



اثر آنتی بیوتیک های اکسی تتراساکلین و فلورفنیکل بر رشد، محتوی کلروفیل a و پروتئین ریز جلبک (*Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898) در محیط آزمایشگاهی

حسین قاسمی^۱، آرش اکبرزاده^{۱*}، مرتضی یوسف زادی^۲

۱. گروه شیلات، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه قم، قم، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثر مواجهه بلند مدت (سمیت مزمین) آنتی بیوتیک های اکسی تتراساکلین (OTC) و فلورفنیکل (FLO) مورد استفاده در مزارع پرورش میگو بر عملکرد رشد، محتوی کلروفیل a و پروتئین کل ریز جلبک *Chaetoceros muelleri* بود. ریز جلبک *C. muelleri* با تراکم اولیه ۴ هزار سلول در هر میلی لیتر به مدت ۱۲ روز به ترتیب در معرض دوزهای ۴۳/۷ و ۲۰/۵ میلی گرم در لیتر اکسی تتراساکلین و فلورفنیکل قرار گرفت و سپس فاکتورهای رشد، محتوای کلروفیل a و پروتئین کل مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که آنتی بیوتیک های OTC و FLO به طور معنی داری باعث کاهش رشد، محتوای کلروفیل a و سنتز پروتئین در *C. muelleri* شدند ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که FLO سمیت بیشتری نسبت به OTC برای *C. muelleri* دارد. کاهش رشد، محتوای کلروفیل a و سنتز پروتئین در ریز جلبک *C. muelleri* در مواجهه با آنتی بیوتیک های OTC و FLO ممکن است به دلیل اثرات مهار کننده این آنتی بیوتیک ها بر تنفس سلولی و سنتز پروتئین باشد.

نوع مقاله

پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۵/۰۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۱۱

تاریخ چاپ الکترونیک: ۱۴۰۲/۰۹/۳۱

*نویسنده مسئول:

akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

کلید واژه ها: آنتی بیوتیک، اکسی تتراساکلین، سمیت، فلورفنیکل، *Chaetoceros muelleri*.

مقدمه

برخی آلاینده های متداول شامل آفت کش ها، مواد پاک کننده، سوخت و غیره در سطوح بالا و از راه های مختلف از جمله فاضلاب شهری، پساب مزارع کشاورزی و کارخانجات وارد اکوسیستم می شوند، اما داروها به صورت مداوم در سطوح و غلظت های پایین به محیط آبی وارد می شوند (Santos et al., 2010; Kummer., 2009). مطالعات نشان می دهند که استفاده از آنتی بیوتیک ها در صنعت آبی پروری خطر شدیدی در رابطه با مقاومت باکتریایی به وجود می آورند که این مقاومت ممکن است با پاتوژن های انسانی نیز متقارن باشد (Gräslund et al., 2003). ترکیبات ضد باکتریایی در مزارع تکثیر و پرورش آبریان چندین ماه در رسوبات محیط های آبی باقی می ماند (Le et al., 2004). مصرف گسترده داروها به ویژه آنتی بیوتیک ها در صنایع آبی پروری در طول چرخه تولید، بخصوص در دو فاز لاروی و رشد می باشد (Thuy et al., 2011; Bermúdez- Almada et al., 2014). آنتی بیوتیک ها در آبی پروری بصورت حمام، تزریق و در غذا استفاده می شوند که در نهایت از مدفوع و یا غذای خورده نشده وارد رسوبات شده و از طریق جریانات آبی مورد استفاده ماهیان دریایی و دیگر موجودات غیر هدف از جمله ریز جلبکها و صدف ها قرار می گیرند (Cabello et al., 2006).

یکی از چالش‌های اصلی در تولید آبزیان بویژه در تکثیر و پرورش میگو موضوع بهداشت و بیماری‌ها است. در میگوها تاکنون حدود ۲۰ بیماری ویروسی، چهار بیماری باکتریایی، سه بیماری قارچی و تعدادی انگل گزارش شده که باعث ایجاد بیماری و خسارت به صنعت تکثیر و پرورش میگو می‌شوند (Lightner *et al.*, 1998). برای مقابله با بیماری‌ها حدود ۱۳۸ نوع آنتی‌بیوتیک در تکثیر و پرورش آبزیان استفاده می‌شود. البته در بخش پرورش میگو ۳۲ نوع از آن‌ها و برای بخش تکثیر میگو ۳۹ نوع آنتی‌بیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرد (Thuy *et al.*, 2011). اکسی‌تتراساکلین (Oxytetracycline: OTC) یک آنتی‌بیوتیک باکتریواستاتیک با فرمول شیمیایی ($C_{22}H_{24}N_2O_9$) است که در درمان عفونت‌های ناشی از میکروارگانیزم‌های حساس استفاده می‌شود (Ferreira *et al.*, 2007; Pakravan and Akbarzadeh., 2017). فلورفنیکل (Florfenicol: FLO) نیز یک آنتی‌بیوتیک مصنوعی با طیف اثر وسیع در مهار سنتز پروتئین بوده که به زیر واحد ریبوزوم ۵۰S باکتریایی متصل می‌شود. این ویژگی خصوصاً برای استفاده در دامپزشکی و آبی پروری به ویژه تکثیر و پرورش میگو برای مقابله با پاتوژن‌های *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium columenare* و دیگر بیماری‌ها به کار می‌رود (Freitas *et al.*, 2018; Bermúdez-Almada *et al.*, 2014). در اکوسیستم‌های آبی و زنجیره‌های غذایی، جلبک‌ها گروه بزرگی از موجودات ساده هستند که در چرخه تولید و تغذیه نقش مهمی ایفا می‌کنند. آن‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات با ارزش همانند: بتاکاروتن، آستاگزانتین، ویتامین و اسیدهای چرب در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و غذایی کاربرد فراوانی یافته‌اند (Naderi *et al.*, 2015). ریزجلبک‌های جنس *Chaetoceros* از رده *Mediophyceae* هستند که دارای ۵۲۸ گونه می‌باشند. یکی از گونه‌های شاخص در بین آن‌ها *Chaetoceros muelleri* است (Lemmermann, 1898). *C. muelleri* به عنوان غذای با ارزش تجاری برای پرورش لارو نرم تنان، سخت پوستان و ماهیان استفاده می‌شوند.

ترکیبات بیوشیمیایی موجود در ریزجلبک‌ها نقش مهمی در رشد و توسعه موفقیت آمیز بسیاری از گونه‌های ماهی و میگوی پرورشی دارد (Brown *et al.*, 2002). موجودات فتوسنتز کننده دارای مکانیسم‌های متفاوتی برای سازگاری با نوسانات محیطی و حفاظت خود در برابر عواملی چون پرتو فرابنفش، نور مرئی و ورود آلاینده‌ها به اکوسیستم آبی هستند که عبارتند از: تنظیم فعالیت‌های آنزیمی و ترکیبات فنلی، فلاونوئیدی (لیکوپن، گزانتوفیل و بتاکاروتن) و آنتی‌اکسیدان‌هایی مانند ویتامین E (آلفا کروفرول)، کاروتنوئیدها و غیره می‌باشند (Carocho *et al.*, 2013; Rossa *et al.*, 2002). تحقیقات بسیاری توان آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک‌ها نسبت به عوامل خارجی را بررسی کرده‌اند که از جمله این تحقیقات می‌توان به تحقیق Nie و همکاران (۲۰۱۳) اشاره کرد که پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی ریزجلبک سبز *Pseudokirchneriella subcapitata* در معرض غلظت‌های مختلف از سه آنتی‌بیوتیک اریترومایسین (ETM)، سیپروفلوکساسین (CPF) و سولفامتوکسازول (SMZ) را بررسی کردند. فاکتورهای مورد بررسی شامل سطح پراکسیداسیون لیپیدی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و سه مکانیزم عمده آنتی‌اکسیدانی بود. ریزجلبک *P. subcapitata*، به روش‌های مختلف ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالای خود را نسبت به قرار گرفتن در معرض SMZ و CPF از آنتی‌بیوتیک ETM نشان داد (Nie *et al.*, 2013). در مطالعه‌ای دیگر که توسط Campa-Córdova و همکاران (۲۰۰۶) صورت گرفت، نشان داده شد که آنتی‌بیوتیک Furazolidone نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های erythromycin و chloramphenicol مهار رشد سلولی بالاتری برای دو ریزجلبک *Isochrysis galbana* و *C. gracilis* داشت (Campa-Córdova *et al.*, 2006). علی‌رغم مطالعات بسیاری که در خصوص سمیت مواد ورودی به اکوسیستم‌های آبی صورت گرفته، پژوهش در مورد سمیت داروها به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها در ریزجلبک‌ها بسیار اندک بوده است. هدف تحقیق حاضر بررسی اثرات بلند مدت (سمیت مزمن) آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراساکلین و فلورفنیکل مورد استفاده در تکثیر و پرورش میگو بر رشد، محتوای کلروفیل a و پروتئین کل ریزجلبک *C. muelleri* می‌باشد.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

آنتی‌بیوتیک OTC (CAT No. O۵۸۷۵)، آنتی‌بیوتیک FLO (C12H14Cl2FNO4S) و اسید گالیک (CAT No. GY۳۸۴) با خلوص بالا از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. همچنین فری سیانید پتاسیم (CAT No. ۲۴۴۰۲۳)، تری کلریک اسید (CAT No. T۶۳۹۹)، سدیم کرینات (CAT No. ۱۶۱۳۷۵۷)، سولفات سدیم (CAT No. ۱۶۱۴۸۰۷)، آمونیوم مولیبدات (CAT No. A۱۳۴۳) و سیدیم هیدروکسید (CAT No. S۸۰۴۵) از شرکت مرک آلمان تهیه شد.

تهیه استوک و کشت ریز جلبک

استوک اولیه ریزجلبک *C. muelleri* از ایستگاه تحقیقاتی بندر کلاهی میناب تهیه شد. ریز جلبک مورد نظر در محیط کشت f/2 با روشنایی 1000 ± 750 لوکس، تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد، شوری ۲۷-۲۵ گرم در لیتر و pH ۷-۸ به صورت نیمه انبوه کشت شد (Banerjee et al., 2011).

تیماردهی با آنتی‌بیوتیک

برای ساخت استوک آنتی‌بیوتیک های FLO و OTC، مقدار یک گرم از آنتی‌بیوتیک مورد نظر در ۱۰۰ میلی لیتر حلال (تانول یا DMSO) حل شد. غلظت های سمیت مزمن آنتی‌بیوتیک ها بر اساس دستورالعمل استاندارد ۲۰۱" سازمان توسعه و همکاری اقتصادی" که برای جلبک‌ها طراحی گردیده تعیین شد (Rodolfo et al., 2011). ریزجلبک *C. muelleri* با تراکم اولیه ۴ هزار سلول در هر میلی لیتر به مدت ۱۲ روز به ترتیب در معرض دوزهای ۴۳/۷ و ۲۰/۵ میلی گرم در لیتر اکسی‌تتراساکلین و فلورفنیکل قرار گرفت

سنجش میزان رشد

پس از معرفی غلظت های مورد نظر آنتی‌بیوتیک ها، نمونه‌های ریزجلبک در طی بازه ۱۲ روزه، به مدت سه روز یک بار جهت تعیین میزان رشد (تراکم سلولی) در سمیت مزمن به وسیله لام هموسیتومتر (مدل Neubauer Improved bright-line chamber, PRECICOLOR HBG, Germany) و با روش پیشنهادی Lavens و Sorgeloos (۱۹۹۶) مورد شمارش قرار گرفتند.

سنجش محتوی کلروفیل a

۱۴ میلی لیتر از نمونه‌ها (هر سه روز) با دور ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و بعداز حذف مایع رویی، لوله های آزمایش حاوی ریزجلبک با فویل آلومینیوم پوشانده شد. سپس استون ۹۰ درصد به آنها اضافه و به مدت ۱ دقیقه ورتکس شدند. پس از استخراج کلروفیل، لوله‌های آزمایش دوباره با دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. میزان جذب نمونه (OD) بوسیله دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۴ نانومتر و ۶۳۰ نانومتر اندازه گیری و با استفاده از فرمول ذیل، محتوای کلروفیل a محاسبه شد (Jeffrey et al., 1975):

Chlorophyll a = $11/47E664 - 0/40E63$.

سنجش پروتئین کل

برای بررسی میزان پروتئین کل از روش برادفورد استفاده شد (Bradford, 1976). برای استخراج عصاره پروتئین ۰/۵ گرم از نمونه در ۱/۵ میلی گرم محلول بافر فسفات حل و در دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس فاز بالایی جدا حاوی پروتئین کل بود گردیده. برای اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد به ۰/۱ سی سی عصاره پروتئینی از هر نمونه ۵ سی سی محلول برادفورد اضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردیده و جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر یادداشت شد.

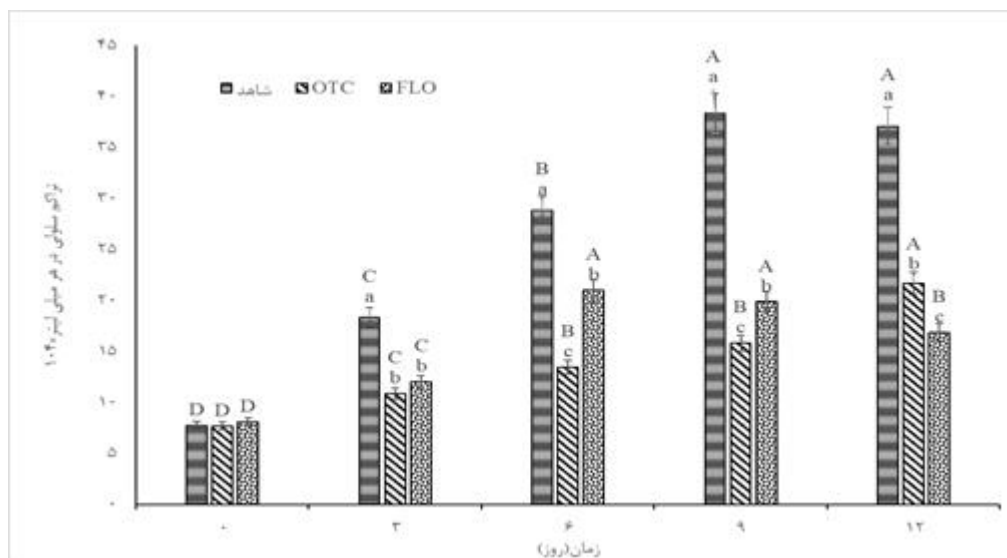
آنالیز آماری

نرمال بودن داده ها به وسیله آزمون Shapiro-Wilk مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی نتایج آزمون و مقایسه میانگین داده ها از آزمون one-way ANOVA استفاده شد. در تمامی بررسی ها سطح معنی دار بودن اختلافها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. ابتدا نرمال بودن داده ها بررسی شد. از آزمون دانکن برای مقایسه تغییرات کلروفیل و پروتئین ریزجلبک در بین نمونه شاهد و تیمار نسبت به یکدیگر در روزهای مختلف آزمایش استفاده شد. تمامی اندازه گیری ها برای فاکتورهای مورد بررسی ریزجلبک سه بار تکرار شد و مقادیر به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش داده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS16 و رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Office Excel 2016 انجام شد.

نتایج

ارزیابی نتایج رشد سلولی

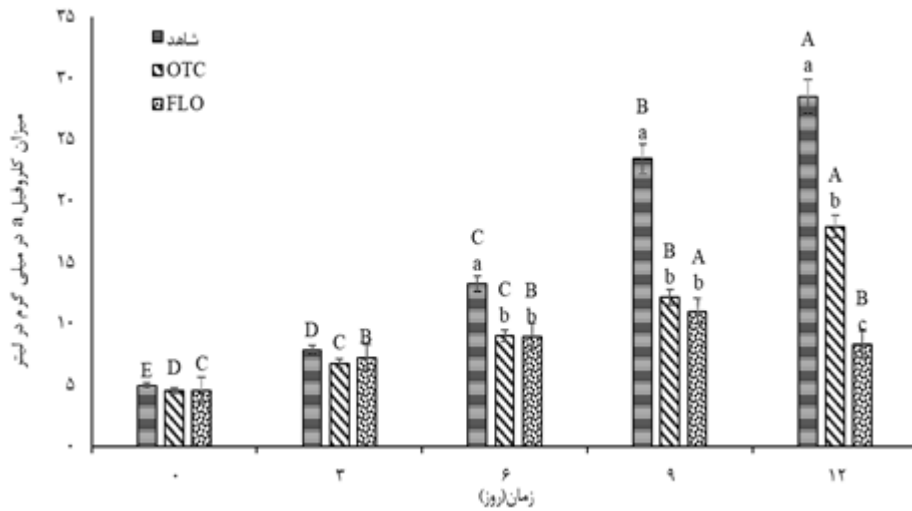
شکل ۱ میزان رشد ریزجلبک *C. muelleri* در تیمارهای مختلف طی ۱۲ روز آزمایش را نشان می دهد. در روزهای ۳، ۶، ۹ و ۱۲، رشد (تراکم) سلولهای *C. muelleri* در گروه کنترل به طور قابل توجهی بیشتر از گروههای تیماری بود که در معرض دوزهای ۴۳.۷ ملی گرم بر لیتر OTC و ۲۰.۵ میلی گرم بر لیتر FLO قرار گرفتند ($p < 0/05$). در تیمار OTC، تراکم سلولهای *C. muelleri* در ابتدا 10.8×10^4 سلول در میلی لیتر بود و سپس در روز دوازدهم به 21.7×10^4 سلول در میلی لیتر افزایش یافت، اما در تیمار FLO، تراکم سلولهای *C. muelleri* در روز سوم 12×10^4 سلول در میلی لیتر بود و در روز دوازدهم به 10.4×19.9 سلول در میلی لیتر افزایش یافت.



شکل ۱. تراکم سلولی ریزجلبک *C. muelleri* در معرض دوزهای ۴۳.۷ ملی گرم بر لیتر OTC و ۲۰.۵ میلی گرم بر لیتر FLO در مدت زمان دوازده روز. حروف بزرگ غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار در تیمار در طی بازه دوازده روز و حروف کوچک غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار داده ها در تیمارهای مختلف در یک روز می باشد ($p < 0.05$).

ارزیابی نتایج کلروفیل a

در این مطالعه با افزایش روزهای تیماردهی با آنتی بیوتیک OTC و FLO محتوی کلروفیل a نسبت به گروه کنترل کاهش چشمگیری داشت. شکل ۲ محتوی کلروفیل a در ریزجلبک *C. muelleri* تیماردهی شده در روزهای مختلف با آنتی بیوتیک های OTC و FLO را نشان می دهد. از روز شروع تست تا روز دوازدهم محتوی کلروفیل a در ریزجلبک (شاهد و تیمار) روند صعودی داشت. از روز ششم به بعد محتوی کلروفیل a نمونه شاهد به طور معنی از نمونه های تیمار دهی شده با آنتی بیوتیک های OTC و FLO بیشتر ($p < 0.05$). بیشترین محتوی کلروفیل a در نمونه شاهد و $28/54 \pm 2/42$ میلی گرم بر لیتر بود. میزان محتوی کلروفیل a در *C. muelleri* در روز ۹، $12/67 \pm 0/21$ میلیگرم بر لیتر بود و تا روز ۱۲ به $8/69 \pm 0/7$ سلول میلی لیتر کاهش یافت.



شکل ۲. محتوی کلروفیل a ریزجلبک *C. muelleri* در معرض دوزهای ۴۳.۷ میلی گرم بر لیتر OTC و ۲۰.۵ میلی گرم بر لیتر FLO در مدت زمان دوازده روز. حروف بزرگ غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار هر تیمار در طی بازه دوازده روز و حروف کوچک غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار داده ها در تیمارهای مختلف در یک روز می باشد ($p < 0/05$).

ارزیابی نتایج پروتئین کل

جدول ۱ محتوای پروتئین کل *C. muelleri* تحت تأثیر آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده را نشان می دهد. محتوای پروتئین کل *C. muelleri* در گروه کنترل در مقایسه با تیمارهای OTC و FLO در روزهای ۳ تا ۱۲ پس از در معرض قرار گرفتن، به طور معنی داری بالاتر بود ($p < 0/05$). علاوه بر این، در تمامی گروه‌های کنترل و آنتی بیوتیکی، از روز ۳ تا ۹ محتوای پروتئین کل *C. muelleri* روند افزایشی معنی داری داشت ($p < 0/05$).

جدول ۱. محتوای پروتئینی ریزجلبک *C. muelleri* در معرض دوزهای ۴۳.۷ میلی گرم بر لیتر OTC و ۲۰.۵ میلی گرم بر لیتر FLO در مدت زمان دوازده روز. حروف بزرگ غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار هر تیمار در طی بازه دوازده روز و حروف کوچک غیرمشابه نشانه اختلاف معنی دار داده ها در تیمارهای مختلف در یک روز می باشد ($p < 0/05$).

روز	تیمار	۱۲	۹	۶	۳
شاهد		۰/۱۰۹±۰/۰۰۵ ^{Aa}	۰/۱۱۲±۰/۰۰۶ ^{Aa}	۰/۱۰۴±۰/۰۰۶ ^{Ba}	۰/۰۹۱±۰/۰۰۲ ^{Ca}
OTC		۰/۰۴۰±۰/۰۰۷ ^{Bb}	۰/۰۴۸±۰/۰۰۳ ^{Ab}	۰/۰۴۵±۰/۰۰۴ ^{Bb}	۰/۰۳۸±۰/۰۰۲ ^{Cb}
FLO		۰/۰۳۸±۰/۰۰۴ ^{Ac}	۰/۰۳۰±۰/۰۰۶ ^{Bc}	۰/۰۲۹±۰/۰۰۱ ^{Bc}	۰/۰۲۱±۰/۰۰۵ ^{Cc}

بحث

در این مطالعه، سمیت مزمن آنتی‌بیوتیک‌های FLO و OTC در ریزجلبک *C. muelleri* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج کاهش قابل توجه رشد جلبک *C. muelleri* پس از سه روز مواجهه با FLO و OTC نسبت به گروه کنترل را نشان داد. همچنین پس از روز نهم تعداد سلول‌ها در همه تیمارها تقریباً ثابت بود که نشان دهنده ورود ریزجلبک به فاز سکون است. در این فاز به دلیل تعادل بین افزایش و مرگ سلولی، تراکم سلولی پایدار است (Xiong *et al.*, 2019). Xiong و همکاران (۲۰۱۷) گزارش نمودند رشد ریزجلبک *Chlamydomonas Mexican* در معرض غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین را بررسی کردند که نتایج مشابهی در پارامترهای رشد در مقایسه با مطالعه حاضر به دست آمده. در این مطالعه، پس از روز نهم، افزایش قابل توجهی در رشد ریزجلبک در تیمار OTC مشاهده شد. این افزایش ممکن است به دلیل تطبیق با محیط و افزایش فراوانی مواد مغذی باشد که رشد متابولیسم ریزجلبک را افزایش داده است. غلظت آنتی‌بیوتیک در محیط کشت، موجب کاهش کلروفیل در نمونه‌های درمانی شده است که منجر به کاهش نرخ فتوسنتز و کاهش رشد شده است. این نتایج با مطالعات قبلی درباره اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر رشد و متابولیسم ریزجلبک‌ها مطابقت دارد (Xiong *et al.*, 2017).

با توجه به نتایج به دست آمده، محتوی کلروفیل a در تیمارهای حاوی آنتی‌بیوتیک نسبت به نمونه شاهد به طور معنی‌داری کاهش یافت. نتایج تحقیق Chen و همکاران (۲۰۱۲) در مورد اثر آنتی‌بیوتیک Cefradine بر ریزجلبک‌های *Microcystis aeruginosa* و *Scenedesmus obliquus* با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. کاهش محتوی کلروفیل a به علت افزایش تولید رادیکال‌های اکسیژن است که باعث پراکسیداسیون این رنگیزه و سرانجام تجزیه شیمیایی آن‌ها می‌شود (Chen *et al.*, 2012). در مطالعه‌ای که بر روی ریزجلبک *T. suecica* انجام شد، اثر سه آنتی‌بیوتیک Chloramphenicol (CHL)، FLO و OTC بر روی روند تغییرات رشد و ترکیبات این ریزجلبک مورد بررسی قرار گرفت (Seoane *et al.*, 2014). نتایج آنها نشان داد که هر سه آنتی‌بیوتیک بر محتوی کلروفیل ریزجلبک سبز *T. suecica* در آنکوباسیون ۹۶ ساعته با غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین مهار را داشته‌اند. پس از ۲۴ ساعت از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک غلظت‌های مختلف تاثیر کاهشی بر محتوی کلروفیل نشان داد. پارامترهای مرتبط با فتوسنتز مانند محتوی کلروفیل نیز پس از ۲۴ ساعت اضافه شدن آنتی‌بیوتیک‌ها تغییر یافته‌اند. آنها نتیجه گرفتند که *T. suecica* به سه آنتی‌بیوتیک CHL، FLO و OTC مورد آزمایش حساس است (Seoane *et al.*, 2014). این نتایج با نتایج بدست آمده در این مطالعه از روند محتوی کلروفیل a در تیمارهای حاوی آنتی‌بیوتیک نسبت به گروه کنترل همخوانی داشت. همچنین، میزان محتوی کلروفیل a ریزجلبک *C. muelleri* در نمونه تیمار OTC پس از اضافه شدن غلظت آنتی‌بیوتیک، ابتدا کاهش یافت؛ ولی در روزهای پایانی (نهم تا دوازدهم) آزمایش، افزایشی محتوای کلروفیل نسبت به روزهای ابتدایی (سوم و ششم) مشاهده شد. صرف نظر از تاثیر غلظت آنتی‌بیوتیک OTC در نمونه تیمار، در نمونه شاهد تا روز نهم آزمایش روند رشد طبیعی ریزجلبک *C. muelleri* مشاهده شد. علت کاهش میزان محتوی کلروفیل پس از روز نهم، وارد شدن ریزجلبک به فاز سکون است که این فاز (سکون) به دلیل ثابت ماندن تراکم سلولی به علت متوازن شدن تکثیر سلولی و مرگ و میر سلولی می‌باشد. Martins و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی اثر آنتی‌بیوتیک *Ciprofloxacin hydrochloride* بر نرخ رشد ویژه و میزان محتوی کلروفیل ریزجلبک *Pseudokirchneriella subcapitata* در غلظت‌های مختلف پرداختند و به این نتیجه دست یافتند که با افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک فاکتورهای ذکر شده نیز کاهش یافت. Geiger (۲۰۱۴) در بررسی اثرات جداگانه و مخلوط دارویی Ciprofloxacin، Ibuprofen، Phenols، Dichloropheno_۲،۴- و Chlorophenol-۳ بر روی ریزجلبک *Chlorella vulgaris* به نتایج مشابهی دست یافتند.

همانطور که پژوهش‌های قبلی نشان داده‌اند، عملکرد آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این مطالعه از طریق اتصال به واحدهای خاص ریبوزوم و مهار سنتز پروتئین می‌باشد (Ferreira *et al.*, 2007). برای تأیید اثر آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده، پروتئین سلول کلی از جلبک‌های ریزوزومی استخراج و با استفاده از آزمون کمی‌سنجی پروتئین BCA و با استفاده از BSA به عنوان

استاندارد، اندازه‌گیری شد. گونه *C.muelleri* حساسیت قابل توجهی در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آزمایش شده نشان داد و این حساسیت با توجه به غلظت کل پروتئین نشان داده شد (جدول ۱). داده‌های این مطالعه نشان داد که اثر نابودکننده آنتی‌بیوتیک FLO نسبت به آنتی‌بیوتیک OTC در طول دوره کشت بیشتر بود ($p < 0.05$). در این مطالعه، با توجه به نمودار کلروفیل a، اگرچه تمام نمونه‌های در معرض آنتی‌بیوتیک روند رشد لگاریتمی را در منحنی کلروفیل a خود نشان دادند، اما شدت و مدت آن‌ها نسبت به کنترل کاهش یافت. به نظر می‌رسد کاهش میزان کلروفیل در درمان‌های آنتی‌بیوتیکی ممکن است ناشی از مداخله در فرآیندهای متابولیکی مرتبط با توسعه طبیعی، به خصوص سنتز پروتئین باشد (Bashir and Cho, 2016). Xiong و همکاران (۲۰۱۷) اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌بیوتیک Ciprofloxacin بر روی فاکتورهای مختلف ریزجلبک *C. Mexican* را بررسی کرده و نشان دادند که پارامترهای رشد از جمله میزان سلول زنده و ترکیبات بیوشیمیایی ریزجلبک در معرض آنتی‌بیوتیک کاهش یافت که با نتایج آنالیزهای انجام شده در تحقیق حاضر مشابه بود.

نتیجه‌گیری کلی

با افزایش زمان ورود آنتی‌بیوتیک به محیط کشت ریزجلبک، اثر مخرب بیشتری به سیستم فیزیولوژیک ریزجلبک *C.muelleri* مشاهده گردید. از سوی دیگر، فعالیت‌های بیوشیمیایی ریزجلبک با افزایش زمان حضور آنتی‌بیوتیک در محیط کشت ریزجلبک *C.muelleri* بالا رفته بود. با توجه به داده‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت تغییرات بسیار کم در افزایش و ورود آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط‌های آبی می‌تواند بر رشد و دوره زندگی آبزیان غیر هدف بویژه ریزجلبک‌ها تاثیر گذار باشد.

منابع

- Assunção, M. F., Amaral, R., Martins, C. B., Ferreira, J. D., Ressurreição, S., Santos, S. D., & Santos, L. M. 2017. Screening microalgae as potential sources of antioxidants. *Journal of applied phycology*, 29(2), 865-877.
- Abd El-Baky, H.H., El Baz, F.K. and El-Baroty, G.S.-2009. Production of phenolic compounds from *Spirulina maxima* microalgae and its protective effect in vitro toward Hepatotoxicity model. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural & Food Chemistry*, 8(12).
- Aruoma, O. 2003. Methodological consideration for characterization potential antioxidant action of bioactive components in plant foods. *Mutation Research*, 524, 9-20.
- Banerjee, S., Hew, W.E., Khatoon, H., Shariff, M., Yusoff, F.M. 2011. Growth and proximate composition of tropical marine *Chaetoceros calcitrans* and *Nannochloropsis oculata* cultured outdoors and under laboratory conditions. *Afr. J. Biotechnol.* 10, 1375-1383.
- Bashir, K.M.I., Cho, M.-G. 2016. The effect of kanamycin and tetracycline on growth and photosynthetic activity of two chlorophyte algae. *BioMed research international* 2016.
- Bermúdez-Almada, M., Espinosa-Plascencia, A., Santiago-ernández, M.L., Barajas-Borgo, C.J. and Acedo-Félix, E. 2014. Comportamiento de oxitetraciclina en camarón de cultivo *Litopenaeus vannamei* y la sensibilidad a tres antibióticos de bacterias de *Vibrio* aisladas de los organismos. *Biotecnica*, 16(3), pp.29-37.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Brown, M.R. 2002. Nutritional value and use of microalgae in aquaculture. *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*, 3, pp.281.
- Cabello, F.C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8(7), pp.1137-1144.

- Campa-Córdova, A.I., Luna-Gonzalez, A., Ascencio, F., Cortés-Jacinto, E. and Cáceres-Martínez, C.J. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture*, 260(1-4), pp.145-150.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51, 15-25.
- Chen, J.Q. and Guo, R.X. 2012. Access the toxic effect of the antibiotic cefradine and its UV light degradation products on two freshwater algae. *Journal of hazardous materials*, 209, pp.520-523.
- Facchini, A. Pena, C. Delerue-Matos and M. C. B. S. M. Montenegro. 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175(1-3): 45-95.
- Ferreira, C. S. G., B. A. Nunes, J. M. d. M. Henriques-Almeida and L. Guilhermino. 2007. Acute toxicity of oxytetracycline and florfenicol to the microalgae *Tetraselmis chuii* and to the crustacean *Artemia parthenogenetica*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3): 452-458.
- Freitas, E.C., Rocha, O. and Espíndola, E.L.G., 2018. Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162: 663-672.
- Geiger, D.F.E. 2014. Individual and Mixture Toxicity of Pharmaceuticals and Phenols on Freshwater Algae *Chlorella vulgaris* (Doctoral dissertation, University of Applied Sciences Technikum Wien).
- Gräslund, S., K. Holmström and A. Wahlström. 2003. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. *Marine Pollution Bulletin*, 46(1): 81-90.
- Hibberd, D. J. 1981. Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes *Eustigmatophyceae* and *Tribophyceae* (synonym *Xanthophyceae*). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 82(2): 93-119.
- Jeffrey, S. W. and G. F. Humphrey. 1975. "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae, and natural phytoplankton." *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* 167(2): 191-194.
- Karsten, U., Lembcke, S. and Schumann, R. 2007. The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta*, 225(4), pp.991-1000.
- Khalili, M. and Ebrahimzadeh, M.A. 2015. A review on antioxidants and some of their common evaluation methods. *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences*, 24(120), pp.188-208.
- Kummerer, K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I. *Chemosphere*, 75, 417-434.
- Le, T. X. and Y. Munekage. 2004. Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam. *Marine Pollution Bulletin*, 49(11-12): 922-929.
- Lavens, P., P. Sorgeloos, Food and A. O. o. t. U. Nations. 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture, Food, and Agriculture Organization of the United Nations.
- Lemmermann, E. 1898. Der grosse Waterneverstorfer Binnensee. Eine biologische Studie. *Forschungsberichte aus der Biologischen Station zu Plön* 6: 166-205.
- Lightner, D.V., and Redman, R.M. 1998. Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164(1), pp.201-220.
- Liu, Y., Guan, Y., Gao, B. and Yue, Q. 2012. Antioxidant responses and degradation of two antibiotic contaminants in *Microcystis aeruginosa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 86, pp.23-30.
- Mata, T.M., Martins, A.A. and Caetano, N.S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, 14(1), pp.217-232.
- Martins, N., Pereira, R., Abrantes, N., Pereira, J., Gonçalves, F. and Marques, C.R. 2012. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. *Ecotoxicology*, 21(4), pp.1167-1176.
- Naderi Farsani, M., Naderi Farsani, M. 2015. Effects of different nitrate levels on growth and fatty acid content in two species of freshwater microalgae. 4(1), 15-28. (in Persian)

- Nie, X.P., Liu, B.Y., Yu, H.J., Liu, W.Q. and Yang, Y.F. 2013. Toxic effects of erythromycin, ciprofloxacin and sulfamethoxazole exposure to the antioxidant system in *Pseudokirchneriella subcapitata*. Environmental pollution, 172, pp.23-32.
- Pakravan S, Akbarzadeh A. . 2017 Teh review of pathogenic mechanism of *Aeromonas hydrophila* and action of tetracycline against it in aquatic animal. J. Aqu. Eco; 6 (4) :1-9 (in Persian)
- Reed, L. A., T. C. Siewicki and J. C. Shah. 2004. "Pharmacokinetics of oxytetracycline in the white shrimp, *Litopenaeus setiferus*." Aquaculture 232(1): 11-28.
- Rodolfo, G. Z. 2011. Society at a Glance. 2011 OECD Social Indicators: OECD Social Indicators. OECD Publishing.
- Rossa, M.M., de Oliveira, M.C., Okamoto, O.K., Lopes, P.F. and Colepicolo, P. 2002. Effect of visible light on superoxide dismutase (SOD) activity in the red alga *Gracilariopsis tenuifrons* (Gracilariales, Rhodophyta). Journal of applied phycology, 14(3), pp.151-157.
- Santos, L. H. M. L. M., A. N. Araújo, A. Facchini, A. Pena, C. Delerue-Matos and M. C. B. S. M. Montenegro., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. Journal of Hazardous Materials, 175(1-3): 45-95.
- Singleton, V.L. and Rossi, J.A. 1965. Colourimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American journal of Enology and Viticulture, 16(3), pp.144-158.
- Seoane, M., Rioboo, C., Herrero, C. and Cid, Á. 2014. Toxicity induced by three antibiotics commonly used in aquaculture on the marine microalga *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butch. Marine environmental research, 101, pp.1-7.
- Soleimani, S., Yousefzadi, M., Rezadoost, H. and Bioki, N.A. 2016. Identification and antioxidant of only hydroxylated naphthoquinone pigments from sea urchin pigments of *Echinometra mathaei*. Medicinal Chemistry Research, 25(7), pp.1476-1483.
- Soobrattee, M.A., Neergheen, V.S., Luximon-Ramma, A., Aruomab, O.I., Bahoruna, T. 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. Mutation Research 579, PP. 200-213.
- Suzuki, N., Koizumi, N., and Sano, H. 2001. Screening of cadmium-responsive genes Tripathi B. N., Gaur J .P. 2006. Physiological behaviour of *Scenedesmus* sP. During exposure to elevated levels of Cu and Zn and after withdrawal of metal stress. Protoplasma. 229, 19.
- Thuy, H. T. T., L. P. Nga and T. T. C. Loan. 2011. "Antibiotic contaminants in coastal wetlands from Vietnamese shrimp farming." Environmental Science and Pollution Research 18(6): 835-841.
- Vijayabaskar, P., Vaseela, N. and Thirumaran, G. 2012. Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated polysaccharide from the brown marine algae *Sargassum swartzii*. Chinese journal of natural medicines, 10(6), pp.421-428.
- Xiong, J.-Q., Kim, S.-J., Kurade, M.B., Govindwar, S., Abou-Shanab, R.A., Kim, J.-R., Roh, H.-S., Khan, M.A., Jeon, B.-H. 2019. Combined effects of sulfamethazine and sulfamethoxazole on a freshwater microalga, *Scenedesmus obliquus*: toxicity, biodegradation, and metabolic fate. Journal of hazardous materials 370, 138-146.
- Xiong, J.-Q., Kurade, M.B., Jeon, B.-H. 2017. Ecotoxicological effects of enrofloxacin and its removal by monoculture of microalgal species and their consortium. Environmental pollution 226, 486-493.



The effect of oxytetracycline and florfenicol antibiotics on growth, chlorophyll a and total protein to microalgae *Chaetoceros muelleri* (Lemmermann, 1898)

Hossein Ghasemi¹, Arash Akbarzadeh^{1*}, Morteza Yousefzadi²

1. Department of Fisheries, Faculty of Marine Science and technology, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran.

2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Qom, Qom, Iran

Abstract

The study aimed to examine the chronic toxicity effects of oxytetracycline (OTC) and florfenicol (FLO) antibiotics, commonly used in shrimp farms, on the growth performance, chlorophyll a content, and total protein of *Chaetoceros muelleri* microalgae. *C. muelleri*, initially at a density of 4,000 cells per milliliter, underwent exposure to oxytetracycline at doses of 7.43 milligrams per liter and florfenicol at 5.20 milligrams per liter for 12 days. Subsequent assessments focused on growth metrics, chlorophyll a content, and total protein. The findings highlighted a significant reduction in the growth, chlorophyll a content, and protein synthesis of *C. muelleri* following exposure to both OTC and FLO antibiotics ($p < 0.05$). Moreover, the study revealed that FLO exhibited higher toxicity toward *C. muelleri* compared to OTC. The observed decline in growth, chlorophyll a content, and protein synthesis in *C. muelleri* under OTC and FLO exposure could be attributed to the inhibitory impact of these antibiotics on cellular respiration and protein synthesis pathways.

ARTICLE TYPE Research

Received: 30 July 2019
Accepted: 1 September 2020
ePublished: 17 December 2023

* Corresponding Author:
akbarzadeh@hormozgan.ac.ir

Keywords: antibiotic, toxicity, florfenicol, oxytetracycline, *Chaetoceros muelleri*.