Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره دوم، خرداد ـ تیر ۱۳۸۶
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

غنی‌سازی و دفع اکسولینیک اسید در ناپلی آرتمیا ارومیانا (*Artemia urmiana*) و لارو تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

***رسول قربانی[۱]، عبدالمجید حاجی مرادلو[۲]، ناصر آق[۳]، مهدی سلطانی[۴]، فرزانه نوری[۵] و عبدالجبار ایرانی[۶]**

[۱]استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار مرکز تحقیقات آرتیما و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه، [۴]استاد دانشگاه تهران، [۵]مربی مرکز تحقیقات آرتیما و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه، [۶] کارشناس ارشد مرکز تحقیقات آرتیما و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۳ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/٦/۸

چکیده

قابلیت انتقال اکسولینیک اسید توسط ناپلی آرتمیا ارومیانا و انتقال آن به لاروهای تاس ماهی ایرانی، تعیین میزان دفع دارو از بدن ناپلی پس از ذخیره‌سازی در انکوباتور سرد (٤ درجه سانتی‌گراد) و در بدن لاروماهی در شرایط مورد مطالعه (۲۱-۱۹ درجه‌سانتی‌گراد) بررسی گردید. بین دفع دارو و زمان نگهداری ناپلی در انکوباسیون سرد همبستگی معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). میزان دفع دارو از ناپلی آرتمیا در ۱۲ ساعت اول در دو دوز ۱۰ و ۵ درصد وزنی/ وزنی اسید چرب غیراشباع به‌ترتیب معادل ۱۳/۰۵ و ۲۳/۱٦ درصد و در ۲٤ ساعت به‌ترتیب معادل ٤۱/۰۹ و ۵۸/۸٦ درصد نسبت به زمان صفر (زمان انتقال به انکوباتور که معادل پایان غنی‌سازی ۲٤ ساعته) کاهش معنی‌دار نشان داد ($P<۰/۰۵$). در دوز ۲۰ درصد میزان دفع در زمان‌های ۲٤، ۱۲، ۸ و ٤ ساعت نسبت به زمان صفر به‌ترتیب معادل ۵۵/۵۱، ۱۸/٤۸، ۱٤/۸۰ و ۱۰/۸۹ درصد کاهش نشان داد. رابطه بین میزان دفع داروارواز بدن ناپلی و زمان ذخیره‌سازی ناپلی از ضریب همبستگی بسیار بالایی (بالای ۹۵ درصد) برخوردار بود و با گذشت زمان این کاهش یا دفع دارو از ناپلی معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). در لارو ماهی میزان دفع دارو یک سیر نزولی را نشان داد که در دوزهای ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد در ۱۲ ساعت اول میزان کاهش به‌ترتیب معادل ۷۰/۵۱، ٤۳/۵۸ و ۵/۷ درصد بود که در دوزهای ۲۰ و ۱۰ درصد این کاهش معنی‌دار بود.

واژه‌های کلیدی: اکسولینیک اسید، دفع، لارو تاس ماهی ایرانی، ناپلی آرتمیا ارومیانا

*- مسئول مکاتبه: ghorbaninasrabadi@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

ناپلی آرتمیا منبع غذایی خوبی است که مطلوب لاروماهیان دریایی و آب شیرین است (سورگلوس و همکاران، ۱۹۸٦). آرتمیا گسترش جهانی دارد و سویه‌های جغرافیایی متنوعی از آن در دنیا وجود دارد. نقش بارز آرتمیا در توسعه صنعت آبزی پروری جهانی یک حقیقت انکار ناپذیر است. در بین مواد غذایی زنده‌ای که برای تغذیه لارو ماهیان دریایی، ماهیان آب شیرین و سخت پوستان (میگو) بکار می‌رود ناپلی تازه تفریخ شده آرتمیا عمدتاً به دلیل ارزش غذایی بالا، سهولت دسترسی، تنوع اشکال کاربردی آن در مراحل مختلف رشد و پرورش انواع آبزیان و قابلیت استفاده از آن به‌عنوان حامل مناسب ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، مواد شیمیایی، واکسن‌ها و هورمون‌ها همگی باعث گردیده تا این ارگانیسم از جایگاه ویژه‌ای در آبزی پروری برخوردار باشد و روز به روز بر اهمیت و دامنه استفاده از آن افزوده شود (بنگستون و همکاران، ۱۹۹۱). آرتمیا توانایی انتقال انواع مواد مختلف در مقادیر و دوزهای مختلف را به آبزیان دارد، به‌طوری‌که بوسیله غنی‌سازی می‌توان از آلودگی آب محیط پرورش جلوگیری کرد زیرا مواد در تماس مستقیم با آب کشت قرار نمی‌گیرند، بسیاری از مواد غنی کننده مانند اسید چرب، ویتامین‌ها و آنتی بیوتیک‌ها دارای نیمه عمر مفیدند و پس از مدتی در آب بی اثر شده و موجب آلودگی آب می‌شوند همچنین بسیاری از مواد بسرعت در آب ته‌نشین می‌شوند ولی در صورت استفاده از آرتمیا در غنی‌سازی ماده مورد نظر از اتلاف این مواد جلوگیری شده و مواد تا ذره آخر مصرف می‌شوند. تنها عیب استفاده از آرتمیای غنی شده اندازه بزرگ آنهاست که ممکن است برای لاروها در مراحل اول ایجاد مشکل کند. اساس غنی‌سازی مناسب عبارت است از حداکثر غنی‌سازی در کوتاه‌ترین مدت ممکن و این زمان بستگی به زمان رسیدن ناپلی‌ها به اولین مرحله تغذیه‌ای (اینستار ۲) دارد (لگر و همکاران، ۱۹۸۷). در زمان کشت متراکم مسئله شیوع بیماری‌های میکروبی از اهمیت زیادی برخوردار است (تراست، ۱۹۸٦). شیوع بیماری‌های باکتریایی با تنوع زیاد باعث مشکلات زیاد در صنعت آبزی پروری گردیده است. بروز عفونت‌های همه گیر در پرورش متراکم ماهی و انواع سخت پوستان خصوصاً میگو بکارگیری روش‌های کنترلی و دارو درمانی را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد. یک گروه اصلی از عوامل ضد باکتریایی در آبزی پروری کینولون است. اکسولینیک اسید کینولونی است که فعالیت ضد باکتریایی با طیف وسیع بخصوص در مقابل باکتری‌های گرم منفی دارد (لیائو و چانگ، ۱۹۹۲؛ گوو و لیائو، ۱۹۹٤). آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید به‌علت مؤثر بودن بر علیه باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه عفونت‌های آئروموناسی و گونه‌های ویبریو در بسیاری از کشورها درکنترل و درمان بیماری‌های عفونی آبزیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (یحیی‌زاده، ۱۳۸۱). اگرچه اتلاف دارو از آرتمیا قبل از خورده شدن توسط ماهی به میزان کمی وجود دارد، بیشترین اتلاف صورت گرفته در آماده‌سازی آرتمیای حاوی دارو می‌باشد (سوباسینگ و همکاران، ۱۹۹٦). در مطالعه آرتمیا به‌عنوان حامل آنتی‌بیوتیک و تعیین میزان دفع اکسولینیک اسید در مراحل ناپلی و بلوغ مشاهده گردید که اثر فاکتورهای مدت زمان غنی‌سازی ودوز دارو در میزان باقیماندگی دارو معنی‌دار بودند (یحیی‌زاده، ۱۳۸۱). موضوعات اصلی این تحقیق مطالعه تجمع اکسولینیک اسید در ناپلی در محیط غنی‌سازی شده و اثر دوزهای مختلف دارو در محیط غنی‌سازی، دوره زمانی دفع دارو از ناپلی و لاروماهی تاس ماهی ایرانی بود.

مواد و روش‌ها

دارو: برای غنی‌سازی ناپلی آرتمیا با اکسولینیک اسید، دوز ٤۰- ۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن غذای زنده‌تر (ناپلی) معادل ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد وزنی/ وزنی اسید چرب مورد استفاده قرار گرفت (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

www.SID.ir

Archive of SID

نحوه آماده‌سازی کپسول‌های ریز حاوی آنتی‌بیوتیک اکسولینیک اسید: برای تعیین مقدار محلول غنی‌سازی مورد نیاز، آب مقطر (به میزان ٤ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر آب حاوی ۲۰۰۰۰۰ ناپلی آرتمیای ارومیه برای دو مرحله عمل غنی‌سازی) برداشته و به نسبت ۱۰ درصد آن اسید چرب غیراشباع بلند زنجیره[1] ۳۰/٤ (۰/٤ گرم در لیتر) (کیونگمین و همکاران، ۲۰۰۰) اضافه گردید. به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر (مخلوط کن برقی) کاملاً بهم زده تا اسید چرب به‌صورت میکروگلبول در آید. سپس به آن اکسولینیک اسید اضافه کرده و به‌مدت ٤۰ دقیقه با هموژنایزر بهم زده تا آنتی‌بیوتیک مزبور داخل میکروگلبول‌های چربی رفته و اصطلاحاً کپسول‌های حاوی دارو ایجاد گردد. پس از تهیه محلول غنی‌سازی به آن گاز ازت اسپری و به داخل یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید.

موا د بیولوژیکی: سیست‌های *Artemia urmiana* دریاچه ارومیه که بوسیله مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود، در آب فیلتر شده با شوری ppt ۳۵-۳۳، pH برابر ۸/۵-۸ تحت شرایط هوادهی مداوم از پایین زوک، دمای ۱±۲۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری مناسب (۲۰۰۰ لوکس) بعد از ۲٤ ساعت تفریخ شدند. سپس ناپلی مرحله ۱ از سیست‌های تخم گشایی نشده جدا گردیده و در آب تمیز کاملاً شستشو داده شدند. سپس به تعدادی زوک شیشه‌ای شش لیتری با تراکم ۲۰۰ ناپلی در میلی‌لیتر منتقل گردید (لگر و همکاران، ۱۹۸٦).

محیط غنی‌سازی: محیط غنی‌سازی شامل امولسیون اسیدهای چرب با ۳۰ درصد HUFA ω۳ به میزان w/v ۱۰ درصد بود که به آن اکسولینیک اسید اضافه گردید. محلول غنی‌سازی حاوی امولسیون اسیدهای چرب و آنتی‌بیوتیک و یا سوسپانسیون اسیدهای چرب بدون دارو روزانه تهیه و در همان روز مصرف می‌شد.

غنی‌سازی ناپلی آرتمیا با دارو: برای شروع عملیات غنی‌سازی، ناپلی‌ها را در تراکم ۲۰۰ ناپلی در هر میلی‌لیتر به زوک‌های شیشه‌ای شش لیتری منتقل کردیم. ابتدا برای بررسی الحاق اکسولینیک اسید به ناپلی آرتمیا، ناپلی‌ها با اسید چرب HUFA و اکسولینیک اسید دردوزهای مختلف (۵۰w/w درصد و ۲۰ درصد، ۱۰ درصد، ۵ درصد) در دو نوبت t.+۱۰ و t. ساعت غنی‌سازی گردیدند. سپس در مرحله بعد برای انجام آزمایش ناپلی آرتمیا در دو گروه با HUFA و اکسولینیک اسید (۲۰w/wدرصد، ۱۰درصد، ۵درصد) و فقط با HUFA بدون اکسولینیک اسید در دو نوبت t.+۱۰ و t. ساعت غنی‌سازی شدند. هر تیمار شامل سه تکرار بود. ظرف‌ها به‌طور تصادفی در دمای آب ۱± ۲۸ درجه سانتی‌گراد با نور و هوادهی ثابت قرارداده شدند. عمل غنی‌سازی آرتمیا ۱۰ ساعت پس از تخم گشایی (زمان t.) شروع و به‌مدت ۲٤ ساعت انجام گرفت (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

ماهی: لارو ماهیان خاویاری تاس ماهی ایرانی (وزن ۳۰-۲۰ میلی‌گرم) که از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت (سد سنگر) تهیه و در تانک‌های ٤۰ لیتری (حاوی ۲۵ لیتر آب) در دمای ۲۱-۱۹ درجه سانتی‌گراد تحت سیستم پرورشی جریان پیوسته باز (دبی آب ۰/٦ لیتر در دقیقه) مجهز به پمپ هواده در شرایط جدید نگهداری گردید. لاروهای ماهیان با وزن ٤۰۰-۳۰۰ میلی‌گرم و با تراکم ۱۲ قطعه در لیتر به میزان ۲۰ درصد وزن ماهی به‌طور روزانه (شعبان‌پور، ۱۳۷۷) در چهار نوبت و در هر نوبت بمدت ۱ ساعت تغذیه شدند. مدت تغذیه با ناپلی‌های غنی شده ۵ روز بود و در ادامه لاروها با ناپلی غنی نشده تغذیه شدند.

آماده‌سازی نمونه‌ها جهت استخراج داروی اکسولینیک اسید: طبق روش معمول در مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه، جهت تعیین و سنجش میزان باقی ماندگی دارو و استخراج اکسولینیک اسید از بافت‌های

1-High Unsaturated Fatty Acid (HUFA)

www.SID.ir

Archive of SID

ماهی و ناپلی‌های آرتمیای غنی شده، نمونه‌های تهیه شده از هر تیمار را در هاون استریل له کرده، سپس با افزودن ۱ سی‌سی استونیتریل (C_2H_3N) در ۳ سی‌سی بافر فسفات ۰/۱ نرمال pH=۳ هموژنیزه گردیدند. محلول هموژنیزه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ٤۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. این کاربرای رسوب پروتئین‌ها و بافت‌های موجود در محلول می‌باشد. بعد از سانتریفوژ، فاز آبکی بوجود آمده به یک لوله منتقل و روی فاز رسوبی باقی مانده مجدداً ۳ سی‌سی محلول بافر فسفات اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ٤۰۰۰ در دقیقه عمل سانتریفوژ تکرار شد. فاز آبکی همانند مرحله اول جدا و به لوله قبلی منتقل و رسوب موجود دور ریخته شد. سپس ۳ سی‌سی هپتان-N به آن اضافه گردید و سر لوله در پیچ‌دار را با پارافیلم و در پیچ‌دار بسته و سر آن را محکم بسته، کاملاً هم زده و سپس اجازه دادیم تا رسوب کند، سپس با استفاده از پیپت پاستور بخش شفاف بالایی هپتان-N را گرفته و دور ریخته شد. به بقیه دوباره ۳ سی‌سی هپتان-N (به خاطر استخراج و حذف چربی‌ها) اضافه کرده، سر آن را بسته و دوباره کار تکرار گردید تا کل چربی استخراج و حذف گردد. سپس آن را به داخل لوله‌های کوچک‌تر ریخته و دوباره به مدت ۱۰ دقیقه با دور٤۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نمونه اصلی را از قسمت بالایی با پیپت پاستور گرفته و در سرنگ ۱۰ سی‌سی با فیلتر ۰/٤٥ میکرون فیلتر گردید، در داخل ویال‌های کوچک ریخته و در آن پرچ شد (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

تجزیه شیمیایی نمونه‌های حاوی داروی اکسولینیک اسید: جهت تجزیه شیمیایی و تعیین میزان باقی ماندگی دارو ۲۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده به دستگاه HPLC تزریق گردید (چیر و همکاران، ۱۹۹۱؛ توراکی و همکاران، ۲۰۰۱ و ریگوز و همکاران، ۲۰۰۳). این روش حساسیت بالایی در بازیابی دارو و عوامل ضد باکتریایی دارد (یونو و همکاران، ۱۹۹۹).

آماده‌سازی و تجزیه شیمیایی هر تیمار که با سه تکرار غنی‌سازی شده به‌طور جداگانه طبق روش فوق‌الذکر شده صورت گرفت. برای جداسازی و تجزیه شیمیایی میزان باقی ماندگی دارو در هر یک از نمونه‌ها از فاز متحرک حاوی ۳۰ درصد متانول و ۷۰ درصد آب و از ستون C۱۸ و دتکتور فراء بنفش UV با طول موج ۲٥٤ نانومتر استفاده گردید.

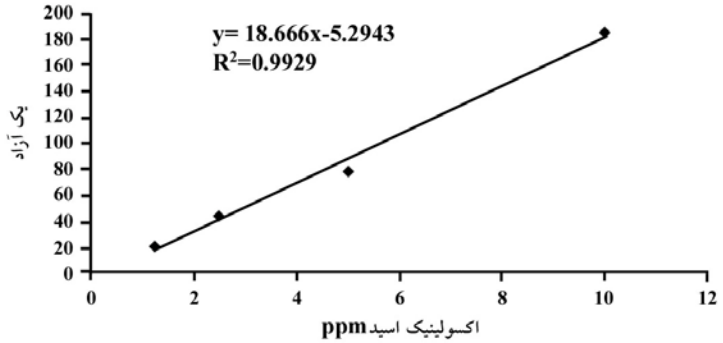
دفع دارو از ناپلی: بعد از اتمام زمان غنی‌سازی با دارو (۲٤ ساعت=t.) ناپلی‌ها پس از شستشو در زیر آب شیرملایم به ظروف حاوی آب تمیز وهوادهی مداوم در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد (انکوباتور سرد) منتقل شدند. زمان‌های نمونه‌برداری t.+۲٤، t.+۱۲، t.+۸، t.+٤، t. ساعت صورت گرفت که مطابق با زمان غذادهی لاروهای ماهی یا به‌عبارت دیگر زمان مصرف ناپلی‌های غنی‌سازی شده بود. در پایان این دوره زمانی ناپلی‌ها صید شده، شستشو و آبگیری شدند و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای تجزیه شیمیایی نگهداری گردید (توراکی و همکاران، ۱۹۹٦).

تجمع دارو در ماهی: ناپلی‌های حاوی اسیدهای چرب و دارو به مدت ٥ روز به لاروهای ماهی داده شدند. سپس لاروهای ماهی به ظرف‌های حاوی آب تمیز انتقال داده شدند (t. زمان انتقال). گروه دیگر ماهیان با ناپلی غنی شده با امولسیون اسیدهای چرب بدون دارو و ماهیان شاهد با ناپلی بدون غنی‌سازی تغذیه شدند. نمونه‌ها در t.+۹٦، t.+٤۸، t.+۲٤، t.+۱۲، t. ساعت جمع‌آوری گردید. لارو ماهی جهت تجزیه شیمیایی در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردیدند.

استاندارد کردن دستگاه HPLC: برای استاندارد کردن دستگاه HPLC از دوزهای مختلف اکسولینیک اسید خالص (سیگما) جهت تزریق به دستگاه استفاده گردید. با افزایش دوزاکسولینیک اسید تزریقی به دستگاه (HPLC) میزان پیک تشکیل یافته به‌صورت خطی افزایش یافت و این رابطه از ضریب همبستگی بسیار بالایی برخوردار (r=۰/۹۹٦) بود (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- رابطه بین دوز آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید و پیک آزاد

نتایج

اثر غلظت یا دوز و مدت زمان غنی‌سازی ناپلی آرتمیا با اکسولینیک اسید: در بررسی اولیه غنی‌سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا با استفاده از تجزیه شیمیایی HPLC، از دوزهای غنی‌سازی ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد و اسید چرب (w/w) (معادل دوز ۱۰۰، ٤۰، ۲۰ و ۱۰ میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر ناپلی در محیط غنی‌سازی) جهت اطمینان از تغذیه ناپلی‌ها از گلبول‌های چربی حاوی آنتی‌بیوتیک اکسولینیک اسید استفاده گردید (جدول ۱).

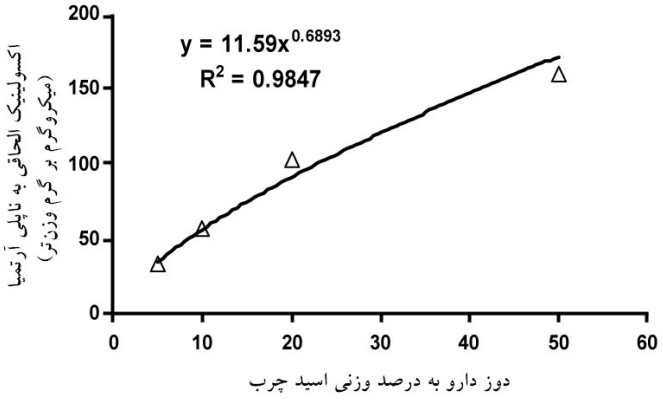
با توجه به جدول ۱ با افزایش غلظت یا دوز آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید در محیط غنی‌سازی میزان آنتی‌بیوتیک الحاقی به ناپلی آرتمیا افزایش یافت. با توجه به نسبت ۱۰ و ٤ و ۲ و ۱ دوز دارو میزان افزایش داروی الحاقی به ناپلی آرتمیا به نسبت ٤/۷۷، ۱/ ۳، ۱/۷ و ۱ بود. میانگین داروی الحاقی به ناپلی آرتمیا با افزایش میزان دوز به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. همچنین با افزایش مدت زمان غنی‌سازی از ۱۰ ساعت به ۲٤ ساعت میزان اکسولینیک اسید از ٦۳/۸ به ۱۰۲/۸٦ میکروگرم بر گرم وزن‌تر افزایش یافت که این افزایش معادل ۱/٦ برابر بود. غنی‌سازی ناپلی آرتمیا با غلظت ۱۰ درصد اکسولینیک اسید تقریباً برابر با غنی‌سازی آن با غلظت ۲۰ درصد اکسولینیک اسید با یکبار غنی‌سازی بوده و تفاوت معنی‌دار نداشت. دوز اکسولینیک اسید با میزان غنی‌سازی ناپلی آرتمیا ازهمبستگی بالا ($r=۰/۹۹$) و معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) برخوردار بود (شکل ۲).

جدول ۱- میانگین آنتی‌بیوتیک استخراج شده از ناپلی آرتمیا در دوزهای مختلف غنی سازی.

دوز غنی‌سازی	میکرو گرم بر گرم وزن‌تر
۵ درصد	۳۳/۵۱d
۱۰ درصد	٥٦/۷۲c
۲۰ درصد یکبار غنی‌سازی	٦۳/۸c
۲۰ درصد	۱۰۲/۸٦b
۵۰ درصد	۱٦۰a

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر غلظت اکسولینیک اسید بر میزان غنی‌سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا.

دفع اکسولینیک اسید از ناپلی آرتمیا بعد از ذخیره‌سازی در انکوباتور سرد: پس از پایان غنی‌سازی، غذادهی لاروهای ماهی با ناپلی‌های مربوطه صورت گرفت. جهت غذادهی در ساعات بعدی، ناپلی‌های غنی‌سازی شده به‌منظور کاهش متابولیسم ناپلی در انکوباتور ٤ درجه سانتی‌گراد مجهز به هواده نگهداری شد. زمان ذخیره‌سازی ناپلی‌ها مطابق با زمان غذادهی لاروهای ماهیان قره‌برون با ناپلی آرتمیا بود. میزان دفع دارو در ۱۲ ساعت اول در دوز ۱۰ و ۵ درصد وزنی وزنی اسید چرب غیر اشباع به‌ترتیب معادل ۱۳/۰۵ و ۲۳/۱٦ درصد و در ٢٤ ساعت به‌ترتیب معادل ٤١/٠٩ و ٥٨/٨٦ درصد نسبت به زمان صفر (زمان انتقال به انکوباتور که معادل پایان غنی‌سازی ٢٤ ساعت است) کاهش معنی‌داری نشان داد (جدول ۲). در دوز ۲۰ درصد میزان دفع در زمان‌های ٢٤، ۱۲، ۸ و ٤ ساعت نسبت به زمان صفر به‌ترتیب معادل ٥٥/٥١، ١٨/٤٨، ١٤/٨٠ و ۱۰/۸۹ درصد کاهش نشان داد.

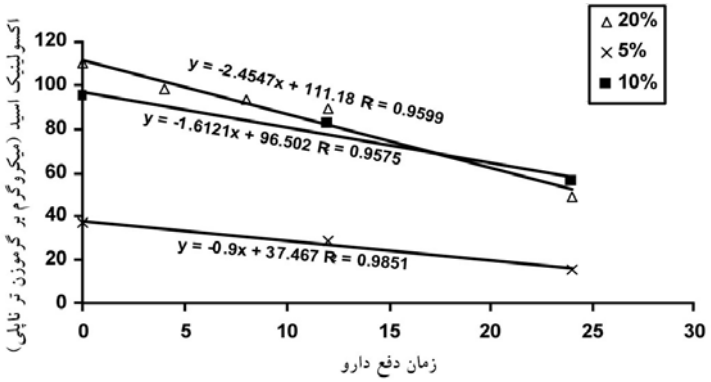
رابطه بین میزان دفع دارو از بدن ناپلی و زمان ذخیره‌سازی ناپلی از ضریب همبستگی بسیار بالایی برخوردار است و با گذشت زمان این کاهش یا دفع دارو از ناپلی از نظر آماری به حد معنی‌داری رسید (شکل ۳).

جدول ۲- میانگین اکسولینیک اسید موجود در ناپلی آرتمیا پس از ذخیره‌سازی در انکوباتور سرد ٤ درجه سانتی‌گراد.

زمان ذخیره سازی ناپلی آرتمیا	٥درصد	۱۰درصد	۲۰درصد
t۰	٣٦/٧a	٩٤/١٥a	۱۰۹/۳a
t۰+ ٤	-	-	٩٧/٤bc
t۰ +٨	-	-	٩٣/١٢c
t۰+ ١٢	٢٨/٢b	٨١/٨٦b	٨٩/١c
t۰+ ٢٤	١٥/١c	٥٥/٤٦c	٤٨/٦٣d

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- نمودار رگرسیونی بین اکسولینیک اسید و زمان دفع دارو از ناپلی آرتمیا.

دفع اکسولینیک اسید از لارو ماهی قره‌برون: پس از تغذیه لاروهای قره‌برون با ناپلی غنی‌سازی شده با اکسولینیک اسید به‌مدت ۵ روز و نگهداری آنها در شرایط مشابه مورد مطالعه میزان دفع دارو یک روند کاهشی را نشان می‌دهد. در دوزهای ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد در ۱۲ ساعت اول میزان کاهش به‌ترتیب معادل ۷۰/۵۱، ٤۳/۵۸، ۵/۷ درصد بود که در دوزهای ۲۰ و ۱۰ درصد این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود. در مدت زمان ۲٤ ساعت میزان دفع دارو به‌ترتیب معادل ۷۳/۰۱، ۸۸/۹۲ و ۸/۱۳ درصد و در ٤۸ ساعت میزان دفع دارو برابر با ۹۱/۵۸ درصد، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد رسید. دفع دارو در ۹٦ ساعت نیز تنها در دوز ۲۰ درصد سنجیده شد که میزان دفع دارو در این غلظت دارو برابر با ۱۰۰ درصد بود (جدول ۳).

بحث

نتایج مطالعه حاضر بیانگر توانایی نـاپلی آرتمیـا ارومیانـا به‌عنوان حامل آنتی‌بیوتیک اکسولینیک اسید می‌باشـد. میـزان داروی الحاقی به ناپلی در غنی‌سازی با دوز ۲۰ درصد در دو بارعمل غنی‌سازی تقریباً ۱/٦۱ برابر میزان داروی الحـاقی در یکبار غنی‌سازی بود. غنی‌سـازی بـا دوز ۵۰ درصـد بخـاطر رسوب سریع دارو در ته‌ظرف حـاوی مـاده غنـی‌سـازی کـه ناشی از زیاد بودن دارو مـی‌باشـد بـه‌نظـر مـی‌رسـد چنـدان مناسب نیست (جدول ۱). به‌نظـر مـی‌رسـد الحـاق دارو بـه ناپلی در ساعات اولیه غنی‌سازی بیشتر صورت می‌گیـرد. در تحقیق یحیی‌زاده اثر مدت زمـان غنـی‌سـازی و دوز دارو در میزان باقی ماندگی دارو معنی‌دار بود بـه‌طـوری‌کـه بیشـترین میـزان بـاقی مانـدگی دارو در نـاپلی آرتمیـا در دوز ۱۰۰ میلـی‌گـرم در طـی ٦ سـاعت غنـی‌سـازی معـادل ۳۸/۸٤۳ میکروگرم بر گرم وزن تر و در آرتمیای بالغ نیز در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر طی ٦ ساعت غنـی‌سـازی معـادل ۱۷۰/۲۲۷ میکروگرم بر گرم وزن تر بود (یحیی‌زاده، ۱۳۸۱).

جدول ۳- میانگین اکسولینیک اسید در لارو ماهی قره‌برون پس از نگهداری در شرایط مورد مطالعه (۲۱-۱۹ درجه سانتی‌گراد).

زمان نگهداری ماهی	۵درصد	۱۰درصد	۲۰درصد
t.	۲/٤٦a	۳/۹۷a	٦/٤۱a
t.+۱۲	۲/۳۲a	۲/۲٤b	۱/۸۹b
t.+۲٤	۲/۲٦a	/٤٤c	۱/۷۳b
t.+٤۸	۰b	۰d	/۵٤c
t.+۹٦			۰d

www.SID.ir

Archive of SID

در غنی‌سازی با دوز ۱۰ درصد مشاهده شد که میزان داروی الحاقی به ناپلی حدود ۲/۵۷ برابر غنی‌سازی با دوز ۵ درصد است و با دوز ۲۰ درصد تفاوت معنی‌دار نداشت. غلظت اکسولینیک اسید در بدن ناپلی آرتمیا در ۱۲ ساعت اول در حد بالایی باقی ماند و در پایان ۲٤ ساعت تا حدود ۵۰ درصد کاهش یافت که احتمالاً به خاطر دفع دارو از ناپلی به محیط اطراف آن یا متابولیسم آن توسط موجود می‌باشد (جدول ۲). با توجه به رگرسیون خطی دفع دارو از ناپلی به‌نظر می‌رسد مصرف ناپلی آرتمیا جهت تغذیه لاروهای ماهی در ۱۲ ساعت اول بعد از پایان غنی‌سازی بهتر است تا از اتلاف دارو و بالطبع هزینه جلوگیری گردد. در بررسی دفع دارو از لاروهای ماهی قره‌برون در دوز ۵ درصد در ۲٤ ساعت اول کاهش غیر معنی‌داری در میزان داروی الحاقی به ماهی مشاهده گردید و در ۲٤ ساعت بعدی افت شدید صورت گرفته و تمام دارو از بدن ماهی دفع گردید. در دوز ۱۰ درصد معنی‌داری با گذشت زمان مشاهده شد ولی کاهش در ۱۲ ساعت اول کمتر و در ۱۲ ساعت بعدی بیشتر بود ولی در دوز ۲۰ درصد افت شدید غلظت دارو در بدن ماهی در همان ۱۲ ساعت اول پس از پایان تغذیه با ناپلی‌های غنی شده اتفاق افتاد. به‌نظر می‌رسد با افزایش دوز دارو میزان دفع دارو از لاروهای ماهی سریع‌تر باشد. حذف در دماهای بالاتر سریع‌تر است ولی رابطه همیشه خطی نیست و بین گونه‌ها متفاوت است. دفع دارو در دماهای پایین‌تر کندتر است. در مطالعه اکسولینیک اسید دفع دارو در دماهای پایین کندتر بوده و باقی مانده‌های قابل ردیابی دارو در خون و کبد برای ۱۰ روز وجود دارد. دفع کند دارو فرصتی برای انتخاب باکترهای مقاوم در بین فلور طبیعی روده و پایداری پاتوژن‌ها در میزبان فراهم می‌کند. این خطر بالقوه در آب سرد است و در سیستم‌های گرمابی کمتر می‌باشد. فاکتور اصلی در امر درمان در مزارع پرورشی عدم یکنواختی در خوردن دارو می‌باشد. عامل مهمی که به آن نسبت داده می‌شود موقعیت جمعیت است. بی اشتهایی از علائم اولیه کلینیکال بیماری است و اگر در یک پاتوژن اپیدمی درمان خیلی زود شروع نشود خوردن دارو ممکن است خیلی کم باشد (اینگلیس، ۱۹۹٦). دارو یا ماده شیمیایی بکار رفته در درمان با داروهای شیمیایی در غلظت‌هایی که برای میزبان مضر نیست باید عامل پاتوژن را حذف کند (باتیکادوس و پاکلیبار، ۱۹۹۲). کینولون‌ها دررسوبات خیلی پایدارند و بقایای قابل ردیابی ممکن است تا ٦ ماه یا بیشتر بعد از درمان با دارو باقی بماند (ساموئلسن، ۱۹۸۹). برای یک موجود حامل، موادی که باید حمل شود و باقی ماندن ماده در آن موجود به‌منظور افزایش مؤثرتر و اجتناب از اتلاف ماده و دفع آن به محیط اطراف عامل زمان قابل توجه است. آزمایش دفع دارو تأییدی برای نگهداری سطوح بالای داروی مورد استفاده در ناپلی در ساعات اولیه بخصوص در دوز ۲۰ درصد پس از پایان دوره ۲٤ ساعته غنی‌سازی می‌باشد.

منابع

۱.شعبان‌پور، ب.، ۱۳۷۷. تعیین ضرایب تبدیل دافنی و ناپلیوس آرتمیا در تغذیه لارو تاس ماهی ایرانی (قره‌برون). پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۱ ص.

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

3.Baticodas, M., and Paclibare, J., 1992. The use of chemotherapeutic agents in aquaculture in the Philippines .In: Shariff M., Subasinghe R.Arthure J. eds. Disease in Asian aquaculture I.p.531-546. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.

www.SID.ir

Archive of SID

4.Bengston, D.A., Leger, P., and Sorgeloos, P., 1991. Use of artemia as a food source for aquaculture. In: Artemia Biology. Brower, R.A. Sorgeloos, P., and Trotina C.M.A. (Eds). CRC press. Inc.Boca. Ratann. 255-285.
5.Chair, M., Romdhane, M., Dehasque, M., Nelis, H.J., De Leenheer, A.P., and Sorgeloos, P., 1991. Live–food mediated drug delivery as a tool for disease treatment in larviculture.A case study with european sea bass .In Larvi.1991.Fish and Crustacean Larviculture Symposium, eds P.European Aquaculture Society, Gent ,Belgium, pp. 412-414.
6.Guo, J., and Liao, I., 1994. Pharmacokinetics of Oxolinic acid in orange – spotted grouper, Epinphelus *coioides*, after single oral administration at 24ºC. Journal Fish. Soc. Taiwan, 21:263-272.
7.Inglis, V., 1996. Antibacterial chemotherapy in aquaculture: Review of practice, associated risks and need for action. Proceeding of the meeting on the use of chemicals in aquculture in Asia. Tigbauan, IIoilo, Philippines.
8.Kyungmin, H., Geurden, I., and Sorgeloos, P., 2000. Enrichment strategies for *Artemia* using emulsions providing different levels of n-3 highly unsaturated fatty acids.Aquaculture, 183.335-347.
9.Leger, P., Bengston, D.A., Simpson, K.L., and Sorgeloos, P., 1986. The use and nutritional value of artemia as food source : Oceaogr.Mar.Biol.Ann.Rev.,Vol,24,pp.521-623.
10.Leger, Ph., Naessens-Foucquaert, E., and Sorgeloos, P., 1987. 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.
11.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. p. 113-137. The Oceanic Institute, Waimanalo, HI.
12.Rigos, G., Nengas, I., Alexis, M., Tyrpenou, A., and Troisi, G., 2003. Tissue distribution and residue depletion of Oxolinic acid in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) following multiple in- feed dosing.Aquaculture, 224, 245-256.
13.Samuelsen, O., 1989. Degradation of Oxytetracycline in seawater at two different temperatures and light intensities, and the persistence of Oxytetracycline in the sediment from a fish farm. Aquaculture, 83: 7-16.
14.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.
15.Subasinghe, R., Barg, U., and Tacon, A., 1996. Chemicals in Asian aquaculture: Need, usage, issues and challenges. Proceeding of the meeting on the use of chemicals in aquculture in Asia.1996. Tigbauan,IIoilo, Philippines. 244p.
16.Touraki, M., Mourelatos, S., Karamanlidou, Gh., 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.
17.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. 247-256.
18.Trust, T.J., 1986. Pathogenesis of infectious diseases of fish.Ann.Rev.Microbiol. 40,479-502.
19.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. 629-633.

www.SID.ir

Archive of SID

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(2), June -July 2007
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Enrichment and excertion of oxolinic acid in *Artemia urmiana* nauplii and *Acipenser persicus* larvae

R. Ghorbani[1], A. Hajimoradloo[2], N. Agh[3], M. Soltani[4], F. Noori[5] and A. Irani[6]
[1]Assistant Prof. Dept. of Fisheries Gorgan Univ. of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associate Prof. Dept. of Fisheries Gorgan Univ. of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof. of Artemia and Aquatic animal Research center Uremia Univ., [4]Prof. of Faculty of veterinary of Tehran University, [5]Instructor of Artemia and Aquatic animal Research center Uremia Univ., [6]Expert of Artemia and Aquatic animal Research center Uremia Univ.,

Abstract

The ability of *Artemia urmiana* nauplii as a carrier of oxolinic acid and its transfer to the Persian sturgeon larvae (*Acipenser persicus*) , drug excertion in the nauplii of Artemia in the cold incubation (4ºC) and fish larvae in the laboratory conditions(19-21ºC) were studied. The correlation between drug excertion and time of nauplii storing in the cold incubation was significant. The oxolinic acid excertion in first 12 hours of experiment in 2 doses of 5% and 10% (w/w) were 23.16% and 13.05% and in 24 hours of experiment 58.86% and 41.09% comparable of t_0 (time of transferring to cold incubation), respectively. This decrease was significant .In dose of 20% of experimental treatment excertion rate of oxolinic acid in 4, 8, 12 and 24 hours of experiment comparable of t_0 were 10.89%, 14.8%, 18.48%, 55.51%, respectively. The correlation between oxolinic acid excertion from nauplii of *Artemia urmiana* and time of nauplii storing by passing the time was high(r>95%) and significant (p<0/05). The oxolinic acid excertion in fish larvae in first 12 hours of experiment in 3 doses of 5%, 10%, 20% were 5.7%, 43.58%, 70.51%, respectively. These decreases were significant in 2 doses 10% and 20%.

Keywords: *Acipenser persicus* Larvae; *Artemia urmiana* nauplii; Excertion; Oxolinic acid

www.SID.ir