Archive of SID

تغـذیه آبزیـان
سال پنجم، شماره اول،
بهار و تابستان ۱۳۹۸

تاثیر گلوتامین بر آنزیم‌های گوارشی و ساختار روده بچه تاسماهیان سیبری (*Acipenser baeri* , Brandt 1869)

سامان درویشی[۱]، حسین خارا[۱*]، محدثه احمد نژاد[۲]
۱- گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران
۲- موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده آبزی پروری آب‌های داخلی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، بندرانزلی، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۷/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۲۷

چکیده
تاسماهی سیبری گونه مناسبی برای استفاده در صنعت آبزی‌پروری است. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثر گلوتامین روی آنزیم‌های گوارشی و ساختار بافتی روده بچه تاسماهی سیبری و آگاهی از مقادیر بهینه گلوتامین در شرایط پرورش به مدت هشت هفته در مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی انجام شد. این بررسی روی ۱۲۶ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۷/۵۶ ± ۴۵/۷۱ گرم در شش تیمار (شاهد، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ گرم گلوتامین در هر کیلوگرم غذا) و سه تکرار انجام شد. جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، روده ماهیان آماده شد و برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز، پروتئاز و آمیلاز به ترتیب از امولسیون صمغ عربی-روغن زیتون، محلول آزوکازئین ۲/۵ درصد و نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. جهت بررسی طول پرز و اپی‌تلیوم روده یک سانتی‌متر از بافت روده در محلول بوئن فیکس شد. سپس، نمونه‌ها آبگیری، شفاف‌سازی، پارافینه و قالب‌گیری شدند. پس از برش بافتی قالب‌ها، رنگ‌آمیزی به روش ائوزین-هماتوکسیلین انجام شد. نتایج نشان داد که آمیلاز، پروتئاز و لیپاز بین تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۵$). بیشترین میزان آمیلاز و لیپاز روده در تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین) و بیشترین پروتئاز روده در تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین) مشاهده شد. هم‌چنین، اندازه طول پرز و اندازه اپی‌تلیوم روده بین تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۵$). بیشترین طول پرز روده در تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین) و بیشترین اندازه اپی‌تلیوم روده در تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین) مشاهده شد. با توجه به بالاترین میزان ترشح آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز و بیشترین طول پرز و اندازه اپی‌تلیوم روده در تیمارهای چهارم و پنجم (۲۰ و ۳۰ گرم گلوتامین)، می‌توان گفت که این سطوح از آمینواسید گلوتامین توانست تاثیر مثبتی بر ساختار فیزیولوژی روده و آنزیم‌های گوارشی روده تاسماهی سیبری بگذارد.

کلمات کلیدی: گلوتامین، آنزیم‌های گوارشی، ساختار روده، تاسماهی سیبری.

نویسنده مسئول: h.khara1974@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ماهیان خاویاری از معروف‌ترین و گران‌بهاترین ماهیان بوده (Berg, 1948) که طی سال‌های اخیر ذخایر آن به‌شدت کاهش یافته است (Ruban and Khodorevskaya, 2011; Moghim, 2013). از دلایل توجه به تکثیر و پرورش این ماهیان در محیط مصنوعی می‌توان به کاهش ذخایر این ماهیان در طبیعت (Webster and Lim, 2002)، خاویار مرغوب و گوشت لذیذ و گران این ماهیان (Moyle, 1976) اشاره کرد. تاسماهی سیبری (*Acipenser baeri*) گونه مناسبی برای آبزی‌پروری محسوب می‌شود و در روسیه میزان تولید آن ۷۵۰ تن در سال تخمین زده شده است (Williot et al. 2001).

به‌دلیل روند افزایشی جمعیت جهان و نیازمندی انسان به منابع پروتئینی متنوع و سالم، آبزی‌پروری یکی از راه‌های تامین پروتئین و غذای بشر می‌باشد (Bell and Sargent, 2003). آبزیان به‌علت ارزش غذایی بالا از جایگاه مناسبی برخوردار می‌باشند (افشار مازندران، ۱۳۸۱) که افزایش مصرف سرانه آبزیان از طریق دو منبع آبزی‌پروری و صید در پنج دهه اخیر نشان‌دهنده استقبال مردم جهان از منابع پروتئینی دریایی است (Treves-Brown, 2013). به عقیده بسیاری از صاحب‌نظران، دلیل اصلی محدودیت پرورش ماهیان خاویاری عدم توجه به نیازهای غذایی و فرمـوله کردن غـذاهای مصـنوعی می‌باشد (Conte et al. 1988). اجرای برنامه‌های بهبود رژیم غذایی و نوع تغذیه در مولدین گونه‌های پرورشی اثر بسیار زیادی بر دستگاه تولیدمثلی ماهیان، تسریع روند رشد، تحریک فرآیند گامتوژنز، میزان باروری، لقاح، کیفیت و بقای اسپرم، بقا و تولید لاروهای طبیعی، افزایش قدرت ایمنی و مقاومت در برابر استرس دارد (Izquierdo et al. 2005). غذا یکی از مهم‌ترین عوامل در پرورش ماهیان محسوب شده و دستیابی به یک جیره غذایی مناسب یک پیش‌نیاز برای صنعت آبزیان است (شریف‌روحانی و ایران، ۱۳۸۹). استفاده از مقادیر متعادلی از ترکیبات غذایی برای دستیابی به رشد مناسب الزامی می‌باشد (افشار مازندران، ۱۳۸۱). از نکات مهم در تغذیه ماهیان خاویاری استفاده از پروتئین خالص در جیره غذایی جهت تامین نیاز پروتئینی می‌باشد (Hansen, 2009). جیره متعادل علاوه بر جذب مناسب سبب کاهش آلاینده‌ها و بیماری می‌شود (Olmos et al. 2011). به‌طور کلی، منابع پروتئینی حاصل از منابع حیوانی و گیاهی می‌باشند (Olmos et al. 2011). پروتئین بخش اصلی اعضای بدن، بافت‌های نرم و مایعات بدن ماهی را تشکیل می‌دهد. مولکول پروتئین از زنجیره آمینواسیدها تشکیل یافته و اهمیت غذایی مواد پروتئینی بستگی به میزان و نوع آمینواسیدها دارد (سوداگر، ۱۳۸۴). برخلاف حیوانات اهلی، ماهیان نیازمند پروتئین بالایی در جیره خود نیستند (Murai, 1992) که علت آن نیاز کمتر به انرژی جهت اعمال بدن نسبت به جانوران خونگرم می‌باشد (Miles and Chapman, 2007). تاسماهی سیبری به ۳۰۰ گرم پروتئین در جیره برای هر کیلوگرم وزن بدن (۲۰ تا ۲۲ گرم بر کیلوژول انرژی در جیره) نیاز دارد (Medale et al. 1995). تنوع و اثرات گلوتامین سبب افزودن این آمینواسید به جیره گردیده که این امر به‌منظور افزایش تولید ماهیان به‌صورت تجاری انجام می‌گردد. گلوتامین آمینواسیدی غیرضروری بوده اما در مواردی مانند برخی بیماری‌های گوارشی می‌تواند ضروری باشد. بیشترین درصد گلوتامین در عضلات ساخته شده اما به‌صورت جزئی از مغز و آبشش‌ها نیز آزاد می‌گردد (Pohlenz et al. 2012a). وظایف اصلی گلوتامین ساخت پروتئین، تنظیم تعادل اسید و باز در کلیه با تولید آمونیوم، منبع انرژی برای یاخته‌ها، به‌عنوان دهنده نیتروژن در فراگشت، به‌عنوان دهنده کربن در چرخه کربس و منتقل‌کننده غیرسمی آمونیاک در گردش خون می‌باشد. بیشترین مصرف گلوتامین توسـط یاخته‌های روده‌ای است (Waddell and Fredricks, 2005).

سلول‌های موجود در اندام‌های بدن دارای آنزیم‌هایی خاص جهت کاتالیز واکنش‌های بیوشیمیایی سلول هستند. تعیین مقدار و فعالیت آنزیم، نحوه فعالیت بافت و اندام را آشکار می‌سازد. ورود آنزیم‌ها به سیستم گردش خون می‌تواند ناشی از نکروز سلولی و آنوکسی باشد که ممکن است باعث از بین رفتن یکپارچگی غشای سلول و ورود آنزیم به داخل پلاسما می‌شود. سنجش غلظت آنزیم و مقایسه آن با حالت طبیعی می‌تواند تغییرات احتمالی و اندام درگیر را مشخص نماید (مجابی، ۱۳۷۰). برای افزایش نواحی سطحی روده چهار روش در ماهیان توسعه یافته که شامل افزایش طول روده، توسعه یک بافت

www.SID.ir

Archive of SID

مخاطی (پوششی) ضخیم با ساختار پیچیده، توسعه دیورتیکول‌ها (کیسه‌ها) و وجود یک چین پوششی داخلی (دریچه مارپیچی) در ناحیه عقبی روده است. گاهی نیز ترکیبی از این چهار روش جهت افزایش ناحیه سطحی در ماهیان دیده می‌شود. ماهیان خاویاری از آمیزه‌ای از بافت مخاطی ضخیم به همراه زوائد متصل و دریچه مارپیچی استفاده می‌کنند (ستاری، ۱۳۸۱).

تاکنون مطالعات گسترده‌ای درباره اثر پروتئین‌ها و آمینواسیدها روی آنزیم‌های گوارشی و ساختار روده آبزیان مختلف انجام شده که می‌توان به مطالعات موحدیان و همکاران (۱۳۹۵) روی فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده تحت تأثیر نسبت‌های مختلف متیونین و لیزین در جیره ماهیان جوان صبیتی (*Sparidentex hasta*)، Nordrum و همکاران (۲۰۰۰) روی اثرات متیونین، سیستئین و تری‌گلیسریدهای با زنجیره متوسط بر قابلیت هضم مواد مغذی، جذب آمینواسیدهای در طول روده و نگهداری مواد مغذی در ماهی آزاد اطلس (*Salmo salar*)، Koven و همکاران (۲۰۰۲) روی اثر تحریک‌کننده پروتئین هضم و/یا آمینواسیدهای آزاد بر ترشح هورمون کوله‌سیستوکینین در لاروهای تازه به تغذیه افتاده ماهی *Clupea harengus*، Yan و Qiu-Zhou (۲۰۰۶) روی اثرات مکمل گلوتامین جیره بر عملکرد رشد و ساختار و عملکرد روده در ماهی کپور جوان (*Cyprinus carpio*)، Debnath و همکاران (۲۰۰۷) روی آنزیم‌های گوارشی و پروفایل متابولیک ماهیان انگشت قد *Labeo rohita* تغذیه شده با جیره دارای سطوح مختلف پروتئین خام و Pohlenz و همکاران (۲۰۱۲a) روی تاثیر غلظت‌های مختلف گلوتامین جیره بر مورفولوژی روده، آمینواسیدهای پلاسما و عملکرد رشد در گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) جوان اشاره کرد.

به علت نیاز ماهیان به منابع پروتئینی و اهمیت آن، ضرورت دارد تا سطوح مناسب گلوتامین در این گونه مورد بررسی قرار گیرد. این پژوهش با هدف بررسی اثر سطوح مختلف گلوتامین جیره بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی و ساختار روده بچه تاسماهیان سیبری انجام گردید. هدف نهایی این بررسی تعیین سطح مطلوب گلوتامین جیره با توجه به موارد فوق بود.

مواد و روش‌ها

شرایط پرورش

این آزمایش به مدت ۸ هفته (در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴) در ۱۸ مخزن فایبرگلاس ۵۰۰ لیتری با استفاده از آب چاه مجموعه و آب رودخانه سفیدرود در بخش ونیروی مرکز بازسازی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی سد سنگر انجام شد. در طول دوره میانگین دمای آب ۰/۹ ± ۱۷/۱ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول ۰/۲ ± ۷/۸ میلی‌گرم بر لیتر و pH آب ۷/۵ تا ۷/۸ بود. سیستم پرورشی ماهیان به‌صورت باز بوده و شرایط نوری به‌صورت دوره نوری طبیعی تنظیم شد.

طراحی آزمایش

جهت انجام این تحقیق ۱۲۶ قطعه ماهی با وزن اولیه ۷/۵۶ ± ۴۵/۷۱ گرم و طول اولیه ۱/۵۳ ± ۲۵/۷۱ سانتی‌متر تحت شرایط محیطی یکسان توزیع شدند. ماهیان جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی (اکسیژن، دما و pH) به مدت ۱۵ روز با غذای کنسانتره متداول برای تغذیه ماهیان خاویاری، تغذیه گردیدند. طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گردید و شامل ۶ تیمار شاهد (فاقد گلوتامین)، تیمار ۱ (۵ گرم گلوتامین در هر کیلوگرم غذا)، تیمار ۲ (۱۰ گرم گلوتامین در هر کیلوگرم غذا)، تیمار ۳ (۱۵ گرم گلوتامین در هر کیلوگرم غذا)، تیمار ۴ (۲۰ گرم گلوتامین در هر کیلوگرم غذا) و تیمار ۵ (۳۰ گرم گلوتامین در هر کیلوگرم غذا) بود و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در این تحقیق از آمینواسید گلوتامین با خلوص صد درصد ساخت شرکت Biotech آمریکا استفاده شد و غلظت‌های آمینواسید گلوتامین بر اساس تحقیق Pohlenz و همکاران (۲۰۱۲b) انتخاب شد. آنالیز پروتئین و خاکستر به ترتیب با دستگاه کلدال مدل BAP40 آلمان و آنالیز چربی به وسیله دستگاه سوکسله مدل BOHR آلمان و درصد رطوبت به‌وسیله آون و دسیکاتور در آزمایشگاه ویرومد رشت انجام شد (AOAC, 1995). ترکیبات جیره غذایی مورد استفاده در این تحقیق در جدول ۱ و ترکیبات تقریبی جیره پایه در جدول ۲ ذکر گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

۱۰۰ × وزن نمونه/ (۶/۲۵ × ۰/۰۰۲۸ × حجم اسید سولفوریک مصرفی) = درصد پروتئین

۱۰۰ - ۱۰۰ × وزن نمونه اولیه / وزن کاغذ صافی - وزن نمونه بعد از دسیکاتور = درصد چربی

۱۰۰ × (وزن ظرف خالی - وزن ظرف با نمونه تر) / (وزن ظرف با نمونه خشک - وزن ظرف با نمونه تر) = درصد رطوبت

۱۰۰ × (وزن ظرف خالی - وزن ظرف با نمونه خشک) / (وزن ظرف خالی - وزن ظرف با خاکستر) = درصد خاکستر

جدول ۱ ترکیبات جیره‌های غذایی مورد استفاده در آزمایش.

	جیره					
تیمارها / ترکیبات جیره	شاهد (فاقد گلوتامین)	تیمار اول (۵ گرم گلوتامین)	تیمار دوم (۱۰ گرم گلوتامین)	تیمار سوم (۱۵ گرم گلوتامین)	تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین)	تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین)
آرد ماهی (٪)	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰	۵۴/۰
آرد گندم (٪)	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰	۱۸/۰
شیر خشک (٪)	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
کنجاله سویا (٪)	۸/۰	۸/۰	۸/۰	۸/۰	۸/۰	۸/۰
روغن ماهی (٪)	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰	۴/۰
گلوتن ذرت (٪)	۵/۰	۵/۰	۵/۰	۵/۰	۵/۰	۵/۰
مخمر (٪)	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰	۳/۰
مخلوط مواد معدنی (٪)	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳	۱/۳
مخلوط مواد ویتامینی (٪)	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷	۱/۷
گلوتامین (گرم بر کیلوگرم غذا)	-	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۳۰

جدول ۲ ترکیبات تقریبی جیره پایه.

	رطوبت	خاکستر	پروتئین	چربی	فیبر
ترکیبات تقریبی (٪)	۱۴/۲ ± ۰/۲	۱۰ ± ۲۰/۷	۴۹ ± ۰/۸	۱۴/۱ ± ۰/۲	۲ ± ۰/۱

با توجه به اندازه ماهیان، غذادهی به میزان ۳٪ وزن بیومس، به‌صورت دستی و در سه نوبت (در ساعات ۷، ۱۵ و ۲۳) انجام شد. غذا در هنگام غذادهی با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم توزین و در سطح مخازن توزیع گردید. زیست‌سنجی ماهیان در طول ۸ هفته پرورش هر ۱۵ روز یک‌بار (در مجموع ۴ بار) در تمام تیمارها و تکرارها و از کلیه ماهیان به‌صورت فردی انجام شد. به‌منظور کاهش استرس ماهیان هنگام زیست‌سنجی، ۱۲ ساعت قبل و بعد از زیست‌سنجی غذادهی قطع گردید.

اندازه‌گیری آنزیم‌ها

ماهیان ۴۸ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی نشدند تا دستگاه گوارش از مواد غذایی به‌خوبی تخلیه شده باشد. سپس ماهیان با استفاده از یک سوزن بلند قطع نخاع شدند و سریعاً در مجاورت یخ قرار گرفتند تا با حداقل رساندن تغییر فعالیت آنزیمی، کالبدشکافی صورت گیرد. جهت سنجش فعالیت آنزیم‌های گوارشی، روده ماهیان آماده گردید (Cahu et al. 1999). سپس، بلافاصله در شرایط انجماد در دمای ۱۹۶- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز نگهداری شدند (Kuz'mina et al. 2010). در آزمایشگاه نمونه‌ها از شرایط انجماد خارج و وزن گردیدند. بعد با نسبت وزنی به حجمی ۱ به ۵ با کلرید سدیم ۰/۲ مولار مخلوط شده و در حضور یخ عمل یکنواخت‌سازی با هموژنایزر (مدل DI18 Disperser) انجام شد (Cahu et al. 1999; Rungruangsak-Torrissen et al. 2002). سوسپانسیون حاصله با دور ۵۰۰۰ در دقیقه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، مایع رویی جدا شد و برای سنجش آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Pérez-Jiménez et al. 2007). برای سنجش فعالیت آنزیم لیپاز از امولسیون صمغ عربی-روغن زیتون به‌عنوان سوبسترا استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

صمغ عربی با روغن زیتون و مقداری یخ خرد و آب مقطر مخلوط و پس از صاف کردن با پشم شیشه، برای رقیق‌سازی نمونه از کلریدکلسیم ۰/۰۰۵ مولار استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم پروتئاز نیز از محلول آزوکازئین ۲/۵ درصد و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم از بافر (استات سدیم-گلایسین-فسفات) ۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۹ استفاده شد. برای سنجش فعالیت آنزیم آمیلاز از نشاسته به‌عنوان سوبسترا استفاده شد. نشاسته در بافر فسفات سدیم ۰/۰۲ مولار حاوی کلرید سدیم ۰/۰۰۶ مولار آماده شده و برای رقیق‌سازی نمونه از آب مقطر استفاده شد (Worthington, 1991).

بافت‌شناسی

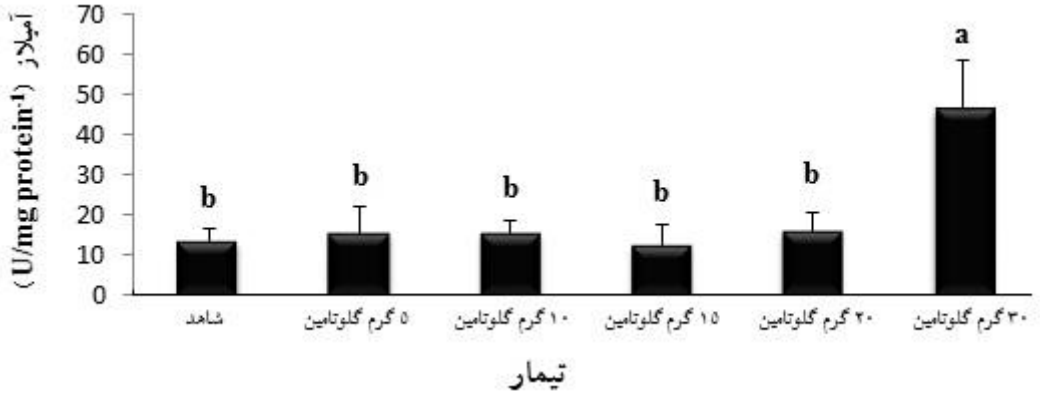
جهت بررسی هیستوپاتولوژیک بافت روده ماهیان به‌منظور بررسی طول پرز و اپی‌تلیوم روده یک سانتی‌متر از بافت روده در محلول بوئن فیکس شد. نمونه‌های فیکس شده توسط الکل ۱-بوتانول با درجات مختلف (۵۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۶) آبگیری شده و در مرحله بعدی عمل شفاف‌سازی (جایگزینی کلروفرم به‌جای الکل و جذب چربی بافت) صورت گرفت. پس از شفاف نمودن، نمونه‌های بافت روده به‌وسیله پارافین مذاب پارافینه و قالب‌گیری شدند (بهمنی و کاظمی، ۱۳۷۷؛ پوستی و همکاران، ۱۳۸۲). با استفاده از میکروتوم از قالب‌های پارافینه حاوی بافت روده برش‌های بافتی به ضخامت ۷ میکرون (Akhundov and Fedorov, 1995) تهیه و برش‌های بافتی به روش ائوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شدند. نمونه بافت‌ها پس از رنگ‌آمیزی به‌وسیله میکروسکوپ نوری (نیکون مدل E600) مجهز به دوربین (MD130، شرکت OME-TOP system، تایوان) و متصل به کامپیوتر مورد مطالعه قرار گرفتند (حلاجیان و همکاران، ۱۳۹۰). بعد از عکس‌برداری به‌منظور اندازه‌گیری طول پرز و اپی‌تلیوم روده ماهیان از نرم‌افزار Image J استفاده شد.

آنالیز آماری

برای تجزیه و تحلیل کلیه داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 18 و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2013 استفاده گردید. داده‌ها ابتدا جهت اطمینان از نرمال بودن با آزمون Kolmogorov-Smirnov بررسی شدند. به‌دلیل نرمال بودن توزیع داده‌ها، با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) در سطح اطمینان ۹۵٪ ابتدا اختلاف کلی بین میانگین‌ها مشخص و سپس با استفاده از آزمون دانکن (Duncan) گروه‌ها از یکدیگر تفکیک گردیدند.

نتایج

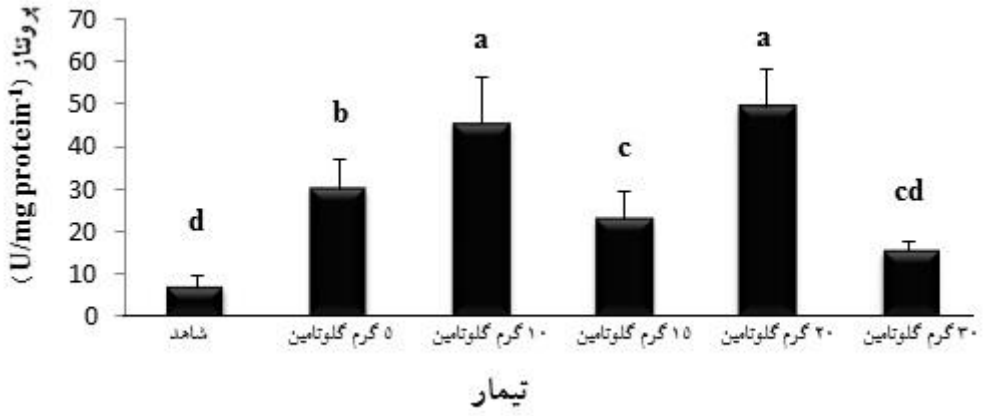
براساس آزمون واریانس یک‌طرفه آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز تیمارهای مختلف با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p<0/05$). بیشترین میزان آمیلاز و لیپاز روده در تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین) و بیشترین پروتئاز روده در تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین) مشاهده شد. در مقابل، کمترین میزان آمیلاز روده در تیمار سوم (۱۵ گرم گلوتامین)، کمترین پروتئاز روده در تیمار شاهد (فاقد گلوتامین) و کمترین لیپاز روده در تیمار اول (۵ گرم گلوتامین) بود (شکل های ۱ تا ۳).



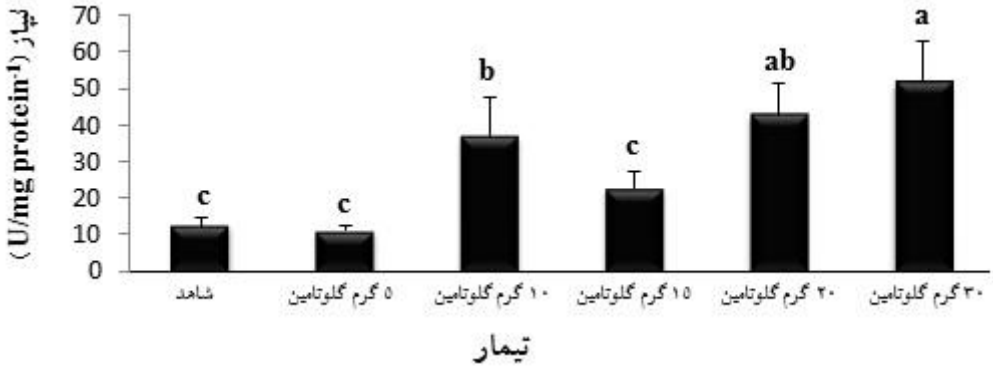
شکل ۱ میانگین آنزیم آمیلاز تاسماهی سیبری در تیمارهای مختلف.

www.SID.ir

Archive of SID

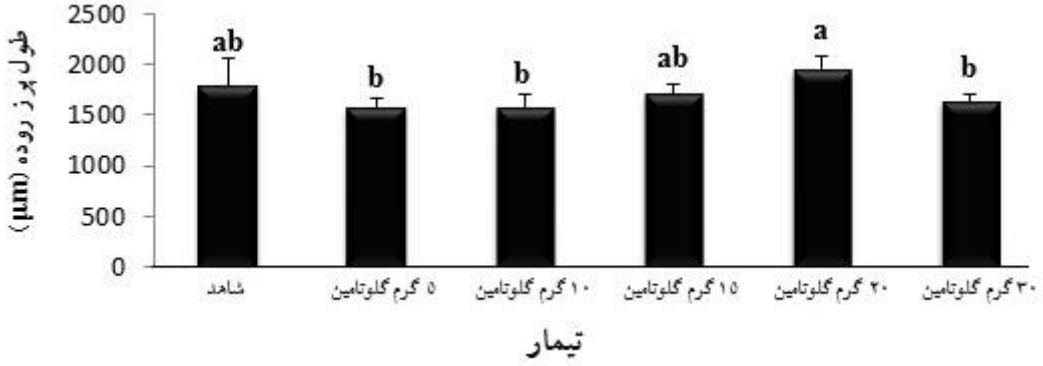


شکل ۲ میانگین آنزیم پروتئاز تاسماهی سیبری در تیمارهای مختلف.



شکل ۳ میانگین آنزیم لیپاز تاسماهی سیبری در تیمارهای مختلف.

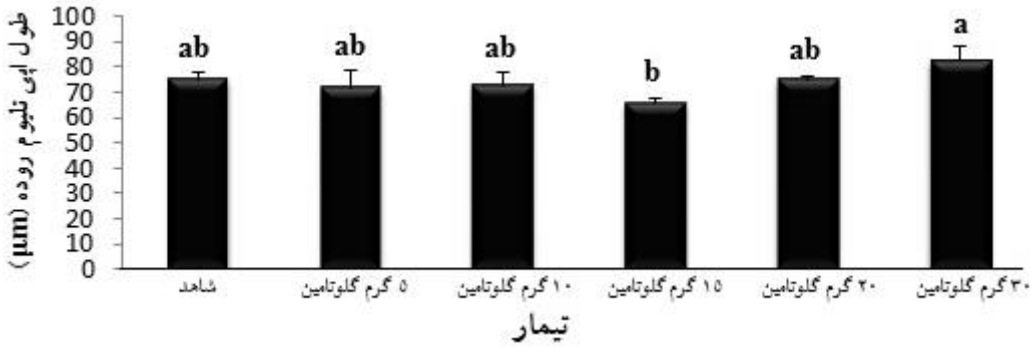
براساس آزمون واریانس یک‌طرفه اندازه طول پرز روده و اندازه اپی‌تلیوم روده بین تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($p<۰/۰۵$). بیشترین طول پرز روده در تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین) و بیشترین اندازه اپی‌تلیوم روده در تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین) مشاهده شد. در مقابل، کمترین طول پرز روده در تیمارهای اول و دوم (۵ و ۱۰ گرم گلوتامین)، کمترین اندازه اپی‌تلیوم روده در تیمار سوم (۱۵ گرم گلوتامین) بود (شکل‌های ۴ و ۵).



شکل ۴ میانگین تغییرات طول پرز روده بافت تاسماهی سیبری در تیمارهای مختلف.

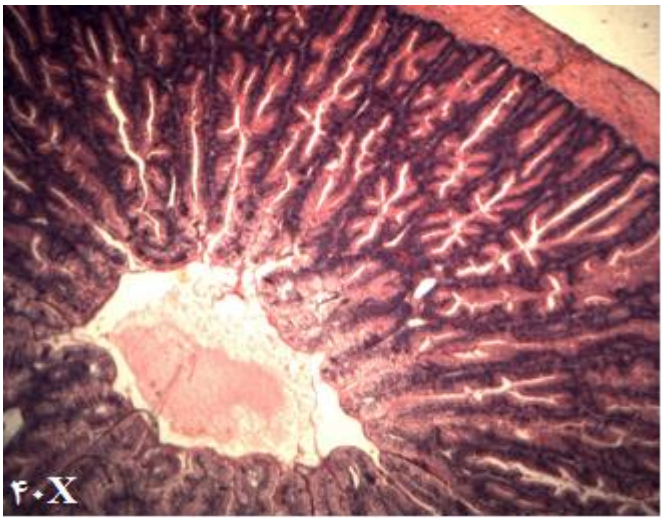
www.SID.ir

Archive of SID

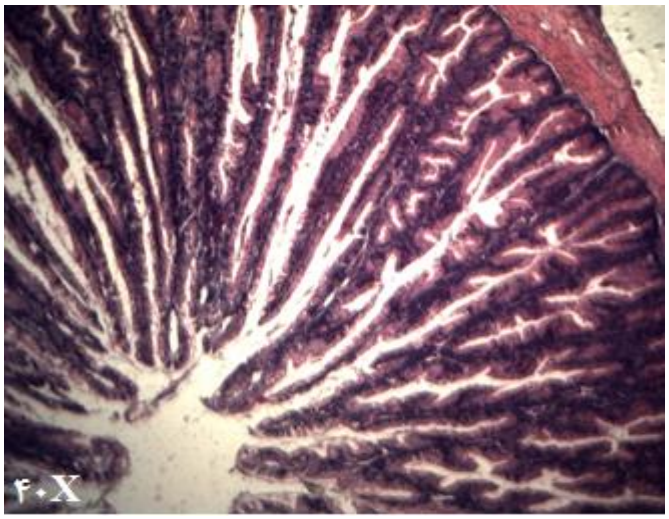


شکل ۵ میانگین تغییرات طول اپی‌تلیوم روده بافت تاسماهی سیبری در تیمارهای مختلف.

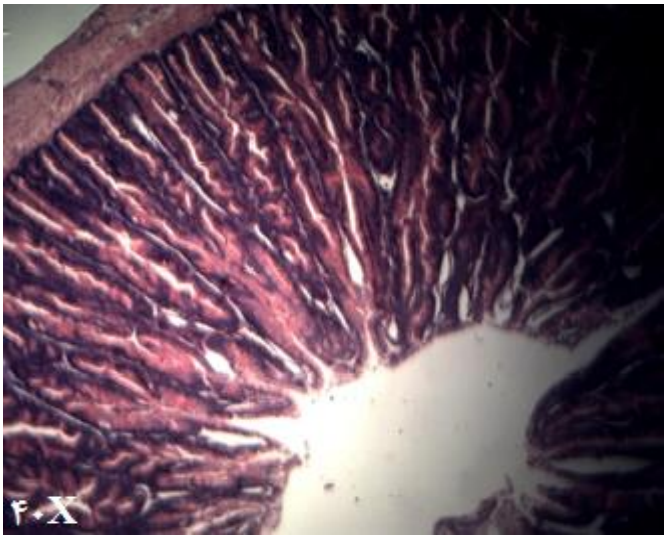
همچنین، به‌منظور بررسی تفاوت های حاصل از سطوح متفاوت گلوتامین در تیمارهای مختلف تصاویر بافت‌شناسی بافت روده تاسماهی سیبری در اشکال ۶ تا ۱۱ گنجانده شده است.



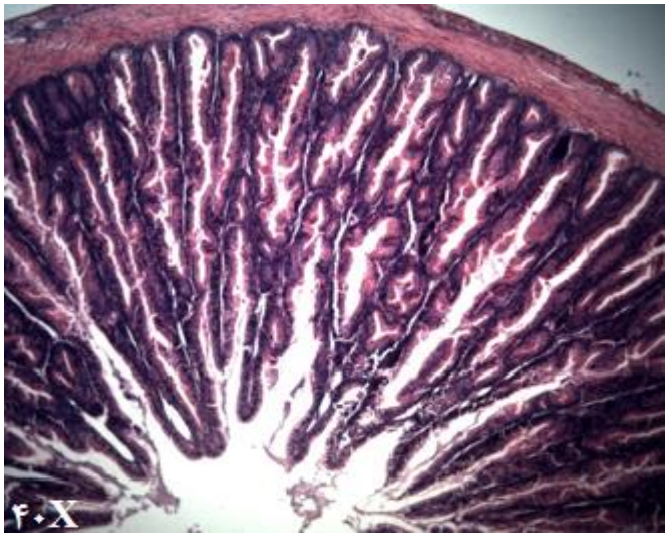
شکل ۶ بافت روده تاسماهی سیبری (تیمار شاهد: فاقد گلوتامین).



شکل ۷ بافت روده تاسماهی سیبری (تیمار اول: ۵ گرم گلوتامین).



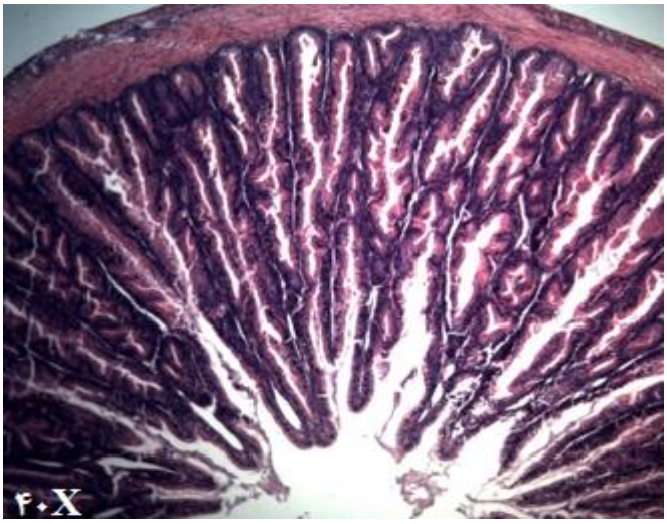
شکل ۸ بافت روده تاسماهی سیبری (تیمار دوم: ۱۰ گرم گلوتامین).



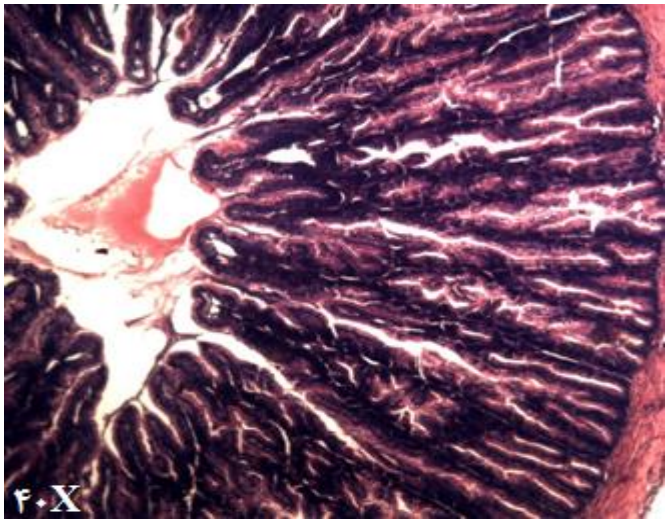
شکل ۹ بافت روده تاسماهی سیبری (تیمار سوم: ۱۵ گرم گلوتامین).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰ بافت روده تاسماهی سیبری (تیمار چهارم: ۲۰ گرم گلوتامین).



شکل ۱۱ بافت روده تاسماهی سیبری (تیمار پنجم: ۳۰ گرم گلوتامین).

بحث

این بررسی با هدف بررسی تاثیر گلوتامین بر آنزیم‌های گوارشی و ساختار روده در بچه تاسماهیان سیبری انجام شد. پرورش ماهیان در تراکم بالا سبب می‌شود تا احتیاج به جیره‌های متعادل و دارای کیفیت بالا و مواد مغذی بیشتر احساس شود (Ringo et al. 2010). جیره‌های مکمل با گلوتامین موجب بهبود افزایش وزن و بازده بالای خوراک در گونه‌های مختلف پرندگان و پستانداران می‌شوند (Bartell and Batal, 2007; Murakami et al. 2007; Wang et al. 2008; Soltan, 2009; Wu et al. 2011). دستگاه گوارش مکان اصلی هضم و جذب مواد غذایی می‌باشد و موجب تنظیم تعادل آمینواسیدهای می‌گردد (Reeds and Burrin, 2000; Wu et al. 2005; Wang et al. 2009). در این میان، روده عضو اصلی استفاده‌کننده و بهره‌بردار از گلوتامین می‌باشد (Windmueller and Spaeth, 1980).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر روی تاسماهی سیبری پرورشی نشان داد که میزان آنزیم‌های گوارشی ترشح شده در تیمارهای مختلف دارای اختلاف معناداری بود. بیشترین میزان آمیلاز و لیپاز روده در تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین) و بیشترین پروتئاز روده در تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین) مشاهده شد. موحدیان و همکاران (۱۳۹۵) با مطالعه ماهیان جوان صبیتی بیان کردند که استفاده از نسبت‌های مختلف مکمل‌های آمینواسید متیونین و لیزین بر فعالیت آنزیم‌های گوارشی تریپسین، کیموتریپسین، آلکالین فسفاتاز و لیپاز به‌طور معناداری تأثیر گذاشت. Yan و Qiu-Zhou (۲۰۰۶) بیان کردند که مکمل گلوتامین موجب افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده (پروتئاز، لیپاز، آلفا-آمیلاز) و فعالیت یونی (Na^+ و K^+) در روده می‌شود. مطالعه روی لارو ماهی کفشک *Cynoglossus semilaevis* نشان داد که مکمل گلوتامین خوراکی می‌تواند بقا و رشد را از طریق بهبود فعالیت آنزیم‌های گوارشی افزایش دهد و ماهیان تغذیه شده با رژیم غذایی با ۲٪ گلوتامین (بالاترین غلظت) دارای فعالیت آمیلاز بسیار بالاتری هم در بخش روده و هم در لوزالمعده نسبت به گروه شاهد بودند (Liu et al. 2015). همچنین، با افزایش مکمل گلوتامین در رژیم غذایی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) فعالیت تریپسین هپاتوپانکراس و روده، فعالیت لیپاز در پروگزیمال و روده میانی و هپاتوپانکراس، فسفاتاز قلیایی و گاما گلوتامیل ترانس پپتیداز در روده، فعالیت کراتین کیناز در روده میانی و دیستال به‌طور قابل توجهی افزایش یافت (Zhao et al. 2015).

نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که اندازه طول پرز روده و اندازه اپی‌تلیوم روده بین تیمارهای مختلف دارای اختلاف معنی‌دار بودند. بیشترین طول پرز روده در تیمار چهارم (۲۰ گرم گلوتامین) و بیشترین اندازه اپی‌تلیوم روده در تیمار پنجم (۳۰ گرم گلوتامین) مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج Yan و Qiu-Zhou (۲۰۰۶) مطابقت دارد. به‌طوری‌که مکمل گلوتامین موجب

www.SID.ir

Archive of SID

افزایش وزن روده و ارتفاع پرزهای روده گردید. Pohlenz و همکاران (۲۰۱۲a) با بررسی تاثیر غلظت-های مختلف گلوتامین جیره در گربه ماهی کانالی بیان نمودند که سطوح بالای گلوتامین بر ساختار میکروسکوپی روده دارای تاثیر مثبتی بوده و به‌طور معناداری باعث افزایش انتروسیت‌ها و ارتفاع میکروپرزهای بخش‌های قدامی، میانی و خلفی روده و افزایش نرخ مهاجرت انتروسیت‌ها گردید. گلوتامین برای انتروسیت‌ها به‌عنوان سازنده سوخت اصلی متابولیسم در دستگاه گوارش خدمت می‌کند. گلوتامین علاوه بر جلوگیری از آتروفی مخاط روده، باعث افزایش رشد روده، افزایش آنزیم‌های گوارشی در روده و افزایش طول پرزهای روده در قسمت دئودنوم (ابتدائی یا دوازدهه) و ژوژنوم (میانی) می‌گردد (Bartell and Batal, 2007; Murakami et al. 2007; Wang et al. 2008; Soltan, 2009; Wu et al. 2011). علاوه بر این، گلوتامین‌ها می‌توانند سبب افزایش بازیابی مساحت سطح پرزهای روده حیواناتی با روده ایسمیک زخمی گردند (Blikslager et al. 1999). جیره‌های غنی از گلوتامین باعث افزایش تعداد ویزیکول‌های جذبی و افزایش حمل و نقل آمینو اسیدها در سرتاسر مرز تماس با انتروسیت‌ها می‌گردد (Salloum et al. 1990; Frankel et al. 1993).

با توجه به بالاترین میزان ترشح آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز و لیپاز و بیشترین طول پرز و اندازه اپی‌تلیوم روده در تیمارهای چهارم و پنجم (۲۰ و ۳۰ گرم گلوتامین)، می‌توان گفت که این سطوح از آمینواسید گلوتامین توانست تاثیر مثبتی بر ساختار فیزیولوژی روده و آنزیم‌های گوارشی روده تاسماهی سیبری بگذارد. همچنین، پیشنهاد می‌گردد چنین تحقیقی روی سایر گونه‌ها نیز انجام گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه تمامی دوستانی که در به ثمر نشستن این تحقیق تلاش نموده‌اند ابراز می‌دارند.

منابع

افشار مازندران، ن. ۱۳۸۱. راهنمای علمی تغذیه و نهاده‌های غذایی و دارویی آبزیان در ایران. چاپ سما رنگ. ۲۱۶ ص.

بهمنی، م.، کاظمی، ر. ۱۳۷۷. مطالعه بافت‌شناسی روی گناد تاسماهیان پرورشی جوان. مجله علمی شیلات ایران ۷: ۱۶-۱.

پوستی، آ.، ادیب مرادی، م.، فضیلی، آ. ۱۳۸۲. بافت-شناسی مقایسه‌ای و تکنیک‌های بافت‌شناسی. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۴۶ ص.

حلاجیان، ع.، کاظمی، ر.، محسنی، م.، دژندیان، س.، یوسفی‌جوردهی، آ.، بهمنی، م.، پوردهقانی، م.، یزدانی، م.ع.، یگانه، ه. ۱۳۹۰. تکه‌برداری به روش جراحی و مطالعه بافت‌شناسی گناد تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) پرورشی. مجله تحقیقات دامپزشکی ۶۶: ۲۳۳-۲۲۹.

ستاری، م. ۱۳۸۱. ماهی شناسی (۱): تشریح و فیزیولوژی. انتشارات نقش مهر. ۶۵۹ ص.

سوداگر، م. ۱۳۸۴. بررسی مقایسه‌ای تاثیر افزایش برخی از مواد جاذب در جیره غذایی فیل ماهیان پرورشی به‌منظور افزایش تحریک غذاگیری و بالا بردن میزان رشد و بازماندگی. رساله دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۷۹ ص.

شریف‌روحانی، م.، ایران، ع.م. ۱۳۸۹. دستورالعمل‌های فنی موضوعی-محصولی، ماهیان خاویاری. وزارت جهاد کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. ۸۴ صفحه.

مجابی، ع. ۱۳۷۰. بیوشیمی درمانگاهی. انتشارات جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۳۷۲ ص.

موحدیان، ر.، ذاکری، م.، کوچنین، پ.، موسوی، س.م.، تقوی مقدم، ا. ۱۳۹۵. فعالیت آنزیم‌های گوارشی روده تحت تأثیر نسبت‌های مختلف مکمل‌های غذایی متیونین و لیزین در جیره غذایی ماهیان جوان صبیتی (*Sparidentex hasta*). مجله علمی شیلات ایران ۲۵: ۹۳-۷۹.

www.SID.ir

Archive of SID

Akhundov, M.M., Fedorov, K. 1995. Effect of exogenous estradiol on ovarian development in juvenile starlet (*Acipenser ruthenus*). Journal of Ichthyology 33: 109-120.

AOAC (Association of official Analytical chemist). 1995. Official Method of Analysis. 15th eds. AOAC. Washington, DC., USA.

Bartell, S.M., Batal, A.B. 2007. The effect of supplemental glutamine on growth performance, development of the gastrointestinal tract, and humoral immune response of broilers. Poultry Science 86: 1940-1947.

Bell, J.G., Sargent, J.R. 2003. Arachidonic acid in aquaculture feeds: current status and future opportunities. Aquaculture 218: 491-499.

Berg, L.S. 1948. Freshwater fisheries of the U.S.S.R. and adjacent countries. Jerusalem, p. 504.

Blikslager, A.T., Rhoads, J.M., Bristol, D.G., Roberts, M.C., Argenzio, R.A. 1999. Glutamine and transforming growth factor-α stimulate extracellular regulated kinases and enhance recovery of villous surface area in porcine ischemic-injured intestine. Surgery 125: 186-194.

Cahu, C.L., Zambonino Infante, J.L., Quazuguel, P., Le Gall M.M. 1999. Protein hydrolysate vs. fish meal in compound diets for 10-day old sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae. Aquaculture 171: 109-119.

Conte, F.S., Doroshov, S.I., Lutes, P.B., Strange, E.M. 1988. Hatchery manual for the white sturgeon Acipenser transmontanus Richardson with application to other North American Acipenseridae. Oakland, University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. 104 p.

Debnath, D., Pal, A.K., Sahu, N.P., Yengkokpam, S., Baruah, K., Choudhury, D., Venkateshwarlu, G. 2007. Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. Comparative Biochemistry and Physiology 146B: 107-114.

Frankel, W.L., Zhang, W., Afonso, J., Klurfeld, D.M., Don, S.H., Laitin, E., Deaton, D., Furth, E.E., Pietra, G.G., Naji, A., Rombeau, J.L. 1993. Glutamine enhancement of structureand function in transplanted small intestine in the rat. Journal of Parenteral and Enteral Nutrition 17: 47-55.

Hansen, A.C. 2009. Effect of replacing fish meal with plant protein in diet for Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). PhD thesis, Bergen University, 74 p.

Izquierdo, M.S., Montero, D., Robaina, L., Caballero, M.J., Rosenlund, G., Gines, R. 2005. Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed vegetable oils for a long-term period, Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding. Aquaculture 250: 431-444.

Koven, W., Rojas-García, C., Finn, R., Tandler, A., Rønnestad, I. 2002. Stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone cholecystokinin and on tryptic activity, in early-feeding herring larvae, *Clupea harengus*. Marine Biology 140: 1241-1247.

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.

Liu, J., Mai, K., Xu, W., Zhang, Y., Zhou, H., Ai, Q. 2015. Effects of dietary glutamine on survival, growth performance, activities of digestive enzyme, antioxidant status and hypoxia stress resistance of half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis* Günther) post larvae. Aquaculture 446: 48-56.

Medale, F., Corrze, G., Kaushik, S.J. 1995. Nutrition of farmed Siberian sturgeon. In: Proceedings of the Third internationall symposium on sturgeons. Gershanovic, A.D., Smith, T.I.J. (Eds.).

www.SID.ir

Archive of SID

VNIRO Publishing, Moscow, Russia, 289-298.

Miles, R.D., Chapman, F.A. 2007. The Concept of ideal protein in formulation of aquaculture feeds. University of Florida IFAS Extension, 144 p.

Moghim, M. 2013. Isolation, characterization and application of micro-satellite markers in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*. Ph.D. Thesis, University of Putra, Malaysia, 277 p.

Moyle, P.B. 1976. Inland Fishes of California. University California Press, Berkeley, CA, 405 p.

Murai, T. 1992. Protein nutrition of rainbow trout. Aquaculture 100: 191-207.

Murakami, A.E., Sakamoto, M.I., Natali, M.R.M., Souza, L.M.G., Franco, J.R.G. 2007. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. Poultry Science 86: 488-495.

Nordrum, S., Krogdahl, A., Røsjø, C., Olli, J.J., Holm, H. 2000. Effects of methionine, cycteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair-feeding regime. Aquaculture 186: 341-360.

Olmos, J., Ochoa, L., Paniagua, J. 2011. Functional feed assessment on *Litopenaeus vannamei* using 100% fish meal replacement by soybean meal, high levels of complex carbohydrates and *Bacillus probiotic* strains. Journal of Marine Drugs 9: 1119-1132.

Pérez-Jiménez, A., Guedes, M.J., Morales, A.E., Oliva-Teles, A. 2007. Metabolic responses to short starvation and refeeding in *Dicentrarchus labrax*. Effect of dietary composition. Aquaculture 265: 325-335.

Pohlenz, C., Buentello, A., Bakke, A., Gatlin, D.M. 2012a. Free dietary glutamine improves intestinal morphology and increases enterocyte migration rates, but has limited effects on plasma amino acid profile and growth performance of channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 370-371: 32-39.

Pohlenz, C., Buentello, A., Mwangi, W., Gatlin, D.M. 2012b. Arginine and glutamine supplementation to culture media improves the performance of various channel catfish immune cells. Fish and Shellfish Immunology 32: 762-768.

Reeds, P.J., Burrin, D.G. 2000. The gut and amino acid homeostasis. Nutrition 16: 666-668.

Ringo, E., Olsen, R.E., Gifstad, T., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemer, G.I., Bake, A.M. 2010. Prebiotic in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition 16: 117-136.

Ruban, G.I., Khodorevskaya, R.P. 2011. Caspian Sea sturgeon fishery: a historic overview. Journal of Applied Ichthyology 27: 199-208.

Rungruangsak-Torrissen, K., Rustad, A., Sunde, J., Eiane, S.A., Jensen, H.B., Opstvedt, J., Nygård, E., Samuelsen, T.A., Mundheim, H., Luzzana, U. 2002. In vitro digestibility based on fish crude enzyme extract for prediction of feed quality in growth trials. Journal of the Science of Food and Agriculture 82: 644-654.

Salloum, R.M., Souba, W.W., Fernandez, A., Stevens, B.R. 1990. Dietary modulation of small intestinal glutamine transport in intestinal brush border membrane vesicles of rats. Journal of Surgical Research 48: 635-638.

Soltan, M.A. 2009. Influence of dietary glutamine supplementation on growth performance, small intestinal morphology, immune response and some blood parameters of broiler chickens. International Journal of Poultry Science 8: 60-68.

Treves-Brown, K.M. 2013. Applied fish pharmacology. Springer Science and Business Media, 309 p.

www.SID.ir

Archive of SID

Waddell, D., Fredricks, K. 2005. Effects of glutamine supplement on the skeletal muscle contractile force of mice. American Journal of Undergraduate Research 4: 11-18.

Wang, J., Chen, L., Li, P., Li, X., Zhou, H., Wang, F., Li, D., Yin, Y., Wu, G. 2008. Gene expression is altered in piglet small intestine by weaning and dietary glutamine supplementation. Journal of Nutrition 138: 1025-1032.

Wang, W.W., Qiao, S.Y., Li, D.F. 2009. Amino acids and gut function. Amino Acids 37: 105-110.

Webster, C.C., Lim, C.E. 2002. Nutrient requirement and feeding of finfish for aquaculture. CAB International, CABI Publishing, 418 p.

Williot, P., Sabiau, L., Gessner, J., Arlati, G., Bronzi, P., Gulyas, T., Berni, P. 2001. Sturgeon farming in western Europe: recent developments and perspectives. Aquatic Living Resources 14: 367-374.

Windmueller, H.G., Spaeth, A.E. 1980. Respiratory fuels and nitrogen metabolism in vivo in small intestine of fed rats. Quantitative importance of glutamine, glutamate, and aspartate. The Journal of Biological Chemistry 255: 107-112.

Worthington, C.C. 1991. Worthington enzyme manual related Biochemical. Freehold, New Jersey, 212-215.

Wu, G., Bazer, F.W., Johnson, G.A., Knabe, D.A., Burghardt, R.C., Spencer, T.E., Li, X.L., Wang, J.J. 2011. Important roles for L-glutamine in swine nutrition and production. Journal of Animal Science 89: 2017-2030.

Wu, G., Flynn, N.E., Yan, W., Barstow, D.G. 1995. Glutamine metabolism in chick enterocytes: absence of pyrroline-5-carboxylase synthase and citrulline synthesis. Biochemical Journal 306: 717-721.

Wu, G., Knabe, D.A., Flynn, N.E. 2005. Amino acid metabolism in the small intestine: biochemical bases and nutritional significance. In: Biology of Growing Animals. Burrin, D.G., Mersmann, H.J. (Eds.). Elsevier, 107-126.

Yan, L., Qiu-Zhou, X. 2006. Dietary glutamine supplementation improves structure and function of intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquaculture 256: 389-394.

Zhao, Y., Hu, Y., Zhou, X.Q., Zeng, X.Y., Feng, L., Liu, Y., Jiang, W.D., Li, S.H., Li, D.B., Wu, X.Q., Wu, C.M., Jiang, J. 2015. Effects of dietary glutamate supplementation on growth performance, digestive enzyme activities and antioxidant capacity in intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquaculture Nutrition 21: 935-941.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of glutamine on digestive enzymes and intestinal structure of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt 1869)

Saman Darvishi[1], Hossein Khara*[1], Mohaddeseh Ahmadnezhad[2]
1- Department of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Guilan, Iran
2- Iranian Fisheries Science Research Institute, Inland Waters Aquaculture Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Guilan, Iran

Received 11 October 2018; accepted 16 February 2019

Abstract
The Siberian sturgeon is a suitable species for using in aquaculture industry. The purpose of this study was to investigate the effect of glutamine on intestinal digestive enzymes and histological structure of intestine in Siberian sturgeon and to determine the optimal amount of glutamine in rearing conditions. This study was performed on 126 fish with a mean weight of 45.71 ± 7.56 g in six treatments (control, 5, 10, 15, 20 and 30 g glutamine /kg feed) and three replicates during 8 weeks in Shahid Dr. Beheshti Sturgeon Restoration and Genetic Conservation Center in Sangar, Rasht. Fish intestine was prepared for study the digestive enzymes activity and Arabic gum-olive oil emulsion, azocasein 2.5% and starch were used as substrate to measure lipase, protease and amylase enzymes, respectively. For examination of villus length and intestinal epithelium, 1 cm of intestinal tissue was fixed in Bouin's solution. The samples were then dehydrated, clarified, paraffin-embedded and molded. After sectioning tissue, staining was performed by eosin-hematoxylin method. The results showed that amylase, protease and lipase were significantly different between treatments ($p<0.05$). The highest amount of amylase and lipase levels was observed in treatment of 30 g glutamine and the highest amount of protease was in treatment of 20 g glutamine. Also, the size of intestinal villi length and intestinal epithelium were significantly different among treatments ($p<0.05$). The highest intestinal villi length was observed in treatment of 20 g glutamine and the highest intestinal epithelium was seen in treatment of 30 g glutamine. Because of the highest secretion of amylase, protease and lipase enzymes and the highest villus length and intestinal epithelium in treatments of 20 and 30 g glutamine, these levels could have a positive effect on the structure of intestinal physiology and the digestive enzymes in this fish.

Keywords: Glutamine, Digestive enzymes, Intestinal structure, Siberian sturgeon.

h.khara1974@yahoo.com

www.SID.ir