



## بررسی فعالیت آنزیم‌های هضمی، آمیلاز و آلکالین فسفاتاز، در لارو ماهی سفید تغذیه شده از ناپلی آرتمیا

فاطمه حسن تبار<sup>\*</sup>، حسین اورجی<sup>۱</sup>، ابوالقاسم اسماعیلی<sup>۱</sup>، سیده صدیقه بابایی<sup>۲</sup>

۱- دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، دانشکده علوم دامی و شیلات، ساری، ایران

۲- دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

مسئول مکاتبات: f.hassantabar@yahoo.com

### چکیده

هدف از این آزمایش تعیین نرخ رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم‌های هضمی (آمیلاز و آلکالین فسفاتاز) لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلی آرتمیا می‌باشد. آزمایش در مخازن شیشه‌ای ۱۱۵ لیتری حاوی ۷۰۰۰ قطعه لارو ماهی سفید با میانگین وزن اولیه ۵/۳ میلی گرم (۲ روز بعد از هچ) انجام شد. جهت سنجش آنزیمی نمونه‌برداری از لاروها بصورت تصادفی در روزهای ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۱، ۲۵ و ۳۰ انجام گرفت. نتایج نشان دادند که ذخیره‌سازی لارو در تراکم بالا کارایی رشد را کاهش می‌دهد اما تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر روی نرخ بازماندگی لارو نداشت. در تحقیق حاضر از روز ۲۳-۳۰ افزایش واضحی در فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده شد بطوری که بیشترین فعالیت آمیلاز در روز ۳۰ بعد از هچ مشاهده شد. محتوای بالای گلیکوژن و کربوهیدرات در غذای زنده ممکن است سنتز و ترشح آمیلاز را تحریک کند. یک پیک فعالیت زود هنگام در فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز در روز ۸ بعد از تفریح مشاهده شد که نشان دهنده روند بلوغ روده در لارو ماهی سفید می‌باشد.

کلمات کلیدی: لارو ماهی سفید، آنزیم هضمی، آمیلاز، آلکالین فسفاتاز

### مقدمه

گونه‌های ماهیان دریایی، سخت‌پوستان (انواع میگوها)، ماهیان خاویاری، برخی از گونه‌های آب شیرین، ماهیان آکواریومی و حتی نرم‌تنان را تشکیل می‌دهد (۲۰). آرتمیا فرانسیسکانا به دلیل اندازه کوچک در زمان تفریح ناپلی، تغذیه غیرانتخابی و کیفیت بالای غذایی می‌تواند به عنوان غذای آغازین، توسط بسیاری از گونه‌های ماهیان به خصوص در مراحل اولیه زندگی مورد استفاده قرار گیرد [۲۵].

هضم، فرآیند کلیدی در متابولیسم جانور است که نشان می‌دهد وجود مواد مغذی برای عملکردهای بیولوژیکی بدن مورد نیاز است [۱۲]. رشد و توسعه موفق سیستم گوارشی برای رشد و بقای لارو ماهی ضروری است زیرا یک سیستم گوارشی کارآمد، ماهی را قادر به صید، بلع، هضم و جذب

ماهی سفید از نظر رژیم غذایی جزو ماهیان همه‌چیزخوار بوده ولی برخلاف سایر ماهیان همه‌چیزخوار به دلیل کوتاه بودن طول روده دارای طیف غذایی محدودی می‌باشد. این ماهی به عنوان غذای آغازین از انواع پلانکتون‌های گیاهی و جانوری و لارو حشرات استفاده نموده ولی پس از رسیدن به وزن بالاتر و در مراحل پس از مهاجرت به دریا عمدتاً از صدف‌های دو کفه‌ای تغذیه می‌نماید. دستگاه گوارش در ماهی سفید شامل دهان، حفره دهانی، حلق، دندان حلقی، مری، روده قدامی و خلفی و مخرج بوده و فاقد معده حقیقی می‌باشد [۱]. غذاهای زنده‌ای مانند روتیفر و آرتمیا در آبری پروری بسیاری از گونه‌های آبزیان اهمیت ویژه‌ای را بخصوص در مراحل اولیه تغذیه‌ای دارا می‌باشند. در این میان، آرتمیا بخش بسیار مهمی از جیره غذایی بسیاری از



کربوهیدرات در غذای زنده ممکن است سنتز و ترشح آمیلاز را تحریک کند.

### مواد و روش کار

پرورش ونمونه برداری: در این تحقیق جهت پرورش لارو از آکواریوم‌های با حجم تقریبی ۱۱۵ لیتر (با حجم آبگیری ۷۵ لیتر) استفاده شد. لاروها با روش حجمی شمارش گردیده و بصورت کاملاً تصادفی در ۶ تانک با تراکم ۷۰۰۰ عدد در هر تانک (۶۰ لارو در هر لیتر) منتقل می‌شوند. هر روز صبح قبل از غذاهای تمام آکواریوم‌ها جهت خروج غذاهای خورده نشده، مدفوع و لاروهای مرده به خوبی سیفون می‌شدند و ماهیان مرده نیز شمارش می‌شدند. بعد از سیفون کردن، تمام آکواریوم‌ها با آب تازه آبگیری می‌شدند (تقریباً ۷۵٪). لاروها تحت رژیم نوری ۱۶ ساعت روشنایی (16L+8D) پرورش یافتند. تغذیه لاروها با ناپلی آرتیمیا (*Artemia franciscana*) هر ۴ ساعت یکبار از ۷ صبح تا ۷ غروب و در سطح اشباع صورت گرفت.

نمونه برداری از لاروها از دومین روز تفریح تا ۳۰ روز بعد از آن صورت پذیرفت. نمونه برداری بصورت کاملاً تصادفی و در صبح روزهای ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۱۰، ۱۵، ۲۱، ۲۵، ۳۰ انجام شد و بلافاصله نمونه‌ها به یخچال ۸۰- (مدل GFL 300) انتقال یافتند و تا مرحله سنجش نگهداری شدند. جهت نمونه برداری لاروها در شب غذاهای نشدند تا تاثیر آنزیم‌های خارجی ناشی از غذای زنده هضم نشده روی دستگاه گوارش لارو حداقل باشد (۱۹).

**تهیه عصاره آنزیم پانکراسی:** برای سنجش آنزیم آمیلاز، یک گرم بافت در ۹ میلی‌لیتر بافر Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۰/۱ میلی‌مولار، Triton X-100 ۰/۱ درصد در ۷/۸ pH توسط هموژنایزر (مدل D 500) هموژن شده و سپس سانتریفوژ شده و سوپرناتانت حاصله

غذا می‌سازد. در این راستا یکی از جنبه‌های مهم مطالعات فیزیولوژی هضم، اطلاع از کارایی گوارش بر اساس نوع و عملکرد آنزیم‌های گوارشی (الگوهای انتورنی آنزیم‌های گوارشی)، به منظور تعیین زمان آغاز تغذیه خارجی (weaning) و تعیین ظرفیت لارو در هضم و جذب انواع مختلف مواد مغذی شامل غذای زنده و یا ریزجیره‌ها می‌باشد [۷ و ۱۲]. بطور کلی اطلاع از نحوه تکامل سیستم آنزیمی می‌تواند در تشخیص عوامل محدود کننده رشد در پرورش لارو، کاهش تلفات در زمان تغذیه فعال و طراحی جیره غذایی متناسب با سیستم آنزیمی مؤثر باشد و علاوه بر آن، به عنوان شاخصی قابل اطمینان از فعالیت‌های گوارشی و شرایط تغذیه‌ای لارو ماهیان می‌باشد [۵ و ۱۲]. بسیاری از محققین معتقدند که فعالیت آنزیم‌های گوارشی تحت تاثیر سن و یا مراحل تکاملی است. دانستن زمان ترشح آنزیم‌های اصلی در روده گونه‌های قابل پرورش، برای آگاهی از زمان شروع تغذیه با غذای خشک جهت رشد سریع و بهتر لارو ضروری می‌باشد [۲۲].

فسفاتاز قلیایی آنزیمی است که بطور معمول در بسیاری از مطالعات سیستم گوارشی در لارو ماهیان مورد مطالعه قرار می‌گیرد. فسفاتاز قلیایی تکامل غشای نوار مسواکی روده را نشان می‌دهد. این آنزیم‌ها در هیدرولیز و سنتز استرهای اسید فسفریک و انتقال گروه‌های فسفات از اسید فسفریک به سایر ترکیبات در pH قلیایی نقش دارد و آن را تسریع می‌نماید و نقش مهمی را در فرآیند معدنی‌سازی اسکلت حیوانات آبی و رشد و نمو موجودات زنده ایفا می‌کنند. بطور کلی مطالعات کمی در ارتباط با عملکرد بیولوژیکی فسفاتاز قلیایی روده‌ای انجام شده است [۲۴ و ۱۷]. در تحقیق حاضر از روز ۲۳-۳۰ افزایش واضحی در فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده شد بطوریکه بیشترین فعالیت آمیلاز در روز ۳۰ بعد از هیچ مشاهده شد. محتوای بالای گلیکوژن و

طرفه (One-Way ANOVA) انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم افزار SPSS 17 برای آنالیز داده‌ها و Excel برای رسم نمودار استفاده شد.

### نتایج

لاروها از ابتدا تا انتهای پرورش بازماندگی بالایی (۲/۴۲ ± ۰/۸۵) داشتند. نتایج مربوط به رشد و ضریب رشد ویژه در نمودار ۱ نشان داده شده است. میانگین طول وزن لاروها در ابتدای دوره به ترتیب ۰/۹۹۳۶ ± ۰/۳ میلی گرم و طول اولیه ۰/۴۲۸ ± ۰/۸ میلی متر بود. نتایج مربوط به رشد نشان می‌دهد که رشد ماهی تا روزهای ۱۴ به طور آهسته انجام شده و بعد از آن تا حدودی روند افزایشی از خود نشان دادند، بطوری که درصد افزایش وزن بدن در روز ۱۸ نسبت به روز اول ۷۲/۴۱ و ۹۸/۲۷ درصد بود ولی از روز ۱۸ تا ۳۰ مربوط به پروتئین خام، چربی خام، کربوهیدرات و خاکستر ناپلئوس آرتیمیا در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- آنالیز تقریبی ناپلئوس آرتیمیا

۵۲/۲ ± ۸/۸	پروتئین
۱۸/۹ ± ۴/۵	چربی
۱۴/۸ ± ۴/۸	کربوهیدرات
۹/۷ ± ۴/۶	خاکستر

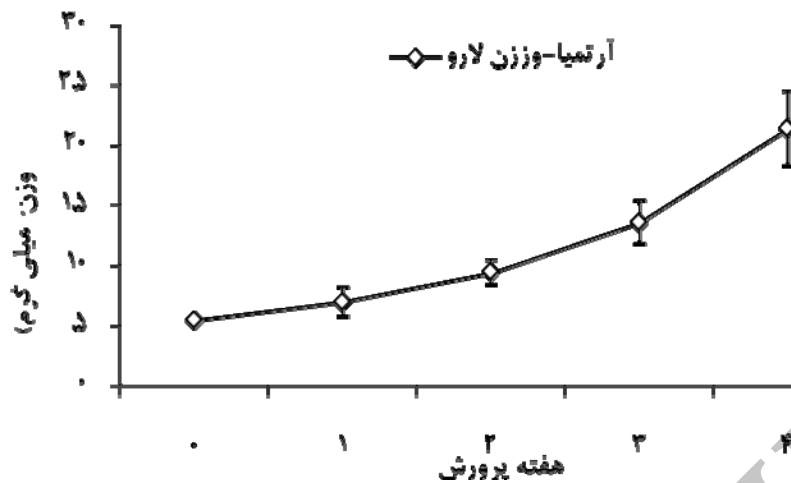
تا زمان سنجش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۰].

**تهیه عصاره آنزیم‌های روده‌ای:** برای استخراج آنزیم آلکالین فسفاتاز از بافر سرد Manitol ۵۰ میلی مولار، بافر Tris-HCl ۲ میلی مولار در pH ۷ به نسبت ۱:۳۰ وزنی- حجمی استفاده گردید و پس از دو مرحله سانتریفوژ توسط CaCl<sub>2</sub> ۰/۱ مولار، سوپرناتانت حاصله جهت سنجش آنزیم‌ها استفاده گردید [۹]. پروتئین محلول نمونه‌های هموزن شده لارو ماهی سفید به روش Bradford [۶] سنجیده شد.

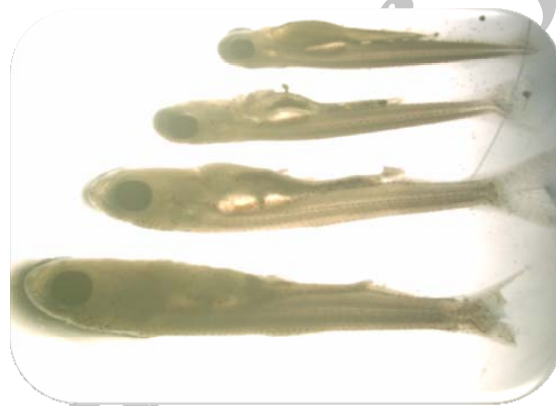
**سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز:** برای تعیین فعالیت آلفا- آمیلاز از نشاسته به عنوان سوبسترا استفاده گردید. نشاسته تحت تاثیر آنزیم تجزیه شده و تولید مالتوز می‌نماید که از طریق رنگ سنجی و تغییر شدت رنگ در معرف دی نیترو سالیسیلیک اسید قابل سنجش می‌باشد. بعد قرائت نوری با استفاده از اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر انجام شد [۲۷].

**سنجش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز:** ۵ قسمت از بافر بیکرینات را با یک قسمت محلول معرف Para-nitrophenylphosphate ۰/۱ مولار مخلوط کرده و ۵ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا هم دمایی صورت گیرد. ۰/۵ میلی لیتر از این مخلوط را با ۲۰ میکرولیتر محلول آنزیمی استخراج شده مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از این زمان ۵ میلی لیتر محلول یک گرم در لیتر سود به آن اضافه شد تا واکنش متوقف شود. میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۳].

**آنالیز آماری:** تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به فعالیت آنزیم‌های گوارشی با استفاده از روش آنالیز واریانس یک



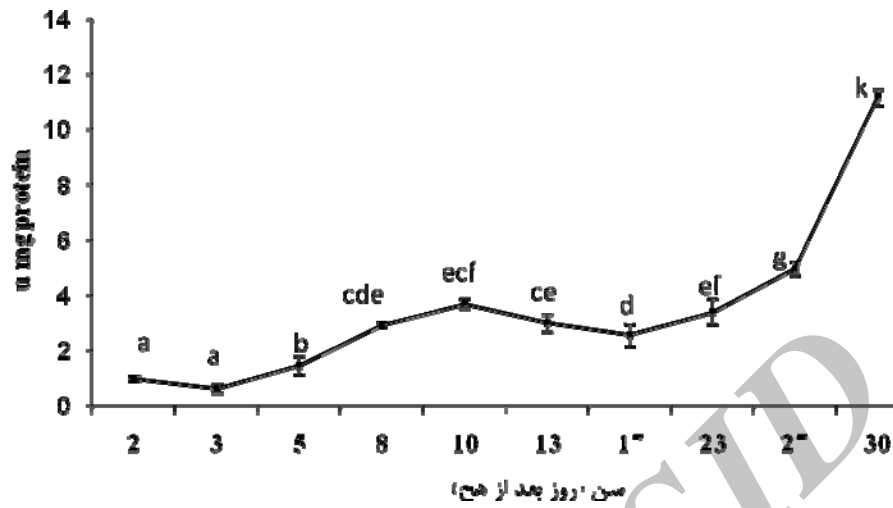
نمودار ۱- منحنی وزن لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلی آرتمیا



شکل ۱- لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلی آرتمیا در هفته ۱، ۲، ۳ و هفته ۴ پرورش

مقایسه با روز ۱۰ بطور معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $P < 0.05$ ). فعالیت آنزیمی از روز ۲۳ تا روز ۳۰ بعد از تفریح یک روند صعودی را نشان داده است بطوری که بیشترین فعالیت در روز ۳۰ مشاهده می‌شود ( $11/18 \pm 0/28$ ) که اختلاف معنی‌داری با سایر روزها دارد ( $P < 0.05$ ).

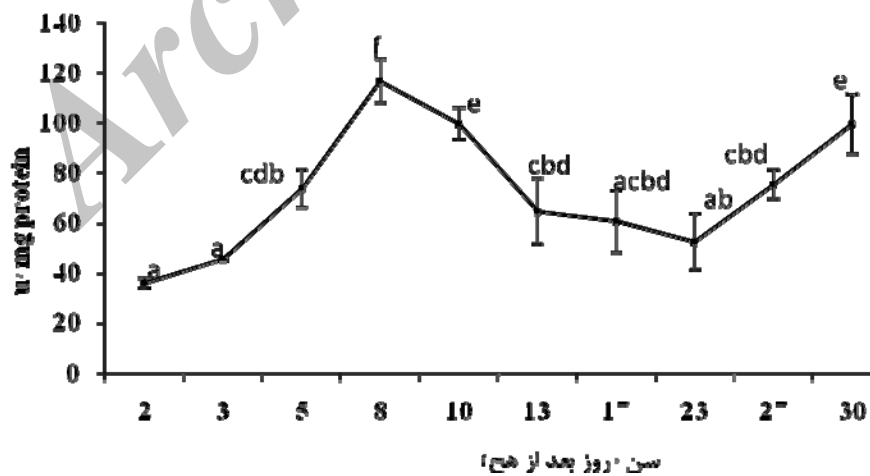
فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز: بر طبق نمودار ۲ کمترین فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در روزهای ۲ و ۳ بعد از تفریح مشاهده می‌شود (به ترتیب  $0/091 \pm 0/976$  و  $0/158 \pm 0/62$  u/mg protein). بعد از آن فعالیت آنزیمی تا روز ۱۰ بعد از تفریح افزایش یافت و سپس فعالیت آن تا روز ۱۷ در



نمودار ۲- فعالیت اختصاصی آنزیم آمیلاز (u/mg protein)

کاهش یافت و در فواصل روزهای ۲۳-۱۳ اختلاف معناداری بین داده‌ها مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ). در روز ۲۷ بعد از تفریح فعالیت آنزیمی مجدداً افزایش (u/mg protein  $5/8 \pm 7/3$ ) یافت ( $P > 0.05$ ).

فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز: فعالیت اختصاصی آنزیم آلکالین فسفاتاز از روز ۲ تا ۳۰ در شکل ۳ نشان داده شده است. فعالیت این آنزیم از روز ۳ بعد از تفریح افزایش یافته و در روز ۸ بعد از تفریح به بیشترین میزان (u/mg protein  $11/23 \pm 52/53$ ) می‌رسد. سپس فعالیت آنزیم



نمودار ۳- فعالیت اختصاصی آنزیم فسفاتاز قلیایی (u/mg protein)



## بحث

رشد: همانطور که در نمودار ۱ نشان داده شد، روند رشدی آهسته‌ای در طی ۲۸ روز پرورش مشاهده شد، که این کاهش رشد احتمالا بخاطر تراکم بالا و در اثر برهمکنش اجتماعی برای غذا و فضا می‌باشد. با این وجود نرخ بازماندگی در حد بالایی قرار داشت و تلفات کمی مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر با یافته‌های Jamro`z بر روی لارو گربه ماهی اروپایی قابل مقایسه می‌باشد [۱۶]. در این مطالعه لاروهای تغذیه شده با غذای طبیعی پایین‌ترین نرخ رشد و بالاترین نرخ بازماندگی را نشان دادند. اما در مطالعه- ای که ابوالفتحی [۲] بر روی لارو ماهی سفید انجام دادند بالاترین عملکرد رشد و نرخ بازماندگی در آن دسته از لاروهایی که با روتیفر تغذیه شدند، یافت شد.

**آلکالین فسفاتاز:** در تحقیق حاضر و در لارو ماهی سفید میزان آنزیم فسفاتاز قلیایی از روز دوم بعد از تخم‌گذاری افزایش یافته و در روز هشتم بعد از تخم‌گذاری در هر دو تیمار غذایی به بیشترین مقدار خود رسید. بعد از روز هشتم فعالیت آلکالین فسفاتاز یک روند نزولی نشان داده و مجددا در هفته سوم افزایش یافت. این الگوی تغییر در ماهیانی مانند *D. puntazzo* و *S. senegalensis* نیز مشاهده شد [۲۳ و ۲۶]. Zambonino-Infante بیان کرد که نوسانات فعالیت اختصاصی آنزیم‌های هضمی به خاطر رخدادهای متابولیکی و فیزیولوژیکی متفاوت در طول تکامل لاروی معمولا مشاهده می‌شود [۲۹]. برای برخی از گونه‌ها مانند لارو ماهی *D. dentex* در روز ششم [۱۲] و در *D. sargu* در روز نهم [۸] یک حداکثر فعالیت زود هنگام گزارش گردید. بر طبق مطالعات Gisbert [۱۲] با افزایش سن فعالیت آنزیم سیتوزولیک کاهش یافته و همزمان فعالیت آنزیم‌های غشای نوار مسواکی (BBM)، افزایش

می‌یابد در واقع، افزایش فعالیت آنزیم‌های برآش بوردر (AP) نشان دهنده روند نرمال تکاملی در بلوغ انتروسیست-های روده لارو ماهی و بهبود توانایی هضمی روده در طول تکامل لاروی می‌باشد [۱۳].

در بررسی مورفولوژیکی بر روی لارو ماهی سفید مشاهده شد که در حدود روز ۲۰ بعد از تخم‌گذاری، زمانی که کیسه زرده کاملا جذب شده، چین‌های روده‌ای توسعه بیشتری یافتند [۱۵]. در تحقیق حاضر، فعالیت آلکالین در لاروهای تغذیه شده با غذای زنده بعد از روز ۲۳ افزایش یافت که احتمالا نشان دهنده توسعه غشای روده و پرزهای موجود در دیواره روده می‌باشد. بنابراین افزایش فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی بعد از یک کاهش اولیه نشان دهنده تکامل روده لارو ماهی سفید در هضم و جذب مواد مغذی و تکامل و تمایز انتروسیست‌ها می‌باشد. بعلاوه گزارش شده است که ماهیان همه‌چیزخوار فعالیت AP کمتری نسبت به ماهیان گوشتخوار دارند [۱۴]. به طوری که در مطالعه حاضر لارو ماهی سفید فعالیت فسفاتاز قلیایی کمتری در مقایسه با برخی از گونه‌های گوشتخوار مانند لارو سول سنگالی (*Solea senegalensis*) [۲۳] نشان داد.

**آلفا- آمیلاز:** فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز در لارو ماهی سفید در روز دوم بعد از تخم‌گذاری مشاهده گردید. فعالیت اختصاصی آمیلاز بعد از شروع تغذیه خارجی افزایش یافت. بر اساس تحقیق Gisbert و همکاران [۱۲] محتوای بالای گلیکوژن و کربوهیدرات جیره در غذای زنده ممکن است سنتز و ترشح آمیلاز را تحریک و محتوای کمتر این مواد در جیره‌های غذایی خشک در طی مرحله weaning (تغییر رژیم غذایی) ممکن است فعالیت این آنزیم را کاهش دهد. در این مطالعه مقدار کربوهیدرات در ناپلئوس آرتیمیا ۱۴/۸ درصد بود (جدول ۱) بنابراین، می‌توان فعالیت بالای آمیلاز در لارو ماهی سفید بعد شروع تغذیه خارجی را به مقادیر قابل توجه کربوهیدرات‌های جیره نسبت داد. در دنتکس

فعالیت کل آنزیم‌های هضمی در پایان آزمایش برای تمام آنزیم‌های مورد مطالعه افزایش یافته که نشان دهنده افزایش توانایی هضمی لارو در این دوره می‌باشد. همچنین افزایش فعالیت آنزیم‌های روده‌ای (فسفاتاز قلیایی) در مراحل تکامل لارو، بلوغ انتروسیست‌ها را شبیه آن چه در افراد بالغ وجود دارد، نشان می‌دهد. با توجه به فعالیت آنزیم‌های گوارشی، مورفولوژی ظاهری و رشد لارو ماهی سفید، فاصله روزهای ۸ تا ۱۰ بعد از تفریح زمان مناسبی جهت تغذیه با جیره خشک (weaning) در این ماهی می‌باشد.

#### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارگاه شهید رجایی به منظور تامین لارو ماهی سفید و از جناب آقای مهندس خلیلی مسئول آزمایشگاه گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری کمال تشکر و سپاس را داریم.

#### منابع

۱. خانجانی، پور. ع.، ولی پور، ر. ۱۳۸۴. ماهی سفید جواهر دریای خزر. ناشر شیلات ایران، ۸۷ صفحه.

2. Abolfathi, M., A. Hajimoradloo, R. Ghorbani, and Zamani, A (2011), Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in juvenile roach, *Rutilus rutilus caspicus*. *Compar-ative Biochemistry and Physiology*, 1-8.

3. Bessey, O.A., O.H. Lowry, and M.J. Brock (1946), Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum. *J. Biol. Chem*, 164: 321-329.

4. Babaei, S.S., A.M. Abedian Kenari, R.M. Nazari, and E. Gisbert (2011), Developmental changes of digestive enzymes in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) during larval ontogeny. *Aquaculture*, 318: 138-144.

معمولی (*Dentex dentex*) نیز آمیلاز در روز تخم‌گشایی و قبل از باز شدن دهان لارو وجود داشت [۱۲]. بعلاوه، در لارو تاسماهی ایرانی فعالیت آمیلاز در طی جذب کیسه زرده بالا بود [۴]. Kim و همکارانش بیان کردند که آمیلاز در اوایل انتورژنیز، حتی در نبود غذا، سنتز می‌شود و کربوهیدرات‌ها فعالانه در طول اندام‌زایی کاتالیز می‌شوند [۱۸]. بنابراین حضور بالای آمیلاز همزمان با شروع تغذیه دلالت بر این موضوع دارد که احتمالاً کربوهیدرات‌های موجود در جیره شکاف انرژی بین تقاضای پروتئین در زمان تغذیه داخلی و خارجی برای لارو ماهیان پر را کرده و زمانی که هضم لیپید و پروتئین افزایش می‌یابد توانایی هضم کربوهیدرات توسط ماهیان کاهش می‌یابد [۱۸].

Peres بیان کرد که کاهش فعالیت آمیلاز طی تکامل لاروی، مرتبط با میزان کربوهیدرات غذا نبوده و یک برنامه‌ریزی ژنتیکی است [۲۱]. Caho و Zambonino نیز گزارش کردند که کاهش فعالیت آمیلاز در لارو ماهی یک برنامه‌ریزی ژنتیکی است، تا بعد از مراحل اولیه، کربوهیدرات‌های ذخیره شده در بدن را هضم کرده و با مصرف جیره‌های غنی از کربوهیدرات، پروتئین را ذخیره کند [۲۸]. بنابراین بطور کلی می‌توان گفت افزایش آلفا آمیلاز در دوران کیسه زرده یک برنامه‌ریزی ژنتیکی و افزایش در دوران تغذیه علاوه بر برنامه‌ریزی ژنتیکی جهت هضم بهتر کربوهیدرات‌ها، ناشی از تحریک کربوهیدرات جیره نیز می‌باشد. فعالیت آنزیم آمیلاز بعد از روز دهم در لارو ماهی سفید تغذیه شده با ناپلئوس آرتمیا کاهش یافته و سپس بین روزهای ۲۷-۳۰ افزایش واضحی در فعالیت آنزیم آمیلاز مشاهده شد.

از آنجایی که ناپلئوس آرتمیا همه چیزخوار می‌باشد، سطح آمیلاز بالایی برای هضم کربوهیدرات موجود در میکروآلگا دارد. بنابراین، آنزیم‌هایی به غیر از آمیلاز در ناپلئوس آرتمیا ممکن است برای شکارچیان آرتمیا اهمیت غیرمستقیم به عنوان آنزیم‌های هضمی خارجی داشته باشند [۱۱].



common dentex, *Dentex dentex*, during early ontogeny. *Aquaculture*, 287: 381–387.

13. Guerreiro, I., M. de Vareilles, P. Pousão-Ferreira, V. Rodrigues, M. Teresa Dinis, and L. Ribeiro (2010), Effect of age-at-weaning on digestive capacity of white seabream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* 300: 194–205.

14. Harpaz, S., and Z. Uni (1999), Activity of intestinal mucosal brush border membrane enzymes in relation to the feeding habits of three aquaculture fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 124:155–160

15. Jafari, M., M.S. Kamarudin, C.H. Saad, A. Arshad, S. Oryan, and M. Bahmani (2009), Development of morphology in hatchery-reared *Rutilus frisii kutum* larvae. *Eur J Sci Res*, 38:296–305.

16. Jamroz, M., D. Kucharczyk, R. Kujawa, and A. Mamcarz (2008), Effect of stocking density and three various diets on growth and survival of European catfish (*Silurus glanis l.*) larvae under intensive rearing condition. *Natural Sciences*, 23(4): 850–857.

17. Jobling, M. (1995), Digestion and absorption. In: Jobling, M. (Ed), *Environmental Biology of Fishes*, Chapter 6. Chapman and Hall, London England. Pp: 175- 210.

18. Kim, B.G., S. Divakaran, C.L. Brown, and A.C. Ostrowski (2001), Comparative digestive enzyme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). *Journal of Fish Physiology and Biochemistry*, 24: 225-241.

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

5. Bolasina, S., A. Perez, and Y. Yamashita (2006), Digestive enzymes activity during ontogenetic development and effect of starvation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 252: 503– 515

6. 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: 248–254.

7. Cahu, C.L., J.L. Zambonino Infante, A.M. Escaffre, P. Bergot, and S. Kaushik (1998), Preliminary results on sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing with compound diet from first feeding. comparison with carp (*Cyprinus carpio*) larvae. *Aquaculture*, 169: 1-7.

8. Cara, J.B., F.J. Moyano, S. Cárdenas, C. Fernández-Dias, and M. Yúferas (2003), Assessment of digestive enzyme activities during larval development of white bream. *J. Fish Biol*, 63: 48–58.

9. Crane, R.K., G. Boge, and A. Rigal (1979), Isolation of brush border membranes in vesicular form from the intestinal spiral valve of the small dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Biochim. Biophys. Acta*, 554: 264–267.

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

11. Gawlicka, A., B. Parent, M.H. Horn, N. Ross, I. Opstad, and O.J. Torrissen (2000), Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Indication of readiness for first feeding. *Aquaculture*. Vol. 184: 303-314.

12. Gisbert, E., G. Giménez, I. Fernández, Y. Kotzamanis, and A. Estévez (2009), Development of digestive enzymes in





25. Sorgeloos, P., P. Dhert, and P. Candrev (2001), Use of brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture* 200: 147-159.
26. Suzer, C., S. Aktülün, D. Çoban, H.O. Kamacı, Ş. Saka, K. Firat, and A. Alpbaz (2007a), Digestive enzyme activities in larvae of sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 148: 470-477.
27. Worthington, C.C. (1991), Worthington enzyme manual related Biochemical. 3th Edition. Freehold. New Jersey. pp.38-42 (amylase, Alpha).
28. Zambonino-Infante, J.L., and C.L. Cahu (2007), Dietary modulation of some digestive enzymes and metabolic processes in developing marine fish, applications to diet formulation. *Aquaculture*, 268(1-4):98-105.
29. Zambonino-Infante, J.L., E. Gisbert, C. Sarasquete, I. Navarro, J. Gutiérrez, and C.L. Cahu (2008), Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino, J.E.O., D. Bureau, B.G. Kapoor, (Eds.), Feeding and Digestive Functions of Fish. Science Publishers, Inc, Enfield, USA, pp. 277-344.
20. Lavens, P., and P. Sorgeloos (2001), Use of Brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 200: 147-159.
21. Peres, A., C.L. Cahu, J.L. Zambonino Infante, M.M. Legall, and P. Quazuguel (1996), Amylase and trypsin responses to intake of dietary carbohydrate and protein depend on the developmental stage in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol. Biochem*, 15: 237-242.
22. Rathore R.M., S. Kumar, R.. Chakrabarti (2005), Digestive enzyme patterns and evaluation of protease classes in *Catla catla* (Family: Cyprinidae) during early developmental stages. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 259(142 B): 98-106.
23. Ribeiro, L., J.L. Zambonino Infante, C. Cahu, and M.T. Dinis (2002), Digestive enzymes profile of *Solea senegalensis* post larvae fed *Artemia* and a compound diet. *Fish Physiol. Biochem*, 27: 61-69.
24. Senger, H., V. Storch, M. Reinecke, W. Kloas, and W. Hanke (1995), A tabular overview of organogenesis in larval turbot (*Scophthalmus maximus*). *ICES Marine Science Symposium*, 201: 35-39.