

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

اکبر بنوره^(۱)؛ بهروز ابطحی^(۲)؛ عیسی شریف پور^(۳) و حسین عبدالحی^(۴)

abtahibm@modares.ac.ir

۱ و ۲- دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، تهران صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

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

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۶

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۸۴

لغات کلیدی: پراکسید هیدروژن، سبز مالاشیت، قارچ زدگی، قزل‌آلای رنگین‌کمان

(Sea lice). تک‌یاخته‌ها و ترماتودهای تک میزبان استفاده می‌شود (Schreier et al., 1996).

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

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

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

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

الف) میزان قارچ زدگی (Fungal Infection):

$$I = \frac{\text{تعداد تخمهای قارچ زده}}{\text{تعداد کل تخم ها}} \times 100$$

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

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

$$E = \frac{\text{تعداد تخمهای چشم زده}}{\text{مرگ و میر ابتدایی - تعداد کل تخمها}} \times 100$$

ج) میزان تفریخ (Arndt et al., 2001):

$$H = \frac{\text{تعداد تخمهای تفریخ شده}}{\text{تعداد تخمهای چشم زده}} \times 100$$

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SPSS و از روش تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت. نتایج اندازه‌گیری عوامل فیزیکی و شیمیایی آب در دوره انکوباسیون تخمها در زمان انجام تحقیق (ماههای آذر و دی) در جدول ۱ نشان داده شده است.

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

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

پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل درجه حرارت، pH، اکسیژن محلول، هدایت الکتریکی و سختی دوبار در شبانه‌روز با استفاده از دستگاه Multiline F/SET-3 اندازه‌گیری و ثبت شدند. برای تعیین مقدار پراکسید هیدروژن در آب انکوباتور (جهت شناخته شدن دینامیک تغییرات این ماده در آب) از روش تیتراژ پرمنگنات پتاسیم استفاده شد. بدین نحو که پس از ۵ و ۱۵ دقیقه که از تیمار دارویی پراکسید هیدروژن گذشت، مقدار مشخصی از آب انکوباتور (۱۰ میلی‌لیتر) را برداشته و ۴ تا ۵ قطره اسید سولفوریک ۵ نرمال به آن افزوده و سپس قطره قطره محلول پرمنگنات پتاسیم ۰/۰۵ مولار اضافه شد تا اینکه در نهایت با تکان دادن ظرف حاوی محلول مورد نظر، رنگ صورتی تثبیت شود (Jeffery, 1989; Rach et al., 1995).

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

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

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

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

نتایج آزمون دانکن بیانگر افزایش میزان درصد چشم‌زدگی در تیمارهای پراکسید هیدروژن با غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر می‌باشد که این دو تیمار با تیمارهای سبزمالاشیت و شاهد صفر اختلاف معنی‌داری داشته و پراکسید هیدروژن با غلظت ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر با بقیه تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). تفریح کامل تخمها ۴۳ روز طول کشید و درصد تفریح در تیمارهای مورد بررسی در جدول ۵ نشان داده شده است.

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

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

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

جدول ۳: نتایج میانگین میزان قارچ‌زدگی، توده‌های قارچ‌زده و تعداد تخم در داخل هر توده

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

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$).

جدول ۴: نتایج میانگین درصد چشم‌زدگی در تیمارهای مختلف

تیمار	درصد چشم زدگی
پراکسید هیدروژن (۵۰۰ میکرولیتر در لیتر)	۶۹±۲۷ ^{ab} *
پراکسید هیدروژن (۷۵۰ میکرولیتر در لیتر)	۷۶/۲±۱/۴ ^a
پراکسید هیدروژن (۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر)	۷۲/۶±۵/۱ ^a
سبزمالاشیت (۱/۵ میلی گرم در لیتر)	۶۲/۲±۲/۹ ^b
شاهد	۶۴/۶±۰/۳ ^b

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$).

جدول ۵: میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مورد بررسی

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

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی‌داری هستند ($P < 0.05$).

تا تفریخ در تیمار مالاشیت افزایش می‌یابد و در این حال، پراکسید هیدروژن با از بین بردن باکتری‌های موجود بر روی پوسته تخم باعث افزایش میزان چشم‌زدگی و تفریخ می‌شود (Barnes et al., 2000).

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

نتایج آزمون دانکن بیانگر آن است که درصد تفریخ در تیمار پراکسید هیدروژن با غلظت ۷۵۰ میکرولیتر بر لیتر با تیمار سبزمالاشیت اختلاف معنی‌دار داشته ($P < 0.05$) ولی با بقیه تیمارها فاقد اختلاف است ($P > 0.05$).

نتایج حاصل از تیمارهای پراکسید هیدروژن برای تخم قزل‌آلای رنگین کمان حاکی از آن است که پراکسید هیدروژن از لحاظ میزان قارچ‌زدگی ضعیف‌تر از سبزمالاشیت عمل می‌کند ولی از لحاظ میزان چشم‌زدگی پراکسید هیدروژن با غلظتهای ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر بر سبزمالاشیت برتری دارد. همچنین میزان تفریخ در تیمار پراکسید هیدروژن نسبت به تیمار سبزمالاشیت بصورت معنی‌داری بیشتر است و این امر می‌تواند ناشی از آن باشد که تراکم باکتری از مرحله چشم‌زدگی

تشکر و قدردانی

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

منابع

- آذری تاکامی، ق.، ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی. انتشارات پرپور، صفحات ۱۲۶ تا ۱۴۶.
- مخیر، ب.، ۱۳۷۴. بیماریهای ماهیان پرورشی. انتشارات دانشگاه تهران، صفحات ۱۷۶ تا ۱۹۴.
- Arndt, E.R.; Wagner, E.J. and Routledge, M.D. , 2001. Reducing or withholding hydrogen peroxide treatment during a critical stage Rainbow Trout development: Effects on eyed eggs, hatch, deformities, and fungal control. North American Journal of Aquaculture. Vol. 63, pp.161-166.
- Barnes, M.E.; Ewing, D.E.; Cordes, R.J and Young, G.L. , 1998. Observation on hydrogen peroxide control of *Saprolegnia spp.* during Rainbow Trout egg incubation. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 60, pp.67-70.
- Barnes, M.E.; Gabel, A.C. and Cordes, R.J. , 2000. Bacterial population during Rainbow Trout egg culture in vertical-flow tray incubators. North American Journal of Aquaculture. Vol. 62, pp.48-53.
- Barnes, M.E. and Stephenson, H. , 2003. Use of hydrogen peroxide and formalin treatments durring incubation of Landlocked fall chinook salmon eyed eggs. North American Journal of Aquaculture. Vol. 65, pp.151-154.
- Bruno, D.V. and Wood, B.P. , 1994. Saprolegnia and other oomycets. Fish Disease. CABI Pub. UK. pp.599-659.
- Howe, G.E.; Gingerich, W.H.; Dawson, V.K. and Olson, J.J. , 1999. Efficacy of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel cat fish. Journal of Aquatic Animal Healths. Vol. 11, pp.222-230.
- Jeffery, G.H. , 1989. Textbook of qualitatve chemical analysis, 5th edition, pp.272-273.
- Marking, L.L.; Rach, J.J. and Schreier, T.M. , 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. The Progressive Fish-Culturist. Vol. 59, pp.225-232.
- Noga, E.J. , 2000. Fish disease: Diagnosis and Treatment. Mosby-Yearbook, Inc, St. Louis, USA. 367P.
- Pottinger, T.G. and Day, J.G. , 1999. A *Saprolegnia parasitica* challenge system for Rainbow Trout: Assessment of pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova, Disease, Aquaculture, Organism, Vol. 36, pp.129-141.
- Rach, J.J.; Gaikowski, M.P.; Howe, G.E. and Schreier, T.M. , 1998. Evaluation of toxicity and efficacy of hydrogen peroxide treatments on eggs of warm and cool water fishes. Aquaculture. Vol. 165, pp.11-25.
- Rach, J.J.; Howe, G.E. and Schreier, T.M. , 1995. A miniature hatching system for evaluating chemical treatments on fish eggs. Elsevier Science. Vol. 29, No. 9, pp.2103-2107.
- Schreier, T.M.; Rach, J.J. and Howe, W. , 1996. Efficacy of formalin, hydrogen proxide and sodium chloride on fungal-infected Rainbow Trout eggs. Aquaculture. Vol. 140, pp.323-331.

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

Banavreh A.⁽¹⁾; Abtahi B.^{(2)*}; Sharifpour I.⁽²⁾ and Abdolhay H.⁽³⁾

abtahibm@modares.ac.ir

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

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

Received: September 2005 Accepted: July 2007

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

Abstract

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

* Corresponding author