

## بررسی اثر غنی‌سازی جیره با پروبیوتیک *Bacillus subtilis* (IS02) بر بقاء، شاخص‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی بچه ماهی نورس کپور دریایی، *Cyprinus carpio*، در مواجهه با تنش اسمزی

سید مرتضی حسینی<sup>۱</sup>، سید حسین حسینی فر<sup>۲\*</sup>، عیسی شریف پور<sup>۳</sup>، ملیکا قلیچ پور<sup>۴</sup>، عباسعلی آقایی مقدم<sup>۱</sup>، محمود حافظیه<sup>۳</sup>

۱ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، مرکز تحقیقات ذخایر آبزیان آبهای داخلی، گرگان

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

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

۴ گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

### چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر افزودن *Bacillus subtilis* (IS02) به جیره‌غذایی بر بقاء، شاخص‌های بیوشیمیایی و بافت‌شناسی بچه‌ماهی نورس کپور دریایی، *Cyprinus carpio*، در مواجهه با تنش شوری انجام شد. بچه‌ماهی کپور (میانگین ۱/۱ گرم) به مدت ۱۵ روز با جیره‌های غذایی حاوی صفر (شاهد)،  $2/5 \times 10^8$  (پرو-۸) و  $2/5 \times 10^9$  (پرو-۹) cfu/g پروبیوتیک تغذیه و سپس به طور مستقیم به آب لب‌شور منتقل و پس از ۳ و ۱۰ روز نمونه‌گیری شدند. بقاء در همه تیمارها بالای ۹۶ درصد بود. مقدار رطوبت و پتاسیم بدن تحت تاثیر زمان نمونه برداری بود به این ترتیب که مقدار رطوبت پس از تنش شوری به طور معنی‌داری کاهش یافت ولی مقدار پتاسیم به طور معنی‌داری افزایش یافت. سدیم بدن در تیمار پرو-۸ در خلال تنش تغییر معنی‌دار نداشت و تیمارهای پروبیوتیک مقدار کلراید کمتری نسبت به شاهد قبل و بعد از تنش شوری داشتند. افزودن پروبیوتیک به جیره باعث افزایش فعالیت گلوکاتایون ردوکتاز، گلوکاتایون پراکسیداز، و غلظت گلوکاتایون احیائی شد در حالی که غلظت مالون دی‌آلدهید را کاهش داد. پروبیوتیک باعث تجمع گلبول‌های سفید در بافت کلیه شد. آسیب بافتی چشمگیر و مهمی در مقایسه با شاهد در آبشش و کلیه بعد از تنش شوری مشاهده نشد. این تحقیق نشان می‌دهد که کپور دریایی نورس توانایی تحمل انتقال مستقیم به آب دریای خزر را بدون غنی‌سازی جیره با پروبیوتیک دارد. ولی، پروبیوتیک باعث تحریک ایمنی در کلیه، تقویت تنظیم یونی و افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در ماهی می‌شود که می‌تواند اثرات مفیدی در شرایط میدانی داشته باشد.

**کلید واژه‌ها:** تنظیم اسمزی، پروبیوتیک، گلوکاتایون، آبشش، کلیه

### نوع مقاله

#### مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۷

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷

\*نویسنده مسئول:

hoseinifar@gau.ac.ir

### مقدمه

ماهی کپور، *Cyprinus carpio*، نقش به‌سزایی در تامین پروتئین مورد نیاز کشور دارد و مردم به دلایل کیفیت گوشت و ذائقه غذایی از این ماهی استفاده می‌کنند. در سال‌های اخیر، صید این ماهی در دریای خزر کاهش زیادی داشته است به طوری‌که از بیش از ۲۸۰۰ تن در دهه ۸۰ به حدود ۱۲ تن در اواسط دهه ۹۰ رسیده است [۱]. سازمان شیلات ایران به منظور احیاء ذخایر کپور در دریای خزر، تولید بچه ماهی و رهاسازی به رودخانه‌های منتهی به دریا را به عنوان برنامه بازسازی ذخایر اجرا می‌نماید. به این ترتیب، سالانه میلیون‌ها قطعه بچه ماهی کپور به رودخانه‌های منتهی به خزر رهاسازی می‌شوند تا ذخایر این ماهیان افزایش یابد. در این راستا میزان رهاسازی بچه ماهی کپور از حدود ۵ میلیون قطعه در سال ۱۳۸۴ به حدود ۵۰ میلیون قطعه در سال ۱۳۹۵ رسیده است؛ اما در همین زمان مقدار صید در واحد تلاش از حدود ۵۰ تا نزدیک به صفر کاهش یافته است که نشان دهنده عدم کارایی کافی برنامه بازسازی ذخایر است [۱].

کم آب شدن رودخانه می‌تواند یکی از دلایل عدم موفقیت در بازسازی ذخایر ماهی کپور در دریای خزر باشد. مشاهدات مستقیم نشان داده‌اند که در زمان رهاسازی بچه ماهی‌های کپور، رودخانه‌های استان گلستان (استان اصلی بازسازی ذخایر کپور دریای خزر) اغلب کم آب هستند و در واقع آبی که در رودخانه‌ها وجود دارد، برگشت آب دریا بوده و شوری حدود ۱۳ گرم در لیتر دارد. به این ترتیب، بچه ماهی‌های کپور با تنش اسمزی

روبرو می‌شوند و مطالعات نشان داده‌اند چنین تنش‌ی برای آنها کشنده است [۲، ۳]. لذا ارائه راهکاری برای مقاوم‌سازی بچه ماهی‌های کپور می‌تواند کارایی برنامه بازسازی ذخایر را افزایش دهد. همچنین، در صورت مقاوم شدن بچه ماهی‌ها به تنش شوری، می‌توان آنها را به جای رودخانه مستقیماً به دریا رهاسازی نمود. این کار دارای مزایای دیگری نیز می‌باشد که از آن جمله می‌توان به فراوانی غذای طبیعی که باعث بهبود سیستم تنظیم اسمزی می‌شود [۴] و ثبات پارامترهای محیطی استرس‌زا (دما، آلاینده‌ها و ...) نسبت به رودخانه‌ها اشاره نمود.

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 [۵]. 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 [۶]. یکی از اثرات تنش اسمزی در ماهی‌ها، بروز استرس اکسیداتیو است. استرس اکسیداتیو با تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد در بدن ایجاد می‌شود که می‌تواند کشنده باشد. تحت تنش اسمزی، تعادل بیوشیمیایی غشای سلول‌ها بهم می‌خورد که باعث تولید مقادیر زیادی رادیکال آزاد می‌شود [۷]. 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 [۸]، ویتامین E [۹]، تورین [۱۰] و زردچوبه [۱۱] 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 روده ماهی، باعث افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی نیز می‌شوند [۱۲]. *Bacillus subtilis* یک کاندیدای پروبیوتیکی خوب در ارزی‌پروری محسوب می‌شود؛ زیرا این باکتری توانایی استفاده از منابع گوناگون کربن و نیتروژن جانوری و گیاهی را دارد و به همین دلیل در شرایط گوناگون زنده می‌ماند [۱۳]. این باکتری خواص ضد میکروبی داشته و مورد تایید FDA می‌باشد [۱۴] و اسپورهای این باکتری قابلیت تحمل شرایط نامساعد محیطی را دارند و توالی ژنتیکی آن به طور کامل به ثبت رسیده است [۱۵]. 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 [۱۶]. استفاده از اسپور *B. subtilis* به عنوان ادجوانت در واکسن ویرمی بهاره کپور منجر به کاهش تولید رادیکال‌های آزاد، بهبود فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و غلظت گلوکوتایون احیائی و کاهش استرس اکسیداتیو در شرایط برون تنی شده است [۱۷]. همچنین، مشخص شده است که سویه C-3102 می‌تواند باعث بهبود رشد و فلور میکروبی روده در ماهی کوی شود، اگرچه اثر بر مقاومت در برابر بیماری ندارد [۱۸]. بهبود رشد، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و کاهش پراکسیداسیون چربی در ماهی کاراس، *Carassius auratus*، تغذیه شده با جیره حاوی *B. subtilis* در شرایط نرمال [۱۹] یا تحت مسمومیت با سرب [۲۰] 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 [۲۱]. در ماهی کفشک زبانی، *Cynoglossus semilaevis*، نیز *B. subtilis* باعث بهبود شرایط آنتی‌اکسیدانی، افزایش گلوکوتایون احیائی و کاهش پراکسیداسیون چربی شده است [۲۲]. همچنین، این باکتری می‌تواند باعث بهبود عملکرد ماهی در آب شور نیز شود؛ به طوری‌که افزودن سویه E221 به جیره غذایی تیلاپپای نیل باعث بهبود رشد و فلور میکروبی در آب لب شور (شوری ۱۶ گرم در لیتر) شده است [۲۳].

سویه IS02 از *B. subtilis* در سال‌های اخیر در کشور تخلیص شده و به تولید تجاری رسیده است. این سویه به منظور زیست در آب شور جداسازی شده است و مشخص شده است که خواص آنتاگونیستی در برابر پاتوژن‌های آبزیان دارد [۲۴]. همچنین، افزودن این سویه به جیره غذایی منجر به افزایش رشد، بقاء، فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و مقاومت در برابر بیماری آبزیان دریایی مانند میگوی وانامی، *Litopenaeus vannamei* [۲۴، ۲۵]، و باس دریایی آسیایی، *Lates calcarifer* [۲۶]، پرورش یافته در آب‌های فوق شور (۴۴-۵۵ گرم در لیتر) می‌شود. اما اطلاعاتی در خصوص اثر آن در ماهی کپور و تحت تنش شوری وجود ندارد. لذا، ممکن است افزودن این پروبیوتیک به جیره غذایی ماهی کپور بتواند مقاومت این گونه به تنش شوری را افزایش داده و استرس اکسیداتیو ناشی از آن را کاهش دهد. بر این اساس، هدف این تحقیق بررسی اثر

افزودن پروبیوتیک تک سل به جیره غذایی کپور دریایی در یک دوره ۱۵ روزه بر تلفات، شاخص‌های بیوشیمیایی و بافت شناسی آبشش و کلیه بوده است.

## مواد و روش‌ها

تغذیه ماهی و مواجهه با آب لب‌شور

در این تحقیق از بچه ماهیان کپور دریایی با میانگین وزن ۱/۱ گرم استفاده شد. تعداد ۵۰۰ بچه ماهی از مرکز تکثیر ماهیان استخوانی سیجوال به مرکز تحقیقات ذخایر آب‌های داخلی منتقل شد. ماهی‌ها در یک مخزن ۱۰۰۰ لیتری متصل به سیستم هوادهی به مدت سه روز ذخیره‌سازی و سپس به ۹ آکواریوم ۴۵ لیتری منتقل شدند. در هر آکواریوم ۴۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی وارد شد و هوادهی از طریق پمپ هوای مرکزی انجام گرفت.

در این تحقیق ۳ جیره غذایی با افزودن صفر (شاهد)،  $10^8 \times 2/5$  (پرو-۸) و  $10^9 \times 2/5$  (پرو-۹) cfu/g پروبیوتیک آماده شد. پروبیوتیک مورد استفاده از شرکت تک ژن زیست تهیه شد. این محصول پروبیوتیکی با نام تجاری تک سل حاوی  $10^{11} \times 2/5$  cfu/g باکتری *B. subtilis* (سویه Inaquosorum IS02; GenBank: JN1.856456) است. خوراک پودری کپور ماهیان دانسو (شرکت مهدانه) به عنوان جیره غذایی شاهد استفاده شد. جیره شاهد به روش استاندارد [آزمایش شد ۲۷] 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. برای ساخت جیره‌های پرو-۸ و پرو-۹، به ترتیب ۱ و ۱۰ گرم از پروبیوتیک تک سل به هر کیلوگرم خوراک اضافه شد. سپس به هر کیلوگرم از این مخلوط، ۵۰۰ میلی لیتر ژلاتین ۲/۴ درصد اضافه شد تا حالت خمیر پیدا کند. خمیر به دست آمده توسط یک توری با اندازه چشمه یک میلی‌متر تبدیل به رشته و در برابر وزش باد پنکه خشک شد. مشخص شده است که باسیلوس‌ها می‌توانند در دوره‌های کوتاه نیز اثر مثبت روی ماهی داشته باشند [۲۸، ۲۹]؛ به همین دلیل دوره تغذیه ماهی‌ها 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، تغذیه ماهی‌ها به مدت یک روز قطع و سپس نمونه کل بدن ماهی از هر تیمار گرفته شد. پس از نمونه‌گیری، 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 لب‌شور انجام شد. در تمام طول دوره پرورش، شاخص‌های کیفی آب توسط دستگاه پرتابل دیجیتال (Hach multi-parameter checker, USA) ثبت شدند (اکسیژن =  $0.36 \pm 7.72$  میلی‌گرم بر لیتر، pH =  $7.81 \pm 0.11$ ، دما =  $25.32 \pm 0.24$  درجه سانتی‌گراد).

نگهداری نمونه‌ها و آزمایشات

در این تحقیق نمونه‌های جداگانه‌ای برای بررسی ساختار میکروسکوپی آبشش و کلیه، اندازه‌گیری یون‌های بدن، و اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی اکسیدانی بدن گرفته شد.

برای تهیه مقاطع بافتی، تعداد ۳ ماهی از آکواریوم تیمار قبل از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری نمونه‌گیری شدند. ابتدا ماهی‌ها کاملاً بیهوش شدند و سپس با قطع نخاع کشته شده و به صورت کامل در محلول بوئن قرار گرفتند. جهت انجام مراحل آنگیری و پارافینه کردن مقاطع بافتی، از دستگاه عمل‌آوری بافت (tissue processor) استفاده شد و نهایتاً نمونه‌ها در بلوک‌های پارافینی قرار گرفتند. سپس با استفاده از دستگاه میکروتوم دوار، برش‌هایی با ضخامت ۵ میکرومتر تهیه و پس از قرار گرفتن برش‌ها بر روی لام، با استفاده از رنگ اتوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی 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 با میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse 50i, NY 11747-3064, USA) مورد مطالعه قرار گرفتند [۳۰].

برای اندازه‌گیری میزان رطوبت کل بدن، تعداد ۳ ماهی از هر آکواریوم پس از قطع نخاع وزن شده و بعد در آون (۱۰۵ درجه به مدت ۲۴ ساعت) خشک شدند [۲۷] تا میزان از دست رفتن آب بدن در آب دریا به دست آید [۳۱]. پس از ثبت رطوبت بدن، ماهی‌های خشک شده برای اندازه‌گیری یون‌های بدن استفاده شدند [۳۲]. نمونه‌ها در اسید نیتریک یک مولار (به نسبت ۱ به ۴) هضم شدند. اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم در نمونه‌ها به روش فلیم فتومتری انجام و اندازه‌گیری یون کلر به روش ترسیب جیوه انجام شد [۳۳، ۳۴].

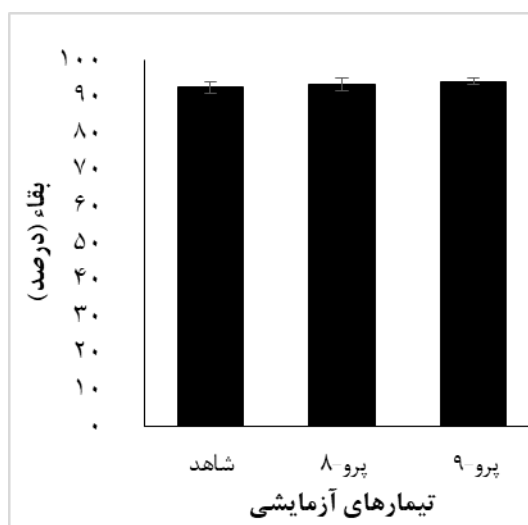
به منظور اندازه‌گیری شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، از هر آکواریوم ۳ ماهی نمونه‌گیری شد. نمونه‌های ماهی بلافاصله پس از صید در نیتروژن مایع منجمد شده و سپس توسط هاون چینی هموژن شدند. پس از هموژن سازی، بافر فسفات سرد با pH ۷ به میزان ۵ برابر وزن ماهی به آنها اضافه [۳۵] و بعد سانتریفیوژ شدند (۱۵ دقیقه، دمای ۴ درجه‌سانتی گراد، دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه). قسمت رویی نمونه در لوله‌های مجزا جمع‌آوری شده و برای اندازه‌گیری گلوتاتیون ردوکتاز، گلوتاتیون پرکسیداز، گلوتاتیون احیائی و مالون دی‌آلدهید استفاده شدند. اندازه‌گیری پارامترهای آنتی‌اکسیدانی با استفاده از کیت‌های زل بایو (آلمان) و دستگاه میکروپلیت ریدر انجام شد [۶].

### تجزیه و تحلیل آماری

ابتدا داده‌ها از نظر پراکنش نرمال و همگن بودن واریانس توسط آزمون‌های شاپیرو-ویلک و لون بررسی شدند. پس از تایید 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 × تیمار غذایی (در صورت معنی‌دار شدن برهمکنش) توسط آزمون LSD انجام شد. معنی‌داری در سطح ۰/۰۵ بررسی شد و کلیه آنالیزها در SPSS v.22 انجام شدند. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد ارائه شدند.

### نتایج

بقاء بچه ماهی‌ها پس از ۱۰ روز مواجهه با آب لب‌شور اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی نداشت (شکل ۱). بقا در تیمار شاهد، پرو-۸ و پرو-۹ به ترتیب  $۱/۴۴ \pm ۰/۸۳$ ،  $۹۶/۷ \pm ۰/۸۳$  و  $۹۸/۷ \pm ۰/۸۳$  درصد بود.



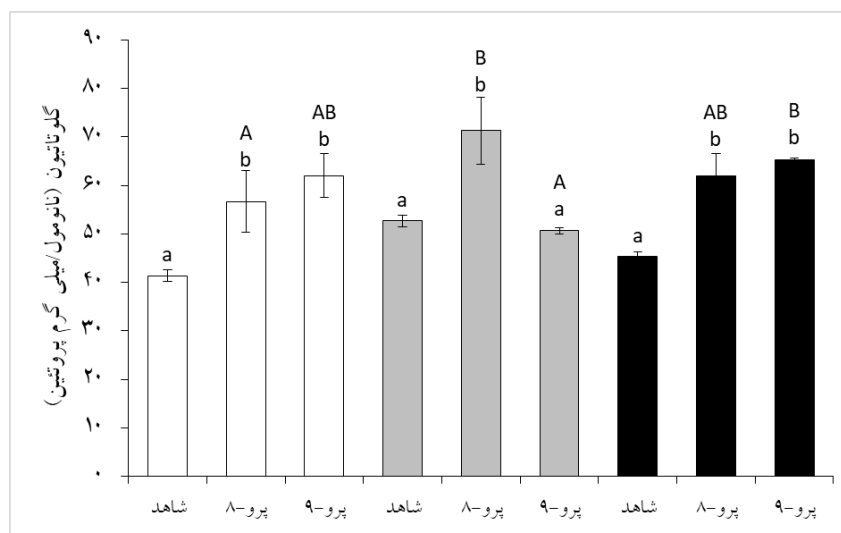
شکل ۱: بقاء بچه ماهی کپور پس از ۱۰ روز مواجهه با آب لب‌شور

جیره غذایی اثر معنی‌داری بر مقدار مقدار مالون دی آلدئید و فعالیت گلوکوتاتیون ردوکتاز بدن داشت. مقدار مالون دی آلدئید بدن در تیمارهای پروبیوتیک مشابه و به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود. همچنین تیمارهای پروبیوتیک دارای فعالیت گلوکوتاتیون ردوکتاز مشابه بوده که به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود (جدول ۱). زمان نمونه برداری نیز اثر معنی‌داری بر این شاخص‌ها داشت به طوری‌که مقدار مالون دی آلدئید و فعالیت گلوکوتاتیون ردوکتاز بعد از ۳ روز تنش شوری افزایش یافت و پس از ۱۰ روز مجدداً به مقادیر قبل از تنش بازگشت (جدول ۱). مقدار رطوبت و پتاسیم بدن تنها تحت تاثیر زمان نمونه برداری بود به این ترتیب که مقدار رطوبت پس از تنش شوری به طور معنی‌داری کاهش یافت در حالیکه مقدار پتاسیم به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۱). پروبیوتیک جیره و زمان نمونه برداری اثر برهمکنشی معنی‌داری روی مقدار گلوکوتاتیون، سدیم و کلراید و فعالیت گلوکوتاتیون پراکسیداز بدن داشتند (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج آنالیز واریانس اندازه‌گیری مکرر ( $P$ -value) در تیمارهای شاهد و پروبیوتیک. حروف انگلیسی متفاوت، نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است.

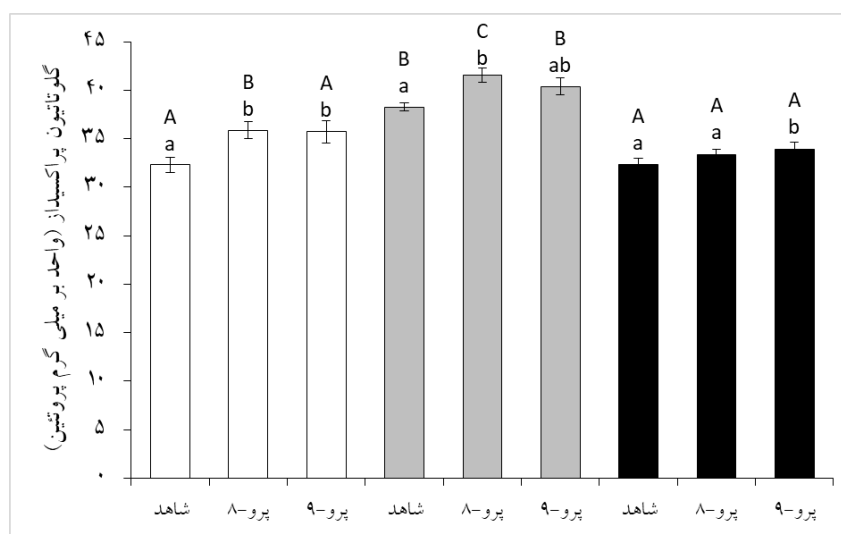
پروبیوتیک × زمان	زمان	پروبیوتیک	
۰/۰۲۴	۰/۲۸۷	۰/۰۰۳	گلوکوتاتیون
۰/۲۴۷	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	مالون دی آلدئید
	قبل از تنش <sup>a</sup> ، ۳ روز <sup>b</sup> ، ۱۰ روز <sup>a</sup>	شاهد <sup>b</sup> ، پرو- <sup>a</sup> ۸، پرو- <sup>a</sup> ۹	
۰/۵۷۰	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	گلوکوتاتیون ردوکتاز
	قبل از تنش <sup>a</sup> ، ۳ روز <sup>b</sup> ، ۱۰ روز <sup>a</sup>	شاهد <sup>a</sup> ، پرو- <sup>b</sup> ۸، پرو- <sup>b</sup> ۹	
۰/۰۲۸	<۰/۰۰۱	۰/۷۱۸	گلوکوتاتیون پراکسیداز
۰/۰۰۶	<۰/۰۰۱	۰/۰۰۲	سدیم
۰/۷۱۴	۰/۰۰۲	۰/۶۸۴	پتاسیم
	قبل از تنش <sup>a</sup> ، ۳ روز <sup>b</sup> ، ۱۰ روز <sup>b</sup>		
۰/۰۰۴	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	کلراید
۰/۹۱۰	۰/۰۱۸	۰/۲۲۸	رطوبت
	قبل از تنش <sup>a</sup> ، ۳ روز <sup>b</sup> ، ۱۰ روز <sup>a</sup>		

مقدار گلوکوتاتیون بدن در تیمارهای پروبیوتیک قبل از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری مشابه هم و به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. مقدار گلوکوتاتیون در تیمار پرو-۸ پس از ۳ روز بعد از تنش شوری، به طور معنی‌داری بالاتر از دو تیمار دیگر بود (شکل ۲).



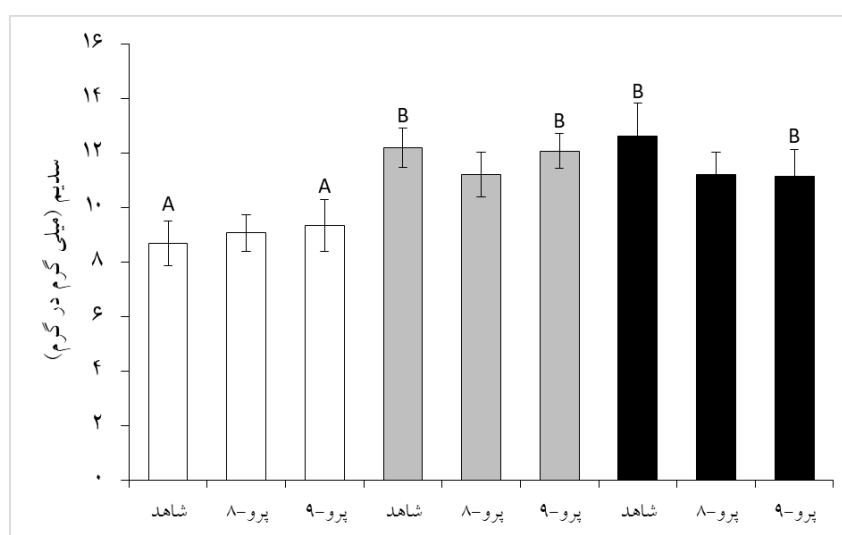
شکل ۲: میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) مقدار گلوکز کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک، میله‌های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح پروبیوتیک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

فعالیت گلوکز پراکسیداز در تیمارهای پروبیوتیک قبل از تنش شوری مشابه هم و به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. فعالیت این آنزیم پس از ۳ و ۱۰ روز تنش شوری به ترتیب در تیمار پرو-۸ و پرو-۹ به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. فعالیت این آنزیم در تیمارهای مختلف پس از ۳ روز تنش شوری افزایش معنی‌دار یافت و پس از ۱۰ روز تنش مجدداً کاهش یافت (شکل ۳).



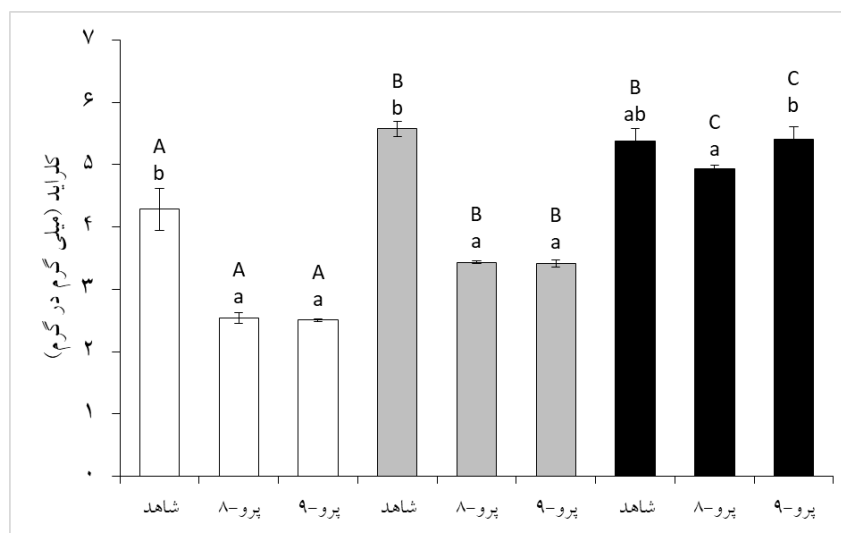
شکل ۳: میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) فعالیت گلوکاتایون پراکسیداز کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک. میله‌های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح پروبیوتیک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

مقدار سدیم بدن در تیمارهای مختلف غذایی اختلاف معنی‌داری با هم نداشت. تیمار شاهد و پرو-۹ دارای میزان سدیم بالاتری پس از تنش شوری نسبت به قبل از تنش بودند؛ درحالی‌که تیمار پرو-۸ تغییری در میزان سدیم در طول تنش شوری نشان نداد (شکل ۴).



شکل ۴: میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) مقدار سدیم کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک. میله‌های 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 معنی‌دار بین زمان‌های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

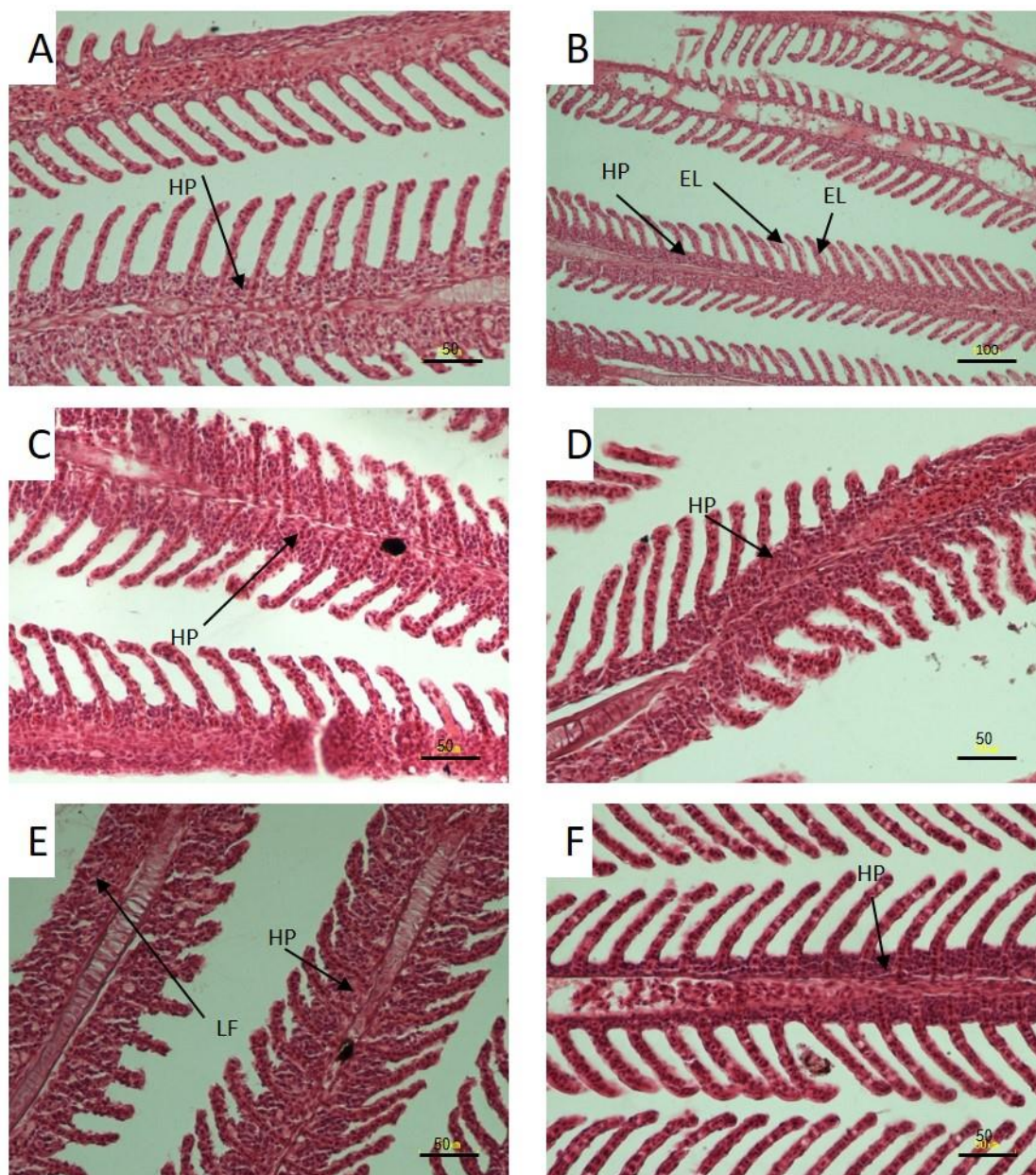
مقدار کلراید بدن در تیمارهای پروبیوتیک قبل از تنش شوری و ۳ روز بعد از آن به طور معنی‌داری کمتر از تیمار شاهد بود ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوتیک با تیمار شاهد ۱۰ روز پس از تنش شوری مشاهده نشد. در همه تیمارها مقدار کلراید بدن پس از تنش شوری افزایش معنی‌دار داشت (شکل ۵).



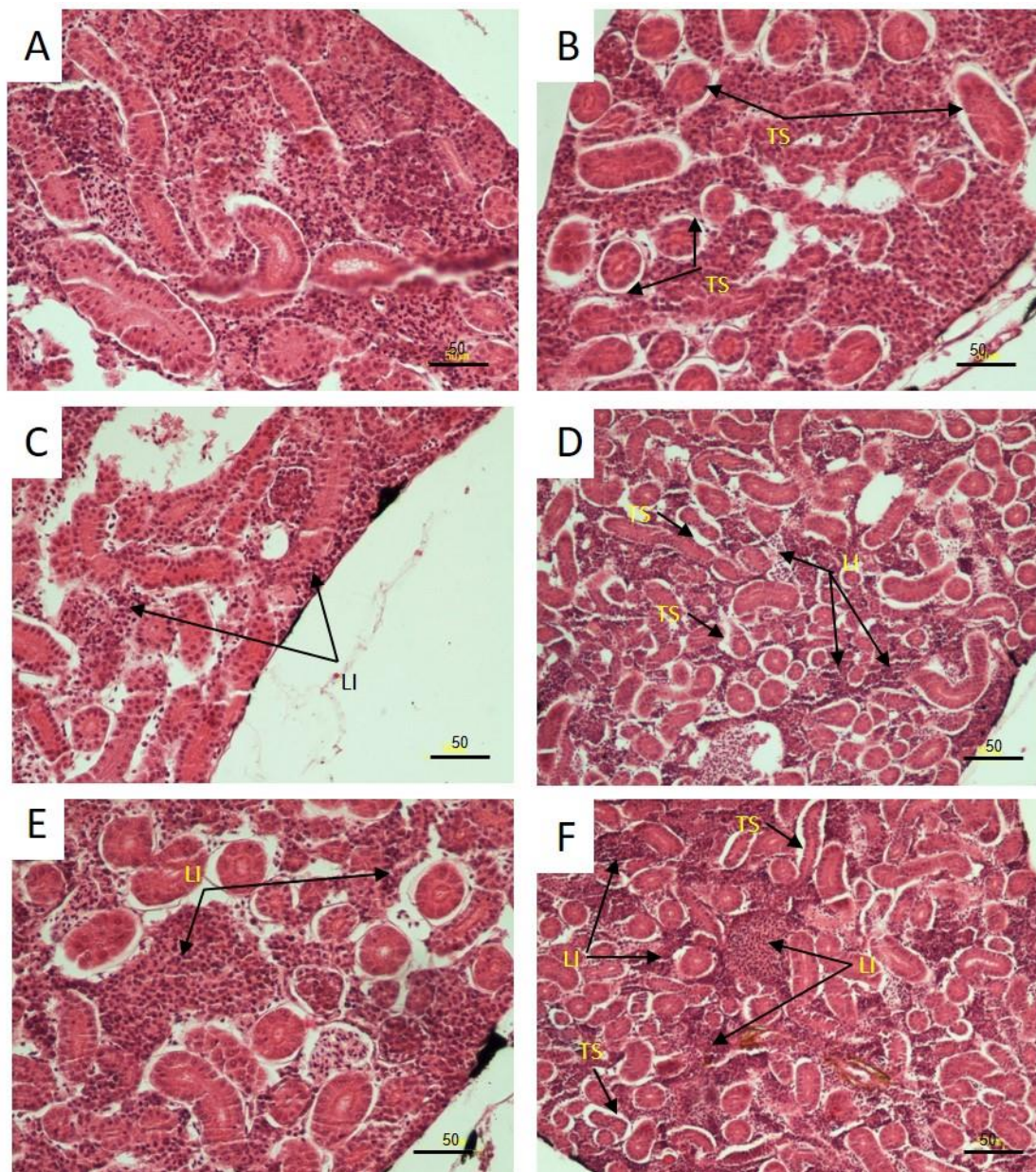
شکل ۵: میانگین ( $\pm$  خطای استاندارد) مقدار کلراید کل بدن در تیمارهای آزمایشی پروبیوتیک. میله‌های سفید، خاکستری و مشکی به ترتیب مربوط به نمونه گیری قبل از تنش شوری، ۳ روز بعد از تنش شوری و ۱۰ روز بعد از تنش شوری هستند. حروف انگلیسی کوچک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین سطوح پروبیوتیک در هر زمان نمونه گیری هستند. حروف انگلیسی بزرگ نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین زمان‌های نمونه گیری در هر تیمار پروبیوتیک هستند (تعداد تکرار = ۳)

بافت آبشش در تیمارهای مختلف در شکل ۶ نشان داده شده است. پیش از تنش شوری، در تیمار شاهد و پرو-۸ کمی هایپرپلازی مشاهده شد. در تیمار پرو-۹ تا حدودی هایپرتروفی و ادم در لاملای ثانویه مشاهده شد. بعد از تنش شوری، آبشش تیمار شاهد تا حدودی دچار ادم لاملا شده بود. تیمارهای پروبیوتیک نسبتاً سالم بودند. مقاطع بافتی کلیه در تیمارهای مختلف در شکل ۷ نشان داده شده‌اند. قبل از تنش شوری بافت کلیه در تیمار شاهد و پرو-۸ نسبتاً طبیعی بود. در تیمار پرو-۹ به مقدار کم نفوذ منطقه ای لنفوسیت‌ها در بافت بینابینی مشاهده شد. پس از تنش شوری، تیمار شاهد و پروبیوتیک کمی چروکیدگی در لوله‌های ادارای داشتند و تیمارهای پروبیوتیک کمی نفوذ منطقه‌ای لنفوسیت‌ها در بافت بینابینی نیز نشان دادند.





شکل ۶: 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، LF: چسبیدگی لاملا. شاخص مقیاس ۱۰۰ و ۵۰ میکرون (زیر عکسها) به ترتیب نشان دهنده بزرگنمایی ۱۰۰ و ۲۰۰ برابر هستند.



شکل ۷: 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.

### بحث

ماهیان استنوهالین توانایی تنظیم اسمزی سریع در مواجهه با محیط‌های دارای شوری‌های مختلف را ندارند [۳۶]. 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 [۳۷]. 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 [۴]. 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 که نشان می‌دهند احتمالاً عواملی 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 بر توانایی سازگاری ماهی کپور با آب شور موثر هستند. 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 [۲]. 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 [۳۸]. 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 [۳۹]. 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 [۴۰]. 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 [۳]. 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.

در این تحقیق تنش شوری باعث کاهش رطوبت و افزایش غلظت سدیم، کلراید و پتاسیم کل بدن شد که نشان می‌دهد ماهی تا حدودی دهیدراته شده است که با مطالعه قبلی روی این گونه در مواجهه با کلرید سدیم همخوانی دارد [۳۷]. بر اساس مطالعات انجام شده مشخص شده است که غلظت یون‌های ماهی کپور در مواجهه با محیط هایپر اسمتیک، افزایش می‌یابد [۳۷، ۴۰] 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 [۴۱-۴۴]. در این تحقیق افزودن پروبیوتیک به جیره تا حدودی تغییرات سدیم و کلراید را پس از تنش شوری کاهش داد که می‌تواند نشانه بهبود تنظیم 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.

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 [۵]. وجود آسیب در آبشش ماهیان قبل از تنش شوری می‌تواند 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 لب‌شور کاهش یافتند و می‌تواند به دلیل نقش درمان‌کنندگی آب لب‌شور باشد که در متون مختلفی به آن استناد شده است (Noga, 2010). 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. مثلاً برخی مطالعات نشان داده‌اند که غنی‌سازی جیره با *B. subtilis* [۴۵] یا سایر پروبیوتیک‌ها [۴۶، ۴۷] 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 [۴۸، ۴۹].

در این تحقیق اثر شوری بر بافت شناسی کلیه مشهودتر از آبشش بود. پروکیدیگی لوله‌های ادراری یکی از نشانه‌های تنش اسمزی و دهیدراته شدن است [۵۰] 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، منیزیم و سولفات در آن بیشتر است [۵۱]. با توجه به اینکه تنظیم سدیم و کلراید در آبشش صورت می‌گیرد و تنظیم یون‌های دو ظرفیتی بیشتر در کلیه صورت می‌گیرد [۵، ۵۲]، 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 [۵۳]؛ 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 [۵۴-۵۶].

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های اکسیداتیو دارند. گلوکاتاتیون یک ملکول آنتی‌اکسیدانی است که ضمن داشتن نقش روبش رادیکال آزاد، به عنوان کو-فاکتور در عملکرد آنزیم گلوکاتاتیون پراکسیداز نقش دارد [۵۷]. گلوکاتاتیون پراکسیداز مسئول خنثی‌سازی پراکسید هیدروژن و سایر هیدروپراکسیدها است و در خلال فعالیت این آنزیم گلوکاتاتیون اکسید می‌شود که این شکل از گلوکاتاتیون از نظر زیستی فعالیت ندارد [۵۸]. گلوکاتاتیون ردوکتاز مسئول احیاء گلوکاتاتیون اکسید شده است [۵۹]. پس از انتقال ماهی به محیط هایپر تونیک، تعادل بیوشیمیایی غشای سلولی در اثر تنش شوری مختل می‌شود که مقدار زیادی ملکول اکسیژنی واکنشگر (reactive oxygen species) تولید می‌کند که می‌تواند باعث بروز استرس اکسیداتیو شوند [۷]. در این تحقیق، انتقال ماهی به آب لب‌شور باعث افزایش فعالیت گلوکاتاتیون پراکسیداز و گلوکاتاتیون ردوکتاز و غلظت گلوکاتاتیون و مالون دی‌آلدئید شد. در قزل‌آلای رنگین‌کمان [۷] و تیلاپیای نیل [۴۳] نیز تنش شوری منجر به فعال شدن آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و بروز استرس اکسیداتیو (افزایش مالون دی‌آلدئید) شده است. افزودن پروبیوتیک تک سل به جیره غذایی ماهی کپور دریایی باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، محتوای گلوکاتاتیون احیائی و کاهش مالون دی‌آلدئید شد که با مطالعات قبلی روی ماهی‌های دیگر همخوانی دارد [۱۶، ۱۷، ۱۹-۲۲]. چنین نتایجی نشان دهنده تحریک قدرت آنتی‌اکسیدانی وابسته به گلوکاتاتیون توسط *B. subtilis* است. مکانیسم دقیق این اثر مثبت *B. subtilis* مشخص نیست ولی می‌تواند به دلیل تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی تیولی مانند سیستئین، باسیلیتول و تیوردوکسین توسط این گونه باشد [۶۰] که شرایط احیائی بدن ماهی را بهبود داده و سهم گلوکاتاتیون احیائی از کل گلوکاتاتیون را افزایش می‌دهد.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بچه ماهی نارس کپور دریایی توانایی ذاتی تحمل انتقال مستقیم به آب دریای خزر را دارد و 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 آنتی‌اکسیدانی 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.

## منابع:

- Bandani G, Larijani M, Frazli H, Daryanabard G. Analyzing the trend of catch rate and reconstruction of carp and roach in the Iranian waters of Caspian Sea. Utilization and cultivation of aquatics. 2020;9(2):45-56.
- Gholami F, Tajari M, Yosef NS, Shahkar E, Kolangi Miandare H, Azimi A. Examination of some biochemical factors of blood serum in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings at different levels of salinity. Journal of Fisheries. 2013;7:37-44 (In Persian).
- Hoseini SM, Hosseini SA. Effect of dietary l-tryptophan on osmotic stress tolerance in common carp, *Cyprinus carpio*, juveniles. Fish Physiol Biochem. 2010;36(4):1061-7.
- Mohiseni M, Banaee M, Nematdust haghgi B, Farabi SMV. Effects of feed deprivation on chloride cell development in kuttum fish (*Rutilus frisii kuttum*) during sea water challenge. Journal of aquatic ecology. 2016;5(4):88-97.

5. Baldisserotto B. Fish osmoregulation: CRC Press; 2019.
6. Ghelichpour M, Taheri Mirghaed A, Zargar A. The response of lufenuron- and flonicamid-exposed *Cyprinus carpio* to saltwater challenge: Study on ion-regulation and stress genes expression and plasma antioxidant characteristics. *Aquac Res.* 2020;51(12):4829-37.
7. Huang M, Yang X, Zhou Y, Ge J, Davis DA, Dong Y, et al. 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.* 2021:1-14.
8. Caxico Vieira CAS, Vieira JS, Bastos MS, Zancanela V, Barbosa LT, Gasparino E, et al. 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.* 2018;81(1-3):20-30.
9. Jalali MA, Hosseini SA, Imanpour MR. Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid-enriched *Artemia urmiana* on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae. *Aquac Res.* 2008;39(12):1286-91.
10. Abdel-Tawwab M, Monier MN. 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.* 2018;44(2):639-49.
11. Moghadam H, Sourinejad I, Johari SA. Dietary turmeric, curcumin and nanoencapsulated curcumin can differently fight against salinity stress in Pacific white shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Aquac Res.* 2022;53(8):3127-39.
12. Hoseinifar SH, Yousefi S, Van Doan H, Ashouri G, Gioacchini G, Maradonna F, et al. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. *Reviews in fisheries science & aquaculture.* 2021;29(2):198-217.
13. Gu Y, Xu X, Wu Y, Niu T, Liu Y, Li J, et al. Advances and prospects of *Bacillus subtilis* cellular factories: from rational design to industrial applications. *Metabolic engineering.* 2018;50:109-21.
14. Olmos J, Acosta M, Mendoza G, Pitones V. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Arch Microbiol.* 2020;202:427-35.
15. Nicholson W. 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; 2004. p. 1-15.
16. Wang L, Ge C, Wang J, Dai J, Zhang P, Li Y. Effects of different combinations of *Bacillus* on immunity and antioxidant activities in common carp. *Aquac Int.* 2017;25(6):2091-9.
17. Liu J, Cheng Y, Lu Y, Xia C, Wang N, Li Y. *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). *Aquac Res.* 2021;52(10):4648-60.
18. He S, Liu W, Zhou Z, Mao W, Ren P. Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture research & development.* 2011;1:S1:005.
19. Cao H, Yu R, Zhang Y, Hu B, Jian S, Wen C, et al. Effects of dietary supplementation with  $\beta$ -glucan and *Bacillus subtilis* on growth, fillet quality, immune capacity, and antioxidant status of Pengze crucian carp (*Carassius auratus* var. Pengze). *Aquaculture.* 2019;508:106-12.
20. Yin Y, Zhang P, Yue X, Du X, Li W, Yin Y, et al. Effect of sub-chronic exposure to lead (Pb) and *Bacillus subtilis* on *Carassius auratus gibelio*: Bioaccumulation, antioxidant responses and immune responses. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;161:755-62.
21. Tang Y, Han L, Chen X, Xie M, Kong W, Wu Z. Dietary supplementation of probiotic *Bacillus subtilis* affects antioxidant defenses and immune response in grass carp under *Aeromonas hydrophila* challenge. *Probiotics and antimicrobial proteins.* 2019;11(2):545-58.
22. Wang Y, Wang Q, Xing K, Jiang P, Wang J. Dietary cinnamaldehyde and *Bacillus subtilis* improve growth performance, digestive enzyme activity, and antioxidant capability and shape intestinal microbiota in tongue sole, *Cynoglossus semilaevis*. *Aquaculture.* 2021;531:735798.

23. Tang S, Liu S, Zhang J, Zhou L, Wang X, Zhao Q, et al. Relief of hypersaline stress in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by dietary supplementation of a host-derived *Bacillus subtilis* strain. *Aquaculture*. 2020;528:735542.
24. Mirbakhsh M, Ghaednia B, Tabatabaee Bafroee AS. 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. *Aquacult Nutr*. 2022;2022:2704224.
25. Mirbakhsh M, Mahjoub M, Afsharnasab M, Kakoolaki S, Sayyadi M, Hosseinzadeh S. 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. *Aquac Int*. 2021;29(6):2489-506.
26. Salehi M, Bagheri D, Sotoudeh E, Ghasemi A, Mozanzadeh MT. 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*. 2023;15(3):655-67.
27. AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA. 2005.
28. Reda RM, El-Hady MA, Selim KM, El-Sayed HM. Comparative study of three predominant gut *Bacillus* strains and a commercial *B. amyloliquefaciens* as probiotics on the performance of *Clarias gariepinus*. *Fish Shellfish Immunol*. 2018;80:416-25.
29. Eslamloo K, Akhavan SR, Henry MA. 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*. 2013;43(3):211-8.
30. Hoseini SM, Khosraviani K, Hosseinpour Delavar F, Arghideh M, Zavvar F, Hoseinifar SH, et al. Hepatic transcriptomic and histopathological responses of common carp, *Cyprinus carpio*, to copper and microplastic exposure. *Mar Pollut Bull*. 2022;175:113401.
31. Grant A, Gardner M, Hanson L, Farrell A, Brauner C. Early life stage salinity tolerance of wild and hatchery-reared juvenile pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. *J Fish Biol*. 2010;77(6):1282-92.
32. Grant A, Gardner M, Nendick L, Sackville M, Farrell A, Brauner C. Growth and ionoregulatory ontogeny of wild and hatchery-raised juvenile pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Can J Zool*. 2009;87(3):221-8.
33. EPA-METHOD. 9250 chloride (colorimetric, automated ferricyanide AAI. Available at: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/9250.pdf>. EPA. 2015.
34. Wu SM, Jong K, Kuo S. Effects of copper sulfate on ion balance and growth in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). *Arch Environ Contam Toxicol*. 2003;45:357-63.
35. Lionetto M, Caricato R, Giordano M, Pascariello M, Marinosci L, Schettino T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar Pollut Bull*. 2003;46(3):324-30.
36. Altinok I, Grizzle JM. Effects of low salinities on oxygen consumption of selected euryhaline and stenohaline freshwater fish. *J World Aquac Soc*. 2003;34(1):113-7.
37. Van der Linden A, Vanaudenhove M, Verhoye M, De Boeck G, Blust R. 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*. 1999;124(3):343-52.
38. Imanpoor MR, Roohi Z, Salaghi Z, Beyzadeh A, Davoudipoor A. 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*. 2015;4(3):17-28.
39. Roohi Z, Imanpoor MR, Jafari V, Taghizadeh V. 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*. 2017;4(1):48-55.
40. Hosseini SA, Hoseini SM. Effect of acute crowding stress on subsequent osmotic challenge and recovery in juvenile common carp *Cyprinus carpio* (Linnaeus). *Comp Clin Path*. 2012;21(5):583-8.

41. Hoseinifar SH, Roosta Z, Hajimoradloo A, Vakili F. 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 Immunol.* 2015;42(2):533-8.
42. Imanpoor MR, Roohi Z. 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.* 2015;15(4):917-22.
43. Shukry M, Abd El-Kader MF, Hendam BM, Dawood MAO, Farrag FA, Aboelenin SM, et al. 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.* 2021;11(6):1621.
44. Azimirad M, Meshkini S, Ahmadifard N, Hoseinifar SH. 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 Immunol.* 2016;54:516-22.
45. Lu Y, Zhang Y, Zhang P, Liu J, Wang B, Bu X, et al. Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on immune, antioxidant, and histopathological parameters of *Carassius auratus gibelio* juveniles exposed to acute saline-alkaline conditions. *Aquac Int.* 2022;30(5):2295-310.
46. Mohapatra S, Chakraborty T, Prusty AK, Kumar K, Pani Prasad K, Mohanta KN. Fenvalerate induced stress mitigation by dietary supplementation of multispecies probiotic mixture in a tropical freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). *Pestic Biochem Physiol.* 2012;104(1):28-37.
47. Tehrani F, Shirazi H, Kazempoor R. Effect of lethal exposure of lead acetate on histopathology of gills of probiotic-treated zebra fish (*Danio rerio*). *Journal of comparative pathobiology.* 2020;17(1):3033-44.
48. Pirarat N, Kobayashi T, Katagiri T, Maita M, Endo M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;113(3):339-47.
49. Bunnoy A, Na-Nakorn U, Srisapoom P. 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.* 2019;7(12):613.
50. Ali A, Azom MG, Sarker BS, Rani H, Alam MS, Islam MS. Repercussion of salinity on hematological parameters and tissue morphology of gill and kidney at early life of tilapia. *Aquaculture and fisheries.* 2022.
51. Tuzhilkin VS, Katunin DN, Nalbandov YR. Natural chemistry of Caspian Sea waters. In: Kostianoy AG, Kosarev AN, editors. *The Caspian Sea environment.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2005. p. 83-108.
52. Katoh F, Tresguerres M, Lee KM, Kaneko T, Aida K, Goss GG. Cloning of rainbow trout SLC26A1: involvement in renal sulfate secretion. *American journal of physiology-regulatory, integrative and comparative physiology.* 2006;290(5):R1468-R78.
53. Deng Q, Huttenlocher A. Leukocyte migration from a fish eye's view. *J Cell Sci.* 2012;125(17):3949-56.
54. Cerezuola R, Fumanal M, Tapia-Paniagua ST, Meseguer J, Moriñigo MÁ, Esteban MÁ. Histological alterations and microbial ecology of the intestine in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) fed dietary probiotics and microalgae. *Cell Tissue Res.* 2012;350(3):477-89.
55. Gisbert E, Castillo M, Skalli A, Andree KB, Badiola I. *Bacillus cereus* var. *toyoi* promotes growth, affects the histological organization and microbiota of the intestinal mucosa in rainbow trout fingerlings. *J Anim Sci.* 2013;91(6):2766-74.
56. Ramos MA, Gonçalves JFM, Costas B, Batista S, Lochmann R, Pires MA, et al. Commercial *Bacillus* probiotic supplementation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*): growth, immune responses and intestinal morphology. *Aquac Res.* 2017;48(5):2538-49.
57. Xie S, Tian L, Niu J, Liang G, Liu Y. Effect of N-acetyl cysteine and glycine supplementation on growth performance, glutathione synthesis, and antioxidative ability of grass carp, *Ctenopharyngodon idella*. *Fish Physiol Biochem.* 2017;43(4):1011-20.
58. Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, et al. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem.* 2001;47(8):1467-9.

59. Galano A, Alvarez-Idaboy JR. Glutathione: mechanism and kinetics of its non-enzymatic defense action against free radicals. *Rsc Advances*. 2011;1(9):1763-71.

60. Tossounian M-A, Baczynska M, Dalton W, Peak-Chew SY, Undzenas K, Korza G, et al. *Bacillus subtilis* YtpP and thioredoxin A are new players in the coenzyme-A-mediated defense mechanism against cellular stress. *Antioxidants*. 2023;12(4):938.



## The Effect of *Bacillus subtilis* (IS02) Supplementation in the Diet of Juvenile Wild Common Carp, *Cyprinus carpio*, on Survival, Antioxidant and Ionic Characteristics, and Tissue Histology under Sudden Salinity Stress

Seyyed Morteza Hoseini<sup>1</sup>, Seyed Hossein Hoseinifar<sup>2\*</sup>, Isa Sharifpour<sup>3</sup>, Melika Ghelichpour<sup>4</sup>, Abbasali Aghaei Moghaddam<sup>1</sup>, Mahmoud Hafezieh<sup>3</sup>

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

2 Department 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

4 Department of Aquatic Animal Health and Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

### ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of adding *Bacillus subtilis* (IS02) to the diet on survival, biochemical indices, and histological alternations of juvenile wild common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to salinity stress. Juvenile common carp (about 1.1 g) were fed diets containing 0 (control),  $2.5 \times 10^8$  (pro-8), and  $2.5 \times 10^9$  (pro-9) cfu/g probiotic for 15 days and then transferred directly to brackish water (13 g/L) and sampled after 3 and 10 days. Diet and sampling time had no significant effect on fish survival, which was above 96% in all treatments. Body moisture and potassium were only affected by sampling time, with moisture decreasing significantly after salinity stress while potassium increased significantly. Whole body sodium in pro-8 treatment did not change significantly during salinity stress, and probiotic treatments had lower chloride levels than the control before and after salinity stress. Adding probiotic to the diet increased glutathione reductase, glutathione peroxidase activity, and reduced glutathione concentration, while decreasing malondialdehyde concentration. Probiotics caused white blood cells infiltration in the kidney tissue. No significant tissue damage was observed in the gill and kidney, compared to the control after salinity stress. This study shows that juvenile wild common carp can tolerate direct transfer to the Caspian Sea without dietary probiotic supplementation. However, probiotic stimulates the kidney immunity, enhances ionoregulation, and increase antioxidant capacity in fish, which can have beneficial effects under field conditions.

**KEYWORDS:** Osmoregulation, Probiotic, Glutathione, Gill, kidney

### ARTICLE TYPE

Original Research

### ARTICLE HISTORY

Received: 22 June 2023

Accepted: 23 July 2023

ePublished: 23 Aug 2023

\* Corresponding Author:

Email address: hoseinifar@gau.ac.ir

Tel:

© Published by Tarbiat Modares University

ISSN: 2322-5513