

غنی‌سازی و دفع اکسولینیک اسید در ناپلی آرتمیا ارومیا (*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

^۱استادیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۲دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ^۳استادیار مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه، ^۴استاد دانشگاه تهران، ^۵مربی مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه، ^۶کارشناس ارشد مرکز تحقیقات آرتمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۳؛ تاریخ پذیرش: ۸۵/۶/۸

چکیده

قابلیت انتقال اکسولینیک اسید توسط ناپلی آرتمیا ارومیا و انتقال آن به لاروهای تاس ماهی ایرانی، تعیین میزان دفع دارو از بدن ناپلی پس از ذخیره‌سازی در انکوباتور سرد (۴ درجه سانتی‌گراد) و در بدن لاروماهی در شرایط مورد مطالعه (۱۹-۲۱ درجه سانتی‌گراد) بررسی گردید. بین دفع دارو و زمان نگهداری ناپلی در انکوباتور سرد همبستگی معنی‌داری وجود داشت ($P < 0.05$). میزان دفع دارو از ناپلی آرتمیا در ۱۲ ساعت اول در دو دوز ۱۰ و ۵ درصد وزنی/وزنی اسید چرب غیراشباع به ترتیب معادل ۱۳/۰۵ و ۲۳/۱۶ درصد و در ۲۴ ساعت به ترتیب معادل ۴۱/۰۹ و ۵۸/۸۶ درصد نسبت به زمان صفر (زمان انتقال به انکوباتور که معادل پایان غنی‌سازی ۲۴ ساعته) کاهش معنی‌دار نشان داد ($P < 0.05$). در دوز ۲۰ درصد میزان دفع در زمان‌های ۲۴، ۱۲، ۸ و ۴ ساعت نسبت به زمان صفر به ترتیب معادل ۵۵/۵۱، ۱۸/۴۸، ۱۴/۸۰ و ۱۰/۸۹ درصد کاهش نشان داد. رابطه بین میزان دفع دارو از 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 ($P < 0.05$). 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 به ترتیب معادل ۷۰/۵۱، ۴۳/۵۸ 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 ارومیا

مقدمه

ناپلی آرتمیا منبع غذایی خوبی است که مطلوب لاروماهیان دریایی و آب شیرین است (سورگولوس و همکاران، ۱۹۸۶). آرتمیا گسترش جهانی دارد و سویه‌های جغرافیایی متنوعی از آن در دنیا وجود دارد. نقش بارز آرتمیا در توسعه صنعت آبی 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 آبی 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 غنی‌کننده 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، ۱۹۸۶). شیوع بیماری‌های باکتریایی با تنوع زیاد باعث مشکلات زیاد در صنعت آبی 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 آبی پروری کینولون است. اکسولینیک اسید کینولونی است که فعالیت ضد باکتریایی با طیف وسیع بخصوص در مقابل باکتری‌های گرم منفی دارد (لیانو و چانگ، ۱۹۹۲؛ گو و لیانو، ۱۹۹۴). آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید به‌علت مؤثر بودن بر علیه باکتری‌های گرم منفی به‌ویژه عفونت‌های آئروموناسی و گونه‌های ویبریو در بسیاری از کشورها در کنترل 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، ۱۹۹۶). 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 و دوز 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 ۴۰-۱۰ 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).

نحوه آماده‌سازی کپسول‌های ریز حاوی آنتی‌بیوتیک اکسولینیک اسید: برای تعیین مقدار محلول غنی‌سازی مورد نیاز، آب مقطر (به میزان ۴ میلی‌لیتر به ازای هر لیتر آب حاوی ۲۰۰۰۰۰۰ ناپلی آرتیمیای ارومیه برای دو مرحله عمل غنی‌سازی) برداشته و به نسبت ۱۰ درصد آن اسید چرب غیراشباع بلند زنجیره^۱ ۳۰/۴ (۰/۴ گرم در لیتر) (کیونگمین و همکاران، ۲۰۰۰) اضافه گردید. به مدت ۱۵ دقیقه با شیکر (مخلوط کن برقی) کاملاً بهم زده تا اسید چرب به صورت میکروگلوبول در آید. سپس به آن اکسولینیک اسید اضافه کرده و به مدت ۴۰ دقیقه با هموژنایزر بهم زده تا آنتی‌بیوتیک مزبور داخل میکروگلوبول‌های چربی رفته و اصطلاحاً کپسول‌های حاوی دارو ایجاد گردد. پس از تهیه محلول غنی‌سازی به آن گاز ازت اسپری و به داخل یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید.

مواد بیولوژیکی: سیست‌های *Artemia urmiana* دریاچه ارومیه که بوسیله مرکز تحقیقات آرتیمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه تهیه شده بود، در آب فیلتر شده با شوری ۳۵-۳۳ ppt، pH برابر ۸/۵-۸ تحت شرایط هوادهی مداوم از پایین زوک، دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری مناسب (۲۰۰۰ لوکس) بعد از ۲۴ ساعت تغریخ 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، ۱۹۸۶).

محیط غنی‌سازی: محیط غنی‌سازی شامل امولسیون اسیدهای چرب با ۳۰ درصد HUFA^۳ 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 آرتیمیا 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 آرتیمیا، ناپلی‌ها با اسید چرب HUFA و اکسولینیک اسید در دوزهای مختلف (۵۰w/w درصد و ۲۰ درصد، ۱۰ درصد، ۵ درصد) در دو نوبت t_0 و t_0+10 ساعت غنی‌سازی گردیدند. سپس در مرحله بعد برای انجام آزمایش ناپلی آرتیمیا در دو گروه با HUFA و اکسولینیک اسید (۲۰w/w درصد، ۱۰ درصد، ۵ درصد) و فقط با HUFA بدون اکسولینیک اسید در دو نوبت t_0 و t_0+10 ساعت غنی‌سازی شدند. هر تیمار شامل سه تکرار بود. ظرف‌ها به‌طور تصادفی در دمای آب 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد با نور و هوادهی ثابت قرارداد شدند. عمل غنی‌سازی آرتیمیا ۱۰ ساعت پس از تخم گشایی (زمان t_0) شروع و به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت (توراک 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 ۴۰ لیتری (حاوی ۲۵ لیتر آب) در دمای ۲۱-۱۹ درجه سانتی‌گراد تحت سیستم پرورشی جریان پیوسته باز (دبی آب ۰/۶ لیتر در دقیقه) مجهز به پمپ هواده در شرایط جدید نگهداری گردید. لاروهای ماهیان با وزن ۴۰۰-۳۰۰ 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 آرتیمیا و جانوران آبی دانشگاه ارومیه، جهت تعیین و سنجش میزان باقی ماندگی دارو و استخراج اکسولینیک اسید از بافت‌های

1-High Unsaturated Fatty Acid (HUFA)

ماهی و ناپلی‌های آرمیای 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 $pH=3$ هموژنیزه گردیدند. محلول هموژنیزه شده به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. این کار برای رسوب پروتئین‌ها و بافت‌های موجود در محلول می‌باشد. بعد از سانتریفوژ، فاز آبیکی 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 ۴۰۰۰ در دقیقه عمل سانتریفوژ تکرار شد. فاز آبیکی 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 پارافیلیم و در پیچ‌دار بسته و سر آن را محکم بسته، کاملاً هم زده و سپس اجازه دادیم تا رسوب کند، سپس با استفاده از پیت 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 دور ۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نمونه اصلی را از قسمت بالایی با پیت پاستور گرفته و در سرنگ ۱۰ سی‌سی با فیلتر ۰/۴۵ میکرون فیلتر گردید، در داخل ویال‌های کوچک ریخته و در آن پرچ شد (توراکی و همکاران، ۲۰۰۱).

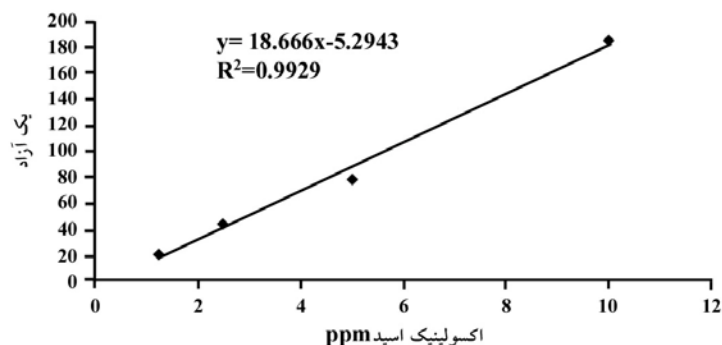
تجزیه شیمیایی نمونه‌های حاوی داروی اکسولینیک اسید:
جهت تجزیه شیمیایی و تعیین میزان باقی ماندگی دارو ۲۰ میکرولیتر از نمونه آماده شده به دستگاه HPLC تزریق گردید (چیر و همکاران، ۱۹۹۱؛ توراکی و همکاران، ۲۰۰۱ و ریگوز و همکاران، ۲۰۰۳). این روش حساسیت بالایی در بازیابی دارو و عوامل ضد باکتریایی دارد (یونو و 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 C18 و دکتور فراء بنفش UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر استفاده گردید.

دفع دارو از ناپلی: بعد از اتمام زمان غنی‌سازی با دارو (۲۴ ساعت= t) ناپلی‌ها پس از شستشو در زیر آب شیرملایم به ظروف حاوی آب تمیز و هوادهی مداوم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد (انکوباتور سرد) منتقل شدند. زمان‌های نمونه‌برداری t ، $t+24$ ، $t+12$ ، $t+8$ ، $t+4$ ، t ساعت صورت گرفت که مطابق با زمان غذادهی لاروهای ماهی یا به عبارت 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، ۱۹۹۶).

تجمع دارو در ماهی: ناپلی‌های حاوی اسیدهای چرب و دارو به مدت ۵ 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 $t+96$ ، $t+48$ ، $t+24$ ، $t+12$ ، 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 دوز اکسولینیک اسید تزریقی به دستگاه (HPLC) میزان پیک تشکیل یافته به‌صورت خطی افزایش یافت و این رابطه از ضریب همبستگی بسیار بالایی برخوردار ($r=0/996$) بود (شکل ۱).



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

نتایج

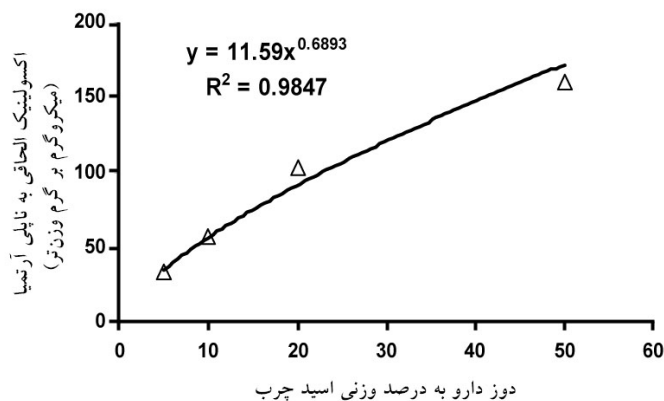
اثر غلظت یا دوز و مدت زمان غنی سازی ناپلی آرتمیا با اکسولینیک اسید: در بررسی اولیه غنی سازی ناپلی آرتمیا ارومیانا با استفاده از تجزیه شیمیایی HPLC، از دوزهای غنی سازی ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ درصد و اسید چرب (w/w) (معادل دوز ۱۰۰، ۴۰، ۲۰ و ۱۰ میلی گرم بر گرم وزن تر ناپلی در محیط غنی سازی) جهت اطمینان از تغذیه ناپلی ها از گلوبول های چربی حاوی آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید استفاده گردید (جدول ۱).

با توجه به جدول ۱ با افزایش غلظت یا دوز آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید در محیط غنی سازی میزان آنتی بیوتیک الحاقی به ناپلی آرتمیا افزایش یافت. با توجه به نسبت ۱۰ و ۴ و ۲ و ۱ دوز دارو میزان افزایش داروی

الحاقی به ناپلی آرتمیا به نسبت ۴/۷۷، ۳/۱، ۱/۷ و ۱ بود. میانگین داروی الحاقی به ناپلی آرتمیا با افزایش میزان دوز به طور معنی دار افزایش یافت. همچنین با افزایش مدت زمان غنی سازی از ۱۰ ساعت به ۲۴ ساعت میزان اکسولینیک اسید از ۶۳/۸ به ۱۰۲/۸۶ میکروگرم بر گرم وزن تر افزایش یافت که این افزایش معادل ۱/۶ برابر بود. غنی سازی ناپلی آرتمیا با غلظت ۱۰ درصد اکسولینیک اسید تقریباً برابر با غنی سازی آن با غلظت ۲۰ درصد اکسولینیک اسید با یکبار غنی سازی بوده و تفاوت معنی دار نداشت. دوز اکسولینیک اسید با میزان غنی سازی ناپلی آرتمیا از همبستگی بالا ($r=0/99$) و معنی داری ($P<0/05$) برخوردار بود (شکل ۲).

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

میکروگرم بر گرم وزن تر	دوز غنی سازی
۳۳/۵۱d	۵ درصد
۵۶/۷۲c	۱۰ درصد
۶۳/۸c	۲۰ درصد یکبار غنی سازی
۱۰۲/۸۶b	۲۰ درصد
۱۶۰a	۵۰ درصد



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

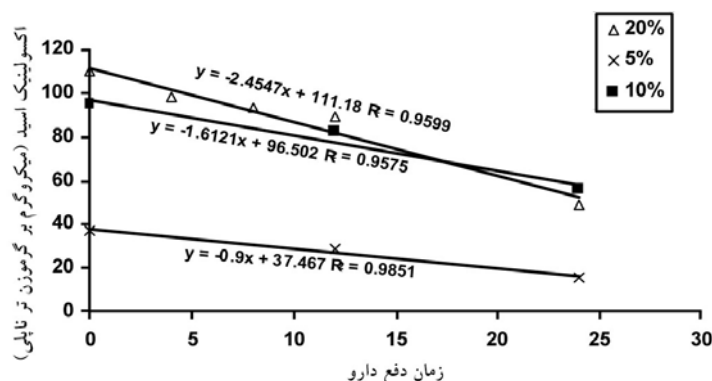
معادل ۴۱/۰۹ و ۵۸/۸۶ درصد نسبت به زمان صفر (زمان انتقال به انکوباتور که معادل پایان غنی سازی ۲۴ ساعت است) کاهش معنی داری نشان داد (جدول ۲). در دوز ۲۰ درصد میزان دفع در زمان های ۴، ۸، ۱۲، ۲۴ و ۵۸/۵۱، ۱۸/۴۸، ۱۴/۸۰ و ۱۰/۸۹ درصد کاهش نشان داد.

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

دفع اکسولینیک اسید از ناپلی آرتمیا بعد از ذخیره سازی در انکوباتور سرد: پس از پایان غنی سازی، غذاهای لاروهای ماهی با ناپلی های مربوطه صورت گرفت. جهت غذاهای در ساعات بعدی، ناپلی های غنی سازی شده به منظور کاهش متابولیسم ناپلی در انکوباتور ۴ درجه سانتی گراد مجهز به هواده نگهداری شد. زمان ذخیره سازی ناپلی ها مطابق با زمان غذاهای لاروهای ماهیان قره برون با ناپلی آرتمیا بود. میزان دفع دارو در ۱۲ ساعت اول در دوز ۱۰ و ۵ درصد وزنی اسید چرب غیر اشباع به ترتیب معادل ۱۳/۰۵ و ۲۳/۱۶ درصد و در ۲۴ ساعت به ترتیب

جدول ۲- میانگین اکسولینیک اسید موجود در ناپلی آرتمیا پس از ذخیره سازی در انکوباتور سرد ۴ درجه سانتی گراد.

زمان ذخیره سازی ناپلی آرتمیا	۵درصد	۱۰درصد	۲۰درصد
t ₀	۳۶/۷a	۹۴/۱۵a	۱۰۹/۳a
t ₀ + ۴	-	-	۹۷/۴bc
t ₀ + ۸	-	-	۹۳/۱۲c
t ₀ + ۱۲	۲۸/۲b	۸۱/۸۶b	۸۹/۱c
t ₀ + ۲۴	۱۵/۱c	۵۵/۴۶c	۴۸/۶۳d



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

به‌عنوان حامل آنتی‌بیوتیک اکسولینیک اسید می‌باشد. میزان داروی الحاقی به ناپلی در غنی‌سازی با دوز ۲۰ درصد در دو بار عمل غنی‌سازی تقریباً ۱/۶۱ برابر میزان داروی الحاقی در یکبار غنی‌سازی بود. غنی‌سازی با دوز ۵۰ درصد بخاطر رسوب سریع دارو در ته‌ظرف حاوی ماده غنی‌سازی که ناشی از زیاد بودن دارو می‌باشد به‌نظر می‌رسد چندان مناسب نیست (جدول ۱). به‌نظر می‌رسد الحاق دارو به ناپلی در ساعات اولیه غنی‌سازی بیشتر صورت می‌گیرد. در تحقیق یحیی‌زاده اثر مدت زمان غنی‌سازی و دوز دارو در میزان باقی ماندگی دارو معنی‌دار بود به‌طوری‌که بیشترین میزان باقی ماندگی دارو در ناپلی آرتمیآ در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در طی ۶ ساعت غنی‌سازی معادل ۳۸/۸۴۳ میکروگرم بر گرم وزن تر و در آرتمیآ بالغ نیز در دوز ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر طی ۶ ساعت غنی‌سازی معادل ۱۷۰/۲۲۷ میکروگرم بر گرم وزن تر بود (یحیی‌زاده، ۱۳۸۱).

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، ۴۳/۵۸، ۵/۷ درصد بود که در دوزهای ۲۰ و ۱۰ درصد این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود. در مدت زمان ۲۴ ساعت میزان دفع دارو به‌ترتیب معادل ۷۳/۰۱، ۸۸/۹۲ و ۸/۱۳ درصد و در ۴۸ ساعت میزان دفع دارو برابر با ۹۱/۵۸ درصد، ۱۰۰ درصد و ۱۰۰ درصد رسید. دفع دارو در ۹۶ 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 ناپلی آرتمیآ ارومیانا

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.	۲/۴۶a	۳/۹۷a	۶/۴۱a
t.+۱۲	۲/۳۲a	۲/۲۴b	۱/۸۹b
t.+۲۴	۲/۲۶a	./۴۴c	۱/۷۳b
t.+۴۸	.b	.d	./۵۴c
t.+۹۶			.d

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 ۲۴ 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 رگرسپون 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 ۲۴ ساعت اول کاهش غیر معنی‌داری در میزان داروی الحاقی به ماهی مشاهده گردید و در ۲۴ 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. بی‌اشتهایی 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، ۱۹۹۶). 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 در رسوبات خیلی پایدارند و بقایای قابل ردیابی ممکن است تا ۶ 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 ۲۴ ساعته غنی‌سازی می‌باشد.

منابع

۱. شعبان‌پور، ب.، ۱۳۷۷. تعیین ضرایب تبدیل دافنی و ناپلیوس آرتمیا در تغذیه لارو تاس ماهی ایرانی (قره‌برون). پایان‌نامه 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.

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, *Epinephelus coioides*, after single oral administration at 24°C. *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 aquaculture in Asia*. Tigbauan, Iloilo, 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. Declair & 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 sharpnout 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 aquaculture in Asia.1996*. Tigbauan, Iloilo, 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 chromatography*. 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.

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

R. Ghorbani¹, A. Hajimoradloo², N. Agh³, M. Soltani⁴, F. Noori⁵ and A. Irani⁶

¹Assistant Prof. Dept. of Fisheries Gorgan Univ. of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Associate Prof. Dept. of Fisheries Gorgan Univ. of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³Assistant Prof. of Artemia and Aquatic animal Research center Uremia Univ., ⁴Prof. of Faculty of veterinary of Tehran University, ⁵Instructor of Artemia and Aquatic animal Research center Uremia Univ., ⁶Expert 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 excretion in the nauplii of Artemia in the cold incubation (4°C) and fish larvae in the laboratory conditions (19-21°C) were studied. The correlation between drug excretion and time of nauplii storing in the cold incubation was significant. The oxolinic acid excretion 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 excretion 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 excretion 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 excretion 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; Excretion; Oxolinic acid