✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۵۶و۵۷ پاییز و زمستان ۱۳۸۱

بررسی تاثیر میکروالمنتهای روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در مخاط روده، ضمائم باب‌المعده و لوزالمعده بچه فیل ماهیان (*Huso huso*)

● **رضا قربانی**، دانشجوی دکترای رشته شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ● **آلکساندر نیوالونی**، دانشکده بیولوژی دانشگاه فنی دولتی آستراخان روسیه
● **ابوالقاسم کمالی**، دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ● **عبدالمجید حاجی مرادلو**، دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی کرکان
● **محمد پورکاظمی**، انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری - رشت

تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۸۱

چکیده

تاثیر میکروالمنت‌های روی (به‌صورت $ZnCl_2$)، نیکل ($NiCl_2.6H_2O$)، کبالت ($CoCl_2$)، منگنز ($MnCl_2.2H_2O$)، آهن ($FeCl_2$)، و مس (به‌صورتهای کلرید مس $CuCL_2$، سولفات مس $CuSO_4.5H_2O$، استات مس $(CH_3Coo)_2$ $Cu.2H_2O$)، و نیترات مس $[Cu(NO_3)_2 3H_2O]$ بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز (باکد آنزیمی ۳.۲.۱.۱) در مخاط روده، ضمائم باب‌المعده و لوزالمعده بچه فیل ماهیان (*Huso huso*) با هدف تعیین میکروالمنتهای افزایش دهنده فعالیت آنزیم اندازه‌گیری گردید. این تحقیق با ۵ تکرار به روش in vitro در دو غلظت ۱ و 1×10^{-4} میلی گرم در لیتر از یونهای Zn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}و Cu^{2+} انجام گرفت. در سال ۱۳۸۰، ۲۱۷ قطعه بچه فیل ماهی با وزن متوسط ۷±۲۵ گرم کالبد شکافی، اندامهای مورد نیاز از بدن ماهیان خارج و در حالت انجماد نگهداری گردیدند. آزمایشات در دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (استان گلستان) و انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری (استان گیلان) پس از خارج سازی اندامها از حالت انجماد انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان دادکه در اغلب تیمارها تحت تاثیر میکروالمنت‌ها، سطح فعالیت آنزیم بیش از تیمار شاهد می‌باشد. سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز تحت تاثیر میکروالمنت آهن با غلظت 1×10^{-4} میلی گرم در لیتر در مخاط روده، آهن و منگنز با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در ضمائم باب المعده، روی و نیترات مس با غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در لوزالمعده کمتر از تیمار شاهد اندازه‌گیری گردید. لازم به‌ذکر است، کاهش سطح فعالیت آنزیم، تحت تاثیر میکروالمنت‌های ذکر شده نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نمی‌باشد ($p>0/05$).

کلمات کلیدی: فیل ماهی، *Huso huso*، آلفا ـ آمیلاز، میکروالمنت‌ها، اندامهای گوارشی

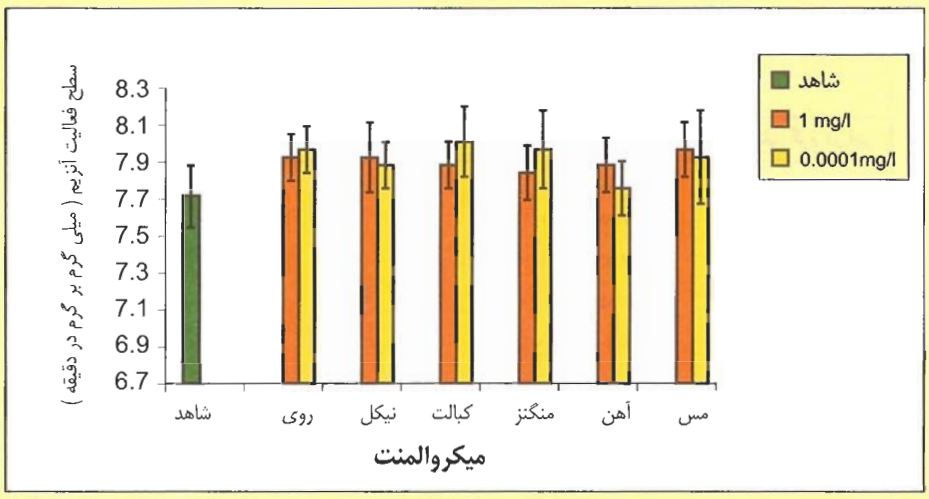
✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 56&57 PP: 83-96**

Influence of microelements zinc, nickel, cobalt, manganese, iron and copper on the level of α-amylase activity in intestinal mucosa, pyloric caecae and pancreas in beluga juvenils (Huso huso)

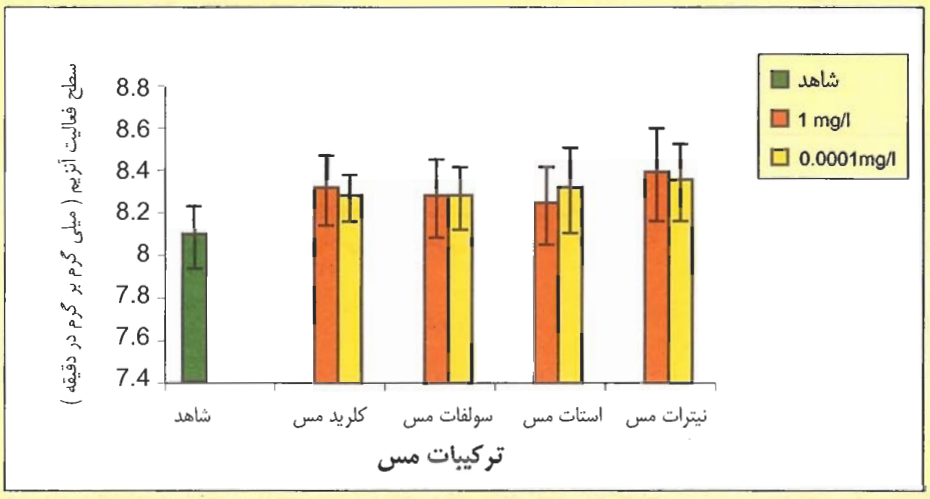
By: Gorbani R. Fisheries Ph.D. Student of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Nevalennyy, A.N. Faculty of Biology. Astrakhan State and Technical University. Russia. Kamali. A. Faculty of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Hajimoradloo, A. Faculty of Fisheries Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. Pourkazemi, M. Sturgeon International Research Institute, Rasht. Iran.

Influence of microelements zinc (as $ZnCl_2$), nickel ($NiCl_2. H_2O$), cobalt ($CoCl_2$), manganese ($MnCl_2. 2H_2O$), iron ($FeCl_2$) and copper [copper chloride $CuCl_2$, copper sulphate $CuSo_4. 5H_2O$, copper acetate $(CH_3COO)_2$ $Cu.2H_2O$ and copper nitrate Cu $(NO_3)_2. 3H_2O$] on the level of α-amilase activity (enzymatical code(E.C) 3.2.1.1.) were measured in intestinal mucosa, pyloric caecae and pancreas in beluga juveniles *(Huso huso)* to determine of microelements that increase the level of enzyme activity. This study was done in vitro with five replications and with two concentrations of 1 and $1x10^{-4}$ mg/l of ions Zn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}. Fe^{2+} and Cu^{2+}. 217 pieces of beluga juveniles with an average weight 25±7 grams, necropsied and necessary organs were removed and Frozen as soon as possible in 2001. The frozen organs were thawed and the experiments were followed in the laboratory of faculty of fisheries, Gorgan university of agricultural science and natural resources (Golestan province) and in the sturgeon international research institute (Guilan province). The results showed that, in most of treatments, the level of enzyme activities were more than control a dose of 1mg/l in pyloric caecae, Zinc and copper nitrate with a dose of 1mg/l in pancreas were less than control. The activity of this enzyme, under influence of iron with a dose $1x10^{-4}$ mg/1 in intestinal mucosa, iron and manganese with a dose of 1 mg/l in pyloric caecae were less than control. Decrease of this enzyme activity under influence of mentioned microelements, were not significantly less than control ($p>0.05$).

Key Woeds: Beluga, *Huso huso*, α -amylase, Microelements, Digestive organs.



شکل شماره ۱ - مقایسه میانگینهای سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در مخاط روده بچه فیل ماهی



شکل شماره ۲ - مقایسه میانگینهای سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در مخاط روده بچه فیل ماهی

مقدمه

فیل ماهی *(Huso huso)* یکی از گونه‌های بسیار با ارزش دریای خزر از نظر صادرات خاویار است و از برخی ماهیان و بی‌مهرگان کف زی تغذیه می‌نماید (۱۴). با توجه به اهمیت ماهیان خاویاری از جنبه تولید خاویار و گوشت، انجام تحقیقات همه جانبه در خصوص آنها لازم و ضروری است. در سالهای اخیر تمایل نسبت به تحقیق پیرامون فرآیند گوارش در ماهیان تحت تاثیر عوامل طبیعی و انسانی به طور قابل توجه‌ایی افزایش یافته است (۷). در زمینه میزان وجود فلزات سنگین در مناطق باز میانی و جنوبی دریای خزر تحقیقاتی انجام گرفته و مقدار آهن از ۳۵۰ تا ۴۷۵، منگنز از ۲۸ تا ۳۷، مس از ۱/۷ تا ۱۰/۳، روی از ۲۹ تا ۱۲۳، کادمیم از ۰ تا ۱/۵، سرب از ۰ تا ۴ و استرانسیوم از ۱۳۲۸ تا ۱۶۰۰ میکروگرم در لیتر اندازه گیری گردیده است (۹).

دلیل عمده بررسی تاثیر میکروالمنتها بر سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در سه اندام روده، لوزالمعده و ضمائم باب المعده نقش و اهمیت کربوهیدراتها در تغذیه ماهیان می‌باشد. بچه ماهیان خاویاری نیازمند رژیمهای غذایی حاوی ۳۰-۲۰ درصد کربوهیدرات می‌باشند (۱). کربوهیدراتها به عنوان منبع انرژی و سنتز چربی در بدن مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰).

از عمده‌ترین دلایل انجام این تحقیق می‌توان به اهمیت ۶ میکروالمنت روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن

جدول شماره ۱- مقایسه میانگین های سطح فعالیت آنزیم آلفا — آمیلاز (بر حسب میلی گرم بر گرم در دقیقه) در مخاط روده

[ارقام نشانگر میانگین ۵ تکرار ± انحراف معیار]

میکروالمنت		شاهد	غلظت میکروالمنت	
			۱ میلی گرم در لیتر	۱×۱۰^{-۱}میلی گرم در لیتر
روی	($ZnCl_2$)	$۷/۷۲^{ab} \pm ۰/۱۶$	$۷/۸۷^{ab} \pm ۰/۱۲$	$۷/۹۳^{ab} \pm ۰/۱۱$
نیکل	($NiCl_2.6H_2O$)		$۷/۸۶^{ab} \pm ۰/۱۷$	$۷/۸۲^{ab} \pm ۰/۱۳$
کبالت	($CoCl_2$)		$۷/۸۴^{ab} \pm ۰/۱۳$	$۷/۹۶^{b} \pm ۰/۱۸$
منگنز	($MnCl_2.2H_2O$)		$۷/۸۰^{ab} \pm ۰/۱۴$	$۷/۹۴^{ab} \pm ۰/۱۹$
آهن	($FeCl_2$)		$۷/۸۴^{ab} \pm ۰/۱۳$	$۷/۷۱^{a} \pm ۰/۱۵$
مس	($CuCl_2$)		$۷/۹۳^{ab} \pm ۰/۱۴$	$۷/۸۷^{ab} \pm ۰/۲۳$
ترکیبات مس				
کلرید مس	($CuCl_2$)	$۸/۱۲^{a} \pm ۰/۱۳$	$۸/۳۴^{ab} \pm ۰/۱۶$	$۸/۲۹^{ab} \pm ۰/۱۲$
سولفات مس	($CuSO_4.5H_2O$)		$۸/۲۹^{ab} \pm ۰/۱۸$	$۸/۳۱^{ab} \pm ۰/۱۴$
استات مس	$(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$		$۸/۲۸^{ab} \pm ۰/۱۷$	$۸/۳۶^{ab} \pm ۰/۲۰$
نیترات مس	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$		$۸/۴۱^{ab} \pm ۰/۲۱$	$۸/۳۳^{ab} \pm ۰/۱۸$

و مس از جنبه‌های مختلف اشاره کرد. برای مثال عدم وجود آهن و مس به میزان کافی در ماهیان می‌تواند موجب کم‌خونی گشته و در ساخت هموگلوبین اختلال ایجاد کند. منگنز در ساختمان بسیاری از آنزیمها شرکت داشته و برای رشد طبیعی حیوانات ضروری است. روی نیز در ساختمان بسیاری از آنزیمها شرکت داشته و عنصری ضروری محسوب می‌شود. کبالت بخش مهمی از ویتامین B_{12} (کوبالآمین) را تشکیل داده و همچنین بر روی برخی آنزیمها تاثیر می‌گذارد (۱۵).

بررسی تاثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در داخل‌کشور در ماهیان بی‌سابقه و در سایر کشورها نیز تحقیقات اندکی در این خصوص صورت پذیرفته است. برای مثال سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در مخاط روده ماهیان سوف و کپور معمولی (۱۶) و سطح فعالیت این آنزیم در روده لاروهای ماهیان کلمه و سیم مورد بررسی قرار گرفته است (۸). میزان تاثیر برخی میکروالمنتها شامل روی، نیکل، آهن و مس بر برخی جنبه‌های تکثیر و پرورش کپور ماهیان چینی، شامل درصد لقاح، درصد تفریخ تخمها، قابلیت بقاء لاروها، وزن و طول لاروها پس از تفریخ در مقایسه با تیمار شاهد (۱۸)، تاثیر مس بر فرآیند تکامل لارو میگوی گونه *Alpheus malabaticusm* (۱۳) و تاثیر کادمیم بر مراحل جنینی و لاروی ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفته است (۱۷).

مواد و روشها

تهیه نمونه‌ها

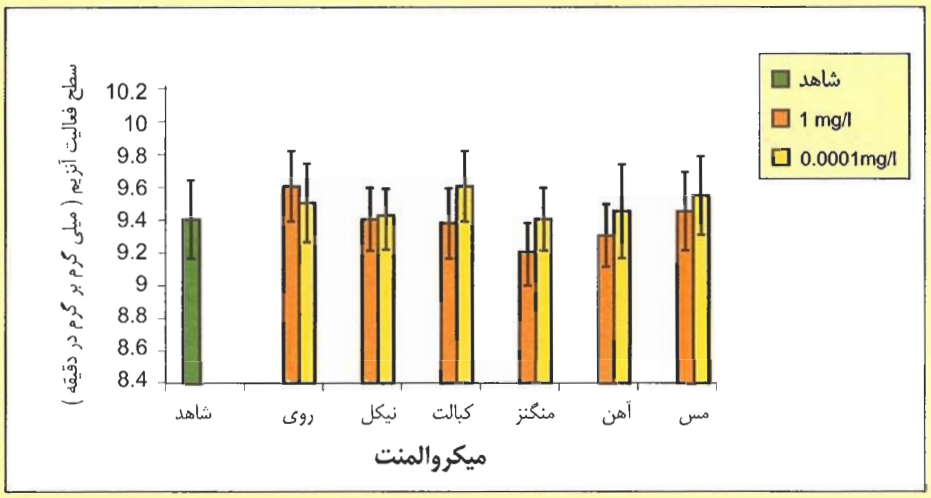
بچه فیل ماهیان مورد نیاز به تعداد ۲۱۷ قطعه و با وزن متوسط ۷±۲۵ گرم در ابتدای سال ۱۳۸۰ از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان (استان گلستان) تأمین و عمل کالبد گشایی آنها صورت گرفت. برای به حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمها، کالبدگشایی ماهی و بیرون آوردن اندامها روی سطح یک صفحه شیشه‌ای مستقر بر ظرف حاوی مخلوط آب و یخ انجام گرفت. سپس اندمهای، روده، ضمائم باب‌المعده و لوزالمعده از بدن ماهیان خارج و بلافاصله در شرایط انجماد نگهداری گردیدند.

تهیه میکروالمنت‌ها

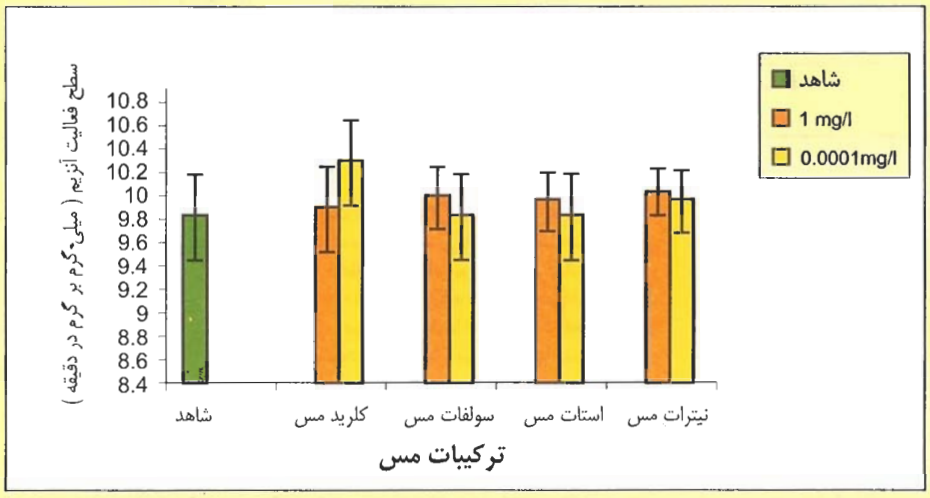
برای بررسی تاثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز از کلرید روی ($ZnCl_2$)، کلرید نیکل ($NiCl_2$)، کلرید کبالت ($CoCl_2$)، کلرید منگنز ($MnCl_2.2H_2O$)، کلرید آهن ($FeCl_2$)، کلرید مس ($CuCl_2$)، سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)، استات مس $(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$ و نیترات مس $Cu(NO3)_23H_2O$ با احتساب دو غلظت ۱ و ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر هریک از یونهای Cu^{2+},Ni^{2+}, Zn^{2+} Mn^{2+},Co^{2+} استفاده گردید.

روش کار

سنجش فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز تحت اثر میکروالمنت‌ها بر اساس تجزیه نشاسته تحت اثر آنزیم از طریق رنگ‌سنجی و تغییر شدت رنگ ترکیبات ید با نشاسته می‌باشد. از محلول ۰/۱ درصد نشاسته $(C_6H_{10}O_5)n$ به‌عنوان بستره[۱] استفاده گردید. برای آماده سازی بافت و روده ابتدا آنها را از حالت انجماد خارج و سپس بافت را در هاون چینی کاملاً ساییده و جداسازی مخاط روده پس از شستشوی روده با محلول رینگر انجام گرفت. برای آماده‌سازی بستره، نشاسته مورد استفاده را در ۳۰ میلی‌لیتر محلول رینگر ریخته و سپس ۷۰ میلی‌لیتر محلول رینگر را جوشانده و به مخلوط می‌افزاییم. سپس نشاسته حل شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول رینگر را مجدداً حرارت می‌دهیم. این عمل به منظور حل شدن کامل نشاسته در محلول رینگر و ایجاد حالت شفاف انجام می‌شود. جهت رقیق سازی بافت و مخاط از



شکل شماره ۳ - مقایسه میانگینهای سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در ضمائم باب المعده بچه فیل ماهی



شکل شماره ۴ - مقایسه میانگینهای سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در ضمائم باب المعده بچه فیل ماهی

محلول رینگر (شامل ۱۰۹ میلی‌مول کربنات سدیم، ۱/۹ میلی مول کلرید پتاسیم، ۱/۱ میلی مول کلرید کلسیم، ۱/۲ میلی مول بی کربنات سدیم) استفاده گردید. عمل سانتریفوژ مخاط و بافت رقیق شده به‌مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام شد. عمل انکوباسیون لوله‌های آزمایش حاوی میکروالمنت و مخاط یا بافت رقیق شده که به آن بستره افزوده شده، به‌مدت ۱۰ دقیقه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در pH=۶/۸ انجام و سپس قرائت دانسیته نوری در طول موج ۶۷۰ نانومتر صورت گرفت. فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز بر حسب مقدار محصول تولید شده (مالتوز) از بستره نشاسته، تحت اثر آنزیم در مدت ۱ دقیقه و به‌ازای ۱ گرم وزن‌تر بافت می‌باشد (میلی‌گرم بر گرم در دقیقه)، (۲، ۵، ۶، ۱۲).

آزمایشات با ۵ تکرار در هر تیمار انجام و نتایج کسب شده از تاثیر میکروالمنتها در دو غلظت بر سطح فعالیت آنزیمها در اندامهای مختلف با شاهد مقایسه گردیدند. تیمار شاهد دارای شرایط یکسانی نسبت به سایر تیمارها بوده ولی فاقد میکروالمنت می‌باشد.

جهت مقایسه میانگین‌های فعالیت آنزیم تحت اثر میکروالمنت‌ها در دو غلظت، ابتدا با استفاده از تجزیه واریانس (ANOVA) میانگین‌ها مقایسه و پس از مشخص شدن وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با استفاده از آزمون دانکن مشخص گردید که بین

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین های سطح فعالیت آنزیم آلفا -آمیلاز (بر حسب میلی گرم بر گرم در دقیقه) در ضمائم باب المعده

[ارقام نشانگر میانگین ۵ تکرار ± انحراف معیار]

میکروالمنت	شاهد	غلظت میکروالمنت	
		۱میلی گرم در لیتر	$10^{-4}\times1$ میلی گرم در لیتر
روی ($ZnCl_2$)	$9/40^{ab} \pm 0/23$	$9/62^{b} \pm 0/20$	$9/51^{ab} \pm 0/16$
نیکل ($NiCl_2.6H_2O$)		$9/45^{ab} \pm 0/19$	$9/46^{ab} \pm 0/18$
کبالت ($CoCl_2$)		$9/42^{a} \pm 0/20$	$9/69^{b} \pm 0/29$
منگنز ($MnCl_2.2H_2O$)		$9/16^{a} \pm 0/12$	$9/47^{b} \pm 0/18$
آهن ($FeCl_2$)		$9/36^{ab} \pm 0/20$	$9/54^{b} \pm 0/28$
مس ($CuCl_2$)		$9/53^{b} \pm 0/22$	$9/60^{b} \pm 0/23$
ترکیبات مس			
کلرید مس ($CuCl_2$)	$9/89^{a} \pm 0/35$	$9/95^{ab} \pm 0/37$	$10/36^{b} \pm 0/37$
سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)		$10/04^{ab} \pm 0/28$	$9/89^{a} \pm 0/35$
استات مس ($(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$)		$9/96^{ab} \pm 0/25$	$9/89^{a} \pm 0/30$
نیترات مس $Cu(NO_3)_2.3H_2O$		$10/09^{ab} \pm 0/19$	$10/03^{ab} \pm 0/27$

تفاوت بین میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک از دو حرف **a** و **b** باشند از نظر آماری معنی دار نیستند.

کدامیک از میانگینها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. نمودارها با استفاده از برنامه کامپیوتری Excel رسم گردیدند.

نتایج

در آزمایشات اولیه اثر ۶ میکروالمنت روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس به شکل کلرید بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در مخاط روده، ضمائم بساب‌المعده و لوزالمعده در دو غلظت ۱ و $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر بررسی و سپس برای اینکه مشخص شود ترکیبات مختلف یک میکروالمنت چه اثری بر فعالیت آنزیم دارند از ترکیبات مختلف مس در آزمایشهای جداگانه‌ای استفاده گردید (جداول شماره ۱ تا ۳).

در جداول شماره ۱ تا ۳ میانگینها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شده‌اند و در خصوص ۶ میکروالمنت اول و ترکیبات مس بطور جداگانه تفاوت بین میانگینها نشان داده شده است.

در بررسی تاثیر میکروالمنت‌های ذکر شده در دو غلظت ۱ و $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر در مخاط روده، فقط تحت تاثیر میکرو المنت آهن در غلظت $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر، سطح فعالیت آنزیم کمتر از تیمار شاهد (میزان میکروالمنت صفر میلی‌گرم در لیتر) اندازه‌گیری گردیده ولی اختلاف بین آنها معنی‌دار نیست. همچنین در این اندام بین سطح فعالیت آنزیم تحت تاثیر کبالت و آهن در غلظت $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در سایر تیمارها افزایش سطح فعالیت آنزیم در مخاط روده، تحت تاثیر میکروالمنتها نسبت به هم و در مقایسه با تیمار شاهد به‌حد معنی‌دار شدن نمی‌رسد (جدول شماره ۱ و شکل شماره ۱).

در بررسی تاثیر ترکیبات مس بر فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در غلظتهای ۱ و $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم بر لیتر در مخاط روده، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مورد آزمایش و تیمار شاهد مشاهده نمی‌گردد (جدول شماره ۱ و شکل شماره ۲).

در ضمائم باب‌المعده به‌جز تحت تاثیر میکروالمنت‌های آهن و منگنز در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، در سایر تیمارها، سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز بیش از تیمار شاهد می‌باشد. ولی اختلاف هیچ یک از تیمارها با تیمار شاهد معنی‌دار نمی‌باشد (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۳).

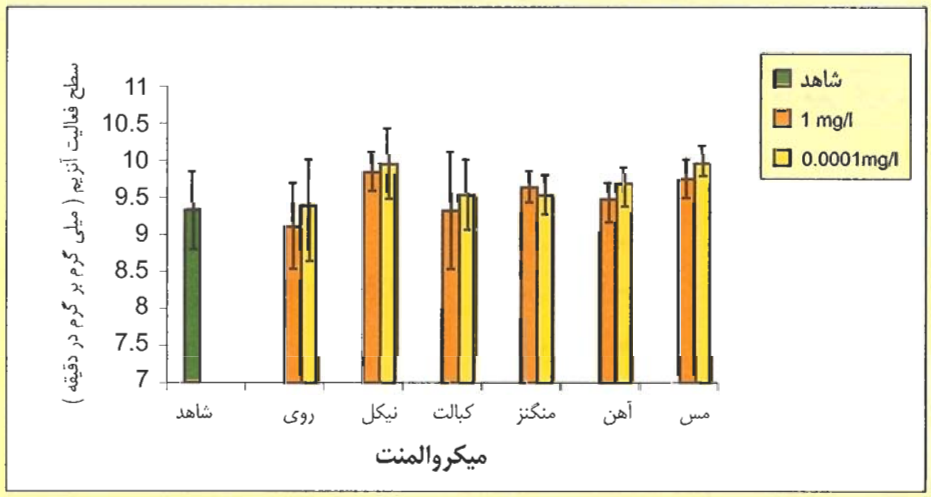
در بررسی تاثیر ترکیبات مس بر فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در ضمائم باب‌المعده، فقط کلرید مس در غلظت $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به تیمار شاهد گردیده است ($p<0/05$)، (جدول شماره ۲ و نمودار شماره ۴).

در بررسی تاثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در لوزالمعده، به‌جز تحت تاثیر میکروالمنت روی در غلظت ۱ میلی گرم در لیتر در سایر تیمارها سطح فعالیت آنزیم بیش از تیمار شاهد اندازه‌گیری گردید (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۵).

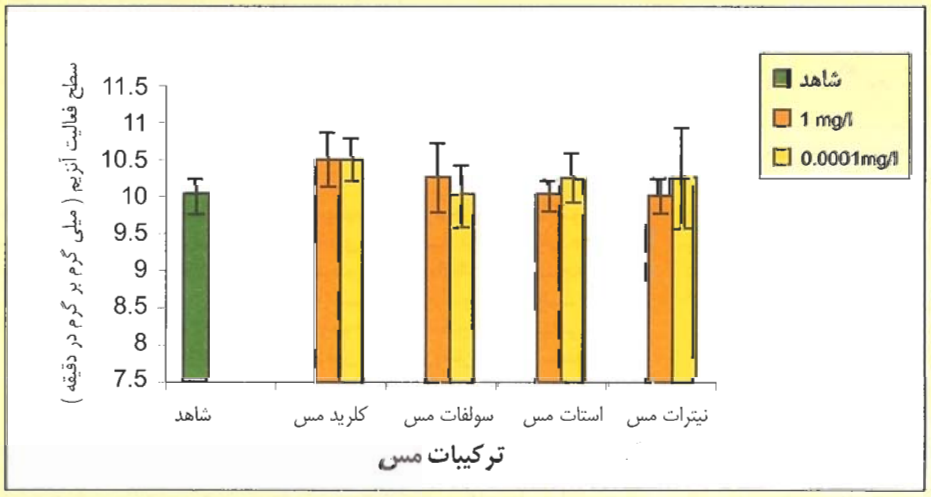
در لوزالمعده، کلرید مس در دو غلظت ۱ و $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش سطح فعالیت آنزیم نسبت به تیمار شاهد گردیده که در غلظت $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد می‌باشد ($p<0/05$)، (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۵ و ۶).

بحث و نتیجه‌گیری

در بررسی تاثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در دو غلظت مشخص گردید که سطح فعالیت آنزیم تحت تاثیر میکروالمنت‌ها در اغلب تیمارها بیش از تیمار شاهد می‌باشد. تغییر سطح فعالیت آنزیم تحت تاثیر میکروالمنت‌ها در دو غلظت ۱ و $10^{-4}\times1$ میلی‌گرم در لیتر در برخی تیمارها نسبت به یکدیگر و نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار می‌باشد. همچنین بالا بودن سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در



شکل شماره ۵ - مقایسه میانگینهای سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لوزالمعده بچه فیل ماهی



شکل شماره ۶ - مقایسه میانگینهای سطح فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لوزالمعده بچه فیل ماهی

ضمائم باب‌المعده نشانگر اهمیت این اندام، همانند اندامهای روده و لوزالمعده در تولید این آنزیم می‌باشد (جداول شماره ۱ تا ۳ و شکلهای شماره ۱ تا ۶). در تحقیق حاضر برای پی بردن به تاثیر ترکیبات مختلف از یک میکروالمنت در خصوص مس علاوه بر کلرید مس از سولفات، استات و نیترات مس نیز استفاده گردید. هدف پی بردن به این موضوع بوده که کدام میکروالمنت‌ها و در چه غلظتی و در خصوص ترکیبات مس کدام ترکیب یا ترکیبات بمیزان بیشتری موجب تغییر سطح فعالیت آنزیم در اندامهای مختلف می‌گردد. استفاده از ترکیبات مختلف مس به‌دلیل در دسترس بودن ترکیبات فوق و به‌عنوان نمونه‌ای از میکروالمنتها صورت گرفت. مس بشکل سولفات، استات، اکسی کلرید و غیره... به‌طور وسیعی به‌عنوان علف‌کش و در ترکیب حشره‌کش‌ها مورد استفاده قرار گرفته و در نتیجه از طریق زه‌کش‌ها از مزارع کشاورزی و کانال‌ها به آبهای ساحلی می‌رسند (۱۳).

تاثیر میکروالمنتها بر سطح فعالیت تعدادی از آنزیم‌ها شامل آنزیم‌های پروتئولیتیک (۵، ۷، ۸) و فسفاتازقلیایی (۸، ۱۱) در برخی گونه‌های آبزی تا حدودی مورد بررسی قرار گرفته است. در خصوص آنزیم آلفا - آمیلاز و سایر آنزیم‌ها، تحقیقات انجام گرفته در سایر کشورها، نیازمند تکمیل از جنبه‌های مختلف از جمله بررسی سطح فعالیت این آنزیم در اندامهای

جدول شماره ۳- مقایسه میانگین های سطح فعالیت آنزیم آلفا -آمیلاز (بر حسب میلی گرم بر گرم در دقیقه) در اندام لوزالمعده

[ارقام نشانگر میانگین ۵ تکرار ± انحراف معیار]

میکروالمنت	شاهد	غلظت میکروالمنت	
		۱میلی گرم در لیتر	۱×۱۰^{-۴} میلی گرم در لیتر
روی ($ZnCl_2$)	$۹/۲۹^{ab} \pm ۰/۵۵$	$۹/۱۳^{a} \pm ۰/۶۲$	$۹/۴۰^{ab} \pm ۰/۶۸$
نیکل ($NiCl_2.6H_2O$)		$۹/۸۲^{bc} \pm ۰/۲۴$	$۹/۹۵^{bc} \pm ۰/۴۸$
کبالت ($CoCl_2$)		$۹/۳۶^{ab} \pm ۰/۷۸$	$۹/۵۹^{abc} \pm ۰/۴۶$
منگنز ($MnCl_2.2H_2O$)		$۹/۷۲^{abc} \pm ۰/۲۰$	$۹/۶۵^{abc} \pm ۰/۲۳$
آهن ($FeCl_2$)		$۹/۶۲^{abc} \pm ۰/۲۵$	$۹/۸۷^{abc} \pm ۰/۲۷$
مس ($CuCl_2$)		$۹/۹۱^{bc} \pm ۰/۲۷$	$۱۰/۰۸^{c} \pm ۰/۲۳$
ترکیبات مس			
کلرید مس ($CuCl_2$)	$۱۰/۰۲^{a} \pm ۰/۲۲$	$۱۰/۶۱^{ab} \pm ۰/۳۶$	$۱۰/۶۲^{ab} \pm ۰/۲۸$
سولفات مس ($CuSO_4.5H_2O$)		$۱۰/۴۲^{ab} \pm ۰/۴۶$	$۹/۰۴^{ab} \pm ۰/۴۱$
استات مس $(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$		$۹/۹۸^{ab} \pm ۰/۲۲$	$۹/۳۱^{ab} \pm ۰/۳۵$
نیترات مس $Cu(NO_3)_2.3H_2O$		$۹/۹۶^{ab} \pm ۰/۲۳$	$۱۰/۵۰^{ab} \pm ۰/۶۹$

تفاوت بین میانگین هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک از حروف a , b و c باشند از نظر آماری معنی دار نیستند.

مختلف بویژه در زمینه ماهیان خاویاری بوده و تحقیق پیرامون تاثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت این آنزیم در ارتباط با اینگونه ارزشمند، تا حدودی پاسخگوی سئوالات موجود در این زمینه است.

Ugolev و Kuzmina سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز را در مخاط روده ماهی سوف ۰/۹ و در مخاط روده ماهی کپور معمولی ۴۱/۴ میلی‌گرم بر گرم در دقیقه (۱۶) و Kuzmina سطح فعالیت این آنزیم را در روده لارو ماهی کلمه ۴۵/۸۰ و در مخاط روده ماهی بالغ ۷/۵۱ و روده لارو ماهی سیم ۲۰/۳۲ و در مخاط روده ماهی بالغ ۲/۱۱ میلی‌گرم بر گرم در دقیقه اندازه‌گیری و قید نموده که سطح فعالیت این آنزیم با افزایش سن ماهیان ذکر شده کاهش می‌یابد (۸).

در تحقیق حاضر با توجه به رژیم غذایی فیل ماهی و با عنایت به اینکه ۲۴ ساعت قبل از خارج نمودن اندامها از بدن بچه ماهیان عمل غذا دهی به آنها متوقف گردیده بود، می‌توان اظهار داشت، سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در سه اندام روده، ضمائم باب‌المعده و لوزالمعده بچه فیل ماهیان قابل توجه بوده و نشانگر وضعیت مطلوب فعالیت این آنزیم در این گونه می‌باشد.

Kuzmina و همکاران اثر درجه حرارت و pH را بر فعالیت آنزیم‌های آمیلولیتیک موجودات غذایی مورد تغذیه برخی ماهیان کف زی خوار (۵) و همچنین فعالیت کربوهیدراتها را در برخی موجودات مورد تغذیه بعضی گونه‌های ماهیان صیاد در pH و درجه حرارت‌های مختلف مورد بررسی قرار داده‌اند (۶). در نتیجه مشخص گردیده که تغییر درجه حرارت و pH بر فعالیت آنزیم‌های فوق تاثیر و موجب تغییر سطح فعالیت آنها می‌گردند.

در تحقیق حاضر در زمان بررسی سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز تحت تاثیر میکروالمنت‌ها، میزان pH و درجه حرارت ثابت نگه داشته شد تا عمل اندازه‌گیری سطح فعالیت آنزیم در شرایط یکسان صورت گیرد.

Ugolev و Kuzmina در بررسی تاثیر میزان کربوهیدارت موجود در غذا بر فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز در مخاط روده ماهی کپور دریافتند که سطح فعالیت این آنزیم، در مخاط روده در زمان تغذیه ماهی از غذای مصنوعی بمراتب بیش از زمان تغذیه از غذای طبیعی است (۱۶). با توجه به اینکه در تحقیق حاضر ۲۴ ساعت قبل از کالبدگشایی عمل غذادهی به بچه ماهیان متوقف و پس از کالبدگشایی، روده با محلول رینگر شستشو داده شده، عملاً غذا نقشی در بررسی نداشته است.

Worobev قید نموده که افزودن برخی میکروالمنت‌ها شامل مس، آهن، روی، و منگنز به‌صورت انفرادی و ترکیبی در اثر دهی کوتاه مدت (کمتر از ۴۰ دقیقه) به آب مورد استفاده در تکثیر و پرورش کپور ماهیان چینی، موجب افزایش درصد لقاح، افزایش درصد تفریخ تخم‌ها، افزایش قابلیت بقاء لاروها و افزایش وزن و طول لاروها پس از تفریخ شدن در مقایسه با تیمار شاهد (مقدار میکروالمنت‌ها صفر میلی‌گرم در لیتر) گردیده است (۱۸).

در توجیه افزایش یا کاهش سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز تحت تاثیر میکروالمنت‌ها در اندامهای روده، ضمائم باب‌المعده و لوزالمعده بچه فیل ماهیان، می‌توان اظهار داشت، برخی آنزیم‌ها برای انجام فعالیت‌های کاتالیزوری به ترکیبات فعال کننده غیر پروتئینی (کوفاکتورهایی) نیازمندند که ممکن است این کوفاکتورها برخی یونهای فلزی باشند (۴). لذا می‌توان اظهار داشت در تحقیق حاضر، میکروالمنتها در اغلب تیمارها نقش کوفاکتوری داشته و با تاثیر بر ساختار موضع فعال آنزیم موجب افزایش فعالیت آنزیم گشته‌اند. در خصوص کاهش فعالیت آنزیم تحت تاثیر برخی میکروالمنتها، در واقع میکروالمنتها نقش بازدارندگی در فعالیت آنزیم داشته و این بازدارندگی می‌تواند ناشی از جایگزینی یک یون فلزی با یون فلزی دیگر با همان بار الکتریکی و با اندازه مشابه در متالوآنزیمها باشد (۱۱). همچنین کاهش فعالیت آنزیم تحت اثر فلز سنگین ناشی از اتصال فلز با بخش پروتئینی آنزیم می‌باشد (۳).

در مجموع می‌توان اظهار داشت، با توجه به اینکه در تحقیق حاضر در اغلب تیمارها تحت تاثیر

میکروالمنتها، سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز، بیش از تیمار شاهد می‌باشد، در زمان افزودن میکروالمنت‌ها به آب در اثر دهی کوتاه مدت (پس از تعیین LC_{50} ۹۶ ساعته) در زمان پرورش بچه فیل ماهی می‌توان از حداکثر غلظتی از میکروالمنتها (میکروالمنت هایی که موجب افزایش فعالیت آنزیم گشته‌اند) به گونه‌ای که موجب مسمومیت ماهی نگردند استفاده نمود. این کار فقط از جنبه تاثیر بر سطح فعالیت این آنزیم توصیه و از جنبه‌های دیگر بایستی بررسیهای لازم به‌عمل آید.

پیشنهادات

۱- بررسی اثرات استفاده از ترکیبات مختلف میکروالمنت‌ها در آب مورد استفاده جهت تکثیر و پرورش فیل ماهی بر سطح فعالیت آنزیم آلفا - آمیلاز.
۲ - بررسی تاثیر میکروالمنت‌ها بر فعالیت این آنزیم و میزان رشد فیل ماهی، در صورت افزودن آنها به غذای دستی مورد تغذیه این گونه .
۳ - بررسی اثرات افزودن به تنهایی و ترکیبی میکروالمنت‌ها به آب مورد استفاده برای تکثیر و پرورش فیل ماهی از جنبه تاثیر بر درصد لقاح، درصد تفریخ شدن تخمها، درصد بازماندگی لاروها و بچه ماهیان و میزان افزایش رشد آنها.
۴ - تعیین LC_{50} ۹۶ ساعته در زمان استفاده از میکروالمنتها به تنهایی و ترکیبی برای گونه فیل ماهی.

سپاسگزاری

از مؤسسه تحقیقات شیلات ایران و انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری به جهت تأمین اعتبارات مالی طرح، از پرسنل محترم بخش فیزیولوژی و بیوشیمی انستیتو، از ریاست محترم دانشکده شیلات و محیط زیست و از پرسنل محترم آزمایشگاه دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و پرسنل محترم مرکز تکثیر و پرورش شهید مرجانی گرگان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

پاورقی

۱- فرهنگستان علوم بجای واژه سوبسترا واژه بستره را جایگزین نموده است.

منابع مورد استفاده

1- Akopovna, N., 1997, Korma i Kormlenie molody acetrovikh ryb v industrialnoy akvakalture. Izdatelstva Azockyy Nauchno - Issledovatelckyy institut khozyaistva. 64p.

2- Davletova, L. V., Kapraleva, L. T., Termeleva, A.G., 1986, Morphophanksionalnoe izochenie organof pishevareniya kopitnikh. Izdatelstva Akademia Nauk S.S.S.R. 59 P.

3- Dnavale, D.M., Masurekar, V.B., 1986, Effect of cadmium exposure on the activiey of phosphatases in the hepatopancreas of crab *Scylla serrata* (Forskal). Indian Journal of Marine Science. Vol. 15, PP. 193-194.

4- Gyliarov, M.C., 1999, Balshoi entsyklopedicheskii slavar biologiya. Nauchnoe Izdatelstva. Moskwa. 863p.

5- Kuzmina, V.V., Golovanova, I.L., Skortsova, E.G., 1999, Contribution of food - object enzymes to digestive processes in fishes: Effects of natural and anthropogenic factors. Journal of Ichthyology. Vol. 39. No, 3, PP. 384-393.

6- Kuzmina, V.V., Golovanova, I.L., 2001, Contribution of carbohydrases of food objects to the digestion processes in predatory fishes. Journal of Ichthyology Vol. 41. No. 8, pp 658-665.

7- Kuzmina, V.V., Skvortsova, E.G., 2001, Activity of proteolytic enzymes of potential prey of predatory fish. Influence of natural and anthropogenic factors. Journal of Ichthyology. Vol. 41. No. 2, pp. 239-248.

8- Kuzmina, V.V., 1996, Influence of age on digestive enzyme activity in some fresh water teleost. Aquaculture. Vol. 148, pp. 25-37.

9- Kastrov, V. P., Gorbunova, G.C, 2000, Ribokhozyaictvennie issledovaniya na Kaspii. Kaspnirkh. Izdatelstva kaspnirkh Astrakhan. Russia, PP. 47-52.

10 - Lovell, T., 1989, Nutrition and feeding of fish. Published By Nostrand Reinhold, New York. 260 p.

11- Lan, W.G., Wong, M.K., Chen, N., Sin, Y.M, 1995, Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysoph yys major*. Aquaculture. Vol 131/3, 4, pp. 219 - 230.

12- Nevalennyy, A.N., 1996, Issledovanie protcessa pishevarenia i ryb. Izdatelstva Astrakhanckii Gasodarstvennii Tekhnicheskii Universitet 14p.

13- Perumal, L.P., Subramanian, P, 1985, Effects of salinity and copper on larval development in pistol prawn, *Alpheus malabaricus malabaricus* Fabricus. Indian Journal of Marine Sciences. Vol. 18. pp. 217-218.

14- Shavkin, V., Aslanidy, K., 1999, Ryby presnikh wod. Izdatelstva Airys press. Moskwa. 127 P.

15- Steffens, W. 1989, Principles of fish nutrition. publisher Chichester. New York. 384P.

16- Ugolev, A.M., Kuzmina, V.V., 1993. Pishevaritelnie Protcessa i Adaptatsyy uryb. Izdatelsva. Akademia Nauk Russia. 238 P.

17- Witeska, M., Gezierska, B., Chaber, G., 1995, The influence of cadmium on common carp embryos and larvae. Aquaculture. Vol. 129 PP.129 - 132.

18- Warobev, V.I., 1993. Biogeokhimya i rybavodstva. Saratov. Izdatelstva, Russia. MP. Littera. 223 P.