



## بررسی اثر لیزر پیوسته کم توان هلیوم-نئون روی میزان تخم‌گشایی و طول عمر *Artemia urmiana*

منصوره قائمی<sup>۱\*</sup>، رسول صدیقی بناپی<sup>۲</sup>، رضا حاجتی وایقان<sup>۲</sup>، لاله رومیانی<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران

<sup>۲</sup> دانشکده فیزیک، دانشگاه صنعتی شریف

نوع مقاله:

مقاله کوتاه

### چکیده

آرتمیا به عنوان غذای زنده جایگاه ویژه‌ای در آبرزی پروری دارد. در این تحقیق با استفاده از پرتودهی با لیزر ۱۰ میلی وات هلیوم-نئون به سیست‌ها، درصد تخم‌گشایی و طول عمر آرتمیا مطالعه شد. پرتودهی در سه زمان ۳، ۴ و ۵ ساعت صورت گرفت. نتایج درصد تخم‌گشایی نشان داد پس از ۱۸ و ۲۴ ساعت از تفریح، سیست‌هایی که با مدت زمان ۴ ساعت پرتودهی شده بودند، دارای درصد تخم‌گشایی بیشتری بودند، همچنین طول عمر آرتمیاهای این تیمار در مقایسه با کنترل، در ماده و نر به ترتیب ۱۲ و ۱۰ روز بیشتر شد ( $p < 0.05$ ).

کلمات کلیدی:

تخم‌گشایی

لیزر

*Artemia urmiana*

### مقدمه

آرتمیا (میگوی آب شور) از دیدگاه رده‌بندی متعلق به زیرشاخه سخت پوستان (Crustacea) و رده آبشش‌پایان (Branchiopoda) می‌باشد (Khomehchin et al., 2013). آرتمیا در شرایط نامناسب محیطی به روش تخم‌گذاری (سیست زائی) تولید مثل می‌کند. سیست‌های تولیدی یا در مرحله خواب (Diapaus) یا در مرحله بیداری (Quiescence) قرار دارند. سیست‌های به دیاپوز رفته حتی در شرایط مناسب محیطی و بدون تغییر شرایط فیزیولوژیکی جنین (در اثر عوامل خارجی)، تخم‌گشایی نمی‌شوند، لذا از مطلوبیت لازم برای تولید غذای زنده برخوردار نمی‌باشند و نیاز به رفع خفتگی دیاپوز دارند. سیست آرتمیا نیز همچون یک منبع غذای زنده مورد استفاده در مراحل لاروی ماهیان دریایی، آب شیرین و گونه‌هایی از سخت پوستان می‌باشد مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zabihi et al., 2007).

تولید آرتمیا در جهان بسیار پررونق است و سالانه بیش از ۱۰۰ تن سیست آن در جهان تولید و با قیمت هر کیلو حدود ۱۲۰ تا ۲۰۰ دلار در سال ۲۰۱۱ به بازار عرضه شده است (Agh and Yahyazadeh, 1996; Aahraf, 1995). برای تولید سیست جهت اقتصادی کردن آن برای کشت انبوه و تولید با کیفیت بالا باید از روش‌های نوین بهره‌برداری برای این موضوع استفاده کرد (Ferdouszadeh, 2010).

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: [mansorehghaeni@gmail.com](mailto:mansorehghaeni@gmail.com)

تاکنون تحقیقات زیادی در دنیا خصوصاً بلژیک به عنوان قطب پژوهش آرتمیا و همچنین در پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبی ارومیه انجام شده است و مقالات و کتب متعددی به چاپ رسیده است (Ferdouszadeh, 2010). طی سال‌های اخیر با گسترش علم زیست فناوری، استفاده از پرتو لیزر و چشمه های ذرات باردار و نوترون در زمینه های زیست فناوری مورد توجه محققان مختلف بیوشیمی، بیوفیزیک، کشاورزی و ... قرار گرفته است. در زمینه آرتمیا نیز تحقیقاتی انجام شده است که می‌توان به بررسی تاثیرات ذرات باردار (الف، بتا، گاما و ...) بر فاکتورهای زیستی در گونه های مختلف آرتمیا اشاره کرد (Sadigh and Qadiri, 2004; Agh and Abdi, 2002; Matveeva et al., 2004).

مطالعه درصد تخم‌گذاری یکی از پارامترهای مهم در آرتمیا می‌باشد و می‌تواند میزان و معیاری از کیفیت سیستم‌ها را ارائه دهد. هرگاه بتوان با استفاده از پرتوهای اعم از پرتوهای با نوترون‌های حرارتی، میدان‌های مغناطیسی، امواج میکروویو لیزر و یا هر وسیله دیگر درصد تخم‌گذاری را افزایش داد، می‌توان به این نتیجه دست یافت که این نوع پرتوهای با یک سری مشخصه‌های چشمه، اثرات مثبتی را در موجود الفاء کرده است. تفریح سیستم آرتمیا به عوامل متعددی از جمله ژنتیک، پراکنش جغرافیایی، شرایط زندگی بالغین، روش برداشت و فرایندهای عمل‌آوری سیستم و مهمترین آنها دما و شوری بستگی دارد که البته تاثیر دما بیشتر از سایر عوامل می‌باشد (Hedayati and Bagheri, 2010).

یکی از مهمترین پارامترهایی که در یک موجود زنده حائز اهمیت می‌باشد، طول عمر موجود زنده است و هرگاه فرایندی صورت گیرد که در آن بتوان این پارامتر را تغییر داد می‌توان به نتایج جالبی دست یافت. کاهش در مدت زمان تخم‌گذاری سیستم‌ها، افزایش درصد تخم‌گذاری و افزایش طول عمر، پارامترهای قابل‌تحلیلی هستند. این امر نیز به نوبه خود با افزایش هموگلوبین سیستم که حامل اکسیژن می‌باشد در ارتباط است. بنابراین افزایش میزان هموگلوبین با افزایش در توانایی جذب اکسیژن همراه است که باعث تنفس بهتر جنین می‌شود و چون جنین در شرایط محیطی مناسب خود را برای تخم‌گذاری آماده می‌کند، لذا شرایط را برای تخم‌گذاری مناسب دیده و از این رو می‌توان کاهش در زمان تخم‌گذاری سیستم‌ها و افزایش تخم‌گذاری را تبیین کرد. این عامل در طول عمر هم موثر است زیرا تنفس بهتر جنین و بالا رفتن توانایی جذب اکسیژن می‌تواند در طول عمر موجود تاثیر مثبتی گذاشته و عمر آن را افزایش دهد (Chyou et al., 2007).

Abatzopoulos و همکاران (۲۰۰۶)، ویژگی‌های سیستم *Artemia urmiana* و سیستم پوسته‌زدایی شده آن را در ایران مورد بررسی کامل قرار دادند. Al-Seria و همکاران (۲۰۱۱)، کارایی تفریح سیستم پوسته‌زدایی شده *Artemia franciscana* با استفاده از لیزر دیود ۸۹۰ نانومتر را مورد مطالعه قرار دادند. Peykaran و همکاران (۲۰۱۱)، ویژگی‌های بیومتریک سیستم‌های آرتمیا را در مناطق مختلف ایران مورد مطالعه قرار دادند و در این میان سیستم *Artemia urmiana* قطر بیشتری (۲۸۵/۴ میکرون) نسبت به سایر سیستم‌ها داشت.

در تحقیق حاضر در میان تمام گزینه‌های موجود زنده برای بررسی اثر منابع تابشی، آرتمیا به دلیل توانایی تولید نسل در مدت زمان کوتاه (۲ تا ۳ هفته) و در دسترس بودن به مقدار زیاد، انتخاب گردید. همچنین با توجه به این که هدف، تاثیر لیزر بر بافت بود، لذا از لیزر هلیوم- نئون با توان ۱۰ میلی‌وات در زمان‌های مختلف استفاده شد و بنابر دلایل مذکور تاثیرات لیزر کم توان پیوسته بر میزان تخم‌گذاری و طول عمر آرتمیا مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی شریف انجام شد. سیستم آرتمیا اورمیا جهت کشت و تکثیر در آزمایشگاه تحقیقاتی لیزر از پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبی ارومیه به صورت خشک و قابل‌نگهداری در دمای محیط تهیه گردید. پرتوهای لیزر هلیوم- نئون ساخته شده در دانشگاه شریف صورت گرفت. برای انجام این پروژه مراحل مختلفی انجام شد. ابتدا اثر لیزر با تغییر در مدت زمان تابش بر روی درصد تخم‌گذاری، زمان تخم‌گذاری و طول عمر بررسی گردید. برای این کار از لیزر هلیوم- نئون با توان ۱۰ میلی‌وات استفاده شد و با توجه به زمان پرتوهای سه تیمار مختلف در نظر گرفته شد:

- ۱- تیمار اول سیستم‌هایی که به مدت ۳ ساعت پرتوهای شدند. (میزان انرژی محاسبه شده ۰۸ ژول)

- ۲- تیمار دوم سیست‌هایی که به مدت ۴ ساعت پرتودهی شدند. (میزان انرژی محاسبه شده ۱۴۴ ژول)
- ۳- تیمار سوم سیست‌هایی که به مدت ۵ ساعت پرتودهی شدند. (میزان انرژی محاسبه شده ۱۸۰ ژول)
- ۴- گروه شاهد سیست‌های بدون پرتودهی

برای کلیه تیمارها ۳ تکرار قرار داده شد. برای هر تیمار مقدار ۰/۰۸ میلی گرم سیست توسط ترازوی دیجیتال توزین و در انکوباتورهای با شوری ppt ۳۳ در مدت زمان‌های تعیین شده تحت تابش قرار گرفتند و سیست‌ها در حین پرتودهی هوادهی شدند و برای جلوگیری از نورهای اضافی ظروف توسط فویل آلومینیومی پوشانده شدند. برای هیچ‌کردن سیست‌ها جهت کنترل دما، انکوباتورها در آکواریوم‌های حاوی آب قرار گرفتند و با هیتر دمای آب در ۲۷ درجه سانتیگراد تنظیم گشت (Sankian *et al.*, 2011). طی مدت ۲۴ ساعت مراحل مختلف رشد و تخم‌گذاری بررسی و درصد تخم‌گذاری با استفاده از شمارش مراحل مختلف محاسبه گردید. برای تغذیه از جلبک *Dunaliella tertioleca* با غلظت  $10^6 \times 18$  cell/ml و مخمر لازمی، طبق جدول غذادهی Coutteau استفاده شد. روزانه بیومتری انجام گرفت و طول کل دوره ۴۰ روز بود (Yarahmadi, 2006).

درصد تخم‌گذاری با استفاده از رابطه زیر، برای هر تیمار محاسبه شد. در این رابطه N نمایانگر تعداد ناپلیوس‌ها در اولین مرحله‌ی لاروی Instar-I، E تعداد لاروها در مرحله‌ی پیش ناپلیوسی و C تعداد سیست‌ها در یک نمونه است (Abatzopoulos *et al.*, 2006)

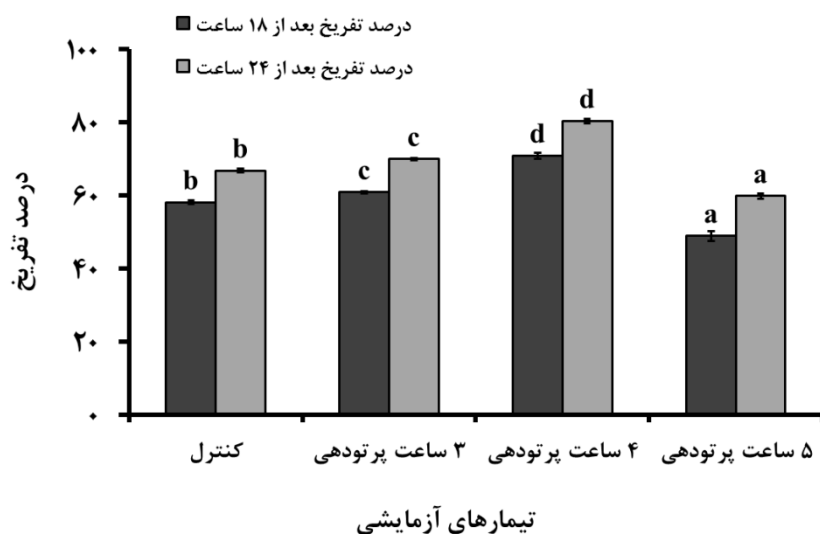
$$\%H = \frac{N}{N + E + C} \times 100$$

### آنالیز آماری

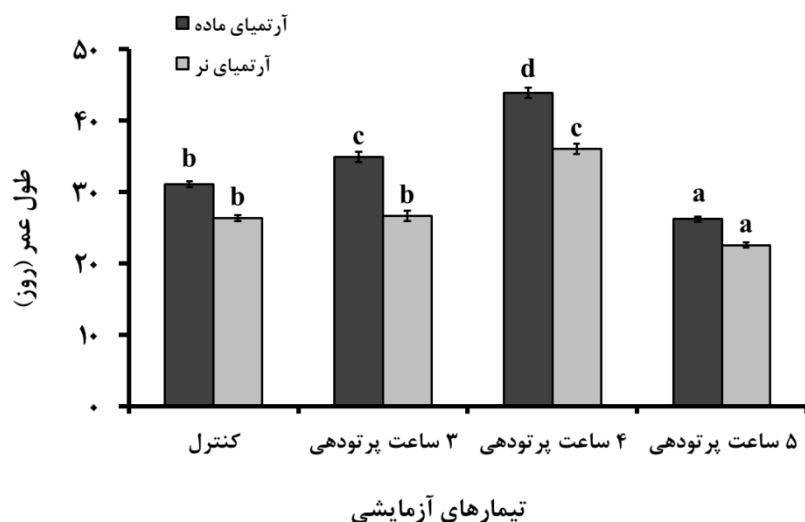
در ابتدا نرمال بودن تمام داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک مورد بررسی قرار گرفت. همچنین همگن بودن واریانس داده‌های حاصل، قبل از انجام تست آماری ANOVA با استفاده از آزمون لیونز بررسی شد. به منظور مقایسه میانگین گروه‌های مختلف آزمایشی با هم و بررسی تاثیر مدت زمان پرتودهی بر فاکتورهای مورد نظر، آنالیز یک طرفه مقایسه واریانس‌ها (ANOVA) اجرا شد. سپس برای تعیین تفاوت موجود در بین گروه‌های آزمایشی، آزمون چند مقایسه‌ای دانکن مورد استفاده قرار گرفت. تمام بررسی‌های آماری انجام شده در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۱۵) اجرا شد. خطای نوع اول با سطح دقت ۰/۰۵ در نظر گرفته شده و تمام مقادیر به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان گردید.

### نتایج

نتایج درصد تخم‌گذاری بعد از ۱۸ و ۲۴ ساعت نشان داد که سیست‌هایی که مربوط به پرتودهی با لیزر ۱۰ میلی وات با مدت زمان ۴ ساعت بودند دارای درصد تخم‌گذاری بیشتری نسبت به بقیه تیمارها بودند (شکل ۱). همان‌طور که پرتودهی با مدت زمان ۴ ساعت اثرات مثبتی در درصد تفریح القا کرده بود، با توجه به شکل ۲ مشاهده می‌شود که با همین مشخصه‌های لیزری تغییرات بارزی بر روی طول عمر موجود ایجاد شده است، به طوری که عمر آرتمیای ماده در مقایسه با کنترل تقریباً ۱۲ روز بیشتر شده بود و تغییرات در طول عمر آرتمیای نر در حدود ۱۰ روز می‌باشد ( $p < 0.05$ ). این برای یک موجود که طول عمری در حدود ۳۰ روز دارد مشخصه بسیار خوبی به شمار می‌رود.



شکل ۱. درصد تخم گشایی سیست آرتمیای ارومیه بعد از ۱۸ و ۲۴ ساعت



شکل ۲. طول عمر آرتمیای ارومیه نر و ماده که سیست های آنها قبل از تفریخ پرتو دهی شده بودند

## بحث

در مطالعه حاضر تأثیر لیزر هلیوم-نئون بر تخم گشایی سیست و طول عمر آرتمیای اورمیانا بررسی گردید. عوامل محیطی از جمله درجه حرارت، اسیدیته، شوری و اکسیژن، شرایط نوری بر میزان تخم گشایی مؤثر می باشد (Lavens *et al.*, 1986). سیست آرتمیای نسبت به اشعه های ماوراء بنفش و پرتوهای یونیزه مقاوم است (Willsie and Clegg, 2001). سیست ها بلافاصله پس از آبیگری شدن در شرایط هوایی، نسبت به نور حساس می گردند (Ghodratnama and Azari Takami, 2007). پس از جذب نور توسط گیرنده های نوری تنفس و متابولیسم کربوهیدرات ها در سیست آغاز گردیده که منجر به افزایش pH و در نتیجه فعال شدن آنزیم تری هالاز و تجزیه تری هالوز می گردد (Van Der Linden *et al.*, 1991)، به دنبال تجزیه این ماده به گلیکوزن و گلیسرول پاره شدن پوسته سیست و تخم گشایی رخ می دهد. بر اساس مطالعات مذکور ارتباط مستقیم بین شدت نور و فعال سازی متابولیسم سیست وجود دارد. علاوه بر شدت نور، مدت زمان نوردهی و طول موج نیز بر میزان موفقیت تخم گشایی مؤثر می باشد (Ghodratnama and Azari Takami, 2007). همچنان که در مطالعه حاضر پرتو دهی با مدت زمان ۴ ساعت اثرات مثبتی در درصد تفریخ القا کرده بود.

Sajjadpour (۲۰۱۲)، برای بررسی میزان هم‌دوسی<sup>۱</sup> و ناهم‌دوسی<sup>۲</sup> منابع نوری از لیزر نیم‌رسانا و لامپ دیود<sup>۳</sup> نور افشان (LED) در ناحیه ی قرمز بر روی فاکتورهای زیستی آرتمیا ارومیانا شامل درصد تخم‌گشایی، طول قد و طول عمر آرتمیا استفاده کرد و مشاهده نمود که تابش در محدوده‌ی قرمز بیشترین درصد تخم‌گشایی را نسبت به نمونه شاهد به خود اختصاص داده است. در طول بازه‌ی زمانی ۲۰ تا ۲۸ ساعت پس از هیدراته شدن، بازه‌ی زمانی ۲۴ تا ۲۶ ساعت بیشترین تغییرات درصد تخم‌گشایی را نشان داد که بیشترین مقدار آن مربوط به طول موج قرمز بوده است. لذا درصد تخم‌گشایی بیشتری در مدت زمان کمتری به دست می‌آید. در واقع تابش، انرژی لازم را به جنین داخل سیست داده و جنین انرژی بیشتری برای تخم‌گشایی در اختیار دارد که علت آن بالا رفتن میزان مصرف اکسیژن است. نتایج این تحقیق با مطالعه حاضر همخوانی دارد.

Al-Seria و همکاران (۲۰۱۰)، با استفاده از لیزر دیود ۸۹۰ نانومتر، بهترین دوز برای افزایش درصد تفریح را ۱۰ دقیقه تابش بیان نموده‌اند که باعث کاهش مدت زمان تفریح شده بود در حالی که در مطالعه حاضر بهترین زمان پرتودهی ۴ ساعت به دست آمد.

طول عمر ماده‌ها در تعیین رشد جمعیت جنسی بسیار حایز اهمیت است و تغییر در شرایط اکولوژیکی اثر بسیار مهمی در چرخه زندگی آرتمیا دارد (Soniraj, 2004). در مطالعه حاضر سیست‌هایی که تحت تابش نور قرمز قرار گرفته بودند، عمر بیشتری داشته و تعداد قابل توجهی از آنها تا واپسین روزهای آزمایش زنده مانده بودند. تابش در محدوده قرمز طول عمر این موجود زنده را تقریباً ۱٫۵ برابر کرده که بسیار قابل توجه است یعنی مدت جوانی این موجود زیادتر شده که توانسته‌اند بیشتر دوام آورند.

به طور کلی نتایج این مطالعه حاکی از کاهش مدت زمان تخم‌گشایی سیست‌ها، افزایش میزان تخم‌گشایی و افزایش طول عمر آرتمیا بود. تابش لیزر در مدت زمان ۴ ساعت با توان ۱۰ میلی‌وات، انرژی لازم را برای تخم‌گشایی بهتر به جنین می‌دهد. از این رو درصد تخم‌گشایی افزایش و مدت زمان آن کاهش می‌یابد. همچنین طول عمر آرتمیای ماده به طور میانگین تا ۱۲ روز و آرتمیای نر تا ۱۰ روز نسبت به نمونه ی کنترل افزایش یافته بود که این امر مربوط به تنفس بهتر و در نتیجه بالا رفتن توانایی جذب اکسیژن محیط در آرتمیا می‌شود.

## منابع

- Abatzopoulos, T.J., Baxevanis, A.D., Triantaphyllidis, G.V., Criel, G., Pador, E.L., Van Stappen, G., Sorgeloos, P. 2006. Quality evaluation of *Artemia urmiana* Giinther (Urmia Lake, Iran) with special emphasis on its particular cyst characteristics (International Study on *Artemia* LXIX). *Aquaculture*. 254: 442-454.
- Agh, N., Abdi, M. 2002. The effect of ultraviolet irradiation on growth rate, survival, reproduction and lifespan of *Artemia urmiana*. *Laboratory Education*. 383 p.
- Agh, N., Yahyazadeh, M. 1996. Life cycle and value of *Artemia urmiana*. Iranian Fisheries Research Institute. 95 p. (in Persian)
- Al-Seria, M.H., Al-Ani, R.R., Anwer, A.G. 2011. Stimulation of Hatching Efficiency in Capsulated Cysts of *Artemia fransiscana* Using 890 nm Diode Laser. *Baghdad Science Journal*. 8(1): 66-71.
- Asharaf, N. 1995. The role of artemia on aquatic animals feed. MSc. thesis. Natural Resources Faculty. Tehran University. (in Persian)
- Chyou, D.T., Rawle, V.L., Trotman, C. 2007. Quaternary structure of *Artemia* haemoglobin II: analysis of T and C polymer alignment and interpolymer interface, *BMC. Structural Biology*. 7: 26 p.
- Coutteau, P., Brendonck, L., Lavens, P., Sorgeloos, P. 1992. The use of manipulated baker's yeast as an algal substitute for the laboratory culture of Anostraca. *Hydrobiology*. 234: 25-32.

<sup>1</sup> coherence

<sup>2</sup> incoherence

<sup>3</sup> Diode

- Ferdouszadeh, L. 2010. Effect of laser on wheat. MSc. thesis. Agriculture faculty. Fisheries Department. Tehran University. 143 p. (in Persian).
- Ghodratnama, M., Azari Takami, G. 2007. Hatching of *Artemia urmiana* cyst in different light. Journal of Biology Science Lahijan. 1(3): 67-72. (in Persian).
- Hedayati, A., Bagheri, T. 2010. Effect of some physicochemical parameters on hatching ability in cyst of *Artemia urmiana*. World Journal of Zoology. 5(4): 295-297.
- Khamechin, M., Manffar, R., Tokmehchin, O., Hojjati, V., Malehi Balajoo, A. 2013. The effect of L-carnitin on growth, survival, breeding and composition of fatty acid in *Artemia parthenogenetic* in laboratory condition. Journal of Marine Science and Tevhnology. 12(2): 98 (in Persian).
- Lavens, P., Tackaert, W., Sorgeloos, P. 1986. International study on artemia XLI. Influence of culture conditions and specific diapause deactivation methods on the hatchability of artemia cysts produced in standard culture system. Marine Ecology Progress Series. 31: 197-203.
- Matveeva, I.S., Smirnov, A.N., Vodennikov, B.D., Popov, I.M., Semenov, D.S., Kolesnikov, M.V., Syroeshkin, A.V. 2004. Neutron flow exposure as a test for survival of *Artemia Salina* spores. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 138(5): 470-474.
- Peykaran, M.N., Vahabzadeh, H., Hafezieh, M., Seidgar, M., Shoa Hasani, A., Yazdani Sadati, M.A. 2011. Biometrical characters of *Artemia* from four Iranian regions. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 10(2): 294-303.
- Sadigh, R., Qadiri, M. 2004. Effect of low intensity He-Ne laser irradiation on hatching characteristics of *Artemia urmiana* cyst. INCO-DEV project on Artemia biodiversity. Iran International Workshop. 21-25. Urmia, Iran.
- Sajjadpour, M. 2012. Effect of photon radiation on biological attribute of Artemia and its cysts. MSc thesis. Physics Department. Sharif University. (in Persian).
- Sankian, Z., Heydari, R., Manaffar, R. 2011. Expression of 90 KDa heat shock proteins in the brine shrimp *Artemia Leach*, 1819 (Crustacean: Anostraca) in response to high salinity stress. International Journal of Artemia Biology. 1: 3-12.
- Soniraj, N. 2004. Effect of salinity on the life span and reproductive characteristics of brine shrimps in the salt pans at Tuticorin. Journal of Marine Biology Assessment. 46 (2): 133-140.
- Van Der Linden, A., Gadeyne, J., Van Onckelen, H., Van Laere, A., Declair, W. 1991. Involvement of cyclic nucleotides in light induced resumption of development of artemia embryos. Journal of Experimental Zoology. 285: 312-321.
- Willsie, J.K., Clegg, J.S. 2001. Nuclear p26, a small heat shock/a crystalline protein, and its relationship to stress resistance in *Artemia franciscana* embryos. The Journal of Experimental Biology. 204: 2339-2350.
- Yarahmadi, A. 2006. Evaluation of Thermal neutrons effect on H% and HE of *Artemia urmiana* cyst. MSc thesis. Physics Department. Sharif University. (in Persian).
- Zabihi, M., Azari Takami, G., Esmaili, L., Ahmadi, R. 2007. Evaluation of diapause *Artemia urmiana* cyst by cooling. Journal of Pajouhesh va Sazandegi. 77: 175 p. (in Persian).