



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

سید مرتضی حسینی^۱، سید حسین حسینی‌فر^{۲*}، ملیکا قلیچ‌پور^۱، عباسعلی آقائی مقدم^۱، بهروز قره‌وی^۱، سید محمود عقیلی^۱، عیسی شریف‌پور^۳، محمود حافظیه^۳، محمدرضا فیاضی^۳

^۱ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آب‌های داخلی، گرگان، ایران

^۲ گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

^۳ مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر افزودن نمک و باکتری *Bacillus subtilis* (IS02) به جیره غذایی بر بقاء، پاسخ کورتیزول و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بچه‌ماهی نوس کپور دریایی، *Cyprinus carpio*، در مواجهه با تنش شوری انجام شد. بچه‌ماهی کپور (میانگین $0.1 \pm 1/1$ گرم) به مدت ۱۵ روز با جیره‌های غذایی حاوی ۵ و ۱۰ درصد نمک یا $10^6 \times 2/5$ و $10^9 \times 2/5$ 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 می‌تواند باعث کاهش استرس و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بچه‌ماهی کپور نوس شود.

واژه‌های کلیدی:

استرس، بازسازی ذخایر، شوری، جیره غذایی، پروبیوتیک، نمک

نوع مقاله:

پژوهشی اصیل

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۲/۰۹/۳۰

پذیرش: ۰۲/۱۰/۲۴

نویسنده مسئول مکاتبه:

سید حسین حسینی‌فر، گروه شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

ایمیل: hoseinifar@gu.ac.ir

۱ | مقدمه

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 می‌دهد مکانیسم‌های کنترلی دقیقی برای آن وجود دارد (Baldisserotto, 2019). برهم خوردن تعادل یونی در 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

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 این حال، 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 تلاش‌ها، میزان صید در واحد تلاش از حدود ۵۰ به تقریباً صفر کاهش یافته است که نشان می‌دهد 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

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 پاتوژن‌های آبزیان دارد (Mirbakhsh et al., 2022). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده است که افزودن این سویه در جیره غذایی برخی گونه‌های دریایی، مانند میگوی وانامی، *Litopenaeus 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 این حال، در حال حاضر اطلاعاتی در مورد 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

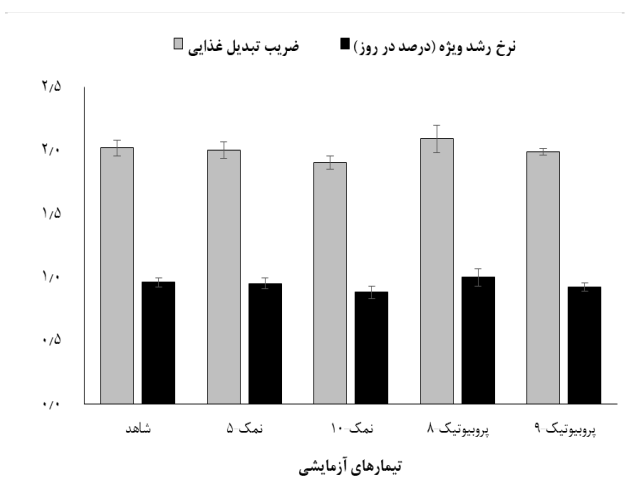
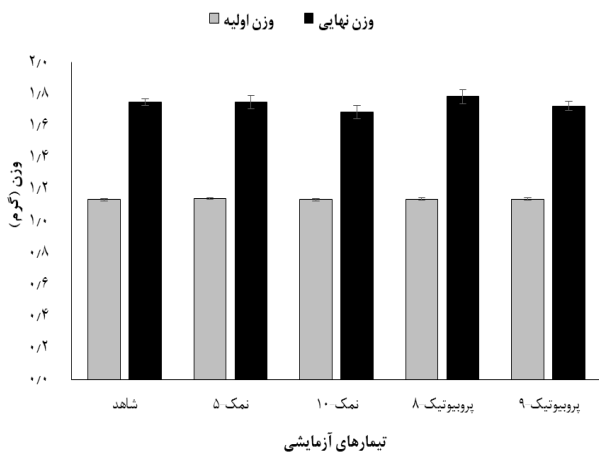
در این تحقیق از بچه‌ماهیان کپور دریایی با میانگین وزن 0.1 ± 0.1 گرم استفاده شد. تعداد ۱۰۰۰ بچه‌ماهی از مرکز تکثیر ماهیان استخوانی سیجوال به مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان داخلی منتقل شد. ماهی‌ها در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری متصل به سیستم هوادهی به مدت سه روز ذخیره‌سازی و سپس به ۱۵ آکواریم ۴۵ لیتری منتقل شدند. در هر آکواریم 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، $10^8 \times 2/5$ و $10^9 \times 2/5$ 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 $10^8 \times 2/5$ CFU/g است) و از نمک طعام دامی به‌عنوان منبع نمک استفاده شد. خوراک پودری کپور ماهیان دانسو (شرکت مهدانه) به عنوان جیره غذایی شاهد استفاده شد. جیره شاهد به روش استاندارد (AOAC, 2020) (AOAC) آزمایش شد و مشخص گردید که حاوی $39/2$ درصد پروتئین، $14/9$ درصد چربی، $7/74$ درصد خاکستر و $1/00$ درصد باز فرار کل بود. به این خوراک مقادیر مناسب نمک و پروبیوتیک و $0/12$ 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 رشته‌های 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)؛ به همین دلیل دوره تغذیه‌ماهی‌ها در این تحقیق ۱۵ روز بود و در این دوره روزانه به میزان ۳ درصد وزن بدن غذاهای انجام شد. پس از پایان دوره غذاهای، تغذیه‌ماهی‌ها به مدت یک روز قطع و سپس نمونه کل بدن ماهی از هر تیمار گرفته شد. پس از نمونه

اکسیداتیو با تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد در بدن ایجاد می‌شود که می‌تواند کشنده باشد. تحت تنش اسمزی، تعادل بیوشیمیایی غشای سلول‌ها به هم 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-Moghdam et al., 2018) و زردچوبه (Tawwab and Monier, 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 آنتی‌اکسیدانی نیز می‌شوند (Hoseinifar et al., 2021). *Bacillus subtilis* یک کاندیدای پروبیوتیکی خوب در آبزی-پروری 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 ضد میکروبی 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 آنتی‌اکسیدانی 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 آنتی‌اکسیدانی و غلظت گلوکاتایون 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 تأثیری ندارد (He et al., 2011). بهبود رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی 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 *A. niloticus* (Oreochromis niloticus) باعث بهبود رشد و فلور میکروبی در آب لب شور (شوری ۱۶ گرم در لیتر) شده است (Tang et al., 2020).

آنالیزها در SPSS-22 انجام شدند. داده‌ها به صورت میانگین \pm 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 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 ۱).



شکل ۱- میانگین (\pm خطای استاندارد) وزن اولیه، وزن نهایی، ضریب تبدیل غذایی و نرخ رشد ویژه بچه‌ماهی کپور نارس تغذیه شده با جیره‌های غنی شده با نمک و پروبیوتیک (تعداد تکرار = ۳).

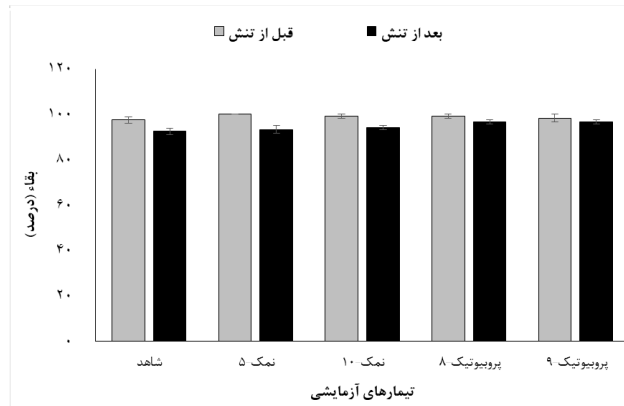
تیمارهای غذایی و تنش شوری اثر معنی‌داری روی بقاء ماهی‌ها نداشتند. بقا ماهی‌ها در تیمارهای مختلف و قبل از تنش شوری بین ۹۷/۵ تا ۱۰۰ درصد بود. ۳۰ روز پس از پرورش در آب لب شور بقا تیمارهای مخلف بین ۹۲/۵ تا ۹۶/۷ درصد متغیر بود (شکل ۲).

گیری، آب دریای خزر وارد مخازن شده و ماهی‌ها به صورت ناگهانی در معرض تنش شوری (آب دریای خزر؛ شوری ۱۳ گرم در لیتر) قرار گرفتند. نمونه‌گیری‌های بعدی ۳ و ۱۰ روز پس از مواجهه با آب لب شور انجام شد. در تمام طول دوره پرورش، شاخص‌های کیفی آب توسط دستگاه پرتابل دیجیتال (Hach multi-parameter checker, USA) ثبت شدند (اکسیژن = 0.36 ± 7.72 میلی‌گرم بر لیتر، pH = 0.11 ± 7.81 ، دما = 0.24 ± 25.32 درجه 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) = $100 \times [(\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه}) \div \text{وزن اولیه}]$
 نرخ رشد ویژه (درصد در روز) = $100 \times [(\text{لگاریتم طبیعی وزن نهایی} - \text{لگاریتم طبیعی وزن اولیه}) \div \text{زمان}]$
 ضریب تبدیل غذایی = $\text{غذای مصرف شده} \div (\text{وزن نهایی} - \text{وزن اولیه})$
 نرخ تلفات = $100 \times (\text{تعداد نهایی ماهی در هر آکواریوم} - \text{تعداد اولیه ماهی در هر آکواریوم}) \div \text{تعداد اولیه ماهی در هر آکواریوم}$

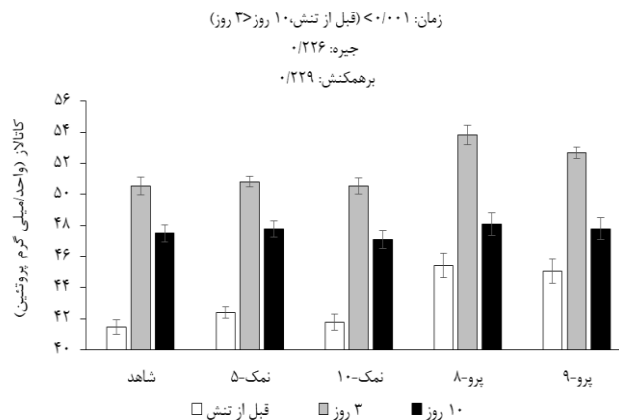
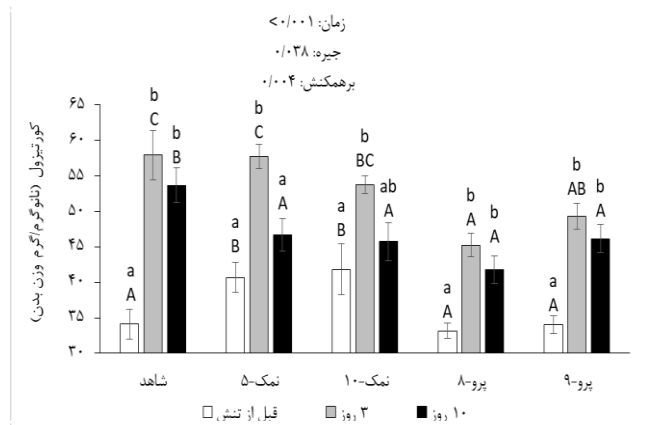
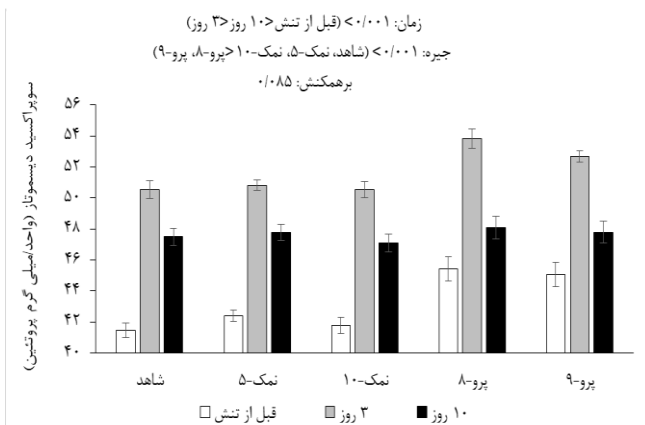
به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، از هر آکواریوم ۳ ماهی نمونه‌گیری شد. نمونه‌های ماهی بلافاصله پس از صید در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس توسط هاون چینی هموژن شدند. پس از هموژن سازی، بافر فسفات سرد با pH ۷ به میزان ۵ برابر وزن ماهی به آنها اضافه (Lionetto *et al.*, 2003) و بعد سانتریفیوژ شدند (۱۵ دقیقه، دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، دور 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 کیت تجاری (مونوباند، آمریکا)، و با استفاده از میکروپلیت ریدر یک در ۴۵۰ نانومتر و ۲۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. این کیت براساس روش الیزای 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 آمونوم مولیبدات اندازه‌گیری شد (Goth, 1991). پروتئین محلول نمونه‌ها به روش فولین-فنل اندازه‌گیری 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، داده‌ها به استفاده از آزمون تحلیل واریانس یک عاملی اندازه‌گیری مکرر آنالیز شدند. مقایسه جفتی بین زمان‌ها، تیمارهای غذایی، یا ترکیب تیمار زمان \times تیمار غذایی (در صورت معنی‌دار شدن برهم‌کنش) توسط آزمون LSD انجام شد. معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بررسی شد و کلیه



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

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).

جیره غذایی و زمان نمونه‌برداری بر هم‌کنش معنی‌داری روی مقدار کورتیزول کل بدن داشت (شکل ۳). قبل از تنش شوری، مقدار کورتیزول کل بدن در تیمارهای نمک بالاتر از سایر تیمارها بود. پس از تنش، کورتیزول کل بدن در تمام تیمارها افزایش معنی‌دار یافت ولی تیمارهای پروبیوتیک کورتیزول کمتری از سایر تیمارها داشتند. زمان نمونه‌برداری و تیمارهای غذایی اثر معنی‌داری روی فعالیت سوپراکسید دیسموتاز کل بدن داشت. تیمارهای پروبیوتیکی فعالیت سوپراکسید



شکل ۳- میانگین (\pm خطای استاندارد) کورتیزول، سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز کل بدن در بچه‌ماهی کپور نارس تغذیه شده با جیره‌های 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 نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌ها در هر تیمار غذایی هستند.

۴ | بحث و نتیجه‌گیری

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 که ماهی 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 آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند. سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز دو آنزیم اصلی در سیستم آنتی‌اکسیدانی 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 هایپر تونیک، تعادل بیوشیمیایی غشای سلولی در اثر تنش شوری مختل می‌شود که مقدار زیادی ملکول اکسیژنی واکشنگر (reactive oxygen species) تولید می‌کند که می‌تواند باعث بروز استرس اکسیداتیو شوند (Huang *et al.*, 2012). در این تحقیق، انتقال ماهی به آب لب‌شور باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن شد. در فزل آلای رنگین (Huang *et al.*, 2012) و تیلاپای نیل (Shukry *et al.*, 2021) نیز تنش شوری منجر به فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بروز استرس اکسیداتیو (افزایش مالون دی‌آلدهید) شده است. افزودن *B. subtilis* به جیره غذایی ماهی کپور دریایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی شد که با مطالعات قبلی روی ماهی‌های دیگر همخوانی دارد (Yin *et al.*, 2019; Tang *et al.*, 2018). یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که بچه‌ماهی نارس کپور دریایی توانایی طبیعی در تحمل انتقال مستقیم به آب دریای خزر را دارد و گنجاندن *B. subtilis* در جیره غذایی آنها باعث بهبود زنده‌مانی در شرایط تنش شوری نمی‌شود. با این حال، استفاده از این پروبیوتیک می‌تواند باعث کاهش استرس و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در 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 نارس کپور دریایی مفید نمی‌باشد.

پست الکترونیک نویسندگان

سید مرتضی حسینی: seyedmorteza.hoseini@gmail.com
 سید حسن حسینی‌فر: hossein.hoseinifar@gmail.com
 ملیکا قلیچ‌پور: ml.ghelichpour@gmail.com
 عباسعلی آقائی‌مقدم: aghaeifishery@gmail.com

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 می‌تواند برای آنها کشنده باشد (Van *et al.*, 1993). اما با توجه به محدودیت منابع آبی در رودخانه‌ها 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 شوری‌های 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 به ترتیب 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، بچه‌ماهی‌های 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

- 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., Hosseini 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

behroozgharavy@yahoo.com

بهروز قره‌وی:

maghili272@gmail.com

سید محمود عقیلی:

isharifpour@yahoo.com

عیسی شریف‌پور:

jhafezieh@yahoo.com

محمود حافظیه:

m.r.faezi@ifro.ir

محمد رضا فایزی:

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 Society*, 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

- 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 (*Cyprinus 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 Nutrition*, 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 haghgi B., Farabi 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.
- 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.

- 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.، فایزی م.ر. اثر افزودن نمک و باکتری *Bacillus subtilis* به جیره غذایی بر پاسخ کورتیزول و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی بجه‌ماهی کپور دریایی *Cyprinus carpio* در مواجهه با تنش شوری. نشریه پژوهش‌های ماهی‌شناسی کاربردی دانشگاه گنبدکاووس. ۱۴۰۲، ۱-۹، ۱۱(۴).

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.

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 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 Nile carp.

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