magiran.com

بررسی اثرات پراکسید هیدروژن در کنترل عفونت‌های قارچی تخم، درصد تخم‌گشایی و ناهنجاری لارو قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

اکبر بنوره[۱]؛ بهروز ابطحی[۲]*؛ عیسی شریف پور[۳] و حسین عبدالحی[۴]

abtahibm@modares.ac.ir

۱و۲- دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، تهران صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

۳ و ۴- مؤسسهٔ تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۶

لغات کلیدی: پراکسید هیدروژن، سبز مالاشیت، قارچ زدگی، قزل آلای رنگین کمان

ساپرولگنیازیس، نوعی بیماری قارچی در ماهیان و تخمهای آنهاست که عامل آن، از قارچهای خانوادهٔ ساپرولگنیاسه می‌باشد (Noga, 2000). این قارچها اساساً در آبهای شیرین زندگی می‌کنند، اما بعضی از آنها می‌توانند شوری تا ۲/۸ قسمت در هزار را تحمل کنند (مخیر، ۱۳۷۴؛ آذری تاکامی، ۱۳۷۶). دستکاری ماهی، تغییر درجهٔ حرارت، وجود آلودگی انگلی و افزایش بار مواد آلی امکان ابتلا به ساپرولگنیازیس را بیشتر می‌کند (Bruno & Wood., 1994).

در کنترل آلودگی به ساپرولگنیا از داروهای شیمیایی استفاده می‌شود. در عین حال آنها را همیشه نمی‌توان با یک معیار بکار برد، زیرا کارآیی و سمیت این مواد در حضور مواد آلی و شرایط فیزیکی وشیمیایی آب متغیر است (Rach *et al.*, ; Howe *et al.*, 1999 1998). از جمله داروهای مؤثر برای درمان یا پیشگیری این عارضه، سبز مالاشیت می‌باشد که بواسطهٔ اثرات مطلوب، همواره مورد استقبال دست‌اندرکاران تکثیر و پرورش ماهی، بویژه در ایران بوده است. در سال ۱۹۹۱، FDA (اداره غذا و دارو در آمریکا) پس از مشخص شدن اثرات مضر سبز مالاشیت نظیر سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی و تجزیهٔ کند آن در طبیعت، استفاده از این دارو را ممنوع اعلام کرد (Marking *et al.*, ; Pottinger & Day, 1999 1994). پراکسید هیدروژن از دههٔ ۱۹۳۰ برای درمان انگلهای خارجی ماهیان آب شیرین و اخیراً برای کنترل شپشک دریایی (Sea lice)، تک‌یاخته‌ها و ترماتودهای تک میزبانه استفاده می‌شود (Schreier *et al.*, 1996).

متاسفانه هنوز در اکثر مزارع تکثیر و پرورش ایران برای جلوگیری از عفونت‌های قارچی از سبز مالاشیت استفاده می‌شود و نیاز است که تحقیقات بیشتری در مورد داروهای جایگزین مثل پراکسید هیدروژن انجام شود. این تحقیق با هدف تعیین کارآیی پراکسید هیدروژن در کنترل ساپرولگنیازیس تخم قزل‌آلا در شرایط شمال ایران انجام شد. بخشی از طرح تحقیق مشابه کارهای انجام شده قبلی در سایر کشورها بوده، اما بواسطه تفاوت مناطق جغرافیایی و تفاوتهای احتمالی در جنس و گونه‌های قارچهای بیماریزا، نتایج متفاوت از کاربرد داروها دور از انتظار نیست.

بخش عملی این تحقیق در کارگاه تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت از آبان تا بهمن ۱۳۸۲ طی مدت ۳ ماه انجام شد. پس از تخم‌کشی از ۱۸ مولد، تخمها با اسپرم مولدین نر لقاح داده شدند. سپس تخمها به مدت حدوداً یک ساعت در داخل تشتک (در محیط بدون نور) قرار داده شدند تا آب جذب کنند. سپس با استفاده از پیمانهٔ مدرج و شمارش حجمی تخمها، تعداد ۱۰۰۰ تخم قزل‌آلا در سینی هر تراف ریخته شد (هر تراف شامل سه سینی و هر تیمار هم شامل سه تکرار بود). ۴۸ ساعت پس از لقاح تیمار دارویی آغاز شد. تیمار دارویی پراکسید هیدروژن (۳۵ مادهٔ فعال) با غلظت ۵۰۰، ۷۵۰

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com

و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر به مدت ۱۵ دقیقه در روزهای متوالی (یک روز در میان) تا روز هفتم صورت گرفت و از روز هفتم تا چهاردهم (۷۰ تا ۱۴۰ درجه روز) دارو درمانی بدلیل حساسیت تخم متوقف شده (Arndt *et al.*, 2001) و از روز پانزدهم دوباره دارو درمانی تا چهار روز قبل از تفریخ صورت گرفت. تیمار دارویی با سبز مالاشیت هم در غلظت ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر (غلظت متعارف کارگاه) بصورت متوالی تا چهار روز قبل از تفریخ انجام شد. در این تحقیق، تیمار شاهد بدون بکارگیری دارو در نظر گرفته شد.

پارامترهای فیزیکی وشیمیایی آب شامل درجهٔ حرارت، pH، اکسیژن محلول، هدایت الکتریکی و سختی دوبار در شبانه‌روز با استفاده از دستگاه Multiline F/SET-3 اندازه‌گیری و ثبت شدند. برای تعیین مقدار پراکسید هیدروژن در آب انکوباتور (جهت شناخته شدن دینامیک تغییرات این ماده در آب) از روش تیتر پرمنگنات پتاسیم استفاده شد. بدین نحو که پس از ۵ و ۱۵ دقیقه که از تیمار دارویی پراکسید هیدروژن گذشت، مقدار مشخصی از آب انکوباتور (۱۰ میلی‌لیتر) را برداشته و۴ تا ۵ قطره اسید سولفوریک ۵ نرمال به آن افزوده و سپس قطره قطره محلول پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۵ مولار اضافه شد تا اینکه در نهایت با تکان دادن ظرف حاوی محلول مورد نظر، رنگ صورتی تثبیت شود (Jeffery, 1989; Rach *et al.*, 1995).

برای تعیین درصد لقاح، تخمها ۹ روز پس از تقسیمات بلاستولایی جهت تثبیت درون اسید استیک ۵ درصد قرار داده شدند (Barnes *et al.*,1998).

عوامل مورد بررسی در این تحقیق و روابط مورد استفاده برای محاسبه آنها عبارت بودند از:

الف) میزان قارچ زدگی (Fungal Infection):

$$I = \frac{\text{تعداد تخمهای قارچ زده}}{\text{تعداد کل تخم ها}} \times ۱۰۰$$

در کنار میزان قارچزدگی از مرحلهٔ لقاح تا چشم زدگی، تعداد توده‌های قارچزده و تعداد تخم در هر توده بعنوان شاخصی بر شدت آلودگی مشخص شد (Barnes ; Barnes & Stephenson, 2003 *et al.*, 1998).

ب) میزان چشم‌زدگی (Arndt *et al.*, 2001):

$$E = \frac{\text{تعداد تخمهای چشم زده}}{\text{مرگ و میر ابتدایی ـ تعداد کل تخمها}} \times ۱۰۰$$

ج) میزان تفریخ (Arndt *et al.*,2001) :

$$H = \frac{\text{تعداد تخمهای تفریخ شده}}{\text{تعداد تخمهای چشم زده}} \times ۱۰۰$$

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و از روش تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج اندازه‌گیری عوامل فیزیکی و شیمیایی آب در دورهٔ انکوباسیون تخمها در زمان انجام تحقیق (ماههای آذر و دی) در جدول ۱ نشان داده شده است.

میزان پراکسید هیدروژن در آب انکوباتور در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه پس از تیمار دارویی در جدول ۲ نشان داده شده است. در طول دارو درمانی با پراکسید هیدروژن در مدت ۱۵ دقیقه، در فاصله‌های ۵ و ۱۵ دقیقه از تیمار دارویی، میزان pH و اکسیژن محلول اندازه‌گیری شد. در میزان pH اختلاف فاحشی دیده نشد (pH ۸±۰/۱)، ولی میزان اکسیژن محلول در طول دارو درمانی حتی به ۱۷ میلی‌گرم در لیتر نیز افزایش یافت.

جدول ۱: نتایج اندازه‌گیری عوامل فیزیکی و شیمیایی آب در دورهٔ تفریخ تخمها

عامل	حداقل	حداکثر	میانگین
اکسیژن (ppm)	۷/۵	۸/۴	۸/۰۵ ± ۰/۵۵
دما (درجه سانتیگراد)	۸	۱۱	۸/۸ ± ۲/۲
pH	۷/۹	۸	۷/۹۵ ± ۰/۰۵
سختی آب (میلی‌گرم بر لیتر)	۱۱۲	۱۴۲	۱۳۲ ± ۲۰
هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتیمتر)	۳۱۲	۳۵۳	۳۳۶± ۲۴

magiran.com

میانگین میزان قارچزدگی، توده‌های قارچزده و تعداد تخم در هر توده در مرحلهٔ چشم‌زدگی در جدول ۳ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که بعلت پایین بودن دمای آب انکوباتور، چشم‌زدگی ۳۲ روز پس از لقاح صورت گرفت. شکل ۱ نمایانگر تخمهای قارچ‌زدهٔ ماهی قزل‌آلا می‌باشد. میانگین درصد چشم‌زدگی در تیمارهای مورد بررسی، در جدول ۴ نشان داده شده است.

نتایج آزمون دانکن بیانگر افزایش میزان درصد چشم‌زدگی در تیمارهای پراکسید هیدروژن با غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر می‌باشد که این دو تیمار با تیمارهای سبز مالاشیت و شاهد صفر اختلاف معنی‌داری داشته و پراکسید هیدروژن با غلظت ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر با بقیهٔ تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). تفریخ کامل تخمها ۴۳ روز طول کشید و درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی در جدول ۵ نشان داده شده است.

جدول ۲: میزان پراکسید هیدروژن در آب انکوباتور در زمانهای ۵ و ۱۵ دقیقه

تیمار پراکسید هیدروژن (میکرو لیتر بر لیتر)	غلظت پراکسید هیدروژن (میکرولیتر بر لیتر)	
	۵ دقیقه	۱۵ دقیقه
۵۰۰	۴۲۰±۴۲	۴۷۰±۳۵
۷۵۰	۶۰۵±۳۹	۷۲۱±۷۱
۱۰۰۰	۸۸۰±۲۶	۱۰۷۳±۶۵

جدول۳: نتایج میانگین میزان قارچزدگی، توده‌های قارچزده و تعداد تخم در داخل هر توده

تیمار	درصد تخم قارچزده	تعداد توده‌های قارچزده	میانگین تعداد تخم در هر توده قارچ زده
پراکسید هیدروژن ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر	۱۵±۴/۷ [b] *	۲۸	۵/۳
پراکسید هیدروژن ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر	۱۲/۷±۶/۵۵ [b]	۲۰/۶	۶
پراکسید هیدروژن ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر	۹/۸±۲/۷ [b]	۱۹	۵/۲
سبزمالاشیت ۱/۵ میلی گرم در لیتر	۱/۱±۱/۵ [a]	۲	۵/۴
شاهد	۹/۷±۴/۵ [b]	۲۳	۴/۳

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P<0/05$).

magiran.com

جدول۴: نتایج میانگین درصد چشم‌زدگی در تیمارهای مختلف

تیمار	درصد چشم زدگی
پراکسید هیدروژن (۵۰۰ میکرولیتر در لیتر)	۶۹±۲/۷^{ab} *
پراکسید هیدروژن (۷۵۰ میکرولیتر در لیتر)	۷۶/۲±۱/۴^{a}
پراکسید هیدروژن (۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر)	۷۲/۶±۵/۱^{a}
سبزمالاشیت (۱/۵ میلی گرم در لیتر)	۶۲/۲±۲/۹^{b}
شاهد	۶۴/۶±۰/۳^{b}

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری هستند (P<۰/۰۵).

جدول ۵: میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی

تیمار	درصد تفریخ
پراکسید هیدروژن (۵۰۰ میکرولیتر در لیتر)	۹۹/۳±۰/۰۹^{ab} *
پراکسید هیدروژن (۷۵۰ میکرولیتر در لیتر)	۹۹/۵±۰/۱۸^{a}
پراکسید هیدروژن (۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر)	۹۹/۳±۰/۲۶^{ab}
سبزمالاشیت (۱/۵ میلی گرم در لیتر)	۹۸/۲±۱/۱^{b}
شاهد	۹۸/۳±۰/۲۴^{ab}

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری هستند(P<۰/۰۵).

نتایج آزمون دانکن بیانگر آن است که درصد تفریخ در تیمار پراکسید هیدروژن با غلظت ۷۵۰ میکرولیتر بر لیتر با تیمار سبز مالاشیت اختلاف معنی‌دار داشته (P<۰/۰۵) ولی با بقیهٔ تیمارها فاقد اختلاف است (P>۰/۰۵).

نتایج حاصل از تیمارهای پراکسید هیدروژن برای تخم قزل‌آلای رنگین کمان حاکی از آن است که پراکسید هیدروژن از لحاظ میزان قارچ‌زدگی ضعیف‌تر از سبز مالاشیت عمل می‌کند ولی از لحاظ میزان چشم‌زدگی پراکسید هیدروژن با غلظتهای ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر بر سبز مالاشیت برتری دارد. همچنین میزان تفریخ در تیمار پراکسید هیدروژن نسبت به تیمار سبز مالاشیت بصورت معنی‌داری بیشتر است و این امر می‌تواند ناشی از آن باشد که تراکم باکتری از مرحلهٔ چشم‌زدگی تا تفریخ در تیمار مالاشیت افزایش می‌یابد و در این حال، پراکسید هیدروژن با از بین بردن باکتری‌های موجود بر روی پوستهٔ تخم باعث افزایش میزان چشم‌زدگی و تفریخ می‌شود (Barnes *et al.*, 2000).

در جمع‌بندی نتایج با در نظر گرفتن تأثیر مثبت پراکسید هیدروژن بر بازماندگی و درصد تفریخ می‌توان آن را داروی مناسبی برای بکارگیری در کنترل بهداشتی کارگاههای تکثیر قزل‌آلا دانست. هر چند اثر قارچ‌کشی پراکسید هیدروژن در مقایسه با سبز مالاشیت کمتر است، کم زیان بودن آن برای کاربران و محیط زیست نکته قابل توجه دیگری برای این ماده محسوب می‌گردد.

magiran.com

تشکر و قدردانی

از همکاری صمیمانه مدیریت مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت، آقای مهندس پاشا و پرسنل محترم آن مرکز که در انجام این تحقیق ما را یاری نمودند، همچنین از آقای مهندس محمد کاظم میرزاخانی که در طول مراحل اجرایی یاور ما بودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

آذری تاکامی، ق. ، ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی. انتشارات پریور، صفحات ۱۲۶ تا ۱۴۶.

مخیر، ب. ، ۱۳۷۴. بیماریهای ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۱۷۶ تا ۱۹۴.

Arndt, E.R.; Wagner, E.J. and Routledge, M.D. , 2001. Reducing or withholding hydrogen peroxide treatment during a critical stage Rainbow Trout development: Effects on eyed eggs, hatch, deformities, and fungal control. North American Journal of Aquaculture. Vol. 63, pp.161-166.

Barnes, M.E.; Ewing, D.E.; Cordes, R.J and Young, G.L. , 1998. Observation on hydrogen peroxide control of *Saprolegnia spp.* during Rainbow Trout egg incubation. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 60, pp.67-70.

Barnes, M.E.; Gabel, A.C. and Cordes, R.J. , 2000. Bacterial population during Rainbow Trout egg culture in vertical-flow tray incubators. North American Journal of Aquaculture. Vol. 62, pp.48-53.

Barnes, M.E. and Stephenson, H. , 2003. Use of hydrogen peroxide and formalin treatments durring incubation of Landlocked fall chinook salmon eyed eggs. North American Journal of Aquaculture. Vol. 65, pp.151-154.

Bruno, D.V. and Wood, B.P. , 1994. Saprolegnia and other oomycets. Fish Disease. CABI Pub. UK. pp.599-659.

Howe, G.E.; Gingerich, W.H.; Dawson, V.K. and Olson, J.J. , 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel cat fish. Journal of Aquatic Animal Healths. Vol. 11, pp.222-230.

Jeffery, G.H. , 1989. Textbook of qualitatve chemical analysis, 5th edition, pp.272-273.

Marking, L.L.; Rach, J.J. and Schreier, T.M. , 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 59, pp.225-232.

Noga, E.J. , 2000. Fish disease: Diagnosis and Treatment. Mosby-Yearbook, Inc, St. Louis, USA. 367P.

Pottinger, T.G. and Day, J.G. , 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for Rainbow Trout: Assessment of pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova, Disease, Aquaculture, Organism, Vol. 36, pp.129-141.

Rach, J.J.; Gaikowski, M.P.; Howe, G.E. and Schreier, T.M. , 1998. Evaluation of toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm and cool water fishes. Aquaculture. Vol. 165, pp.11-25.

Rach, J.J.; Howe, G.E. and Schreier, T.M. , 1995. A miniature hatching system for evaluating chemical treatments on fish eggs. Elsevier Science. Vol. 29, No. 9, pp.2103-2107.

Schreier, T.M.; Rach, J.J. and Howe, W. , 1996. Efficacy of formalin, hydrogen proxide and sodium chloride on fungal-infected Rainbow Trout eggs. Aquaculture. Vol. 140, pp.323-331.

magiran.com

Effects of hydrogen peroxide on fungal desinfection, hatch rate and larval deformities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Banavreh A.[1]; Abtahi B.[2]*; Sharifpour I.[2] and Abdolhay H.[3]

abtahibm@modares.ac.ir

1, 2- Faculty of Natural Resource and Marine Sciences, Tarbiat Modarres University, P.O.Box: 14155-175, Tehran, Iran.

3, 4 - Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran

Received: September 2005 Accepted: July 2007

Keywords: Hydrogen peroxide, Fungal infection, Egg, *Oncorhynchus mykiss*

Abstract

The hydrogen peroxide in concentrations of 500, 750 and 1000µl/l, malachite green with usual concentration (1.5mg/l) and natural control treatments were examined to evaluate the antifungal effects of the chemicals on Rainbow Trout eggs. Hydrogen peroxide and malachite green treatments were performed after 48 hours after fertilization in every other day, until 4 days before hatch, each time for 15 minutes. During experiments, water parameters were measured which were 8.05±0.55mg/l for dissolved oxygen, 8.8 ± 2.2°C for temperature, 7.9± 0.05 for pH, 132±20mg/l for total hardness, and E.C was 336±24 µs/cm. The fungal infection was minimal in malachite green treatment and was significantly different with other treatments ($P<0.05$). The ratio of eyed eggs treated with 750 and 1000µl/l of hydrogen peroxide was significantly higher than malachite green and control treatments ($P<0.05$). The hatch rate in 750µl/l of hydrogen peroxide showed significant difference with malachite green treatment ($P<0.05$) but it was not significantly different with other treatments ($P>0.05$). No significant difference in deformities caused by the treatments were observed ($P>0.05$).

* Corresponding author