magiran.com

ارزیابی کارآیی پراکسید هیدروژن در مقابله با آلودگی قارچی تخمهای تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*)

حبیب وهابزاده رودسری[۱] ؛ محمدرضا احمدی[۲] ؛ امین کیوان[۳] و محمود معصومیان[۴]

Habib.Vahabzadeh@gmail.com

۱- دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران، پونک صندوق پستی: ۱۸۱-۱۹۵۸۵

۲-دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ٦٤٥٣-١٤١٥٥

۳- دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان صندوق پستی: ١٦١٦

۴-موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥

تاریخ ورود: آبان ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۳

چکیده

تکثیر مصنوعی تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) هر ساله جهت بازسازی ذخایر انجام می‌شود. مشکل اصلی انکوباسیون این گونه تلفات زیاد ناشی از قارچهای آبی است. گزینه بهینه برای جایگزینی داروی مالاشیت گرین در آمریکا و بسیاری از کشورهای اروپایی، پراکسید هیدروژن(H_2O_2) می‌باشد که توسط سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) تایید شده و در گروه داروهای با اولویت نظارت پایین (LPR) رده‌بندی شده است. نظر به عدم تجربه استفاده از این ماده در شرایط کارگاههای تکثیر و پرورش تاسماهیان بویژه در ایران، این تحقیق طی دو سال و ٦ سری آزمایش با مقادیر ۷۵۰ ، ۱۵۰۰،۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۹۰۰۰ µl/L بصورت حمام ۱۰ و ۱۵ دقیقه‌ای بر روی تخمهای تاسماهی ایرانی انجام شد. نتایج درصد تفریخ تخمها، مقایسه آماری تعداد کلنی‌های کشت قارچی نمونه‌های تخم و آب انکوباتور و همچنین مقایسه درصد وزنی تخمهای سالم و آلوده به قارچ نشان داد که بسته به شرایط انکوباسیون استفاده ازغلظتهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰µl/L پراکسید هیدروژن بعد از مرحله گاسترولا در انکوباتور یوشچنکو با صعود تخمهای مرده و قارچی به سطح آب علاوه بر تسهیل حذف فیزیکی تخمهای ناسالم، در مقایسه با مالاشیت گرین تا حد قابل قبولی در کنترل عارضه قارچ‌زدگی تخمهای تاسماهی ایرانی موثر بوده است بطوریکه درمقایسه درصد تفریخ در تیمارهای یاد شده با شاهد (مالاشیت گرین) براساس طرحهای آماری، اختلاف معنی‌داری نداشت (۶۴ درصد درتیمار پراکسید هیدروژن و۵۵ درصد درمالاشیت گرین) و با توجه به اثبات برابری کارآیی آن و کم خطر بودن این ماده نسبت به مالاشیت گرین می‌توان از آن برای کنترل ودرمان قارچ‌زدگی تخمهای تاسماهی ایرانی طی دوره انکوباسیون استفاده نمود.

لغات کلیدی : پراکسید هیدروژن، تاسماهی ایرانی، *Acipenser persicus* ، آلودگی قارچی

magiran.com

مقدمه

بیماریهای قارچی مشکلی دامنه‌دار برای پرورش‌دهندگان ماهی می باشند (Rach *et al.*, 1997). گونه‌های قارچهای راسته ساپرولگنیا (Saprolegniales) و سایر قارچهای آبی، ساکنان منابع تامین کننده آب مراکز تکثیر ماهی می‌باشند و اغلب سبب بروز عوارض و بیماریهای جدی در بخش انکوباسیون می‌شوند. این قارچها بویژه در کشتهای متراکم مشاهده می‌گردند (Marking *et al.*, 1994).

از روشهای گوناگونی نظیر جوشاندن، سرد کردن و اکسیژن‌دار کردن آب، ایجاد حرکت چرخشی در تخمها با استفاده از کنترل سرعت جریان آب، روشهای بیولوژیک نظیر استفاده از سخت‌پوستان و تک یاخته‌های جانوری تغذیه‌کننده از قارچها و روشهای الکتروفیزیولوژیک استفاده از تابش‌های ماوراء بنفش(UV) برای کنترل قارچزدگی تخمها استفاده شده است. حمام درمانی با مواد شیمیایی شیوه‌ای رایج برای بسیاری از بیماریها از جمله قارچزدگی در مراحل مختلف زندگی ماهی است. فوستر و وودبوری (۱۹۳۶) برای اولین بار مالاشیت گرین را بعنوان قارچکش موثر در درمان تخم‌های قارچزده ماهیان مصرف نموده‌اند. همچنین باروس (۱۹۴۹) به منظور پیشگیری و درمان آلودگی قارچی تخمهای قزل‌آلا و ماهی آزاد، مالاشیت‌گرین را پیشنهاد نمود. در گذشته مالاشیت گرین، فرمالین و نمک داروهای رایج مورد استفاده در پرورش ماهی بودند. از مالاشیت گرین و فرمالین بعنوان قارچکش در تخمهای قزل‌آلای قهوه‌ای نام برده اند (Cline & Post, 1972). استفاده از مالاشیت‌گرین بدلیل تاثیر ناقص‌الخلقه‌زایی آن در بسیاری از کشورهای جهان مجاز نمی‌باشد (Mayor & Yorgenson, 1984). با اینحال استفاده از نمک در پرورش ماهی ادامه دارد اما در سیستمهای پرورشی جریان‌دار مشکلات حمل و نقل و ذخیره مقادیر زیاد نمک همیشه مشکلاتی را بوجود می‌آورد. همچنین از فرمالین بعنوان یک قارچکش برای تخمهای آزاد ماهیان و سوف ماهیان استفاده می‌شود اما پساب و بقایای آن مشکل ساز خواهد بود زیرا فرمالین سمی است و بحثهایی درباره تخلیه پساب آن به محیط زیست وجود دارد و به همین دلیل بسیاری از مدیران کارگاهها مدعی‌اند که قادر به برآوردن خواستهای سازمانهای حفاظت‌کننده محیط زیست نمی‌باشند (Marking *et al.*, 1994). در این میان تحقیقات نشان داده است که پراکسید هیدروژن ماده موثری در کنترل آلودگیهای قارچی تخمهای ماهی قلمداد می‌گردد (Rach *et al.*, 1997). سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) داروی فوق را در زمره داروهای کم ضرر و با اولویت نظارت کم) طبقه‌بندی نموده است (LRP: Low Regulation Priority) بطوریکه می‌توان مقادیر بالای ۵۰۰μl/L را برای کنترل آلودگیهای قارچی تمام گونه‌ها و مراحل مختلف زندگی ماهی از جمله تخم آن بکار برد. تاثیر پراکسیدهیدروژن بعنوان یک قارچکش و طبقه‌بندی آن در گروه داروهای با اولویت نظارت کم موجب توجه و تاکید تحقیقات در راه استفاده از آن برای سایر بیماریهای ماهی را هم به دنبال داشته است. پراکسید هیدروژن در مقایسه با مواد شیمیایی تجاری دیگر فواید متعددی را برای مراکز تکثیر ماهی به ارمغان می‌آورد مثلاً این ماده در آب به اکسیژن و آب تجزیه می‌شود و برای کاربران هم نسبتاً بی‌خطر است زیرا در طول مدت استفاده فاقد بخارات مضر است. با اینحال در هنگام

magiran.com

کار باید به هشدارهای معمول توجه داشت. اطلاعات اندکی درباره غلظت‌های بکارگیری پراکسید هیدروژن وجود دارد. در این میان مقادیر درمانی براساس گونه ماهی و دمای آب نیز متغیر خواهد بود (Marking *et al.*, 1994).

از جمله گونه‌هایی که تخم آن پس از تکثیر مورد هجوم قارچهای آبی قرار می‌گیرد، تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) است.

روش پیشگیری و درمان رایج قارچزدگی تخمها در ایران تاکنون استفاده از مالاشیت‌گرین و حذف فیزیکی تخمهای قارچزده بوده است. استفاده از روش حذف فیزیکی تخمهای قارچزده نیز سبب هدر رفتن بسیاری از تخمهای سالم می‌شود و برای درمان کفایت نمی‌کند. از آنجا که هدف اصلی ایجاد مراکز تکثیر تاسماهیان حفظ و بازسازی ذخایر طبیعی این گونه‌هاست و نیز مشکلات مهاجرت و تولید مثل طبیعی ناشی از توسعه جوامع انسانی موجب کاهش ذخایر و لطمه جدی به آن شده است (Detlaff *et al.*, 1993)، بنابراین باید تلفات در مرحله انکوباسیون تخمهای تکثیر شده در روش مصنوعی به گونه‌ای کاهش یابد که افزایش کارایی این روش تکثیر، جبران کاستی‌های تکثیرطبیعی ناشی از صید بی رویه و آلودگی آب رودخانه‌ها را نماید. جهت نیل به هدف فوق کارآیی پراکسید هیدروژن بعنوان گزینه اصلی جایگزینی مالاشیت‌گرین مورد ارزیابی و آزمایش قرار گرفت.

مواد و روش کار

ماده اصلی مورد آزمایش پراکسید هیدروژن با فرمول شیمیایی H_2O_2 ساخت کارخانه "Merck" با ۳۰ درصد ماده فعال بود. ماده مورد نظر بصورت حمام درمانی در انکوباتور یوشچنکو بکار رفت. بطوریکه پس از قطع جریان آب در پاکتهای انکوباتور و توقف خروج آب از قسمت ناودانی سرریز، بخشی از آب انکوباتور با مقدار پراکسید هیدروژن طراحی شده ترکیب و دوباره وارد انکوباتور حاوی تخم شد و بمدت زمانهای ۱۵ و ۱۰ دقیقه در این حالت باقی ماند. تیمارهای یاد شده طی دو سال پیاپی آزمایشات با دو نوع شاهد مقایسه گردید. در سال ۱۳۸۰ تخمهای گروه شاهد هیچگونه داروی ضد قارچی را دریافت نکردند (جهت بررسی خاصیت ضد قارچی و تاثیر آن بر درصد تفریخ)، در سال ۱۳۸۱ گروه شاهد تخمهایی بودند که با مالاشیت‌گرین ضد عفونی شدند و درصد تفریخ آنها با تیمارهای مختلف پراکسید هیدروژن مقایسه شد تا مناسبترین مقدار جهت کنترل و درمان قارچ زدگی تخمهای تاسماهی ایرانی شناسایی گردد.

در آزمایش اول استفاده از پراکسید هیدروژن که برای اثبات اولیه خاصیت ضد قارچی این ماده بر روی تخمهایی با درصد لقاح بسیار پایین و غیرقابل تفریخ انجام شد، تخمهای موجود در هر پاکت انکوباتور یوشچنکو پس از پایان دوره پیش بینی شده برای تفریخ طبیعی تخمهای سالم پس از غربال شدن و جداسازی قارچ زده‌ها وتخمهایی که فاقد پوشش قارچی بودند، توزین شدند. با توجه به یکسان

magiran.com

بودن کشت اولیه در انکوباتور درصد وزنی این دو دسته درتیمارها و گروه شاهد از دیدگاه آماری مورد مقایسه قرار گرفت.

طی دوره انکوباسیون و انجام آزمایشهای فوق، اکسیژن محلول آب انکوباتورها، دما و pH آب قبل از شروع، ۱۰ دقیقه پس از آغاز عملیات و پس از پایان آن توسط دستگاههای اکسیژن متر، دماسنج و pH متر دیجیتال اندازه‌گیری و ثبت شد.

با توجه به هدف کنترل آلودگی قارچی و مقایسه اثر پراکسید هیدروژن و شاهد (مالاشیت‌گرین) بر قارچ‌های ساپروفیت محیط انکوباتور و تخمها (زنده ومرده) در هر بار آزمایش پس از بکارگیری پراکسید هیدروژن و مالاشیت‌گرین از تخمهای تحت تیمار و آب انکوباتور همزمان نمونه‌برداری شد. این نمونه‌ها در آزمایشگاه میکروبیولوژی انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری در دو نوع محیط کشت "سابورو دکستروآگارز" و "کورن میل" کشت داده شدند. پس از تشکیل کلنی‌ها، کشت ثانویه انجام شده و در نهایت از آنها اسلاید کالچر تهیه گردید. شناسایی قارچها در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد. همچنین از تخمهایی که تحت تیمار با دارو نیز نبودند نمونه‌گیری و کشت قارچ تهیه شد. پس از کشت اولیه نمونه‌های تخم و آب در محیط کشت، با گذشت ۵ تا ۷ روز کلنی‌های تشکیل شده در هر پلیت شمارش و با توجه به تعداد کلنی‌ها در پلیتهای نمونه شاهد، مقایسه آماری جهت ارزیابی کارآیی پراکسید هیدروژن در کنترل آلودگی قارچ انجام شد.

تعداد تخم در گرم بصورت شمارش تخمکها قبل از لقاح و تخمهای پس از لقاح (پس از آب‌گیری) به دفعات و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱گرم انجام گردید و طبق فرمول زیر تعداد تخم کشت شده در انکوباتور بدست آمد :

تعداد کل تخم کشت شده = وزن کل تخم × گرم / تخم

با توجه به دمای آب بترتیب حدود ۶ ساعت پس از لقاح (در مرحله تقسیم چهارتایی یا بلاستودرم) و حدود ۲۴ ساعت پس از لقاح (پایان گاسترولاسیون) تعداد ۲۰۰ تا ۳۰۰ عدد تخم نمونه‌گیری شد و با استفاده از لوپ چشمی بررسی و تخمهای لقاح نیافته، پارتنوژنز و پلی اسپرمی مشخص و درصد لقاح براساس فرمول زیر تعیین گردید (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳).

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{(تخمهای پارتنوژنز + تخمهای پلی اسپرمی + تخمهای لقاح نیافته)- کل تخمها}}{\text{تعداد کل تخمها}} \times ۱۰۰$$

تعداد تخمهای لقاح یافته نیز با فرمول زیر محاسبه می شد :

تعداد تخمهای لقاح یافته = تعداد کل تخمهای کشت شده × درصد لقاح

همزمان با خروج نوزادان از تخمها آنها را جمع‌آوری و تعداد لارو در گرم محاسبه شد. تعداد کل لارو استحصالی طبق فرمول زیر محاسبه گردید :

تعداد لارو استحصالی = وزن کل لارو استحصالی × گرم/ لارو

magiran.com

درصد تفریخ، یکی از معیارهای اصلی برای مقایسه اثرات تیمارها و شاهد می‌باشد که به روش زیر محاسبه گردید (Rach *et al.*, 1998):

درصد تفریخ = ۱۰۰ × تعداد تخم لقاح یافته / تعداد لارو

محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزارهای Excel 2000 و Statgraph بصورت آنالیزهای واریانس آزمایش توکی و آزمون آنالیز چند دامنه‌ای با اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. با توجه به تغییرات محیطی طی دوره تکثیر و نیز کیفیت متفاوت تخمها از نظر لقاح‌پذیری، در مجموع شش بار آزمایش طی دو سال بعمل آمد. تیمارهای طراحی شده شامل مقادیر ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۳۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۹۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بودند که برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در این آزمایشها درصد تفریخ آزمایشهای دوم، سوم، چهارم و پنجم و درصد قارچزدگی تخمها در آزمایش اول و کشت نمونه قارچی و شمارش کلنی‌های قارچ از آزمایشهای چهارم، پنجم و ششم انجام شد. ضمن اینکه در آزمایش دوم تنها از یک تکرارتمام تیمارها، جهت تعیین اثر حذف فیزیکی تخمهای ناسالم توسط پوآر صورت گرفت و در سایر آزمایشها تخمهای لقاح نیافته از محیط انکوباتور خارج نشدند.

نتایج

دامنه pH اندازه‌گیری شده آب انکوباتورها، طی آزمایشهای دو ساله معادل ۸/۳۰±۰/۲۷ ثبت گردید.

در ۶ بار آزمایش طی دو سال، دمای آب انکوباتورها و مدت زمان انکوباسیون تا تفریخ ثبت گردید (جدول ۱).

جدول ۱ : میانگین دمای آب و زمان انکوباسیون در طی ٦ بار آزمایش

شماره آزمایش	تاریخ شروع	میانگین دمای آب طی انکوباسیون	مدت زمان انکوباسیون (ساعت)
۱	۸۰/۲/۱۴	۲۰± ۱/۵	۱۳۰
۲	۸۰/۲/۲۰	۲۳/۱ ± ۰/۲	۸۰
۳	۸۱/۲/۲	۱۵/۳ ۰±/۴	۱۴۴
۴	۸۱/۲/۱۰	۱۷ ±۰/۵	۱۱۳/۵
۵	۸۱/۲/۱۸	۱۷ ±۰/۲	۱۰۸/۵
۶	۸۱/۲/۲۶	۱۸/۴ ±۲/۵	۱۱۳

شوری آب سالن انکوباسیون مجتمع سد سنگر ۳/۵ قسمت در هزار اندازه‌گیری گردید.

magiran.com

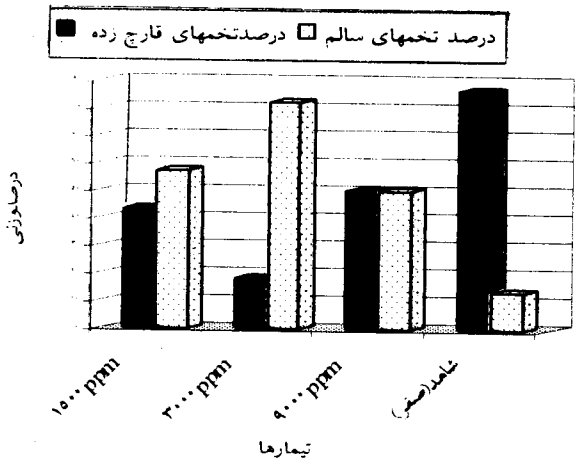
اکسیژن محلول در زمان استفاده از دارو و نیز طی دوره انکوباسیون در هر آزمایش بطور مرتب اندازه‌گیری شد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲ : میانگین اکسیژن محلول در هر آزمایش ودر تیمارهای مختلف

شماره آزمایش	دفعات اندازه گیری	میانگین DO (میلیگرم در لیتر)	مقدار پراکسید هیدروژن مصرف شده در هر تیمار (µl/L)						
			۷۵۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۳۰۰۰	۹۰۰۰	شاهد
۱	٤۳	۹/۱±۰/٤	--	--	۸/۸±۰/۵	--	۹/۲±۰/۸	۹/۷±۱	۸/٦±۰/۷
۲	۱٤	۱۱/۵±۳/۱	--	--	۸/۷±۰/۵	--	۱۰/۹±۳/۹	۱۳/۲±٦/۸	--
۳	۳٦	۱۰/٤±۰/٦	۱۰/۱±۰/٦	--	۱۰/٦±۱/۷	۱۱/۱±۱/۹	--	--	۹/۹±۰/٤
٤	۲۵	۱۳±۲/۹	۱۳/٤±٦/۸	۱۳/۹±٦/۸	۱۱/۵±٤/٤	--	--	--	۹/۸±۱/۰
۵	۱۸	۱۲/۱±۳/٤	۱۲/٦±۸/۵	۱۱/۹±٦/۹	۱۳/۷±۹/٦	--	--	--	۸/۸±۱/۳
٦	۱۹	۱۰/٦±۱/٦	۱۰/۵±۳/۵	۱۰۹±٤/۷	۱۱/٤±٦/۱	--	--	--	۹/۳±۰/۳
میانگین	۲۵/۸	۱۰/۷±۰/٦	۱۱/٦±۲/۰	۱۰/۸±۱/۷	۱۱/٦±۲/۰	۱۱/۱±۱/۹	۹/۷±۱/۲	۱۰/۷±۲/۰	۹/۳±/۳
دفعات اندازه‌گیری	۱۵۳	--	۳٦	۳۰	۲۵	۱۰	۱۵	۱۸	۲۹

مقایسه میانگین درصد تخمهای قارچ‌زده و سالم در تیمارهای ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۹۰۰۰ µl/L که طی ۲۴ ساعت اول پس از لقاح با پراکسید هیدروژن ضد عفونی شده بودند با شاهد در جدول ۳ و نمودار ۱ نشان داده شده است.

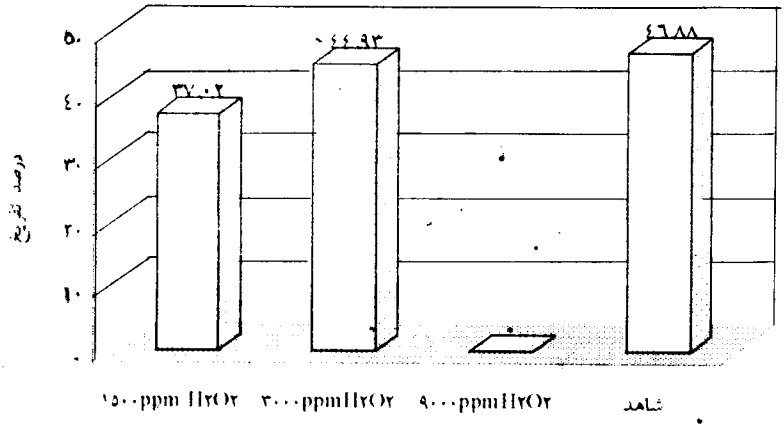
نتایج آزمون توکی نشان می‌دهد که میانگین درصدهای وزنی اندازه‌گیری شده در تیمارها و شاهد با هم دارای اختلاف معنی‌داری است. در این آزمایش تیمار II با تیمار III و تیمار III با شاهد دارای اختلاف عمده‌ای در میانگین‌ها هستند.



نمودار ۱: مقایسه درصد وزنی تخمهای قارچ زده و سالم در تیمارهای آزمایش اول (سال ۱۳۸۰)

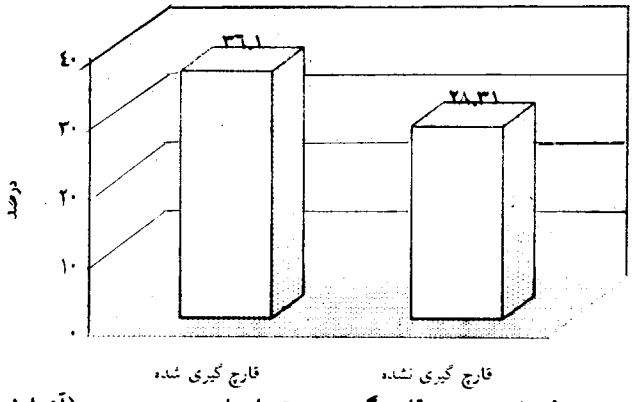
magiran.com

آزمـایش دوم سال ۱۳۸۰: در ایـن آزمایش تخمهایی با لقاح ۶۶/۰۳ درصد بکار رفت. در این عمل طی ۲۴ سـاعت اول پـس از لقاح با مقادیر ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ و ۹۰۰۰ μL/l پراکسید هیدروژن بمدت ۱۵دقیقه مورد درمان واقع شدند که نتایج درصد تفریخ در نمودار ۲ شده است.



نمودار ۲: میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش دوم سال ۱۳۸۰)

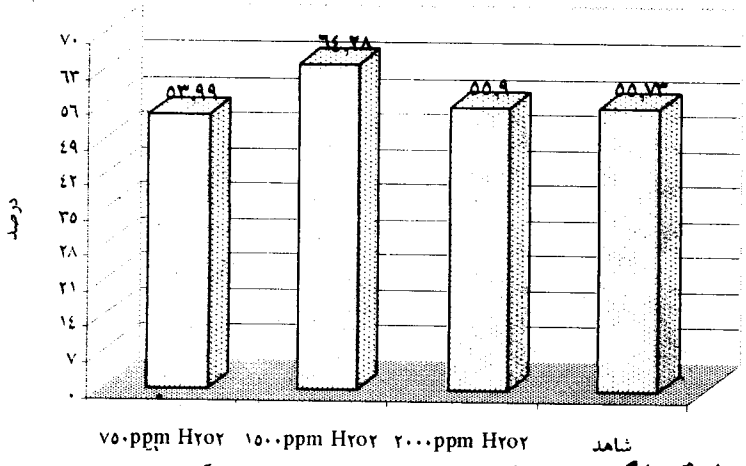
نـتایج آزمـون توکی تنها نشانگر اختلاف تیمار III با سایر تیمارهاست که موجب مرگ تمام تخمها گـردید . در این آزمایش مقایسه عملیات قارچ‌گیری و حذف فیزیکی قارچ هم انجام شد. میانگین درصد تفـریخ تخمهـای قـارچ‌گـیری شده ۳۶/۱۰۵ و تخمهای قارچ‌گیری نشده ۲۸/۳۱۵ بود که از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین این دو مقدار وجود نداشت (نمودار ۳).



نمودار ۳: میانگین درصد تفریخ برحسب قارچ‌گیری در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش دوم سال ۱۳۸۰)

آزمایش سوم (سال ۱۳۸۱): تیمارهای بکار رفته در این آزمایش که درصد لقاح تخمهای مورد استفاده در آن ۹۲ درصـد بود، عبارت بود از: ۷۵۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰ و شاهد (استفاده ازمالاشیت). میانگین درصد تفریخ تخمها در نمودار ۴ نشان داده شده‌اند.

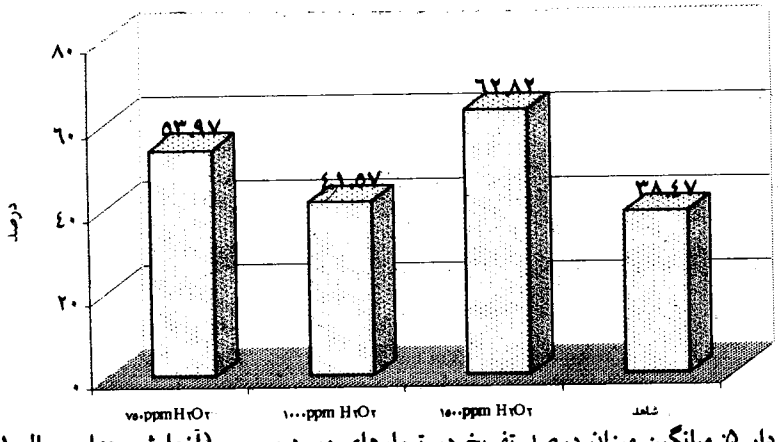
magiran.com



نمودار ۴: میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش سوم سال ۱۳۸۱)

لازم به ذکر است که در تیمار III این آزمایش با توجه به افزایش ناگهانی اکسیژن محلول آب و احتمال آسیب دیدن تخمها زمان اثر ۵ دقیقه در نظر گرفته شد. تجزیه نتایج آزمون توکی نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین درصد تفریخ تیمارها با هم و شاهد وجود ندارد. همچنین میانگین درصد تفریخ در تیمار II ($1500 H_2O_2 \mu l/L$) نسبت به سایر تیمارها و شاهد دارای مزیت نسبی بود.

آزمایش چهارم (سال ۸۱) : با در نظر گرفتن نتایج آزمایش قبلی در این آزمایش تیمارهای ۷۵۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ µl/L و مالاشیت‌گرین (شاهد) با مدت زمان حمام دادن ۱۰ دقیقه‌ای طراحی گردید. (۸۱ درصد = درصد لقاح تخم) میانگین‌های درصد تفریخ تیمارها به شرح نمودار ۵ می‌باشد. تجزیه نتایج آزمون توکی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمار III با شاهد و سایر از نظر درصد تفریخ می‌باشد.

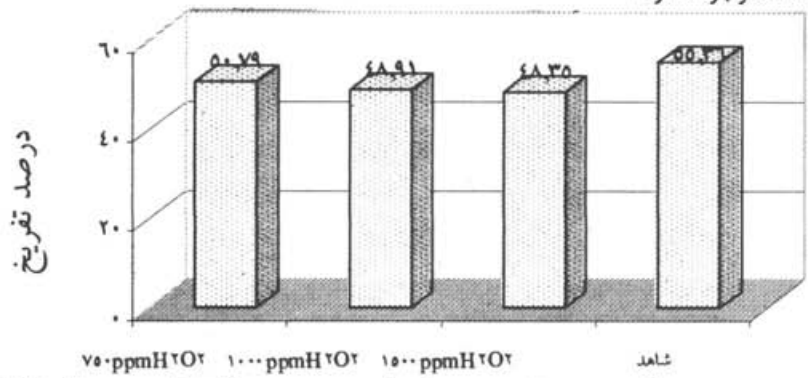


نمودار ۵: میانگین میزان درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش چهارم سال ۱۳۸۱)

آزمایش پنجم (سال ۱۳۸۱): در این آزمایش تیمارها براساس آزمایش قبلی و با همان زمان ۱۰ دقیقه‌ای حمام دادن طراحی شد. درصد لقاح در این آزمایش ۷۳/۷ بوده است. میانگین درصد تفریخ

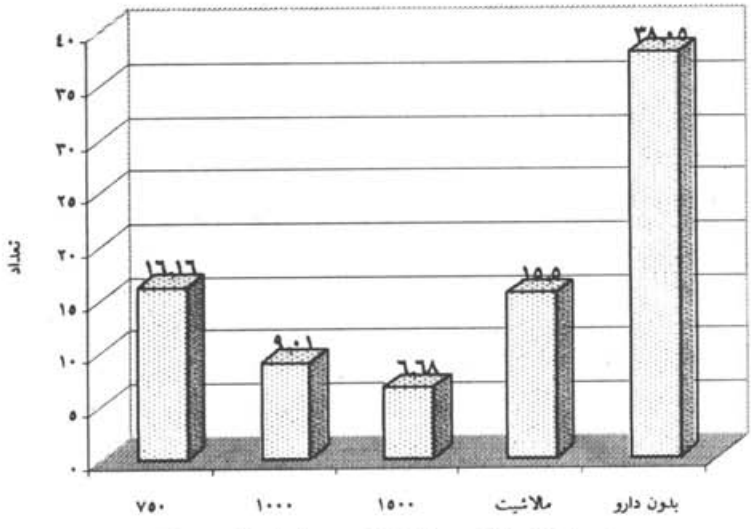
magiran.com

تیمارها و شاهد بشرح نمودار ۶ می‌باشد. نتایج آزمون توکی نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین تیمارها و شاهد وجود ندارد.



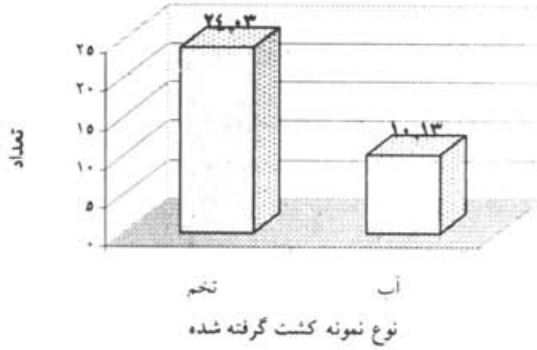
نمودار ۶: میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش پنجم سال ۱۳۸۱)

نتایج شمارش کلنی‌ها در کشت‌های قارچی تهیه شده از نمونه‌های تخم و آب که در زمان قبل از دارو زدن (مالاشیت‌گرین و پراکسید هیدروژن) در تیمارهای ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ مالاشیت‌گرین و صفر گویای اختلاف معنی‌دار تیمار ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ با سایر تیمارهاست. نمودار ۷ نشاندهنده میانگین‌ها می‌باشند، همچنین میانگین‌های تعداد کلنی در نمونه‌های تخم با آب براساس آزمون توکی دارای اختلاف معنی‌دار است. بطوریکه میانگین تعداد کلنی در نمونه‌های آب ۱۰/۱۳۳۳۳ و در کشت نمونه‌های تخم ۲۴/۰۳۳۳۳ بود (نمودار۸). تنها گونه شناسایی شده جنس پنیسیلیوم(*Penicilium*) بود. بنابراین مقایسه اصلی تیمارها براساس تعداد کلنی‌های رشد یافته درمحیط‌های کشت انجام شد زیرا اولا گونه‌های یادشده نمایانگر تمام گونه‌های موجود در محیط انکوباتور نبود و ثانیا امکان تهیه محیط کشت اختصاصی برای تمام گونه‌ها میسر نبود. با اینحال تخمهای قارچ‌زده و پوشیده شده از قارچ ساپرولگنیا (Saprolegnia) بوضوح در انکوباتورها مشاهده شدند (اشکال ۱،۲ و۳).

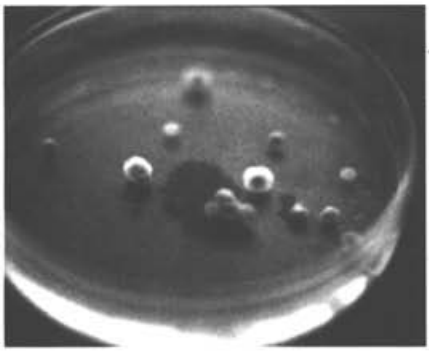


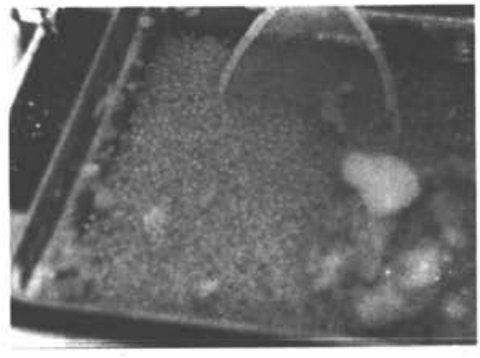
نمودار۷: میانگین تعداد کلنی در تیمارهای مورد بررسی

magiran.com

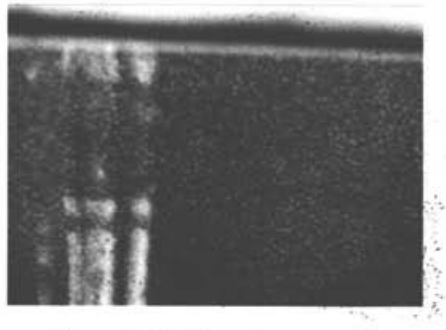


نمودار۸: میانگین تعداد کلنی برحسب نوع نمونه کشت گرفته شده در تیمارهای مورد بررسی





شکل ۱ و ۲ از راست به چپ : تخمهای قارچزده تاسماهی ایرانی در انکوباتور یوشچنکو و آزمایشگاه



شکل ۳: تخمهای سالم (آزمایش اول)

magiran.com

بحث

در این مطالعه که برای اولین بار تاثیر داروی پراکسید هیدروژن در تیمار تخم تاسماهی ایرانی بررسی شد هدف اصلی ارزیابی کارآیی مقادیر داروی یاد شده جهت انتخاب آن بعنوان جایگزینی ایده‌آل برای مالاشیت‌گرین بوده است و آزمایشها براساس روند رایج انکوباسیون تخم تاسماهی در شرایط کارگاههای تکثیر طراحی گردید. طی این آزمایشها سه عامل درصد تفریخ (Rach *et al.*, 1998) در تیمارهای ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۹۰۰۰ µl/L و مالاشیت گرین (شاهد دوم) و شاهد (صفر)، درصد وزنی تخمهای قارچزده و سالم و تعداد کلنی‌های تشکیل شده پس از کشت قارچ نمونه‌های آب و تخم در انکوباتورها بعنوان معیار کارآیی تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفتند. البته موفقیت تفریخ علاوه بر درمان‌های شیمیایی به عوامل دیگری از جمله گونه ماهی، درصد لقاح، سلامت تخمها و مولدین، شرایط لقاح، دستکاری تخم، دمای آب مرحلهٔ جنینی و زمان بکارگیری دارو و سایر عوامل فیزیکی بستگی دارد (Rach *et al.*, 1998; Piper *et al.*, 1982).

تفسیر و تحلیل نتایج آماری در آزمون تجزیه واریانس و توکی حاکی از آنست که در صورت استفاده از ماده پراکسید هیدروژن پیش از اتمام مرحله گاسترولاسیون (حدود ۲۴ ساعت پس از لقاح) تاثیر عمده‌ای بر آلودگی قارچی تخمها نخواهد داشت و حتی مقادیر بالا نظیر ۹۰۰۰ µl/L و ۶۰۰۰ در هر مرحله تمام تخمها را از بین می‌برد (Rach *et al.*, 1998). برغم آنکه در مورد گونه‌های مختلف ماهی مقادیر ۲۵۰ و ۵۰۰µl/L طی ۱۵ دقیقه (Dawson *et al.*, 1994) یا ۱۰۰۰ µl/L به مدت ۱۵ دقیقه را پیشنهاد کرده‌اند (Rach *et al.*, 1998) اما در صورت بکارگیری این ماده پس از مرحله گاسترولاسیون تخم تاسماهی ایرانی بخصوص در مقدار ۱۵۰۰µl/L بصورت حمام ۱۰ دقیقه‌ای علاوه برآنکه تا حد معنی‌داری بر آلودگی قارچی تخمها موثر است بلکه با توجه به شرایط اکسیژن محلول آب، دمای آب، درصد لقاح تخم در مواردی بر شاهد (مالاشیت‌گرین) برتری هم دارد. همچنین مقایسه آماری میانگین تعداد کلنی‌های رشد یافته پس از کشت نمونه‌های آب و تخم نیز موید نتیجه فوق و مزیت نسبی تیمار ۱۵۰۰µl/L می‌باشد. با اینحال نکته قابل توجه وجود تخمهای قارچزده طی دوره آزمایش در تمام تیمارها اعم از شاهد، مالاشیت‌گرین و مقادیر مختلف پراکسید هیدروژن می‌باشد که چنین نتیجه‌ای برای تاسماهی دریاچه‌ای (*Acipenser fluvescens*) نیز گزارش شده است (Rach *et al.*, 1998). بنابراین لزوم حذف تخمهای ناسالم بعنوان سوبسترای رشد قارچ تاکید می‌شود (Noga, 2000; Willoughby & Roberts, 2000). ضمن اینکه این روش موجب سهولت تفریخ لاروها، تنفس و سلامت آنها پس از تفریخ می‌شود (آذری تاکامی و کهنه شهری،۱۳۵۳). نتایج آزمایشها و مشاهدات نشان می‌دهد که استفاده از پراکسید هیدروژن دارای مزیت جداسازی تخمهای قارچزده می‌باشد. مشاهدات دو ساله نشان داد که بمحض ورود پراکسید هیدروژن به آب، تخمهایی که آلوده به قارچ بودند بر اثر چسبیدن حبابهای اکسیژن آزاد شده به بافت قارچ به سطح آب انکوباتور صعود کرده و از سایر تخمها جدا می‌شدند که این امر موجب سهولت جمع‌آوری منابع آلودگی بدون آسیب‌رساندن به تخمهای سالم

magiran.com

بر اثر جابجایی و قارچ‌گیری می‌شود. این خاصیت تاکنون توسط سایر محققان گزارش نشده است. اختلاف معنی‌دار مشاهده شده بین میانگین تعداد کلنی‌های حاصل از کشت نمونه‌های قارچی آب و تخم در زمان‌های بعد و قبل از تیمار با پراکسید هیدروژن و همچنین درصد وزنی تخمهای سالم و قارچزده بیانگر اینست که اولاً داروی پراکسید هیدروژن بعنوان کنترل کننده عارضه قارچزدگی موثر می‌باشد. بنابراین با توجه به مضرات یاد شده مالاشیت‌گرین می‌توان براساس نتایج این تحقیق از پراکسید هیدروژن جهت پیشگیری و درمان آلودگی تخمها به قارچ استفاده کرد، ثانیاً تخمهای سالم دارای مکانیسم مقاومت در برابر قارچزدگی‌اند، این خاصیت در مورد تخمهای ماهی سوف حاجی طرخان (*Perca fluviatilis*) هم مورد تحقیق قرار گرفته است (Paxton & Willoughby, 2000) در نتیجه حذف فیزیکی تخمهای ناسالم و آلوده به همراه دارو درمانی با پراکسید هیدروژن موجب عدم پوشش قارچی تخمها و جلوگیری از خفه شدن جنین می‌شود. نتایج نشان داد که میزان اکسیژن دوره‌ای بمیزان ۳۰۰ درصد حالت اشباع در طولانی مدت باعث تاخیر در زمان تفریخ و عوارض فیزیولوژیک در تاسماهیان می‌شود (ایگومنووا، ۱۹۹۲) ولی در این تحقیق اولاً زمان افزایش ناگهانی اکسیژن کمتر از ۱۰ دقیقه بود و ثانیاً اختلاف زمانی معنی‌داری بین زمان تفریخ در تیمارها و شاهد بوجود نیامد. همچنین تحقیقات نشاندهنده ارتباط ضعیف بین میزان اکسیژن و بازماندگی جنین در یک دوره انکوباسیون می‌باشد (ایگومنووا، ۱۹۹۲). در این مطالعه با توجه به اینکه اختلاف معنی‌داری در زمان خروج از تخم لاروها در تیمارها و شاهد مشاهده نشد، بنابراین اعمال تیمارهای پراکسید هیدروژن در مقادیر طراحی شده در این تحقیق تاثیری بر روند تکوین و زمان تفریخ لاروها نداشت، با توجه به اینکه مدت زمان تغییرات اکسیژن آب انکوباتور نسبت به کل دوره جنینی کمتر از ۰/۰۱ بود. از آنجایی که مهمترین عامل موثر در زمان انکوباسیون دمای آب است (Dettlaff *et al.*, 1993)، در صورت افزایش دمای آب در اواخر دوره تکثیر تاسماهی ایرانی همچنین افزایش کارآیی تکثیر مصنوعی در این زمان (افزایش درصد لقاح)، مناسب‌تر بودن شرایط مولدین و کاهش میزان تخمهای ناسالم و مستعد آلودگی با قارچ می‌توان از مقدار µl/L ۱۰۰۰ هم با توجه به شرایط یاد شده استفاده نمود. از سویی نتایج مقایسه کارآیی پراکسید هیدروژن با سایر قارچ‌کش‌ها از جمله فرمالین و کلرید سدیم نیز حاکی از برتری این دارو بویژه در بکارگیری آن برای تخم ماهیان می‌باشد (Scheier *et al.*, 1996). براساس نتایج مطالعاتی که در زمینه کاربرد پراکسید هیدروژن برای درمان قارچزدگی در سایر مراحل زندگی ماهی از دوره لاروی تا مولد در گونه‌های مختلف ماهی و تاثیر دمای آب برسمیت آن صورت گرفت، باید به مرحله زندگی ماهی، دمای آب و حتی سرعت جریان آب در زمان حمام دادن توجه نمود. با این حال در عمده موارد تا مقدار µl/L ۱۰۰۰و مدت زمان حمام دادن ۱۵دقیقه نتایج مطلوب حاصل شد و تلفاتی گزارش نشده است (Rach *et al.*, 1997). پراکسید هیدروژن در عوارضی همچون بیماریهای باکتریایی آبشش ماهیان، درمان شپش ماهی و انگلهای سطحی برای سایر گونه‌ها (سرد آبی و گرمابی) بکار رفته و حتی در مورد سمیت این ماده نیز بررسیهایی انجام شده است که همگی بر موثر

magiran.com

بودن و سلامت بیشتر این دارو در مقایسه با فرمالین و مالاشیت گرین تاکید دارند Rach ; Rach *et al*., 1998) .(Arndt & Wagner, 1997 ; Dawson, *et al*., 1994 ; Rach *et al*., 2001 ; *et al*., 2000

با توجه به یکسان بودن نتایج مختلف، تحقیقات آتی باید در جهت شناسایی برخی استثنائات یا مطابقت برخی روشها با شرایط کارگاههای تکثیر در ایران و گونه‌های بومی با توجه به شرایط متفاوت تکثیر، انکوباسیون و اختلافات گونه‌ای طبق روال این پژوهش و در صورت لزوم با اعمال برخی اصلاحات ادامه یابد و همچنین محیط‌های اختصاصی کشت برخی گونه‌های قارچ برای تعیین طیف قارچ‌کشی پراکسید هیدروژن تهیه گردد.

تشکرو قدردانی

بدینوسیله از مدیریت مجتمع شهید بهشتی و کارکنان و کارشناسان آزمایشگاه و انکوباسیون مجتمع، معاونت پژوهشی انستیتو بین‌المللی تحقیقات ماهیان خاویاری و بخشهای فیزیولوژی، میکروبیولوژی و اکولوژی انستیتو تحقیقات ماهیان خاویاری، جناب آقای دکتر ابراهیم‌زاده موسوی از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و آقایان مهندس یاوری، مشهدی، بهرامی و یار محمدی از دانشگاه آزاد لاهیجان صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

آذری تاکامی، ق. و کهنه شهری، م. ،۱۳۵۳. تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری انتشارات دانشگاه تهران. ۲۹۸ صفحه.

ایگومنووا، ال. وی. ، ۱۹۹۲. تاثیر افزایش اکسیژن بر روی تکوین جنینی و پیش لاروی فیل ماهی ترجمه: سعید یلقی، ۱۳۷۳. ماهنامه آبزیان سال پنجم، شماره ۹، صفحات ۴۴ تا ۴۷.

Arndt, R.E. and Wagner, E.J. , 1997. The toxicity of hydrogen peroxide to rainbow trout *Onchorhynchus mykiss* and cutthroat trout *Onchorhynchus clarki* fry and fingerlings; Journal of world aquaculture,Vol.28, No.2, pp.150-157.

Burrows, R.E. , 1949. Prophylactic treatment for control of fungus on salmon eggs; progresive fish culturist. Vol. II, pp.97-103.

Cline, T.F. and Post, G. , 1972. Therapy for trout eggs infected with Saporolegnia; Progesive Fish Culture Ist., Vol. 34. pp.148-151.

Dawson, V.K. ; Schnick, R.A.; Rach, J.J. and Schreicr, T.M. , 1994. Crosse center discovers fungci de for immediate use; Am. Fish Soc. Newsltr. Vol. 22, No. 1, 9P.

Dettlaff, T.A. ; Ginsburg, A. S. and Schmathausen, O.I. , 1993. Sturgeon fishes. Translated by Gause and Vassetzky. Springer-Verlag , Germany. 300P.

magiran.com

Foster, F.J. and Woodbury, 1936. The use of malachite green as fish fungicid and anti-septic, Prog Fish culture. Vol. 3, No. 18, pp.7-9.

Marking, L.L. ; Rach, J.J. and Screier, T.M. , 1994. Evaluation of anti fungal agents for fish culture. Prog. Fish-Cult. Vol. 65, No. 4, pp.225-231.

Mayor, F.P. and Jorgenson, T.A. , 1984. Teratological and other effects of malachite green on development in rabbits and rainbow trout. Transaction of the American Fisheries Society. Vol. 112, pp.818-824.

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

Paxton, C.G. M. and Willoughby, L.G. , 2000. Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi. Journal of Fish Biology. Vol. 57, pp.562-570.

Piper, R.G. ; McElwain, I.B. ; Orme, L.E. ; McCraren, J.P. ; Fowler, L.G. and Leonard, R.J. , 1982. Fish hatchery management. US Fish and Wildlife Service. Washington D.C. USA. 517 P.

Rach, J.J. ; Scheier, T.M. ; Howe, G.E. and Schreier, T.M. , 1997. Effect of species, life stage and water temprature on toxicity of hydrogen proxide to fish. Prog. Fish-Cul. Vol. 59, pp.41-46.

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

Rach, J.J. ; Goikwski, M.P. and Ramsay, R.T. , 2000. Efficacy of hydrogen peroxide to control mortalities associated with bacterial gill disease infection on hatchery reared Salmonids. Midwest tribal aquaculture network. Vol. 36, June, 2001. 6 P.

Rach, J.J. ; Goikwski, M.P. and Ramsay, R.T. , 2001. Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestation on hachery reared fish. Midwest tribal aquaculture network. Vol. 36, June, 2001.

Reynolds, E.F. l Parfitt, K. ; Parsons, A.V. and Sweetman, S.C. , 1996. Maritindale (the extra Pharmacopoeia, Royal Pharmaceutical Society. Vol. I, 2738 P.

Schreier, T.M. ; Rach, J.J. and Howe, G.H. , 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. Aquaculture. Vol. 140, pp.323-331.

magiran.com

Willoughby, I.G. and Roberts, R.J. , 1992. Towards strategic use of fungicides against Saprolegnia parasitca in samonid fish hatcheries. Journal of Fish Disease. Vol. 15. pp.1-13.

magiran.com

Evaluation of Hydrogen Peroxide effectiveness in fungal desinfection of *Acipenser persicus* eggs

Vahabzadeh R.H.[1] ; Ahmadi, M.R. [2] ; Keyvan A. [3] and Masoumian M. [4]

Habib.Vahabzadeh@gmail.com

1 – Science and Research Branch, Islamic Azad University, P.O.Box: 19585-181 Tehran, Iran

2- Faculty of Veterniary Medicine, University of Tehran, P.O.Box: 14155-6453 Tehran, Iran

3- Islamic Azad University, Lahijan Branch, P.O.Box: 1616 Lahijan, Iran

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

Received: November 2003 Accepted: May 2004

Keywords:Hydrogen Peroxide, *Acipenser persicus*, Fungal infection

Abstract

Fungal infection during incubation of *Acipenser persicus* eggs claims high mortalities in the hatcheries each year. Malachite Green has been used for many years to disinfect eggs during incubation, but recent studies have shown that the compound might be toxic and potentially mutagenic. In addition, there are implications in the literature for the chemical to be teratogenic and tumor promoter in animals and humans. One of the best replacements for the chemical is Hydrogen Peroxide (H_2O_2) which has been categorized as a low priority regulation (LPR) drug by FDA.

During a two year study, six experiments were carried out on the effectiveness of Malachite Green and Hydrogen Peroxide on the infected eggs of Persian sturgeon with fungi while keeping another group of the eggs as control in Yuschenkov incubators. The chemicals were applied to the eggs at a concentration of 750, 1000, 1500, 2000, 3000 and 9000 µl/l. Hatching rate and number of fungal colonies weight percentage of infected to that of healthy eggs were used to assess the usefulness of the chemicals in controling the infection. The results showed that eggs treated with 1000 and 1500 µl/l of H_2O_2, compared to Malachite Green and other doses of the chemicals, had higher hatching rate, and were free from fungal infections. The separation and removal of the infected eggs was also easier when H_2O_2 was used. Hence, the chemical can be introduced to the sturgeon hatcheries as an appropriate anti-fungal agent.