

## بررسی غنی سازی ناپلیوس آرتمیا اورمیانا با آنتی بیوتیک اکسولینیک اسید و تعیین میزان بازماندگی دارو در غلظت‌ها و زمانهای مختلف

میر یوسف یحیی‌زاده<sup>(۱)</sup>؛ سعید جوان<sup>(۲)</sup>\*؛ مهدی سلطانی<sup>(۳)</sup> و صابر شیرینی<sup>(۳)</sup>

saeed\_dvm2003@yahoo.com

۱ و ۴- مرکز تحقیقات آرتمیای کشور، اورمیه صندوق پستی: ۳۶۸

۲- مرکز ملی تحقیقات فرآوری آبزیان، بندر انزلی صندوق پستی: ۱۶۵۵-۴۳۱۴۵

۳- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران صندوق پستی: ۶۴۳۳-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۸۶

### چکیده

این تحقیق به منظور غنی سازی ناپلیوس آرتمیا اورمیانا (*Artemia urmiana*) با غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک اکسولینیک اسید و تعیین میزان تجمع دارو در بدن ناپلیوس در مدت زمانهای متفاوت تحت تاثیر، اجرا گردید. ناپلیوس‌های استحصالی از تخم‌گشایی سیستم‌های آرتمیای دریاچه اورمیه بطور جداگانه در شرایط آزمایشگاهی تحت تاثیر غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از داروی اکسولینیک اسید خالص (Oxolinic acid-sigma) مخلوط شده با امولسیون چربی در مدت زمانهای ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت قرار گرفتند. کلیه شرایط محیط کشت شامل شوری آب، pH، نور، هوادهی، غلظت دارو و مدت زمان غنی‌سازی برای تمام تیمارها یکسان بود و هر تیمار با سه تکرار اجرا گردید. هر یک از نمونه‌های غنی‌سازی شده بعد از انجام مراحل آماده‌سازی، با دستگاه HPLC مورد آنالیز قرار گرفتند. سپس داده‌ها با نرم‌افزار آماری SPSS و روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و تست دانکن مورد آنالیز قرار گرفتند. با توجه به نتایج بدست آمده و جدول آنالیز واریانس، اثر عوامل مدت زمان غنی‌سازی و غلظت دارو در میزان باقیماندگی دارو معنی‌دار بودند ( $P < 0.001$  و  $P < 0.05$ ). بیشترین میانگین میزان تجمع دارو از نظر غلظت دارویی در ناپلیوس آرتمیا در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر طی ۶ ساعت غنی‌سازی و به میزان  $14/38 \pm 38/843 \mu\text{g/g}\cdot\text{w}\cdot\text{w}$  و کمترین مقدار آن در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر طی ۸ ساعت و بمیزان  $0/422 \pm 2/583 \mu\text{g/g}\cdot\text{w}\cdot\text{w}$  بود.

لغات کلیدی: آرتمیا اورمیانا، *Artemia urmiana*، اکسولینیک اسید، آنتی بیوتیک

\* نویسنده مسئول

## مقدمه

روز عفونتهای همه گیر در پرورش متراکم ماهی و انواع سخت‌پوستان خصوصاً میگو، بکارگیری روشهای کنترلی و دارو درمانی را اجتناب‌ناپذیر می‌سازد. در این میان بیماریهای میکروبی عمدتاً در اثر باکتریهای گرم منفی بوجود می‌آیند (Trust, 1986). با این حال، روشهای معمول و رایج درمان و پیشگیری از بیماریهای عفونی، اغلب با افزودن غلظت نسبتاً بالای انواع مختلف آنتی بیوتیکها در آب پرورشی یا مخلوط با غذا انجام می‌گیرد که از معایب عمده این روش، دامنه محدود آن در استفاده بموقع و غلظت مناسب دارو توسط ماهی می‌باشد که علاوه بر عدم استعمال آن در درمان، هزینه‌های سنگین اتلاف دارو و تکرار درمان را بر پرورش‌دهنده تحمیل می‌کند (Samuelson et al., Leger & Sorgeloos, 1992). همچنین افزودن دارو به محیط، امکان ظهور مقاومت باکتریایی و مشکلات دیگری را نیز در بر دارد (Bjorkland et al., 1991). در شیوه پیشگیری و درمان بیماری، سلامتی انواع آبزیان خصوصاً لارو ماهی و میگو را بطور مستقیم از طریق خوراندن ترکیبات دارویی به موجود زنده و تغذیه آبزیان از آن موجود می‌توان تضمین نمود که موضوع فوق به واسطه روش غنی‌سازی به اثبات رسیده و یک روش مناسب و کنترل شده جهت رساندن دارو به انواع آبزیان و جلوگیری از بروز مشکلات مرتبط با درمانهای رایج است (Nelis ; Teuraki et al., 1999 ; Hanaee et al., 1995 ; et al., 1991).

غذاهای زنده از منابع مهم غذایی در پرورش لارو ماهیان دریایی و میگو می‌باشند. یکی از رایج‌ترین غذاهای زنده مورد استفاده در تغذیه و پرورش انواع سخت‌پوستان و ماهی، میگوی آب شور یا آرتمیا می‌باشد که ناپلیوس آن در پرورش مرحله لاروی انواع ماهی و سخت‌پوستان و توده زنده آرتمیا در مرحله بلوغ ماهی و میگو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sorgeloos et al., 1977).

در اکثر نقاط دنیا ارزش غذایی آرتمیا را با استفاده از روش غنی‌سازی با خوراندن ترکیبات و مواد انتخاب شده، تقویت می‌کنند (Leger & Sorgeloos, 1992). بطوریکه Mohny و Sorgeloos در سال ۱۹۹۰ با یک روش غنی‌سازی ابتکاری (تغذیه ناپلیوس آرتمیا با ترکیب دارویی غیر محلول در آب و استفاده از آن در تغذیه لارو میگو) از ناپلیوس آرتمیا بعنوان حامل دارو استفاده کردند که بتدریج موضوع غنی‌سازی آرتمیا با ترکیبات دارویی و استفاده از آن در کنترل و پیشگیری بیماریهای باکتریایی به اثبات رسید (Dhert & Sorgeloos, 1995 ; Verpraet et al., 1992 ;

## مواد و روش کار

جهت انجام عملیات غنی‌سازی ناپلیوس، سیست آرتمیا اورمیانا به میزان مورد نیاز از دریاچه ارومیه تهیه شد و مطابق با روش پیشنهادی Sorgeloos و همکاران در سال ۱۹۷۷ هیدراته و طبق روش Moats در سال ۱۹۸۶ تخم‌گشایی گردیدند. سیست‌ها به مدت یک ساعت در آب شیرین هوادهی شده و سپس برای برداشتن لایه خارجی سیست (کورپون)، سیست‌ها کپسول برداری شدند. به این ترتیب که سیست‌ها در محلول حاوی ۷۵ میلی‌لیتر هیپوکلریت ۴۰ درصد، ۱۷۵ میلی‌لیتر آب دریای صناعی (با شوری ۳۳ گرم در لیتر) و ۹ میلی‌لیتر هیدروکسید سدیم ۴۰ درصد بمدت ۱۵ دقیقه هوادهی شدند. بعد از کپسول‌زایی، سیست‌ها با تیوسولفات سدیم به منظور متوقف ساختن واکنشهای شیمیایی شسته شدند. سیست‌های آرتمیا بمیزان ۲ گرم در لیتر در محیط تفریح (دمای  $28 \pm 1$  درجه سانتیگراد، شوری  $35 \text{ppt}$  و  $\text{pH} = 7.5$ ) در ظروف مخروطی همراه با هوادهی و در حضور نور به مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند. بعد از تخم‌گشایی سیست‌ها، ناپلیوس اینستار یک (Instar I) جداسازی و با شستشو در آب شیرین از باقیمانده نخاله‌های مربوط به تفریح تفکیک گردیدند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از تخم‌گشایی که ناپلیوس‌ها شروع به تغذیه نمودند، با تراکم ۴۰۰ عدد ناپلیوس در هر میلی‌لیتر در لیوانهای شیشه‌ای مخروطی شکل با شوری ۷۵ گرم در لیتر و تحت دمای  $28 \pm 1$  درجه سانتیگراد و هوادهی و نور و با سه تکرار کشت داده شدند. آنتی بیوتیک انتخابی یعنی اکسولینیک اسید با امولسیون چربی مخلوط و با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر به هر یک از محیطهای کشت اضافه گردید (Hanaee et al., 1995). نمونه‌ها از هر یک از محیطهای کشت حاوی ناپلیوس آرتمیا و ماده

از چربی و کاروتنوئید جداسازی و بعد از فیلتر کردن جهت آنالیز و تعیین میزان باقیماندگی دارو به میزان ۲۰٪ به دستگاه HPLC با پمپ نوع K-1001 و دریچه تزریق مدل D-14163 تزریق شد. اندازه‌گیری pH تمام نمونه‌ها در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتیگراد و با دستگاه pH متر Hanna مدل HI 9218 و با الکتروود شیشه‌ای انجام گردید. برای جداسازی و آنالیز میزان باقیماندگی دارو در هر یک از نمونه‌ها از فاز متحرک حاوی ۳۰ درصد متانول و ۷۰ درصد آب و از ستون C18 و دکتور فرابنفش UV با طول موج ۲۵۴ نانومتر مدل V 7566 استفاده گردید (Nelis et al., 1991).

داده‌های حاصله از دستگاه HPLC وارد نرم افزار SPSS13 گردیده و از طریق آنالیز واریانس یکطرفه اختلاف بین گروهها (غنی‌سازی با غلظتها و زمانهای مختلف) تعیین گردید. میزان Significance در حد  $(P < 0.001)$  و  $(P < 0.05)$  انتخاب شده بودند. اختلاف بین تیمارها و همگونی واریانس بترتیب با آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و دانکن مورد مطالعه قرار گرفتند.

## نتایج

نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌ها و میزان باقیماندگی دارو در ناپلیوس آرتمیای دریاچه اورمیه بعد از غنی‌سازی با غلظتهای ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اکسولینیک اسید در مدت زمانهای ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت بشرح جدول ۱ و نمودار ۱ می‌باشد.

غنی‌سازی بترتیب بعد از مدت زمانهای ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت جمع‌آوری و جهت حذف محلول روغن و دارو از سطح بدن ناپلیوس، در الک ۱۰۰ میکرون کاملاً شستشو داده شدند. بعد از آگیری هر نمونه، مقدار ۰/۵ گرم در ترازوی دیجیتالی وزن گردید و به پلت‌های دربدار شیشه‌ای استریل منتقل و جهت آنالیز در دمای ۲۰ - درجه سانتیگراد ذخیره شدند.

جهت تعیین و سنجش میزان باقیماندگی دارو و استخراج اکسولینیک اسید از بافت ناپلیوسهای غنی‌سازی شده، ۰/۵ گرم از نمونه‌های تهیه شده از هر تیمار را در هاون استریل له کرده، سپس در ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH = ۳) هموژنیزه گردیدند. محلول هموژنیزه شده در لوله‌های سانتریفوژ وارد و بمدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰ (rpm) سانتریفوژ (مدل Hettich-D-7200) شد. این عمل جهت حذف پروتئینها و بافتهای موجود در محلول انجام شد. بعد از سانتریفوژ، لایه آبی بوجود آمده به یک لوله منتقل شده و روی فاز رسوبی باقیمانده مجدداً ۳ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات اضافه کرده و به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۴۰۰۰، عمل سانتریفوژ تکرار و فاز آبی همانند مرحله اول جدا و به لوله قبلی منتقل و رسوب موجود حذف شد. جهت حذف چربی‌ها و کاروتنوئیدها، ۶ میلی‌لیتر از محلول آبی بدست آمده را در یک لوله ریخته و ۵ میلی‌لیتر ماده شیمیایی n هگزان به آن اضافه و سانتریفوژ گردید. بعد از سانتریفوژ لایه آبی توسط پی پت پاستور از لایه چربی که کاملاً مشخص بود، جدا شد. به محلول آبی جدا شده مجدداً ۵ میلی‌لیتر n هگزان اضافه و عمل - می‌باشد. بهم زدن و سانتریفوژ کردن تکرار و محلول آبی کاملاً شفاف و عاری

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار میزان باقیماندگی اکسولینیک اسید در ناپلیوس آرتمیا اورمیا

میزان باقیماندگی اکسولینیک اسید در ناپلیوس آرتمیا ( $\mu\text{g/g/w. w}$ )				مدت زمان غنی‌سازی (ساعت)
۸	۶	۴	۲	
				غلظت داروی مصرفی (میلی‌گرم در لیتر)
$1/120 \pm 0/0425^c$	$28/823 \pm 14/379^{b-}$	$9/980 \pm 2/91^{ab}$	$18/53 \pm 5/351^{ab}$	۱۰۰
$2/583 \pm 0/422^a$	$15/057 \pm 13/406^{ab}$	$10/223 \pm 1/73^{ab}$	$21/43 \pm 13/58^{ab}$	۷۵
$6/337 \pm 2/989^{ab}$	$3/173 \pm 0/291^a$	$8/847 \pm 2/649^{ab}$	$32/383 \pm 15/7^b$	۵۰
$7/047 \pm 4/177^{ab}$	$5/180 \pm 2/56^{ab}$	$4/00 \pm 1/246^{ab}$	$4/683 \pm 2/342^a$	۲۵

در هر ستون مقادیری که با حروف مشابه مشخص شده‌اند اختلاف معنی‌دار ندارند.

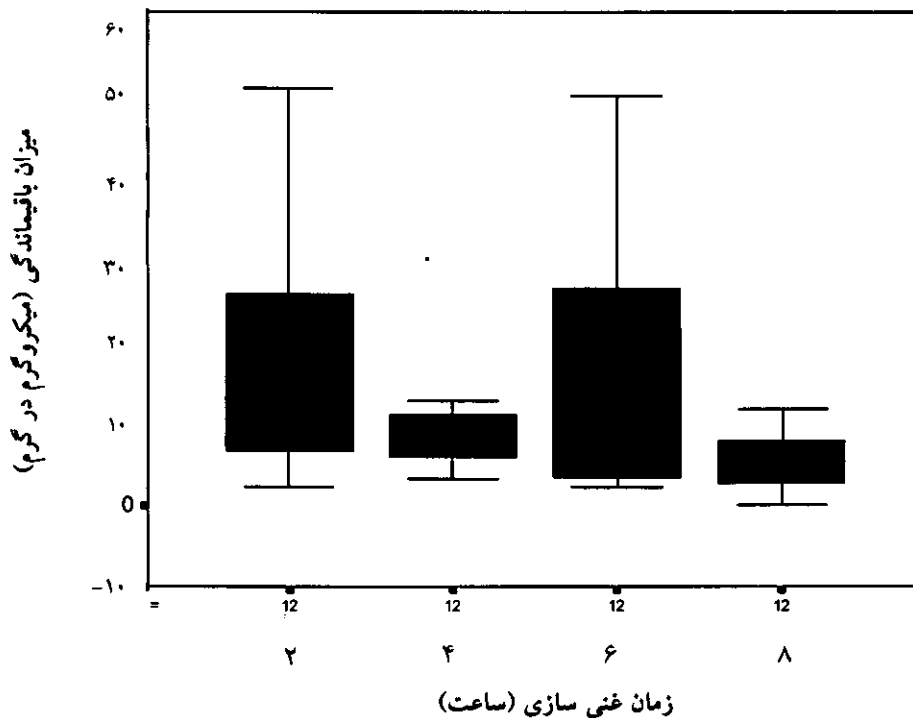
مطابق جداول آنالیز واریانس، اثر مدت زمان غنی سازی در میزان باقیماندگی دارو در ناپلیوس کاملاً معنی دار بود ( $P < 0.05$ ) (جدول ۲ و ۳).  
( $P < 0.001$ ) و اثر غلظت دارو نیز معنی دار بوده است

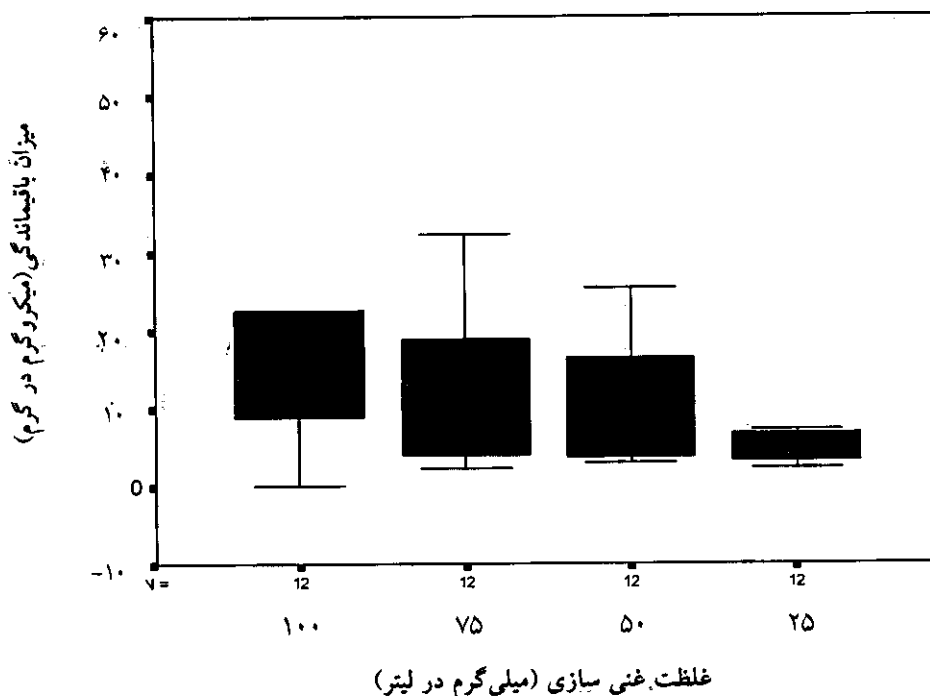
جدول ۲: آنالیز واریانس اثر زمان در میزان باقیماندگی دارو در ناپلیوس

میزان معنی دار بودن	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	
۰/۰۳۳	۴۱۶/۳۹۵	۳	۱۲۴۹/۱۸۵	بین گروهها
	۱۳۱/۰۳۲	۴۳	۵۶۴۳/۳۸۶	داخل گروهها
		۴۶	۶۸۸۳/۵۷۱	کل

جدول ۳: آنالیز واریانس اثر غلظت در میزان باقیماندگی دارو در ناپلیوس

میزان معنی دار بودن	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	
۰/۰۰۰	۲۸۴۴۳/۱۴۰	۳	۸۵۳۲۹/۴۱۹	بین گروهها
	۳۸۹۱/۲۸۴	۴۴	۱۷۱۲۱۶/۵۱۲	داخل گروهها
		۴۷	۲۵۶۵۴۵/۹۳۲	کل





نمودار ۱: باقیماندگی اکسولینیک اسید در بدن ناپلیوس آرتمیا در غلظتها و مدت زمانهای مختلف غنی سازی

## بحث

سایز موجودات زنده از جمله روتیفر و نماتود بررسی و به اثبات رسیده است (Dixon et al., Mohny & Sorgeloos, 1990; Verpraet et al., 1992; 1995a).

Mohny و Sorgeloos در سال ۱۹۹۰ غنی سازی ناپلیوس آرتمیا فرانسیسکانا (*Artemia franciscana*) با ترکیب غیر محلول در آب Romet-30 را به روش ابتکاری و تجربی بررسی نموده و میزان جذب دارو توسط ناپلیوس را ۰/۱ میکروگرم بر ناپلیوس آرتمیا با غلظت ۳ میلی گرم در لیتر در مدت زمان ۴ ساعت غنی سازی برآورد کرده اند.

در غنی سازی ناپلیوس آرتمیا فرانسیسکانا و روتیفر (*Brachionus plicatilis*) با غلظتهای ۱، ۵ و ۱۰ درصد از داروهای سولفامتاکسازول SMX و تری متوپریم TMP استفاده گردید که میزان کل داروی جذب شده (باقیمانده در بدن ناپلیوس و روتیفر) با غلظت ۱۰ درصد در مدت زمان ۲۴ ساعت غنی سازی در ناپلیوس و آرتمیا نسبت به روتیفر در مدت زمان ۶ ساعت غنی سازی بیشتر می باشد (Verpraet et al., 1992).

آرتمیا بعنوان یک موجود زنده غذایی بطور وسیع و در اشکال متفاوت در تغذیه مرحله لاروی و بلوغ انواع ماهیان آب شیرین، دریایی و میگو مورد استفاده قرار می گیرد (Sorgeloos et al., 1977) و حسینی قطره، (۱۳۷۶). علاوه بر ویژگیها و ارزش غذایی آن، یکی از صفات اختصاصی و اصلی آرتمیا بعنوان حامل بیولوژیک مناسب، انتقال مواد ضروری، ترکیبات دارویی، واکسینها و هورمونها می باشد که با استفاده از روش غنی سازی علاوه بر نیل به اهداف مورد نظر از لحاظ اقتصادی و کاهش ضررهای زیست محیطی بطور موفقیت آمیز مورد توجه و بکار برده می شود (Lavens et al., 1995).

غنی سازی آرتمیا و ناپلیوس با هر یک از ترکیبات دارویی ضد باکتریایی واکسینها و هورمونها و استفاده از آن در تغذیه انواع آبزیان بمنظور درمان و کنترل بیماریهای عفونی باکتریایی در چند مورد توسط محققین مختلف مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته و اثر بخشی روش غنی سازی در میزان باقیماندگی دارو، مدت زمان غنی سازی، داروی مورد استفاده و انتقال دارو بواسطه تغذیه ماهی و میگو از آرتمیا و ناپلیوس و در مواردی با

تست حساسیت آنتی بیوتیکی گونه های باکتری آئروموناس هیدروفیلا و آئروموناس سوبریا را بررسی نمودند.

تغذیه لارو ماهیان سی باس و قزل آلا از آرتیمیای غنی سازی شده با غلظت های ۲۰ و ۴۰ درصد سولفامتاکسازول+ تری متوپریم و ان استیل سولفامتوکسازول اهمیت و ارزش انتقال دارو بوسیله موجودات زنده غذایی به ماهی و میگو را بیان می کند. همچنین نتایج مطالعات Nelis و همکاران (1991) و Gapasin و همکاران (1996) را در ارتباط با غنی سازی آرتیمیا با غلظت های ۲۰ و ۴۰ درصد SMX+TMP در مدت ۶ و ۲۴ ساعت و تغذیه ماهی *(Dicentrarchus labrax)* اروپایی و میزان جذب دارو در بدن ماهی را تایید می کند (Chair et al., 1996).

مطالعات مختلف نشان داده اند که رساندن خوراکی ترکیبات ضد باکتریایی، واکسنها و هورمونها بواسطه روش غنی سازی موجودات زنده غذایی بویژه آرتیمیا و ناپلیوس به راحتی انجام شده و روند دارو درمانی را تسهیل می نماید (Chair et al. 1996; Sorgeoos et al., 1999; Teuraki et al., 1999; Choo et al., 1995; al., 2001).

نتایج حاصل از این تحقیق نیز که با هدف تعیین میزان بازماندگی داروی اکسولینیک اسید در ناپلیوس آرتیمیا ارومیانبا اجرا گردید نشان می دهد که میزان باقیماندگی دارو در ناپلیوس آرتیمیا با استفاده از غلظت های مختلف و مدت زمانهای متفاوت از دامنه صفر تا ۵۰ میکروگرم بر گرم وزن تر در ناپلیوس می باشد. با توجه به جدول آنالیز واریانس و میزان باقیماندگی های بدست آمده اثر غلظت دارو و مدت زمان غنی سازی در میزان باقیماندگی دارو کاملاً معنی دار بوده است. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده می توان با انجام تحقیقات لازم مبنی بر تعیین میزان داروی اکسولینیک اسید مورد نیاز بر علیه عفونتهای باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی و کاربردی و همچنین تعیین میزان ذخیره دارو در بدن ماهی و میگو متعاقب استفاده از آرتیمیا یا ناپلیوس غنی سازی شده وضعیت درمان و کنترل بیماری را با استفاده از روش غنی سازی بر مبنای نتایج بدست آمده بهبود بخشید.

میزان باقیماندگی دارو در آرتیمیا و ناپلیوس علاوه بر مدت زمان حمام دارویی و غلظت دارو می تواند به نوع ترکیب دارویی و متابولسیم جانور، تراکم و عوامل متعددی از جمله گونه، شرایط تخم گشایی و مراحل غنی سازی بستگی داشته و البته این عوامل در مورد گونه های متفاوت و در مطالعات انجام گرفته به حد کافی

در مطالعه دیگری غنی سازی ناپلیوس آرتیمیا فرانسیسکانا و نماتود (*Panagrellus redivivus*) با غلظت ۳ میلی گرم در میلی لیتر از داروی Romet-30 (۲/۵ میلی گرم در میلی لیتر سولفا متوکسازول و ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر اورمتوپریم) و با استفاده از سبوس برنج طی ۴ ساعت غنی سازی بررسی شده و میزان باقیماندگی دارو در ناپلیوس آرتیمیا  $0.1 \mu\text{g}/\text{nauplii}$  و در نماتود  $0.25 \mu\text{g}/\text{nematode}$  بدست آمده است (Leone et al., 1990).

Dhart و Sorgeoos در سال ۱۹۹۵ و Chair و همکاران در سال ۱۹۹۶ استفاده از آرتیمیای غنی سازی شده با سولفانامیدها در تغذیه لارو ماهیان سی باس و قزل آلا موثر بودن انتقال دارو به روش خوراکی بعد از چهار ساعت تغذیه لارو ماهیان یاد شده از ناپلیوس آرتیمیای غنی سازی شده را علیه *V. angillarum* نشان دادند.

Aguilar-Aguila و همکاران در سال ۱۹۹۴ با استفاده از غلظت های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر از داروی Romet-30 ناپلیوس آرتیمیا فرانسیسکانا را در مدت زمانهای ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت غنی سازی نموده و با استفاده از روش آنتی بیوگرام علیه یک گونه ویبریو پاتوزن، میزان و غلظت باقیماندگی دارو در ناپلیوس را در محدوده ای از صفر تا ۹ میکروگرم در BSN برآورد کرده و اعلام نمودند که میزان جذب و باقیماندگی دارو در بدن ناپلیوس آرتیمیا وابسته به مقدار دارو و مدت زمان غنی سازی می باشد.

Dixon و همکاران (1995a) غنی سازی ناپلیوس آرتیمیا فرانسیسکانا با غلظتهایی از ۰.۱، ۵، ۱۵، ۲۰ و ۴۰ درصد از داروی سارافلوکساسین (*Savafloxacin*) در مدت زمانهای ۲ تا ۲۴ ساعت را بررسی کردند و با استفاده از روش تست حساسیت آنتی بیوتیکی و آغشته نمودن محیطهای کشت به عصاره ناپلیوس غنی سازی شده با غلظتهای یاد شده علیه سه گونه ویبریوپاتوزن آنگوئیلا روم و یک گونه *V. vulnificus*، مشخص نمودند که غلظت ۱۵ درصد دارو در مدت ۶ ساعت غنی سازی علیه هر چهار گونه ویبریوموثر می باشد ولی بقیه غلظت ها و حتی مدت زمانهای ۲ و ۴ ساعت غنی سازی موثر نیست. همچنین اعلام داشتند که مدت زمانهای طولانی (۲۴ ساعت) غنی سازی هم نمی تواند اندازه منطقه مهارکننده رشد باکتری را افزایش دهد. همچنین غنی سازی آرتیمیای بالغ را با Romet-30 و ترامایسین با تراکم ۵۰۰۰ آرتیمیا در لیتر به مدت ۲ ساعت با

- Aguilar-Aguila, A. ; Tejada Mansir, A. and Ruiz Manriques, A. , 1994.** Using Brine shrimp as a drug carrier for therapeutic application in aquaculture. *Aqua cultural Engineering*. Vol. 13, pp.301-309.
- Bjorkland, H.V. ; Raberg, C.M.I and Bland, G. , 1991.** Residues of Oxolinic acid and Oxytetracycline in f fish and sediments from fish farms. *Aquaculture*. Vol. 97, pp.85-96.
- Chair, M. ; Nelis, H.J. ; Leger, P. ; Sorgeloos, P. and De leenheer, A.P. , 1996.** Accumulation of Trimethoprim, sulfamethoxazole, and n-acetylsul famethoxazole in fish and shrimp fed medicated *Artemia franciscana*. *Antibacterial Agents and Chemotherapy*. Vol. 40, No.7, pp.1649- 1652.
- Choo, P.S. , 1995.** Withdrawal time for oxytetracycline in Red tilapia cultured in freshwater. *Asia Fisheries Science*. Vol. 8, pp.169-176.
- Dehert, Ph. and Sorgeloos, P. , 1995.** Live feeds in aquaculture. *In: (eds. K.P.P. Nambiar and T. Singh). Aquaculture towards the 21<sup>st</sup> century. Proceeding Info fish- Aquatech 94 Conference. Colombo, Srilanka, August 29-31, 1994. Info fish, Kuala Lumpur, Malsia. 287P:*
- Dixon, B.A. ; Van poucke, S.O. ; Kawahigashi, D. ; Chair,-M. ; Dehasque, M. ; Nelis, H.J. ; Sorgeloos, P. and De leenheer, A.P. , 1995a.** Bioencapsulation of antibacterial drugs in nauplii and adult Brine Shrimp, *Artemia franciscana*. *In: (eds. P. Lavens; E. Jaspers and I. Roelants). Larvi 65- fish and shellfish larviculture symposium. European Aquaculture*

مورد بررسی قرار نگرفته است. بطوریکه غلظت ۱۵ درصد سارافلوکساسین در مدت ۶ ساعت غنی‌سازی علیه گونه‌های ویبریو در مدت زمانهای ۲، ۴ و ۲۴ ساعت غنی‌سازی تاثیری نداشته است. هیچ یک از غلظت‌های SMX+TMP علیه گونه‌های ویبریو تحت شرایط مشابه غنی‌سازی با سارافلوکساسین موثر نبوده است (Dixon *et al.*, 1995b). در نهایت به رغم اینکه روش غنی‌سازی روش مناسبی برای رساندن ترکیبات ضد باکتریایی در درمان و کنترل بیماریهای عفونی در انواع آبزیان است، ولی این موضوع در آرتمیای اورمیانا با توجه به تفاوت گونه‌ای با سایر گونه‌های شناخته شده و نیز تاثیر عوامل متعدد و روشهای مختلف غنی‌سازی در میزان باقیماندگی دارو مورد مطالعه و بررسی قرار نگرفته است. لذا استفاده کاربردی و موفق‌آمیز مستلزم تعیین غلظتهای ترکیبات دارویی مختلف با رعایت و توجه به بروز مقاومت باکتریایی آنتی بیوتیکها بوده و در این راستا تحقیق در موضوعات زیر ضروری است:

- تاثیر تکنیکهای مختلف غنی سازی در میزان باقیماندگی دارو در بدن آرتمیای اورمیانا
- غنی‌سازی آرتمیای اورمیانا با ترکیبات مختلف آنتی بیوتیک و مقایسه میزان باقیماندگی هر یک از داروها با توجه به تفاوت سنتتیکنی داروها؛
- تحقیق در مورد میزان انتقال ترکیبات دارویی به بدن ماهی و میگو متعاقب تغذیه از آرتمیای اورمیانا و ناپلیوس غنی‌سازی شده جهت دستیابی به غلظت موثر در درمان بیماری؛
- تعیین غلظت مهارکنندگی دارو بر علیه عفونتهای باکتریایی با روش غنی‌سازی آرتمیای اورمیانا و ناپلیوس با غلظتها و ترکیبات مختلف آنتی بیوتیک.

## منابع

حسینی قطره، س.ح.، ۱۳۷۶. بررسی ارزش غذایی آرتمیای دریاچه اورمییه با تاکید بر ارزیابی میزان پروتئین، چربی و ترکیب اسیدهای چرب آن در مراحل مختلف رشد. پایان نامه دکترای دامپزشکی شماره ۲۴۱، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ارومیه: ۲۰۱ صفحه.

- Society, Special Publication, No. 24, Gent, Belgium. pp.508-510.
- Dixon, B.A. ; Van poucke, S.O. ; Chair, M. ; Dehasque, M. ; Nelis, H.J. ; Sorgeloos, P. and Deleenheer, A.P. , 1995b.** Bioencapsulation of the antibacterial drug sarafloxacin in nauplii of the brine shrimp *Artemia franciscana*. Journal of Aquatic Animal Health. Vol. 7, pp.42-45.
- Gapasin, R.S.J. ; Nelis, H.J. ; Chair, M. ; Sorgeloos, P. , 1996.** Drug assimilation in the tissue of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fry delivered orally through bioencapsulation. Journal of Appl. Ichthyol. Vol. 12, pp.39-42.
- Hanaee, J.A. ; Agh, N. ; Hanaee, M. ; Delazar, A. and Sarker, S.D. , 1995.** Studies on the enrichment of *Artemia urmiana* cysts for improving fish food value. Animal Feed Science and Technology. Vol. 54, pp.95-105.
- Lavens, P. ; Sorgeloos, P. ; Dhert, P. and Devresse, B. , 1995.** Larval foods. In: (eds. N.R. Bromage and R.J. Roberts) Broodstock management and egg and larval quality. 424P.
- Leger, Ph. and Sorgeloos, P. , 1992.** Optimized feeding regimes in shrimp hatcheries. In: (eds. A.W. Fast and L.J. Lester), Marine shrimp culture: Principles and practices. Elsevier Science Publishers. pp.225-244.
- Leone, L. ; Mohney, D.V. ; Lightner R.R. and Williams, S. , 1990.** Bioencapsulation of therapeutic quantities of the antibacterial Romet-30 in nauplii of the Brine shrimp *Artemia* and in the Nematode *panagrellus redivivus*. Journal of the World Aquaculture Society. Vol. 21, No. 3, pp.54-63.
- Moats, W.A. , 1986.** Determination of tetracycline Antibiotics in tissues and blood serum of cattle and swine by HPLC. Journal of Chromatography. Elsevier Science Publishers. Vol. 385, pp.253-259.
- Mohney, A. and Sorgeloos, P. , 1990.** Bioencapsulation of Romet-30 using adult Brine shrimp, *Artemia franciscana*. Journal of Fish Disease. Vol. 43, Issue II, pp.101-105.
- Nelis, H.J. ; Leger, F. ; Sorgeloos, P. and Deleenheer, A.P. , 1991.** Liquid chromatographic determination of efficacy of incorporation of trimetoprim and sulfa metoxazole in brine shrimp (*Artemia spp.*) Used for prophylactic chemotherapy of fish. Antimicrob. Agents and Chemother. Vol. 35, No. 12, pp.2485-2489.
- Salmuelsen, O.B. ; Hjeltnes, B. and Torkildsen, L. , 1999.** Efficacy of orally administered oxolinic acid and Vetoquinol, an oxolinic acid ester, for the treatment of furunculosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*) held in seawater. Inter research – Diseases of Aquatic Organisms (DAO). Vol. 37, No. 1, pp.53- 59.
- Sorgeloos, P. ; Dhert, P. and Candreva, P. , 2001.** Use of the brine shrimp, *Artemia spp.*, in marine fish larviculture. Aquaculture. Vol. 200, pp.159-177.
- Sorgeloos, P. ; Bossuyt, E. ; Lavina, E. ; Baeza Mesa, M. And Persoone, G. , 1977.** Decapsulation of *Artemia* cysts: A simple technique for the improvement of the use of brine shrimp in aquaculture. Aquaculture. Vol. 12, pp.311-315.
- Teuraki, M. ; Niopas, I. and Kastritsis, G. , 1999.** Bioencapsulation of trimethoprim, sulfa-



methoxazole in *Artemia nauplii* and residual kinetics in sea bass larvae after repeated oral dosing of medicated nauplii. *Aquaculture*. Vol. 175, pp.15-30.

**Trust, T.J. , 1986.** Pathogenesis of infectious disease of fish. *Annu. Rev. Microbiol.* Vol. 40, pp.479-502.

**Verpraet, R.; Chair, M.; Leger, Ph.; 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*. *Aquacultural Engineering*. Vol. 11, pp.133-139.

**Survey on enrichment of *Artemia urmiana* nauplii with  
Oxolinic Acid and determination of its accumulation rate  
in different dosages and times**

**Yahyazadeh M.Y.<sup>(1)</sup>; Javan S.<sup>(2)\*</sup>; Soltani M.<sup>(3)</sup> and Shiri S.<sup>(4)</sup>**

Saeed\_dvm2003@yahoo.com

1,4- Iranian Artemia Research Center, P.O.Box: 368 Urmia, Iran

2- National Fish Processing Research Center, P.O.Box: 43145-1655 Bandar Anzali, Iran

3- Veterinary Faculty of Tehran University, P.O.Box: 6433-14155 Tehran, Iran

Received: October 2006

Accepted: September 2007

**Keywords:** *Artemia urmiana*, Oxolinic Acid, Antibacterial drug

### ***Abstract***

The nauplii of *Artemia urmiana* was enriched with oxolinic acid and the accumulation rate of this antibacterial drug in different times and dosages was determined. The nauplii which were hatched out of cysts from Urmia Lake's *Artemia* were incubated in the antibiotic / seawater suspension with dosages of 25, 50, 75 and 100mg/l of Oxolinic Acid, in intervals of 2, 4, 6 and 8 hours. All factors including salinity, pH, aeration, dosage and enrichment time were kept the same for all treatments. Each treatment was repeated three times. After enrichment, the concentration of Oxolinic Acid per sample was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). One way ANOVA and Duncan's tests were implemented to analyze the data. The results showed that the effect of enrichment time and dosage on the oxolinic acid residue in the nauplii of *Artemia* were significant ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.001$ ). The maximum amount of accumulation rate in nauplii was found in a dosage rate of 100 mg/l during 6 hours of enrichment ( $38.84 \pm 14.38 \mu\text{g}\backslash\text{gr}\backslash\text{w.w}$ ) and the minimum amount was found in a dosage rate of 75mg/l during 8 hours of enrichment ( $2.583 \pm 0.422 \mu\text{g}\backslash\text{gr}\backslash\text{w.w}$ ).

---

\* Corresponding author