

## اثر مکمل نمک در جیره غذایی بر تغییر بافت‌های آبشش و کلیه بچه ماهی سفید *Rutilus kutum*

سیدمحمدوحید فارابی<sup>۱\*</sup>، عباس متین‌فر<sup>۲</sup>، شهریار بهروزی<sup>۲</sup>، منصور شریفیان<sup>۲</sup>، محمود قانعی تهرانی<sup>۲</sup>

۱- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۶/۳

### چکیده

در این تحقیق از مکمل نمک در خوراک بچه‌ماهیان سفید (حدود یک گرم) در محیط آب شیرین به منظور تأثیر بر آبشش و کلیه برای تحریک سیستم تنظیم اسمزی استفاده گردید. هدف از این تحقیق، افزایش نرخ بقاء بچه ماهیان به هنگام رهاسازی به آب لب‌شور بود. میانگین وزن اولیه بچه ماهیان  $0.91 \pm 0.01$  گرم (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) بود. آزمایش در دو مرحله انجام شد. در مرحله یک بچه ماهیان به مدت ۱۵ روز در آب شیرین با غذای تجاری و مکمل نمک کلرید سدیم در ۴ تیمار (تیمار شاهد بدون مکمل نمک، ۵، ۷ و ۱۰ درصد) تغذیه شدند. هر تیمار شامل ۳ تکرار بود. در مرحله دو به آب لب‌شور دریای خزر (۱۲/۵ گرم در هزار) انتقال و به مدت ۲۸ روز با غذای تجاری بدون مکمل نمک تغذیه گردیدند. نتایج نشان داد که در تیمارهای مرحله یک تغییری در بافت کلیه مشاهده نشد. اما، اختلاف معنی داری بین اندازه گلو مروز و لوله های کلیوی بین دو محیط آب شیرین و لب‌شور (بین مرحله یک و دو) مشهود بود ( $P < 0.05$ ). در مرحله یک سلول‌های جانبی آماده تبدیل به سلول کلراید در آبشش در تیمارهای تغذیه شده با مکمل نمکی مشهود بود. در پایان مرحله دو تعداد سلول‌های کلراید آبشش در تیمار شاهد کمتر از تیمارهای تغذیه شده با مکمل نمک در مرحله یک بود ( $P < 0.05$ ). نتایج نشان داد که بچه‌ماهیان در تغذیه از مکمل ۵ درصد نمک کلرید سدیم در جیره غذایی در مقابل تیمارهای دیگر از نرخ بازماندگی بیشتری برخوردار بودند ( $P < 0.05$ ). بنابراین تغذیه ماهیان سفید انگشت قد در آب شیرین با سطوح پایین مکمل نمک در جیره غذایی سبب تحریک فیزیولوژی و مقاومت ماهی در برابر محیط آب شور می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** بچه‌ماهیان سفید، مکمل نمک، نرخ بازماندگی، آبشش، کلیه.

## مقدمه

ماهی سفید از گروه ماهیان رود کوچ بوده و جهت تکثیر به آب شیرین رودخانه مهاجرت می کند. از آنجا که رودخانه های کرانه جنوبی دریای خزر به واسطه تخریب زیستگاه و آلودگی، توان اکولوژیک لازم برای تامین بچه ماهیان سفید را ندارند (رضوی صیاد، ۱۳۷۴؛ کرباسی و همکاران، ۱۳۸۹؛ امینی رنجبر و هادیان، ۱۳۸۷؛ Emadi, 1979). لذا این ماهی در شرایط کنونی، نیازمند حفاظت گردید (عبدلی و نادری، ۱۳۸۷) و تکثیر مصنوعی به عنوان یکی از روش های حفظ شرایط موجود می باشد. سالانه میلیون ها قطعه بچه ماهی حاصل از تکثیر مصنوعی پس از پرورش اولیه به رودخانه های حوضه جنوبی دریای خزر رهاسازی می گردند (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۴). در سراسر دنیا نیز برنامه هایی برای تولید انبوه ماهیان وحشی در مراکز تکثیر و رهاسازی بچه ماهیان به محیط های طبیعی جهت افزایش میزان صید تجاری شکل گرفته است (Bell et al. 2006). یکی از عمده ترین مشکلات در بازسازی ذخایر ماهیان مربوط به تلفات بچه ماهیان در زمان رهاسازی از مراکز تکثیر به محیط های طبیعی است (Suboski and Templeton, 1989). زیرا بیشترین تلفات بچه ماهیان در هنگام ورود به محیط طبیعی اتفاق می افتد (Olla et al., 1998) و در این راستا بیشترین تلفات مربوط به چند روز اول و یا چند هفته اول، بعد از رهاسازی است (Howell, 1994). ضعف شرایط فیزیولوژی و سازگاری ماهیان حاصل از تکثیر مصنوعی به محیط جدید از مهمترین عوامل مرگ و میر بچه ماهیان در مراحل اولیه زندگی است (Munro and Bell, 1997). این عوامل ممکن است از نارسایی غذایی حاصل گردد، همانطور که محیسنی و

همکاران (۱۳۹۵) عدم موفقیت بچه ماهیان (نیم گرمی) گرسنه در سازش پذیری با آب لب شور دریای خزر را نشان دادند. زیرا ظرفیت سازش پذیری ماهیان استخوانی یوری هالین به تغییرات شوری محیط به محتوای انرژی بدن ماهی وابسته است (Sangiao-Alvarellos et al., 2005). شوری یکی از عوامل مهم در محیط زیست ماهیان محسوب می گردد و ماهیان در مهاجرت به همراه تغییر شوری محیط نیازمند مکانیسمی جهت سازگاری یا تنظیم اسمزی در شرایط جدید هستند (ستاری، ۱۳۸۱). اگرچه سیستم تنظیم اسمزی در ماهیان با کمک سلول های پوششی معده ای\_ روده ای<sup>۱</sup> و کلیه صورت می پذیرد، اما آبشش ها مهمترین مکان تبادل و تنظیم یون ها می باشند (Evans et al., 1999). تنظیم فشار اسمزی فرآیند پیچیده ای است که بطور همزمان سبب تغییرات بافتی، هورمونی، یونی، آنزیمی و متابولیتی موجودات آبرزی می شود و نتیجه این تغییرات در میزان تلفات ظاهر می گردد (Evans, 2002). یکی از روش های متداول در دنیا برای تحریک سیستم تنظیم اسمزی در بچه ماهیان قبل از انتقال به آب شور، تغذیه با استفاده از نمک در جیره غذایی است. بررسی Zaugg و همکاران (۱۹۸۳) نشان داد که در استفاده از جیره نمکی (۷٪ کلرید سدیم، ۵٪ کلرید سدیم و ۲٪ کلرید پتاسیم) در تغذیه بچه ماهیان (*Oncorhynchus tshawytscha*) Chinook salmon، به مدت ۲۸ روز، میزان فعالیت آنزیم  $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$  آبشش و میزان بقاء بچه ماهیان تغذیه شده با جیره نمکی در انتقال مستقیم از آب شیرین به آب دریا افزایش داشته است. Pellertier و Besner (۱۹۹۲) در تغذیه از جیره نمکی در ماهی Brook charr (*Salvelinus fontinalis*) نشان

<sup>۱</sup> Gastrointestinal epithelium

(۰، ۱، ۱/۵ و ۲ درصد) را بر رشد، بقاء و تغذیه عملی برای تعیین بازدهی غذا بر بچه ماهیان  $12/32 \pm 0/34$  گرمی گونه *Oreochromis shiranus* (Trewavas, 1941) در مدت ۹۰ روز مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد بیشترین بقاء در گروه بدون مکمل نمکی (۹۷/۷ درصد) و کمترین بقاء در گروه مکمل نمکی (۱٪) (۹۴/۸ درصد) بدست آمد. این مطالعه نشان داد که مکمل نمک کلرید سدیم می‌تواند رشد ماهی را ارتقاء ببخشد و از سوی دیگر مقادیر زیادتر مکمل نمکی کلرید سدیم (۲٪) سبب رشد منفی در این ماهی گردد.

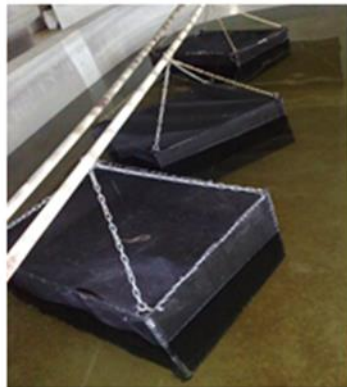
بنابراین، هدف از این پژوهش تحریک و فعال-سازی سیستم تنظیم اسمزی بچه ماهیان سفید با استفاده از نمک در جیره غذایی در آب شیرین در قبل از ورود به آب لب شور دریا بوده که سبب کاهش تلفات احتمالی آن‌ها هنگام رهاسازی به محیط طبیعی می-گردد.

### مواد و روش‌ها

بچه ماهیان از مجتمع تکثیر و پرورش شهید رجایی در فاصله ۱۵ کیلومتری شهرستان ساری در استان مازندران واقع در حوضه جنوبی دریای خزر با دامنه وزنی ۱۰۰۰-۸۰۰ میلی گرم تهیه و به پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال یافت. آب شیرین از رودخانه تجن و آب لب شور از دریای خزر تأمین گردید. جهت تأمین اکسیژن مورد نیاز محیط آزمایش از پمپ هواساز مرکزی استفاده گردید. طی دوره آزمایشات پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب (اکسیژن محلول، pH، دمای آب، شوری و یون آمونیوم) با استفاده از دستگاه دیجیتالی (Palintest مدل ۷۵۰۰)

دادند که ۸٪ و ۱۲٪ کلرید سدیم در جیره و تغذیه به-مدت ۶ هفته و همچنین نگهداری بچه ماهیان به مدت ۶ روز در آب لب شور سبب سازگاری بهتر و افزایش بقاء بچه ماهیان ۹۰-۲۵٪ در انتقال از آب شیرین به آب شور دریا شد. Perry و همکاران (۲۰۰۶) در استفاده از جیره نمکی در ماهی بعنوان فریب ماهی در آب شیرین نام بردند، که سبب می‌گردد تا ماهی اندام‌های مربوط به تنظیم اسمزی را فعال نماید. در بررسی پاتولوژی (TEM) و ایمنوهیستولوژی بافت آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نشان داد که درصد سطوح سلول‌های کلراید (MRC) و فعالیت آنزیم  $Na^+, K^+$  ATPase در تغذیه ماهیان با ۱۱٪ کلرید سدیم در جیره افزایش یافته است. در نتیجه گیری عنوان نمودند که جیره نمکی در محیط آب شیرین سبب آمادگی بچه ماهیان جهت آداپتاسیون با آب شور شده و ساختمان آبشش را تغییر می‌دهد. Santos و همکاران (۲۰۱۴) اثر مکمل نمک کلرید سدیم (۰، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد از وزن خشک جیره اصلی) را بر روی تغییرات بافت آبشش و تنظیم اسمزی بچه ماهی *Cobia* در آب لب-شور (۵ گرم در لیتر) مورد ارزیابی قرار دادند. بررسی آن‌ها نشان داد که فعالیت آنزیم  $Na^+, K^+$  ATPase در گروه بدون مکمل نمک بیشتر بود و در مقابل تعداد سلول‌های کلراید در گروه استفاده کننده از مکمل نمکی بیشتر بود، به طوری که در جیره مکمل ۱۰٪ نمک کلرید سدیم تعداد سلول به ۴۱ عدد در میلی متر مربع رسید، در صورتی که، در گروه بدون استفاده از مکمل نمک ۱۶ عدد در میلی متر مربع بود. این فرآیند سبب کاهش مصرف انرژی در جریان تنظیم اسمزی می‌گردد و بر رشد بچه ماهیان تأثیر گذار است. Mzengereza و Kang'ombe (۲۰۱۵) اثر مکمل نمک کلرید سدیم

آب در مخزن ۱۶ متر مربعی ۰/۵ لیتر در ثانیه و در شبانه روز حدود ۰/۱۲ آب مخزن تعویض گردید، زیرا به ازای هر ماهی حدود ۲۲ لیتر آب در مخزن موجود بود. هر تیمار آزمایشی شامل سه تکرار و در مرحله یک هر تکرار دارای ۶۰ قطعه بچه ماهی با تراکم یک قطعه بچه ماهی در دو لیتر آب و در مرحله دو به تعداد ۳۰ قطعه در هر قفس بود.



ساخت کشور انگلستان اندازه گیری شد. آزمایش ها در دو مرحله انجام شد. مرحله یک در مخازن مدور ۳۰۰ لیتری، محتوی ۱۲۰ لیتر آب شیرین و مرحله دو در قفس های شناور با حجم ۶۰ لیتر مستقر در مخازن ۱۶ متر مربعی با حجم آبیگری ۸۰۰۰ لیتر (۴×۴×۰/۵ متر) و آب لب شور دریای خزر انجام شد (شکل ۱). جریان آب در مخازن ۳۰۰ لیتری مدور، ۳ لیتر در دقیقه و در شبانه روز ۵۰ درصد آب آن ها تعویض گردید. جریان

شکل ۱: محیط آزمایش در آب شیرین (راست: وان های ۳۰۰ لیتری) و لب شور (چپ: قفس های ۶۰ لیتری در مخزن ۱۶ متر مربعی)

نگهداری و مورد ارزیابی قرار گرفتند (Zaugg *et al.*, 1983; Perry *et al.*, 2006; Mzengereza and Kang'ombe, 2015).

غذای پودری بچه ماهی سفید از غذای متداول مجتمع تکثیر شهید رجائی ساری که در کارخانه غذای دام و آبزیان واقع در شهرستان ساری تولید شده، استفاده گردید. حدود ترکیبات غذا شامل: رطوبت ۱۰ درصد، پروتئین خام<sup>۱</sup> ۳۷ درصد، چربی<sup>۲</sup> ۱۱ درصد، خاکستر<sup>۳</sup> ۱۲ درصد و ازت آزاد<sup>۴</sup> ۳۰ درصد و با انرژی ۳۳۰۰ کالری بر کیلوگرم<sup>۵</sup> بود.

در شروع آزمایش (مرحله یک) پس از انتقال و بیومتری اولیه، بچه ماهیان به مدت ۳ روز جهت پذیرش محیط جدید، نگهداری و غذادهی شدند. سپس ۲۴ ساعت قبل از معرفی بچه ماهیان به تیمارهای آزمایشی، غذادهی قطع گردید (McKenzi *et al.*, 1999).

در مرحله یک آزمایش بچه ماهیان در یک گروه وزنی (۸۰۰-۱۰۰۰ میلی گرم) و با تغذیه از چهار سطح مکمل نمک کلرید سدیم در جیره غذایی (۰، ۵، ۷ و ۱۰ درصد جیره پایه) در آب شیرین به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. در ادامه و در مرحله دو بچه ماهیان در چهار گروه فوق الذکر در آب لب شور دریای خزر (شوری ۲۱/۵±۱۲/۵ گرم در هزار) در مدت ۲۸ روز و با تغذیه از جیره پایه، جهت تعیین درصد بازماندگی

<sup>1</sup> Crude Protein

<sup>2</sup> EE (Eter Extract)

<sup>3</sup> Ash

<sup>4</sup> NFE(Nitrogen Free Extract)

<sup>5</sup> SFK

بچه ماهیان از خوراک در تیمارهای آزمایشی، نمک اضافی به درصد جیره پایه افزوده شد ( Mzengereza and Kang'ombe, 2015). غذادهی به نسبت ۴ درصد میانگین وزن بدن ماهیان در تیمار یک (شاهد و بدون استفاده از مکمل غذایی) و براساس وزن ماهی تعیین و در دو نوبت صبح و عصر غذادهی بچه ماهیان صورت گرفت (جدول ۱).

در مرحله دو بچه ماهیان در ابتدا به مخزن ۱۶ متر مربعی حاوی آب شیرین منتقل و بتدریج آب لب شور دریای خزر در طول ۴۸ ساعت افزوده و کاملاً جایگزین آب شیرین گردید (شکل ۱). سپس بچه ماهیان به مدت ۲۸ روز (مرحله دوم) با غذای پایه (بدون مکمل نمک) در آب لب شور دریای خزر نگهداری و تغذیه شدند (جدول ۱) و در پایان آزمایش درصد بازماندگی تیمارهای آزمایشی تعیین شد ( Ai et al., 2006).

جیره نمکی از طریق تهیه محلول نمک در آب و با استفاده از اسپری روی غذای خشک، آماده شد. پس از اسپری محلول نمک روی غذا، غذای حاوی نمک در آن ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد و سپس مورد استفاده قرار گرفت. بدین ترتیب جیره نمکی در سه نسبت (۵، ۷ و ۱۰ درصد) تهیه گردید.

در مرحله یک بچه ماهیان به مدت ۱۰ روز به تدریج با غذای آزمایشی (بدون نمک و با نمک) تغذیه شدند. به طوری که جهت حصول تیمارهای آزمایشی ۵٪ نمک: پنج روز غذای بدون نمک و از روز ششم تا دهم هر روز ۱٪ نمک به غذا اضافه گردید. بنابراین، در تیمار ۷٪ نمک: از روز چهارم و در تیمار ۱۰٪ نمک از روز اول تا روز دهم به میزان ۱٪ نمک اضافه شد. سپس از روز دهم به مدت ۵ روز تا روز پانزدهم بچه ماهیان با مکمل نمکی طبق درصدهای نهایی فوق تغذیه گردیدند. جهت کسب انرژی مساوی توسط

جدول ۱: معرفی بچه ماهیان سفید در دو مرحله آزمایش (آب شیرین و لب شور) در تیمارها

وزن اولیه (میلی گرم)	مراحل آزمایش	شوری آب محیط آزمایش	تغذیه تیمارها
۸۰۰-۱۰۰۰	مرحله یک	آب شیرین	تیمار ۱
			تیمار ۲
			تیمار ۳
			تیمار ۴
۱/۲۵±۰/۰۱	مرحله دو	آب لب شور	تیمار ۱
			تیمار ۲
			تیمار ۳
			تیمار ۴

در پایان مرحله یک و دو آزمایش جهت تهیه مقطع و بررسی بافت‌های آبخش و کلیه به تعداد ۱۰ قطعه بچه ماهی به صورت تصادفی از هر تیمار نمونه برداری به عمل آمد. نمونه به طور کامل<sup>۱</sup> در فرمالین بافر خنثی ۱۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و کاملاً تثبیت گردید (پوستی و مرادی، ۱۳۸۵؛ پوستی و مروستی، ۱۳۷۸). در ابتدا نمونه های تثبیت شده توسط دستگاه اتوتکنیکال (Shandon مدل ۱۰۰۰: Citadel ساخت انگلستان) آماده سازی و برای قالب گیری با پارافین آماده گردید. برش بافت با میکروتوم دوار (Shandon ساخت انگلستان) به ضخامت ۶ میکرومتر به عمل آمد و روی لام قرار داده شد. بعد از برش جهت ذوب شدن پارافین، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰-۵۴ درجه سانتی گراد به داخل آون (Memmert ساخت آلمان) انتقال داده شد. سپس به روش رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) مقاطع بافتی رنگ آمیزی و جهت بررسی های میکروسکوپی آماده گردید (پوستی و مرادی، ۱۳۸۵؛ Roberts, 2001؛ Bancroft and Gamble, 2002؛ از قسمت میانی کلیه مقطع بافتی تهیه شد. سپس سلول های آبخش و کلیه بچه ماهیان بر اساس بافت شناسی کاربردی (Young and Heath, 2000) و اطلس هیستوپاتولوژی ماهی (Takashima and Hibiya, 2001) مورد بررسی قرار گرفتند. قطر بزرگ گلو مرون بر حسب میکرومتر در برش های بافتی کلیه میانی بچه ماهیان در تیمارهای مختلف مرحله یک و دو آزمایش اندازه گیری شد (Charmi et al., 2009; Krayushkina et al., 1996; Cataldi et al., 1995). همچنین اندازه گیری قطر سلول های کلراید آبخشی

(بزرگترین قطر) در پایان مرحله یک و دو انجام شد. اندازه گیری پس از عکس برداری از مقاطع گرفته شده با استفاده از میکروسکوپ نوری در بزرگنمایی ۴۰۰ (۴۰×۱۰)، با استفاده از نرم افزار: KILONK Image (12.2.1.8) Measurement انجام شد. در این بررسی از طرح آماری کاملاً تصادفی متعادل (CRD<sup>۲</sup>) استفاده گردید و جهت ثبت اطلاعات و تعیین آمار توصیفی داده ها از نرم افزار Excel, 2010 و جهت تجزیه و تحلیل آماری داده ها از برنامه آماری Spss (Version.18) استفاده شد. درصد بازماندگی، اندازه و تعداد سلول های کلراید آبخش و اندازه گلو مرون کلیه تحت آزمون F مورد سنجش قرار گرفت. مقایسه میانگین پارامتر های مورد سنجش در تیمارهای آزمایشی پس از معنی دار بودن، از طریق آزمون دانکن<sup>۳</sup> و مقایسه مرحله یک و دو با استفاده از آزمون t در سطح پنج درصد صورت گرفت.

### نتایج

تلفات در بچه ماهیان سفید در تیمارهای آزمایشی مرحله یک (۱۵ روز اول) مشاهده نشد. نتایج نشان داد که بچه ماهیان سفید در استفاده از مکمل نمک در جیره غذایی به نسبت ۵، ۷ و ۱۰ درصد مقاوم بودند. در مرحله دو تلفات محدودی در تیمارهای آزمایشی طی ۲۸ روز دوره پرورش رخ داد. در نتیجه درصد بقاء بچه ماهیان در تیمارهای آزمایشی طی دوره آزمایش (یک و دو) به مدت ۴۳ روز به شرح شکل ۲ آمده است. نتایج نشان داد که بیشترین درصد بقاء در تیمار ۲ و کمترین درصد بقاء در تیمار ۴ بدست آمد (P<۰/۰۵) و سه تیمار ۱، ۲

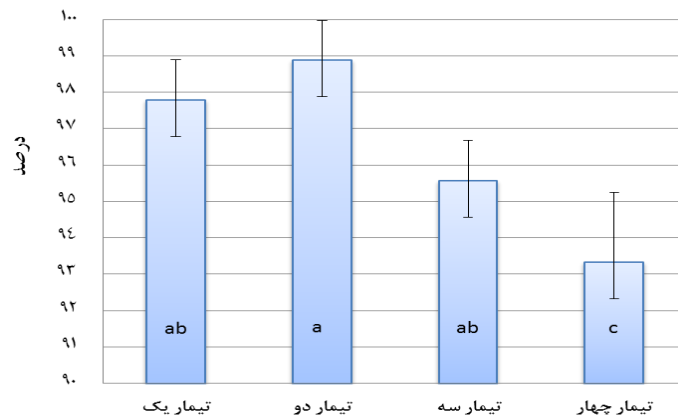
<sup>2</sup> Complete Random Design

<sup>3</sup> Duncan Test

<sup>1</sup> Whole - body

و ۳ دارای اختلاف معنی داری نبودند ( $P > 0.05$ ).

(شکل ۲).



شکل ۲. درصد بقاء بچه ماهیان سفید در پایان ۴۳ روز تغذیه با مکمل نمکی در آب شیرین و پرورش در آب لب شور بدون مکمل نمکی در تیمارهای آزمایشی (خطای استاندارد  $\pm$  میانگین)

(تیمار ۱: بدون مکمل نمکی در مرحله یک، تیمار ۲، ۳ و ۴: به ترتیب استفاده از مکمل نمکی در مرحله یک آزمایش به میزان ۵، ۷ و ۱۰ درصد جیره پایه، حروف لاتین نماینده اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد است)

آزمایش بین تیمارهای مختلف مشاهده نگردید و کلیه بچه ماهیان سفید تغییری با استفاده از جیره نمکی در این آزمایش نشان نداد، اما تفاوت‌هایی در اندازه گلو مریول-ها و فضای داخلی لوله‌های پروکسیمال و دیستال در مرحله دو آزمایش نسبت به مرحله یک در تمام تیمارهای آزمایشی مشاهده شد (جدول ۲)، (شکل ۳).

بررسی‌ها نشان داد که در بافت کلیه بچه ماهیان سفید در هر دو مرحله آزمایش با مکمل نمکی و بدون آن (شاهد)، اکثر فضای کلیوی را توپول‌های مزونفریک احاطه کرده‌اند. همچنین گلو مریول نیز در تیمارهای آزمایشی در دو مرحله مشاهده گردید. اما تفاوتی در مقاطع بافتی کلیه در مرحله یک و دو

جدول ۲: اندازه گلو مریول (بر حسب میکرومتر) در برش‌های قسمت میانی کلیه بچه ماهیان سفید در آب شیرین و لب شور

تیمارهای آزمایشی	آب شیرین			آب لب شور		
	حداقل	حداکثر	میانگین	حداقل	حداکثر	میانگین
یک	۳۲/۲	۴۳/۵	۳۶/۳ $\pm$ ۱/۲۳	۲۵/۴	۳۲/۴	۲۶/۹ $\pm$ ۰/۶۴
دو	۳۱/۵	۴۳/۳	۳۶/۱ $\pm$ ۱/۱۳	۲۵/۳	۳۲/۶	۲۶/۶ $\pm$ ۰/۶۹
سه	۳۱/۶	۴۲/۷	۳۶/۱ $\pm$ ۱/۰	۲۴/۴	۳۳/۷	۲۷/۱ $\pm$ ۰/۹۵
چهار	۳۱/۱	۴۲/۸	۳۶/۱ $\pm$ ۱/۰۳	۲۳/۹	۳۱/۳	۲۶/۵ $\pm$ ۰/۷۱

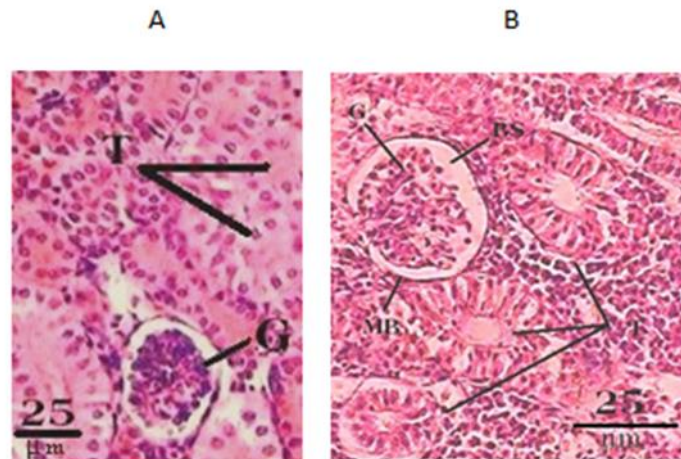
\* آب شیرین: تیمار یک بدون تغذیه از مکمل نمکی و تیمار دو، سه و چهار با استفاده از مکمل نمکی بترتیب به مقدار ۵، ۷ و ۱۰ درصد غذا به مدت ۱۵ روز، آب لب شور دریای خزر: تغذیه بدون مکمل نمکی به مدت ۲۸ روز

اندازه گلو مریول در مرحله یک (آب شیرین) و مرحله دو (آب لب شور) تحت آزمون t اختلاف معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد وجود داشت ( $P < 0.05$ ).

نتایج نشان داد که اختلاف معنی داری بین میانگین اندازه گلو مریول بافت کلیه در تیمارها در آب شیرین و همچنین در آب شور وجود نداشت ( $P > 0.05$ ). اما بین

آب لب شور نسبت به آب شیرین مشهود بود.

همچنین در هر چهار تیمار در مرحله دو آزمایش افزایش اندازه لوله‌های کلیه و فضای داخلی آن‌ها در



شکل ۳: مقطع میکروسکوپی بافت کلیه بچه ماهی سفید در آب شیرین (A: مرحله یک، ۱/۲۵ گرم) و پس از ۲۸ روز پرورش در آب لب شور دریای خزر با شوری ۱۲/۵ گرم در هزار (B: مرحله دو، ۲ گرم)

(تثیت شده در فرمالین و رنگ آمیزی به روش هماتوکسلین اتوزین، بزرگ نمائی ۴۰۰X)

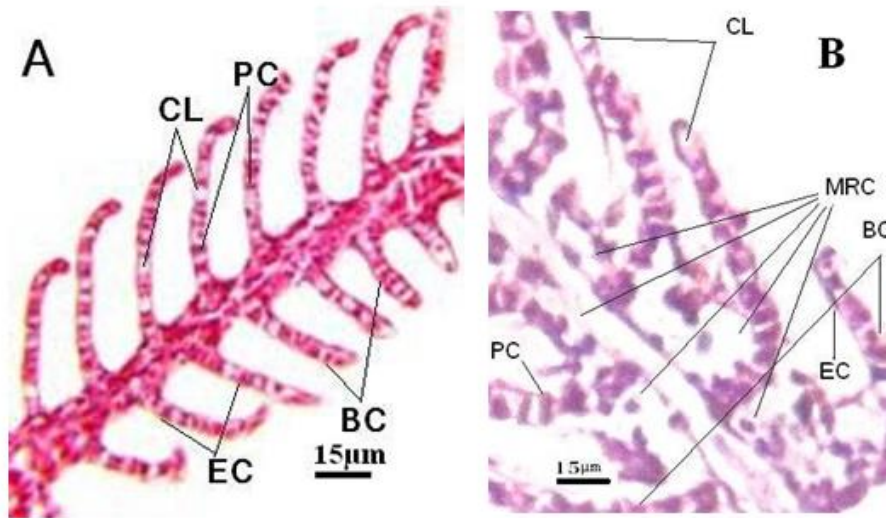
گلومرول (G: Glomerulus)، توبول (T: Tubules)، فضای بومن (BS: Bowmans Space)، جسم مالپیگی (MB: Malpighian Body)

دارای اختلاف معنی داری نبود ( $P > 0.05$ ). همچنین تعداد سلول‌های کلراید در گروه‌های تغذیه شده با مکمل نمکی (تیمارهای دو، سه و چهار) بیشتر بود، به طوری که میانگین تعداد سلول‌های کلراید در این گروه ۴۸۴۶ عدد در میلی متر مربع و در صورتی که در گروه شاهد ۳۵۰۰ عدد در میلی متر مربع بود. این فرآیند سبب تنظیم بهتر اسمزی در ماهیان می گردد (جدول ۴).

سلول‌های کلراید ( $MRC^1$ ) در بافت آبشش بچه ماهیان سفید در آب شیرین و لب شور، مشاهده گردید و تیغه‌های ثانویه غیرطبیعی در تیمارهای آزمایشی مشهود نبود. همچنین سلول‌های کلراید در بخش پایه تیغه‌های ثانویه مشاهده شدند (شکل ۴). در ماهیان تغذیه شده با مکمل نمکی در آب شیرین، در بافت آبشش برآمدگی‌هایی حاصل از سلول‌های آماده<sup>۲</sup> تبدیل به سلول‌های کلراید وجود داشت، به طوری که در تیمار چهار بزرگترین قطر برآمدگی و در تیمار یک کوچکترین قطر برآمدگی ( $P < 0.05$ ) مشاهده گردید و اندازه این برآمدگی‌ها در تیمارهای دو و سه نسبت به هم دارای اختلاف معنی داری نبودند ( $P > 0.05$ ). اندازه سلول کلراید در آب لب شور در تیمارهای مختلف

<sup>1</sup> MRC: Mitochondria-Rich Cells

<sup>2</sup> Accessory cells



شکل ۴: مقطع میکروسکوپی بافت آبشش بچه ماهی سفید (۲ گرمی) در آب شیرین (A) و لب شور (B) ۱۲/۵ گرم در هزار (رنگ آمیزی به روش هماتوکسیلین ائوزین)

سلول پیلار (PC: Pillar Cell)، سلول اپیتلیال (EC: Epithelial Cell)، سلول خونی (Blood Cell BC:)، سلول میتوکندری (MRC: Mitochondria-Rich Cell)، حفره باریک (CL: Capillary Lumen)

جدول ۳: اندازه و تعداد سلول و برآمدگی سلولی کلراید آبشش بچه ماهیان سفید در آب شیرین و آب لب شور (در آب شیرین تیمار یک بدون تغذیه از مکمل نمکی و تیمار دو، سه و چهار با استفاده از مکمل نمکی کلرید سدیم به ترتیب به مقدار ۵، ۷ و ۱۰ درصد غذا و تغذیه در آب لب شور بدون مکمل نمکی)

شرح	تیمارهای آزمایشی	آب شیرین (برآمدگی سلولی)	آب لب شور (سلول)
اندازه (میکرومتر)	یک	۵/۴۴±۰/۰۶ <sup>c</sup>	۸/۰۱±۰/۱۱ <sup>a</sup>
	دو	۶/۴۷±۰/۰۶ <sup>ab</sup>	۸/۰۵±۰/۱۰ <sup>a</sup>
	سه	۶/۵۶±۰/۰۶ <sup>ab</sup>	۸/۰۶±۰/۱۰ <sup>a</sup>
	چهار	۶/۸۴±۰/۰۷ <sup>a</sup>	۸/۰۷±۰/۱۰ <sup>a</sup>
تعداد (در میلی متر مربع)	یک	-	۳۵۰±۱۴۸ <sup>b</sup>
	دو	-	۴۸۶±۱۸۰ <sup>a</sup>
	سه	-	۴۸۰±۱۶۴ <sup>a</sup>
	چهار	-	۴۸۸±۱۶۶ <sup>a</sup>

\*حروف لاتین در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها تحت آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد

## بحث

به طور کلی، با ورود ماهی از آب شیرین به آب شور تغییراتی در سیستم تنظیم یونی-اسمزی ماهیان رود کوچ بوجود می آید. این فرآیند سبب تغییر حالت از هایپراسموتیک (در آب شیرین) به حالت هیپواسموتیک (در آب شور) در ماهی می گردد (Hwang *et al.*, 2007). همچنین در عرصه تعادل با محیط جدید، علاوه بر دخالت پیام‌های عصبی و هورمونی، ماهیان نیازمند تغییراتی در اندام‌های مختلف جهت سازش پذیری با محیط جدید هستند. این قابلیت‌ها به جنس، گونه، سن و اندازه (وزن و طول) هر ماهی بستگی دارد و در طی این فرآیند یون‌های سدیم، پتاسیم، کلسیم و منیزیم وارد بدن ماهی گشته و ماهی جهت بقا و حفظ تعادل نیازمند دفع آن از طریق آبشش (یون‌های تک ظرفیتی) و کلیه (یون‌های دو ظرفیتی) است. این مکانیسم مورد تأیید گزارشات علمی متعددی است (Svasand *et al.*, 2000; Sanchez-Lamadrid, 2002; Farabi *et al.*, 2007 and 2009).

اما آنچه در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت، استفاده از مکمل نمکی برای تحریک سیستم تنظیم یونی اسمزی برای آمادگی معرفی بچه‌ماهیان سفید از آب شیرین به آب لب‌شور دریای خزر بوده است که توسط Perry و همکاران (۲۰۰۶) از آن بعنوان فریب ماهی در آب شیرین نام بردند، بدین ترتیب که با این عمل ماهی اندام مربوط به تنظیم یونی-اسمزی خود را فعال نماید. آن‌ها نشان دادند که اندازه سلول کلراید آبشش و همچنین میزان فعالیت آنزیم  $\text{Na}^+ + \text{K}^+ - \text{ATPase}$  در تغذیه ماهیان با مکمل ۱۱٪ کلرید سدیم در جیره افزایش یافته است. این فرآیند توسط دانشمندان متعددی و با استفاده از درصدهای

مختلفی از مکمل نمکی در گونه‌های مختلف ماهی با اندازه‌های متفاوت مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج مشابهی در برداشته است. به طوری که مکمل نمکی در جیره غذایی ماهی در محیط آب شیرین سبب آمادگی بچه‌ماهیان جهت سازگاری با آب شور شده و ساختمان اندام‌های دخیل در تنظیم یونی-اسمزی را تغییر می‌دهد و بر کارایی رشد ماهی نیز مؤثر است (Applebaum and Jesuarockiaraj, 2009; Keshavanath *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014; Mzengereza and Kang'ombe, 2015).

ماهی سفید از جمله ماهیان رود کوچ است و بچه-ماهیان جهت ادامه زندگی مجبور به مهاجرت از آب شیرین، به آب لب‌شور دریای خزر هستند. یکی از سنجش‌های اصلی در سازش‌پذیری این بچه‌ماهیان به محیط جدید، آمادگی لازم برای پذیرش آب لب‌شور است. گزارشات علمی متعددی حاکی از پذیرش بهتر محیط آب شور با افزایش وزن بچه‌ماهی سفید وجود دارد (ایمانپور، ۱۳۸۴: عنایت غلامپور<sup>۱</sup> و همکاران، ۱۳۹۰: صیادبورانی، ۱۳۸۹: فارابی و همکاران، ۱۳۹۳: صیادبورانی و همکاران، ۱۳۹۳).

به طور کلی، سلول‌های کلراید آبششی در پاسخ به تغییرات شوری محیط تغییراتی در اندازه، تعداد، شکل و نحوه توزیع آن‌ها پدید آمده و به طور کلی توسعه پیدا نموده و به شکل قابل توجهی افزایش در تعداد و اندازه آن‌ها ایجاد می‌گردد (McCormick, 2001: Wang *et al.*, 2009).

ایمانپور (۱۳۸۴)، با بررسی تنش شوری روی بچه-ماهیان سفید ۵/۰ تا سه گرم و امیری و همکاران (۱۳۸۷) بر بچه‌ماهیان سفید یک گرمی در شوری‌های ۱۰ppt و کمتر از آن نشان دادند که توانایی سازگاری

<sup>۱</sup> Hosseini

(درصد بازماندگی بیش از ۹۵ درصد) و رشد خوبی برای بچه ماهیان در چنین شرایطی وجود دارد. البته ایمانپور (۱۳۸۴) نشان داد که با افزایش وزن از ۰/۵ تا ۳ گرم تعداد سلول‌های کلراید به طور معنی داری افزایش داشته است که به عبارتی با درصد بازماندگی بچه ماهیان و افزایش تعداد و قطر سلول‌های کلراید در مرحله دو آزمایش (آب لب شور) در این بررسی مطابقت دارد (جدول ۳).

اما بررسی های بافتی آبشش و کلیه در این تحقیق نشان داد که بچه ماهیان تحت تغذیه از مکمل نمک کلرید سدیم (مرحله یک) و تنش شوری آب (مرحله دو)، تغییراتی در ساختار آنها پدید آمد. بررسی های فارابی و همکاران (۱۳۹۳) نشان داد که برخی از بچه ماهیان سفید کمتر از یک گرم بخصوص در اوزان کمتر از ۰/۵ گرم در انتقال مستقیم از آب شیرین به آب لب شور دریای خزر به میزان بیشتری دچار تخریب بافت آبششی شدند. اما در این بررسی تخریب در بافت آبشش مشاهده نگردید. دلیل این موضوع ممکن است بواسطه معرفی بچه ماهیان بیش از ۱/۲۵ گرم به آب لب شور باشد که با مطالعات بهروزی و همکاران (۱۳۹۴) مطابقت دارد.

Daborn و همکاران (۲۰۰۱) نشان دادند که در زمان انتقال ماهی از آب شیرین به شور، سلول‌های کلراید آبششی از تمایز سلول‌های سنگفرشی ایجاد می شوند و پس از تماس با آب شور نرخ این تمایز افزایش یافته و با گذشت زمان تعداد سلول‌های کلراید آبششی افزایش می یابد. همچنین Foskett و همکاران (۱۹۸۱) نشان دادند که پس از گذشت چند روز مواجهه با آب شور، تعداد سلول‌های کلراید به حد ثابتی رسیده و از این پس نرخ افزایش در اندازه سلول

تسریع می گردد. در این بررسی با تغذیه تیمارهای ۲، ۳ و ۴ از مکمل نمک در مرحله یک آزمایش در محیط آب شیرین برآمدگی هایی در سلول‌های آماده تبدیل<sup>۱</sup> به سلول‌های کلراید بوجود آمد، که این پدیده در تیمار یک یا شاهد (بدون تغذیه از مکمل نمک) مشاهده نگردید. این برآمدگی در تیمار شماره چهار با درصد بالاتر (۱۰٪) تغذیه از مکمل نمکی مشهودتر بوده است (جدول ۳). اما اندازه این سلول‌ها پس از گذشت ۲۸ روز دوره پرورش در آب لب شور در چهار تیمار آزمایشی در پایان مرحله دو فاقد اختلاف معنی دار بود ( $P > 0.05$ ). به نظر می رسد که در این مدت بچه ماهیان سفید در تیمار شاهد توانایی لازم جهت تنظیم یونی-اسمزی را کسب نموده اند. این نتیجه با بررسی های محیسنی و همکاران (۱۳۹۵) بر بچه ماهی سفید مطابقت دارد. بررسی آنها نشان داد که بچه ماهی سفید در مواجهه با آب لب شور تا روز چهارم مواجهه با آب لب شور، افزایش تعداد سلول‌های کلراید آبششی در آنها مشهود است و پس از آن تا روز هفتم، به سطح نسبتاً ثابتی می رسند. همچنین نشان دادند که تعداد سلول‌های کلراید آبششی در ماهیان تغذیه شده تا روز چهارم مواجهه با آب لب شور بیشتر از ماهیانی بود که تا روز چهارم تغذیه نشدند. اطلاعات بدست آمده آنها با مطالعات Foskett و همکاران (۱۹۸۱) در بررسی میزان تمایز سلول‌های کلراید آبششی در ماهی سیچلید (*Sarothodon mossambicus*) در زمان تطبیق با آب شور مطابقت دارد. ماهی سیچلید (*Sarothodon mossambicus*) تنها تا روز سوم پس از مواجهه با آب شور افزایشی در تعداد سلول‌های کلراید آبششی نشان داده است. همچنین Trombetti و همکاران (۱۹۹۶)

<sup>1</sup> Accessory cells

برای تنظیم بهتر یونی - اسمزی در مواجهه با آب شور و یا لب شور می گردد.

کلیه ماهیان به عنوان یکی از مهمترین اندام های بدن ماهی جهت سازگاری موجود با محیط های مختلف است (Sveltana, 2006). بافت کلیه بچه ماهیان سفید در مرحله یک آزمایش تغییر نکرده است و با ورود بچه ماهیان به آب لب شور تغییراتی در بافت کلیه در چهار تیمار آزمایشی با افزایش حفره داخلی توبول های کلیوی (پروکسیمال و دیستال) و همچنین کاهش قطر گلومرول ها (شکل ۳) و در راستای سازش پذیری در آب لب شور مشاهده گردید. عدم تغییر ساختار کلیه در مرحله یک احتمالاً بدلیل عدم وظیفه مندی کلیه در دفع یون های تک ظرفیتی (یون سدیم و کلر) است. زیرا در تنظیم یونی - اسمزی در محیط آب شیرین، عمدتاً جذب یون های تک ظرفیتی برای انتقال به سرم خون ماهیان از آبشش ها و از کلیه ها دفع زیاد آب صورت می گیرد و در تنظیم یونی - اسمزی ماهیان در محیط آب شور نیز عمدتاً ترشح یون های تک ظرفیتی مازاد سرم خون ماهیان به آب از آبشش ها و ترشح یون های دو ظرفیتی از کلیه ها صورت می گیرد (McCormick, 2001).

در تحقیقی که توسط Stoskopf (۱۹۹۳) انجام شد، نشان داد که اندازه گلومرول ها در گونه های مختلف ماهیان متفاوت می باشد، اما ماهیان استخوانی آب شیرین از تعداد گلومرول بیشتر و بزرگتری نسبت به ماهیان دریازی برخوردارند. در این بررسی تغییر اندازه گلومرول بچه ماهیان سفید در اندازه های مختلف و در آب لب شور نسبت به آب شیرین مشاهده گردید (جدول ۲).

تأثیر مکمل نمکی کلرید سدیم (۱۰٪) بر تنظیم اسمزی ماهی قزل آلا ی رنگین کمان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج بررسی آن ها نشان داد که فعالیت آنزیم  $(Na^+K^+)-ATPase$  آبششی در تغذیه با مکمل نمکی کلرید سدیم بیشتر، ولی تعداد سلول های کلراید آبششی در پایان آزمایش در دو گروه اختلاف معنی دار نداشت. اما در این بررسی در تغذیه از مکمل نمکی در آب شیرین سبب گردید که در ۲۸ روز پرورش بچه - ماهیان سفید در آب لب شور تعداد سلول های کلراید آبششی نسبت به تیمار شاهد از افزایش معنی داری برخوردار گردد ( $P < 0.05$ )، (جدول ۳). نتایج این تحقیق با بررسی های Santos و همکاران (۲۰۱۴) در تغذیه از مکمل نمک کلرید سدیم بر روی تغییرات بافت آبشش و تنظیم اسمزی بچه ماهی Cobia در آب لب شور و افزایش تعداد سلول های کلراید در گروه استفاده کننده از مکمل نمکی مطابقت دارد. آن ها معتقدند که این فرآیند سبب کاهش مصرف انرژی در جریان تنظیم اسمزی می گردد و بر رشد بچه ماهیان تأثیر گذار است. زیرا توسعه تعداد و اندازه سلول های کلراید آبششی، افزایش سطح فعالیت آنزیم پمپ سدیم پتاسیم آبششی را به دنبال دارد. مطالعات Fontainhas-Fernandes و همکاران (۲۰۰۰) نیز به نتایج مشابهی تغذیه از مکمل نمکی و انتقال به آب لب شور در ماهی نیل تیلاپیا دست یافتند.

بنابراین، می توان نتیجه گرفت که تأثیر جیره نمکی در آب شیرین در افزایش تعداد سلول کلراید در بافت آبشش در مواجهه با آب لب شور در گونه های مختلف و احتمالاً در اندازه های مختلف می تواند متفاوت باشد. ولی تأثیر آن به طور کلی سبب تغییر در عملکرد آبشش

ماندگاری بچه ماهی سفید انگشت قد ( *Rutilus frisii kutum* ) مجله علمی شیلات ایران، ۱۷(۱): ۲۱-۳۰.

۲. امینی رنجبر، غ. و هادیان، ا.، ۱۳۸۷. بررسی میزان ددت در رسوبات رودخانه سفیدرود (حد فاصل سد تاریک تا بندر کياشهر). مجله پژوهش و سازندگی در امور دام و آبزیان، ۸۱: ۸۶-۸۱.

۳. ایمانپور، م. ر.، ۱۳۸۴. اثرات طیف نور، دوره های نوری و غنی سازی روی پرورش لاروی و تنظیم اسمز بچه ماهیان سفید *Rutilus frisii kutum*. رساله دوره دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۱۰۸ ص.

۴. بهروزی، ش.، فارابی، س. م. و.، هدایتی فرد، م. و شریفیان، م.، ۱۳۹۴. بررسی اثر شوری بر نرخ بازماندگی و تغییرات بافت کلیه بچه ماهی سفید *Rutilus frisii kutum*. نشریه دامپزشکی در پژوهش سازندگی، ۱۰۷: ۳۱ تا ۳۷.

۵. پوستی، ا. م. و مرادی، ا.، ۱۳۸۵. روش های آزمایشگاهی بافت شناسی، انتشارات دانشگاه تهران. ۲۹۶ ص.

۶. پوستی، ا. ع. و مروستی، ص.، ۱۳۷۸. اطلس بافت شناسی ماهی (اشکال طبیعی و آسیب شناسی) انتشارات دانشگاه تهران. ۳۲۸ ص.

۷. رضوی صیاد، ب.، ۱۳۷۴. ماهی سفید ( *Rutilus frisii kutum* )، انتشارات وزارت جهاد کشاورزی، مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، ۸۶ صفحه.

۸. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۴. سازمان شیلات ایران، معاونت توسعه مدیریت و منابع، دفتر برنامه و بودجه. ۶۴ ص. ۲۸ / ۱۰ / ۱۳۹۴.

قهрманزاده و همکاران (۱۳۹۳) در دو محیط آب لب شور (دریای خزر ۸/۴۹ گرم در لیتر) و آب شیرین (رودخانه خشک رود) در مقایسه بافت شناسی کلیه (قدامی، میانی و خلفی) مولدین ماهی سفید را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که از نظر تعداد لوله های کلیوی ماهی سفید اختلاف معنی داری بین دو محیط نداشتند ( $P > 0/05$ ) و میانگین اندازه لوله های دیستال، جمع کننده و شبکه گلمرولی در آب شیرین به طور معنی داری بزرگتر از آب لب شور بود ( $P < 0/05$ ). میانگین اندازه لوله های پروگسیمال در آب دریا نسبت به آب شیرین بیشتر بود. اگر چه اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). در نتیجه لوله های کلیوی در ماهی سفید بعد از مهاجرت به آب شیرین جهت سازگاری با محیط جدید تغییر می کند. این تغییرات در واقع مکانیزم تحمل ماهی سفید در مواجهه با شرایط هیپواسمیتیک است.

بنابراین، با توجه به تغییر محیط از آب شیرین به آب لب شور دریای خزر، ساختار کلیه بچه ماهیان سفید نیز تغییر نمود. اما در استفاده از مکمل نمک کلرید سدیم در مدت آزمایش تغییری در بافت کلیه در مرحله یک آزمایش در محیط آب شیرین مشاهده نشد.

### سپاسگزاری

در اینجا بر خود لازم می دانیم از زحمات کلیه کسانی که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند سپاسگزاری نمایم.

### منابع

۱. امیری، ا.، صیاد بورانی، م.، مرادی، م. و پور غلامی، ا.، ۱۳۸۷. اثر شوری های مختلف بر رشد و

اکسیژن در آب. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ۶۶ ص.

۱۵. قهرمان زاده، ز.، بانی، ع.، ایمانپور نمین، ج. و حلاجیان، ع.، ۱۳۹۳. مقایسه بافت شناسی لوله های کلیوی مولدین ماهی سفید *Rutilus frisii kutum* در دو محیط لب شور (دریای خزر) و آب شیرین (رودخانه خشک رود). مجله پژوهشهای جانوری (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۷(۱): ۱۳۴-۱۴۲.

۱۶. کرباسی، ع.، نبی بیدهندی، غ.، غضبان، ف. و کوکی حبیب زاده، ش.، ۱۳۸۹. تفکیک شمیایی عناصر و بررسی شدت آلودگی در رسوبات رودخانه سیاهرود. محیط شناسی، سال ۳۶(۵۳): ۲۰-۱۱.

۱۷. محیسنی، م.، بنایی، م.، نعمت دوست حقی، ب. و فارابی، س.م.و.، ۱۳۹۵. اثر محرومیت غذایی بر توسعه سلولهای کلراید آبخشی در بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) در مواجهه با تنش شوری. مجله بوم شناسی آبریان، ۵(۴): ۸۸-۹۷.

۱۸. محیسنی، م.، فارابی، س.م.و.، بنایی، م. و نعمت دوست حقی، ب.، ۱۳۹۵. اثر گرسنگی بر تغییر الکترولیت های بدن بچه ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus frisii kutum*) طی سازگاری با آب شور. نشریه توسعه آبی پروری، ۱۰(۴): ۱۲۴-۱۱۱.

19. Ai, Q., Mai K, Tan, B., Xu, W., Duan, Q., Ma, H. & Zhang, L., 2006. Replacement of fish meal by meat and bone meal in diets for large Yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Aquaculture*, 260: pp. 255-263.

20. Applebaum, S. & Jesuarockiaraj, A., 2009. Salt incorporated diets for enhancing growth performance and survival in gilthead sea bream *Sparus aurata* L.

[http://www.khzshilat.ir/Content/media/ima.ge/2016/01/795\\_orig.pdf](http://www.khzshilat.ir/Content/media/ima.ge/2016/01/795_orig.pdf)

۹. ستاری، م.، ۱۳۸۱. ماهی شناسی (۱). تشریح و فیزیولوژی، انتشارات نقش مهر، چاپ اول. ۶۵۹ ص.

۱۰. صیادبورانی، م.، ۱۳۸۹. تعیین اندازه مناسب رهاسازی بچه ماهی سفید از طریق ارزیابی قابلیت های تنظیم اسمزی. پروژه موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۹۴ صفحه.

۱۱. صیادبورانی، م.، احمد نژاد. م.، مقصودیه کهن، ح.، دژندیان، س. و شریفیان، م. ۱۳۹۳. بررسی فراوانی و پراکنش سلول های کلراید آبخش بچه ماهیان سفید در مواجهه با شوری آب دریای خزر. نشریه توسعه آبی پروری، ۸(۲): ۴۴-۳۵.

۱۲. عبدلی، ا. و نادری، م. ۱۳۸۷. تنوع زیستی ماهیان حوضه جنوبی دریای خزر. انتشارات علمی آبریان. ۲۳۸ ص.

۱۳. عنایت غلامپور، ط.، ایمانپور، م. ر.، حسینی، س. ع. و ب. شعبانپور، ۱۳۹۰. تأثیر سطوح مختلف شوری بر شاخص های رشد، میزان بازماندگی، غذا گیری و پارامترهای خونی در بچه ماهیان سفید *Rutilus frisii kutum*. مجله زیست شناسی ایران، ۲۴(۴): ۵۳۹-۵۴۹.

۱۴. فارابی، س.م.و.، بهروزی، ش.، قانعی تهرانی، م.، رمضان، ح.، آذری، ع.ح.، شکوری، م.، نجف پور، ش.، واحدی، ف.، نصرالله تبار، ع.، ملایی، ح.، علوی، ا. و معاضدی، ج.، ۱۳۹۳. تعیین درصد مقاومت بچه ماهی سفید (۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلیگرمی) به شوری، گل آلودگی و کاهش

- the Southeast of Caspian Sea. World applied sciences Journal, 7(9): 1090-1096.
31. Fontainhas-Fernandes. A., Russell-Pinto, F., Gomes, E., Reis-Henriques, Ma.A. & Coimbra, J., 2000. The effect of dietary sodium chloride on some osmoregulatory parameters of the teleost, *Oreochromis niloticus*, after transfer from freshwater to seawater. *Fish Physiology and Biochemistry*, 23(4): 307-316.
  32. Foskett, J.K., Logesdon, C.D., Turner, T., Mochen, T.E. & Bern, H.A., 1981. Differentiation of the chloride cell extrusion mechanism during seawater adaptation of a teleost fish, the cichlid *Sarothodon mossambicus*, *Journal of Experimental biology*, 94: 209-224.
  33. Hwang, P.P., Lee, T.H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 148: 479-497.
  34. Howell, B.R., 1994. Fitness of hatchery-reared fish for survival in the sea. *Aquaculture and Fisheries Management*. 25: 3-17.
  35. Keshavanath, P., Oishi, C.A., Leao da Fonseca, F.A., Affonso, E.G. & Filho, M.P., 2012. Growth Response of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Fingerlings to Salt (Sodium Chloride) Supplemented Diets. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 7: pp. 439-446.
  36. Krayushkina, L.S., Panov, A.A., Gerasomov, A.A. & Potts, W.T.W., 1996. Changes in sodium, calcium and magnesium ion concentrations in sturgeon (*Huso huso*) urine and in kidney morphology. *Journal of Computational Biology*, B, 165: 527-533.
  37. Mzengereza, K. & Kang'ombe, J., 2015. Effect of Dietary Salt (Sodium Chloride) Supplementation on growth, survival and feed utilization of *Oreochromis shiranus* (Trewavas, 1941). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 7:1. 8.
  38. McCormick, S.D., 1990. Cortisol directly stimulates differentiation of chloride cells in tilapia opercular membrane. 259: R857-863.
  - juveniles reared in low saline brackish water. *Scienria Marina*, 73(S1): 213-217.
  21. Bancroft. J. D. & Gamble. M., 2002. Theory and practice of histological techniques. Churchill Livingstone, 796 p.
  22. Bell, J.D., Bartley, D.M., Lorenzen, K. & Loneragan, N.R., 2006. Restocking and Stock Enhancement of Coastal Fisheries: Potential, Problems and Progress. *Fish Res* 80:1-8
  23. Cataldi, E., Ciccotti, E., Dimarco Disan, P., Disantano, O., Bronzi, P. & Cataudella, S., 1995. Acclimation trials of juvenile Italian sturgeon to different salinities: Morpho-physiological descriptors. *Journal of Fish Biology*, 47: 609-618.
  24. Charmi, A., Bahmani, M., Sajjadi, M.M. & Kazemi. R., 2009. Morpho-histological study of kidney in farmed juvenile Beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(1): 11-18.
  25. Daborn, K., Cozzi, R. & Marshall, W., 2001. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, 204(11): 1889-1899.
  26. Emadi, H., 1979. The state of the fishing and reproduction of the kutum, *Rutilus frisii kutum*, in the Caspian Sea of Iran. *Journal of Ichthyology*, 19(4): 151-154.
  27. Evans, D.H., 2002. The physiology of fishes. CRC Press, New York.York, pp. 91-239.
  28. Evans, D. H., Piermarini. P.M. & Potts, W.T.W., 1999. Ionic transport in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*, 283: 641-652.
  29. Farabi. S.M.V., Hajimoradloo, A. & Bahmani, M., 2007. Study on salinity tolerance and some physiological indicators of ion-osmoregulatory system in juvenile beluga, *Huso huso* (Linnaeus, 1758) in the south Caspian Sea: Effects of age and size. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 6(2): 15-32.143.
  30. Farabi. S.M.V., Najafpour, Sh. & Najafpour, G. D., 2009. Aspect of Osmotic-ions Regulation in Juvenile Ship, *Acipenser nudiiventris* (Lovetsky, 1828) in

48. Stoskopf, M. K., 1993. Fish medicine. Philadelphia: W.B. Saunders Co., p. 882.
49. Suboski, M. D., Templeton, J. J., 1989. Life skills training for hatchery fish: social learning and survival. Fisheries Research, 7, 343e352.
50. Svasand, T., Kristiansen, T.S. Pedersen, T., Salvenes, A.G.V., En-gelsen, R., Nævdal, N. & Nødtvedt, M., 2000. The enhancement of cod stocks. Fish and Fisheries, 1: 173-205.
51. Sveltana, F., 2006. Normal kidney development in normal medaka fish. [http://www.jsps.go.jp/english/e-plaza/e-sdialogue/03\\_data/Dr\\_Fedorova.pdf](http://www.jsps.go.jp/english/e-plaza/e-sdialogue/03_data/Dr_Fedorova.pdf).
52. Takashima, F. & Hibiya, T., 2001. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. 1th Edn., Kodansha Ltd., New york, p: 234
53. Trombetti, F., Ventrella, V., Pagliarani, A., Ballestrazzi, R., Galeotti, M., Trigari, G., Pirini M. & Borgatti, A.R., 1996. Response of rainbow trout gill (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase and chloride cells to T 3 and NaCl administration. Fish Physiology and Biochemistry, 15(3): 265-274.
54. Wang, P.J., Lin, C.H., Hwang, L.Y., Huang, C.L., Lee, T.H. & Hwang, P.P., 2009. Differential responses in gills of euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to various hyperosmotic shocks. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. 152: 544-551.
55. Young, B. & Heath, J., 2000. Functional Histology, a text and colour Atlas. 4th Edn., New York: Churchill Livengstone, Pp: 252-298.
56. Zaugg, W.S., Roley, D.D., Prentice, E.F., Gores, K.X. & Waknitz, F.W., 1983. Increased seawater survival and contribution to the fishery of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by supplemental dietary salt. Aquaculture, 32: 183-188
39. McKenzie, D.J., Cataldi, E., Di Marco, P., Mandlich, A., Romano, P., Ansferri, S., Bronzi, P. & Cataudella, S., 1999. Some aspects of osmotic and ionic regulation in Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. II: Morpho\_physiological adjustments to hyperosmotic environment. Journal of Applied Ichthyology, 15: 61\_66.
40. Munro, J.L. & Bell, J.D., 1997. Enhancement of marine fisheries resources. Reviews in Fisheries Science, 5: 185-222.
41. Olla, B.L., Davis, M.W. & Ryer, C.H., 1998. Understanding how the hatchery environment represses or promotes the development of behavioral survival skills. B. Mar. Sci. 62: 531- 550.
42. Pellertier, D. & Besner, M., 1992. The effect of salty diets and gradual transfer to sea water on osmotic adaptation, gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activation, and survival of brook charr, *Salvelinus fontinalis*, Mitchill. Journal of Fish Biology. 141: 791-803.
43. Perry, S.F., Rivero-Lopez, L., McNeill, B. & Wilson, J.M., 2006. Fooling a freshwater fish: How dietary salt loading transforms the trout gill into a seawater phenotype. Journal of Experimental Biology, 209: 4591-4596.
44. Roberts, R. J., 2001. Fish pathology. 3rd ed. W. B. Sanders, London. 472p.
45. Sanchez-Lamadrid, A., 2002. Stock enhancement of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.): assessment of season, fish size and place of release in SW Spanish coast. Aquaculture, 210:187-202.
46. Sangiao-Alvarellos, S., Arjona, F.J., Martín del Río, M.P., Míguez, J.M., Mancera, J.M. & Soengas, J.L., 2005. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. Journal of Experimental Biololgy, 208: 4291-4304.
47. Santos, R.A., Bianchini, A., Jorge, M.B., Romano, L.A., Sampaio, L.A. & Tesser, M.B., 2014. Cobia *Rachycentron canadum* L. reared in low-salinity water: does dietary sodium chloride affect growth and osmoregulation? Aquaculture Research, 45(4): 4: 728-735.