وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان:

بررسی اثرات نمک و پروبیوتیک تک سل (Takcell®; *Bacillus subtilis*) در جیره غذایی بر بقاء بچه ماهی نورس کپور (*Cyprinus carpio*) در برابر تنش ناگهانی شوری

مجری مسئول:
سید مرتضی حسینی

شماره ثبت
٦٤٣١٧

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی

عنوان طرح/پروژه: بررسی اثرات نمک و پروبیوتیک تک سل (*Bacillus subtilis*; Takcell®) در جیره غذایی بر بقاء بچه ماهی نورس کپور (*Cyprinus carpio*) در برابر تنش ناگهانی شوری
کد مصوب: ٠١٠٢٨٤-٠٠٧-١٢٥١-٧٧-٣
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: سید مرتضی حسینی
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : سید مرتضی حسینی
نام و نام خانوادگی مجری: سید حسین حسینی فر
نام و نام خانوادگی همکار(ان): عباسعلی آقائی مقدم، بهروز قره وی، عیسی شریف پور، محمود حافظیه، ملیکا قلیچ پور، محمدرضا فایضی، سیدمحمود عقیلی
نام و نام خانوادگی مشاور(ان):
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -
محل اجرا: استان گلستان
تاریخ شروع: ١٤٠١/٤/١
مدت اجرا: ١ سال و ٠ ماه
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ١٤٠٢
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: بررسی اثرات نمک و پروبیوتیک تک سل (;Takcell®
***Bacillus subtilis*) در جیره غذایی بر بقاء بچه ماهی نورس کپور**
(*Cyprinus carpio*) در برابر تنش ناگهانی شوری

کد مصوب : ۰۱۰۲۸٤-۰۰۷-۱۲۵۱-۷۷-۳

شماره ثبت (فروست) : ٦٤٣١٧ تاریخ : ۱٤۰۲/۷/۳۰

با مسئولیت اجرایی جناب آقای سیدمرتضی حسینی دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته شیلات است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش اصلاح‌نژاد و تکثیر و پرورش آبزیان در تاریخ ۱۴۰۲/۷/۹ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ☐ مرکز ■ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱-مقدمه ۲
۱-۱-کپور معمولی ۲
۱-۲-تنش شوری ۵
۱-۳-آبشش در ماهیان استخوانی ۶
۱-۴-کلیه در ماهیان استخوانی ۶
۱-۵-سیستم آنتی اکسیدانی ۷
۱-۶-غنی سازی جیره برای مقاومت به تنش شوری ۹
۱-۷-کلرید سدیم ۱۰
۱-۸-پروبیوتیک ها ۱۰
۱-۹-اهداف ۱۴
۱-۱۰-فرضیات تحقیق ۱۴
۲-سابقه تحقیق ۱۵
۳-مواد و روش‌ها ۱۸
۳-۱-زمان و مکان اجرای تحقیق ۱۸
۳-۲-تهیه جیره های غذایی ۱۸
۳-۳-تغذیه ماهی و تنش شوری ۱۹
۳-۴-نمونه گیری و انجام آزمایش‌ها ۲۲
۳-۵-تجزیه و تحلیل آماری ۲۶
۴-نتایج ۲۷
۴-۱-شاخص‌های رشد و بقا ۲۷
۴-۲-اثر نمک جیره بر شاخصهای بیوشیمیایی ماهی ۲۹
۴-۳-اثر نمک جیره بر بافت آبشش و کلیه ماهی ۳۲
۴-۴-اثر پروبیوتیک جیره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی ۳۴
۴-۵-اثر پروبیوتیک جیره بر بافت آبشش و کلیه ماهی ۳۹
۵-بحث ۴۲

۵-۱-اثر تنش شوری بر بقاء ماهی ۴۲
۵-۲-اثر نمک و پروبیوتیک بر رطوبت و یونهای بدن بعد از تنش شوری.....۴۲
۵-۳-اثر نمک و پروبیوتیک بر بافت شناسی آبشش و کلیه بعد از تنش شوری ۴۳
۵-۴-اثر نمک و پروبیوتیک بر کورتیزول بدن بعد از تنش شوری ۴۴
۵-۵-اثر نمک و پروبیوتیک بر شاخصهای آنتی اکسیدانی بدن بعد از تنش شوری ۴۴
۶-نتیجه‌گیری کلی..... ۴۶
پیشنهادها..... ۴۷
منابع ۴۸
چکیده انگلیسی..... ۵۶

عنوان	«فهرست جداول»	صفحه

جدول ۱: تشریح تیمارهای آزمایشی ۱۸
جدول ۲: نتایج آنالیز واریانس اندازه گیری مکرر (*P*-value) در تیمارهای شاهد و نمک ۳۰
جدول ۳: نتایج آنالیز واریانس اندازه گیری مکرر (*P*-value) در تیمارهای شاهد و پروبیوتیک ۳۵

عنوان	«فهرست اشکال»	صفحه

شکل ۱: تصویر شماتیک از کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۲
شکل ۲: پراگندگی جهانی ماهی کپور ۲
شکل ۳: میزان صید ماهیان استخوانی طی سالهای بهره برداری ۷۱-۱۳۷۰ الی ۹۹-۱۳۹۸ در سواحل ایرانی دریای خزر ۴
شکل ۴: پلتهای غذایی تولید شده برای تغذیه ماهی ۱۹
شکل ۵: انتقال ماهی به محل اجرای آزمایش ۲۰
شکل ۶: تیماربندی و توزیع ماهی ها در آکواریوم ۲۱
شکل ۷: بیومتری دسته جمعی ماهی های آکواریوم ها ۲۲
شکل ۸: نمونه برداری اندامهای مختلف ماهی ۲۲
شکل ۹: تثبیت نمونه های کل بدن ماهی در محلول بوئن ۲۳
شکل ۱۰: فویلهای آلومینیومی برای خشک کردن ماهی در آون ۲۴
شکل ۱۱: هموژن کردن کل بدن ماهی و تهیه عصاره آنزیمی ۲۵
شکل ۱۲: میانگین (± خطای استاندارد) وزن اولیه و وزن نهایی در تیمارهای آزمایشی مختلف (تعداد تکرار = ۳) ۲۷
شکل ۱۳: میانگین (± خطای استاندارد) ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی مختلف (تعداد تکرار = ۳) ۲۸
شکل ۱۴: میانگین (± خطای استاندارد) درصد بقاء در تیمارهای آزمایشی مختلف قبل و بعد از تنش شوری (تعداد تکرار = ۳) ۲۹
شکل ۱۵: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار گلوتاتیون کل بدن در تیمارهای آزمایشی نمک ۳۱
شکل ۱۶: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار مالون دی آلدهید کل بدن در تیمارهای آزمایشی نمک ۳۱
شکل ۱۷: مقطع بافتی آبشش ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های شاهد ۳۲
شکل ۱۸: مقطع بافتی کلیه ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های شاهد ۳۳
شکل ۱۹: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار گلوتاتیون کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک ۳۶
شکل ۲۰: میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک ۳۷
شکل ۲۱: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار سدیم کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک ۳۸
شکل ۲۲: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار کلراید کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک ۳۹
شکل ۲۳: مقطع بافتی آبشش ماهی های تغذیه شده با جیره های شاهد ۴۰
شکل ۲۴: مقطع بافتی کلیه ماهی های تغذیه شده با جیره های شاهد ۴۱

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر افزودن نمک (کلرید سدیم) و پروبیوتیک *Bacillus subtilis* (IS02) به جیره‌غذایی بر بقاء، شاخص‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی بچه‌ماهی نورس کپور دریایی در مواجهه با تنش شوری انجام شد. بچه‌ماهی کپور (حدود ۱/۱ گرم) به مدت ۱۵ روز با جیره‌های غذایی حاوی ۰، ۵ و ۱۰ درصد کلرید سدیم و صفر (شاهد)، $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ (پرو-۸) و $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ cfu/g (پرو-۹) پروبیوتیک تغذیه و سپس به طور مستقیم به آب لب‌شور ۱۳ گرم در لیتر منتقل و پس از ۳ و ۱۰ روز نمونه‌گیری شدند. جیره غذایی و زمان نمونه‌برداری اثر معنی‌داری بر بقاء ماهی‌ها نداشت و در کل بقاء در همه تیمارها بالا بود (بیش از ۹۲ درصد). رطوبت بدن پس از تنش شوری در همه تیمارها کاهش معنی‌دار داشت. مقدار سدیم بدن در تیمار پرو-۸ در خلال تنش شوری تغییری نداشت ولی در سایر تیمارها ۳ روز پس از تنش شوری افزایش معنی‌دار داشت. افزودن نمک به جیره غذایی اثری بر مقدار کلراید بدن نداشت ولی تیمارهای پروبیوتیک باعث کاهش کلراید نسبه به شاهد، بدن قبل و بعد از تنش شدند. تنش شوری باعث افزایش کلراید بدن در همه تیمارها شد. افزودن نمک به جیره باعث کاهش پتاسیم بدن شد ولی تنش شوری میزان پتاسیم را در همه تیمارها افزایش داد. افزودن نمک به جیره غذایی اثر معنی‌داری بر کورتیزول، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز بدن نداشت ولی پروبیوتیک باعث کاهش کورتیزول و افزایش گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز بدن شد. تنش شوری به مدت ۳ روز منجر به افزایش معنی‌داری میزان کورتیزول، گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پراکسیداز بدن را در همه تیمارها شد ولی پس از ۱۰ روز مجددا کاهش یافت. تیمار نمک (مخصوصا ۱۰ درصد) و پروبیوتیک باعث افزایش مقدار گلوتاتیون احیائی و کاهش مالون دی آلدهید بدن شدند. پیش از تن شوری، همه تیمارها تا حدودی عوارض بافتی در آبشش (هایپرپلازی، چسبیدگی لاملا و جدا شدگی لاملا) داشتند که بعد از تنش شوری شدت این عوارض کاهش یافت. بافت کلیه در تیمارهای شاهد و نمک قبل از تنش شوری عارضه ای نداشت ولی در تیمارهای پروبیوتیک تا حدودی تجمع منطقه‌ای گلبول‌های سفید مشاهده شد که پس از تنش نیز وجود داشتند. تنش شوری باعث چروکیدگی لوله‌های ادراری در همه تیمارها شد. علاوه بر این کمی از هم گسیختگی بافت بینابینی نیز در تیمارهای نمک مشاهده شد. این تحقیق نشان می‌دهد که کپور دریایی نورس توانایی تحمل انتقال مستقیم به آب دریای خزر را بدون غنی‌سازی جیره با نمک دارد. افزودن ۱۰ گرم در کیلوگرم نمک به جیره می‌تواند باعث کاهش پراکسیداسیون چربی شود. پروبیوتیک باعث تحریک ایمنی در کلیه، تقویت تنظیم یونی و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در ماهی می شود که ممکن است اثرات مفیدی در شرایط میدانی داشته باشد.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، نمک، جیره غذایی، تنش شوری، کپور معمولی

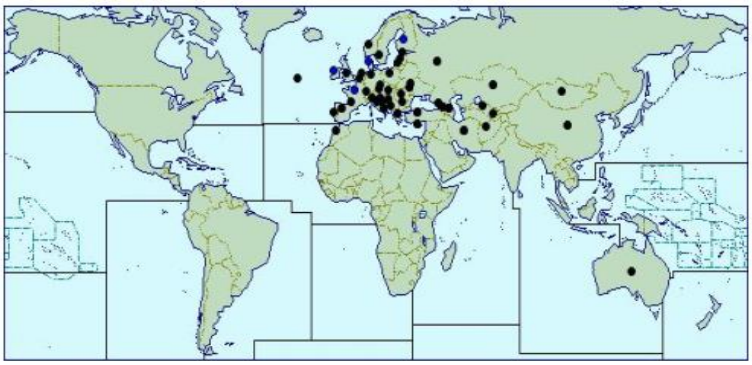
۱-مقدمه

۱-۱-کپور معمولی

ماهي كپور داراي بدني كشيده كه از طرفين فشرده شده است (شكل ۱) و معمولاً بين ۳۰ تا ۶۰ سانتيمتر طول و ۴ تا ۰/۵ كيلوگرم وزن دارند و دارای خار پشتی مضرس دارند (Pietsch and Hirsch, 2015). ماهي كپور نر با داشتن باله شكمي بزرگتر از ماهي ماده فرق داده می شود. در ماهيان بالغ دهان انتهايي و در كپور ماهيان جوان دهان نيمه انتهايي ديده مي شود (Crespi and New, 2009)، دو عدد سبيلك در هر طرف دهان همچنين دارای دندان حلقي سه رديفي با فرمول ۱/۱/۳-۳/۱/۱ بوده و تعداد خارهاي آبششي روي اولين كمان آبششي آن ۱۸ تا ۳۶ عدد می باشد. كپور ماهيان دارای فلس ها بزرگ و ضخيم بوده و تعداد فلس ها روي خط جانبي بين ۳۲ تا ۴۰ عدد می باشد. فرمول شعاع هاي باله پشتي بصورت (۲۳- ۱۵) II- IV و فرمول شعاعهاي باله مخرجي (۶- ۴) II- IV می باشد (Crespi and New, 2009).

شكل ۱: تصوير شماتيک از كپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

با توجه به اینکه کپور معمولی یکی از قدیمی ترین گونه های پرورشی در دنیا و آب شیرین می باشد پراکندگی آن اروپا و سراسر آسیای غربی و همچنین جنوب شرق آسیا و چین و ژاپن را در بر می گیرد (Crespi and New, 2009).



شكل ۲: پراگندگی جهانی ماهی كپور

محل زیست کپوردریایی به طور طبیعی محدوده دریای سیاه، آرال، خزر و در رودخانه دانوب می باشد. این ماهی به کشورهای اروپایی مثل هلند، آلمان، دانمارک، انگلیس نیز وارد شده و به طور موفقیت آمیزی نیز تکثیر شده است (شکل ۲). ماهی کپور معمولی دریایی بومی دریای خزر است. این ماهی اکثرا در آبهای گرم و نسبتا آرام و راکد که دارای بسترهای شنی و یا لجنی پوشیده از گیاهان آبزی می باشند زندگی می کنند و بطور کلی از لارو حشرات، نرمتنان ریز، کرمها و نیز از لارو سایر ماهیان تغذیه می کنند. بچه کپور ماهیان در ابتدا از پلانکتونهای گیاهی و جانوری که شامل جلبک ها، سخت پوستان و روتاتوریا باشد،تغذیه کرده و زمانی که به اندازه ۸۷ میلی متر می رسند به تغذیه از کفزیان مبادرت می کنند. مناسب ترین دما برای رشد و تغدیه کپور ماهیان ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد می باشد (FAO, 2019). معمولا زمان تخم ریزی کپور معمولی برحسب دمای آب از اوایل اردیبهشت تا تیرماه است. تعداد تخم ۳۰۰-۲۰۰ هزار عدد تخم برای هر کیلوگرم از وزن بدن ماهی ماده می باشد. تخمها قطری حدود ۱-۱/۶ میلی متر بوده، شفاف و چسبناک می باشند و معمولا بر روی گیاهان آبزی می چسبند. دوره انکوباسیون بر حسب درجه حرارت آب بین ۳-۵ روز به طول می انجامد (FAO, 2019).

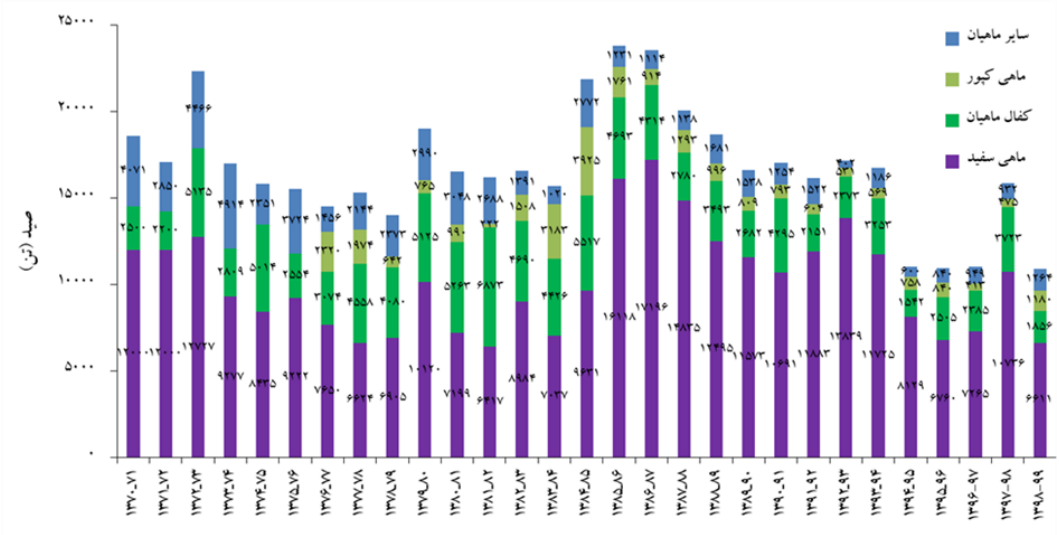
۱-۱-۱-بازسازی ذخایر جمعیت کپور دریای خزر

دو گونه ماهی کپور و کلمه از ماهیان شاخص استان گلستان بوده و طی دو دهه اخیر عمده صید این دوگونه در استان گلستان رخ داده است. با توجه به اینکه ماهی کپور در قسمت های جنوب شرقی، جنوب غربی و غرب دریای خزر دارای جمعیت های متفاوتی می باشد (قلی اف، ۱۹۹۷)، اما بیش از ۸۰ درصد صید ماهی کپور در سواحل جنوبی و به ویژه ساحل شرقی دریای خزر (خلیج گرگان و تالاب گمیشان) صورت می گیرد (دریانبرد، ۱۳۹۲؛ بیک زاده تاکری و همکاران، ۱۳۹۴).

در چند دهه اخیر جمعیت ماهی های رود کوچ بطور ناخوشایندی در سرتاسر دنیا به شدت کاهش یافته وتعداد زیادی ازجمعیت های این ماهیان نابود شده اند، این امر بطورعمده مربوط به تخریب رودخانه، کاهش کفیت وکمیت آب شیرین منتهی به دریا وتخریب مکان های تخمریزی می باشد (Limburg and Waldman, 2009). ذخایر ماهی کپور و کلمه از این وضعیت مستثنا نبوده ودر پی تخریب رودخانه ها ومناطق سیلابی مصب، خشکسالی عقب نشینی آب دریا واز بین رفتن بخش عمده ای ازمکان های تغذیه به میزان قابل توجهی کاهش یافته است (فضلی، ۱۴۰۱). همچنین نوسانات موجود در صید ماهی کپور به دلیل : صید بی رویه و غیر مجاز دز سال هاس گذشته، صید بی رویه در فصل تخمریزی و افزایش آلودگیهای اکوسیتم دریای خزر به دنبال بهره برداری از مخازن نفتی دریا نیز ذکر کرده اند (یلقی، ۱۳۷۹). بازسازی ذخایر بعنوان یک اهرم به منظور جبران کاهش صید، احیای گونه های تحت فشار بهره برداری بیش از حد در دستور سازمان شیلات ایران قرار گرفت و بعنوان یکی از ارکان مدیریت برداشت پایدار مورد توجه قرار گرفت (بندانی، ۱۳۹۵). به همین منظور اقدام به تکثیر نیمه طبیعی این ماهی کرده است. اما پائین بودن بازدهی در مراکز تکثیر و پرورش ماهی و

مشکلات مربوط به تلفات بچه ماهیان در مرحله رها سازی عواملی هستند که بخش اجراء با آنها درگیر می باشد. یکی از عوامل موثر در موفقیت رها سازی بچه ماهیان کسب توانایی تنظیم اسمزی در محل رهاسازی و نیز در هنگام انتقال از محل رها سازی تا دریا می باشد (عطایی مهر و همکاران، ۱۳۸۵).

پروژه های ارزیابی ذخایر دریای خزر از سال ۱۳۸۶ آغاز و تا کنون ادامه داشته است و در تمام مطالعات روند تغییرات صید و بیوماس و کاهش صید بررسی شده و راه کارهای مدیریتی در اختیار واحد های اجرایی قرار داده شده است. میزان صید کاهی کپور در پره های صیادی آب های ایرانی خزر از ۲۳۲۰ تن در سال ۷۷-۷۶ به میزان ۳۱۸۳ تن در سال ۸۴-۸۳ رسیده ولی باز با کاهش شدید به ۴۷۵ تن در سال ۹۸-۹۷ و باز در سال ۹۹-۹۸ به میزان ۱۱۸۰تن رسیده است، اگر چه میزان نوسانات افزایش یا کاهش برداشت در بین تمام این سالها بوده است (شکل ۳) (فضلی، ۱۴۰۱).



شکل ۳: میزان صید ماهیان استخوانی طی سالهای بهره برداری ۷۱-۱۳۷۰ الی ۹۹-۱۳۹۸ در سواحل ایرانی دریای خزر

رودخانه های استان گلستان که برای رهاسازی بچه ماهی کپور استفاده می شوند در مسیر مناطق شهری و زمین های کشاورزی هستند و همیشه در معرض آلودگی به پساب های خانگی و کشاورزی می باشند. یکی از مشکلات بازسازی ذخایر ماهی کپور در منطقه جنوب دریای خزر عدم همزمانی رسیدن بچه ماهی ها به وزن مناسب (حدود ۱ گرم) و زمان پرآبی رودخانه های منتهی به این منطقه است. عمده رهاسازی بچه ماهیان در اواخر بهار و اوایل تابستان و مصادف با کم آبی طبیعی رودخانه ها بدلیل قرار گرفتن در فصل کم بارش است. لذا آب رودخانه علاوه بر آلودگی های فوق‌الذکر در محل رهاسازي، بدلیل کم آبي فصل تابستان، لب شور شده و بچه ماهیان به ناچار وارد آب لب‌شور مي‌گردند و امکان حرکت بچه ماهیان به بالادست رودخانه مهیا نمي‌باشد. همچنین، به دلیل عمق کم و کدورت بالای آب رودخانه در این زمان، درجه حرارت آب افزایش می یابد که علاوه بر ایجاد تنش دمایی، عاملی مهم در عملکرد سیستم تنظیم اسمزی

ماهی است (McCormick *et al.*, 2009; Vargas-Chacoff *et al.*, 2020). در چنین شرایطی لازم است که بچه‌ماهیان از توان فیزیولوژی مناسبی برای تحمل شرایط نامساعد محیطی برخوردار باشند.

۱-۲-تنش شوری

شوری آب یک عامل محیطی حیاتی برای ماهی ها است به طوریکه آنها در طول مهاجرت بین محیطهای دارای شوری های متفاوت نیاز به مکانیزمهایی برای انطباق و تنظیم اسمزی در شرایط جدید دارند (رجبی و خدابنده، **۱۳۹۲**). ماهی ها از نظر توانایی تحمل تغییرات شوری به سه دسته تقسیم می شوند. دسته اول آنهایی هستند که غلظت یونها و فشار اسمزی داخل بدن با آب دریا برابر است و در واقع این ماهی ها توانایی کنترل غلظت یونهای داخل بدن را ندارند و به همین در محیطهای با شوری ثابت زندگی می کنند. مثال این دسته ماهی میگزینی است که در اقیانوس زندگی می کند (Glover *et al.*, 2017). دسته دوم آنهایی هستند که به تغییرات شوری حساس نیستند و در مواجهه با شوری های مختلف به سرعت غلظت یونها و فشار اسمزی داخل بدن را تنظیم می کنند. به این گروه "یوری هالین" گفته می شود که ماهی کفال خاکستری یکی از نمونه های این گروه است (Marrero *et al.*, 2023). دسته آخر به نام "استنوهالین" شناخته می شوند که توانایی محدودی در تنظیم یونی و فشار اسمزی بدن دارند و به همین دلیل می توانند تغییرات محدود و تدریجی شوری را تحمل نمایند. ماهی کپور در این دسته قرار می گیرد (Hoseini and Hosseini, 2010). ورود به شوری های مختلف برای ماهی های استنوهالین تنش زا است؛ به همین دلیل مقاوم سازی ماهی ها برای مواجهه با تنش اسمزی برای مهاجرت آنها از آب شیرین به آب شور ضروری می باشد. تحریک و فعال کردن سیستم تنظیم اسمزی و یونی در ماهی های استنوهالین ممکن است در کاهش تلفات ناشی از تنش شوری ناگهانی موثر باشد.

عوامل مختلفی مانند اندازه و سن بچه ماهی و شرایط محیط پرورش بر سرعت رشد حاصل از سازگاری با آب شور تأثیر می گذارد. این عوامل به تحمل و سازگاری بچه ماهیان در محیط شور کمک می کند و منجر به تغییراتی در فاکتورهای خونی و بافتی می شود که آنها را برای کسب توانایی فیزیولوژیکی لازم برای تنظیم یون اسمزی آماده می کند. درک فرآیند پیچیده تنظیم اسمزی در ماهی برای مهاجرت موفق و بقا در شرایط متغیر محیطی ضروری است. مطالعات مختلف نشان داده اند که مدت زمان سازگاری ماهی با شوری جدید از یک روز تا چهارده روز متغیر است (Nakano *et al.*, 1998; Ugedal *et al.*, 1998; Hoseini and Hosseini, 2010).

۱-۲-۱-کورتیزول و نقش آن در تنظیم یونی و پاسخ به تنش شوری

کورتیزول یکی از هورمونهای اصلی در سازگاری ماهی با شور است. کورتیزول فعالیت Na^+-K^+-ATPase را تحریک می کند و بر تبادل آب و الکترولیت در بافت ها تأثیر می گذارد (Forrest Jr *et al.*, 1973; Hegab and Hanke, 1984; Madsen, 1990). تزریق کورتیزول فعالیت Na^+-K^+-ATPase را در ماهی قزل آلا کوهو، *Oncorhynchus kisutch* (McCormick and

Bern, 1989)، قزل آلای رنگین کمان، *Oncorhynchus mykiss* (Madsen, 1990)، افزایش داده است. کورتیزول همچنین در تحمل شرایط استرس دخالت دارد (Barton, 2002). افزایش کورتیزول خون باعث فعال شدن مکانیسم گلوکونئوژنز شده که گلوکز لازم جهت مقابله با شرایط استرس زا را تامین می کند. به این ترتیب، کورتیزول در آن واحد هم باعث افزایش فعالیتهای تنظیم اسمزی شده و هم انرژی لازم چهت مقابله با تنش اسمزی را تامین می نماید (Marsigliante *et al.*, 2000).

اگرچه سیستم تنظیم اسمزي در ماهیان با کمک آبشش، روده و کلیه صورت مي پذیرد، اما آبشش ها مهمترین اندام تنظیم اسمزی در ماهی ها معرفی شده اند که دلیل آن نقش فعال این اندام در تنظیم سدیم و کلراید و حفظ pH خون است. با توجه به اینکه سدیم و کلراید بخش عمده یونهای محلول در آب دریاهای آزاد را تشکیل می دهند، لذا آبشش به عنوان اندام اصلی تنظیم یونی در ماهی شناخته شده است (Evans *et al.*, 2005). اما در آبهای شوری که دارای ترکیب یوبنب متفاوتی نسبت به آب دریاهای آزاد هستند، نقش سایر اندامها در تنظیم اسمزی برجسته تر می شود.

۱-۳-آبشش در ماهیان استخوانی

ماهی های استخوانی دارای پنج جفت کمان آبشش هستند که دارای تیغه های آبشش اولیه و ثانویه هستند. تیغه های اولیه از غضروف، رگ های خونی و بافت اپیتلیال چند لایه تشکیل شده اند، در حالی که تیغه های ثانویه از یک لایه دو ردیفی از سلول های اپیتلیال تشکیل شده اند که توسط سلول های پیلار پوشانده شده است. سلول‌های مخاطی و سلول‌های کلراید تیغه‌های اولیه را می‌پوشانند، که سلولهای کلراید عمدتاً در پایه تیغه‌های ثانویه یافت می‌شود (Roberts, 2012). در محیطهای آب شور، افزایش تعداد سلول های کلراید امکان تبادل یون با محیط را فراهم می کند (Sakamoto *et al.*, 2001). با بزرگ‌تر شدن ماهی‌ها و مواجهه با شوری های مختلف آب، اندازه و تعداد سلول‌های کلراید در بافت آبشش افزایش می‌یابد. اما اگر ماهی نتواند شرایط محیطی را تحمل کند، بافت آبشش اولین اندامی است که آسیب می بیند. سلول های کلراید حاصل تغییر سلول های جانبی واقع در نزدیکی آنها در اپیتلیوم پایه آبشش هستند (Rombough, 2007). این سلول ها جایگزین سلول های کلراید آسیب دیده یا قدیمی می شوند. ترشح هورمون کورتیزول بر رشد سلول های کلراید در آب شور تأثیر می گذارد و باعث تمایز و تکثیر آنها می شود (Sakamoto *et al.*, 2001).

۱-۴-کلیه در ماهیان استخوانی

ماهی های استخوانی دارای کلیه ای هستند که از قسمت قدامی و تنه تشکیل شده است که قسمت قدامی آن از پرونفروس و تنه از مزونفروس تشکیل شده است. کلیه قدامی حاوی بافت لنفوئیدی تشکیل شده است، در حالی که تنه کلیه حاوی تعداد زیادی نفرون و بافت لنفاوی بینابینی است. نفرون یا لوله ادراری، واحد ساختاری کلیه است و شامل گلومرول، گردن، لوله پروگزیمال I و II، دیستال و مجرای جمع کننده در همه مهره داران است، اگرچه ترتیب آنها

متفاوت است. گویچه های کلیوی از کپسول بومن و گلومرول تشکیل شده اند. گلومرول توده ای از مویرگ ها است و وظیفه تصفیه خون را دارد (Roberts, 2012). بافت کلیه ماهی ها به دلیل شرایط محیطی مختلف بسیار متفاوت است، ماهی های دریایی در مقایسه با ماهی های آب شیرین گلومرول های کمتر و کوچکتری در کلیه های خود دارند (Wong and Woo, 2006). برخی از ماهیان استخوانی دریایی به طور کامل فاقد لوله دیستال و گلومرول هستند، در حالی که در محیط های آب شیرین، تعداد و اندازه گلومرول های کلیه با بزرگتر شدن ماهی افزایش می یابد.

به دلیل ویژگی‌های نفوذ ناپذیر لوله‌های دیستال و مثانه در ماهیان آب شیرین، ماهی می تواند ادرار رقیق تولید نماید که بازجذب یون‌های ارزشمند (عمدتاً سدیم و کلراید) را امکان‌پذیر می کند و در عین حال بازجذب اسمزی آب را محدود می کند. در لوله پروکسیمال I، اسیدهای آلی ترشح می‌شوند، در حالی که ترکیباتی مانند گلوکز، سایر درشت مولکول‌ها، سدیم، کلراید و مقدار کمی آب بازجذب می‌شوند (McDonald and Grosell, 2006). اکثر یون های دو ظرفیتی مانند منیزیوم، سولفات و کلسیم در لوله پروکسیمال II نفرون دوباره جذب می شوند. سدیم، کلراید، پتاسیم و بی کربنات نیز در لوله های پروکسیمال II همراه با مقداری آب بازجذب می شوند (Cliff and Beyenbach, 1988; Dantzler, 2003). اگرچه عملکرد اصلی کلیه در آب شیرین بازجذب املاح و دفع آب است، اما بیشتر تحقیقات تا به امروز روی ماهی‌هایی بوده که در شرایط گرسنگی بوده اند و شواهد نشان می‌دهد که مصرف یون‌های غذایی می‌تواند باعث تغییر از بازجذب به ترشح یون‌های تک ظرفیتی و دو ظرفیتی شود (Takvam *et al.*, 2021)

۱-۵-سیستم آنتی اکسیدانی

همه موجودات هوازی از جمله آبزیان به اکسیژن مولکولی (O_2) نیاز دارند زیرا این عنصر برای بسیاری از فرآیندهای متابولیکی و تولید انرژی ضروری است. ولی وابستگی به اکسیژن می تواند خطری برای زندگی هوازی باشد (Lushchak and Bagnyukova, 2006)، زیرا اکسیژن می تواند خطر استرس اکسیداتیو را به همراه داشته باشد. در واقع، اکسیژن می تواند دو شکل شیمیایی داشته باشد، یک فرم اتمی (O) که یک رادیکال آزاد است و یک شکل مولکولی (O_2) که یک بی-رادیکال آزاد است (Rice-Evans *et al.*, 1995). گونه های فعال اکسیژن انواع مختلف دارند و بسیار واکنش پذیر هستند. آنیون سوپراکسید، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن (یک ترکیب غیر رادیکال) مهم ترین گونه های فعال اکسیژن محسوب می شوند که طی فرآیندهای فیزیولوژیکی در بدن جانداران تولید می شوند (Wilhelm Filho, 2007). رادیکال سوپراکسید بیشتر توسط میتوکندری تولید می شود. به طور معمول، در طی احیای شیمیایی اکسیژن به آب، الکترون‌ها از طریق زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی منتقل می‌شوند، اما ممکن است ۱ تا ۳ درصد از تمام الکترون‌ها از این زنجیره فرار کنند که منجر به تولید سوپراکسید می‌شود. رادیکال سوپراکسید تولید شده در سلول ها واکنش های شیمیایی مختلفی را باعث می شود که عملکردهای بیولوژیکی را تغییر می دهد. سوپراکسید دیسموتاز آنزیمی است که مسئول حذف سوپراکسید است. این آنزیم کاتالیزور تغییر مولکول سوپراکسید به اکسیژن و پراکسید هیدروژن است. اگر

سوپراکسید دیسموتاز فعالیت نداشته باشد، ملکول سوپراکسید منجر به تشکیل رادیکال های هیدروکسیل می شود (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). رادیکال های هیدروکسیل نیمه عمر بسیار کوتاهی دارند و به عنوان واکنش پذیرترین و مضر ترین گونه های فعال اکسیژن محسوب می شوند. از آنجایی که هیچ آنتی اکسیدانی قادر به خنثی سازی رادیکال های هیدروکسیل نیست، فقط می توان از تشکیل آن جلوگیری یا آسیب ناشی از آن را ترمیم کرد (Schieber and Chandel, 2014). اما پراکسید هیدروژن به عنوان یک ملکول اکسیژن فعال غیر رادیکال، به وفور در ماتریکس میتوکندری در طی فرآیند کاهش ملکول اکسیژن تولید می شود. پراکسید هیدروژن را می توان تا حدی توسط آنزیمهایی مانند کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز حذف کرد. پراکسید هیدروژن نیمه عمر بیشتری نسبت به اکثر ملکول فعال اکسیژن رادیکالی دارد و می تواند به راحتی از غشاهای زیستی عبور کند و ممکن است بیشتر در سیتوپلاسم سلول آزاد شود. در حضور یون های فلزی با ظرفیت متغیر، پراکسید هیدروژن می تواند به رادیکال هیدروکسیل تبدیل شود (Baud *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2016).

آبزیان مانند همه موجودات هوازی در خلال متابولیسم طبیعی خود ملکولهای اکسیژن فعال تولید می کنند، به ویژه در میتوکندری، پراکسی زوم ها، شبکه آندوپلاسمی و غشای پلاسمایی (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017). تحت شرایط فیزیولوژیکی نرمال، ملکولهای اکسیژن فعال در فرآیندهای مختلفی مانند دفاع از میزبان (به عنوان مثال، دفاع در برابر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا)، تنظیم چرخه سلولی و بسیاری از مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی نقش دارد (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). در غلظت‌های کم تا متوسط، ملکولهای اکسیژن فعال باعث آسیب نمی‌شوند، اما در غلظت‌های بالا، تغییرات منفی در اجزای سلولی مانند چربی ها، پروتئین‌ها و DNA را القاء می‌کنند. ملکولهای اکسیژن فعال می توانند باعث پراکسیداسیون اسیدهای چرب چند غیراشباع شوند که منجر به اختلال در آرایش دولایه چربی غشاء و تغییر ساختار و نفوذپذیری آن می‌شوند (Hematyar *et al.*, 2019). علاوه بر این، محصولات پراکسیداسیون چربی، مانند مالون دی آلدهید و آلدهیدهای غیر اشباع، ممکن است فعالیت بسیاری از پروتئین ها را تغییر دهند و باعث ایجاد پیوندهای متقابل پروتئین شوند. علاوه بر چربی، ملکولهای اکسیژن فعال همچنین می‌توانند مستقیماً اسیدهای آمینه پروتئین را تغییر داده و باعث تشکیل پروتئین کربونیل شوند که ساختار و عملکرد پروتئین را تغییر می‌دهد (Hematyar *et al.*, 2019). ملکولهای اکسیژن فعال به طور بالقوه می تواند به DNA حمله کرده و باعث تخریب بازها، شکسته شدن DNA تک یا دو رشته ای و تغییرات پورین، پیریمیدین یا قند آنها شوند (Janssens *et al.*, 2002; Hamed and El-Sayed, 2019). این تغییرات DNA منجر به سمیت ژنتیکی از جمله القای تشکیل میکرونوکلئوس، ناهنجاری های کروموزومی و هسته ای، جهش، حذف یا جابجایی، و پیوند متقابل DNA با پروتئین ها می شود (Guilherme *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2018). ملکولهای اکسیژن فعال می‌توانند باعث القای بیان چندین فاکتور رونویسی مانند فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده کاپا (NF-kB)، پروتئین فعال‌کننده ۱ (AP-1)، فاکتور هسته‌ای سلول‌های T فعال و فاکتور ۱-آلفا القاشونده توسط هیپوکسی شوند که در

التهاب نقش دارند (Moniruzzaman *et al.*, 2018). آبشارهای انتقال سیگنال که اطلاعات را از بیرون به داخل سلول منتقل می کند باعث فعال شدن فاکتورهای رونویسی به وسیله ملکولهای اکسیژن فعال می شوند (Sun and Oberley, 1996). علاوه بر آنزیمهای آنتی اکسیدانی، مواد آنتی اکسیدانی با وزن مولکولی کم مانند کاروتنوئیدها، ویتامین های E، K و C، اسیدهای آمینه و پپتیدها (گلوتاتیون)، در سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی ماهی ها شناسایی شده اند (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005; Biller and Takahashi, 2018). از آنجایی که سوپراکسید اولین ملکول اکسیژن فعال تولید شده توسط سلول ها است، خنثی سازی آن توسط سوپراکسید دیسموتاز بسیار مهم است. سوپراکسید دیسموتاز به مقدار زیاد در میتوکندری (Mn^{2+}-SOD) و سیتوزول (Cu^{2+}-SOD و Zn^{2+}-SOD) یافت می شود (Ken *et al.*, 2003; Arockiaraj *et al.*, 2014). فعالیت سوپراکسید دیسموتاز منجر به تبدیل سوپراکسید به پراکسید هیدروژن می شود که می تواند توسط آنزیمهای کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز خنثی شود (Schieber and Chandel, 2014). کاتالاز، هم در میتوکندری و هم در پراکسی زوم‌ها فعالیت دارد و تعادل بین تشکیل و خنثی سازی ملکولهای اکسیژن فعال را حفظ می‌کند که برای عملکرد ایمنی ذاتی ضروری است (Hoseini *et al.*, 2021; Hoseini *et al.*, 2022a). کاتالاز در بسیاری از فرآیندها از جمله تکثیر، تمایز، مهاجرت سلولی و آپوپتوز نقش دارد (Tehrani and Moosavi-Movahedi, 2018). همچنین در حضور گلوتاتیون احیائی، پراکسید هیدروژن می تواند توسط گلوتاتیون پراکسیداز در میتوکندری یا در سیتوزول خنثی شود که در این واکنش گلوتاتیون احیائی اکسید شده و از نظر زیستی غیر فعال خواهد بود. گلوتاتیون پراکسیداز نقش مهمی در جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدی و جلوگیری از آسیب های غشای سلولی ایفا می کند و فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز برای احیاء مجدد گلوتاتیون اکسید شده ضروری است (Hoseini *et al.*, 2022c; Hoseini *et al.*, 2022b; Yousefi *et al.*, 2022).

۱-۶-غنی سازی جیره برای مقاومت به تنش شوری

افزودنی های غذایی مقاومت ماهیان به تنش شوری را افزایش می دهند. این افزودنی ها با تامین مواد مغذی و مواد معدنی ضروری منجر به حفظ تعادل یونی در بدن ماهی و در نتیجه غلبه بر استرس اسمزی می شوند (Gatlin III *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 2020). استرس اسمزی زمانی رخ می دهد که اختلاف زیادی بین غلظت املاح (یون ها، نمک ها و ...) موجود در بدن ماهی و آب محیط اطراف آن وجود داشته باشد (Baldisserotto, 2019). استرس اسمزی می تواند منجر به از دست دادن آب یا جذب بیش از حد آبرشود که برای ماهی مضر است. ماهی ها باید تعادل یون هایی مانند سدیم، پتاسیم و کلر را در مایعات بدن خود حفظ کنند. افزودنی های غذایی مانند الکترولیت ها، ویتامین ها و مواد معدنی به تنظیم تعادل اسمزی و تنظیم جذب و دفع یون ها در ماهی کمک می کنند. استرس اسمزی می تواند سیستم ایمنی ماهی را ضعیف کند و آن را مستعد ابتلا به بیماری کند (Dawood *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2022). افزودنی‌های غذایی مانند ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند باعث تقویت عملکرد ایمنی و قدرت سیستم آنتی اکسیدانی ماهی شده و به مبارزه با عفونت‌ها و بیماری‌ها کمک کنند. استرس اسمزی می تواند تولید رادیکال های آزاد را افزایش دهد که می تواند به

سلول ها و بافت ها آسیب برساند و منجر به استرس اکسیداتیو شود (Huang *et al.*, 2021). آنتی اکسیدان هایی مانند ویتامین C، ویتامین E و سلنیوم می توانند به خنثی کردن رادیکال های آزاد و محافظت از سلول ها در برابر آسیب اکسیداتیو کمک کنند (Lee *et al.*, 2015). این آنتی اکسیدان ها اغلب در خوراک ماهی به عنوان افزودنی های غذایی برای بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی ماهی و محافظت از آن در برابر اثرات مضر استرس اسمزی گنجانده می شوند (Jalali *et al.*, 2008; 2010; Dawood *et al.*, 2019). علاوه بر این، برخی از افزودنی‌های غذایی مانند پروبیوتیک‌ها نشان داده‌اند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ماهی را با افزایش رشد باکتری‌های مفید در روده بهبود می‌بخشند. این باکتری ها می توانند آنتی اکسیدان هایی مانند گلوتاتیون تولید کنند که می تواند به محافظت از ماهی در برابر استرس اکسیداتیو کمک کند (Hoseinifar *et al.*, 2021).

۱-۷-کلرید سدیم

افزودن کلرید سدیم به جیره آبزیان به منظور رشد و تغییرات فیزیولوژیکی انجام شده است و مشخص شده که باعث افزایش توانایی ماهی برای مقابله با تنش شوری می شود (Smith *et al.*, 1999; Perry *et al.*, 2010). افزودن نمک به جیره غذایی ماهی ها به منظور تامین الکترولیتهای مورد نیاز و یا فعال نمودن سیستم تنظیم اسمزی انجام می شود. به عنوان مثال، افزودن نمک به جیره ماهی های آب شور که در آب شیرین یا لب شور نگهداری می شوند باعث افزایش تعداد سلولهای کلراید و کاهش مصرف انرژی جهت تنظیم یونهای بدن می شود (Santos *et al.*, 2014; Alam *et al.*, 2015). همچنین، در برخی مطالعات مشخص شده است که افزودن نمک به جیره غذایی ماهیان آب شیرین می تواند باعث بهبود عملکرد تنظیم اسمزی پس از انتقال به آب شور شود (Fontainhas-Fernandes *et al.*, 2000; Perry *et al.*, 2010). همچنین، مشخص شده است که تنش شوری منجر به بروز استرس اکسیداتیو (اکسیداسیون مواد بیولوژیکی بدن مانند پروتئینها، اسیدهای چرب غیر اشباع و آسیب به DNA) در ماهی می شود که می تواند منجر به تلفات گردد (Caxico Vieira *et al.*, 2018; Ghelichpour *et al.*, 2020). به همین دلیل کاهش تنش اسمزی می تواند بقاء ماهی در مواجهه با آب شور را افزایش دهد.

۱-۸-پروبیوتیک ها

پروبیوتیک ها موجوداتی هستند که به تعادل میکروبی روده کمک می کنند. علاقه به استفاده از پروبیوتیکها در آبزی پروری روند افزایش دارد در حال حاضر به منظور ارتقاء سلامت، پیشگیری و درمان بیماریها و افزایش رشد در جیره غذایی استفاده می شوند (Nayak, 2010). پروبیوتیک ها از مدتها قبل در فعالیت های آبزی پروری استفاده می شدند، اما در چند سال اخیر پروبیوتیک ها به بخشی جدایی ناپذیر از آبزی پروری برای بهبود رشد و مقاومت در برابر بیماری تبدیل شده اند. این استراتژی مزایای زیادی دارد و برای غلبه بر محدودیت ها و عوارض جانبی آنتی بیوتیک ها و سایر داروها

موثر است و همچنین از طریق افزایش رشد و پیشگیری از بیماری منجر به افزایش تولید می شود (Yilmaz *et al.*, 2022). انواع مختلفی از پروبیوتیکها در آبزی پروری مورد استفاده می شوند که هر یک برای هدف و گونه خاصی طراحی شده اند.

در سیستم‌هاي آبزي‌پروري، میکروب‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار بوده و بر عملکرد رشد اثرات ویژه‌ای نشان می‌دهند. علت این امر تا حدی مربوط به ارتباط مستقیم بیماري‌ها و کیفیت آب، با عوامل میکروبي است. اخیراً در آبزي‌پروري به‌منظور حفظ شرایط اکولوژیك، از پروبیوتیك به‌جاي آنتي‌بیوتیك استفاده مي‌شود. به‌منظور استفاده از پروبیوتیك‌ها در آبزی‌پروری، در نظر گرفتن الزاماتی نظیر وجود باکتري با کیفیت مناسب به‌عنوان پروبیوتیك و تکنیك انتقال باکتري به لارو ضروري است (Skjermo and Vadstein, 1999). این گونه باکتري‌ها با تولید مواد سلولي یا میکرونوترینت‌هایی شبیه اسیدهاي چرب ضروري (Ringø and Gatesoupe, 1998)، ویتامین‌ها (Sugita *et al.*, 1991)، مواد معدني یا حتي آنزیم‌ها (Ray *et al.*, 2012) به تغذیه کمك مي‌نمایند.

حضور باکتري‌هاي اسید لاکتیك در دستگاه گوارش دلیلي بر وجود تخمیر در روده می‌باشد. این باکتری‌ها بر هیدرات‌هاي کربن پیچیده همچون نشاسته و سلولز تأثیر گذاشته و آنها را به ترکیبات ساده‌تر تبدیل مي‌کنند تا جذب و سنتز ویتامین‌هاي خانواده B و ویتامین K در لوله گوارش صورت گیرد (Hoseinifar *et al.*, 2017). در اکوسیستم‌هاي آبي ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها و دیگر واحدهاي زنده و همچنین جریان مداوم آب، میان دستگاه گوارش ماهیان و بي‌مهرگان، همه روي میکروفلور بومي تأثیر مي‌گذارد. ایجاد کلني‌هاي پروبیوتیك در امعاء و احشا احتمالاً در اثر مصرف آن از محیط آبي اطراف مي‌باشد که سبب تعدیل فلور امعاء و احشا مي شود و باعث بهبود رشد و بقاي لاروها مي‌گردد (Vasemägi *et al.*, 2017). این امکان وجود داردکه پروبیوتیك‌ها همانند یك ماده فعال‌کننده مکانیسم‌هاي دفاعي عمل نمایند. باکتري‌هاي پروبیوتیك هوازي با مصرف اکسیژن، شرایط لوله گوارش را براي عوامل بیماریزا هوازي سخت مي‌نمایند و براي آنها محدودیت ایجاد مي‌نمایند و از رشد آنها جلوگیري مي‌کنند. همچنین از لحاظ فضا و غذا نیز با آنها رقابت مي‌کنند. در این میان تعدادي از پروبیوتیك‌ها اجباراً از بین مي روند (Raa, 1996).

در واقع استفاده از پروبیوتیك‌ها در آبزي‌پروري، باعث کاهش مصرف ترکیبات آنتي‌میکروبیال (بویژه آنتي‌بیوتیك‌ها)، افزایش میزان اشتها و یا مقدار رشد گونه‌هاي پرورش یافته مي‌شود (Irianto and Austin, 2002). شاید بتوان مهم‌ترین ویژگي پروبیوتیك‌ها را در این دانست که ضمن کاهش بیماري و بهبود ضریب تبدیل غذایي در دام و طیور، هیچ باقیمانده‌ای در بافت‌ها نداشته و برخلاف پادزیست‌ها مقاومت میکروبي ایجاد نمي‌نمایند. درمان با آنتي‌بیوتیك وضعیت فلور معمولي محافظت کننده بدن را بر هم مي‌زند و موجود را نسبت به سایر عفونت‌هاي فرصت طلب مستعد مي‌نماید و موجب افزایش نگراني و ترس از ایجاد سویه‌هاي میکروبي مقاوم به آنتي‌بیوتیك در اثر استعمال گسترده آن شده است. با استفاده از آنتي‌بیوتیك‌هاي مشابه، سویه‌هاي میکروبي نسبت به آنها مقاومت پیدا مي‌کنند و به‌سرعت رشد یافته و تکامل مي‌یابند (Alderman and Hastings, 1998).

۱-۸-۱-انواع پروبیوتیک‌ها

در حال حاضر پروبیوتیک‌هایی که در تغذیهٔ انسان و جانوران خشکی‌زی استفاده می‌شوند باکتری‌های گرم مثبت بی‌هوازی اختیاری یا اجباری و عمدتاً از دستهٔ باکتری‌های اسید لاکتیک هستند. لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها از معمول‌ترین پروبیوتیک‌ها در تغذیهٔ انسان هستند و بیفیدوباکترها جهت مقابله با عوامل بیماری‌زا کاربرد دارند. اما میکروب‌هایی که برای انسان یا دام کاربرد دارند ممکن است که برای آبزیان کاربرد نداشته باشند. وقتی یک پروبیوتیک برای آبزیان انتخاب می‌شود باید عادات غذایی ماهی (گیاهخوار، گوشتخوار و همه‌چیزخوار) و سازگاری پروبیوتیک با میکروبیوتای روده (که بیشتر شامل باکتری‌های گرم منفی بی‌هوازی اختیاری هستند) در نظر گرفته شوند. همچنین، پروبیوتیک انتخابی باید بتواند شرایط pH معده و رودهٔ ماهی را تحمل کند. pH بخش‌های مختلف دستگاه گوارش ماهی بین ۸/۵-۷ است (Ng *et al.*, 2009; Solovyev and Izvekova, 2016). پروبیوتیک‌ها باید برای میزبان مواد سودمند تولید کنند، مانند باکتریوسین‌ها، پراکسید هیدروژن و بیوسورفکتانت‌ها که از رشد عوامل بیماری‌زا مانند مخمرهای مضر جلوگیری کنند (Chen *et al.*, 2019; El-Saadony *et al.*, 2021).

باکتری‌های اسید لاکتیک کروی هستند، هاگ تولید نمی‌کنند و متعلق به جنس‌های مختلفی از باکتری‌های گرم مثبت هستند. آنها می‌توانند کربوهیدرات را تخمیر کرده و اسید لاکتیک، اتانول و یا سایر متابولیت‌ها را تولید نمایند (Françoise, 2010). میکروبیوتای بومی رودهٔ ماهیان آب شیرین عمدتاً شامل باکتری‌های اسید لاکتیک است که تعدادشان نسبت به ماهیان آب شور بیشتر است (Ringø *et al.*, 2010). جنس‌های غالب این باکتری‌ها در ماهی عبارتند از *Lactobacillus*، *Leuconostoc* و *Pediococcus*، و جنس‌های *Carnobacterium*، *Oenococcus*، *Sporolactobacillus*، *Tetragenococcus*، *Weissella* و *Bifiobacterium* نیز به تعداد کم وجود دارند. تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک در ماهیان توسط تکنیک‌های پیشرفتهٔ ملکولی مشخص شده است. بسیاری از گونه‌های فوق الذکر بی‌خطر هستند ولی باکتری‌های اسید لاکتیک دیگر مثل *Streptococcus iniae* و *Lactococcus garvieae* باعث بیماری در ماهی می‌شوند (Gatesoupe, 2007). *Lactobacillus* بزرگترین جنس از خانوادهٔ Lactobacillaceae است که گونه و زیر گونه‌های زیادی داشته که در انسان خواص درمانی و پیشگیری از بیماری دارند. این باکتری‌های کموارگانوتروف خردهوازی می‌توانند در pH اسیدی تکثیر کنند و بهترین pH برای آنها ۶/۲-۵/۵ است (Zhu, 2000). گونه‌های این جنس در ماهیان آب شیرین و شور وجود دارند و خاصیت پروبیوتیکی آنها با روند رو به رشدی در حال بررسی است.

باسیلوس‌ها نیز به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. این باکتری‌های کروی گرم مثبت هوازی هتروتروف نسبت به حرارت مقاوم هستند و می‌توانند pH اسیدی دستگاه گوارش را تحمل کنند (Cutting, 2011). این گروه شامل انواع باکتری‌های گرمادوست، سرمادوست، میانه‌دوست، اسید دوست، قلیادوست و خنثی‌دوست است. *Bacillus megaterium*، *B. lincheniforms*، *Paenibacillus polymyxa*، و چندین نژاد از *B. subtilis* در حال حاضر در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند (Cutting, 2011) که گونهٔ اخیر بیشتر از بقیه مورد مطالعه قرار گرفته است. این گونه می‌تواند اندوسپور تولید کرده و به این

ترتیب می‌تواند ژنوم خود را به خوبی در شرایط بد محیطی حفظ کند (McKenney *et al.*, 2013). برخی از باسیلوس‌ها مانند *Bacillus mycoides* در ماهی بیماری ایجاد می‌کنند.

مخمرها نیز می‌توانند پروبیوتیک باشند. آنها می‌توانند نوسانات pH را تحمل کنند. شایع‌ترین مخمر در رودهٔ انسان *Candida albicans* است؛ همچنین، *Saccharomyces boulardii* می‌تواند به عنوان پری بیوتیک از بیماری‌های روده جلوگیری کند زیرا می‌تواند با برخی سموم باکتریایی مقابله کند، فعالیت ضدپاتوژنی دارد، و می‌تواند ایمنی موکوس روده را افزایش دهد (Czerucka *et al.*, 2007). در نشخوارکنندگان، *S. cerevisiae* برای باکتری‌های شکمبه مفید هستند که علت آن فعالیت تنفسی آنهاست (Newbold *et al.*, 2007). مخمرهایی که به عنوان پری بیوتیک در آبزیان استفاده می‌شوند می‌توانند pH دستگاه گوارش را تحمل کرده و در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند (Czerucka *et al.*, 2007). بهترین pH و دما برای مخمرها به ترتیب ۶/۵-۴/۵ و ۳۰-۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد است (Czerucka *et al.*, 2007). *S. cerevisiae* بیماری‌زا نبوده و از نظر ژنتیکی قابل شناسایی است و بیشتر از سایر مخمرها در آبزی‌پروری مورد مطالعه قرار گرفته است (Gatesoupe, 2007).

۱-۸-۲-نحوه عمل پروبیوتیک‌ها

پروبیوتیک‌ها اثرات مثبت چندگانه‌ای را از طریق جیره به میزبان منتقل می‌کنند. مکانیسم این اثرات در ماهیان کاملاً مشخص نیست. در انسان، پروبیوتیک‌ها از ۳ مسیر بر سلامت میزبان اثر می‌گذارند: ۱- با حذف باکتری‌های بیماری‌زا، ۲- تنظیم مسیرهای سیگنالینگ، و ۳- و با اثر بر ایمنی روده. در حال حاضر تحقیقاتی جهت بررسی این مسیرها در ماهیان در حال انجام است. پروبیوتیک‌های مفید مانند باکتری‌های اسید لاکتیک می‌توانند بر اکوسیستم روده اثر مثبت داشته باشند. آنها روی موکوس تولید شده توسط سلول‌های اپیتلیال روده بیوفیلم تشکیل می‌دهند. باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند مستقیماً یا به طور غیرمستقیم (از طریق باکتری‌های اتوکتانوس) با باکتری‌های بیماری‌زا رقابت کنند. همچنین، این پروبیوتیک‌ها می‌توانند به تولید موکوس و پپتیدهای ضدمیکروبی کمک کنند، از آپوپتوز جلوگیری کنند و یا عملکرد فضاهای بین سلولی (tight junction) را بهبود بخشند که در نتیجه باعث بالا رفتن کارایی سد اپیتلیالی می‌شوند. ملکول‌های ممانعت کنندهٔ حاصل از پروبیوتیک‌ها از تثبیت عوامل بیماری‌زا در روده جلوگیری می‌کنند. بنابراین پروبیوتیک‌ها می‌توانند بر عوامل بیماری‌زا غلبه نموده و از ایجاد شکاف در سد موکوسی -که باعث عفونت می‌شود- جلوگیری کنند. پروبیوتیک‌ها همچنین می‌توانند ساختار روده و قابلیت استفاده از مواد غذایی را بهبود دهند که باعث بهبود رشد می‌شود (Ringø *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015).

در ماهی‌ها، پاسخ به پروبیتیک‌ها بیشتر از بُعد پاسخ‌های ایمنی عمومی و مقاومت در برابر بیماری بررسی شده است. برای مشخص شدن مفید بودن پروبیتیک‌ها، باید مشخص شود که چطور ملکول‌های مؤثر پروبیوتیک‌ها سلول‌های ایمنی

را فعال کرده و پاسخ میزبان به فعال شدن سیستم ایمنی چیست. همچنین، باید مشخص شود که بهبود تاغذیه از طریق پروبیوتیک‌ها با تأثیر بر کدام مکانیسم‌های فیزیولوژیکی میزبان صورت می‌پذیرد.

۱-۹-اهداف

- تعیین اثر افزودن نمک و پروبیوتیک به جیره بر بقاء بچه ماهی کپور نورس به تنش شوری
- تعیین اثر افزودن نمک و پروبیوتیک به جیره بر شاخصهای آنتی اکسیدانی بچه ماهی کپور نورس به تنش شوری
- تعیین اثر افزودن نمک و پروبیوتیک به جیره بر یونهای بدن بچه ماهی کپور نورس به تنش شوری

۱-۱۰-فرضیات تحقیق

فرض اول

- H_0: تجویز خوراکی نمک اثری بر استرس و زنده مانی ماهی کپور نورس در مواجهه با آب شور ندارد
- H_1: تجویز خوراکی نمک منجر به کاهش استرس و افزایش زنده مانی ماهی کپور نورس در مواجهه با آب شور می شود

فرض دوم

- H_0: تجویز خوراکی پروبیوتیک اثری بر استرس اکسیداتیو و زنده مانی ماهی کپور نورس در مواجهه با آب شور ندارد
- H_1: تجویز خوراکی پروبیوتیک منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و افزایش زنده مانی ماهی کپور نورس در مواجهه با آب شور می شود

۲-سابقه تحقیق

بچه ماهی کپور دریایی با وزن ۲/۱ گرم پس از یک هفته نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، تلفات ۱۰۰ درصدی پس از ۲۴ ساعت مواجهه مستقیم با آب ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر دریای خزر داشته است؛ درحالیکه میزان تلفات در شوری های ۵ و ۱۰ گرم در لیتر تا ۹۶ ساعت گزارش نشده است. میزان سدیم و پتاسیم خون به ترتیب افزایش و کاهش معنی داری ۲۴ ساعت پس از مواجهه با آب لب شور ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر داشته است که نشان دهنده تنش اسمزی مرگبار در بچه ماهیان است (Gholami *et al.*, 2013).

بچه ماهی کپور دریایی که پس از ۴۵ روز پرورش در آزمایشگاه به وزن ۴/۵ گرم رسیده بود، در مواجهه با تنش شوری ۱۳ گرم در لیتر (منشاء آب شور نامشخص) پس از ۷ روز تلفاتی نداشته است (Imanpoor and Roohi, 2015).

بچه ماهی کپور دریایی با وزن اولیه حدود ۲/۵ گرم به مدت ۸ هفته در شرایط آزمایشگاهی پرورش یافته و سپس به طور مستقیم به شوری ۱۳ گرم در لیتر (منشاء آب شور نامشخص) تلفات ناچیزی (کمتر از ۵ درصد) نشان داده است (Roohi *et al.*, 2017).

بچه ماهی کپور دریایی (۱۰ گرمی) که به مدت ۱۰ روز در شوری آب ۳ گرم در لیتر (شوری طبیعی آب چاه) نگهداری شده بود پس از افزودن ۵ گرم در لیتر کلرید سدیم به آب تلفاتی نداشت ولی میزان کورتیزول، گلوکز و سدیم سرم ماهی افزایش داشت (Hosseini and Hoseini, 2012). در آزمایشی دیگر با استفاده از بچه ماهیان ۱۴ گرمی کپور (با منشاء مشابه مطالعه قبل) که در همان آب چاه نگهداری شده بودند، پس از افزودن ۷ گرم در لیتر کلرید سدیم، طی سه روز تلفات ۹۴ درصدی داشتند و افزایش میزان کورتیزول، گلوکز، کلراید و سدیم سرم در ماهی ها مشهود بود (Hoseini and Hosseini, 2010).

انتقال تدریجی ماهی قزل الای رنگین کمان به آب لب شور دریا (روزی ۳ گرم در لیتر افزایش؛ تا ۱۵ گرم در لیتر) منجر به افزایش کورتیزول سرم و فعالیت سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کبد و مالون دی آلدهید در عضله شد. (Huang *et al.*, 2021)

افزودن نمک از ۲/۵ تا ۱۲/۵ درصد به جیره غذایی سی باس سیاه اثر معنی داری بر غلظت سدیم و پتاسیم بدن ماهی نداشته است ولی میزان کلراید بدن در تیمار ۷/۵ درصد نمک به طور معنی داری افزایش یافت ولی در مقادیر بالاتر نمک جیره مجددا کاهش یافت (Alam *et al.*, 2015).

فارابی و همکاران (۱۳۹۹) اثر افزودن ۱ درصد نمک به جیره غذایی ماهی سفید به مدت ۵، ۷ و ۱۰ روز را بر بقاء در برابر تنش شوری بررسی نمودند. به این منظور بچه ماهی های یک گرمی به مدت ۲۸ روز در آب دریای خزر قرار گرفتند. نتایج نشان داد که افزودن یک درصد نمک به جیره غذایی به مدت ۵ روز منجر به تغییر ساختار آبشش و افزایش بقاء در برابر تنش شوری ناگهانی می شود.

Gatlin و همکاران (۱۹۹۲) به بررسی اثر افزودن کلرید سدیم به جیره ماهی شوریده در آب شیرین، لب شور و شور پرداختند. در خلال ۸ هفته پرورش در آب شیرین، افزودن ۲ درصد کلرید سدیم به جیره باعث افزایش کارایی غذا شد ولی این نتایج در آب لب شور و شور مشاهده نشد. همچنین، کلرید سدیم اثر بر بقاء و شاخصهای خونی ماهی پس از انتقال به آب دریا نداشت.

Fontainhas-Fernandes و همکاران (۲۰۰۱) به بررسی اثر افزودن ۸ درصد کلرید سدیم به جیره تیلاپیا بر شاخصهای خونی این ماهی پس از انتقال مستقیم از آب شیرین به شور پرداختند. نتایج نشان داد که کلرید سدیم باعث افزایش کورتیزول قبل و بعد از انتقال به آب شور می شود. همچنین، فعالیت آنزیم Na/K-ATPase در آبشش بعد از انتقال به آب شور در گروه تیمار شده با کلرید سدیم بیشتر از گروه شاهد بود. کلرید سدیم اثر معنی داری بر اسمولالیته و غلظت یون کلر نداشت ولی باعث شد که این شاخصها پس از انتقال به آب شور، کمتر از گروه شاهد افزایش یابند.

Perry و همکاران (۲۰۰۶) جیره حاوی ۱۱ درصد کلرید سدیم را به ماهی قزل آلا عرضه کردند. نتایج نشان داد که کلرید سدیم باعث افزایش بیان ژن پروتئین cystic fibrosis transmembrane conductance regulator و Na/K/2Cl– co-transporter و آنزیم Na/K-ATPase در آبشش شد که نقش مهمی در تنظیم یونی در آب شور دارند. همچنین، مطالعات سلولی نشان داد که کلرید سدیم باعث تغییراتی در ریخت شناسی سلولهای کلراید آبشش شده که توانایی ماهی در تنظیم یونی در آب شور را افزایش می دهد.

محققین گزارش نمودند که افزودن ۳ درصد کلرید سدیم به جیره تیلاپیا باعث افزایش اسمولالیه خون و افزایش رشد و کارایی غذا در این ماهی می شود (Cnaani *et al.*, 2010).

Tang و همکاران (۲۰۲۰) بیان داشتند باسیلوس سوبتیلیس میزان رشد و ضریب تبدیل غذایی تیلاپیای نیل در شوری ۱۶ گرم در لیتر نسبت به ماهیان رشد یافته در آب شیرین و آب شور بدون پروبیوتیک را افزایش می دهد. همچنین باسیسلوس سوبتیلیس باعث افزایش فعالیت کمپلمان (Complement activity) در این گروه شد که به طور معنی داری بیشتر از دو تیمار دیگر بود. پرورش در آب شور باعث کاهش مقدار ایمنوگلبولین شد ولی این کاهش در تیمار پروبیوتیک کمتر از تیمار بدون پروبیوتیک بود.

Caxico Vieira و همکاران (۲۰۱۷) ماهی تیلاپیای نیل را در آب شور (۲۱ گرم در لیتر) یا شیرین وارد نمودند و تغییرات پارمترهای میزان بقا و بیان ژن های سیستم آنتی اکسیدانی و استرس را اندازه گیری نمودند. نتایج نشان داد که شوری آب منجر به استرس اکسیداتیو و کاهش بقا می شود و استفاده از ویتامین C به عنوان یک آنتی اکسیدان باعث کاهش اثرات منفی شوری در ماهی می شود.

Tang و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی خواص آنتی اکسیدانی باسیلوس سوبتیلیس در ماهی آمور پرداختند. آنها نشان دادند این پروبیوتیک منجر به افزایش رشد ماهی می شود. همچنین، مواجهه با باکتری بیماری زا منجر به بروز استرس اکسیداتیو

و بالا رفتن مقدار مالون دی آلدهید (Malondialdehyde) و کاهش مقدار گلوتاتیون احیائی (Reduced glutathione) شد و باسیلوس سوبتیلیس باعث کاهش استرس اکسیداتیو می شود.

Yin و همکاران (۲۰۱۸) به بررسی خواص آنتی اکسیدانی باسیلوس سوبتیلیس در ماهی قرمز پرداختند. به این منظور، ماهی ها در معرض غلظتهای مختلف سرب قرارگرفتند تا استرس اکسیداتیو در بدن آنها بروز نماید. نتایج نشان داد که غنی سازی جیره با باسیلوس سوبتیلیس منجر به افزایش فعالیت انزیمهای آنتی اکسیدانی و افزایش غلظت گلوتاتیون در ماهی می شود و میزان التهاب را کاهش می دهد.

انتقال مستقیم تیلاپیای نیل به شوری های ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر منجر به افزایش کورتیزول، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز و مالون دی آلدهید شد. از طرفی افزودن پروبیوتیک (*Aspergillus oryzae*) به جیره غذایی باعث کاهش اثرات ناشی از تنش شوری در ماهی شد (Shukry *et al.*, 2021).

۳-مواد و روش‌ها

۳-۱-زمان و مکان اجرای تحقیق

این تحقیق در تابستان ۱۴۰۱ در مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی گرگان انجام شد.

۳-۲-تهیه جیره های غذایی

در این تحقیق ۵ جیره غذایی حاوی صفر، ۵ و ۱۰ درصد نمک و صفر، $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ و $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ cfu/g پروبیوتیک تولید شد (جدول ۱). از پروبیوتیک تک سل محصول تک ژن زیست به عنوان منبع باسیلوس سوبتیلیس (مقدار توصیه شده شرکت برای تولید جیره $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/g است) و از نمک طعام دامی به عنوان منبع نمک استفاده شد. خوراک پودری کپور ماهیان دانسو (شرکت مهدانه) به عنوان جیره غذایی شاهد استفاده شد. جیره شاهد به روش استاندارد (AOAC, 2005) آزمایش شد و مشخص گردید که حاوی ۳۹/۲ درصد پروتئین، ۱۴/۹ درصد چربی، ۷/۷۴ درصد خاکستر و ۱/۰۰ درصد باز فرار کل بود. به این خوراک مقادیر مناسب نمک و پروبیوتیک و ۰/۱۲ درصد ژلاتین اضافه شد. مقدار مناسب نمک و ژلاتین در آب حل و ۵۰۰ میلی لیتر از این محلول به هر کیلوگرم جیره اضافه شد تا حالت خمیر پیدا کند. خمیر به دست آمده توسط یک توری با اندازه چشمه یک میلی متر تبدیل به رشته و در برابر وزش باید پنکه خشک شد. سپس رشته های با دست خرد شدند (شکل ۴) و تا زمان استفاده در یخچال قرار گرفتند.

جدول ۱: تشریح تیمارهای آزمایشی

تیمار	شرح
۱	۱۵ روز تغذیه با جیره پایه و سپس مواجهه با آب لب شور
۲	۱۵ روز تغذیه با جیره پایه + ۵ درصد نمک و سپس مواجهه با آب لب شور
۳	۱۵ روز تغذیه با جیره پایه + ۱۰ درصد نمک و سپس مواجهه با آب لب شور
۴	۱۵ روز تغذیه با جیره پایه + $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ پروبیوتیک و سپس مواجهه با آب لب شور
۵	۱۵ روز تغذیه با جیره پایه + $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ پروبیوتیک و سپس مواجهه با آب لب شور

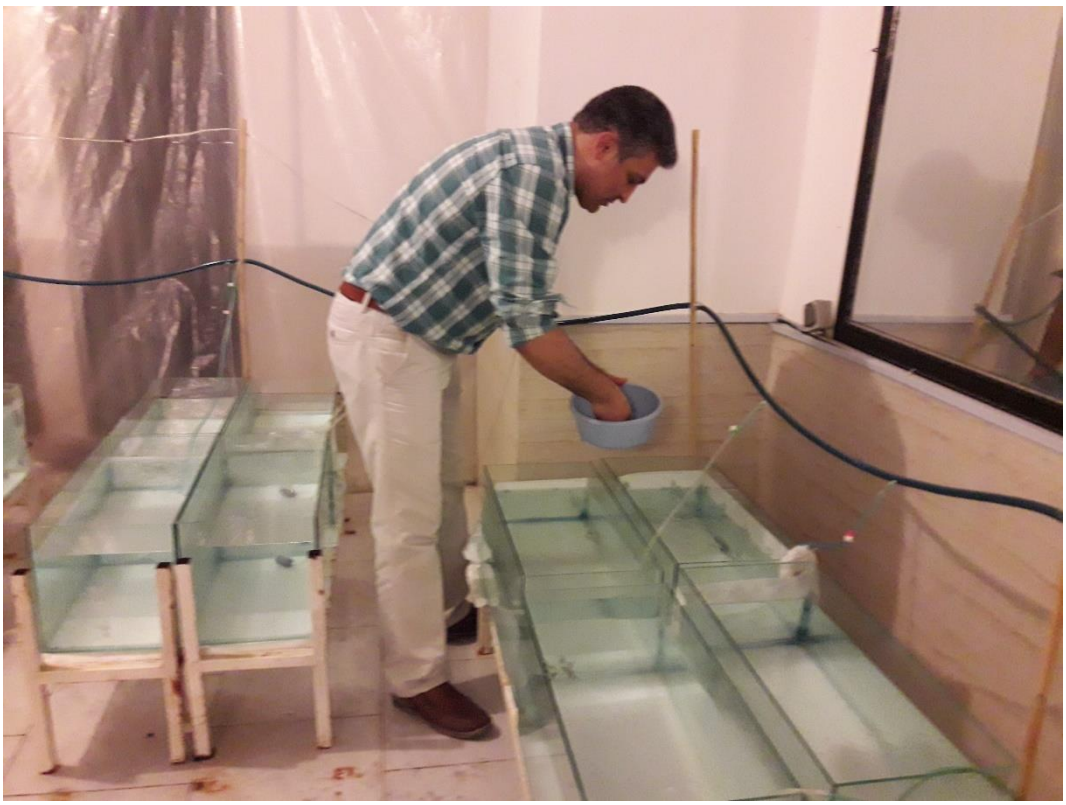
شکل ۴: پلتهای غذایی تولید شده برای تغذیه ماهی

۳-۳-تغذیه ماهی و تنش شوری

در این تحقیق از بچه ماهیان کپور دریایی با وزن حدود ۱/۱ گرم استفاده شد. تعداد ۱۰۰۰ بچه ماهی توسط یک مخزن ۳۰۰ لیتری از مرکز تکثیر ماهیان استخوانی سیجوال به مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی منتقل شدند (شکل ۵). ماهی ها در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری متصل به سیستم هوادهی به مدت سه روز ذخیره سازی و سپس به ۱۵ آکواریوم ۴۵ لیتری منتقل شدند (شکل ۶ و ۷). در هر آکواریوم ۴۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی وارد شد و هوادهی از طریق پمپ هوای مرکزی انجام گرفت.

شکل ۵: انتقال ماهی به محل اجرای آزمایش

هر یک از جیره های غذایی فوق در اختیار ماهیان سه آکواریوم قرار گرفت. دوره تغذیه ماهی ها ۱۵ روز بود (فارابی و همکاران، ۱۳۹۹) و در این دوره روزانه ۳ درصد وزن بدن غذادهی صورت گرفت. سپس آب لب شور وارد مخازن شده و ماهی ها به صورت ناگهانی در معرض تنش شوری قرار گرفتند.آب شور مورد نیاز از استخرهای آب شور گمیشان به آزمایشگاه منتقل شد و در ابتدا شوری آن توسط رفرکتومتر (آتاگو، ژاپن) اندازه گیری شد که معادل ۳۵ گرم در لیتر بود. این آب با مقادیر مناسب آب شهری مخلوط شد و شوری آن به میزان ۱۳ گرم در لیتر رسید. ماهی ها به مدت ۳۰ روز در این شرایط پرورش یافتند و در خلال این دوره، همه آکواریومها با جیره شاهد تغذیه شدند. در کل دوره پرورش و مواجهه با تنش شوری، نیمی از آب هر آکواریوم یک روز در میان با آب مناسب تعویض گردید. در کل دوره پرورش شاخصهای کیفی آب ثبت شدند (اکسیژن = ۰/۳۶ ± ۷/۷۲ میلی گرم بر لیتر، pH = ۰/۱۱ ± ۷/۸۱، دما = ۰/۲۴ ± ۲۵/۳۲ درجة سانتی گراد).



شکل ۶: تیماربندی و توزیع ماهی ها در آکواریوم

شاخصهای رشد و تلفات بر اساس فرمولهای زیر محاسبه شد:

وزن کسب شده (درصد) = ۱۰۰× [(وزن نهایی - وزن اولیه) ÷ وزن اولیه]

نرخ رشد ویژه (درصد در روز) = ۱۰۰ × [(لگاریتم طبیعی وزن نهایی - لگاریتم طبیعی وزن اولیه) ÷ زمان]

ضریب تبدیل غذایی = غذای مصرف شده ÷ (وزن نهایی - وزن اولیه)

نرخ تلفات = ۱۰۰ × (تعداد نهایی ماهی در هر آکواریوم - تعداد اولیه ماهی در هر آکواریوم) ÷ تعداد اولیه ماهی در هر آکواریوم

شکل ۷: بیومتری دسته جمعی ماهی های آکواریوم ها

۳-۴-نمونه گیری و انجام آزمایش‌ها

در این تحقیق نمونه های جداگانه ای برای بررسی ساختار میکروسکوپی آبشش و کلیه، اندازه گیری یونهای بدن، و اندازه گیری شاخصهای آنتی اکسیدانی و کورتیزول بدن گرفته شد (شکل ۸). پس از پایان دوره غذادهی ۱۵ روزه، تغذیه ماهی ها به مدت یک روز قطع و سپس نمونه کل بدن ماهی از هر تیمار گرفته شد. نمونه گیری های بعدی ۳ و ۱۰ روز پس از مواجهه با آب لب شور انجام شد.

شکل ۸: نمونه برداری اندامهای مختلف ماهی

جهت تهیه مقاطع بافتی، تعداد ۳ ماهی از هر تیمار قبل از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری نمونه گیری شدند. ابتدا ماهی ها با قطع نخاع کشته شده و به صورت کامل در محلول بوئن قرار گرفتند (شکل ۹). جهت انجام مراحل آبگیری و پارافینه کردن مقاطع بافتی، از دستگاه تیشوپروسسور استفاده شد و نهایتا نمونه ها در بلوک های پارافینی قرار گرفتند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم، برش هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و پس از قرار گرفتن بر روی لام، با استفاده از رنگ ائوزین-هماتوکسیلین رنگ آمیزی شدند. از هر نمونه ماهی تعداد ۳ مقطع با فواصل ۲۰۰ میکرون تهیه گردید. در نهایت مقاطع بافتی تهیه شده جهت ارزیابی تغییرات بافتی در آبشش و کلیه استفاده شد.

شکل ۹: تثبیت نمونه های کل بدن ماهی در محلول بوئن

برای اندازه گیری میزان رطوبت کل بدن، تعداد ۳ ماهی از هر تیمار پس از قطع نخاع وزن شده و روی فویلهای آلومینیومی قرار گرفتند (شکل ۱۰). سپس فویلها در آون (۱۰۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت) خشک شدند (AOAC, 2005) تا میزان از دست رفتن آب بدن در آب دریا به دست آید (Grant *et al.*, 2010). پس از ثبت رطوبت بدن، ماهی های خشک شده برای اندازه گیری یونهای بدن استفاده شدند (Grant *et al.*, 2009). نمونه ها در اسید نیتریک یک مولار (به نسبت ۱ به ۴) هضم شدند. اندازه گیری سدیم و پتاسیم در نمونه ها به روش فلیم فتومتری انجام و اندازه گیری یون کلر به روش ترسیب جیوه انجام شد (Wu *et al.*, 2003; EPA-METHOD, 2015).

شکل ۱۰: فویلهای آلومینیومی برای خشک کردن ماهی در آون

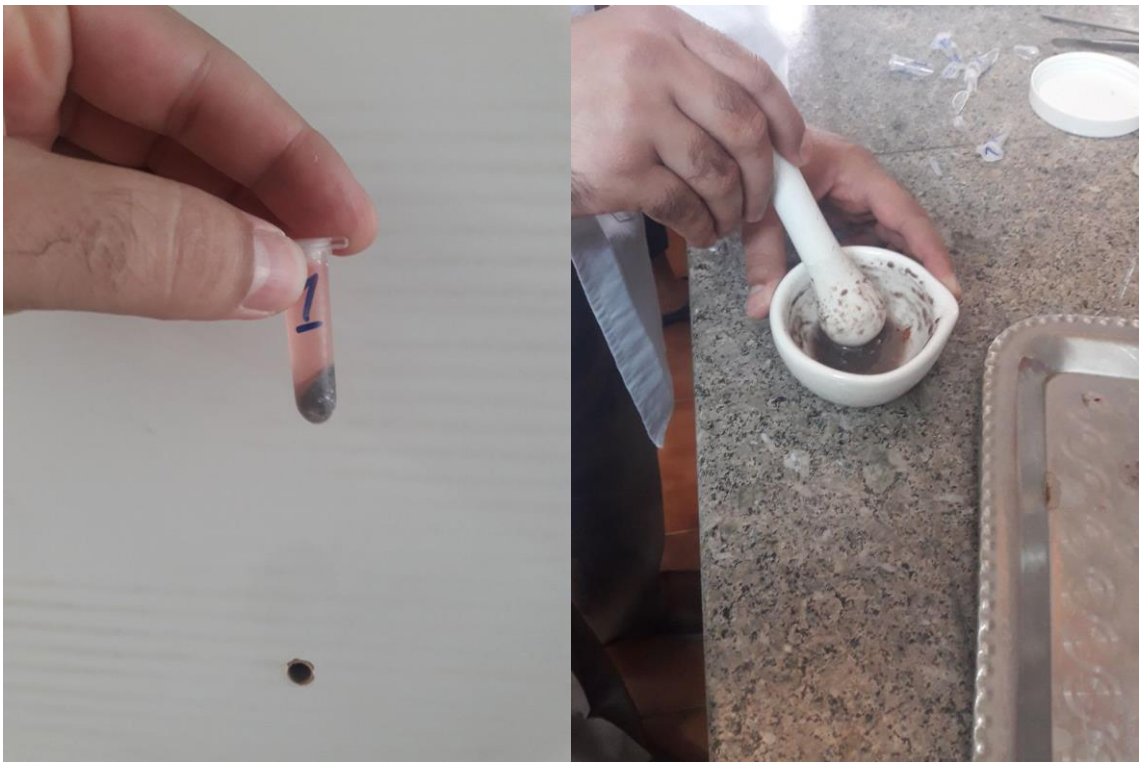
به منظور اندازه گیری شاخصهای آنتی اکسیدانی، از هر آکواریوم ۲ ماهی با هم مخلوط شدند تا یک نمونه به دست آید. نمونه های ماهی بلافاصله پس از صید در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس توسط هاون چینی هموژن شدند (شکل ۱۱). پس از هموژن سازی، بافر فسفات پی اچ ۷ سرد به میزان ۵ برابر وزن ماهی به آنها اضافه (Lionetto *et al.*, 2003) و بعد سانتریفیوژ شدند (۱۵ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی گراد، ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه). قسمت رویی نمونه در لوله های مجزا جمع آوری شده و برای اندازه گیری گلوتاتیون ردوکتاز، گبوتاتیون پرکسیداز، گلوتاتیون احیائی و مالون دی آلدهید استفاده شدند.

برای اندازه گیری فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز بدن، از کیت تجاری Zellbio آلمان استفاده شد. این کیت فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز را به طور غیرمستقیم و در واکنش موازی با گلوتاتیون ردوکتاز اندازه گیری می کند. فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز باعث تولید گلوتاتیون دی سولفید می شود که توسط گلوتاتیون ردوکتاز و اکسیداسیون NADPH به حالت احیا شده خود برمی گردد. اکسیداسیون NADPH به $NADP^+$ با کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر همراه است. نرخ کاهش جذب به طور مستقیم با فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز در نمونه متناسب است.

برای اندازه گیری فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز بدن، از کیت تجاری Zellbio آلمان استفاده شد. در این کیت با افزودن گلوتاتیون دی سولفید به نمونه ها، گلوتاتیون ردوکتاز با اکسیداسیون NADPH شروع به تبدیل گلوتاتیون دی سولفید به گلوتاتیون احیائی می کند. اکسیداسیون NADPH به +NADP با کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر همراه است. نرخ کاهش جذب به طور مستقیم با فعالیت گلوتاتیون گلوتاتیون ردوکتاز در نمونه متناسب است.

برای اندازه گیری فعالیت گلوتاتیون احیائی بدن، از کیت تجاری Zellbio آلمان استفاده شد. غلظت گلوتاتیون احیائی بر اساس واکنش با[5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)] DTNB در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. DTNB و

گلوتاتیون احیائی با هم واکنش می دهند تا اسید ۲-نیترو ۵-تیوبنزوئیک تولید شود که رنگ زرد دارد. شدت رنگ متناسب با غلظت گلوتاتیون احیائی در نمونه است. از اسید سولفوسالیسیلیک برای حذف پروتئین ها، محافظت گلوتاتیون احیائی در برابر اکسیداسیون و واکنش γ-گلوتامیل ترانس پپتیداز استفاده شد.



شکل ۱۱: هموژن کردن کل بدن ماهی و تهیه عصاره آنزیمی

در این روش، اسید تیوباربیتوریک با مالون دی آلدهید واکنش می دهد تا یک محصول قرمز تشکیل دهد که می تواند با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر شناسایی شود. به این منظور ۳۷۵ میلی گرم اسید تیوبابیتوریک، ۱۵ گرم تری کلرواستیک اسید و ۱۰ میلی گرم بوتیل هیدروکسی تولوئن در ۸۵ میلی لیتر اسید استیک گلاشیال حل شد. این محلول معمولاً به مدت ۱ هفته در دمای ۴+ یا ۲۰- درجه سانتی گراد پایدار است. برای سنجش نمونه ها، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول فوق مخلوط و در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۶۰ دقیقه انکوبه شد. سپس این محلول به مدت ۱۰ دقیقه در یک حمام یخ در دمای اتاق سرد شد. سپس به این مخلوط، بوتانول نرمال اضافه شد. پس از هم زدن شدید، نمونه حاصله سانتریفیوژ و قسمت بالایی نمونه دور ریخته شد. رسوبات به دست آمده مجددا با بوتانول نرمال شستشو و سانتریفیوژ شدند. پس از تبخیر بوتانول، باقی مانده مواد در آب مقطر حل شده و برای اندازه گیری مالون دی آلدهید استفاده شدند. جذب محلول در ۵۳۲ نانومتر ثبت شد. از محلول استاندارد مالون دی آلدهید (سیگما، آمریکا) جهت تعیین غلظت مالون دی آلدهید بر مبنای جذب نمونه استفاده شد.

سطح کورتیزول بدن با استفاده از یک کیت تجاری (مونوبایند، آمریکا)، و با استفاده از میکروپلیت ریدر یک در ۴۵۰ نانومتر و ۲۰ درجه سانتی گراد اندازه گیری شد. این کیت بر اساس روش الایزای رقابتی طراحی و برای سنجش کورتیزول در بدن ماهی استفاده شده است (Abdollahpour *et al.*, 2020). محدوده تشخیص کیت ۰ -۵۰۰ نانوگرم در میلی لیتر (حساسیت ۳/۶ نانوگرم در میلی لیتر) و واریانس میان سنجشی آن ۷/۵۲ درصد بود.

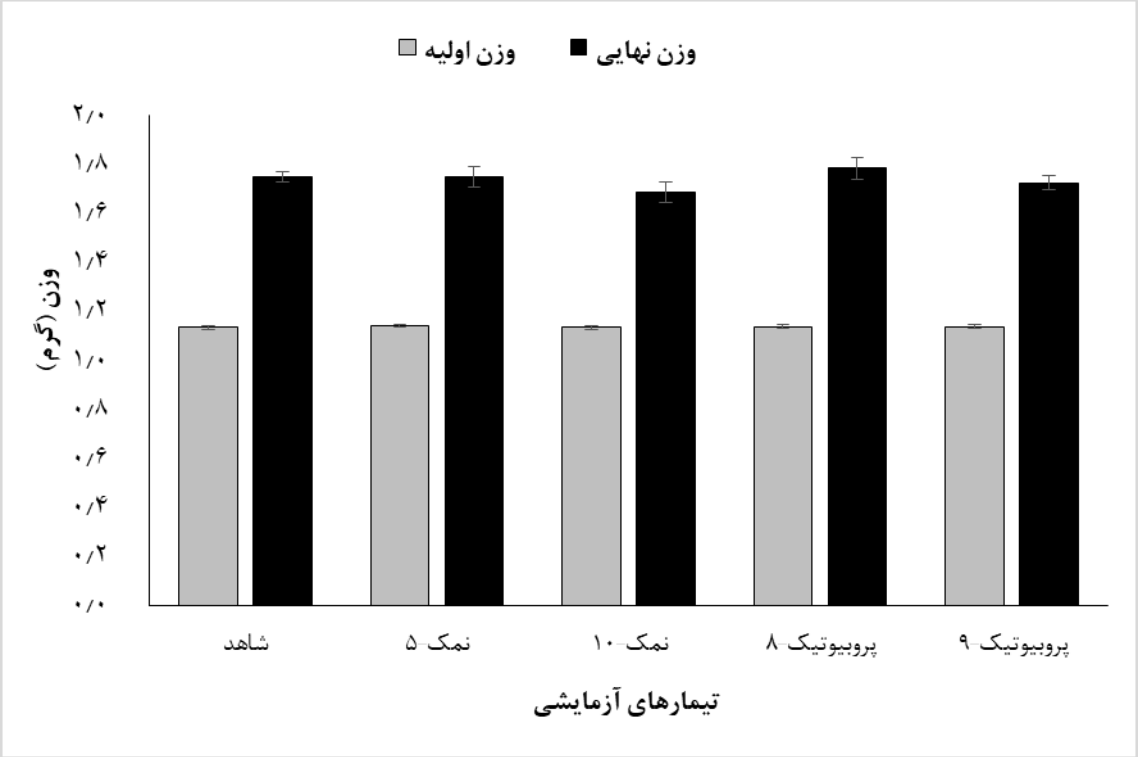
۳-۵-تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده ها از نظر پراکنش نرمال توسط آزمون های شاپیرو-ویلک بررسی شدند. همگن بودن واریانسها توسط آزمون مائوخلی بررسی شد. پس از تایید مفروضات تحلیل واریانس، داده ها به استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک عاملی اندازه گیری مکرر آنالیز شدند. مقایسه جفتی بین زمانها، تیمارهای غذایی، یا ترکیب تیمار زمان × تیمار غذایی (در صورت معنی دار شدن برهمکنش) توسط آزمون LSD انجام شد. معنی داری در سطح ۰/۰۵ بررسی شد و کلیه آنالیزها در SPSS v.22 انجام شدند. داده ها به صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند.

۴-نتایج

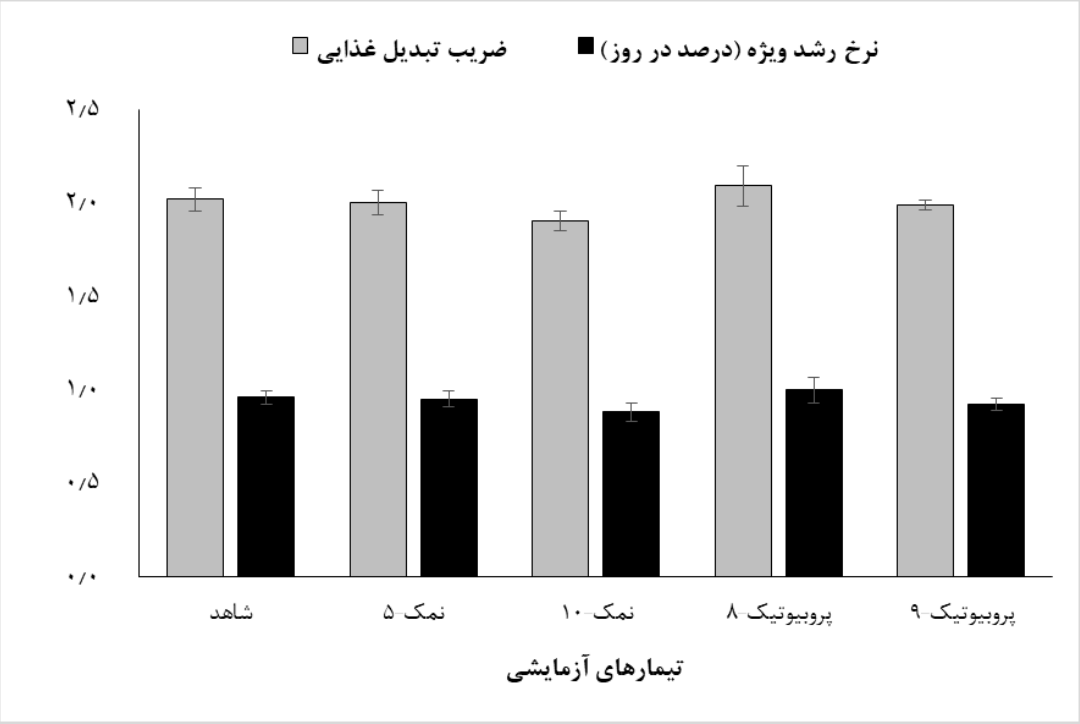
۴-۱-شاخص‌های رشد و بقا

تیمارهای مختلف غذایی اثر معنی داری بر وزن نهایی ماهی پس از ۱۵ روز پرورش در آب شیرین و ۳۰ روز پرورش در آب لب شور نداشتند. میانگین وزن نهایی در تیمارهای مختلف بین ۱/۶۹ الی ۱/۷۵ گرم بود (شکل ۱۲).



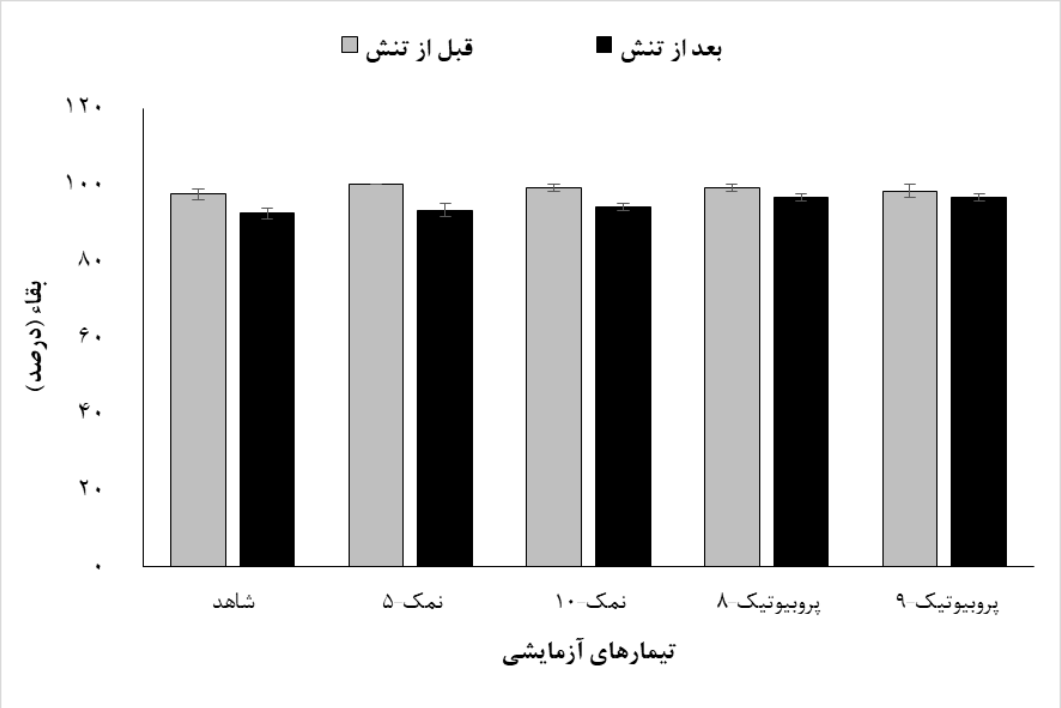
شکل ۱۲: میانگین (± خطای استاندارد) وزن اولیه و وزن نهایی در تیمارهای آزمایشی مختلف (تعداد تکرار = ۳)

اختلاف معنی داری بین تیمارهای مختلف غذایی در شاخصهای ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه مشاهده نشد. در تیمارهای مختلف، ضریب تبدیل غذایی ۱/۹۱ الی ۲/۰۹ و نرخ رشد ویژه ۰/۸۸ الی ۱ درصد در روز بود (شکل ۱۳).



شکل ۱۳: میانگین (± خطای استاندارد) ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه در تیمارهای آزمایشی مختلف (تعداد تکرار = ۳)

تیمارهای غذایی و تنش شوری اثر معنی داری روی بقا ماهی ها نداشتند. بقا ماهی ها در تیمارهای مختلف و قبل از تنش شوری بین ۹۷/۵ تا ۱۰۰ درصد بود. ۳۰ روز پس از پرورش در آب لب شور بقا تیمارهای مخلف بین ۹۲/۵ تا ۹۶/۷ درصد متغیر بود (شکل ۱۴).



شکل ۱۴: میانگین (± خطای استاندارد) درصد بقاء در تیمارهای آزمایشی مختلف قبل و بعد از تنش شوری (تعداد تکرار = ۳)

۴-۲-اثر نمک جیره بر شاخصهای بیوشیمیایی ماهی

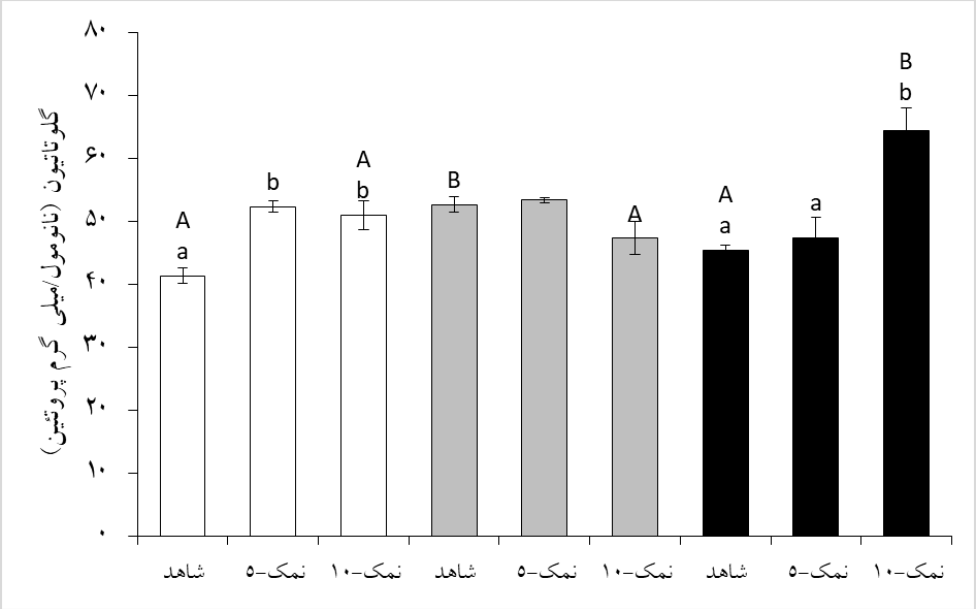
جیره های غذایی اثر معنی داری بر فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز و گلوتاتیون پرکسیداز نداشتند ولی فعالیت این دو آنزیم ۳ روز پس از تنش شوری افزایش یافت و پس از ۱۰ روز به مقادیر قبل از تنش بازگشت (جدول ۲). همچنین جیره های غذایی اثر معنی داری بر مقدار کورتیزول نداشتند ولی غلظت کورتیزول ۳ روز پس از تنش شوری افزایش یافت و پس از ۱۰ روز به مقادیر قبل از تنش بازگشت (جدول ۲). جیره های غذایی و زمان برهمکنش معنی داری روی مقدار گلوتاتیون و مالون دی آلدهید بدن داشتند (جدول ۲). مقدار گلوتاتیون بدن در تیمارهای نمک قبل از تنش به طور معنی داری بالاتر از شاهد بود. همچنین، مقدار گلوتاتیون بدن در تیمار نمک-۱۰ پس از ۱۰ روز تنش شوری به طور معنی داری بالاتر از سایر تیمارها بود (شکل ۱۵). مقدار مالون دی آلدهید بدن قبل از تنش در تیمار نمک-۱۰ به طور معنی داری کاهش یافت؛ همچنین ۳ و ۱۰ روز پس از تنش، تیمارهای نمک دارای مالون دی آلدهید کمتری نسبت به شاهد بودند (شکل ۱۶).

زمان اثر معنی داری بر رطوبت بدن داشت به طوریکه پس از تنش شوری، مقدار رطوبت بدن به طور معنی داری کاهش یافت (جدول ۲). جیره غذایی و زمان نمونه برداری اثر معنی داری بر غلظت پتاسیم بدن داشتند (جدول ۲). قبل از تنش شوری، تیمارهای نمک-۵ و نمک-۱۰ غلظت پتاسیم کمتری از تیمار شاهد داشتند. تنش شوری باعث افزایش معنی دار غلظت پتاسیم پس از ۳ و ۱۰ روز شد. مقدار کلراید و سدیم بدن تحت تاثیر معنی دار زمان بود. مقدار سدیم و کلراید

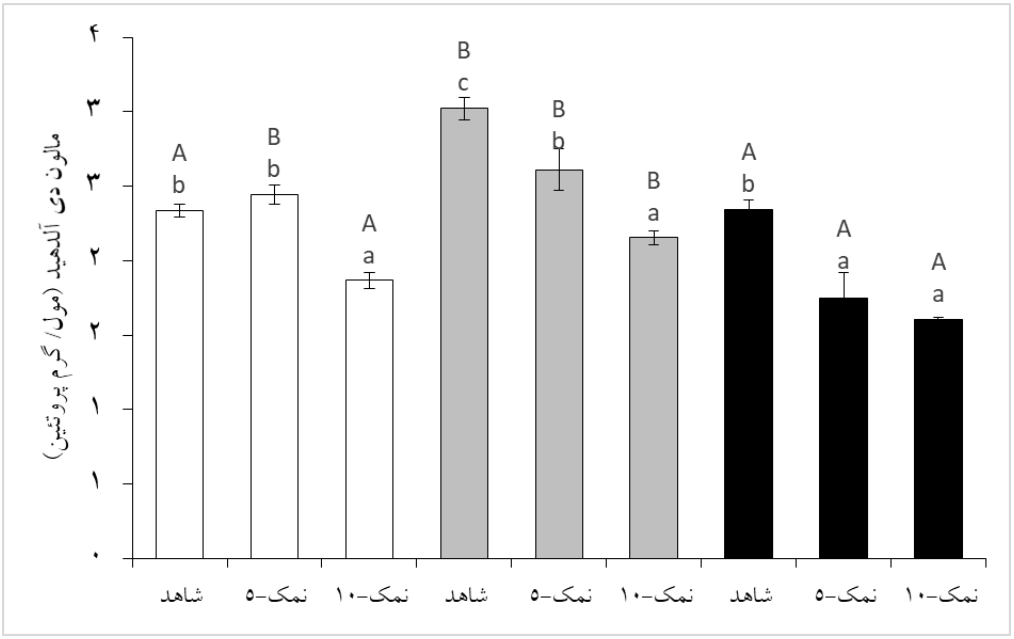
بدن به طوری معنی داری پس از ۳ روز مواجهه با آب لب شور افزایش و پس ۱۰ روز به طور معنی داری کاهش یافت؛ با این حال تنها سدیم بدن در این زمان به مقادیر قبل از تنش بازگشت (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج آنالیز واریانس اندازه گیری مکرر (*P*-value) در تیمارهای شاهد و نمک

	نمک	زمان	نمک × زمان
گلوتاتیون	۰/۰۰۶	۰/۱۱۵	<۰/۰۰۱
مالون دی آلدهید	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۳۵
گلوتاتیون ردوکتاز	۰/۹۳۴	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[a]	۰/۹۸۵
گلوتاتیون پرکسیداز	۰/۴۱۴	۰/۰۰۳ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[a]	۰/۳۴۳
کورتیزول	۰/۷۴۷	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[a]	۰/۰۵۴
سدیم	۰/۸۲۳	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[a]	۰/۰۹۸
پتاسیم	۰/۰۳۱ شاهد[b]، نمک-۵[a]، نمک-۱۰[a]	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[b]	۰/۳۶۷
کلراید	۰/۰۸۹	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[c]، ۱۰ روز[b]	۰/۰۷۱
رطوبت	۰/۲۵۳	۰/۰۴۴ قبل از تنش[b]، ۳ روز[a]، ۱۰ روز[a]	۰/۷۰۴



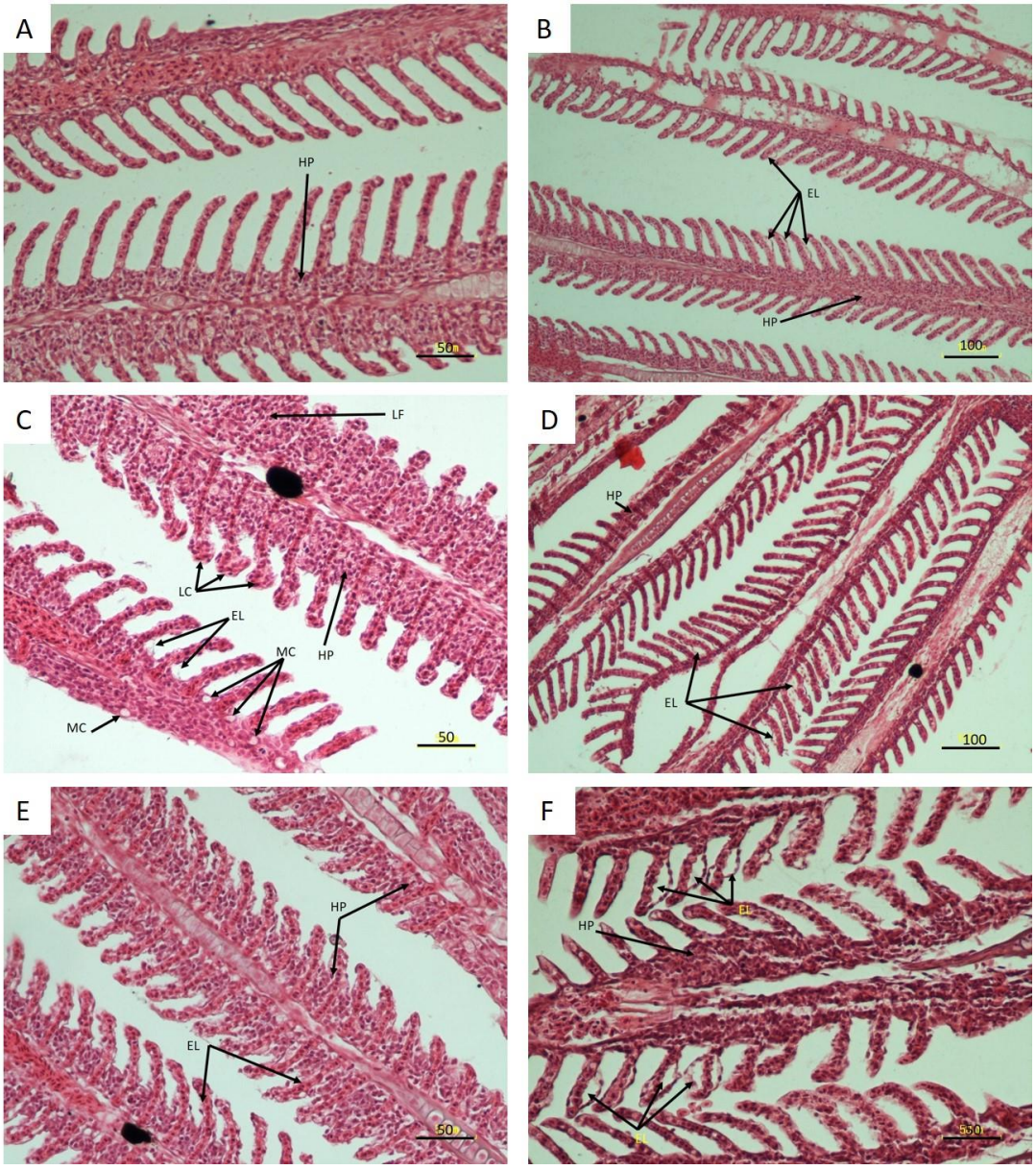
شکل ۱۵: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار گلوتاتیون کل بدن در تیمارهای آزمایشی نمک.
میله های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین سطوح نمک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان های نمونه گیری در هر تیمار نمک هستند (تعداد تکرار = ۳)



شکل ۱۶: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار مالون دی آلدهید کل بدن در تیمارهای آزمایشی نمک.
میله های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین سطوح نمک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان های نمونه گیری در هر تیمار نمک هستند (تعداد تکرار = ۳)

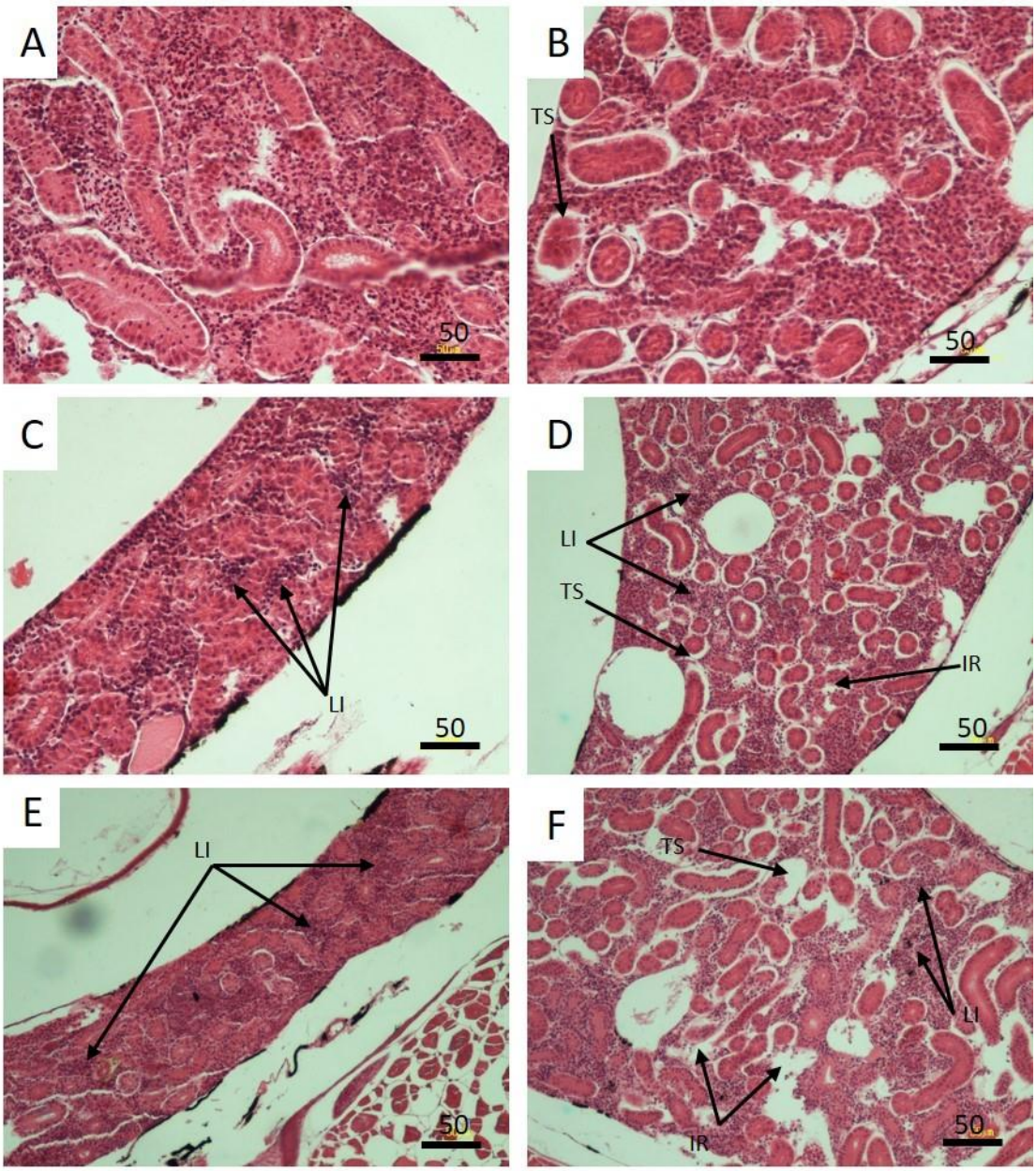
۴-۳-اثر نمک جیره بر بافت آبشش و کلیه ماهی

قبل از تنش شوری، مقداری هایپرپلازی در لاملاهای ثانویه در همه تیمارها مشاهده شد که شدت آن به این صورت بود: شاهد< نمک-۱۰< نمک-۵ بود که در تیمار نمک-۵ تبدیل به چسبیدن لاملا به هم شده بود. جداشدن لایه اپیتلیال در رشته‌های ثانویه در تیمارهای نمک مشاهده شد. همچنین در تیمار نمک-۵ عوارض چماقی شدن لاملاها و افزایش تعداد سلول‌های موکوسی مشاهده شد (شکل ۱۷).



شکل ۱۷: مقطع بافتی آبشش ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های شاهد.

نمک-۵ و نمک-۱۰ قبل و بعد از ۱۰ روز تنش شوری. A، C و E به ترتیب تیمارهای شاهد، نمک-۵ و نمک-۱۰ قبل از تنش. B، D و F به ترتیب تیمارهای شاهد، نمک-۵ و نمک-۱۰ بعد از تنش. HP: هایپرپلازی، EL: جداشدگی لاملا، LC: چماقی شدن لاملا، MC: سلول‌های موکوسی، LF: چسبیدگی لاملا. شاخص مقیاس ۱۰۰ و ۵۰ میکرون (زیر عکس‌ها) به ترتیب نشان دهنده بزرگنمایی ۱۰۰ و ۲۰۰ برابر هستند.



شکل ۱۸: مقطع بافتی کلیه ماهی‌های تغذیه شده با جیره‌های شاهد.
نمک-۵ و نمک-۱۰ قبل و بعد از ۱۰ روز تنش شوری. A، C و E به ترتیب تیمارهای شاهد، نمک-۵ و نمک-۱۰ قبل از تنش. B، D و F به ترتیب تیمارهای شاهد، نمک-۵ و نمک-۱۰ بعد از تنش. TS: چروکیدگی لوله‌های ادراری، LI: تجمع گلبولهای سفید، IR: از هم گسیختگی بافت بینابینی. شاخص مقیاس ۵۰ میکرون (زیر عکس‌ها) نشان دهنده بزرگنمایی ۲۰۰ برابر است.

پس از تنش شوری، بافت آبشش در تیمار شاهد نسبتا سالم بود و تنها کمی هایپرپلازی لاملاهای ثانویه و جدا شدن لایه اپیتلیال در برخی لاملاها مشاهده شد. در تیمار نمک-۵، جدا شدن لایه اپیتلیال و هایپرپلازی در لاملاهای ثانویه مشاهده گردید. در تیمار نمک-۱۰، بافت آبشش نسبتا سالم بود و تنها مقداری جدا شدن لیفت لایه اپیتلیال و هایپرپلازی در لاملاهای ثانویه مشاهده شد (شکل ۱۷).

قبل از تنش شوری، بافت کلیه در تیمار شاهد عوارضی نداشت ولی تیمارهای نمک تا حدودی نفوذ گلبول‌های سفید در بافت بینابینی داشتند. تنش شوری باعث چروکیدگی لوله‌های ادراری در تیمارها شد که شدت این عارضه در تیمارهای نمک بالاتر از شاهد بود. در تیمارهای نمک تا حدودی از هم گسیختگی بافت بینابینی و تجمع زیاد گلبول‌های سفید پس از تنش مشاهده شد (شکل ۱۸).

۴-۴-اثر پروبیوتیک جیره بر شاخص‌های بیوشیمیایی ماهی

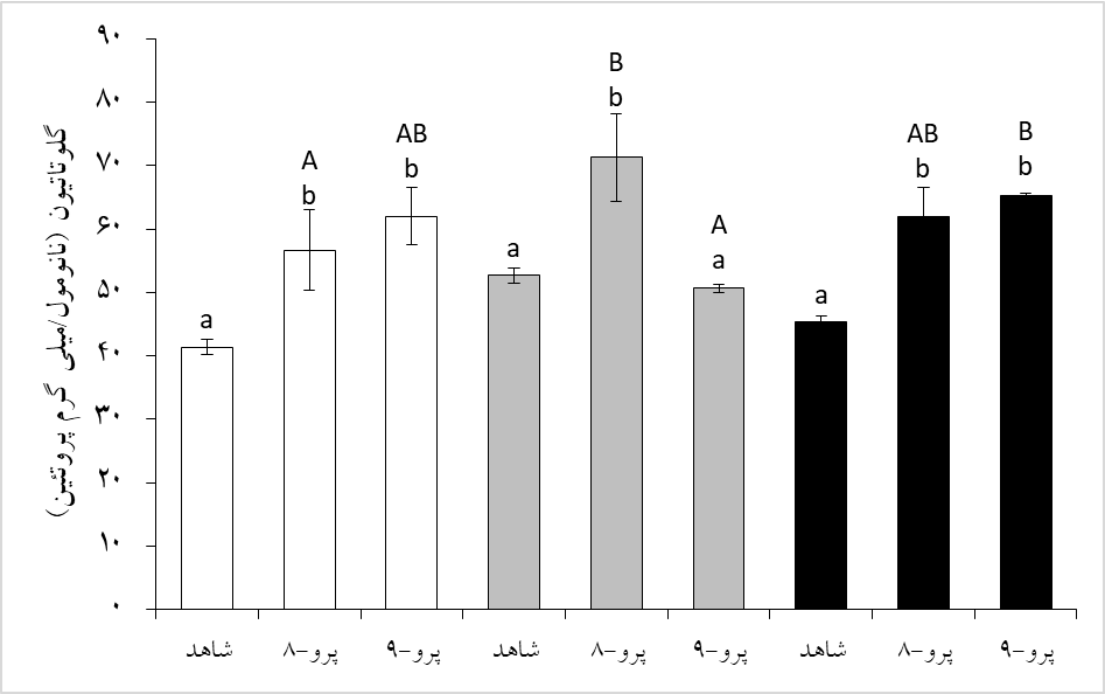
جیره غذایی اثر معنی داری بر مقدار مقدار مالون دی آلدهید و کورتیزول و فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز بدن داشت. مقدار مالون دی آلدهید و کورتیزول بدن در تیمارهای پروبیوتیک مشابه و به طور معنی داری کمتر از تیمار شاهد بود. همچنین تیمارهای پروبیوتیک دارای فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز مشابه بوده که به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد بود (جدول ۳). زمان نمونه برداری نیز اثر معنی داری بر این شاخصها داشت به طوریکه مقدار مالون دی آلدهید و فعالیت گلوتاتیون ردوکتاز بعد از ۳ روز تنش شوری افزایش یافت و پس از ۱۰ روز مجددا به مقادیر قبل از تنش بازگشت (جدول ۳). مقدار کورتیزول در خلال تنش شوری به طور معنی داری بالاتر از قبل از تنش شوری بود (جدول ۳). مقدار رطوبت و پتاسیم بدن تنها تحت تاثیر زمان نمونه برداری بود به این ترتیب که مقدار رطوبت پس از تنش شوری به طور معنی داری کاهش یافت در حالیکه مقدار پتاسیم به طور معنی داری افزایش یافت (جدول ۳).

پروبیوتیک جیره و زمان نمونه برداری اثر برهمکنشی معنی داری روی مقدار گلوتاتیون، سدیم و کلراید و فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز بدن داشتند (جدول ۳).

جدول ۳: نتایج آنالیز واریانس اندازه گیری مکرر (*P*-value) در تیمارهای شاهد و پروبیوتیک

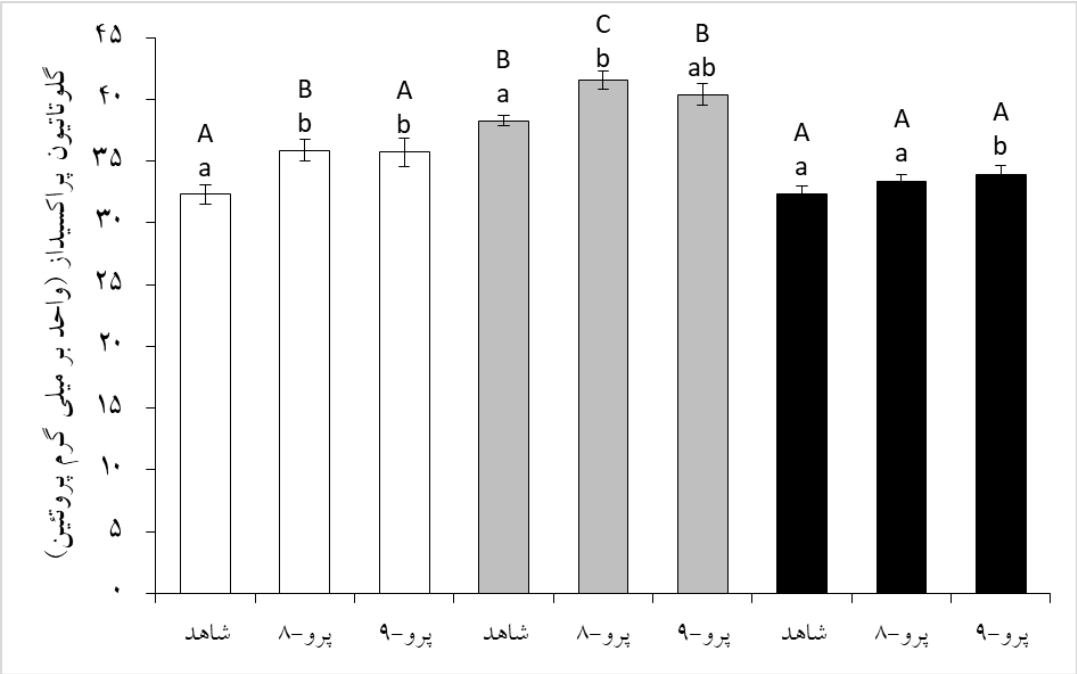
	پروبیوتیک	زمان	پروبیوتیک × زمان
گلوتاتیون	۰/۰۰۳	۰/۲۸۷	۰/۰۲۴
مالون دی آلدهید	<۰/۰۰۱ شاهد[b]، پرو-۸[a]، پرو-۹[a]	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[a]	۰/۲۴۷
گلوتاتیون ردوکتاز	۰/۰۰۱ شاهد[a]، پرو-۸[b]، پرو-۹[b]	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[a]	۰/۵۷۰
گلوتاتیون پرکسیداز	۰/۷۱۸	<۰/۰۰۱	۰/۰۲۸
کورتیزول	۰/۰۰۷ شاهد[b]، پرو-۸[a]، پرو-۹[a]	<۰/۰۰۱ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[b]	۰/۰۸۵
سدیم	۰/۰۰۲	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۶
پتاسیم	۰/۶۸۴	۰/۰۰۲ قبل از تنش[a]، ۳ روز[b]، ۱۰ روز[b]	۰/۷۱۴
کلراید	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۴
رطوبت	۰/۲۲۸	۰/۰۱۸ قبل از تنش[b]، ۳ روز[a]، ۱۰ روز[a]	۰/۹۱۰

مقدار گلوتاتیون بدن در تیمارهای پروبیوتیک قبل از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری مشابه هم و به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد بود. ۳ روز بعد از تنش شوری، مقدار گلوتاتیون در تیمار پروبیوتیک-۸ به طور معنی داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود (شکل ۱۹).



شکل ۱۹: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار گلوتاتیون کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک. میله های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین سطوح پروبیوتیک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

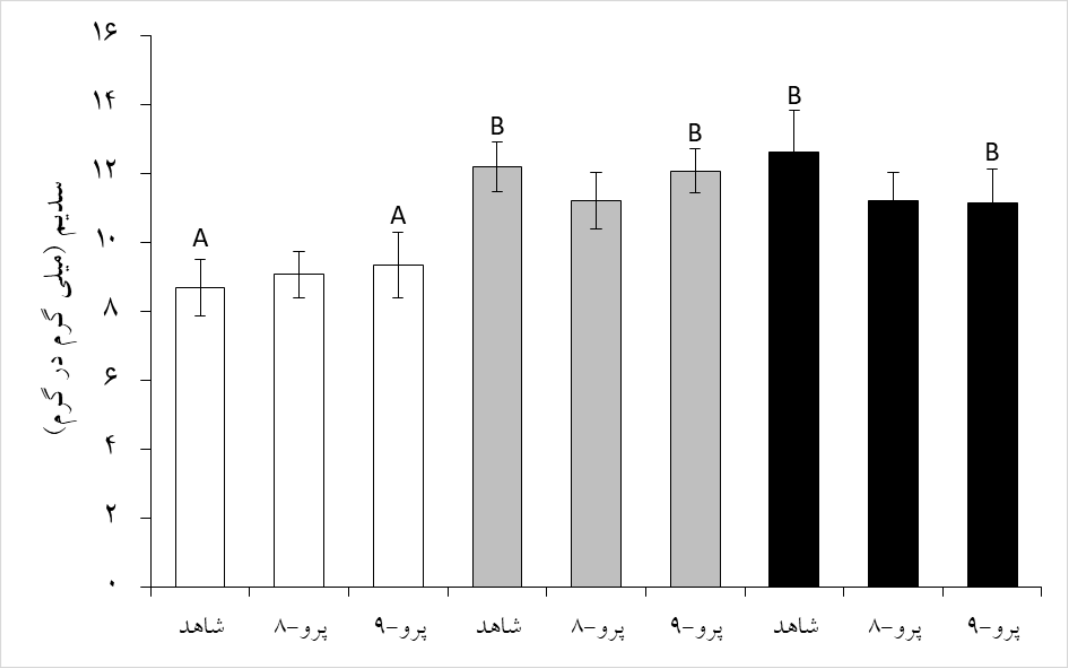
فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز در تیمارهای پروبیوتیک قبل از تنش شوری مشابه هم و به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد بود. فعالیت این آنزیم پس از ۳ و ۱۰ روز تنش شوری به ترتیب در تیمار پروبیتیک-۸ و پروبیوتیک-۹ به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد بود. فعالیت این آنزیم در تیمارهای مختلف پس از ۳ روز تنش شوری افزایش معنی دار یافت و پس از ۱۰ روز تنش مجددا کاهش یافت (شکل ۲۰).



شکل ۲۰: میانگین (± خطای استاندارد) فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک.

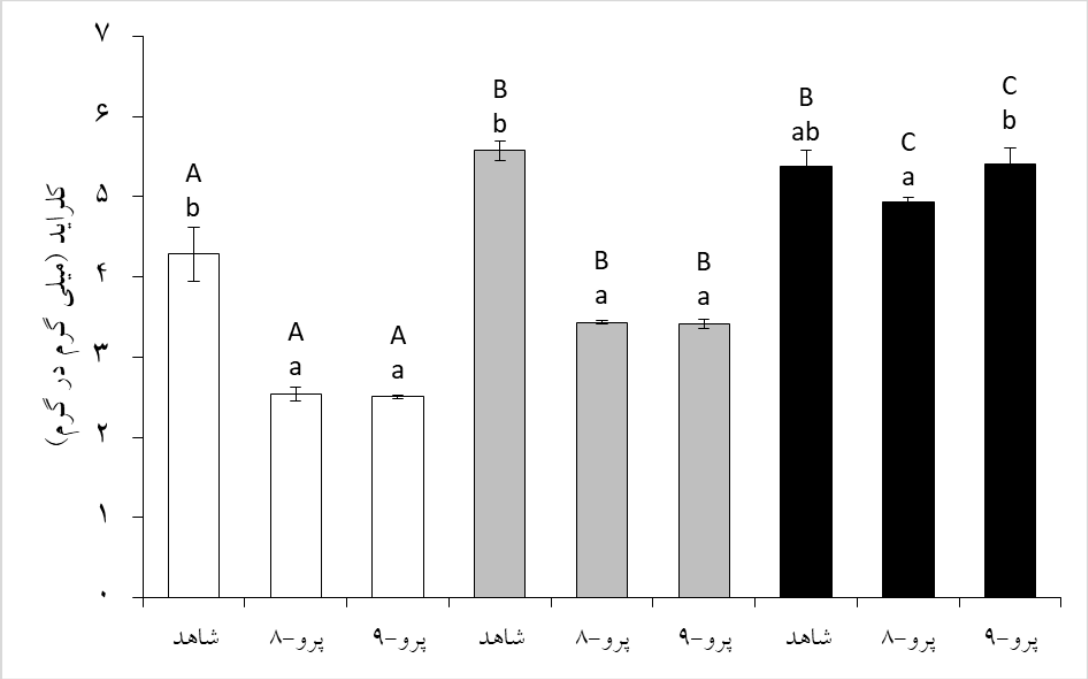
میله های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین سطوح پروبیوتیک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

مقدار سدیم بدن در تیمارهای مختلف غذایی اختلاف معنی داری با هم نداشت. تیمار شاهد و پروبیوتیک-۹ دارای میزان سدیم بالاتری پس از تنش شوری نسبت به قبل از تنش بودند؛ درحالیکه تیمار پروبیتیک-۸ تغییری در میزان سدیم در طول تنش شوری نشان نداد (شکل ۲۱).



شکل ۲۱: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار سدیم کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک. میله های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

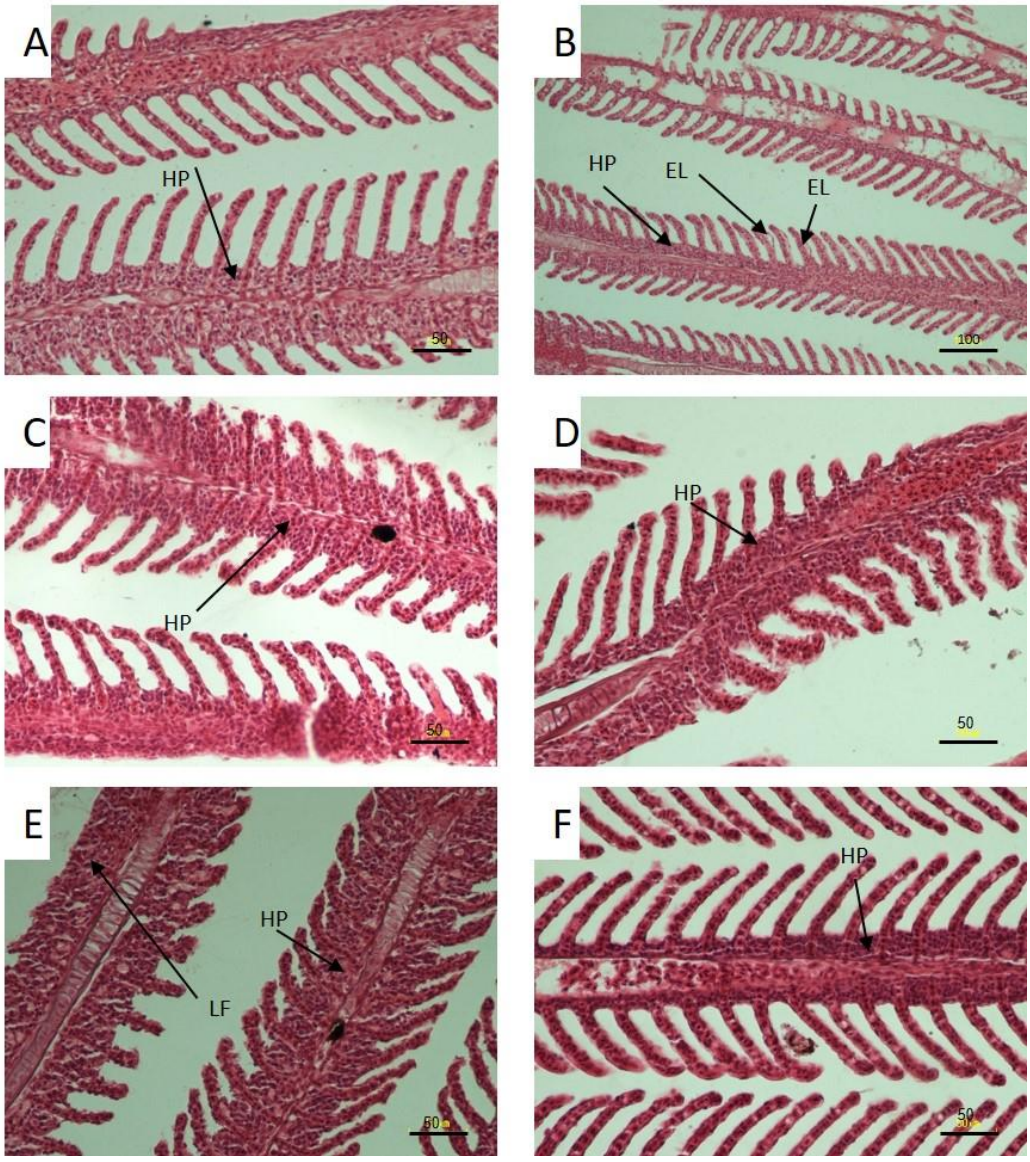
مقدار کلراید بدن در تیمارهای پروبیوتیک قبل از تنش شوری و ۳ روز بعد از آن به طور معنی داری کمتر از تیمار شاهد بود ولی اختلاف معنی داری بین تیمارهای پروبیوتیک با تیمار شاهد ۱۰ روز پس از تنش شوری مشاهده نشد. در همه تیمارها مقدار کلراید بدن پس از تنش شوری افزایش معنی دار داشت (شکل ۲۲).



شکل ۲۲: میانگین (± خطای استاندارد) مقدار کلراید کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک. میله های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی دار بین سطوح پروبیوتیک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی دار بین زمان های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

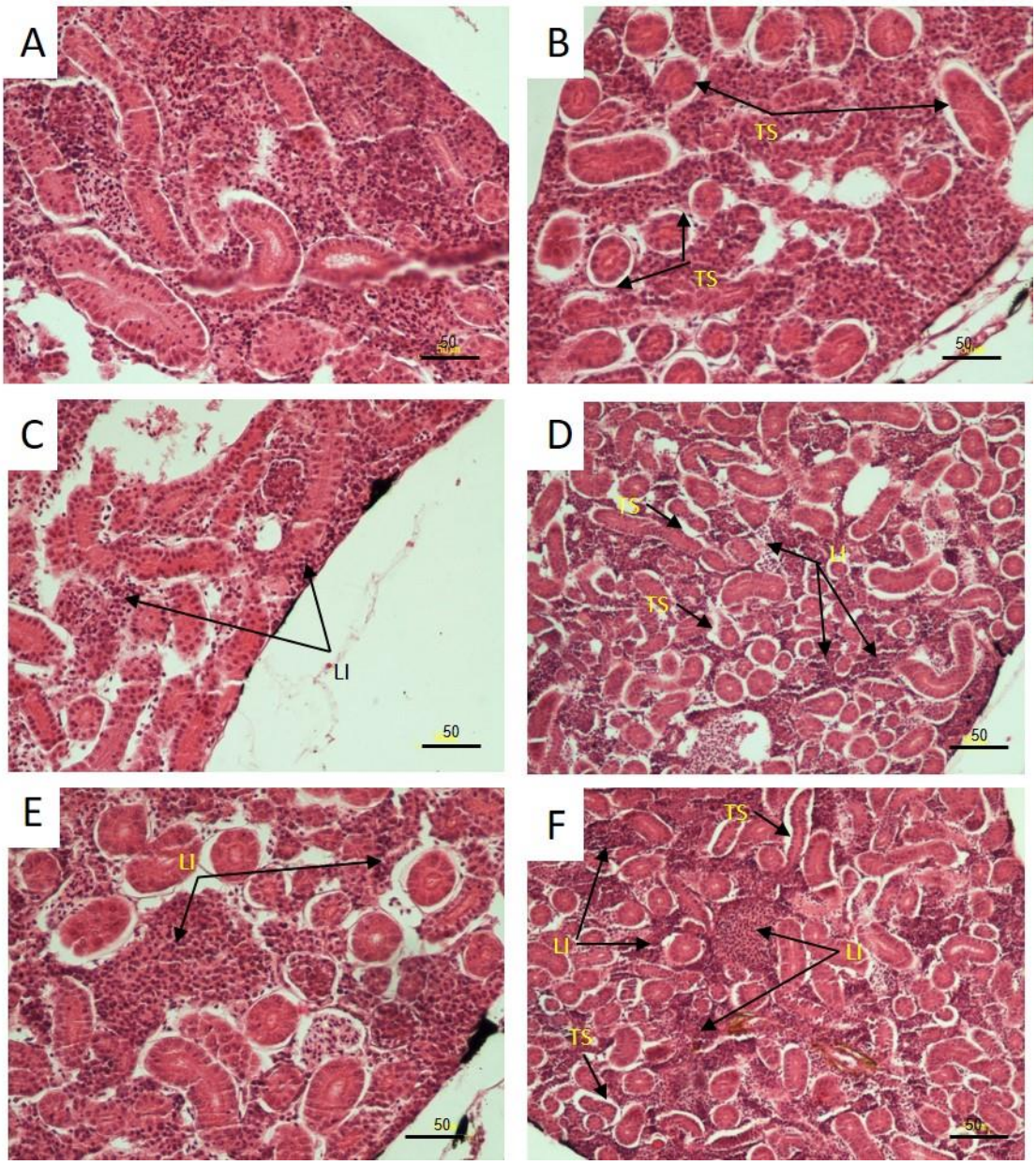
۴-۵-اثر پروبیوتیک جیره بر بافت آبشش و کلیه ماهی

بافت آبشش در تیمارهای مختلف در شکل ۲۳ نشان داده شده است. پیش از تنش شوری، کمی هایپرپلازی در همه تیمارها مشاهده شد که در تیمار پروبیوتیک-۹ تبدیل به چسبندگی لاملا شده بود. بعد از تنش شوری، آبشش تیمار شاهد تا حدودی دچار هایپرپلازی و ادم لاملا شده بود. تیمارهای پروبیوتیک نسبتا سالم بودند و تنها کمی هایپرپلازی مشاهده شد.



شکل ۲۳: مقطع بافتی آبشش ماهی های تغذیه شده با جیره های شاهد.

پرو-۸ و پرو-۹ قبل و بعد از ۱۰ روز تنش شوری. A، C و E به ترتیب تیمارهای شاهد، پرو-۸ و پرو-۹ قبل از تنش. B، D و F به ترتیب تیمارهای شاهد، پرو-۸ و پرو-۹ بعد از تنش. HP: هایپرپلازی، EL: جداشدگی لاملا، LC، LF: چسبیدگی لاملا. شاخص مقیاس ۱۰۰ و ۵۰ میکرون (زیر عکس‌ها) به ترتیب نشان دهنده بزرگنمایی ۱۰۰ و ۲۰۰ برابر هستند.



شکل ۲۴: مقطع بافتی کلیه ماهی های تغذیه شده با جیره های شاهد.

پرو-۸ و پرو-۹ قبل و بعد از ۱۰ روز تنش شوری. A، C و E به ترتیب تیمارهای شاهد، پرو-۸ و پرو-۹ قبل از تنش. B، D و F به ترتیب تیمارهای شاهد، پرو-۸ و پرو-۹ بعد از تنش. TS: چروکیدگی لوله‌های ادراری، LI: تجمع گلبولهای سفید. شاخص مقیاس ۵۰ میکرون (زیر عکس‌ها) نشان دهنده بزرگنمایی ۲۰۰ برابر است.

مقاطع بافتی کلیه در تیمارهای مختلف در شکل ۲۴ نشان داده شده اند. قبل از تنش شوری بافت کلیه در تیمار شاهد و پروبیوتیک-۸ نسبتا طبیعی بود. در تیمار پروبیوتیک-۹ به مقدار کم نفوذ منطقه ای لنفوسیتها در بافت بینابینی مشاهده شد. پس از تنش شوری، تیمار شاهد و پروبیوتیک کمی چروکیدگی در لوله های ادارای داشتند و تیمارهای پروبیوتیک کمی نفوذ منطقه ای لنفوسیتها در بافت بینابینی نیز نشان دادند.

۵-بحث

۵-۱-اثر تنش شوری بر بقاء ماهی

ماهیان استنوهالین توانایی تنظیم اسمزی سریع در مواجهه با محیط‌های دارای شوری‌های مختلف را ندارند (Altinok and Grizzle, 2003). به طور کل ماهی کپور معمولی یک گونه استنوهالین محسوب می‌شود و این دیدگاه وجود دارد که رهاسازی مستقیم آن به دریای خزر می‌تواند برای آن کشنده باشد (Van der Linden *et al.*, 1999). از طرفی، به دلیل کمبود آب رودخانه‌ها و سفره غذایی گسترده‌تر در دریای خزر، رهاسازی مستقیم به دریا به عنوان یکی از گزینه‌های بازسازی ذخایر این گونه مطرح شده است (Mohiseni *et al.*, 2016). نتایج این تحقیق نشان داد که بچه ماهی کپور دریایی توانایی ذاتی تحمل انتقال مستقیم به آب لب‌شور دریای خزر را دارد. تحقیقات پیشین در این زمینه نتایج متفاوتی داشته‌اند. بچه ماهی کپور دریایی با وزن ۲/۱ گرم پس از یک هفته نگهداری در شرایط آزمایشگاهی، تلفات ۱۰۰ درصدی پس از ۲۴ ساعت مواجهه مستقیم با آب ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر دریای خزر داشته است؛ درحالیکه میزان تلفات در شوری های ۵ و ۱۰ گرم در لیتر تا ۹۶ ساعت گزارش نشده است. میزان سدیم و پتاسیم خون به ترتیب افزایش و کاهش معنی‌داری ۲۴ ساعت پس از مواجهه با آب لب‌شور ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر داشته است که نشان دهنده تنش اسمزی مرگبار در بچه ماهیان است (Gholami *et al.*, 2013). بچه ماهی کپور دریایی که پس از ۴۵ روز پرورش در آزمایشگاه به وزن ۴/۵ گرم رسیده بود، در مواجهه با تنش شوری ۱۳ گرم در لیتر (منشاء آب شور نامشخص) پس از ۷ روز تلفاتی نداشته است (Imanpoor *et al.*, 2015). در آزمایشی مشابه بچه ماهی کپور دریایی با وزن اولیه حدود ۲/۵ گرم به مدت ۸ هفته در شرایط آزمایشگاهی پرورش یافته و سپس به طور مستقیم به شوری ۱۳ گرم در لیتر (منشاء آب شور نامشخص) تلفات ناچیزی (کمتر از ۵ درصد) نشان داده است (Roohi *et al.*, 2017). بچه ماهی کپور دریایی (۱۰ گرمی) که به مدت ۱۰ روز در شوری آب ۳ گرم در لیتر (شوری طبیعی آب چاه) نگهداری شده بود پس از افزودن ۵ گرم در لیتر کلرید سدیم به آب تلفاتی نداشت ولی میزان کورتیزول، گلوکز و سدیم سرم ماهی افزایش داشت (Hosseini and Hoseini, 2012). در آزمایشی دیگر با استفاده از بچه ماهیان ۱۴ گرمی کپور (با منشاء مشابه مطالعه قبل) که در همان آب چاه نگهداری شده بودند، پس از افزودن ۷ گرم در لیتر کلرید سدیم، طی سه روز تلفات ۹۴ درصدی داشتند و افزایش میزان کورتیزول، گلوکز، کلراید و سدیم سرم در ماهی‌ها مشهود بود (Hoseini and Hosseini, 2010). ضروریست برای مقایسه نتایج عوامل موثری مانند ترکیب یونی آب (استفاده از آب دریا یا کلرید سدیم)، سن و وزن ماهی، منشاء ماهی (دریایی یا پرورشی) و دوره نگهداری در شرایط آزمایشگاهی مد نظر قرار گیرد.

۵-۲-اثر نمک و پروبیوتیک بر رطوبت و یونهای بدن بعد از تنش شوری

در این تحقیق تنش شوری باعث کاهش رطوبت و افزایش غلظت سدیم، کلراید و پتاسیم کل بدن شد که نشان می دهد ماهی تا حدودی دهیدراته شده است که با مطالعه قبلی روی این گونه در مواجهه با کلرید سدیم همخوانی دارد (Van der

Linden *et al.*, 1999). بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که غلظت یون‌های ماهی کپور در مواجهه با محیط هایپراسمتیک، افزایش می‌یابد (Van der Linden *et al.*, 1999; Hosseini and Hoseini, 2012) که با نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد. افزودن پروبیوتیک به جیره تا حدودی تغییرات سدیم و کلراید را پس از تنش شوری کاهش داد. گرچه مطالعات زیادی به بررسی اثر پروبیوتیک‌ها بر مقاومت در برابر تنش شوری در ماهی‌های استنوهالین پرداخته‌اند، در هیچ یک از این مطالعات تغییرات یونی پس از تنش بررسی نشده‌اند (Hoseinifar *et al.*, 2015; Imanpoor and Roohi, 2015; Azimirad *et al.*, 2016; Shukry *et al.*, 2021). با این حال، افزودن نمک به جیره غذایی اثر معنی‌داری بر غلظت یون‌ها و میزان رطوبت بدن نداشت. مطالعه مشابه روی ماهی کپور انجام نشده است ولی افزودن نمک از ۲/۵ تا ۱۲/۵ درصد به جیره غذایی سی باس سیاه اثر معنی‌داری بر غلظت سدیم و پتاسیم بدن ماهی نداشته است ولی میزان کلراید بدن در تیمار ۷/۵ درصد نمک به طور معنی داری افزایش یافت ولی در مقادیر بالاتر نمک جیره مجددا کاهش یافت (Alam *et al.*, 2015). در این تحقیق افزودن پروبیوتیک به جیره تا حدودی تغییرات سدیم و کلراید را پس از تنش شوری کاهش داد که می‌تواند نشانه بهبود تنظم یونی در تیمارهای پروبیوتیک باشد. مکانیسم دقیق چنین تغییراتی یونی در این تحقیق مشخص نیست و مطالعات بیشتری در خصوص اثر این پروبیوتیک بر مسیرهای تنظیم یونی لازم است تا مکانیسم‌های دخیل در آن درک شوند.

۵-۳-اثر نمک و پروبیوتیک بر بافت شناسی آبشش و کلیه بعد از تنش شوری

آبشش و کلیه دو اندام مهم در تنظیم اسمزی و یونی هستند که پس از ورود ماهی به شوری‌های متفاوت، تغییرات ساختاری و فیزیولوژیک نشان می‌دهند (Baldisserotto, 2019). مقاطع بافتی ماهی در این تحقیق به طور کل نشان می‌دهد که افزودن نمک به جیره غذایی اثر مثبتی بر اندام‌های دخیل در تنظیم یونی نداشته است. وجود آسیب در آبشش ماهیان قبل از تنش شوری می تواند ناشی از وضعیت سلامتی آنها در استخر خاکی قبل از شروع آزمایش باشد. این آسیب‌ها می‌توانند به دلیل وجود انگل‌ها یا مواد مضر در آب استخر باشد (Roberts, 2012) که پس از ورود به آب لب شور کاهش یافتند و می‌تواند به دلیل نقش درمان کنندگی آب لب‌شور باشد که در متون مختلفی به آن استناد شده است (Noga, 2010). همچنین، افزودن نمک به جیره غذایی (به خصوص ۵ گرم در کیلوگرم) باعث بروز آسیب‌هایی به آبشش و کلیه ماهی شد که دلیل آن مشخص نیست ولی نشان دهنده اثرات منفی این مقدار نمک در این گونه است.

همچنین، پروبیوتیک نقشی در تغییرات ساختاری آبشش نداشته است. مطالعه مشابهی در این زمینه برای مقایسه وجود ندارد ولی امکان دارد اثر پروبیوتیک‌ها بر بافت آبشش در ماهی وابسته به شرایط آزمایشی باشد. مثلا برخی مطالعات نشان داده‌اند که غنی‌سازی جیره با *B. subtilis* (Lu *et al.*, 2022) یا سایر پروبیتیک‌ها (Mohapatra *et al.*, 2012; Tehrani *et al.*, 2020) می‌تواند اثرات مثبتی بر بافت آبشش در شرایط مسمومیت با مواد آلاینده آب داشته باشد؛ در حالیکه چنین اثرات مثبتی در شرایط آلودگی با عوامل بیماری‌زای باکتریایی مشاهده نشده‌اند (Pirarat *et al.*, 2006; Bunnoy *et al.*, 2019).

در این تحقیق اثر شوری بر بافت شناسی کلیه مشهودتر از آبشش بود. چروکیدگی لوله‌های ادراری یکی از نشانه‌های تنش اسمزی و دهیدراته شدن است (Ali *et al.*, 2022) که نتایج میزان رطوبت بدن نیز موید این پدیده است. علت تفاوت در پاسخ ساختاری آبشش و کلیه به تنش شوری در این تحقیق می‌تواند به دلیل ترکیب یونی آب دریای خزر باشد که نسبت کلراید و سدیم آن کمتر از آب دریاهای آزاد است و در عوض سهم یون‌های کلسیم، منیزیوم و سولفات در آن بیشتر است (Tuzhilkin *et al.*, 2005). با توجه به اینکه تنظیم سدیم و کلراید در آبشش صورت می‌گیرد و تنظیم یون‌های دو ظرفیتی بیشتر در کلیه صورت می‌گیرد (Katoh *et al.*, 2006; Baldisserotto, 2019)، مشاهده چنین تغییراتی در بافت کلیه ماهی‌ها منطقی است. نکته جدید این تحقیق تجمع گلبول‌های سفید در بافت کلیه در تیمارهای پروبیوتیک است. نفوذ گلبول‌های سفید در بافت‌های بدن به طور عمومی به عنوان یک پاسخ التهابی شناخته می‌شود که نقش مهمی در ایمنی دارد (Deng and Huttenlocher, 2012)؛ با این حال چنین پاسخی به تجویز پروبیوتیک‌ها تا کنون تنها در بافت روده ماهی‌ها بررسی شده و مشخص شده است که افزودن پروبیوتیک‌های باسیلی از جمله *B. subtilis* به جیره غذایی منجر به افزایش تجمع گلبول‌های سفید در بافت روده می‌شود (Cerezuela *et al.*, 2012; Gisbert *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2017).

۵-۴-اثر نمک و پروبیوتیک بر کورتیزول بدن بعد از تنش شوری

کورتیزول هورمون اصلی استرس در ماهی‌ها است که نقش مهمی در سازگاری با آب شور دارد. کورتیزول انرژی مورد نیاز را برای تنظیم اسمزی فراهم می‌کند، تعداد و اندازه سلول‌های کلرید را افزایش می‌دهد و فعالیت Na^+,K^+-ATPase را تحریک می‌کند (Ghelichpour *et al.*, 2020). همه این تغییرات به ماهی کمک می‌کند تا تعادل آب و املاح را پس از ورود به آب شور باز یابد. انتقال ماهی کپور از آب شیرین به شور منجر به افزایش کورتیزول خون و افزایش بیان ژن گیرنده کورتیزول در آبشش ماهی می‌شود که نشان دهنده نقش این هورمون در سازگاری با آب شور در ماهی کپور است (Hoseini and Hosseini, 2010; Ghelichpour *et al.*, 2020). از طرفی، میزان افزایش کورتیزول پس از استرس‌ها، می‌تواند نشانه‌ای از شدت استرسی باشد که ماهی متحمل شده است (Barton, 2002). بنابراین، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پروبیوتیک تک سل استرس ناشی از تنش شوری را در ماهی کاهش داده است. در تایید این نتایج، مزالعات پیشین نشان داده‌اند که افزودن *B. subtilis* به تنهایی (Oliveira *et al.*, 2022) یا در ترکیب با سایر باکتری‌های این جنس (Sadat Hoseini Madani *et al.*, 2018; Romanova *et al.*, 2020)، می‌تواند باعث کاهش کورتیزول قبل یا بعد از استرس شوند.

۵-۵-اثر نمک و پروبیوتیک بر شاخصهای آنتی اکسیدانی بدن بعد از تنش شوری

آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند. گلوتاتیون یک ملکول آنتی اکسیدانی است که ضمن داشتن نقش روبش رادیکال آزاد، به عنوان کو-فاکتور در عملکرد آنزیم گلوتاتیون پرکسیداز نقش دارد (Xie *et al.*, 2017). گلوتاتیون پرکسیداز مسئول خنثی‌سازی پرکسید هیدروژن و سایر هیدروپرکسیدها

است و در خلال فعالیت این آنزیم گلوتاتیون اکسید می‌شود که این شکل از گلوتاتیون از نظر زیستی فعالیت ندارد (Pastore *et al.*, 2001). گلوتاتیون ردوکتاز مسئول احیاء گلوتاتیون اکسید شده است (Galano and Alvarez-Idaboy, 2011). پس از انتقال ماهی به محیط هایپرتونیک، تعادل بیوشیمیایی غشای سلولی در اثر تنش شوری مختل می‌شود که مقدار زیادی ملکول اکسیژنی واکنشگر (reactive oxygen species) تولید می‌کند که می‌توانند باعث بروز استرس اکسیداتیو شوند (Huang *et al.*, 2021). در این تحقیق، انتقال ماهی به آب لب‌شور باعث افزایش فعالیت گلوتاتیون پرکسیداز و گلوتاتیون ردوکتاز و غلظت گلوتاتیون و مالون دی آلدهید شد. در قزل آلای رنگین کمان (Huang *et al.*, 2021) و تیلاپیای نیل (Shukry *et al.*, 2021) نیز تنش شوری منجر به فعال شدن آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و بروز استرس اکسیداتیو (افزایش مالون دی آلدهید) شده است. نکته جالب توجه تحقیق حاضر این است که افزودن نمک به جیره غذایی (مخصوصا ۱۰ درصد) منجر به کاهش مالون دی آلدهید و افزایش گلوتاتیون شد که نشان دهنده کاهش پرکسیداسیون چربی در این تیمارها است.

افزودن پروبیوتیک تک سل به جیره غذایی ماهی کپور دریایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی، محتوای گلوتاتیون احیائی و کاهش مالون دی آلدهید شد که با مطالعات قبلی روی ماهی‌های دیگر همخوانی دارد (Wang *et al.*, 2017; Yin *et al.*, 2018; Cao *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2021). چنین نتایجی نشان دهنده تحریک قدرت آنتی اکسیدانی وابسته به گلوتاتیون توسط *B. subtilis* است. مکانیسم دقیق این اثر مثبت *B. subtilis* مشخص نیست ولی می‌تواند به دلیل تولید ترکیبات آنتی اکسیدانی تیولی مانند سیستئین، باسیلی‌تیول و تیوردوکسین توسط این گونه باشد (Tossounian *et al.*, 2023) که شرایط احیائی بدن ماهی را بهبود داده و سهم گلوتاتیون احیائی از کل گلوتاتیون را افزایش می دهد.

۶-نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می دهد که بچه ماهی نورس کپور دریایی توانایی ذاتی تحمل انتقال مستقیم به آب دریای خزر را دارد و افزودن نمک به جیره غذایی اثر مثبتی بر تحمل تنش شوری ندارد. نتایج شاخصهای بافت شناسی و آنتی اکسیدانی نشان می دهند که ۵ گرم در کیلوگرم نمک باعث بروز آسیب‌های بافتی در ماهی می‌شود و افزودن ۱۰ گرم در کیلوگرم نمک باعث کاهش پراکسیداسیون چربی می شود. مطالعات بیشتر در زمینه عوامل موثر بر توانایی تحمل تنش شوری در این گونه مانند دمای آب و استرس‌های رایج در استخر خاکی و حمل و نقل به رودخانه می‌تواند دلیل تلفات این گونه در زمان رهاسازی به آب لب‌شور در شرایط میدانی را مشخص نماید. افزودن *B. subtilis* به جیره غذایی اثر مثبتی بر زنده‌مانی در خلال تنش شوری ندارد. با این حال، نکته مثبت افزودن این پروبیوتیک به جیره غذایی تحریک ایمنی در کلیه، تقویت تنظیم یونی و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی در ماهی است که ممکن است بتواند به ماهی کمک کند که سایر استرس‌های محیطی (مانند دما، آلودگی آب یا عوامل بیماری‌زا) را در زمان رهاسازی مستقیم به دریا تحمل نماید؛ البته تایید این موضوع منوط به انجام آزمایشات میدانی است.

پیشنهادها

پیشنهادهای پژوهشی

- بررسی برهمکنش عوامل استرس‌زای محیطی و تنش شوری روی مقاومت و پاسخ‌های استرس بچه ماهی کپور
- بررسی شاخصهای آنتی اکسیدانی بچه ماهی کپور دریایی در مراکز بازسازی ذخایر قبل و بعد از صید و رهاسازی
- بررسی آلودگی انگلی و کیفیت آب استخرهای مراکز بازسازی ذخایر و ارتباط با سلامت بافتهای ماهی کپور دریایی
- بررسی کاربرد پروبیوتیک تک سل در آب استخرهای مراکز بازسازی ذخایر به منظور مقاوم سازی بچه ماهی کپور دریایی

پیشنهادات اجرایی

- افزودن $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/g به جیره غذایی بچه ماهی کپور دریایی ۱۵ روز پیش از رهاسازی به منظور بهبود ایمنی و سلامت ماهی

منابع

- بندانی، غ.ع.، ۱۳۹۵ . ارزیابي ذخایر ماهیان کپور و کلمه در آبهاي ایراني دریاي خزر . گزارش نهایی موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور. ۳۴ ص.
- بیک زاده، آ.، ایمان پور، م.ر. و تقی زاده. و.، ۱۳۹۴ . اثر بلندمدت کورتیزول خوراکی بر مقاومت به تنش شوري در بچه ماهیان کپور معمولی . یافته های نوین در علوم زیستی، جلد۲ ، (۲): ۱۱۲-۱۰۳
- دریانبرد، غ.، ۱۳۹۲. بررسی برخی از شاخص‌های بیولوژیکی ماهیان استخوانی در سواحل جنوبی دریای خزر. گزارش نهایی موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور. ۱۳۲ ص.
- رجبی، ح. و خدابنده، ص.، ۱۳۹۲. ارتباط وزن بدن بچه ماهیان دو تابستانه آزاد خزر (*Salmo trutta caspius*) با توان تنظیم اسمزی در آب لب شور (ppt۱۳). پژوهش های جانوری (زیست شناسی ایران)، ۲۶(۴): ۳۹۴-۴۰۵.
- عطایی مهر، ب.، اميري مجازي، ب.، عبداحی، ح. و میرواقفی، ع.، ۱۳۸۵ . بررسی تغییرات تعداد و اندازه سلولهاي کلراید آبششی و میزان تلفات بچه آزادماهیان دریاي خزر با اوزان گوناگون در شوریهاي مختلف آب . مجلهٔ علمی شیلات ایران ۴: ۱۲۷-۱۱۹
- فارابی، س.و.، متین فر، ع.، بهروزی، ش.، شریفیان، م. و قانعی تهرانی، م. ۱۳۹۹. اثر مکمل نمک در جیره غذایی بر تغییر بافت های آبشش و کلیه بچه ماهی سفید *Rutilus kutum*. توسعه آبزی پروری (علوم زیستی). ۱۴(۱): ۶۳-۷۸.
- فضلی. ح .، ۱۴۰۱. ارزیابی ذخایر و بررسی وضعیت برداشت از ذخایر ماهیان استخوانی در سواحل ایرانی دریای خزر (۹۹-۱۳۹۷). گزارش نهایی موسسه تحقیقاتی علوم شیلاتی کشور
- قلي اف، ذ.م.، ۱۹۹۷. کپورماهیان و سوف ماهیان حوزه جنوبي و مياني دریاي خزر (ساختار جمعیت ها ، اکولوژي، پراکنش و تدابیري جهت بازسازي ذخایر). در ترجمه یونس عادلي، ۱۳۷۷. مرکز تحقیقات شیلاتي استان گیلان. ۴۴ ص.
- وثوقی .غ. و مستجیر، و.ب.، ۱۳۸۵ . ماهیان آب شیرین . انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۲ ص
- یلقی، س.، ۱۳۷۹. پایان نامه کارشناسی ارشد شیلات (بررسی بیولوژی تولید مثل ماهی کپور معمولی مصب گرگانرود) دانشکده منابع طبیعی و شیلات گرگان.
- Abdollahpour, H., Falahatkar, B., Jafari, N., andLawrence, C., 2020. Effect of stress severity on zebrafish (*Danio rerio*) growth, gonadal development and reproductive performance: Do females and males respond differently? Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 522: 735099.
- Alam, M.S., Watanabe, W.O., Myers, A., Rezek, T., Carroll, P.M., andSkrabal, S.A., 2015. Effects of dietary salt supplementation on growth, body composition, tissue electrolytes, and gill and intestinal Na^+/K^+ ATPase activities of black sea bass reared at low salinity. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 446: 250-258.
- Alderman, D., andHastings, T., 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance–potential for consumer health risks. International journal of food science & technology. 33: 139-155.

- Ali, A., Azom, M.G., Sarker, B.S., Rani, H., Alam, M.S., andIslam, M.S., 2022. Repercussion of salinity on hematological parameters and tissue morphology of gill and kidney at early life of tilapia. Aquaculture and Fisheries.
- Altinok, I., andGrizzle, J.M., 2003. Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. Journal of the World Aquaculture Society. 34: 113-117.
- AOAC, 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- Arockiaraj, J., Palanisamy, R., Bhatt, P., Kumaresan, V., Gnanam, A.J., Pasupuleti, M., andKasi, M., 2014. A novel murrel *Channa striatus* mitochondrial manganese superoxide dismutase: gene silencing, SOD activity, superoxide anion production and expression. Fish Physiology and Biochemistry. 40: 1937-1955.
- Azimirad, M., Meshkini, S., Ahmadifard, N., andHoseinifar, S.H., 2016. The effects of feeding with synbiotic (*Pediococcus acidilactici* and fructooligosaccharide) enriched adult Artemia on skin mucus immune responses, stress resistance, intestinal microbiota and performance of angelfish (*Pterophyllum scalare*). Fish & Shellfish Immunology. 54: 516-52.۲
- Baldisserotto, B., 2019. Fish osmoregulation. CRC Press.
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integrative and Comparative Biology. 42: 517-525.
- Baud, O., Greene, A.E., Li, J., Wang, H., Volpe, J.J., andRosenberg, P.A., 2004. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. The Journal of Neuroscience. 24: 1531.
- Biller, J.D., andTakahashi, L.S., 2018. Oxidative stress and fish immune system: phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 90: 3403-3414.
- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S.J., andWillmore, W.G., 2017. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. Fish and Fisheries. 18: 928-942.
- Bunnoy, A., Na-Nakorn, U., andSrisapoome, P., 2019. Probiotic effects of a novel strain, *Acinetobacter* KU011TH, on the growth performance, immune responses, and resistance against *Aeromonas hydrophila* of bighead catfish (*Clarias macrocephalus* Günther, 1864). Microorganisms. 7: 613.
- Cao, H., Yu, R., Zhang, Y., Hu, B., Jian, S., Wen, C., Kajbaf, K., Kumar, V., andYang, G., 2019. Effects of dietary supplementation with β-glucan and Bacillus subtilis on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 508: 106-112.
- Caxico Vieira, C.A.S., Vieira, J.S., Bastos, M.S., Zancanela, V., Barbosa, L.T., Gasparino, E., andDel Vesco, A.P., 2018. Expression of genes related to antioxidant activity in Nile tilapia kept under salinity stress and fed diets containing different levels of vitamin C. Journal of toxicology and environmental health, part A. 81: 20-30.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.Á., andEsteban, M.Á., 2012. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. Cell and Tissue Research. 350: 477-489.
- Chen, S.-W., Liu, C.-H., andHu, S.-Y., 2019. Dietary administration of probiotic *Paenibacillus ehimensis* NPUST1 with bacteriocin-like activity improves growth performance and immunity against *Aeromonas hydrophila* and Streptococcus iniae in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish & Shellfish Immunology. 84: 695-703.
- Cliff, W.H., andBeyenbach, K.W., 1988. Fluid secretion in glomerular renal proximal tubules of freshwater-adapted fish. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 254: R154-R158.
- Cnaani, A., Barki, A., Slosman, T., Scharcanski, A., Milstein, A., andHarpaz, S., 2010. Dietary salt supplement increases the growth rate in freshwater cultured tilapia hybrids. Aquaculture Research. 41: 1545-1548.
- Crespi, V., andNew, M., 2009. *Cyprinus carpio*, Cultured aquatic species fact sheets. FAO, Roma, Italy, pp. Available at: https://www.fao.org/fishery/docs/DOCUMENT/aquaculture/CulturedSpecies/file/en/en_commoncarp.htm.
- Cutting, S.M., 2011. Bacillus probiotics. Food microbiology. 28: 214-220.
- Czerucka, D., Piche, T., andRampal, P., 2007. Review article: yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii*. Alimentary Pharmacology and Therapeutics.۲۷۸-۷۶۷ :۲۶ .
- Dantzler, W.H., 2003. Regulation of renal proximal and distal tubule transport: sodium, chloride and organic anions. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 136: 453-478.

- Dawood, M.A., Koshio, S., Fadl, S.E., Ahmed, H.A., El Asely, A., Abdel-Daim, M.M., andAlkahtani, S., 2020. The modulatory effect of mannanoligosaccharide on oxidative status, selected immune parameters and tolerance against low salinity stress in red sea bream (*Pagrus major*). Aquaculture Reports. 16: 100278.
- Dawood, M.A., Koshio, S., Zaineldin, A.I., Van Doan, H., Moustafa, E.M., Abdel-Daim, M.M., Angeles Esteban, M., andHassaan, M.S., 2019. Dietary supplementation of selenium nanoparticles modulated systemic and mucosal immune status and stress resistance of red sea bream (*Pagrus major*). Fish Physiology and Biochemistry. 45: 219-230.
- Deng, Q., andHuttenlocher, A., 2012. Leukocyte migration from a fish eye's view. Journal of Cell Science. 125: 3949-3956.
- El-Saadony, M.T., Alagawany ,M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A.O., Dhama, K., andAbdel-Latif, H.M.R., 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. Fish & Shellfish Immunology. 117: 36-52.
- EPA-METHOD, 2015. 9250 chloride (colorimetric, automated ferricyanide AAI. Available at: https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/9250.pdf. EPA.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., andChoe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiological Reviews. 85: 97-177.
- FAO, 2019. Fisheries and Aquaculture Information and Statistics Branch- Common carp, *Cyprinus carpio*. FAO, Rome, Italy.
- Fontainhas-Fernandes, A., Russell-Pinto, F., Gomes, E., Reis‐Henriques, M.A., andCoimbra, J., 2000. The effect of dietary sodium chloride on some osmoregulatory parameters of the teleost, *Oreochromis niloticus*, after transfer from freshwater to seawater. Fish Physiology and Biochemistry. 23: 307-316.
- Forrest Jr, J.N., Cohen, A.D., Schon, D.A., andEpstein, F.H., 1973. Na transport and Na-K-ATPase in gills during adaptation to seawater: effects of cortisol. American Journal of Physiology-Legacy Content. 224: 709-713.
- Françoise, L., 2010. Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. Food microbiology. 27: 698-709.
- Galano, A., andAlvarez-Idaboy, J.R., 2011. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. RSC Advances. 1: 1763-1771.
- Gatesoupe, F.-J., 20۰۷Updating the Importance of Lactic Acid Bacteria in Fish Farming: Natural Occurrence and Probiotic Treatments. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 14: 107-114.
- Gatlin III, D.M., MacKenzie, D.S., Craig, S.R., andNeill, W.H., 1992. Effects of dietary sodium chloride on red drum juveniles in waters of various salinities. The Progressive Fish-Culturist. 54: 220-227.
- Ghelichpour, M., Taheri Mirghaed, A., andZargar, A., 2020. The response of lufenuron- and flonicamid-exposed *Cyprinus carpio* to saltwater challenge: Study on ion-regulation and stress genes expression and plasma antioxidant characteristics. Aquaculture Research. 51: 4829-4837.
- Gholami, F., Tajari, M., Yosef, N.S., Shahkar, E., Kolangi Miandare, H., andAzimi, A., 2013. Examination of some biochemical factors of blood serum in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings at different levels of salinity. Journal of fisheries. 7: 37-44 (In Persian).
- Gisbert, E., Castillo, M., Skalli, A., Andree, K.B., andBadiola, I., 2013. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. Journal of Animal Science. 91: 2766-2774.
- Glover, C.N., Wood, C.M., andGoss, G.G., 2017. Drinking and water permeability in the Pacific hagfish, *Eptatretus stoutii*. Journal of Comparative Physiology B. 187: 1127-1135.
- Grant, A., Gardner, M., Hanson, L., Farrell, A., andBrauner, C., 2010. Early life stage salinity tolerance of wild and hatchery-reared juvenile pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. Journal of Fish Biology. 77: 1282-1292.
- Grant, A., Gardner, M., Nendick, L., Sackville, M., Farrell, A., andBrauner, C., 2009. Growth and ionoregulatory ontogeny of wild and hatchery-raised juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). Canadian Journal of Zoology. 87: 221-228.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M., andPacheco, M., 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide–elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 743: 1-9.
- Hamed, H.S., andEl-Sayed, Y.S., 2019. Antioxidant activities of *Moringa oleifera* leaf extract against pendimethalin-induced oxidative stress and genotoxicity in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). Fish Physiology and Biochemistry. 45: 71-82.

- Hegab, S.A., andHanke, W., 1984. The significance of cortisol for osmoregulation in carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). General and Comparative Endocrinology. 54: 409-417.
- Hematyar, N., Rustad, T., Sampels, S., andKastrup Dalsgaard, T., 2019. Relationship between lipid and protein oxidation in fish. Aquaculture Research. 50: 1393-1403.
- Hoseini, S.M., andHosseini, S.A., 2010. Effect of dietary l-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. Fish Physiology and Biochemistry. 36: 1061-1067.
- Hoseini, S.M., Aydın, B., Hoseinifar, S.H., Moonmanee, T., andVan Doan, H., 2022a. Dietary Artemisia, *Artemisia annua*, supplementation improves common carp welfare under high stocking density. Aquaculture Research. 53: 3494-3503.
- Hoseini, S.M., Gharavi, B., Taheri Mirghaed, A., Hoseinifar, S.H., andVan Doan, H., 2021. Effects of dietary phytol supplementation on growth performance, immunological parameters, antioxidant and stress responses to ammonia exposure in common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 545: 737151.
- Hoseini, S.M., Moghaddam, A.A., Ghelichpour, M., Pagheh, E., Haghpanah, A., Gharavi, B., Mansouri, B., andArghideh, M., 2022c. Dietary glycine supplementation modulates antioxidant and immune responses of beluga, *Huso huso*, juveniles. Aquaculture Reports. 23: 101026.
- Hoseini, S.M., Paolucci, M., Arghideh, M., Hosseinpour Delavar, F., Zavvar, F ,.Hoseinifar, S.H., andVan Doan, H., 2022b. Effects of dietary glycine administration on biochemical responses to ammonia toxicity in common carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture Research. 53: 2185-2194.
- Hoseinifar, S.H., Mirvaghefi, A., Amoozegar, M.A., Merrifield, D.L., andRingø, E., 2017. *In vitro* selection of a synbiotic and in vivo evaluation on intestinal microbiota, performance and physiological response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fingerlings. Aquaculture Nutrition. 23: 111-118.
- Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A., andVakili, F., 2015. The effects of Lactobacillus acidophilus as feed supplement on skin mucosal immune parameters, intestinal microbiota, stress resistance and growth performance of black swordtail (*Xiphophorus helleri*). Fish & Shellfish Immunology. 42: 533-538.
- Hoseinifar, S.H., Yousefi, S., Van Doan, H., Ashouri, G., Gioacchini, G., Maradonna, F., andCarnevali, O., 2021. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic ,prebiotic, and synbiotics. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture. 29: 198-217.
- Hosseini, S.A., andHoseini, S.M., 2012. Effect of acute crowding stress on subsequent osmotic challenge and recovery in juvenile common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus). Comparative Clinical Pathology. 21: 583-588.
- Huang, M., Yang, X., Zhou, Y., Ge, J., Davis, D.A., Dong, Y., Gao, Q., andDong, S., 2021. Growth, serum biochemical parameters, salinity tolerance and antioxidant enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to dietary taurine levels. Marine Life Science & Technology: 1-14.
- Imanpoor, M.R., andRoohi, Z., 2015. Influence of primalac probiotic on growth performance, blood biochemical parameters, survival and stress resistance in the Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 15: 917-922.
- Imanpoor, M.R., Roohi, Z., Salaghi, Z., Beykzadeh, A., andDavoudipoor, A., 2015. Effect of Primalac probiotic on growth indices, blood biochemical parameters, survival and resistance to salinity stress in *Cyprinus carpio* fingerlings. Journal of Fisheries Science and Technology. 4: 17-28.
- Irianto, A., andAustin, B., 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. 25: 633-642.
- Jalali, M.A., Hosseini, S.A., andImanpour, M.R., 2008. Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid-enriched *Artemia urmiana* on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae. Aquaculture Research. 39: 1286-1291.
- Jalali, M.A., Hosseini, S.A., andImanpour, M.R., 2010. Physiological characteristics and stress resistance of great sturgeon (*Huso huso*) juveniles fed with vitamins C, E, and HUFA-enriched Artemia urmiana nauplii. Fish Physiology and Biochemistry. 36: 555-564.
- Janssens, B.J., Le Gall ,R., andRees, J.F., 2002. Peroxide-triggered erythrocytes haemolysis as a model for the study of oxidative damage in marine fishes. Journal of Fish Biology. 61: 71-84.
- Jiang, W.-D., Feng, L., Qu, B., Wu, P., Kuang, S.-Y., Jiang, J., Tang, L., Tang, W.-N ,.Zhang, Y.-A., andZhou, X.-Q., 2016. Changes in integrity of the gill during histidine deficiency or excess due to depression of cellular anti-oxidative ability, induction of apoptosis, inflammation and impair of cell-cell tight junctions related to Nrf2 ,TOR and NF-κB signaling in fish. Fish & Shellfish Immunology. 56: 111-122.
- Katoh, F., Tresguerres, M., Lee, K.M., Kaneko, T., Aida, K., andGoss, G.G., 2006. Cloning of rainbow trout SLC26A1: involvement in renal sulfate secretion. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 290: R1468-R1478.

- Ken, C.-F., Lin, C.-T., Shaw, J.-F., andWu, J.-L., 2003. Characterization of fish Cu/Zn–superoxide dismutase and its protection from oxidative stress. Marine biotechnology. 5: 16.۱۷۳-۷
- Lee, C.-S., Lim, C., andWebster, C.D., 2015. Dietary nutrients, additives, and fish health. Wiley-Blackwell, NJ, USA.
- Limburg, K.E., andWaldman, J.R., 2009. Dramatic declines in North Atlantic diadromous fishes. Bioscience. 59: 955-965.
- Lionetto, M ,.Caricato, R., Giordano, M., Pascariello, M., Marinosci, L., andSchettino, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and Mullus barbatus in an Italian coastal marine area. Marine Pollution Bulletin. 46: 324-330.
- Liu, J., Cheng, Y., Lu, Y., Xia, C., Wang, N., andLi, Y., 2021. *Bacillus subtilis* spores as an adjuvant to enhance the protection efficacy of the SVCV subunit vaccine (SVCV-M protein) in German mirror carp (*Cyprirnus Carpio Songpa* Linnaeus Mirror). Aquaculture Research. 52: 4648-4660.
- Lu, Y., Zhang, Y., Zhang, P., Liu, J., Wang, B., Bu, X., Wei, Q., Liu, S., andLi, Y., 2022. Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on immune, antioxidant, and histopathological parameters of *Carassius auratus gibelio* juveniles exposed to acute saline-alkaline conditions. Aquaculture International. 30: 2295-2310.
- Lushchak, V.I., andBagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 144: 283-289.
- Madsen, S.S., 1990. Enhanced hypoosmoregulatory response to growth hormone after cortisol treatment in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Fish Physiology and Biochemistry. 8: 271-279.
- Marrero, M., Monroig, Ó., Pérez, J.A., Betancor, M.B., Galindo, A., Bolaños, A., Acosta, N.G., andRodríguez, C., 2023. Dietary LC-PUFA and environmental salinity modulate the fatty acid biosynthesis capacity of the euryhaline teleost thicklip grey mullet (*Chelon labrosus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology: 110865.
- Marsigliante, S., Barker, S., Jimenez, E., andStorelli, C., 2000. Glucocorticoid receptors in the euryhaline teleost *Anguilla anguilla*. Molecular and Cellular Endocrinology. 162: 193-201.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., andSanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Reviews in Fish Biology and Fisheries.۸۸-۷۵:۱۵ .
- McCormick, S.D., andBern, H.A., 1989. In vitro stimulation of Na^+-K^+-ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 256: R707-R715.
- McCormick, S.D., Lerner, D.T., Monette, M.Y., Nieves-Puigdoller, K., Kelly, J.T., andBjörnsson, B.T., 2009. Taking it with you when you go: how perturbations to the freshwater environment, including temperature, dams, and contaminants, affect marine survival of salmon, American Fisheries Society Symposium, pp. 195-214.
- McDonald, M.D., andGrosell, M., 2006. Maintaining osmotic balance with an aglomerular kidney. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 143: 447-458.
- McKenney, P.T., Driks, A., andEichenberger, P., 2013. The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. Nature Reviews Microbiology. 11: 33-44.
- Mohapatra, S., Chakraborty, T., Prusty, A.K., Kumar, K., Pani Prasad, K., andMohanta, K.N., 2012. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). Pesticide Biochemistry and Physiology. 104: 28-37.
- Mohiseni, M., Banaee, M., Nematdust haghi, B., andFarabi, S.M.V., 2016. Effects of feed deprivation on chloride cell development in kuttum fish (*Rutilus frisii kuttum*) during sea water challenge. Journal of aquatic ecology. 5: 88-97.
- Moniruzzaman, M., Ghosal, I., Das, D., andChakraborty ,S.B., 2018. Melatonin ameliorates H2O2-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/NFkB pathway. Biological Research. 51.
- Nakano, K., Tagawa, M., Takemura, A., andHirano, T., 1998. Temporal changes in liver carbohydrate metabolism associated with seawater transfer in *Oreochromis mossambicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 119: 721-728.
- Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish & Shellfish Immunology. 29: 2-14.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., andMcIntosh, F.M., 2007. Mode of action of the yeast Saccharomyces cerevisiae as a feed additive for ruminants. British Journal of Nutrition. 76: 249-261.
- Ng, W.-K., Koh, C.-B., Sudesh, K., andSiti-Zahrah, A., 2009. Effects of dietary organic acids on growth, nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture Research. 40: 1490-1500.

- Noga, E.J., 2010. Fish disease: diagnosis and treatment. John Wiley & Sons, Iowa, USA.
- Oliveira, F.C., Soares, M.P., Oliveira, B.P.N., Pilarski, F., andde Campos, C.M., 2022. Dietary administration of *Bacillus subtilis*, inulin and its synbiotic combination improves growth and mitigates stress in experimentally infected *Pseudoplatystoma reticulatum*. Aquaculture Research. 53: 4256-4265.
- Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L.M., Tozzi, G., andFederici, G., 2001. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. Clinical Chemistry. 47: 1467-1469.
- Perry, J.J.P., Shin, D.S., Getzoff, E.D., andTainer, J.A., 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics. 1804: 245-262.
- Pietsch, C., andHirsch, P., 2015. Biology and ecology of carp. CRC Press, Boca Raton.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., andEndo, M., 2006. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental Edwardsiella tarda infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary Immunology and Immunopathology. 113: 339-347.
- Raa, J., 1996. The use of immunostimulatory substances in fish and shellfish farming. Reviews in Fisheries Science. 4: 229-288.
- Ramos, M.A., Gonçalves, J.F.M., Costas, B., Batista, S., Lochmann, R., Pires, M.A., Rema, P., andOzório, R.O.A., 2017. Commercial *Bacillus* probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) and brown trout (Salmo trutta): growth, immune responses and intestinal morphology. Aquaculture Research. 48: 2538-2549.
- Ray, A.K., Ghosh, K., andRingø, E., 2012. Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. Aquaculture Nutrition. 18: 465-492.
- Rice-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, G., andDavies, K.J., 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life, Biochemical Society Symposia. Portland Press, pp. 1-31.
- Ringø, E., andGatesoupe, F.-J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 160: 177-203.
- Ringø, E., Olsen, R., Gifstad, T., Dalmo, R., Amlund, H., Hemre, G.I., andBakke, A., 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaculture Nutrition. 16: 117-136.
- Roberts, R.J., 2012. Fish pathology. John Wiley & Sons.
- Romanova, E., Spirina, E., Romanov, V., Lyubomirova, V., andShadyeva, L., 2020. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on catfish in industrial aquaculture, E3S Web of Conferences. EDP Sciences, pp. 02013.
- Rombough, P., 2007. The functional ontogeny of the teleost gill: which comes first, gas or ion exchange? Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 148: 732-742.
- Roohi, Z., Imanpoor, M.R., Jafari, V., andTaghizadeh, V., 2017. The effect of salinity stress on survival, biochemical and blood parameters in fingerling *Cyprinus carpio* fingerling fed with herbal supplement of *Carum carvi*. Nova Biologica Reperta. 4: 48-55.
- Sadat Hoseini Madani, N., Adorian, T.J., Ghafari Farsani, H., andHoseinifar, S.H., 2018. The effects of dietary probiotic Bacilli (*Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*) on growth performance, feed efficiency, body composition and immune parameters of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) postlarvae. Aquaculture Research. 49: 1926-1933.
- Sakamoto, T., Uchida, K., andYokota, S., 2001. Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. Zoological Science. 18: 1163-1174.
- Santos, R.A., Bianchini, A., Jorge, M.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A., andTesser, M.B., 2014. Cobia *Rachycentron canadum* L. reared in low-salinity water: does dietary sodium chloride affect growth and osmoregulation? Aquaculture Research. 45: 728-735.
- Schieber, M., andChandel, N.S., 2014. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Current Biology. 24: R453-R462.
- Shukry, M., Abd El-Kader, M.F., Hendam, B.M., Dawood, M.A.O., Farrag, F.A., Aboelenin, S.M., Soliman, M.M., andAbdel-Latif, H.M.R., 2021. Dietary *Aspergillus oryzae* modulates serum biochemical indices, immune responses, oxidative stress, and transcription of HSP70 and cytokine genes in Nile tilapia exposed to salinity stress. Animals. 11: 1621.
- Skjermo, J., andVadstein, O., 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 177: 333-343.
- Smith, T.R., Tremblay, G.C., andBradley, T.M., 1999. Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology. 284: 286-298.

- Solovyev, M.M., andIzvekova, G.I., 2016. Seasonal changes in pH values in the intestine of fish from Lake Chany (West Siberia). Inland Water Biology. 9: 400-404.
- Sugita, H., Miyajima, C., andDeguchi, Y., 1991. The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 92: 267-276.
- Sun, Y., andOberley, L.W., 1996. Redox regulation of transcriptional activators. Free Radical Biology and Medicine. 21: 335-348.
- Takvam, M., Wood, C.M., Kryvi, H., andNilsen, T.O., 2021. Ion transporters and osmoregulation in the kidney of teleost fishes as a function of salinity. Frontiers in Physiology. 12: 664588.
- Tang, S., Liu, S., Zhang, J., Zhou, L ,.Wang, X., Zhao, Q., Weng, W., Qin, J.G., Chen, L., andLi, E., 2020. Relief of hypersaline stress in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by dietary supplementation of a host-derived *Bacillus subtilis* strain. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 528: 73554.۲
- Tang, Y., Han, L., Chen, X., Xie, M., Kong, W., andWu, Z., 2019. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus subtilis* affects antioxidant defenses and immune response in grass carp under *Aeromonas hydrophila* challenge. Probiotics and Antimicrobial Proteins. 11: 545-558.
- Tehrani, F., Shirazi, H., andKazempoor, R., 2020. Effect of lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills of probiotic-treated zebra fish (*Danio rerio*). Journal of Comparative Pathobiology. 17: 3033-3044.
- Tehrani, H.S., andMoosavi-Movahedi, A.A., 2018. Catalase and its mysteries. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 140: 5-12.
- Tossounian, M.-A., Baczynska, M., Dalton, W., Peak-Chew, S.Y., Undzenas, K., Korza, G., Filonenko, V., Skehel, M., Setlow, P., andGout, I .۲۰۲۳ ,.*Bacillus subtilis* YtpP and thioredoxin A are new players in the coenzyme-A-mediated defense mechanism against cellular stress. Antioxidants. 12: 938.
- Tuzhilkin, V.S., Katunin, D.N., andNalbandov, Y.R., 2005. Natural chemistry of Caspian Sea waters .in: Kostianoy, A.G., andKosarev, A.N. (Eds.), The Caspian Sea environment. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 83-108.
- Ugedal, O., Finstad, B., Damsgård, B., andMortensen, A., 1998. Seawater tolerance and downstream migration in hatchery‐reared and wild brown trout. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 168: 395-405.
- Van der Linden, A., Vanaudenhove, M., Verhoye, M., De Boeck, G., andBlust, R., 1999. Osmoregulation of the common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to an osmotic challenge assessed in-vivo and non-invasively by diffusion-and T2-weighted magnetic resonance imaging. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 124: 343-352.
- Vargas-Chacoff, L., Arjona, F.J., Ruiz-Jarabo, I., García-Lopez ,A., Flik, G., andMancera, J.M., 2020. Water temperature affects osmoregulatory responses in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). Journal of Thermal Biology. 88: 102526.
- Vasemägi, A., Visse, M., andKisand, V., 2017. Effect of environmental factors and an emerging parasitic disease on gut microbiome of wild salmonid fish. MSphere. 2: e00418-00417.
- Vieira, C.E.D., Pérez, M.R., Acayaba, R.D.A., Raimundo, C.C.M., anddos Reis Martinez, C.B., 2018. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere. 195: 125-134.
- Wang, L., Ge, C., Wang, J., Dai, J., Zhang, P., andLi, Y., 2017. Effects of different combinations of *Bacillus* on immunity and antioxidant activities in common carp. Aquaculture International. 25: 2091-2099.
- Wang, Y., Wang, Q., Xing, K., Jiang, P., andWang, J., 2021. Dietary cinnamaldehyde and *Bacillus subtilis* improve growth performance, digestive enzyme activity, and antioxidant capability and shape intestinal microbiota in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 531: 735798.
- Wilhelm Filho, D., 2007. Reactive oxygen species, antioxidants and fish mitochondria. Frontiers in Bioscience-Landmark. 12: 1229-1237.
- Wong, M., andWoo, N., 2006. Rapid changes in renal morphometrics in silver sea bream *Sparus sarba* on exposure to different salinities. Journal of Fish Biology. 69: 770-782.
- Wu, S.M., Jong, K., andKuo, S., 2003. Effects of copper sulfate on ion balance and growth in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 45: 357-363.
- Xie, S., Tian, L., Niu, J., Liang, G., andLiu, Y., 2017. Effect of N-acetyl cysteine and glycine supplementation on growth performance, glutathione synthesis, and antioxidative ability of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. Fish Physiology and Biochemistry. 43: 1011-1020.
- Yilmaz, S., Yilmaz, E., Dawood, M.A.O., Ringø, E., Ahmadifar, E., andAbdel-Latif, H.M.R., 2022. Probiotics, prebiotics, and synbiotics used to control vibriosis in fish: A review. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 547: 737514.

- Yin, Y., Zhang, P., Yue, X., Du, X., Li, W., Yin, Y., Yi, C., andLi, Y., 2018. Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and Bacillus subtilis on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses. Ecotoxicology and Environmental Safety. 161: 755-762.
- Yousefi, M., Hoseini, S.M., Kulikov, E.V., Seleznev, S.B., Petrov, A.K., Babichev, N.V., Kochneva, M.V., andDavies ,S.J., 2022. Effects of dietary Hyssop, *Hyssopus officinalis*, extract on physiological and antioxidant responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, juveniles to thermal stress. Frontiers in veterinary science. 9: 1042063.
- Zhang, C.N., Li, X.F., Xu, W.N ,.Zhang, D.D., Lu, K.L., Wang, L.N., Tian, H.Y., andLiu, W.B., 2015. Combined effects of dietary fructooligosaccharide and Bacillus licheniformis on growth performance, body composition, intestinal enzymes activities and gut histology of triangular bream (*Megalobrama terminalis*). Aquaculture Nutrition. 21: 755-766.
- Zhu, J., 2000. A review of microbiology in swine manure odor control. Agriculture, Ecosystems & Environment. 78: 93-106.

Abstract:

This study was conducted to investigate the effect of adding salt (sodium chloride) and probiotic TakCell Bacillus subtilis (IS02) to the diet on survival, biochemical indices, and histology of juvenile wild common carp, Cyprinus carpio, exposed to salinity stress. Juvenile common carp (about 1.1 g) were fed diets containing 0 (control), 5, and 10% sodium chloride and 2.5 × 108 (pro-8), and 2.5 × 109 (pro-9) CFU/g probiotic for 15 days, then transferred directly to brackish water at a salinity of 13 g/L and sampled after 3 and 10 days. The diet and sampling time had no significant effects on fish survival, and overall survival was high in all treatments (above 92%). Whole body moisture decreased significantly in all treatments after salinity stress. The amount of sodium in the body did not change in the pro-8 treatment during salinity stress, but increased significantly in the other treatments after 3 days of stress. Adding salt to the diet had no significant effect on the whole body chloride levels, but probiotic treatments reduced chloride levels compared to the control, before and after stress. Salinity stress increased the whole body chloride levels in all treatments. Adding salt to the diet resulted in a decrease in the whole body potassium, but salinity stress increased potassium levels in all treatments. Adding salt to the diet had no significant effect on cortisol, glutathione reductase, and glutathione peroxidase levels in the body, but probiotic reduced cortisol levels and increased glutathione reductase and glutathione peroxidase activities. Salinity stress for 3 days led to a significant increase in cortisol, glutathione reductase, and glutathione peroxidase levels in all treatments, but decreased again after 10 days. Salt treatment (especially 10%) and probiotics increased the amount of reduced glutathione and decreased malondialdehyde levels in the body. Before salinity stress, all treatments had some tissue damage in the gills (hyperplasia, lamellar fusion, and epithelial), which decreased in intensity after stress. The kidney tissue had no damage in the control and salt treatments before stress, but some focal accumulations of white blood cells were observed in the probiotic treatments, which persisted after stress. Salinity stress caused shrinkage of the urinary tubes in all treatments. In addition, some interstitial tissue disorganization was observed in the salt treatments. This study shows that juvenile wild common carp can tolerate direct transfer to the Caspian Sea without enriching the diet with salt. Adding 10 g/kg salt to the diet can reduce lipid peroxidation. Probiotic stimulates immunity in the kidney, strengthens ionoregulation, and increases antioxidant capacity in fish, which may have beneficial effects under field conditions.

Keywords: Probiotic, Salt, Diet, Salinity stress, Common carp

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute- Inland Waters Aquatics Resources Research Center- Gorgan

---

Project Title: Investigation of effects of dietary salt and probiotic Takcell® (*Bacillus subtilis*) on survival of carp (*Cyprinus carpio*) fry in response to abrupt salinity stress
Approved Number: 3-77-1251-007-010284
Author: Seyyed Morteza Hoseini
Project Leader/ Researcher: Seyyed Morteza Hoseini
Project Researcher: Seyed Hossein Hoseinifar
Collaborator(s): A.A. Aghaei Moghaddam, B. Gharavi, I. Sahrifpour, M. Hafezieh, M. Nazemi, M.R. Faezi, S.M. Aghili
Advisor(s):
Supervisor: -
Location of execution: Golestan Province
Date of Beginning: 2022
Period of execution: 1 Year
Publisher: Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing: 2023

All Right Reserved. No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference.

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute - Inland Waters Aquatics Resources Research Center

Project Title:

Investigation of effects of dietary salt and probiotic Takcell® (*Bacillus subtilis*) on survival of carp (*Cyprinus carpio*) fry in response to abrupt salinity stress

Project Leader:

Seyyed Morteza Hoseini

Register NO.

64317