معرفی آنتی‌بیوتیک پرمصرف (فلورفنیکل، انروفلوکساسین یا داکسی‌سایکلین) با کمترین اثر سوء بر شاخص‌های رشد، زنده‌مانی و خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

کاوه وکیلی[۱]، بهنام سلیمی[۲*]، منصوره غلامی[۳]

[۱] گروه شیلات، واحد علوم و تحقیقات کردستان، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

[۲] گروه علوم درمانگاهی دامپزشکی، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

[۳] گروه شیلات، واحد سنندج، دانشگاه آزاد اسلامی، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۱/۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۳

چکیده

مطالعه حاضر با هدف بررسی اثرات آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین بر شاخص‌های رشد، درصد زنده‌مانی و خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت. بدین منظور ۷۲۰ قطعه بچه‌ماهی با میانگین وزنی ۵/۵±۲۷/۲ گرم در قالب ۴ تیمار آزمایشی شامل تیمار ۱: گروه شاهد، تیمار ۲: خوراک حاوی دز موثر آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل، تیمار ۳: خوراک حاوی دز موثر آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین و تیمار ۴: خوراک حاوی دز موثر آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین، به‌مدت ۴۰ روز تغذیه شدند. در پایان دوره آزمایش، شاخص‌های وزن نهایی (W_T)، نرخ رشد ویژه (SGR)، ضریب رشد روزانه (DGR)، کارآیی خوراک (FER)، ضریب تبدیل خوراک (FCR) و درصد زنده‌مانی (SP) محاسبه شدند. همچنین شاخص‌های خونی (WBC، RBC، Hb، %Htc، MCV، MCH، MCHC، لنفوسیت، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل) مورد سنجش قرار گرفتند. بر اساس نتایج به‌دست آمده، شاخص‌های رشد و درصد زنده‌مانی تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین قرار گرفتند و کاهش یافتند ($p<۰/۰۵$). به‌طوری که وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، ضریب رشد روزانه، کارآیی خوراک، ضریب تبدیل خوراک و درصد زنده‌مانی ماهیان گروه شاهد در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بودند ($p<۰/۰۵$). البته کاهش این شاخص‌ها در ماهیان تغذیه شده با فلورفنیکل بیشتر از ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک‌های انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین بود ($p<۰/۰۵$). از شاخص‌های خونی، تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و لنفوسیت تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها افزایش یافتند ($p<۰/۰۵$). در مقایسه شاخص‌های تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، درصد هماتوکریت (%Htc)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، مونوسیت، نوتروفیل و ائوزینوفیل اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$). در نهایت نتیجه‌گیری شد که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات سوء بر شاخص‌های رشد، زنده‌مانی و خون‌شناسی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان دارند. اما در این بین فلورفنیکل بیشترین و انروفلوکساسین کمترین تاثیر منفی را بر این شاخص‌ها داشتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، استفاده از انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین در هنگام بروز بیماری و تجویز آنتی‌بیوتیک توسط دامپزشک، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فلورفنیکل، انروفلوکساسین، داکسی‌سایکسیلین، شاخص‌های رشد، زنده‌مانی، خون‌شناسی، قزل‌آلای رنگین‌کمان.

*نویسنده مسئول: bnmsalimi@gmail.com

مقدمه

افزایش جمعیت جهانی و نیاز به تولید بیشتر، منجر به پرورش ماهیان در سیستم‌های متراکم شده است. در شرایط متراکم سرایت عوامل بیماری‌زا از یک ماهی به ماهی دیگر آسان‌تر صورت می‌گیرد و از طرفی تراکم خود یکی از عوامل استرس‌زا برای ماهیان می‌باشد، و همین امر همانند سایر عوامل استرس‌زا باعث افزایش احتمال ابتلای ماهی به بیماری می‌شود. لذا در چنین شرایطی خطر بروز و گسترش انواع بیماری‌های آبزیان رو به افزایش بوده و نیاز به روش‌های درمانی موثر می‌باشد (Tirado و همکاران، ۲۰۱۰).

به‌کارگیری روش‌های کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها نظیر امنیت زیستی، واکسیناسیون، استفاده از پروبیوتیک‌ها و مدیریت استرس راه‌کارهایی کلیدی در مدیریت بهداشتی یک مزرعه پرورش ماهی هستند. علیرغم توسعه این روش‌ها، مواقعی که تلفات شدید ناشی از مواجهه با بیماری عفونی رخ می‌دهد، درمان آنتی‌بیوتیکی به منظور کنترل وضعیت اجتناب‌ناپذیر است و به‌عنوان آخرین راهبرد ضرورت می‌یابد (FAO، ۲۰۱۲). به‌طور کلی از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبزیان به‌منظور پیشگیری از بروز بیماری‌ها و نقش درمانی استفاده می‌شود. جهت استفاده درمانی، تشخیص عامل بیماری نخستین و اساسی‌ترین گام است و پس از تأیید اثربخشی یک عامل ضدمیکروبی در آزمایشگاه، می‌توان در مزرعه از آن بهره گرفت (Matthews و همکاران، ۲۰۱۳). اگرچه به‌دلیل خسارت‌های سنگین و شکست‌های اقتصادی در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ناشی از عفونت‌های باکتریایی، آنتی‌بیوتیک‌های مختلف از سوی پرورش‌دهندگان به‌کار گرفته می‌شود (Safaeian و همکاران، ۲۰۱۴؛ Shahrani و همکاران، ۲۰۱۴). آنتی‌بیوتیک‌هایی که امروزه در صنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده می‌شود محدود بوده، و سه نوع آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین، داکسی سایکلین و فلورفنیکل بیشترین مصرف را دارند (Chopra و Reberts، ۲۰۰۱).

فلورفنیکل نسل سوم کلرومایستین، یکی از مشتقات کلرامفنیکل و در واقع آنالوگ ترکیب شده با فلور تیامفنیکل بوده که به‌عنوان یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های اختصاصی وسیع‌الطیف در کلینیک های دام‌پزشکی شناخته می‌شود (Pourmolaie و همکاران، ۲۰۱۵). بر اساس گزارش سازمان غذا و دارو ایالات متحده (US.FDA) در سال ۲۰۱۴، در ارتباط با داروهای مورد تأیید این سازمان به‌منظور به‌کارگیری آن‌ها در آبزی‌پروری، آکوافلور با دوز خوراکی ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در یک دوره ده روزه متوالی، برای تمام ماهیان آب شیرین پرورشی بیمار مجاز دانسته شده و به ویژه بر استفاده از آن برای کنترل عفونت‌هایی نظیر کولومواریس، فرونکولوزیس و بیماری باکتریایی کلیه تأکید شده است (Shahrani و همکاران، ۲۰۱۴).

مکانیسم فعالیت انروفلوکساسین به‌صورت باکتری‌کشی است و نقش در ممانعت از آنزیم DNAgyrase دیواره سلولی باکتری‌ها که در تکثیر DNA نقش دارند، می‌باشد (Dulopnt، ۱۹۸۹). از انروفلوکساسین به‌دلیل حداقل غلظت‌های ممانعتی نسبتا پایین برای حساس‌ترین پاتوژن‌های ماهیان و انتشار موثر آن‌ها در بدن، به‌صورت خوراکی و به شکل گسترده‌ای در درمان عفونت‌های باکتریایی عمومی ماهیان استفاده می‌شود (O'Grady، ۱۹۸۸).

داکسی‌سایکلین آنتی‌بیوتیکی وسیع‌الطیف با اثر باکتریواستات است که با اتصال به تحت واحد S30

ریبوزمومی مانع از سنتز پروتئین باکتریایی می‌شود. داکسی‌سیکلین با مکانیسم فوق بر روی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها مانند استافیلوکوک‌ها، استرپتوکوک‌ها، کلستریدیوم و باکتری‌های گرم منفی مانند ای‌کولای، سالمونلا، پاستورلا، هموفیلوس و همچنین بر روی مایکوپلاسماها، کلامیدیاها، ریکتزیاها و اسپیروکت‌ها موثر است (Pourmolaie و همکاران، ۲۰۱۵). این آنتی‌بیوتیک برای درمان ویبریوز آب سرد، بیماری دهان قرمز روده‌ای، فلاووباکتریوز، فورونکولوز و استرپتوکوکوزیس در انواع ماهیان پرورشی تجویز می‌شود. داکسی سایکیلین معمولا با دز ۱۵ تا ۷۵ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت مخلوط با خوراک به مدت ۷ تا ۱۰ روز تجویز می‌شود (Shahrani و همکاران، ۲۰۱۴).

با توجه به گسترش روز افزون صنعت آبزی‌پروری و مصرف آنتی بیوتیک‌ها، که بیشتر ناشی از عدم رعایت شرایط استاندارد بهداشتی و پرورشی توسط پرورش‌دهنده‌ها می باشد، بررسی تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان یک موضوع مهم جلوه می‌کند. برخی مطالعات پیشین در این خصوص، نشان‌دهنده اثرات مخرب مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها بر فیزیولوژی آبزیان است. به‌طوری که کاهش رشد، اختلال در غدد درون ریز و اختلال در تکامل جنینی آبزیان در اثر مصرف برخی آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده است (Naghdi و همکاران، ۲۰۱۸؛ Pomati و همکاران، ۲۰۰۶؛ Dalecka و همکاران، ۲۰۲۱). نتایج مطالعه Oliveria و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که مصرف آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین منجر به کاهش رشد، هچ زودرس لاروها و ناهنجاری‌های ریخت‌شناسی در ماهی زبرا (*Danio rerio*) شد. همچنین در پژوهشی که توسط شریفی و همکاران (۱۴۰۲) انجام گرفت، مشخص شد که آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین بر برخی شاخص‌های فیزیولوژی میگوی پاسفید غربی (*Penaeus vannamei*) اثر سوء دارد. لذا مطالعه حاضر با هدف معرفی آنتی‌بیوتیک پرمصرفی (انروفلوکساسین، داکسی‌سایکیلین یا فلورفنیکل) که کمترین اثر سوء بر شاخص‌های رشد، زنده‌مانی و خون‌شناسی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) دارد، طراحی و اجرا شد. با توجه به اینکه در هنگام بروز بیماری هموستاز ماهی کاملا تحت تاثیر قرار گرفته و بیشتر انرژی صرف مقابله با بیماری می‌شود. بنابراین نمی‌توان اثرات داروها در زمان بروز بیماری را بر روی شاخص‌های فیزیولوژیک ماهیان را به‌عنوان یک متغییر مستقل بررسی نمود، و بهتر است در ماهیان سالم که سایر فاکتورها هم تحت کنترل بوده و در حد استاندارد می‌باشد، بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و شرایط انجام آزمایش: این پژوهش در یکی از کارگاه‌های خصوصی پرورش ماهی در استان کردستان با تعداد ۷۲۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۲/۵±۲۷/۵ گرم انجام گرفت. ماهی‌ها پس از گذراندن دو هفته دوره سازگاری، با تراکم ۶۰ قطعه به‌صورت تصادفی در مخازن بتنی ۳۰۰ لیتری در قالب ۴ تیمار و ۳ تکرار ذخیره شدند. منبع تامین آب جهت پرورش بچه‌ماهیان آب چشمه با دبی ۰/۵ لیتر در ثانیه برای کل مخازن و با میانگین دمایی ۰/۵± ۱۳ درجه سانتی‌گراد بود. به‌منظور تغذیه ماهیان از خوراک کارخانه مازندران استفاده شد (جدول ۱). در ادامه آنتی‌بیوتیک‌ها با دزهای مشخص و موثره جهت تنظیم و تهیه جیره‌های غذایی آزمایشی (جدول ۲) بر روی جیره‌های غذایی به‌صورت اسپری افزوده شد (Matthews و همکاران، ۲۰۱۳). در این مطالعه از فلورفنیکل ۱۰ درصد شرکت

کیمیا، انروفلوکساسین ۱۰ درصد شرکت شیمی آفاق و داکسی‌سایکیلین ۱۰ درصد شرکت دارویی دام ایران استفاده شد. غذادهی روزانه ماهیان به‌صورت ۳ درصد وزن بدن و در سه نوبت انجام و مقدار مصرف غذای روزانه برحسب گرم یادداشت شد. نحوه غذادهی در این مطالعه بدین صورت بود، که ماهیان به‌مدت ۱۰ روز از غذای حاوی آنتی‌بیوتیک (طول دوره مصرف آنتی‌بیوتیک) و در ادامه به‌مدت ۱۰ روز با غذای بدون آنتی‌بیوتیک تغذیه شدند. این روند غذادهی دوره‌ای (۱۰ روز با خوراک حاوی آنتی‌بیوتیک و ۱۰ روز با خوراک بدون آنتی‌بیوتیک) تا ۴۰ روز تکرار شد (Hung و همکاران، ۲۰۰۸).

جدول ۱- آنالیز تقریبی خوراک FFT2 مازندران

شاخص	پروتئین خام	چربی خام	خاکستر	رطوبت
درصد	۴۲/۲	۱۸/۱	۱۰>	۱۱>

جدول ۲- تیمارهای آزمایشی

تیمار	نوع آنتی‌بیوتیک	دز استفاده (mg/kg وزن بدن)
۱	شاهد	۰
۲	فلورفنیکل	۱۰
۳	انروفلوکساسین	۱۰
۴	داکسی‌سایکیلین	۷۰

محاسبه شاخص‌های رشد و درصد زنده‌مانی: ماهیان در پایان دوره پرورش جهت بررسی تغییرات شاخص‌های رشد و درصد زنده‌مانی زیست‌سنجی و شمارش شدند. با استفاده از داده‌های مربوط به وزن اولیه، وزن نهایی و مقدار غذای خورده شده، شاخص‌های نرخ رشد ویژه (SGR: Specific Growth Rate)، ضریب رشد روزانه (DGR: Daily Growth Ratio)، کارآیی خوراک (FER: Feed Efficiency Ratio) و ضریب تبدیل غذا (FCR: Food Conversion Ratio) و بر اساس تعداد اولیه و نهایی ماهیان، شاخص درصد زنده‌مانی (SP: Survival Percentage) براساس روابط زیر محاسبه شدند (Hamza *et al*., 2008).

۱۰۰× ((روز) طول دوره پرورش/ (لگاریتم طبیعی وزن اولیه – لگاریتم طبیعی وزن نهایی))=
(SGR) نرخ رشد ویژه

طول دوره پرورش به روز/ (وزن اولیه– وزن نهایی) =
(DGR) ضریب رشد روزانه

(گرم) مقدار افزایش وزن/ (گرم) مقدار غذای خشک مصرف شده = (FER) کارآیی خوراک

(گرم) مقدار غذای خشک داده شده/ (گرم) مقدار افزایش وزن = (FCR) ضریب تبدیل غذایی

۱۰۰× (تعداد اولیه ماهیان/ تعداد نهایی ماهیان)=
(SP) درصد زنده‌مانی

سنجش شاخص‌های خون‌شناسی: در پایان دوره آزمایشی و پس از بیهوشی ماهیان بامحلول پودر گل میخک با غلظت ppm ۲۵۰ با استفاده از سرنگ آغشته به هپارین از ساقه دمی خون‌گیری به‌عمل آمد (Akhlaghi و Borojerdi Mirab، ۱۹۹۷). سپس خون‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ سی‌سی انتقال داده شده و در دمای یخچال نگهداری شدند. تعداد گلبول‌های قرمز (RBC) با استفاده از محلول هایم و توسط ملانژور به روش توصیه شده توسط Lewes و همکاران (۲۰۰۶)، مقدار هموگلوبین (Hb) از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین و بر اساس روش Blaxhall و Daisley در سال ۱۹۷۳، و میزان درصد هماتوکریت (Htc%) نیز با استفاده از میکروهماتوکریت و به روش توصیه شده توسط Rehulka در سال ۲۰۰۰ به‌دست آمد. همچنین متوسط حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) بر اساس روش توصیه شده توسط

Lewes و همکاران (۲۰۰۶) بر اساس روابط زیر محاسبه شدند:

تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون / (هماتوکریت ×۱۰) = (MCV) متوسط حجم گلبول‌های قرمز

تعداد گلبول‌های قرمز بر حسب میلیون /(هموگلوبین ×۱۰) = (MCH) متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز

هماتوکریت / (هموگلوبین ×۱۰) = (MCHC) متوسط غلظت هموگلوبین سلولی

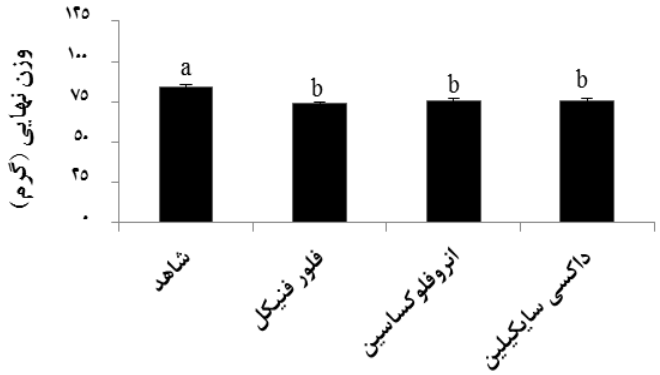
همچنین شمارش گلبول‌های سفید به کمک ملانژور و لام نئوبار انجام گرفت. و در نهایت پس از مراحل رنگ‌آمیزی توسط گیمسا تعداد هر یک از سلول‌ها در شمارش افتراقی گلبول‌های سفید (نوتروفیل، مونوسیت، لنفوسیت و ائوزینوفیل) به صورت جداگانه محاسبه شد (Lewes و همکاران، ۲۰۰۶).

آنالیز آماری

پژوهش حاضر به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نرمال بودن داده‌ها و همچنین همگنی واریانس‌ها به‌ترتیب با استفاده از آزمون‌های کولموگروف- اسمیرنوف و لون بررسی شد. برای آنالیز داده‌ها از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و با توجه به نرمال بودن داده‌ها برای مقایسه میانگین تیمارهای مختلف از آزمون توکی استفاده و نتایج به‌صورت میانگین± انحراف معیار ارائه گردیدند. حداقل سطح معنی‌دار بودن آزمون‌ها، ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. برای انجام آنالیزهای آماری از نرم افزار SPSS و برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

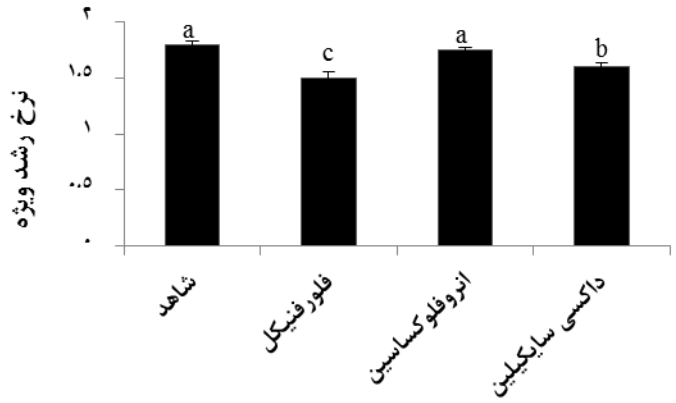
شاخص‌های رشد و زنده‌مانی: نتایج شاخص‌های رشد در شکل‌های ۱ تا ۶ آورده شده است. بر اساس این نتایج شاخص وزن نهایی (W_T)، در ماهیان گروه شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود ($p<0/05$). به‌طوری‌که بیشترین و کمترین وزن نهایی به‌ترتیب در ماهیان گروه شاهد و تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل مشاهده شد ($p<0/05$).



شکل ۱- تغییرات شاخص وزن نهایی (W_T) در تیمارهای مختلف پرورشی

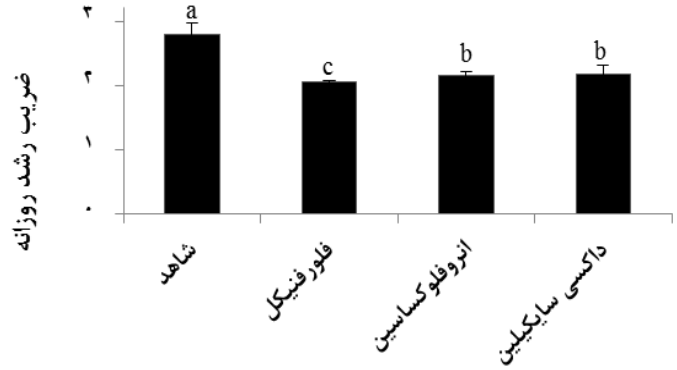
شاخص نرخ رشد ویژه (SGR) در ماهیان گروه شاهد و تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک انروفلوکساسین با تیمارهای تغذیه شده با فلورفنیکل و داکسی‌سایکلین اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$). همچنین بین تیمار فلورفنیکل و داکسی‌سایکلین نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p<0/05$). بیشترین نرخ رشد ویژه در ماهیان گروه شاهد و کمترین آن در ماهیان

تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل دیده شد (p<۰/۰۵).



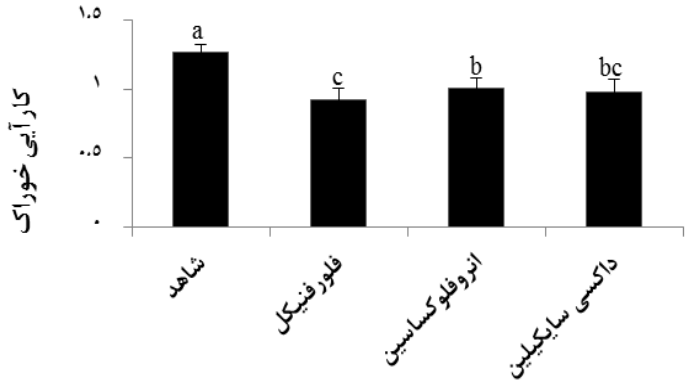
شکل ۲- تغییرات شاخص نرخ رشد ویژه (SGR) در تیمارهای مختلف پرورشی

شاخص ضریب رشد روزانه (DGR) ماهیان گروه شاهد در مقایسه با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). همچنین بین تیمارهای فلورفنیکل با انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). بیشترین و کمترین ضریب رشد روزانه به ترتیب در ماهیان گروه شاهد و ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل به ثبت رسید (p<۰/۰۵).



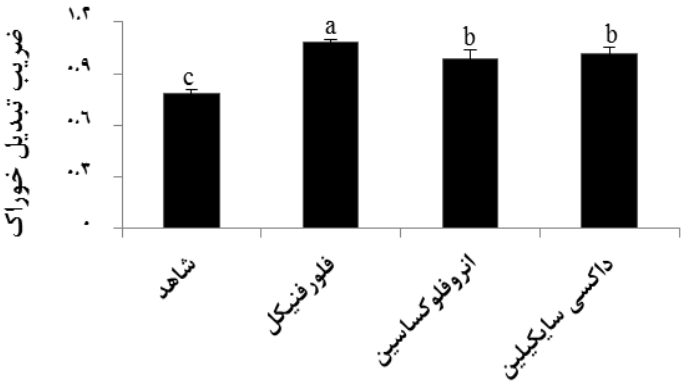
شکل ۳- تغییرات شاخص ضریب رشد روزانه (DGR) در تیمارهای مختلف پرورشی

کارآیی خوراک (FER) نیز در ماهیان گروه شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). همچنین بین تیمارهای فلورفنیکل با انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). بیشترین کارآیی خوراک در تیمار شاهد و کمترین آن در ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل مشاهده شد (p<۰/۰۵).



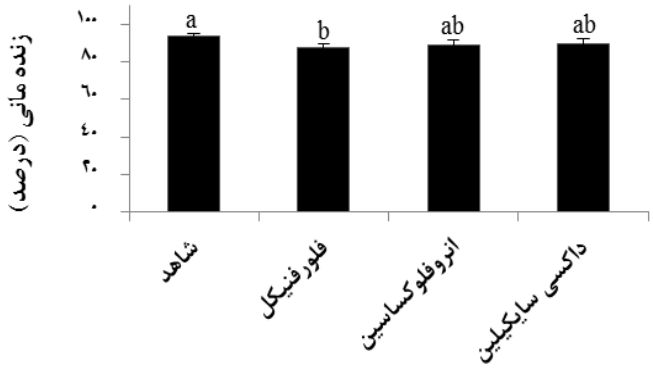
شکل ۴- تغییرات شاخص کارآیی خوراک (FER) در تیمارهای مختلف پرورشی

همچنین ضریب تبدیل خوراک (FCR) نیز در ماهیان گروه شاهد با سایر تیمارهای آزمایشی دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). همچنین بین تیمارهای فلورفنیکل با انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵). کمترین و بیشترین ضریب تبدیل خوراک به ترتیب در گروه شاهد و تیمار فلورفنیکل به ثبت رسید (p<۰/۰۵).



شکل ۵- تغییرات شاخص ضریب تبدیل خوراک (FCR) در تیمارهای مختلف پرورشی

شاخص درصد زنده‌مانی (SP) در ماهیان گروه شاهد با ماهیان تغذیه شده با فلورفنیکل دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). بین سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). بیشترین زنده‌مانی در تیمار شاهد و کمترین آن در تیمار فلورفنیکل دیده شد (p<۰/۰۵).



شکل ۶-تغییرات شاخص درصد زنده‌مانی (SP) در تیمارهای مختلف پرورشی

شاخص‌های خون‌شناسی: نتایج آزمون مقایسه میانگین‌های مربوط به شاخص‌های خون‌شناسی (جدول ۳) نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید (WBC) و لنفوسیت در ماهیان گروه شاهد با تمامی تیمارهای آزمایشی (ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین) اختلاف معنی‌داری داشت ($p\leq ۰/۰۵$). همچنین این شاخص‌ها در ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل و انروفلوکساسین دارای اختلاف معنی‌داری با ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین داشتند ($p\leq ۰/۰۵$). این نتایج نشان داد که شاخص‌های تعداد گلبول‌های قرمز (RBC)، هموگلوبین (Hb)، درصد هماتوکریت (%Htc)، حجم متوسط گلبولی (MCV)، هموگلوبین متوسط گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبولی (MCHC)، نوتروفیل، مونوسیت و ائوزینوفیل تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین قرار نگرفتند ($p>۰/۰۵$).

جدول ۳- مقایسه شاخص‌های خون‌شناسی برای تیمارهای مختلف پرورشی، (Mean ± SE, n=3)

شاخص	شاهد	فلورفنیکل	انروفلوکساسین	داکسی‌سایکلین
WBC ($10^3 \times mm^3$)	۱۰/۰±۹/۵^a	۱۳/۰±۱/۴^b	۱۳/۰±۱/۱^b	۱۳/۰±۹/۲^c
RBC ($10^6 \times mm^3$)	۶/۰±۵۸/۰۳	۶/۰±۴۲/۰۳	۶/۰±۷۹/۰۳	۶/۰±۸۵/۰۲
Hb (g/dL)	۸/۰±۲/۱۶	۸/۰±۱/۱۴	۸/۰±۲/۱۳	۰±۸/۱۷
Htc (%)	۲۴/۰±۵/۷	۲۳/۰±۵/۹	۲۴/۰±۳/۹	۲۴/۰±۶/۶
MCV (fL)	۱±۲۷۸/۱۵	۲۷۶/۲±۳/۰۳	۲±۲۷۳/۰۸	۰±۲۷۶/۵۸
MCH (Pg)	۵۵/۰±۴/۰۶	۵۵/۰±۶/۰۹	۵۶/۰±۳/۴۷	۵۶/۰±۲/۴۳
MCHC (g/dL)	۱۹/۰±۹/۱	۲۰/۰±۱/۱	۱۹/۰±۶/۳	۱۹/۰±۶/۱
نوتروفیل (%)	۱۵/۰±۵/۶	۰±۱۶/۶	۱۵/۱±۷/۲	۰±۱۶/۶
لنفوسیت (%)	۶۶/۰±۸/۳^c	۷۶/۰±۳/۳^b	۸۸/۱±۶/۲^a	۸۹/۰±۲/۷^a
مونوسیت (%)	۰±۵/۶	۳/۰±۷/۳	۴/۰±۷/۳	۵/۰±۳/۳
ائوزینوفیل (%)	۰/۰±۳/۳	۰/۰±۷/۳	۰/۰±۷/۷	۰/۰±۳/۳

بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری به‌منظور پیشگیری از بروز بیماری‌ها ضرورت دارد (FAO، ۲۰۱۲). تغذیه ماهیان با آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی علاوه بر نقش درمانی و کنترل عفونت‌های باکتریایی، می‌تواند فیزیولوژی ماهیان را نیز تحت تاثیر قرار دهد (Matthews و همکاران، ۲۰۱۳). بدین منظور بایستی آنتی‌بیوتیکی انتخاب شود که علاوه بر کنترل موثر و سریع بیماری‌ها، اثرات سوء کمتری نیز بر فیزیولوژی ماهیان داشته باشد (Chopra و Roberts، ۲۰۰۱).

در تحقیق حاضر، شاخص‌های مرتبط با رشد و زنده‌مانی تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی قرار گرفتند. به‌طوریکه ضریب تبدیل خوراک در همه گروه‌های تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک افزایش یافت. شاخص‌های وزن نهایی، نرخ رشد ویژه، ضریب رشد روزانه، کارآیی خوراک و درصد زنده‌مانی نیز در ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک‌ها (فلورفنیکل، انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین) در مقایسه با گروه شاهد کاهش یافت. البته بر اساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر مشخص شد که اثرات سوء آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل بر شاخص‌های رشد و زنده‌مانی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین بیشتر بود. بررسی نتایج مربوط به شاخص‌های خون‌شناسی نیز نشان داد که تعداد گلبول‌های سفید و لنفوسیت تحت تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های فلورفنیکل، انروفلوکساسین و داکسی‌سایکلین قرار گرفته و در مقایسه با گروه شاهد افزایش یافتند. البته در سایر شاخص‌های خون‌شناسی تغییرات معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج مطالعات انجام گرفته در خصوص اثرات آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشان‌دهنده تغییرات فیزیولوژی ماهیان بود، که با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارند. اثر بر ریخت‌شناسی، تغییرات ژنتیکی و کاهش درصد زنده‌مانی ماهیان توسط Hartwig و Schwerdtle در سال ۲۰۰۲ گزارش شد. در مطالعات Li و همکاران (۲۰۱۲) و Sole و همکاران (۲۰۱۰)، تغییراتی در شاخص‌های فیزیولوژیکی ماهی کاراس طلایی (*Carassius auratus*) گزارش شد. نتایج این مطالعات نشان‌دهنده کاهش رشد، تغییرات در شاخص‌های خون‌شناسی، سیستم ایمنی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی بود. نتایج بررسی مصرف آنتی‌بیوتیک آموکسی‌سیلین در ماهی زبرا (*Danio rerio*)، کاهش رشد این ماهیان را نشان داد (Oliveria و همکاران، ۲۰۱۳). در مطالعه Botelho و همکاران (۲۰۱۵)، شاخص‌های درصد بقاء، رشد و تولید مثلی ماهیان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تغذیه شده با خوراک حاوی آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و فلورفنیکل تحت تاثیر قرار گرفتند. همچنین تغییرات ژنتیکی و فعالیت آنزیم‌های استرسی (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون پراکسیداز) ماهی کاراس معمولی (*Carassius carassius*) نیز توسط Dar و همکاران (۲۰۱۵) گزارش شد. تغییرات همئوستازی بدن و اثر بر متابولیسم انرژی از عوامل به تاخیر افتادن رشد ماهیان تغذیه شده با آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی عنوان شده است (Sole و همکاران، ۲۰۱۲؛ Li و همکاران، ۲۰۰۲). همچنین از دلایل اصلی کاهش شاخص‌های مرتبط با رشد، تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر کاهش فلور باکتریایی و طبیعی روده (پروبیوتیک‌ها) می‌باشد. مشخص شده است که پروبیوتیک‌ها موجب بهبود عملکرد تغذیه به دلیل هضم و جذب بهینه کربوهیدرات و پروتئین‌ها به‌واسطه تولید ویتامین‌ها، دفع آلاینده‌های خوراک و شکستن ترکیبات غیرقابل هضم خوراک شده و در نهایت بر رشد ماهیان اثر مثبت می‌گذارند (Abdelhamid و همکاران، ۲۰۰۹).

سنجش شاخص‌های خونی از مهم‌ترین بررسی‌های سلامت فیزیولوژیکی ماهیان می‌باشد که مرتبط با نوع تغذیه، گونه ماهی و عوامل محیطی می‌باشد (Fanouraki و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش این شاخص‌ها در ماهیان تغذیه شده با انواع مختلفی از افزودنی‌های خوراک مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، توسط محققان متعددی گزارش شده است (Van der Oost و همکاران, ۲۰۰۳؛ Campbell و همکاران، ۲۰۰۵؛ Davis و همکاران، ۲۰۰۸). برخی منابع نیز افزایش این شاخص‌ها را تاثیر افزودنی‌های خوراک بر مکانیسم اریتروپویزیس (آزاد شدن اریتروسیت‌ها از بافت‌های خون‌ساز) و کاهش حجم پلاسما عنوان کردند (Yildirim-Aksoy و همکاران، ۲۰۰۸).

به‌طور کلی می‌توان چنین بیان نمود که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اثرات سوء بر شاخص‌های رشد، زنده‌مانی و خون‌شناسی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان دارند. اما در این بین فلورفنیکل بیشترین و انروفلوکساسین کمترین تاثیر منفی را بر این شاخص‌ها داشتند. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه، استفاده از انروفلوکساسین و داکسی‌سایکیلین در هنگام بروز بیماری و تجویز آنتی‌بیوتیک توسط دام‌پزشک، در مقایسه با آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل پیشنهاد می‌گردد.

منابع

Abdelhamid, A.M., Mehrim, A.I., El.barbary, M.I., Ibrahim, S.M., Abd Elwahab, A.I., 2009. Evaluation of a new Egyptian probiotic by African catfish fingerlings. Journal of Environmental. Science and Technology 3, 133-145.

Akhlaghi, M., Mirab Brojerdi, M., 1997. Investigating the effect of anesthetizing clove in fish and determining its LC50. Journal of Veterinary Research 54(2), 49-52.

Blaxhall, P.C., and Daisley, K. W., 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology, (5): 771-781.

Botelho, R.G., Christofoletti, C.A., Correia, J.E., Ansoar, Y., Olinda, R.A. and Tornisielo, V.L., 2015. Genotoxic responses of juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to florfenicol and oxytetracycline. Chemosphere 132, 206–212.

Campbell, H.A., Handy, R.D., Sims, D.W., 2005. Shifts in a fish's resource holding power during a contactpaired interaction: the influence of a copper contaminated diet in rainbow trout. Physiological and Biochemical Zoology 78, 706-714.

Chopra, I., Roberts, M., 2001. Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews 65, 232–260.

Dalecka, B., Strods, M., Cacivkins, P., Ziverte, E., Rajarao, G.K., Juhna, T., 2021. Removal of pharmaceutical compounds from municipal wastewater by bioaugmentation with fungi: an emerging strategy using fluidized bed pelleted bioreactor. Environmental Advances 5, 100086.

Dar, S.A., Yousuf, A.R., Balkhi, M.U., Ganai, F.A., Bhat, F.A., 2015. Assessment of endosulfan induced genotoxicity and mutagenicity manifested by oxidative stress pathways in freshwater cyprinid fish crucian carp (*Carassius carassius* L.). Chemosphere 120, 273–283.

Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecology 22(5), 760- 772.

Dulopnt, H.L., 1989. Quinolone antibacterial agents in the management of bacterial enteric infections. In: Wolfson, J.S., Hooper, D.C. (Editors), Quinolone Antibacterial Agents. American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 5-34.

Fanouraki, B.P., Divanach, M., Pavlidis, M., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red progy (*Pargrus pagrus*). Aquaculture 265, 294-304.

FAO., 2012. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. 2 nd ed. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 547. Edited by: Bondad-Reantaso MG, Arthur RA, Subasinghe RP. Rome, Pp: 25-90.

Hartwig, A., Schwerdtle, T., 2002. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. Toxicology Letters 127, 47–54.

Lewis, S., Bain, B., Bates, I., 2006. Dacie and Lewis Practical Hematology. Tenth Edition. Philadelphia, PA. Churchill Livingstone, Elsevier, 722p.

Li, Z., Lu, G., Yang, X., Wang, C., 2012. Single and combined effects of selected pharmaceuticals at sublethal concentrations on multiple biomarkers in *Carassius auratus*. Ecotoxicology 21, 353–361.

Matthews, M.D., James, D., Bowker, J.D., Carty, D.J., Wandelear, N., Bowman, M.P., 2013. Efficacy of Aquaflor (50% Florfenicol)– Medicated Feed to Control Mortality Associated with *Flavobacterium columnare* Infection in Florida Largemouth Bass and Bluegill. Nourth American Journal of Aquaculture 75, 385-392.

Naghdi, M., Taheran, M., Brar, SK., KermanshahiPour, A., Verma, M., Surampalli, R.Y., 2018. Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. Environmental Pollution 234, 190-213.

O'Grady, P., Moloney, M., Smith, P.R., 1988. Bath administration of the quinolone antibiotic flumequine to brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmon salar*). Disease of Aquatic Organisms 4, 27-33.

Oliveira, R., McDonough, S., Ladewig, J.C., Soares, A.M., Nogueira, A.J., Domingues, I., 2013. Effects of oxytetracycline and amoxicillin on development and biomarkers activities of zebrafish (*Danio rerio*). Environmental toxicology and Pharmacology 36(3), 903-912.

Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., 2006. Effects of a complex mixture of therapeutic drugs at environmental levels on human embryonic cells. Environmental Science & Technology 40(7), 2442-2447.

Pourmolaie, B., Eshraghi, H.R., Haghighi, M., Mortazavi, S.A., Sharif Rohani, M., 2015. Pharmacokinetics of florfenicol administrated to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by oral gavages and medicated feed routes. Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Science 4(4), 14-17.

Rehulka, J., 2000. Influence of astaxanthin on growth rate, condition and some blood indices of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 190, 27-47.

Safaeian, S., Moghaddam, Z., Hosseiny, H., Esmaili, A., 2014. Antibiotic resistance in isolated negative gram bacteria from intestinal organ of Anzali wetland wild common carp. Journal of Environmental Science and Technology 15(4), 65-74.

Shahrani, M., Raissy, M., Tajbakhsh, E., 2014. Study of frequency and antimicrobial resistance of Lactococcus garvieae in rainbow trout fish in Chaharmahal va Bakhtiari Province. Biological Journal of Microorganism 3(11), 71-78.

Sharifi, A., Deliri, M., Niromand, M., Sobhani, S.A., Sharifinia, M., 1402. Effects of long-term exposure to amoxicillin antibiotic residues on stress resistance and body biochemical compositions of western Pacific shrimp. Journal of Health and Environment 16(1), 85-96.

Sole, M., Shaw, J.P., Frickers, P.E., Readman, J.W., Hutchinson, T.H., 2010. Effects on feeding rate and biomarker responses of marine mussels experimentally exposed to propranolol and acetaminophen. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396, 649-656.

Tirado, M.C., Clarke, R., Jaykus, L.A., McQuatters-Gollop, A., Frank, J.M., 2010. Climate change and food safety: A review. Food Research International 43, 1745– 1765.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review, Environ. Toxicology and Applied Pharmacology, 13, 57-149.

Yildirim-Aksoy, M., Lim, C., Li, M.H., Klesius, P.H., 2008. Interaction between dietary levels of vitamins C and E on growth and immune responses in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). Aquaculture Research 39(11), 1198-1209.

Journal of New Technologies in Aquaculture Development
Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Vol. 17, No. 2, Summer 2023

Introduction of widely used antibiotic (florfenicol, enrofloxacin or doxycycline) with the least adverse effect on growth, survival and hematology indices of rainbow trout fingerlings (*Oncorhynchus mykiss*)

K. Vakili[1], B. Salimi[2]*, M. Gholami[3]

[1] Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Kurdistan Science and Research Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[2] Department of Veterinary Clinical Sciences, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[3] Department of Fisheries, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

Abstract

The present study was carried out with aim of the investigating the effects of florfenicol, enrofloxacin, and doxycycline antibiotics on growth and survival indices, and hematology of rainbow trout fingerlings. For this purpose, 720 rainbow trout fingerlings with an average weight of 27.5±2.5 g were fed in 4 treatments including, treatment 1: control, treatment 2: diet with florfenicol antibiotic, treatment 3: diet with enrofloxacin and treatment 4: diet with doxycycline for 40 days. At the end of the test period, the indices of Weight Total (W_T), Specific Growth Rate (SGR), Daily Growth Rate (DGR), Feed Efficiency (FER), Feed Conversion Ratio (FCR) and Survival Percentage (SP) were calculated. Also, hematological parameters (WBC, RBC, Hb, Htc %, MCV, MCH, MCHC, lymphocyte, monocyte, neutrophil and eosinophil) were measured. Based on the obtained results, growth and survival indices were affected by florfenicol, enrofloxacin and doxycycline antibiotics and decreased ($p<0.05$). So that the final weight, specific growth rate, daily growth coefficient, feed efficiency, feed conversion coefficient and survival percentage of control group fish had significant differences compared to other experimental treatments ($p<0.05$). The reduction of these indices in fish fed with florfenicel was more than that of fish fed with enrofloxacin and doxycycline antibiotics ($p<0.05$). Among the hematological parameters, the number of white blood cells (WBC) and lymphocyte increased under the influence of antibiotics ($p<0.05$). Comparing the indices of the number of RBC, Hb, %Htc, MCV, MCH, MCHC, monocyte, neutrophil and eosinophil differences no significance was observed between treatments ($p<0.05$). Finally, it was concluded that the use of antibiotics has adverse effects on growth, survival and hematology indicators of rainbow trout. But in the meantime, florfenicel had the most and enrofloxacin the least negative effect on these indicators. According to the results obtained from this study, the use of enrofloxacin and doxycycline is recommended when the disease occurs and the antibiotic is prescribed by the veterinarian, compared to the antibiotic florfenicol.

***Keywords*:** Florfenicol, Enrofloxacin, Doxycycline, Growth and survival indices, Hematological parameters, Rainbow trout

*Corresponding author: bnmsalimi@gmail.com