تغــذیه آبزیــان
سال اول، شماره اول،
بهار و تابستان ۱۳۹۴

روند تغییرات فعالیت پروتئازی دستگاه گوارشی فیل ماهی (*Huso huso*) در طی دوران تکوین لاروی

رضا عسگری[۱]، سهیل ایگدری[۱*]، غلامرضا رفیعی[۱]، هادی پورباقر[۱]، ناصرآق[۲]
۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، صندوق پستی ۴۳۱۴، ایران
۲- پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۴/۳/۱۰

چکیده
در این تحقیق روند تغییرات فعالیت پروتئازی معده (پپسین) و لوزالمعده (تریپسین و کیموتریپسین) از زمان تخم‌گشایی تا روز پنجاهم پس از تخم‌گشایی در نوزاد فیل ماهی (*Huso huso*) مطالعه شد. نوزادان فیل ماهی تازه تخم‌گشایی شده از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی (گرگان، ایران) تهیه شدند. نمونه برداری بلافاصله پس از تخم‌گشایی و در روزهای ۷، ۱۴، ۱۸، ۲۳، ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۵۰ پس از تخم‌گشایی انجام شد. نتایج نشان داد که نوزاد فیل ماهی در زمان شروع تغذیه خارجی دارای غدد معدی فعال، با توجه به افزایش فعالیت پروتئازی معده می‌باشد، در حالی که فعالیت پروتئازی لوزالمعده پس از جذب کیسه زرده کاهش می‌یابد که نشان دهنده اهمیت آنزیم‌های پروتئازی لوزالمعده در مراحل جذب کیسه زرده است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نوزاد فیل ماهی بلافاصله پس از اتمام کیسه زرده دارای دستگاه گوارش تکامل یافته برای هضم پروتئازی غذای دستی است.

کلمات کلیدی: فیل ماهی (*Huso huso*)، فعالیت پروتئازی، تکوین

* نویسنده مسئول: soheil.eagderi@ut.ac.ir

مقدمه

به طور سنتی، پرورش نوزاد و بچه ماهی خاویاری با استفاده از غذای زنده انجام می‌شود (Gisbert and Williot, 2002) که تولید غذای زنده و غنی‌سازی آن مستلزم صرف هزینه زیاد، فضای کافی، نیروی کارگری و متخصص زیادی است. به علاوه محتوای تغذیه‌ای غذای زنده اغلب برای مرحله نوزادی و بچه ماهی کافی نیست و از این رو در طی بیست سال اخیر، مطالعه‌های متعددی در زمینه امکان استفاده از غذاهای فرموله شده و غذای زنده غنی سازی شده در پرورش نوزاد ماهیان خاویاری از زمان شروع تغذیه فعال انجام شده است (Buddington and Doroshov, 1984; Dabrowski et al. 1985; Bardi et al. 1998; Gisbert and Doroshov, 2006; Agh et al. 2012).

شناخت شکل‌گیری ساختار تغذیه‌ای ماهیان خاویاری به همراه آغاز فعالیت دستگاه گوارش می‌تواند به درک بهتر نیازهای تغذیه‌ای این گونه کمک کند، چرا که میزان کارایی غذا به ظرفیت فیزیولوژیک ماهی در هضم و جذب مواد غذایی بستگی دارد (Furne et al., 2008). مکانیسم‌های هضم و جذب در نوزاد ماهیان در طی دو دهه اخیر مورد مطالعه قرار گرفته است (Babaei et al. 2011). مانند اکثر ماهیان، نوزاد ماهیان خاویاری در زمان تخم‌گشایی به طور کامل تکوین نیافته و این امر هضم و جذب بهینه غذای خارجی را تا زمان تکوین و تمایز کامل تحت تاثیر قرار می‌دهد (Gisbert and Sarasquete, 2000). تکوین آنزیم‌های گوارشی منعکس کننده میزان تکوین دستگاه گوارش و ظرفیت هضمی جانوران است و می‌تواند به عنوان شاخصی از وضعیت تغذیه‌ای در مراحل ابتدایی زندگی (Yúfera and Darias, 2007) و در جهت شناخت نیازهای تغذیه‌ا (Twining et al. 1983) به کار رود. بنابراین تجزیه و تحلیل تغییرات تکوینی در طی مراحل ابتدایی زندگی ماهی برای طراحی استراتژی تغذیه‌ای و فرمول بندی غذای خشک ضروری به نظر می‌رسد (Verreth and Segner, 1995).

فیل ماهی (*Huso 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 گران‌بها است. با وجود اینکه تولید نوزاد و بچه ماهی در فیل ماهی نسبت به دیگر ماهیان خاویاری کشور از میزان موفقیت بالاتری برخوردار است، ولی هنوز درصد تلفات بسیار بالا (۸۰-۵۰٪) بوده (Asgari et al. 2013) و تا رسیدن به سطح تولید اقتصادی فاصله زیادی وجود دارد. بنابراین شناخت میزان فعالیت آنزیمی دستگاه گوارش به عنوان یکی از شاخص‌های مفید در تدوین استراتژی تغذیه‌ای، می‌تواند در درک علل تلفات بالا و بهبود بیوتکنیک اقتصادی‌تر پرورش این گونه در مراحل نوزادی و بچه ماهی کمک کند.

تاکنون مطالعات متعددی در خصوص فعالیت آنزیم‌های گوارشی در ماهیان استخوانی دریایی و آب شیرین انجام شده است (Zambonino-Infante et al. 2009; Holt, 2011). با این وجود، مطالعات بسیار کمی در خصوص فعالیت آنزیم‌های گوارشی ماهیان خاویاری انجام شده و از آن جمله می‌توان به مطالعه آنزیم‌های گوارشی در تاسماهی سفید (*Acipenser transmontanus*) (Buddington and Droshov, 1986)، بستر (Timeiko and Bondarenko, 1988)، تاسماهی سیبری (*A. baerii*) (Gisbert et al. 1999; Zoltowska et al. 1999) و نیز بررسی فعالیت آنزیمی نوزاد قره برون (*A. persicus*) (Babaei et al. 2011; Noori et al. 2011) اشاره کرد.

از این رو این مطالعه با هدف توضیح روند تکوین فعالیت آنزیم‌های پروتئازی معده (پپسین) و لوزالمعده (تریپسین و کموتریپسین) از زمان تخم‌گشایی تا زمان رهاسازی این ماهی به استخرهای خاکی (روز پنجاهم) جهت فراهم آوردن اطلاعات مناسب برای بهبود بیوتکنیک پرورش این ماهی (فرمول بندی غذا و افزایش امنیت تولید بچه ماهی و انگشت قد مورد نیاز برای پرواربندی) با توجه به صنعت رو به توسعه پرورش این گونه به اجرا درآمد. شناخت شکل‌گیری ساختار تغذیه‌ای ماهیان خاویاری به همراه آغاز فعالیت دستگاه گوارش می تواند به درک بهتر نیازهای تغذیه‌ای این گونه کمک کند.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورشی

نوزادان مورد استفاده در این تحقیق حاصل تکثیر مصنوعی مولدین فیل ماهی با هورمون $LHRHa_2$ با نسبت جنسی سه ماهی ماده به یک ماهی نر، از مرکز

تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید مرجانی گرگان تهیه شدند. برای مرحله پرورش تعداد ۱۸۰۰ عدد (حدود ۳۳ گرم) لارو تازه تخم‌گشایی شده با میانگین وزنی و طولی ۵/ ۰± ۱۱ میلی‌گرم و ۰/۰۱ ± ۱۲/۱ میلی‌متر در ۱۵ مخزن پرورشی ۵۰۰ لیتری انتقال یافتند. در طول دوره پرورش، نوزادها از نظر شدت نور، حجم، منبع و دبی آب و تغذیه در شرایط یکسان پرورشی قرار داشتند. همچنین منبع و دبی آب با استفاده از مخلوط آب چاه و رودخانه به ترتیب با دبی ۴۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه و ۲۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه تامین شد. دما، اکسیژن و pH در تمام تیمارها یکسان بود. میزان pH آب در حدود ۷/۴-۷/۱ و نوسانات حداقل و حداکثر دمای آب به ترتیب ۱۴/۵°C و ۱۸/۵°C توسط دستگاه pH 330i/set, Germany و حداقل و حداکثر اکسیژن آب به ترتیب ۷/۹ ppm و ۹/۳ ppm و توسط دستگاه (Oxi 323-B/set, Germany) ثبت شد. نوزادان از روز ۸ تا روز ۱۲ پس از تخم‌گشایی با استفاده از ناپلیوس های آرتمیا با تراکم ۵۰۰ عدد در روز برای هر نوزاد تغذیه شدند و سپس تا روز ۲۵ از مخلوط آرتمیا و دافنی تا ۵۰٪ زیتوده و از روز ۲۵ تا روز ۳۰ پس از تخم‌گشایی از مخلوط غذای کنسانتره بیومار با قطر ۰/۵ میلی‌متر و شیرونومیده چرخ شده به صورت خمیری به میزان ۳۰٪ زیتوده استفاده شد. از روز ۳۰ پس از تخم‌گشایی تا پایان آزمایش از غذای کنسانتره بیومار با قطر ۰/۸ میلی‌متر به صورت خشک استفاده شد. تعداد دفعات غذادهی در کل دوره ۶-۴ بار در روز در نظر گرفته شد (شکل ۱).

نمونه برداری

نمونه‌برداری از نوزادان پرورشی برای سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، بلافاصله پس از تخم‌گشایی و در روزهای هفتم، ۱۴ و ۱۸ به میزان ۷۰ عدد نوزاد و در روزهای ۲۳، ۲۸، ۳۵، ۴۲ و ۵۰ پس از تخم‌گشایی به میزان ۲۰ عدد بچه ماهی انجام شد. در طی شب هیچ گونه تغذیه‌ای انجام نشد و نمونه‌گیری در اوایل صبح قبل از شروع تغذیه برای کاهش خطای تاثیر محتوی آنزیمی غذای زنده انجام شد (Kolkovski, 2001). نمونه‌ها سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. تا روز نوزدهم رشد کل توده نوزادان و پس از آن، فقط دستگاه گوارش جدا و تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در نیتروژن مایع نگهداری شدند.

روش سنجش فعالیت آنزیمی

به دلیل کوچکی ماهی در زمان لاروی تا روز ۱۹ میزان فعالیت آنزیمی با هموژن کردن کل لاروهای نمونه‌گیری شده و پس از آن فقط دستگاه گوارش جدا و با ۹ میلی لیتر بافر (Tris–HCl buffer with 0.1 100 mM mM EDTA and 0.1% Triton X-100, pH 7.8,) مخلوط و سپس با هموژنایزر مدل Polytron PT 1300 D سه بار و هر بار به مدت ۳۰ ثانیه همگن شدند. مخلوط آماده شده با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (Sigma 2-16 k refrigerated centrifuge) شده و مایع فوقانی تا زمان اندازه‌گیری فعالیت آنزیمی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

فعالیت آنزیم پپسین بر اساس روش Rungruangsak و Utne (۱۹۸۱) سنجش شد. در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۲۰۰ میکرولیتر کازئین ۱ ٪ (در HCl ۶۰ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. واکنش با اضافه کردن یک میلی‌لیتر TCA ۵٪ متوقف شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. در ادامه محلول آماده شده به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ۰/۵ میکرولیتر از محلول رویی برداشته شد و با یک میلی‌لیتر NaOH نیم مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر معرف Folin-Ciocalteu مخلوط و در نهایت پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد در طول موج ۷۲۰ نانومتر میزان جذب نوری قرائت و با منحنی استاندارد L-Tyrosine مقایسه شد. میزان فعالیت آنزیم پپسین به صورت ماکرومول تیروزین/ ساعت/ میلی‌گرم پروتئین بیان شد.

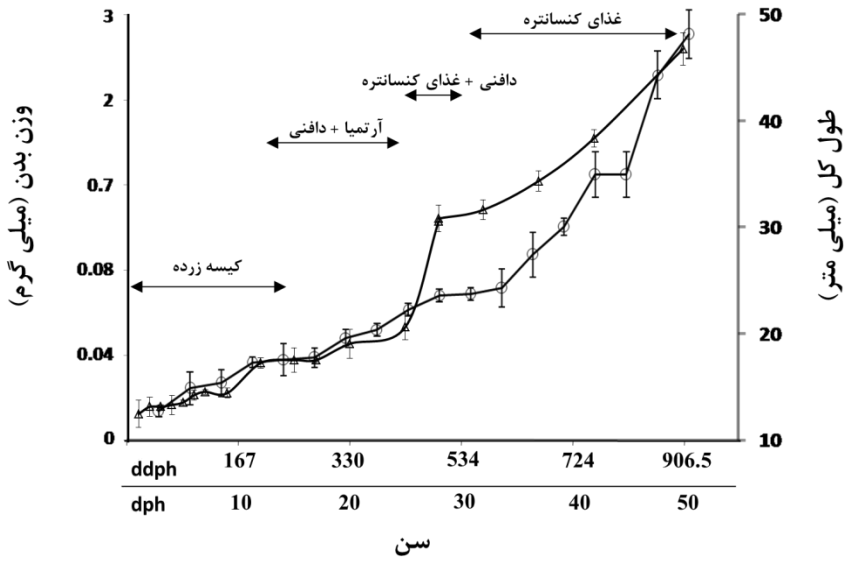
فعالیت آنزیم تریپسین با ماده benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) به عنوان سوبسترا سنجش شد (Erlanger et al. 1961). در ابتدا میزان ۴۳/۵ میلی گرم BAPNA در یک میلی لیتر Dimethylsulphoxide (DMSO) حل شد و سپس با محلول بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار ($CaCl_2.2H_2O$)

۰/۰۲ مولار، pH=۷/۵) به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. در ادامه ۲۵ ماکرولیتر عصاره آنزیمی با ۱/۲۵ سوبسترای آماده شده (BAPNA) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گوبه شده و سپس واکنش با اضافه نمودن ۱ میلی لیتر اسید استیک ۳۰٪ متوقف و میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. میزان آنزیم تریپسین از طریق فرمول زیر محاسبه شد:

(میلی گرم پروتئین در مخلوط واکنش/۸۸۰۰)/(میلی‌لیتر مخلوط واکنش × ۱۰۰۰ × میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر) = میلی گرم پروتئین/ واحد

میزان فعالیت آنزیم کموتریپسین نیز با استفاده از ماده Succinyl-$(Ala)_2$ - Pro -Phe -*p* -Nitroanilide (SAPNA) ۰/۱ میلی مولار در محلول بافر Tris-HCl ۰/۰۵ مولار ($CaCl_2.2H_2O$ ۰/۰۲ مولار، pH=۷/۵) به عنوان سوبسترا سنجش شد (Erlanger et al., 1961). مخلوط به دست آمده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه انکوباسیون شد و بلافاصله میزان جذب نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر قرائت و میزان آنزیم کموتریپسین با استفاده از فرمول ذکر شده جهت محاسبه میزان آنزیم تریپسین، محاسبه شد.

میزان پروتئین کل نیز از روش Bradford (۱۹۷۶) با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد محاسبه شد. تمامی فعالیت‌های آنزیمی در سه تکرار مورد سنجش قرار گرفت.



شکل ۱- وزن (Δ) و طول کل (○) لارو و بچه فیل ماهی (*Huso huso*) در طول آزمایش (میانگین ± انحراف معیار).

آنالیز آماری

داده‌ها قبل از مقایسه آماری برای بررسی نرمال بودن و همگنی به ترتیب با تست Kolmogorov–Smirnov و Bartlett's مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده اند. میانگین میزان فعالیت آنزیمی بین زمان های نمونه برداری (روز درجه) به وسیله آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) در سطح معنی داری ۵٪ مورد مقایسه قرار گرفتند (SPSS version 15; IBM, Somers, New York, USA).

نتـــایج

فعالیت پروتئازی معدی

نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیم پپسین در مرحله لاروی فیل ماهی از زمان تخم‌گشایی تا باز شدن دهان و شروع تغذیه خارجی و اتمام کیسه زرده به سرعت افزایش

و سپس تا روز بیست و سوم ثابت و پس از آن مجدداً به تدریج افزایش می یابد (جدول ۱).

فعالیت پروتئازی لوزالمعده

میزان فعالیت آنزیم تریپسین بلافاصله پس از تخم‌گشایی تا اتمام کیسه زرده با شیب تندی افزایش یافت و سپس ناگهان کاهش و دوباره از روز بیست و هشتم میزان آن افزایش یافته و در انتهای آزمایش ثابت شد (جدول ۱). میزان آنزیم کموتریپسین بلافاصله پس از تخم‌گشایی تا زمان آغاز تغذیه مخلوط کاهش و پس از آن تا زمان اتمام کیسه زرده افزایش و مجدداً تا روز بیست و سوم میزان آن کاهش یافت. از روز بیست و سوم به بعد میزان آن به صورت نوسانی بود، ولی در انتهای آزمایش به شدت افزایش یافت (جدول ۱).

جدول ۱- روند تغییرات فعالیت پروتئازی (u/mg protein) دستگاه گوارش فیل ماهی (*Huso huso*) از زمان تخم‌گشایی تا ۵۰ روزگی (P≤۰/۰۵) (میانگین ± انحراف معیار).

سن	فعالیت پروتئازی معده (u/mg protein)	فعالیت پروتئازی پانکراس (u/mg protein)	
روز (درجه-روز)	پپسین	تریپسین	کموتریپسین
تخم گشایی (۰)	۱/۰۸ ± ۰/۵۲^{d}	۰/۰۷ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۱۲ ± ۰/ ۰۱^{b}
۷ (۱۱۱/۳)	۳/۹۲ ± ۰/۴۴^{c}	۰/۰۸ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۰۹ ± ۰/۰۱^{bc}
۱۴ (۲۳۵/۲)	۶/۰۳ ± ۰/۹۴^{b}	۰/۱۲ ± ۰/۰۱^{a}	۰/۱۰ ± ۰/۰۱^{b}
۱۸ (۳۰۶)	۵/۸۸ ± ۰/۴۳^{b}	۰/۰۴ ±۰/۰۱^{cd}	۰/۰۷ ± ۰/۰۱^{c}
۲۳ (۴۰۰/۲)	۶/۰۷ ± ۰/۵۵^{b}	۰/۰۳ ± ۰/۰۱^{d}	۰/۰۳ ± ۰/۰۱^{d}
۲۸ (۴۹۰)	۶/۹۰ ± ۰/۶۴ ^{b}	۰/۰۳ ± ۰/۰۱^{d}	۰/۰۶ ± ۰/۰۱^{c}
۳۵ (۶۱۲/۵)	۸/۵۷ ± ۰/۹۱^{ab}	۰/۰۴ ± ۰/۰۱^{c}	۰/۰۳ ± ۰/۰۱^{d}
۴۲ (۷۵۶)	۹/۴۲ ± ۰/۷۵^{a}	۰/۰۸ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۰۶ ± ۰/۰۱^{c}
۵۰ (۹۰۶/۵)	۹/۳۱ ± ۰/۹۶^{a}	۰/۰۸ ± ۰/۰۱^{b}	۰/۲۰ ± ۰/۰۱^{a}

بحث

بهبود غذای فرموله شده برای جایگزینی غذای زنده در پرورش لارو آبزیان نیازمند شناخت کافی از فرآیند هضم در طی مراحل اولیه تکوین لاروی می باشد (Cahu and Zambonino-Infante, 1997; Lazo et al. 2000). پایین بودن میزان موفقیت در جایگزینی کامل غذای زنده با غذای دستی در شروع تغذیه آغازین، نشانه عدم تکوین کامل دستگاه گوارش و پایین بودن ظرفیت هضم پس از تخم‌گشایی و همچنین عدم وجود دانش کافی از این دو عامل در بسیاری از لاروهای آبزیان پرورشی است (Lauf and Hoffer, 1984; Munilla-Moran et al. 1990; Holt, 1993). در این خصوص تاکنون مطالعات بسیاری در ماهیان استخوانی به ویژه ماهیان دریایی انجام شده است که منجر این امر نشان می‌دهد که ترشح این آنزیم‌ها در روزهای ابتدایی تکوین تحت تاثیر تغذیه نیست و به وسیله به کاهش قابل توجه استفاده از غذای زنده و فرمول‌بندی غذاهای مناسب با توجه به ظرفیت هضمی آبزی مورد پرورش شده است (Holt, 2011). با وجود این، مطالعات بسیار کمی در خصوص ماهیان خاویاری انجام شده است (Buddington and Doroshov, 1984; Dabrowski et al. 1985; Bardi et al., 1998; Gisbert and Doroshov, 2006; Ebrahimi, 2006; Babaei et al. 2011; Agh et al. 2011).

با توجه به روند روبه رشد پرورش این ماهیان، لزوم مطالعات بیشتر در این خصوص و شناخت ظرفیت هضمی آنها از طریق بررسی آنزیم‌های گوارشی در دوران لاروی ضروری به نظر می‌رسد.

نتایج این تحقیق نشان داد که تمامی آنزیم‌های مورد مطالعه بلافاصله پس از تخم‌گشایی تشخیص داده شدند و فرآیندهای ژنتیکی تنظیم می‌شود (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). به علاوه نقش موثر این

آنزیم‌ها در هضم لایه کوریون جنینی در طی فرآیند تخم‌گشایی به اثبات رسیده است (Dettlaff et al. 1993). وجود آنزیم‌های گوارشی بلافاصله پس از تخم گشایی، در بسیاری از ماهیان استخوانی و خاویاری گزارش شده است (Rønnestad and Morais, 2007; Zambonino-Infante et al. 2009; Babaei et al. 2011).

در مطالعه حاضر میزان آنزیم‌های آلکالین پروتئاز، تریپسین و کموتریپسین در دوران جذب کیسه زرده نسبت به بعد از اتمام کیسه زرده بالاتر بود که نشان دهنده نقش موثر این آنزیم‌ها در هضم پروتئین‌های زرده برای فرآیندهای تکوین لاروی در مراحل اولیه توسعه ماهیان خاویاری (Gisbert et al. 2009; Babaei et al. 2011) همانند سایر ماهیـان عالی از نظر تکاملی است (Zambonino-Infante and Cahu, 2001). تغییر تدریجی هضم قلیایی (تریپسین و کموتریپسین) به هضم اسیدی (پپسین) با افزایش سن لارو فیل‌ماهی نشانه تکامل تدریجی دستگاه گوارش و قابلیت هضم برون سلولی پروتئین‌ها است (Senger et al., 1994). سنجش پپسین بلافاصله پس از تخم‌گشایی در هیچ یک از ماهیان خاویاری مطالعه شده تاکنون گزارش نشده است (Gisbert et al. 2009; Babaiea et al. 2011; Budddington, 1985)، با این حال، وجود فعالیت آنزیم پپسین بلافاصله پس از تخم‌گشایی در ماهیان استخوانـــی دیگـــر ماننـد ماهـــی آزاد دریـــای خـــزر (*Salmo caspius*) گزارش شده است (Zamani et al. 2009). نتایج این تحقیق نشان داد معده در فیل ماهی نسبت به ماهیان خاویاری مطالعه شده دیگر زودتر تشکیل شده و شروع به فعالیت می‌کند که مطالعات بافت‌شناسی و شیمی بافت دستگاه گوارش در مراحل نوزادی نیز این موضوع را تایید می‌کند (Asgari et al. 2013). تغییر کامل تغذیه از مدل قلیایی یا لاروی به مدل اسیدی یا بالغ تنها از روز چهل و دوم به بعد که میزان آنزیم پپسین در اوج خود و به حالت تعادل رسیده است، رخ می‌دهد.

نتایج همچنین نشان داد که لارو فیل ماهی که در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری کشور تا روزهای ۳۰ تا ۳۵ روز پس از تخم‌گشایی از غذای زنده استفاده می‌کند و مستلزم هزینه، نیروی کار و فضای زیاد است، توانایی هضم غذای کنسانتره دستی را بلافاصله پس از آغاز تغذیه خارجی و اتمام کیسه زرده (روز چهاردهم در این مطالعه) داراست. به همین دلیل توصیه می‌شود بلافاصله پس از جذب کیسه زرده، دوره عادت دهی به غذای دستی آغاز و پس از روز بیست و هشتم (۴۹۰ درجه - روز) و کامل شدن ظرفیت هضمی از غذای دستی به طور کامل استفاده شود. توانایی پذیرش و هضم غذای دستی بلافاصله پس از شروع تغذیه خارجی در مطالعه‌ای که اخیرا در مورد عادت دهی فیل ماهی به غذای دستی و تغییر تغذیه از غذای زنده به غذای دستی انجام شده است، نیز گزارش شده است (Agh et al. 2011). در این مطالعه گزارش شده است که می‌توان لارو فیل ماهی را بلافاصله پس از آغاز تغذیه خارجی، با موفقیت با غذای دستی سازگار کرد که با نتایج به دست آمده از فعالیت آنزیم‌های گوارشی، در مطالعه حاضر مطابقت دارد.

منابع

Agh, N., Noori, F., Irani, A., Van Stappen G. Sorgeloos, P. 2012. Fine tuning of feeding practices for hatchery produced Persian sturgeon, *Acipenser persicus* and Beluga sturgeon, *Huso huso*. Aquaculture Research 44: 335-344.

Asgari, R., Rafiee, G., Eagdei, 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, 20: 595-608.

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.

Bardi, R.W., Chapman, F.A., Barrows, F.T. 1998. Feeding trials with hatchery-produced Gulf of Mexico sturgeon larvae. Progressive in Fish Culturist 60: 25-31.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 1 248-254.

Buddington, R.K., 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*, during early development. Journal of Fish Biology 26: 715-723.

Buddington, R.K., Doroshov, S.I. 1984. Feeding trials with hatchery produced white sturgeon juveniles (*Acipenser transmontanus*). Aquaculture36: 237-243.

Buddington, R.K., Doroshov, S.I., 1986. Digestive enzyme complement of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). Comparative Biochemistry and Physiology, 83A: 561-567.

Dabrowski, K., Kaushik, S.J. Fauconneau, B. 1985. Rearing of sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt): I. Feeding trial. Aquaculture 47: 185–192.

Dettlaff, T.A., Ginsburg, A.S., Schmalhausen, O.I. 1993. Sturgeon Fishes: Developmental Biology and aquaculture. Springer-Verlag, New York, USA, 300 p.

Ebrahimi, E. 2006. Determination of the best time to transfer Beluga (*Huso huso*) juveniles from natural to commercial diets. Journal of Applied Ichthyology 22: 274-277.

Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics 95: 271-278.

Furne, M., García-Gallego, M., Hidalgo, M.C., Morales, A.E., Domezain, A., Domezain, J., Sanz, A. 2008. Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in sturgeon (*Acipenser naccarii*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology, 149A: 420-425.

Gisbert, E., Doroshov, S.I. 2006. Allometric growth in green sturgeon larvae. Journal of Applied Ichthyology 22: 202-207.

Gisbert, E., Sarasquete, C. 2000. Histochemical identification of the blackbrown pigment granules found in the alimentary canal of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during the lecitotrophic stage. Fish Physiology and Biochemistry 22: 349-354.

Gisbert, E., Williot, P. 2002. Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon. Journal of Fish Biology 60: 1071-1092.

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.

Gisbert, E., Gimenez, G., Fernandez, I., Kotzamanis, Y., Estevez, A. 2009. Development of digestive enzymes in common dentex, *Dentex dentex*, during early ontogeny. Aquaculture 287: 381-387.

Henning, S.J. 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. (Ed.), Physiology of the Gastrointestinal Tract, 2nd edition. Raven Press, New York, pp. 285-300.

Holt, J.G. 2011. Larval fish nutrition. Willey-Blackwell Press, UK, 434 p.

Kirshner, D. 1998. Encyclopedia of Fishes, second edition, Sheena Coupe Press, Australia, 240 p.

Kolkovski, S. 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and applications to formulated diets. Aquaculture 200: 181-201.

Lazo, J.P., Mendoza, R., Holt, G.J., Aguilera, C., Arnold, C.R. 2007. Characterization of digestive enzymes during larval development of red drum (*Sciaenops ocellatus*). Aquaculture 265: 194-205.

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.

Rønnestad, I., Morais, S. 2007. Digestion. In: Fin, R.N., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Larval Physiology. Enfield, Science Publishers, 201-262.

Segner, H., Storch, V., Reinecke, M., Kloas, W., Hanke, W. 1994. The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus*. Marine Biology 119: 471-486.

Timeiko, V.N., Bondarenko, L.G. 1988. A study of digestive enzymes in bester (Giant sturgeon sterlet hybrid) during postembryonic period. Voprosy Ikhtiologii 1: 117-123.Verreth, J., Segner, H. 1995. The impact of development on larval nutrition. In: Lavens, P., Jasper, E., Roelants, I. (Eds.), Proceedings of Larvi' 95, Fish and Shellfish Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special publication, 24, Ghent, Belgium, 321-330.

Yúfera, M., Darias, M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture 268: 53-63.

Zamani, A., Hajimoradloo, A., Madani, R., Farhangi, M. 2009. Assessment of digestive enzymes activity during the fry development of the endangered Caspian brown trout *Salmo caspius*. Journal of Fish Biology 75: 932-937.

Zambonino-Infante, J.L., Cahu, C. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology 130C: 477-487.

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, J.E.O., Bureau, D., Kapoor, B.G. (Eds.), Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277-344.

Zółtowska, 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.

Changes in proteolitic activity of digestive system of Beluga sturgeon, *Huso huso* during larval ontogeny

Reza Asgari[1], Soheil Eagderi[*1], Gholamreza Rafiee[1], Hadi Poorbagher[1], Naser Agh[2]
1- Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2- Artemia and Aquatic Animal Institute, Urmia University, Urmia, Iran

Received 1 January 2015; accepted 31 May 2015

Abstract
The development of proteolysis digestive enzymes from the stomach and pancreas were studied in Beluga, *Huso huso* from hatching up to 50th day post hatching (dph). Larvae were obtained from Shahid Marjani Sturgeon Rearing Center, Gorgan province, Iran. Sampling was carried out immediately after hatching, 7, 14, 19, 24, 29, 35, 42 and 50 dph. The results showed that at the onset of exogenous feeding, gastric glands were already functional, which was indicated by an increase in proteolitic activity of stomach. In contrast, proteolitic activity of pancreas decreased after the onset of exogenous feeding, showing the importance of these types of enzymes in the cleavage of yolk proteins during the endogenous feeding phase. The present study indicated that larvae of Beluga at the onset of exogenous feeding had an advanced digestive system to accept exogenous food and to digest the formulated diets.

Keywords: Beluga, *Huso huso*, Proteolytic enzymes, Larvae

*Corresponding author: soheil.eagderi@ut.ac.ir