

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

حبیب و هابزاده رودسری^(۱)؛ محمدرضا احمدی^(۲)؛ امین کیوان^(۳) و

محمود معصومیان^(۳)

Habib.Vahabzadeh@gmail.com

- ۱- دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، پونک صندوق پستی: ۱۹۵۸۵-۱۸۱
 - ۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۴۵۳
 - ۳- دانشگاه آزاداسلامی واحد لاهیجان، لاهیجان صندوق پستی: ۱۶۱۶
 - ۴- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۶۱۱۶
- 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 ۶ سری آزمایش با مقادیر ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ و ۹۰۰۰ $\mu\text{L/L}$ 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 از غلظتهای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ $\mu\text{L/L}$ پراکسید هیدروژن بعد از مرحله گاسترولا در انکوباتور بوشچنکو 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 در تیمار پراکسید هیدروژن ۵۵ درصد در مالاشیت گرین) و با توجه به اثبات برابری کارآیی آن و کم خطر بودن این ماده نسبت به مالاشیت گرین می‌توان از آن برای کنترل و درمان قارچ‌زدگی تخمهای تاسماهی ایرانی طی دوره انکوباسیون استفاده نمود.

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

مقدمه

بیماریهای قارچی مشکلی دامنه‌دار برای پرورش‌دهندگان ماهی می‌باشند (Rach *et al.*, 1997). گونه‌های قارچهای راسته ساپروولگنیا (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 سخت‌بوستان 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 خواسته‌های 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 ۵۰۰ μl/L را برای کنترل آلودگیهای قارچی تمام گونه‌ها و مراحل مختلف زندگی ماهی از جمله تخم آن بکار برد. تاثیر پراکسید هیدروژن 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

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 زایج 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 تکثیر طبیعی ناشی از صید بی رویه و آلودگی آب رودخانه‌ها را نماید. جهت نیل به هدف فوق کارایی 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 لقاخ 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 و تخمهایی که فاقد پوشش قارچی بودند، توزین شدند. با توجه به یکسان

بودن کشت اولیه در انکوباتور درصد وزنی این دو دسته در تیمارها 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 اندازه گیری و ثبت شد.

با توجه به هدف کنترل آلودگی قارچی و مقایسه اثر پراکسید هیدروژن و شاهد (مالاشیت گرین) بر قارچهای ساپروفیت محیط انکوباتور و تخمها (زنده ومرده) در هر بار آزمایش پس از بکارگیری پراکسید هیدروژن و مالاشیت گرین از تخمهای تحت تیمار و آب انکوباتور همزمان نمونه برداری شد. این نمونهها در آزمایشگاه میکروبیولوژی انستیتو تحقیقات ماهیان خاوباری 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 نمونه گیری 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 کارایی 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 آب گیری) به دفعات و با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم 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 نمونه گیری شد و با استفاده از لوپ چشمی بررسی و تخمهای لقاح نیافته، پارتوژنز و پلی اسپرمی مشخص و درصد لقاح براساس فرمول زیر تعیین گردید (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳).

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

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 جمع آوری و تعداد لارو در گرم محاسبه شد. تعداد لارو لاستحصالی طبق فرمول زیر محاسبه گردید :

$$\text{تعداد لارو لاستحصالی} = \text{وزن کل لارو لاستحصالی} \times \text{گرم / لارو}$$

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 = $100 \times$ 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، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰ 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 تکرار تمام 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 $8/30 \pm 0/27$ 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 ۶ بار آزمایش

شماره آزمایش	تاریخ شروع	میانگین دمای آب طی انکوباسیون	مدت زمان انکوباسیون (ساعت)
۱	۸۰/۲/۱۴	$20 \pm 1/5$	۱۳۰
۲	۸۰/۲/۲۰	$23/1 \pm 0/2$	۸۰
۳	۸۱/۲/۲	$15/30 \pm 4$	۱۴۴
۴	۸۱/۲/۱۰	$17 \pm 0/5$	۱۱۳/۵
۵	۸۱/۲/۱۸	$17 \pm 0/2$	۱۰۸/۵
۶	۸۱/۲/۲۶	$18/4 \pm 2/5$	۱۱۳

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

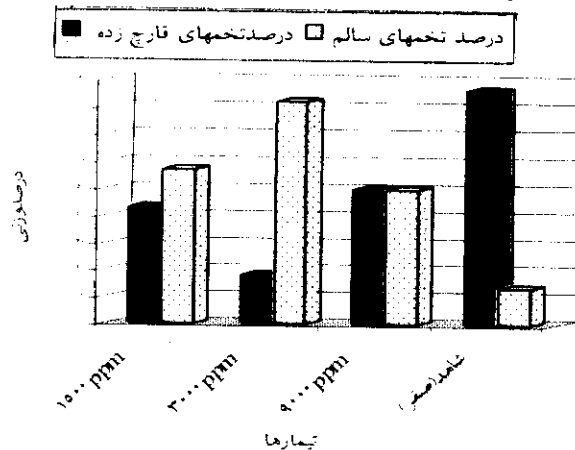
اکسیژن محلول در زمان استفاده از دارو و نیز طی دوره انکوباسیون در هر آزمایش بطور مرتب اندازه گیری شد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است.

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

شماره آزمایش	دفعات اندازه گیری	مقدار پراکسید هیدروژن مصرف شده در هر تیمار (μl/L)						میانگین DO (میلیگرم در لیتر)
		۹۰۰۰	۳۰۰۰	۲۰۰۰	۱۵۰۰	۱۰۰۰	۷۵۰	
۱	۴۳	۹/۷±۰/۷	۹/۲±۰/۸	--	۸/۸±۰/۵	--	--	۹/۱±۰/۴
۲	۱۴	--	۱۰/۹±۳/۹	--	۸/۷±۰/۵	--	--	۱۱/۵±۳/۱
۳	۳۶	۹/۹±۰/۴	--	۱۱/۱±۱/۹	۱۰/۶±۱/۷	--	۱۰/۱±۰/۶	۱۰/۴±۰/۶
۴	۲۵	۹/۸±۱/۰	--	--	۱۱/۵±۴/۴	۱۳/۹±۶/۸	۱۳/۴±۶/۸	۱۲/۲±۲/۹
۵	۱۸	۸/۸±۱/۳	--	--	۱۳/۷±۹/۶	۱۱/۹±۶/۹	۱۲/۶±۸/۵	۱۲/۱±۳/۴
۶	۱۹	۹/۳±۰/۳	--	--	۱۱/۴±۶/۱	۱۰/۹±۴/۷	۱۰/۵±۳/۵	۱۰/۶±۱/۶
میانگین	۲۵/۸	۱۰/۷±۲/۰	۹/۷±۱/۲	۱۱/۱±۱/۹	۱۱/۶±۲/۰	۱۰/۸±۱/۷	۱۱/۶±۲/۰	۱۰/۷±۰/۶
دفعات اندازه گیری	۱۵۳	۲۹	۱۸	۱۵	۱۰	۲۵	۳۰	۳۶

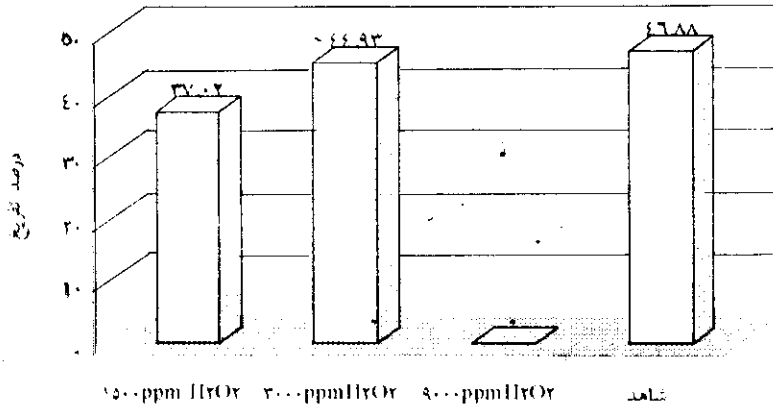
مقایسه میانگین درصد تخمهای قارچ زده و سالم در تیمارهای ۱۵۰۰، ۳۰۰۰ و ۹۰۰۰ μl/L که طی ۲۴ ساعت اول پس از لقاح با پراکسید هیدروژن ضد عفونی شده بودند با شاهد در جدول ۳ و نمودار ۱ نشان داده شده است.

نتایج آزمون توکی نشان می دهد که میانگین درصدهای وزنی اندازه گیری شده در تیمارها و شاهد با هم دارای اختلاف معنی داری است. در این آزمایش تیمار II با تیمار III و تیمار III با شاهد دارای اختلاف عمده ای در میانگین ها هستند.



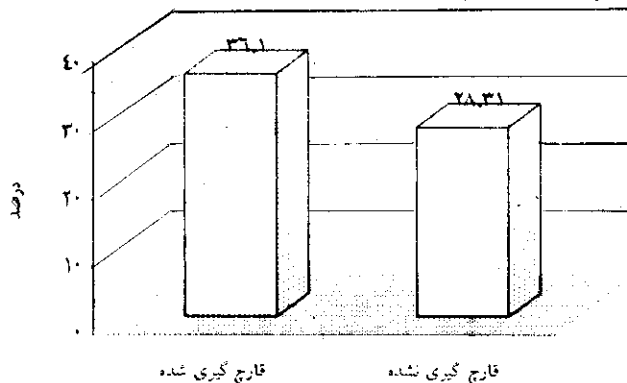
نمودار ۱: مقایسه درصد وزنی تخمهای قارچ زده و سالم در تیمارهای آزمایش اول (سال ۱۳۸۰)

آزمایش دوم سال ۱۳۸۰: در این آزمایش تخمهایی با لقاح ۶۶/۰۳ درصد بکار رفت. در این عمل طی ۲۴ ساعت اول پس از لقاح با مقادیر ۱۵۰۰ و ۳۰۰۰ و $\mu\text{L}/19000$ پراکسید هیدروژن بمدت ۱۵ دقیقه مورد درمان واقع شدند که نتایج درصد تفریخ در نمودار ۲ شده است.



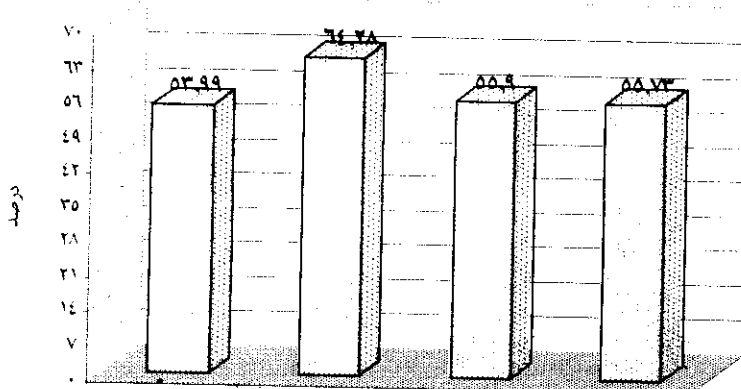
نمودار ۲: میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش دوم سال ۱۳۸۰)

نتایج آزمون توکی تنها نشانگر اختلاف تیمار III با سایر تیمارهاست که موجب مرگ تمام تخمها گردید. در این آزمایش مقایسه عملیات قارچ‌گیری و حذف فیزیکی قارچ هم انجام شد. میانگین درصد تفریخ تخمهای قارچ‌گیری 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 درصد بود، عبارت بود از: ۱۵۰۰، ۷۵۰، ۲۰۰۰ و شاهد (استفاده از مالاشیت). میانگین درصد تفریخ تخمها در نمودار ۴ نشان داده شده‌اند.

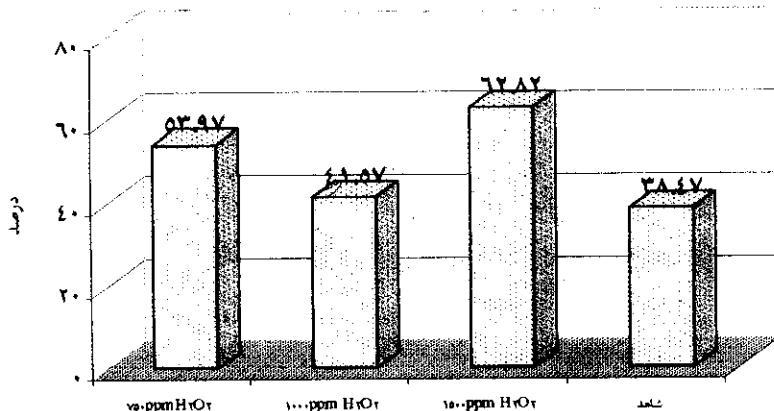


75.0 ppm H₂O₂ 150.0 ppm H₂O₂ 200.0 ppm H₂O₂ شاهد

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 µl/L H₂O₂) نسبت به سایر تیمارها و شاهد دارای مزیت نسبی بود.

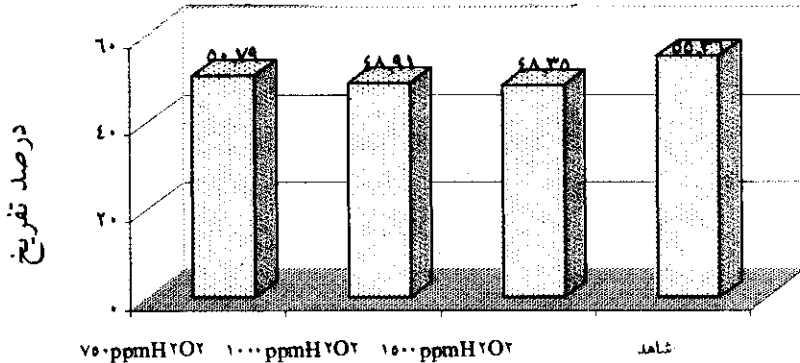
آزمایش چهارم (سال ۸۱): با در نظر گرفتن نتایج آزمایش قبلی در این آزمایش تیمارهای ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ µl/L و ملاشیت‌گرین (شاهد) با مدت زمان حمام دادن ۱۰ دقیقه‌ای طراحی گردید. (۸۱ درصد = درصد لقاح تخم) میانگین‌های درصد تفریخ تیمارها به شرح نمودار ۵ می‌باشد. تجزیه نتایج آزمون توکی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار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

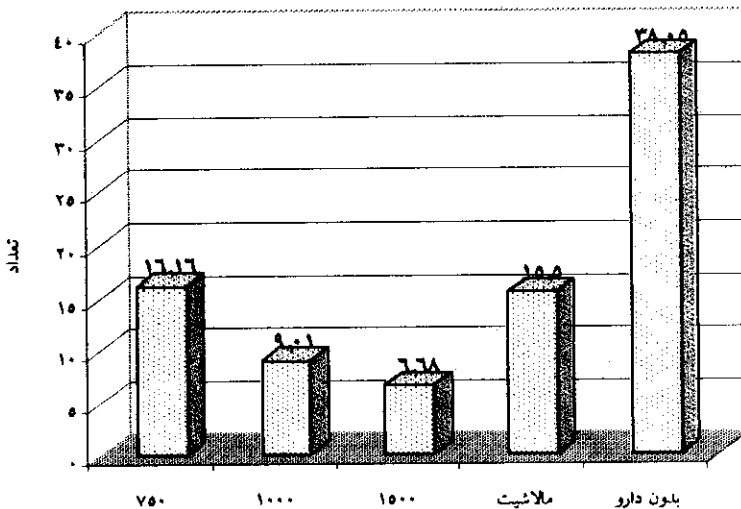
آزمایش پنجم (سال ۱۳۸۱): در این آزمایش تیمارها براساس آزمایش قبلی و با همان زمان ۱۰ دقیقه‌ای حمام دادن طراحی شد. درصد لقاح در این آزمایش ۷۳/۷ بوده است. میانگین درصد تفریخ

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

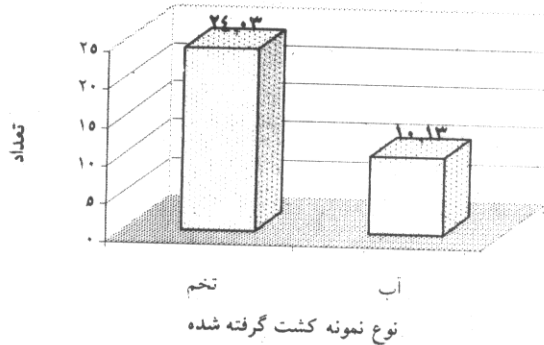


نمودار ۶: میانگین درصد تفریح در تیمارهای مورد بررسی (آزمایش پنجم سال ۱۳۸۱)

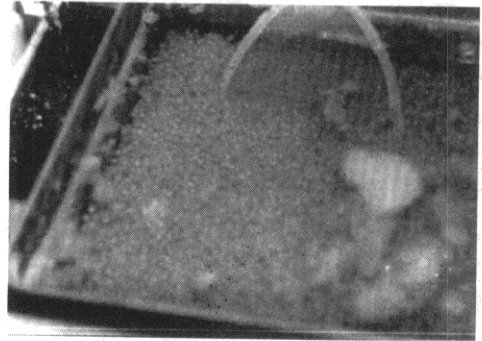
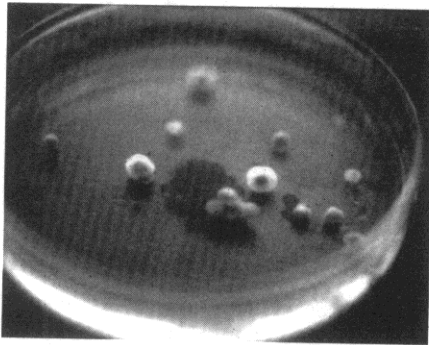
نتایج شمارش کلنی‌ها در کشت‌های قارچی تهیه شده از نمونه‌های تخم و آب که در زمان قبل از دارو زدن (ملاشیت‌گرین و پراکسید هیدروژن) در تیمارهای ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ ملاشیت‌گرین و صفر گویای اختلاف معنی‌دار تیمار ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ با سایر تیمارهاست. نمودار ۷ نشان‌دهنده میانگین‌ها می‌باشند، همچنین میانگین‌های تعداد کلنی 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 (نمودار ۸). تنها گونه شناسایی شده جنس پتیسیلیوم (*Penicilium*) بود. بنابراین مقایسه اصلی تیمارها براساس تعداد کلنی‌های رشد یافته در محیط‌های کشت انجام شد زیرا اولاً گونه‌های یادشده نمایانگر تمام گونه‌های موجود در محیط انکوباتور نبود و ثانياً امکان تهیه محیط کشت اختصاصی برای تمام گونه‌ها میسر نبود. با اینحال تخمهای قارچ‌زده و پوشیده شده از قارچ ساپروولگنیا (*Saprolegnia*) بوضوح در انکوباتورها مشاهده شدند (اشکال ۱، ۲ و ۳).



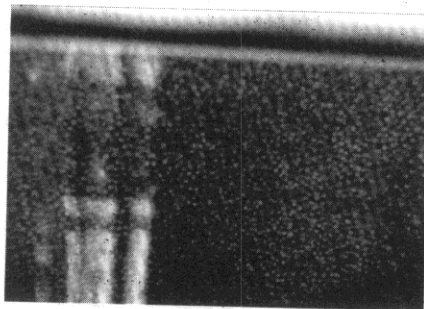
نمودار ۷: میانگین تعداد کلنی در تیمارهای مورد بررسی



نمودار ۸: میانگین تعداد کلنی برحسب نوع نمونه کشت گرفته شده در تیمارهای مورد بررسی



شکل ۱ و ۲ از راست به چپ: تخمهای فارچزده تاسماهی ایرانی در انکوباتور پوشچنکو و آزمایشگاه



شکل ۳: تخمهای سالم (آزمایش اول)

بحث

در این مطالعه که برای اولین بار تاثیر داروی پراکسید هیدروژن در تیمار تخم تاسماهی ایرانی بررسی شد هدف اصلی ارزیابی کارایی مقادیر داروی یاد شده جهت انتخاب آن بعنوان جایگزینی ایده آل برای مالاشیت گرین 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 $\mu\text{l/L}$ و مالاشیت گرین (شاهد دوم) و شاهد (صفر)، درصد وزنی تخمهای قارچ زده و سالم و تعداد کلنی های تشکیل شده پس از کشت قارچ نمونه های آب و تخم در انکوباتورها بعنوان معیار کارایی تیمارها مورد ارزیابی قرار گرفتند. البته موفقیت تفریخ علاوه بر درمان های شیمیایی به عوامل دیگری از جمله گونه ماهی، درصد لقاح، سلامت تخمها و مولدین، شرایط لقاح، دستکاری تخم، دمای آب مرحله جنینی و زمان بکارگیری دازو 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 عمده ای بر آلودگی قارچی تخمها نخواهد داشت و حتی مقادیر بالا نظیر $\mu\text{l/L}$ ۹۰۰۰ و ۶۰۰۰ در هر مرحله تمام تخمها را از بین می برد (Rach et al., 1998). برغم آنکه در مورد گونه های مختلف ماهی مقادیر ۲۵۰ و $\mu\text{l/L}$ ۵۰۰ طی ۱۵ دقیقه (Dawson et al., 1994) یا $\mu\text{l/L}$ ۱۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه را پیشنهاد کرده اند (Rach et al., 1998) اما در صورت بکارگیری این ماده پس از مرحله گاسترولاسیون تخم تاسماهی ایرانی بخصوص در مقدار $\mu\text{l/L}$ ۱۵۰۰ بصورت حمام ۱۰ دقیقه ای علاوه بر آنکه تا حد معنی داری بر آلودگی قارچی تخمها موثر است بلکه با توجه به شرایط اکسیژن محلول آب، دمای آب، درصد لقاح تخم در مواردی بر شاهد (مالاشیت گرین) برتری هم دارد. همچنین مقایسه آماری میانگین تعداد کلنی های رشد یافته پس از کشت نمونه های آب و تخم نیز موید نتیجه فوق و مزیت نسبی تیمار $\mu\text{l/L}$ ۱۵۰۰ می باشد. با اینحال نکته قابل توجه وجود تخمهای قارچ زده طی دوره آزمایش در تمام تیمارها اعم از شاهد، مالاشیت گرین و مقادیر مختلف پراکسید هیدروژن می باشد که چنین نتیجه ای برای تاسماهی دریاچه ای (*Acipenser fluvescens*) نیز گزارش شده است (Rach et al., 1998). بنابراین لزوم حذف تخمهای ناسالم بعنوان سوبسترای رشد قارچ تاکید می شود (Noga, 2000; Willoughby & Roberts, 2000). ضمن اینکه این روش موجب سهولت تفریخ لاروها، تنفس و سلامت آنها پس از تفریخ می شود (آذری تاکامی و کهنه شهری، ۱۳۵۳). نتایج آزمایشها و مشاهدات نشان می دهد که استفاده از پراکسید هیدروژن دارای مزیت جداسازی تخمهای قارچ زده می باشد. 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 می شدند که این امر موجب سهولت جمع آوری منابع آلودگی بدون آسیب رساندن به تخمهای سالم

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 کنترل‌کننده عارضه قارچ‌زدگی موثر می‌باشد. بنابراین با توجه به مضرات یاد شده مالاشرت‌گرین 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 تفریح و عوارض فیزیولوژیک در تاسماهیان می‌شود (ایگومنوا، ۱۹۹۲) ولی در این تحقیق اولاً زمان افزایش ناگهانی اکسیژن کمتر از ۱۰ دقیقه بود و ثانیاً اختلاف زمانی معنی‌داری بین زمان تفریح در تیمارها و شاهد بوجود نیامد. همچنین تحقیقات نشان‌دهنده ارتباط ضعیف بین میزان اکسیژن و بازماندگی جنین در یک دوره انکوباسیون می‌باشد (ایگومنوا، 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 تفریح لاروها نداشت، با توجه به اینکه مدت زمان تغییرات اکسیژن آب انکوباتور نسبت به کل دوره جنینی کمتر از ۰/۱ 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 کارایی 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 $1000 \mu\text{l/L}$ هم با توجه به شرایط یاد شده استفاده نمود. از سویی نتایج مقایسه کارایی 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 $1000 \mu\text{l/L}$ و مدت زمان حمام دادن ۱۵ دقیقه 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 گرمایی) بکار رفته و حتی در مورد سمیت این ماده نیز بررسیهایی انجام شده است که همگی بر موثر

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.

تشکر و 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 یآوری، 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 یلغی، 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 Schreier, 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.

- 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. | 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.

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

Evaluation of Hydrogen Peroxide effectiveness in fungal disinfection 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 Veterinary 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 (H₂O₂) 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 controlling the infection. The results showed that eggs treated with 1000 and 1500 µl/l of H₂O₂, 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 H₂O₂ was used. Hence, the chemical can be introduced to the sturgeon hatcheries as an appropriate anti-fungal agent.