بررسی قابلیت تحمل به آب دریا و فعالیت آنزیم Na^+, K^+-ATPase در طی مراحل مختلف رشد (پار و اسمولت) بچه‌ماهیان آزاد دریای خزر

محمد صیاد بورانی

تنکابن، مرکز تحقیقات ماهیان سردابی کشور

تاریخ دریافت: ۸۷/۷/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۱۵

چکیده

این تحقیق بمنظور تعیین مراحل پار و اسمولت و تعیین اندازه‌ای از بچه ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius* Kessler,1877) جهت تحمل آب دریای خزر انجام گرفت. در این تحقیق از ۴ گروه وزنی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی در سه تیمار شوری آب دریا (۱۱/۵-۱۱ در هزار)، آب ساحل (۷ در هزار) و آب شیرین و با ۳ تکرار استفاده شد. متوسط فشار اسمزی بچه ماهیان ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی در زمان صفر بترتیب معادل ۷/۱±۳۰۱، ۱۴/۶±۳۳۴/۷، ۶±۳۰۷/۷ و ۸/۷±۳۳۱/۳ میلی اسمول در لیتر و متوسط فشار اسمزی پس از ۲۴۰ ساعت ماندگاری در آب دریای خزر بترتیب ۱۳/۴±۳۴۶/۵، ۶/۷±۳۲۵/۳، ۹±۳۲۱ و ۰/۵۳±۳۲۹ میلی‌اسمول در لیتر محاسبه گردید. آبشش بچه ماهیان ۵ گرمی، سطح پایینی از فعالیت آنزیم Na^+,K^+-ATPase (بر اساس روش غیر مستقیم سنجش فسفر معدنی آزاد شده از ATP) به میزان ۳/۲ تا ۶/۱ میکرومول فسفات/ میلی‌گرم پروتئین در ساعت را نشان داد. در همه گروههای وزنی میزان فعالیت آنزیم فوق در بچه‌ماهیان موجود در آب دریا بیش از میزان فعالیت آنزیم فوق در آب ۷ در هزار بود. در گروه ۱۰ گرمی در زمان صفر (قبل از مقابله با آب خزر) سطح بالایی از آنزیم مشاهده شد که دارای اختلاف معنی‌دار با گروه وزنی ۲۰ گرمی بود ($P<0/05$). این وضعیت را می‌توان به تغییرات متابولیک و گذار به شرایط آمادگی برای مهاجرت نسبت داد (مطابقت با تعریف پار- اسمولت). در صورتیکه بچه‌ماهیان ۱۵ و ۲۰ گرمی این مرحله را پشت سر گذاشته و ویژگیهای مرحله اسمولت را نشان می‌دهند.

واژه های کلیدی: *Salmo trutta caspius*، تنظیم اسمزی، آنزیم Na^+,K^+-ATPase

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۵۶۲۲۲۷-۰۱۹۲ ، پست الکترونیکی: mohammadborani@yahoo.com

مقدمه

ماهی آزاد دریای خزر از جمله ماهیان مهاجر رودرو (آنادرموس) و بومی دریای خزر می‌باشد که از ارزش اقتصادی و مقبولیت ویژه برخوردار بوده و با قیمت بسیار بالایی عرضه می گردد.

در حال حاضر مهاجرت و تکثیر ماهی آزاد خزر در رودخانه تنکابن صورت می‌گیرد و در این رودخانه نیز به دلیل وجود موانع از جمله احداث پل‌ها، ماهی قادر به مهاجرت به بالادست رودخانه و تکثیر نیست. طی سالهای ۱۳۷۰ تا ۱۳۸۰ ضریب بقاء این ماهیان ۰/۴ درصد محاسبه گردید (۲).

گونه‌های جنس Salmo و Onchorhynchus با تغییر شکل از Parr به اسمولت برای زندگی دریایی مهیا می شوند. تغییر شکل پار به اسمولت (Smoltification) در بچه‌ماهیان آزاد، با تغییرات رفتاری، فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مورفولوژیک همراه است. این تغییرات باعث افزایش فعالیت آنزیم Na^+- K^+-ATPase شده و این آنزیم آبششی عملکرد تنظیم اسمزی در ماهی را متعادل می‌کند و به

عنوان یکی از بهترین شاخص‌های Smoltification مورد توجه است (۲۲).

هنگامی که بچه‌ماهی در زمان‌های مقتضی (به لحاظ رشد) رها سازی شوند. اندازه بزرگتر بچه ماهی به دلیل ظرفیت شنا کردن، فرار از شکارچی و توانایی صید عناصر غذایی سودمندترخواهد بود (۱۱).

بررسی اسمولت شدن ماهی آزاد دریای خزر و تشخیص مراحل مختلف رشد بچه‌ماهی (پار و اسمولت) می‌تواند اندازه قابل تحمل بچه‌ماهی به آب دریا را مشخص نموده و این امر در افزایش تولید و ضریب بازگشت شیلاتی این ماهی نقش بسزایی دارد. در میان عوامل فیزیولوژیک، دستگاه تنظیم اسمزی و چگونگی تشکیل و تکامل اندام-های تنظیم کننده بمنظور تعیین اندازه مناسب رهاسازی یا پرورش دریائی اهمیت بیشتری دارند (۳).

در میان اندامهای دخیل در تنظیم اسمزی، آبشش دارای نقش کلیدی در تعادل آب و املاح بدن می باشد. نقش عمده دفع یون‌های تک ظرفیتی همانند سدیم و کلر بر عهده سلولهای کلراید آبششی است. در شرایط دریایی ماهیان سدیم را دفع و پتاسیم را جذب می کنند. این واکنش بوسیله آنزیم Na^+,K^+-ATPase و برخلاف شیب غلظتی انجام می‌شود، لذا انرژی زیادی باید مصرف گردد و بخاطر همین تعداد سلولهای کلراید در آبشش ماهیان زیاد است (۱۸).

نتایج این مطالعه در رهاسازی، در پرورش ماهی آزاد دریای خزر در قفس و همچنین موضوع Sea ranching کاربرد دارد.

مواد و روشها

در این تحقیق از جمعیت بچه ماهیان آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius* Kessler, *1877*) حاصل تولید مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید باهنرکلاردشت از مولدین صید شده (نژاد پائیزه) در نزدیک دهانه رودخانه تنکابن در سال های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ استفاده شد.

عملیات و اجرای تیمارها در ایستگاه تحقیقاتی تکثیر و پرورش ماهیان دریایی (واقع در ساحل غازیان بندرانزلی) در سالهای ۸۳-۱۳۸۲ انجام گرفت. جهت تطابق، بچه ماهیان حدود یک ماه در حوضچه‌های گرد بتونی ایستگاه ساحل غازیان با چرخش آب شیرین و هوادهی قرار گرفتند. برای انجام عملیات تیمارداری، ۴ گروه وزنی بچه ماهیان با متوسط وزن ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی مستقیماً به وان های ۱۰۰ لیتری و با ۳ سطح شوری آب شیرین، ۷ در هزار و آب دریای خزر (۱۱/۵-۱۱ در هزار) مجهز به سیستم هواده مرکزی انتقال یافتند. بچه ماهیان تحت شرایط نور طبیعی قرار داشتند. بنابراین با توجه به ۴ گروه وزنی و ۳ سطح شوری و با ۳ تکرار مجموعاً از ۳۶ پلات آزمایشی استفاده شد.

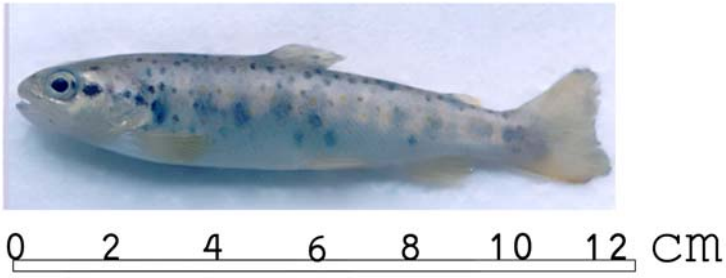
تقسیم بچه ماهیان در تیمارها برای حصول زی توده یکسان در هر وان بر مبنای ۵ گرم در لیتر صورت گرفت (۴).

میزان تعویض آب روزانه حدود۲۰٪ بوده و غذادهی در تمام مدت آزمایش یکبار در روز بوسیله غذای پلت مخصوص آزاد ماهیان (FFt) به میزان ۲٪ وزن بدن انجام می گرفت (۴).

سنجش شوری آب بوسیله دستگاه شوری‌سنج BECKMAN مدل Portable, Rs- 7B تعیین شد.

در زیست سنجی بچه ماهیان طول با دقت ۱ میلی‌متر و وزن با دقت ۰/۱ گرم مورد سنجش قرار گرفت. پس از قرار گرفتن بچه‌ماهیان در پلات‌ها در فواصل زمانی۰، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۷۲، ۱۶۸، ۲۴۰ ساعت، خون‌گیری از ساقه دمی بوسیله لوله‌های مویین هپارینه انجام شد. برای اندازه‌گیری فشار اسمزی، از اسمومتر (مدل ۱۳: Type. Nr.9610003، ساخت شرکت Roebling آلمان) استفاده شد. این دستگاه

بر اساس نقطه انجماد مایع مورد آزمایش، فشار اسمزی را بر حسب میلی اسمول در لیتر تعیین می‌کند (۱۴).



تصویر ۱- نمایی از بچه‌ماهی آزاد خزر در تیمار آب دریای خزر

برای تثبیت نمونه‌های بافت آبشش، نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت در محلول فیکساتیوبوئن و پس از ۷۲ ساعت در اتانول ۷۰ درجه غوطه ور شدند. مطالعات بافتی براساس بافت‌شناسی کلاسیک انجام گرفت و برای تهیه مقاطع بافتی، نمونه‌ها از مراحل آبگیری، شفاف سازی، پارافینه شدن، قالب گیری، برش، رنگ آمیزی و مونته کردن عبور داده شدند. جهت تشخیص بهتر سلولهای مختلف آبشش از روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین – ائوزین استفاده شد (۱).

فعالیت آنزیم Na^{+},K^{+}-ATPase، بعنوان تولید فسفات غیر آلی (Pi) اندازه‌گیری شد و ارزیابی آنزیم با روش Zaugg (۱۹۸۲) به انجام رسید (۲۱).

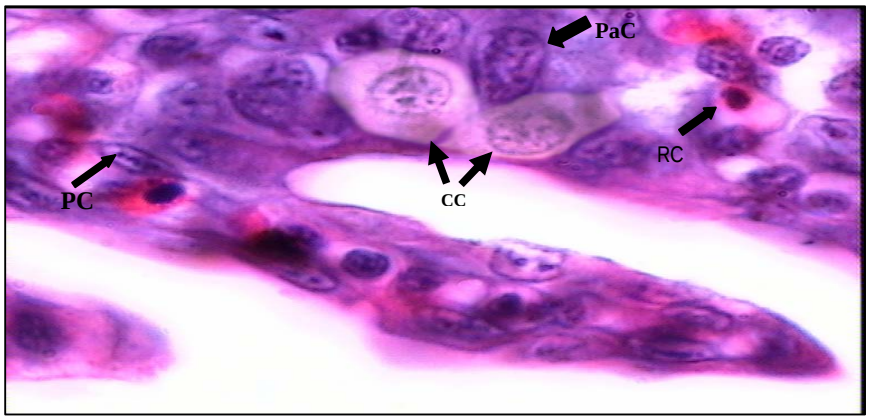
داده‌های زیست‌سنجی با روش‌های عمومی آمار توصیفی مورد پردازش و میانگین‌گیری قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه با سطح اطمینان ۹۵٪ مورد بررسی قرار گرفتند و در جداسازی گروه‌های همگن بر حسب کلاسه‌های وزنی و شوری و مدت زمان قرارگیری از آزمون توکی استفاده شد. عملیات یاد شده در فضای نرم افزار SPSS انجام گرفت. در ترسیم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

زیست سنجی بچه ماهیان: میانگین وزن بچه ماهیان در گروه‌های وزنی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی بترتیب ۴/۸±۰/۸، ۹/۴±۱، ۱۴/۵±۰/۹ و ۱۹ /۳±۱/۱ گرم بوده که تفاوت معنی‌داری ما بین گروه‌های وزنی مشاهده می‌شود. بنابراین سورت‌بندی بچه‌ماهیان با دقت انجام گرفته است.

میانگین طول بچه ماهیان زیست سنجی شده در گروه های وزنی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی بترتیب ۸ ±۰/۲، ۹/۶ ±۰/۰۳، ۱۱/۲ ± ۰/۰۳ و ۱۲/۳ ±۰/۰۳۷ سانتی‌متر محاسبه گردید(تصویر ۱).

سلولهای کلراید آبشش : در تصویر ۲، نمایی از برش طولی بافت آبشش بچه ماهی آزاد خزری با بزرگنمایی X۱۱۶ نشان داده شده و در این تصویر انواع مختلفی از سلول‌ها همانند سلول‌های تنفسی، سلول‌های پشتیبان (پیلار)، سلول‌های سنگفرشی (Pavement cells)، گلبول-های قرمز خون (Red cells) و سلول‌های کلراید دیده می-شود. سلول‌های کلراید معمولاً در پایه تیغه‌های ثانویه قرار داشته و در مقایسه با سایر سلول‌ها بزرگتر و روشن‌تر هستند. سلول‌های پهن سنگفرشی با لبه‌ای ظریف و به شکل اثر انگشت، خارجی‌ترین لایه بافت پوششی تیغه‌های اولیه را تشکیل می‌دهند. در بافت پوششی تیغه‌های ثانویه تعداد زیادی سلول‌های پشتیبان وجود دارد. در دفع یون-های تک ظرفیتی همانند سدیم و پتاسیم، آنزیم فسفاتاز آبششی نقش و اهمیت بسزائی داشته و این آنزیم در سلول‌های کلراید آبشش قرار دارد.



CC =سلولهای کلراید، **PC** = سلول پیلار ، **PaC** = سلول سنگفرشی ،**RC** = گلبول قرمز

تصویر ۲- نمایی از برش طولی بافت آبشش بچه‌ماهی آزاد دریای خزر با بزرگنمایی ۱۱۶ X (H & E)

تغییرات میزان فعالیت آنزیم:Na+,K+,ATPase : بچه ماهیان ۵ گرمی: بر اساس آنالیز واریانس یکطرفه، اختلاف معنی‌داری به لحاظ این متغیر فیزیولوژیک در بین میانگین-های محاسبه شده طی زمان‌های مختلف در آب ۷ در هزار وجود نداشت.

در آب دریای خزر انتظار می‌رفت که میزان فعالیت آنزیم با افزایش شوری زیاد شود (بدلیل سطح تبادلات یونی بیشتر) ولی تغییر چندانی نسبت به زمان صفر یا سطح این آنزیم در آب ۷ در هزار مشاهده نگردید، بطوریکه میزان فعالیت آنزیم در سه گروه زمانی صفر، ۳ و ۱۲ ساعت تقریباً یکسان بود و در زمان های ۷۲ و ۱۶۸ ساعت مختصر افزایشی در سطح این آنزیم مشاهده گردید. اختلاف معنی‌داری بین میانگینهای این متغیر فیزیولوژیک در زمانهای مختلف وجود نداشته است (جدولهای۱و۲).

بچه ماهیان ۱۰ گرمی : اختلاف معنی‌داری بین میانگین های سنجش این آنزیم در تیمارهای آب دریای خزر و آب ۷ در هزار در مقاطع زمانی مختلف مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

بچه ماهیان ۱۵ گرمی : پس از انتقال بچه‌ماهیان ۱۵ گرمی از آب شیرین (گروه شاهد) به آب ۷ در هزار، نوساناتی در فعالیت آنزیم در زمان های مختلف مشاهده گردید که در مقایسه با قرارگیری آن‌ها در آب دریا کمتر بود. بطوریکه میزان فعالیت از حدود ۱/۷۴ ± ۵/۲ در زمان صفر (آب شیرین) به حدود ۱/۸۹±۰/۳۵ در ۱۲ ساعت و ۰/۷۲ ± ۲/۱ میکرومول فسفات/ میلی گرم پروتئین در ساعت در زمان ۱۶۸ ساعت رسیده است. در حقیقت بدلیل سطح کم تبادلات یونی در آب ۷ در هزار، سطح فعالیت آنزیم در همان مقادیر بین ۱/۸۹ تا ۳/۹۵ میکرومول فسفات/ میلی-گرم پروتئین در ساعت باقی مانده است. مقایسه میانگین‌ها در زمان‌های مختلف قرارگیری در آب ۷ در هزار نشان داده که اختلاف معنی‌داری بین این سطوح وجود ندارد (sig=/۰۷ F= ۲/۸۷).

با انتقال بچه‌ماهیان به آب دریای خزر، افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطح فعالیت آنزیم در ساعت‌های اولیه قرارگیری (۳ ساعت) رخ داد که این افزایش نسبت به زمان صفر حدود ۱/۶ برابر بود (۵/۷ ± ۱۳/۴۲ میکرومول فسفات/ میلی گرم پروتئین در ساعت). سطح فعالیت این آنزیم در گروه ۱۶۸ ساعته نسبت به گروه شاهد ۲۳٪ رشد نشان می‌دهد. مقایسه میانگین‌ها حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار بین گروه زمانی ۳ ساعته با سایر گروه‌های زمانی می‌باشد. از مجموع مطالب فوق می‌توان نتیجه گرفت که

با انتقال بچه‌ماهیان ۱۵ گرمی به آب دریای خزر، بدلیل گسترده بودن سطح تبادلات یونی (در مقایسه با آب ۷ در هزار) افزایش قابل ملاحظه‌ای در سطح این آنزیم در همان ساعت‌های اولیه مشاهده گردیده و این گروه وزنی قابلیت سازگاری با آب دریا را دارد. با انتقال همین گروه وزنی به آب ۷ در هزار، سطح تبادلات یونی و سطح فعالیت آنزیم از سطح آن در آب دریا کمتر گردید.

بچه ماهیان ۲۰ گرمی: پس از انتقال بچه‌ماهیان ۲۰ گرمی از آب شیرین به آب ۷ در هزار تغییرات چندانی در سطح فعالیت این آنزیم در گروه‌های زمانی مختلف مشاهده نگردید. آنالیز واریانس یکطرفه، عدم اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های زمانی مختلف را تائید می‌کند (sig ۰/۷۱۲ , F=۰/۵۳۸).

در تیمار آب دریای خزر، سطح فعالیت آنزیم از ۳/۹۴±۲/۷ میکرومول فسفات/ میلی‌گرم پروتئین در ساعت (زمان صفر) به ۳/۴ ± ۲۲ میکرومول فسفات/ میلی گرم پروتئین در ساعت (پس از ۳ ساعت قرارگیری در آب دریای خزر) رسید که افزایشی حدود ۴/۵ برابر داشته و پس از این زمان میزان فعالیت آنزیم کاهش یافت (در مقایسه با ۳ ساعت) و پس از ۱۶۸ ساعت ماندگاری به حدود ۵/۹±۰/۳۵ میکرومول فسفات/ میلی گرم پروتئین در ساعت رسید که نسبت به زمان صفر افزایشی حدود ۴۹/۷ درصد را نشان می‌دهد. تفاوت معنی‌داری بین میانگین این شاخص در گروه زمانی ۳ ساعته با سایر گروه‌های زمانی وجود دارد ولی در سایر گروه‌ها اختلاف دیده نشد.

نتایج نشان داد که بچه ماهیان ۲۰گرمی در آب دریای خزر، سطح تبادلات یونی گسترده‌تری را در مقایسه با آب ۷ در هزار بویژه در ساعت‌های اولیه انجام می‌دهند و این گروه وزنی نیز قابلیت سازگاری با آب دریا را دارند.

براساس آزمون توکی با سطح احتمال ۵٪، میانگین میزان فعالیت آنزیم بافت آبشش بچه ماهی۵ گرمی در زمان ۳ ساعته با گروه های ۱۵ و ۲۰ گرمی تفاوت معنی‌دار داشته ولی بین گروه های ۵ و ۱۰ گرمی تفاوت معنی‌داری در زمان ۳ ساعت دیده نشد(جدولهای۱و۲).

جدول ۱- میزان فعالیت آنزیم Na^+,K^+-ATPase بافت آبشش *بچه ماهیان آزاد دریای خزر* پس از قرارگیری در تیمارهای شوری (µmol /h P/mg protein)

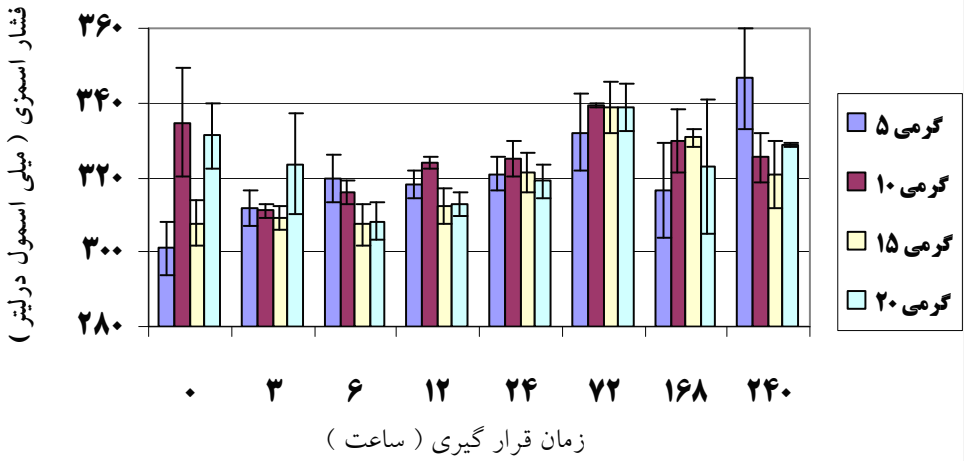
زمان / گروه وزنی	تیمار شوری	ساعت ۰	ساعت ۳	ساعت ۱۲	ساعت ۷۲	ساعت ۱۶۸
۵ گرمی	آب دریای خزر	۴/۳±۰/۹	۴/۴±۲/۲	۴/۵±۱/۵	۶/۱±۱/۵۶	۶/۱±۰/۴۴
	آب ۷ درهزار	۴/۳±۰/۹	۴/۸±۰/۸	۳/۱۶±۲/۵	۵/۴۴±۱/۴	۵/۲±۰/۵
۱۰ گرمی	آب دریای خزر	۹/۲±۴/۳	۷/۴±۰/۶۴	۷/۴۵±۳/۶	۹/۲±۱/۳	۹/۳۴±۰/۱۹
	آب ۷ درهزار	۹/۲±۴/۳	۲/۳±۰/۵۶	۲/۳۳±۱/۸	۱/۴±۰/۳	۳/۷±۲/۹۷
۱۵ گرمی	آب دریای خزر	۵/۲±۱/۷۴ b	۱۳/۴±۰/۷ a	۲/۸۲±۱/۴۵ b	۶/۴±۱/۹۵ b	۶/۴±۲ b
	آب ۷ درهزار	۵/۲±۱/۷۴	۳/۹۵±۰/۶	۱/۸۹±۰/۳۵	۳/۶۱±۲/۶۳	۲/۱±۰/۷۲
۲۰ گرمی	آب دریای خزر	۳/۹۴±۲/۷ b	۲۲±۳/۴ a	۵/۵۴±۰/۴۵ b	۴/۶±۱/۳ b	۵/۹±۰/۳۵ b
	آب ۷ درهزار	۳/۹۴±۲/۷	۳/۹±۲/۴	۴/۳±۱/۵	۲/۷±۰/۲۹	۲/۴±۰/۷

در سطرهای حروف گذاری نشده اختلاف معنی دار بین میانگین ها موجود نیست. ارقام دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی دار می باشند. تفاوت معنی دار داده ها در مقاطع زمانی مختلف به تفکیک گروه وزنی و سطح شوری ذکر شده است (آزمون توکی-P<۰/۰۵).

جدول ۲- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم Na^+,K^+– ATPase بافت آبشش بچه ماهیان آزاد خزری در گروه شاهد. (زمان صفر) و پس از قرارگیری در تیمار آب دریای خزر

تیمار	میزان فعالیت آنزیم (µmol P/mg protein/h)
بچه ماهیان ۵ گرمی- زمان صفر (آب شیرین)	۴/۳±۰/۹ ceg
بچه ماهیان ۵ گرمی- زمان ۳ ساعت	۴/۴±۲/۲ ceg
بچه ماهیان ۵ گرمی- زمان ۷۲ ساعت	۶/۱±۱/۵۶ ceg
بچه ماهیان ۱۰ گرمی- زمان صفر (آب شیرین)	۹/۲±۴/۳ be
بچه ماهیان ۱۰ گرمی- زمان ۳ ساعت	۷/۴±۰/۶۴ ceg
بچه ماهیان ۱۰ گرمی- زمان ۷۲ ساعت	۹/۲±۱/۳ bdg
بچه ماهیان ۱۵ گرمی- زمان صفر (آب شیرین)	۵/۲±۱/۷۴ceg
بچه ماهیان ۱۵ گرمی- زمان ۳ ساعت	۱۳/۴±۰/۷ b
بچه ماهیان ۱۵ گرمی- زمان ۷۲ ساعت	۶/۴±۱/۹۵ ceg
بچه ماهیان ۲۰ گرمی- زمان صفر (آب شیرین)	۳/۹۴±۲/۷ cd
بچه ماهیان ۲۰ گرمی- زمان ۳ ساعت	۲۲±۳/۴ a
بچه ماهیان ۲۰ گرمی- زمان ۷۲ ساعت	۴/۶±۱/۳ ceg

ارقام دارای حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار می باشند (آزمون توکی-۰/۰۵> P) زمان ۳ و ۷۲ ساعت تیمار آب دریای خزر با شوری ۱۱/۵- ۱۱ در هزار است.



نمودار ۱- نوسانات فشار اسمزی بچه ماهیان آزاد دریای خزر در تیمار آب دریای خزر

تغییرات فشار اسمزی پلاسما: سطح فشار اسمزی پس از ۲۴۰ ساعت قرارگیری بچه‌ماهیان ۵ گرمی در آب دریای خزر معادل ۱۳/۴ ± ۳۴۶/۵ میلی اسمول در لیتر (حداکثر ۳۶۰ میلی اسمول در لیتر) بوده که در مقایسه با زمان صفر (۷± ۳۰۱ میلی اسمول در لیتر) افزایشی حدود ۱۵/۱٪ را نشان داده که این افزایش معنی‌دار بوده است (آزمون توکی – $P< ۰/۰۵$). در سایر زمان‌ها نیز مقدار فشار اسمزی بالاتر از زمان صفر می‌باشد. بنابراین بچه‌ماهیان ۵ گرمی موجود در آب دریا قادر نبوده‌اند سطح فشار اسمزی خود را به سطح اولیه فشار اسمزی پلاسمای خون برسانند. سطح فشار اسمزی در گروه های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی در زمان صفر بترتیب ۱۴/۶ ± ۳۳۴/۷، ۶ ±۳۰۷/۷، ۸/۷± ۳۳۱/۳ میلی اسمول در لیتر بوده و این مقادیر در زمان ۲۴۰ ساعت بترتیب به ۶/۷±۳۲۵/۳، ۹± ۳۲۱ و ۰/۵۳ ±۳۲۹ میلی اسمول در لیتر رسیده که در مقایسه با زمان صفر تفاوت معنی داری مشاهده نمی‌شود(نمودار ۱).

بحث

یکی از راههای افزایش ضریب بقای بچه ماهیان بخصوص در مورد گونه‌های آزاد ماهیان بررسی وضعیت فیزیولوژیک می باشد. مطالعه تکمیل و توسعه اندام‌های دخیل در تنظیم اسمزی (همانند آبشش) می‌تواند زمان مناسب مهاجرت ماهی از رودخانه به دریا و در حقیقت اندازه مناسب رهاسازی بچه ماهیان آزاد یا پرورش در محیط‌های دریایی را مشخص نماید (۹). و از این طریق بر میزان بازگشت ماهیان مولد بیافزاید (۷ و۱۶).

در این تحقیق پاسخ‌های فیزیولوژیک بچه‌ماهیان آزاد خزر به افزایش شوری محیط در چهار گروه وزنی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی مطالعه شد. پاسخهای بررسی شده شامل فشار اسمزی پلاسما و مقادیر آنزیم Na^+,K^+,ATPase است.

در ماهیان استخوانی، سلولهای غنی از میتوکندری اپی تلیوم آبشش (سلولهای کلراید)، عامل تنظیم یونی و مسئول دفع یونهای اضافی از مایعات بدن ماهیان سازش یافته با آب دریا هستند. همچنین در ماهیان سازش یافته با آب شیرین نقشی را در جذب یون بعهده دارند (۶).

پس از انتقال بچه‌ماهیان به آب دریا، آنزیم Na^+, K^+ - ATPase دارای نقش کلیدی در دفع کلر و سدیم از سلولهای کلراید آبشش ماهیان استخوانی است. بعنوان مثال، در ماهی آزاد اقیانوس اطلس، فراوانی و اندازه سلولهای کلراید توأم با بالا رفتن فعالیت Na^+, K^+ - ATPase افزایش می‌یابد (۱۰).

Uchida و همکاران (۱۹۹۶) دریافتند که پس از انتقال بچه ماهیان آزاد چام (*Oncorhynchus keta*) به آب دریا، افزایشی در فعالیت Na^+,K^+, ATPase آبشش رخ داد. علاوه بر این

اجتماعات زیاد سلولهای کلراید رشته‌های آبششی دیده شد. در نتیجه دو موضوع فوق الذکر باعث افزایش توانایی بچه ماهیان در تنظیم فشار اسمزی می‌گردد (۲۰).

مدلی برای بیان مکانیسم دفع NaCl بوسیله سلولهای کلراید بیان شده که در آن سه انتقال دهنده یونی شامل Na^+, K^+, ATPase، $Na^+, K^+ - 2Cl^-$ و کانال Cl^- نقش دارند (۱۲ و ۱۷). در این تحقیق سطح فعالیت آنزیم $Na^+,K+$_ ATPase در آبشش بطور غیرمستقیم از طریق سنجش مقدار فسفات غیر آلی (Pi) اندازه‌گیری شد (۲۱). بهنگام سازش بچه‌ماهیان با آب دریا، آنزیم Na^+,K^+- ATPase (پمپ سدیم- پتاسیم) موجود در اپیتلیوم آبشش، عمل انتقال یونها را بعهده دارد که دفع یا جذب یونهای ضروری را هدایت می‌کنند (۶). فراوانی آنزیم $Na^+,K+$, ATPase در اپیتلیوم آبشش بسیاری از ماهیان یوری هالین همگام با تغییر شوری محیط، تغییر می‌کند و این نوسانات جهت سازگاری ماهی با محیط شورتر بوقوع می‌پیوندد (۱۳).

یافته‌های این تحقیق نشان داد که سطح فعالیت آنزیم Na^+,K^+ - ATPase آبشش بچه‌ماهیان در گروه وزنی ۵

گرمی مورد آزمایش در ساعت صفر (مقابله با آب شیرین) و ساعتهای قرار گیری ماهی در آب دریای خزر هیچ‌گونه تغییر معنی داری مشاهده نشده (جدول ۱) و این موضوع حاکی از عدم توسعه سلول‌های کلراید آبشش جهت رویارویی با شوری محیط می‌باشد. همچنین روند نوسانات فشار اسمزی این گروه وزنی پس از زمان ۷۲ ساعت (قرار گیری با آب دریای خزر) نسبت به زمان صفر (آب شیرین) افزایش معنی‌داری نشان داده و به سطح اولیه نزدیک نشده (نمودار ۱) و این روند بیانگر عدم تکامل و توسعه اندام-های دخیل در تنظیم اسمزی (کلیه، آبشش) جهت بالانس نمودن یون‌های موجود در خون و در نتیجه به تعادل رساندن فشار اسمزی می‌باشد. **گروه ۱۰ گرمی در زمان صفر (آب شیرین یا قبل از مقابله با آب دریای خزر) سطح بالایی از فعالیت آنزیم را نشان داده (جدول ۱) که این افزایش در مقایسه با ماهیان ۲۰ گرمی معنی دار بوده است** ($p < ۰/۰۵$).

در زمان های مختلف قرار گیری ماهیان ۱۰ گرمی در آب دریای خزر، سطح فعالیت آنزیم بیش از گروه ۵ گرمی می باشد. همچنین سطح فشار اسمزی در زمان صفر ۳۳۴/۷ میلی اسمول در لیتر و پس از ۱۰ روز به ۳۲۵/۳ میلی اسمول در لیتر یعنی نزدیک به میزان فشار اسمزی پلاسما در آب شیرین رسیده است (نمودار ۱). موضوع فوق الذکر حاکی از تغییرات متابولیک و فیزیولوژیک و گذار به شرایط آمادگی برای مهاجرت نسبت داد (مطابقت با تعریف پار- اسمولت).

افزایش فعالیت آنزیم در آب شیرین، مکانیسم پیش سازگاری جهت رویارویی با محیط دریا بشمار می رود. در این مرحله بچه ماهیان از مرحله پار به اسمولت تبدیل می-گردند (۱۵و۱۹).

این آنزیم پس از ۳ ساعت در آب دریا برای گروههای وزنی ۱۵و۲۰گرمی بطور معنی‌داری بترتیب ۲/۵ و ۵/۶ برابر نسبت به آب شیرین افزایش یافته ($P<۰/۰۵$) و بیانگر تأثیر افزایش اندازه در توانایی بیوشیمیایی آبشش بچه ماهیان است (جدولهای ۱ و ۲). همچنین تغییرات فشار اسمزی در زمان‌های مختلف قرارگیری ماهیان ۱۵و۲۰ گرمی روند متعادلی داشته و پس از ۱۰ روز افزایش معنی-داری نسبت به زمان صفر (آب شیرین) نداشته و به سطح اولیه نزدیک شده است (نمودار ۱). بنابراین بچه ماهیان ۱۵و۲۰ گرمی ویژگی‌های مرحله اسمولت را نشان داده و قادر به زندگی، بقاء و رشد در آب دریای خزر خواهند بود. در صورت رهاسازی این گروه وزنی در آب شیرین دوره زمانی توقف کوتاه بوده و ماهی سریعاً به آب دریا مهاجرت خواهد کرد. همچنین از این گروههای وزنی جهت پرورش دریایی در محیط های محصور همچون قفس می توان استفاده نمود. لازم بذکر است بچه ماهیان ۵ گرمی در گروه سنی $^{+}۰$ و بچه ماهیان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرمی در گروه سنی $^{+}۱$ بوده اند.

در سازگاری آزاد ماهیان با آب دریا افزایشی در آنزیم $Na^{+,}$ K^{+} - ATPase مشاهده می‌شود که از برجسته ترین رویدادهای بیوشیمیایی طی اسمولت شدن می باشد. در این تحقیق آبشش بچه ماهیان ۵ گرمی، سطح پایینی از فعالیت آنزیم فوق الذکر را نشان داد. همچنین طبق نتایج در همه گروههای وزنی میزان فعالیت آنزیم Na^{+}, K+- ATPase بچه‌ماهیان موجود در آب دریا بیش از میزان فعالیت آنزیم فوق در آب ۷ در هزار بود.

بر اساس بررسی های McCormick و Saunders (۱۹۸۷)، سطوح اسمولاریته پلاسما در ماهیان استخوانی بطور نرمال بین ۲۹۰ تا ۳۴۰ میلی اسمول در لیتر قرار دارد. در یافته های این تحقیق، دامنه اسمولاریته چهار گروه وزنی بچه ماهیان در آب ۷ در هزار بین ۲۷۹ تا ۳۳۹ میلی اسمول در لیتر و در تیمار آب دریای خزر، این دامنه در مورد بچه ماهیان ۱۰, ۱۵ و ۲۰ گرمی در محدوده ۳۰۱ تا ۳۴۴ میلی اسمول در لیتر قرار داشته (حد نرمال) در صورتیکه در بچه‌ماهیان ۵ گرمی انتقال یافته به آب دریای خزر فشار

اسمزی بین ۳۰۷ تا ۳۶۰ میلی اسمول در لیتر قرار دارد و از حد نرمال فراتر رفته است. دامنه ذکر شده از فشار اسمزی مربوط به آب شیرین (زمان صفر) تا زمان‌های مختلف قرار گیری بچه‌ماهی در آب دریا (تا ۱۰ روز) بوده است (۱۵).

تغییرات اسمولاریته سرم خون ماهیان در معارضه با شوریهای دریایی طی دو مرحله رخ می‌دهد. در مرحله نخست، اسمولاریته سرم خون در روزهای ابتدایی (پس از انتقال به آب دریا) افزایش می‌یابد تا تقریباً با محیط دریا هم غلظت شود. در مرحله دوم اسمولاریته سرم خون پس از چند روز مجدداً به سطح نزدیک به اسمولاریته ماهی در آب شیرین کاهش می یابد (۸).

بچه ماهیانی که تغییر شکل از مرحله پار به اسمولت را کامل نکرده‌اند و قبل از مرحله اسمولت به آب دریا منتقل می شوند ممکن است برای مدت زمانی زنده بمانند، اما تغذیه و رشد نمی‌کنند و ماهی از رشد باز می‌ماند. اسمولت ناقص یا از رشد باز مانده با اختلالاتی در ظرفیت تنظیم اسمزی دریایی، تغذیه و رشد روبرو هستند و غلظت بالایی از هورمون رشد و غلظت‌های پائینی از IGF –I مشاهده می‌شود (۵). در مطالعه حاضر، گروه وزنی ۵ گرمی نیز تقریباً یک چنین مشخصاتی داشته‌اند و قادر به بقاء در آب دریا در طول دوره آزمایش بوده‌اند. ولی شاخص‌های مهم فیزیولوژیکی در این مرحله از رشد حاکی از عدم تنظیم اسمزی دریایی در این گروه وزنی می‌باشد. بنابراین در صورت رها سازی این گروه وزنی به دریا، احتمال بقاء و رشد طبیعی این ماهیان پائین خواهد بود.

با در نظر گرفتن همه بخشهای تحقیق می‌توان آب با شوری ۷ در هزار را با ترکیب خزر برای بقا و رشد بچه ماهیان آزاد خزر از وزن ۵ گرم به بالا مناسب دانست و در شرایط شوری دریای خزر (۱۱/۵– ۱۱ در هزار) ماهی آزاد خزری از حدود ۱۰ گرم به بالا، قابلیت تحمل و توسعه فعالیت آنزیم Na^+,K^+- ATPase را دارد.

آمادگی ماهی برای تنظیم فشار اسمزی یکی از عوامل مهم فیزیولوژیک در تعیین زمان مهاجرت یا رهاسازی محسوب می شود. در کنار آن، توجه به شرایط اکولوژیک و قابلیتهای رفتاری ماهی نیز ضروریست. بنابراین احراز توانایی تنظیم هموستاتیک در رهاسازی شرط لازم ولی ناکافی است.

نهایتاً می‌توان نتایج تحقیق را بصورت زیر خلاصه کرد:

بچه ماهیان ۵ گرمی توانایی تنظیم اسمزی در محیط دریایی را نداشته و قادر به بقاء در محیط دریای خزر نیستند. بنابراین این گروه وزنی در حالت پار بسر می‌برند.

در بچه ماهیان ۱۰ گرمی تغییر حالت از پار به اسمولت مشاهده گردیده و این بچه ماهیان در حالت گذار به شرایط مهاجرت و شروع تغییرات متابولیک بسر می برند (مرحله پار – اسمولت).

بچه ماهیان ۱۵و۲۰ گرمی در مرحله اسمولت بوده و توانایی تنظیم اسمزی دریایی را دارند.

تشکر و قدردانی

از ریاست محترم مؤسسه تحقیقات شیلات ایران، معاونین محترم، ریاست محترم پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی کشور و معاونین ایشان، پرسنل بخش اکولوژی پژوهشکده، ریاست محترم انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان رشت، معاون پزوهشی و پرسنل بخش فیزیولوژی، به خاطر همکاری صمیمانه قدردانی می گردد. همچنین از پرسنل زحمتکش ایستگاه تحقیقاتی تکثیر و پرورش ماهیان دریایی (ساحل غازیان انزلی)، مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان سردابی شهید باهنر کلاردشت بخاطر تلاش مجدانه تشکر وقدردانی می گردد.

منابع

۱. پوستی، ا.، و صدیق مرودستی، ع.، ۱۳۷۸. اطلس بافت‌شناسی ماهی (اشکال طبیعی و آسیب شناسی)، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۳۲۸ .

۲. غنی نژاد، د.، مقیم. م.، عبدالملکی، ش.، و صیادبورانی، م.، ۱۳۸۱. ارزیابی ذخایر ماهیان استخوانی دریای خزر در سال ۷۹-۸۰، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی کشور، بندر انزلی، ۹۸ص.

۳. کرایوشکینا، ل.، ۱۳۷۸. بررسی سیستم اسمزی ماهیان، گردآوری: دانش خوش اصل، ع.، و مرادی، م.، پژوهشکده آبزی پروری آبهای داخلی کشور، بندر انزلی، ۸۳ ص.

4. Avella, M., Young. G., Prunet. P., and Schreck . C. B., 1990, Plasma prolactin and cortisol concentrations during salinity challenges of coho salmon *(Oncorhynchus kisutch*) at smolt and post-smolt stages. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam. Aquaculture, 359 – 372.

5. Dyre, A. R., Upton, Z., Stone, D., Thomas, P. M., Soole, K. L., Higgs, N., Quinn, K., and Carragher, J. F., 2004, Development and validation of a radioimmunoassay for fish insuline-like growth factor and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels.Gen. Comp. Endocrinol 135, 268-275.

6. Evans, D. H., 2002, The physiology of fishes. CRC Press, New York. Folmar, L. C., Dickhoff, W. W., 1980, The parr-smolt transformation and seawater adaptation in salmonids, A review of selected literature, Aquaculture, 21:1-37.

7. Hansen, L. P., and Jonsson, B., 1989, Salmon ranching experiments in the River Imsa: effects of timing of Atlantic salmon smolt migration on survival to adults Aquaculture 82: 367-373.

8. Krayushkkina, L. S., Panov, A. A., Gerasimov, A. A., and Potts, W. T. W., 1999, Changes in Sodium, Calcium and Magnesium Ion Concentrations in Sturgeon [Huso huso] Urine and in Kidney Morphology. J. Comp Physiol B. 165, 527-533.

9. Laird, L. M., and Needham, T., 1988, Salmon and trout farming. Ellis Horwood Limited. PP: 87-116.

10. Langdon, J. S., Thorpe, J. E., and Roberts, R. J., 1984, Effects of cortisol and ACTH on gill Na+, K^+-ATPase, SDH and chloride cells in juvenile Atlantic salmon Salmo salar L. Comp. Biochem. Physiol. A 77, PP: 9-12.

11. Leber, K. M., Kitada, S., Blankenship, H. L., and Svasand, T., 2004, Stock enhancement and sea ranching. Blackwell Publishing, PP:199-233.

12. Marshall, W. S., 1995, Transport processes in isolated teleost epithelia: Opercular epithelium and urinary bladder. In C. M. Wood and T. J. Shuttleworth (eds.), Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation, Academic Press Inc., New York, PP: 1-23.

13. McCormick, S. D., 2001, Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. Amer. Zool, 41:781-794.

14. McCormik, S. D., and Naiman, R. J., 1984, Osmoreglation in the brook trout, *Salvelinus fontinalis* .2. Effects of Size, Age and Photoperiod on Seawater Survival and Ionic Regulation, Comp Biochem.- Physiol, A .Vol 79A,no. 1, PP:17-28.

15. McCormik, S. D., and Saunders, R. L., 1987, Preparatory physiological adaptations for marine life of Salmonids: Osmoregulation, growth, and metabolism. Am. Fish .Soc. Symp. 1, PP: 211-229.

16. Peterson, G. L., 1973, A simplified method for analysis of inorganic phosphate in presence of interfering substances. Anal. Biochem. 84, PP: 164-172.

17. Silva, P., Solomon, R., Spokes, K. and Epstein, F. 1977. Ouabain inhibition of gill Na+-K^+-ATPase: relationship to active chloride transport. J. Exp. Zool. 199, 419-426.

18. Schmitz, M., 1992, Annual variations in rheotactic behaviour and seawater adaptability in landlocked Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Can. J, Fish. Aquat. Sci. 49, PP: 448-452.

19. Staurnes, M., Sigholt, T., Lysfjord, G., and Gulseth, O. A., 1993, Difference in the sea water tolerance of anadromous and landlocked populations of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 49, PP: 443-447.

20. Uchida, K., Kaneko, K., Yamauchi, K., and Hirano, T., 1996, Morphometrical analysis of chloride cell activity in the gill filaments & lamellae and changes in Na+,K^+- ATPase activity during seawater adaptation in chum salmon fry. J, Exp. Zool, 276: 193-200.

21. Zaugg, W. S., 1982. A simplified preparation for adenosine triphosphate determination in gill tissue. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 39, 215-217.

22. Zaugg, W. S., and Beckman, B. R., 1989, Salt-water-induced decreases in weight and length relative to seasonal gill Na+,K^+-ATPase changes in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): a test for saltwater adaptability. Aquaculture 86, P: 19

Study of Sea water tolerance and Na^+,K^+-ATPase activity in Different growth stages (parr and smolt) of *Salmo trutta caspius* juveniles

Sayyad Bourani M.[1], Abtahi B.[2], Bahmani M.[3], Saberi H.[1] and Moradi chafi M.[1]

[1] National Inland Waters Aquaculture Institute, Anzali, I.R. of Iran.

[2] Marine Biology Dept., Faculty of Biological Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

[3] International Research Institute of Sturgeon Fishes, Rasht, I.R. of Iran

Abstract

This study was carried out to determine the size of parr and smolt and Sea water tolerance of Caspian trout (*Salmo trutta caspius* Kessler, 1877) juveniles. In this research were exposed to 3 salinity trials using Caspian Sea water (11- 11.5 ppt), inshore water (7 ppt) and fresh water (control) in 4 weight groups of 5, 10, 15 and 20 g, all in 3 replicates. Mean plasma osmolality of 20, 15, 10 and 5 gr juveniles in control group (time of 0) were 331.3±8.7, 307.7±6, 334.7±14.6 and 301±8.7 mosml/l. This parameter in the above weight groups after 240 hours exposure to Caspian Sea water were 329±0.53, 321±9, 325.3±6.7 and 346.5±13.6 respectively. Na^+, K^+-ATPase activity (was estimated by phosphate released from ATP) in juveniles of 5g weight group in 7 ppt salinity and Caspian Sea water was low (3.2 – 6.1 µmol P_i /mg protein/ h). The enzyme activities in all weight groups were higher under the exposure in Caspian Sea water than that in water of 7 ppt salinity. In group of 10 g juveniles at start time (control in freshwater) the activity of Na^+, K^+-ATPase was significantly higher ($p<0.05$) than that in 20g group. It is may be related to some metabolic changes and transforming to parr-smolt. 15 and 20 gr juveniles were in smolt range.

Keywords: *Salmo trutta caspius*, osmoregulation, Na^+,K^+-ATPase activity.