



دانشگاه گنبد کاووس

نشریه "پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی"

دوره هفتم، شماره دوم، تابستان ۹۸

<http://jair.gonbad.ac.ir>

بررسی فعالیت برخی آنزیم‌های گوارشی و پارامترهای بیوشیمیایی خون تحت تأثیر

استفاده از نمک (NaCl) در جیره غذایی بچه فیل ماهی پرورشی

Huso huso (Linnaeus, 1758)

سمیه حسن پور لسکو کلايه^۱، محمدرضا قمی^{۲*}، حبیب وهابزاده رودسری^۳، حامد موسوی ثابت^۴،

رضوان کاظمی^۵

^۱ دانشجوی دکتری شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

^۲ دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران

^۳ استادیار، گروه شیلات، مرکز تحقیقات علوم شیلاتی و فنون دریایی دکتر کیوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان،

لاهیجان، ایران ^۴ دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، صومعه‌سرا، ایران

^۵ استادیار، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاسماهیان دریای خزر، رشت،

ایران

تاریخ ارسال: ۹۷/۷/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۹/۲۰

چکیده

این آزمایش در قالب ۴ تیمار با افزودن نمک در چهار سطح ۰، ۳، ۶، ۹ درصد به جیره غذایی پایه طراحی گردید. برای این منظور ۴۸۰ قطعه بچه فیل ماهی (*H. huso*) پرورشی با میانگین وزن ۱۷۵ گرم و سن ۵ ماه، در ۱۲ مخزن فایبرگلاس ۲۰۰۰ لیتری به مدت ۱۲ هفته مورد آزمایش قرار گرفت. در پایان دوره، کلسترول، تری-گلیسرید، پروتئین کل، چربی کل، گلوکز، اسمولاریته، کلر، سدیم و برخی از آنزیم‌های گوارش شامل آلکالین فسفاتاز، پروتئاز، لیپاز و آمیلاز مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج مشخص گردید که میزان همه آنزیم‌های گوارشی مورد بررسی در این تحقیق در تمامی تیمارها نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری داشته است. نتایج نشان داد که بیشترین سطح افزایش مربوط به آلکالین فسفاتاز است. به طوری که در شاهد از مقدار 3380 ± 405 به میزان $(u/kg) 1667/50 \pm 1217/50$ در جیره با غلظت ۰.۶٪ نمک افزایش یافت. همچنین میزان سدیم و کلر سرم خون ماهیان در تیمار ۳ افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد داشته است، اما در سایر شاخص‌های بیوشیمیایی مورد آزمایش بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که افزودن نمک به جیره غذای می‌تواند در عملکرد سیستم گوارشی و سلامت مؤثر واقع شود.

*نویسنده مسئول: mghomi@tonekabon.iau.ac.ir

واژه‌های کلیدی: *H. huso*، نمک، آنزیم‌های گوارشی، شاخص‌های بیوشیمیایی

مقدمه

ماهیان خاویاری از جمله ماهیان ارزشمند از نظر اقتصادی هستند که امروزه به دلیل صید غیر مجاز، آلوده شدن محیط زیست و از بین رفتن زیستگاه‌های تکثیر در معرض خطر انقراض قرار دارند (Carmona et al., 2009). فیل‌ماهی (*H. huso*) یکی از ارزشمندترین ماهیان تجاری دریای خزر محسوب می‌شود که مدتی است تکثیر و پرورش آن در محیط‌های پرورشی شروع شده است. این گونه از مشهورترین ماهیان خاویاری با خاویار ممتاز، درشت و گران‌بهاست. با وجود اینکه تولید نوزاد و بچه-ماهی در فیل‌ماهی نسبت به دیگر ماهیان خاویاری کشور از میزان موفقیت بالاتری برخوردار است، ولی هنوز درصد تلفات بسیار بالا بوده (۵۰ - ۸۰ درصد) و تا دستیابی به مرحله تولید اقتصادی فاصله زیادی وجود دارد (Asgari et al., 2013).

اندام‌های گوارشی طی مرحله اولیه زندگی به طور عمده تکامل یافته و فعالیت می‌کنند و توسعه آنتوژنیک و عملکردی آنها به طور مستقیم رشد، بقا و شرایط تغذیه‌ای آنها را تعیین می‌کند. همچنین فعالیت آنزیم‌های گوارشی شاخص خوبی از ظرفیت گوارشی است و مستقیماً تکامل لوله‌های گوارشی و وضعیت تغذیه‌ای، ماهی را نشان می‌دهد (Ueberschar, 1993).

تاکنون مطالعات متعددی در خصوص فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهیان استخوانی دریایی و آب شیرین انجام شده است (Zambonino-Infante et al., 2009). با این وجود، مطالعات کمی در خصوص فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان خاویاری انجام شده و از آن جمله می‌توان به مطالعه آنزیم‌های گوارشی در تاس‌ماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) توسط بادینگتون و دوروشوف (Buddington and Doroshov, 1986)؛ تاس‌ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) توسط گسبرت و همکاران (Gisbert et al., 1999) و زالتوسکا و همکاران (Zoltowska et al., 1999) و نیز بررسی فعالیت آنزیمی در نوزاد قره‌برون (*Acipenser persicus*) توسط نوری و همکاران (Noori et al., 2011) و بابایی و همکاران (Babaei et al., 2011) اشاره کرد. وجود آنزیم‌های گوارشی نشان‌دهنده میزان تکامل دستگاه گوارش و ظرفیت هضمی جانوران است و توسعه آن به طور مستقیم در رشد و بقا تأثیرگذار بوده و به عنوان یک شاخص وضعیت تغذیه‌ای در مراحل اولیه زندگی مورد استفاده قرار گیرد (Yufer and Darias, 2007).

در نتیجه شناخت میزان فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش به عنوان یکی از شاخص‌های مناسب در تدوین استراتژی تغذیه‌ای، می‌تواند نشانگر عامل تلفات بالا و بهبود بیوتکنیک اقتصادی تر پرورش این گونه در مراحل ابتدایی زندگی و بچه‌ماهی می‌باشد.

در حال حاضر چالش عمده آبی پروری تجاری، بهبود جیره غذایی فرموله شده برای بهینه‌سازی رشد و ارتقاء سلامت ماهیان است (Baqai Bambaridi *et al.*, 2013). میزان کارایی غذا به ظرفیت فیزیولوژیک ماهی در هضم و جذب مواد غذایی بستگی دارد (Furne *et al.*, 2008).

عوامل گوناگونی در کارایی تولید ماهیان دخیل است. اما کاهش مرگ و میر ناشی از عوامل بیماری‌زا و افزایش رشد همانند افزایش بهره‌وری تغذیه از فاکتورهای مهمی هستند که باید مورد توجه قرار گیرند. از سوی دیگر افزایش کارایی تولید آبزیان به نوع جیره غذایی و روش تولید آن وابسته است (Nayak, 2010). در حال حاضر مسئله اصلی آبی‌پروری تجاری، افزایش سلامت ماهیان و ارتقاء جیره غذایی فرموله شده برای بهینه‌سازی رشد می‌باشد (Baqai Bambaridi *et al.*, 2013). بر این اساس تحقیقات و تلاش بسیاری در امر ارتقا تولیدات در کوتاه‌ترین زمان ممکن، با صرف حداقل هزینه و کمترین عوارض جانبی با استفاده از افزودنی‌هایی که ضمن حفظ ویژگی‌های مطلوب فاقد تبعات سوء بهداشتی و زیست محیطی باشند، انجام گرفته است (Burr *et al.*, 2005).

استفاده از نمک (کلرید سدیم) در غذای جانداران روش جدیدی نیست، نمک بر طعم و مزه غذا اثر مطلوب گذاشته، در تعادل فشار اسمزی بدن تأثیر گذار است و اسید را در غشاء مخاطی معده تولید می‌کند. با فعال‌سازی پپسین و آنزیم‌های غدد بزاقی حلق و گلو، فرآیند گوارش را نرمال می‌سازد (Nandeeshia *et al.*, 2000). شوری نیز، یکی از فاکتورهای محیط زیستی است که بر فیزیولوژی، کارایی رشد و جذب غذا در ماهی مؤثر می‌باشد (Rubino *et al.*, 2005). سلمان و ادی (Eddy and Salman, 1988) و همچنین آپلبام و همکاران (Appelbaum and Arockiaraj, 2008 and 2009) تحقیقاتی را در خصوص اثر مثبت نمک در جیره غذایی آبزیان به ثبت رساندند. زاگ و همکاران (Zaugg *et al.*, 1983) عنوان کردند که نمک را به جیره غذایی ماهیان افزودند که از جمله مزیت‌های آن افزایش اشتها ماهیان بوده است. همچنین در این خصوص می‌توان به تحقیقات هارپاز و همکاران (Harpaz *et al.*, 2005) و ارولدوغان و همکاران (Eroldogan *et al.*, 2004) اشاره نمود.

بهبود شاخص‌های فیزیولوژیک آبزیان را در نتیجه بهبود و ارتقاء فرمولاسیون جیره، علاوه بر شاخص‌های رشد می‌توان با فاکتورهای خونی نیز ردیابی نمود (Firouzbaksh *et al.*, 2011). آنالیز پارامترهای بیوشیمیایی خون می‌تواند منبعی برای ارزیابی وضعیت سلامتی، تشخیص کم‌خونی، مسمومیت‌ها، بیماری‌ها، کمبود مواد غذایی و فیزیولوژی ماهی باشد (Yousefian *et al.*, 2011). عوامل استرس‌زا، آلاینده‌ها، تغذیه و شرایط اکولوژیکی منجر به بروز تغییرات عمده‌ای در ساختار خون ماهیان از لحاظ میزان سطح هورمون، مقدار پروتئین و گلوکز می‌گردد (Bullis, 1993).

اسمولاریته نیز به شدت تحت تأثیر غلظت یون‌های مختلف سرم خون به‌ویژه یون‌های سدیم در آب شیرین و منیزیم در آب شور می‌باشد. عملکرد متفاوت اندام‌های دخیل در تنظیم فشار اسمزی مانند

پوست، روده، آبشش و کلیه در محیط‌های مختلف می‌تواند تعیین کننده نوع یون مؤثر در فشار اسمزی باشد (Kazemi et al., 2010).

گلوکز سرم خون و کلسترول به مانند بسیاری از فاکتورهای هماتولوژیکی جهت بررسی پاسخ‌های فیزیولوژی ماهیان استفاده می‌شود (Kiffer et al., 2001). دامنه مطلوب این پارامترها را می‌توان به‌عنوان یک راهنما جهت بررسی استرس وارده ناشی از تغییرات فیزیولوژیک (شرایط محیطی، غذای نامناسب و مقادیر اضافه میکروالمان‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها و اسیدهای آمینه اضافه در جیره غذایی) مورد استفاده قرار داد (Martinez et al., 1994; Martins et al., 2004). بنابراین جهت سنجش و برآورد پایداری و تطابق ماهی در برابر تغییر شرایط طبیعی با بررسی‌های خونی می‌توان اطلاعات ارزشمندی در رابطه با حد تحمل گونه‌های مورد آزمایش ارائه داد.

براساس مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد که نمک با تاثیر بر آنزیم‌های گوارشی و تأمین مواد مغذی ضروری سبب کاهش دفع مواد مغذی و افزایش میزان هضم و جذب مواد غذایی می‌گردد. لذا انتظار می‌رود که نمک بتواند به‌عنوان یک ماده معدنی ضروری باعث ارتقاء سطح کیفیت جیره‌های غذایی و سلامت آبزیان و همچنین کاهش هزینه تولید به دلیل قیمت مناسب در غذا شود. در پژوهش حاضر تأثیر استفاده از سطوح مختلف نمک در جیره غذایی فیل ماهی به منظور بررسی بعضی از شاخص‌های بیوشیمیایی خون و تأثیر آن بر مقدار و نوع عملکرد آنزیم‌های گوارشی ماهی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق که در مزرعه خاویار طلایی سد سنگر در پاییز ۱۳۹۶ انجام شد تعداد ۴۸۰ قطعه بچه فیل ماهی به مدت ۱۲ هفته با میانگین وزن $173/80 \pm 0/49$ ، در ۱۲ مخزن با گنجایش ۲ متر مکعب (قطر مخزن ۲ متر و ارتفاع آب ۶۵ سانتی‌متر) پرورش داده شد. میزان آب ورودی هر مخزن حدود ۰/۲ لیتر در ثانیه و منبع آب چاه سطحی بود که توسط دمنده مرکزی هوادهی می‌شد. فاکتورهای کیفی آب شامل میزان اکسیژن محلول، pH، درصد اشباعیت برای همه تیمارها یکسان و مشابه به‌وسیله دستگاه مولتی‌متر مدل HQ40d آمریکایی اندازه‌گیری شد. در طول دوره آزمایش دمای آب $19/50 \pm 0/5$ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن $6/57 \pm 0/5$ میلی‌گرم در لیتر و pH $7/90 \pm 0/4$ در نوسان بود.

تیمارها با درصدهای مختلف نمک شامل تیمار (۱) دارای ۰/۳٪ نمک، تیمار (۲) دارای ۰/۶٪ نمک، تیمار (۳) دارای ۰/۹٪ نمک و گروه شاهد بدون نمک در نظر گرفته شد. تمامی گروه‌های آزمایشی در ۶ نوبت با جیره‌های غذایی تعیین شده، تغذیه شدند. برای هر یک از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد.

برای اضافه کردن نمک به غذا از جیره GFSI مخصوص مرحله رشد ماهیان خاویاری حاوی ۰.۴۵٪ پروتئین، ۱۶٪ چربی و ۵/۳٪ فیبر تولید شرکت فردانه مطابق با نیازمندی‌های غذایی ماهیان خاویاری در مرحله رشد و پیش‌پروراری استفاده شد. در راستای تهیه غذا در آسیاب مدل (Damicar Co, Tehran, Iran) به مدت ۱۰ دقیقه آسیاب شد تا کاملاً به شکل پودر درآمده و سپس به ازای هر یک کیلوگرم غذا، نمک را با توجه به درصد‌های تعیین شده در ۲۸۰ سی‌سی آب حل و به غذای پودر شده اضافه گردید. برای گروه شاهد، ۲۸۰ سی‌سی آب بدون نمک به غذای پودر شده اضافه شد مخلول آب و نمک در نسبت‌های ذکر شده در یک کیلوگرم غذا مخلوط و سپس با استفاده از مخلوط‌کن (Pooya Notash Machinery Co, Mashhas, Iran) میکس شدند. پس از آن غذای مخلوط‌شده وارد چرخ گوشت گردیده و به صورت رشته‌های نودل خارج و توسط تیغه برش به قطعه‌های متناسب با اندازه دهان ماهی (پلت‌ها) تبدیل شد و در دستگاه خشک‌کن به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Mohseni *et al.*, 2008). غذا از خشک‌کن خارج و قبل از استفاده در بسته‌های پلاستیکی ذخیره و در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. جیره غذایی مورد نظر، هر ۱۵ روز یکبار در مؤسسه تحقیقات بین‌المللی تاس‌ماهیان دریای خزر واقع در سد سنگر گیلان، آماده و در یخچال نگهداری شد. طی ۱۲ هفته آزمایش، ۳ مرحله بیومتری جهت محاسبه مقدار غذایی و نیز بررسی رشد ماهیان انجام شد.

سه عدد ماهی از هر تکرار با استفاده از روش آسان‌کشی قطع نخاع شده و سریعاً در مجاورت یخ قرار داده شد تا با حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدگشایی آنها صورت گیرد. جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، روده ماهیان به روش کاهوو و همکاران (Cahu *et al.*, 1999) آماده‌سازی و بلافاصله شرایط انجماد ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند (Kuz'mina *et al.*, 2010).

به منظور هموزن شدن روده، ماهی‌ها به‌طور تصادفی انتخاب و جداسازی روده از ماهی انجام شد و پس از آن روده با ۹ میلی‌لیتر بافرتریس (شامل ۱۰۰mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.8) مخلوط و سپس با هموژنایزر مدل (Polytron PT D-1300) (ساخت کمپانی Kinematica سوئیس) سه بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه همگن شد. مخلوط آماده شده با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Sigma 2-16k Laboratory centrifuge, Sigma CO., USA) و نمونه‌های سوپرناتانت تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شدند و فعالیت آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و آمیلاز از روش (Worthington, 1991) و آلکالین فسفاتاز به روش کاهوو و همکاران (Cahu *et al.*, 1999) با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر (Mindry BS-200 چین) مورد سنجش قرار گرفت.

در پایان دوره، خون‌گیری از بچه‌فیل ماهیان پرورشی با میانگین وزنی 29 ± 633 گرم صورت گرفت. برای این منظور جهت جلوگیری از استرس، ۲۴ ساعت قبل از خون‌گیری، تغذیه ماهیان قطع گردید و از هر تکرار ۶ قطعه ماهی (از هر تیمار ۱۸ نمونه) به‌طور تصادفی انتخاب و برای جلوگیری از ورود موکوس و آب به نمونه خون، ماهیان خشک گردیده و سپس خون‌گیری انجام شد. برای خون‌گیری و تهیه سرم، با استفاده از سرنگ ۲ سی‌سی از ساقه دمی در انتهای باله مخرجی به مقدار حدود ۲ سی‌سی نمونه خون تهیه شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه پس از سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور (rpm) به مدت ۱۰ دقیقه برای تهیه سرم یا پلاسما مورد استفاده قرار گرفت (Kazemi *et al.*, 2010). اندازه‌گیری پارامترهای بیوشیمیایی سرم خون، با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر (Eppendorf, EPOS) ساخت کشور آلمان، طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از کیت‌های آزمایشگاهی انجام شد (Hoseinifar *et al.*, 2011). پروتئین تام به روش دوماس و همکاران (Dumas *et al.*, 1981)، اندازه‌گیری کلسترول به روش کلسترول اکسیداز (Cholesterol Oxidase) و تری‌گلیسرید به روش آنزیمی لیپاز انجام شد (Akrami *et al.*, 2011 - Lipase/GPO-PAP). اندازه‌گیری گلوکز سرم خون از روش آنزیماتیک با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل RA-1000، شرکت Technicon، ساخت آمریکا) و به‌کارگیری کیت‌های من (Man)، ساخت ایران انجام شد (Yooneszadeh *et al.*, 2009). اندازه‌گیری الکترولیت‌های سرم شامل میزان کلر و سدیم با استفاده از دستگاه فلیم فتومتر (Jenway-PEP ساخت کشور انگلستان) انجام شد (Thrall *et al.*, 2004). برای اندازه‌گیری اسمولاریته از دستگاه اتوماتیک اسمومتر و برحسب میلی‌اسمول در لیتر محاسبه شد (Kazemi *et al.*, 2010). اندازه‌گیری شاخص‌های خونی و گوارشی در آزمایشگاه تخصصی دامپزشکی ویرومد انجام گرفت.

جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف، از آزمون واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد. ضمناً، جهت مقایسه میانگین تیمارها، از آزمون مقایسه میانگین چند دامنه دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS-20 انجام شد.

نتایج

در مقایسه میزان آنزیم‌های گوارشی مورد آزمایش خون ماهیان بین گروه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($p < 0.05$). به‌طوری‌که مقدار آن برای ALP به‌صورت ($p = 0.007$, $F = 20.846$)، آنزیم آمیلاز ($p = 0.002$, $F = 37.955$)، آنزیم لیپاز ($p = 0.042$, $F = 7.314$) و همچنین برای آنزیم پروتئاز ($p = 0.033$, $F = 8.424$) در جدول ۱ نشان داده شده است. در این ارتباط میزان تمام آنزیم‌های گوارشی سرم خون ماهیان مورد آزمایش در این تحقیق در تیمارهای ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمار ۳ داشته است و بیشترین میزان این فاکتور در تیمار ۲ و کمترین میزان این آنزیم‌ها در شاهد مشاهده شد (جدول ۱).

در مقایسه میانگین میزان گلوکز خون ماهیان بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد ($p = 0.350$, $F = 1.203$) (جدول ۲).

در مقایسه گروه‌ها با شاهد جهت بررسی میزان پارامترهای بیوشیمیایی خون ماهیان اختلاف معنی‌دار آماری برای لیپید ($p = 0.364$, $F = 1.164$)، کلسترول ($p = 0.598$, $F = 0.650$)، تری‌گلیسرید ($p = 0.247$, $F = 1.575$)، پروتئین کل ($p = 0.137$, $F = 2.232$) مشاهده نشد. همچنین نتایج بررسی اسمولاریته نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نیست ($p > 0.05$)، ($p = 0.001$, $F = 10.027$) (جدول ۲).

مقایسه میزان سدیم ($p = 0.035$, $F = 3.832$)، کلر ($p = 0.001$, $F = 10.027$) و سرم خون ماهیان گروه‌ها با شاهد حاکی از اختلاف معنی‌دار آماری بود ($p < 0.05$)، به‌طوری‌که میزان سدیم و کلر سرم خون ماهیان در تیمار ۳ افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد مشاهده گردید همچنین مقدارشان در سرم خون در تیمارهای ۱ و ۲ نیز به‌لحاظ عملکرد بیش از شاهد بوده است اما اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (جدول ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین میزان آنزیم‌های گوارشی بین تیمارها و گروه شاهد بچه فیل‌ماهی (*H. huso*) تغذیه شده با سطوح مختلف نمک

فاکتور	۰٪ نمک	۳٪ نمک	۶٪ نمک	۹٪ نمک
آلکالین فسفاتاز u/kg	338.0 ± 40.5^c	793.9 ± 187^b	$1211.7 \pm 50.1^{a, 6}$	436.2 ± 186^c
آمیلاز u/kg	90.5 ± 15.0^c	145 ± 6.0^b	176 ± 9.0^a	103.5 ± 6.5^c
لیپید u/kg	278.5 ± 27.5^c	382.5 ± 28.5^b	536.5 ± 61.5^a	358 ± 32^c
پروتئاز u/kg	38.5 ± 2.5^c	54.0 ± 3.5^{ab}	73.5 ± 8.5^a	48.5 ± 3.5^c

* حروف لاتین متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۲- مقایسه میانگین میزان فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون بچه فیل‌ماهی (*H. huso*) تغذیه‌شده با سطوح مختلف نمک.

فاکتور	۰٪ نمک	۳٪ نمک	۶٪ نمک	۳٪ نمک
کلسترول Mg/dl	۵۴/۷۵ ± ۱/۴۹	۵۲/۲۵ ± ۵/۰۲	۴۷ ± ۳/۹۲	۵۳/۲۵ ± ۵/۲۰
تری‌گلیسرید Mg/dl	۳۰۵/۷۵ ± ۱۰/۱۸	۲۶۹/۵۰ ± ۲۹/۵۶	۲۷۰/۲۵ ± ۱۲/۰۹	۳۲۰/۷۵ ± ۲۳/۷۵
توتال پروتئین g/dl	۲/۳۶ ± ۰/۰۵	۳/۱۵ ± ۰/۰۲۲	۳/۱۰ ± ۰/۰۳۴	۳/۰۲ ± ۰/۰۲۸
توتال لیپید mg/dl	۴۰۱ ± ۹/۸۹	۳۶۴ ± ۴۰/۲۴	۳۴۷/۷۵ ± ۱۳/۲۷	۴۰۸ ± ۳۱/۵۲
گلوکز mg/dl	۵۲ ± ۱/۰۸	۴۷/۵ ± ۲/۱۰	۵۱ ± ۳/۹۳	۵۴ ± ۱/۸۷
کلراید mmol/l	۸۸/۶۷ ± ۱/۴۳ ^c	۹۱/۷۵ ± ۱/۹۸ ^{bc}	۹۸/۲۲ ± ۰/۶۷ ^a	۹۵ ± ۰/۵۹ ^b
سدیم mmol/l	۱۳۰/۸۵ ± ۰/۲۵ ^b	۱۳۱/۲۰ ± ۰/۴۸ ^{ab}	۱۳۲ ± ۰/۲۵ ^{ab}	۱۳۳/۰۲ ± ۰/۷۱ ^a
اسمولاریته mmol/l	۲۷۳/۲۵ ± ۱/۷۹	۲۷۴ ± ۲/۱۲	۲۷۷ ± ۶/۰۱	۲۸۱/۲۵ ± ۵/۶۵

*حروف لاتین متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار آماری می‌باشد ($P < 0.05$).

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد استفاده از درصد‌های مختلف نمک (NaCl) در جیره غذایی فیل‌ماهی، بر مقدار هریک از آنزیم‌های گوارشی مورد آزمایش به‌صورت مجزا تأثیرگذار بوده و همچنین فعالیت آنزیم‌های گوارشی را بهبود بخشیده است، اما بر فاکتورهای بیوشیمیایی خون به‌جز اسمولاریته اثر معنی‌داری نداشت. آگاهی از عملکرد دستگاه گوارشی و آنزیم‌های مترشحه از آن می‌تواند به تأمین مواد مغذی با قابلیت هضم و جذب بالاتر در جیره‌غذایی ماهی کمک کند، همچنین آنزیم‌های گوارشی می‌توانند به‌عنوان الگویی مناسب جهت مشخص نمودن عادت غذایی ماهی باشند (Hidalgo et al., 1999; Hofer and Kock, 1989).

بنابر نتایج تحقیق حاضر در انتهای دوره پرورش، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز مشاهده شد. در این ارتباط میزان ALP سرم خون ماهیان در تیمارهای ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمار ۳ داشته است و بیشترین میزان این فاکتور در تیمار ۲ و کمترین میزان ALP در شاهد مشاهده شد. باتوجه به‌وجود آنزیم فسفاتاز قلیایی در روده و عملکرد آن در آخرین مراحل هضم و گوارش، تصور بر این است که این آنزیم علامتی برای جذب موادمغذی باشد (Senger et al., 1994).

در بررسی آپلبام و همکاران (Appelbaum and Arockiaraj, 2008 & 2009)، روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مشخص شد که جیره غذایی حاوی ۱۲٪ نمک روند رشد را بهبود بخشیده، میزان بقاء ماهی را افزایش داده و ضریب تبدیل غذایی نیز بهبود یافته است. اما این محققین اظهار داشتند که افزودن بیش از ۱۲٪ نمک روند رشد را کاهش داده است. باتوجه به نتایج

این محققین نیز می‌توان چنین استنباط نمود که استفاده از نمک در جیره غذایی روی آنزیم‌های روده از جمله فسفاتاز اثر گذاشته و جذب موادمغذی را افزایش داده و در نتیجه باعث بهبود رشد ماهیان مورد تحقیق می‌شود. آلکالین فسفاتاز در غشای سلولی که در آن انتقال فعال صورت می‌گیرد، فعالیت دارد و به‌عنوان یک نشانگر عمده جذب مواد غذایی در نظر گرفته می‌شود. فعالیت آلکالین فسفاتاز اغلب برای ارزیابی عملکرد غشای روده مورد استفاده قرار می‌گیرد (Wahnon *et al.*, 1992).

آنزیم آلکالین فسفاتاز توسط سلول‌های انتروسیت بالغ غشای لبه مسواکی تولید می‌شود که شاخص عملکرد سلول‌های انتروسیت روده است. این سلول‌ها دارای آنزیم‌های گوارشی برای هضم مواد غذایی و پروتئین‌های حامل برای جذب مواد غذایی هضم شده هستند (Krogdahl and Marie, 2005). که در نهایت افزایش عملکرد این سلول‌ها و ترشح بیشتر آنزیم‌ها به‌خصوص آنزیم آلکالین فسفاتاز سبب رشد بیشتر موجود می‌شود (Nya and Austin, 2011). در تحقیق حاضر بالاترین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در جیره غذایی حاوی ۰.۶٪ نمک نشان داده شد. باتوجه به گزارشات فوق و تأثیر مثبت نمک در جیره غذایی بر آنزیم آلکالین فسفاتاز، می‌توان چنین عنوان کرد که کلرید سدیم (NaCl) به‌عنوان یک ماده معدنی ضروری بدن جانداران و به‌خصوص ماهیان یوری هالین می‌تواند کارکرد و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز را بهبود بخشیده و جذب مواد مغذی جیره غذایی را افزایش دهد و سبب رشد بیشتر در ماهیان شود. از سوی دیگر، در مطالعه آپلبام و همکاران (Appelbaum and Arockiaraj, 2008 and 2009)، گزارش شد که ماهیان تغذیه شده با جیره غذایی با سطوح بالای نمک، عملکرد رشد بهتری را نسبت به گروه تغذیه شده با جیره غذایی شاهد داشتند. این موضوع بیانگر وجود رابطه مثبت خطی بین میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز و شاخص‌های رشد است (Yeganeh *et al.*, 2014; Nya and Austin, 2011; Taheri *et al.*, 2011). میزان فعالیت این آنزیم در روده بیانگر وضعیت فعالیت روده است و نقش مهمی در فرآیند معدنی‌سازی اسکلت موجودات آبی فرآیندهای متابولیکی مختلف به‌ویژه در رشد و نمو موجودات زنده دارد (Taheri *et al.*, 2011).

با این تفاسیر، می‌توان آنزیم آلکالین فسفاتاز را بهترین نشانگر آنزیمی شاخص‌های رشد، در پاسخ فیزیولوژیک بدن بچه فیل‌ماهی مورد آزمایش به تغییر در محتوای جیره غذایی، در نظر گرفت. این آزمایش نتایج تأثیر مثبت سطوح مختلف نمک را بر پروتئازها مشخص کرد. در مطالعات مختلف، پروتئازها را از عوامل مهم هضم پروتئین در سیستم گوارش آبزیان عنوان کردند (Yúfera *et al.*, 2013; García and Meilán, 2009; Wu *et al.*, 2004). مقدار و فعالیت آنزیم‌های پروتئازی در گونه‌های مختلف و جیره‌های غذایی با ترکیب مواد مغذی مختلف، متفاوت است (Buddington and Krogdahl, 2004; García and Meilán, 2013). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که طی آزمایش، افزودن

کلرید سدیم اثر معنی‌داری بر فعالیت اختصاصی آنزیم‌های پروتئاز دارد. در این ارتباط میزان آنزیم پروتئاز خون ماهیان در تیمار ۲ افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و تیمار ۳ نشان داده است و بیشترین میزان این فاکتور در تیمار ۲ و کمترین میزان آنزیم پروتئاز در شاهد مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر با تحقیق ناندیشا و همکاران (Nandeesha *et al.*, 2000) مطابقت دارد که عنوان کردند نمک یکی از عناصر معدنی ضروری بدن حیوانات و گیاهان است تا کارکرد نرمال داشته باشند.

قمی و همکاران (Ghomi *et al.*, 2012) گزارش کردند که استفاده از مولتی آنزیم کمین (که حاوی پروتئاز نیز می‌باشد) در جیره فیل‌ماهی افزایش رشد را نشان داد، به طوری که میزان ۲۵۰ میلی‌گرم آنزیم در هر کیلوگرم غذا بیشترین رشد را نشان داد. همچنین بیشترین میزان شاخص رشد ویژه و پایین‌ترین ضریب تبدیل غذایی در این غلظت گزارش شد. باتوجه به این تحقیق، در اثبات عملکرد پروتئاز بر افزایش رشد که ممکن است در پی هضم و جذب بالاتر مواد غذایی توسط این آنزیم باشد، می‌توان چنین نتیجه گرفت که تغییر در جیره غذایی مستقیماً بر آنزیم‌های گوارشی تأثیرگذار بوده و می‌تواند با افزایش مقدار پروتئاز، آمیلاز و سایر پارامترهای مورد آزمایش در تجزیه و جذب مواد مغذی نظیر پروتئین مؤثر باشد که در نهایت منجر به افزایش رشد در ماهی شود.

باتوجه به بالا بودن میزان پروتئین در غذای ماهیان این گونه می‌توان عنوان کرد که حدود ۱۰ درصد از باندهای پپتیدی در معده شکسته شده و و مابقی باندها در روده توسط آنزیم‌های پروتئاز روده‌ای شکسته می‌شود (Ugolev and Kuz'mina, 1994). باتوجه به گزارشات فوق و نتایج تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که در این پژوهش به کاربرد نمک در جیره غذایی فیل‌ماهی میزان ترشح و فعالیت آنزیم گوارشی را افزایش داده و عملکرد بالای این آنزیم‌ها می‌تواند باعث بهبود وضعیت تغذیه‌ای در گونه مورد آزمایش باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که در انتهای دوره پرورش، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی در میزان فعالیت آنزیم آمیلاز نیز وجود دارد. در این ارتباط میزان آنزیم آمیلاز خون ماهیان در تیمار های ۱ و ۲ افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و تیمار ۳ نشان دادند و بیشترین میزان این فاکتور در تیمار ۲ به مقدار 176 ± 90 u/kg و کمترین میزان آنزیم آمیلاز در شاهد به میزان $90/50 \pm 1/50$ مشاهده شد.

به نظر می‌رسد که پرورش گونه‌های یوری‌هالین در آب شیرین با کاهش میزان کلرید سدیم (نمک) از حد مطلوب، ظرفیت جذب مواد مغذی توسط آنزیم‌های گوارشی کاهش یابد. همچنین با تغییر نسبت کلرید سدیم (نمک) در جیره غذایی بر فعالیت این آنزیم‌ها تأثیر داشته و حد مناسب نمک در جیره غذایی می‌تواند فعالیت آنزیم‌های روده‌ای را بهبود بخشد.

نتایج حاصل از فعالیت آنزیم لیپاز در ماهیان تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی نمک گروه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌دار آماری نشان داد. در این ارتباط میزان آنزیم لیپاز خون ماهیان نیز مانند سایر آنزیم‌های گوارشی مورد آزمایش در این تحقیق در تیمار ۲ افزایش معنی‌داری را نسبت به شاهد و تیمار ۳ داشته و بیشترین میزان این فاکتور در تیمار ۲ و کمترین آن در شاهد مشاهده شد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد استفاده از نمک در جیره فیل‌ماهی، تفاوت معنی‌داری در میزان فاکتورهای بیوشیمیایی خون (گلوکز، پروتئین کل، کلسترول، تری‌گلیسیرید، چربی کل) ایجاد نمود. اما اختلاف معنی‌دار در کلر و سدیم در تیمار ۳ و افزایش کلر در تیمار ۲ مشاهده شد. به نظر می‌رسد تغییرات کلر و سدیم در خون ماهیان تغذیه‌شده با جیره حاوی سطوح مختلف نمک، نشان‌دهنده تطابق و سازگاری این ماهی یوری‌هالین با شرایط تغییر شوری در غذا باشد و شاخص فیزیولوژیکی این سازگاری را در بچه فیل‌ماهیان نشان می‌دهد چراکه هیچ تلفاتی در این تحقیق مشاهده نشد. همچنین در میزان اسمولاریته تفاوت معنی‌داری وجود نداشت که این مسئله می‌تواند به دلیل مقاوم بودن این ماهی‌ها به تغییرات شوری باشد. این ماهی می‌تواند اسمولاریته خون خود را در محدوده وسیعی از شوری در حد ثابت نگه دارد.

کاهش میزان پروتئین کل می‌تواند به دلیل اشکال در جذب و هضم یک پروتئین یا به دلیل کاهش میزان آلبومین در بیماری‌هایی مانند بیماری‌های کبدی، کلیوی، عفونت‌ها و یا افزایش آن در مواردی مانند پاراپروتئینی، لنفوم هوچکین و لوسمی‌ها دیده می‌شود (Tietz, 1986). به نظر می‌رسد عامل اصلی عدم تغییرات معنی‌دار در میزان غلظت پروتئین کل سرم خون ماهیان مورد مطالعه در ارتباط با عدم اثر سو نمک بر اندامهای داخلی و همچنین عدم اختلال در جذب و هضم پروتئینها می‌باشد.

کلسترول نیز جزء اصلی ساختمان غشاهای سلولی و پیش‌سازی برای هورمون‌های استروئیدی و اسیدهای صفراوی است و در سلول‌ها سنتز می‌شود و از طریق مواد غذایی نیز جذب بدن می‌شود. وقتی بر اثر استرس، کورتیزول افزایش می‌یابد در واقع مقادیر زیادی از کلسترول صرف ساخت کورتیزول می‌شود (Kazemi, 2010). با توجه به نتایج و عدم اختلاف معنی‌دار در مقدار کلسترول در بین تیمارها و شاهد می‌توان چنین استنباط نمود که تغییر جیره غذایی با استفاده از سطوح مختلف نمک، هیچ استرس و اختلالی را ایجاد ننموده تا باعث کاهش سطح کلسترول یا حتی افزایش آن گردد، چرا که افزایش کلسترول و چربی کل در خون نشان‌دهنده ایجاد اختلال در مکانیسم انتقال کلسترول و برداشت آن از بافت‌ها و تخریب کارآیی فیزیولوژیکی کبد می‌باشد (Zhou et al., 2010). در مورد تری‌گلیسیرید هم به نظر می‌رسد که نبودن اختلاف معنی‌دار در مقدار گلیسیرید ماهیان مورد آزمایش به دلیل عدم ایجاد اختلال جیره حاوی نمک در سیستم گوارش و روند متابولیسم باشد.

نتایج تحقیق حاضر برای مقایسه گلوکز بین تیمارها و شاهد عدم اختلاف معنی‌دار را نشان داد. مقدار گلوکز خون نیز شاخص مناسبی برای پاسخ‌های ثانویه استرسی ماهی به شرایط نامناسب زیستی است (Yousefian *et al.*, 2011). همچنین گلوکز اصلی‌ترین ماده حاصل از متابولیسم مواد کربوهیدراتی است (Mohammadi Zarejabad *et al.*, 2010). در نتیجه به نظر می‌رسد که عدم تغییر در میزان گلوکز به دلیل عدم اثر سو نمک در سوخت و ساز بچه فیل‌ماهیان تغذیه‌شده با جیره غذایی حاوی نمک می‌باشد.

به‌طور کلی نتایج این تحقیق بیانگر این مسئله بود که استفاده از نمک در جیره غذایی فیل‌ماهی کارآیی جیره را افزایش داده و علاوه بر اینکه سبب بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی شده است. باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق، به دلیل عدم ایجاد اختلال در پارامترهای بیوشیمیایی و عدم مشاهده تلفات و عوارض جانبی، استفاده از غلظت ۶ درصد نمک در جیره فیل‌ماهی توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از آقای مهندس پوردهقانی کارشناس ارشد موسسه تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دریای خزر رشت به سبب مساعدت‌های صادقانه و حمایت‌های بی‌دریغشان و نیز در اختیار گذاشتن امکانات مزرعه خاویار طلایی دیلم واقع در سد سنگر رشت، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

- Akrami R., Ghelichi A., Ahmadifar E. 2011. Effect of dietary prebiotic inulin on hematological and biochemical parameters of cultured juvenile beluga (*Huso huso*). Journal of Veterinary Research, 66: 131-136. (In Persian).
- Appelbaum S., Arockiaraj A.J. 2008. Israeli researchers test viability of using brackish inland waters for rearing gilthead sea bream. Hatchery international, 9(4): 22-23.
- Appelbaum S., Arockiaraj A.J. 2009. Cultivation of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in low salinity inland brackish geothermal water. AACL Bioflux, 2 (2): 197-203.
- Asgari R., Rafiee Gh., Eagderi S., Shahrooz R., Pourbagher H., Agh, N., Gisbert E. 2013. Ontogeny of the digestive system in hatchery produced beluga (*Huso huso* Linnaeus, 1758); a comparative study between beluga and genus *Acipenser*. Aquaculture Nutrition, 416-417: 33-40.
- Babaei S.S., Abedian Kenari A., Rajabmohammad Nazari R.M., Gisbert E. 2011. Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. Aquaculture, 318: 138-144.

- Baqai Bambaridi M., Faghani Langroudi H., Toloui M., Samii Ardakani M. 2013. The effect of probiotic bectocetal on the biological factors of baby fila (*Huso huso*). Quarterly Journal of Applied and Aquaculture Sciences, 1(1): 21-34.
- Buddington R.K., Doroshov S.I. 1986. Digestive enzyme complement of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 83: 561-567.
- Buddington R.K., Krogdahl A. 2004. Hormonal regulation of the fish gastrointestinal tract. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: enzymes in plasma at different measuring temperatures, 38: 555-561.
- Bullis R.A. 1993. Clinical Photology of Temperate Freshwater and Estuarine Fishes. In: Stoskopf MK (Eds.). Fish Medicine, Stoskopf, Philadelphia, USA, pp: 232-239.
- Burr G., Gatlin D., Ricke S. 2005. Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. Journal of the World Aquaculture Society, 36(4): 425-436.
- Cahu C., Zambonino Infante J., Quazuguel P, Le Gall M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture, 171: 109-119.
- Carmona R., Domezain A., Garcia-Gallego M., Antonio Hernando J., Rodrigues F., Ruiz-Rejon M. 2009. Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons, Springer publication, Netherlands. 476 P.
- Doumas B.T., Bayse D.D., Carter R.J., Peters T.J.R., Schaffer R.A. 1981. Candidate reference method for determination of total protein in serum. Development and Validation. Clinical Chemistry, 10: 42-50.
- Eroldoğan O. T., Kumlu M., Aktaş M. 2004. Optimum feeding rate for European sea bass reared in seawater and freshwater. Aquaculture, 231: 501-515.
- Firouzbaksh F., Noori F., Khalesi M., Jani-Khalili K. 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. Journal of Fish Physiology and Biochemistry, 37: 833-842.
- Furne J., Saeed A., Levitt M.D. 2008. Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 295(5): 1479-1485.
- García-Meilán I., Valentín J., Fontanillas R., Gallardo M. 2013. Different protein to energy ratio diets for gilthead sea bream (*Sparus aurata*): Effects on digestive and absorptive processes. Aquaculture, 412: 1-7.
- Ghomi M.R., Shahriari R., Langroudi H.F., Nikoo M., Von Elert E. 2012. Effects of exogenous dietary enzyme on growth, body composition, and fatty acid profiles of cultured great sturgeon *Huso huso* fingerlings. Aquaculture International, 20: 249-254.

- Gisbert E., Sarasquete M.C., Williot P., Castello-Orvay F. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) during early ontogeny. *Journal of Fish Biology*, 55: 596-616.
- Harpaz S., Hakim T.Y., Slosman T., Eroldoğan O.T. 2005. Effects of adding salt to the diet of Asian sea bass *Lates calcarifer* reared in fresh or salt water recirculating tanks, on growth and brush border enzyme activity. *Aquaculture*, 248: 315-324.
- Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
- Hofer R., Kock G. 1989. Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. *Polish Archive Hydrobiology*, 36: 439-441.
- Hoseinifar H., Mirvaghefi A., Merrifield D.L. 2011. The effects of dietary inactive brewer's yeast *Saccharomyces uvarum* var. *ellipsoideus* on the growth, physiological responses and gut microbiota of juvenile beluga (*Huso huso*). *Aquaculture*, 318: 90-94.
- Kazemi R., Pourdehghani M., Yarmohammadi M., Yosefi Jourdehi A., Nasri Tajan, M. 2010. Cardiovascular System Physiology of Aquatic Animals and Applied Techniques of Fish Haematology. Bazargan Publicatio, Rasht, Iran. 194 P. (In Persian).
- Kiffer J.D., Wakefield A.M., Litvak M.K. 2001. Juvenile exhibit reduced physiological response exercise. *Journal of Experimental Biology*, 204: 4281-4289.
- Krogdahl A., Marie Bakke-McKellep A. 2005. Fasting and refeeding cause rapid changes in intestinal tissue mass and digestive enzyme capacities of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141: 450-460.
- Kuz'mina V., Shekovtsova N., Bolobonina V. 2010. Activity dynamics of proteinases and glycosidases of fish chyme with exposure in fresh and brackish water. *Biology Bulletin*, 37: 605-611.
- Martinez F. H., Garcia-Riera M.P., Canteras M., De-costa J., Camora S. 1994. Blood Parameters in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*): Smillataneous influence of various factors. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 101: 95-100.
- Martins M.L., Nomura D.T., Myiaazaki D.M.Y., Pilarshy F., Ribeiro K., Castro M.P., Campos CF.M. 2004. Physiological and haematological response of *orochomis niloticus* exposed to single and consecutive stress of capture. *Acta Scientiarum, Animal Sciences*, 26: 449-456.
- Mohammadi Zarejabad A., Sudagar S., Pouralimotlagh S., Darvish Bastami K. 2010. Effects of rear temperature on hermatological and biochemical parameters of great sturgeon (*Huso huso* Linnaeus, 1758) juvenile. *Comparative Clinical Pathology*, 19: 367-371.

- Mohseni M., Ozorio R.O.A., Pourkazemi M., Bai S.C. 2008. Effects of dietary Lcarnitine supplements on growth and body in beluga sturgeon (*Huso huso*) juveniles. *Journal of Applied Ichthyology*, 24(6): 646-649.
- Nandeesh M.C., Gangadhar B., Keshavanath P., Varghese T.J. 2000. Effect of dietary sodium chloride supplementation on growth, biochemical composition and digestive enzyme activity of young *Cyprinus carpio* (Linn.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.). *Journal of Aquaculture in the Tropics*, 15: 135-144.
- Nayak S.K. 2010. Probitics and immunity: a fish perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 29(1): 2-14.
- Noori F., Van Stappen G., Sorgeloos P. 2011. Preliminary study on the activity of protease enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus* Borodin, 1897) larvae in response to different diets: effects on growth and survival. *Aquaculture Research*, 43: 198-207.
- Nya E.J., Austin B. 2011. Dietary modulation of digestive enzymes by the administration of feed additives to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*) Walbaum. *Aquaculture Nutrition*, 17: 459-466.
- Rubino V.C., Sanchez Vazquez F.J., Madrid J.A. 2005. Effect of salinity on food intake and macronutrient selection in European sea bass. *Physiology and Behavior*, 85(3): 333-339.
- Salman N.A., Eddy F.B. 1988. Effects of dietary sodium chloride, on growth, food intake and conversion efficiency in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Aquaculture* 70: 131-144.
- Senger H., Storch V., Reinecke M., Kloas W., Hanke W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximum*. *Marine Biology*, 119: 471-486.
- Taheri A., Abedian Kenari A., Hallaj R., Habibi Rezaei M., Motamed Zadegan A.S., Owji Fard U. 2011. Effect of different levels of hydrolysis protein on digestive enzymes of rainbow trout alvins (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Pathobiology, Scientific-Proceedings*, 8(4): 674-665. (In Persian).
- Thrall M.A., Baker D.C., Campbell T.W., Denicola, D., Fettman M.J., Lassen E.D., Re-bar A., Weiser G. 2004. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott Williams and Wikins, USA. 618 P.
- Tietz N.W. 1986. *Textbook of Clinical Chemistry*, W.B., Saunders, Philadelphia, USA. 579 P.
- Ueberschar B. 1993. Measurement of Proteolytic Enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Walter BT, Fyhn HJ (Eds.). *Physiological and biochemical aspects of fish development*. University of Bergen, Norway, pp: 233-239.
- Ugolev A.M., Kuz'mina V.V. 1994. Fish enterocyte hydrolases. *Nutrition adaptations. Comparative Biochemistry and physiology*, 107: 187-93.

- Wahnon R., Coogan V., Mokady S. 1992. Dietary fish oil modulates the alkaline phosphatase activity and not the fluidity of rat intestinal microvillus membrane. *Journal of Nutrition*, 122(5): 1077-1084.
- Worthington C.C. 1991. Worthington enzyme manual related Biochemical. 3rd Edition. Freehold, New Jersey, USA. 346 P.
- Wu T., Sun L.C., Du C.H., Cai Q.F., Zhang Q.B., Su W.J., Cao M.J. 2009. Identification of pepsinogens and pepsins from the stomach of European eel (*Anguilla anguilla*). *Food Chemistry*, 115: 137-42.
- Yeganeh S., Ramezanzadeh F., Jani-Khalili K., Babaei S.S. 2014. Investigating the effects of light period on the activity of some gastrointestinal and intestinal digestive enzymes in larvae and teenagers rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Science*, 23(2): 1-14. (In Persian).
- Yooneszadeh M., Bahmani M., Kazemi R., Pourdehghani M., Feizbaksh H. 2009. The survey of seasonal changes of cortisol, Glucose and Ionic in Farmed female Stellate Sturgeon, *Acipenser stellatus*. *Journal of Fisheries*, 4: 1-11.
- Yousefian M., Sheikholeslami Amiri M., Kor D. 2011. Serum Biochemical Parameter of Male, Immature and Female Persian Sturgeon (*Acipenser Persicus*). *Fisheries Journal, Islamic Azad University, Azadshahr Branch*, 6(4): 9-14. (In Persian).
- Yufera M., Darias M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268: 53-63.
- Yúfera M., Fernández Díaz C., Vidaurreta A., Cara J.B., Moyano F.J. 2004. Gastrointestinal pH development of the acid digestion in larvae in earlyjuveniles of *Sparus aurata* (Pisces: Teleostei). *Marine Biology* 144(5): 863-869.
- Zambonino-Infante J., Gisbert E., Sarasquete C., Navarro I., Gutiérrez J., Cahu C.L. 2009. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino JEO, Bureau D, Kapoor BG (Eds.). *Feeding and Digestive Functions of Fish*. Science Publishers, Incorporation, Enfield, USA, pp: 277-344.
- Zaugg W.S., Roley D.D., Prentice E.F., Gores K.X. 1983. Increased seawater survival and contribution to the fishery of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by supplemental dietary salt. *Aquaculture*, 32(1): 183-188.
- Zhou F.J., Xu R., Ma J., Xu Z. 2010. Quantitative l-lysine requirement of juvenile black sea bream (*Sparus macrocephalus*). *Aquaculture Nutrition*, 16: 194-204.
- Zoltowska K., Kolman R., Lopienska E., Kolman H. 1999. Activity of digestive enzymes in Siberian sturgeon juveniles (*Acipenser baeri* Brandt), a preliminary study. *Archives of Polish Fisheries*, 7: 201-211.