Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره دوم، تابستان 1396

بررسی اثر سطوح مختلف سرکه سیب بر شاخص‌های همولنف و بار باکتریایی *Vibrio* در روده میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)

سجاد پورمظفر[2,1]*، عبدالمجید حاجی‌مرادلو[3]، حامد کلنگی میان‌دره[4]

تاریخ دریافت: آبان 95 تاریخ پذیرش: دی 95

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی اثر جیره غذایی حاوی سرکه سیب بر برخی از شاخص‌های همولنف میگوی وانامی و شمارش تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio* در روده آن است. در این مطالعه، 225 قطعه میگو وانامی با وزن 10/2±0/04 گرم، با جیره غذایی حاوی سرکه سیب به مدت 60 روز تغذیه شدند. تیمارها شامل سه جیره آزمایشی حاوی سطوح صفر (شاهد)، 2 و 4 درصد سرکه سیب بود (هر تیمار با سه تکرار). در پایان دوره به صورت تصادفی از میگوها به منظور بررسی شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف و شمارش تعداد باکتری‌های *Vibrio* نمونه‌برداری شد. نتایج نشان داد که تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio* در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت ($P<0/05$). میزان پروتئین تام و کلسیم در میگوهای تغذیه شده با جیره آزمایشی افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). اما اختلاف معنی‌داری در میزان گلوکز میان تیمارها مشاهده نشد ($P>0/05$). در مقابل، میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در تیمارهای حاوی سرکه سیب کاهش معنی‌داری داشت و بیشترین کاهش هم در تیمار 4 درصد سرکه سیب مشاهده شد ($P<0/05$). نتایج این مطالعه نشان داد که افزودن سرکه سیب می‌تواند موجب تغییر برخی شاخص‌های همولنف و کاهش تعداد کلونی‌های *Vibrio* در روده میگوی وانامی شود.

واژگان کلیدی: *سرکه سیب، همولنف، Vibrio، میگوی وانامی.*

1- دانشجوی دکتری شیلات، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
2- عضو باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بوشهر، بوشهر، ایران.
3- استاد گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
4- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: sajjad5550@gmail.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تولیدات جهانی میگو به واسطه افزایش سریع صنعت پرورش میگو با افزایش چشمگیری همراه بوده است، اما بروز و گسترش بیماری‌های ناشی از باکتری‌های فرصت‌طلب همچون *Vibrio* در سال‌های اخیر از موانع عمده این صنعت به شمار می‌آید (Tseng et al., 2009). *Vibrio*ها، اغلب در آبزیان بعد از ایجاد استرس و جراحت و یا همراه با سایر عوامل بیماری‌زا، ایجاد بیماری می‌کند. باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi*، در ایجاد تورم در رگ‌ها، التهاب روده و ایجاد جراحت چشم در ماهیان دریایی نقش دارد و در میگوها موجب مرگ و میر دسته جمعی لاروهای میگو می‌شود (Mine and Boopathy, 2011). باکتری *Vibrio parahaemolyticus* در اثر مصرف آبزیان به ویژه میگو و یا نرم‌تنان، به صورت خام یا نیم‌پخت می‌تواند انسان را نیز بیمار کند (Salem and Amin, 2012). بیماری ناشی از باکتری *Vibrio* میگوهای جوان و بالغ را در مرحله رشد مورد آسیب قرار می‌دهد و منجر به بروز تلفات می‌شود (Sivagnanavelmurugan et al., 2014). در پاسخ به این تهدید، پرورش‌دهندگان برای جلوگیری و درمان این بیماری به طور گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده کردند، در حالی که به مرور زمان باکتری *Vibrio* از طریق انتقال ژنی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم شد (Reboucas et al., 2011). از طرفی این مواد اثرات منفی و مخرب بر جانور میزبان، محیط زیست و مصرف‌کننده نهایی دارد، به طوری که امروزه استفاده از آن در بسیاری از کشورها ممنوع شده است (Ng et al., 2015). به دلیل وابستگی سخت‌پوستان به سیستم ایمنی ذاتی، در اغلب اوقات از مواد محرک ایمنی برای بالا بردن سیستم ایمنی استفاده می‌شود (Sivagnanavelmurugan et al., 2014). یکی از این موارد اسیدهای آلی هستند که به دلیل اثرات ضدمیکروبی قوی در سال‌های اخیر توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. از این مواد عموما به عنوان ترکیبات ایمن نام برده می‌شود و به دلیل وجود گروه کربوکسیل در ساختار آن‌ها دارای اثر ضدمیکروبی هستند (Ng et al., 2015). یکی از مواد طبیعی حاوی اسید آلی، سرکه سیب است. این ماده اسیدی از تخمیر سیب حاصل شده و علاوه بر اسید آلی، حاوی فلاونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، ویتامین و عناصر معدنی است (Kondo et al.,

www.SID.ir

Archive of SID

5000 سال قبل از میلاد، بابلیان از سرکه سیب به عنوان نگهدارنده استفاده می‌کردند (Kondo et al., 2009; Naziroglu et al., 2014). به علاوه، اسید استیک به میزان 9-3 درصد به عنوان ماده اصلی در سرکه سیب مطرح است (Beheshti et al., 2012). از طرفی، بر اساس مطالعات گذشته انواع مختلفی از سرکه نقش مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌های مضر دارند (Vijayakumar and Wolf-Hall, 2002; Jin et al., 2012; Shah et al., 2013).

یکی از راه‌های موثر بررسی شرایط محیطی و فیزیولوژیکی سخت‌پوستان، ارزیابی شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف است (Adeogun et al., 2015). به طوری که سطح کلسترول و تری‌گلیسیرید در همولنف نشان‌گر کیفیت غذای مصرفی است و میزان پروتئین نیز اغلب به عنوان شاخصی برای پاسخ‌های ایمنی مطرح است. همچنین، میزان گلوکز در اغلب اوقات بیانگر واکنش جانور به استرس در نظر گرفته می‌شود (Apun-Molina et al., 2015). از این رو، نتایج مطالعات پیشین نشان داد که سرکه سیب در کاهش چربی خون، تری‌گلیسیرید و گلوکز خون در موش و انسان نقش بسزایی داشته است (Kondo et al., 2009; Naziroglu et al., 2014; Iman et al., 2015). با توجه به این که همولنف سخت‌پوستان وظایف و فعالیت‌های متعددی بر عهده دارد، مطالعه و ارزیابی ترکیبات بیوشیمیایی آن حائز اهمیت است.

تاکنون مطالعات بسیار اندکی پیرامون استفاده از سرکه در صنعت آبزی‌پروری صورت گرفته است. از این رو، مطالعه حاضر به بررسی اثر خوراکی سرکه سیب و اثرگذاری این ماده بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف و بار باکتریایی *Vibrio* در روده میگوی وانامی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

طراحی آزمایش

میگوهای وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با میانگین وزنی 10/2±0/04 گرم از مزارع پرورش میگو در گمیشان استان گلستان تهیه و به محل اجرای پروژه (دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان) انتقال داده شد. برای سازگاری به محیط آزمایشی، میگوها به مدت 15 روز در وان‌های حاوی آب شور قرار داده شدند. پس از این مرحله، تعداد 225 قطعه میگو به صورت تصادفی در 9 وان فایبرگلاس با ظرفیت 400 لیتر (با حجم آب

www.SID.ir

Archive of SID

حدود 200 لیتر) پراکنده شدند. در طول دوره غذادهی، فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب شامل شوری و دما به صورت روزانه با استفاده از دستگاه مولتی پارامتر پرتابل (HI98194، HANNA، آمریکا) اندازه‌گیری می‌شد. میگوها روزانه 4 بار در ساعت‌های 7 و 11/30، 15/30 و 22 به میزان 3 درصد وزن بدن به مدت 60 روز با جیره‌های آزمایشی تغذیه شدند. هر روز صبح، قبل از شروع غذادهی، غذاهای خورده نشده و مدفوع خارج می‌شد. همچنین هر روز حدود 20 درصد از آب وان با آب جدید دریا جایگزین می‌شد. پس از مرحله سازگاری، میگوها با جیره‌های غذایی حاوی صفر (جیره پایه)، 2 و 4 درصد سرکه سیب تجاری حاوی 5٪ اسید استیک (1&1®) به عنوان مکمل غذایی (در سه تکرار) تغذیه شدند (Ng et al., 2009). هر سه جیره غذایی با ژلاتین پوشش‌دار شدند (Xie et al., 2010) و در دمای 20- سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

بررسی تعداد باکتری‌ها

در پایان دوره آزمایش (روز 60)، از هر تکرار 3 عدد میگو به صورت تصادفی برای بررسی تعداد باکتری‌های روده انتخاب شد. 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 (1- 10 تا 10- 10) رقیق شد. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون بر روی پلت‌های حاوی محیط کشت اختصاصی *Vibrio*، آگار تیوسولفات سیترات بایل ساکارز (TCBS، BioLife، ایتالیا) قرار داده شد و پلت‌ها و در دمای 28 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. شمارش باکتری‌ها بر اساس واحد شمارش کلونی (CFU) انجام شد. برای این منظور از پلت‌هایی که حاوی 30-300CFU بودند، برای شمارش تعداد کل باکتری‌های زنده استفاده شد (Da Silva et al., 2013).

شاخص‌های بیوشیمیایی همولنف

در پایان دوره پرورش، نمونه‌گیری از همولنف میگوهای تغذیه شده با سطوح مختلف سرکه سیب به عمل آمد. برای این منظور، برای جلوگیری از بروز استرس 24 ساعت قبل از نمونه‌گیری غذای‌دهی به میگوها قطع شد و سپس 5 قطعه میگو به ازای هر تکرار به صورت تصادفی انتخاب شدند. نمونه‌گیری به وسیله

www.SID.ir

Archive of SID

سرنگ انسولین با سر و سوزن شماره 26 از طریق سینوس شکمی انجام شد (شکل 1).

شکل 1: نحوه برداشت همولنف از سینوس شکمی میگوی وانامی

سپس نمونه‌های همولنف به لوله‌های فاقد ماده ضد انعقاد منتقل شد و سرم آن توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (5810، Eppendorf، آلمان) در دمای 5 درجه سانتی‌گراد با سرعت 10000 دور در دقیقه جدا و تا زمان انجام آزمایش در یخچال 20- سانتی‌گراد نگهداری شد (حسینی‌فرد و همکاران، 1391).

میزان پروتئین تام بر اساس روش لوری (Lowry et al., 1951) با استفاده از سرم آلبومین گاوی[1] به عنوان نمونه استاندارد و در طول موج 750 نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل 8405D47، Eppendorf، آلمان) اندازه‌گیری شد. سایر شاخص‌های بیوشیمیایی با استفاده از کیت (پارس آزمون، ایران) و براساس دستور العمل شرکت سازنده انجام شد. گلوکز به روش گلوکز اکسیداز، کسترول به روش کلسترول اکسیداز، تری‌گلیسیرید به روش گلیسروفسفات دی‌هیدروژناز (GPO-PAP) (حسینی‌فرد و همکاران، 1391) و کلسیم به روش ارتوکرزول فتالئین[2] (Khajepour and Hosseini, 2010) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

نرمال بودن پراکنش داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف- اسمیرنوف مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، اختلاف موجود بین تیمارها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه، در نرم‌افزار SPSS 18 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای مقایسه

1- Bovine Serum Albumin

2- Ortho Cresolphthalein

www.SID.ir

Archive of SID

میانگین‌ها از تست LSD در سطح احتمال 95 درصد استفاده شد.

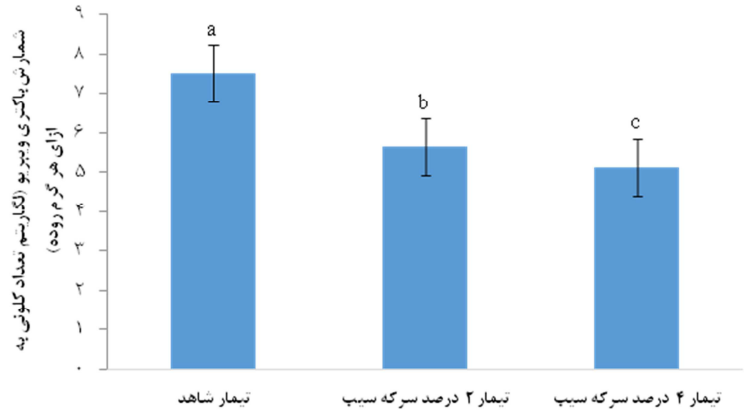
نتایج

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب که در طول دوره آزمایش اندازه‌گیری شدند شامل شوری با میانگین 20/27±1/21 گرم در لیتر و دما 25/84±1/64 درجه سانتی‌گراد بود.

نتایج مربوط به شمارش تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio* در شکل 2 نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که سرکه سیب موجود در جیره غذایی تاثیر معنی‌داری بر تعداد باکتری‌های *Vibrio* نسبت به تیمار شاهد شد ($P<0/05$)، به طوری که با افزایش غلظت سرکه سیب تعداد کلونی‌ها کاهش یافت و کمترین تعداد کلونی در تیمار 4 درصد سرکه سیب مشاهده شد ($P<0/05$).

نتایج مربوط به اندازه‌گیری پروتئین تام تیمارهای مختلف در شکل 3 آمده است. نتایج به دست آمده نشان داد که تیمارهای حاوی سرکه سیب موجب افزایش معنی‌دار میزان پروتئین تام نسبت به تیمار شاهد شدند، به طوری که میزان پروتئین تام در تیمار 2 درصد سرکه سیب نسبت به تیمار شاهد 58 درصد افزایش داشت ($P<0/05$).

نتایج به دست آمده از بررسی اثر جیره غذایی حاوی سرکه سیب بر شاخص‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در همولنف میگوی وانامی در جدول 1 بیان شده است.

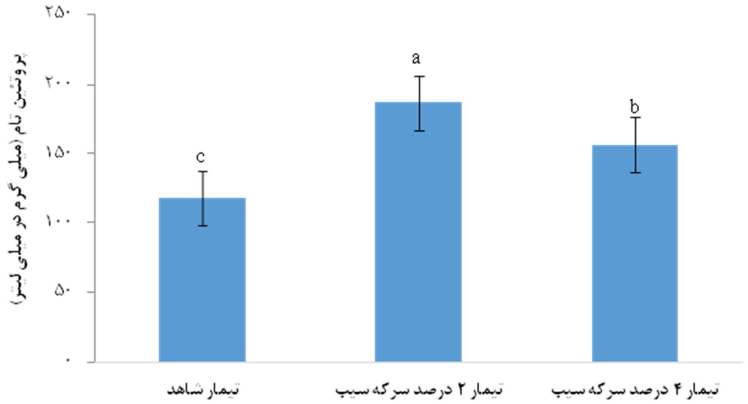


www.SID.ir

Archive of SID

شکل 2: شمارش تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio* در روده میگوی وانامی تغذیه شده با سطوح صفر (شاهد)، 2 و 4 درصد سرکه سیب (میانگین ± خطای استاندارد). حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند (P<0/05).

بر همین اساس، کمترین میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در تیمار 4 درصد سرکه سیب مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت (P<0/05). از طرفی، میزان کلسیم در تیمارهای تغذیه شده با سرکه سیب افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان داد (P<0/05). اما تفاوت معنی‌داری در میزان گلوکز در میان تیمارها مشاهده نشد (P>0/05).



شکل 3: میزان پروتئین تام همولنف میگوی وانامی تغذیه شده با سطوح صفر (شاهد)، 2 و 4 درصد سرکه سیب (میانگین ± خطای استاندارد). حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند (P<0/05).

جدول 1: شاخص‌های بیوشیمیایی اندازه‌گیری شده در همولنف میگوی وانامی تغذیه شده با سطوح متفاوت سرکه سیب (میانگین ± انحراف معیار)

پارامترهای بیوشیمیایی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	تیمارهای حاوی سرکه سیب		
	صفر درصد (شاهد)	2 درصد	4 درصد
گلوکز	23/40±2/26 [a]	25/72±2/24 [a]	24/70±0/70 [a]
کلسترول	33/00±2/00 [a]	26/31±1/13 [b]	23/07±1/97 [c]
تری‌گلیسیرید	72/83±3/31 [a]	61/80±2/04 [b]	58/35±6/19 [b]

www.SID.ir

Archive of SID

کلسیم	27/40±0/65 [b]	28/92±0/36 [a]	29/38±0/47 [a]

حروف لاتین غیرهمنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهند (P<0/05).

بحث

نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که جیره‌های غذایی حاوی سرکه سیب موجب کاهش تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio* در روده میگوی وانامی شدند (شکل 2). باکتری *Vibrio* در دستگاه گوارش میزبان تکثیر پیدا می‌کند و تبدیل به عامل بیماری‌زا می‌شود. 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 موجب کاهش pH سیتوپلاسم باکتری شده که در نتیجه مرگ باکتری‌های مضر را به دنبال دارد (Ng et al., 2015; Romano et al., 2015). بنابراین سرکه سیب دارای اثرات ضدباکتریایی است. به علاوه، مطالعات پیشین نشان داده است که سرکه بامبو (حاوی 4 درصد اسید استیک و 4 درصد سایر اسیدهای آلی) در شرایط آزمایشگاهی اثر ممانعت‌کنندگی بر رشد باکتری‌های *Ralstonia* sp.، *Pseudomonas* sp. و *Alcaligenes* sp. و قارچ‌های *Aureobasidium pullulans* و *Chaetomium globosum* دارد (Sulaiman et al., 2005). همچنین، سرکه گیاه جو حاوی درصدهای مختلف اسید استیک اثر مثبتی در جلوگیری از رشد باکتری‌های جدا شده از گربه‌ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) داشت به طوری که بیشترین کاهش به ترتیب در تیمارهای حاوی 5 و 2/5 درصد اسید استیک مشاهده شد (Lingham et al., 2012). از طرفی، استفاده از اسید استیک و اسید سیتریک در بسته‌های حاوی فیله ماهی آزاد اثر منفی بر رشد و تعداد باکتری کل و باکتری‌های انتروباکتریاسه[1] و اسید لاکتیک داشت (Schirmer et al., 2009). نتایج این مطالعات با نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر مطابقت و همخوانی دارد. از طرف دیگر، استفاده خوراکی از اسیدهای آلی یا نمک‌های آن‌ها موجب کاهش تعداد باکتری در روده خوک (Kluge et al., 2006) و هیبرید تیلاپیا *Oreochromis* sp. (Ng et al., 2009) شد. همچنین Da Silva و همکاران (2014) گزارش دادند که استفاده از نمک اسید آلی بوتیرات (به میزان 0/5، 1 و 2 درصد) به مدت 47 روز، موجب کاهش کلونی‌های

1- Enterobacteriaceae

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری *Vibrio* در روده میگوی وانامی شد. اسیدهای آلی اغلب بر باکتری‌های گرم منفی همچون *Vibrio* اثر بازدارندگی موثرتری دارند (Salem and Amin, 2012). به طوری که مصرف چندین نوع اسید آلی (به میزان 1، 2 و 4 درصد) موجب افزایش بقای میگوی وانامی در برابر *Vibrio harveyi* شد (Romano et al., 2015). همچنین در مطالعه‌ای دیگر استفاده از چندین نوع اسید آلی به میزان 4 گرم به ازای هر کیلوگرم غذا موجب افزایش مقاومت ماهی فلاندر (*Paralichthys olivaceus*) در مواجهه با باکتری *Edwardsiella tarda* شد (Park et al., 2011). Mine و Boopathy (2011) نشان دادند که حداقل قدرت بازدارندگی اسید استیک در برابر رشد باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi* حدود 0/041 درصد است. از این رو نتایج به دست آمده 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 موثری ایفا کند.

شاخص‌های بیوشیمیایی، شاخصی ارزشمند در توصیف وضعیت سلامت، پاسخ‌های فیزیولوژیکی و استرس هستند (عبداللهی آرپناهی و همکاران، 1393). گلوکز منوساکارید پایه‌ای است که نقش‌های فیزیولوژی مهمی مانند سنتز کتین و گلیکوژن دارد و همچنین به عنوان منبع تولید انرژی استفاده می‌شود (Dutra et al., 2008). میزان گلوکز در همولنف میگو به عنوان شاخصی برای شرایط غذایی و استرس در نظر گرفته می‌شود (Apun-Molina et al., 2015). سطح گلوکز همولنف در سخت‌پوستان به وسیله هورمون CHH[1] تنظیم می‌شود. بر اساس نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، میزان گلوکز در تیمارهای مختلف با هم تفاوت معنی‌داری نداشت. تاکنون مطالعه‌ای درباره اثر سرکه سیب بر میزان گلوکز موجودات آبزی انجام نگرفته است. همچنین، جیره غذایی حاوی بتاگلوکان، تاثیری بر میزان گلوکز همولنف میگوی وانامی نداشت (Boonanuntanasarn et al., 2015). اما Yamashita و همکاران (2007) گزارش دادند که استفاده از استات موجب کاهش گلوکز موجود در خون موش شد. همچنین استفاده خوراکی از سرکه سیب (به میزان 1/6 و 0/16 درصد) به مدت 21 روز در کاهش

1- Crustacean Hyperglycemic Hormone

www.SID.ir

Archive of SID

سطح گلوکز خون موش‌های آلوده به بیماری دیابت نقش موثری داشت و موجب کاهش هایپرگلیسمیا[1] شد (Iman et al., 2015). تاکنون، اطلاعات اندکی در مورد مکانیسم اثرگذاری سرکه سیب بر میزان گلوکز وجود دارد.

غلظت کل پروتئین موجود در همولنف به شرایط ایمنی و غذایی مرتبط می‌باشد و به عنوان شاخص بالینی در سنجش میزان سلامتی و استرس به کار برده می‌شود (Apun-Molina et al., 2015). به طوری که در پاسخ به استرس‌های محیطی، پروتئین موجود در همولنف برای تولید انرژی مصرف می‌شود و این فرآیند با سازگار شدن موجود به شرایط محیطی جدید متوقف می‌شود (Liu et al., 2012). نتایج به دست آمده از این مطالعه نشان داد که پروتئین تام در جیره‌های غذایی حاوی 2 و 4 درصد سرکه سیب به ترتیب افزایش 58 و 38 درصدی نسبت تیمار شاهد داشت (شکل 3). به علاوه، فرهنگی و همکاران (1392) نشان دادند که استفاده از جیره غذایی حاوی رنگدانه آستاگزانتین به میزان 100 و 150 میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم غذا، به مدت 9 هفته، موجب افزایش پروتئین تام همولنف میگوی وانامی شد. همچنین افزایش معنی‌دار در میزان پروتئین همولنف در میگوهای تغذیه شده با پروبیوتیک باسیلوس مشاهده شد (عبداللهی آرپناهی و همکاران، 1393). به نظر می‌رسد سرکه سیب با فعال‌سازی ظرفیت آنابولیک سلول‌های کبدی موجب افزایش تولید پروتئین می‌شود (Kamgar et al., 2013). پروتئین‌های موجود در همولنف شامل پروتئین‌های درگیر در شناسایی میگرواورگانیسم‌های مهاجم، پروسه انعقاد، سیستم فنول اکسیداز و پپتیدهای ضدمیکروبی است (فرهنگی و همکاران، 1392). بنابراین با توجه به مطالب عنوان شده، بهبود پروتئین همولنف نقش بسزایی در افزایش پاسخ‌های ایمنی میگو و مقاومت در برابر بیماری‌ها دارد.

در سخت‌پوستان، کلسترول علاوه بر حضور در ساختار سلول، در تولید هورمون‌های استروئیدی و پوست‌اندازی دخیل است. با این وجود سخت‌پوستان قادر به تولید کلسترول نیستند و تنها از طریق غذا این ماده در دسترس جانور قرار می‌گیرد (Bonilla-Gomez et al., 2012). بر اساس نتایج این

1- Hyperglycemia

www.SID.ir

Archive of SID

مطالعه، میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در تیمارهای حاوی سرکه سیب کاهش یافت (جدول 1). در همین راستا، Beheshti و همکاران (2012) گزارش دادند که استفاده خوراکی از سرکه سیب به مدت 8 هفته موجب کاهش سطح کلسترول و تری‌گلیسیرید در خون انسان شد. همچنین، استفاده روزانه از سرکه سیب به میزان 0/6 درصد به مدت 28 روز موجب کاهش میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در خون موش شد (Naziroglu et al., 2014). از طرفی کاهش میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید در مرغ‌های تغذیه شده با پروبیوتیک *Lactobacillus* مشاهده شد (Mansoub, 2010). با توجه به مطالب بیان شده، غذا اثر بسزایی در میزان ذخیره لیپید دارد. از این رو، اسید استیک موجود در سرکه از رونویسی آنزیم‌های تولید کننده کلسترول و تری‌گلیسیرید جلوگیری می‌کند که در نتیجه کاهش غلظت آن‌ها را در پی دارد (Yamashita et al., 2007).

کلسیم یک عنصر ضروری برای حفظ هموستازی سخت‌پوستان است. این عنصر نقش مهمی در پوست‌اندازی، تنظیم یونی، رشد (Li and Cheng, 2012) و سیستم ایمنی با فعال‌سازی پروفنول اکسیداز (Ai et al., 2008) ایفا می‌کند. در این مطالعه، افزایش معنی‌دار کلسیم در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد (جدول 1). Kishi و همکاران (1999) نیز نشان دادند که استفاده از جیره غذایی حاوی سرکه به مدت 32 روز منجر به افزایش جذب کلسیم در موش شد. به علاوه، استفاده از استات و پروپیونات موجب افزایش جدب کلسیم در روده انسان شد (Trinidad et al., 1996). به نظر می‌رسد، اسید استیک سرکه با یونیزه کردن کلسیم یا تشکیل استات کلسیم موجب افزایش حلالیت کلسیم در روده می‌شود (Kishi et al., 1999) که در نتیجه افزایش میزان کلسیم در کوتیکول، همولنف و هپاتوپانکراس را به دنبال دارد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که شاخص‌های بیوشیمیایی همچون پروتئین محلول و کلسیم در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب نسبت به تیمار شاهد بهبود یافت. در مقابل میزان کلسترول و تری‌گلیسیرید روندی کاهشی داشت. به علاوه در تیمارهای حاوی سرکه سیب تعداد کلونی‌های باکتری *Vibrio* در روده به طور چشمگیری کاهش یافت. بنابراین پیشنهاد می‌شود که سایر شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی در میگوها

www.SID.ir

Archive of SID

مورد بررسی قرار گیرد و همچنین تاثیر این ماده در سایر گونه‌های آبزیان مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

حسینی‌فرد س.م.، شاکر خشرودی م.، بیکایی س.ح.، عزت رحیمی ن. و رازقی منصور م. 1391. تاثیر جایگزینی سطوح مختلف آرد سویا با آرد ماهی بر برخی از پارامترهای بیوشیمیایی همولنف در خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacus leptodactylus*). مجله علمی شیلات ایران، 22(1): 184–175.

عبداللهی آرپناهی د.، جعفریان ح.، سلطانی م. و قلی‌پور کنعانی ح. 1393. بکارگیری دو گونه از پروبیوتیک‌های باسیلوسی بر پاسخ‌های ایمنی و فلور میکروبی روده پست‌لارو میگوی پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*). مجله علمی شیلات ایران، 23(4): 117–105.

فرهنگی م.، احمدی س.، رفیعی غ.ر.، قاعدنیا ب. و تقوی د. 1392. بررسی اثر سطوح مختلف رنگدانه آستاگزانتین در جیره غذایی بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی و ایمنی غیراختصاصی میگوی جوان پاسفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در مواجهه با تنش کاهش شدید اکسیژن. مجله علوم و فنون دریایی، 12(2): 114-103.

Adeogun A.O., Salami O.A., Chukwuka A.V. and Alaka O.O. 2015. Haematological and serum biochemical profile of the blue crab, *Callinectes amnicola* from two tropical lagoon ecosystems. African Journal of Biotechnology, 18: 233–247.

Ai H.S., Huang Y.C., Li S.D., Weng S.P., Yu X.Q. and He J.G. 2008. Characterization of a prophenol-oxidase from hemocytes of the shrimp *Litopenaeus vannamei* that is down-regulated by white spot syndrome virus. Fish and Shellfish Immunology, 25(1-2): 28–39.

Apun-Molina J.P., Santamaria-Miranda A., Luna-Gonzalez A., Ibarra-Gamez J.C., Medina-Alcantar V. and Racotta I.S. 2015. Growth and metabolic responses of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* and Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in polyculture fed with potential probiotic microorganisms on different schedules. Latin American Journal of Aquatic Research, 43(3): 435–445.

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, 9(4): 2431–2440.

Bonilla-Gomez J.L., Chiappa-Carrara X., Galindo C., Gilberto J., Cuzon G. and Gaxiola G. 2012. Physiological and biochemical changes of wild and cultivated juvenile pink

www.SID.ir

Archive of SID

shrimp *Farfantepenaeus duorarum* (Crustacea: Penaeidae) during molt cycle. Journal of Crustacean Biology, 32(4): 597–606.

Boonanuntanasarn S., Wongsasak U., Pitaksong T. and Chaijamrus S. 2015. Effects of dietary supplementation with β-glucan and synbiotics on growth, haemolymph chemistry, and intestinal microbiota and morphology in the Pacific white shrimp. Aquaculture Nutrition, 22(4): 837–845.

Da Silva B.C., Vieira F.N., Mourino J.L.P., Bolivar N. and Seiffert W.Q. 2014. Butyrate and propionate improve the growth performance of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture Research, 47(2): 612–623.

Da Silva B.C., Vieira F.N., Mourino J.L.P., Ferreira G.S. and Seiffert W.Q. 2013. Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. Aquaculture, 384–387: 104–110.

Dutra B.K., Da Silva K.M., Zank C., Conter M.R. and Oliveira G.T. 2008. Seasonal variation of the effect of high-carbohydrate and high-protein diets on the intermediate metabolism of *Parastacus brasiliensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) maintained in the laboratory. Iheringia, Serie Zoologia, 98(4): 433–440.

Iman M., Moallem S.A. and Barahoyee A. 2015. Effect of apple cider vinegar on blood glucose level in diabetic mice. Pharmaceutical Sciences, 20(4): 163–168.

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

Kamgar M., Pourgholam R., Ghiasi M. and Ghane M. 2013. Studies on *Bacillus subtilis*, as potential probiotics, on the biochemical parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) to challenge infections. Advanced Studies in Biology, 5(1): 37–50.

Kishi M., Fukaya M., Tsukamoto Y., Nagasawa T., Takehana K. and Nishizawa N. 1999. Enhancing effect of dietary vinegar on the intestinal absorption of calcium in ovariectomized rats. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 73(8): 1837–1843.

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, 90(7-8): 316–324.

Kondo T., Kishi M., Fushimi T., Ugajin S. and Kaga T. 2009.

www.SID.ir

Archive of SID

Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 73(8): 1837–1843.

Li C.H. and Cheng S. 2012. Variation of calcium levels in the tissues and hemolymph of *Litopenaeus vannamei* at various molting stages and salinities. Journal of Crustacean Biology, 32(1): 101–108.

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, 1(11): 1–5.

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 hypo-osmotic stress. Aquaculture, 362–363: 80–87.

Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193(1): 265–275.

Mansoub N.H. 2010. Effect of probiotic bacteria utilization on serum cholesterol and triglycrides contents and performance of broiler chickens. Global Veterinaria, 5(3): 184–186.

Mine S. and Boopathy R. 2011. Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. Current Microbiology, 63(1): 1–7.

Naziroglu M., Guler M., Ozgul C., Saydam G., Kucukayaz M. and Sozbir 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, 247(8): 667–673.

Ng W.K., Koh C.B., 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, 40(13): 1490–1500.

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, 449: 69–77.

Park G., Lee J.H., Yun H.Ho., Browdy C.L., Bharadwaj A.S.

www.SID.ir

Archive of SID

and Bai S.C. 2011. Effects of two different organic acid blands in olive flounder. Korean Journal of Organic Agriculture, 19: 39–42.

Reboucas H.R., de Sousa O.V., Lima A.S., Vasconcelos F.R., de Carvalho P.B. and Vieira R.H. 2011. Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceara, Brazil. Environmental Research, 111(1): 21–24.

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, 435: 228–236.

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, 7(1): 41–48.

Schirmer B.C., Heiberg R., Eie T., Moretro T., Maugesten T., Carlehog M. and Langsrud S. 2009. A novel packaging method with a dissolving CO_2 headspace combined with organic acids prolongs the shelf life of fresh salmon. International Journal of Food Microbiology, 133(1-2): 154–160.

Shah Q., Bibi F. and Shah A. 2013. Anti-microbial effects of olive oil and vinegar against *Salmonella* and *Escherichia coli*. The Pacific Journal of Science and Technology, 14(2): 479-486.

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, 39(2): 439–449.

Sulaiman O., Murphy R.J., Hashim R. and Sanchis Gritsch C. 2005. The inhibition of microbial growth by bamboo vinegar. Journal of Bamboo and Rattan, 4(1): 71–80.

Trinidad T.P., Wolever T.M.S. and Thompson L.U. 1996. Effect of acetate from the rectum and propionate on calcium absorption and distal colon of humans. American Journal of Clinical Nutrition, 63: 574–578.

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, 26(2): 339–344.

www.SID.ir

Archive of SID

Vijayakumar C. and Wolf-Hall C.E. 2002. Evaluation of household sanitizers for reducing levels of *Escherichia coli* on iceberg lettuce. Journal of Food Protection, 65(10): 1646–1650.

Xie Z., Wang F., Liu H., Guo S., Zhu A. and Niu H. 2010. Gelatin-walled microencapsulated diet for larval shrimp (*Penaeus japonicus* Bate) manufactured using the fluidized bed coating process. Aquaculture Research, 42(1): 65–73.

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, 71(5): 1236–1243.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 2, Summer 2017

Evaluation of different levels Apple cider vinegar effect on hemolymph parameters and intestinal *Vibrio* spp. of *Litopenaeus vannamei*

Sajjad Pourmozaffar[1,2]*, Abdol Majid Hajimoradloo[3], Hamed Kolangi Miandare[4]

Received: October 2016 Accepted: December 2016

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of dietary supplementation with apple cider vinegar on the hemolymph parameters and *Vibrio* spp. colony forming unit (CFU) in the intestine of the *Litopenaeus vannamei*. In this study, two hundred twenty-five *L. vannamei* with an average initial weight of 10.2±0.04g were fed diets supplemented with of apple cider vinegar for 60 days. Treatments included levels of 0% (control), 2% and 4% apple cider vinegar diets (triplicate). The shrimps were randomly sampled for determination biochemical parameters hemolymph and *Vibrio* spp. counts at the end of the experiment. The results indicated that *Vibrio* spp. CFU counts of the shrimp fed with apple cider vinegar diets were significantly lower compared to the control group ($P<0.05$). The shrimps fed with the supplemental diets had significantly higher total protein and calcium levels ($P<0.05$). But, no significant difference was observed in the glucose level among treatments ($P>0.05$). In contrast, the cholesterol and triglyceride concentrations were significantly decreased in the shrimps fed with diets containing apple cider vinegar and a dramatic decrease was observed in 4% apple cider vinegar treatment ($P<0.05$). Results of this study indicated that the addition of apple cider vinegar can changes the hemolymph parameters and decreases *Vibrio* spp. CFU load in the intestine of shrimp.

Key words: *Apple Cider Vinegar, Hemolymph,* Vibrio, Litopenaeus vannamei.

1- Ph.D. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Member of Young Researchers and Elite Club, Boushehr Branch, Islamic Azad University, Bushehr, Iran.
3- Professor in Fisheries Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- Assistant Professor in Fisheries Department, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding Author: sajjad5550@gmail.com

www.SID.ir