تاثیر استفاده از لاکتوفرین و باکتری‌های *Lactobacillus rhamnosus* و *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بر شاخص‌های تولید مثلی ماهی مولد کاراس طلایی (*Carassius auratus*)

احمدنیای مطلق، ح. ر[۱و*]؛ حاجی مرادلو، ع.[۲] قربانی، ر.[۲]؛ آق‌ٔ ن.؛ قاسمی، م.[۳]

[۱] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
[۲] گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
[۳] پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه، ایران
*Email: Hamid.ahmadnia@gmail.com

تاکنون تلاش‌های متعددی در راستای افزایش تولید آبزیان از طریق اثر گذاری بر رشد و کاهش تلفات به وسیله افزودنی‌های مختلف خوراکی صورت گرفته است اما مطالعات پیرامون تاثیر این افزودنی‌ها بر تولید مثل محدود می‌باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر استفاده از لاکتوفرین و باکتری‌های *Lactobacillus rhamnosus* و *Pediococcus acidilactici* به مدت ۱۲۰ روز بر شاخص‌های تولید مثلی مولدین کاراس طلایی (*Carassius auratus*) (میانگین وزن ۰/۵۰±۱۲/۲۱ گرم) طراحی شد. تیمارهای آزمایشی شامل باکتری‌های *L. rhamnosus* و *P. acidilactici* هرکدام به میزان 10^6 باکتری به ازای هر گرم جیره، لاکتوفرین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره، یک تیمار ترکیبی (*L. rhamnosus* به همراه لاکتوفرین) و یک تیمار شاهد در سه تکرار بود. نتایج نشان داد قطر و وزن تخمک، طول و وزن لاروهای چهارروزه به صورت معنی‌داری در اثر استفاده از *L. rhamnosus* افزایش یافت ($P < 0/05$). در حالی که قطر و وزن تخم، طول و وزن لاروهای یک روزه تحت تاثیر پروبیوتیک‌های ذکر شده و لاکتوفرین قرار نگرفت. نتایج نشان داد استفاده ترکیبی از *L. rhamnosus* و لاکتوفرین به صورت معنی‌داری شاخص‌های تولید مثلی را سرکوب می‌کند ($P < 0/05$). بر اساس نتایج حاضر استفاده از باکتری‌های *L. rhamnosus* و *P. acidilactici* با سطوح 10^6 باکتری به ازای هر گرم جیره برای افزایش کارایی تولید مثل در ماهی کاراس طلایی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: ماهی کاراس طلایی، *Lactobacillus rhamnosus*، *Pediococcus acidilactici*، لاکتوفرین، شاخص-های تولیدمثلی.

مقدمه:

یکی از مهمترین راه‌های افزایش تولید، ارتقاء میزان تولید مثل و افزایش کیفیت لارو و بچه ماهیان از طریق بهبود تغذیه و ایمنی مولدین می‌باشد. در تمام مهره داران، تولید مثل توسط فعل و انفعال سه غده هیپوتالاموس، هیپوفیز و گناد تنظیم می‌شود که محور تولید مثل را تشکیل می‌دهند. عملکرد صحیح محور تولید مثل و توان تولید مثلی، وابسته به عوامل متابولیک و تغذیه‌ای می‌باشد. تغذیه بر همه جوانب باروری از بلوغ تا گامتوژنز در هر دو جنس نر و ماده تاثیر می‌گذارد (۱).

استفاده از مکمل‌های غذایی میکروبی و به ویژه پروبیوتیک ها در طی دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده است و تحقیقات گسترده‌ای در این خصوص صورت پذیرفته است. این تحقیقات عمدتاً متمرکز بر تعیین اثرات و مکانسیم اثر بر شاخص‌های رشد، پاسخ ایمنی

و مقاومت در برابر بیماری بوده است ولی علی رغم علاقه‌مندی زیاد به استفاده از پروبیوتیکها، مطالعات محدودی در زمینه اثرات پروبیوتیک‌ها بر تولید مثل ماهیان صورت پذیرفته است.

لاکتوفرین به عنوان اولین عامل سیستم دفاعی بدن در برابر عفونت‌ها عمل می‌کند و یکی از مولفه‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی می‌باشد. نقش‌های فیزیولوژیک بسیاری به آن نسبت داده شده است که از آن جمله می‌توان به تنظیم عملکرد ایمنی و تحریک پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی اشاره کرد. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که لاکتوفرین در ماهیان نیز تولید می‌شود (۲).

جنس لاکتوباسیل از جمله مهمترین، پرکاربردترین و موفق‌ترین پروبیوتیک‌های آبزیان می‌باشد که بیش از ۵۰ گونه را شامل می‌شود (۳). مطالعاتی که به بررسی اثرات باکتری *L. rhamnosus* روی تولید مثل ماهی گورخری (*Danio rerio*) پرداخته‌اند نشان داده‌اند که میزان تخم‌گذاری روزانه، اوولاسیون و نرخ تفریخ به میزان قابل توجهی افزایش یافت (۱). همچنین تکامل جنینی سریعتری به مدت ۴ ساعت زودتر در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده گردید (۵). در مطالعات بافت شناسی تخمدان، بهبود رشد فولیکول و شاخص گنادی، که نشان دهنده افزایش فولیکول‌های زرده با مشارکت پروبیوتیک بود تائید شد(۴).

مطالعات متعددی به بررسی اثر لاکتوفرین بر سیستم ایمنی و رشد آبزیان پرداخته‌اند، اما اطلاعات پیرامون نحوه اثر لاکتوفرین بر تولید مثل آبزیان محدود بوده و تنها پژوهشی که در این صورت گرفته است (۷) نشان می‌دهد که تیمار مولدین ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با لاکتوفرین گاوی سبب افزایش معنی‌دار هم‌آوری، بازماندگی تخم، میزان تفریخ تخم، بازماندگی لارو، میزان پروتنین و چربی خام موجود در تخم و همچنین اسیدهای چرب موجود در تخم شد.

تاکنون اثرات استفاده از این دو محرک به شکل جداگانه و ترکیبی در تولید مثل ماهی‌ها مورد بررسی قرار نگرفته است، بنابراین، این آزمایش با هدف بررسی اثر استفاده از باکتری‌های *L. rhamnosus* ، *P. acidilactici* و لاکتوفرین بر برخی از شاخص‌های تولید مثلی (قطر و وزن تخمک، خصوصیات تخم (قطر و وزن) و لارو (طول کل، وزن) طراحی شد.

مواد و روش ها:

طراحی آزمایش به این شکل بود که از باکتری‌های *L. rhamnosus* و *P. acidilactici* با سطح 10^6 واحد تشکیل دهنده کلنی به ازای هر گرم غذا (CFU) و لاکتوفرین به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم غذا، به صورت جداگانه در قالب سه تیمار و یک تیمار ترکیبی (باکتری *L. rhamnosus* با غلظت ۱۰۶ واحد تشکیل دهنده کلنی به ازای هر گرم غذا به علاوه لاکتوفرین ۲۰۰ میلی‌گرم بر هر کیلوگرم غذا) و یک تیمار شاهد، در یک طرح کاملاً تصادفی (۴ تیمار به همراه یک گروه شاهد و هریک در ۳ تکرار) استفاده شد.

باکتری‌های مورد استفاده در این طرح به شکل لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری و طبق دستورالعمل موجود کشت و نگهداری شدند.

نمونه برداری جهت برآورد قطر و وزن تخمک در پایان آزمایش با بی‌هوش کردن ماهی توسط پودر گل‌میخک و شکافتن بدن صورت گرفت. پس از توزین گناد، جهت محاسبه قطر، وزن تخمک، تعدادی تخمک از هر مولد ماده در فرمالین ۱۰ درصد فیکس شد. قطر ۳۰ قطعه تخمک از هر ماهی قبل از هیدراته شدن با استفاده از لوپ مجهز به میکرومتر چشمی (با دقت ۱۰۰ میکرومتر) اندازه گیری شد. جهت توزین نیز از ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ استفاده به عمل آمد (۵).

در پایان دوره غذادهی و پس از تخم کشی از مولدین، میزان کل تخم تولیدی، خصوصیات تخم (قطر و وزن) لاروهای تولیدی (طول کل و وزن) و همچنین بازماندگی لارو مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور پس از لقاح و تشکیل سلول تخم، نمونه برداری انجام و جهت تثبیت در فرمالین سه درصد برای اندازه‌گیری قطر و وزن متوسط فیکس شدند. همچنین پس از انکوباسیون

و تفریخ تخم، از لاروهای یک‌روزه و چهارروزه جهت اندازه‌گیری طول کل و وزن، نمونه برداری شد. کلیه اندازه‌گیری‌ها (طول) به وسیله لوپ مجهز به میکرومتر چشمی (با دقت ۱۰۰ میکرومتر) انجام شد (۸).

بعد از تحقق دو شرط اصلی آزمون‌های پارامتریک تجزیه واریانس، از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه برای مقایسه واریانس بین تیمارها و از آزمون دانکن برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین میانگین‌ها (در سطح اعتماد ۵ درصد) استفاده شد.

نتایج و بحث:

در مسیر تکاملی، اصل مشترک برای تمامی ماهیان تولید تخم‌هایی با زرده بزرگ است (۹). براساس نتایج موجود (جدول ۱) بیشترین قطر و وزن تخمک در تیمارهای پروبیوتیکی و کمترین آن در تیمارهای ترکیبی و شاهد مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). با توجه به نتایج مشابه در مطالعات پیرامون اثر پروبیوتیک‌ها در تولید مثل ماهی گورخری (*D. rerio*) بزرگتر و سنگین‌تر شدن تخمک‌ها می‌تواند در اثر جذب بیشتر زرده در پی افزایش فولیکول‌های ویتلوژنین به دلیل تامین بهتر اسیدهای چرب ضروری در روده باشد (۹). اندازه گیری قطر و وزن تخم نشان داد که بیشترین قطر تخم در تیمار *P. acidilactici* و کمترین آن در تیمار ترکیبی مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). وزن تخم در هیچ‌یک از تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نشان نداد. تخمک ماهیان در زمان لقاح آب جذب می‌کنند و عوامل متعددی بر توانایی جذب آب توسط تخم موثر می‌باشد، لذا میزان آب جذب شده می تواند وزن تخم را تحت تاثیر قرار دهد. در نتیجه به نظر می‌رسد در برخی موارد، قطر و وزن تخمک غیر اوولہ معیار دقیق‌تری نسبت به قطر و وزن تخم جهت قضاوت در مورد اثر مواد مختلف بر تولید مثل می‌باشد.

طول و وزن لاروهای چهار روزه تیمار *L. rhamnosus* بیشتر از سایر تیمارها بود. لاروهای ماهی طلایی در دمای ۱۹ تا ۲۰ درجه سانتی گراد ظرف مدت چهار روز به تغذیه فعال رسیدند که این اتفاق در مورد تیمارهای لاکتوفرین و *L. rhamnosus* تقریبا یک روز زودتر افتاد. تکامل جنینی سریعتر ماهی گورخری (*D. rerio*) در اثر استفاده از باکتری *L. rhamnosus* توسط سایر محققین به اثبات رسیده است (۱). علاوه بر این، اندازه بزرگتر لاروهای تولید شده در تیمارهای تحت تغذیه با پروبیوتیک می‌تواند به دلیل متوازن بودن تولید اسیدهای چرب ضروری به وسیله باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در روده ماهی مولد کاراس طلایی باشد که به نوبه خود به تولید تخم‌ها و لاروهای بزرگتر کمک می‌کند (۱۰).

عملکرد تولید مثلی در تیمار ترکیبی به صورت قابل ملاحظه‌ای از همه تیمارها پائین‌تر بود (جدول ۱). محققین دلیل این اتفاق را به ترکیبات ناشناخته موجود در جیره و اثرات متقابل آن‌ها با لاکتوفرین و متابولیت‌های باکتریایی، اختصاصات سیستم گوارشی و شرایط پرورش نسبت می‌دهند (۱۱).

جدول ۱- میانگین (± انحراف معیار) قطر و وزن تخمک و تخم به همراه طول و وزن لاروهای یک روزه و چهار روزه حاصل از ماهی مولد کاراس طلایی تغذیه شده با لاکتوفرین و باکتری‌های *L. rhamnosus* و *P. acidilactici* در تیمارهای آزمایشی (n = ۳)

تیمار	تخمک		تخم		لارو یک روزه		لارو چهار روزه	
	قطر (میلیمتر)	وزن (میلیگرم)	قطر (میلیمتر)	وزن (میلیگرم)	طول (میلیمتر)	وزن (میلیگرم)	طول (میلیمتر)	وزن (میلیگرم)
شاهد	۰/۶۹±۰/۲۸^{b}	۰/۴۷±۰/۱۹^{a}	۱/۱۹±۰/۱۰^{ab}	۰/۹۵±۰/۱۱^{a}	۳/۹۸±۰/۱۱^{a}	۰/۸۵±۰/۱۰^{a}	۵/۲۲±۰/۱۱^{ab}	۰/۷۱±۰/۰۸^{ab}

L. rhamnosus	۰/۸۵±۰/۲۹^{c}	۰/۷۱±۰/۱۰^{ab}	۱/۱۸±۰/۱۰^{ab}	۱/۲۲±۰/۱۵^{a}	۴/۲۲±۰/۲۰^{a}	۱/۰۰±۰/۱۲^{a}	۵/۷۹±۰/۲۵^{c}	۱/۴۰±۰/۱۷^{c}
لاکتوفرین	۰/۷۹±۰/۳۲^{bc}	۰/۷۹±۰/۱۱^{b}	۱/۲۷±۰/۰۸^{bc}	۱/۰۰±۰/۱۲^{a}	۴/۰۲±۰/۲۵^{a}	۰/۸۴±۰/۱۰^{a}	۵/۱۷±۰/۲۰^{a}	۱/۱۶±۰/۱۴^{bc}
ترکیبی	۰/۵۴±۰/۲۳ ^{a}	۰/۲۶±۰/۲۵^{a}	۱/۱۴±۰/۱۲^{a}	۱/۰۴±۰/۲۰^{a}	۴/۱۲±۰/۴۱^{a}	۰/۸۷±۰/۱۲^{a}	۵/۶۱±۰/۴۱^{bc}	۰/۵۰±۰/۰۶^{a}
P. acidilactici	۰/۸۲±۰/۲۹^{bc}	۰/۶۶±۰/۱۳^{ab}	۱/۲۹±۰/۵۶^{c}	۱/۱۵±۰/۱۱^{a}	۴/۳۰±۰/۴۱^{a}	۱/۰۰±۰/۱۰^{a}	۴/۹۶±۰/۴۱^{a}	۰/۸۷±۰/۱۰^{ab}

* داده‌های ارائه شده در هر ردیف با حروف غیر مشترک با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند (P < ۰/۰۵)

نتیجه گیری کلی:

پروبیوتیک‌ها می‌توانند با تولید مواد مغذی مانند اسیدهای چرب ضروری و ترشح آنزیم‌های گوارشی، کارایی هضم پروتئین و چربی‌ها را در جیره افزایش دهند (۸). پروتئین‌ها و اسیدهای چرب اجزای بسیار مهم زرده را تشکیل می‌دهند و فعالیت باکتری-های اسید لاکتیک میزان بیشتری از ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و اسیدهای چرب ضروری را در اختیار میزبان قرار داده و در نتیجه باعث بلوغ بهتر، توسعه و تکامل مناسب اووسیت‌ها، و تولید میزان بیشتری ویتلوژنین می‌شوند (۱۰).

با توجه به اینکه ترکیب باکتری *L. rhamnosus* و لاکتوفرین به نوعی بازدارندگی رشد غدد جنسی را به همراه داشت، استفاده از این ترکیب جهت کنترل و ایجاد تاخیر در تولید مثل پیشنهاد می‌شود. اما در مواردی که رشد و توسعه بهتر گنادها و افزایش تولید در نظر می‌باشد استفاده از باکتری *L. rhamnosus* در سطح 10^{6} کلنی در گرم غذای مولدین پیشنهاد می‌شود.

منابع:

1. *Gioacchini G, Maradonna F, Lombardo F, Bizzaro D, Olivotto I, Carnevali O. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (Danio rerio). Reproduction. 2010;140(6):953-9.*
2. *González-Chávez SA, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. International journal of antimicrobial agents. 2009;33(4):301. e1-. e8.*
3. *Tannock GW. A special fondness for lactobacilli. Applied and environmental microbiology. 2004;70(6):3189-94.*
4. *Carnevali O, Avella M, Gioacchini G. Effects of probiotic administration on zebrafish development and reproduction. General and comparative endocrinology. 2013;188:297-302.*
5. *Standen B, Rawling M, Davies S, Castex M, Foey A, Gioacchini G, et al. Probiotic Pediococcus acidilactici modulates both localised intestinal-and peripheral-immunity in tilapia (Oreochromis niloticus). Fish & shellfish immunology. 2013;35(4):1097-104.*
6. *Ahmadian E, Agh N, Tokmechi A, Jalili R. EFFECT OF DIETARY BOVINE LACTOFERRIN ON RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS) FECUNDITY AND LARVAL QUALITY. larvi 2013. 2012:6.*
7. *Motlagh HRA, Farhangi M, Rafiee G, Noori F. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of Artemia urmiana by administration of different levels of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis. Aquaculture International. 2012;20(4):693-705.*
8. *Izquierdo M, Fernandez-Palacios H, Tacon A. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. Aquaculture. 2001;197(1):25-42.*
9. *Irianto A, Austin B. Probiotics in aquaculture. Journal of fish diseases. 2002;25(11):633-42.*

10. Yokoyama S, Koshio S, Takakura N, Oshida K, Ishikawa M, Gallardo-Cigarroa FJ, et al. Effect of dietary bovine lactoferrin on growth response, tolerance to air exposure and low salinity stress conditions in orange spotted grouper Epinephelus coioides. Aquaculture. 2006;255(1):507-13.

Comparison of the application of lactorerrin and *Pediococcus acidilactici* in feed, on Growth physiological and reproduction performances of *Carassius auratus* brood stocks

Ahmadnia Motlagh, H. R.[1,*]; Hajimoradlo, A.[2]; Gorbani, R.[2], Agh, N.[3]; Ghasemi, M.[2]

[1] *Department of Fishery, Faculty of Natural Resources and Environment, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran;*
2 Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
3 Artemia and Aquatic Animals Research Center, Urmia University, Urmia, Iran
[*]*Email: Hamid.ahmadnia@gmail.com*

Up to date, many efforts have been made to improve aquaculture production by means of growth enhancement and mortality reduction through the application of feed additives. But information about the effects of these additives on reproduction axis is rare. This study was conducted to evaluate the effects of lactorerrin, *Lactobacillus rhamnosus* and *Pediococcus acidilactici* treatment for 120 days on reproduction properties of *Carassius auratus* brood stocks (12.21±0.50 gr). Treatments included Lactoferrin (200 mg per kg feed), *P. acidilactici* and *L. rhamnosus* (10^6 CFU per gram feed), combination treatment (*L. rhamnosus* plus lactoferrin) and Control. All treatments were conducted in triplicates. The results showed that *L. rhamnosus* and lactoferrin enhanced diameter and weight of the ovule ($P<0.05$). Also they improved length and weight of the 4 day larvae ($P<0.05$). But diameter and weight of the eggs, length and weight of the one day old larvae were not affected nor by bacteria and lactoferrin. Results also indicated that the combination of lactoreffin and *L. rhamnosus* Suppressed reproduction performances significantly ($P<0.05$). So it is recommended to use *P. acidilactici* and *L. rhamnosus* (10^6 CFU per gram feed) for reproduction purposes.

Keywords: *Carassius auratus*, *Pediococcus acidilactici*, Lactoferrin, reproduction Factors.