

## اثرات مکمل‌های غذایی میکروبی بر تکثیر ماهیان زینتی

سید حسین حسینی فر<sup>۱\*</sup>، فاضل ظهیری<sup>۱</sup>

۱- گروه تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

\*Hoseinifar@gau.ac.ir

تاریخ پذیرش: بهمن ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۳

### چکیده

صنعت آبی پروری تجاری و تزئینی طی دهه اخیر رشد و توسعه فراوانی داشته است. همگام با این رشد و توسعه، انجام تحقیقات در زمینه جنبه‌های مختلف تکثیر و پرورش ماهیان زینتی حائز اهمیت است. علی‌رغم انجام مطالعات فراوان در زمینه اثرات مکمل‌های غذایی میکروبی شامل پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها بر کارایی رشد، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری ماهیان مطالعات محدودی در زمینه اثرات احتمالی و مکانیسم اثر مکمل‌های غذایی میکروبی بر عملکرد تولید مثلی ماهیان زینتی صورت پذیرفته است. نتایج مطالعات انجام شده در زمینه اثرات پروبیوتیک‌ها بر عملکرد تولید مثلی گونه‌های آب‌های شیرین مانند ماهی گوپی (*Poecilia reticulata*)، مولی (*Poecilia sphenops*)، ماهی دم شمشیری سبز (*Xiphophorus helleri*)، ماهی پلتي (*Xiphophorus maculatus*) و یا ماهی گورخری حاکی از اثرات مثبت استفاده از پروبیوتیک‌ها بر عملکرد تولید مثلی بوده است. این نتایج نشان دهنده وجود ارتباطی بین میکروبیوتای روده‌ای و فرآیندهای تولید مثلی می‌باشد. اگرچه هنوز مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها بر عملکرد تولید مثلی به خوبی تبیین نشده است و نیازمند مطالعات بیشتری است.

**کلمات کلیدی:** مکمل میکروبی، تکثیر، آبی پروری، ماهی زینتی.

## مقدمه

صنعت آبی پروری در سالیان اخیر رشد و توسعه فراوانی داشته به طوری که نرخ رشد سالانه آن بیشتر از سایر صنایع بوده است (FAO, 2014). تکثیر و پرورش ماهیان زینتی نیز به دلیل اهمیت اقتصادی بالای آن توسعه چشمگیری داشته است. در این راستا تعداد گونه‌های آبی که به منظور آبی‌پروری تجاری و یا زینتی مورد پرورش قرار گرفته‌اند به سرعت رو به افزایش است (Firouzbaksh et al., 2011). از این رو انجام تحقیقات کاربردی در زمینه جنبه‌های مختلف تکثیر و پرورش ماهیان آکواریومی از جمله کارایی رشد، افزایش مقاومت و پاسخ ایمنی و نیز بیوتکنیک تکثیر ضروری به نظر می‌رسد (Hoseinifar et al., 2015b). در سالیان اخیر استفاده از مکمل‌های غذایی و به خصوص مکمل‌های غذایی میکروبی در جیره غذایی ماهیان پرورشی تجاری و تزئینی مورد توجه بوده است. مکمل‌های غذایی میکروبی عمدتاً شامل پروبیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها می‌باشد (Ringø et al., 2014). پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌ها یا محصولات آن‌ها هستند که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان خود دارند. انواع مختلفی از میکروارگ‌ها (*Tetraselmis*)، مخمرها (*Phaffia*، *Bacillus*)، باکتری‌های گرم مثبت (*Saccharomyces*، *Carnobacterium*، *Enterococcus*، *Lactobacillus*، *Lactococcus*، *Micrococcus*، *Streptococcus* & *Weissella*) و باکتری‌های گرم منفی (*Aeromonas*، *Alteromonas*)، به عنوان پروبیوتیک بررسی شده‌اند (Irianto and Austin, 2002). دسته دیگر از مکمل‌های غذایی پروبیوتیک‌ها هستند که شامل مواد غذایی غیر قابل هضم برای میزبان هستند که توسط باکتری‌های موجود در میکروبیوتای روده‌ای مصرف شده و سبب افزایش تعداد و غالبیت باکتری‌های بالقوه مفید (مانند باکتری‌های اسید لاکتیک) می‌شوند (Hoseinifar et al., 2014). سین‌بیوتیک به استفاده توأم از پروبیوتیک و پریبیوتیک اطلاق می‌شود. محققین بسیاری اثرات مثبت مکمل‌های غذایی میکروبی را بر کارایی رشد، ایمنی و مقاومت در برابر بیماری گزارش کرده‌اند (Hoseinifar et al., 2015a; Ringø et al., 2014). یکی از جنبه‌های که اخیراً در تحقیقات مورد توجه بوده است تعیین اثرات احتمالی و مکانیسم اثرگذاری مکمل‌های غذای میکروبی بر تکثیر ماهیان زینتی بوده است. با توجه به اهمیت این موضوع به عنوان یک راهبرد جالب توجه در تکثیر ماهیان زینتی در این مقاله مروری یافته‌های موجود به‌طور اجمالی مورد بحث و بررسی قرار گرفته‌اند.

## اثرات به کارگیری مکمل‌های غذایی میکروبی

## بر تولید مثل در ماهیان تزئینی

استفاده از مکمل‌های غذایی میکروبی و به ویژه پروبیوتیک‌ها در طی دهه اخیر بسیار مورد توجه بوده است و تحقیقات گسترده‌ای در خصوص صورت پذیرفته است. این تحقیقات عمدتاً متمرکز بر تعیین اثرات و مکانیسم اثر بر شاخص‌های رشد، پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری بوده است ولی علی‌رغم علاقه‌مندی زیاد به استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنعت پرورش ماهی، مطالعات محدودی در زمینه اثرات پروبیوتیک‌ها بر تولید مثل ماهیان صورت پذیرفته است (Ghosh et al., 2007). در این مطالعات اثرات استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی بر عملکرد تولید مثلی گونه‌های آب‌های شیرین مانند ماهی گوبی (*Poecilia reticulata*)، مولی (*Xiphophorus helleri*)، ماهی پلنتی (*Xiphophorus maculatus*) و یا ماهی گورخری بررسی شده است (Ghosh et al., 2007, Abasali and Mohamad, 2010, Gioacchini et al., 2010).

اجزاء جیره مولدین مانند چربی، پروتئین، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و کاراتنوئید می‌توانند اثرات شگرفی در مراحل مختلف تولید مثل مانند هم‌آوری، لقاح، تفریح تخم و توسعه لارو داشته باشند (Izquierdo et al., 2001). همچنین گزارش شده است که بکارگیری هورمون‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، مکمل‌های گیاهی در جیره غذایی مولدین می‌تواند اثرات زیادی بر جوامع میکروبی و فعالیت آنها در دستگاه گوارش مولدین داشته باشند (Nayak, 2010, Sullam et al., 2012). به نظر می‌رسد مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها بر تولید مثل ماهی‌ها نیز به همین دلیل بوده و تغذیه ماهیان مولد با پروبیوتیک‌ها در جیره می‌تواند سبب بازسازی و تقویت توازن میکروبی روده شده و از طریق افزایش مواد معدنی در دسترس، ویتامین‌ها و تولید آنزیم‌های گوارشی مهم و یا متابولیت‌ها بر تولید مثل ماهیان موثر باشند (Holzapfel et al., 1998). اگرچه میزان مقالات موجود در این زمینه محدود است، ولی نتایج به دست آمده تا این زمان بسیار امیدوارکننده بوده و به طور مشخص، نشان‌دهنده اثرات مثبت به کارگیری پروبیوتیک‌ها بر فرآیندهای تولید مثلی مولدین ماده می‌باشد.

## اثرات پروبیوتیک‌ها بر تولید مثل گونه‌های ماهیان تزئینی زنده‌زا

یکی از انواع مهم ماهی‌های زینتی که علاقه‌مندان زیادی دارد ماهی‌های زنده‌زا می‌باشند. اولین مطالعه در خصوص بکارگیری پروبیوتیک در ماهی‌های زنده‌زا توسط Ghosh و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. در این مطالعه اثرات باکتری پروبیوتیکی *Bacillus subtilis* جدا شده از روده کپور مریگال (*Cirrhinus mrigala*) بر عملکرد تولید مثلی چهار گونه از ماهیان زینتی زنده‌زا شامل گویی، مولی، دم شمشیری سبز و پلتی بررسی شد. سطوح استفاده شده باکتری پروبیوتیک در جیره ماهی‌ها ۴ سطح،  $10^5 \times 5$ ،  $10^6 \times 5$  و  $10^7 \times 5$  و  $10^8 \times 5$  باکتری به ازای گرم بود. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از پروبیوتیک سبب بهبود معنی‌دار شاخص گنادوسوماتیک و هم‌آوری و تخم‌ریزی ماهیان ماده در همه گونه‌ها می‌شود. همچنین بررسی طول و وزن بچه ماهی‌ها در همه گونه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک به طور معنی‌داری بیشتر از گروه شاهد بود. علاوه بر این تلفات و بد شکلی بچه ماهیان در تیمار تغذیه شده با پروبیوتیک کاهش یافت. بررسی آماری نتایج به دست آمده نشان داد که اثرات مثبت پروبیوتیک وابسته به دوز نبود و استفاده از مقادیر بیشتر، لزوماً منجر به عملکرد تولید مثلی بهتری در مولدین نمی‌گردد. همچنین در مطالعه دیگری عباسعلی و محمد (۲۰۱۱) اثرات استفاده از مخلوط پروبیوتیک تجاری پریمالاک، متشکل از نسبت مساوی باکتری‌های بیفیدوباکتریوم ترموفیلوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، انتروکوکوس فیسیوم را در جیره ماهی پلتی بررسی کردند. پس از بیست و شش هفته تیمار با پروبیوتیک با غلظت‌های مختلف (۰/۰۹، ۰/۰۴ و ۰/۱۴ درصد جیره) بهبود شاخص گنادوسوماتیک در مولدین ماده‌ها مشاهده شد. علاوه بر این لاروهای به دست آمده از ماده‌ها تغذیه شده با پروبیوتیک طول و میزان بازماندگی بیشتری را در مقایسه با لاروهای گروه شاهد نشان دادند. هرچند از نظر وزن و میزان بدشکلی تفاوت معنی‌داری بین تیمار پروبیوتیک و شاهد مشاهده نشد.

## اثرات پروبیوتیک‌ها بر تولید مثل ماهی گور خری

ماهی گور خری علاوه بر اهمیت به‌عنوان ماهی زینتی، به دلیل دارا بودن ویژگی‌های مناسب بسیاری مانند شناسایی کامل توالی ژنومی،

سهولت پرورش، سایز کوچک و مراحل لاروی کوتاه مدت یک ارگانیزم مهره‌دار مدل عالی جهت مطالعات ژنتیکی انسانی، مطالعات تولید مثلی و تکاملی بشمار می‌آید (Keller and Murtha, 2004, Penberthy et al., 2002). در برخی از مطالعات اخیر اثرات پروبیوتیک تجاری (*Lactobacillus rhamnosus* Synbiotec Srl) ساخت ایتالیا) بر عملکرد تولید مثلی این ارگانیزم مدل بررسی شده است. اگرچه هنوز نتایج به دست آمده در سطوح مولکولی، ماکرومولکولی و فیزیولوژیک کامل نیستند ولی اطلاعات زیادی را در خصوص مکانیسم‌های احتمالی اثر پروبیوتیک‌ها بر عملکرد تولید مثلی به دست می‌دهند.

تغذیه ماهی گور خری با جیره‌های حاوی *Lb. rhamnosus* (به میزان  $10^6$  CFU در گرم) به مدت ۱۰ روز به طور معنی‌داری سبب افزایش اوولاسیون تخم‌ها شد (Gioacchini et al., 2010). همچنین نرخ تفریح بالاتر و تکوین جنینی سریعتر در ماهیان گور خری ماده تغذیه شده با *Lb. rhamnosus* مشاهده گردید، به طوری که تفریح در ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک ۴ ساعت زودتر از گروه شاهد اتفاق افتاد (Gioacchini et al., 2010). بررسی میکروبیوتای روده‌ای مولدین ماده تغذیه شده با پروبیوتیک با استفاده از روش مبتنی بر کشت و غیرمبتنی بر کشت نشان‌دهنده تغییراتی در میکروبیوتای روده و بخصوص سطوح بالای *Lb. rhamnosus* در ماهی‌های تحت تیمار بود (Gioacchini et al., 2011). همچنین بررسی جوامع باکتریایی روده با استفاده از روش PCR-DGGE نشان داد که پروبیوتیک‌ها نه تنها قادر به تشکیل کلونی در دستگاه گوارش می‌باشند بلکه قادر به مدولاسیون جوامع میکروبی هستند؛ به طوری که تغییر مشخصی در جوامع میکروبی و به خصوص افزایش حضور یک باکتری اسید لاکتیک دیگر به نام *Streptococcus thermophiles* مشاهده شد. در ارتباط با اثرات به کارگیری *Lb. rhamnosus* روی تکوین تخمدان، نتایج به دست آمده موید اثرات مثبت آن بر فازهای رشد و رسیدگی بود. همچنین مطالعه بافت شناسی تخمدان ماهی‌های تیمار شده با پروبیوتیک افزایشی در فولیکول‌های در حال زرده‌سازی نشان داد (Gioacchini et al., 2010, Gioacchini et al., 2011). بعلاوه بررسی بیان ژن سیتوکروم p 19 (*cyp19a*) افزایشی معنی‌داری در گروه پروبیوتیک نشان داد که این ژن کد کننده آنزیم دخیل در تبدیل نهایی تستوسترون به استرادیول در تخمدان و ویتیلوژنین (*vtg*) و ایزوفرم آلفا گیرنده استرادیول (*era*) در کبد می‌باشد (Gioacchini et al., 2011). تحقیقات انجام شده نشان دادند اوسیت‌های ماهیان ماده تغذیه شده با پروبیوتیک میزان بالاتر

تا حد کمی شناخته شده است. Gioacchini و همکاران (۲۰۱۱) براساس تفسیر یافته‌های به دست آمده از PCR-DGGE بیان کردند احتمالاً سوای از اثرات مستقیم بر میکروبیوتای روده‌ای، پروبیوتیک مستقیماً در ارتباط با تخمدان‌ها نمی‌باشد. همچنین همین محققین نشان دادند که در هر دو سطح گوارشی و مغزی استفاده از پروبیوتیک سبب افزایش معنی‌دار بیان ژن لپتین می‌شود که یک هورمون کلیدی در هموستازی انرژی و کارکردهای نورواندوکرین می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهند که پروبیوتیک می‌تواند به طور غیر مستقیم از طریق فعال‌سازی یک هورمون متابولیک قوی مانند لپتین عمل کند.

در حال حاضر هیچگونه مطالعه‌ای در مقیاس وسیع در خصوص گونه‌های مهم تجاری که مواجه با اختلالات عملکرد تولید مثلی در شرایط اسارت هستند، انجام نشده است. نتایج به دست آمده از این مطالعات پایه‌ای را برای مطالعات آینده در خصوص بهبود جیره‌ای عملکرد تولید مثلی فراهم می‌آورد. همچنین با توجه خلاء تحقیقاتی موجود، می‌بایست پژوهش‌هایی در زمینه اثرات پروبیوتیک بر عملکرد تولید مثلی و توسعه گنادهای نر انجام شود. در مجموع نتایج مطالعات انجام شده حاکی از اهمیت میکروبیوتای روده‌ای در فرآیندها و عملکرد تولید مثلی است و موید این امر است که استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌تواند به عنوان یک راهبرد جدید در بهبود عملکرد تولید مثلی مورد توجه قرار گیرد.

## منابع

- Abasali, H. and 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.
- FAO, 2014. Aquaculture Department (2014) The state of world fisheries and aquaculture 2014. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*, 243 p.
- Firouzbakhsh, F., Noori, F., Khalesi, M.K. and Jani-Khalili, K., 2011. Effects of a probiotic, protexin, on the growth performance and hematological parameters in the Oscar (*Astronotus ocellatus*) fingerlings. *Fish physiology and biochemistry*, 37, 833-842.

GVBD داشتند که حاکی از نقش تحریک‌کنندگی *Lb. rhamnosus* بر فاز رسیدگی فولیکول‌ها می‌باشد (Gioacchini et al., 2010).

نتایج به دست آمده از مطالعات صورت پذیرفته در سطح مولکولی در ناحیه تخمدان ماهی‌های تغذیه شده با پروبیوتیک افزایش بیان ژن‌های کدکننده سیگنال‌هایی که فاز رسیدگی را تحریک می‌کنند (مانند ژن‌های *cyclin*, *amprβ*, *20β-hsd*, *lhr*, *activinβA1*, *B*, *smad2*)، را همراه با کاهش بیان ژن‌های کدکننده فاکتورهایی که مانع رسیدگی اووسیت می‌شوند (مانند *tgfb1*, *gdf9* و *bmp15*) نشان داد. Gioacchini و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند که تغذیه مولدین ماده با پروبیوتیک *Lb. rhamnosus* سبب جلوگیری از آپوپتوزیس فولیکولی و بهبود بقای فولیکولی می‌گردد (Gioacchini et al., 2013).

## اثرات پروبیوتیک بر تولید مثل killifish

مرور منابع انجام شده نشان داد که تنها یک مطالعه به بررسی اثرات پروبیوتیک بر تولید مثل killifish پرداخته است. لامباردو و همکاران (۲۰۱۱) اثرات پروبیوتیک *Lb. rhamnosus* را در سطح  $10^6$  CFU به ازای گرم در جیره غذایی killifish بررسی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه مولدین killifish با *Lb. rhamnosus* به مدت ده روز سبب افزایش معنی‌دار هم‌آوری (افزایش دو برابری در مقایسه با گروه شاهد) و مقادیر بالاتر شاخص گنادوسوماتیک (افزایش پانزده درصدی در مقایسه با گروه شاهد) گردید (Lombardo et al., 2011). اگرچه بکارگیری *Lb. rhamnosus* در جیره غذایی مولدین اثر معنی‌داری بر سرعت تکامل جنینی نداشت، میزان بازماندگی جنین به‌طور معنی‌داری در تیمار پروبیوتیک افزایش یافت همچنین لاروهای به دست آمده از مولدین تحت تیمار با پروبیوتیک میزان وزن و طول کل بیشتری در مقایسه با گروه شاهد داشتند. با این حال استفاده از پروبیوتیک اثری چشمگیری بر بازماندگی لاروها نداشت (Lombardo et al., 2011).

## جمع بندی و چشم انداز آینده

براساس مطالعاتی که در بالا بیان شد به نظر می‌رسد که به کارگیری پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی مولدین اثرات مثبتی بر تولید مثل ماهیان آکواریومی دارد. اگرچه مکانیسم‌هایی که به وسیله آنها پروبیوتیک‌ها باعث بهبود عملکرد تولید مثلی می‌شوند

- Hoseinifar, S.H., Roosta, Z., Hajimoradloo, A. and Vakili, F., 2015b.** 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 Immunology*, 42, 533-538.
- Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, 25, 633-642.
- Izquierdo, M., Fernandez-Palacios, H. and Tacon, A., 2001.** Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25-42.
- Keller, E.T. and Murtha, J.M., 2004.** The use of mature zebrafish (*Danio rerio*) as a model for human aging and disease. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138, 335-341.
- Lombardo, F., Gioacchini, G. and Carnevali, O., 2011.** Probiotic-based nutritional effects on killifish reproduction. *Fisheries and Aquaculture Journal, FAJ-33*, 1-11
- Nayak, S.K., 2010.** Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquaculture Research*, 41, 1553-1573.
- Penberthy, W.T., Shafizadeh, E. and Lin, S., 2002.** The zebrafish as a model for human disease. *Frontiers in Bioscience*, 7, D1439-D1453.
- Ringø, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S.H. and Davies, S.J., 2014.** Prebiotics in Finfish: An Update In *Aquaculture Nutrition*, pp. 360-400 . John Wiley & Sons, Ltd.
- Sullam, K.E., Essinger, S.D., Lozupone, C.A., O'CONNOR, M.P., Rosen, G.L., Knight, R., Kilham, S.S. and Russell, J.A., 2012.** Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. *Molecular ecology*, 21, 3363-3378.
- Ghosh, S., Sinha, A. and Sahu, C., 2007.** Effect of probiotic on reproductive performance in female livebearing ornamental fish. *Aquaculture Research*, 38, 518-526.
- Gioacchini, G., Dalla Valle, L., Benato, F., Fimia, G.M., Nardacci, R., Ciccocanti, F., Piacentini, M., Borini, A. and Carnevali, O., 2013.** Interplay between autophagy and apoptosis in the development of *Danio rerio* follicles and the effects of a probiotic. *Reproduction, Fertility and Development*, 25, 1115-1125.
- Gioacchini, G., Lombardo, F., Merrifield, D., Silvi, S., Cresci, A., Avella, M. and Carnevali, O., 2011.** Effects of probiotics on Zebrafish reproduction. *Journal of Aquaculture Research and Development*, S1:002. doi:10.4172/2155-9546.S1-002.
- Gioacchini, G., Maradonna, F., Lombardo, F., Bizzaro, D., Olivotto, I. and Carnevali, O., 2010.** Increase of fecundity by probiotic administration in zebrafish (*Danio rerio*). *Reproduction*, 140, 953-959.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and in't Veld, J.H.H., 1998.** Overview of gut flora and probiotics. *International journal of food microbiology*, 41, 85-101.
- Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A. and Sun, Y.Z., 2015a.** Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 23, 315-328.
- Hoseinifar, S.H., Ringø, E., Shenavar Masouleh, A. and Esteban, M.Á., 2014.** Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture*, DOI: 10.1111/raq.12082.