فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی 35، جلد 9، شماره 4، پائیز 95، صفحه 1 تا12

بررسی اثر رژیم غذایی سرکه سیب بر بافت هپاتوپانکراس و فلور باکتریایی روده در میگوی وانامی *Litopenaeus vannamei*

سجاد پورمظفر[1]، عبدالمجید حاجی مرادلو[1]، حامد کلنگی میان دره[1]
1-گروه شیلات و تکثیر و پرورش آبزیان، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گلستان. ایران. *sajjad5550@gmail.com*

تاریخ دریافت:95/6/16 **تاریخ پذیرش: 95/8/15**

چکیده

زمینه و هدف: تولیدات طبیعی اسیدهای آلی هم چون سرکه سیب، اغلب با کاهش یا تغییر در باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش و اسیدی کردن روده در میزبان، موجب جلوگیری از رشد باکتری‌های مضر در میزبان می‌شوند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر جیره غذایی حاوی سرکه سیب بر شمارش کلی تعداد هموسیت‌ها، بافت‌شناسی هپاتوپانکراس و فلور باکتریایی روده میگوی وانامی است.

روش کار: در این مطالعه تعداد 225 قطعه میگو وانامی با وزن 0/04±10/2 گرم با رژیم غذایی حاوی سطوح مختلف سرکه سیب به مدت 60 روز تغذیه شدند. تیمارها شامل، سه جیره‌ی آزمایشی حاوی سطوح صفر، 2% و 4% سرکه سیب بود. در پایان دوره به صورت تصادفی از میگوها نمونه‌برداری شد. جهت اندازه‌گیری تعداد هموسیت کل، همولنف از قسمت شکمی نمونه‌ها برداشته و تعداد سلول‌های *B* و *R*، مساحت توبول‌ها در بررسی بافت‌شناسی اندازه‌گیری گردید. از طرفی، جهت بررسی فلور باکتریایی روده($log\ CFU\ g^{-1}$) از محیط کشت نوترینت آگار به همراه نمک استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تعداد کل هموسیت در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب افزایش معنی‌داری داشت($p < 0/05$). علاوه بر این، از لحاظ تعداد سلول‌های کیسه‌ای و مساحت توبول‌های هپاتوپانکراس تفاوت معنی‌داری در تیمارها مشاهده نشد($p > 0/05$)، در حالی که تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در تیمارهای حاوی سرکه سیب کاهش معنی‌داری و بیشترین کاهش در تیمار 2% سرکه سیب مشاهده گردید($p < 0/05$). کل باکتری‌های قابل‌کشت در روده میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب کاهش معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد داشت($p < 0/05$).

نتیجه‌گیری: این مطالعه، به عنوان اولین اطلاعات گزارش شده در مورد استفاده از سرکه سیب در رژیم غذایی آبزیان می‌باشد. این یافته‌ها نشان داد که سرکه می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای اسیدهای آلی معرفی و پتانسیل بزرگی برای استفاده از این ماده در جیره غذایی میگوی وانامی وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: سرکه سیب، میگوی وانامی، تعداد هموسیت‌های کل، هپاتوپانکراس، فلور باکتریایی.

مقدمه

گونه‌های مفید باکتریایی دستگاه گوارش می‌تواند، اثر قابل توجهی بر ارتقای سلامت و رشد میزبان داشته باشد. از این رو، منجر به افزایش بهره‌وری و تولید در صنعت آبزی‌پروری می‌شود(20). هم چنین فاکتورهای متفاوتی در فراوانی و ترکیب گونه‌ای فلور باکتریایی میزبان نقش دارد. تعدادی از این عوامل به فیزیولوژی و آناتومی میزبان هم چون ساختار و زمان عبور غذا از روده و شرایط محیطی زندگی میزبان ارتباط دارد(۱۵،۲۰). کاهش تعداد باکتری‌های دستگاه گوارش که اغلب گونه‌های بیماری‌زا هستند، منجر به بهبود رشد و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها می‌شود(17). از طرفی، موجودات آبزی مانند میگو، نقش به سزایی در انتقال باکتری‌های بیماری‌زا هم چون ویبریو به انسان دارد. بنابراین، بایستی تلاش‌های گسترده و هدف مند جهت عرضه میگوی سالم به مصرف‌کننده انجام گیرد(22). میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*)، جزء گونه‌هایی است که

www.SID.ir

به صورت گسترده در جهان پرورش داده می‌شود. اگر چه تقاضا برای این گونه به طور پیوسته‌ای در سال‌های اخیر رو به افزایش است، اما بروز و گسترش بیماری-های میگو فشار زیادی را بر روی گسترش جهانی پرورش میگو وارد کرده است که این امر سبب شده اغلب اوقات پرورش‌دهندگان به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها تمایل پیدا کنند. در سال‌های اخیر، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها با مخالفت‌های شدیدی روبرو شده است. زیرا این مواد از طرفی اثرات مخربی و بلند مدتی بر محیط‌زیست و مصرف‌کننده نهایی می‌گذارد. به هر حال استفاده بلندمدت از این مواد می‌تواند منجر به مقاومت باکتریایی به خصوص عوامل بیماری‌زایی هم چون ویبریو در میگو شود و نیز در دوزهای بالاتر می‌تواند تأثیر منفی بر رشد و سایر فاکتورهای ایمنی داشته باشد(18،21). بنابراین علاقه‌مندی وسیعی در معرفی جایگزینی مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها و کاهش استفاده از آن‌ها به وجود آمده است. 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. هم چنین حدود 400 سال قبل از میلاد مسیح، بقراط پدر علم نوین دارویی، از مخلوط سرکه سیب و عسل برای درمان بسیاری از بیماری‌ها بهره می‌برد. در طول جنگ‌های داخلی کشور آمریکا از این ماده به‌عنوان ترمیم دهنده زخم‌ها معرفی گردید(2). این ماده غذایی حاوی فلاونوئیدها، پلی فنولیک، اسیدهای آلی، ویتامین‌ها و عناصر معدنی می‌باشد که این مواد عملکرد دارویی بدون ایجاد اثرات جانبی دارند(11،16). از طرفی سرکه سیب در خنثی‌سازی و از بین بردن مواد سمی و باکتری‌های مضر موجود در بدن نقش دارد(8). اسید استیک(9- 3 درصد) به‌عنوان ماده اصلی در سرکه سیب مطرح است(2). اسید استیک از خانواده اسیدهای آلی است که در ساختارشان حاوی یک یا چند گروه کربوکسیل(*-COOH*) اغلب به عنوان ترکیبات ضد باکتریایی در صنعت تولید غذای موجودات زنده استفاده می‌شود، باشد(18،21)، هم چنین اسیدهای آلی اغلب با کاهش یا تغییر در باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش و اسیدی کردن روده در میزبان، موجب افزایش حلالیت عناصر معدنی هم چون فسفر، آمینواسید و چربی در معده و روده شده که در نتیجه افزایش آنزیم‌های هضمی را در پی دارد(4). تاکنون، اغلب مطالعات انجام گرفته بر روی اثرات سرکه سیب، معطوف به حیواناتی هم چون موش و خرگوش و یا انسان بوده و مطالعه‌ای در خصوص موجودات آبزی انجام نشده است. از این رو نتایج مطالعات پیشین نشان داده که سرکه سیب می‌تواند باعث کاهش چربی خون، افزایش تولید آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و حفاظت در برابر استرس‌های اکسیداتیو در موش می‌شود(16). *Iman* و همکاران در سال 2015، نشان داد، که استفاده از سرکه سیب به مدت 21 روز در کاهش اثر گلوکز خون موش‌های آلوده به دیابت مؤثر می‌باشد(8). از طرفی، استفاده از سرکه سیب به مدت 12 هفته در کاهش وزن و مقدار تری گلیسیریدها در اشخاص دارای اضافه وزن نقش مؤثری را ایفا نموده است(11). به طور کلی، سیستم گوارشی در میگوها از قسمت‌های مختلفی هم چون دهان و حفره دهانی، مری، معده، روده(میانی و پسین) و معقد تشکیل شده است. دهان و حفره دهانی، مواد غذایی را گرفته و آن را به قسمت‌های کوچک تر تبدیل می‌کند. مری، لوله‌ی کوتاهی است، که غذا را به سمت معده هدایت می‌کند. حفره اول معده، کاردیاک نام دارد و متشکل از دندان‌های کوتیکولی است که در آسیاب کردن غذا نقش مؤثری دارد. پیلور به عنوان حفره دوم

Archive of SID

www.SID.ir

معده شناخته می‌شود، که ذرات را به‌وسیله‌ی اندام فیلتر کننده، فیلتر می‌گردد. ذرات بزرگ تر از 100-50 نانومتر از طریق معقد دفع می‌شود. روده میانی، بیشترین حجم از مجرای روده را اشغال می‌کند. مواد تصفیه شده به هپاتوپانکراس منتقل تا مواد غذایی آن جذب شود. روده پسین، لوله کوتاهی است که روده میانی را به معقد متصل می‌کند(26). مورفولوژی هپاتوپانکراس اولین بار در اوایل قرن بیستم(سال 1928) توسط *Hirschand Jacobs* شرح داده شد(23). این غده حدود 6-2 درصد وزن بدن را تشکیل می‌دهد و به‌عنوان بزرگ ترین اندام در روده میانی سخت‌پوستان محسوب می‌شود(19). هپاتوپانکراس، متشکل از چندین توبول ستاره‌ای شکل است که در بافت پوششی دارای چندین نوع سلول از جمله سلول‌های جذبی-ذخیره‌ای(*R-cell*)، کیسه‌ای شکل(*B-cell*)، جنینی(*E-cell*) و رشته‌ای(*F-cell*) 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(13) و سیستم ایمنی(7) نیز اشاره نمود. سلول‌های جذبی-ذخیره‌ای، سلول‌های استوانه‌ای شکل با حاشیه مشخص و فراوان‌ترین سلول در هپاتوپانکراس است، آن‌ها حاوی واکوئل‌های رأسی هستند و اغلب در ناحیه پروکسیمال واحدهای ترشحی حضور دارند. سلول‌های کیسه‌ای، سلول‌هایی حاوی واکوئل‌های بزرگ که با لایه نازکی از سیتوپلاسم پوشیده شده و بزرگ ترین سلول موجود در هپاتوپانکراس است. سیتوپلاسم سلول حاوی واکوئل-های متعدد می‌باشد. بیشترین پراکندگی سلول کیسه‌ای در ناحیه‌ی مدیال و دیستال توبول‌های هپاتوپانکراس می‌باشد. سلول‌های جنینی، سلول‌های تمایز نیافته، گرد با هسته مشخص و سیتوپلاسم بازوفیلی است که اغلب در ناحیه دیستال توبول‌ها حضور دارد. سلول‌های رشته‌ای، سلول‌های استوانه‌ای یا مثلثی شکل با هسته‌ای گرد و مشخص و سیتوپلاسم بازوفیلی است. این سلول اغلب در ناحیه مدیال و دیستال توبول‌ها واقع شده است(۵،۱)(شکل 1). تاکنون، هیچ گونه اطلاعاتی در مورد استفاده از رژیم غذایی حاوی سرکه سیب، در صنعت آبزی‌پروری میگو انجام نگرفته است. از این رو این مطالعه به بررسی اثر سرکه سیب در غذای تجاری میگوی وانامی و پتانسیل این ماده بر تأثیرگذاری بر تعداد هموسیت‌ها، بافت‌شناسی هپاتوپانکراس و بررسی فلور باکتریایی روده میگوی وانامی پرداخته است.

مواد وروش ها

طراحی آزمایش

میگوهای به ظاهر سالم وانامی(10/2±0/04 گرم) از مزارع پرورش در گمیشان استان گلستان تهیه و به محل اجرای پروژه انتقال داده و به مدت 15 روز در تانک‌های حاوی آب شور جهت سازگاری به محیط قرار داده شدند. پس از این، تعداد 225 قطعه میگو به صورت تصادفی در 9 تانک فایبرگلاس با ظرفیت 400 لیتر پراکنده شدند. در طول دوره غذادهی، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب به صورت روزانه اندازه‌گیری گردید. میزان شوری 1/21 ± 20/27 گرم در لیتر و دما 1/64 ± 25/84 درجه سانتی گراد 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 گردید. هم چنین هر روز حدود 20 درصد از آب با آب جدید دریا جایگزین شد. پس از مرحله سازگاری، میگوها با غذای تجاری تعاونی 21 بیضاء و غذاهای تجاری حاوی 2 و 4 درصد سرکه سیب تجاری حاوی 5% اسید استیک (1 &1®) به‌عنوان مکمل غذایی تغذیه شدند(18). هر سه جیره غذایی با

Archive of SID

www.SID.ir

روغن پوشش‌دار شدند و در دمای 20- سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری گردیدند(21).

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. روده‌ها با استفاده از پنس و اسکالپل برداشته 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 غیر اختصاصی باکتری‌های هتروتروفیک) به همراه 1/5 درصد نمک قرار داده و در دمای 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت انکوباسیون شدند. شمارش باکتری‌ها بر اساس واحد شمارش کلونی(*CFU*) انجام گرفت. پلت‌هایی که حاوی 300-30 *CFU* در هر پلت بودند، برای شمارش تعداد کل باکتری های زنده استفاده شد (4،21).

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 تثبیت (5) و برای نگهداری بیشتر وارد محلول اتانول 70% تا زمان بررسی شدند. برش های عرضی(7-5 میکرون) با استفاده از میکروتوم پس از مراحل قالب گیری تهیه و با استفاده از ائوزین-هماتوکسیلین رنگ‌آمیزی گردیدند. بررسی فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای و کیسه‌ای با استفاده از میکروسکوپ نوری صورت گرفت. همچنین با استفاده از برنامه *Digimizer 4.1.1.0*، مساحت توبول‌های هپاتوپانکراس اندازه گیری شد.

شمارش کلی سلول‌های هموفلنف(*THC*)

در پایان دوره آزمایش شمارش کلی سلول‌های هموفلنف انجام گرفت. جهت بیهوش نمودن میگوها، به مدت 15 دقیقه بر روی یخ قرار داده و هموفلنف، 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، یک قطره از سوسپانسیون هموفلنف - ضد انعقاد بر روی لام هموسیتومتر برای شمارش کلی سلول‌های هموفلنف قرار داده شد.

تحلیل آماری

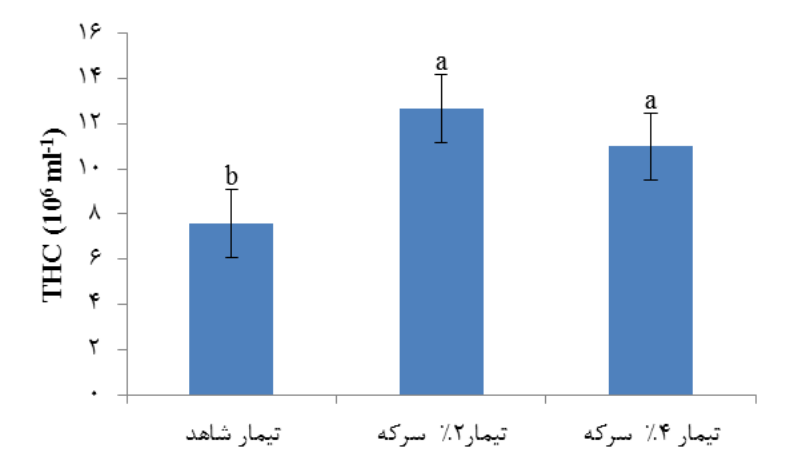
پراکنش نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگراف - اسمیرنوف مورد سنجش قرار گرفت. با توجه به نرمال بودن داده‌ها، اختلاف موجود بین تیمارها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در 3 تیمار و 3 تکرار تعیین و نتایج حاصله با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه، با استفاده از نرم‌افزار *SPSS 18* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. جهت مقایسه میانگین‌ها از تست *LSD* در سطح احتمال 95 درصد استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به شمارش کلی سلول‌های هموسیت (*THC*) تیمارهای مختلف در نمودار 1 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،کم ترین تعداد هموسیت-ها در تیمار کنترل(1/01± 7/58) مشاهده گردید.

Archive of SID

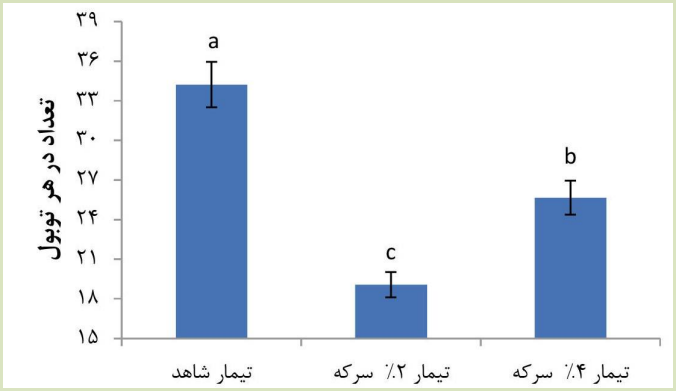
www.SID.ir



نمودار 1- شمارش کلی هموسیت در تیمار شاهد و میگوهای تغذیه شده با 2% و 4% سرکه سیب در جیره غذایی به مدت 60 روز.
حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد($p < 0/05$).

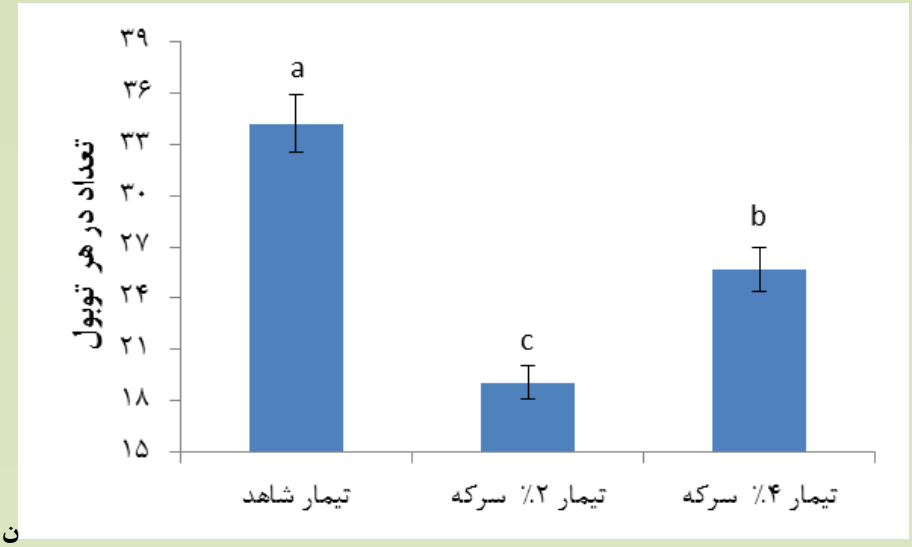
بافت‌شناسی هپاتوپانکراس

نتایج حاصل از شمارش سلول‌های کیسه‌ای و جذبی – ذخیره‌ای در توبول‌های هپاتوپانکراس با استفاده از رنگ‌آمیزی ائوزین- هماتوکسیلین نشان داد که تعداد سلول‌های کیسه‌ای در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب تفاوت معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نداشت($p > 0/05$)(نمودار 2). علاوه بر این، تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب کاهش معنی‌داری مشاهده شد($p < 0/05$). به طوری که تعداد این سلول در تیمار 2 و 4 درصد سرکه سیب به ترتیب 55% و 44% نسبت به تیمار شاهد کاهش داشت(نمودار 3). از طرفی، در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری در اندازه مساحت توبول‌های هپاتوپانکراس مشاهده نشد(نمودار 4) ($p > 0/05$).



نمودار2- مقایسه فراوانی سلول‌های کیسه‌ای (*B-cell*) در تیمار شاهد و میگوهای تغذیه شده با 2% و 4% سرکه سیب به مدت 60 روز.
حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

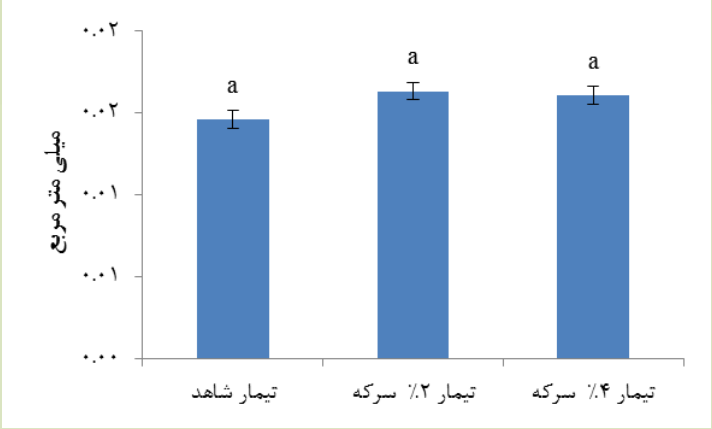
www.SID.ir



نمودار3- مقایسه فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای (*R-cell*) در تیمار شاهد و میگوهای تیمار شده با 2 %و 4% سرکه سیب به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

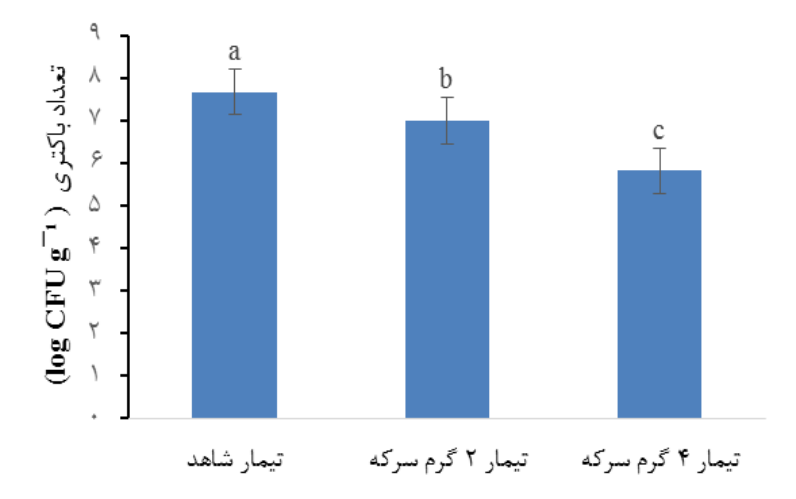
فلور باکتریایی روده

نتایج مربوط به فلور باکتریایی روده در نمودار 5 نمایش داده شده است. نتایج نشان داد که، غلظت سرکه سیب موجود در جیره غذایی موجب کاهش معنی‌دار تعداد باکتری‌ها کل نسبت به تیمار کنترل شد. به طوری که با افزایش غلظت سرکه سیب، کم ترین تعداد باکتری‌های کل در تیمار 4% سرکه سیب مشاهده شد($p < 0/05$).

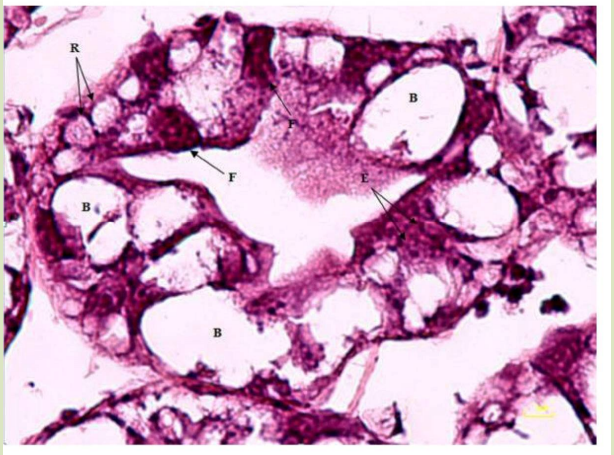


نمودار4- مقایسه مساحت توبول‌های هپاتوپانکراس(میلی متر مربع) میگوی وانامی تیمار شده با 2 %و 4% سرکه سیب به مدت 60 روز. حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد($p < 0/05$).

www.SID.ir



نمودار5- شمارش کل باکتری‌های قابل کشت در روده میگوی وانامی تیمار شده با سطوح 2% و 4% سرکه سیب به مدت 60 روز.
حروف لاتین غیر همنام تفاوت معنی‌دار را نشان می‌دهد ($p < 0/05$).

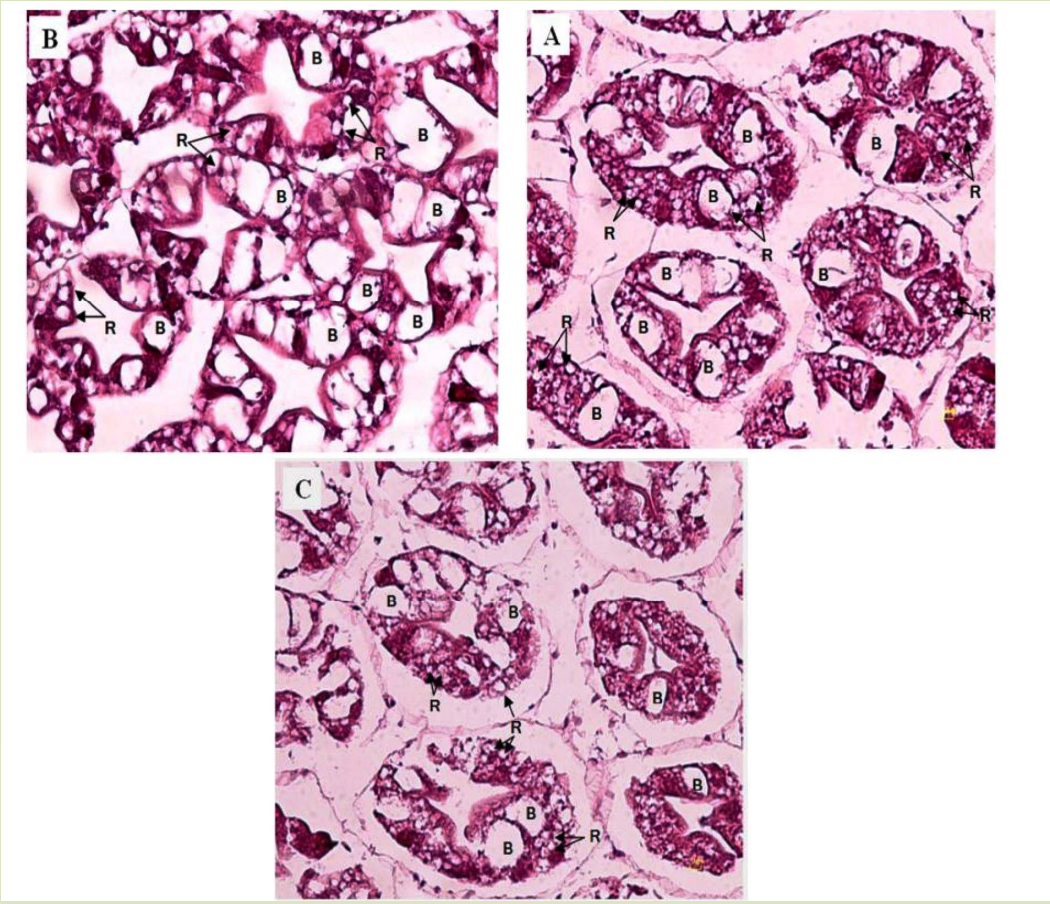


شکل 1- مقطع عرضی از هپاتوپانکراس میگوی وانامی.
توبول هپاتوپانکراس دارای سلول‌های جذبی – ذخیره‌ای (*R-cell*)، کیسه‌ای (*B-cell*)، رشته‌ای (*F-cell*) و جنینی (*E-cell*). بزرگنمایی 40×.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که رژیم غذایی حاوی سرکه سیب در جیره‌ی میگوی وانامی، توانایی افزایش سیستم ایمنی از طریق افزایش تعداد هموسیت-ها را دارا است. از طرفی، سرکه سیب موجب کاهش فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای و در نتیجه کاهش ذخیره لیپید در هپاتوپانکراس شد. هم چنین این ماده، بر روی فلور میکروبی روده تأثیرگذار بود. 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 مشاهده شد. به نظر می‌رسد که کاهش تعداد باکتری‌ها، می‌تواند به واسطه کاهش pH در روده توسط سرکه سیب باشد و ورود اسید آلی به داخل سلول و کاهش pH سیتوپلاسم باکتری، که در نتیجه مرگ باکتری‌های مضر را به دنبال دارد(21 ،17). از طرفی کاهش تعداد کل باکتری در روده میگوی وانامی وابسته به مقدار سرکه سیب می‌باشد. به طوری که در تیمار 4% کمترین تعداد کلونی‌های باکتری‌ها مشاهده شد($p < 0/05$)(نمودار 5).

www.SID.ir



شکل 2- مقطع عرضی از هپاتوپانکراس میگوی وانامی تغذیه شده با غذای کنترل(*A*)، یا حاوی 2%(*B*) و 4% سرکه سیب(*C*).

توبول‌ها ی هپاتوپانکراس دارای سلول های جذبی – ذخیره‌ای(*R-cell*) و کیسه‌ای(*B-cell*). فراوانی کمتر در سلول های جذبی- ذخیره‌ای در تیمار های حاوی سرکه سیب مشخص شده است. بزرگنمایی 20× .

استفاده از مخلوط چند نوع اسیدآلی و پتاسیم دی فرمات منجر به کاهش تعداد باکتری‌های موجود در مدفوع ماهی هیبرید تیلاپیا(*Oreochromis sp*) می-شود، این مطالعه توسط *NG* و همکاران در سال 2009 انجام گرفت(18). استفاده از رژیم غذایی حاوی اسیدآلی در خوک موجب کاهش تعداد باکتری‌های موجود در روده شد که با نتایج حاصل از این مطالعه هم خوانی و مطابقت دارد(10). از طرفی، *Da Silva* و همکاران در سال 2013، نشان داد که تغذیه میگوهای وانامی با 2% نمک فرمات به مدت 14 روز موجب کاهش معنی‌داری در تعداد کل باکتری‌های هتروتروفیک شده است(4)، که با نتایج حاصل از این مطالعه مطابقت و هم خوانی دارد. اما در مقابل، جیره غذایی حاوی نمک آلی بوترات موجب کاهش معنی‌دار در تعداد باکتری ویبریو در روده میگوی وانامی می شود اما تأثیری بر روی تعداد کل باکتری روده ندارد(3). مطالعات گذشته نشان دادند که اسیدهای آلی اغلب بر روی باکتری‌های گرم منفی هم چون ویبریو اثر بازدارندگی مؤثرتری دارند(22). به طوری که مصرف 2% از چندین نوع اسیدآلی موجب کاهش تعداد باکتری‌ها در روده و هپاتوپانکراس و افزایش بقای میگوی وانامی در برابر *Vibrio harveyi* گردید(17). حداقل قدرت بازدارندگی اسیدهای آلی مانند اسید استیک، فرمیک اسید و بوتریک اسید در برابر رشد باکتری بیماری‌زای *Vibrio harveyi* به ترتیب حدود 0/041، 0/035 و 0/066 درصد

www.SID.ir

می‌باشد(14). به نظر می‌رسد اثر گذاری اسیدهای آلی بر فلور باکتری روده ناشی از نوع اسیدآلی 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 به‌عنوان یک محصول طبیعی و هم چنین حاوی اسیدآلی مانند اسید استیک می‌تواند در بهبود سلامتی میگوی وانامی و همچنین جلوگیری از بروز بیماری‌ها نقش مؤثری ایفا کند. تعداد سلول‌های هموسیت(*THC*) به بسیاری از فاکتورهای محیطی، فیزیولوژیکی و عوامل استرس‌زا وابسته است(25). 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 بوده و توانایی فاگوسیتوز، تشکیل نودول، تشکیل کپسول و تولید چندین پروتئین مربوط به سیستم ایمنی را دارا می باشد(24). تعداد هموسیت‌ها به وسیله‌ی فعالیت بافت هماتوپویتیک تنظیم می‌شود. در واقع افزایش تعداد هموسیت در همولنف شاخصی برای بهبود سیستم ایمنی مطرح می‌شود(12). در این مطالعه بررسی تعداد هموسیت‌های کل نشان داد که میگوهای تغذیه شده با سطوح 2% و 4% سرکه سیب به ترتیب افزایش معنی‌داری در حدود 40% و 30% در مقایسه با گروه کنترل داشتند($p < 0/05$)(نمودار1). تاکنون مطالعات اندکی پیرامون کارایی اسیدهای آلی بر تعداد کل هموسیت در میگو انجام گرفته است. به هر حال *Dasilva* و همکاران در سال 2014، گزارش دادند که تفاوت معنی‌داری در تعداد کل هموسیت میگوهای وانامی تغذیه شده با سطوح مختلف پروپینات و بوتریات مشاهده نشد(3). به طور کلی هپاتوپانکراس، مواد غذایی رو به شکل ذرات لیپید در سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای، ذخیره کرده و محلی برای ترشح آنزیم‌های هضمی به شمار می‌آید که عملکردی شبیه به کبد و پانکراس در مهره‌داران آبزی دارد(9). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جیره غذایی حاوی سرکه سیب می‌تواند بر فراوانی سلول‌های موجود در هپاتوپانکراس تأثیرگذار باشد به نحوی که موجب کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای شد(نمودار 3). اگر چه، در تعداد سلول‌های کیسه‌ای و مساحت توبول‌ها تفاوتی مشاهده نشد(نمودار 2 و 4). بنابراین سرکه سیب با کاهش فراوانی سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای موجب کاهش ذخیره انرژی، هم چنین با توجه به تعداد سلول‌های کیسه‌ای، نقشی در تغییر ترشح آنزیم‌های هضمی نداشت. در مقابل *Romano* و همکاران در سال 2015، نشان دادند که فراوانی سلول‌های جذبی – ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با مخلوطی از چندین نوع اسیدهای آلی افزایش یافته در حالی که فراوانی سلول‌های کیسه‌ای کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد داشت(21). *Kalil* و همکاران در سال 2014 گزارش دادند که جیره‌های غذایی حاوی 2، 3 و 4% سدیم لاکتات منجر به تورم سلول‌های جذبی – ذخیره‌ای و کیسه‌ای و در نتیجه افزایش آسیب به هپاتوپانکراس را در میگوی آب شیرین(*Macrobrachium rosenbergii*) گردید(9). استفاده از اسیدهای آلی در جیره‌ی غذایی میگوی وانامی منجر به کاهش آسیب و تخریب هپاتوپانکراس در برابر باکتری *Vibrio harveyi* شد(17). 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 پلاسمای انسان‌های بیمار به چربی بالا و چاق نشان داد که استفاده روزانه از این ماده می‌تواند کاهش قابل ملاحظه‌ای در تری گلیسیرید و کلسترول موجود در خون داشته باشد (11

Archive of SID

www.SID.ir

2،). نیز استفاده از سرکه سیب به مدت 28 روز، موجب کاهش اکسیداسیون لیپید و افزایش مقدار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در موش شد(16) که با نتایج حاصل از این مطالعه هم خوانی و مطابق دارد. به نظر می‌رسد اسیداستیک موجود در سرکه سیب موجب کاهش اکسیداسیون اسیدهای چرب و از چربی‌زایی در بافت‌ها جلوگیری می‌کند که در نتیجه کاهش غلظت چربی را به دنبال دارد(۶،۲۷). نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که استفاده از سرکه سیب می‌تواند موجب افزایش تعداد هموسیت‌ها در همولنف میگوی وانامی شده است. از طرفی، کاهش قابل ملاحظه‌ای در تعداد سلول‌های جذبی- ذخیره‌ای در میگوهای تغذیه شده با سرکه سیب به ثبت رسید، اما تفاوتی میان سلول‌های کیسه‌ای در تیمارهای مختلف مشاهده نشد. از طرفی با افزایش غلظت سرکه سیب، تعداد باکتری‌های غیراختصاصی به طور چشم گیری 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 به‌عنوان یک ماده طبیعی و ارزان قیمت حاوی اسیدآلی 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- رضائیان، م.، صفری کاچیانی، م.ر. 1380. سلول‌شناسی غده‌ی هپاتوپانکراس در میگوی سفید هندی خلیج فارس. مجله دامپزشکی دانشگاه تهران. شماره 4. ص 29-25.

2.*Beheshti, Z., Huak Chan, Y., Sharif Nia, H., Hajihosseini, F., Nazari, R., Shaabani, M., Salehi Omran, M.T. (2012). Influence of apple cider vinegar on blood lipids. Life Sci. J, 9(4); 2431-2440.*

3.*Dasilva, B.C., Vieira, F.doN., Mouriño, J.L.P., Bolivar, N., Seiffert, W.Q. (2014). Butyrate and propionate improve the growth performance of Litopenaeus vannamei. Aquac. Res, 47(2); 612–623.*

4.*Dasilva, B.C., Vieira, F.doN., Mourinoo, J.L.P., Ferreira, G.S., Seiffert, W.Q. (2013). Salts of organic acids selection by multiple characteristics for marine shrimp nutrition. Aquac, 384–387, 104–110.*

5.*Franceschini-Vicentini, I.B., Ribeiro, K., Papa, L.P., Marques Junior, J., Vicentini, C.A., Valenti, P.M.C.M. (2009). Histoarchitectural Features of the hepatopancreas of the amazon river prawn, Macrobrachium amazonicum. Int. J. Morphol, 27(1); 121–128.*

6.*Fushimi, T., Suruga, K., Oshima, Y., Fukiharu, M., Tsukamoto, Y., Goda, T. (2006). Dietary acetic acid reduces serum cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. Br. J. Nutr, 95(5); 916–924.*

7.*Gao, W., Tan, B., Mai, K., Chi, S., Liu, H., Dong, X., Yang, Q. (2012). Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white shrimp(Litopenaeus vannamei) exposed to long-term low salinity stress. Aquac, 364–365, 186–191.*

8.*Iman, M., Moallem, S. A., Barahoyee, A. (2015). Effect of apple cider Vinegar on blood glucose level in diabetic mice. Pharm. Sci, 20(4); 163–168.*

9.*Khalil, M.T., Setaita H.S., Ashraf M.A.G., Madlin M.H., Hanan, H. (2014). Impact of sodium lactate as a growth promoter on the hepatopancreas of the freshwater prawn Macrobrachium rosenbergii (de Man, 1879). Egypt. J. Aquat. Biol. Fish, 18(1); 4–6.*

10.*Kluge, H., Broz, J., Eder, K. (2006). Effect of benzoic acid on growth performance, nutrient digestibility, nitrogen balance, gastrointestinal microflora and parameters of microbial metabolism in piglets. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl), 90 (7–8), 316–324.*

11.*Kondo, T., Kishi, M., Fushimi, T., Ugajin, S., Kaga, T. (2009). Vinegar intake reduces body weight, body fat mass, and serum triglyceride levels in obese Japanese subjects. Biosci. Biotechnol. Biochem, 73(8); 1837–1843.*

Archive of SID

www.SID.ir

12.*Kumar, N.R., Raman, R.P., Jadhao, S.B., Brahmchari, R.K., Kumar, K., Dash, G. (2013). Effect of dietary supplementation of Bacillus licheniformis on gut microbiota, growth and immune. Aquacult Int, 21; 387–403.*

13.*Liu, H., Sun, W., Tan, B., Chi, S., Dong, X., Yang, Q. (2012). Molecular cloning and expression of hepatopancreas glutamine synthetase in the Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei, induced by acute hypoosmotic stress. Aquac, 362–363, 80–87.*

14.*Mine, S., Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, Vibrio harveyi. Curr. Microbiol,63(1); 1–7.*

15.*Moss, S.M., LeaMaster, B.R., Sweeney, J. N. (2000). Relative abundance and species composition of gram-negative, aerobic bacteria associated with the gut of juvenile white shrimp Litopenaeus vannamei reared in oligotrophic well water and eutrophic pond water. J. World Aquac. Soc, 31(2); 255-263.*

16.*Naziro□lu, M., Güler, M., Özgül, C., Saydam, G., Küçükayaz, M., Sözbir, E. (2014). Apple cider vinegar modulates serum lipid profile, erythrocyte, kidney, and liver membrane oxidative stress in ovariectomized mice fed high cholesterol. J. Membr. Biol, 247(8); 667–673.*

17.*Ng, W.K., Koh, C.B., Teoh, C.Y., 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. Aquac, 449; 69–77*

18.*Ng, W., Koh, C., Sudesh, K., 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. Aquac. Res, 40; 1490–1500.*

19.*Nunes, E.T., Braga, A.A., Camargo-Mathias, M.I. (2014). Histochemical study of the hepatopancreas in adult females of the pink-shrimp Farfantepenaeus brasiliensis Latreille, 1817. Acta Histochem, 116(1); 243–251.*

20.*Oxley, A.P.A., Shipton, W., Owens, L., McKay, D. (2002). Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, Penaeus merguiensis. J. Appl. Microbiol, 93(2); 214–223.*

21.*Romano, N., Koh, C.B., 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. Aquac, 435; 228–236.*

22.*Salem, A., Amin, R. (2012). Evaluation of some organic acids as potential decontaminants of Vibrio parahaemolyticus in fresh shrimp. World J. Dairy Food Sci, 7(1); 41–48.*

23.*Sreeram, M.P., Menon, N.R. (2005). Histopathological changes in the hepatopancreas of the penaeid shrimp Metapenaeus dobsoni exposed to petroleum hydrocarbons. J. Mar. Biol. Assoc. India, 47(2); 160–168.*

24.*Tassanakajon, A., Somboonwiwat, K., Supungul, P., Tang, S. (2012). Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. Fish Shellfish Immunol, 34(4); 954-967.*

25.*Van de Braak, C.B.T., Faber, R., Boon, J.H. (1996). Cellular and humoral characteroistics of Penaeus mondon (Fabricius, 1798) haemolymph. Comp. Haematol. Int, 6; 194–203.*

26.*Vogt, G. (1996). Morphology and physiology of digestive epithelia in Decapod crustaceans. Pfltigers Arch - Eur J Physiot, 431(69); 239-240.*

27.*Yamashita, H., Fujisawa, K., Ito, E., Idei, S., Kawaguchi, N., Kimoto, M., Hiemori, M. (2007). Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. Biosci. Biotechnol. Biochem, 71(5); 1236–1243.*

.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation dietary effect of Apple cider vinegar on histology of the hepatopancreas and intestinal microbiota of the Litopenaeus vannamei

***S. Pourmozaffar*[1], *M. Hajimoradloo*[1.], *H. Kolangi Miandare*[1]**

1. *Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan.Iran.* ***sajjad5550@gmail.com***

Received:2016.6. 9 ***Accepted:2016.5. 11***

Abstract

Inroduction & Objective: ***Organic acids product such as Apple cider vinegar usually alter or reduce bacteria within the gastrointestinal tract and decrease pH in the intestinal tract, thus inhibit the growth of harmful bacteria the host animal. The objectives of this study, was to evaluate the effect of dietary supplementation of Apple cider vinegar on total hemocyte count, histology of the hepatopancreas and intestinal microbiota of the Litopenaeus vannamei.***

Materials and Methods: ***In this study two hundred twenty-five Litopenaeus vannamei with an average initial weight of 10.2 ± 0.04 g, that they were fed diets supplemented with different levels of a Apple cider vingar after 60 days. Treatments included levels of 0, 2% and 4% Apple cider vinegar diets. Shrimp were randomly sampled at the end of the experiment. The hemolymph was withdrawn from abdominal segments of samples for measuring total hemocyte count. The number of the B-cells and R-cells, as well as tubule diameter were quantified for histological examination. Also, the gut microbial fora count (log CFU g^{-1}) was determined using nutrient agar medium plus salt.***

Results: ***The results indicated that, shrimp fed Apple cider vinegar diets had significantly higher total hemocyte count ($p < 0.05$). In addition, no significant differences in blister cells and area of hepatopancreas tubules were observed among treatments ($p > 0.05$), whereas the number of the resorptive cells significantly decreased in shrimp fed a diet containing Apple cider vinegar and a dramatic decrease was observed in 2% Apple cider vinegar treatment ($p < 0.05$). Total viable bacterial counts in the intestine of shrimp fed Apple cider vinegar diets were significantly lower compared to control group ($p < 0.05$).***

Conclusion: ***This study was the first reported data on the use of dietary Apple cider vinegar in aquatic animal. These findings indicate that the Apple cider vinegar was introducing suitable organic acid alternative and also it has the greatest potential for use as a diet supplement for L. vannamei.***

Key word: *Apple Cider Vinegar, Litopenaeus vannamei, Total Hemocyte Count, Hepatopancreas, Intestinal Microbiota*

www.SID.ir