/۵^{Z}	۲۰/۶±۲/۱^{YZ}	۲۳±۱/۱^{XY}	۲۵±۱/۳^{X}

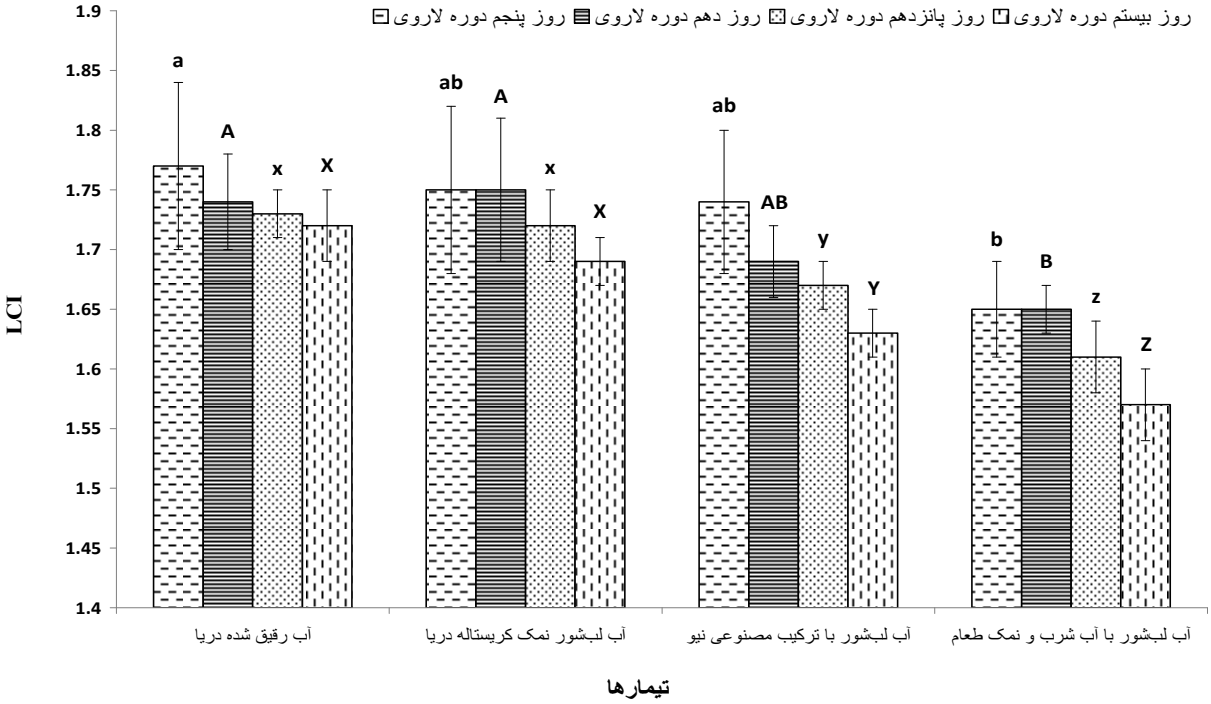
نتایج نشان داد که شاخص وزن خشک لارو تازه‌تفریخ‌شده تفاوت معنی‌داری را در بین تیمارهای مورد مطالعه نشان نداد ($P\geq$۰/۰۵)؛ در حالی که، همین شاخص در روز هشتم تفاوت معنی‌داری را در بین تیمارها نشان داد ($P\leq$۰/۰۵) و تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا بیشترین مقدار و تیمار آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام کمترین مقدار را نشان دادند.



نمودار ۲. وزن خشک لارو در سنین مختلف دورهٔ لاروی در تیمارهای متفاوت آب لب‌شور (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون‌گروهی است و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) است.

نمودار ۳ نتایج شاخص وضعیت لارو (LCI) را در روزهای پنجم، دهم، پانزدهم و بیستم دورهٔ لاروی

نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که در تمامی تیمارها شاخص وضعیت لارو طی دورهٔ لاروی کاهش می‌یابد. همچنین، نتایج شاخص وضعیت لارو در مراحل مختلف نشان داد که با نزدیک‌شدن به انتهای دورهٔ لاروی تفاوت معنی‌دار بین تیمارها مشخص‌تر می‌شود. این شاخص در تمامی مراحل لاروی تفاوت معنی‌داری بین تیمار آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام با سایر تیمارهای مورد مطالعه نشان داد (P≤۰/۰۵). در حالی که، همین شاخص طی دورهٔ لاروی تفاوت معنی‌داری بین دو تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا نشان نداد (P≥۰/۰۵) (نمودار ۳).



نمودار ۳. شاخص وضعیت لارو در سنین مختلف دورهٔ لاروی در تیمارهای متفاوت آب لب‌شور (انحراف معیار±میانگین). مقایسه درون‌گروهی است و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار (P≤۰/۰۵) است.

غلظت تحت کشندگی ۵۰٪ لاروها به استرس فرمالین (LC_{50}-24 h) در سه مرحلهٔ ۴، ۷ و ۱۱ طی یک شبانه‌روز طبق دستورالعمل (Kitsawat and Chuchot, 1991) ثبت شد. نتایج نشان داد که لاروهای حاصل از تیمارهای مختلف آب لب‌شور تفاوت معنی‌داری از نظر میزان تحمل به استرس فرمالین دارند. در مرحلهٔ ۴ لاروی بیشترین میزان تحمل لاروها در تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و در مرحلهٔ ۷ در آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا و در مرحلهٔ ۱۱ مجدداً بیشترین مقدار در آب لب‌شور رقیق‌شدهٔ دریا مشاهده شد. در هر سه مرحلهٔ فوق لاروهای آب لب‌شور با آب شرب نمک طعام کمترین تحمل را به استرس فرمالین نشان دادند (جدول ۴).

جدول ۴. بازماندگی استرس فرمالین (LC_{50}-24 h) در مراحل رشد مختلف در تیمارهای آب لب‌شور (انحراف معیار±میانگین). در هر سطح مقایسه درون‌گروهی است و حروف متفاوت بیانگر تفاوت معنی‌دار ($P\leq$۰/۰۵) است.

تیمارهای آب لب‌شور	LC50-24 h استرس فرمالین در مراحل مختلف تکامل لاروی		
	۴	۷	۱۱
آب رقیق‌شدهٔ دریا	۱۳۱±۶/۶^{a}	۱۵۳/۳±۴/۱^{A}	۱۸۰/۴±۶^{x}
آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا	۱۲۴±۷/۲^{ab}	۱۵۶±۵/۹^{A}	۱۷۳/۳±۵/۷^{x}
آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو	۱۱۴/۶±۴^{bc}	۱۴۲±۵^{B}	۱۶۸±۳/۶^{y}
آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام	۱۰۸/۵±۴/۱^{c}	۱۴۰/۶±۶^{B}	۱۶۳/۸±۴^{y}

۴. بحث و نتیجه‌گیری

ترکیبات یونی و نمکی موجود در آب لب‌شور از دو جنبهٔ پوست‌اندازی و تنظیم اسمزی در زیست‌شناسی لارو میگوی بزرگ آب شیرین تأثیر مستقیم دارند. ترکیبات یونی موجود در آب لب‌شور (شوری ۱۲ گرم در لیتر) تیمارهای آزمایش متفاوت بودند؛ این تفاوت در ترکیبات آب لب‌شور تأثیرات زیستی درخور توجهی در کیفیت و رشد لاروها نشان داد. نبود تفاوت معنی‌دار در وزن خشک لاروهای تازه‌تفریخ‌شده در بین تیمارهای آزمایش و وجود تفاوت معنی‌دار در همین شاخص در روز هشتم و شانزدهم بیانگر تأثیر ترکیبات معدنی و یونی منابع مختلف آب لب‌شور در وزن لاروهاست؛ مهم‌ترین ترکیب معدنی مؤثر در پوست‌اندازی و افزایش وزن لاروها کلسیم موجود در آب است (Hangsapreuke *et al.*, 2008). کربنات کلسیم موجود در پوستهٔ لارو میگوی بزرگ آب شیرین حدود ۲۵ درصد وزن بدن را تشکیل می‌دهد در حالی که ترکیبات سدیم، پتاسیم و منیزیم کمتر از ۲/۵ درصد وزن کل بدن است (Wilder *et al.*, 2009). در این تحقیق بیشترین غلظت کلسیم مربوط به آب لب‌شور با نمک کریستالهٔ دریا بود، اما بیشترین وزن خشک لاروها در روز هشتم و شانزدهم در لاروهای تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا مشاهده شد. مطالعات نشان داده است که بالابودن غلظت منیزیم در آب دسترسی زیستی غلظت کلسیم را برای جذب در پوستهٔ سخت‌پوستان کاهش می‌دهد (Jain *et al.*, 2006; Houang *et al.*, 2010)؛ این امر بیانگر این موضوع است که غلظت کلسیم به تنهایی برای رشد لارو کافی نیست و مهم‌تر از آن توازن غلظت کلسیم و منیزیم است که تناسب بهتری را در تیمار آب لب‌شور رقیق‌شدهٔ دریا دارد. بعد از پوست‌اندازی تا شکل‌گیری پوستهٔ جدید کوتیکولی، لایهٔ اپیدرمیس سطح بدن بسیار نازک است و در این مرحله موجود قادر است برخی از مواد معدنی مورد نیاز خود نظیر کلسیم، منیزیم، سدیم و پتاسم را به طور مستقیم از آب محیط اطراف جذب کند (Cheng *et al.*, 2003)؛ این امر در اوایل مرحلهٔ لاروی که توالی پوست‌اندازی بالاست اهمیت بیشتری دارد. محققان در مطالعات خود نشان دادند که عناصر کلسیم و منیزیم آب برای پوست‌اندازی و تشکیل پوستهٔ میگوی بزرگ آب شیرین ضروری

است و کلسیم نیز در ترکیب کربنات کلسیم به همراه ترکیبات کیتینی پوسته را تشکیل می‌دهند (Wilder *et al*., 1998). پوست‌اندازی لاروها باعث رشد و رشد مرحله‌ای آنها نیز می‌شود (Bart and Yen, 2003)؛ در این تحقیق به‌رغم اینکه بیشترین درصد بقای لاروها در دو تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا مشاهده شد، اما بیشترین مقدار شاخص مرحلهٔ رشد لارو در دو تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو مشاهده شد. در حالی که، بیشترین مقدار شاخص وضعیت لارو در دو تیمار آب رقیق‌شدهٔ دریا و آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا مشاهده شد. از آنجا که در تیمار آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو در مقایسه با سایر تیمارها نسبت غلظت منیزیم به کلسیم بیشتر است، پوست‌اندازی لاروها با پوسته‌های ضعیف و با کیفیت پایین انجام می‌شود؛ این امر باعث می‌شود که به‌رغم طی‌شدن مرحلهٔ رشد لارو، وزن لاروها، درصد بقای آنها و میزان تحمل آنها به استرس فرمالین به‌خصوص در مراحل ۷ و ۱۱ لاروی در تیمار آب لب‌شور نیو پایین‌تر باشد.

محققان یون‌های پتاسیم، سدیم و کلراید را عوامل اصلی تعیین اسمولالیتی همولنف و تنظیم اسمزی بدن میگوی بزرگ آب شیرین بیان کرده‌اند (Cheng *et al*., 2003; Pan *et al*., 2006). منبع یون کلراید در آب لب‌شور عمدتاً ترکیبات نمکی کلراید سدیم، کلراید پتاسیم و کلراید کلسیم بیان شده است که به میزان مناسب در ترکیبات آب لب‌شور یافت می‌شود (Pan *et al*., 2006)، اما غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم در آب لب‌شور و مایع همولنف بیشترین تأثیر را در تنظیم اسمزی لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین دارند (Cheng *et al*., 2003). بالابودن نقطهٔ ایزواسموتیک مایع همولنف درون بدن لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین (Singh, 1980) و شکل‌نگرفتن سیستم تنظیم اسمزی در مراحل اولیهٔ رشد لاروی (Bouaricha *et al*., 1994) باعث شده است که در طبیعت، مراحل تکوینی لاروها در آب لب‌شور با اسمولالیتی مشابه اسمولالیتی همولنف درون بدن لاروها (۱۵-۱۰ گرم در لیتر) انجام شود و در صورت دسترسی‌نداشتن لاروهای تازه‌تفریخ‌شده به آب لب‌شور تلف خواهند شد (Caluwe *et al*., 1995; Wilder *et al*., 1998; Cavalli *et al*., 2001). شاخص مرحلهٔ رشد لاروها در روز دهم بهترین مقدار را برای تیمار آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو و کمترین مقدار را برای تیمار آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام نشان داد؛ این در حالی است که بیشترین غلظت پتاسیم در آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو و کمترین غلظت آن در تیمار آب لب‌شور با آب شرب و نمک طعام قرار دارد. مطالعهٔ سیر تکوینی لاروهای میگوی بزرگ آب شیرین نشان داده است که تمایز سیستم تنظیم اسمزی و شکل‌گیری آن در بین مراحل زوآ و مایسیس اتفاق می‌افتد (Bouaricha *et al*., 1994) که این امر تقریباً هم‌زمان با روز نهم تا سیزدهم تکامل لاروی است. به‌رغم اینکه رشد بهینهٔ موجودات آبزی در محیط ایزواسموتیک- به علت نیازنداشتن صرف انرژی برای تنظیم اسمزی- اتفاق می‌افتد، اما این اصل دربارهٔ میگوی بزرگ آب شیرین صادق نیست و به‌رغم اینکه نقطهٔ ایزواسموتیک مایع درون بدن ۱۷ گرم در لیتر است، اما رشد بهینهٔ موجود در طبیعت در شوری‌های پایین‌تر اتفاق می‌افتد (Singh, 1980).

مطالعات نشان داده است که نقطهٔ ایزواسموتیک مایع درون بدن و توانایی تنظیم اسمزی در میگوی بزرگ آب شیرین ثابت نیست و با سن و اندازهٔ موجود و در مراحل مختلف رشد نیز تغییر می‌کند (Perdue and Nakamura, 1976).

یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد در منابع آب لب‌شور، که نسبت به یکدیگر توازن غلظت کلسیم و منیزیم دارند، لاروها رشد و کیفیت بهتری نشان دادند. از طرف دیگر، غلظت یون پتاسیم در بین مراحل زوآ و مایسیس- هم‌زمان با شکل‌گیری سیستم اسمزی لاروها- در رشد لاروی اهمیت بسیاری دارد و بالابودن شاخص رشد لاروی در روز دهم در آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو احتمالاً به علت غلظت مناسب پتاسیم در آن است. نتایج نشان داد که آب لب‌شور تهیه‌شده از آب دریا بهترین گزینه برای استفاده در مراکز تکثیر و تولید لارو میگوی بزرگ آب شیرین است و بازدهی آب لب‌شور با ترکیب مصنوعی نیو تفاوت معنی‌داری را با آب لب‌شور رقیق‌شده با آب دریا و آب لب‌شور نمک کریستالهٔ دریا دارد. با توجه به هزینهٔ حمل و نقل آب دریا به مراکز تکثیر برای تولید آب لب‌شور، تولید آب لب‌شور با نمک کریستالهٔ دریا در دورهٔ لاروی میگوی بزرگ آب شیرین در مراکز تفریخ‌گاه پیشنهاد می‌شود. همچنین، پیشنهاد می‌شود برای دستیابی به ترکیب مصنوعی ایدئال آب لب‌شور، برای مراکز تولید و تکثیر میگوی بزرگ آب شیرین نسبت بهینهٔ کلسیم و منیزیم در مقایسه با یکدیگر و غلظت مناسب پتاسیم طی دورهٔ لاروی بررسی شود.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم مرکز تکثیر دریاچهٔ ویلر و آزمایشگاه‌های دیوید کلارک وابسته به بخش تکثیر و پرورش آبزیان گرمابی دانشکدهٔ زیست‌شناسی و علوم کشاورزی دانشگاه ایالتی کارولینای شمالی برای فراهم‌کردن امکانات تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین، از مؤسسهٔ توسعهٔ میگوی بزرگ آب شیرین امریکا برای فراهم‌کردن مولدین مورد نیاز تحقیق و سرکار خانم جنیفر واریللو، متخصص آزمایشگاه دیوید کلارک، برای همکاری‌های فنی طی تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

[1]. 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 .

[2]. Bart, A.N., Yen, P.T., 2003. Comparison of larval performance between Thai and Vietnamese freshwater giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man): a preliminary study. Aquaculture Research. 34, 1453-1458.

[3]. Bouaricha, N., Daures, M.C., Thuet, P., Trilles, J.P., Charmantier, G., 1994. Ontogeny of osmoregulatory structures in the shrimp *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda). The Biological Bulletin 186, 29-40.

[4]. Caluwe, J.D., Korkor, A.M.E., Hisbi, D., Lavens, Sorgeloos, P., 1995. In vitro hatching of *Macrobrachium rosenbergii* eggs: optimization of environmental conditions. European Aquaculture Society. 24, 1-4 .

[5]. 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.

[6]. 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.

[7]. Hangsapreuke, K., Thamrongnawasawat, T., Powtongsook, S., Tabthipwon, P., Lumubol, P., Pratoomchat, B., 2008. Embryonic development, hatching, mineral consumption, and survival of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) reared in artificial seawater in closed recirculating water system at different levels of salinity. Maejo International Journal of Science and Technology. 2, 471-482.

[8]. Hanson, R.T., Sempier, S.H., 2007. Freshwater prawn cost of production. Mississippi Agricultural and Forestry Bulletin. 1162. 1-16.

[9]. 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.

[10]. Jain, K.L., Gupta, R.K., Sabhlok, V.P., Singh, B., Jindal, M., 2006. Growth, survival and production of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) in nursery ponds. Livestock Research for Rural Development. 20, 1-7.

[11]. Juarez, L.M., Holtschmit, K.H., Salmeron, J.J., Smith, M.K., 1987. The effects of chemical and visual communication, space availability, and substratum color growth of the juvenile freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Journal of Experimental Marine Ecology and Biology 110, 285-295.

[12]. Kitsawat P. & Chuchot S. (1991) Acute toxicity of formalin to giant freshwater prawn (*Macrobranchium rosenbergii*). King Mongkut's Agricultural Journal, 9, 45-52.

[13]. Menasveta, P., Piyatiratitivokul, S., 1980. A comparative study on larviculture techniques for the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Aquaculture. 20, 239-249.

[14]. Mente, E., 2003. Nutrition, Physiology and Metabolism in Crustaceans. Science Publisher, Inc., Enfield, USA. 170 pp.

[15]. 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.

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

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

[18]. 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.

[19]. Pan, L.Q., Luan, Z.H., Jin, C.X., 2006. Effects of Na^+ /K^+ and Mg^{2+} /Ca^{2+} ratios in saline groundwaters on Na^+ -K^+ -ATPase activity, survival and growth of *Marsupenaeus japonicus* postlarvae. Aquaculture. 261, 1396-1402 .

[20]. Perdue, N.K., Nakamura, R., 1976. The effects of salinity on the growth of *Macrobrachium rosenbergii*. Proc. Seventh Annu. Meeting World Maricult. Soc. San Diego. Ca. pp. 647-654.

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

[22]. Singh, T., 1980. The isosmotic concept in relation to the aquaculture of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. 20, 251-256.

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

[24]. Uno, Y., Kwon, C.S., 1969. Larval development of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man) reared in the laboratory. Journal of the Tokyo University of Fisheries. 55, 179–190.

[25]. 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.

[26]. Wilder, M.N., Ikuta, K., Atmomarsono, M., Hatta, T., Komuro, K., 1998b. 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.

[27]. 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.

[28]. Wiley, J., (1991). Introduction to Aquaculture. mattew Co, New York, 440pp.

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