نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی
Journal homepage: http://jair.gonbad.ac.ir
وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
دانشگاه گنبد کاووس

اثر افزودن نمک و باکتری *Bacillus subtilis* به جیره غذایی بر پاسخ کورتیزول و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی کپور دریایی *Cyprinus carpio* در مواجه با تنش شوری

سید مرتضی حسینی[1]، سید حسین حسینی‌فر[2*]، ملیکا قلیچ‌پور[1]، عباسعلی آقائی مقدم[1]، بهروز قره‌وی[1]، سیدمحمود عقیلی[1]، عیسی شریف‌پور[3]، محمود حافظیه[3]، محمدرضا فایضی[3]

[1] سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی، گرگان، ایران
[2] گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[3] مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

نوع مقاله:
پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۰۲/۰۹/۳۰
پذیرش: ۰۲/۱۰/۲۴

نویسنده مسئول مکاتبه:
سید حسین حسینی‌فر، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

ایمیل: hoseinifar@gau.ac.ir

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر افزودن نمک و باکتری *Bacillus subtilis* (IS02) به جیره‌غذایی بر بقاء، پاسخ کورتیزول و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی نورس کپور دریایی، *Cyprinus carpio*، در مواجهه با تنش شوری انجام شد. بچه‌ماهی کپور (میانگین ۰/۱ ± ۱/۱گرم) به مدت ۱۵ روز با جیره‌های غذایی حاوی ۵ و ۱۰ درصد نمک یا $۲/۵ \times ۱۰^{۸}$ و $۲/۵ \times ۱۰^{۹}$ کلنی گرم (cfu/g) پروبیوتیک تغذیه و سپس به‌طور مستقیم به آب لب-شور با غلظت ۱۳ گرم بر لیتر منتقل و پس از ۳ و ۱۰ روز نمونه‌گیری شدند. بقاء در همه تیمارها بالای ۹۶ درصد بود. میزان کورتیزول پایه و پس از تنش شوری در تیمارهای پروبیوتیکی به‌طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز در تیمارهای پروبیوتیکی بالاتر از سایر تیمارها بود. جیره‌های غذایی اثر معنی‌داری بر فعالیت کاتالاز نداشتند. بر اساس نتایج این تحقیق، استفاده از *B. subtilis* در جیره غذایی می-تواند باعث کاهش استرس و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی‌در بچه‌ماهی کپور نورس شود.

واژه‌های کلیدی:
استرس، بازسازی ذخایر، شوری، جیره غذایی، پروبیوتیک، نمک

۱ | مقدمه

ماهی کپور با نام علمی *Cyprinus carpio* نقش حیاتی در تأمین پروتئین مورد نیاز کشور ایفا می‌کند و مردم این ماهی را به‌دلیل کیفیت گوشت و طعم لذیذ آن می‌پسندند. با این‌حال، صید ماهی کپور در دریای خزر به مرور زمان کاهش چشمگیری داشته است. در دهه ۱۹۸۰، صید این گونه بیش از ۲۸۰۰ تن بود، اما در اواسط دهه ۹۰ به حدود ۱۲ تن کاهش یافت (Bandani *et al.*, 2022). سازمان شیلات ایران برای رسیدگی به این موضوع و احیای ذخایر ماهی کپور در دریای خزر، برنامه تولید و رهاسازی بچه‌ماهی در رودخانه‌های منتهی به دریا را اجرا کرده است. نرخ رهاسازی بچه‌ماهی کپور از حدود ۵ میلیون قطعه در سال ۲۰۱۴ به حدود ۵۰ میلیون در سال ۲۰۱۵ افزایش یافته است. اما با وجود این تلاش ها، میزان صید در واحد تلاش از حدود ۵۰ به تقریباً صفر کاهش یافته است که نشان می دهد برنامه احیای ذخایر به اندازه کافی کارآمد نیست (Bandani *et al.*, 2022). کاهش مقدار آب در رودخانه‌های منتهی به دریای خزر می‌تواند یکی از عامل عدم موفقیت احیای ذخایر کپور در دریای خزر باشد. مشاهدات حاکی از آن است که در زمان رهاسازی بچه‌ماهی کپور در استان گلستان، رودخانه‌ها اغلب جریان آب کمی دارند و آب دریا به دهانه رودخانه‌ها نفوذ می‌کند که باعث شوری آب در محل رهاسازی بچه‌ماهی‌ها می‌شود. در نتیجه، بچه‌ماهیان کپور تحت تنش اسمزی قرار گرفته که برای آنها کشنده است (Gholami *et al.*, 2013). بنابراین، یافتن راه حلی برای افزایش مقاومت بچه‌ماهی کپور می‌تواند اثربخشی برنامه احیای ذخایر را افزایش دهد. علاوه بر این، اگر بچه‌ماهی‌ها بتوانند در برابر تنش شوری مقاومت کنند، می‌تواند به‌جای رودخانه مستقیماً در دریا رهاسازی شود. یکی از مزایای این رویکرد، فراوانی غذای طبیعی در دسترس ماهی است که سیستم تنظیم اسمزی آنها را تقویت می‌کند (Mohiseni *et al.*, 2016). تنش اسمزی می‌تواند برای ماهیان استنوهالین مرگبار باشد. دامنه تغییرات غلظت یون‌ها در بدن بسیار محدود است که نشان می-دهد مکانیسم‌های کنترلی دقیقی برای آن وجود دارد (Baldisserotto, 2019). برهم خوردن تعادل یونی‌در بدن موجودات زنده باعث اختلالات زیادی در عملکرد فیزیولوژیک از جمله در سیستم عصبی و نقل و انتقالات غشای سلولی می‌شود (Ghelichpour *et al.*, 2022). یکی از اثرات تنش اسمزی در ماهی‌ها، بروز استرس اکسیداتیو است. استرس

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

اکسیداتیو با تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد در بدن ایجاد می‌شود که می‌تواند کشنده باشد. تحت تنش اسمزی، تعادل بیوشیمیایی غشای سلول‌ها به‌هم می‌خورد که باعث تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد می‌شود (Huang *et al*.,2012). لذا، ارتقاء توانایی سیستم آنتی‌اکسیدانی ماهی می‌تواند یکی از راهکارهای افزایش مقاومت ماهی در برابر تنش اسمزی باشد. در این راستا مطالعات نشان داده‌اند که انواع مختلف افزودنی‌های جیره با خواص آنتی‌اکسیدانی مانند ویتامین C (Caxico *et al*., 2018)، ویتامین E (Jalali *et al*., 2008)، تورین (Abdel-Tawwab and Monier, 2018) و زردچوبه (Moghadam *et al*,. 2018) می‌توانند باعث افزایش مقاومت آبزیان در برابر تنش اسمزی شوند. پروبیوتیک‌ها یکی از افزودنی‌های جیره هستند که علاوه بر خواص متعدد روی رشد، ایمنی و بهبود سلامت روده‌ماهی، باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانی نیز می‌شوند (Hoseinifar *et al*., 2021). *Bacillus subtilis* یک کاندیدای پروبیوتیکی خوب در آبزی‌پروری محسوب می‌شود؛ زیرا این باکتری توانایی استفاده از منابع گوناگون کربن و نیتروژن جانوری و گیاهی را دارد و به‌همین دلیل در شرایط گوناگون زنده می‌ماند (Gu *et al*., 2018). این باکتری خواص ضدمیکروبی داشته و مورد تایید FDA می‌باشد (Olmos *et al*.,2020) و اسپورهای این باکتری قابلیت تحمل شرایط نامساعد محیطی را دارند و توالی ژنتیکی آن به‌طور کامل به ثبت رسیده است (Nicholson, 2004). مطالعات انجام شده روی ماهی کپور نشان داده‌اند افزودن *B. subtilis* به جیره غذایی اثر معنی‌داری در رشد ندارد ولی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی را افزایش و شاخص پراکسیداسیون چربی را کاهش می‌دهد (Wang *et al*.,2018). استفاده از اسپور *B. subtilis* به عنوان ادجوانت در واکسن ویرمی‌بهاره کپور منجر به کاهش تولید رادیکال‌های آزاد، بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و غلظت گلوتاتیون احیائی و کاهش استرس اکسیداتیو در شرایط *برون تنی(in vitro)* شده است (Liu *et al*.,2021). همچنین، مشخص شده است که سویه C-3102 می‌تواند باعث بهبود رشد و فلور میکروبی روده در ماهی کوی(*Cyprinus rubrofuscus*) شود، اگر بر میزان مقاومت در برابر بیماری تاثیری ندارد (He *et al*., 2011). بهبود رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون چربی در ماهی کاراس (*Carassius auratus*) ، تغذیه شده با جیره حاوی *B. subtilis* در شرایط نرمال (Cao *et al*., 2018) یا تحت مسمومیت با سرب (Yin *et al*., 2018) گزارش شده است. افزودن سویه Ch9 به جیره غذایی ماهی آمور *Ctenopharyngodon idellus*، افزایش رشد و کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از بروز بیماری در ماهی شد (Tang *et al*., 2019). در ماهی کفشک زبانی، *Cynoglossus semilaevis*، نیز *B. subtilis* باعث بهبود شرایط آنتی اکسیدانی، افزایش گلوتاتیون احیائی و کاهش پراکسیداسیون چربی شده است (Wang *et al*., 2021). همچنین، این باکتری می‌تواند باعث بهبود عملکرد ماهی در آب شور نیز شود؛ به‌طوری‌که افزودن سویه E221 به جیره غذایی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) باعث بهبود رشد و فلور میکروبی در آب لب شور (شوری ۱۶ گرم در لیتر) شده است (Tang *et al*., 2020). سویه IS02 از *B. subtilis* در سال‌های اخیر با موفقیت خالص‌سازی و به صورت تجاری با نام تک‌سل تولید شده است. این سویه به‌طور خاص برای رشد در آب شور جدا شده است و خواص آنتاگونیستی در برابر پاتوژن های آبزیان دارد (Mirbakhsh *et al*., 2022). علاوه براین، تحقیقات نشان داده است که افزودن این سویه در جیره غذایی برخی گونه‌های دریایی، مانند میگوی وانامی، *Litopeneaeus vannamei* (Mirbakhsh*et al*., 2021)، و باس دریایی آسیایی، *Lates calcarifer* (Salehi *et al*., 2023)، منجر به بهبود رشد، بقاء، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مقاومت در برابر بیماری می‌شود. با این‌حال، درحال حاضر اطلاعاتی درمورد اثرات این پروبیوتیک روی ماهی کپور در شرایط تنش شوری در دسترس نیست. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر افزودن پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی کپور دریایی در یک دوره ۱۵ روزه بر میزان مرگ و میر و همچنین پاسخ کورتیزول و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شد.

۲ | مواد و روش‌ها

دراین تحقیق از بچه‌ماهیان کپور دریایی با میانگین وزن ۰/۱ ± ۱/۱گرم استفاده شد. تعداد ۱۰۰۰ بچه‌ماهی از مرکز تکثیر ماهیان استخوانی سیجوال به مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آب‌های داخلی منتقل شد. ماهی‌ها در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری متصل به سیستم هوادهی به مدت سه روز ذخیره‌سازی و سپس به ۱۵ آکواریوم ۴۵ لیتری منتقل شدند. در هر آکواریوم ۴۰ قطعه‌ماهی به‌صورت تصادفی وارد شد و هوادهی از طریق پمپ هوای مرکزی انجام گرفت. در این پژوهش از پروبیوتیک حاوی باکتری *B. subtilis* IS02 (Gen Bank: JN 856456) تولید شرکت تک ژن زیست استان تهران، شهرستان تهران استفاده شد. ۵ جیره غذایی حاوی صفر، ۵ و ۱۰ درصد نمک (Farabi *et al*., 2020) و صفر، $۱۰^{۸} \times ۲/۵$ و $۱۰^{۹} \times ۲/۵$ کلنی/گرم CFU/g پروبیوتیک تولید شد. از پروبیوتیک محصول تک ژن زیست به‌عنوان منبع باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) (مقدار توصیه شده شرکت برای تولید جیره $۱۰^{۸} \times ۲/۵$ CFU/g است) و از نمک طعام دامی‌به‌عنوان منبع نمک استفاده شد. خوراک پودری کپور ماهیان دانسو (شرکت مهدانه) به عنوان جیره غذایی شاهد استفاده شد. جیره شاهد به روش استاندارد (AOAC) (AOAC, 2020) 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 (AOAC, 2005) خمیر بهدست 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 و تا زمان استفاده در یخچال قرار گرفتند. مشخص شده است که باسیلوس‌ها می‌توانند در دوره‌های کوتاه نیز اثر مثبت روی ماهی داشته باشند (Reda *et al*., 2018)؛ به‌همین دلیل دوره تغذیه‌ماهی‌ها در این تحقیق ۱۵ روز بود و در این دوره روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن غذادهی انجام شد. پس از پایان دوره غذادهی، تغذیه‌ماهی‌ها به مدت یک روز قطع و سپس نمونه کل بدن ماهی از هر تیمار گرفته شد. پس از نمونه

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

گیری، آب دریای خزر وارد مخازن شده و ماهی‌ها به صورت ناگهانی‌در معرض تنش شوری (آب دریای خزر؛ شوری ۱۳ گرم در لیتر) قرار گرفتند. نمونه‌گیری‌های بعدی ۳ و ۱۰ روز پس از مواجهه با آب لب‌شور انجام شد. در تمام طول دوره پرورش، شاخص‌های کیفی آب توسط دستگاه پرتابل دیجیتال (Hach multi-parameter checker, USA) ثبت شدند (اکسیژن = ۰/۳۶ ± ۷/۷۲ میلی‌گرم بر لیتر، pH = ۰/۱۱ ± ۷/۸۱، دما = ۰/۲۴ ± ۲۵/۳۲ درجهٔ سانتی‌گراد). سپس ماهی‌ها به مدت ۳۰ روز در این شرایط (شوری ۱۳ گرم در لیتر) و با جیره شاهد پرورش یافتند.

شاخص‌های رشد و تلفات براساس 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]

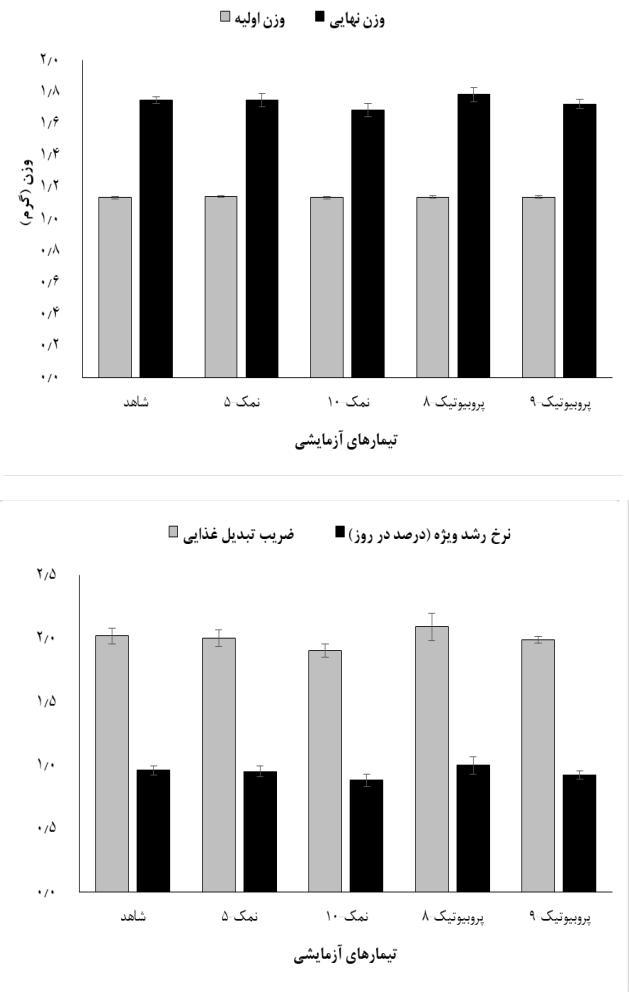
ضریب تبدیل غذایی = غذای مصرف شده ÷ (وزن نهایی – وزن اولیه)

نرخ تلفات = ۱۰۰ × (تعداد نهایی ماهی در هر آکواریوم – تعداد اولیه‌ماهی در هر آکواریوم) ÷ تعداد اولیه‌ماهی در هر آکواریوم

به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی اکسیدانی، از هر آکواریوم ۳ ماهی نمونه‌گیری شد. نمونه‌های ماهی بلافاصله پس از صید در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس توسط هاون چینی هموژن شدند. پس از هموژن سازی، بافر فسفات سرد با pH ۷ به میزان ۵ برابر وزن ماهی به آنها اضافه (Lionetto *et al.*, 2003) و بعد سانتریفیوژ شدند (۱۵ دقیقه، دمای ۴ درجه‌سانتی گراد، ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه). قسمت رویی نمونه در لوله‌های مجزا جمع‌آوری شده و برای اندازه‌گیری کورتیزول، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز استفاده شد. سطح کورتیزول بدن با استفاده از یک کیت‌تجاری (مونوبایند، آمریکا)، و بااستفاده از میکروپلیت ریدر یک در ۴۵۰ نانومتر و ۲۰ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد. این کیت براساس 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 میلی‌لیتر (حساسیت ۳/۶ نانوگرم در میلی‌لیتر) و واریانس میان سنجشی آن ۷/۵۲ درصد بود. فعالیت سوپراکسید دیسموتاز با استفاده از کیت تشخیصی تجاری (Zellbio Co., Germany) اندازه‌گیری شد. اساس کارکرد این کیت مبتنی بر نرخ کاهش اکسیداسیون پیروگالول است. فعالیت کاتالاز بر اساس نرخ تجزیه آب اکسیژنه و واکنش با آمونیوم مولیبدات اندازه‌گیری شد (Goth, 1991). پروتئین محلول نمونه ها به روش فولین-فنل اندازه گیری شد (Lowry *et al.*, 1951). ابتدا داده‌ها از نظر پراکنش نرمال و همگن بودن واریانس توسط آزمون‌های شاپیرو-ویلک و لون بررسی شدند. پس از تأیید مفروضات تحلیل واریانس، داده ها به استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک عاملی اندازه‌گیری مکرر آنالیز شدند. مقایسه جفتی بین زمان‌ها، تیمارهای غذایی، یا ترکیب تیمار زمان × تیمار غذایی (در صورت معنی‌دار شدن برهم‌کنش) توسط آزمون LSD انجام شد. معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بررسی شد و کلیه آنالیزها در SPSS-22 انجام شدند. داده‌ها به‌صورت میانگین ± خطای استاندارد ارائه شدند.

۳ | نتایج

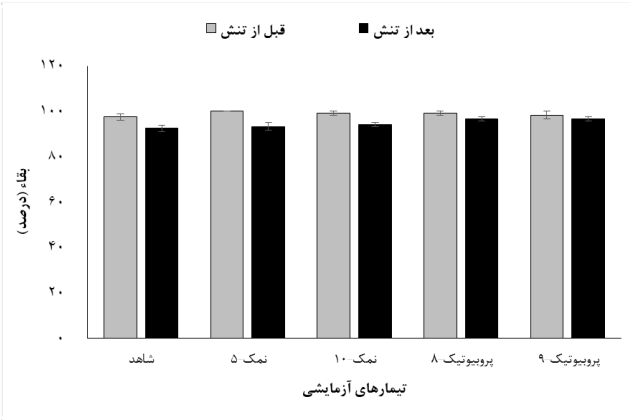
تیمارهای مختلف غذایی اثر معنی‌داری بر وزن نهایی ماهی پس از ۱۵ روز پرورش در آب شیرین و ۳۰ روز پرورش در آب لب شور نداشتند. میانگین وزن نهایی در تیمارهای مختلف بین ۱/۶۹ الی ۱/۷۵ گرم بود. اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف غذایی در شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی و نرخ‌رشد ویژه مشاهده نشد. در تیمارهای مختلف، ضریب‌تبدیل غذایی ۱/۹۱ الی ۲/۰۹ و نرخ‌رشد ویژه ۰/۸۸ الی ۱ درصد در روز بود (شکل ۱).



شکل۱- میانگین (± خطای استاندارد) وزن اولیه، وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه بچه‌ماهی کپور نورس تغذیه شده با جیره‌های غنی شده با نمک و پروبیوتیک (تعداد تکرار = ۳).

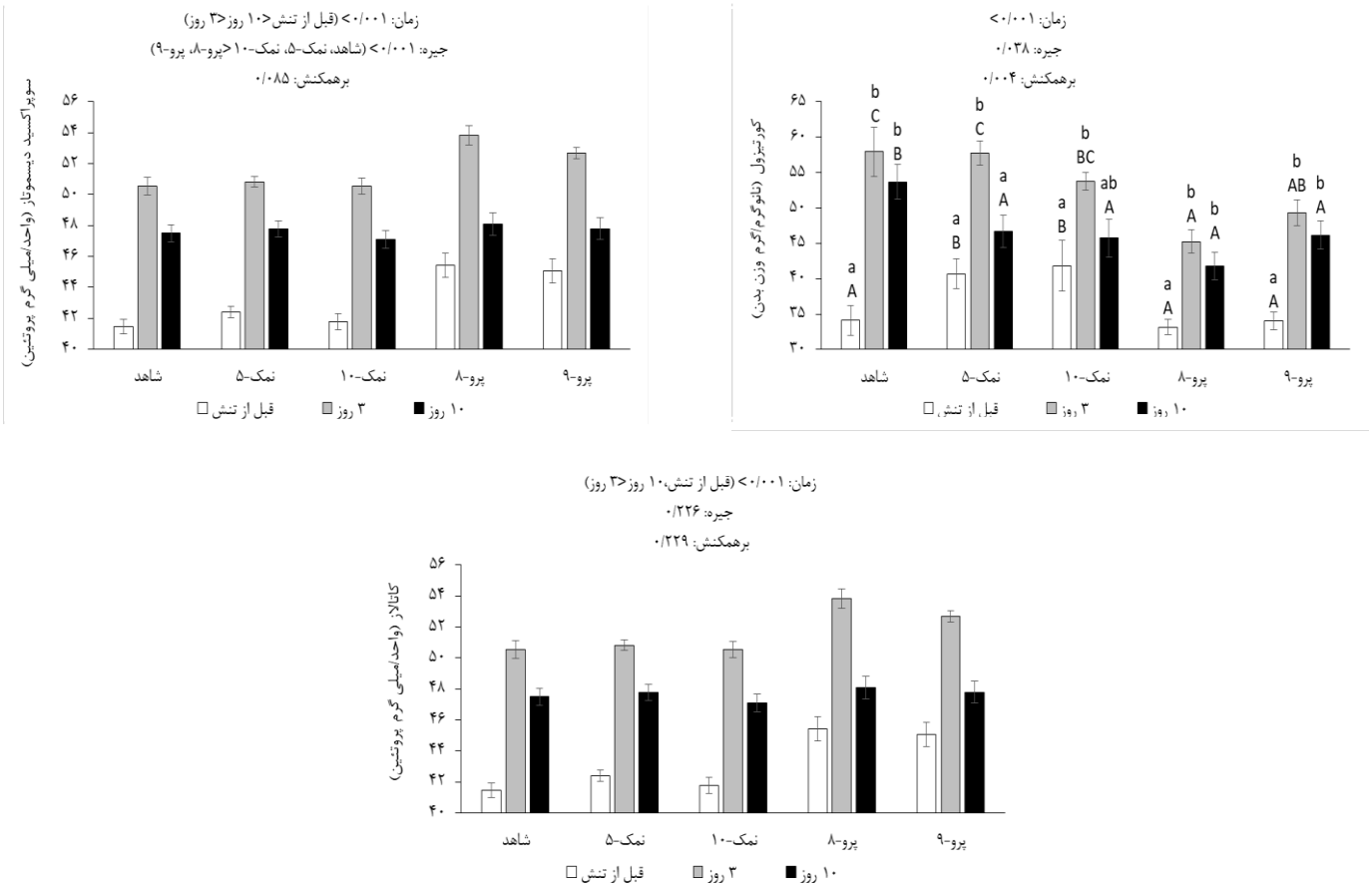
تیمارهای غذایی و تنش شوری اثر معنی‌داری روی بقاء ماهی‌ها نداشتند. بقا ماهی‌ها در تیمارهای مختلف و قبل از تنش شوری بین ۹۷/۵ تا ۱۰۰ درصد بود. ۳۰ روز پس از پرورش در آب لب‌شور بقا تیمارهای مخلف بین ۹۲/۵ تا ۹۶/۷ درصد متغیر بود (شکل ۲).

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]



شکل ۲- میانگین (± خطای استاندارد) درصد بقاء بچه‌ماهی کپور نورس تغذیه شده با جیره‌های غنی شده با نمک و پروبیوتیک قبل و بعد از تنش شوری (تعداد تکرار = ۳).

جیره غذایی و زمان نمونه‌برداری برهم‌کنش معنی‌داری روی مقدار کورتیزول کل بدن داشت (شکل ۳). قبل از تنش شوری، مقدار کورتیزول بدن در تیمارهای نمک بالاتر از سایر تیمارها بود. پس از تنش، کورتیزول بدن در تمام تیمارها افزایش معنی‌دار یافت ولی تیمارهای پروبیوتیک کورتیزول کمتری از سایر تیمارها داشتند. زمان نمونه برداری و تیمارهای غذایی اثر معنی‌داری روی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کل بدن داشت. تیمارهای پروبیوتیکی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز بالاتری از سایر تیمارها داشتند. همچنین، فعالیت سوپر-اکسید دیسموتاز پس از ۳ روز به حداکثر خود رسید و پس از ۱۰ روز کاهش یافت ولی کماکان بالاتر از قبل از تنش بود (شکل ۳). جیره غذایی اثری بر فعالیت کاتالاز بدن نداشت ولی زمان نمونه‌برداری اثر معنی‌داری روی فعالیت کاتالاز داشت. ۳ روز پس از تنش شوری، فعالیت کاتالاز به حداکثر خود رسید ولی پس از ۱۰ روز به مقادیر قبل از تنش بازگشت (شکل ۳).



شکل ۳- میانگین (± خطای استاندارد) کورتیزول، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کل بدن در بچه‌ماهی کپور نورس تغذیه شده با جیره های غنی شده با نمک و پروبیوتیک قبل از تنش شوری و ۳ و ۱۰ روز پس از تنش (تعداد تکرار = ۳). حروف بزرگ متفاوت روی میله‌ها نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای غذایی در هر زمان هستند. حروف کوچک متفاوت روی میله‌ها نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار غذایی هستند.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

ماهی‌های استنوهالین، مانند کپور معمولی، وقتی در معرض محیط‌هایی با شوری‌های متفاوت قرار می‌گیرند، توانایی تنظیم اسمزی بالایی ندارند (Altinok and Grizzle, 2003). این باور وجود دارد که رهاسازی مستقیم ماهی کپور معمولی در دریای خزر می تواند برای آنها کشنده باشد (Van *et al*.,1993). اما باتوجه به محدودیت منابع آبی در رودخانه ها و در دسترس بودن غذا در دریای خزر، رهاسازی مستقیم آنها در دریا به‌عنوان یک گزینه بالقوه برای احیای جمعیت آنها پیشنهاد شده است (Mohiseni *et al*., 2016). این مطالعه با هدف بررسی تحمل بچه‌ماهی کپور دریایی به انتقال مستقیم به آب شور دریای خزر انجام شد. تحقیقات قبلی در این زمینه نتایج متفاوتی را به‌همراه داشته است که نشان می‌دهد عواملی مانند ترکیب یونی آب (استفاده از آب دریا یا کلرید سدیم)، سن و وزن ماهی، منشاء ماهی (دریایی یا پرورشی)، و مدت نگهداری در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند بر آن تأثیر بگذارد. بچه‌ماهی کپور دریایی با وزن ۱/۲ گرم پس از یک هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاه، در مواجهه ناگهانی با آب دریای خزر (شوری ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر) در عرض ۲۴ ساعت ۱۰۰ درصد تلفات داشت. اما در شوری های ۵ و ۱۰ گرم در لیتر طی ۹۶ ساعت تلفات گزارشی مشاهده نشد. ۲۴ ساعت پس از قرار گرفتن در معرض ۱۵ و ۲۰ گرم در لیتر آب شور سطح سدیم و پتاسیم خون به‌طور معنی‌داری به‌ترتیب افزایش و کاهش یافت که نشان‌دهنده استرس اسمزی کشنده در بچه‌ماهی است (Gholami *et al*., 2013). بچه‌ماهی کپور دریایی با وزن ۴/۵ گرم، پس از ۴۵ روز پرورش در آزمایشگاه، تلفاتی پس از ۷ روز قرار گرفتن در معرض تنش شوری ۱۳ گرم در لیتر (منبع آب شور نامشخص) نداشت (Imanpoor *et al*., 2015). به همین ترتیب، بچه‌ماهی های کپور دریایی با وزن اولیه تقریباً ۲/۵ گرم در شرایط آزمایشگاهی به مدت ۸ هفته پرورش داده شدند و سپس مستقیماً در معرض شوری ۱۳ گرم در لیتر (منبع آب شور نامشخص) قرار گرفتند که منجر به تلفات ناچیز (کمتر از ۵ درصد) شد. (Roohi *et al*., 2017). بچه‌ماهی کپور دریایی به وزن ۱۰ گرم که به مدت ۱۰ روز در آب با شوری ۳ گرم در لیتر (شوری طبیعی آب چاه) نگهداری می‌شد، با افزودن ۵ گرم در لیتر کلرید سدیم به آب تلفاتی نداشت. با این حال، افزایش سطح کورتیزول، گلوکز و سدیم در سرم ماهی مشاهده شد (Hosseini and Hosseini, 2012). در آزمایشی دیگر، با استفاده از بچه‌ماهی کپور (۱۴ گرم) که در همان آب چاه نگهداری می‌شد، افزودن ۷ گرم در لیتر کلرید سدیم منجر به تلفات ۹۴ درصدی طی سه روز شد که با افزایش سطح کورتیزول، گلوکز، کلراید و سدیم سرم همراه بود (Hoseini and Hoseini, 2010). لذا، در نظر گرفتن عواملی مانند ترکیب یونی آب، سن و وزن ماهی، منشاء ماهی و مدت نگهداری در شرایط آزمایشگاهی هنگام مقایسه نتایج مهم است. 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*., 2019). همه این تغییرات به‌ماهی 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 (Ghelichpour *et al*., 2020). از طرفی، میزان افزایش کورتیزول پس از استرس‌ها، می‌تواند نشانه‌ای از شدت استرسی باشد که‌ماهی متحمل شده است (Barton, 2003). بنابراین، نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که پروبیوتیک تک سل استرس ناشی از تنش شوری را در ماهی کاهش داده است. در تأیید این نتایج، مزالعات پیشین نشان داده‌اند که افزودن *B. subtilis* به تنهایی (Oliveira *et al*., 2022) یا در ترکیب با سایر باکتری‌های این جنس (Romanova *et al*., 2013)، می‌تواند باعث کاهش کورتیزول قبل یا بعد از استرس شوند. آنزیم‌های آنتی اکسیدانی نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند. سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز دو آنزیم اصلی در سیستم آنتی اکسیدانی هستند که وظیفه تبدیل یون سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و سپس آب و اکسیژن داشته و به همین دلیل نقش مهمی در جلوگیری از استرس اکسیداتیو دارند .(Hoseini *et al*., 2022). 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*., 2012). در این تحقیق، انتقال ماهی به آب لب‌شور باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی بدن شد. در قزل آلای رنگین (Huang *et al*.,2012) 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. افزودن *B. subtilis* به جیره غذایی ماهی کپور دریایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی شد که با مطالعات قبلی روی ماهی‌های دیگر همخوانی‌دارد (Yin *et al*., 2018; Tang *et al*., 2019). یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که بچه‌ماهی نورس کپور دریایی توانایی طبیعی در تحمل انتقال مستقیم به آب دریای خزر را دارد و گنجاندن *B. subtilis* در جیره غذایی آنها باعث بهبود زنده‌مانی‌در شرایط تنش شوری نمی‌شود. با این حال، استفاده از این پروبیوتیک می‌تواند باعث کاهش استرس و افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی‌در ماهی شود. این اثرات ممکن است به‌ماهی کمک کند تا در مقابل سایر تنش‌های محیطی مانند نوسانات دما، آلودگی آب یا قرار گرفتن در معرض عوامل بیماری‌زا مقاومت کند. بر اساس نتایج این تحقیق، افزودن نمک به جیره غذایی بچه‌ماهی نورس کپور دریایی مفید نمی‌باشد.

پست الکترونیک نویسندگان

سید مرتضی حسینی: seyyedmorteza.hoseini@gmail.com

سید حسن حسینی‌فر: hossein.hoseinifar@gmail.com

ملیکا قلیچ‌پور: ml.ghelichpour@gmail.com

عباسعلی آقائی‌مقدم: aghaeifishery@gmail.com

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

بهروز قره‌وی: behroozgharavy@yahoo.com
سید محمود عقیلی: maghili272@gmail.com
عیسی شریف‌پور: isharifpour@yahoo.com
محمود حافظیه: jhafezieh@yahoo.com
محمدرضا فایضی: m.r.faezi@ifro.ir

REFERENCES

Abdel-Tawwab M., Monier M.N. 2018. Stimulatory effect of dietary taurine on growth performance, digestive enzymes activity, antioxidant capacity, and tolerance of common carp, *Cyprinus carpio* L., fry to salinity stress. Fish Physiol Biochem, 44: 639-49.

Abdollahpour H., Falahatkar B., Jafari N., Lawrence C. 2020. Effect of stress severity on zebrafish (*Danio rerio*) growth, gonadal development and reproductive performance: Do females and males respond differently? Aquaculture, 522:735099.

AOAC. (2005). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.

Altinok I., Grizzle J.M. 2003. Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. Journal of World Aquaculture Socity, 34:71-83.

Barton B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integration Comp Biology, 42: 517-525.

Baldisserotto B. 2019. Fish osmoregulation: CRC Press.

Bandani G., Larijani M., Frazli H., Daryanabard G. 2020. Analyzing the trend of catch rate and reconstruction of carp and roach in the Iranian waters of Caspian Sea. Utilization and cultivation of aquatics, 9:45-56.

Cao H., Yu R., Zhang Y., Hu B., Jian S., Wen C., Kajbaf K., Kumar V., Yang 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, 508:106-112.

Caxico Vieira C.A.S., Vieira J.S., Bastos M.S., Zancanela V., Barbosa L.T., Gasparino E., Del 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.

Eslamloo K., Akhavan S.R., Henry M.A. 2013. Effects of dietary administration of *Bacillus* probiotics on the non-specific immune responses of tinfoil barb, *Barbonymus schwanenfeldii* (Actinopterygii: Cypriniformes: Cyprinidae). Acta ichthyologica et piscatoria, 43:211-218.

Farabi S.M.V., Matinfar A., Behrouzi S., Sharifian M., Ghaneei Tehrani M. 2020. Investigation effect of salt supplementation on change of gill and kidney tissues of *Rutilus kutum*. Aquaculture development, 14:63-78.

Ghelichpour M., Mirghaed A.T., Hoseinifar S.H., Khalili M., Yousefi M., Van Doan H., Jimenez A.P. 2019. Expression of immune, antioxidant and stress related genes in different organs of common carp exposed to indoxacarb. Aquatic Toxicology, 208:208-16.

Goth L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. Clin Chim Acta, 196:143-51.

Gu Y., Xu X., Wu Y., Niu T., Liu Y., Li J., Du G., Liu L. 2018. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. Metabolic engineering, 50:109-21.

Ghelichpour M., Taheri Mirghaed A., Zargar 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., Azimi 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).

Ghelichpour M., Taheri Mirghaed A., Hoseini S.M., Perez Jimenez A. 2020. Plasma antioxidant and hepatic enzymes activity, thyroid hormones alterations and health status of liver tissue in common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to lufenuron. Aquaculture, 516:634-644.

Hoseini S.M., Paolucci M., Arghideh M., Hosseinpour Delavar F., Zavvar F., Hoseinifar S.H., Van Doan H. 2022. Effects of dietary glycine administration on biochemical responses to ammonia toxicity in common carp, *Cyprinus carpio*. Aquaculture Research, 53:2185-94.

Hoseini S.M., Hosseini S.A., Soudagar M. 2012. Dietary tryptophan changes serum stress markers, enzyme activity, and ions concentration of wild common carp *Cyprinus carpio* exposed to ambient copper. Fish Physiol Biochem, 38:1419-26.

Hosseini S.A., Hoseini S.M. 2012. Effect of acute crowding stress on subsequent osmotic challenge and recovery in juvenile common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus). Comp Clin Path, 21:583-8.

He S., Liu W., Zhou Z., Mao W., Ren P. 2011. Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture research & development, 1:S1:005.

Hoseinifar S.H., Yousefi S., Van Doan H., Ashouri G., Gioacchini G., Maradonna F., Carnevali O. 2021. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. Reviews in fisheries science & aquaculture, 29:198-202.

Huang M., Yang X., Zhou Y., Ge J., Davis D.A., Dong Y., Gao Q., Dong S. 2012. 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.

Hoseini S.M., &Hosseini S.A .(۲۰۱۰) .Effect of dietary l-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. Fish Physiology Biochem, 36:1061-1067

.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

Imanpoor M.R., Roohi Z., Salaghi Z., Beykzadeh A., Davoudipoor 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.

Jalali M.A., Hosseini S.A., Imanpour 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, 39:1286-91.

Liu J., Cheng Y., Lu Y., Xia C., Wang N., Li 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.

Lionetto M., Caricato R., Giordano M., Pascariello M., Marinosci L., Schettino T. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and Mullus barbatus in an Italian coastal marine area. *Mar* Pollution Bulletin, 46:324-30.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., &Randall R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193,265-75.

Mirbakhsh M., Mahjoub M., Afsharnasab M., Kakoolaki S., Sayyadi M., Hosseinzadeh S. 2021. Effects of *Bacillus subtilis* on the water quality, stress tolerance, digestive enzymes, growth performance, immune gene expression, and disease resistance of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during the early hatchery period. Aquaculture international, 29: 2489-506.

Mirbakhsh M., Ghaednia B., Tabatabaee Bafroee A.S. 2022. An *in vivo* and *in vitro* assessment of the probiotic potentials of indigenous halotolerant bacteria on growth performance and digestive enzymes of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) in high-salinity waters. Aquaculture Nutrion, 27: 24-42.

Moghadam H., Sourinejad I., Johari S.A. 2022. Dietary turmeric, curcumin and nanoencapsulated curcumin can differently fight against salinity stress in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. Aquaculture Research, 53:3127-39.

Mohiseni M., Banaee M., Nematdust haghi B., Farabi S.M.V. 2016. Effects of feed deprivation on cloride cell development in kuttum fish (*Rutilus frisii kuttum*) during sea water challenge. Journal of aquatic ecology, 5:88-97.

Nicholson W. 2004. Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* spores. In: Ricca E., Henriques A., Cutting S., editors. Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications. Norfolk, UK: Horizons Bioscience, pp: 1-15.

Oliveira F.C., Soares M.P., Oliveira B.P.N., Pilarski F., de 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, 53:4256-65.

Olmos J., Acosta M., Mendoza G., Pitones V. 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. Arch Microbiology, 202:427-35.

Reda R.M., El-Hady M.A., Selim K.M., El-Sayed H.M. 2018. Comparative study of three predominant gut Bacillus strains and a commercial *B. amyloliquefaciens* as probiotics on the performance of *Clarias gariepinus*. Fish Shellfish Immunology, 80:416-25

Roohi Z., Imanpoor M.R., Jafari V., Taghizadeh 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.

Romanova E., Spirina E., Romanov V., Lyubomirova V., Shadyeva L. 2013. Effects of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on catfish in industrial aquaculture. E3S Web of Conferences: EDP Sciences, 241p.

Sadat Hoseini Madani N., Adorian T.J., Ghafari Farsani H., Hoseinifar 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, 49:1926-33.

Salehi M., Bagheri D., Sotoudeh E., Ghasemi A., Mozanzadeh M.T. 2023. The combined effects of propionic acid and a mixture of Bacillus spp. probiotic in a plant protein–rich diet on growth, digestive enzyme activities, antioxidant capacity, and immune-related genes mRNA transcript abundance in *Lates calcarifer* fry. Probiotics and antimicrobial proteins, 15:655-667.

Shukry M., Abd El-Kader M.F., Hendam B.M., Dawood M.A.O., Farrag F.A., Aboelenin S.M., Soliman M.M., Abdel-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, 11:16-21.

Tang S., Liu S., Zhang J., Zhou L., Wang X., Zhao Q., Weng W., Qin J.G., Chen L., Li E. 2020. Relief of hypersaline stress in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by dietary supplementation of a host-derived *Bacillus subtilis* strain. Aquaculture, 528:542-735.

Tang Y., Han L., Chen X., Xie M., Kong W., Wu 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.

Van der Linden A., Vanaudenhove M., Verhoye M., De Boeck G., Blust 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.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

Wang Y., Wang Q., Xing K., Jiang P., Wang 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*, 531:735-798.

Wang L., Ge C., Wang J., Dai J., Zhang P., Li Y. 2017. Effects of different combinations of *Bacillus* on immunity and antioxidant activities in common carp. Aquaculture International, 25:2091-2099.

Yin Y., Zhang P., Yue X., Du X., Li W., Yin Y., Yi C., Li Y. 2018. Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and Bacillus subtilis on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses. Ecotoxicology Environment Safty, 161:755-762.

نحوه استناد به این مقاله:

حسینی س.م.، حسینی فر س.ح.، قلیچ‌پور م.، آقائی‌مقدم ع.، قره‌وی ب.، عقیلی س.م.، شریف‌پور ع.، حافظیه م.، فایضی م.ر. اثر افزودن نمک و باکتری *Bacillus subtilis* به جیره غذایی بر پاسخ کورتیزول و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی کپور دریایی *Cyprinus carpio* در مواجه با تنش شوری. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۲، ۹-۱ :(۴)۱۱ .

Hoeini S.M., Hoeinifar S.H., Ghelichpour M., Aghaeimoghaddam A., Gharavi B., Aghili S.M., Sharifpour I., Hafezieh M., Fayezi M.R. Effect of adding salt and *Bacillus subtilis* to diet on cortisol response and antioxidant indices of wild common carp fry, *Cyprinus carpio* under salinity stress. Journal of Applied Ichthyological Research, University of Gonbad Kavous. 2023, 11(4): 1-9.

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]

Effect of adding salt and *Bacillus subtilis* to diet on cortisol response and antioxidant indices of wild common carp fry, *Cyprinus carpio* under salinity stress

Hoseini S.M[1]., Hoseinifar S.H[2*]., Ghelichpour M[1]., Aghaei Moghaddam A[1]., Gharavi B[1]., Aghili S.M[1]., Sharifpour I[3]., Hafezieh M[3]., Fayezi M.R[3].

[1] Inland Waters Aquatics Resources Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Gorgan, Iran.

[2] Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

[3] Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Tehran, Iran.

Type:

Original Research Paper

Paper History:

Received: 21-12-2023
Accepted: 14-01- 2024

Corresponding author:

Hoseinifar S.H. Dept. of Fisheries, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Email: hossein.hoseinifar@gmail.com

Abstract

This research was conducted in order to investigate the effect of adding salt and *Bacillus subtilis* bacteria (IS02) to the diet on the survival, cortisol response and antioxidant indices of sea carp, *Cyprinus carpio*, under salinity stress. Baby carp fish (average 1.1 g) were fed with diets containing 5 and 10% salt or 108 x 5.2 and 109 x 5.2 colony grams (cfu/g) of probiotics for 15 days and then to They were directly transferred to saline water with a concentration of 13 grams per liter and samples were taken after 3 and 10 days. Survival in all treatments was above 96%. The amount of cortisol at baseline and after salinity stress in probiotic treatments was significantly lower than other treatments. Superoxide dismutase activity was higher in probiotic treatments than other treatments. Diets had no significant effect on catalase activity. Based on the results of this research, the use of B. subtilis in the diet can reduce stress and increase the antioxidant capacity in juvenile Norse carp.

Keywords: Stress, Stock rehabilitation, Salinity, Diet, Probiotics, Salt

[Downloaded from jair.gonbad.ac.ir on 2024-09-01]