اثرات رژیم غذایی حاوی اسیدآلی و سرکه سیب بر یک‌پارچگی هپاتوپانکراس و فلور باکتریایی روده در میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

- **سجاد پورمظفر***: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **عبدالمجید حاجی‌مرادلو**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥
- **حمیدرضا احمدنیای مطلق**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
- **رضا گودرزی**: گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: ٤٨٧-٤٩١٧٥

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: آبان ۱۳۹۵

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر جیره غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید بر بافت‌شناسی هپاتوپانکراس، شمارش تعداد هموسیت و فلور باکتریایی روده میگوی وانامی می‌باشد. در این مطالعه تعداد ۲۲۵ قطعه میگو وانامی با وزن ۰/۰٤±۱۰/۲ گرم با رژیم غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید به‌مدت ٦۰ روز تغذیه شدند. تیمارها شامل، سه جیره آزمایشی حاوی سطوح صفر، ۱٪ سرکه سیب و ۰/۵٪ پروپیونیک اسید بود. در پایان دوره به‌صورت تصادفی از میگوها نمونه‌برداری شد. نتایج نشان داد که تعداد کل هموسیت در میگوهای تغذیه شده با جیره غذایی مکمل افزایش معنی‌داری داشت ($p<0/05$). تعداد سلول‌های کیسه‌ای تفاوت معنی‌داری در میان تیمارها مشاهده نشد ($p>0/05$)، درحالی‌که تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در تیمارهای حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید کاهش معنی‌داری داشت و بیش‌ترین کاهش هم در تیمار سرکه سیب به مشاهده شد ($p<0/05$). از طرفی، نتایج نشان داد که قطر توبول‌های هپاتوپانکراس در تیمار پروپیونیک اسید کاهش داشت. هم‌چنین، کل باکتری‌های قابل کشت در روده میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب و پروپیونیک اسید کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($p<0/05$). این یافته‌ها نشان داد که سرکه می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای اسیدهای آلی معرفی شود و هم‌چنین پتانسیل بزرگی برای استفاده از این ماده در جیره غذایی میگوی وانامی وجود دارد.

کلمات کلیدی: سرکه سیب، میگوی وانامی، فلور باکتریایی، هپاتوپانکراس، تعداد هموسیت کل

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sajjad5550@gmail.com

مقدمه

در سال‌های اخیر، صنعت پرورش میگو با چالش‌های بزرگی به دلیل شیوع بیماری‌های باکتریایی و ویروسی مواجه شده است. این امر سبب شده اغلب اوقات پرورش‌دهندگان به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها تمایل پیدا کنند. در سال‌های اخیر، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با مخالفت‌های شدیدی روبه رو شده است. به‌طوری‌که امروزه در صنعت آبزی‌پروری، استفاده از مواد ضدمیکروب به‌ازای هر تن محصول حدود ۷۰۰-۲ گرم می‌باشد (Ng و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین اتحادیه اروپا استفاده از مواد آنتی‌بیوتیک در تولیدات را جانوری ممنوع اعلام کرد (Dasilva و همکاران، ۲۰۱۳). زیرا این مواد اثرات مخربی و بلندمدتی بر محیط‌زیست و مصرف‌کننده نهایی می‌گذارند. به‌هرحال استفاده بلندمدت از این مواد می‌تواند باعث به وجود آمدن مقاومت باکتریایی در میگو شود و هم‌چنین در دوزهای بالاتر نیز می‌تواند تأثیر منفی بر روی رشد و سایر فاکتورهای ایمنی داشته باشد (Romano و همکاران، ۲۰۱۵؛ Ng و همکاران، ۲۰۰۹). به‌طوری‌که استفاده از دوز بالای اکسی تتراسایکلین در جیره غذایی میگوی وانامی موجب کاهش مصرف غذا و افزایش نرم شدن پوست میگو در طول چرخه پوست‌اندازی شد (Bray و همکاران، ۲۰۰۶). بنابراین، علاقه‌مندی گسترده‌ای جهت شناسایی جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفت. به‌طوری‌که، امروزه در صنعت آبزی‌پروری راه‌هایی مختلفی برای بهبود سلامتی هم‌چون استفاده‌ازواکسن(پورمظفروهمکاران،۱۳۹۴)،پربیوتیک (Wongsasak و همکاران، ۲۰۱۵)، پروبیوتیک (Kumar و همکاران، ۲۰۱۳) و مواد گیاهی (Sivagnanavelmurugan و همکاران، ۲۰۱۴) استفاده شده است.امابه‌دلیل عدم وجود سیستم ایمنی اختصاصی در سخت‌پوستان، به‌کارگیری واکسن روش مناسب برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها نمی‌باشد (Tseng و همکاران، ۲۰۰۹). از طرفی، در میگو تجویز مواد محرک ایمنی اغلب به‌صورت خوراکی انجام می‌گیرد (Sivagnanavel murugan و همکاران، ۲۰۱۴). اخیراً یکی از موادی که به‌دلیل اثر ضد میکروبی قوی و خصوصیات پیشگیری‌کننده از بیماری‌ها توجه زیادی رو به‌خود جلب کرد، اسیدهای آلی بود (Ng و همکاران، ۲۰۱۵). اسیدهای آلی، ساختمانی کوتاه زنجیره دارند که شامل پروپیونیک اسید، اسید استیک، فرمیک اسید، سیتریک و لاکتیک اسید می‌شود. این مواد به‌همراه نمک‌هایشان حاوی یک یا چند گروه کربوکسیل (COOH-) هستند که به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی در صنعت تولید غذای موجودات زنده استفاده می‌شود (Romano و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین، مطالعات پیشین نشان داده است که اسیدهای آلی اثرات ضدباکتری در میگوی وانامی (Dasilva و همکاران، ۲۰۱۳)، هیبرید قرمز تیلاپیا (*Oreochromis sp*) (Ng و همکاران، ۲۰۰۹)، معده خوک (Kluge و همکاران، ۲۰۰۶) و میگوی مونودون (Ng و همکاران، ۲۰۱۵) دارد. سرکه سیب، یک محصول کاملاً طبیعی و اسیدی است که از تخمیر سیب به‌دست می‌آید. تاریخچه استفاده از این ماده به صدها سال پیش بر می‌گردد، به‌طوری‌که اولین‌بار حدود ۵۰۰۰ سال پیش از این ماده به‌عنوان نگه‌دارنده استفاده شده است. هم‌چنین حدود ۴۰۰ سال قبل از میلاد مسیح، بقراط پدر علم نوین دارویی، از مخلوطی از سرکه سیب و عسل برای درمان بسیاری از بیماری‌ها بهره می‌برد. (Beheshi و همکاران، ۲۰۱۲). این ماده غذایی حاوی فلاویدها، پلی فنولیک، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی می‌باشد که این مواد عملکرد دارویی بدون ایجاد اثرات جانبی دارند (Naziroğlu و همکاران، ۲۰۱۴؛ Kondo و همکاران، ۲۰۰۹). از طرفی سرکه سیب در خنثی‌سازی و از بین بردن مواد سمی و باکتری‌های مضر نظیر ویبریو در بدن نقش دارد (Iman و همکاران، ۲۰۱۵). به‌طوری‌که براساس مطالعات گذشته سرکه سیب، سرکه بامبو و سرکه سفید در خنثی‌سازی و از بین بردن باکتری‌های مضر نقش دارند (Iman و همکاران، ۲۰۱۵؛ Jin و همکاران، ۲۰۱۲؛ Vijayakumar و Wolf-Hall، ۲۰۰۲). هم‌چنین، اسیداستیک (AcOH)(۹- ۳ درصد) به‌عنوان‌ماده‌اصلی‌در‌سرکه‌سیب‌مطرح‌می‌باشد (Beheshti و همکاران، ۲۰۱۲). تاکنون، نتایج حاصل از مطالعات پیشین نشان داده است سرکه سیب موجب کاهش گلوکز، چربی و استرس‌های اکسیداتیو در انسان یا حیواناتی هم‌چون موش و خرگوش شده است، اما درخصوص موجودات آبزی مطالعات اندکی انجام گرفته است (Iman و همکاران، ۲۰۱۵؛ Naziroğlu و همکاران، ۲۰۱۴؛ Kondo و همکاران، ۲۰۰۹). مرفولوژی هپاتوپانکراس اولین بار در اوایل قرن بیستم (سال ۱۹۲۸) توسط (Jacobs و Hirsch) شرح‌داده‌شد (Sreeram و Menon، ۲۰۰۵). این غده حدود ۶-۲ درصد وزن بدن را تشکیل می‌دهد و به‌عنوان بزرگ‌ترین اندام درسخت‌پوستان به‌حساب می‌آید(Nunes و همکاران، ۲۰۱۴). هپاتوپانکراس، متشکل از چندین توبول ستاره‌ای شکل است که در بافت پوششی چندین نوع سلول از جمله سلول‌های جذبی ذخیره‌ای(R-cell)،کیسه‌ای‌شکل(B-cell)،جنینی (E-cell) و رشته‌ای (F-cell) تشکیل شده است. این اندام مهم و اساسی وظایف بسیاری برعهده دارد که از آن جمله می‌توان به هضم و جذب مواد غذایی، ذخیره‌سازی مواد آلی، چربی‌ها و کربوهیدرات‌ها، سنتز و ترشح آنزیم‌های هضمی، تنظیم اسمزی (Liu و همکاران، ۲۰۱۲) و هم‌چنین سیستم ایمنی (Gao و همکاران، ۲۰۱۲) نیز اشاره نمود. استفاده خوراکی از اسیدهای آلی یا نمک‌هایشان از تخریب و آسیب به بافت هپاتوپانکراس در برابر عوامل بیماری‌زا جلوگیری کرده است (Ng و همکاران، ۲۰۱۵؛ Romano و همکاران، ۲۰۱۵).

تاکنون، مطالعه‌ای درخصوص استفاده از رژیم غذایی حاوی سرکه سیب، در صنعت آبزی‌پروری میگو انجام نگرفته است. از این‌رو این مطالعه به بررسی اثر سرکه سیب و پروپیونیک اسید در غذای تجاری میگوی وانامی و پتانسیل این مواد بر تأثیرگذاری بر تعداد هموسیت،بافت‌شناسی هپاتوپانکراس و هم‌چنین بررسی فلور باکتریایی روده میگوی وانامی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش: در سال ۱۳۹۴ میگوهای به ظاهر سالم وانامی (۲/۰۴±۱۰/۰ گرم) از مزارع پرورش در گمیشان استان گلستان تهیه و به محل اجرای پروژه سالن پرورش ماهی شهید فضلی برآبادی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل شدند. به‌مدت ۱۵ روز در مخازن حاوی آب شور جهت سازگاری به محیط قرار داده شدند. پس از این، تعداد ۲۲۵ قطعه میگو به‌صورت تصادفی در ۹ مخزن فایبرگلاس با ظرفیت ۴۰۰ لیتر پراکنده شدند. در طول دوره غذادهی،فاکتورهای فیزیکی‌وشیمیایی آب به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد. میزان شوری ۱/۲۱±۲۰/۲۷ گرم در لیتر و دما ۱/۶۴±۲۵/۸۴ درجه سانتی‌گراد بود. میگوها روزانه ۴ بار در ساعت‌های ۷ و ۱۱/۳۰، ۱۵/۳۰ و ۲۲ به‌میزان ۳ درصد وزن بدن به‌مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. هر روز صبح، قبل از شروع غذادهی، غذاهای خورده نشده و مدفوع خارج می‌شد. هم‌چنین هر روز حدود ۲۰ درصد از آب با آب جدید دریا جایگزین شد. پس از مرحله سازگاری، میگوها با جیره غذایی تجاری تعاونی ۲۱ بیضاء و غذاهای شامل ۱ درصد سرکه سیب تجاری حاوی۵٪اسیداستیک(®1و ۱) و ۵/ درصد پروپیونیک اسید (Sigma Aldrich St. Louis, Mo, USA) به‌عنوان مکمل غذایی تغذیه شدند. هر سه جیره غذایی با روغن پوشش‌دار شدند و در دمای ۲۰- تا زمان استفاده نگه‌داری شدند (Romano و همکاران، ۲۰۱۵).

بررسی تعداد باکتری‌ها: در پایان دوره آزمایش (روز ۶۰)، از هر تکرار ۳ عدد میگو به‌صورت تصادفی جهت بررسی تعداد باکتری روده انتخاب شد که این بررسی در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده شیلات دانشگاه‌کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان انجام گرفت.روده‌ها با استفاده از پنس و اسکالپل برداشته شد و در داخل محلول استریل حاوی ۰/۹ درصد کلریدسدیم هموژنیزه شدند. در ادامه، نمونه‌ها به‌صورت سریالی (10^{-1} تا 10^{-10}) رقیق گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون بر روی پلت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (برای شمارش غیراختصاصی باکتری‌های هتروتروفیک) به‌همراه ۱/۵ درصد نمک قرار داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. شمارش باکتری‌ها براساس واحد شمارش کلونی (CFU) انجام گرفت. پلت‌هایی که حاوی ۳۰۰-۳۰ کلونی در هر پلت بودند،برای‌شمارش‌تعداد کل باکتری‌های زنده استفاده شد (Romano و همکاران، ۲۰۱۵؛ DaSilva و همکاران، ۲۰۱۳).

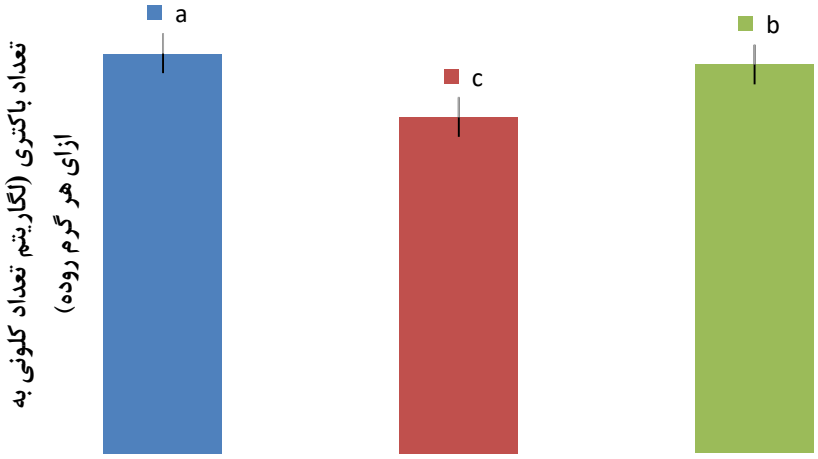
نمونه‌گیری از هپاتوپانکراس: هپاتوپانکراس سه میگو در هر مخزن جهت بررسی آزمایش بافت‌شناسی در پایان دوره نیز برداشته شد. هپاتوپانکراس‌ها در محلول ۱۰٪ فرمالین برای ۳ روز فیکس شدند (Franceschini-Vicentini و همکاران، ۲۰۰۹). سپس برای نگه‌داری بیش‌تر وارد محلول اتانول ۷۰٪ تا زمان بررسی شدند. برش عرضی (۵-۷ میکرون) با استفاده از میکروتوم تهیه و با استفاده از ائوزین هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای و کیسه‌ای‌پرداخته شد. هم‌چنین با استفاده از برنامه Digimizer ۴,۱,۱,۰، قطر توبول‌های هپاتوپانکراس اندازه‌گیری شد.

شمارش کلی سلول‌های همولنف(THC): در پایان دوره آزمایش شمارش کلی سلول‌های همولنف انجام گرفت. جهت بی‌هوش نمودن میگوها، به‌مدت ۱۵ دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. همولنف، از دومین بند شکمی استخراج شد. از سرنگ ۱ میلی‌لیتر و سر سوزن شماره ۲۵ که حاوی محلول ضد انعقاد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (سدیم سیترات ۲۷ میلی‌مولار، EDTA ۹ میلی‌مولار، گلوکز ۱۱۵ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۳۳۶ میلی‌مولار، pH برابر با ۷) استفاده شد. سپس یک قطره از سوسپانسیون همولنف- ضدانعقاد بر روی لام هموسیتومتر برای شمارش کلی سلول‌های همولنف قرار داده شد (DaSilva و همکاران، ۲۰۱۴).

آنالیز داده‌ها: پراکنش نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف- اسمیرنوف مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، اختلاف موجود بین تیمارها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۳ تیمار و ۳ تکرار تعیین شد و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS۱۸ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از تست LSD در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد.

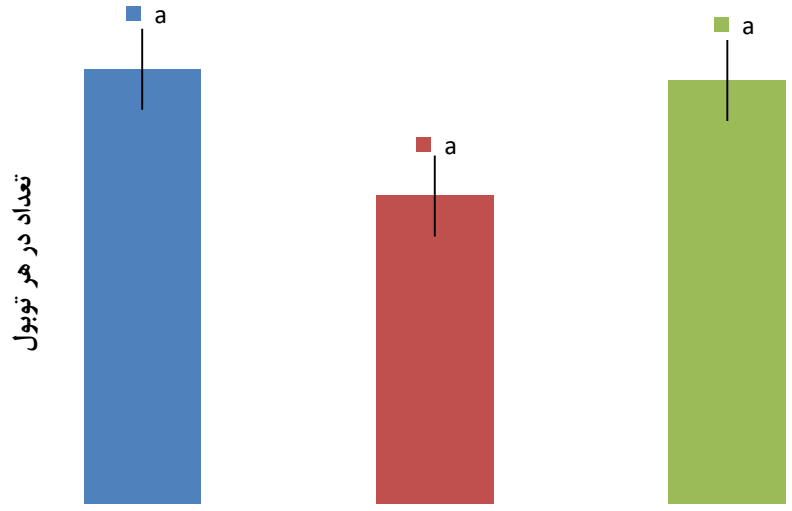
نتایج

فلور باکتریایی روده: نتایج مربوط به فلور باکتریایی روده در شکل ۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که، سرکه سیب و پروپیونیک اسید موجود در جیره غذایی موجب کاهش معنی‌دار تعداد باکتری‌ها کل نسبت به تیمار شاهد شد ($p<0/05$).

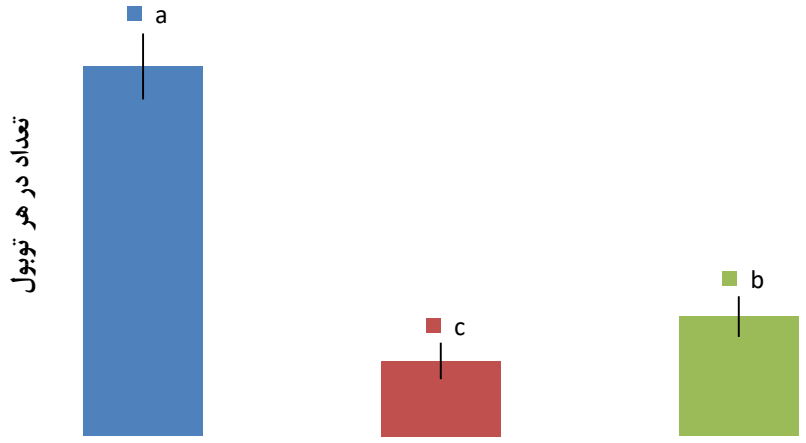


شکل ۱: شمارش کل باکتری‌های قابل کشت در روده میگوی وانامی تغذیه شده به‌ترتیب با سطوح ۱٪ و ۰/۵٪ سرکه سیب و پروپیونیک اسید به‌مدت ۶۰ روز. حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

بافت‌شناسی هپاتوپانکراس: نتایج حاصل از شمارش سلول‌های کیسه‌ای و جذبی- ذخیره‌ای در توبول‌های هپاتوپانکراس با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین-هماتوکسیلین نشان داد که تعداد سلول‌های کیسه‌ای در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت (p>۰/۰۵) (شکل ۲). علاوه بر این، تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با غذای مکمل کاهش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). به‌طوری که تعداد این سلول در تیمار سرکه سیب و پروپیونیک اسید به‌ترتیب ۸۰٪ و ۶۱٪ نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت (شکل ۳).

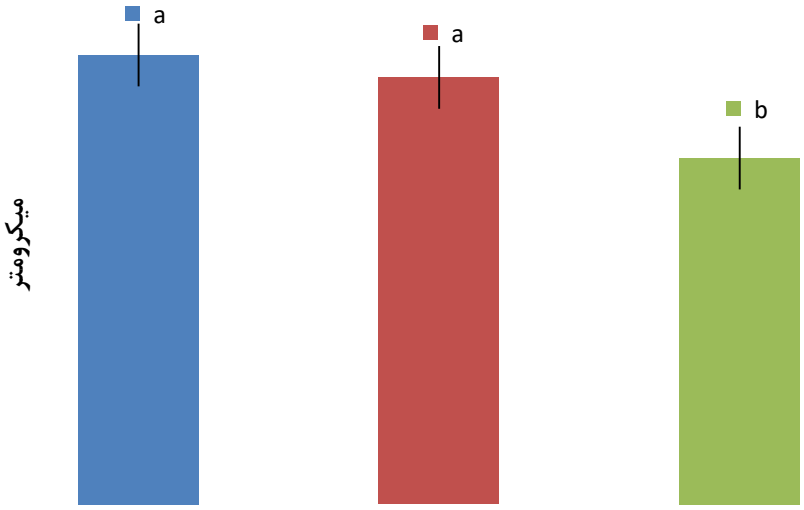


شکل ۲: مقایسه فراوانی سلول‌های کیسه‌ای (B-cell) در میگوهای تغذیه شده به‌ترتیب با سطوح ۱٪ و ۰/۵٪ سرکه سیب و پروپیونیک اسید به‌مدت ۶۰ روز. حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).



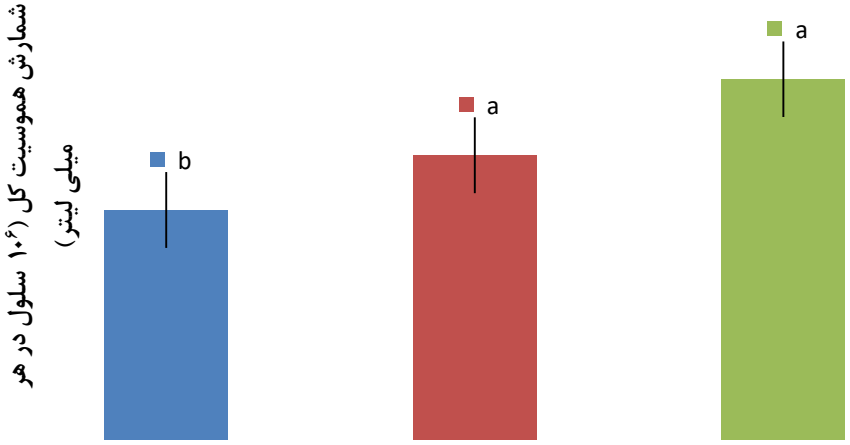
شکل ۳: مقایسه فراوانی سلول‌های جذبی-ذخیره‌ای (R-cell) در میگوهای تغذیه شده به‌ترتیب با سطوح ۱٪ و ۰/۵٪ سرکه سیب و پروپیونیک اسید به‌مدت ۶۰ روز. حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

از طرفی، قطر توبول‌های هپاتوپانکراس در تیمار پروپیونیک اسید تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت (شکل ۴) (p<۰/۰۵).



شکل ۴: مقایسه قطر توبول‌های هپاتوپانکراس میگوی وانامی در میگوهای تغذیه شده به‌ترتیب با سطوح ۱٪ و ۰/۵٪ سرکه سیب و پروپیونیک اسید در جیره غذایی به‌مدت ۶۰ روز حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

نتایج مربوط به شمارش کلی سلول‌های هموسیت (THC) تیمارهای مختلف در شکل ۵ آمده است. تعداد هموسیت‌ها در تیمارهای تغذیه شده با سرکه سیب افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد (p<۰/۰۵) به‌طوری‌که،کم‌ترین تعداد هموسیت در تیمار شاهد (۷/۵۵±۱/۰۱) مشاهده شد.



شکل ۵: شمارش کلی هموسیت در میگوهای تغذیه شده به‌ترتیب با سطوح ۱٪ و ۰/۵٪ سرکه سیب و پروپیونیک اسید در جیره غذایی به‌مدت ۶۰ روز حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد (p<۰/۰۵).

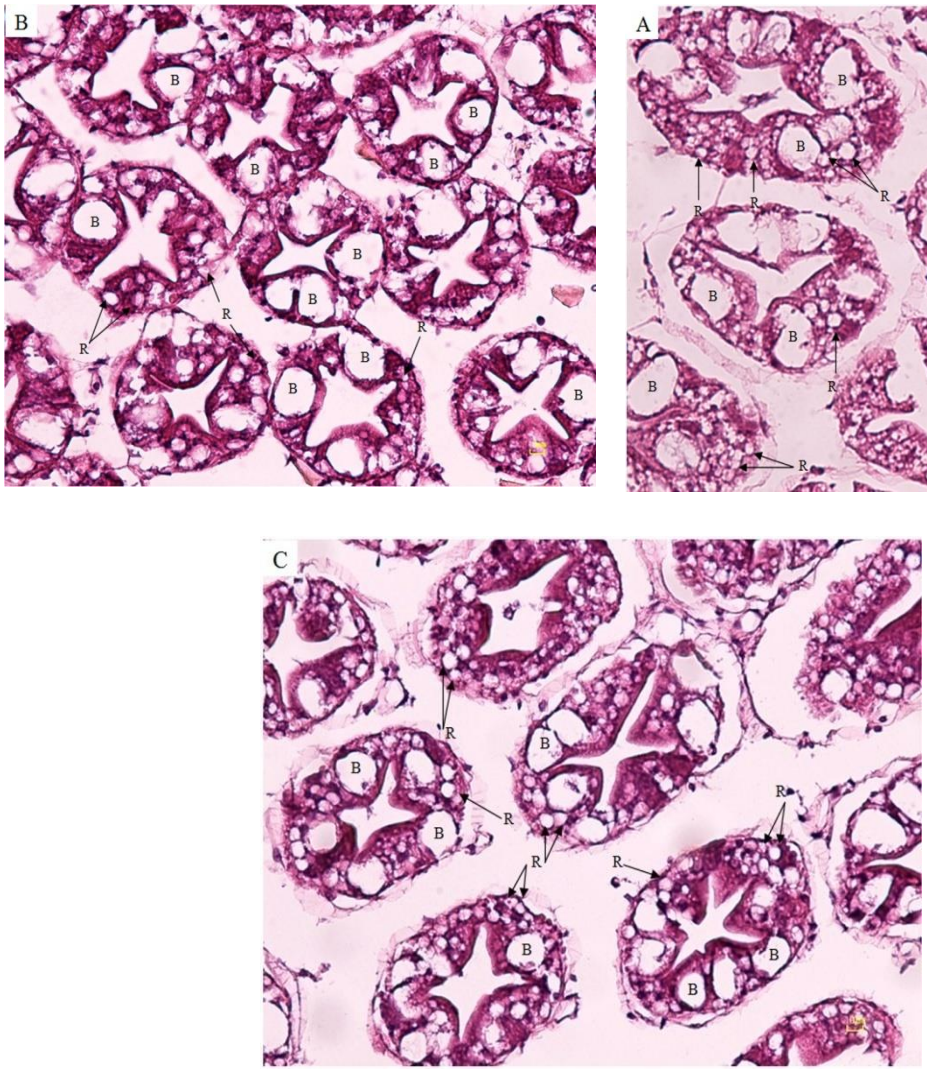
بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رژیم غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید در جیره میگوی وانامی، توانایی افزایش سیستم ایمنی از طریق افزایش تعداد هموسیت‌ها را دارا است. از طرفی، این مواد موجب کاهش فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای و در نتیجه کاهش ذخیره لیپید در هپاتوپانکراس و همچنین فلور میکروبی روده شد. در واقع فلور میکروبی، شامل مجموعه‌ای از باکتری‌ها است که نقش مهمی در هضم غذا و کنترل بیماری‌ها بر عهده دارد. از این‌رو، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد کل باکتری روده در تیمارهای حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید مشاهده شد. به‌نظر می‌رسد که کاهش تعداد باکتری‌ها، می‌تواند به‌واسطه کاهش pH در روده توسط سرکه سیب باشد و همچنین ورود اسیدآلی به‌داخل سلول و کاهش pH سیتوپلاسم باکتری، که در نتیجه مرگ سلول به‌دنبال دارد (NG و همکاران، ۲۰۱۵؛ Romano و همکاران، ۲۰۱۵). از طرفی کم‌ترین تعداد کل باکتری در روده میگوی وانامی در تیمار سرکه سیب مشاهده شد (p<۰/۰۵) (شکل ۱). نتایج حاصل از مطالعات پیشین نشان داده که سرکه بامبو (حاوی حداقل ۷ درصد اسیداستیک) اثر ممانعت کنندگی از رشد باکتری (*Micrococcus Luleus* و *Bacillus Subtilis*) و قارچ (*Saccharomyces Cerevisiae* و *Aspergillus Niger*) در شرایط آزمایشگاهی داشت (Jin و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین استفاده از سرکه (حاوی ۵ درصد اسیداستیک) و اسیداستیک به‌صورت خالص اثر مثبت در جلوگیری از رشد باکتری‌های جداسازی شده از گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) داشت به‌طوری‌که بیش‌ترین کاهش به‌ترتیب در تیمارهای حاوی اسیداستیک و ۲/۵ درصد سرکه مشاهده شد (Lingham و همکاران، ۲۰۱۲). از طرفی، Ng و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که استفاده از مخلوطی چند از اسیدهای آلی و پتاسیم دیفرمات می‌تواند منجر به کاهش تعداد باکتری‌های موجود در مدفوع ماهی هیبرید تیلاپیا (*Oreochromis sp*) شود. هم‌چنین استفاده از رژیم غذایی حاوی اسیدآلی در خوک موجب کاهش تعداد باکتری‌های موجود در روده شد که با نتایج حاصل از این مطالعه هم‌خوانی و مطابقت دارد (Kluge و همکاران، ۲۰۰۶). به‌علاوه، DaSilva و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که تغذیه میگوهای وانامی با ۲٪ نمک فرمات به‌مدت ۱۴ روز موجب کاهش معنی‌داری در تعداد کل باکتری‌های هتروتروفیک شد، این در حالی است که استفاده از استات تأثیری بر تعداد کل باکتری‌ها نداشت. که این مطالعات با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت و هم‌خوانی دارد. اما در مقابل، جیره غذایی حاوی نمک آلی بوتیرات موجب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری ویبریو در روده میگوی وانامی شد اما تأثیری بر روی تعداد کل باکتری روده نداشت (DaSilva و همکاران، ۲۰۱۴). اسیدهای آلی اغلب بر باکتری‌های گرم منفی هم‌چون ویبریو اثر بازدارندگی مؤثرتری دارد (Salem و Amin، ۲۰۱۲). هم‌چنین، مصرف ۲٪ از چندین نوع اسید آلی موجب کاهش تعداد باکتری‌ها در روده، هپاتوپانکراس و افزایش بقای میگوی وانامی در برابر *Vibrio harveyi* شد که کاهش تعداد باکتری‌های دستگاه گوارش اغلب مربوط به گونه‌های بیماری‌زا است (Ng و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین Mine و Boopathy (۲۰۱۱) گزارش دادند که حداقل

قدرت بازدارندگی اسیدهای آلی هم‌چون اسید استیک، فرمیک اسید و پروپیونیک اسید در برابر رشد باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi* به‌ترتیب حدود ۰/۰۴۱، ۰/۰۳۵ و ۰/۰۳ درصد می‌باشد. به‌نظر می‌رسد اثرگذاری اسیدهای آلی بر فلور باکتری روده ناشی از نوع اسید آلی و مقدار به‌کار گرفته شده در جیره غذایی باشد. از این‌رو نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سرکه سیب به‌عنوان یک محصول طبیعی و هم‌چنین حاوی اسید آلی هم‌چون اسید استیک می‌تواند در بهبود سلامتی میگوی وانامی و هم‌چنین جلوگیری از بروز بیماری‌ها نقش مؤثری ایفا کند.

به‌طورکلی هپاتوپانکراس، مواد غذایی را به شکل ذرات لیپید در سلول‌های جذبی-ذخیره‌ای، ذخیره‌کرده و هم‌چنین محلی برای ترشح آنزیم‌های هضمی به‌شمار می‌آید که عملکردی شبیه به کبد و پانکراس در مهره‌داران آبزی دارد (Khalil و همکاران، ۲۰۱۴). به‌هر روی، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جیره غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید می‌تواند بر فراوانی سلول‌های موجود در هپاتوپانکراس تأثیرگذار باشد به‌نحوی که موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای شد (شکل ۳). اگر چه، در تعداد سلول‌های کیسه‌ای تفاوتی مشاهده نشد (شکل‌های ۲ و ۶). اما در مقابل قطر توبول در تیمار پروپیونیک اسید کاهش داشت. بنابراین سرکه سیب و پروپیونیک اسید با کاهش فراوانی سلول‌های جذبی ذخیره‌ای موجب کاهش ذخیره انرژی و هم‌چنین با توجه به تعداد سلول‌های کیسه‌ای، نقشی در تغییر ترشح آنزیم‌های هضمی نداشتند. در مقابل Romano و همکاران (۲۰۱۵)، نشان دادند که فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با مخلوطی از چندین نوع اسیدهای آلی افزایش یافت درحالی‌که فراوانی سلول‌های کیسه‌ای کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت هم‌چنین قطر توبول در تیمار اسیدهای آلی اندکی کاهش داشت، اما تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای مشاهده نشد. از طرفی Khalil و همکاران (۲۰۱۴) گزارش داد که جیره‌های غذایی حاوی ۲، ۳ و ۴٪ سدیم لاکتات منجر به ورم کردن سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای و کیسه‌ای و درنتیجه افزایش آسیب به هپاتوپانکراس را در میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) در پی داشت. از طرفی، در میگوی وانامی و مونودون رژیم غذایی حاوی ۲ درصد اسید آلی موجب کاهش آسیب و تخریب هپاتوپانکراس و هم‌چنین افزایش بقاء در برابر باکتری *Vibrio harveyi* شد (Ng و همکاران، ۲۰۱۵؛ Romano و همکاران، ۲۰۱۵). به‌هرحال، تاکنون مطالعه‌ای در خصوص استفاده از سرکه سیب در جیره غذایی آبزیان انجام نشده است، لذا شناخت و درک مکانیسم‌های اثرگذاری این ماده در آبزیان تا حدود زیادی ناشناخته می‌باشد. از طرفی، نتایج حاصل از بررسی اثر سرکه سیب بر لیپید پلاسما در انسان‌های بیمار به چربی بالا و چاق نشان داد که، استفاده روزانه از این ماده می‌تواند کاهش قابل ملاحظه‌ای در تری‌گلیسیرید و کلسترول موجود در خون داشته‌باشد(Beheshti و همکاران ۲۰۱۲؛ Kondo و همکاران، ۲۰۰۹). هم‌چنین، استفاده از سرکه سیب به‌مدت ۲۸ روز، موجب کاهش اکسیداسیون لیپید و افزایش مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش شد (Naziroğlu و همکاران، ۲۰۱۴). که با نتایج حاصل از این مطالعه هم‌خوانی و مطابق دارد. به‌نظر می‌رسد پروپیونیک اسید و اسید استیک، موجب کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب شده و از چربی‌زایی در بافت‌ها جلوگیری می‌کند که در نتیجه کاهش غلظت چربی را به‌دنبال دارد (Yamashita و همکاران، ۲۰۰۷؛ Fushimi و همکاران، ۲۰۰۶).

تعداد کل سلول‌های هموسیت (THC) به بسیاری از فاکتورهای محیطی، فیزیولوژیکی و عوامل استرس‌زا وابسته می‌باشد (Van de Braak و همکاران، ۱۹۹۶). از این‌رو، تعداد این سلول‌ها می‌تواند انعکاسی از وضعیت سیستم ایمنی در میگو باشد. به‌طوری‌که این سلول‌ها اولین خط دفاعی در برابر عوامل بیماری‌زا است و توانایی فاگوسیتوز، تشکیل ندول، تشکیل کپسول و تولید چندین پروتئین مربوط به سیستم ایمنی را دارا است (Tassanakajon و همکاران، ۲۰۱۲). تعداد هموسیت‌ها به‌وسیله فعالیت بافت هماتوپویتیک تنظیم می‌شود. در واقع افزایش تعداد هموسیت در همولنف به‌عنوان شاخصی برای بهبود سیستم ایمنی مطرح می‌شود(Kumar و همکاران، ۲۰۱۳). در این مطالعه بررسی تعداد هموسیت‌های کل در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب و پروپیونیک اسید به‌ترتیب افزایشی در حدود ۲۴٪ و ۵۶٪ در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند ($p<0/05$) (شکل ۵). از طرفی، افزایش تعداد هموسیت‌ها موجب افزایش مقاومت میگوی مونودون (*Penaeus monodon*) در برابر باکتری *Vibrio parahaemolyticus*شد(Sivagnanavelmurugan و همکاران، ۲۰۱۴). تاکنون مطالعات اندکی پیرامون کارایی اسیدهای آلی بر تعداد هموسیت در میگو انجام گرفته است. به‌هرحال، تفاوت معنی‌داری در تعداد کل هموسیت میگوهای وانامی تغذیه شده با سطوح مختلف پروپینات و بوتریات مشاهده نشد (Dasilva و همکاران ۲۰۱۴). هم‌چنین Wongsasak و همکاران (۲۰۱۵) گزارش دادند که مواجهه با آمونیاک منجر به افزایش تعداد هموسیت در میگوهای وانامی شد.



شکل ۶: مقطع عرضی از هپاتوپانکراس میگوی وانامی تغذیه شده با غذای شاهد (A)، یا حاوی ۱٪ سرکه سیب (B) و ۰/۵٪ پروپیونیک اسید (C)
توبول‌های هپاتوپانکراس دارای سلول‌های جذبی-ذخیره‌ای (R-cell) و کیسه‌ای (B-cell). فراوانی کم‌تر در سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در تیمارهای حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید مشخص شده است. بزرگ‌نمایی ۲۰×

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سرکه سیب و پروپیونیک اسید موجب افزایش تعداد هموسیت‌ها در همولنف میگوی وانامی شده است. هم‌چنین، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با غذای مکمل به ثبت رسید، اما تفاوتی میان سلول‌های کیسه‌ای در تیمارهای مختلف مشاهده نشد. ازطرفی در تیمار سرکه سیب، تعداد باکتری‌های غیراختصاصی روده به‌طور چشمگیری کاهش یافت. اغلب، مطالعات پیشین به بررسی اثرات تولیدات مصنوعی و خالص اسیدهای آلی یا نمک‌های استحصال شده از آن‌ها در جیره غذایی آبزیان پرداخته بودند. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد که سرکه سیب به‌عنوان یک ماده طبیعی و ارزان قیمت حاوی اسید آلی می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای اسیدهای آلی درنظر گرفته شود، هرچند مطالعات گسترده‌تر جهت درک بهتر نقش سرکه سیب در پاسخ‌های ایمنی و فاکتورهای رشد مورد نیاز می‌باشد.

منابع

۱. **پورمظفر، س.؛ سلطانی، م.؛ نفیسی‌بهابادی، م.؛ مهاجری برازجانی، ژ.؛ محمدی، م. و پذیر، خ.، ۱۳۹۴.** بررسی اثر بتاگلوکان برکارایی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس (*Streptococcus iniae*) و برخی شاخص‌های خونی و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

(*Oncorhynchus mykiss*) . مجله دامپزشکی ایران. سال ۱۱، شماره ۷، صفحات ۴۴ تا ۵۳.

۲. **Beheshti, Z.; Huak Chan, Y.; Sharif Nia, H.; Hajihosseini, F.; Nazari, R.; Shaabani, M. and Salehi Omran, M.T., 2012**. Influence of apple cider vinegar on blood lipids. Life Science Journal. Vol. 9, No. 4, pp: 2431-2440.

۳. **Bray, W.A.; Williams, R.R.; Lightner, D.V. and Lawrence, A.L., 2006**. Growth, survival and histological responses of the marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, to three dosage levels of oxytetracycline. Aquaculture. Vol. 258, pp: 97-108.

٤. **DaSilva, B.C.; Vieira, F. do N.; Mouriño, J.L.P.; Bolivar, N. and Seiffert, W.Q., 2014**. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research. Vol. 47, No. 2, pp: 612-623.

۵. **DaSilva, B.C.; Vieira, F. do N.; Mourinoo, J.L.P.; Ferreira, G.S. and Seiffert, W.Q., 2013**. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. Aquaculture. Vol. 384-387, pp: 104-110.

۶. **Franceschini-Vicentini, I.B.; Ribeiro, K., Papa, L.P.; Marques Junior, J.; Vicentini, C.A. and Valenti, P.M.C.M., 2009.** Histoarchitectural Features of the Hepatopancreas of the Amazon River Prawn *Macrobrachium amazonicum*. International Journal of Morphology. Vol. 27, pp: 121-128.

۷. **Fushimi, T.; Suruga, K.; Oshima, Y.; Fukiharu, M.; Tsukamoto, Y. and Goda, T., 2006**. Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. British Journal of Nutrition. Vol. 95, No. 5, pp: 916-924.

۸. **Gao, W.; Tan, B.; Mai, K.; Chi, S.; Liu, H.; Dong, X. and Yang, Q., 2012**. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp (*Litopenaeus vannamei)* exposed to long-term low salinity stress. Aquaculture. Vol. ۳۶۴-۳۶۵, □□: ۱۸۶-۱۹۱.

۹. **Iman, M.; Moallem, S.A. and Barahoyee, A., 2015**. Effect of apple cider Vinegar on blood glucose level in diabetic mice. Pharmaceutical Sciences. Vol. 20, No. 4, pp: 163-168.

۱۰. **Jin, T.; Wu, Y. and Wang, Q., 2012.** The inhibitory effects of bamboo vinegar against bacteria and fungi. Advances in Intelligent and Soft Computing. Vol. 134, pp: 451-457.

۱۱. **Khalil, M.T.; Setaita H.S.; Ashraf M. A.G.; Madlin M.H. and Hanan, H.., 2014**. Impact of sodium lactate as a growth promoter on the hepatopancreas of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries. Vol. 18, No. 1, pp: 1-11.

۱۲. **Kluge, H.; Broz, J. and Eder, K., 2006**. Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. Vol. 90, No. 7-8, pp: 316-324.

۱۳. **Kondo, T.; Kishi, M.; Fushimi, T.; Ugajin, S. and Kaga, T., 2009**. Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 73, No. 8, pp: 1837-1843.

۱۴. **Kumar, N.R.; Raman, R.P.; Jadhao, S.B.; Brahmchari, R.K.; Kumar, K. and Dash, G., 2013.** Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune. Aquaculture International. Vol. 21, pp: 387-403.

۱۵. **Lingham, T.; Besong, S.; Ozbay, G. and Lee, J., 2012**. Antimicrobial Activity of Vinegar on Bacterial Species Isolated from Retail and Local Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). Journal of Food Processing and Technology. Vol. 1, pp: 1-5.

۱۶. **Liu, H.; Sun, W.; Tan, B.; Chi, S.; Dong, X. and Yang, Q., 2012**. Molecular cloning and expression of hepatopancreas glutamine synthetase in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by acute hypoosmotic stress. Aquaculture. Vol. 362-363, pp: 80-87.

۱۷. **Mine, S. and Boopathy, R., 2011**. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. Current Microbiology. Vol. 63, No. 1, pp: 1-7.

۱۸. **Naziroğlu, M.; Güler, M.; Özgül, C.; Saydam, G.; Küçükayaz, M. and Sözbir, E., 2014**. Apple cider vinegar modulates serum lipid profile, erythrocyte, kidney, and liver membrane oxidative stress in ovariectomized mice fed high cholesterol. Journal of Membrane Biology. Vol. 247, No. 8, pp: 667-673.

۱۹. **Ng, W.K.; Koh, C.B.; Teoh, C.Y. and Romano, N., 2015**. Farm-raised tiger shrimp, *Penaeus monodon*, fed commercial feeds with added organic acids showed enhanced nutrient utilization, immune response and resistance to *Vibrio harveyi* challenge. Aquaculture. Vol. 449, pp: 69-77.

۲۰. **Ng, W.; Koh, C.; Sudesh, K. and Siti-zahrah, A., 2009**. Effects of dietary organic acids on growth , nutrient digestibility and gut microflora of red hybrid tilapia , *Oreochromis sp*., and subsequent survival during a challenge test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture Research. Vol. 40, pp: 1490-1500.

۲۱. **Nunes, E.T.; Braga, A.A. and Camargo-Mathias, M.I., 2014**. Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). Acta Histochemica. Vol. 116, No. 1, pp: 243-251.

۲۲. **Romano, N.; Koh, C.B. and Ng, W.K., 2015**. Dietary microencapsulated organic acids blend enhances growth, phosphorus utilization, immune response, hepatopancreatic integrity and resistance against *Vibrio harveyi* in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 435, pp: 228-236.

۲۳. **Salem, A. and Amin, R., 2012**. Evaluation of some organic acids as potential decontaminants of *Vibrio parahaemolyticus* in fresh shrimp. World Journal of Dairy and Food Sciences. Vol. 7, No. 1, pp: 41-48.

۲۴. **Sivagnanavelmurugan, M.; Thaddaeus, B.J.; Palavesam, A. and Immanuel, G., 2014.** Dietary effect of Sargassum wightii fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 39, No. 4, pp: 439-449.

۲۵. **Sreeram, M.P. and Menon, N.R., 2005**. Histopathological changes in the hepatopancreas of the penaeid shrimp *Metapenaeus dobsoni* exposed to petroleum hydrocarbons. Journal of the Marine Biological Association of India. Vol. 47, No. 2, pp: 160-168.

۲۶. **Tassanakajon, A.; Somboonwiwat, K.; Supungul, P. and Tang, S., 2012**. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 34, No. 4, pp: 954-967.

۲۷. **Tseng, D.Y.; Ho, P.L.; Huang, S.Y.; Cheng, S.C.; Shiu, Y.L.; Chiu, C.S. and Liu, C.H. 2009.** Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, Bacillus subtilis

E20. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 26, No. 2, pp: 339-344.

۲۸. **Van de Braak, C.B.T.; Faber, R. and Boon, J.H., 1996**. Cellular and humoral characteroistics of *penaeus mondon* (Fabricius, 1798) haemolymph. Comparative haematology international. Vol. 6, pp: 194-203.

۲۹. **Wongsasak, U.; Chaijamrus, S., Kumkhong, S. and Boonanuntanasarn, S., 2015.** Effects of dietary supplementation with β-glucan and synbiotics on immune gene expression and immune parameters under ammonia stress in Pacific white shrimp. Aquaculture. Vol. 436, pp: 179-187.

۳۰. **Yamashita, H.; Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, M. and Tsuji, H., 2007**. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. Vol. 71, No. 5, pp: 1236-1243.