

## تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پریوتیک *Raffinos* بر کارایی رشد و برخی خصوصیات زیست‌شناختی تخمک و پارامترهای اسپرم شناختی در ماهیان طلایی (*Carassius auratus*)

دل آرا سپهرفر<sup>۱\*</sup>، سیدحسین حسینی فر<sup>۲</sup>، علی جافرنوده<sup>۳</sup>

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۴/۲۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۴

### چکیده

این تحقیق به منظور بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پریوتیک *Raffinos* در جیره غذایی بر کارایی رشد و خصوصیات زیست‌شناختی تخمک و پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی طلایی (*Carassius auratus*) انجام گرفت. بر این اساس در اواسط بهمن ماه، تعداد ۱۸۰ قطعه ماهی طلایی با میانگین وزنی  $26/3 \pm 0/18$  گرم، پس از ۲ هفته دوره سازگاری در ۴ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار شامل: جیره تجاری (گروه شاهد)، غذای تجاری مکمل شده با *P. acidilactici* به میزان  $0/9 \times 10^7$  CFU/g (تیمار ۱)، غذای حاوی *Raffinos* به میزان ۱۰ گرم بر کیلوگرم (تیمار ۲) و غذای تجاری حاوی ترکیبی از *P. acidilactici* به میزان  $0/9 \times 10^7$  CFU/g و پریوتیک *Raffinos* به مقدار ۱۰ گرم بر کیلوگرم (تیمار ۳) به طور تصادفی تقسیم شدند. دوره آزمایش ۹۰ روز به طول انجامید و نمونه برداری از ماهیان به منظور بررسی شاخص‌های رشد و شاخص‌های کیفی تخمک و اسپرم در پایان دوره آزمایش انجام شد. نتایج تجزیه و تحلیل داده‌های رشد نشان داد که میزان شاخص‌های افزایش وزن بدن، درصد افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در تیمار سین بیوتیک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ( $P < 0/05$ )، ولی در میزان شاخص‌های ضریب تبدیل غذایی، شاخص وضعیت و بقا در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). همچنین آنالیز شاخص‌های کیفی تخمک و اسپرم نشان داد که میزان شاخص‌های تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت و pH مایع سمینال در تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با هم نداشت ( $P > 0/05$ )، ولی شاخص‌های طول دوره تحرک اسپرم، قطر تخمک و فضای زرده در تیمار سین بیوتیک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ( $P < 0/05$ ). بر اساس نتایج میزان جیره غذایی حاوی  $0/9 \times 10^7$  CFU/g پروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پریوتیک موجب بهبود شاخص‌های رشد و خصوصیات زیست‌شناختی تخمک و پارامترهای اسپرم شناختی می‌گردد.

**کلمات کلیدی:** ماهی طلایی، تخمک، اسپرم، فراسنجه‌های رشد، مکمل غذایی.

## مقدمه

یکی از سودآورترین صنایع در دهه‌های اخیر را می‌توان صنعت آکواریوم و پرورش ماهیان زینتی نام برد. به طوری که ارزش صادرات ماهیان زینتی در جهان به سرعت در حال رشد و توسعه است (Hoshino et al., 2018). امروزه میلیون‌ها نفر از مردم در سراسر جهان، ماهیان آکواریومی را به عنوان سرگرمی انتخاب می‌کنند و گلدفیش از عمومی‌ترین ماهیان خانگی در جهان محسوب می‌شود.

ماهی طلائی یا گلدفیش با نام علمی (Carassius auratus)، از خانواده کپور ماهیان و تخم‌گذار می‌باشد. ماهی طلائی از ماهیان زینتی، با ارزش اقتصادی بالا بوده که قدمت آن تا چین باستان هم می‌رسد و در آیین نوروز ایرانیان جایگاه ویژه‌ای دارد. برخلاف تصور عامه مردم، این ماهی در شرایط مطلوب تا ۳۲ سال عمر می‌کند و دارای سویه‌های متنوعی است (Liu et al., 2018).

در آبرزی پروری توجه به کیفیت تخمک نسبت به اسپرم از اهمیت بیشتری برخوردار است حال آنکه هر دو گامت (تخمک و اسپرم) روی موفقیت لقاح مؤثر می‌باشد (Hirohashi and Yanagimachi, 2018).

یک از مشکلات مهم در پرورش کپور ماهیان دستیابی به گامت‌های باکیفیت است. Zarski و همکاران در سال ۲۰۱۷ مشخص کردند که تولید گامت‌های باکیفیت به طور مستقیم بر روی تولید لاروهای باکیفیت اثر می‌گذارد و می‌تواند کارایی لقاح و تکثیر مصنوعی را در ماهیان افزایش دهد. ارزیابی کیفیت گامت‌ها (اسپرم و تخمک) برای بهبود روش‌های لقاح مصنوعی، نگهداری گامت‌ها و مطالعه اثر آلاینده‌های محیطی روی موفقیت تکثیر در ماهیان مؤثر می‌باشد (برادران و

حسن‌زاده، ۱۳۹۷). از جمله عوامل مؤثر بر کیفیت گامت‌ها می‌توان به سن مولدین، جیره غذایی، شرایط محیطی، فاکتور وضعیت ماهی، زمان چرخه تخم‌ریزی، فرایند فوق رسیدگی و عوامل ژنتیکی اشاره نمود (Zarski et al., 2017)

در صنعت آبرزی پروری، هدف اصلی افزایش رشد و تولید، با صرف کمترین هزینه و کسب بهترین نتیجه است به همین دلیل انتخاب جیره غذایی در رشد و سیستم گوارشی تأثیر بسزایی دارد و بهینه‌سازی تغذیه و غذا به منظور افزایش رشد، افزایش اشتها، تحریک سیستم ایمنی، خاصیت ضد باکتریایی بسیار حائز اهمیت است (Chen et al., 2017). ازین رو استفاده از افزودنی‌های غذایی مثل پروبیوتیک‌ها و پریوتیک‌ها و سین بیوتیک‌ها عنوان گردید.

طبق تعریف سازمان خواروبار جهانی و سازمان بهداشت جهانی پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان مناسب مورد استفاده قرار گیرند می‌توانند سبب بهبود وضعیت سلامت میزبان شوند (Gibson et al., 2017). از جمله مزایای استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌توان به بهبود جذب کلسیم، سنتز ویتامین‌ها، پروتئین‌ها و بهبود تعادل میکروفلور روده (Tengeler et al., 2018)، تحریک و ارتقاء سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول سرم خون، افزایش کارایی غذایی (که این امر از طریق تولید ویتامین‌ها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصر کمیاب و نیز تولید آنزیم‌های گوارشی) اشاره کرد (Khan and Ansari, 2007).

مطالعه روی خصوصیات منی برای تشخیص مراحل بیوشیمیایی که در طی حرکت اسپرم و لقاح صورت می‌گیرد لازم است (Cejko et al., 2018). از

است (Mizraji *et al.*, 2017)، به همین دلیل هدف از این تحقیق، ارزیابی به کارگیری اثرات مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پریوتیک *Raffinos* در جیره غذایی بر کارایی رشد و خصوصیات زیست‌شناختی تخمک و پارامترهای اسپرم شناختی در ماهیان طلائی (*Carassius auratus*) بود.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش به مدت ۹۰ روز در مرکز تحقیقات آبزی پروری شهید فضلای دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. ماهیان طلائی با میانگین وزنی  $18/0 \pm 26/3$  گرم پس از یک دوره آدپتاسیون، به تعداد ۱۵ عدد در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر نگهداری شدند. یک روز در میان ۷۰ درصد آب از طریق برداشت ضایعات باقی مانده در کف تعویض می‌شد. پارامترهای کیفی آب مانند درجه حرارت و pH به صورت روزانه و میزان اکسیژن محلول هر هفته یک بار اندازه‌گیری گردید.

پارامترهای کلی برای ارزیابی کیفی اسپرم در ماهیان می‌توان به تحرک، غلظت، حجم و ترکیبات بیوشیمیایی پلاسمای منی اشاره نمود (بینایی و همکاران، ۱۳۹۵)، همچنین طول دوره تحرک اسپرماتوز آ پارامتر کلیدی جهت مشخص نمودن موفقیت در لقاح می‌باشد (Kalbassi *et al.*, 2014).

در دهه‌های اخیر مطالعات زیادی در زمینه استفاده از پروبیوتیک‌ها صورت گرفته که تمرکز این تحقیقات بیشتر در زمینه اثرات این مکمل‌ها بر روی رشد، سیستم ایمنی و مقاومت در برابر بیماری‌ها بوده است. علی‌رغم پژوهش‌های زیاد در این زمینه، مطالعات در زمینه اثرات این مکمل‌ها بر روی تولیدمثل محدود بوده است (Ghosh *et al.*, 2007)؛ که از آن جمله می‌توان به مطالعات صورت گرفته بر روی ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*)، مولی (*Poecilia sphenops*)، دمششیری (*helleris Xiphophoru*) و ماهی پلاتوسی (*Xiphophorus maculatus*) اشاره کرد (Gioacchini *et al.*, 2010, Abasali and Mohamad, 2010, Ghosh *et al.*, 2007, Shah *et al.*, 2018). یکی از مهم‌ترین عوامل خارجی مؤثر بر دستگاه تولیدمثل آبزیان، ترکیبات مرتبط موجود در رژیم غذایی آن‌ها

جدول ۱: میانگین پارامترهای کیفی آب در طول دوره تحقیق

پارامتر	مقدار
اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)	$6/7 \pm 0/30$
درجه حرارت (سانتی گراد)	$19 \pm 10$
pH	$7/8 \pm 0/20$

*Raffinos* ابتدا توزین سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل گردید و به غذای تجاری کپور اسپری شد (جافرنوده، ۱۳۹۵)، سپس در مجاورت هوا خشک و در زیپ کیپ پلاستیکی در یخچال نگهداری شد.

در این آزمایش از غذای تجاری ماهی کپور (شرکت فرادانه) استفاده شد (ترکیب جیره غذایی در جدول ۲ نشان داده شده است) و برای تیمارهای آزمایش، پروبیوتیک *P. acidilactici* و پریوتیک

جدول ۲: ترکیب و درصد اجزاء جیره تجاری مورداستفاده در تغذیه در ماهی طلایی (*Carassius auratus*)

اجزای جیره	پروتئین خام	چربی خام	فیبر خام	خاکستر	رطوبت	فسفر کل
درصد اجزاء جیره (%)	۳۵-۳۸	۴-۸	۴-۷	۷-۱۱	۵-۱۱	۱-۱/۵

فرمول‌های زیر محاسبه شد (Bekcan *et al.*, 2006, Ai) (et al., 2007, Hevrøy *et al.*, 2005).

درصد افزایش  $PBWI (\%) = [(W_{t_2} - W_{t_1}) / W_{t_1}] \times 100$

وزن بدن

$W_{t_1}$  = وزن اولیه (گرم)

$W_{t_2}$  = وزن ثانویه (گرم)

نرخ  $SGR (\% / day) = [(\ln W_{t_2} - \ln W_{t_1}) / (t_2 - t_1)] \times 100$

رشد ویژه

شاخص وضعیت  $CF = [W / L^3] \times 100$

$W$  = وزن ماهی (گرم)

$L$  = طول ماهی (سانتی متر)

$FCR = \text{dry feed eaten (g)} / \text{live weight gain (g)}$

ضریب تبدیل غذایی

$\text{dry feed eaten (g)} = \text{غذای خورده شده (گرم)}$

$\text{live weight gain (g)} = \text{گرم وزن ماهی به دست آمده (گرم)}$

$\text{Survival} = 100 \times \frac{\text{initial fish number} - \text{dead fish number}}{\text{initial fish number}}$

initial fish number = تعداد ماهیان در ابتدای دوره آزمایش

آزمایش

dead fish number = تعداد ماهیان مرده در طول دوره آزمایش

آزمایش

در پایان دوره آزمایش ابتدا ماهیان نر با استفاده از

عصاره گل میخک به میزان ۱۰۰ ppm بی هوش شدند و

قسمت تحتانی بدن کاملاً به وسیله دستمال کاغذی

خشک گردید و با ماساژ ملایم ناحیه شکمی نمونه

اسپرم تهیه شد. سپس سنجش پارامترهای تحرک اسپرم

با استفاده از روش (Alavi *et al.*, 2010, Bozkurt, )

(2006) انجام شد.

تیمارهای آزمایش شامل: تیمار اول (شاهد) فقط با غذای تجاری و مابقی تیمارها با غذای تجاری مکمل شده به پروبیوتیک *P. acidilactici* و پروبیوتیک *Raffinos* به ترتیب حاوی، تیمار دوم (CFU/kg)  $10^7 \times 9/0$  پروبیوتیک، تیمار سوم (۱۰ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک)، تیمار چهارم (CFU/kg)  $10^7 \times 9/0$  پروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک) تغذیه شدند (Castex *et al.*, 2010). غذای موردنیاز هر تانک با توجه به نتایج به دست آمده از زیست‌سنجی هر تانک پرورشی محاسبه و تنظیم گردید. ماهیان روزانه در ۳ وعده غذایی شدند (ساعت ۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعدازظهر)، میزان غذایی ۳ درصد وزن بدن و کل دوره آزمایش ۹۰ روز به طول انجامید.

برای تعیین عملکرد جیره غذایی و رشد ماهیان، زیست‌سنجی آن‌ها در سه مرحله (اول، وسط و آخر دوره) با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم و خط کش با دقت یک میلی‌متر صورت گرفت. در ضمن ۱۲ ساعت قبل و بعد از زیست‌سنجی غذایی قطع می‌گردید.

با توجه به زیست‌سنجی‌های انجام‌شده بررسی عملکرد رشد بر اساس فرمول‌های زیر انجام شد.

الف- درصد افزایش وزن بدن<sup>۱</sup>، نرخ رشد ویژه<sup>۲</sup> فاکتور وضعیت<sup>۳</sup> و ضریب تبدیل غذایی<sup>۴</sup> بر اساس

<sup>1</sup>- Percent body Weight Increase (PBWI)

<sup>2</sup>- Specific Growth Rate (SGR)

<sup>3</sup>- Condition Factor (CF)

<sup>4</sup>- Feed Conversion Ratio (FCR)

تخمک‌ها توزین و با استفاده از لوپ تعداد آن‌ها شمارش گردید، همچنین قطر تخمک‌ها و فضای زرده با استفاده از میکروسکوپ دارای عدسی چشمی مدرج (میکرومتر) اندازه‌گیری شد.

پس از ثبت داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن، از طریق نرم‌افزار SPSS-نسخه ۱۶ آنالیز آماری انجام گردید. تمام داده‌ها بر اساس انحراف معیار  $\pm$  میانگین، ارائه شدند.

### نتایج

نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* به جیره غذایی ماهیان طلایی اختلاف معنی‌داری را در شاخص‌های افزایش وزن بدن و درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه ایجاد کرده ( $P < 0/05$ )، اما در سایر شاخص‌ها تأثیر معنی‌داری نداشته است ( $P > 0/05$ ) (جدول ۳).

بدین منظور یک قطره اسپرم بر روی لام قرار گرفت و با افزودن یک قطره آب رقیق‌سازی شد و تحرک اسپرم آغاز گردید. مدت‌زمان تحرک کل با استفاده از میکروسکوپ تا متوقف شدن حرکت موجی شکل ارزیابی گردید.

برای محاسبه میزان اسپرماتوکریت از اسپرم ماهیان نمونه‌برداری شد (Hatef *et al.*, 2007) سپس لوله‌های موئینه حاوی منی به وسیله دستگاه سانتریفیوژ میکروهماتوکریت به مدت ۵ دقیقه و با دور RPM ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد (Alavi *et al.*, 2009, Verma *et al.*, 2009). سپس میزان اسپرماتوکریت هر نمونه به وسیله خط کش مخصوص مشخص گردید.

تعیین تراکم اسپرم پس از رقیق‌سازی به نسبت یک به هزار با استفاده از لام نئوبار در زیر میکروسکوپ اندازه‌گیری شد و در واحد میلی‌لیتر مایع منی بیان گردید.

پس از بی‌هوشی با پودر گل میخک با دوز ۳۰۰ ppm، طول و وزن ماهیان ماده به صورت جداگانه اندازه‌گیری شد. بعد از تخمک‌گیری، ۰/۱ گرم از

جدول ۳: مقایسه شاخص‌های رشد در ماهیان طلایی تغذیه‌شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* ( $10^7 \times 0/9$ ) و پربیوتیک *Raffinos* (۱۰ گرم بر کیلوگرم)

شاخص‌های رشد	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه	۲۶/۴۴±۰/۱۰ <sup>a</sup>	۲۶/۴۴±۰/۰۹ <sup>a</sup>	۲۶/۳۶±۰/۲۱ <sup>a</sup>	۲۶/۳۳±۰/۱۷ <sup>a</sup>
وزن نهایی	۳۷/۱۷±۰/۷۳ <sup>a</sup>	۳۷/۱۷±۰/۶۰ <sup>a</sup>	۳۷/۲۸±۱/۱۱ <sup>a</sup>	۳۹/۰۱±۱/۳۱ <sup>a</sup>
افزایش وزن بدن	۱۰/۷۳±۰/۶۳ <sup>b</sup>	۱۰/۷۲±۰/۵۱ <sup>b</sup>	۱۰/۹۱±۱/۱۳ <sup>ab</sup>	۱۲/۶۷±۱/۲۷ <sup>a</sup>
درصد افزایش وزن	۴۰/۵۶±۲/۲۴ <sup>b</sup>	۴۰/۵۶±۱/۸۰ <sup>b</sup>	۴۱/۴۱±۴/۴۰ <sup>b</sup>	۴۸/۱۳±۴/۷۷ <sup>a</sup>
نرخ رشد ویژه	۰/۹۷±۰/۰۴ <sup>b</sup>	۰/۹۷±۰/۰۳ <sup>b</sup>	۰/۹۸±۰/۰۸ <sup>ab</sup>	۱/۱۲±۰/۰۹ <sup>a</sup>
شاخص وضعیت	۲/۲۹±۰/۰۵ <sup>a</sup>	۲/۴۷±۰/۱۵ <sup>a</sup>	۲/۴۰±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۲/۵۲±۰/۲۱ <sup>a</sup>
ضریب تبدیل غذایی	۱/۳۵±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۱/۳۱±۰/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۲۱±۰/۱۷ <sup>a</sup>	۱/۳۳±۰/۲۶ <sup>a</sup>
بقا	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>	۱۰۰ <sup>a</sup>

پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پروبیوتیک *Raffinos* در جدول ۴ ارائه شده است. با توجه به جدول ۴ با وجود افزایش نسبی تراکم اسپرم و اسپرماتوکریت در تیمار سین بیوتیک اما اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0/05$ ). شاخص مدت تحرک اسپرم در تیمارهای سین بیوتیک و پروبیوتیک با تیمار شاهد اختلاف معنی داری گزارش شد و بیشترین مدت زمان تحرک در تیمار سین بیوتیک بود.

بیشترین میزان قطر تخمک در تیمار پروبیوتیک بود و در تمامی تیمارها اختلاف معنی دار مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). فضای زرده در تیمار شاهد با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت و بیشترین میزان فضای زرده در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد ( $P < 0/05$ ).

بیشترین میزان افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد و بین تیمار پروبیوتیک و سین بیوتیک با تیمار شاهد اختلاف معنی داری گزارش شد با این حال اختلاف معنی داری بین تیمار پروبیوتیک و شاهد مشاهده نگردید. درصد افزایش وزن بدن بین تیمار سین بیوتیک با سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده شد و بیشترین درصد افزایش وزن بدن در تیمار سین بیوتیک بود. در سایر شاخص های رشد اختلاف معنی داری مشاهده نگردید. بعد از تیمار بندی و در طول دوره پرورش هیچ گونه تلفاتی گزارش نشد و میزان بقا در تمامی تیمارها ۱۰۰ درصد بود. نتایج حاصل از اندازه گیری شاخص های تخمک شناختی و اسپرم شناختی ماهیان طلایی تغذیه شده با

جدول ۴. مقایسه شاخص های تخمک شناختی و اسپرم شناختی ماهیان طلایی تغذیه شده با پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* ( $10^7$  CFU/g) و پروبیوتیک *Raffinos* (۱۰ گرم بر کیلوگرم)

تیمار ۳	تیمار ۲	تیمار ۱	شاهد	تخمک/اسپرم شناختی
$1/85 \pm 0/25^a$	$1/83 \pm 0/23^a$	$1/71 \pm 0/18^a$	$1/81 \pm 0/22^a$	تراکم اسپرم (میلیارد در میلی لیتر)
$37/3 \pm 3/02^a$	$36/8 \pm 4/54^a$	$37/2 \pm 1/31^a$	$34/8 \pm 2/34^a$	اسپرماتوکریت (درصد)
$85/9 \pm 9/23^a$	$75/2 \pm 7/68^b$	$77/6 \pm 10/91^{ab}$	$70/1 \pm 8/82^b$	مدت تحرک (ثانیه)
$7/48 \pm 0/21^a$	$7/49 \pm 0/18^a$	$7/48 \pm 0/17^a$	$7/51 \pm 0/19^a$	pH مایع منی
$1/09 \pm 0/16^a$	$1/07 \pm 0/11^{ab}$	$1/11 \pm 0/13^a$	$0/95 \pm 0/09^b$	قطر تخمک (میلی متر)
$1/09 \pm 0/16^a$	$1/07 \pm 0/11^a$	$0/98 \pm 0/14^a$	$0/84 \pm 0/07^b$	فضای زرده (میلی متر)

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شاخص هایی همچون درصد افزایش وزن بدن و نرخ رشد ویژه در تیمار سین بیوتیک بیشتر از سایر تیمارها بود و با تیمار شاهد اختلاف معنی دار داشت. در حالی که افزایش نسبی در شاخص های رشد نسبت به گروه کنترل در تیمار پروبیوتیک و پروبیوتیک مشاهده شد اما این اختلاف معنی دار نبود. با توجه به نتایج به نظر می رسد افزایش شاخص های رشد در تیمار سین

## بحث

در این تحقیق، به بررسی اثر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پروبیوتیک *Raffinos* در جیره غذایی بر کارایی رشد و خصوصیات زیست شناختی تخمک و پارامترهای اسپرم شناختی در ماهی طلایی (*Carassius auratus*) پرداخته شد.

بیوتیک به علت تأثیر هم‌افزایی پروبیوتیک و پریوتیک مورد استفاده در این آزمایش باشد.

هم‌راستا با نتایج به دست آمده در تحقیقی اثر پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی بر رشد، شاخص تغذیه-ای، کلنی روده و پارامترهای سلامتی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد و هیچ اثر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیافتند (Merrifield *et al.*, 2010). همچنین در مطالعه-ای بر روی ماهی قزل‌آلای گزارش کردند که تیمارهای حاوی ۱٪ و ۲٪ گالاتوالیگوساکاراید اثر معنی‌داری بر فاکتورهای رشد ندارد و فقط تا حدودی توانست در کاهش ضریب تبدیل غذایی مؤثر ب‌همچنین تیمارهای حاوی ۱٪ و ۲٪ گالاتوالیگوساکاراید به‌طور معنی‌داری مقاومت بیشتری در برابر تنش شوری نسبت به گروه شاهد (صفر درصد) نشان داد (Hoseinifar *et al.*, 2013). همچنین در مطالعه جنابی حق‌پرست و همکاران ترکیب پروبیوتیک باکتوسل و پریوتیک مانان‌الیگوساکاراید را بر رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که تیمارهای تغذیه‌شده با پروبیوتیک و پریوتیک دارای شاخص‌های رشد (درصد افزایش وزن، ضریب تبدیل غذایی، شاخص وضعیت و نرخ رشد ویژه) بهتری در مقایسه با ماهیان شاهد بود (جنابی حق‌پرست و همکاران، ۱۳۹۲). در تحقیق دیگری قبادی و همکاران (۱۳۹۶) اثرات مکمل نوکلوتیدی جیره و پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی را بر عملکرد رشد و برخی از شاخص‌های ایمنی بررسی کردند که نتایج حاکی از افزایش مقاومت در برابر بیماری در تیمار سین بیوتیک بود (قبادی و همکاران، ۱۳۹۶).

گزارش‌های متفاوت محققان ممکن است ناشی از تفاوت گونه پرورشی، اندازه، سن، طول دوره پرورش، شرایط محیطی و بهداشتی نگهداری موجود، رفتارهای تغذیه‌ای، خصوصیات فیزیولوژیک موجود، نوع مواد اولیه به کاررفته در تهیه جیره و کمیت و کیفیت آن‌ها، فرمولاسیون جیره غذایی، درجه خلوص و میزان مورد استفاده آن در جیره، نحوه اضافه کردن مکمل جیره و احتمالاً فلور میکروبی ویژه‌ای که قادر به استفاده از آن به‌عنوان سوبسترا هستند، باشد. این امر بر تأثیر انواع مکمل‌های غذایی روی رشد و بازماندگی نیز مؤثر می‌باشد.

همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که برخی شاخص‌های تخمک‌شناختی و اسپرم‌شناختی در تیمار سین بیوتیک اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت، اما در شاخص‌های دیگر از جمله تراکم اسپرم، اسپرماتوکریت و پلاسمای سمینال با وجود روند افزایش اختلاف معنی‌دار نبود. با این حال چون استفاده از سین بیوتیک موجب تحریک آنزیم‌های گوارشی روده و افزایش مصرف غذا و جذب انرژی بیشتر شده در نتیجه روی بهبود کیفیت اسپرم اثرگذار است به همین دلیل شاخص مدت تحرک اسپرم در تیمارهای سین بیوتیک و پروبیوتیک با تیمار شاهد اختلاف معنی‌دار داشت و بیشترین مدت زمان تحرک در تیمار سین بیوتیک بود. بیشترین میزان قطر تخمک در تیمار پروبیوتیک و بیشترین میزان فضای زرده در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد و اختلاف معنی‌داری را نشان داد. با توجه به نتایج تیمار سین بیوتیک عملکرد بهتری داشته است.

هم‌راستا با این نتایج در تحقیقی، تغذیه ماهی گورخری با جیره‌های حاوی *Lb. rhamnosus* (به میزان  $10^6$  CFU/g) به مدت ۱۰ روز به‌طور معنی‌داری

پروتئولیتیکوس<sup>۲</sup>، موجب افزایش قابلیت هضم و جذب پروتئین‌ها در روده‌ی این ماهیان می‌شود (De Schrijver and Ollevier, 2000).

می‌دانیم پروتئین‌ها و اسیدهای چرب از ترکیبات بسیار اساسی در تشکیل زرده بوده و وجود آن‌ها در جیره‌ی غذایی ماهیان مولد از نقطه نظر تکامل و بلوغ اووسیت‌ها و نیز افزایش نرخ زرده سازی<sup>۳</sup> بسیار ضروری می‌باشند (Qiao, 2016)؛ بنابراین پروبیوتیک‌ها از طریق تأثیری که در ساخت ترکیبات غذایی مختلف به‌ویژه پروتئین‌ها و اسیدهای چرب دارند می‌توانند در زرده سازی و بلوغ اووسیت‌ها نقش داشته باشند. اسیدهای چرب علاوه بر نقشی که در بحث فیزیولوژی تولیدمثل در ماهیان دارند، در تأمین انرژی موردنیاز برای فعالیت‌های تولیدمثلی نیز نقش دارد.

به‌طور کلی تولید لاروهای سالم با کمترین میزان ناهنجاری‌ها، علاوه بر وراثت و عوامل محیطی به تغذیه نیز بستگی دارد. در رابطه با تغذیه، متعادل بودن جیره‌ی غذایی مولدین از نظر چربی، پروتئین، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و رنگ‌دانه‌ها می‌توانند در مراحل مختلف تولیدمثل مانند هماوری، لقاح، تفریح تخم و توسعه لارو مؤثر باشند (Fernández et al., 2018)، همچنین استفاده از مکمل‌های غذایی مانند هورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها در جیره غذایی مولدین می‌تواند بر تعادل میکروفلور میکروبی روده و دستگاه گوارش مؤثر باشد (De et al., 2018). از این رو تغذیه ماهیان با پروبیوتیک‌ها در جیره موجب بازسازی و تقویت توازن

سبب افزایش اوولاسیون تخمک‌ها شد، طبق این بررسی *Lb. rhamnosus* می‌تواند تأثیر مثبتی بر فاز رشد و رسیدگی گناد جنسی داشته باشد (Gioacchini et al., 2010). همچنین در مطالعه دیگری تأثیر *Lb. rhamnosus* بر تولیدمثل ماهی *killifish* بررسی شد نتایج حاصل افزایش معنی‌داری در هماوری و شاخص گنادوسوماتیک نشان داد (Lombardo et al., 2011). در تحقیق Ghosh و همکاران با افزودن باکتری پروبیوتیکی باسیلوس سابتیلیس به جیره‌ی غذایی ماهیان دم‌شمشیری و پلاتی، عملکرد تولیدمثلی آن‌ها را مورد مطالعه قرار دادند و نتایج نشان داد که پروبیوتیک مذکور به‌طور معنی‌داری سبب افزایش شاخص گنادوسوماتیک، هماوری، تولید لارو، طول و وزن لاروها در ماهیان شد (Ghosh et al., 2007).

به‌طور کلی باکتری‌های پروبیوتیکی با قرار گرفتن در روده و تثبیت شدن در محل مناسب سبب ساخت ترکیبات غذایی ضروری (پروتئین‌ها و اسیدهای چرب ضروری) و تولید آنزیم‌های ویژه (آمیلاز، پروتئاز و لیپاز) می‌شوند (Rather et al., 2017). به‌علاوه باکتری‌های پروبیوتیکی موجود در دستگاه گوارش ماهی سبب افزایش ساخت و ترشح آنزیم‌های گوارشی میزبان نیز می‌شوند (Langford, 2018). مجموعه‌ی این آنزیم‌ها در نهایت منجر به افزایش قابلیت هضم چربی‌ها و پروتئین‌های موجود در جیره غذایی شده و کارایی تغذیه در ماهی میزبان به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. در تأیید این مطلب گزارش کردند که تغذیه‌ی بچه ماهیان اسکافتالموس ماکسیموس<sup>۱</sup> با جیره‌های غذایی حاوی باکتری پروبیوتیکی و بی‌ریو

<sup>2</sup>- *Vibrio proteolyticus*

<sup>3</sup>- Vitelligenesis

<sup>1</sup>- *Scophthalmus maximus*

ماهیان انگشت قد قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). رساله دکتری، دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ صفحه.

۴. جنابی حق پرست، ر.، مشکینی، س.، توکمه چی، ا.، ۱۳۹۲. اثرات پری بیوتیک مانان الیگوساکارید بر رشد و ایمنی در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان، مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۸ (۴)، ۳۷۵ تا ۳۸۲.
۵. قبادی، م.، میرواقفی، ع.، فرهمند، ح.، ۱۳۹۶. ارزیابی بررسی اثرات مکمل نوکلئوتیدی جیره و پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدی لاکتیکی بر شاخص های رشد، بیوشیمیایی و ایمنی سرم خون و بازماندگی ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) پس از رویارویی با باکتری *Aeromonas hydrophila*، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۹ (۴)، ۴۰۷ تا ۴۱۶.

6. Abasali, H., Mohamad, S., 2010. Effect of dietary supplementation with probiotic on reproductive performance of female livebearing ornamental fish. Research Journal of Animal Sciences, 4, 103-107.
7. Ai, Q., Mai, K., Zhang, L., Tan, B., Zhang, W., Xu, W., Li, H., 2007. Effects of dietary  $\beta$ -1, 3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish & shellfish immunology, 22, 394-402.
8. Alavi, S.H., Rodina, M., Policar, T., Linhart, O., 2009. Relationship between semen characteristics and body size in *Barbus barbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 153, 430-437.
9. Alavi, S.M., Jorfi, E., Hatef, A., Saheb Mortezaei, S.A., 2010. Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbus sharpeyi* (Günther, 1874). Aquaculture research, 41(10), e688-e694.

میکروبی روده گردیده و از طریق افزایش مواد معدنی در دسترس، ویتامین ها و تولید آنزیم های گوارشی بر تولید مثل ماهیان اثر می گذارد (Gasco et al., 2018). در مجموع نتایج مطالعه انجام شده حاکی از آن است که استفاده هم زمان پروبیوتیک *P. acidilactici* و پریبیوتیک *Raffinos* که تحت عنوان سین بیوتیک مطرح می شود می تواند اثر هم افزایی داشته باشد و عملکرد بهتری نسبت به استفاده مجزا از پروبیوتیک و پریبیوتیک داشته باشد و می تواند به عنوان یک راهکار در بهبود عملکرد تولید مثلی مورد توجه قرار گیرد.

### سپاسگزاری

بدین وسیله از کارکنان مرکز تحقیقات آبی پروری دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به واسطه همکاری تنگاتنگ در انجام این پژوهش کمال تشکر و امتنان را داریم.

### منابع

۱. برادران نویری، ش و حسن زاده صابر، م.، ۱۳۹۷. روش های ارزیابی کیفیت اسپرم ماهیان، نشریه توسعه آبی پروری، ۱۲ (۳)، ۱۵ تا ۲۹.
۲. بینایی، م.، پور غلام، ر.، برادران نویری، ش.، قیاسی، م.، بهمنی، م و قانعی تهران، م.، ۱۳۹۵. ارزیابی کیفیت اسپرم ماهیان سفید (*Rutilus kutum*) کو آزاد دریای خزر (*Salmon trutta caspius*) قبل و بعد از انجماد، نشریه توسعه آبی پروری، ۱۰ (۳)، ۵۷ تا ۶۷.
۳. جعفرنوده، ع.، ۱۳۹۵. بررسی خواص سینرژیستی برخی اسیدهای آلی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازنی (*Lactobacillus casei*) در پرورش بچه

- dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. *Aquaculture* 186, 107-116.
17. Fernández, I., Gavaia, P., Darias, M.J., Gisbert, E., 2018. Fat-Soluble Vitamins in Fish: A Transcriptional Tissue-Specific Crosstalk that Remains to be Unveiled and Characterized. In: *Emerging Issues in Fish Larvae Research*. Springer, pp. 159-208.
  18. Gasco, L., Gai, F., Maricchiolo, G., Genovese, L., Ragonese, S., Bottari, T., Caruso, G., 2018. Supplementation of Vitamins, Minerals, Enzymes and Antioxidants in Fish Feeds. In: *Feeds for the Aquaculture Sector*. Springer, pp. 63-103.
  19. Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C., 2007. Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture research*, 38, 518-526.
  20. Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., et al. 2017. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 14, 491.
  21. Gioacchini, G., Maradonna, F., Lombardo, F., Bizzaro, D., Olivotto, I., Carnevali, O., 2010. Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction*, 140, 953-959.
  22. Hatef, A., Niksirat, H., Amiri, B.M., Alavi, S.M.H., Karami, M., 2007. Sperm density, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). *Aquaculture research*, 38, 1175-1181.
  23. Hevrøy, E., Espe, M., Waagbø, R., Sandnes, K., Ruud, M., HEMRE, G.I., 2005. Nutrient utilization in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed increased levels of fish protein hydrolysate during a period of fast growth. *Aquaculture Nutrition*, 11, 301-313.
  10. Bekcan, S., Dogankaya, L., Cakirogullari, G.C., 2006. Growth and body composition of European catfish (*Silurus glanis* L.) fed diets containing different percentages of protein.
  11. Bozkurt, Y., 2006. The relationship between body condition, sperm quality parameters and fertilization success in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5, 284-288.
  12. Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chim, L., 2010. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish & shellfish immunology*, 28, 622-631.
  13. Cejko, B.I., Horváth, Á., Kollár, T., Kása, E., Lujić, J., Marinović, Z., Urbányi, B., Kowalsk, R.K., 2018. Optimisation of sodium and potassium concentrations and pH in the artificial seminal plasma of common carp *Cyprinus carpio* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-8.
  14. Chen, M., Wang, S., Liang, X., Ma, D., He, L., Liu, Y., 2017. Effect of Dietary Acidolysis-Oxidized Konjac Glucomannan Supplementation on Serum Immune Parameters and Intestinal Immune-Related Gene Expression of *Schizothorax prenanti*. *International journal of molecular sciences*, 18, 2558.
  15. De, S., Mondal, T., Bera, A., Mannas, S., Gantait, T., Maity, S., Dutta, N., De, S., Charkorborty, P., 2018. Studies on the effect of commercial and formulated probiotic application in the growth performance and intestinal microbial flora of the cat fish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *International Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 202-205.
  16. De Schrijver, R., Ollevier, F., 2000. Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of

- applications for salmonids. *Aquaculture*, 302, 1-18.
33. Mizraji, R., Ahrendt, C., Perez-Venegas, D., et al. 2017. Is the feeding type related with the content of microplastics in intertidal fish gut? *Marine pollution bulletin*, 116, 498-500.
  34. Qiao, Q., 2016. Reprotoxic effects of microcystins and secondary metabolites produced by cyanobacteria *Microcystis* in adult medaka fish. Paris, Muséum national d'histoire naturelle.
  35. Rather, S.A., Akhter, R., Masoodi, F., Gani, A., Wani, S., 2017. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT-Food Science and Technology*, 83, 50-58.
  36. Shah, M.R., Lutz, G.A., Alam, A., et al. 2018. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. *Journal of Applied Phycology*, 30, 197-213.
  37. Tengeler, A.C., Kozicz, T., Kiliaan, A.J., 2018. Relationship between diet, the gut microbiota, and brain function. *Nutrition reviews*, 76(8):603-617.
  38. Verma, D., Routray, P., Dash, C., Dasgupta, S., Jena, J., 2009. Physical and biochemical characteristics of semen and ultrastructure of spermatozoa in six carp species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 9, 67-76.
  39. Źarski, D., Horváth, Á., Bernáth, G., Krejszeff, S., Radóczy, J., Palińska-Źarska, K., Bokor, Z., Kupren, K., Urbányi, B., 2017. Evaluation of Gamete Quality. In: *Controlled Reproduction of Wild Eurasian Perch*. Springer, pp. 61-72.
  24. Hirohashi, N., Yanagimachi, R., 2018. Sperm acrosome reaction: Its site and role in fertilization. *Biology of reproduction*, 99(1), 127-133.
  25. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rostami, H.K., Esteban, M.Á., 2013. Dietary galactooligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. *Fish & shellfish immunology*, 35, 1416-1420.
  26. Hoshino, É.d.M., Hoshino, M.D.F.G., Tavares-Dias, M., 2018. Parasites of ornamental fish commercialized in Macapá, Amapá State (Brazil). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(1), 74-79.
  27. Kalbassi, M., Lorestani, R., G Marammazi, J., 2014. Improvement of Sperm Quality Indices of Benni Fish (*Barbus sharpeyi*) by Application of LHRHA2 and Metoclopramide. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 91-104.
  28. Khan, S.H., Ansari, F.A., 2007. Probiotics-the friendly bacteria with market potential in global market. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 20, 76-82.
  29. Langford, C.J., 2018. Method of enhancing palatability of a dietary supplement to animal food. Google Patents.
  30. Liu, X., Sha, Z., Wang, C., Li, D., Bureau, D.P., 2018. A web-based combined nutritional model to precisely predict growth, feed requirement and waste output of gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) in aquaculture operations. *Aquaculture*, 492, 335-348.
  31. Lombardo, F., Gioacchini, G., Carnevali, O., 2011. Probiotic-based nutritional effects on killifish reproduction. *Fisheries and Aquaculture Journal*, FAJ-33.
  32. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., et al. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic