

اثر آنتی بیوتیک اکسی تتراسایکلین بر فراسنجه‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مبتلا به آئرومونازیس (*Aeromonas*) و تأثیر استفاده از بوتیل هیدروکسی تولوئن در بهبود اثرات جانبی درمان آنتی بیوتیکی

پگاه فرهنگ^۱، علیرضا میرواقفی*^۲، باقر مجازی امیری^۲

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۱ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۹/۱۵

چکیده

با توجه به استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری و از سوی دیگر عدم توجه پرورش‌دهندگان به مضرات تجویز بی‌رویه داروهای ضد باکتریایی، مطالعه تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر فراسنجه‌های زیستی آبزیان ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه ضمن بررسی تأثیر آنتی-بیوتیک اکسی تتراسایکلین بر فراسنجه‌های خونی (گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید، هماتوکریت و هموگلوبین) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بیمار شده با باکتری *Aeromonas hydrophila*، به بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) در بهبود اثرات جانبی حاصل از اعمال آنتی‌بیوتیک بر فراسنجه‌های خونی مذکور پرداخته شد. با بررسی نتایج این مطالعه که به مدت ۶۱ روز روی ۱۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی $30 \pm 175/92$ g در چهار تیمار (شاهد، تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین، تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین و آنتی‌اکسیدان BHT با دوز ۰/۵٪ جیره روزانه و تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین و آنتی‌اکسیدان BHT با دوز ۰/۸٪ جیره روزانه) و سه تکرار انجام شد، به نظر می‌رسد که آنتی-اکسیدان BHT در بهبود اثرات جانبی ناشی از اعمال اکسی تتراسایکلین در جیره آبزیان، بر فراسنجه‌های خونی مورد بررسی تأثیر معنی‌داری داشته است. از سویی با توجه به عدم وجود اختلاف معنی‌دار در دوزهای مختلف (۰/۵٪ و ۰/۸٪ جیره روزانه) آنتی‌اکسیدان BHT بر فراسنجه‌های خونی، استفاده از دوز ۰/۵٪ به منظور استفاده در استخرهای پرورشی، اقتصادی‌تر به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین، شاخص‌های خونی، آنتی‌اکسیدان، BHT، *Aeromonas hydrophila*

۱. مقدمه

امروزه به موازات افزایش روزافزون تقاضا برای پروتئین به‌ویژه پروتئین آبزیان، ذخایر طبیعی آن رو به کاهش است، بنابراین آبی‌پروری به یکی از مهم‌ترین صنایع و منابع تأمین پروتئین برای بشر تبدیل شده که همواره رو به توسعه و گسترش است (Sharifuzzaman and Austin, 2010). در کنار این رشد، به دلیل تلاش برای ایجاد آبی‌پروری مدرن که مستلزم افزایش تولید در واحد سطح است، شرایط استرسی محیط پرورشی نیز رو به افزایش گمارده است، این مساله باعث می‌گردد صنعت آبی‌پروری همواره با مشکلات متعددی روبه‌رو شود که از آن جمله می‌توان به بروز بیماری‌های مختلف در این شرایط اشاره نمود. از جمله مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌های مزارع پرورشی توسط گونه‌های ویبریو (*Vibrio spp.*) و آئروموناس (*Aeromonas spp.*) ایجاد می‌گردند (Wang et al., 2008). آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) باکتری گرم منفی، اکسیداز مثبت و تخمیرگر گلوکز است (Snower et al., 1989) که پراکنش جهانی دارد و با وجود این که معمولاً در میکروفلور طبیعی آبزیان یافت می‌شود (Ibrahem et al., 2008)، موجب بروز بیماری در ماهیان می‌شود (Cipriano et al., 2001).

همواره بهترین سیاست برای جلوگیری از وقوع بیماری، پیشگیری از بیماری است (Swann and Randy, 1991)، اما در هنگام شیوع بیماری معمول‌ترین واکنش، مقابله با گسترش و درمان آن است که معمولاً با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و افزودنی‌های شیمیایی همراه می‌گردد. در اغلب مزارع پرورشی آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین و فلورفنیکل به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Rigos and Troisi, 2005).

اغلب استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند اثرات مخربی بر محیط زیست و موجود زنده داشته باشد که از جمله مهم‌ترین اثرات منفی استفاده از آن‌ها می‌توان به بقای آنتی‌بیوتیک در بافت‌های آبزیان (Saglam and Yonar, 2009)، افزایش مقاومت باکتری‌ها (Vivekanandhan et al., 2002)، عدم تعادل در میکروفلور طبیعی روده (Moori-

Fatemi, 2016) و کاهش رشد (bakhtiari et al., 2016) اشاره کرد. علاوه بر این در برخی موارد نیز با ایجاد رادیکال‌های آزاد منجر به بروز استرس اکسیداتیو (Conklin, 2000) و در نتیجه تخریب بافت کلیه و کبد می‌گردد (Devall et al., 2012). آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که از طریق واکنش با رادیکال‌های آزاد و گونه‌های فعال، اکسیداسیون را مهار کرده و یا به تأخیر می‌اندازند (Shariatzadeh et al., 2007). بوتیل هیدروکسی تولوئن (Butylated hydroxytoluene) آنتی‌اکسیدانی شیمیایی است که طور گسترده در تولید غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد (Aguilar et al., 2011) و با تشکیل رادیکال، از اکسیداسیون جلوگیری می‌نماید (Sodagar and Zakariyayi, 2015).

در زمینه سنجش فراسنجه‌های خونی آبزیان در زمان مواجهه با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین مطالعات مختلفی انجام شده است (Grondel et al., 1985; Wishkovsky et al., 1987; Tafalla et al., 1999; Romero et al., 2012) که از جمله مهم‌ترین آن می‌توان به مطالعه روی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) اشاره کرد که بر اثر افزایش دوز آنتی‌بیوتیک، کاهش سطوح هماتوکریت و هموگلوبین مشاهده شد (Omeregic and Oyebanji, 2002)، با توجه به این که استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها اغلب موجب تغییرات فیزیولوژیکی گسترده در میزبان، کاهش و یا توقف رشد می‌گردند، افزایش مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، بر احتمال بروز استرس اکسیداتیو می‌افزاید. از آنجایی که به‌طور مستقیم نمی‌توان استرس اکسیداتیو را مورد سنجش قرار داد، بایستی تاثیر آن را بر فراسنجه‌های دیگری مانند خون بررسی نمود. در این مطالعه سعی گردید ضمن بررسی تأثیرات آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر فراسنجه‌های خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیمار شده با باکتری *A. hydrophila*، اثرات استفاده از آنتی‌اکسیدان BHT در جیره غذایی این گونه برای پایش کاهش احتمالی اثرات نامطلوب این آنتی‌بیوتیک نیز مورد بررسی قرار گیرد.

۲. مواد و روش‌ها

گردید، بنابراین میزان اکسی‌تتراسایکلین مصرفی در طول مدت هفت روز نمونه‌برداری برابر با ۶۳ گرم محاسبه شد. پودر آنتی‌اکسیدانی BHT از شرکت فرادانه (ایران) تهیه شد و میزان مصرف آن در دوزهای ۰/۵ و ۰/۸ درصد جیره روزانه (با توجه به حد مجاز مصرف این آنتی‌اکسیدان)، به ترتیب برابر با ۰/۳۲ و ۰/۵۱ گرم در هر تیمار محاسبه، در روغن حل و بر روی غذا اسپری شد.

۴.۲. مواجه‌سازی و غذادهی

تیمارها به مدت ۶۱ روز و به میزان ۲ درصد وزن بدن تغذیه شدند. پس از بیهوش‌سازی ماهی با استفاده از پودر گل میخک (با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، تزریق یک سی‌سی باکتری با غلظت 10^8 CFU رقیق شده با سرم قابل تزریق ۹ درصد نمکی، به درون صفاق انجام پذیرفت. به منظور اطمینان از بیماری‌زایی ایجاد شده ناشی از باکتری *A. hydrophila* آزمون تشخیصی اندول (Endol)، اکسیداز (Oxidase)، کاتالاز (Catalase)، اکسیداسیون تخمیر (Oxidative fermentative) و رنگ‌آمیزی گرم انجام پذیرفت (Bakhshi and Bakhshi, 1978).

۵.۲. بررسی فراسنجه‌های خونی

به منظور بررسی فراسنجه‌های خونی، نمونه‌های ماهی به وسیله محلول پودر گل میخک با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر بی‌هوش، سپس با استفاده از سرنگ دو سی‌سی از ناحیه کمان خونی ساقه دمی خون‌گیری شدند. در ادامه نمونه‌های خون به لوله‌های حاوی EDTA با حجم تقریبی یک سی‌سی انتقال یافت. به منظور شمارش گلبول‌های سفید، نمونه‌های خون با غلظت ۱:۵۰ توسط محلول Dacies رقیق شد و سپس توسط لام نئوبار و میکروسکوپ مورد شمارش قرار گرفت. تعداد گلبول‌های سفید در واحد میلی‌متر مکعب طبق رابطه زیر محاسبه گردید.

تعداد گلبول‌های سفید موجود در هر میلی‌متر مکعب = تعداد سلول‌های شمارش شده در ۰/۱ میلی‌متر مکعب $\times 10$ (منطقه مورد شمارش) $\times 50$ (رقت محلول)

۱.۲. تهیه استوک و تزریق باکتری

سویه باکتری *Aeromonas hydrophila* از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد. به منظور قرائت کدورت باکتری *A. hydrophila* از دستگاه اسپکتروفوتومتر Spectrophotometer UV-2100 استفاده گردید و به منظور دستیابی به غلظت باکتری 10^8 CFU (Colony forming unit) در طول موج ۶۰۰ نانومتر، عدد ۰/۰۸-۰/۱ قرائت شد.

۲.۲. آداپتاسیون و تیمار بندی ماهیان

تعداد ۱۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان *Oncorhynchus mykiss* با میانگین وزنی $30 \pm 175/92$ g و میانگین طولی 50 ± 225 mm به مخزن آداپتاسیون ۱۰۰۰ لیتری (که از ۷۲ ساعت قبل از معرفی ماهیان، به میزان یک سوم از آب هوادهی شده و به مقدار دو سوم با آب استخر پرورشی، آبیگری شده بود)، انتقال یافت. مدت زمان آداپتاسیون ۱۰ روز در نظر گرفته شد سپس ماهی‌ها به ۱۲ مخزن ۳۰۰ لیتری انتقال داده شده و تحت تیمار قرار گرفتند. روزانه به میزان ۱۰ درصد از حجم کل مخازن تعویض آب صورت گرفت. متغیرهای فیزیکی در کل دوره شامل میانگین دما $1 \pm 14/5$ درجه سانتی‌گراد، میانگین pH آب $0/1 \pm 7/9$ و میزان سختی کل آب نیز $10 \pm 344/25$ میلی‌گرم در لیتر، به وسیله دستگاه Hanna HI9811-5 اندازه‌گیری شد. برای نمونه‌های مورد نظر چهار تیمار با سه تکرار ۱۰ قطعه‌ای شامل (۱) شاهد، (۲) تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین، (۳) تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین و آنتی‌اکسیدان BHT با دوز ۰/۵ درصد و (۴) تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین و آنتی‌اکسیدان BHT با دوز ۰/۸ درصد تقسیم شدند.

۳.۲. نحوه استفاده اکسی‌تتراسایکلین و

BHT در جیره

آنتی‌بیوتیک اکسی‌وت (Oxyvet) ۲۰٪ از شرکت رازک (ایران) تهیه شد، که به صورت روزانه بنابر دستورالعمل ذکر شده بر آن، نه گرم پودر آنتی‌بیوتیکی با درصد خلوص ۲۰ درصد برای نه مخزن تحت تیمار، محاسبه و در آب مقطر محلول و بر روی غذا اسپری

جدول ۱- بررسی فراسنجه‌های خونی در تیمارهای مورد بررسی (میانگین \pm انحراف معیار).

گروه	فراسنجه‌های مورد بررسی			
	WBC	HCT	Hb	RBC
C	۳۷/۵۹۳ \pm ۰/۳۶۸ ^{bc}	۲۸/۹۴۳ \pm ۰/۵۷۳ ^a	۶/۲۳۶ \pm ۰/۲۸۱ ^a	۳/۳۹۳ \pm ۰/۱۱۵ ^a
A	۳۹/۴۶۸ \pm ۰/۷۰۰ ^{ab}	۲۳/۹۹۸ \pm ۱/۸۴۲ ^b	۴/۸۷۰ \pm ۰/۷۱۱ ^{bc}	۲/۶۹۸ \pm ۰/۲۴۶ ^b
O	۴۰/۷۱۰ \pm ۰/۹۱۹ ^a	۲۳/۹۳۸ \pm ۱/۸۰۳ ^b	۴/۸۱۰ \pm ۰/۷۰۴ ^c	۲/۶۰۲ \pm ۰/۳۱۶ ^b
M	۴۰/۴۴۴ \pm ۱/۵۹۶ ^a	۲۳/۶۵۶ \pm ۱/۸۵۱ ^b	۴/۸۰۸ \pm ۰/۷۲۳ ^c	۲/۷۲۴ \pm ۰/۱۹۰ ^b
R	۳۹/۳۵۰ \pm ۱/۸۵۳ ^{ab}	۲۳/۸۴۰ \pm ۱/۸۸۱ ^b	۴/۵۵۲ \pm ۰/۶۶۲ ^c	۲/۸۲۸ \pm ۰/۱۰۴ ^b
N	۳۶/۵۲۲ \pm ۱/۰۴۶ ^c	۲۸/۴۲۴ \pm ۰/۵۸۴ ^a	۶/۱۴۶ \pm ۰/۳۴۲ ^{ab}	۳/۴۹۲ \pm ۰/۱۹۱ ^a
S	۳۶/۳۱۲ \pm ۰/۶۳۷ ^c	۲۹/۶۹۴ \pm ۰/۷۱۵ ^a	۶/۱۶۰ \pm ۰/۶۳۹ ^{ab}	۳/۴۵۴ \pm ۰/۳۵۸ ^a

C: شاهد؛ A: باکتری؛ O: باکتری + اکسی تترا سایکلین؛ M: باکتری + اکسی تترا سایکلین + ۰/۵٪ BHT؛ R: باکتری + اکسی تترا سایکلین + ۰/۸٪ BHT؛ N: ۰/۵٪ BHT پس از قطع آنتی‌بیوتیک؛ S: ۰/۸٪ BHT پس از قطع آنتی‌بیوتیک. RBC: گلبول های قرمز؛ HB: هموگلوبین؛ HCT: هماتوکریت؛ WBC: گلبول های سفید. (حروف غیر همسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) و حروف همسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار ($P > 0.05$) بین تیمارها می باشند.)

(A)، بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک (O)، بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان (M) ۰/۵٪، بیمار تحت درمان با آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان (O) ۰/۸٪، (R)، بیمار درمان شده و تحت تیمار آنتی‌اکسیدان ۰/۵٪ (N) و ۰/۸٪ (S)، تعریف شدند.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام پذیرفت. با توجه به اهمیت اثر متغیرها بر فراسنجه‌های مورد بررسی، مقایسه میانگین با آزمون‌های توکی (Tukey) به شرط همسانی واریانس‌ها و گیمز هاول (Games Howell) به شرط عدم همسانی واریانس‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد و سطح معنی‌داری ($P < 0.05$) انجام شد. همچنین برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد.

۳. نتایج

مطابق نتایج آزمون‌های گیمز هاول (در سطوح میانگین گلبول‌های سفید و هماتوکریت) و توکی (در سطوح میانگین هموگلوبین و گلبول‌های قرمز) در مقایسه جفتی تیمار شاهد با ماهیان بیمار تحت درمان با اکسی تتراسایکلین (O) و تحت درمان با اکسی-تتراسایکلین و BHT با دوز ۰/۵٪ (M) در تمامی فراسنجه‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. در حالی که در مقایسه جفتی تیمار شاهد با ماهیان مبتلا به آثرومونازیس (A) و ماهیان تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی تتراسایکلین و BHT با دوز ۰/۸٪ (R) تفاوت

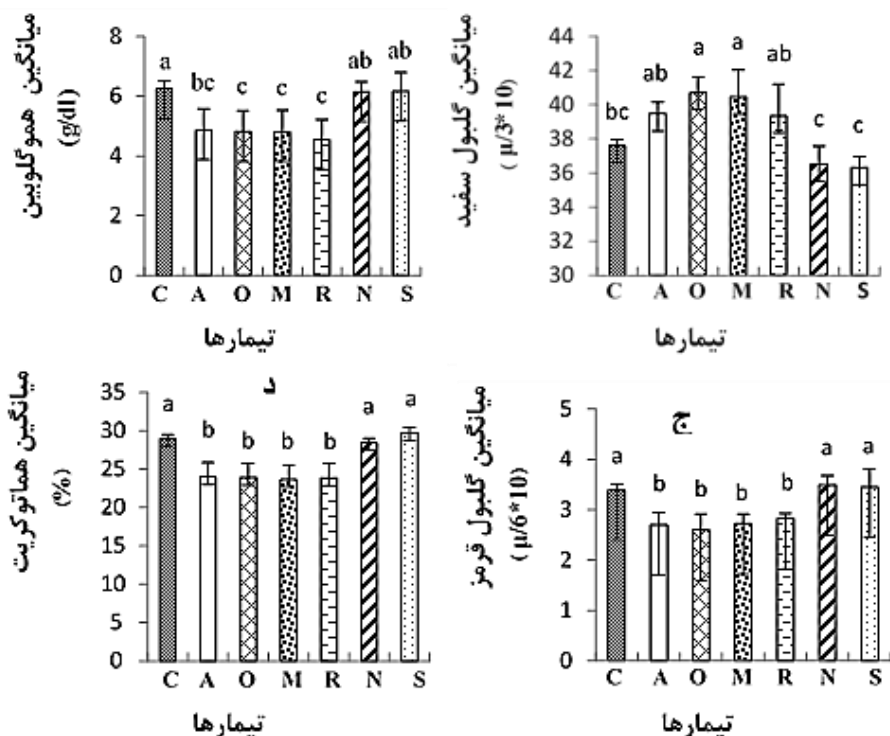
گلبول‌های قرمز خون نیز پس از رقیق‌سازی خون با غلظت ۱:۵۰ و در شوری ۰/۹٪ (w/v) با استفاده از محلول Hayem، توسط لام نئوبار و میکروسکوپ، مورد شمارش قرار گرفت. سپس تعداد گلبول‌های قرمز در واحد میلی متر مکعب طبق فرمول زیر محاسبه گردید.

تعداد گلبول های موجود در هر میلی‌متر مکعب = تعداد گلبول قرمز شمارش شده در ۰/۲ میلی‌متر مکعب \times ۵۰ (منطقه مورد شمارش) \times ۵۰ (رقت محلول)

برای سنجش سطح هموگلوبین نیز نمونه‌های خون با محلول Drabkin مخلوط و سپس در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه، انکوبه شد. سپس میزان جذب نوری توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد.

برای سنجش هماتوکریت نیز نمونه‌های خونی به مدت ۵ دقیقه و با سرعت ۱۰۵۰۰ rpm (Revolution per minute) سانتریفوژ شد و سپس حجم هماتوکریت توسط میکروهماتوکریت خوانده شد (Adegoke et al., 2015).

به‌منظور بررسی فراسنجه‌های خونی سه دوره خون‌گیری انجام پذیرفت. اولین نمونه‌برداری خونی پنج روز پس از تزریق باکتری به آبی با مشاهده علائم بیماری آثرومونازیس، دومین دوره، هفت روز پس از اعمال آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان در جیره با مشاهده بهبود علائم بیماری و سومین نمونه‌برداری، پس از قطع آنتی‌بیوتیک و تداوم استفاده از آنتی‌اکسیدان در جیره به مدت یک هفته، انجام پذیرفت. نمونه‌ها به صورت گروه‌های شاهد بدون بیماری (C)، تیمار بیمار



شکل ۱ - حروف غیر همسان نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) و حروف همسان نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار ($P > 0.05$) بین تیمارها می‌باشند. مقایسه تغییر سطح الف) گلبول‌های سفید (WBC)، ب) هموگلوبین (Hb) ج) گلبول‌های قرمز (RBC) و د) هماتوکریت (HCT) در نمونه‌ی خونی ماهی‌های تیمار شاهد (C)، مبتلا به آئرومونازیس (A)، مبتلا به آئرومونازیس تحت درمان با آنتی‌بیوتیک (O)، مبتلا به آئرومونازیس تحت درمان با آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان با دوزهای ۰/۵ (M) و ۰/۸ (R) درصد و تغذیه شده با آنتی‌اکسیدان ۰/۵ (N) و ۰/۸ (S) درصد پس از قطع آنتی‌بیوتیک.

با وجود تحقیقات گسترده‌ای که در زمینه شناخت باکتری‌ها، بیماری‌های عفونی و مقاومت‌های باکتریایی انجام شده، نتایج بسیار محدودی در مباحث مرتبط با تاثیر بیماری‌های عفونی بر فراسنجه‌های خونی گزارش شده است. با توجه به نتایج، به نظر می‌رسد که افزایش در سطوح میانگین گلبول‌های سفید در سیستم بدنی، به دلیل تلاش سیستم دفاعی به منظور مقابله با عامل بیماری‌زا صورت می‌گیرد که در پژوهش‌های مختلف دیگری نیز به آن پرداخته شده است (Haney et al., 1992; Pathiratne and Rajapakshe, 1998; Martins et al., 2008). تزریق باکتری *A. hydrophila* و اعمال دوز آنتی-بیوتیکی در جیره آبزیان مورد بررسی، افزایش معنی-داری را در سطوح گلبول‌های سفید نسبت به تیمار شاهد نشان داد. به نظر می‌رسد که عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای شاهد و بیمار بیانگر این است که استفاده از آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین به منظور درمان بیماری آئرومونازیس، موجب افزایش اثرات جانبی بر گلبول‌های سفید خون شده است. اکبر صفت

معنی‌دار در همه‌ی فراسنجه‌ها به جز گلبول‌های سفید مشاهده شد.

در مقایسه جفتی تیمار A با تیمار ماهیانی که پس از قطع آنتی‌بیوتیک به مدت یک هفته با BHT با دوز ۰/۵ (N) و ۰/۸ (S) درصد تغذیه شده بودند، در گلبول‌های قرمز، گلبول‌های سفید و هماتوکریت و در مقایسه تیمارهای O، M و R با تیمارهای N و S در تمامی فراسنجه‌ها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۱).

با توجه به نتایج، میانگین تعداد گلبول‌های سفید، گلبول‌های قرمز خون و هماتوکریت در ماهیان مبتلا به آئرومونازیس و ماهیان تحت تیمار آنتی-بیوتیک، تفاوت معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)، همچنین در گروه‌هایی که تداوم مصرف آنتی‌اکسیدان ۰/۵ و ۰/۸ درصد پس از قطع آنتی‌بیوتیک ادامه داشت نیز تفاوت معنی‌داری در سطح گلبول‌های سفید (شکل ۱-الف)، هموگلوبین (شکل ۱-ب)، گلبول‌های قرمز (شکل ۱-ج) و هماتوکریت (شکل ۱-د) مشاهده شد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

مدت زمان استفاده از آنتی‌اکسیدان BHT را دلیل آن برشمرد. همچنین استفاده از آنتی‌اکسیدان BHT موجب افزایش سطوح میانگین گلبول‌های قرمز کاهش یافته بر اثر بیماری شد که این امر بیانگر تاثیر آنتی-اکسیدان BHT بر بهبود اثرات جانبی بیماری در فراسنجه گلبول قرمز است.

در برخی مطالعات صورت گرفته روی ماهیان، عفونت‌های آئروموناوسی باعث کاهش هموگلوبین شده است (Foda, 1973; Rehukla, 2002). با توجه به این که در مطالعه حاضر تفاوت معنی‌داری میان سطوح هموگلوبین تیمارهای بیمار و تحت درمان با اکسی‌تتراسایکلین مشاهده نشد و از طرفی تفاوت معنی‌دار میان تیمار شاهد و بیمار (A) مشاهده شد، به نظر می‌رسد تاثیر باکتری *A. hydrophila* در کاهش سطوح میانگین هموگلوبین به مراتب بیشتر از اثر اکسی‌تتراسایکلین بوده است. Oyebanji و Omoregie (۲۰۰۲) اثبات نمود که افزایش میزان مصرف آنتی-بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین موجب کاهش معنی‌دار سطوح هموگلوبین خون می‌گردد.

از آنجایی که استفاده از تیمار آنتی‌اکسیدانی پس از قطع آنتی‌بیوتیک، (در هر دو دوز) اختلاف معنی‌داری را در سطوح هموگلوبین نسبت به تیمار حاوی آنتی‌بیوتیک نشان داد، به نظر می‌رسد استفاده از آنتی‌اکسیدان BHT در جیره، موجب بهبود اثرات جانبی و منفی ناشی از بیماری و آنتی‌بیوتیک بر فراسنجه هموگلوبین شده است.

در تحقیقات متعددی کاهش سطوح میانگین گلبول‌های قرمز در اثر ابتلاء ماهیان به بیماری‌ها گزارش شده است (Harbell et al., 1979; Pathiratne and Rajapakshe, 1998; Harikrishnan et al., 2003; Rehukla, 1998, 2002; Haney et al., 1992; Martins et al., 2008). مطابق نتایج پژوهش حاضر، کاهش سطوح میانگین گلبول‌های قرمز، بر اثر بیماری آئروموناوسی مشاهده شد، ولی آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین تاثیر معنی‌داری بر سطوح گلبول‌های قرمز نداشت. Akbarsefat (۲۰۱۴) نیز نتایج مشابهی را گزارش نمود. اما در مطالعه Rayes (۲۰۱۲)، ماهیان بیمار شده با باکتری و تحت درمان با آنتی‌بیوتیک اکسی-تتراسایکلین در تعداد گلبول‌های قرمز نسبت به تیمار شاهد تغییر معنی‌دار مشاهده نشده است که به‌نظر

(۱۳۹۳) نیز افزایش معنی‌دار سطوح میانگین گلبول‌های سفید را در زمان درمان آئروموناوسی با آنتی-بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین گزارش کرده است.

با توجه به این که کاهش معنی‌دار در سطوح میانگین گلبول‌های سفید در تیمارهای حاوی آنتی-بیوتیک و آنتی‌اکسیدان نسبت به تیماری که فقط با آنتی‌بیوتیک تغذیه شد، مشاهده نشد، به نظر می‌رسد که استفاده همزمان آنتی‌اکسیدان با آنتی‌بیوتیک در بازه‌ی زمانی یک هفته، بر کاهش اثرات آنتی‌بیوتیک تاثیر چندانی نداشت. حال آن که با قطع آنتی‌بیوتیک و تداوم استفاده از BHT در جیره به مدت یک هفته، اثرات جانبی ناشی از بیماری و استفاده از آنتی‌بیوتیک، در گلبول‌های سفید خون کاهش یافت. باکتری‌های گرم منفی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث کاهش هماتوکریت خون می‌شوند (Moyner et al., 1993; Rehukla, 1998). نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز نشان داد که تزریق باکتری گرم منفی *A. hydrophila* موجب کاهش معنی‌دار در هماتوکریت می‌گردد که با مطالعه Harikrishnan و همکاران (۲۰۰۳) مطابقت دارد. با مقایسه تیمار بیمار با تیماری که در جیره‌شان آنتی‌بیوتیک اکسی-تتراسایکلین به منظور درمان آئروموناوسی اعمال شد، هیچ تغییر معنی‌داری مشاهده نشد. به نظر می‌رسد این امر بیانگر اثر آئروموناوسی و عدم تاثیر آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین بر فراسنجه هماتوکریت است. اما در مطالعه دیگر روی ماهی *O. niloticus* افزایش دوز آنتی‌بیوتیک، باعث کاهش سطوح هماتوکریت نسبت به تیمار شاهد شد (Omorieg and Oyebanji, 2002). به نظر می‌رسد اثر متقابل باکتری بر آنتی-بیوتیک، تفاوت در گونه ماهی و همچنین تفاوت در اثرگذاری آنتی‌بیوتیک بر هماتوکریت از دلایل این اختلاف باشند.

با توجه به این که در مطالعه حاضر آنتی‌بیوتیک و آنتی‌اکسیدان به صورت همزمان در جیره مورد استفاده قرار گرفتند، عدم اختلاف معنی‌دار با تیماری که فقط آنتی‌بیوتیک در جیره‌شان اعمال شد، می‌تواند بیانگر اثر متقابل آنتی‌بیوتیک بر آنتی‌اکسیدان باشد. از آنجایی که قطع آنتی‌بیوتیک و ادامه مصرف آنتی-اکسیدان به مدت یک هفته، اثر معنی‌داری را در سطوح هماتوکریت ایجاد نموده است، به نظر می‌رسد می‌توان

که آنتی‌اکسیدان BHT در بهبود اثرات جانبی ناشی از اعمال اکسی‌تتراسایکلین در جیره آبزیان مورد بررسی، تاثیر معنی‌داری نشان داد و با مشاهده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در دوزهای مختلف (۰/۵ و ۰/۸ درصد) آنتی‌اکسیدان BHT بر فراسنجه‌های خونی، استفاده از دوز ۰/۵ درصد به‌منظور پرورش ماهیان اقتصادی‌تر به نظر می‌رسد.

References

- Adegoke, A.M., Gbadegesin, M.A., Otitoju, A.P., Odunola, O.A., 2015. Hepatotoxicity and Genotoxicity of Sodium Arsenite and Cyclophosphamide in Rats: Protective Effects of Aqueous Extract of *Adansonia digitata* L. Fruit Palp. *British Journal of Medicine & Medical Research* 8(11), 963-974.
- Akbarsefat, L., 2014. Comparison of the effect of *Pediococcus acidilactici* and immune stimulant β -glucan and treatment with oxytetracycline antibiotics on blood and immune parameters and liver enzymes of rainbow trout infected with pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*. Master thesis. Fish culture and fisheries group. Campus of Agriculture and Natural resources. University of Tehran, Alborz, 220 P. (In Persian)
- Aguillar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Galtier, P., Gilbert, J., Gott, D.M., GundertRemi, U., Koenig, J., Lambré, C., Leblanc, J.C., Mortensen, A., Mossesso, P., Parent-Massin, D., Rietjens, I.M.C.M., Stankovic, I., Tobback, P., Waalkens Berendsen, I., Woutersen, R.A., Wright, M., 2011. Scientific opinion on the re-evaluation of butylated hydroxyanisole – BHA (E 320) as a food additive. *European Food Safety Authority* 9(10), 2392.
- Bakhshi, Z., Bakhshi, M., 1978. Practical diagnostic bacteriology. Avaye Zohoor publication. Tehran, 191 p. (In Persian)
- Cipriano, C.R., Bullock, G.L., Pyle, S.W., 2001. *Aeromonas hydrophila* and Motile *Aeromonas* Septicemias of fish. *Fish Disease Leaflet*, 68 p.
- Conklin, K.A., 2000. Dietary antioxidants during cancer chemotherapy: impact on chemotherapeutic effectiveness and development of side effects. *Nutrition and Cancer* 37(1), 1-18.
- Devall, G., Martin, E., Horner, J., Roberts, R., 2012. Drug induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology* 2012, 1-13.
- Fatemi, A., 1995. Antibacterial drugs in fish. *Journal of Research and Construction* 27, 76-79. (In Persian)
- می‌رسد این اختلاف ممکن است به دلیل تفاوت در نوع گونه و سویه باکتری باشد.
- با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که تاثیر بیماری زایی در مقایسه با اعمال آنتی‌بیوتیک اکسی-تتراسایکلین بر تغییر فراسنجه‌های مورد بررسی به جز گلبول‌های سفید، به مراتب بیشتر است ولی با توجه به استفاده گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها در آبی‌پروری، اثرات جانبی آن‌ها می‌تواند بسیار قابل توجه باشد. از آن جایی
- FODA, A., 1973. Changes in hematocrit and hemoglobin in Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a result of furunculosis disease. *Fisheries Research Board of Canada* 30(3), 467-468.
- Grondel, J.L., Gloudemans, A.G.M., Muiswinkel, W.B.V., 1985. The influence of antibiotics on the immune system. II. Modulation of fish leukocyte responses in culture. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 9(3), 251-260.
- Haney, D.C., Hursh, D.A., Mix, M.C., Winton, J.R., 1992. Physiological and hematological change in chum salmon artificially infected with erythrocytic necrosis virus. *Aquatic Animal Health* 4(1), 48-57.
- Harbell, S.C., Hodgins, H.O., Schiewe, M.H., 1979. Studies on the pathogenesis of vibriosis in coho salmon *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *Journal of Fish Disease* 2(5), 391-404.
- Harikrishnan, R., Nisha-Rani, M., Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture* 221(1-4), 41-50.
- Ibrahim, M.D., Mostafa, M.M., Arab, R.M.H., Rezk, M.A., 2008. Prevalence of *Aeromonas hydrophila* infection in wild and cultured *Tilapia niloticus* (*O.niloticus*) in Egypt, 8th International symposium on Tilapia in Aquaculture 1257-1271.
- Martins, M.L., Mourino, J.L.P., Amaral, G.V., Vieira, F.N., Dotta, G., Jatoba, A.M.B., Pedrotti, F.S., Jeronimo, G.T., Buglione-Neto, C.C., Pereira-Jr, G., 2008. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. *Brazilian Journal of Biology* 68(3), 657-661.
- Moori-Bakhtiari, N., Peyghan, R., Monzavi, F., 2016. Determination of antimicrobial resistance pattern in *Aeromonas hydrophila* isolated from common carp *Cyprinus carpio* in Khuzestan province. *Scientific Journal of Fisheries* 5, 41-49. (In Persian)
- Moyner, K., Roed, K.H., Sevattal, S., Heum, M., 1993. Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, induced by *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish & Shellfish Immunology* 3(4), 253-265.

- Omoregie, E., Oyebanji, S.M., 2002. Oxytetracyclin-induced blood disorder in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* (Trewavas). *Journal of the World Aquaculture Society* 33(3), 377-382.
- Pathiratne, A., Rajapakshe, W., 1998. Haematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in the Asian cichlid fish, *Etroplus suratensis*. *Asian Fisheries Science* 11(3-4), 177-316.
- Rayes, A.H., 2012. A trial for treatment of Flavobacteriosis in Red Sea cultured Humor fish *Epinephelus polyphkadion* using Humate substance and Oxytetracycline. *Report and Opinion* 4(5), 5-11.
- Rehulka, J., 1998. The blood indices of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in aeromonas-induced ulcerous dermatitis. *Acta Veterinaria Brno* 67, 317-322.
- Rehukla, J., 2002. Aeromonas Causes Severe Skin Lesions in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Clinical Pathology, Haematology and Biochemistry. *Acta Veterinaria Brno* 71, 351-360.
- Rigos, G., Troisi, G., 2005. Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important Euryhaline fish species and possible environmental implications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15(1-2), 53-73.
- Romero, J., Feijoo, C., Navarrete, P., 2012. Health and environment in aquaculture; chapter antibiotics in aquaculture, use, abuse and alternatives 159-198.
- Saglam, N., Yonar, M., 2009. Effects of sulfamerazine on selected haematological and immunological parameters in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). *Aquaculture Research* 40(4), 395-404.
- Shariatzadeh, M., Malekirad, E., Fani, E., Dezfolian, E., 2007. Free radicals and antioxidants: Their effects on health and disease. Ayizh publication. Tehran, 222 p. (In Persian)
- Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2010. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic Kocuria SM1. *Journal of Fish & Shellfish Immunology* 29(2), 212-216.
- Sodagar, M., Zakariyayi, H., 2015. Use of natural and synthetical antioxidants in aquaculture. *Journal of Ornamental Fish* 4, 17-32. (In Persian)
- Swann, L. and Randy, M., 1991. Diagnosis and Treatment of *Aeromonas hydrophila* Infection of Fish. *Aquaculture Extension*, Indiana Sea Grant Program; Fact Sheet AS-461.
- Tafalla, C., 2002. In vivo and in vitro effect of oxytetracycline treatment on the immune response of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 22(4), 271-276.
- Vivekanandhan G., Savithamani K., Hatha A., Lakshmanaperumalsamy P., 2002. Antibiotic resistance of (*Aeromonas hydrophila*) isolated from marketed fish and prawn of South India. *International Journal of Food Microbiology* 76(1-2), 165-168.
- Snower, D.P., Ruff, C., Kuritza, A.P., Edberg, S.C., 1989. *Aeromonas hydrophila* infection associated with the use of medicinal leeches. *Journal of Clinical Microbiology* 27(6), 1421-1422.
- Wang, Y.B., Rong-Li, J., Lin, J., 2008. Probiotics in aquaculture: challenges and outlook. *Aquaculture* 281(1-4), 1-4.
- Wishkovsky, A., Roberson, B., Hetrick, FM., 1987. In vitro suppression of the phagocytic response of fish macrophages by tetracyclines. *Journal of Fish Biology* 31, 61-65.