

مقاله علمی - ترویجی:

میکرو ورم، روش کشت و کاربرد آن در پرورش لارو ماهیان زینتی

محمد امینی چرمهینی*

*m.amini@bkatu.ac.ir

دانشگاه صنعتی خاتم الأنبياء بهبهان، دانشکده منابع طبیعی، بهبهان، ایران

تاریخ پذیرش: فروردین ۱۴۰۱

تاریخ دریافت: دی ۱۴۰۰

چکیده

در پرورش انواع آبزیان آب شیرین و شور، یکی از چالش برانگیزترین مراحل تغذیه لاروها می باشد. در این دوره از زندگی، لاروها بسیار حساس بوده و بسیاری از آنها به غذای خاص برای تأمین نیازهای خود احتیاج دارند و در صورتی که غذا از نظر ترکیب مواد مغذی و ویژگی های فیزیکی از جمله اندازه و شکل، با نیازهای لارو مطابقت نداشته باشد، بقاء و رشد لاروها با مخاطره جدی مواجه خواهد شد. برای سال های طولانی ناپلی آرتمیا اصلی ترین غذای زنده با مشخصات مذکور بوده است به طوری که پرورش لارو بسیاری از گونه ها وابسته به آن می باشد. اما هزینه زیاد و نیروی کار مورد نیاز برای تولید آن، به عنوان نقطه ضعف ناپلی آرتمیا مطرح می باشد. از این رو، جایگزین کردن آن با سایر غذاهای زنده می تواند به رفع محدودیت های پرورش لارو و صرفه اقتصادی نیز منجر شود. یکی از امیدوارکننده ترین گزینه ها برای جایگزینی ناپلی آرتمیا، نماتودها به ویژه میکروورم می باشد. این کرم به راحتی و با ساده ترین وسایل و مواد غذایی در دسترس قابل پرورش بوده و با توجه به اندازه کوچک برای گونه های زیادی از آبزیان آب شیرین و شور قابل استفاده می باشد. همچنین می تواند با توجه به نیاز گونه خاصی به صورت هدفمند غنی سازی شود. از دیگر مزایای آن می توان به نیاز به نیروی کار کمتر نسبت به تولید سایر انواع غذاهای زنده اشاره نمود. در این مقاله زیست شناسی، روش کشت، برداشت، نحوه استفاده، محیط کشت و ارزش غذایی و غنی سازی میکروورم ارائه شده است.

کلمات کلیدی: میکروورم، روش کشت، پرورش لارو، ماهیان زینتی.

زیست‌شناسی میکروورم‌ها

نماتودها^۱ (کرم‌های لوله‌ای، گرد یا نخ‌سان تباران) گروه بسیار متنوعی از کرم‌ها با بیش از ۲۸۰۰۰ گونه هستند که در بسترهای مختلف از خاک تا همراه گیاهان و جانوران و به صورت انگل یا شکارچی زندگی می‌کنند. تعدادی از آنها نیز به صورت آزاد و غیرانگلی زیست کرده که از باکتری‌ها یا قارچ‌ها تغذیه می‌کنند (Brüggemann, 2012). از سال‌های گذشته تاکنون، تعداد کمی از گونه‌ها به عنوان غذای زنده برای تغذیه لارو آبیان استفاده شده‌اند که دارای زندگی آزاد، خاک‌زی، غیرانگلی و باکتری‌خوار هستند، از جمله می‌توان به *Caenorhabditis briggsae*, *Caenorhabditis elegans* و *Anguillula silusiae*, *Panagrellus redivivus* Hofsten et al., 1983;) اشاره نمود (*Turbatrix aceti* Buck et al., 2015; Ramee et al., 2019). اندازه کوچک آنها (معمولاً کمتر از ۳ میلی‌متر) و حرکت دائمی آنها باعث می‌شود به عنوان غذایی جذاب برای تغذیه لارو ماهیان مورد توجه قرار گیرند. *T. aceti* معمولاً به نام "مارماهی سرکه"^۲ شناخته می‌شود. این گونه اغلب در سرکه و در میوه‌های در حال فساد یافت می‌شود جایی که از باکتری‌های اسید استیک تغذیه می‌کند. نماتودهای جنس *Caenorhabditis* نیز می‌توانند برای پرورش لارو ماهیان گزینه‌ای قابل توجه باشند. *C. elegans* به عنوان یک موجود مدل در تحقیقات مختلف ژنتیکی و میکروبیولوژیک به طور گسترده استفاده می‌شود. از این‌رو، روش‌های پرورش آن به‌خوبی توسعه یافته است (Brüggemann, 2012). البته روش‌های به‌کار رفته عموماً آزمایشگاهی است و برای تولید انبوه آنها برای آبی‌پروری باید آزمایش‌ها و نوآوری‌هایی صورت گیرد.

گونه *P. redivivus* (میکروورم)^۳، نماتود خاک‌زی غیرانگلی از راسته Rhabditida و خانواده Panagromaimidae بوده و رایج‌ترین گونه مورد استفاده در پرورش لارو ماهیان می‌باشد (شکل ۱). این گونه به عنوان یک نماتود غیرانگلی باکتری‌خوار همانند *C. elegans* و *T. aceti* برای لارو ماهی بی‌خطر می‌باشد. *P. redivivus* تخم‌زنده‌زا^۴ (تخم‌ها داخل بدن مادر

نگهداری شده و کرم جوان تازه از تخم خارج شده به صورت زنده از بدن مادر خارج می‌شوند)، می‌باشد. نر و ماده از نظر شکل متفاوت بوده و نرها کوچک‌تر و انتهای دم آنها خمیده است. نسبت نر و ماده نابرابر و به طور معمول ۳/۷۵ ماده به ازاء هر نر است. هنگامی که محیط کشت آنها تثبیت شود، این نسبت به ۱/۲ ماده برای هر نر کاهش می‌یابد، اما هیچ‌گاه نرها از ماده‌ها بیشتر نمی‌شوند. یکی دیگر از ویژگی‌های قابل توجه این گونه این است که میزان تولید مثل بالایی دارد. ماده‌ها بعد از ۳ روز به بلوغ می‌رسند و در طول دوره زندگی ۲۵-۲۰ روزه خود هر ۱/۵-۱ روز با توجه به سن خود حدود ۴۰-۱۰ نوزاد (در مجموع، حدود ۱۵ دوره زایمان و ۳۰۰ نوزاد)، به دنیا می‌آورند. ماده‌های جوان‌تر تعداد نوزاد کمتری به دنیا می‌آورند. *P. redivivus* بالغ حدود ۲۰۰۰-۱۵۰۰ میکرومتر طول و به طور متوسط ۷۰-۵۰ میکرومتر قطر دارد درحالی‌که نوزاد تازه از تخم درآمده ۲۹۰-۱۸۰ میکرون طول و ۰/۱۳ میکرون قطر دارد (هاف و اسنل، ۱۳۹۴). اندازه کوچک به‌ویژه قطر کم آنها، تغذیه لاروهای با دهان کوچک از میکروورم را امکان‌پذیر می‌سازد. وزن هر عدد میکروورم ۰/۰۰۱۱-۰/۰۰۱۵ میلی‌گرم گزارش شده است درحالی‌که وزن ناپلی آرتمیا حدود ۰/۰۰۲۶۹ میلی‌گرم می‌باشد (Brüggemann, 2012). از نظر اندازه، میکروورم با روتیفر قابل مقایسه می‌باشد ولی در مقالات مختلف به دلیل تحمل بالای میکروورم به شرایط سخت و متغیر محیطی، معمولاً با ناپلی آرتمیا مقایسه می‌شود. میکروورم هوایی است و با کاهش میزان اکسیژن محیط به سمت دیواره ظرف کشت حرکت می‌کند. این گونه در شرایط خاص به مدت محدود از قابلیت سازگاری با شرایط بی‌هوایی برخوردار است و با تولید موادی نظیر اتانول و لاکتات می‌تواند به روش بی‌هوایی سوخت‌وساز نماید (Butterworth and Barrett, 1985).

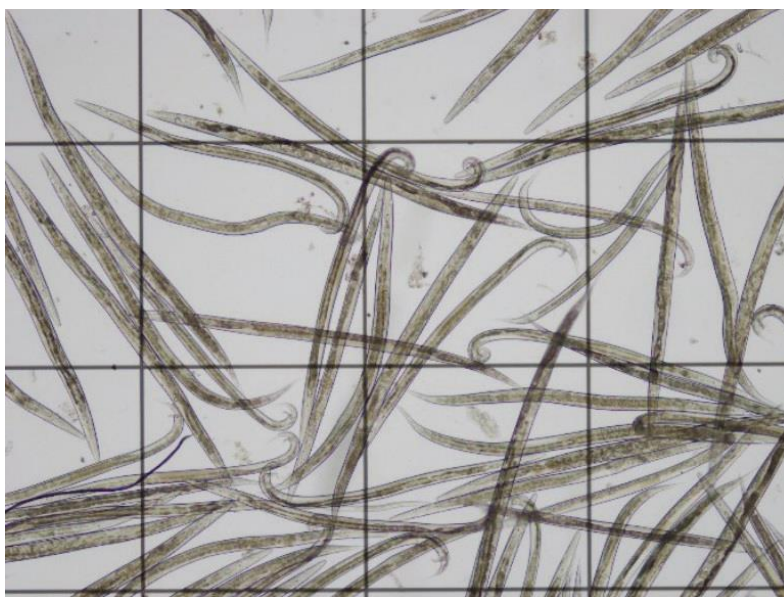
گونه *P. redivivus* در محدوده دمایی وسیع ۲۸-۱/۵ درجه سانتی‌گراد می‌تواند زنده بماند، ولی برای پرورش آن در دامنه ۲۱-۲۷ به‌ویژه محدوده پائینی این دامنه ترجیح داده می‌شود. میزان رشد و طول زندگی کرم به درجه حرارت محیط بستگی دارد به‌طوری‌که در درجه حرارت‌های پایین، رشد کندتر ولی دوام کشت بیشتر و بالعکس در درجه حرارت‌های بالا رشد

3 - Microworm
4 - Ovoviviparous

1 - Nematodes
2 - Vinegar eel

به تدریج در اثر فرآیند تخمیر pH تا حدود ۳/۴-۴/۲ پایین می‌آید که مناسب برای رشد میکروورم می‌باشد. با توجه به موارد مذکور و سادگی کشت، گونه *P. redivivus* در تحقیقات مختلف ارجح‌ترین گونه برای کشت و استفاده در تغذیه لارو انواع آبزیان بوده است.

سریع‌تر و دوره آن کوتاه‌تر می‌باشد. دوره نوری اثر واضحی بر رشد جمعیت کرم‌ها ندارد، ولی نور مستقیم خورشید توصیه نمی‌شود. برای کشت آن محیطی با نور متوسط تا کم با منبع نوری غیر از خورشید ترجیح داده می‌شود. این گونه در دامنه pH وسیعی زندگی می‌کند. در ابتدای شروع کشت به دلیل استفاده از مواد غذایی تازه pH حدود خنثی می‌باشد ولی



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی میکروورم (ابعاد شبکه ۱ میلی‌متر). بدن غیر بندبند و طویل آنها قابل مشاهده است.

در اغلب موارد ظروف کشت بسیار ساده و شامل ظروف شیشه‌ای یا پلاستیکی مستطیل یا گرد با سطح زیاد و عمق کم (حدود ۶-۱۲ سانتی‌متر) می‌شود. می‌توان ارتفاع ظروف کشت را طوری در نظر گرفت که هنگام لزوم بتوان آنها را در قفسه‌های یخچال قرار داد. با توجه به اینکه محیط کشت با ضخامت حدود ۲-۱ سانتی‌متر روی کف ظرف قرار می‌گیرد، ظرف باید حداقل ۵-۸ سانتی‌متر دیواره آزاد بالای محیط کشت در دسترس کرم‌ها داشته باشد. انواع ظروف یک‌بار مصرف (پلیمری) ترجیحاً شفاف یا نیمه شفاف مثل سطل‌های با حجم ۲-۱ لیتر یا ظروف پلاستیکی مستطیلی موجود در بازار برای این منظور قابل استفاده هستند. ظروف کشت باید با درپوش یا لایه پلاستیک یا سلفون پوشانده شود. باید به منظور تبادل هوا چند منفذ کوچک در درپوش ایجاد شود. درپوش از تبخیر سطح محیط کشت و خشک شدن آن جلوگیری می‌کند. Ricci و همکاران

روش‌های کشت

یادآور می‌شود، هنوز روشی برای تولید انبوه این کرم برای تأمین نیازهای مزارع تجاری در مقیاس زیاد توسعه پیدا نکرده است. ولی روش‌های موجود می‌تواند مقدار کرم لازم برای مصارف خانگی، کارگاه‌های کوچک و آزمایش‌های تغذیه‌ای بر انواع آبزیان را تأمین نماید. روش‌های پرورشی موجود می‌تواند مبنایی برای توسعه روش‌های کشت تجاری و حل مسائل آن و نیز رفع چالش‌های فرارو باشد. از چالش‌های تولید میکروورم می‌توان به تولید در مقیاس بالا و نحوه جداسازی محیط کشت از کرم‌ها اشاره نمود. زیرا هنگامی که از محیط کشت جامد استفاده می‌شود، جداسازی کرم‌ها از محیط کشت و اطمینان از عدم ورود محیط کشت به تانک پرورش لارو آبی اهمیت زیادی خواهد داشت.

اوقات در فریزر، نگهداری نمود. بعد از گرم شدن محیط کشت، کرم‌ها دوباره فعال می‌شوند.

برداشت میکروورم

هنگامی که جمعیت کرم‌ها به اندازه کافی زیاد شود، شروع به خزیدن روی دیواره ظرف کشت می‌کنند و می‌توان آنها را با یک قاشقک، پنس یا کارد از روی دیواره ظرف برداشت نمود. از این جهت ارتفاع دیواره و اندازه دهانه ظرف کشت برای سهولت برداشت اهمیت دارد. می‌توان برای برداشت کرم‌ها یک نوار پلاستیکی یا کاغذی روی سطح کشت قرار داد، کرم‌ها روی آن می‌خزند و جمع‌آوری می‌شوند. با قرار دادن نوار در آب، کرم‌ها جدا شده و پس از مدتی در کف ظرف آب ته‌نشین می‌شوند. با متراکم شدن در کف ظرف برداشت آنها به راحتی صورت خواهد گرفت. برای برداشت کرم‌ها ابتکارهای زیادی انجام شده است. برای مثال، از ظروف کشت با دیواره کوتاه داخل یک ظرف بزرگتر پر از آب استفاده شده است. در این حالت هنگامی که کرم‌ها از دیواره ظرف کشت بالا می‌آیند، داخل ظرف بزرگتر افتاده و داخل آب شناور می‌شوند. روش‌های دیگری نیز بر پایه مهاجرت کرم‌ها ابداع شده است (Wilkenfeld *et al.* 1984; Biedenbach *et al.* 1989; Brüggemann, 2012; Sautter *et al.* 2007). در همه این روش‌ها تا زمانی که کشت پایدار بوده و تولید کرم ادامه داشته باشد، کرم‌ها روی دیواره یا سایر وسایل تعبیه شده می‌خزند و قابل برداشت خواهند بود. اما زمانی که محیط کشت رو به اتمام و تخریب می‌رود یا وقتی که بخواهید همه کرم‌های موجود را برداشت نمایید، مواد به کار رفته در محیط کشت با کرم‌ها و آب مخلوط می‌شود. در این مورد باید از چند مرحله فیلتر یا معلق کردن در آب و ته‌نشین شدن کرم‌ها برای جداسازی آنها استفاده نمود. Brüggemann (2012) راه جالبی برای جداسازی نماتودها از نمونه‌های خاک پیشنهاد می‌کند که احتمالاً ممکن است برای برداشت میکروورم از محیط کشت نیز قابل استفاده باشد. نماتدهای خاکی دارای وزن مخصوص ۱/۰۸ هستند. هنگامی که به محلول دارای چگالی بالاتر (۱/۱۵) اضافه شوند (برای مثال، محلول ساکارز،

۲۰۰۳) از روش متفاوتی برای پرورش میکروورم استفاده نمود. آنها کیسه‌های پلاستیکی قابل اتوکلاو (۵۰×۳۰ سانتی‌متر) را از محیط کشت و قطعات اسفنج مکعبی (۴-۱ مترمکعب) را به نسبت ۲۴ به ۱ پر کردند به طوری که محیط کشت کاملاً جذب اسفنج‌ها شود. دهانه باز کیسه پلاستیکی کاملاً مسدود شد و فقط دو سوراخ در آن ایجاد شد. لوله‌های ورودی و خروجی به منظور تهویه هوا به سوراخ‌ها متصل و کاملاً با چسب پوشانده شد. جریان هوا از طریق لوله‌ها برقرار شد. هوا از یک فیلتر ۰/۲ میکرون برای تصفیه و همچنین آب استریل به منظور افزایش رطوبت عبور داده می‌شد. به منظور تلقیح کشت با میکروورم از سرنگ استریل استفاده شد. در این روش پس از ۱۳-۱۱ روز برداشت انجام شد که با توجه به رشد کرم‌ها روی اسفنج‌ها، و مخلوط بودن محیط کشت با آنها، جداسازی کرم از مواد جامد محیط کشت و قطعات اسفنج باید صورت می‌گرفت.

ذخیره اولیه (استوک) میکروورم به راحتی از آزمایشگاه‌ها، کارگاه‌ها یا فروشندگان خانگی از طریق فضای مجازی قابل تهیه می‌باشد. از این ذخیره برای تلقیح و شروع کشت جدید استفاده می‌شود. می‌توان مقدار کمی ذخیره اولیه خریداری نمود و سپس در چند مرحله با افزایش مقیاس کشت (استفاده از کرم تولیدی به عنوان تلقیح کشت جدید)، به میزان کافی کرم تولید نمود. بعد از حدود یک هفته بعد از تلقیح محیط کشت، کشت بارور می‌شود. شایان ذکر است، سرعت رشد به دما بستگی دارد به طوری که در دمای ۲۰-۱۸ درجه سانتی‌گراد جمعیت کرم بعد از ۱۱-۱۰ روز به اوج خود می‌رسد. هنگامی که کشت رو به زوال می‌رود، محیط کشت شروع به تیره شدن، مایع شدن و بوی ترشیدگی شدید می‌کند. اگر در این زمان اقدام لازم صورت نگیرد، در نهایت کشت کاملاً از بین می‌رود و کرم‌ها می‌میرند. به منظور نجات کشت از نابودی باید محیط کشت جدید ساخت تا کرم‌ها به آن منتقل شوند یا می‌توان محیط کشت جدید را به ظرف و محیط کشت قدیمی افزود. این کار باید زمانی انجام شود که محیط کشت حالت مایع پیدا کرده ولی هنوز بوی ترشیدگی شدید ایجاد نشده است. یک کشت فعال با ابعاد حدود ۲۰×۳۰ سانتی‌متر می‌تواند ۵-۸ میلی‌لیتر (۱/۵-۱) قاشق چایخوری) در روز میکروورم تولید نماید. کشت‌های اضافی و غیرفعال را می‌توان برای مدت طولانی در یخچال و حتی گاهی

سولفات منیزیم یا سیلیس کلوئیدی لودوکس^۱، نماتدها شناور خواهند شد و می‌توان آنها را با پیپت از محلول بازیابی کرد. این‌که آیا این روش در محیط کشت ارگانیک کار می‌کند، باید آزمایش شود. همچنین Santiago و همکاران (۲۰۱۴) به منظور جدا کردن ذرات محیط کشت و تمیز کردن میکروورم‌ها، از محلول ۴۰٪ شکر استفاده کردند. این نشان می‌دهد با اصلاح و بهینه‌سازی، این روش می‌تواند امیدبخش باشد. Buck و همکاران (۲۰۱۵) برای برداشت *T. aceti* شش روش مختلف برداشت شامل فیلتر کردن، رسوب کردن و تخلیه مایع اضافی، حرکت فعال کرم‌ها و ترکیبی از آنها را به کار بردند. در نهایت روش فیلتر کردن با تور چشمه ۲۰ میکرون بهترین نتیجه را در برداشت، البته یادآور می‌شود که برای پرورش *T. aceti* از محیط کشت مایع استفاده شده بود. در برخی تحقیقات از محیط کشت مایع برای پرورش میکروورم نیز استفاده شده است (Fisher and Fletcher, 1995; Kumlu et al., 1998). هرچند این روش‌ها تجاری‌سازی نشده‌اند، ولی در صورت استفاده از محیط کشت مایع به دلیل عدم مزاحمت ذرات جامد، جداسازی کرم‌ها راحت‌تر خواهد بود.

میکروورم تاکنون برای تغذیه لارو انواع ماهیان یا سخت پوستان به تنهایی یا همراه با سایر غذاها استفاده شده است. Cheah و همکاران (۱۹۸۵) از میکروورم، ناپلی آرتمیا، زرده تخم مرغ و موئینا^۲ برای تغذیه لارو گورامی بوسنده *Helostoma temmincki* استفاده کردند و نتیجه گرفتند میکروورم همراه با زرده تخم مرغ در هفته اول و دوم دارای بهترین نتیجه بود. در مطالعه‌ای دیگر از میکروورم، روتیفر، موئینا و آرتمیا برای تغذیه لارو بارب نقره‌ای^۳ (*Barbodes gonionotus*)، استفاده شد که میکروورم و آرتمیا نسبت به موئینا و روتیفر نتایج بهتری نشان دادند (Jahangard, 2003). در این مطالعه لارو بارب نقره‌ای با تراکم ۱۰ عدد در لیتر به مدت ۱۴ روز نگهداری شد و بهترین تراکم میکروورم برای تغذیه آن ۲۰ عدد در میلی‌لیتر گزارش شد. Santiago و همکاران (۲۰۰۴) لارو کپور سرگنده را به میزان ۲۵ عدد در لیتر ذخیره‌سازی و دو مرتبه در روز با میکروورم تغذیه نمودند. آنها دریافتند که بهترین تراکم میکروورم ۱۰۰ عدد در میلی‌لیتر برای تغذیه لارو این ماهی می‌باشد. Affandi و همکاران (۲۰۱۹) لارو خرچنگ آبی (*Portunus pelagicus*) را با استفاده از میکروورم پرورش یافته با غذای غنی شده با روغن آفتابگردان تغذیه نمودند و دریافتند که میکروورم می‌تواند با موفقیت در ۲ روز بعد از تخم‌گذاری لارو خرچنگ استفاده شود. در این آزمایش لارو خرچنگ با تراکم ۱ عدد در میلی‌لیتر نگهداری شد و تراکم میکروورم به میزان ۵ عدد در میلی‌لیتر به طور مداوم به محیط اضافه شد. در آزمایش دیگری بر ماهی هامور معمولی (*Epinephelus coioides*)، لارو ماهی با تراکم ۱۵ عدد در میلی‌لیتر نگهداری و میکروورم به میزان ۷۵ عدد در میلی‌لیتر برای تغذیه آن استفاده شد. نتایج نشان داد که میکروورم برای تغذیه لارو این ماهی به عنوان اولین غذا بعد از شروع تغذیه تا زمانی که بتواند از ناپلی آرتمیا تغذیه کند، غذای مناسبی می‌باشد (Reyes et al., 2011).

نحوه استفاده

میکروورم‌ها معمولاً به صورت مستقیم بر اساس وزن (تر یا خشک) یا حجم برای تغذیه لاروها استفاده می‌شوند. همچنین بعد از برداشت می‌تواند تا چندین ساعت در آب شیرین و شور (۳۰ گرم در لیتر) بدون شوک اسمزی زنده بماند. بنابراین، از قابلیت استفاده برای تغذیه لارو آبزیان آب شیرین و شور برخوردار است. می‌توان آنها را در مقدار کمی آب به صورت حجمی شمارش نمود و سپس در اختیار لاروها قرار داد. به این منظور باید مخلوط همگنی از میکروورم در آب درست کرد و سپس با برداشتن حجمی مشخص به عنوان نمونه (معمولاً ۱ میلی‌لیتر) و شمارش میکروورم‌ها در آن، تعداد کل را محاسبه نمود. برای شمارش میکروورم به دلیل ریز بودن به یک لوپ (استریو میکروسکوپ) نیاز می‌باشد. پس از شمارش یا تعیین مقدار (حجم یا وزن) میکروورم‌ها، می‌توان آنها را به میزان لازم برای تغذیه لارو انواع آبزیان استفاده نمود.

- 1 - LUDOX® Colloidal Silica
- 2 - Moina

محیط کشت

محیط کشت متعارف و رایج کشت میکروورم از آرد (یا پرک) جودوسر^۱ (یک لیوان پر یا ۲۵۰ میلی‌لیتر)، مخمر ۲ (۱/۵-۱ گرم) و آب (۵۰۰ میلی‌لیتر) تشکیل شده است. اما مواد غذایی بسیار متنوع دیگری نیز تاکنون استفاده شده و نتایج قابل قبولی داشته است. میکروورم از باکتری‌ها و احتمالاً مخمر رشد کرده در محیط تغذیه می‌کند. در واقع، محیط کشت مورد استفاده، بستری مناسب برای رشد باکتری و مخمر را فراهم می‌کند. در برخی آزمایش‌ها، میکروورم بدون افزودن مخمر، با موفقیت کشت شده است، اما مخمر می‌تواند تا زمانی که میکروورم‌ها به تعداد زیاد رشد نمایند، از طریق رقابت مانع توسعه قارچ‌های مضر شوند و محیط را تا آن زمان مساعد نگه دارند.

همان‌طوری که ذکر شد، مواد مختلفی می‌تواند به عنوان محیط کشت برای پرورش میکروورم استفاده شود. در انتخاب این مواد علاوه بر کارایی و تأثیر بر رشد و نمو کرم‌ها، باید هزینه نیز مورد توجه قرار گیرد. برای مثال، شکل‌های مختلف جودوسر مثل پرک، آرد یا سرآل (غذای نوزاد بر مبنای جودوسر)، وجود دارد که معمولاً پرک ارزان‌ترین گزینه خواهد بود. از دیگر موادی که برای پرورش میکروورم استفاده شده است می‌توان به نشاسته ذرت و گندم (Focken *et al.*, 2006)، سیب‌زمینی (ورزیده‌رنج، ۱۳۹۸)، لوبیا چیتی، عدس، نخود فرنگی، آب پنیر خشک شده، کنجاله پنبه دانه (Brüggemann, 2012) یا سایر منابع در دسترس اشاره نمود. برای مثال، Kumlu و همکاران (۱۹۹۸) میکروورم را با استفاده از محیط کشت مایع حاوی ۱۰٪ کلیه همگن شده خوک، ۱٪ مخمر، ۳/۵٪ روغن ذرت و آب تلقیح شده با باکتری *E. coli*، کشت داد. اگرچه در مطالعات مختلف سعی شده است بهترین مقدار هر کدام از مواد مذکور تعیین شود، ولی به نظر می‌رسد میکروورم‌ها نسبت به نوع محیط کشت چندان حساس نیستند و اگرچه استفاده از ترکیب‌های مختلف می‌تواند باعث تغییر میزان تولید و ترکیب لاشه میکروورم شود، اما به منظور کشت آن برای مصارف معمول می‌توان از مواد نشاسته‌ای در دسترس محلی استفاده نمود. استفاده از مواد مختلف با هدف تغییر ترکیب لاشه در بخش غنی‌سازی بیشتر توضیح داده خواهد شد.

برای تهیه محیط کشت مقدار لازم از منبع نشاسته (جودوسر یا سیب زمینی)، وزن شده و با مقداری آب مخلوط می‌شود که حالت نرم و خمیری داشته باشد، ولی شل و آبکی نباشد. اگر مخلوط حاصل آبکی باشد، لایه‌ای باکتری روی آن رشد نموده و از توسعه میکروورم‌ها جلوگیری می‌کند. مخمر مورد نیاز (حدود ۱ درصد وزن کل محیط کشت) را می‌توان با خمیر کاملاً مخلوط یا روی سطح آن پراکنده نمود. محیط کشت با ضخامت ۱-۴ سانتی‌متر در کف ظرف پرورش قرار داده می‌شود. دیواره‌های ظرف به دلیل برداشت کرم‌ها از روی آن، باید کاملاً تمیز و عاری از محیط کشت باشد. در نهایت میکروورم به میزان حدود ۳۵۰ عدد به ازاء هر گرم محیط کشت روی سطح کشت اضافه می‌شود (Ricci *et al.*, 2003). میکروورم فقط ۵ میلی‌متر بالایی محیط کشت را اشغال می‌کند، ولی محیط کشت اضافی از خشک شدن کشت جلوگیری می‌کند و نیاز به نوسازی یا تعویض کشت کمتر می‌شود. در فواصل ۱-۲ روز می‌توان در صورت نیاز و خشک شدن سطح کشت، کمی آب روی آن و دیواره‌های ظرف اسپری نمود.

میکروورم می‌تواند شوری‌های بالا را به خوبی تحمل نماید و این مسئله زمانی که برای تغذیه لارو آبزیان دریایی استفاده می‌شوند، اهمیت بیشتری دارد. طبق آزمایش‌های انجام شده این کرم می‌تواند تا شوری ۳۰ گرم در لیتر رشد کرده و در شوری ۳۵ گرم در لیتر به مدت ۸ ساعت هنوز فعالیت خود را حفظ کند (Brüggemann, 2012). اما Ricci و همکاران (۲۰۰۳) برای ساخت محیط کشت از آب با شوری ۰/۸ گرم در لیتر استفاده نمود.

ارزش غذایی و غنی‌سازی

ترکیب مواد مغذی بدن میکروورم و درصد رطوبت آن تا حد زیادی به نوع و شرایط کشت بستگی دارد. ورزیده‌رنج (۱۳۹۸) میزان رطوبت بدن میکروورم را ۷۴/۵۷-۷۷/۹۸ با میانگین ۷۶/۴۵ درصد وزن بدن، مقدار پروتئین را ۳۹/۹-۵۵/۶ با میانگین ۵۰/۷، میزان خاکستر را ۵/۶-۵/۸۵ با میانگین ۵/۷۳ و مقدار چربی را ۱۸/۱۷-۴۲/۳۲ با میانگین ۲۷/۴۳ درصد وزن خشک بدن گزارش کرده است. بنابراین، استفاده از محیط

اثر استفاده از محیط کشت‌های مختلف بر میزان پروتئین و ترکیب اسیدهای آمینه میکروورم نیز بررسی شده و نتایج متفاوتی به دست آمده است. از سوئی، Buck و همکاران (۲۰۱۵) بیان می‌کند که غنی‌سازی محیط کشت جودوسر با پیتون (۵ گرم در ۱۰۰ گرم محیط کشت)، تأثیر چندانی بر ترکیب اسیدهای آمینه ندارد و ترکیب اسیدهای آمینه پایدار می‌باشد در حالی که Schlechtriem (۲۰۰۴) با مقایسه محیط کشت جودوسر خالص با محیط کشت نیمه مصنوعی، تأکید می‌نماید که ترکیب محیط کشت، تأثیری کاملاً معنی‌دار بر ترکیب اسیدهای آمینه میکروورم دارد و برخلاف سایر غذاهای زنده (آرتمیا و روتیفر)، ترکیب اسیدهای آمینه میکروورم می‌تواند طبق نیاز آبی پرورشی تعدیل شود. ورزیده‌رنج (۱۳۹۸) نیز با مقایسه محیط کشت سیب زمینی، جو دوسر، گندم و ترکیب آنها، گزارش کرد که انواع محیط کشت بر میزان پروتئین و مقدار اسیدهای آمینه مختلف تأثیر دارد.

میکروورم‌ها می‌توانند با استفاده از مواد مغذی و رنگدانه‌ای نیز غنی‌سازی شده و کیفیت آنها برای پرورش لارو آبزیان افزایش داده شود (Kumlu *et al.*, 1998; Ramee *et al.*, 2019). در مجموع، با توجه به ویژگی‌ها و خواص غذایی میکروورم، تغذیه لارو بسیاری از گونه‌های آبزیان به‌ویژه سخت‌پوستان نتایج رضایت‌بخش در مقایسه با استفاده از سایر زئوپلانکتون‌ها از جمله ناپلی آرتمیا داشته است (Brüggemann, 2012).

منابع

ورزیده‌رنج، ز.، ۱۳۹۸. اثر انواع محیط کشت و غنی‌سازی روغن روی رشد و تجزیه تقریبی کرم ریز *Panagrellus redivivus* پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان. به راهنمایی دکتر محمد امینی چرمهینی. ۱۴۲ ص.

هاف، اف.اچ. و اسنل، ت. دابلیو.، ۱۳۹۴. تکثیر و پرورش غذای زنده، دستورالعمل تکثیر و پرورش پلانکتون‌ها. مترجمین: آذری تاکامی، ق. و امینی چرمهینی، م. تهران. انتشارات دانشگاه تهران. چاپ دوم، ۳۳۷ ص.

کشت‌های مختلف می‌تواند منجر به تغییر ترکیب مواد مغذی میکروورم‌ها شود و از این طریق برای تغذیه لارو انواع آبزیان بهبود یابد به طوری که Focken و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که با تغییر محیط کشت میکروورم از جو دوسر خالص به نشاسته ذرت- گندم میزان بقاء لارو میگو وانامی افزایش یافته است. در مطالعه‌ای جلبک سبز-آبی اسپیرولینا به محیط کشت جو دوسر اضافه شد و مشاهده شد که افزودن اسپیرولینا به محیط کشت باعث افزایش رشد میکروورم‌ها و حضور اسیدهای آمینه و چرب آن در میکروورم خواهد شد (de Lara *et al.*, 2007). در مطالعات مختلف تأثیر افزایش انواع روغن به محیط کشت بررسی شده و در همه آنها نقش روغن در غنی‌سازی محیط کشت و تأثیر معنی‌دار آن بر ترکیب لاشه میکروورم تأیید شده است (ورزیده‌رنج ۱۳۹۸; Ricci, 2004; Schlechtriem, 2004; Jahangard, 2003; Kumlu *et al.*, 1998; Reyes *et al.*, 2011; Honnens *et al.*, 2014; Affandi *et al.*, 2019). در این مطالعات انواع روغن مثل آفتابگردان، بذر کتان، ماهی، پنبه دانه، پالم، ذرت، کبد ماهی کاد، و کنجد استفاده شده است که در تقریباً همه آنها روغن آفتابگردان بیشترین تأثیر را بر افزایش تولید میکروورم داشت و بهترین میزان مصرف روغن ۲-۴ درصد وزن کل محیط کشت به دست آمد. در تعداد کمی از این تحقیقات، تأثیر نوع روغن بر ترکیب اسیدهای چرب بدن کرم بررسی شده است، ولی Ricci و همکاران (۲۰۰۳) با جایگزین کردن روغن ماهی و روغن کبد کاد به جای روغن آفتابگردان مشاهده نمود که ترکیب چربی بدن میکروورم مطابق نوع روغن به کار رفته می‌باشد. Honnens و همکاران (۲۰۱۴) میکروورم را با توجه به فقدان DHA¹ در نماتودها، با استفاده از یک ماده تجاری مخصوص غنی‌سازی اسیدهای چرب (S.presso[®]), غنی‌سازی نمودند و توانستند با موفقیت این اسید چرب را در بدن میکروورم به میزان ۵/۸ درصد کل چربی بدن افزایش دهند. بنابراین، استفاده از انواع روغن با ترکیب اسیدهای چرب متفاوت می‌تواند به احتمال زیاد باعث غنی‌سازی آنها در بدن کرم شود و کرم را برای مصرف در پرورش لارو انواع آبزیان آب شیرین و شور متناسب نماید.

¹ - Docosahexaenoic acid

- Affandi, I., Ikhwanuddin, M., Syahnnon, M. and Abol-Munafi, A.B., 2019.** Growth and survival of enriched free-living nematode, *Panagrellus redivivus* as exogenous feeding for larvae of blue swimming crab, *Portunus pelagicus*. *Aquaculture Reports*, 15: 1-6.
- Biedenbach, J.M., Smith, L.L., Thomsen, T.K. and Lawrence, A.L., 1989.** Use of the nematode *Panagrellus redivivus* as an *Artemia* replacement in a larval penaeid diet. *Journal of the World Aquaculture Society*, 20(2): 61-71.
- Brüggemann, J., 2012.** "Nematodes as live food in larviculture - a review. *Journal of World Aquaculture Society*, 43: 739-763.
- Buck, B.H., Brüggemann, J., Hundt, M., Bischoff, A.A., Grote, B., Strieben, S. and Hagen, W., 2015.** Improving nematode culture techniques and their effects on amino acid profile with considerations on production costs. *Journal of Applied Ichthyology*, 31: 1-9.
- Butterworth, P. and Barrett, J., 1985.** Anaerobic metabolism in the free-living nematode *Panagrellus redivivus*. *Physiological Zoology*, 58(1): 9-17.
- Cheah, S.H., Sharr, H.A., Ang, K.J. and Kabir, A., 1985.** An Evaluation of the Use of Egg Yolk, *Artemia* nauplii, Microworms and *Moina* as Diets in Larval Rearing of *Helostoma temmincki* Cuvier and Valenciennes. *Pertunika*, 8(1): 43-51.
- de Lara, R., Castro, T., Castro, J. and Castro, G., 2007.** Cultivo del nematodo *Panagrellus redivivus* (Goodey, 1945) en un medio de avena enriquecida con *Spirulina* sp. *Revista de Biología Marínay Oceanografía*, 42(1): 29-36.
- Fisher, C.M.L. and Fletcher, D.J., 1995.** Novel feeds for use in aquaculture. Patent: International Application Number PCT/GB95/00021.
- Focken, U., Schlechtriem, C., Von Wuthenau, M., García-Ortega, A., Puello-Cruz, A. and Becker, K., 2006.** *Panagrellus redivivus* mass produced on solid media as live food for *Litopenaeus vannamei* larvae. *Aquaculture Research* 37(14): 1429-1436.
- Hofsten, A.V., Kahan, D., Katznelson, R. and BarEl, T., 1983.** Digestion of free-living nematodes fed to fish. *Journal of Fish Biology* 23: 419-428.
- Honnens, H., Assheuer, T. and Ehlers, R.U., 2014.** Enrichment of the nematode *Panagrolaimus* sp., a potential live food for marine aquaculture, with essential n-3 fatty acids. *Aquaculture International*, 22: 399-409.
- Jahangard, A., 2003.** Evaluation of Free-Living Nematode *Panagrellus Redivivus* as a Live Food Organism for Silver Barb *Barbodes Gonionotus* Larvae. PhD thesis, University Putra Malaysia. 162 P.
- Kumlu, M., Fletcher, D. J. and Fisher, C.M., 1998.** Larval pigmentation, survival and growth of *Penaes indicus* fed the nematode *Panagrellus redivivus* enriched with astaxanthin and various lipids. *Aquaculture Nutrition*, 4: 193-200.
- Ramee, S., Lipscomb, T. and DiMaggio, M., 2019.** Microworm Culture for Use in Freshwater Ornamental Aquaculture. EDIS, (2). Retrieved from <https://edis.ifas.ufl.edu/>
- Reyes, O.S., Duray, M.N., Santiago, C.B. and Ricci, M., 2011.** Growth and survival of

grouper *Epinephelus coioides* (Hamilton) larvae fed free-living nematode *Panagrellus redivivus* at first feeding. *Aquaculture International*, 19(1): 155-164.

Ricci, M., Fifi, A.P., Ragni, A., Schlechtriem, C. and Focken, U., 2003. Development of a low-cost technology for mass production of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as an alternative live food for first feeding fish larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 556–559.

Santiago, C B., Ricci, M. and Reyes-Lampa, A., 2004. Effect of nematode *Panagrellus redivivus* density on growth, survival, feed consumption and carcass composition of bighead carp *Aristichthys nobilis* (Richardson) larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(1): 22–27.

Sautter J., Kaiser,H., Focken,U. and Becker, K., 2007. *Panagrellus redivivus* (Linne) as a live food organism in the early rearing of the catfish *Synodontis petricola* (Matthes). *Aquaculture Research*, 38: 653-659.

Slechtriem, C., Ricci, M., Focken U. and Becker K., 2004. The suitability of the free-living nematode *Panagrellus redivivus* as live food for first-feeding fish larvae. *Journal of Applied Ichthyology*, 20 (3): 161-168.

Wilkenfeld, J.S., Lawrence, A.L. and Kuban, F.D., 1984. Survival, metamorphosis and growth of penaeid shrimp larvae reared on a variety of algal and animal foods. *Journal of the World Mariculture Society*, 15: 31–49.

Micro worm, culture method and its application in ornamental larviculture

Amini Chermahini M.*

*m.amini@bkatu.ac.ir

Faculty of Natural Resources and Environment, Behbahan Khatam Alanbia University, Behbahan, Iran.

Abstract

In the culture of freshwater and saltwater aquatic species, feeding is one of the most challenging stages. During this period of life, larvae are very sensitive and many of them need special food to meet their needs, if the food does not meet the needs of larvae in terms of nutrient composition and physical characteristics such as size and shape, the survival and growth of the larvae will be seriously endangered. For many years, nauplii of the brine shrimp has been the main live food with the mentioned characteristics, so the larval rearing of many species depends on it. But the high cost and labor required to produce it is a disadvantage of *Artemia nauplii*. Therefore, replacing it with other live foods can eliminate the limitations of larval rearing and also be economical. One of the most promising options for replacing *Artemia nauplii* is nematodes, especially micro worms. This worm can be grown easily and with the simplest tools and nutrients available and due to its small size, it can be used for many species of fresh and saltwater aquatic animals. It can also be purposefully enriched according to the needs of a particular species. Another advantage is the need for less labor than the production of other types of live food. In this paper, the biology, cultivation method, harvest, usage, culture media, nutritional value and enrichment of micro worm are presented.

Keywords: Micro worm, culture method, Ornamental fish, larviculture.