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: **49175-487**
- **عبدالمجید حاجی‌مرادلو:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: **49175-487**
- **حمید احمدی‌نیامطلق:** گروه شیلات و تکثیر و پرورش آبزیان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه فردوسی، مشهد
- **رضا گودرزی:** گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، صندوق پستی: **49175-487**

تاریخ دریافت: مرداد 1395 تاریخ پذیرش: آبان 1395

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 225 قطعه میگو وانامی با وزن 10/0±2/04 گرم با رژیم غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید به مدت 60 روز تغذیه شدند. تیمارها شامل، سه جیره‌ی آزمایشی حاوی سطوح صفر، 1% سرکه سیب و 0/5% پروپیونیک اسید بود. در پایان دوره به صورت 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 ($p>0/05$)، در حالی که 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 کنترل داشت ($p<0/05$). این یافته‌ها نشان داد که، سرکه می‌تواند به عنوان 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

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. به طوری که امروزه در صنعت آبزی‌پروری، استفاده از مواد ضد میکروب به ازای هر تن محصول حدود 700-2 گرم می‌باشد (Ng و همکاران، 2009). بنابراین اتحادیه اروپا استفاده از مواد آنتی‌بیوتیک در تولیدات را جانوری ممنوع اعلام کرد (Dasilva و همکاران، 2013). زیرا این مواد اثرات مخربی و بلند مدتی بر محیطزیست و مصرف‌کننده نهایی می‌گذارد. به هر حال 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 (Ng و همکاران، 2009؛ Romano و همکاران، 2015). به طوری که 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، 2006). بنابراین، علاقه‌مندی گسترده‌ای جهت شناسایی جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه قرار گرفت. به طوری که، امروزه در صنعت آبزی‌پروری راه‌هایی مختلفی برای بهبود سلامتی همچون استفاده از واکسن (پورمظفر و همکاران، 1394)، پربیوتیک (Wongsasak و همکاران، 2015)، پروبیوتیک (Kumar و همکاران، 2013) و مواد گیاهی (Sivagnanavelmurugan و همکاران، 2014) استفاده شده است. اما به دلیل عدم وجود سیستم ایمنی اختصاصی در سخت‌پوستان، به کارگیری واکسن روش مناسب برای پیشگیری از بروز بیماری‌ها نمی‌باشد (Tseng و همکاران، 2009). از طرفی، در میگو تجویز مواد محرک ایمنی اغلب به صورت خوراکی انجام می‌گیرد (Sivagnanavelmurugan و همکاران، 2014). اخیراً یکی از موادی که به دلیل اثر

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: sajjad5550@gmail.com

ضد میکروبی قوی و خصوصیات پیشگیری کننده از بیماری‌ها توجهات زیادی رو به خود جلب کرد، اسیدهای آلی بود (Ng و همکاران، 2015). اسیدهای آلی، ساختمانی کوتاه زنجیره دارند که شامل پروپیونیک اسید، اسید استیک، فرمیک اسید، سیتریک و لاکتیک اسید می‌شود. این مواد به همراه نمک‌هایشان حاوی یک یا چند گروه کربوکسیل (COOH-) هستند که به عنوان ترکیب ضد میکروبی در صنعت تولید غذای موجودات زنده استفاده می‌شود (Romano و همکاران، 2015). همچنین، مطالعات پیشین نشان داده است که اسیدهای آلی اثرات ضد باکتری در میگوی وانامی (Dasilva و همکاران، 2013)، هیبرید قرمز تیلاپیا (*Oreochromis sp*) (Ng و همکاران، 2009)، معده خوک (Kluge و همکاران، 2006) و میگوی مونودون (Ng و همکاران، 2015) دارد.. سرکه سیب، یک محصول کاملاً طبیعی و اسیدی است که از تخمیر سیب به دست می‌آید. تاریخچه استفاده از این ماده به صدها سال پیش بر می‌گردد، به طوری که اولین بار حدود 5000 سال پیش از این ماده به عنوان نگهدارنده استفاده شده است. همچنین حدود 400 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، 2012). این ماده غذایی حاوی فلاویدها، پلی فنولیک، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی می‌باشد که این مواد عملکرد دارویی بدون ایجاد اثرات جانبی دارند (Naziroğluو همکاران، 2014؛ Kondo و همکاران، 2009). از طرفی سرکه سیب در خنثی‌سازی و از بین بردن مواد سمی و باکتری‌های مضر نظیر ویبریو در بدن نقش دارد (Iman و همکاران، 2015). به طوری که براساس مطالعات گذشته سرکه سیب، سرکه بامبو و سرکه سفید در خنثی‌سازی و از بین بردن باکتری‌های مضر نقش دارند (Iman و همکاران، 2015؛ Jin و همکاران، 2012؛ Vijayakumar و Wolf-Hall، 2002). همچنین، اسید استیک (AcOH)(9- 3 درصد) به عنوان ماده اصلی در سرکه سیب مطرح می‌باشد (Beheshti و همکاران، 2012). 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 در خصوص موجودات آبزی مطالعات اندکی انجام گرفته است (Iman و همکاران، 2015؛ Naziroğlu و همکاران، 2014، Kondo و همکاران، 2009).

مرفولوژی هپاتوپانکراس اولین بار در اوایل قرن بیستم (سال 1928) توسط (Hirsch and Jacobs) شرح داده شد (Sreeram و Menon، 2005). این غده حدود 6-2 درصد وزن بدن را تشکیل می‌دهد و به عنوان بزرگترین اندام در سخت‌پوستان به حساب می‌آید (Nunes و همکاران، 2014). هپاتوپانکراس، متشکل از چندین توبول ستاره‌ای شکل است که در بافت پوششی چندین نوع سلول از جمله سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای (R-cell)، کیسه‌ای شکل (B-cell)، جنینی (E-cell) و رشته‌ای (F-cell) تشکیل شده است. این اندام مهم و اساسی وظایف بسیاری بر عهده 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، 2012) و همچنین سیستم ایمنی (Gao و همکاران، 2012) 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، 2015؛ Romano و همکاران، 2015).

تاکنون، مطالعه‌ای در خصوص استفاده از رژیم غذایی حاوی سرکه سیب، در صنعت آبزی‌پروری میگو انجام نگرفته است. از این رو 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 1394 میگوهای به ظاهر سالم وانامی (0/04±10/2 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. به مدت 15 روز در مخازن حاوی آب شور جهت سازگاری به محیط قرار داده شدند. پس از این، تعداد 225 قطعه میگو به صورت تصادفی در 9 مخزن فایبرگلاس با ظرفیت 400 لیتر پراکنده شدند. در طول دوره غذادهی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. میزان شوری 1/21 ± 20/27 گرم در لیتر و دما 1/64 ± 25/84 درجه سانتی‌گراد بود. میگوها روزانه 4 بار در ساعت‌های 7 و 11/30، 15/30 و 22 به میزان 3 درصد وزن بدن به مدت 60 روز تغذیه شدند. هر روز صبح، قبل از شروع غذادهی، غذاهای خورده نشده و مدفوع خارج می‌شد. همچنین هر روز حدود 20 درصد از آب با آب جدید دریا جایگزین شد. پس از مرحله سازگاری، میگوها با جیره غذایی تجاری تعاونی 21 بیضاء و غذاهای شامل 1 درصد سرکه سیب تجاری حاوی 5% اسید استیک (®1& 1) و 0/5 درصد پروپیونیک اسید (Sigma Aldrich St. Louis, Mo, USA) به عنوان مکمل غذایی تغذیه شدند. هر سه جیره غذایی با روغن پوشش‌دار شدند و در دمای 20- تا زمان استفاده نگهداری شدند (Romano و همکاران، 2015).

بررسی تعداد باکتری‌ها: در پایان دوره آزمایش (روز 60)، از هر تکرار 3 عدد میگو به صورت تصادفی جهت بررسی تعداد باکتری روده انتخاب شد که این بررسی در آزمایشگاه ژنتیک دانشکده شیلات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. روده‌ها با استفاده از پنس و اسکالپل برداشته شد و در داخل محلول استریل حاوی 0/9 درصد کلرید سدیم هموژنیزه شدند. در ادامه، نمونه‌ها به صورت سریالی (10^{-1} تا 10^{-10}) رقیق گردید. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون بر روی پلت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار (برای شمارش غیراختصاصی باکتری‌های هتروتروفیک) به همراه 1/5 درصد نمک قرار داده شد و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوباسیون شدند. شمارش باکتری‌ها براساس واحد شمارش کلونی (CFU) انجام گرفت. پلت‌هایی که حاوی 300-30 کلونی در هر پلت بودند، برای شمارش تعداد کل باکتری‌های زنده استفاده شد (Romano و همکاران، 2015؛ DaSilva و همکاران، 2013).

نمونه‌گیری از هپاتوپانکراس: هپاتوپانکراس سه میگو در هر تانک جهت بررسی آزمایش بافت‌شناسی در پایان دوره نیز برداشته شد. هپاتوپانکراس‌ها در محلول 10% فرمالین برای 3 روز فیکس شدند (Franceschini-Vicentini و همکاران، 2009). سپس برای نگهداری

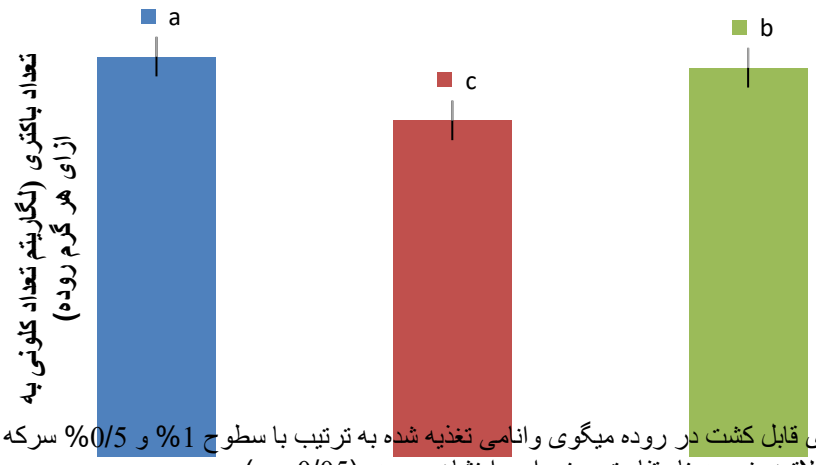
بیشتر وارد محلول اتانول 70% تا زمان بررسی شدند. برش عرضی (7-5 میکرون) با استفاده از میکروتوم تهیه و با استفاده از ائوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی شد. سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری به بررسی فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای و کیسه‌ای پرداخته شد. همچنین با استفاده از برنامه Digimizer 4.1.1.0، قطر توبول‌های هپاتوپانکراس اندازه گیری شد.

شمارش کلی سلول‌های همولنف (THC): در پایان دوره آزمایش شمارش کلی سلول‌های همولنف انجام گرفت. جهت بیهوش نمودن میگوها، به مدت 15 دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. همولنف، از دومین بند شکمی استخراج شد. از سرنگ 1 میلی‌لیتر و سر سوزن شماره 25 که حاوی محلول ضد انعقاد با دمای 4 درجه سانتی‌گراد (سدیم سیترات 27 میلی مولار، EDTA 9 میلی مولار، گلوکز 115 میلی مولار، کلرید سدیم 336 میلی مولار، pH برابر با 7) استفاده شد. سپس یک قطره از سوسپانسیون همولنف - ضد انعقاد بر روی لام هموسیتومتر برای شمارش کلی سلول‌های همولنف قرار داده شد (DaSilva و همکاران، 2014).

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 3 تیمار و 3 تکرار تعیین شد و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از تست LSD در سطح احتمال 95 درصد استفاده شد.

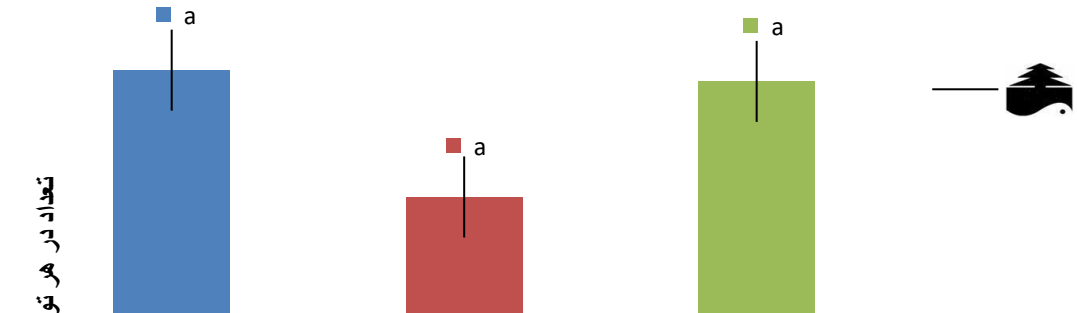
نتایج

فلور باکتریایی روده: نتایج مربوط به فلور باکتریایی روده در شکل 1 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. ($p < 0/05$).

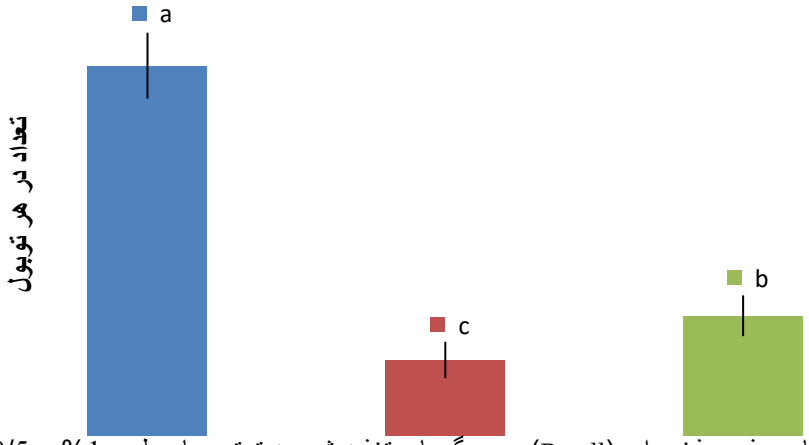


شکل 1. شمارش کل باکتری‌های قابل کشت در روده میگوی وانامی تغذیه شده به ترتیب با سطوح 1% و 0/5% سرکه سیب و پروپیونیک اسید به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

بافت‌شناسی هپاتوپانکراس: نتایج حاصل از شمارش سلول‌های کیسه‌ای و جذبی – ذخیره‌ای در توبول‌های هپاتوپانکراس با استفاده از رنگ آمیزی ائوزین- هماتوکسیلین نشان داد که تعداد سلول های کیسه ای در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت ($p > 0/05$) (شکل 2). علاوه بر این، تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با غذای مکمل کاهش معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). به طوری که تعداد این سلول در تیمار سرکه سیب و پروپیونیک اسید به ترتیب 80% و 61% نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت (شکل 3).

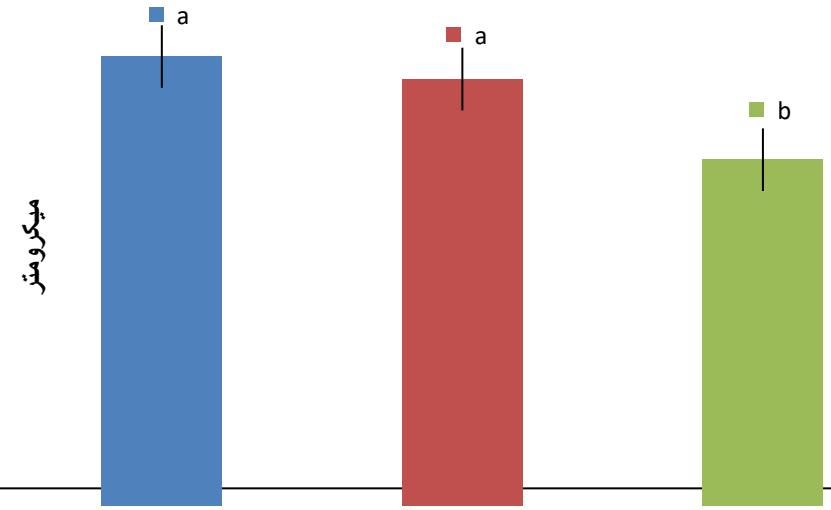


شکل 2. مقایسه فراوانی سلول‌های کیسه‌ای (B-cell) در میگوهای تغذیه شده به ترتیب با سطوح 1% و 0/5% سرکه سیب و پروپیونیک اسید به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).



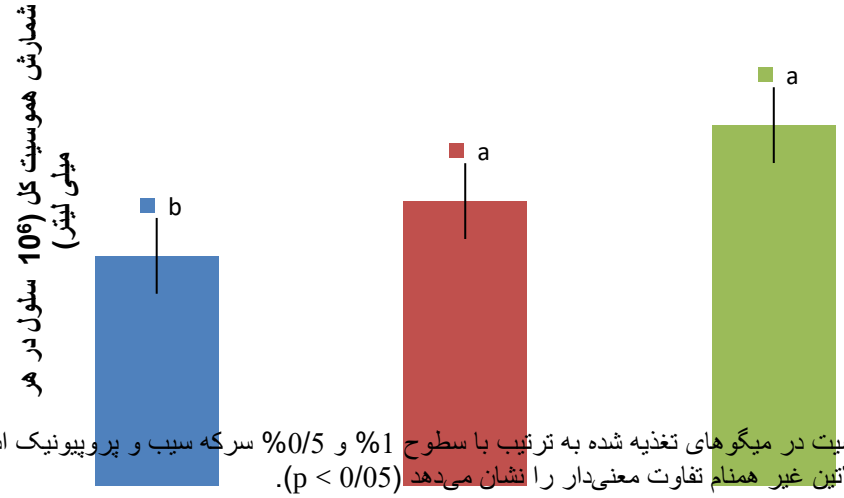
شکل 3. مقایسه فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای (R-cell) در میگوهای تغذیه شده به ترتیب با سطوح 1% و 0/5% سرکه سیب و پروپیونیک اسید به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

از طرفی، قطر توبول‌های هپاتوپانکراس در تیمار پروپیونیک اسید تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشت (شکل 4) ($p < 0/05$).



شکل 4. مقایسه قطر توبول‌های هپاتوپانکراس میگوی وانامی در میگوهای تغذیه شده به ترتیب با سطوح 1% و 0/5% سرکه سیب و پروپیونیک اسید در جیره غذایی به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

نتایج مربوط به شمارش کلی سلول‌های هموسیت (THC) تیمارهای مختلف در شکل 5 آمده است. تعداد هموسیت‌ها در تیمارهای تغذیه شده با سرکه سیب افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار کنترل نشان داد ($p < 0/05$) به طوری که،کمترین تعداد هموسیت در تیمار شاهد (7/55 1±/01) مشاهده شد.



شکل 5. شمارش کلی هموسیت در میگوهای تغذیه شده به ترتیب با سطوح 1% و 0/5% سرکه سیب و پروپیونیک اسید در جیره غذایی به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

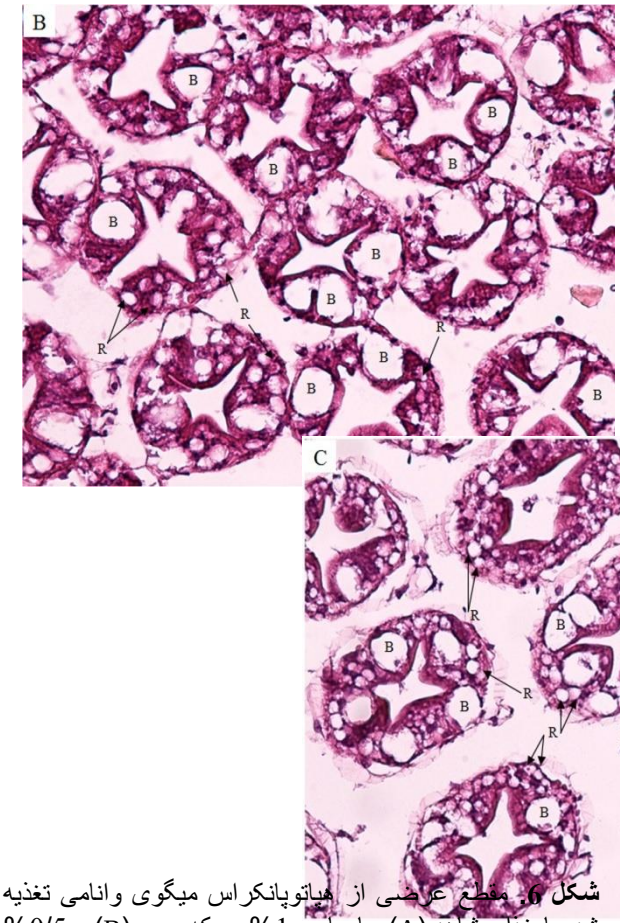
بحث

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رژیم غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید در جیره‌ی 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 این رو، 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. به نظر می‌رسد که کاهش تعداد باکتری‌ها، می‌تواند به واسطه کاهش pH در روده توسط سرکه سیب باشد و همچنین ورود اسید آلی به داخل سلول و کاهش pH سیتوپلاسم باکتری، که در نتیجه مرگ سلول به دنبال دارد (NG و همکاران، 2015؛ Romano و همکاران، 2015). از طرفی کمترین تعداد کل باکتری در روده میگوی وانامی در تیمار سرکه سیب مشاهده شد ($p < 0/05$) (شکل 1). نتایج حاصل از مطالعات پیشین نشان داده که سرکه بامبو (حاوی حداقل 7 درصد اسید استیک) 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، 2012). همچنین استفاده از سرکه (حاوی 5 درصد اسید استیک) و اسید استیک به صورت خالص اثر مثبت در جلوگیری از رشد باکتری‌های جداسازی شده از گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) داشت به طوری که بیشترین کاهش به ترتیب در تیمارهای حاوی اسید استیک و 2/5 درصد سرکه مشاهده شد (Lingham و همکاران، 2012). از طرفی، Ng و همکاران (2009) 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 اسید آلی در خوک موجب کاهش تعداد باکتری‌های موجود در روده شد که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی و مطابقت دارد (Kluge و همکاران، 2006). به علاوه، DaSilva و همکاران (2013) نشان دادند که تغذیه میگوهای وانامی با 2% نمک فرمات به مدت 14 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 (Da Silva و همکاران، 2014). اسیدهای آلی اغلب بر باکتری‌های گرم منفی همچون ویبریو اثر بازدارندگی مؤثرتری دارد (Salem و Amin، 2012). همچنین، مصرف 2% 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، 2015). همچنین Mine و Boopathy (2011) گزارش دادند که حداقل قدرت بازدارندگی اسیدهای آلی همچون اسید استیک، فرمیک اسید و پروپیونیک اسید در برابر رشد باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi* به ترتیب حدود 0/041، 0/035 و 0/03 درصد می‌باشد. به نظر می‌رسد اثرگذاری اسیدهای آلی بر فلور باکتری روده ناشی از نوع اسید آلی و مقدار به کار گرفته شده در جیره غذایی باشد. از این رو نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سرکه سیب به عنوان 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.

به طور کلی هپاتوپانکراس، مواد غذایی رو به شکل ذرات لیپید در سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای، ذخیره کرده و همچنین محلی برای ترشح آنزیم‌های هضمی به شمار می‌اید که عملکردی شبیه به کبد و پانکراس در مهره‌داران ابزی دارد (Khalil و همکاران، 2014). به هر روی، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جیره غذایی حاوی سرکه سیب و پروپیونیک اسید می‌تواند بر فراوانی سلول‌های موجود در هپاتوپانکراس تاثیرگذار باشد به نحوی که موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای شد (شکل 3). اگر چه، در تعداد سلول‌های کیسه‌ای تفاوتی مشاهده نشد (شکل 2 و 6). 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 (2015)، نشان دادند که فراوانی سلول‌های جذبی – ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با مخلوطی از چندین نوع اسیدهای آلی افزایش یافت در حالی که 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 (2014) گزارش دادند که جیره‌های غذایی حاوی 2، 3 و 4% سدیم لاکتات منجر به ورم کردن سلول‌های جذبی – ذخیره‌ای و کیسه‌ای و در نتیجه افزایش آسیب به هپاتوپانکراس را در میگوی آب شیرین (*Macrobrachium rosenbergii*) در پی داشت. از طرفی، در میگوی وانامی و مونودون رژیم غذایی حاوی 2 درصد اسید آلی موجب کاهش آسیب و تخریب هپاتوپانکراس و همچنین افزایش بقاء در برابر باکتری *Vibrio harveyi* شد (Ng و همکاران، 2015؛ Romano و همکاران، 2015). به هر حال، 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 تری‌گلیسرید و کلسترول موجود در خون داشته باشد (Kondo و همکاران، 2009؛ Beheshti و همکاران 2012). همچنین، استفاده از سرکه سیب به مدت 28 روز، موجب کاهش اکسیداسیون لیپید و افزایش مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش شد (Naziroğlu و همکاران، 2014). که با نتایج حاصل از این مطالعه همخوانی و مطابق دارد. به نظر 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 به دنبال دارد (Fushimi و همکاران، 2006؛ Yamashita و همکاران، 2007).



شکل 6. مقطع عرضی از هپاتوپانکراس میگوی وانامی تغذیه شده با غذای شاهد (A)، یا حاوی 1% سرکه سیب (B) و 0/5% 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 20× .

تعداد کل سلول‌های هموسیت (THC) به بسیاری از فاکتورهای محیطی، فیزیولوژیکی و عوامل استرس‌زا وابسته می‌باشد (Van de Braak و همکاران، 1996). از این رو، تعداد این سلول‌ها می‌تواند انعکاسی از وضعیت سیستم ایمنی در میگو باشد. به طوری که 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، 2012). تعداد هموسیت‌ها به وسیله‌ی فعالیت بافت هماتوپویتیک تنظیم می‌شود. در واقع افزایش تعداد هموسیت در هملنف به عنوان شاخصی برای بهبود سیستم ایمنی مطرح می‌شود (Kumar و همکاران، 2013). در این مطالعه بررسی تعداد هموسیت‌های کل در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب و پروپیونیک اسید به ترتیب افزایشی در حدود 24% و 56% در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند ($p < 0/05$) (شکل 5). از طرفی، افزایش تعداد هموسیت‌ها موجب افزایش مقاومت میگوی مونودون (*Penaeus monodon*) در برابر باکتری *Vibrio parahaemolyticus* شد (Sivagnanavelmurugan و همکاران، 2014). تاکنون مطالعات اندکی پیرامون کارایی اسیدهای آلی بر تعداد هموسیت در میگو انجام گرفته است. به هر حال، تفاوت معنی‌داری در تعداد کل هموسیت میگوهای وانامی تغذیه شده با سطوح مختلف پروپینات و بوتریات مشاهده نشد (Dasilva و همکاران 2014). همچنین Wongsasak و همکاران (2015) گزارش دادند که مواجهه با آمونیاک منجر به افزایش تعداد هموسیت در میگوهای وانامی شد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سرکه سیب و پروپیونیک اسید موجب افزایش تعداد هموسیت‌ها در هملنف 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. از طرفی در تیمار سرکه سیب، تعداد باکتری‌های غیراختصاصی روده به طور 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 این رو، به نظر می‌رسد که سرکه سیب به عنوان یک ماده طبیعی و ارزان قیمت حاوی اسید آلی می‌تواند به عنوان جایگزینی مناسب برای اسیدهای آلی در نظر گرفته شود، هر چند مطالعات گسترده‌تر جهت درک بهتر نقش سرکه سیب در پاسخ‌های ایمنی و فاکتورهای رشد مورد نیاز می‌باشد.

منابع

1- **پورمظفر، س.؛ سلطانی، م.، نفیسی بهابادی، م.، مهاجری برازجانی، ژ.، محمدی، م. و پذیر، خلیل.، 1394.** بررسی اثر بتاگلوکان برکارایی واکسن ضد استرپتوکوکوزیس (*Streptococcus iniae*) و برخی شاخص‌های خونی و رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) . مجله دامپزشکی ایران، سال 11، شماره 7، صفحات 44 تا 53.

2- **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.

3- **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.

4- **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.

5- **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.

6- **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.

7- **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.

8- **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. 364–365, pp: 186–191.

9- **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.

10- **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.

11- **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.

12- **Kluge, H.; Broz, J. and Eder, K., 2006**. Effect

test with *Streptococcus agalactiae*. Aquaculture Research. Vol. 40, pp: 1490–1500.

21- **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.

22- **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.

23- **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.

24- **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.

25- **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.

26- **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.

27- **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.

28- **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.

29- **Wongsasak, U.; Chaijamrus, S., Kumkhong,** 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.

13- **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.

14- **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.

15- **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.

16- **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.

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

18- **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.

19- **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.

20- **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

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.

30- **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.

.1