

مقایسه اثر فرمالین با مالاشیت سبز در کنترل عفونت های قارچی تخم، درصد تفریح و ناهنجاری های لاروی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

اکبر بنوره^۱، محمد کاظم میرزاخانی^{۲*}، بهروز ابطحی^۳، مرتضی کمالی^۴

۱ و ۲- موسسه آموزش عالی خزر، گروه شیلات، محمود آباد، مازندران، ایران، صندوق پستی: ۳۸۹-۴۶۳۱۵

۳ و ۴- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، نور، مازندران، ایران، صندوق پستی: ۶۴۴۱۴۳۵۶

mirzakhani@khazar.ac.ir

چکیده

آلودگی قارچی می تواند باعث تلفات و کاهش درصد تفریح در تخم آزادماهیان گردد. در ایران، در اغلب مراکز تکثیر هنوز هم از مالاشیت سبز جهت کنترل قارچ زدگی تخمها استفاده می شود. ولی، با توجه به اثرات نامطلوب مالاشیت سبز مانند سرطانزایی، ضروری است از مواد مطلوب شیمیایی دیگر نظیر فرمالین که در چند سال اخیر به عنوان داروی مناسب معرفی شده است، استفاده گردد. در این تحقیق فرمالین با دو غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر، مالاشیت سبز با غلظت متعارف کارگاه (۱/۵ میلی گرم در لیتر) و تیمار کنترل (شاهد) بدون استفاده از دارو، جهت ارزیابی قارچی شدن تخم ها در نظر گرفته شدند. هر تیمار شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰۰۰ عدد تخم بود. از مدت زمان ۴۸ ساعت پس از لقاح، تیمار دارویی با فرمالین و مالاشیت سبز به صورت یک روز در میان تا ۴ روز قبل از تفریح به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. در پایان آزمایش، بر اساس آزمون واریانس یکطرفه و دانکن، میزان قارچ زدگی تخمها در تیمار مالاشیت سبز نسبت به سایر تیمارها کمتر بود و با آنها اختلاف معنی داری داشت ($p \leq 0/05$). میزان چشم زدگی در تیمار فرمالین با غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر نسبت به تیمارهای مالاشیت سبز و تیمار شاهد بیشتر و دارای اختلاف معنی دار بود ($p \leq 0/05$)، ولی نسبت به تیمار فرمالین با غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر دارای اختلاف معنی دار نبود ($p > 0/05$). میزان تفریح در تیمار فرمالین با غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر نسبت به تیمار مالاشیت سبز دارای اختلاف معنی دار بود ($p \leq 0/05$). در نهایت، میزان ناهنجاری لاروی در هیچ کدام از تیمارها اختلاف معنی دار نداشت ($p > 0/05$).

کلمات کلیدی: قزل آلائی رنگین کمان، قارچ زدگی، مالاشیت سبز، فرمالین.

مقدمه

سaprolegniasis)، نوعی بیماری قارچی در ماهیان و تخم های آنها می باشد که عامل آن از قارچ های خانواده ساپروولگنیاسه است (۱۱). این قارچ ها اساساً در آب های شیرین زندگی می کنند اما بعضی از آنها می توانند در آب های شور (تا ۲/۸ در هزار)، رشد کنند و در آب های دریایی مشاهده نمی شوند (۲۰۱). دستکاری ماهی، تغییر درجه حرارت، وجود انگل و افزایش بار مواد آلی شانس ابتلا به بیماری ساپروولگنیاسه را بیشتر می کند (۷). ازدیاد قارچ های آبزی (Saprolegniaceae) در آب مشکلاتی را در تخم های ماهیان پرورشی ایجاد می کند (۱۶)، هر چند که حساسیت تخم های ماهیان به عفونت های قارچی اغلب بستگی به کیفیت آب، میزان جریان آب و تراکم تخم های ماهیان در انکوباتور دارد. تخم های مرده و مواد آلی در آبی پروری به عنوان بستری مناسب برای رشد قارچ ها محسوب می شوند. برای کنترل این عارضه (Saprolegniasis) یکی از روش های قابل قبول در پرورش آبزیان استفاده از داروهای شیمیایی است. البته باید این نکته را در نظر داشت که داروهای شیمیایی را همیشه نمی توان با یک معیار به کار برد، زیرا کارایی و سمیت این مواد در حضور مواد آلی و شرایط فیزیکی شیمیایی آب متغیر است (۱۴ و ۹). با این حال دارو درمانی با مواد شیمیایی، روش رایج درمان این عارضه بخصوص در مورد تخم ماهیان است. از جمله داروهای موثر برای درمان یا پیشگیری این عارضه، مالاشیت سبز می باشد که بواسطه اثرات مطلوب قارچ کشی و سهولت استفاده از آن، همواره مورد توجه دست اندرکاران تکثیر و پرورش ماهی بویژه در ایران بوده است. در سال ۱۹۹۱ اداره غذا

و دارو در آمریکا (FDA) پس از مشخص شدن اثرات مضر مالاشیت سبز نظیر سرطان زایی، ناقص الخلقه زایی و تجزیه کند آن در طبیعت، استفاده از این دارو را ممنوع اعلام کرد (۱۲ و ۱۰). پس از آن، بر روی اثر بخشی داروهای دیگر تحقیقات بسیاری انجام شد و در این میان فرمالین به عنوان یکی از داروهای ضد قارچ موثر معرفی شد (۱۰). محققین در سال ۱۹۹۶ استفاده از فرمالین با غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر را برای اغلب ماهیان سردابی و گرمابی توصیه نمودند (۱۲). همچنین در سال ۱۹۹۶ غلظت ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر از فرمالین را جهت قارچ کشی و افزایش درصد تفریح در سالن های انکوباسیون تخم ماهی قزل آلی رنگین کمان مفید تشخیص دادند (۱۶). در سال ۲۰۰۰ با استفاده از فرمالین با غلظت ۱۶۶۷ میکرولیتر بر لیتر تلفات تخم های ماهیان قزل آلی رنگین کمان از مرحله چشم زدگی تا تفریح را کاهش دادند (۵).

متأسفانه در ایران هم اکنون در اکثر مزارع تکثیر و پرورش، برای جلوگیری از عفونت های قارچی از مالاشیت سبز استفاده می شود و نیاز است که تحقیقات بیشتری در مورد داروهای جایگزین انجام شود. این تحقیق با هدف تعیین کارایی فرمالین به عنوان یکی از داروهای موثر در کنترل ساپروولگنیازیس تخم قزل آلا 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 تفاوت های احتمالی در جنس و گونه های قارچ های بیماریزا، نتایج متفاوت از کاربرد داروها دور از انتظار نیست.

پارامتر های فیزیکی و شیمیایی آب شامل درجه حرارت، pH، اکسیژن محلول، هدایت الکتریکی و سختی دوبار در شبانه روز با استفاده از دستگاه Multiline F/SET-3 اندازه گیری و ثبت شدند. برای تعیین درصد لقاح، تخم ها ۹ روز پس از تقسیمات بلاستولایی درون اسید استیک ۵٪ قرار داده شدند (۴).

فاکتور های مورد بررسی در این تحقیق عبارتند از: الف) میزان قارچ زدگی:

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

در کنار میزان قارچ زدگی از مرحله لقاح تا مرحله چشم زدگی، تعداد تخم های قارچ زده، توده های قارچ زده و تعداد تخم در داخل هر توده مشخص شدند (۳).

ب) میزان چشم زدگی (۳):

$$E = \frac{\text{تعداد تخم های چشم زده}}{\text{مرگ و میر ابتدایی - تعداد کل تخم ها}} \times 100$$

ج) میزان تفریخ (۳):

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

د) میزان ناهنجاری:

در نهایت شش روز پس از تفریخ، لارو های ناهنجار مشخص شدند که این لاروها عبارت بودند از: لاروهای خمیده، لاروهای سر سوزنی، لاروهای که دارای کیسه زرده ناهنجار بودند و همچنین لاروهایی که کیسه زرده به هم چسبیده داشتند (۳):

مواد و روشها

این تحقیق در کارگاه تکثیر آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت از آبان تا بهمن ماه ۱۳۸۲ طی مدت ۳ ماه انجام شد. پس از تخم کشی از ۱۸ مولد، تخم ها با هم مخلوط و سپس با اسپرم مولدین نر لقاح داده شدند. سپس تخم ها به مدت حدوداً یک ساعت در داخل تشتک (در محیط بدون نور) قرار داده شدند تا آب جذب کنند. بعد از این مرحله با استفاده از پیمانانه مدرج و شمارش حجمی تخم ها، تعداد ۱۰۰۰ عدد تخم قزل آلا در داخل 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 فرمالین (۳۷٪ ماده فعال) با غلظت های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر (۱۴ و ۱۶) به مدت ۱۵ دقیقه در روزهای متوالی (یک روز در میان) تا چهار روز قبل از تفریخ صورت گرفت. برای تعیین میزان داروی مورد نیاز از رابطه زیر استفاده شد (۱۵):

$$X = Cf \times T \times E \times K$$

Cf = غلظت فرمالین، T = مدت زمان اعمال دارو،

E = دبی آب انکوباتور در دقیقه.

K = فاکتور ثابت (برای رساندن فرمالین به ۱۰۰٪ ماده

فعال) که معادل ۲/۵ است.

X = غلظت فرمالین محاسبه شده.

تیمار دارویی با مالاشیت سبز هم در غلظت ۱/۵ میلی گرم در لیتر (غلظت متعارف کارگاه) به صورت متوالی تا چهار روز قبل از تفریخ انجام شد. در این تحقیق، تیمار شاهد که با هیچ دارویی درمان نمی شد نیز در نظر گرفته شد.

میانگین میزان قارچ زدگی، توده های قارچ زده و تعداد تخم در داخل هر توده در مرحله چشم زدگی در جدول ۲ نشان داده شده است. بطوریکه آزمون واریانس یکطرفه اختلاف معنی دار آماری را نشان می دهد. نتایج آزمون دانکن نشانگر اختلاف معنی دار ($p \leq 0/05$) بین تیمار مالاشیت سبز با سایر تیمارهاست و بقیه تیمارها با هم اختلاف معنی داری نداشتند ($p > 0/05$) (شکل ۱). لازم به ذکر است که به علت پایین بودن دمای آب انکوباسیون، چشم زدگی ۳۲ روز پس از لقاح صورت گرفت.

$$M = \frac{\text{لاروهای ناهنجار}}{\text{تخم های تفریخ شده}} \times 100$$

برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار آماری SPSS و آزمون واریانس یکطرفه استفاده شد و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن (Duncan) انجام پذیرفت.

نتایج

نتایج اندازه گیری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در دوره انکوباسیون تخم ها در زمان انجام تحقیق (ماههای آذر و دی ۱۳۸۲) در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: نتایج اندازه گیری پارامترهای فیزیکی و شیمیایی آب در دوره انکوباسیون تخم ها

میانگین	عامل
۸/۰۵±۰/۵۵	اکسیژن محلول (میلی گرم در لیتر)
۸/۸±۲/۲	دما (درجه سانتی گراد)
۷/۹۵±۰/۰۵	pH
۱۳۲±۲۰	سختی (میلی گرم بر لیتر)
۳۳۶±۲۴	هدایت الکتریکی (میکروزیمنس بر سانتیمتر)

جدول ۲: نتایج میانگین میزان قارچ زدگی، توده های قارچ زده و تعداد تخم در داخل هر توده بر حسب نوع تیمار

میانگین تعداد تخم در هر توده قارچ زده	تعداد توده های قارچ زده	درصد تخم قارچ زده	میزان قارچ زدگی نوع تیمار
۶/۲	۲۳	۱۴/۰۶±۳/۹ b*	فرمالین ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۳/۹	۲۳	۸/۷±۴/۵ b	فرمالین ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۵/۴	۲	۱/۱±۱/۵a	مالاشیت سبز ۱/۵ میلی گرم در لیتر
۴/۳	۲۳	۹/۷±۴/۵b	شاهد

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی داری هستند ($p < 0/05$)



شکل ۱: نمایی از تخم های قارچ زده جمع آوری شده

جدول ۳: نتایج میانگین درصد چشم زدگی در

تیمارهای مختلف

درصد چشم زدگی	میزان چشم زدگی نوع تیمار
۶۶/۹±۳/۳ab*	فرمالین ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۷۲/۴±۷a	فرمالین ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۶۲/۲±۲/۹b	مالاشیت سبز ۱/۵ میلی گرم در لیتر
۶۴/۶±۰/۳b	شاهد صفر

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی

داری هستند ($p < 0/05$).

میانگین درصد چشم زدگی در تیمارهای مورد بررسی، در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس آزمون واریانس یکطرفه بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری دیده شد. نتایج آزمون دانکن بیانگر افزایش میزان درصد چشم زدگی در تیمار فرمالین ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر می باشد به طوری که این با تیمارهای مالاشیت سبز و شاهد صفر اختلاف معنی داری داشته ($p \leq 0/05$) ولی با تیمار فرمالین ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر اختلاف معنی داری نشان نداد ($p > 0/05$).

جدول ۵: نتایج میانگین درصد ناهنجاری لاروها

در تیمارهای مختلف

درصد ناهنجاری	میزان ناهنجاری نوع تیمار
۰/۱۹±۰/۰۷a*	فرمالین ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۰/۱۴±۰/۰۷a	فرمالین ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۰/۲±۰/۰۸a	مالاشیت سبز ۱/۵ میلی گرم در لیتر
۰/۱±۰/۱۴a	شاهد صفر

*اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی

داری هستند ($p < 0/05$).

بحث

با وجود تحقیقات فراوانی که بعد از ممنوعیت استفاده از مالاشیت سبز در سال ۱۹۹۱ بر روی داروهای جایگزین انجام شده است، ولی به نظر می رسد که استفاده از این داروها در ایران ناشناخته باقی مانده است. برخی از این داروها مانند فرمالین و پراکسید هیدروژن علاوه بر خاصیت قارچ کشی دارای خاصیت باکتری کشی نیز می باشند (۸۰۶). نتایج حاصل از تیمارهای فرمالین برای جلوگیری از قارچی شدن تخم ماهی قزل آلائی رنگین کمان در این تحقیق حاکی از آن است که فرمالین از لحاظ تاثیر بر میزان قارچ زدگی ضعیفتر از مالاشیت سبز عمل می کند، ولی از لحاظ تاثیر بر میزان چشم زدگی تیمار فرمالین (با غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر) نسبت به تیمار مالاشیت سبز و تیمار شاهد دارای افزایش معنی داری می باشد و همچنین میزان تفریخ در تیمار فرمالین با غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر نسبت به سایر تیمارها بالاتر و با تیمار مالاشیت سبز اختلاف معنی داری دارد. تاثیر فرمالین در افزایش میزان تفریخ در تحقیقات Schreier و

میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مختلف در جدول ۴ نشان داده شده است. بطوریکه طبق آزمون واریانس یکطرفه بین تیمارها اختلاف معنی دار وجود داشت. نتایج آزمون دانکن مربوط به درصد تفریخ تیمارهای مورد بررسی بیانگر این مطلب است که درصد تفریخ در تیمار فرمالین با غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر نسبت به سایر تیمارها بالاتر و با تیمار مالاشیت سبز اختلاف معنی دار دارد ($p < 0/05$).

جدول ۴: نتایج میانگین درصد تفریخ در تیمارهای مختلف

درصد تفریخ	میزان تفریخ نوع تیمار
۹۸/۴±۰/۳ab	فرمالین ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۹۹/۵±۰/۵ b*	فرمالین ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر
۹۸/۲±۰/۱ a	مالاشیت سبز ۱/۵ میلی گرم در لیتر
۹۸/۳±۰/۲۴ ab	شاهد صفر

*اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی

داری هستند ($p < 0/05$).

در نهایت، میانگین درصد ناهنجاری لاروها یک هفته پس از تفریخ کامل تخم ها مشخص شد که نتایج آن در جدول ۵ نشان داده شده است. هر چند که میزان ناهنجاری در تیمار مالاشیت سبز بیشتر از سایر تیمارها بود، ولی آزمون واریانس یکطرفه و آزمون دانکن در این مورد اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نشان نداد ($p > 0/05$).

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری صمیمانه مدیریت مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت و سایر پرسنل محترم آن مرکز که در انجام این تحقیق ما را یاری نموده اند تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

۱. آذری تاکامی، ق.، ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روشهای پیشگیری و درمان بیماریهای ماهی، انتشارات پرپور، ص ۱۴۶-۱۲۶.
۲. مخیر، ب.، ۱۳۷۴. بیماریهای ماهیان پرورشی، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۱۹۴-۱۷۶.
3. Arndt, E.R.; Wagner, E.J. and Rout ledge, 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, 63: 161- 166.
4. 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 – Cuturist, 60:67-70.
5. Barnes, M.E.; Wintersteen, K.; sayler, W. and Cordes, R., 2000. Use of formalin during incubation of Rainbow Trout eyed eggs, North American Journal of Aquaculture, 62: 54-59.
6. Barnes, M.E. and Stephenson, H., 2003. Use of Hydrogen Peroxide and Formalin during incubation of Landlicked Fall Chinook Salmon eyed eggs, North American Journal of Aquaculture, 65: 151-154.
7. Bruno, D.V. and Wood, B.P., 1994. Saprolegnia and other Oomycets. In Fish Disease, CABI pub. UK. Pp. 599 - 659.

همکاران نیز در سال ۲۰۰۰ به اثبات رسیده است (۱۶). این امر احتمالاً می‌تواند به این دلیل باشد که تراکم باکتریها بر روی پوسته تخم از مرحله چشم زدگی تا تفریخ به اوج خود می‌رسد و فرمالین با از بین بردن باکتریهای موجود بر روی پوسته تخم باعث افزایش میزان چشم زدگی و تفریخ می‌گردد (۵). باکتریها در محیط انکوباسیون تخم ماهیان قزل آلائی رنگین کمان از روزهای ابتدایی نمو جنینی تا روزهای پایانی آن حضور دارند (۴) ولی جمعیت آنها به طور معمول بعد از مرحله چشم زدگی تا زمان تفریخ افزایش می‌یابد (۵). بنابراین می‌توان بیان نمود افزایش درصد چشم زدگی و درصد تفریخ با استفاده از تیمار فرمالین (غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر) به دلیل خاصیت باکتری کشی آن در مقایسه با مالاشیت سبز می‌تواند باشد.

در تحقیقات پیشین از فرمالین در غلظتهای ۲۵۰ تا حتی ۲۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر برای کنترل بیماریهای قارچی در سالنهای تکثیر ماهیان استفاده شده است (۵)، (۱۰ و ۶) و بهترین غلظت برای آزادماهیان ۱۶۶۷ میکرولیتر بر لیتر عنوان گردیده است (۶) که نتایج تحقیق حاضر نیز می‌تواند تاییدی بر آن باشد.

بنابراین با توجه به یافته‌های این تحقیق، با در نظر گرفتن تاثیر مثبت فرمالین بر درصد تفریخ می‌توان آن را داروی مناسبی برای بکارگیری در کنترل بهداشتی کارگاههای تکثیر قزل آلا دانست. هرچند اثر قارچ کشی فرمالین در مقایسه با مالاشیت سبز کمتر است، ولی کم خطر بودن آن در مقایسه با مالاشیت سبز نکته قابل توجه دیگری برای این ماده محسوب می‌شود.

8. Giesecker, C.M.; Serfling, S.G. and Reimschuessel, R., 2006. Formalin treatment to reduce mortality associated with *Saprolegnia parasitica* in rainbow trout. *Aquaculture*, 253: 120-129.
9. Howe, G.E.; Gingerich, W.H.; Dawson, V.K. and Olson, J.J., 1999. Efficiency of hydrogen peroxide for treating saprolegniasis in channel cat fish, *Journal of Aquatic Animal Healths*, 11:222-230
10. Marking, L.L.; Rach, J.J. and Schreier, T.M., 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture, *The Progressive Fish-Culturist*, 59:225-2320.
11. Noga, E.J., 2000. Fish disease: diagnosis and treatment. Mosby-Yearbook, Inc, St. Louis, Mo.pp.367.
12. 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, *Dis Aquat Org*, 36:129-141.
13. Rach, J.J.; How, 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.
14. Rach, J.J.; How, G.E. and Schreier, T.M., 1995. Safety of formalin treatment on warm water and cool water fish eggs. *Aquaculture*, 149: 183-191.
15. Saez, J. and Bowser, P.R., 2000. Hydrogen Peroxide concentration in hatchery culture units and effluent during and after treatment, *North American Journal of Aquaculture*.63: 74 – 78.
16. Schreier, T.M.; Rach, J.J. and Hower, G., 1996. Efficiency of Formalin, Hydrogen Peroxide and Sodium chloride on fungal-infected Rainbow Trout eggs. *Aquaculture*, 140:323-331.