مطالعه اثر درمانی فرمالین بر میزان تفریخ تخم ماهی کپور معمولی در شرایط کارگاهی ایران (مرکز شهید رجایی ساری)

دکتر مهدی سلطانی[1] دکتر محمدرضا کلباسی[2] دکتر رجب محمدنظر[3] حسین مصطفوی[3]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ٥٦، شماره ٤، ٧١-٦٩، (١٣٨٠)

اثرات درمانی ضد قارچ فرمالین با غلظتهای ۲۵۰ ppm، ۵۰۰ ppm، ۱۰۰۰ ppm، ۱۵۰۰ppmو ۲۰۰۰ ppm بر روی میزان تفریخ تخم ماهی کپور معمولی *(Cyprinus carpio)* و در شرایط کارگاهی شامل اکسیژن محلول ۷/۳±۰/۸ mg/lit، درجه حرارت ۱۹/۸±۱/۹ درجه سانتیگراد، pH برابر ۸/۱±۰/۱، درجه سختی ۲۸۶ mg/lit و میزان دبی آب برابر ۱/۸±۱/۰۶ lit/min مطالعه شده است. عملیات درمانی به مدت ۳۰ دقیقه و در فاصله زمانی ۴۰ ساعت پس از شروع انکوباسیون تخمها انجام گردید. نتایج حاصله نشان داد که اولاً درصد تفریخ لارو در تمامی گروههای درمان نسبت به گروه شاهد از اختلاف معنیداری برخوردار بوده است (P<۰/۰۵). ثانیاً اختلاف معنیداری بین درصد تفریخ لارو در گروههای درمانی ۲۵۰ ppm وppm ۵۰۰ و نیز بین گروههای ppm ۱۰۰۰ و ppm ۱۵۰۰ مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). در حالیکه درصد تفریخ لارو در سایر گروههای درمانی نسبت به همدیگر از اختلاف معنیداری برخوردار بود (P<۰/۰۵). با توجه به بیشترین درصد تفریخ لارو (۹۳/۷ درصد) در گروه درمانی با ppm ۲۰۰۰ و کمترین آن (۵۹/۷۳ درصد) در گروههای درمانی ppm ۲۵۰ و ppm ۵۰۰ توصیه می شود که به منظور جلوگیری از قارچ زدگی تخم کپور معمولی، در فاصله زمانی ۴۰ ساعت پس از شروع انکوباسیون تخمها نسبت به ضدعفونی آنها با غلظت ppm ۲۰۰۰ فرمالین به مدت ۳۰ دقیقه در این منطقه جغرافیایی اقدام شود.

واژههای کلیدی: فرمالین، قارچ زدگی، تخم ماهی، کپورمعمولی.

یکی از مشکلات متداول مراکز تکثیر ماهی در بسیاری از مناطق دنیا قارچزدگی تخمها در دوران انکوباسیون است بهطوریکه خسارات اقتصادی قابل توجهی را به اینگونه مراکز تحمیل می نماید. ازجمله عوامل عمده و اصلی قارچزدگی تخمها میتوان به کپکهای آبی از خانواده ساپرولگنیاسه اشاره نمود که عواملی مانند کیفیت نامناسب آب، بار مواد آلی موجود در آب، دستکاریهای غیر ضروری دوران تفریخ، افزایش شدت جریان آب ورودی به ترافهای حاوی تخم موجب تثبیت و تشدید اینگونه قارچها روی تخمها و در نتیجه قارچ زدگی آنها میشود (۱۵، ۱۳، ۱۲، ۴). به همین دلیل اتخاذ شیوههای کنترلی و درمانی برای حذف عوامل قارچی دوران انکوباسیون امری ضروری بهویژه برای آن دسته از مراکزی که دوره انکوباسیون طولانیتر و نیاز به درجه حرارتهای پایینتری دارند، امری رایج میباشد.

اگرچه سبزمالاشیت یکی از مؤثرترین عوامل شیمیایی ضدقارچ در مرحله انکوباسیون تخمها است ولی امروزه مصرف آن به خاطر جنبههای بهداشت عمومی و زیست محیطی ممنوع میباشد (۲). لذا یافتن عوامل شیمیایی جایگزین یکی از نیازهای اساسی مراکز تکثیر ماهی می باشد. مطالعات انجام شده توسط Marking و همکاران (۱۹۹۴) نشان داد که فرمالین یک داروی ضدقارچ مؤثری است. همچنین طی مطالعهای توسط Rach و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که استفاده از فرمالین در کاهش خسارات ناشی از قارچزدگی تخمها در دوران انکوباسیون برخی گونههای سرد آبی و گرم آبی از جمله کپور معمولی مؤثر می باشد. براساس نتایج محققین مزبور مصرف ۱۵۰۰ µl/lit فرمالین به مدت ۴۵ دقیقه موجب تفریخ ۶۴ درصد تخم کپور معمولی شده که در مقایسه با گروه کنترل قابل توجه میباشد. سایر مطالعات انجام شده در این زمینه، استفاده از فرمالین را به عنوان یک عامل ضد قارچ مؤثری مورد حمایت قرارداده است اما هیچیک از مطالعات فوق به شرایط کیفی زمان آزمایشها و مطالعات خود اشارهای ننموده است (۱۴، ۱۱، ۹، ۸، ۷، ۵، ۳، ۱).

لذا با توجه به اهمیت اطلاع از شرایط کیفی آب زمان مطالعات و از آنجاییکه فون قارچی آبهای مناطق مختلف جغرافیایی متفاوت بوده، توصیه غلظتهای مناسبی از یک عامل ضد قارچ مستلزم انجام آزمایشهای منطقهای/ کارگاهی است. بنابراین هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات درمانی فرمالین در میزان تفریخ تخم کپور معمولی در شرایط کارگاهی استان مازندران میباشد. بهر حال عوامل دیگری مانند جلوگیری از دستکاریهای غیر ضروری، عدم استفاده از فشار بالا، آبهای با کیفیت نامناسب و تجربه کارشناسان مربوط به انکوباسیون تخمها همگی در کاهش قارچ زدگی تخمها و افزایش درصد تفریخ لارو نقش دارند.

مواد و روش کار

۱. مواد مصرفی: مواد مصرفی در این مطالعه شامل تخم ماهی کپور معمولی به دست آمده از مولدین سازمان پرورش ماهی نصر، محلول کاربامید برای حذف چسبندگی تخمها، فرمالین ۳۷ درصد (Merck)، الکل متانول (Merck)، EDTA برای تعیین سختی آب به روش تیتراسیون با EDTA (۶).

۲. مواد غیرمصرفی: مواد غیر مصرفی و تجهیزات مورد نیاز شامل تمامی وسایل و تجهیزات موجود در مرکز تکثیر ماهی شهید رجایی ساری بود که از جمله می توان به انکوباتورهای ویس برای انکوباسیون تخمها، انکوبارهای زوک برای نگهداری لاروهای حاصله، پمپهای هواده، pH متر، اکسیژن متر و حرارتسنج اشاره نمود.

۳. روش کار: الف) شمارش تخمهای لقاح یافته و عملیات ضدعفونی: پس از انجام عمل تخمگیری و لقاح به روش متداول کارگاه تکثیر سازمان پرورش نصر و انتقال تخمهای لقاح یافته به مرکز تکثیر شهید رجایی ساری (انتقال تخمها ۲۴ ساعت پس از عمل لقاح صورت گرفت) نسبت به شمارش و تعیین درصد لقاح در یک میلی متر (تعداد تخمهای لقاح یافته در یک میلیمتر تقسیم بر تعداد کل تخم (لقاح یافته و لقاح نیافته) در یک میلی لیتر ضربدر عدد صد) از تخمها به روش توصیه شده توسط Piper و همکاران (۱۹۸۲) اقدام، سپس به ازای هر ویس میزان ۲۰ml از تخمهای لقاح یافته منتقل گردید. تعداد ۱۸ ویس در شش گروه آزمایش و یک گروه شاهد در نظر گرفته به طوری که هرگروه آزمایش شامل سه تکرار و یک گروه شاهد در سه تکرار در نظر گرفته شد. قبل از انتقال تخمها به ویس ها برای سهولت در امر هوادهی و ضدعفونی داخل تخمها، ابتدا جریان آب ورودی به ویس ها قطع و عملیات درمانی با استفاده از غلظتهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰و ۲۰۰۰ میکرولیتر به ازای هر لیتر فرمالین خالص حاوی الکل متانول (۱۰ درصد) (برای جلوگیری از تشکیل پارافرمالدئید)

۱) گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران.
۲) گروه شیلات - دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.
۳) مرکز تحقیقات شیلات استان مازندران، مازندران - ایران.

جدول ۱- نتایج تفریخ تخم کپور معمولی درمان شده با غلظتهای مختلف فرمالین در شرایط کارگاهی (مرکز تکثیر شهید رجایی)

غلظت فرمالین (µLL-1) مورداستفاده	تعداد تکرار (N)	مینیمم تفریخ	ماگزیمم تفریخ	میانگین تفریخ در تکرارها	انحراف معیار (Std. Er)	خطای معیار (Std. Err)	میانگین درصد تفریخ
۰	۳	۶۵۲	۶۷۸	۶۶۵/۰۰	۱۳/۰۰	۷/۵۱	۳۲/۷
۲۵۰	۳	۱۰۹۶.	۱۲۹۴	۱۲۱۸/۳۳	۱۰۶/۹۳	۶۱/۷۴	۵۹/۹۲
۵۰۰	۳	۹۹۳	۱۳۵۰	۱۲۱۴/۳۳	۱۹۳/۳۰	۱۱۱/۶۰	۵۹/۷۳
۱۰۰۰	۳	۱۶۰۱	۱۶۹۳	۱۶۴۱/۳۳	۴۷/۰۴	۲۷/۱۶	۸۰/۷
۱۵۰۰	۳	۱۸۰۶	۱۸۷۴	۱۸۴۱/۳۳	۳۴/۰۸	۱۹/۶۸	۹۰/۵۷
۲۰۰۰	۳	۱۸۷۳	۱۹۴۷	۱۹۰۵/۶۷	۳۷/۷۵	۲۱/۸۰	۹۳/۷

به هر یک از گروههای شش گانه اضافه و عمل درمان به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. در ابتدای عمل ضیدعفونی و نیز ۱۵ دقیقه پس از آن شرایط کیفی آبشامل درجه حرارت، pH، میزان اکسیژن محلول و درجه سختی آب اندازه‌گیری و ضمناً هواده به طور مداوم فعال بوده است. پس از مدت مذکور نسبت به برقراری جریان آب ورودی به ویس ها اقدام گردید.

ب) تعیین درصد تفریخ: پس از اتمام دوره انکوباسیون (حدود۹۰ساعت) و با مشاهده اولین لاروها در ویس ها، تخمهای هر ویس به زوکهای جداگانه منتقل و بعد از تفریخ کامل لاروها، آب ورودی هر زوک قطع و نسبت به سیفون آب زوکها اقدام (بااستفاده از شیلنگ با قطر ۲cm و طول ۱/۵ متر و لوله پلیکا ۷۰cm که در انتهای آن توری با قطر ۷۰ میکرون برای جلوگیری از خروج لاروهانصب شده بود) و لاروهای هر زوک به داخل تشتکهایی منتقل و براساس روش توصیه شده توسط Scherier و همکاران (۱۹۹۶) (فرمول زیر) شمارش چشمی و درصد تفریخ هر ویس تعیین گردید.

$$\text{درصد لقاح} = \frac{\text{تعداد لاروهای تفریخ شده در هر ویس}}{\text{تعداد کل تخم لقاح یافته در ۲۰CC-تعداد تخم در ۲۰ml}} \times ۱۰۰$$

٤. آنالیز آماری داده‌ها: به منظور تعیین سطح اختلاف معنی‌دار بین غلظتهای مختلف فرمالین با همدیگر و نسبت به گروه شاهد و تعیین هموژنیسیتی در سطح ۹۵ درصد اطمینان از آزمون تجزیه واریانس (ANOVA) و Tukey HSD و با استفاده از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

نتایج

۱. شرایط کیفی آب: نتایج شرایط کیفی آب شامل درجه حرارت، اکسیژن محلول، pH، سختی و میزان دبی آب در طول آزمایش به ترتیب شامل ۱/۸±۱/۰۶ lit/min و ۲۸۶mg/lit، ۸/۱±۰/۱۱،۷/۳۲±۰/۸ mg/lit،۱۹/۸±۱/۹۸^{oC} بوده است. البته میزان سختی آب پس از افزودن فرمالین از ۲۸۶ به ۲۵۶ میلیگرم در لیتر کاهش پیدا کرد.

۲. درصد تفریخ : نتایج درصد تفریخ تخمهای درمان شده با هریک از غلظتهای فرمالین در جدول ۱ نشان داده شده است. هم چنان که مشخص است بیشترین درصد میانگین تولید لارو (تفریخ) در تیمار درمان شده با غلظت ۲۰۰۰ ppm به میزان ۹۳/۷ درصد و کمترین آن در غلظتهای ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm به میزان ۵۹/۷۳ درصد و ۵۹/۹۲ درصد حاصل شده است. درصد تفریخ در گروههای درمانی ۱۰۰۰ ppm و ۱۵۰۰ ppm به ترتیب ۸۰/۷ درصد و ۹۰/۵۷درصد بوده است که در مقایسه با گروه شاهد (۳۲/۷ درصد) از اختلاف معنی‌داری برخوردار است (P<۰/۰۵). مقایسه درصد تفریخ در گروههای مختلف درمانی با فرمالین با گروه شاهد و نسبت به همدیگر نشان داد که اولاً همه گروههای درمانی اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته (P<۰/۰۵)، ثانیاً گروههای درمانی با غلظتهای ۲۵۰ و ۵۰۰ ppm نسبت به همدیگر اختلاف معنی‌دار نداشته (P>۰/۰۵)، ثالثاً گروههای ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ppm نسبت به همدیگر فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است در حالی‌که سایر گروههای درمانی نسبت به همدیگر از اختلاف معنی‌داری برخوردار می‌باشند (P<۰/۰۵).

بحث

اگر چه استفاده از غلظتهای مختلف فرمالین به عنوان یک عامل ضد قارچ دوره انکوباسیون تخم ماهیان، توسط محققین متعددی توصیه شده است اما در بسیاری از موارد مطالعات مذکور فاقد سوابق کیفیت آب دوران درمان می‌باشد (۱۴، ۱۱، ۹، ۷، ۵، ۴، ۳).

به هرحال Scherier و همکاران (۱۹۹۶) در مطالعه خود غلظتهای ۱۵۰۰-۱۰۰۰ را به مدت ۱۵ دقیقه برای ضدعفونی تخم قزل آلا توصیه نموده است. اگر چه غلظتهای مذکور در تحت شرایط µl/lit کیفی آب شامل درجه حرارت ۲°C±۱۲، اکسیژن محلول برابر ۹<، دبی آب ورودی برابر lit/min ۷/۶-۳/۸، درجه سختی برابر ppm ۱۳۸و pH برابر ۸ توصیه شده است اما نامبردگان به نتایج درصد تفریخ اشاره‌ای ننموده‌اند. Rach و همکاران (۱۹۹۷) در مطالعه خود با استفاده از غلظت µl/lit ۱۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه و در تحت شرایط کیفی آب شامل درجه حرارت °C ۲±۱۸، اکسیژن محلول µl/lit ۹/۸۲-۷/۷۲، pH برابر ۸/۲-۷/۷ دبی آب ورودی lit/min ۲۵±۲۴۰ و سختی ppm ۱۴۰-۱۳۸ موفق به ۶۴ درصد تفریخ لارو کپور معمولی گردیدند. در مطالعه حاضر و در شرایط کیفی آب مشابه شامل pH، درجه حرارت و اکسیژن محلول میزان تفریخ لارو ۹۳-۹۱ درصد برای هر یک غلظتهای ppm۲۰۰۰-۱۵۰۰ فرمالین به مدت ۳۰ دقیقه حاصل گردید. اگر چه مقایسه نتایج این مطالعه با مطالعه Rach و همکاران (۱۹۹۷) تا حدی کار دشواری است، زیرا برخی فاکتورهای کیفی آب متفاوت می‌باشد. اما نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که با توجه به وجود گونه‌های مختلف قارچهای ساپرولگنیاسه در آبهای مناطق مختلف جغرافیایی، نژاد مولدین مورد استفاده و روشهای تکثیر مصنوعی، ضروری است تا هر منطقه‌ای نسبت به انجام این‌گونه مطالعات و استاندارد کردن غلظتهای درمانی فرمالین در شرایط کارگاهی خود اقدام نمایند. با توجه به کوتاه بودن طول دوره انکوباسیون تخم کپور معمولی و سایر گونه های کپور پرورشی و با توجه به نتایج این مطالعه، توصیه می‌شود تا ۴۰-۳۰ ساعت پس از شروع انکوباسیون تخمها، نسبت به ضدعفونی با استفاده از فرمالین با غلظت µl/lit ۲۰۰۰ آنها برای یک مرتبه و به مدت ۳۰ دقیقه اقدام شود تا از خسارات ناشی از قارچ زدگی جلوگیری شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان برخود لازم می دانند که از زحمات کارکنان مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهید رجایی ساری و جناب آقای مهندس مقدسی ریاست مرکز و نیز جناب آقای دکتر حسین خوش باور رستمی رییس مرکز تحقیقات شیلاتی مازندران به خاطر حمایتهای به عمل آمده برای انجام این تحقیق تشکر و قدردانی نمایند.

References

۱. شهباززاده، د. (۱۳۶۶): بررسی آلودگی با قارچ ساپرولگنیا در تخمهای کارگاه پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان جاجرود. پایان نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران.

2. Alderman D.J. (1985): Malachite green: A review- Journal of Fish Diseases 8. 289-298.
3. Bills, T.D., Marking, L.L. and Chandler, J.H. (1977): Formalin: Its toxicity to fish and detoxification of antimycin. U.S. Fish and Wildlife Service Investigations in Fish Control 73.
4. Bruno D.W. and Poppe T.T.(1997): Fungal diseases. In: A color Atlas of Salmonid Diseases Bruno D.W. and Poppe T.T.(eds). Academic Press. PP. 57-64.
5. Clemens, H.P and Sneed, K.E. (1959): Lethal doses of several commercial chemicals for fingerling channel catfish. U.S. Fish Wildlife Service, Special Scientific Report Fisheries PP: 319.
6. Clesceri, L. Greenberg A.E. and Trussell, R.R. (1989): Standard Methods for examination of water and waste water. American Public Health Association 1015NW, Washington DC.
7. Cline, T.F., and Post. G. (1972): Therapy for trout eggs infected with *Saprolegnia.* Progressive Fish-Culturist 34:148-151.
8. Forelich, S.L., and Engelhardt, T. (1996): Comparative effects of formalin and salt treatment on hatch rates of Koi crap eggs. Prog. Fish-Cult. 58:209-211.
9. Horwacth, L. (1984): Special Methods in Pond Fish Husbandry. National Academy of Sciences (USA), PP: 31.
10. Marking, L.L., Rach, J.J., and Schreier, T.M. (1994): Evaluation of antifungal agents for fish culture. Prog. Fish-Cul. 56:225-231.
11. Piper, R.C., I.B.Mc Elwain, Orme, L.E. Craren, J.P. Mc. Flower, L.G. and Leonard, J.R. (1982): Fish hatchery management U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C. PP: 517.
12. Rach, J.J. Howe, G.E. and Schreier M.T. (1997): Safety of formalin treatment on warm and cool water fishes, Aquaculture 149:183-191.
13. Schreier, T.M. Rach. J.J. and Howe, G.E. (1996): Efficacy of formalin hydrogen peroxide and sodium chloride of fungual infected rainbow trout eggs. Aquaculture 14:323-331.
14. Waterstrat, P.R., Marking, L.L. (1995): Clinical evaluation of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride for treatment of *Saprolegnia parasitica* on fall chinook solmon eggs Progressive. Fish Culturist, 57, 287-291.
15. Willoughby, L.G. (1994): Fungi and Fish diseases. Pisces Press, Stirling, Scotland, P: 57.

Therapeutic effects of formalin on hatch rate of common carp *(Cyprinus carpio)* eggs under farmed conditions in (Shahid Rajaii Center Sari) Iran

Soltani, M.[1], Kalbassi, M.R.[2], Mohammad Nazar, R.[3] Mostafavi. H.[3]

[1] Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran. [2] Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Marine Science, University of Tarbiat Moddaress, Tehran – Iran. [3]Mazandaran Research Center of Fisheries, Sari, Iran. ***J. Fac. Vet. Med. Tehran. Univ. 56, 4: 69-71, 2001.***

Antifungal effects of formalin was evaluated on hatch rate of common carp *(Cyprinus Carpio)* eggs under water quality variables including dissolved oxygen (7.3±0.8 mg/L), water temperature (19.8±1.8C°), PH(8.1±0.1), total hardness (286mg/L) and inletwater (1.8±1.06 L/min). Groups of eggs were treated with formalin at concentrations of 250, 500, 1000, 1500 and 2000 µL/L for 30 minutes about 40 hours after incubation period. The obtained results showed that there was significantly difference between the hatch rates of all treated eggs groups and control one ($P<0.05$). Also there was no significant difference between the hatch rates of groups treated with formalin at concentrations of 200 and 500 µL/L and groups treated at concentrations of 1000 and 1500 µL/L ($P>0.05$). However, there was significantly differences between other treated groups ($P<0.05$). Maximum hatch rate of %93.7 was obtained in group treated with 2000 µL/L of formalin, while minimum hatch rate of %59.73 was found in fish treated with both 250 and 500 µL/L. Therefore, in aquaculture practice it is recommended to use formalin at a concentration of 2000 µL/L for 30 minutes about 30-40 hours after eggs incubation in this area.

Key words: Formalin, Common Carp eggs, *Cyprinus carpio* Antifungal effect.