

غنی سازی آرتمیا ارومیا (*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

اعضای هیات علمی گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه،

گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۷/۱۹

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 3×10^8 سلول در میلی‌لیتر از تکنیک غنی‌سازی (مدت زمان ۲۴ ساعت غنی‌سازی آرتمیا ارومیا) 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. در این مطالعه کاربرد ناپلی آرتمیا ارومیا 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 ارومیا، اکسولینیک اسید، پیشگیری، غنی‌سازی، لارو ماهی قره‌برون

مقدمه

خوب، آماده‌سازی صحیح استخر، تراکم ذخیره‌سازی مناسب، منبع آب با کیفیت مناسب) و بالا بردن توانایی ایمنی جانوران آبی (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 آبی پروری به‌عنوان آخرین راه بکار می‌رود (لیائو و همکاران، ۱۹۹۲). زمانی که کشت مترکم مطرح است مسئله شیوع بیماری‌های میکروبی از اهمیت زیادی برخوردار است

استفاده از مواد شیمیایی ضد باکتریایی در آبی 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 تحریک‌کننده‌های ایمنی بدن، واکسن‌ها، غذای با کیفیت بالا از جمله عوامل جلوگیری از بروز بیماری است (سوپیادی و همکاران، ۱۹۹۲). مدیریت بهداشتی استخر (استخر با طراحی

(تراست، ۱۹۸۶). شیوع بیماری‌های باکتریایی با تنوع زیاد مشکلات فراوانی همراه با تلفات در صنعت آبی پروری بوجود می‌آورد. به همین خاطر جهت 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 کتتری 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 به موقع و دوز مناسب دارو توسط ماهی می‌باشد که علاوه بر 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 از آن 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^۱ است (لگر و همکاران، ۱۹۸۷ ای؛ روبین و همکاران، ۱۹۸۷؛ نیلیس و همکاران، ۱۹۹۱).

آرتمیا به عنوان 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 به صورت فیلترکننده غیرانتخابی از مواد آلی گندیده، جلبک‌های ریز میکروسکوپی و باکتری‌های موجود در آب (ذرات کوچکتر از ۵۰ میکرون) تغذیه می‌کند (برگرفته از بحیی‌زاده، ۱۳۸۱). ارزش غذایی بالا، تنوع اشکال کاربرد آرتمیا در مراحل مختلف رشد و پرورش انواع آبزیان و قابلیت استفاده از آن به عنوان حامل ویتامین‌ها، رنگدانه‌ها، مواد شیمیایی، واکسن‌ها و هورمون‌ها همگی باعث شده تا این موجود از جایگاه

ویژه‌ای در آبی پروری برخوردار باشد. لارو ناپلیوس آرتمیا یک منبع غذایی خوبی است که مطلوب لارو ماهیان دریایی و آب شیرین است (سورگوس و همکاران، ۱۹۸۶). ناپلیوس آرتمیا می‌تواند حامل موادی شود که به سبب به ارگانسیم‌های مصرف‌کننده انتقال یابند (لگر و همکاران، ۱۹۸۷ ب). از جمله چنین موادی می‌توان اسیدهای چرب غیراشباع با درجه غیراشباعیت بالا^۲ 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 به عنوان حامل داروهای ضد باکتریایی به لاروهای ماهی و میگو بررسی شده است (ورپریت و همکاران، ۱۹۹۲). در اکثر نقاط دنیا ارزش غذایی آرتمیا را با استفاده از تکنیک غنی‌سازی^۳ با خوراندن ترکیبات و ماده انتخاب شده تقویت می‌کنند به طوریکه 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 به عنوان حامل دارو استفاده کردند که به تدریج موضوع غنی‌سازی آرتمیا با ترکیبات دارویی و استفاده از آن در کنترل و پیشگیری بیماری‌های باکتریایی در مطالعات دهرت و همکاران (۱۹۹۵)، آگوئیلا-آگوئیلا و همکاران (۱۹۹۴)، چیر و همکاران (۱۹۹۶) و دیکسون و همکاران (۱۹۹۵) به اثبات رسید. از تکنیک غنی‌سازی با دارو به عنوان وسیله‌ای برای پیشگیری لاروهای ماهی باس دریایی (*Dicentrarchus labrax*) مقابله داده شده با باکتری گرم منفی ویبریو انگوئیلازوم (*Vibrio anguillarum*) استفاده گردید و بهبود معنی‌داری در بقای لاروهای تغذیه

غنی‌سازی ناپلی آرتیمیا و آرتیمیای 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 آرتیمیا دوز ۱۰۰ میلی‌گرم طی ۶ ساعت غنی‌سازی معادل ۳۸/۸۴۳ میکروگرم بر گرم وزن تر و در آرتیمیای بالغ نیز بیشترین میانگین میزان باقی ماندگی دارو در دوز ۵۰ میلی‌گرم معادل ۱۹۲/۲۳۳ میکروگرم بر گرم وزن تر به دست 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 *Aeromonas hydrophila* را نام برد که می‌تواند موجب تلفات ماهیان در دوران لاروی گردد. اکسولینیک اسید از گروه کینولون‌ها^۱ به‌علت مؤثر بودن علیه باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه عفونت‌های آنروموناتسی 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 آرتیمیا با اکسولینیک اسید، دوز ۴۰-۱۰ میلی‌گرم برگرم وزن غذای زنده تر (ناپلی) و ۸-۲ میلی‌گرم بر گرم وزن تر ماهی معادل ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد اسید چرب (w/w) مورد استفاده قرار می‌گیرد (توراک و همکاران، ۲۰۰۱).

نحوه آماده‌سازی کپسول‌های ریز حاوی اکسولینیک اسید: ابتدا پس از محاسبه مقدار محلول غنی‌سازی مورد نیاز (به میزان ۴ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر آب حاوی ۲۰۰۰۰۰ ناپلی آرتیمیای ارومیه برای دو مرحله عمل غنی‌سازی) آب مقطر برداشته و به نسبت ۱۰ درصد آن اسید چرب غیر اشباع بلند زنجیره ۳۰:۴ اضافه شده و به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر (مخلوط کن برقی) کاملاً بهم زده

شده با ناپلی غنی شده نسبت به لاروهای ماهی تغذیه شده با ناپلی غنی نشده پس از مقابله با باکتری ویبریو مشاهده گردید (توراک و همکاران، ۱۹۹۶). در مکزیک انروفلوکسازین^۱ و اکسی تتراسایکلین^۲ رایج‌ترین مواد ضدباکتریایی مورد استفاده در تفریخگاه‌های میگو می‌باشند (گومز-گیل و همکاران، ۲۰۰۱). برای تعیین اثر اکسولینیک اسید و فلوروفینیکل خوراکی در درمان ماهی کد (*Gadus morhua*) که به‌طور آزمایشی با ویبریو (حمام با غلظت $10^6 \times 8/5$ سلول در میلی‌لیتر) به مدت ۱ ساعت مقابله تحریک شده بود از دوز ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم در روز اکسولینیک اسید و فلوروفینیکل 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، ۱۹۹۶) تا ۳۲ ساعت (توراک 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 آرتیمیا ارومیه با امولسیون‌های اسید چرب^۳ ICES ۳۰:۴ و ۵۰:۰/۶ به‌صورت مقایسه‌ای در مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت انجام گرفت که بهترین نتیجه در غنی‌سازی با امولسیون ICES ۳۰:۴ در مدت ۲۴ ساعت حاصل شد (برگرفته از مناف فر، ۱۳۸۰). در غنی‌سازی ناپلی آرتیمیا ارومیا با اسید چرب ICES ۳۰:۴ مشاهده گردید که در مورد اسید چرب ایکوزاپنتانویک اسید^۴ مقدار ۱۳ میلی‌گرم در گرم وزن خشک و در مورد دوکوزاهگزانویک اسید^۵ 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 ۸۱-۱۳۸۰ یک تحقیق بر روی

1- Enrofloxacin

2- Oxytetracycline

3- International Council for the Exploration of Sea

4- Eicosa Pentanoic Acid (EPA)

5- Docosa Hexaenoic Acid (DHA)

6- Quinolon

تا اسید چرب به صورت میکروگلوبول در آید سپس به آن اکسولینیک اسید را اضافه کرده و به مدت ۴۰ دقیقه با هموژنایزر بهم زده تا داروی مزبور به داخل میکروگلوبول های چربی برود و اصطلاحاً کپسول های حاوی دارو ایجاد گردد. پس از تهیه محلول غنی سازی برای جلوگیری از اکسید شدن اسید چرب به آن گاز ازت اسپری کرده و به داخل یخچال منتقل می گردد.

سیست آرتمیا: سیست های آرتمیا ارومیا (Artemia urmiana) دریاچه ارومیه که به وسیله مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبی 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 میلی گرم در لیتر، دما (۱±۲۸ درجه سانتی گراد) و نوری مناسب (دولامپ مهتابی با قدرت ۲۰۰۰ لوکس) بعد از ۲۴ ساعت تفریح شدند. سپس ناپلی مرحله ۱ از سیست های تخم گشایی نشده جدا شده، در آب تمیز شستشو داده و سپس به تعدادی زوک شیشه ای شش لیتری با تراکم ۲۰۰ ناپلی در میلی لیتر منتقل گردید.

آئروموناس هیدروفیلا: سوش باکتری آئروموناس هیدروفیلا از آزمایشگاه بیماری های 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 به صورت سوسپانسیون تهیه و سانتریفوژ گردید (۴۰۰۰ دور در دقیقه در مدت زمان ۱۰ دقیقه)، مواد شناور روی مایع دور ریخته شده و باقیمانده مواد دوباره در آب مقطر به صورت سوسپانسیون درآمد. غلظت باکتری هم با اسپکترومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر و هم با مشاهده میکروسکوپی برآورد گردید (توراکی و همکاران، ۱۹۹۶) و یا پس از کشت ۴۸ ساعته سلول ها در محلول PBS^۱ استریل جمع آوری و با آب دکلره شده شهری رقیق گردید و به حجم آب مورد نیاز برای حمام باکتریایی اضافه شد. مقداری از آب را در لوله ریخته و با لوله مک فارلند

شماره ۱ (۳×۱۰^۸ سلول در میلی لیتر) مقایسه گردید. جهت انجام مقابله باکتریایی از غلظت بیماریزایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا ۳×۱۰^۸ سلول در میلی لیتر استفاده گردید.

محیط غنی سازی: محیط غنی سازی شامل امولسیون اسیدهای چرب با ۳۰ درصد HUFA ω-۳ به میزان ۱۰w/v درصد (وزنی حجمی) است که به آن اکسولینیک اسید اضافه شد. برای آماده سازی محلول غنی سازی 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 غنی سازی درون ظروف حاوی سوسپانسیون اسید چرب + دارو و اسید چرب بدون دارو گاز نیتروژن اسپری^۲ نموده و در دمای یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری گردید.

غنی سازی آرتمیا با دارو: برای شروع عملیات غنی سازی، ناپلی ها را در تراکم ۲۰۰ ناپلی در هر میلی لیتر به زوک های شیشه ای شش لیتری منتقل گردید. ناپلی آرتمیا در دو گروه با HUFA واکسولینیک اسید (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) و فقط با HUFA بدون اکسولینیک اسید در نوبت t. و t+۱۰ ساعت غنی سازی شد. هر تیمار سه تکرار داشت. ظرف ها به طور تصادفی در حمام آب گرم ۲۸ درجه سانتی گراد با نور و هوا دهی ثابت قرار داده شد. عمل غنی سازی آرتمیا ۱۰ ساعت پس از تخمه گشایی (زمان t) شروع و به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

ماهی: لاروماهیان خاویاری قره برون به وزن ۲۰-۳۰ میلی گرم که از مرکز تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت (سد سنگر) تهیه شد و در تانک های ۴۰ لیتری (حاوی ۲۵ لیتر آب) در دمای ۱۹-۲۱ درجه سانتی گراد تحت سیستم پرورشی جریان پیوسته باز (دبی آب ۰/۶ لیتر در دقیقه) مجهزه هواده در شرایط جدید تا رسیدن به وزن ۴۰۰-۳۰۰ میلی گرم نگهداری گردید.

لاروهای ماهیان ۴۰۰-۳۰۰ میلی گرمی با تراکم ۱۲ قطعه در لیتر به میزان ۲۰ درصد وزن ماهی به طور روزانه (شعبان پور، ۱۳۷۷) در چهار نوبت و در هر نوبت به مدت ۱ ساعت تغذیه شدند. مدت تغذیه با ناپلی های غنی شده ۵ روز بود. در ادامه کار لاروها با ناپلی غنی نشده تغذیه گردیدند.

آزمایش های مقابله و درمان: آزمایش ها روی لاروهای قره برون آماده شده تحت تیمارهای غذایی مذکور انجام گرفت. تغذیه لاروها ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش های مقابله باکتریایی متوقف شد. دما (19 ± 1) درجه سانتی گراد) و مقدار pH آب (۷-۸) در حد مناسب، مقدار اکسیژن محلول در حد اشباع و تعویض پیوسته آب جهت دفع متابولیت صورت گرفت. مقابله باکتریایی لارو ماهی در تشت های 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.

خشتی کردن باکتری در آب و محیط اطراف با استفاده از فرمالین با غلظت ۱ به ۴۰۰۰ و به مدت 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

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

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

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 نمونه برداری: تجزیه و تحلیل آماری بر روی مرگ و میر ثبت شده در ادامه مقابله ماهی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا در گروه های 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^۱ و آزمون LSD با استفاده از نرم افزار SPSS در محیط ویندوز انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل نمونه ها: در مطالعه حاضر از کروماتوگرافی مایع^۲ به عنوان وسیله ای برای اندازه گیری مقدار آنتی بیوتیک منتقل شده به نمونه های ناپلی آرتمیای 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 آرتمیای: غلظت اکسولینیک اسید افزوده شده در ناپلی آرتمیای با افزایش دوز دارو در محیط غنی سازی افزایش یافت و این افزایش معنی دار بود (جدول ۱).

به ازای ۴ میلی‌لیتر از محلول حاوی اکسولینیک اسید با دوزهای ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی / وزنی اسید چرب در مدت زمان ۲۴ ساعت مدت زمان غنی‌سازی، به هر ظرف ۱ لیتری حاوی ۲۰۰۰۰۰ ناپلی آرتیمیا میزان دارو به‌ترتیب معادل ۳۶/۷، ۹۴/۱۵ و ۱۰۹/۳ 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 ۰/۳۶۷، ۰/۴۷۱ و ۰/۲۷۳ درصد داروی اضافه شده به محیط غنی‌سازی ناپلی آرتیمیا بود. بیشترین نسبت مربوط به دوز مصرفی ۱۰ 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 و ۲۰ 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 آرتیمیا به‌نظر می‌رسد ناپلی آرتیمیا 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 آئروموناس هیدروفیلا در مدت زمان ۱۰ روز پس از مقابله با باکتری انجام شد که نتایج آن بشرح زیر است (جدول ۴). مرگ و میر ماهیان بعد از ۱۰ روز (تا زمانی که از ناپلی آرتیمیای 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 غنی‌سازی ناپلی آرتیمیا ارومیانا و تجمع دارو در لارو قره‌برون با تغذیه از آن.

میکروگرم بر گرم وزن تر ناپلی	دوز غنی‌سازی (w/w) اسید چرب
۲/۴۶ c	%۵
۳/۹۷b	%۱۰
۶/۴۱a	%۲۰

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

میانگین	انحراف معیار	حداکثر	حداقل
۷/۵	۴/۱	۱۹/۸	۲/۲

جدول ۴- مقایسه بقای لاروهای ماهی قره‌برون پس از رویارویی با باکتری آئروموناس هیدروفیلا.

تیمار	شاهد بدون	شاهد بدون	پیشگیری ۵٪	پیشگیری ۱۰٪	پیشگیری ۲۰٪	درمان ۵٪	درمان ۱۰٪	درمان ۲۰٪
بقا	مقابله	درمان						
۱۰۰±۰	۹۷،۳±۳،۰۶	۹۷/۳±۲/۳۱	۹۷/۳±۱/۵	۹۸±۳/۵	۹۸±۳،۵	۹۶،۷±۱،۱۵	۹۷،۳±۱،۱۵	

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 در ناپلی آرمیا و لارو ماهی به هنگام تغذیه از آنها می‌گردد. در مطالعه آرمیا به‌عنوان حامل آنتی بیوتیک و تعیین میزان باقیماندگی دارو در مراحل ناپلی و بلوغ آرمیا مشاهده گردید که اثر مدت زمان غنی‌سازی و دوز دارو بر میزان باقیماندگی دارو معنی‌دار بود (یحیی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۱). سطوح اکسولینیک اسید و فلومکوئین در ناپلی آرمیا در مطالعه صورت گرفته توسط توراک و همکاران (۲۰۰۱) برابر با 247 ± 2496 میکروگرم اکسولینیک اسید در هر گرم وزن خشک ناپلی و 15 ± 450 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 109.3 میکروگرم در هر گرم وزن تر ناپلی آرمیای ارومیا بود. تفاوت بین آنها علاوه بر 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 توراک و همکاران خیلی بالاتر از مقادیر به‌دست آمده در مطالعات قبلی محققین که براساس روش ارزیابی زیستی^۱ که روش قدیمی‌تری برای تعیین داروهای مزبور در ناپلی آرمیاست (توراک و همکاران، ۲۰۰۱) بود. تکنیک‌های مورد استفاده برای اندازه‌گیری سطوح آنتی بیوتیک منتقل شده در ناپلی آرمیا نیز متفاوت می‌باشد که شامل ارزیابی زیستی انتشار شعاعی^۲ که در آن باکتری ایشرشیا کلی (*Escherichia coli*) به‌عنوان باکتری شاخص یا اندیکاتور (دیکسون و همکاران، ۱۹۹۵)، و بیرو

آلجینولایتیک (*Vibrio alginolyticus*) (مانی و همکاران، ۱۹۹۰) و باسیلوس سابیتیلیس (*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 آرمیای غنی شده با اکسولینیک اسید افزایش بقای خیلی بالایی را در ماهیان آلوده نشان داد (توراک و همکاران، ۲۰۰۱). در مطالعه حاضر ظاهراً کاربرد ناپلی آرمیا ارومیا 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 محیط‌های با ایجاد استرس بالا برای لاروها در کارگاه‌های پرورشی پیشنهاد می‌گردد. از مضرات اصلی استفاده از دارو در آبی 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 آبی پروری برای درمان انسان نیز استفاده می‌شوند. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها اغلب ایمنی ماهی و میگو را در برابر عوامل عفونی کاهش می‌دهند (یولین، ۱۹۹۶). 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 آئروموناس به‌دست آمده از ماهیان پرورشی به اکسولینیک اسید حساس هستند. برای کنترل چنین بیماری‌هایی، اکسولینیک اسید در دوز ۴۰-۲۰ میلی‌گرم در کیلوگرم وزن بدن با غذا مخلوط و روزانه برای مدت ۵ روز تجویز می‌شود (لیائو و همکاران، ۱۹۹۲؛ گو و لیائو، ۱۹۹۴). برای تعیین اثر اکسولینیک اسید در درمان ماهی کد که به‌طور آزمایشی با ویبریو (حمام با غلظت $10^6 \times 1/5$ سلول در میلی‌لیتر) به‌مدت

1- Bioassay

2- Radial diffusion bioassay

ماهی باس دریایی مقابله داده شده با باکتری گرم منفی و بیبریو انگوئیلاروم استفاده گردید و بهبودی معنی داری در بقای لاروهای تغذیه شده با ناپلی غنی شده نسبت به لاروهای ماهی تغذیه شده باناپلی غنی نشده پس از مقابله با باکتری و بیبریو مشاهده گردید (توراک و همکاران، ۱۹۹۶).

یک ساعت رویارویی تحریک شده بود از دوز ۱۰ و ۲۰ میلی گرم در کیلو گرم روز اکسولینیک اسید برای مدت ۱۰ روز تجویز گردید. بقای ماهیان درمان شده نسبت به ماهیان درمان نشده به طور معنی دار بالاتر بود (ساموئلسن و برگ، ۲۰۰۳). از تکنیک غنی سازی با دارو به عنوان وسیله ای برای پیشگیری یا درمان تست شده با لاروهای

منابع

۱. شعبان پور، ب. ۱۳۷۷. تعیین ضرایب تبدیل دافنی و ناپلیوس آرتمیا در تغذیه لارو تاس ماهی ایرانی (قره برون). پایان نامه کارشناسی ارشد رشته شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۷۱ ص.
۲. مناف فر، ر. ۱۳۸۰. غنی سازی ناپلیوس آرتمیا ارومیا با امولسیون اسید چرب و جلبک دونالیلا و بررسی متابولیسم HUFA تحت انکوباسیون سرد. پایان نامه کارشناسی ارشد بیولوژی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس. ۷۹ ص.
۳. یحیی زاده، م. ۱۳۸۱. استفاده از آرتمیا به عنوان 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., Tejeda 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 larviculture. 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 medicated *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. Health* 7. 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 bioencapsulation. *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, *Epinephelus coioides*, after single oral administration at 24°C. *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. Decler & 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,

- 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 brine 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 bioencapsulation 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 chromatography. 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.

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. Ghorbani¹, A.M. Hajimoradloo¹, N. Agh², M. Soltani³, F. Noori² and A.J. Irani²

¹Faculty members of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, ²Artemia & Aquatic Animal Research Center, Uremia University, Uremia, Iran, ³Faculty 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