Archive of SID

بررسی تأثیر برخی میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و آنزیم فسفاتاز قلیایی در دستگاه گوارش بچه فیل ماهی (*Huso huso*)

رضا قربانی[۱]، ابوالقاسم کمالی[۲]، آلکساندر نیوالونی[۳]، عبدالمجید حاجی‌مرادلو[۴] و محمدپورکاظمی[۵]

ghorbani194@yahoo.com

۱ - بخش آبزی‌پروری، پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر صندوق پستی: ۱۳۷۴
۲ و ۴ - دانشکده شیلات و محیط‌زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان صندوق پستی: ۱۵۷۳۹-۴۹۱۳۸
۳ - دانشگاه فنی دولتی آستراخان، دانشکده بیولوژی، آستراخان، روسیه
۵ - انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری، رشت صندوق پستی ۶۳۴۶-۴۱۶۳۵

تاریخ دریافت : شهریور ۱۳۸۱ تاریخ پذیرش : بهمن ۱۳۸۱

چکیده

تأثیر میکروالمنت‌های روی (بصورت $ZnCl_2$)، نیکل ($NiCl_2.6H_2O$)، کبالت ($CoCl_2$)، منگنز ($MnCl_2.2H_2O$)، آهن ($FeCl_2$) و مس [بصورت کلرید مس $CuCl_2$، سولفات مس $CuSO_4.5H_2O$، استات مس $(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$ و نیترات مس $Cu(NO_3)_2.3H_2O$] بر سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی (تریپسین باکد آنزیمی (E.C)۳.۴.۲۱.۴، کیموتریپسین E.C.۳.۴.۲۱.۱ و پپتیدازهای مختلف) در مخاط روده، آنزیم پروتئاز اسیدی (پپسین E.C.۳.۴.۲۳.۱) در مخاط معده و فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (E.C.۳.۱.۳.۱) در ضمائم باب‌المعده بچه فیل ماهی اندازه‌گیری گردید. این تحقیق با ۵ تکرار در هر تیمار بروش *in vitro* در دو غلظت ۱ و ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر از یونهای Zn^{2+}، Ni^{2+}، Co^{2+}، Mn^{2+}، Fe^{2+} و Cu^{2+} انجام گرفت. دراین بررسی ۲۱۷ عدد بچه فیل ماهی با وزن متوسط ۷±۲۵ گرم کالبدگشایی و اندامهای مورد

www.SID.ir

Archive of SID

نیاز از بدن ماهیان خارج و در حالت انجماد نگهداری گردیدند. در آزمایشگاه پس از رفع انجماد، آزمایشات انجام گرفت. نتایج کسب شده نشان داد که در اغلب تیمارهای تحت تأثیر میکروالمنت‌ها، سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک (قلیایی و اسیدی) و فسفاتاز قلیایی، کمتر از تیمار شاهد (میزان میکروالمنت صفر میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد. سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی، تحت تأثیر استات مس با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در مخاط روده و سطح فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی (پپسین) تحت تأثیر میکروالمنت روی با غلظت ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر و نیترات مس با غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر در مخاط معده، بطور معنی‌دار بیش از تیمار شاهد اندازه‌گیری گردیدند ($P<۰/۰۵$). همچنین سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی، تحت تأثیر نیترات مس با غلظت ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر در ضمائم باب‌المعده بطور معنی‌داری بیش از تیمار شاهد می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

لغات کلیدی: فیل ماهی، *Huso huso* میکروالمنت، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فسفاتاز قلیایی،

مقدمه

فیل ماهی (*Huso huso*) یکی از گونه‌های بسیار با ارزش دریای خزر از نظر تولید خاویار است. از نظر تغذیه‌ای از برخی ماهیان و بی‌مهرگان کفزی تغذیه می‌نماید (Shavkin & Aslanidy 1999). 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 تأثیر عوامل طبیعی و انسانی بطور قابل توجهی افزایش یافته است (Kuzmina *et al.*, 1999). در زمینه میزان برخی میکروالمنت‌ها در قسمت‌های 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 و روی از ۲۹ تا ۱۲۳ میکروگرم در لیتر، اندازه‌گیری گردیده است (Kastrov & Gorbanuva, 2000). به جهت اهمیت ویژه آنزیم‌های پروتئولیتیک و فسفاتاز قلیایی نسبت به بررسی تأثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنها در ۳ اندام روده، معده و ضمائم باب‌المعده اقدام گردیده است. به منظور پی بردن به اهمیت آنزیم‌های پروتئولیتیک برای این گونه لازم بذکر است که بچه ماهیان خاویاری نیازمند رژیم‌های غذایی حاوی ۴۸ تا ۵۳ درصد پروتئین می‌باشند (Akopovna, 1997). همچنین فسفاتاز قلیایی آنزیمی است که هیدرولیز و سنتز استرهای اسید

www.SID.ir

Archive of SID

فسفریک و انتقال گروههای فسفات از اسید فسفریک به سایر ترکیبات را در pH قلیایی تسریع می‌نماید (Parker, 1986). این آنزیم می‌تواند نقش مهمی را در فرآیند معدنی سازی اسکلت آبزیان بعهده داشته باشد (Lan *et al.*, 1995).

در تحقیق حاضر با توجه به میزان میکروالمنت‌ها در دریای خزر و محدوده تقریبی افزایش آنها در آبهای طبیعی (Kastrov & Gorbanuva, 2000) و با توجه به اینکه در کشور روسیه از غلظت‌های تا ۵ میلی‌گرم در لیتر از میکروالمنت‌های مس، آهن، روی و منگنز برای بررسی تأثیر آنها بر درصد لقاح، درصد تفریخ تخمها و قابلیت بقاء لاروها و وزن و طول لاروهاپس از تفریخ تخمها در کپور ماهیان چینی مورد استفاده قرار گرفته (Warobev, 1993) از دو غلظت ۱ و $۱×۱۰^{-۴}$ میلی‌گرم در لیتر برای انجام بررسی استفاده گریده است. در واقع با استفاده از غلظت‌های فوق، میزان تغییر سطح فعالیت آنزیم‌ها در دو غلظت زیاد و کم از میکروالمنت‌ها مشخص و در نتیجه می‌توان با دید وسیعتری نسبت به انتخاب سایر غلظت‌ها در تحقیقات آتی اقدام نمود.

از عمده‌ترین دلایل اثر دهی ۶ میکروالمنت روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس اهمیت آنها از جنبه‌های مختلف می‌باشد. برای مثال عدم وجود آهن و مس بمیزان کافی در ماهیان می‌تواند موجب کم‌خونی گشته و در ساخت هموگلوبین اختلال ایجاد شود. منگنز در ساختمان بسیاری از آنزیم‌ها شرکت داشته و عنصری ضروری محسوب می‌گردد. کبالت بخش مهمی از ویتامین $B_{۱۲}$ (کوبالامین) را تشکیل داده و همچنین بر برخی آنزیم‌ها تأثیر می‌گذارد (Steffens, 1989).

با توجه به اهمیت حیاتی آنزیم‌ها و نقش سیستم گوارش ماهیان در هضم و جذب غذا و نیاز ماهیان به میکروالمنت‌ها (Steffens, 1989 ; Lovell, 1989) نسبت به انجام این تحقیق اقدام گردید. هدف بررسی تاثیر میکروالمنت‌های روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس با دو غلظت ۱ و $۱×۱۰^{-۴}$ میلی‌گرم در لیتر بر سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و فسفاتاز قلیایی در روده، معده و ضمائم باب‌المعده می‌باشد. برای پی بردن به تأثیر ترکیبات مختلف از یک میکروالمنت بر سطح فعالیت آنزیم‌ها، از ۴ ترکیب مختلف مس استفاده گردید. نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌تواند راهگشای انجام تحقیقات بعدی در خصوص استفاده از میکروالمنت‌ها به تنهایی و یا بشکل ترکیبی از جنبه‌های مختلف باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش کار

بچه فیل ماهیان مورد نیاز به تعداد ۲۱۷ عدد با وزن متوسط ۷±۲۵گرم در ابتدای سال ۱۳۸۰ از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان (استان گلستان) تأمین و عمل کالبدگشایی بچه ماهیان و بیرون آوردن اندامها روی سطح یک صفحه شیشه‌ای مستقر بر ظرف حاوی مخلوط آب و یخ انجام گرفت. سپس روده، ضمائم باب‌المعده و لوزالمعده از بدن ماهیان خارج شده و در شرایط انجماد نگهداری گردیدند. کاهش درجه حرارت در زمان کالبدگشایی بچه ماهیان و نگهداری اندامها، به منظور حفظ فعالیت آنزیمها انجام شده است.

برای بررسی تأثیر میکروالمنت بر سطح فعالیت آنزیم‌ها 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 $Cu(NO_3)_2.3H_2O$ با احتساب دو غلظت ۱ و ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر هر یک از میکروالمنت‌های روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس استفاده گردید.

سنجش سطح فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی (پپسین E.C.۳.۴.۲۳.۱) در مخاط معده بر مبنای روش فولین سیوکالتو می‌باشد. اساس عمل این است که اسید آمینه تیروزین ناشی از تجزیه سوبسترا (هموگلوبین) بوسیله آنزیم، در مجاورت معرف فولین ایجاد کمپلکس رنگین می‌نماید و شدت رنگ به تعداد اسید آمینه تیروزین ایجاد شده بستگی دارد (Nevalennyy, 1996 ; Kuzmina *et al.*, 1999 ; Kuzmina & Skvortsova, 2001). در این روش از هموگلوبین ۰/۱ درصد بعنوان سوبسترا و از بافر ۰/۱ مولارگلیسین با pH ۱/۵ برای رقیق‌سازی سوبسترا و مخاط استفاده گردید. عمل سانتریفوژ مخاط رقیق شده به مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه انجام و عمل انکوباسیون لوله‌های آزمایش حاوی میکروالمنت و مخاط رقیق شده که به آن سوبسترا افزوده شده به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و قرائت دانسیته نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۷۰ نانومتر انجام‌گرفت (Davletova *et al.*, 1986 ; Nevalennyy, 1996 ; Kuzmina *et al.*, 1999 ; Kuzmina & Skortsova, 2001).

برای سنجش سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی (تریپسین E.C. ۳.۴.۲۱.۴ ،

www.SID.ir

Archive of SID

کیموتریپسین E.C. ۳.۴.۲۱.۱ و پپتیدازهای مختلف) در مخاط روده، اساس روش همانند پروتئاز اسیدی، مبنی بر تشخیص و اندازه‌گیری اسید آمینه تیروزین می‌باشد. در این روش از کازئین ۱ درصد بعنوان سوبسترا و از بافر فسفات با pH ۷/۴ برای رقیق سازی سوبسترا و از آب مقطر برای رقیق سازی مخاط استفاده گردید. سایر شرایط مانند سانتریفوژ، مدت زمان انکوباسیون، درجه حرارت انکوباسیون و طول موج دستگاه اسپکتروفتومتر برای قرائت دانسیته نوری همانند آنزیم پروتئاز اسیدی است. واحد سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک بر اساس مقدار محصول ایجاد شده در نتیجه تاثیر آنزیم بر سوبسترا در مدت ۱ دقیقه و بوسیله ۱ گرم وزن‌تر بافت می‌باشد (میکرومول برگرم در دقیقه)، (Kuzmina *et al.*, 1999 ;Kuzmina& Skvortsova, 2001 ; Davletova *et al.*, 1986; Davletova *et al.*, 1986 ; Nevalennyy, 1996).

برای سنجش سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی تحت اثر میکروالمنت‌ها از محلول ۰/۶ میلی مول در لیتر پارانیترو فنیل فسفات بعنوان سوبسترا استفاده گردید. محلول فوق تحت اثر آنزیم به فسفات و محلول زرد رنگ پارانیتروفنل تجزیه می‌گردد. برای رقیق سازی بافت و سوبسترا از محلول رینگر (۱۰۹ میلی مول کلرید سدیم، ۱/۹ میلی مول کلرید پتاسیم، ۱/۱ میلی مول کلرید کلسیم، ۱/۲ میلی مول بی کربنات سدیم) استفاده گردید. سپس بافت رقیق شده به مدت ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. عمل انکوباسیون لوله‌های آزمایش حاوی میکروالمنت و مخاط رقیق شده که بدان سوبسترا اضافه شده به مدت ۶۰ دقیقه در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد و قرائت دانسیته‌نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر انجام گرفت. واحد سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی براساس مقدار محصول تولید شده در نتیجه تأثیر آنزیم بر سوبسترا در مدت ۱ دقیقه و بوسیله ۱ گرم وزن‌تر بافت می‌باشد (میکرومول بر گرم در دقیقه)،(Kuzmina & Skvortsova, 2001 ; Kuzmina, 1996).

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

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها، از طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل استفاده گردید. آزمایش یک با دو فاکتور، میکروالمنت در شش سطح (روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس بشکل کلرید) و غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

میکروالمنت‌ها در دو سطح (۱ و ۱×۱۰^{-۴} میلی گرم در لیتر) و آزمایش دو با دو فاکتور، ترکیبات مس در چهار سطح (کلرید مس، سولفات مس، استات مس و نیترات مس) و غلظت میکروالمنت در دو سطح (۱ و ۱×۱۰^{-۴} میلی گرم در لیتر) هر کدام با پنج تکرار انجام و با تیمار شاهد مقایسه گردیدند. جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای Spss و Excel انجام گرفت.

نتایج

در بررسی تأثیر میکروالمنت‌های روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و مس بر سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی، ابتدا تأثیر میکروالمنت‌های فوق، بشکل کلرید مورد بررسی و سپس برای پی بردن به میزان تأثیر ترکیبات مختلف یک میکروالمنت بر سطح فعالیت آنزیم‌های گوارشی، در خصوص مس علاوه بر کلرید مس از سولفات، استات و نیترات مس نیز بطور جداگانه استفاده گردید (جداول 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 تأثیر میکروالمنت‌ها، بر سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی (تریپسین، کیموتریپسین و پپتیدازهای مختلف) مخاط روده مشخص گردید که سطح فعالیت آنزیم بجز تحت تأثیر میکروالمنت آهن، استات مس و نیترات مس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، در سایر تیمارها، کمتراز تیمار شاهد (مقدار میکروالمنت صفر میلی‌گرم در لیتر) می‌باشد. فعالیت آنزیم تحت تأثیر استات مس در غلظت فوق بطور معنی‌داری بیش از تیمار شاهد می‌باشد ($P<۰/۰۵$) (نمودارهای ۱ و ۲ و جدول ۱).

در مخاط روده، روی، کلرید مس و استات مس در غلظت ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر و نیکل در دو غلظت، کبالت و منگنز در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر، موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به تیمار شاهد گردیده‌اند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۱ و نمودارهای ۱ و ۲).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱ :مقایسه میانگین‌های* سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی (میکرومول بر گرم در دقیقه) در مخاط روده بچه فیل ماهی (n=۵)

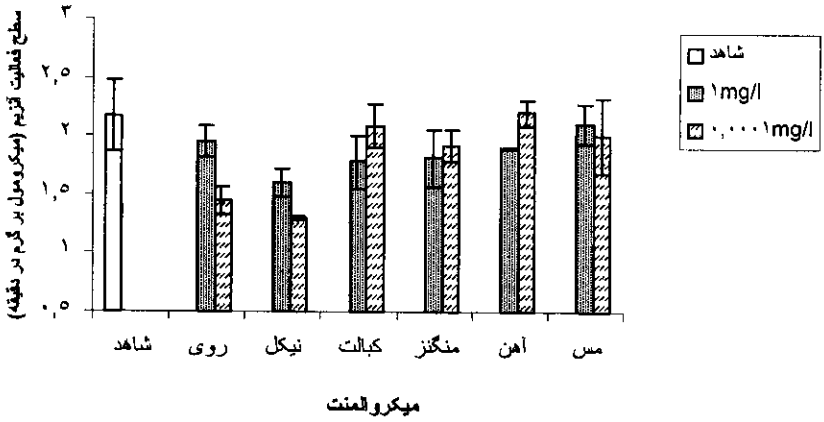
میکروالمنت		شاهد	غلظت میکروالمنت	
			۱ میلی‌گرم در لیتر	۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم‌درلیتر
روی	$(ZnCl_2)$		$۱/۹۵^{def}\pm۰/۱۳$	$۱/۴۵^{ab}\pm۰/۱۲$
نیکل	$(NiCl_2)$		$۱/۶۰^{bc}\pm۰/۱۲$	$۱/۲۹^{a}\pm۰/۰۲$
کبالت	$(CoCl_2)$	$۲/۱۷^{ef}\pm۰/۳۱$	$۱/۷۸^{cd}\pm۰/۲۳$	$۲/۰۹^{f}\pm۰/۱۸$
منگنز	$(MnCl_2.2H_2O)$		$۱/۸۱^{cd}\pm۰/۲۴$	$۱/۹۲^{def}\pm۰/۱۳$
آهن	$(FeCl_2)$		$۱/۹^{de}\pm۰/۰۱$	$۲/۲۰^{f}\pm۰/۱۱$
مس	$(CuCl_2)$		$۲/۱۱^{ef}\pm۰/۱۷$	$۲^{def}\pm۰/۳۲$
		ترکیبات مس		
کلریدمس	$(CuCl_2)$		$۱/۹۷^{abc}\pm۰/۱۳$	$۱/۷۷^{a}\pm۰/۱۵$
سولفات‌مس	$(CuSO_4.5H_2O)$	$۲/۱۸^{c}\pm۰/۱۵$	$۱/۹۷^{abc}\pm۰/۲۲$	$۲/۰۳^{abc}\pm۰/۲۱$
استات‌مس	$(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$		$۳/۰۲^{d}\pm۰/۴۴$	$۱/۸۶^{ab}\pm۰/۲۳$
نیترات‌مس	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$		$۲/۱۹^{c}\pm۰/۱۲$	$۲/۱۵^{bc}\pm۰/۲۹$

***تفاوت بین میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک از حروف a, b, c و d باشند از نظر آماری معنی‌دار نیستند.**

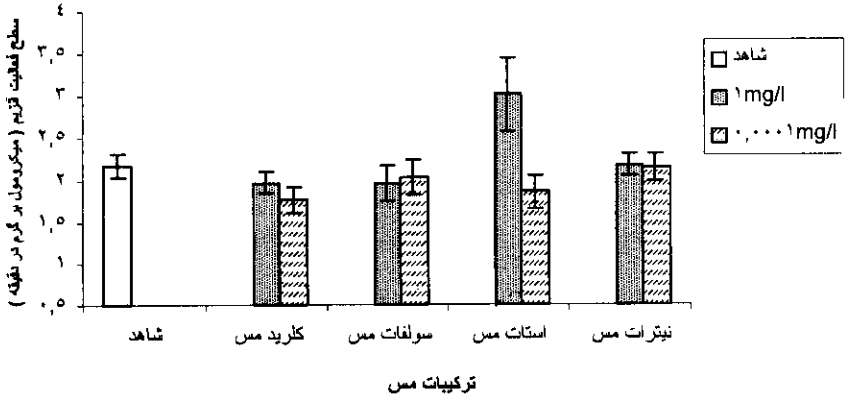
در بررسی تأثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی معده (پپسین)، بجز تحت تأثیر میکروالمنت روی در غلظت ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر و نیکل در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر و نیترات مس در دو غلظت، در سایر تیمارها (سطح فعالیت آنزیم تحت تأثیر استات مس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر مساوی با شاهد است) سطح فعالیت آنزیم کمتر از تیمار شاهد می‌باشد. روی در غلظت فوق و نیترات مس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر موجب افزایش معنی‌دار فعالیت آنزیم نسبت به تیمار شاهد گردیده‌اند ($P<۰/۰۵$) (جدول ۲ و نمودار ۳).

www.SID.ir

Archive of SID



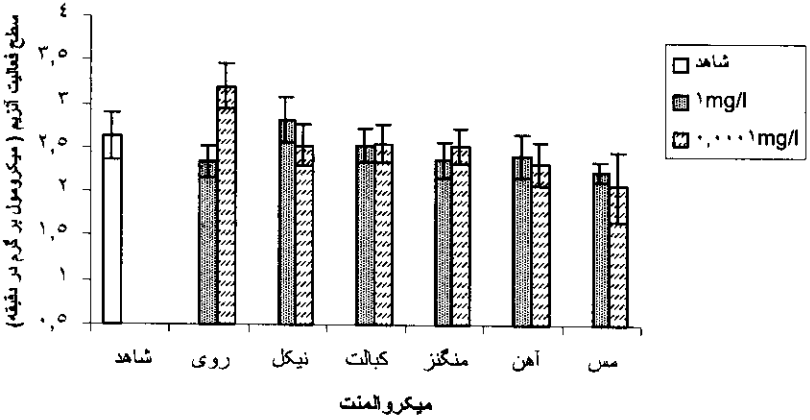
نمودار ۱ : مقایسه میانگین‌های سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی در مخاط روده بچه فیل ماهی



نمودار ۲ : مقایسه میانگین‌های سطح فعالیت کل آنزیم‌های پروتئولیتیک قلیایی در مخاط روده بچه فیل ماهی

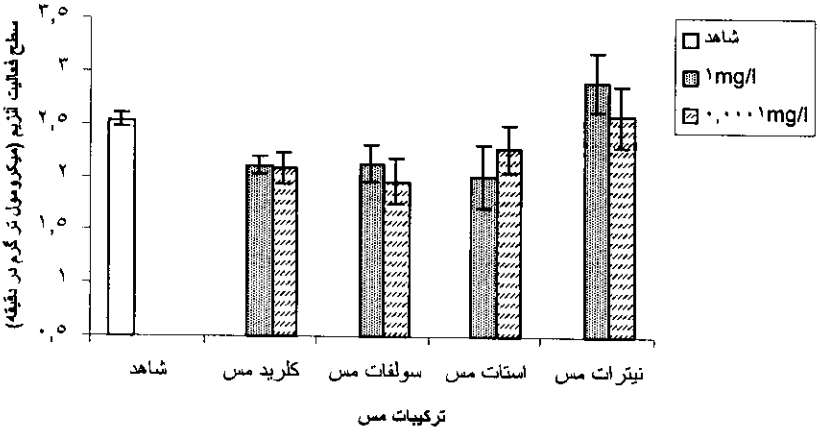
www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۳ : مقایسه میانگین‌های سطح فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی (پپسین) در مخاط معده بچه فیل ماهی

در مخاط معده، کلرید مس و سولفات مس در دو غلظت و استات مس درغلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم پپسین، نسبت به تیمار شاهد گشته‌اند($P<0/05$) (جدول ۲ ونمودار ۴).



نمودار ۴ : مقایسه میانگین‌های سطح فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی (پپسین) در مخاط معده بچه فیل ماهی

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: مقایسه میانگین‌های* سطح فعالیت آنزیم پروتئاز اسیدی (برحسب میکرومول بر گرم در دقیقه) در مخاط معده بچه فیل ماهی (n=۵)

میکروالمنت		شاهد	غلظت میکروالمنت	
			۱ میلی گرم در لیتر	۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم‌درلیتر
روی	$(ZnCl_2)$		۲/۳۵^{abc}±۰/۱۸	۳/۲۰^{e}±۰/۰۲۶
نیکل	$(NiCl_2)$		۲/۸۲^{d}±۰/۲۶	۲/۵۳^{bcd}±۰/۲۴
کبالت	$(CoCl_2)$	۲/۶۳^{cd} ± ۰/۲۷	۲/۵۳^{bcd}±۰/۲۰	۲/۵۵^{cd}±۰/۲۲
منگنز	$(MnCl_2.2H_2O)$		۲/۳۷^{abc}±۰/۲۰	۲/۵۲^{bcd}±۰/۲۰
آهن	$(FeCl_2)$		۲/۴۱^{bc}±۰/۲۴	۲/۳۲^{abc}±۰/۲۵
مس	$(CuCl_2)$		۲/۲۳^{ab}±۰/۱۲	۲/۰۶^{a} ±۰/۴
		ترکیبات مس		
کلریدمس	$(CuCl_2)$		۲/۱۱^{a}±۰/۰۹	۲/۰۸^{a}±۰/۱۵
سولفات‌مس	$(CuSO_4.5H_2O)$	۲/۵۴^{bc}±۰/۰۷	۲/۱۳^{a}±۰/۱۸	۱/۹۶^{a}±۰/۲۱
استات‌مس	$(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$		۲/۰۱^{a}±۰/۳۰	۲/۲۷^{ab}±۰/۲۳
نیترات‌مس	$(Cu(NO_3)_2.3H_2O)$		۲/۹۱^{d}±۰/۲۸	۲/۵۸^{c}±۰/۲۹

*تفاوت بین میانگین‌ها که حداقل دارای یک حرف مشترک از حروف a, b, c و d باشند از نظر آماری معنی‌دار نیستند.

در بررسی تأثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در ضمائم باب‌المعده، بجز تحت تأثیر نیترات مس در دو غلظت در سایر تیمارها سطح فعالیت آنزیم، کمتر از تیمار شاهد اندازه‌گیری گردیده که افزایش فعالیت آنزیم تحت تأثیر نیترات مس در غلظت ۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار می‌باشد (جدول ۳ و نمودارهای ۵ و ۶).

میکروالمنت‌های روی، نیکل، کبالت، منگنز، آهن و کلرید مس در دو غلظت و سولفات مس در غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش معنی‌دار فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در ضمائم باب‌المعده، نسبت به تیمار شاهد گردیده‌اند (جدول ۳ و نمودارهای ۵ و ۶).

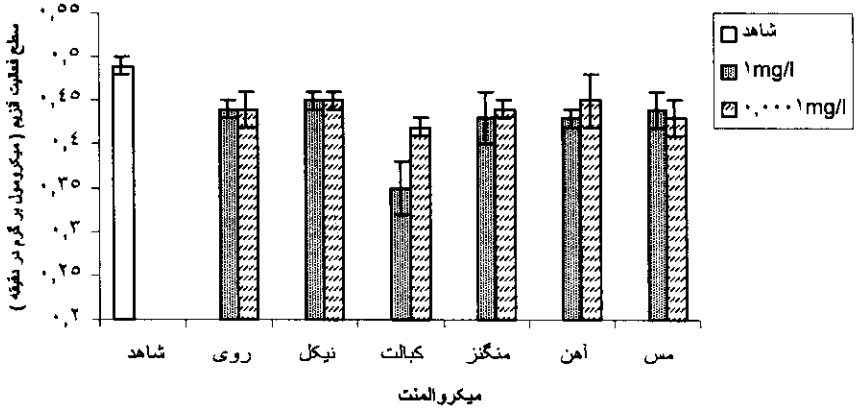
www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: مقایسه میانگین‌های* سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی (میکرومول برگرم در دقیقه) در ضمائم باب‌المعده بچه فیل ماهی (n=۵)

میکروالمنت		شاهد	غلظت میکروالمنت	
			۱ میلی گرم در لیتر	۱×۱۰^{-۴} میلی‌گرم‌درلیتر
روی	$(ZnCl_2)$		$۰/۴۴^{bc}\pm۰/۰۱$	$۰/۴۴^{bc}\pm۰/۰۲$
نیکل	$(NiCl_2)$		$۰/۴۵^{bc}\pm۰/۰۱$	$۰/۴۵^{bc}\pm۰/۰۱$
کبالت	$(CoCl_2)$	$۰/۴۹^{d}\pm۰/۰۱$	$۰/۳۵^{a}\pm۰/۰۳$	$۰/۴۲^{b}\pm۰/۰۱$
منگنز	$(MnCl_2.2H_2O)$		$۰/۴۳^{bc}\pm۰/۰۳$	$۰/۴۴^{bc}\pm۰/۰۱$
آهن	$(FeCl_2)$		$۰/۴۳^{bc}\pm۰/۰۱$	$۰/۴۵^{bc}\pm۰/۰۳$
مس	$(CuCl_2)$		$۰/۴۴^{bc}\pm۰/۰۲$	$۰/۴۳^{bc}\pm۰/۰۲$
		ترکیبات مس		
کلریدمس	$(CuCl_2)$		$۰/۳۹^{ab}\pm۰/۰۲$	$۰/۳۸^{a}\pm۰/۰۱$
سولفات‌مس	$(CuSO_4.5H_2O)$	$۰/۴۳^{c}\pm۰/۰۱$	$۰/۴۰^{ab}\pm۰/۰۲$	$۰/۴۱^{bc}\pm۰/۰۱$
استات‌مس	$(CH_3COO)_2Cu.2H_2O$		$۰/۴۳^{c}\pm۰/۰۲$	$۰/۴۲^{bc}\pm۰/۰۲$
نیترات‌مس	$Cu(NO_3)_2.3H_2O$		$۰/۴۴^{c}\pm۰/۰۲$	$۰/۴۶^{d}\pm۰/۰۲$

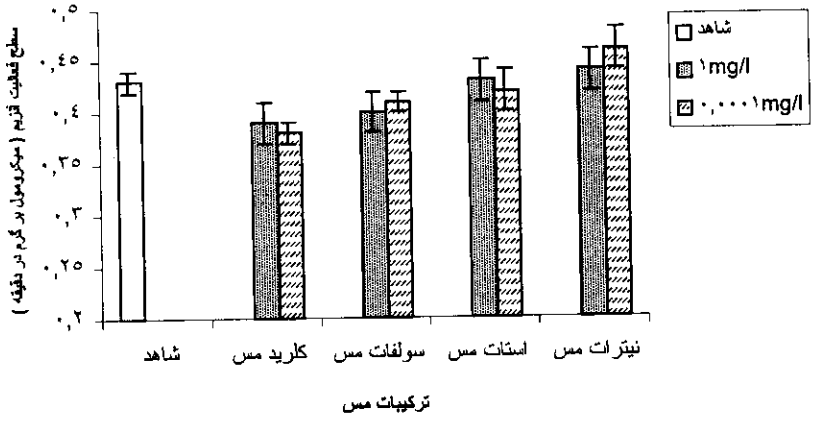
* تفاوت بین میانگین‌ها که حداقل دارای یک حرف مشترک از حروف a, b, c و d باشند از نظر آماری معنی‌دار نیستند.



نمودار ۵ : مقایسه میانگین‌های سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در ضمائم باب المعده بچه فیل ماهی

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۶ : مقایسه میانگین‌های سطح فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در ضمائم باب‌المعده بچه فیل ماهی

بحث

در بررسی تأثیر میکروالمنت‌ها بر سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک (اسیدی و قلیایی) و آنزیم فسفاتاز قلیایی در اندامهای معده، روده و ضمائم باب‌المعده بچه فیل ماهی، سطح فعالیت آنزیم‌های فوق تحت تأثیر میکروالمنت‌ها در اغلب تیمارها کمتر از تیمار شاهد اندازه‌گیری گردید. همانگونه که در نتایج ذکر گردید، افزایش و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌ها تحت تأثیر میکروالمنت‌ها در برخی تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد می‌باشند ($P<0/05$).

در تحقیق حاضر برای پی‌بردن به تأثیر ترکیبات مختلف از یک میکروالمنت در خصوص مس علاوه بر کلرید مس، از سولفات، استات و نیترات مس نیز استفاده گردید. هدف پی‌بردن به این موضوع بود که کدام میکروالمنت یا میکروالمنت‌ها و در چه غلظتی و در خصوص ترکیبات مس کدام ترکیب یا ترکیبات به میزان بیشتری موجب تغییر سطح فعالیت آنزیم در اندامهای مختلف می‌گردند.

مس بشکل، سولفات، استات و اکسی کلرید و غیره بطور وسیعی بعنوان علف‌کش و در ترکیب حشره‌کش‌ها مورد استفاده قرار گرفته و در نتیجه از طریق زه‌کش‌ها از مزارع کشاورزی و از طریق کانالها به آبهای ساحلی می‌رسد (Perumal & Subramanian, 1985).

Lan و همکاران در سال ۱۹۹۵، در بررسی تأثیر دو میکروالمنت ضروری شامل مس و روی بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی کبد ماهی سیم قرمز دریایی *Chrysophrys major* ده ماهه دریافتند که فعالیت این

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر از میکروالمنت روی، افزایش و در زمان رسیدن غلظت این عنصر به ۵۰۰ میکروگرم در لیتر، فعالیت این آنزیم تغییری نمی‌کند. در مقادیر بیش از ۵۰۰ میکروگرم در لیتر از میکروالمنت روی، فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. میکروالمنت مس در غلظت ۲۰ میکروگرم در لیتر موجب افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در لیتر بطور قابل توجهی موجب کاهش فعالیت آنزیم می‌گردد. همچنین در تحقیق فوق قید گردیده ماهی سیم قرمز دریایی در مرحله لاروی (۲ هفته پس از تفریخ) دارای حساسیت بالایی نسبت به میکروالمنت‌های ذکر شده می‌باشد.

Perumal و Subramanian در سال ۱۹۸۵، در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف مس بر درصد مرگ و میر لاروهای میگوی *Alpheus malabaricus malabaricus* دریافتند که لاروها در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر از مس دارای کمترین درصد تلفات می‌باشند.

Warobev در سال ۱۹۹۳، قید نموده که افزودن میکروالمنت‌های مس، روی، منگنز و آهن به تنهایی و یا بشکل ترکیبی با آب مورد استفاده برای تکثیر و پرورش کپور ماهیان چینی، موجب افزایش درصد لقاح، درصد تفریخ تخمها، قابلیت بقاء لاروها و وزن و طول لاروها پس از تفریخ در مقایسه با تیمار شاهد (مقدار میکروالمنت صفر میلی‌گرم در لیتر) می‌گردند. در تحقیق فوق عمل اثر دهی مس و آهن بمدت ۲ تا ۵ دقیقه و عمل اثردهی روی و منگنز بمدت ۴۰ دقیقه در غلظت‌های ۰/۰۵ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر (بسته به نوع میکروالمنت) انجام گرفته است.

برخی محققین تأثیر بعضی فلزات سنگین غیرضروری را بر فعالیت تعدادی از آنزیمها، مورد بررسی قرار داده‌اند. برای مثال در بررسی تأثیر فلز سنگین کادمیم با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر بر سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک موجودات مورد تغذیه برخی ماهیان استخوانی، کادمیم موجب کاهش سطح فعالیت آنزیم در اغلب تیمارها نسبت به تیمار شاهد گردیده است (Kuzmina & Skvortsova, Kuzmina *et al.*, 1999 ; 2001).

در بررسی تأثیر کادمیم در غلظت ۰/۳ تا ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر، بر فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی در اندام هپاتوپانکراس خرچنگ گونه *Scylla serata* کادمیم موجب کاهش سطح فعالیت این آنزیم گردیده‌است (Dnavale & Malsurkar, 1986).

Witeska و همکاران در سال ۱۹۹۵، در بررسی تأثیر کادمیم بر جنین و لارو ماهی کپور معمولی

www.SID.ir

Archive of SID

دریافتند که غلظت ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۵ قسمت در میلیون از کادمیم موجب کاهش آب کشیدگی تخمها، طولانی‌تر شدن زمان تفریخ تخمها و کاهش بقاء جنین‌ها و لاروها در مقایسه با تیمار شاهد می‌گردد.

Mathew و Menon در سال ۱۹۹۲، در بررسی تأثیر کمپلکس برخی فلزات سنگین شامل مس کادمیم و جیوه بر صدف گونه *Donax ncarnatus* مشخص گردیده که این گونه نسبت به مقادیر کمی از آنها حساسیت بالایی دارد.

در توجیه افزایش یا کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک و فسفاتاز قلیایی تحت تأثیر میکروالمنت‌ها در اندامهای روده، معده و ضمائم باب‌المعده بچه فیل ماهیان می‌توان اظهار داشت، برخی آنزیمها برای انجام فعالیت‌های کاتالیزوری به ترکیبات فعال‌کننده غیر پروتئینی (کوفاکتورهایی) نیازمندند که ممکن است این کوفاکتورها برخی از یونهای فلزی باشند (Gyliarov, 1999). لذا می‌توان اظهار داشت، میکروالمنت‌ها در برخی تیمارها نقش کوفاکتوری داشته و با تأثیر بر موضع فعال آنزیم موجب افزایش فعالیت آنزیم گشته‌اند. در خصوص کاهش سطح فعالیت آنزیم تحت تأثیر میکروالمنت‌ها، در واقع میکروالمنت‌ها نقش بازدارندگی بر 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 متالو آنزیم‌ها باشد (Lan *et al.*, 1995). همچنین کاهش فعالیت آنزیم تحت تأثیر فلز سنگین ناشی از اتصال فلز با بخش پروتئینی آنزیم می‌باشد (Dnavale & Masurekar, 1986).

در مجموع می‌توان اظهار داشت، با توجه باینکه در تحقیق حاضر در برخی تیمارها تحت تأثیر میکروالمنت‌ها، سطح فعالیت آنزیم‌ها بیش از تیمار شاهد می‌باشد، در زمان افزودن میکروالمنت‌ها به آب مورد استفاده جهت پرورش بچه فیل ماهی، می‌توان از میکروالمنت‌هایی که موجب افزایش سطح فعالیت آنزیم‌ها گشته‌اند استفاده نمود. این کار فقط از جنبه تأثیر بر سطح فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی توصیه و از جنبه‌های دیگر بایستی تحقیقات لازم بعمل‌آید.

تشکر و قدردانی

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

www.SID.ir

Archive of SID

شیلات و محیط‌زیست و از پرسنل محترم آزمایشگاه دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و از پرسنل محترم مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید مرجانی گرگان تشکر و قدردانی بعمل می‌آید.

منابع

Akopovna, N. , 1997. Korma i kormlenie molody acetrovikh ryb v industrialnoy akvakulture. Izdatelstwa Azovskyy Nauchno-Institut Khazyaictva. 64 P.

Davletova, L.V. ; Kapraleva, L.T. and Termalava, A.G. , 1986. Morphophanksion-alnoe izochenie organof pishevareniya Kopitnikh. Izdatelstva Akademia Nauk U.S.S.R. 59 P.

Dnavale, D.M. and Masurkar, V.B. , 1986. Effect of cadmium exposure on the activity of phosphatases in the hepatopancreas of crab *Scylla serrata* (Forskal). Indian Jornal of Marine Science. Vol. 15, pp.193-194.

Gyliarov, M.C. , 1999. Balshoi entsyklopedicheskii slavar biologia. Nauchnoe Izdatelstva. Moskwa. 863 P.

Kastrov, V.P. and Gorbanuva, A.C. , 2000. Ribokhozyaistvennie issledovanya na kaspii. Russia, Kaspnirkh. Astrakhan. 375 P.

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

Kuzmina, V.V. ; Golovanova, I.L. and 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.

Kuzmina , V.V. and Skvortsova, E.G. , 2001. Activity of proteolytic enzymes of potential prey of predatory fish. Influence of natural and anthropogenic factors.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Ichthyology. Vol. 41, No. 2, pp.239-248.

Lan, W.G. ; Wong, M.K. ; Chen, M. and Sin, Y.M. , 1995. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by ortogonal array desgign on alkaline phosphatase activity in liver of the Red sea bream, *Chrysophrys major*. Aquaculture. Vol. 131/3,4. pp.219- 230.

Lovell, T. , 1989. Nutrition and feeding of fish. Pubished by Van Nostrand Reinhold. New York. 260 P.

Mathew, P. and Menon, R. , 1992. Effect of heavy metal (Cu, Cd and Hg) combination on *Donax incarnatus* Gmelin. Indian Journal of Marine Sciences. Vol. 21, pp.26-29.

Nevalennyy, A.N. , 1996. Issledovanie protcessa pishevarenia i ryb. Izdatelstva. Astrakhanskii Gosodarstvennii Tekhnicheskii Universitet. 20 P.

Parker, S.P. , 1986. Dictionary of biology. Mc Graw Hill Company. NewYork. 384 P.

Perumal, L.P. and Subramanian, P. , 1985. Effects of salinity and copper on larval development in pistol prawn, *Alpheus malabaricus malabaricus* Faxbricius. Indian Journal of Marine Sciences. Vol. 14, pp.33-37.

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

Steffens, W. , 1989. Principles of fish nutrition. Publisher Chichester. New York. 384 P.

Warobev, V.I. , 1993. Biogeokhimya i rybavodstva. Saratov. Izdatelstva. MP. Litera. 223 P.

Witeska, M. ; Jezierska, B. and Chaber, J. , 1995. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae. Aquaculture. Vol. 129, pp.129-132.

www.SID.ir