وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

عنوان:

مقایسه اثرسنجی محلول آنولیت خنثی (Neutral Anolyte) با سبز مالاشیت در کنترل آلودگی قارچی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان در مرحله انکوباسیون

مجری :
عیسی شریف پور

شماره ثبت
٤٧٥٠٥

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی

عنوان پروژه : مقایسه اثرسنجی محلول آنولیت خنثی (Neutral Anolyte) با سبز مالاشیت در کنترل آلودگی قارچی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان در مرحله انکوباسیون
شماره مصوب پروژه : ۹۱۱۲۱-۱۲-۱۲-٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان : عیسی شریف پور
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه ها و طرحهای ملی و مشترک دارد) : -
نام و نام خانوادگی مجری / مجریان : عیسی شریف پور
نام و نام خانوادگی همکار(ان) : محمدرضا مهرابی - شاپور کاکولکی - مریم قیاسی - سلطنت نجارلشکری - حسین عصاییان - محمد صیاد بورانی - محمد اسماعیل راست روان – میثم صمدی - ابوالفضل سپهداری - حسن نظام آبادی – مریم اسلامی -رحمت یوسفی - علیرضا وکیلیان - نسرین خانبانزاده- سید محمد ابراهیم فخارزاده
نام و نام خانوادگی مشاور(ان) : -
نام و نام خانوادگی ناظر(ان) : کاظم عبدی
محل اجرا : استان مازندران
تاریخ شروع : ۹۱/۱/۱
مدت اجرا : ۱ سال و ۳ ماه
ناشر : موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار : سال۱۳۹۵
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

پروژه : مقایسه اثرسنجی محلول آنولیت خنثی (Neutral Anolyte) با سبز مالاشیت در کنترل آلودگی قارچی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان در مرحله انکوباسیون

کد مصوب : ۹۱۱۲۱-۱۲-۱۲-٤

شماره ثبت (فروست) : ٤٧٥٠٥ تاریخ : ۹٤/٥/۲۱

با مسئولیت اجرایی جناب آقای عیسی شریف پوردارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت و بیماری های آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در تاریخ ۹۴/۴/۲۳ مورد ارزیابی و رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ■ پژوهشکده □ مرکز □ ایستگاه □

با سمت مشاور رئیس موسسه و مدیر اطلاعات و ارتباطات علمی و بین المللی در موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور مشغول بوده است.

عنوان	« فهرست مندرجات »	صفحه

چکیده ۱
۱- مقدمه ۳
۲- مواد و روشها ۸
۱-۲- آماده سازی وسایل هچری و معرفی تخم سبز ۸
۲-۲- تیماربندی ۱۰
۳-۲- تیمارداری ۱۳
۴-۲- ثبت داده ها ۱۵
۵-۲- آنالیز آماری ۱۸
۳- نتایج ۱۹
۴- بحث ۳۰
پیشنهادها ۳۳
منابع ۳۴
چکیده انگلیسی ۳۷

چکیده

یکی از مشکلات مهم در صنعت تولید ماهی قزل آلای رنگین کمان بروز آلودگی قارچی تخم در هچری است و در این میان جنس ساپرولگنیا (*Saprolegnia sp.*) مهمترین عامل تلفات تخم در هچری قزل آلای رنگین کمان است. در گذشته کنترل ساپرولگنیازیس در هچری با مالاشیت گرین که یک ماده قارچ کش بسیار موثر است انجام می شده است که اکنون بدلیل ممنوعیت استفاده آن تلاشهای زیادی شده است تا مواد دیگری را بتوان به عنوان یک قارچ کش موثر در هچری جایگزین آن نمود. از مهمترین موادی که در این زمینه مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته اند می توان به فرمالین، کلرید سدیم و پراکسید هیدروژن و...اشاره نمود.

هدف از مطالعه حاضر ارزیابی اثرات محلول آنولیت خنثی حاصل از الکترولیز آب با دستگاه Envirolyte بر در صد تلفات تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان و لاروهای تولیدی از نظر شاخصهای رشد و یازماندگی تا مرحله جذب کیسه زرده و شروع تغذیه فعال لاروهادر مرحله انکوباسیون در مقایسه با سبزمالاشیت گرین بوده است تا بتوان جایگزینی برای آن معرفی کرد.

این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی مشتمل بر ۷ تیمار و ۳ تکرار (در مجموع ۲۱ واحد) و در تراف های کالیفرنیایی با ابعاد cm ۷۰×۳۵×۲۰ (طول×عرض×عمق) که در هر تراف یک انکوباتور قرار داشت انجام گرفت. تیمار ها عبارت بودند از: حمام دائم و مستمر محلول آنولیت با غلظت های ppm ۰/۲۵ و ۰/۵ و تیمارهای دوره ای آنولیت (یک روز در میان) با غلظت های ppm ۳۰ و ۱۰۰ و تیمار دوره ای مالاشیت گرین با غلظت ppm ۲ (یک روز در میان)، شاهد مثبت آلوده شده با قارچ بدون هیچگونه ماده ضد عفونی کننده و شاهد منفی بدون آلوده شدن با قارچ و بدون هیچگونه ماده ضد عفونی کننده.

میزان ۳۰۰ گرم تخم های سبز تازه تکثیر شده قزل آلای رنگین کمان که از یکی از مزارع پرورش ماهی واقع در جاده هراز تهیه شده و با دمای آب تراف ها هم دما شده بودند در کف سبد تراف ها به صورت یک لایه پخش شدند. تمامی تیمارها بجز شاهد منفی بوسیله قارچ ساپرولگنیا، که از تخم های قارچ زده ماهی قزل آلای رنگین کمان که قبلاً از یکی از مزارع پرورش ماهی منطقه دوهزار تنکابن تهیه شده بود، آلوده شدند.

عملیات تیمار داری از آغاز تا انتها حدود یک ماه به طول انجامید. متغیرهای مورد بررسی عبارت بودند از درصد تفریخ، درصد چشم زدگی، درصد ناهنجاری و درصد تخمهای سفید شده که درصد چشم زدگی در میانه و بقیه موارد در انتهای آزمایش محاسبه و ثبت گردید.

در این مطالعه از روش های آماری آزمون تی – استیودنت،آزمون لون، آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون بن فرونی استفاده گردید. برای بررسی ناهنجاری، تفریخ، قارچ زدگی و چشم زدگی تخم ها ابتدا نسبت به تعیین درصد و سپس انجام آزمون من – ویتنی برای مقایسه رتبه ناهنجاری دریکی از تیمارهای آنولیت (که کمترین میزان ناهنجاری را داشت) ومالاشیت گرین اقدام گردید. البته این مقایسه به دنبال تحلیل میزان تفریخ، قارچ

زدگی و چشم زدگی در اثر مواد مورد استفاده در تیمارهای مختلف به کمک روش آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون بن فرونی انجام پذیرفت.

در نتایج حاصل از این بررسی مشخص شد که در دوزهای کمتر آنولیت (۰/۲۵ ppm و ۰/۵ ppm)، میزان شمارش کلنی قارچی آب هچری و نیز درصد قارچ زدگی تخمها، تواما بطور معنی داری بیشتر از دوزهای بالاتر آنولیت (۳۰ ppm و ۱۰۰ ppm) و نیز مالاشیت گرین بود. به عبارت دیگر با افزایش دوز، اثر قارچ کشی نیز افزایش داشته است.

در ارزیابی درصد چشم زدگی مشخص گردید که از نظر آماری درصد چشم زدگی در دو تیمار ۰/۲۵ ppm و مالاشیت گرین بطور معنی داری بیشتر از سه تیمار دیگر آنولیت بوده اند که این مسئله می تواند تفریخ تخمها در دوز ۰/۲۵ ppm و عدم مشاهده تفریخ در سه دوز دیگر را توجیه نماید.

در بین تیمارهای ۰/۲۵ ppm و مالاشیت گرین، گروه ۲۵/ ۰ppm آنولیت به دلیل بالا بودن درصد چشم زدگی تخم ها و کم بودن توتال کانت قارچی می تواند برای ضدعفونی تخم ماهی قزل آلا مناسب تر از مالاشیت گرین مدنظر پرورش دهندگان قرار گیرد.

نتایج این بررسی نشان داد که میزان ناهنجاری در تیمار ۲۵ppm / ۰ در مقایسه با گروه مالاشیت گرین بیشتر بوده است. از آنجایی که این تحقیق اولین بررسی استفاده از آنولیت به عنوان عامل قارچ کش در هچری ماهیان قزل آلای رنگین کمان بوده است لذا برای مطالعه دقیق تر در خصوص دوز و زمان بندی مصرف و عوامل موثر بر این دو نیاز به تحقیقات جامع و گسترده تری وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: ضد عفونی؛ محلول آنولیت خنثی؛ سبز مالاشیت؛ تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان؛ قارچ کش؛ ساپرولگنیا؛ Envirolyte

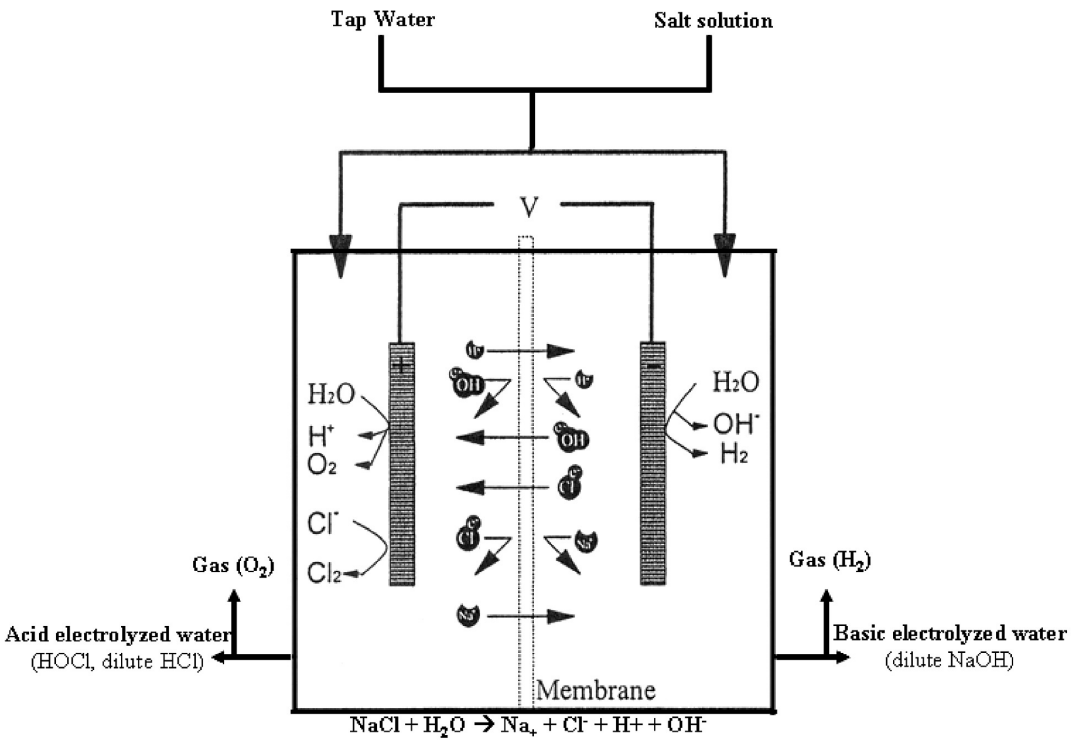
۱-مقدمه

قزل آلای رنگین کمان به دلیل خصوصیاتی چون سادگی در امرتکثیر مصنوعی، سازش خوب آن با شرایط پرورش متراکم، عادت پذیری به غذای دستی و برخورداری از سرعت رشد مناسب امروزه به صورت ماهی شماره یک اکثر مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بیشتر نقاط جهان درآمده است (وثوقی و مستجیر، ۱۳۷۹). در صنعت آبزی پروری ایران نیز این ماهی اهمیت به سزایی داشته و طی چند سال گذشته میزان تولید آن از رشد چشمگیری برخوردار بوده است، بطوریکه طی یک بررسی ۱۰ ساله (از سال ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۹) نشان داده شده است که تولید قزل آلای رنگین کمان به عنوان مهمترین گونه پرورشی سردآبی در کشور از ۹۰۰۰ تن به ۹۱۵۱۹ تن رسیده است (سالنامه آماری شیلات ایران ۱۳۸۹) و با رشد متوسط حدود ۳۰ درصدی طی ۱۵ سال، میزان آن به بیش از ۱۳۱۰۰۰ تن در سال ۱۳۹۱ رسیده است. لیکن یکی از مشکلات مهم در صنعت تولید این ماهی بروز آلودگی قارچی تخم در هچری است و در این میان جنس ساپرولگنیا (*Saprolegnia sp.*) مهمترین عامل تلفات تخم در هچری قزل آلای رنگین کمان است. از مهمترین گونه های شناخته شده این قارچ میتوان به ساپرولگنیا پارازیتیکا (*S. parasitica*)، ساپرولگنیا دیکلینا (*S. diclina*)، ساپرولگنیا فراکس(*S. ferax*)، ساپرولگنیا دلیکا(*S. delica*) و ساپرولگنیا مونیکا(*S. monica*) اشاره نمود(قیاسی ۱۳۸۷). در هچریها، گونه های ساپرولگنیا میتوانند تخمهای مرده ماهیان را آلوده نمایند و از این کانون عفونت در اثر قابلیت شیمیوتاکسی مثبت به تخمهای زنده سرایت کنند. این پدیده در واقع ناشی از سیگنالهای شیمیایی است که از تخم های زنده به قارچ داده میشوند و موجب حرکت قارچ بطرف آنها میگردد. هنگام استقرار قارچ بر روی تخم مرده، زئواسپورهای فراوانی ایجاد میشود که نتیجه آن انتشار آلودگی در تمام هچری است. لذا تخم مرده، مهمترین کانون آلودگی است و وجود آن در هچری موجب افزایش آلودگی قارچی میشود. آنچه که به ایجاد خسارت ناشی از این قارچ در هچری قزل آلا کمک میکند دمای پایین انکوباسیون و دوره نسبتا طولانی تفریخ است (Espeland and Hansen, 2004). در نروژ مشاهده شده که ساپرولگنیا در تابستان و پاییز رشد بیشتری دارد و این زمانی است که درجه حرارت آب به حدود ۱۲ – ۱۱ درجه سانتیگراد می رسد. در این دوره، خطر عفونت در بالاترین حد خود قرار دارد. در شرایط معمول میزان اسپور ۲۰۰ – ۵۰ عدد در لیتر آب هچری است ولی با کاهش درجه حرارت میزان آن تا بیست برابر افزایش می یابد (Van West 2006). از آنجایی که در هچریها تخمهای مرده مهمترین کانون برای شکل گیری کلنی های قارچی هستند لذا حذف تخمهای مرده از محیط هچری یکی از راه های مبارزه با این عوامل قارچی عنوان شده است، لیکن از آنجایی که دستکاری تخمها تا قبل از چشم زدگی می تواند موجب بروز تلفات در تخم شده و زمینه بیشتری را برای بروز ساپرولگنیازیس(Saprolegniasis) فراهم آورد (حسینی ۱۳۸۵)، لذا بکار بردن داروی مناسب که ضمن کارایی مطلوب، دارای حداقل اثرات سمی باشد همواره در جهت مبارزه با گونه های ساپرولگنیا از اهمیت بالایی برخوردار بوده است(ابطحی ۱۳۸۴). باید در نظر داشت قابلیت سهولت مصرف دارو امری مهم در انتخاب آن در مراکز تکثیر است لیکن دامنه سلامت دارویی(marginal

safety) امری فراتر بوده و ابعاد مختلفی را دربر می گیرد. یکی از جنبه های مهم در این زمینه تاثیر داروی مصرفی بر بهداشت انسانی است. همچنین از جنبه اکولوژیک، سلامت دارو ابعاد وسیعتری را در بر می گیرد. از این دیدگاه بررسی تاثیرات زیست محیطی دارو و نیز تاثیر آن بر فرآیندهای فیزیولوژیک ماهی نیز بسیار حائز اهمیت است(Fitzpatrick, *et a*l. 1995).

در گذشته کنترل ساپرولگنیازیس در هچری با مالاشیت گرین که یک ماده قارچ کش بسیار موثر است شروع گردید(Pottinger and Day, 1999). مصرف این ماده از سال **۱۹۳۳** آغاز شد و از آن در جهت کنترل طیف وسیعی از عوامل انگلی استفاده گردید(Meyer and Jorgenson, 1983). این ماده سالیان متمادی بطور گسترده در صنعت آبزی پروری اروپا و نیز در سراسر دنیا مورد استفاده بود و جایگزین مناسبی نداشت زیرا قدرت بالای قارچ کشی آن در مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی به اثبات رسیده بود (Fitzpatrick, *et al*. 1995; Kitancharoen, *et al*. 1997). مالاشیت گرین یک پودر کریستالی سبز است که شکل اکسالات بدون روی آن در آبزی پروری مصرف می شود. این ماده شیمیایی بصورت محلول آبی در ترافها مورد استفاده قرار گرفته و بدین ترتیب به راحتی به محیطهای آبی وارد میشود(Burchmore and Wilkinson, 1993). غلظتهای مختلفی از مالاشیت گرین در درمان عفونتهای قارچی و انگلی استفاده می شود که از ppm۱۰۰ برای چند لحظه غوطه وری تا مصرف نامحدود با دوز ppm۰/۱ در استخرها است(Stoskopf, 1993). مالاشیت گرین بعنوان یک مهار کننده آنزیمهای تنفسی موجب آسیب به سیستم نقل و انتقال انرژی سلولهای قارچی شده و آنها را از هر گونه فعالیت متابولیسمی باز می دارد(Alderman 1985) و احتمالا همین امر است که آن را به یک قارچ کش موثر بدل ساخته است. لیکن این ماده موثر قارچ کش قادر به ایجاد عوارض متنوع در لاروها و نیز ماهیان بزرگتر است. از مهمترین عوارض جانبی مصرف این ماده بروز عوارض ناقص الخلقه زایی(Teratogenic) در لارو ها می باشد. مهمترین آنومالی ایجاد شده ناشی از مصرف مالاشیت گرین در تخم ها بروز شکست های کرموزومی (Chromosome breaks) است که در لارو ماهیان قزل آلای رنگین کمان گزارش شده است. مطالعات نشان داده است که مصرف این ماده در هچری می تواند عوارض شکلی(Deformity) را در لارو قزل آلا سه تا پنج برابر افزایش دهد (Meyer and Jorgenson, 1983). از دیگر عوارض این ماده می توان به سرطانزایی (Cancerogenic) و جهش زایی(Mutagenic) آن اشاره نمود. مطالعات نشان داده است که مالاشیت گرین قابلیت ترکیب با DNA خصوصا در نواحی غنی از آدنین و تیمین را دارد و این فرآیند احتمالی است که سبب بروز عوارض ذکر شده می شود. از سوی دیگر این ماده طی متابولیسم احیا شده و تبدیل به لکومالاشیت (Leucomalachite) که ماده ای بیرنگ است میگردد. لکومالاشیت نیز قادر است بصورت کووالانت با بخشهایی از مولکول DNA ترکیب شده و نقش مهمی در ایجاد عوارض یاد شده داشته باشد (Culp and Beland, 1996). از سوی دیگر باید توجه داشت که لکومالاشیت قدرت باقی ماندگی در بدن ماهی را نیز دارد. این ماده در سرم، کبد، کلیه، عضله، پوست و احشا باقی می ماند (Srivastava, *et al*. 2004) و احتمال دارد عوارض خود را با مصرف ماهیان آلوده در انسانها نیز ایجاد نماید لذا به

همین دلیل مصرف این ماده در کشور آمریکا و کانادا از سال ۱۹۹۱ منع قانونی یافته است (Marking, *et al.* 1994). به همین دلیل تلاشهای زیادی شده است تا مواد دیگری را بتوان به عنوان یک قارچ کش موثر در هچری جایگزین مالاشیت گرین نمود. از مهمترین موادی که در این زمینه مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته اند می توان به فرمالین، کلرید سدیم و پراکسید هیدروژن اشاره نمود. هریک از این مواد علی رغم موثر بودن نقاط ضعفی نیز دارند. بطور مثال فرمالین با باقی ماندن در محیط عوارض زیست محیطی داشته و از سوی دیگر بدلیل خاصیت فیکس کنندگی و تخریب سلولهای مخاطی برای کارگرانی که با آن در تماس هستند بسیار خطرناک است (Fitzpatrick, *et al.* 1995). کلرید سدیم با اینکه بسیار کم خطر و نیز ارزان قیمت است لیکن در غلظتهای بیش از mg/L ۳۰۰۰۰ موثر است که این امر می تواند سبب بروز مشکلات اسمزی در سلول زنده شود (Kitancharoen, *et al.* 1997). پراکسید هیدروژن داروی خوبی برای مقابله با ساپرولگنیازیس است و کمترین عوارض انسانی و زیست محیطی را دارد ولی در استفاده از آن باید به نوع گونه ماهی، مراحل زیستی و دمای آب دقت نمود(Rach, *et al* 2005). یکی از روشهایی که اخیرا برای ضد عفونی در صنعت پرورش طیور و نیز صنایع غذایی در اروپا و آمریکا مورد استفاده قرار گرفته است آب الکترولیزه شده است. تکنولوژی آب الکترولیز شده اولین بار در حدود سال ۱۹۰۰ در صنعت تولید سود سوز آور و جوش شیرین که تولید هیپوکلریت سدیم را هم شامل می شد مورد استفاده قرار گرفت. از سال ۱۹۸۰ این تکنولوژی به عنوان یک ضد عفونی کننده خوب برای آب نگهداری شده در مخازن به بازار معرفی گردید. با بهبود تکنولوژی و تولید ابزارآلات ساده تر در این زمینه، تکنولوژی الکترولیز در زمینه های مختلف مورد استفاده قرار گرفت و امروزه به عنوان یک رهیافت بی نقص و بی نیاز به پروسه حرارتی برای کنترل بهداشتی مورد استفاده قرار گرفته است(Youshida, 2003). مطالعات نشان داده است افزودن ۰/۲٪ کلرید سدیم به آب و قرار گرفتن آن در یک محفظه الکترولیز در جایی که الکترودهای آند و کاتد توسط یک غشا از هم جدا می شوند باعث می شود مولکولهای سدیم و آب به Na^+ و H^+ تبدیل و به طرف الکترود منفی و یونهای Cl^- و OH^- بطرف الکترود مثبت کشیده شوند و به این ترتیب در این پروسه آب اکسید کننده (Electrolyzed oxidative water) (EOW) و آب احیا کننده (Electrolyzed reduced water) (ERW) هم زمان با هم تولید شوند (Al-Haq, *et al.* 2005) (تصویر ۱).



تصویر ۱: نمایی شماتیک از ژنراتور تولید کننده آب الکترولیز شده و ترکیبات بدست آمده (Al-Haq, *et al.* 2005)

کلرین در بخش آند (آب اکسید کننده یا اسیدی) و H2 در کاتد (آب قلیایی یا احیا کننده) تولید می شوند. CL2 تولید شده با آب واکنش داده و به HOCL و HCL تبدیل می شود. در این قسمت pH بین ۴/۵ – ۲/۵ بوده و HOCL هرچند قدرت اسیدی پائینی دارد ولی از قدرت ضد عفونی کنندگی بسیار بالایی برخوردار است (White, 1992). به این ترتیب آب الکترولیز شده اکسید کننده(EOW) یا آنولیت، تبدیل به ماده ای با خاصیت اکسید کنندگی بالا شده و قدرت بالایی درکشتن ویروسها، باکتریها و قارچ ها پیدا میکند (جدول ۱).

جدول ۱ – نمونه ای از میکروارگانیسمهایی که اثر مثبت ضدعفونی کنندگی آنولیت بر آنها بررسی شده است.

(**Morita, *et al*. 2000; Buck, *et al.* 2002; Kashiwagi, *et al* 2000; Al-Haq, *et al*. 2005**)

ویروس	باکتری	قارچ
Hepatitis B virus (HBV)	*Bacillus cereus* *B. subtilis*	*Alternaria sp*.
Human immunodeficiency virus (HIV)	*Campilobacter jeojeni*	*Aspergillus flavus* *Aspergillus niger*
	Enterobacter aeroginosa	*Cladosporium sp*.
	Escherichia coli O157:H7	*Curvularia lunata*
	Listeria monocytogenes	*Epicoccum nigrum*
	Pseudomonas aeruginosa	*Fusarium moniliforme* *Fusarium sp.*
	Salmonella enteritidis *S. typhimurium*	*Helminthosporium sp*.
	Staphylococcus aureus	*Trichoderma spirale*
	Streptococcus sp.	*Erwinia chrysanthemi*
	Mycobacterium tuberculosis *Mycobacterium bovis*	*Saprolegnia parasitica*

امروزه استفاده از آنولیت در صنایع غذایی، کشاورزی، دامپزشکی و پزشکی کاربرد فراوان دارد. بطور مثال در مراکز تولید جوجه های یک روزه، اسپری آنولیت بر تخم مرغها در هچری موجب کاهش چشمگیر گروه باکتریهای آنتروباکتریاسه و باکتریهای هوازی گردید. با این عملکرد از یک سو تلفات دوره جنینی را کاهش داده و از سوی دیگر بهبود راندمان هچ و جوجه درآوری را سبب گردید (Fasenko, *et al*. 2009). همچنین از آنولیت در جهت افزایش زمان ماندگاری محصولات کشاورزی و حفظ آنها از فساد میکروبی و قارچی استفاده فراوان می شود (Al-Haq, *et al*. 2001; Al-Haq, *et al.* 2005)، لیکن از استفاده این فناوری و کاربرد آن در صنعت آبزی پروری اطلاعات چندانی در دسترس نیست. در این بررسی تلاش شده است که کارایی محلول آنولیت خنثی که به روش الکترولیز آب با نمک طعام تولید می شود را با سبز مالاشیت که مؤثرترین ماده قارچ کش در هچری ماهی قزل آلای رنگین کمان است مقایسه گردد. در صورت اثبات کاربردی بودن این فناوری و قابل رقابت بودن آن با سبز مالاشیت میتوان این فناوری را در سطح گسترده به تمام مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلای رنگین کمان معرفی نمود تا از یک سو با کاهش هزینه های درمان و هزینه های کارگری نسبت به کاربرد دیگر مواد ضد عفونی کننده، هزینه های کمتری به پرورش دهنده تحمیل شود و از سوی دیگر با افزایش راندمان تولید شاهد کمترین عوارض زیست محیطی نیز باشیم.

۲ - مواد و روش ها

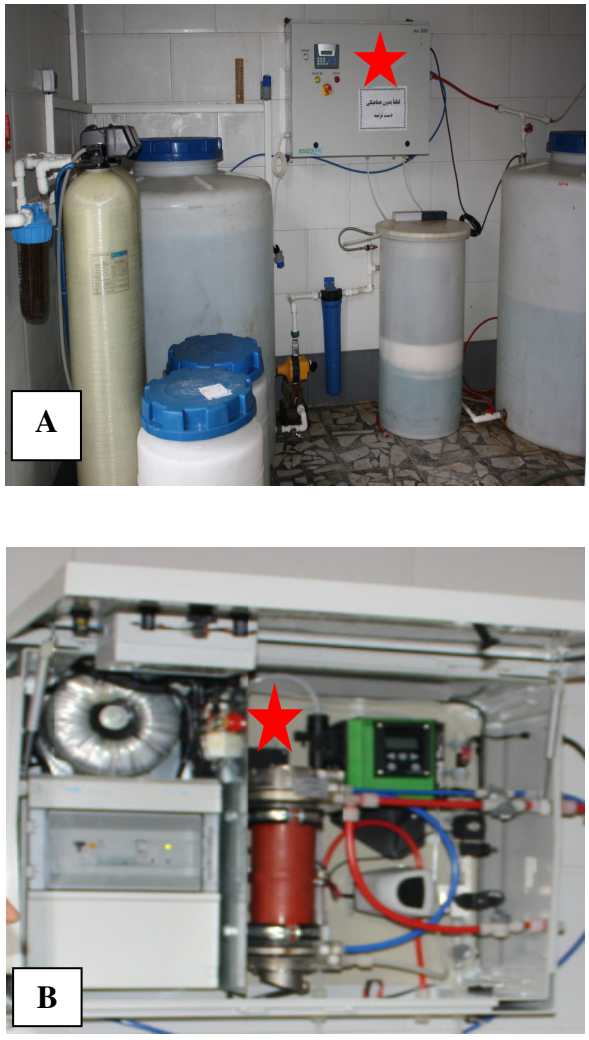
۲-۱- آماده سازی وسایل هچری و دستگاه تولید محلول آنولیت خنثی

واحد آزمایش در این بررسی تراف کالیفرنیایی با ابعاد ۷۰×۳۵×۲۰ cm (طول×عرض×عمق) بود (تصویر ۲) که در هر تراف یک انکوباتور قرار گرفت. عمق آبگیری هر تراف برابر ۲۰ سانتی متر و ارتفاع آب روی تخم ها برابر ۱۰ سانتیمتر تنظیم گردید. دبی ورودی آب هر تراف برابر ۴ تا ۶ لیتر در دقیقه تنظیم شد. همچنین برای جلوگیری از تابش نور به تخم ها روی هر تراف به وسیله یک لایه کارتن پلاست پوشیده شد. برق سالن انکوباسیون نیز تا زمان چشم زدن تخم ها حتی الامکان خاموش ماند. پس از چشم زدگی نیز شرایط تاریکی تا حد ممکن برای تخم ها در نظر گرفته شد (Kashiwagi, *et al.*, 2000).

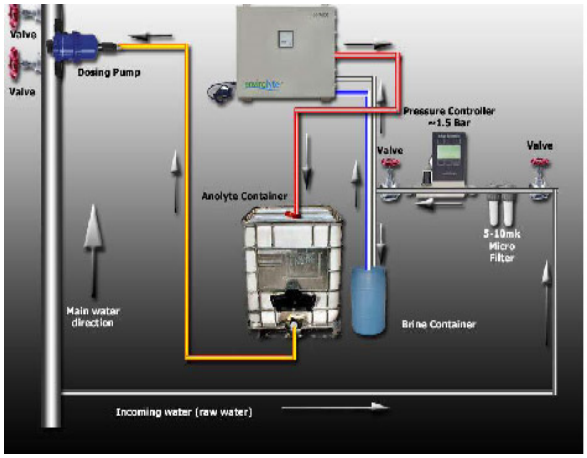
تصویر ۲: تراف های کالیفرنیایی مورد استفاده در سالن انکوباسیون که با یک لایه کارتن پلاست پوشیده شده اند.

برای تولید محلول آنولیت خنثی از دستگاه Envirolit، مدل ela 2000، ساخت کشور لهستان، به نمایندگی شرکت خسرو مدیسا طب (KMT) در ایران، استفاده گردید (تصویر ۳). این دستگاه با استفاده از جریان مستقیم برق، قادر به تجزیه نمک موجود در آب به یونهای کلر منفی و سدیم مثبت است، یعنی در حقیقت اساس این تکنولوژی بر مبنای الکترولیز آب و نمک می باشد. بدینصورت که آب ورودی سیستم ابتدا سختی گیری شده و سپس با نمک خالص ترکیب و از یک غشاء تراوا عبور داده می شوند. در مرحله بعد مقدار معینی از این ترکیب از طریق پمپ تعیین کننده دوز (Dosing pump) وارد دستگاه شده و سپس عمل تجزیه کاملا به صورت خودکار انجام می شود. این تکنولوژی و محلول گندزدای تولیدی، حاصل الکترولیز آب و نمک بوده که در آند و کاتد سبب ایجاد ترکیبات شیمیایی مؤثری می شود. نام محلول گندزدای تولیدی میکس اکسیدانت یا اکسید کننده مرکب (Mixed oxidant) می باشد که در این حالت به آن آنولیت نیز می گویند. ترکیبات تشکیل شده در آند عبارتند از: کلرفعال آزاد (FAC)، دی اکسید کلر (CLO2)، ازن (O3) و اکسیژن (O2). دستگاه به گونه ای طراحی شده است

که محصول تولیدی کاتد یعنی سود سوز آور (NaOH) به عنوان کاتولیت از دستگاه خارج می شود. البته این محصول می تواند برای تنظیم pH محصول نهایی از طریق شیر تنظیم به آن اضافه شود. اهمیت این نکته از آن جهت است که pH فرآورده آنولیت پایین می باشد، از این رو با تغییر درجه شیر کاتولیت تنظیم pH دستگاه صورت می پذیرد و آنولیت به آنولیت خنثی تبدیل می شود (تصویر ۴).



تصویر ۳- دستگاه Envirolit مورد استفاده در این تحقیق:
A) مجموعه سیستم B) قسمت مرکزی الکترولیز کننده آب و نمک (★)



تصویر ٤: شمای دستگاه Envirolit که محصول نهایی آن آنولیت خنثی می باشد.

۲ – ۲ – تیمار بندی و معرفی تخم سبز

این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی مشتمل بر ۷ تیمار و ۳ تکرار (در مجموع ۲۱ واحد) انجام گرفت. تیمار ها عبارت بودند از: حمام دائم و مستمر محلول آنولیت با غلظت های ppm ۰/۲۵ و ۰/۵ و تیمارهای دوره ای آنولیت (یک روز در میان) با غلظت های ppm ۳۰ و ۱۰۰ و تیمار دوره ای مالاشیت گرین با غلظت ppm ۲ (یک روز در میان)، شاهد مثبت آلوده شده با قارچ بدون هیچگونه ماده ضد عفونی کننده و شاهد منفی بدون آلوده شدن با قارچ و بدون هیچگونه ماده ضد عفونی کننده. تراف ها و انکوباتورهای مورد استفاده برای انجام آزمایش ها، با مایع ظرفشویی شستشو و با سولفات مس ضد عفونی شدند. سپس از تخم های سبز تازه تکثیر شده قزل آلای رنگین کمان که از یکی از مزارع پرورش ماهی واقع در جاده هراز تهیه شده (تصویر ۵) و با دمای آب تراف ها هم دما شده بودند (تصویر ۶) میزان ۳۰۰ گرم با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت گرم توزین شد (تصاویر ۸–۷) و سپس در کف سبد تراف ها به صورت یک لایه پخش شدند. لازم به ذکر است که تعداد در گرم تخم برابر ۱۵/۳ عدد محاسبه شد، لذا حدود ۴۶۰۰ عدد تخم در هر تراف قرار گرفت. قبل از ورود تخم سبز به تراف ها فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب تراف ها اندازه گیری و ثبت شدند.

تمامی تیمارها بجز شاهد منفی بوسیله قارچ ساپرولگنیا آلوده شدند، به این ترتیب که از تخم های قارچ زده ماهی قزل آلای رنگین کمان که قبلاً از یکی از مزارع پرورش ماهی منطقه دوهزار تنکابن تهیه شده بود (تصویر ۹) تعداد ۵۰ عدد شمارش و آماده شد (تصویر ۱۰) و در پارچه تنظیفی قرار داده و با نخ بسته شد (تصویر ۱۱) و به داخل سینی تراف ها منتقل گردید.

تصویر ٥: تخم سبز تازه تکثیر شده قزل آلای رنگین کمان که از یکی از مزارع پرورش ماهی واقع در جاده هراز تهیه شده بود.

تصویر ٦: هم دما سازی تخم های سبز با دمای آب تراف ها قبل از ورود به تراف های آزمایش

تصویر ۷: توزین دقیق تخم های سبز با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت گرم قبل از ورود به تراف های آزمایش

تصویر ۸: ۳۰۰ گرم تخم سبز تازه تکثیر شده قزل آلای رنگین کمان (حدود ٤٦٠٠ عدد تخم) پس از توزین دقیق برای هر تراف منظور شد.

تصویر ۹: تخم های قارچ زده ماهی قزل آلای رنگین کمان که از یکی از مزارع پرورش ماهی منطقه دوهزار تنکابن تهیه شده بود برای آلوده کردن تراف های آزمایش استفاده شد.

تصویر ۱۰: شمارش و آماده کردن تخم های قارچ زده برای آلوده کردن تراف های آزمایش.

تصویر ۱۱: تعداد ۵۰ عدد تخم قارچ زده در پارچه تنظیفی قرار داده و با نخ بسته شد و به صورت معلق در آب، برای ایجاد آلودگی در داخل تراف ها قرار داده شدند.

۳-۲- تیمار داری

دمای سیستم در زمان معرفی تخم سبز در حدود ۱۴ درجه سانتیگراد ثبت گردید. در طول دوره انکوباسیون فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، pH، اکسیژن محلول و سختی در هر روز و به تفکیک هر تراف اندازه گیری شد تا شرایط یکسان برای کلیه تیمارها فراهم گردد. تعداد تخمهای تلف شده طی مراحل انکوباسیون در تیمارهای مختلف با فاصله هر سه روز یک بار شمارش و ثبت شد. پس از ورود تخم ها به سیستم (بعد از ۱۲ ساعت زمان آداپتاسیون) عملیات تیمار داری آغاز گردید. شیر ورودی محلول آنولیت به محیط در تیمارهای ۰/۲۵ ppm و ۰/۵ ppm به گونه ای مناسب تنظیم گردید (تصویر ۱۲) تا غلظت مطلوب در تمام طول مدت آزمایش حفظ گردد. تیمار در این دو غلظت به صورت مستمر انجام پذیرفت و تا پایان آزمایش (۴۸ ساعت قبل از تفریخ) ادامه داشت.

تصویر ۱۲: شیر ورودی محلول آنولیت به تراف ها در تیمار های ۰/۲۵ ppm و ۰/۵ ppm به گونه ای تنظیم شد تا غلظت مطلوب در تمام طول مدت آزمایش به صورت مستمر حفظ گردد.

غلظت روزانه کلر به عنوان شاخص عملکرد دستگاه و صحت تیمارداری در تیمارهای آنولیت بوسیله تیتراسیون محاسبه گردید. تیمارهای مالاشیت سبز و آنولیت ۳۰ppm و ۱۰۰ ppm نیز هر ۴۸ ساعت به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. حمام مالاشیت سبز با تنظیم دبی ورودی محلول و حمام آنولیت نیز به همین نحو انجام گرفت. برای این منظور غلظت محیط حمام به ۲ ppm رسانده و در همین غلظت به مدت ۳۰ دقیقه باقی ماند. برای انجام دقیق عملیات تیمار داری حجم کل آب سیستم محاسبه گردید و بر اساس میزان دبی ورودی هر تراف میزان محلول لازم (مالاشیت و آنولیت) بدست آمد. سپس دبی مورد نیاز محلول تیمار برای رسیدن غلظت محیط به حد مطلوب نیز به همین ترتیب محاسبه شد و در سیستم اعمال گردید. برای تأیید صحت محاسبات، غلظت کلر هر تراف به صورت جداگانه محاسبه و ثبت گردید. سنجش غلظت کلر با استفاده از روش تیتراسیون در کنار سیستم تیمار داری انجام پذیرفت. این پارامتر به جهت اهمیت آن در بخش تیمار داری روزانه ثبت و تغییرات آن در نظر گرفته شد. دقت سنجش کلر در تیمارهای ۰/۲۵ ppmو ۰/۵ ppm تا صدم (دو رقم اعشار) و در تیمارهای ۳۰ ppm و ۱۰۰ ppm تا دهم (یک رقم اعشار)، بود. با توجه به تفاوت شدید غلظت کلر در تیمارهای مختلف آنولیت از دو روش تیتراسیون مختلف برای سنجش غلظت کلر استفاده گردید (Clesceri, *et al.*, 2005).

عملیات تیمار داری تا ۴۸ ساعت قبل از خروج لاروها انجام شد و پس از آن متوقف گردید. این عمل به جهت جلوگیری از تاثیر مواد آزمایش بر کیفیت نهایی لارو حاصل و هم راستا با آنچه در محیط طبیعی انجام می شود، صورت گرفت. در این زمان ورودی محلول آنولیت در تیمارهای مستمر قطع شد و پس از آن هیچ گونه تیمار دوره ای درمانی نیز صورت نپذیرفت.

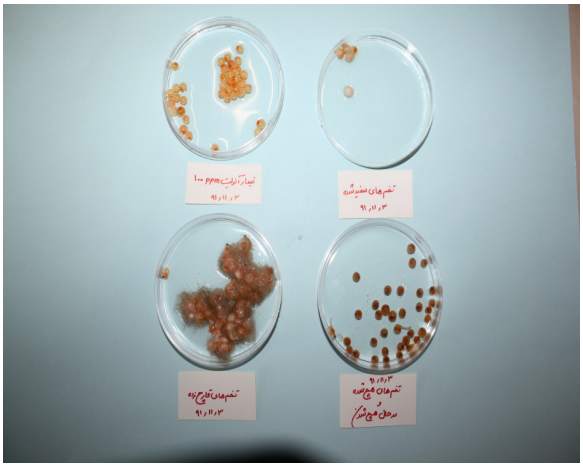
٤-۲- ثبت داده ها

بازبینی ترافها به منظور ارزیابی تلفات تخم و ثبت داده های مربوط به فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب بطور روزانه انجام پذیرفت (تصویر ۱۳). فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دما، pH، اکسیژن محلول و میزان کلر تولید شده توسط دستگاه Envirolit، ثبت گردید. مرحله اول جدا سازی تخم های تلف شده پس از چشم زدگی و در زمان محاسبه درصد چشم زدگی انجام شد.

تصویر ۱۳: بازبینی ترافها به منظور ارزیابی تلفات تخم و ثبت داده های مربوط به فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب بطور روزانه انجام گردید.

چشم زدگی در روز دوازدهم آغاز و در روز سیزدهم کامل شد. نوبت دوم جدا سازی تخم های تلف شده نیز در پایان آزمایش و در زمان سنجش درصد تفریخ انجام شد. در پایان آزمایش و در زمان خروج لاروها از تخم، میزان کل تلفات تخم های تلف شده شمارش و ثبت گردید. ۷۲ ساعت پس از خروج لاروها (تصویر ۱۴) نیز میزان تلفات و درصد ناهنجاریهای هر تراف محاسبه و ثبت شد (تصویر ۱۵). در برخی از تیمارها بدلیل فقدان نمونه لارو زنده، داده ای به عنوان درصد تفریخ و درصد ناهنجاری ثبت نگردید.

تصویر ١٤: لاروهای تفریخ شده حاوی کیسه زرده



تصویر ۱۵: تخم های نمونه برداری شده در وضعیت های مختلف

عملیات تیمار داری از آغاز تا انتها حدود یک ماه به طول انجامید. متغیرهای مورد بررسی عبارت بودند از درصد تفریخ، درصد چشم زدگی، درصد ناهنجاری و درصد تخمهای سفید شده که درصد چشم زدگی در میانه و بقیه موارد در انتهای آزمایش بر اساس فرمولهای زیر محاسبه و ثبت گردید:

۱۰۰ × [تعداد کل تخمها / تعداد تخمهای قارچ زده] = درصد قارچ زدگی (Barnes, *et al*., 1998)

۱۰۰ × [(مرگ و میر ابتدایی – تعداد کل تخم ها / تعداد تخمهای چشم زده] = درصد چشم زدگی (Arndt, *et al*., 2001)

۱۰۰ × [تعداد تخمهای چشم زده / تعداد تخمهای تفریخ شده] = درصد تفریخ (Arndt, *et al*., 2001)

۱۰۰ × [تعداد تخمهای تفریخ شده / لاروهای ناهنجار] = درصد ناهنجاری ها (Arndt, *et al*.2001).

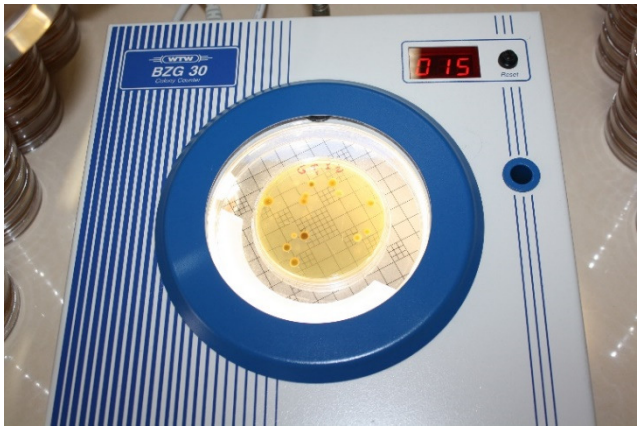
میزان ناهنجاری لاروها نیز ۶ روز پس از تفریخ تخمها تعیین گردید (Arndt, *et al*., 2001).

نمونه برداری از قارچهای ساپرولگنیا رشد یافته بر روی تخم ها انجام و پس از ضد عفونی و کشت دادن بر روی محیط YGC حاوی کلرامفنیکول به مدت ۷-۵ روز گرمخانه گذاری شدند. پس از گذشت زمان یاد شده قارچهای رشد یافته بر روی محیط های کشت YGC رنگ آمیزی و با استفاده از استریو میکروسکوپ دوربین دار مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین نمونه برداری از آب جهت تعیین بار قارچی قبل و بعد از شروع هر نوبت از آزمایشها انجام گرفت. در واقع در طی دوره انکوباسیون، دو مرحله نمونه برداری (قبل از ضدعفونی، از همه تیمارها و بعد از ضدعفونی، برای تیمارهای ppm ۳۰ و ppm ۱۰۰ آنولیت و ppm ۲ سبز مالاشیت) انجام شد و در هر مرحله ۱۰ نمونه آب از هر تراف و مجموعاً ۱۲۰ نمونه آب برداشت و بلافاصله به آزمایشگاه میکروبیولوژی منتقل گردید. قارچها تا رقت ۲- و هر یک با سه تکرار و بر روی محیط سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل کشت سطحی داده شد و به مدت ۷-۵ روز در دمای ۱۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و

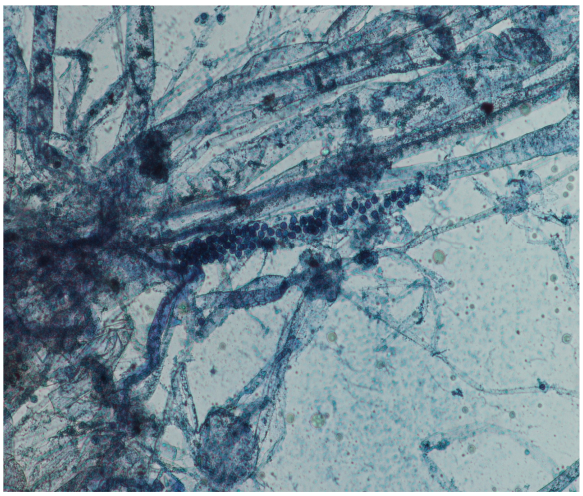
سپس شمارش کلنی ها با استفاده از کلنی کانتر و به تفکیک هر پلیت انجام شد و در جداول مربوطه ثبت گردید (Bandh *et al*., 2012) (تصاویر ۱۹-۱۶).

تصویر ١٦: نمونه برداری از قارچ های ساپرولگنیا رشد یافته بر روی تخمها و ضد عفونی آنها جهت انتقال به محیط کشت YGC

تصویر ۱۷: گرمخانه گذاری محیط های کشت سابورو دکستروز آگار



تصویر ۱۸: شمارش کلنی های رشد یافته قارچ بر روی محیط کشت سابورو دکستروز آگار



تصویر ۱۹: رشته های رنگ آمیزی شده قارچ ساپرولگنیا جدا شده از تخم های آلوده

۵-۲- آنالیز آماری

برای مقایسه تأثیر مواد مختلف بر روی رشد قارچ ها قبل و بعد از مواجهه از روش آزمون تی – استیودنت استفاده گردید که در همین راستا تعیین برابری واریانسها به کمک آزمون لون مشخص گردید. برای مشخص شدن تفاوت بین اثر مواد مختلف با یکدیگر و مقایسه دو به دو تیمارهای مختلف، روش آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون بن فرونی مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی ناهنجاری، تفریخ، قارچ زدگی و چشم زدگی تخم ها ابتدا نسبت به تعیین درصد و سپس انجام آزمون من – ویتنی برای مقایسه رتبه ناهنجاری در یکی از تیمارهای آنولیت (که کمترین میزان ناهنجاری را داشت) و مالاشیت گرین اقدام گردید. البته این مقایسه به دنبال تحلیل میزان تفریخ، قارچ زدگی و چشم زدگی در اثر مواد مورد استفاده در تیمارهای مختلف به کمک روش آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون بن فرونی انجام پذیرفت.

۳ – نتایج

میانگین اندازه گیری پارامترهای مختلف در کلیه تیمارها در طول دوره آزمایش در جدول شماره ۲ ذکر شده است.

جدول ۲ : میانگین اندازه گیری پارامترهای مختلف در کلیه تیمارها در طول دوره آزمایش

نام پارامتر	تیمار اول (۰,۲۵ppm)	تیمار دوم (ppm ۰,۵)	تیمار سوم (۳۰ppm)	تیمار چهارم (۱۰۰ppm)	تیمار پنجم (مالاشیت)	تیمار ششم شاهد (+)	تیمار هفتم شاهد (–)
دما	۱۵,۱۵±۱,۱۸	۱۵,۱۵±۱,۱۸	۱۵,۱۵±۱,۱۸	۱۵,۱۵±۱,۱۸	۱۵,۱۵±۱,۱۸	۱۵,۱۵±۱,۱۸	۱۵,۱۵±۱,۱۸
کلر دستگاه	۵۴۱,۱۷	۵۲۸,۵۷	۵۶۰	–	–	–	–
کلر تراف	۰,۲۴±۰,۰۵	۰,۵۱±۰,۰۶	۳۳,۷±۸,۳۵	۹۸,۷±۱۱,۴۴	–	–	–
سختی	۲۵۹,۳±۱,۷	۲۶۱,۲±۱۸	۲۶۳,۱۵±۱۷,۵	۲۷۰,۷۵±۱۷,۸	۲۶۹,۸±۱۸	۲۷۰,۷۵±۱۷,۸	۲۷۰,۷۵±۱۷,۵
اکسیژن	۶,۹۵±۰,۱۴	۶,۹۸±۰,۱۷	۶,۹۳±۰,۱۳	۶,۸۴±۰,۱۷	۶,۹۵±۰,۱۶	۶,۹۵±۰,۱۲	۶,۹۹±۰,۱۸
pH	۷,۷۶±۰,۰۴	۷,۷۵±۰,۰۵	۷,۷۳±۰,۰۴	۷,۷۳±۰,۰۴	۷,۷۴±۰,۰۶	۷,۷۵±۰,۰۵	۷,۷۴±۰,۰۶

توضیح: میانگین ها با احتساب انحراف معیار منظور گردید.

نتایج آزمایشها در خصوص میزان ناهنجاری، تفریخ، قارچ زدگی و چشم زدگی تخم ها بصورت درصدی در جدول (۳) ذکر شده است.

جدول شماره ۳ : درصد ناهنجاری، درصد تفریخ، درصد قارچ زدگی و درصد چشم زدگی تخم ها

تیمار	تیمار ۱			تیمار ۲			تیمار ۳			تیمار ٤			تیمار ٥			تیمار ٦			تیمار ۷		
	۰/۲۵ ppm			۰/۵ ppm			۳۰ ppm			۱۰۰ ppm			۲ مالاشیت ppm			شاهد مثبت			شاهد منفی		
پارامتر	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
درصد ناهنجاری	٤/٨١	۳/۵۰	۳/٤۳	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱/۸٤	۳/۳۷	۱/۸٦	۰	۰	۲/٤۳	۰/۹۰	۰	۰
درصد تفریخ	۸۸/۷٤	۸٦/۵۰	۸۹/۲۹	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۹۰/۸٦	۸۲/۵۵	۸۹/۵	۰	۰	۵۱/۲۱	۷۵/۷۳	۰	۰
درصد قارچ زدگی	۳۰/۷۵	۱۱/۲۵	۲۹/۵۰	۲۰/۵۰	۱۸/۷۵	۲۸/۵۰	۵/۳۵	۷	٦/۳۵	٤	۲/۵۰	٦	۱	۱۷/۷۵	۱۸/۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۹۱/۷۵	۷٦/۳۵	۱۰۰	۹۷
درصد چشم زدگی	۷۱/۲۵	۵۳/۵۰	۹۵/۵۰	۲۷/۷۵	۵۲/۵۰	۳۱/۲۵	۵۷/۵۰	۳۰/۲۵	۲۸/۷۵	۲۱/۷۵	۲۸/۵۰	۳۱	٦۷	۵۵	۷۵	٤۱/۲۵	۵٤/۲۵	۷۰	۵٦/۷۵	۷۱/۲۵	۵۲/۵۰

نتیجه آزمون T-test درجدول شماره ۵ حاکی از وجود اختلاف معنی دار (P<.05) است و با توجه به مقادیر موجود در جدول ۴ و از آنجائیکه در گروه بندی گروه ۱ (قبل ازتجویز) و گروه ۲ (بعد از تجویز) نامگذاری شده اند چنین بنظر می رسد در کلیه تیمارها شمارش کل قارچ ها با توان بالایی بعد از استفاده از محلول آنولیت، پائین تر از گروه ۱ (قبل از تجویز) است.

جدول ٤: مقدار میانگین کلنی شمارش شده مربوط به تیمارهای مختلف قبل (۱) و بعد (۲) از مواجهه با مقادیر مختلف محلول آنولیت

Treatments	Groups	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
t.25	1	9	107.7778	17.87301	5.95767
	2	9	68.8889	11.66667	3.88889
t.5	1	9	153.3333	47.69696	15.89899
	2	9	66.6667	16.58312	5.52771
t.30	1	9	45.5556	18.10463	6.03488
	2	9	22.2222	10.92906	3.64302
t.100	1	9	24.4444	14.24001	4.74667
	2	9	12.2222	8.33333	2.77778
mal.	1	9	46.6667	26.92582	8.97527
	2	9	13.3333	7.07107	2.35702

t.25=treatment 1; t.5= treatment2; t.30, 100= treatment; mal= malachite green treatment

جدول ٥: بررسی معنی داری مقادیر کلنی ها در تیمار های مختلف قبل و بعد از مواجهه با مقادیر مختلف محلول آنولیت

Treatments		Levene's Test for Equality of Variances		t	df	Sig. (2-tailed)
		F	Sig.			
t.25	Equal variances assumed	1.892	.188	5.466	16	.000
t.5	Equal variances assumed	4.409	.052	5.149	16	.000
t.30	Equal variances assumed	3.789	.069	3.310	16	.004
t.100	Equal variances assumed	2.959	.105	2.222	16	.041
mal.	Equal variances assumed	2.216	.156	3.592	16	.002
t.6	Equal variances assumed	.067	.800	2.714	16	.015

t.25=treatment 1; t.5= treatment2; t.30= treatment 100; mal= treatment malachite green

از نتایج فوق چنین استنباط می گردد که محلول آنولیت در کاهش میزان قارچ موثر است.

جدول ٦: خصوصیات توصیفی داده های مربوط به شمارش کلی قارچ ها بعد از استفاده از محلول آنولیت

Treatments	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	9	68.8889	11.66667	3.88889	59.9211	77.8567	50.00	80.00
2	9	66.6667	16.58312	5.52771	53.9197	79.4136	50.00	100.00
3	9	22.2222	10.92906	3.64302	13.8214	30.6230	10.00	40.00
4	9	11.1111	9.27961	3.09320	3.9782	18.2440	.00	20.00
5	9	11.1111	7.81736	2.60579	5.1022	17.1201	.00	20.00
Total	45	33.3333	27.33441	3.71974	25.8725	40.7942	.00	100.00

t.25=treatment 1; t.5= treatment2; t30= treatment 100; mal= treatment malachite green;

جدول ۷: تحلیل واریانس گروههای مختلف در شمارش قارچ ها بعد از استفاده از محلول آنولیت

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32977.778	5	6595.556	47.807	.000
Within Groups	6622.222	48	137.963		
Total	39600.000	53			

جدول ۸: مقایسه همگانی گروههای مختلف در شمارش قارچ ها بعد از استفاده از محلول آنولیت

	(I)	(J)	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
	Treatments	Treatments	Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	1	2	2.22222	5.53701	.999	-14.2110	18.6555
		3	46.66667*	5.53701	.000	30.2334	63.0999
		4	57.77778*	5.53701	.000	41.3445	74.2110
		5	57.77778*	5.53701	.000	41.3445	74.2110
	2	1	-2.22222	5.53701	.999	-18.6555	14.2110
		3	44.44444*	5.53701	.000	28.0112	60.8777
		4	55.55556*	5.53701	.000	39.1223	71.9888
		5	55.55556*	5.53701	.000	39.1223	71.9888
	3	1	-46.66667*	5.53701	.000	-63.0999	-30.2334
		2	-44.44444*	5.53701	.000	-60.8777	-28.0112
		4	11.11111	5.53701	.354	-5.3221	27.5444
		5	11.11111	5.53701	.354	-5.3221	27.5444
	4	1	-57.77778*	5.53701	.000	-74.2110	-41.3445
		2	-55.55556*	5.53701	.000	-71.9888	-39.1223
		3	-11.11111	5.53701	.354	-27.5444	5.3221
		5	.00000	5.53701	1.000	-16.4333	16.4333
	5	1	-57.77778*	5.53701	.000	-74.2110	-41.3445
		2	-55.55556*	5.53701	.000	-71.9888	-39.1223
		3	-11.11111	5.53701	.354	-27.5444	5.3221
		4	.00000	5.53701	1.000	-16.4333	16.4333
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.							

براساس جدول شماره ۷ چنین بنظر می رسد که بین گروههای مختلف از نظر تعداد شمارش شده قارچ بعد از استفاده از محلول آنولیت تفاوت های معنی داری حداقل بین ۲ گروه آزمایشی وجود دارد .از نتایج جدول شماره ۸ چنین استنباط می شود که از نظر تعداد شمارش شده قارچ ها بعد از استفاده از محلول آنولیت در گروه ۱ نسبت به گروه ۲ تفاوت معنی داری وجود ندارد (P>.05) ، لیکن این گروه با کلیه گروههای دیگر تفاوت معنی داری دارد (P<.05). در هر حال از نظر شمارش کل قارچ ها، گروههای ۳، ۴ و ۵ (غلظت های ppm ۳۰ و ppm ۱۰۰ آنولیت و مالاشیت گرین) در یک گروه قرار داشته و با گروههای ۱ و ۲ (غلظت ppm ۰/۲۵ و ppm ۰/۵ آنولیت) که عملاً خود با یکدیگر اختلاف معنی داری ندارند (P>.05)، اختلاف معنی داری خواهند داشت (P<.05). با توجه به مقادیر تیمارهای مختلف چنین بنظر می رسد که تعداد قارچ ها به ترتیب در تیمار مالاشیت گرین، تیمار ۵، تیمار ۴، تیمار ۳، تیمار ۱ وتیمار ۲ به ترتیب کمتر بوده و به تدریج در تیمارهای بعد از خود مقدار آنها افزوده می شود. براساس این جدول قائدتاً تصمیم گیری و تحلیل این است که مالاشیت گرین نسبت به آنولیت، و غلظت های بالای آنولیت نسبت به غلظت های پائین از اثر بخشی بیشتری برخوردار است، اما آیا

این بالا بودن اثر بخشی با تفریخ و چشم زدگی تخم نیز هم جهت است؟ نتیجه در جداول بعدی قابل جستجو است.

جدول شماره ۹: رتبه های تعیین شده در مقایسه ناهنجاری بین گروههای ppm ۰/۲۵ آنولیت (۱) و مالاشیت گرین(۲)

	Groups	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Anomaly	1	3	5.00	15.00
	2	3	2.00	6.00
	Total	6		

جدول شماره ۱۰: آزمون من - ویتنی دو نمونه ای مستقل برای مقایسه ناهنجاری در گروههای ppm ۰/۲۵ آنولیت و مالاشیت گرین

	Anomaly
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	6.000
Z	-1.964
Asymp. Sig. (2-tailed)	.050
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.100[a]
a. Not corrected for ties.	
b. Grouping Variable: groups	

براساس نتایج جدول نان پارامتریک شماره ۱۰، این نتیجه حاصل می گردد که میانگین رتبه درصد وضعیت ناهنجاری در گروه مالاشیت گرین از گروه ۱ کمتر است. علت عدم مقایسه تیمارهای ppm ۵/. تا ppm ۱۰۰ در مقایسه ناهنجاریها به این دلیل است که عملاً لاروها در این غلظت ها تفریخ نشده اند تا وضعیت ناهنجاری آنها بررسی گردد.

تا اینجای تحقیق چنین بنظر میرسد انتخاب ماده تاثیرگذار با توجه به عدم تفریخ در تیمارهای ۰/۵، ۳۰ و ppm ۱۰۰ بین غلظت ۰/۲۵ آنولیت و ppm ۲ مالاشیت گرین است.

جدول شماره ۱۱: داده های دموگرافیک شاخص درصد تفریخ در تیمارهای مختلف

Treatments *	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	88.1767	1.47785	.85324	84.5055	91.8478	86.50	89.29
2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
4	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
5	3	87.6367	4.45736	2.57346	76.5640	98.7094	82.55	90.86
6	3	17.0700	29.56611	17.07000	-56.3763	90.5163	.00	51.21
7	3	25.2433	43.72274	25.24333	-83.3700	133.8566	.00	75.73
Total	21	31.1610	41.45867	9.04702	12.2892	50.0327	.00	90.86

*۱-۴ آنولیت در غلظت های مختلف، ۵ مالاشیت گرین و ۶ و ۷ گروه کنترل می باشد.

جدول شماره ۱۲: تحلیل واریانس درصد تفریخ بین گروهها و کنترل ها

Hatchability	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between groups	28760.658	6	4793.443	11.950	.000
Within groups	5615.769	14	401.126		
Total	34376.427	20			

جدول شماره ۱۳: مقایسه چندگانه درصد تفریخ بین گروهها و کنترل ها در آزمون بن فرونی

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	88.17667*	16.35291	.002	27.6835	148.6698
	3	88.17667*	16.35291	.002	27.6835	148.6698
	4	88.17667*	16.35291	.002	27.6835	148.6698
	5	.54000	16.35291	1.000	-59.9531	61.0331
	6	71.10667*	16.35291	.014	10.6135	131.5998
	7	62.93333*	16.35291	.037	2.4402	123.4265
2	1	-88.17667*	16.35291	.002	-148.6698	-27.6835
	3	.00000	16.35291	1.000	-60.4931	60.4931
	4	.00000	16.35291	1.000	-60.4931	60.4931
	5	-87.63667*	16.35291	.002	-148.1298	-27.1435
	6	-17.07000	16.35291	1.000	-77.5631	43.4231
	7	-25.24333	16.35291	1.000	-85.7365	35.2498
3	1	-88.17667*	16.35291	.002	-148.6698	-27.6835
	2	.00000	16.35291	1.000	-60.4931	60.4931
	4	.00000	16.35291	1.000	-60.4931	60.4931
	5	-87.63667*	16.35291	.002	-148.1298	-27.1435
	6	-17.07000	16.35291	1.000	-77.5631	43.4231
	7	-25.24333	16.35291	1.000	-85.7365	35.2498
4	1	-88.17667*	16.35291	.002	-148.6698	-27.6835
	2	.00000	16.35291	1.000	-60.4931	60.4931
	3	.00000	16.35291	1.000	-60.4931	60.4931
	5	-87.63667*	16.35291	.002	-148.1298	-27.1435
	6	-17.07000	16.35291	1.000	-77.5631	43.4231
	7	-25.24333	16.35291	1.000	-85.7365	35.2498
5	1	-.54000	16.35291	1.000	-61.0331	59.9531
	2	87.63667*	16.35291	.002	27.1435	148.1298
	3	87.63667*	16.35291	.002	27.1435	148.1298
	4	87.63667*	16.35291	.002	27.1435	148.1298
	6	70.56667*	16.35291	.015	10.0735	131.0598
	7	62.39333*	16.35291	.040	1.9002	122.8865
6	1	-71.10667*	16.35291	.014	-131.5998	-10.6135
	2	17.07000	16.35291	1.000	-43.4231	77.5631
	3	17.07000	16.35291	1.000	-43.4231	77.5631
	4	17.07000	16.35291	1.000	-43.4231	77.5631
	5	-70.56667*	16.35291	.015	-131.0598	-10.0735
	7	-8.17333	16.35291	1.000	-68.6665	52.3198
7	1	-62.93333*	16.35291	.037	-123.4265	-2.4402
	2	25.24333	16.35291	1.000	-35.2498	85.7365
	3	25.24333	16.35291	1.000	-35.2498	85.7365
	4	25.24333	16.35291	1.000	-35.2498	85.7365
	5	-62.39333*	16.35291	.040	-122.8865	-1.9002
	6	8.17333	16.35291	1.000	-52.3198	68.6665

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

جدول شماره ١٤ : جدول دموگرافیک درصد قارچ زدگی و تخم های چشم زده در گروهها و کنترل ها

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
قارچ زدگی	1	3	23.8333	10.91539	6.30201	-3.2820	50.9487	11.25	30.75
	2	3	22.5833	5.19816	3.00116	9.6704	35.4963	18.75	28.50
	3	3	6.1667	.87797	.50690	3.9857	8.3477	5.25	7.00
	4	3	4.1667	1.75594	1.01379	-.1953	8.5287	2.50	6.00
	5	3	12.3333	9.81814	5.66850	-12.0563	36.7229	1.00	18.25
	6	3	97.2500	4.76314	2.75000	85.4177	109.0823	91.75	100.00
	7	3	91.0833	12.93332	7.46706	58.9552	123.2115	76.25	100.00
	Total	21	36.7738	38.46556	8.39387	19.2645	54.2831	1.00	100.00
تحم چشم زده	1	3	73.4167	21.08366	12.17266	21.0419	125.7914	53.50	95.50
	2	3	37.1667	13.39387	7.73296	3.8944	70.4389	27.75	52.50
	3	3	38.8333	16.18320	9.34337	-1.3680	79.0346	28.75	57.50
	4	3	27.0833	4.78496	2.76260	15.1968	38.9698	21.75	31.00
	5	3	65.6667	10.06645	5.81187	40.6602	90.6731	55.00	75.00
	6	3	55.1667	14.39690	8.31206	19.4028	90.9306	41.25	70.00
	7	3	60.1667	9.83086	5.67585	35.7455	84.5879	52.50	71.25
	Total	21	51.0714	19.77248	4.31471	42.0711	60.0718	21.75	95.50

جدول ۱۵: تحلیل واریانس درصد قارچ زدگی و تخم چشم زدگی در گروهها و کنترل ها

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Fungus	Between groups	28719.238	6	4786.540	76.782	.000
	Within groups	872.750	14	62.339		
	Total	29591.988	20			
Eyed eggs	Between groups	5191.101	6	865.184	4.609	.009
	Within groups	2627.917	14	187.708		
	Total	7819.018	20			

جدول ١٦ : مقایسه چندگانه درصد قارچ زدگی تیمارها و کنترل ها

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	1.25000	6.44667	1.000	-22.5977	25.0977
	3	17.66667	6.44667	.335	-6.1810	41.5144
	4	19.66667	6.44667	.181	-4.1810	43.5144
	5	11.50000	6.44667	1.000	-12.3477	35.3477
	6	-73.41667*	6.44667	.000	-97.2644	-49.5690
	7	-67.25000*	6.44667	.000	-91.0977	-43.4023
2	1	-1.25000	6.44667	1.000	-25.0977	22.5977
	3	16.41667	6.44667	.489	-7.4310	40.2644
	4	18.41667	6.44667	.266	-5.4310	42.2644
	5	10.25000	6.44667	1.000	-13.5977	34.0977
	6	-74.66667*	6.44667	.000	-98.5144	-50.8190
	7	-68.50000*	6.44667	.000	-92.3477	-44.6523
3	1	-17.66667	6.44667	.335	-41.5144	6.1810
	2	-16.41667	6.44667	.489	-40.2644	7.4310
	4	2.00000	6.44667	1.000	-21.8477	25.8477
	5	-6.16667	6.44667	1.000	-30.0144	17.6810
	6	-91.08333*	6.44667	.000	-114.9310	-67.2356
	7	-84.91667*	6.44667	.000	-108.7644	-61.0690
4	1	-19.66667	6.44667	.181	-43.5144	4.1810
	2	-18.41667	6.44667	.266	-42.2644	5.4310
	3	-2.00000	6.44667	1.000	-25.8477	21.8477
	5	-8.16667	6.44667	1.000	-32.0144	15.6810
	6	-93.08333*	6.44667	.000	-116.9310	-69.2356
	7	-86.91667*	6.44667	.000	-110.7644	-63.0690
5	1	-11.50000	6.44667	1.000	-35.3477	12.3477
	2	-10.25000	6.44667	1.000	-34.0977	13.5977
	3	6.16667	6.44667	1.000	-17.6810	30.0144
	4	8.16667	6.44667	1.000	-15.6810	32.0144
	6	-84.91667*	6.44667	.000	-108.7644	-61.0690
	7	-78.75000*	6.44667	.000	-102.5977	-54.9023
6	1	73.41667*	6.44667	.000	49.5690	97.2644
	2	74.66667*	6.44667	.000	50.8190	98.5144
	3	91.08333*	6.44667	.000	67.2356	114.9310
	4	93.08333*	6.44667	.000	69.2356	116.9310
	5	84.91667*	6.44667	.000	61.0690	108.7644
	7	6.16667	6.44667	1.000	-17.6810	30.0144
7	1	67.25000*	6.44667	.000	43.4023	91.0977
	2	68.50000*	6.44667	.000	44.6523	92.3477
	3	84.91667*	6.44667	.000	61.0690	108.7644
	4	86.91667*	6.44667	.000	63.0690	110.7644
	5	78.75000*	6.44667	.000	54.9023	102.5977
	6	-6.16667	6.44667	1.000	-30.0144	17.6810
*. The mean difference is significant at the .05 level.						

جدول ۱۷: مقایسه چندگانه درصد چشم زدگی تخم ها در گروههای مختلف

(I) Treatments	(J) Treatments	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	36.25000	11.18655	.124	-5.1316	77.6316
	3	34.58333	11.18655	.167	-6.7983	75.9649
	4	46.33333*	11.18655	.021	4.9517	87.7149
	5	7.75000	11.18655	1.000	-33.6316	49.1316
	6	18.25000	11.18655	1.000	-23.1316	59.6316
	7	13.25000	11.18655	1.000	-28.1316	54.6316
2	1	-36.25000	11.18655	.124	-77.6316	5.1316
	3	-1.66667	11.18655	1.000	-43.0483	39.7149
	4	10.08333	11.18655	1.000	-31.2983	51.4649
	5	-28.50000	11.18655	.488	-69.8816	12.8816
	6	-18.00000	11.18655	1.000	-59.3816	23.3816
	7	-23.00000	11.18655	1.000	-64.3816	18.3816
3	1	-34.58333	11.18655	.167	-75.9649	6.7983
	2	1.66667	11.18655	1.000	-39.7149	43.0483
	4	11.75000	11.18655	1.000	-29.6316	53.1316
	5	-26.83333	11.18655	.650	-68.2149	14.5483
	6	-16.33333	11.18655	1.000	-57.7149	25.0483
	7	-21.33333	11.18655	1.000	-62.7149	20.0483
4	1	-46.33333*	11.18655	.021	-87.7149	-4.9517
	2	-10.08333	11.18655	1.000	-51.4649	31.2983
	3	-11.75000	11.18655	1.000	-53.1316	29.6316
	5	-38.58333	11.18655	.082	-79.9649	2.7983
	6	-28.08333	11.18655	.524	-69.4649	13.2983
	7	-33.08333	11.18655	.218	-74.4649	8.2983
5	1	-7.75000	11.18655	1.000	-49.1316	33.6316
	2	28.50000	11.18655	.488	-12.8816	69.8816
	3	26.83333	11.18655	.650	-14.5483	68.2149
	4	38.58333	11.18655	.082	-2.7983	79.9649
	6	10.50000	11.18655	1.000	-30.8816	51.8816
	7	5.50000	11.18655	1.000	-35.8816	46.8816
6	1	-18.25000	11.18655	1.000	-59.6316	23.1316
	2	18.00000	11.18655	1.000	-23.3816	59.3816
	3	16.33333	11.18655	1.000	-25.0483	57.7149
	4	28.08333	11.18655	.524	-13.2983	69.4649
	5	-10.50000	11.18655	1.000	-51.8816	30.8816
	7	-5.00000	11.18655	1.000	-46.3816	36.3816
7	1	-13.25000	11.18655	1.000	-54.6316	28.1316
	2	23.00000	11.18655	1.000	-18.3816	64.3816
	3	21.33333	11.18655	1.000	-20.0483	62.7149
	4	33.08333	11.18655	.218	-8.2983	74.4649
	5	-5.50000	11.18655	1.000	-46.8816	35.8816
	6	5.00000	11.18655	1.000	-36.3816	46.3816
*. The mean difference is significant at the 0.05 level.						

٤ - بحث

آلودگی های قارچی تخم در مرحله انکوباسیون یکی از مهمترین چالشهای اساسی تولید آبزیان پرورشی خصوصاً قزل آلای رنگین کمان است که همه ساله موجب خسارات اقتصادی قابل توجهی در مراکز تکثیر آبزیان می شود.

قارچ زدگی تخم های لقاح یافته قزل آلای رنگین کمان به دلیل دمای پایین آب از یک سو و طولانی بودن زمان انکوباسیون تخم این ماهیان از سوی دیگر یکی از مهمترین عوامل تلفات در هچری این ماهیان می باشد. ساپرولگنیا و سایر اوومیستها بطور طبیعی در اکثر منابع آبی موجود بوده و در صورت حضور عوامل زمینه ساز مانند هرگونه استرس فیزیکی و شیمیایی و همین طور کیفیت نامناسب تخم و یا استحصال تخم از مولدین نارس و یا فوق رسیده بودن تخمها که در نهایت موجب افزایش میزان تخمهای مرده در هچری گردد، به سهولت تکثیر یافته و به آسانی در سطح هچری گسترش می یابند.(ابراهیم زاده موسوی و همکاران ۱۳۸۵، قیاسی ۱۳۸۷،). برای مبارزه با این مشکل و کاهش تلفات تخم، مدیران مراکز تکثیر و پرورش ماهیان قزل آلا از ترکیباتی چون مالاشیت گرین، فرمالین و یا پراکسید اکسیژن استفاده می کنند. لیکن مالاشیت گرین به دلیل قابلیت قارچ کشی بالا و سهولت مصرف به عنوان مهمترین عامل دارویی ضد قارچی مصرفی در مراکز تکثیر ماهیان قزل آلا شناخته شده است (اخلاقی و بهاالدینی، ۱۳۹۲). اثرات ناقص الخلقه زایی (Meyer and Jorgenson, 1983)،سرطانزایی و جهش زایی (Culp and Beland, 1996) مالاشیت گرین کاملاً به اثبات رسیده است. لذا به نظر می رسد انتخاب جایگزین برای این ماده که اثرات سوء بر لارو و نیز کارگران مراکز تکثیر دارد امری ضروری است که در این میان یکی از این گزینه ها می تواند استفاده از آب الکترولیز شده اکسید کننده(EOW) یا محلول آنولیت باشد. امروزه از آب الکترولیز شده اکسید کننده یا آنولیت استفاده فراوانی در صنایع کشاورزی، سردکننده ها، استخرهای شنا، ضد عفونی وسایل، دندان پزشکی، درمان پوست و تمیزکننده ها می شود(Bakhir, 1997; Leonov, 1997). مطالعات نشان داده است که آب الکترولیز شده اکسید کننده(EOW) قدرت باکتری کشی بالایی داشته و تاثیر بسزایی بر کاهش میزان باکتریهای گرم منفی، گرم مثبت و مایکوباکتریومها دارد. هرچند تفاوتهایی از نظر حساسیت به قدرت کشندگی این ماده در بین گونه های مختلف باکتری وجود دارد(Fenner, 2005). مطالعات مختلف اثر کشندگی آب الکترولیز شده اکسید کننده(EOW) را بر روی رشته و اسپور بسیاری از قارچهای ساپروفیت نشان داده است (Buck, *et al*. 2002)، لیکن اثر کشندگی این ماده بر کاندیدا با قارچهای ساپروفیت متفاوت بوده و به نظر می رسد جنس کاندیدا از حساسیت بیشتری نسبت به قارچهای هایفی دار در برابر قدرت کشندگی این ماده برخوردار است (Jirotková, *et al*. 2012). در نتایج حاصل از این بررسی مشخص شد که در دوزهای کمتر (۰/۲۵ ppm و ۰/۵ ppm) میزان شمارش کلنی قارچی آب هچری و نیز درصد قارچ زدگی تخمها، تواما بطور معنی داری بیشتر از دوزهای بالاتر آنولیت (۳۰ ppm و ۱۰۰ ppm) و نیز مالاشیت گرین بود. به عبارت دیگر با افزایش دوز، اثر قارچ کشی نیز افزایش داشته است. مطالعات نشان داده است که کلرین

تولید شده به HOCL تبدیل میشود. این ماده هرچند در pH پایین ناپایدار است (قدرت اسیدی پایین) لیکن از قدرت اکسید کنندگی بسیار بالایی برخوردار است، بطوریکه ظرفیت اکسید کنندگی آن تقریبا مشابه فعالیت مولکولی کلرین است (Al-Haq, *et al*. 2005). اطلاعات اندکی در خصوص چگونگی مکانیسم اثر آب الکترولیز شده اکسید کننده (EOW) وجود دارد. Kiura و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی اثرات ضد میکروبی آب الکترولیز شده اکسید کننده نشان دادند که با مواجهه دادن باکتریهای باسیلوس سوبتیلیس (*Bacillus subtilis*) در غشاء باکتری شکستگی و حباب ایجاد میگردد و میزان بروز این شکستگی و حبابها در دوزهای بالاتر بیشتر می شود. این در حالی است که نمونه هایی که در مجاورت آنولیت قرار نگرفته اند یکپارچگی غشا خارجی و داخلی آنها کاملا حفظ شده است. به عبارت دیگر این یافته نشان می دهد که غلظت بیشتر آنولیت با درهم ریختگی و عدم انسجام بیشتر دیواره سلول باکتری همراه است. وی و همکارانش برای روشن شدن چگونگی اثر عمیق آنولیت بر سلولهای باکتری دست به ردیابی DNA کروموزومی به روش RLFP-PCR زدند. در باکتریهای مواجهه داده شده با آنولیت هیچ باندی مشاهده نشد در حالیکه باند قوی در نمونه های شاهد وجود داشت. به عبارت دیگر با تخریب و اختلال در دیواره باکتری احتمالا آب دیواره سلولی را شکسته و به سیتوپلاسم نفوذ میکند و موجب آسیب و تخریب در پروتئینهای سیتوپلاسم که بسیاری از آنها آنزیمهای حیاتی سلول هستند میگردد (Kiura, *et al*. 2002). البته Len و همکاران (۲۰۰۰) نیز احتمال داده اند که HOCL به دلیل وزن پایین مولکولی به راحتی از عرض دیواره باکتری نفوذ کرده و به سیتوپلاسم وارد شده و موجب اکسیداسیون غیر قابل برگشت آنزیمهای سیتوپلاسمی موجود در دیواره داخلی و سیتوپلاسم میگردد. با توجه به آنچه گفته شد، ممکن است وضعیت مشابه نیز برای عوامل قارچی ایجاد گردد و این مسئله وجود ارتباط مستقیم بین افزایش دوز و کاهش میزان شمارش پرگنه های قارچی و نیز درصد قارچ زدگی در این مطالعه را اثبات میکند. لازم به ذکر است که در خصوص اثرات آنولیت بر ساپرولگنیازیس مطالعات اندکی صورت گرفته است لیکن Kashiwagi و همکاران (2000) تاثیر این ماده را بر میزان قارچ زدگی و بقاء تخم دو ماهی چار (*Salvelinus leucomaenis*) و قزل الای رنگین کمان در مقایسه با گروه کنترل (بدون استفاده از هیچ ماده دارویی) نشان دادند. آنها نشان دادند که استفاده از این ماده بطور معنی داری موجب کاهش قارچ زدگی در هچریهای تحت تیمار آنولیت در مقایسه با شاهد شده است. از سوی دیگر مطالعات آنها تا مرحله چشم زدگی بود و نتایج نشان از تفاوت معنی دار در میزان چشم زدگی ماهیان چار در مقایسه با شاهد داشت لیکن چنین اثری در تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان تحت تیمار مشاهده نشد که این مسئله را به تفاوتهای فیزیولوژیک بین این دو گونه ماهی نسبت دادند. در ارزیابی درصد چشم زدگی مشخص گردید که از نظر آماری درصد چشم زدگی در دو تیمار ppm ۰/۲۵ و مالاشیت گرین بطور معنی داری بیشتر از سه تیمار دیگر آنولیت بوده اند که این مسئله می تواند تفریخ تخمها در دوز ppm ۰/۲۵ و عدم مشاهده تفریخ در سه دوز دیگر را توجیه نماید. بررسیها نشان داده است که ترکیبات حاوی نیتروژن (خصوصا ترکیبات پروتئنی و اسیدهای آمینه) ترکیبات پایداری را با ترکیبات واکنش پذیر کلر

(HCLO) ایجاد نموده و به ترکیبات نیتروژن دار کلره تبدیل می شوند. این امر از یک سو موجب تغییر در ساختمان شیمیایی ترکیبات نیتروژن دار شده و از سوی دیگر از قدرت ضد میکروبی HCLO کم می نماید (Fenner, 2005). یکی از ترکیباتی که به راحتی با این ترکیب کلر دار پیوند پایدار ایجاد می نماید اسید آمینه آلانین است (Jirotková, *et al*. 2012). این ماده در دیواره سلولهای تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان وجود دارد و به عنوان عامل شیمیوتاکسی مثبت موجب جذب زئواسپور ثانویه قارچ ساپرولگنیا به تخم می شود (قیاسی ۱۳۸۷). بر اساس آنچه گفته شد به نظر می رسد عدم تفریخ تخمهایی که در مواجهه با دوز های بالاتر آنولیت قرار گرفته اند می تواند مربوط به تغییر در ترکیب دیواره سلولی و در نهایت اختلال در عملکرد غشا تخم باشد. نتایج این بررسی نشان داد که میزان ناهنجاری در تیمار ۲۵ppm /۰ در مقایسه با گروه مالاشیت گرین بیشتر بوده است. از آنجایی که این تحقیق اولین بررسی استفاده از آنولیت به عنوان عامل قارچ کش در هچری ماهیان قزل آلای رنگین کمان بوده است لذا برای مطالعه دقیق تر در خصوص دوز و زمان بندی مصرف و عوامل موثر بر این دو نیاز به تحقیقات جامع و گسترده تری وجود دارد.

براساس نتایج حاصل از جداول شماره ۱۷-۱۱ چنین بنظر می رسد در بین تیمارهای ppm ۰/۲۵ و مالاشیت گرین، گروه ppm ۲۵/ ۰آنولیت به دلیل بالا بودن درصد چشم زدگی تخم ها و کم بودن توتال کانت قارچی می تواند برای ضدعفونی تخم ماهی قزل آلا مناسب تر از مالاشیت گرین مدنظر پرورش دهندگان قرار گیرد.

پیشنهادها

- پیشنهاد می شود این آزمایشات در یک محیط کاملاً ضدعفونی شده با غلظت های شناسایی شده تکرار تا نتیجه دقیق تری حاصل شود.
- پیشنهاد می شود با توجه به تأثیر مناسب تر آنولیت در مقایسه با مالاشیت گرین ، دوره های ترویجی و آموزشی جهت پرورش دهندگان و تکثیر کنندگان ماهی سردآبی برگزار شود.

منابع

۱ – ابراهیم زاده موسوی، ح.ع، شریف روحانی، م.، خسروی، ع، ر.، مهرابی، ی.، آخوندزاده بستی، آ.، ارزیابی کاربرد اسانس اوکالیپتوس(*Eucaliptus camaldonensis*) در کنترل آلودگیهای قارچی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان، فصل نامه گیاهان دارویی، سال پنجم، شماره بیستم، ۴۷-۴۲

۲ – ابطحی، ب.، نظری، ر.م.، رسولی، ع.، شفیع زاده سماکوش، پ.، ۱۳۸۴، مقایسه شاخص های درمانی داروهای ضد قارچی سبز مالاشیت و پرمنگنات پتاسیم در تاسماهی ایرانی، پژوهش و سازندگی، شماره ۶۷، ۴۲ – ۴۷

۳ – اخلاقی، م.، بهاالدینی، ,.م.، ۱۳۹۲، مقایسه چند روش درمانی برای مبارزه با ساپرولگنیازیس در تخم های لقاح یافته ماهی قزل آلای رنگین کمان، پژوهش و سازندگی، شماره ۹۴، ۲۴ – ۱۸ص

۴ – حسینی. س.م، (۱۳۸۵)، جداسازی و شناسایی گونه های ساپرولگنیا از تخم های آلوده به قارچ قزل آلای رنگین کمان مزارع استان مازندران، پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشگاه آزاد اسلامی – واحد علوم و تحقیقات

۵ – سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۸۹، دفتر برنامه و بودجه – گروه آمار و مطالعات توسعه شیلاتی

۶ – قیاسی، م.، ۱۳۸۷، تعیین الگوی مولکولی و پروتئینی قارچهای آبزی بیماریزا(ساپرولگنیا) جداشده از تخم های آلوده ماهیان خاویاری و استخوانی مراکز تکثیر و پرورش استان مازندران، پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته قارچ شناسی، دانشگاه تهران

۷ – وثوقی، غ. ح.، مستجیر، ب.، ۱۳۷۹، ماهیان آب شیرین، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، ۳۱۸ صفحه

8 - Alderman, D.J., 1985, Malachite green: a review. Journal of Fish Diseases. 8: 289-298

9 - Al-Haq, M.I, Seo, Y., Oshita, S., Kawagoe, Y., 2001, Fungicidal effectiveness of electrolyzed oxidizing water on postharvest brown rot of peach, Hortscience,36(7):1310-1314

10 - Al-Haq, M.I., Sugiyama, J.,Isobe, S., 2005, Applications of electrolyzed water in agriculture & food industries, Journal of Food Science and Technology, 11(2):135-150

11 - Arndt, C, Gaill F, Felbeck H., 2001. Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. Journal of Experimental Biology. 204:741-750.

12 - Bakhir, V.M. 1997. Electrochemical Activation: theory and practice. Proceedings of the First International Symposium on Electrochemical Activation in Medicine, Agriculture and Industry. Moscow, Russia, 38-45.

13 - Bandh. S.A., Kamili1. A.N., Ganai. B.A., Saleem1. S., Lone1. B.A., Nissa. H.,(2012), First qualitative survey of filamentous fungi in Dal Lake Kashmir, Journal of Yeast and Fungal Research , 3(1), 7 – 11

14 - Barnes, M. E, D. E. Ewing, R. J. Cordes and G. L. Young, 1998. Observations on hydrogen peroxide control of Saprolegnia spp. during rainbow trout egg incubation. Progressive Fish-Culturist, 60: 67-70.

15 - Bialka, K. L., A. Demirci, S. J. Knabel, P. H. Patterson, and V. M .Puri. 2004. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for the microbial safety and quality of eggs, Poultry Science, 83:2071–2078.

16 - Buck, J.W., Iersel, M.W.V., Oetting, R.D., Hung,Y. C., 2002, In vitro fungicidal activity of acidic electrolyzed oxidizing water, Plant Disease, 86(3):278-281

17 - Burchmore, S., Wilkinson, M., 1993, Proposed environmental quality standards for malachite green in water (DWE 9026). UK Department of the Environment, Report no. 316712 (November 1993, prepared by the Water Research Center. Buckinghamshire SL7 2HD.

18 - Clesceri, L. T., Greenbery, A. E., Eaton ,A. D., 2005., Standard Methods for the examination of water and waste water, 21th edition, American Public Health Association, Portcity Press, Baltimor ,Maryland, USA, pp. 2800.

19 - Culp, S. J, and Beland, F. A, 1996, Malachite Green: A Toxicological Review International Journal of Toxicology, 15: 219-238.

20 - Espeland. S, Hansen. P, (2004) Prevention Saprolegnia onRainbow trout eggs, Bsc thesis, Nattur uvisindadeildin faroe, Island

21 - Fasenko, G.M., O'Dea Christopher, E.E., McMullen, L.M., 2009, Spraying hatching eggs with electrolyzed oxidizing water reduces eggshell microbial load without compromising broiler production parameters, Poultry Science, 88:1121–1127

22 - Fenner, D.C, 2005, Antimicrobial activity of electrolyzed oxidizing water using standard in-vitro test procedures for the evaluation of chemical disinfectants, PhD, Thesis, Veterinary Bacteriology Dep. Vetsuisse-Fakultät University, Zurich, Germmany

23 - Fitzpatrick, M.S., Schreck, C.B., Chitwood, R.L., Marking, L.L., 1995, Evaluation of three candidate fungicides for treatment of Spring Chinook salmon. The progressive Fish culturist, 57(2): 153-155.

24 - Hotta, K., Kawaguti, K., Saito, F., Saito, N., Suzuki, K., Ochi, K., Nakayama, T., 1994, Antimicrobial activity of electrolyzed NaCl solution: effect on the growth of Streptomyces spp, Actiomyatologica, 8:51-6

25 - Iwasawa, A.,Y. Nakamura, Y., 1995, Bactericidal effect of acidic electrolyzed water-Comparison of chemical acidic sodium hydrochloride (NaClO) solution.Kansenshogaku Zasshi, 70(9), 915-922.

26 - Jirotková,D., Šoch, M., Kernerová, N.,Pálka, V., Eidelpesová, L., 2012, Use of electrolyzed water in animal production, Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, : 2 (2) 477-483

27 - Kashiwagi, M., Sato, A., Bando, E.,Yoshioka, M.,Ueno, R.,Nakamura, M., Deno, H., 2000, Physical chemical and preservative properties of electrolyzed NaCl solutions with bactericidal activities. suisanzoshoku,48(3), 559-564.

28 - Kitancharoen N., Ono, A., Yamamoto, A., Hata, K., 1997, The fungistatic effect of NaCl on rainbow trout egg saprolegniasis. Fish Pathology, 32(3): 159-162.

29 - Kiura, H., Sano, K., Morimatsu, S., Nakano, T., Morita, C., Yamaguchi, M., et al. (2002). Bactericidal activity of electrolyzed acid water from solution containing sodium chloride at low concentration, in comparison with that at high concentration. International Journal of Food Microbiology Methods, 49, 285–293.

30 - Kobayashi, T., Yamane, A., Lee, N., Miyata, M., Miyazaki, T., 1999, The disinfectant effect of neutral products of electrolyzed sodium chloride solution to fish pathogenic virus. Suisanzoshoku, 47(1), 97-101.

31 - Len, S. V., Hung, Y. C., Erickson,. M., Kim .,C., 2000, Ultraviolet spectrophotometric characterization and bacterial properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. Journal of Food Protection, 63, 1534-1537.

32 - LEONOV BI (1997), Electrochemical activation of water and aqueous solutions: Past, present and future. Proc. 1st Int. Symp. on Electro-chem. Activation, Moscow. 11-27.

33 - Marking, L.L., Rach, J.J., Screier, T.M., 1994, Evaluation of antifungal agents for fish culture, The Progressive Fish-Culturist, 56(4): 225 – 231

34 - Meyer, F.P.,Jorgenson, T.A., 1983, Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. Transactions of the American Fisheries Society 112:818-24.

35 - Morita, C., Sano, K., Morimatsu, S.,Kiura, H., Goto, T, Kohno, T.,Hong, W., Miyoshi, H., Iwasawa, A.,Nakamura, Y.,Tagawa, M.,Yokosuka, O.,Saisho, H.,Maeda, T., Katsuoka, Y., 2000, Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations, Journal of Virological Methods, 85:163–174

36 - Pottinger T.G., Day, J.G., 1999, A *Saprolegnia parasitica* challenge system for rainbow trout: assessment of Pyceze as an anti-fungal control agent for both fish and ova. Diseases of Aquatic Organisms, 36: 129-141

37 - Rach, J.J., Redman,S., Best, D., Gaikowski, M.P., 2005, Efficacy of Hydrogen peroxide versus formalin treatment to control mortality associated with Saprolegniasis on lake trout eggs, North American Journal of Aquaculture, 67(2): 148-154

38 - Srivastava, S., Sinha, R. and Roy, D. 2004. Toxicological effects of malachite green: a review. Aquatic Toxicology 66: 319-329

39 - Stoskopf, M. K. 1993, Fish medicine, Philadelphia: W.B. Saunders Co., 882 p.
40 - Van West. P, (2006) Saprolegnia parasitica, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenge for an old problem, Mycologist, 20: 99 – 104
41 - White, G.C. 1992. Handbook of chlorination and alternative disinfectants. Van Nostrand Reinhold Co. New York.
42 - Yoshida, K., 2003, A fundamental and applied researchers on the control of microorganisms using electrolyzed water. Unpublished PhD dissertation. Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Japan, p. 137

Abstract
One of the important problems in Rainbow trout production industry is egg fungal infection especially saprolegniasis which is the most important mortality factor in Rainbow trout hatcheries. Controlling saprolegniasis in hatcheries was done using green malachite in the past years, which is a very effective fungicide. Nowadays, due to the prohibition of using green malachite, effort is done to replace it with other materials as an effective fungicide. Some of the most important materials which have been examined are formalin, sodium chloride and hydrogen peroxide etc.
The aim of this study was to evaluate the effects of neutral anolyte on the mortality percent of rainbow trout eggs and produced larvae in point of view of growth indices and survival until yolk sac absorption and larvae active feeding in incubation phase comparing with green malachite to be able to introduce a suitable alternative.
This study was carried out in a complete randomly plan with 7 treatments and 3 replications (21 troughs in general), in 20*35*70 cm (length*width*depth) Californian troughs containing an incubator. Treatments included anolyte solutions constant bathing with 0.5 and 0.25 ppm concentrations and periodic anolyte treatments with 2 ppm concentrations (every 2 days), positive control infected with fungus without any disinfectant and negative control without any infection or disinfectant.
300 grams of newly propagated green eggs of rainbow trout which were provided from one of the fish hatcheries in Haraz Road and acclimated with the trough's water temperature, were distributed in one layer at the bottom of the trough basket.
All treatments, except negative control, were infected with saprolegnia, taken from infected eggs of rainbow trout which were previously provided from one of the fish hatcheries of 2000 Road in Tonekabon.
The treatments took one month to complete. The studied variables included hatching percent, percent of eyed eggs, abnormality percent and percent of unfertilized eggs, from which percent of eyed eggs was calculated and recorded in the middle and the rest of the variables at the end of the test.
In this study Paired-sample T-student test, Levene's test, one-way ANOVA and Bonferroni's test was used. For examining egg abnormality, hatching, fungus infection and eyed eggs, first the percent of the variables were specified and then for comparing the rate of abnormality in one of the anolyte treatments (which had the least abnormality) and green malachite, Mann-Whitney test was carried out. This comparison was done to analyze the rate of hatching, fungus infections, eyed eggs, resulting from the materials used in different treatments, using one-way ANOVA Bonferroni's tests.
Results showed that in lower anolyte concentrations (0.5 and 0.25 ppm), the number of fungal colonies of hatchery water and the percent of egg fungus infection were significantly higher than higher concentrations of anolyte (100 ppm and 30 ppm) and green malachite. In other words with concentration increase, the fungicidal effect has also increased.
In evaluating the percent of eyed eggs, statistical results showed that eyed eggs percent in 0.25 ppm treatment and green malachite treatment were significantly higher than the other three anolyte treatments. This result can explain egg hatching in 0.25 ppm concentrations and not seeing hatching in the (other) remaining three doses. Between the treatments of 0.25 ppm and green malachite, the group of 0.25 ppm anolyte can be a better disinfectant for rainbow trout eggs compared to green malachite, for fish farmers, due to the high percent of eyed eggs and the low total count of fungus.
The results of this study showed that the amount of abnormality in 0.25 ppm treatment has been higher compared to the green malachite group.
Because this study was the first research on using anolyte as a fungicide in rainbow trout hatcheries, therefore for more specific study of the concentrations, the timing of usage and the factors affecting these two, more vast and general research is needed.
Keywords: Disinfectant, Neutral anolyte, Green malachite, Rainbow trout egg, Fungiside, Saprolegnia, Envirolyte

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute – Cold Water Fishes Research Center

---

Project Title : Comparison of Neutral Anolyte solution and Malachite green efficiency on fungal contamination control of Rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) eggs in incubation stage
Approved Number: 4-12-12-91121
Author: Issa Sharifpour
Project Researcher : Issa Sharifpour
Collaborator(s) *:* M. R. Mehrabi; S. Kakoolaki; M. Ghiasi; S. Najjarlashkari; M. E. Fakharzadeh; H. Asaeian; M. Sayyadboorani; M. E. Rastravan; A. Sepahdari; H. Nezamabadi; A. R. Vakilian; N. Khanbazadeh,M.Eslami,R.Yosefi,M.Samadi
Advisor(s):-
Supervisor: K. Abdi
Location of execution : Mazandaran provnice
Date of Beginning : 2012
Period of execution : 1 Year & 3 Months
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2015
All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
Iranian Fisheries Science Research Institute

Project Title :

Comparison of Neutral Anolyte solution and Malachite green efficiency on fungal contamination control of Rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) eggs in incubation stage

Project Researcher :

Issa Sharifpour

Register NO.

47505