Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
سال سیزدهم، شماره دوم، خرداد- تیر ۱۳۸۵
www.magiran.com/jasnr

غنی سازی آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) با اکسولینیک اسید برای پیشگیری از آلودگی باکتریایی (*Aeromonas hydrophila*) لارو ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*)

رسول قربانی[۱]، عبدالمجید حاجی مرادلو[۱]، ناصر آق[۲]، مهدی سلطانی[۳]، فرزانه نوری[۲] و عبدالجبار ایرانی[۲]
[۱]اعضای هیات علمی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه،
[۳]گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۸٤/۷/۱۹

چکیده

توانایی ناپلی آرتمیای دریاچه ارومیه (*Artemia urmiana*) به‌عنوان حامل اکسولینیک اسید در غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی وزنی اسید چرب مطالعه شد. برای پیشگیری از عفونت باکتریایی، لارو ماهی قره‌برون (*Acipenser persicus*) مقابله داده شده با باکتری گرم منفی آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در غلظت ۳×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر از تکنیک غنی‌سازی (مدت زمان ٢٤ ساعت غنی‌سازی آرتمیا ارومیانا) استفاده گردید. غلظت اکسولینیک اسید در ناپلی آرتمیا با افزایش دوز دارو در محیط غنی‌سازی افزایش معنی‌دار داشت. بقای لاروهای قره‌برون (۱۰۰ درصد) از سری لاروهای ماهی قره‌برون بدون مقابله بهترین نتیجه را داد، ولی در کل تفاوت معنی‌داری در بقای لاروهای ماهی در بین سری‌های ماهی قره‌برون غنی شده با دارو و غنی نشده با دارو، مقابله شده در برابر باکتری و مقابله نشده در برابر باکتری مشاهده نگردید. دراین مطالعه کاربرد ناپلی آرتمیا ارومیانا بدون غنی‌سازی با دارو در مراحل اولیه رشد لاروی ماهی قره‌برون باعث بالا بردن مقاومت آن در برابر استرس‌های محیطی و آلودگی‌های باکتریایی گردید.

واژه‌های کلیدی: آرتمیا ارومیانا، اکسولینیک اسید، پیشگیری، غنی‌سازی، لارو ماهی قره‌برون

مقدمه

استفاده از مواد شیمیایی ضد باکتریایی در آبزی پروری بیش از ۵۰ سال است که بکار می‌رود. استفاده از داروها در زمان افزایش بروز بیماری، هم از نظر تعداد افراد مصرف‌کننده و هم از نظر کمیت دارو گسترش یافت. کیفیت بالای آب، استفاده از تحریک کننده‌های ایمنی بدن، واکسن‌ها، غذای با کیفیت بالا از جمله عوامل جلوگیری از بروز بیماری است (سوپرییادی و همکاران، ۱۹۹۲). مدیریت بهداشتی استخر (استخر با طراحی خوب، آماده‌سازی صحیح استخر، تراکم ذخیره‌سازی مناسب، منبع آب با کیفیت مناسب) و بالا بردن توانایی ایمنی جانوران آبزی (کاربرد ویتامین و تحریک سیستم ایمنی بدن) ابزارهای ترجیحی برای جلوگیری از بروز بیماری‌ها هستند. برای اطمینان از سلامتی انسان و کاهش آسیب به محیط زیست، استفاده از مواد شیمیایی در آبزی پروری به‌عنوان آخرین راه بکار می‌رود (لیائو و همکاران، ۱۹۹۲). زمانی که کشت متراکم مطرح است مسئله شیوع بیماری‌های میکروبی از اهمیت زیادی برخوردار است

www.SID.ir

Archive of SID

(تراست، ۱۹۸٦). شیوع بیماری‌های باکتریایی با تنوع زیاد مشکلات فراوانی همراه با تلفات در صنعت آبزی پروری بوجود می‌آورد. به همین خاطرجهت پیشگیری و درمان بیماری‌های عفونی ترکیبات ضد میکروبی در سطح وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بروز عفونت‌های همه گیر در پرورش متراکم ماهیان بکارگیری روش‌های کنترلی و دارو درمانی را اجتناب ناپذیر می‌سازد. با این همه روش‌های معمول درمان و پیشگیری از بیماری‌های عفونی، بیشتر با افزودن دوز نسبتاً زیاد انواع مختلف آنتی‌بیوتیک‌ها در آب پرورش یا مخلوط با غذا صورت می‌گیرد که از محدودیت‌ها و یا معایب عمده این روش دامنه محدود استفاده به‌موقع و دوز مناسب دارو توسط ماهی می‌باشد که علاوه‌بر ناکار آمد بودن در درمان، هزینه سنگین اتلاف دارو و تکرار درمان را بر پرورش دهنده تحمیل می‌کند. همچنین افزودن دارو به محیط امکان ظهور مقاومت باکتریایی و مشکلات ناشی ازآن را نیز در بر دارد. در نتیجه یک راه ساده، کنترل شده و درست مقابله با آن تهیه داروهای مناسب برای لارو ماهیان از طریق زنجیره غذایی با استفاده از فرآیند بیوانکپسولیشن[1] است (لگر و همکاران، ۱۹۸۷ ای؛ روبین و همکاران، ۱۹۸۷؛ نیلیس و همکاران، ۱۹۹۱).

آرتمیا به‌عنوان یک حامل برای انتقال داروهای ضد باکتریایی به لاروهای ماهی و میگو از ارزش بسیار زیادی برخوردار است. آرتمیا گسترش جهانی دارد و سویه‌های جغرافیایی متنوعی از آن در دنیا وجود دارد. آرتمیا به‌صورت فیلترکننده غیرانتخابی از موادآلی گندیده، جلبک‌های ریز میکروسکوپی و باکتری‌های موجود در آب (ذرات کوچکتر از ۵۰ میکرون) تغذیه می‌کند (برگرفته از یحیی‌زاده، ۱۳۸۱). ارزش غذایی بالا، تنوع اشکال کاربرد آرتمیا در مراحل مختلف رشد و پرورش انواع آبزیان و قابلیت استفاده از آن به‌عنوان حامل ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، مواد شیمیایی، واکسن‌ها و هورمون‌ها همگی باعث شده تا این موجود از جایگاه ویژه‌ای در آبزی پروری برخوردار باشد. لارو ناپلیوس آرتمیا یک منبع غذایی خوبی است که مطلوب لارو ماهیان دریایی و آب شیرین است (سورگلوس و همکاران، ۱۹۸٦). ناپلیوس آرتمیا می‌تواند حامل موادی شود که بسهولت به ارگانیسم‌های مصرف‌کننده انتقال یابند (لگر و همکاران، ۱۹۸۷ ب). از جمله چنین موادی می‌توان اسیدهای چرب غیراشباع با درجه غیراشباعیت بالا[2] که از عناصر غذایی ضروری برای ماهیان دریایی پرورشی است را نام برد (واتانابه، ۱۹۸۲) که می‌تواند از طریق زنجیره غذایی به لارو ماهیان انتقال یابد (لگر و همکاران، ۱۹۸۷ ای). قابلیت در دسترس قرارگیری ماده مغذی در عمق آب به اندازه مناسب ذرات یا قطرات غنی‌سازی و به غلظت کافی ماده مغذی در این ذرات یا قطرات بستگی دارد (لگر و همکاران، ۱۹۸۷ ب). ارزش گونه‌های آرتمیا به‌عنوان حامل داروهای ضد باکتریایی به لاروهای ماهی و میگو بررسی شده است (ورپرایت و همکاران، ۱۹۹۲). در اکثر نقاط دنیا ارزش غذایی آرتمیا را با استفاده از تکنیک غنی‌سازی[3] با خوراندن ترکیبات و ماده انتخاب شده تقویت می‌کنند به‌طوریکه مانی و همکاران (۱۹۹۰) با یک روش غنی‌سازی ابتکاری (تغذیه ناپلی آرتمیا با ترکیب دارویی غیرمحلول در آب و استفاده از آن در تغذیه لارو میگو) از ناپلی آرتمیا به‌عنوان حامل دارو استفاده کردند که به‌تدریج موضوع غنی‌سازی آرتمیا با ترکیبات دارویی و استفاده از آن در کنترل و پیشگیری بیماری‌های باکتریایی در مطالعات دهرت و همکاران (۱۹۹۵)، آگوئیلار_ آگوئیلا و همکاران (۱۹۹٤)، چیر و همکاران (۱۹۹٦) و دیکسون و همکاران (۱۹۹۵) به اثبات رسید. از تکنیک غنی‌سازی با دارو به‌عنوان وسیله‌ای برای پیشگیری لاروهای ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) مقابله داده شده با باکتری گرم منفی ویبریو انگوئیلاروم (*Vibrio anguillarum*) استفاده گردید و بهبود معنی‌داری در بقای لاروهای تغذیه

1- Bioencapsulation

2 -High Unsaturated Fatty Acid (HUFA- ω3)
3- Enrichment

www.SID.ir

Archive of SID

شده با ناپلی غنی شده نسبت به لاروهای ماهی تغذیه شده با ناپلی غنی نشده پس از مقابله با باکتری ویبریو مشاهده گردید (توراکی و همکاران، ۱۹۹٦). در مکزیک انروفلوکساسین[1] و اکسی تتراسایکلین[2] رایج‌ترین مواد ضدباکتریایی مورد استفاده در تفریخگاه‌های میگو می‌باشند (گومز- گیل و همکاران، ۲۰۰۱). برای تعیین اثر اکسولینیک اسید و فلوروفنیکل خوراکی در درمان ماهی کد (*Gadus morhua*) که به‌طور آزمایشی با ویبریو (حمام با غلظت $۸/۵ \times ۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر) به‌مدت ۱ ساعت مقابله تحریک شده بود از دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز اکسولینیک اسید و فلوروفنیکل برای مدت ۱۰ روز تجویز گردید. ماهیان درمان شده نسبت به ماهیان درمان نشده به‌طور معنی‌دار بقای بالاتر داشتند (ساموئلسن و برگ، ۲۰۰۳). تکنیک استاندارد یکنواختی در زمینه غنی‌سازی وجود ندارد ولی مدت زمان غنی‌سازی از ۲ (گاپاسین و همکاران، ۱۹۹٦) تا ۳۲ ساعت (توراکی و همکاران، ۱۹۹۱) متفاوت بوده است. سابقه غنی‌سازی در ایران به چند سال اخیر محدود می‌شود و مطالعات دامنه‌داری در این مورد صورت نگرفته است. در سال ۱۳۷۹ یک دوره غنی‌سازی ناپلیوس آرتمیا ارومیه با امولسیون‌های اسید چرب[3] ICES ۳۰:٤ و ۰/٦ :۵۰ به‌صورت مقایسه‌ای در مدت ۱۲ و ۲٤ ساعت انجام گرفت که بهترین نتیجه در غنی‌سازی با امولسیون ICES ۳۰:٤ در مدت ۲٤ ساعت حاصل شد (برگرفته از مناف فر، ۱۳۸۰). در غنی‌سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا با اسید چرب ICES ۳۰:٤ مشاهده گردید که در مورد اسید چرب ایکوزاپنتانوئیک اسید[4] مقدار ۱۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک و در مورد دوکوزاهگزانوئیک اسید[5] مقدار ۱۷/۵ میلی‌گرم در گرم وزن خشک در نمونه غنی‌سازی شده با امولسیون نسبت به نمونه شاهد افزایش یافت (مناف فر، ۱۳۸۰). در سال ۸۱ ـ۱۳۸۰ یک تحقیق برروی غنی‌سازی ناپلی آرتمیا و آرتمیای بالغ با ترکیبات آنتی باکتریال و تعیین میزان باقی ماندگی دارو در دوزها و مدت زمان‌های مختلف با استفاده از اکسولینیک اسید صورت گرفت. بیشترین میانگین میزان باقی ماندگی دارو از نظر دوز دارویی در ناپلی آرتمیا دوز ۱۰۰ میلی‌گرم طی ٦ ساعت غنی‌سازی معادل ۳۸/۸٤۳ میکروگرم بر گرم وزن‌تر و در آرتمیای بالغ نیز بیشترین میانگین میزان باقی ماندگی دارو در دوز ۵۰ میلی‌گرم معادل ۱۹۲/۲۳۳ میکروگرم بر گرم وزن تر به‌دست آمد (یحیی زاده، ۱۳۸۱). یکی از مشکلات احتمالی کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری ایران مواجه شدن با آلودگی‌های باکتریایی است. از شایع‌ترین آلودگی‌های باکتریایی می‌توان آلودگی به آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas ydrophila*) را نام برد که می‌تواند موجب تلفات ماهیان در دوران لاروی گردد. اکسولینیک اسید از گروه کینولون‌ها[6] به‌علت مؤثر بودن علیه باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه عفونت‌های آئروموناسی و ویبریو در بسیاری از کشورها در کنترل و درمان بیماریهای عفونی آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (برگرفته از یحیی‌زاده، ۱۳۸۱).

مواد و روش‌ها

دارو: برای غنی‌سازی ناپلی آرتمیا با اکسولینیک اسید، دوز٤۰ –۱۰ میلی‌گرم برگرم وزن غذای زنده تر (ناپلی) و ۸ – ۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ماهی معادل ۵، ۱۰ و۲۰ درصد اسید چرب (w/w) مورد استفاده قرار می‌گیرد (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

نحوه آماده‌سازی کپسول‌های ریز حاوی اکسولینیک اسید: ابتدا پس از محاسبه مقدار محلول غنی‌سازی مورد نیاز (به میزان ٤ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر آب حاوی ۲۰۰۰۰۰ ناپلی آرتمیای ارومیه برای دو مرحله عمل غنی‌سازی) آب مقطر برداشته و به نسبت ۱۰ درصد آن اسید چرب غیر اشباع بلند زنجیره ۳۰:٤ اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر (مخلوط کن برقی) کاملاً بهم زده

1- Enrofloxacin
2- Oxytetracycline
3- International Council for the Exploration of Sea
4- Eicosa Pentanoeic Acid (EPA)
5- Docosa Hexaenoic Acid (DHA)
6- Quinolon

www.SID.ir

Archive of SID

تا اسید چرب به‌صورت میکروگلبول در آید سپس به آن اکسولینیک اسید را اضافه کرده و به‌مدت ٤٠ دقیقه با هموژنایزر بهم‌زده تا داروی مزبور به داخل میکروگلبول‌های چربی برود و اصطلاحاً کپسول‌های حاوی دارو ایجاد گردد. پس از تهیه محلول غنی‌سازی برای جلوگیری از اکسید شدن اسید چرب به آن گاز ازت اسپری کرده و به داخل یخچال منتقل می‌گردد.

سیست آرتمیا: سیست‌های آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) دریاچه ارومیه که به‌وسیله مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه تهیه شده، در آب فیلتر شده با شوری ppt ۳۵-۳۳، pH برابر ۸/۵-۸ تحت شرایط هوادهی مقدار اکسیژن بالاتر از ۲ میلی‌گرم در لیتر)، دما (۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد) و نوری مناسب (دولامپ مهتابی با قدرت ۲۰۰۰ لوکس) بعد از ٢٤ ساعت تفریخ شدند. سپس ناپلی مرحله ۱ از سیست‌های تخم گشایی نشده جدا شده، در آب تمیز شستشو داده و سپس به تعدادی زوک شیشه‌ای شش لیتری با تراکم ۲۰۰ ناپلی در میلی‌لیتر منتقل گردید.

آئروموناس هیدروفیلا: سوش باکتری آئروموناس هیدروفیلا از آزمایشگاه بیماری‌های باکتریایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه و پس از پاساژ دادن روی محیط کشت آگار خون دار در دمای آزمایشگاه نگهداری شد. قبل از آزمایش تعدادی نمونه باکتریایی به‌صورت سوسپانسیون تهیه و سانتریفوژ گردید (٤٠٠٠ دور در دقیقه در مدت زمان ۱۰ دقیقه)، مواد شناورروی مایع دور ریخته شده و باقیمانده مواد دوباره در آب مقطر به‌صورت سوسپانسیون درآمد. غلظت باکتری هم با اسپکترفتومتر با طول موج ٦٠٠ نانومتر و هم با مشاهده میکروسکوپی برآورد گردید (توراکی و همکاران، ١٩٩٦) و یا پس از کشت ٤٨ ساعته سلول‌ها در محلول PBS[1] استریل جمع‌آوری و با آب دکلره شده شهری رقیق گردید و به حجم آب مورد نیازبرای حمام باکتریایی اضافه شد. مقداری از آب را در لوله ریخته و با لوله مک فارلند شماره ۱ (۳×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر) مقایسه گردید. جهت انجام مقابله باکتریایی از غلظت بیماریزایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۳×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر استفاده گردید.

محیط غنی‌سازی: محیط غنی‌سازی شامل امولسیون اسیدهای چرب با ۳۰ درصد ۳ -ω HUFA به میزان ۱۰w/v درصد (وزنی حجمی) است که به آن اکسولینیک اسید اضافه شد. برای آماده‌سازی محلول غنی‌سازی حاوی امولسیون اسیدهای چرب و آنتی بیوتیک و یا سوسپانسیون اسیدهای چرب بدون دارو روزانه تهیه و در همان روز مصرف شد. در فاصله بین دو نوبت غنی‌سازی درون ظروف حاوی سوسپانسیون اسید چرب + دارو و اسید چرب بدون دارو گاز نیتروژن اسپری[2] نموده و در دمای یخچال (٤ درجه‌سانتی‌گراد) نگهداری گردید.

غنی‌سازی آرتمیا با دارو: برای شروع عملیات غنی‌سازی، ناپلی‌ها را در تراکم ۲۰۰ ناپلی در هر میلی‌لیتر به زوک‌های شیشه‌ای شش لیتری منتقل گردید. ناپلی آرتمیا در دو گروه با HUFA واکسولینیک اسید (w/w ۵، ۱۰ و۲۰ درصد) و فقط با HUFA بدون اکسولینیک اسید در نوبت t. و t+۱۰ ساعت غنی‌سازی شد. هر تیمار سه تکرار داشت. ظرف‌ها به‌طور تصادفی در حمام آب گرم ۲۸ درجه سانتی‌گراد با نور و هوا دهی ثابت قرار داده شد. عمل غنی‌سازی آرتمیا ۱۰ ساعت پس از تخمه گشایی (زمان t.) شروع و به‌مدت ٢٤ ساعت انجام گرفت (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

ماهی: لاروماهیان خاویاری قره‌برون به وزن ۳۰-۲۰ میلی‌گرم که ازمرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت (سد سنگر) تهیه شد و در تانک‌های ٤٠ لیتری (حاوی ۲۵ لیتر آب) در دمای ۲۱-۱۹ درجه سانتی‌گراد تحت سیستم پرورشی جریان پیوسته باز (دبی آب ۰/٦ لیتر در دقیقه) مجهزبه هواده در شرایط جدید تا رسیدن به وزن ٤٠٠-۳۰۰ میلی‌گرم نگهداری گردید.

1- Phosphate Buffered Saline (PBS)

2- Flash

www.SID.ir

Archive of SID

لاروهای ماهیان ۴۰۰-۳۰۰ میلی‌گرمی با تراکم ۱۲ قطعه در لیتر به میزان ۲۰ درصد وزن ماهی به‌طور روزانه (شعبان‌پور، ۱۳۷۷) در چهار نوبت و در هر نوبت به‌مدت ۱ ساعت تغذیه شدند. مدت تغذیه با ناپلی‌های غنی شده ۵ روز بود. در ادامه کار لاروها با ناپلی غنی نشده تغذیه گردیدند.

آزمایش‌های مقابله و درمان: آزمایش‌ها روی لاروهای قره‌برون آماده شده تحت تیمارهای غذایی مذکور انجام گرفت. تغذیه لاروها ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش‌های مقابله باکتریایی متوقف شد. دما (۱±۱۹ درجه سانتی‌گراد) و مقدار pH آب (۸-۷) در حد مناسب، مقدار اکسیژن محلول در حد اشباع و تعویض پیوسته آب جهت دفع متابولیت صورت گرفت. مقابله باکتریایی لارو ماهی در تشت‌های حاوی باکتری آئروموناس هیدروفیلا با هوادهی ثابت و بدون تعویض آب تشت انجام شد. مقابله باکتریایی بعد از سپری شدن ۱ ساعت با تعویض دو بار آب پایان یافت.

خنثی کردن باکتری درآب و محیط اطراف با استفاده از فرمالین با غلظت ۱ به ۴۰۰۰ و به‌مدت یک ساعت صورت گرفت و پس از آن ظروف حاوی آب را تخلیه و محیط اطراف با آب کاملاً شستشو داده شد. درمان با تجویز فقط یکبار با ناپلی آرتمیای حاوی دارو صورت گرفت. درصد بقا برای ۱۰ روز پس از مقابله باکتریایی برای ۴ سری (بدون مقابله- بدون درمان، مقابله - بدون درمان، مقابله - پیش درمان، مقابله - درمان آنی) تعیین گردید (هر سری شامل ۳ تکرار ۶-۴ ماهی در لیتر است) (توراکی و همکاران، ۱۹۹۶). تغذیه لاروها بعد از مقابله باکتریایی با ناپلی غنی نشده جهت برآورد درصد بقا انجام گرفت.

روش آماری و شیوه نمونه‌برداری: تجزیه و تحلیل آماری برروی مرگ و میر ثبت شده در ادامه مقابله ماهی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در گروه‌های مقابله داده شده و بدون مقابله با باکتری مذکور در تیمارهای شاهد (تغذیه شده با ناپلی آرتمیای غنی نشده) و تیمارهای تغذیه شده با اسید چرب غیر اشباع و اکسولینیک اسید و هر تیمار با ۳ تکرار بوسیله آنالیز واریانس یک طرفه[1] و آزمون LSD با استفاده از نرم افزار SPSS در محیط ویندوز انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل نمونه‌ها: در مطالعه حاضر از کروماتوگرافی مایع[2] به‌عنوان وسیله‌ای برای اندازه‌گیری مقدار آنتی بیوتیک منتقل شده به نمونه‌های ناپلی آرتمیا و لاروهای ماهی استفاده شد (چیر و همکاران، ۱۹۹۱). این روش با حساسیت بالا در بازیابی دارو و عوامل ضد باکتریایی کاربرد دارد (یونئو و همکاران، ۱۹۹۹).

نتایج

تجمع اکسولینیک اسید در ناپلی آرتمیا: غلظت اکسولینیک اسید افزوده شده در ناپلی آرتمیا با افزایش دوز دارو درمحیط غنی‌سازی افزایش یافت و این افزایش معنی‌دار بود (جدول ۱).

جدول ۱- اثر دوز اکسولینیک اسید در غنی‌سازی ناپلی آرتمیای ارومیانا.

دوز غنی سازی (w/w) اسید چرب	میکروگرم بر گرم وزن تر ناپلی
٪۵	۳۶/۷c
٪۱۰	۹۴/۱۵b
٪۲۰	۱۰۹/۳a

1- Anova one-way
2- High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

www.SID.ir

Archive of SID

به ازای ٤ میلی‌لیتر از محلول حاوی اکسولینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی/ وزنی اسید چرب در مدت زمان ٢٤ ساعت مدت زمان غنی‌سازی، به هر ظرف ۱ لیتری حاوی ۲۰۰۰۰۰ ناپلی آرتمیا میزان دارو به‌ترتیب معادل ٣٦/٧، ٩٤/١٥ و ١٠٩/٣ میکروگرم در هر ناپلی بود. نسبت داروی مورد استفاده در محیط غنی‌سازی و تغذیه ناپلی از آن و افزودن به درون بدن ناپلی در دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درصدی وزنی اسید چرب به‌ترتیب برابر با ۰/٣٦٧، ۰/٤٧١ و ۰/٢٧٣ درصد داروی اضافه شده به محیط غنی‌سازی ناپلی آرتمیا بود. بیشترین نسبت مربوط به دوز مصرفی۱۰ درصدی بود.

تجمع اکسولینیک اسید در لاروهای ماهی: غلظت اکسولینیک اسید در لاروهای ماهی نیز با تغذیه (به‌مدت ۵ روز) از ناپلی‌هایی که با دوز بالاتر دارو غنی‌سازی شده‌اند، به‌طور معنی‌داری بالاتر بود (جدول ۲).

در تغذیه لاروهای ماهی از ناپلی‌های غنی‌سازی شده با دوزهای مختلف دارو به‌مدت ۵ روز و به دنبال آن افزودن دارو به لاروهای ماهی مشاهده شد که در دوزهای ۵، ۱۰ و۲۰ درصدی وزنی اسید چرب به‌ترتیب برابر با ۰/۱۲۳، ۰/۱ و ۰/۰۸ درصد داروی اضافه شده به ازای وزن ماهی به محیط غنی‌سازی بود. بیشترین نسبت مربوط به دوز مصرفی ۵ درصدی بود.

اندازه قطر ذرات چربی امولسیون شده حاوی اکسولینیک اسید در محلول غنی‌سازی آماده شده: با توجه به اندازه ریز قطرات چربی حاوی اکسولینیک اسید مشاهده شده با میکروسکوپ و نیز تغذیه غیرانتخابی آرتمیا به‌نظر می‌رسد ناپلی آرتمیا بتواند ذرات فوق را به مصرف برساند، به‌عبارتی دیگر هدف از این تحقیق که انتقال دارو به ناپلی از طریق بیوانکپسولیشن است، تأمین نماید (جدول ۳).

آزمایش‌های مقابله و درمان: تجزیه و تحلیل روی داده‌های مربوط به بقا لاروهای ماهی قره‌برون مقابله داده شده با آئرومونـاس هیدروفیلا در مدت زمان ۱۰ روز پس از مقابله با باکتری انجام شد که نتایج آن بشرح زیر است (جدول ٤). مرگ و میر ماهیان بعد از ۱۰ روز (تا زمانی که از ناپلی آرتمیای غنی نشده جهت تغذیه لاروهای ماهی استفاده می‌شد) ثبت شد و در ادامه پس از معرفی غذای دستی به لاروها و تلفات آنها، مرگ و میر لاروها محاسبه نگردید. بهترین نتایج روی بقای لاروها قره‌برون (۱۰۰ درصد) از سری لاروهای ماهی قره‌برون بدون مقابله به‌دست آمد ولی در کل تفاوت معنی‌داری در بقای لاروهای ماهی در بین سری‌های مورد بررسی مشاهده نگردید.

جدول ۲- اثر دوز غنی سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا و تجمع دارو در لارو قره‌برون با تغذیه از آن.

دوز غنی سازی (w/w) اسید چرب	میکروگرم بر گرم وزن‌تر ناپلی
٪۵	٢/٤٦ c
٪۱۰	٣/٩٧b
٪٢٠	٦/٤١a

جدول ۳- قطر قطرات چربی حاوی اکسولینیک اسید (میکرون).

میانگین	انحراف معیار	حداکثر	حداقل
٧/٥	٤/١	١٩/٨	٢/٢

جدول ٤- مقایسه بقای لاروهای ماهی قره‌برون پس از رویارویی با باکتری آئرومونـاس هیدروفیلا.

تیمار	شاهد بدون مقابله	شاهد بدون درمان	پیشگیری ۵٪	پیشگیری ۱۰٪	پیشگیری ۲۰٪	درمان ۵٪	درمان ۱۰٪	درمان ۲۰٪
بقا	۱۰۰± ۰	۹۷,۳± ۳,۰٦	۹۷/۳±۲/۳۱	۹۷/۳± ۱/۵	۹۸± ۳/۵	۹۸± ۳,۵	۹٦,۷± ۱,۱۵	۹۷,۳± ۱,۱۵

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

اکسولینیک اسید یک عامل سنتتیک است که ساختار اسکلتی کینولون دارد و دارای فعالیت ضد باکتریایی در برابر باکتری‌های گرم منفی است. بالا بردن غلظت اکسولینیک اسید در محیط غنی‌سازی منجر به افزایش سطوح این دارو درناپلی آرتمیا و لارو ماهی به هنگام تغذیه از آنها می‌گردد. در مطالعه آرتمیا به‌عنوان حامل آنتی بیوتیک و تعیین میزان باقیماندگی دارو در مراحل ناپلی و بلوغ آرتمیا مشاهده گردید که اثر مدت زمان غنی‌سازی و دوز دار و بر میزان باقیماندگی دارو معنی‌دار بود (یحیی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۱). سطوح اکسولینیک اسید و فلومکوئین در ناپلی آرتمیا در مطالعه صورت گرفته توسط توراکی و همکاران (۲۰۰۱) برابر با ۲٤۹٦±۲٤۷ میکروگرم اکسولینیک اسید در هر گرم وزن خشک ناپلی و ٤٥۰±۱٥ میکروگرم فلومکوئین در هر گرم وزن خشک ناپلی برای غلظت ۲۰ درصدی وزنی/ وزنی بود. مقادیر به‌دست آمده در این مطالعه برای غلظت ۲۰ درصدی برابر با ۱۰۹,۳ میکروگرم در هر گرم وزن تر ناپلی آرتمیای ارومیانا بود. تفاوت بین آنها علاوه‌بر سنجش براساس وزن‌تر یا خشک بودن ناپلی احتمالاً می‌تواند بخاطر روش آماده‌سازی نمونه‌ها و روش اختصاصی و موثرتر تعیین داروها در ناپلی مورد مطالعه آنها باشد. باید خاطر نشان کرد که مقادیر ذکر شده توسط توراکی و همکاران خیلی بالاتر از مقادیر به‌دست آمده در مطالعات قبلی محققین که براساس روش ارزیابی زیستی[1] که روش قدیمی‌تری برای تعیین داروهای مزبور در ناپلی آرتمیاست (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱) بود. تکنیک‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری سطوح آنتی بیوتیک منتقل شده در ناپلی آرتمیا نیز متفاوت می‌باشد که شامل ارزیابی زیستی انتشار شعاعی[2] که در آن باکتری ایشریشیا کلی (*Escherichia coli*) به‌عنوان باکتری شاخص یا اندیکاتور (دیکسون و همکاران، ۱۹۹۵)، ویبریو آلجینولایتیک (*Vibrio alginolytics*) (مانی و همکاران، ۱۹۹۰) و باسیلوس سابتیلیس (*Bacillus subtilis*) (روکوئه و همکاران، ۱۹۹۸) بوده است. در مطالعات دیگر از HPLC به‌عنوان وسیله‌ای برای اندازه‌گیری مقدار آنتی بیوتیک منتقل شده، استفاده کرده‌اند (چیر و همکاران، ۱۹۹۱). به هر حال مطالعات اولیه با لارو ماهی باس دریایی مقابله داده شده با باکتری پاتوژن و درمان با آرتمیای غنی شده با اکسولینیک اسید افزایش بقای خیلی بالایی را در ماهیان آلوده نشان داد (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه حاضر ظاهراً کاربرد ناپلی آرتمیا ارومیانا بدون غنی‌سازی در مراحل اولیه رشد لاروی ماهی قره‌برون باعث بالا بردن مقاومت آن در برابر استرس‌های محیطی و آلودگی‌های باکتریایی اولیه می‌گردد. بنابراین تغذیه این لاروها در مراحل اولیه رشدی در محیط های با ایجاد استرس بالا برای لاروها در کارگاه‌های پرورشی پیشنهاد می‌گردد. از مضرات اصلی استفاده از دارو در آبزی پروری توسعه نژادهای مقاوم باکتری است. فائق آمدن بر آن نه تنها نیاز به افزایش دوز دارو دارد بلکه ممکن است برای سلامت انسان نیز خطرناک باشد، به‌طوریکه اکثر مواد شیمیایی بکار رفته در آبزی پروری برای درمان انسان نیز استفاده می‌شوند. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها اغلب ایمنی ماهی و میگو را در برابر عوامل عفونی کاهش می‌دهند (یولین، ۱۹۹٦). دارو یا ماده شیمیایی بکار رفته در درمان با داروهای شیمیایی در غلظت‌هایی که برای میزبان مضر نیست باید عامل پاتوژن را بکشد یا حذف کند (باتیکادوس و پاکلیبار، ۱۹۹۲). ایزوله‌های ویبریو و آئرومونـاس به‌دست آمده از ماهیان پرورشی به اکسولینیک اسید حساس هستند. برای کنترل چنین بیماری‌هایی، اکسولینیک اسید در دوز ٤۰-۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن با غذا مخلوط و روزانه برای مدت ٥ روز تجویز می‌شود (لیائو و همکاران، ۱۹۹۲؛ گوو و لیائو، ۱۹۹٤). برای تعیین اثر اکسولینیک اسید در درمان ماهی کد که به‌طور آزمایشی با ویبریو (حمام با غلظت $۸/٥ \times ۱۰^{٦}$ سلول در میلی‌لیتر) به‌مدت

1- Bioassay
2- Radial diffusion bioassay

www.SID.ir

Archive of SID

یک ساعت رویارویی تحریک شده بود از دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلو گرم روز اکسولینیک اسید برای مدت ۱۰ روز تجویز گردید. بقای ماهیان درمان شده نسبت به ماهیان درمان نشده به‌طور معنی‌دار بالاتر بود (ساموئلسن و برگ، ۲۰۰۳). از تکنیک غنی‌سازی با دارو به‌عنوان وسیله‌ای برای پیشگیری یا درمان تست شده با لاروهای ماهی باس دریایی مقابله داده شده با باکتری گرم منفی ویبریو انگوئیلاروم استفاده گردید و بهبودی معنی‌داری در بقای لاروهای تغذیه شده با ناپلی غنی شده نسبت به لاروهای ماهی تغذیه شده باناپلی غنی نشده پس از مقابله با باکتری ویبریو مشاهده گردید (توراکی و همکاران، ۱۹۹۶).

منابع

۱.شعبان‌پور، ب. ۱۳۷۷. تعیین ضرایب تبدیل دافنی و ناپلیوس آرتمیا در تغذیه لارو تاس ماهی ایرانی (قره‌برون) . پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد رشته شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۱ ص.

۲.مناف‌فر، ر. ۱۳۸۰. غنی‌سازی ناپلیوس آرتمیا ارومیانا با امولسیون اسید چرب و جلبک دونالیلا وبررسی متابولیسم HUFA تحت انکوباسیون سرد. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا،دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس.۷۹ص.

۳.یحیی‌زاده، م. ۱۳۸۱. استفاده از آرتمیا به‌عنوان حامل آنتی بیوتیک و تعیین میزان باقیماندگی دارو در مراحل مختلف رشد آن. مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام.آذربایجان غربی، ارومیه.۲۰ ص.

4.Aguilar-Aguila, A., Tejede Mansir, A., and Ruiz Manriques, A.1994. Using brine shrimp as a drug carrier for therapeutic application in aquaculture. Aquaculture Engineering.13:301-309.

5.Baticados, M., and Paclibare, J. 1992. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines. In: Shariff, M., Subasinghe, RP, Arthure, JR. eds. Disease in Asian Aquaculture I.P. Fish Health Section,Asian Fisheries Society, Manila. Pp: 531-546.

6.Chair, M., Romdhane, M., Dehasque, M., Nelis, H., De Leenheer, A., and Sorgeloos, P. 1991. Live–food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture11.A case study with European sea bass .In Larvi. Fish and Crustacean Larviculture Symposium,eds: P. European Aquaculture Society,Gent,Belgium.Pp: 412-414.

7.Chair, M., Nelis, H., Sorgeloos, P., and DeLeenher, A. 1996. Accumulation of trimethoprim , sulfamethoxazole and N-acetylsulfamethoxazole in fish and shrimp fed mediciated *Artemia franciscana*.Antimicrob.Agents Chemother.40(7): PP.1649-1652.

8.Dhert, P., and Sorgeloos, P. 1995. Live feeds in aquaculture. In: Aquaculture towards the 21 st century nambiar K.P.P., and T. Singh (eds): Proceeding infofish - Aquatech 94 conference. Colombo, Srilanka, August 29-31-1994, infofish , Kuala Lumpur , P.209-219. 287 pp.

9.Dixon, B., Van Poucke, S., Chair, M., Dehasque, M., Nelis, H., Sorgeloos, P., and De Leenheer, A. 1995. Bioencapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in the nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. J. Aquat. Anim. Health7. Pp: 42-45.

10.Gapasin, R., Nelis, H., Chair, M., and Sorgeloos, P. 1996. Drug assimilation in the tissue of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry delivered orally through bioencapsulatio n .J. Appl.Ichthyol. 12:39-42.

11.Gomez-Gil, B., Cabanillas, J., Paez-rambila, S., and Roque, A. 2001. Standardization of the bioencapsulation of enrofloxacin and oxytetracycline in *Artemia franciscana* Killgg, 1906. Aquaculture.196, .Pp:1-12.

12.Guo, J., and Liao, I. 1994. Pharmacokinetics of Oxolinic acid in orange–spotted grouper, *Epinphelus coioides*, after single oral administration at 24ºC . J. Fish. Soc. Taiwan. 21:263-272.

13.Leger, P., Naessens-Foucquaert, E., and Sorgeloos, P. 1987a. International study on Artemia .Techniques on manipulate fatty acid profile in Artemia nauplii and the effect on its nutritional effectiveness for the marine crustacean Mysidopsis bahia (M.) .In:Artemia Research and its Applications, Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, eds: P. Sorgeloos, D. A.Bengston, W. Decleir& E. Jaspers. Universa Press, Watteren. Belgium. Pp: 411-424.

14.Leger, P., Bengston, D., Sorgeloos, P., Simpson, K., and Beeck, D. 1987b. The nutritional value of the artemia in:Artemia research and its applications,Vol.3.Ecology. Culturing, Use in Aquaculture,

www.SID.ir

Archive of SID

eds: P. Sorgeloos, D.A. Bengston, W. Decleir & E. Jaspers. Universal press. Wetteren, Belgium. Pp: 357-372.

15.Liao, Ch. 1991. Aquaculture: The Taiwanese experience. Bull. Inst. Zool., Acad. Sinica, Monogr.Pp: 16:1-36.

16.Liao, I., Su, M., and Chang, C. 1992. Disease of *Penaeus monodon* in Taiwan: a review from 1977 to 1991. In: Fulks W, Main KL. eds. Disease of cultured Penaeid shrimp in Asia and the United States. PP. 113-137.

17.Mohney, L., Lightner, D., Williams, R., and Bauerlein, M. 1990. Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Romet–30 in nauplii of the braine shrimp *Artemia spp*. J. World Aquacult. Soc. 21, 186-191.

18.Nelis, H., Leger, P., Sorgeloos, P., and De Leenher, A. 1991. Liquid chromatographic determination of incorporation of trimethoprim and sulfamethoxazole in brine shrimp (*Artemia* spp.) used for prophylactic chemotherapy of fish. Antimicrobial. Agents and Chemother. 85, 2486-9.

19.Robin, J., Le Milinaire, C., and Stephan, G. 1987. Production of Artemia using mixed diets: control of fatty acid content for marine fish larvae culture. In: Artemia Research its Applications, Vol.3.Ecology, Culturing, Use in Aquaculture, eds: P. Sorgeloos, D. Bengston, W. Decleir & E. Jaspers. Universa Press, Wetteren, Belgium. PP: 437-45.

20.Roque, A., Turnbull, J., and Gomez – Gil, B. 1998. Delivery of bioencapsulated oxytetracycline to the marine shrimp (*Penaeus monodon*). J. World Aquacult. Soc. 29. 249-251.

21.Samouelsen, O., and Bergh, O. 2003. Efficacy of orally administered florfenicol and oxolinic acid for treatment of Vibriosis in cod (*Gadus morhua*). Abstract. Department of Aquaculture, Institute of Marine Research, P. O. Box 1870 Nordnes, N-5817, Norway.

22.Sorgeloos, P., Lavens, P., Leger, P., Tackaert, W., and Versichele, D. 1986. Manual for the culture and use of Brine Shrimp Artemia in aquaculture. State University of Gent, Belgium. 319pp.

23.Supriyadi, H., and Rukyani, A. 1992. The use of chemotherapeutic agents for the treatment of bacterial diseases of fish and shrimp in Indonesia. In: Shariff M, Subsinghe R., and Arthur J. eds. Diseases in Asian Aquaculture. PP: 515-517.

24.Touraki, M., Rigas, P., Pergantas, P., Abatzopoulos, T., and Kastritsis, C. 1991. Optimizing bioencap-sulation of the antibiotics trimethoprim and sulfamethoxazole in Artemia nauplii.In:Larvi1991-Fish and Crustacean Larviculture Symposium, eds: P.Lavens, P.Sorgeloos, E. Jaspers & F. Olleiver. Special Publication No.15, European Aquaculture Society, Gent, Belgium. PP.415-7.

25.Touraki, M., Mourelatos, S., Karamanlidou, G., Kalaitzopoulou, S., and Kastritsis, C. 1996. Bioencapsulation of chemotherapeutics in Artemia as a means of prevention and treatment of infectious disease of marine fish fry. Aquacultural engineering, vol.15, No.2, PP: 133-147.

26.Touraki, M., Ladoukakis, M., and Prokopiou, C. 2001. High – performance liquid chromatographic determination of Oxolinic acid and Flumequine in live fish feed *Artemia*. Journal of chromatogeraphy. PP. 247-256.

27.Trust, T. 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish. Ann. Rev. Microbiol.40: 479 -502.

28.Ueno, R., Sangrungruang, K., and Miyakawa, M. 1999. A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography. Food Research International. 32: PP. 629-633.

29.Verpraet, R., Chair, M., Leger, P., Nelis, H., Sorgeloos, P., and De Leenheer, A. 1992. Live-food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture: the enrichment of therapeutics in rotifers and Artemia nauplii.Aquacult.Eng.11: PP.133-139.

30.Watanabe, T. 1982. Lipid nutrition in fish.Comp.Biochem.Physiol.73.B. PP.3-15.

31.Yulin, J. 1996. The use of chemicals in aquaculture in the people's Republic of China. Use of chemicals in aquaculture in Asia .Proceeding of the meeting on the use of chemicals in aquaculture in Asia.20-22 May 1996. Pp:141-153.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 13(2), June-July 2006
www.magiran.com/jasnr

Bioencapsulation of oxolinic acid in *Artemia urmiana* as a means of prevention and treatment of bacterial infectious disease (*Aeromonas hydrophila*) of *Acipenser persicus* larvae

R. Ghorbani[1], A.M. Hajimoradloo[1], N. Agh[2], M. Soltani[3], F. Noori[2] and A.J. Irani[2]
[1]Faculty members of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, [2]Artemia & Aquatic Animal Research Center, Uremia University, Uremia, Iran, [3]Faculty of Veterinary medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

The ability of artemia nauplii to act as carrier of the oxolinic acid in 3 concentrations 5, 10, 20% w/w fatty acids was studied. The enrichment was applied for prevention of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae that was challenged on *Aeromonas hydrophilic*. The concentration of oxolinic acid in artemia nauplii increased with increasing of drug in enrichment medium and it was significant.The highest survival of the fish larvae (100%) attained from series of non challenged, but there was no observation significant different among series of enriched and unenriched by drug and challenged and non challenged on *Aeromonas hydrophila*. In this study, the results showed that the use of unenriched *Artemia urmiana* with oxolinic acid in initial stages of growth of *Acipenser persicus* larvae was cause to increase of resistance to *Aeromonas hydrophila* infection.

Keywords: *Acipenser persicus* larvae; *Artemia urmiana*; Enrichment; oxolinic acid; prevention

www.SID.ir