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)

اثـــرات درمـانی ضد قارچ فرمـــالین بـا غلظتـهای ppm ۲۵۰، ppm ۵۰۰، ppm ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ppmو ppm ۲۰۰۰ بر روی میزان تفریخ تخـم مـاهی کپـور معمولی *(Cyprinus carpio)* و در شرایط کارگاهی شـامل اکسـیژن محلـول mg/lit ۷/۳±۰/۸، درجه حـــرارت ۱۹/۸±۱/۹ درجـه سـانتیگراد، pH برابـر ۸/۱±۰/۱، درجه سختی mg/lit ۲۸۶ و میزان دبی آب برابر lit/min ۱/۸±۱/۰۶ مطالعه شده است. عملیات درمانی به مدت ۳۰ دقیقه و در فاصله زمـــانی 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 شـاهد از اختلاف معنی‌داری برخوردار بوده است (P<۰/۰۵). ثانیاً اختلاف معنـــی‌داری بین درصد تفریخ لارو در گروههای درمانی ppm ۲۵۰ وppm ۵۰۰ و نیز بیـــن گروههای ppm ۱۰۰۰ و ppm ۱۵۰۰ مشاهده نگردیـــد (P>۰/۰۵). در حالی‌کـه درصد تفریخ لارو در سایر گروههای درمانی نسبت به همدیـــگر از اختـلاف معنی‌داری برخوردار بود (P<۰/۰۵). با توجه به بیشـــترین درصد تفریخ لارو (۹۳/۷ درصد) در گروه درمانی با ppm ۲۰۰۰ و کمـترین آن (۵۹/۷۳ درصـد) در گروههای درمانی ppm ۲۵۰ و ppm ۵۰۰ توصیه می شود که بـــه منظـور جلوگیری از قارچ زدگی تخم کپور معمولی، در فاصله زمانی ۴۰ ساعت پـــس از شروع انکوباسیون تخمها نسبت به ضدعفونی آنها بـــا غلظـت ppm ۲۰۰۰ فرمالین به مدت ۳۰ دقیقه در این منطقه جغرافیایی اقدام شود.

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

یکـی از مشـکلات متـداول مراکـز تکثـیر مـاهی در بسـیاری از منـاطق دنیـا قارچزدگی تخمها در دوران انکوباسیون است به‌طوری‌که خسارات اقتصادی قابل توجهی را به این‌گونه مراکز تحمیل می نماید. ازجملـه عوامـل عمـده و اصلـی قارچزدگی تخمها می‌توان به کپکهای آبی از خانواده ساپرولگنیاسه اشاره نمـود که عواملی مانند کیفیت نامناسب آب، بار مواد آلی موجود در آب، دسـتکاریهای غیر ضروری دوران تفریخ، افزایش شدت جریان آب ورودی به ترافهای حـاوی 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 درمـانی برای حذف عوامل قارچی دوران انکوباسیون امـری ضـروری بـه‌ویژه بـرای آن دسته از مراکزی کـه دوره انکوباسـیون طولانیـتر و نیـاز بـه درجـه حرارتـهای پایینتری دارند، امری رایج می‌باشد.

اگرچه سبزمالاشیت یکی از مؤثرترین عوامل شیمیایی ضدقارچ در مرحلـه انکوباسیون تخمها است ولی امروزه مصرف آن بـه خـاطر جنبـه‌های بهداشـت عمومی و زیست محیطـی ممنـوع می‌باشـد (۲). لـذا یـافتن عوامـل شـیمیایی جایگزین یکی از نیازهای اساسی مراکز تکثیر ماهی می باشد. مطالعـات انجـام شده توسط Marking و همکاران (۱۹۹۴) نشـان داد کـه فرمـالین یـک داروی ضدقارچ مؤثری است. همچنین طی مطالعه‌ای توسط Rach و همکاران (۱۹۹۷) نشـــان دادنـــد کـــه اســـتفاده از فرمـــالین در کـــاهش خســـارات ناشـــی از قارچزدگی تخمها در دوران انکوباسیون برخی گونه‌های ســـرد آبـی و گرم آبـی از جمله کپور معمولی مؤثر می باشد. براسـاس نتـایج محققیـن مزبـور مصـرف µl/lit ۱۵۰۰ فرمالین به مدت ۴۵ دقیقه موجب تفریـخ ۶۴ درصـد تخـم کپـور معمولی شده که در مقایسه با گروه کنترل قابل توجه می‌باشد. ســایر مطالعـات انجام شده در این زمینه، استفاده از فرمالین را به عنوان یک عـامل ضـد قـارچ مؤثری مورد حمایت قرارداده است اما هیچ‌یک از مطالعات فوق به شرایط کیفی زمـان آزمایشـها و مطالعـات خـود اشـاره‌ای ننمـوده اســت (۱۴، ۱۱، ۹، ۸، ۷، ۵، ۳، ۱).

لذا با توجه بـه اهمیـت اطـلاع از شـرایط کیفـی آب زمـان مطالعـات و از آنجایی‌که فون قارچی آبهای مناطق مختلف جغرافیایی متفـاوت بـوده، توصیـه غلظتـهای مناسبی از یـک عـامل ضـد قـارچ مســتلزم انجـام آزمایشـــهای منطقه‌ای/ کارگاهی است. بنابراین هدف از انجام ایـــن مطالعـه بررسـی اثـرات درمانی فرمالین در میزان تفریخ تخم کپور معمولی در شرایط کارگاهـی اسـتان مازندران می‌باشد. بهر حال عوامل دیگری مانند جلوگیری از دستکاریهای غـیر ضـروری، عـدم اسـتفاده از فشـار بـالا، آبـهای بـا کیفیـت نامناسـب و تجربـه 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 ایـن مطالعـه شـامل تخـم مـاهی کپـور معمولی به دست آمده از مولدین سازمان پرورش ماهی نصر، محلـول کاربـامید برای حـذف چسـبندگی تخمـها، فرمـالین ۳۷ درصـد (Merck)، الکـل متـانول (Merck)، EDTA برای تعیین سختی آب به روش تیتراسیون با EDTA (۶).

۲. مواد غیرمصرفی: مواد غیر مصرفی و تجهیزات مورد نیاز شـامل تمـامی وسایل و تجهیزات موجود در مرکز تکثیر ماهی شهید رجایی ساری بـود کـه از جمله می توان به انکوباتورهای ویس برای انکوباسیون تخمها، انکوبارهای زوک برای نگهـداری لاروهـای حاصلـه، پمپـهای هـواده، pH مـتر، اکسـیژن مـتر و حرارت‌سنج اشاره نمود.

۳. روش کار: الف) شمارش تخمهای لقاح یافته و عملیات ضدعفونی: پـس از انجام عمل تخمگیری و لقاح به روش متداول کارگاه تکثیر سازمان پـرورش نصر و انتقال تخمهای لقاح یافته به مرکز تکثیر شـهید رجـایی سـاری (انتقـال تخمها ۲۴ ساعت پس از عمل لقاح صورت گرفت) نسبت به شـمارش و تعییـن درصد لقاح در یک میلی متر (تعداد تخمهای لقاح یافته در یک میلیمتر تقسـیم 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، سـپس بـه 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 کـه هـرگروه 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 هوادهـی و ضدعفونـی داخـل تخمها، ابتدا جریان آب ورودی به ویس ها قطع و عملیات درمانی با اسـتفاده از غلظتهای ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰و۲۰۰۰ میکرولیتر به ازای هـر لیـتر فرمـالین 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 ۱۹/۸±۱/۹۸°C، ۷/۳۲±۰/۸ mg/lit، ۸/۱±۰/۱۱، ۲۸۶mg/lit و ۱/۸±۱/۰۶ lit/min 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 ۱۲±۲°C، اکسیژن محلول برابر ۹<، دبی آب ورودی برابر ۳/۸-۷/۶ lit/min، درجه سختی برابر ۱۳۸ ppm و 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 ۱۸±۲ °C، اکسیژن محلول µl/lit ۹/۸۲-۷/۷۲، pH برابر ۷/۷-۸/۲ دبی آب ورودی ۲۴۰±۲۵ lit/min و سختی ۱۳۸-۱۴۰ ppm 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 ۱۵۰۰-۲۰۰۰ppm 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.