تعیین غلظت نیمه کشنده ضد عفونی کننده هواسان TR50 (هیدروژن پراکسید+نقره) بر تخم‌های قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

نادر وجدانی‌فر[1]، مهرداد شیرین‌آبادی[2]، علی پارسا*[1]،کاظم عبدی[3]

[1]گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد واحد سنندج، سنندج، ایران.

[2]بخش شیلات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران.

[3]سازمان دامپزشکی کشور، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: a.parsa@iausdj.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۲/۲۵

چکیده

عفونت‌های قارچی از عوامل مهمی هستند که باعث از بین رفتن ماهی‌های آب شیرین و تخم‌های آن‌ها در طبیعت و در مزارع تجاری پرورش ماهی می‌شوند. این پژوهش با هدف بررسی غلظت کشندگی ماده هواسان TR50 که در زمره نسل جدید ترکیبات ضدعفونی کننده اکولوژیکی می‌باشد، به اجرا درآمد. بدین منظور از ۴۰۰۰ عدد تخم لقاح یافته قزل‌آلای رنگین در ۵ تیمار دارویی و یک تیمار شاهد و هر گروه با ۳ تکرار مجموعاً در ۱۸ ظرف توزیع شدند. درطول مدت آزمایش دمای آب ۰/۵±۱۱ ^{o}C و اکسیژن محلول ۰/۳۲±۸/۶ میلی-گرم در لیتر و pH حدود ۰/۴۱±۷/۷ و سختی آب ۱۳۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در طول دوره ۹۶ ساعته آزمایش، آب ظروف محتوی تخم به‌وسیله پمپ‌ها هوادهی و هر ۲۴ ساعت یکبار اقدام به جمع‌آوری و ثبت مرگ و میر شد. نتایج نشان داد که درصد تلفات در تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد ($P<0/05$). بر این اساس غلظت نیمه کشنده این ماده در ۲۴ ساعت ۲۲۷۸/۱۲، در ۴۸ ساعت ۱۲۵۱/۳۵، در ۷۲ ساعت ۵۵۲/۳۱ و در ۹۶ ساعت ۳۱۲/۴۰ قسمت در میلیون محاسبه شد. با توجه به غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته هواسان که به دز توصیه شده درمانی بسیار نزدیک است و با دزهای سمی آن فاصله نسبتاً زیادی دارد. بنابراین، این مقدار برای کاربرد مراکز تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا قابلیت توصیه دارد.

واژگان کلیدی: تخم، غلظت نیمه کشنده، هیدروژن پراکسید، نقره.

مقدمه

در دنیای امروز طی ده سال گذشته آبزی‌پروری به طور متوسط ۱۱ درصد در سال افزایش یافته است. در این راستا آبزی‌پروری به ویژه ماهی قزل آلای رنگین کمان در ایران توسعه زیادی پیدا کرده و در حال تبدیل شدن به یک صنعت مهم اقتصادی است (Hussein and Hatai, 2002). عفونت‌های قارچی از عوامل مهمی هستند که باعث از بین رفتن ماهی های آب‌شیرین و تخم آن‌ها در طبیعت و مزارع تجاری می‌شوند (Shahbazian *et al*., 2010). کیفیت و کمیت لارو ماهیان تولید شده از ضروریات افزایش تولیدات آبزی‌پروری می‌باشد (Kjorsvik *et al*., 1990). تخم ماهی می‌تواند برای انتقال بیماری از مولدین به نوزادان و بین محل‌های پرورش به عنوان یک ناقل باشد (Atanasov *et al*., 2011). خسارت‌های ناشی از بیماری در صنعت پرورش آزادماهیان در دنیا، سالانه حدود ده میلیون پوند برآورد شده است (Hussein and Hatai, 2002). در بیشتر مواقع عفونت از تخم‌های بارور نشده شروع می‌شود. هنگامی که این عفونت تثبیت شد، می‌تواند به سرعت به تخم‌های سالم گسترش یابد و در نهایت، منجر به تلفات و آلودگی لاروهای دارای کیسه زرده نیز شود (Czeczuga *et al*., 2005).

مالاشیت سبز از سال ۱۹۳۳ جهت پیشگیری و درمان قارچزدگی تخم ماهی‌ها به کار گرفته شد (Meyer and Jorgenson, 1983). تا سال ۲۰۰۲ عفونت‌های قارچی به خوبی با استفاده از رنگ آلی مالاشیت سبز پیشگیری و درمان می‌شد و موثرترین

ماده شیمیایی بر علیه آن‌ها بود (Willoughby and Roberts, 1992). مدت طولانی نگذشت که محققان به این نتیجه رسیدند که در ماهیان حاصل از تخم‌های درمان شده با مالاشیت سبز، بقایای این ماده همچنان تا مرحله بازاری به صورت غیرقابل تشخیص یافت می‌شود (Meinertz *et al*., 1995). در حال حاضر مالاشیت سبز در لیست داروهای مجاز دامپزشکی جهت استفاده در دام‌های پرورشی قرار ندارد و استفاده از آن در آبزی‌پروری نیز غیرمجاز است. سازمان غذا و داروی ایالات متحده آمریکا (FDA) نیز استفاده از مالاشیت سبز را در آبزی‌پروری ممنوع کرده است (Schreier *et al*., 1996). به طورکلی استفاده از ضدعفونی برای کاهش مرگ و میر تخم‌ها و توسعه موفقیت آمیز پرورش لاروها می‌باشد (Das, 2001). طیف گسترده‌ای از مواد ضدعفونی کننده در مرحله انکوباسیون تخم ماهیان استفاده می‌شود که می‌توان از آن‌ها مالاشیت سبز، سولفات مس، فرمالین، پراکسید هیدروژن، سدیم هیپوکلرایت، متیلن بلو، بنزوکونیوم و بسیاری از مواد دیگر را نام برد (Aydin *et al*., 2011).

پراکسید هیدروژن یا آب اکسیژنه اثر ضد قارچی داشته و در عین حال دارای حداقل اثرات سوء بر ماهی و محیط زیست بوده و در محیط به آب و اکسیژن تجزیه می‌شود. همچنین صنعت پرورش ماهی در ایران به مواد ضد عفونی کننده جایگزین برای ترکیباتی همانند مالاشیت گرین نیاز دارد که ایمن و در عین حال موثر باشد. پراکسید هیدروژن ماده مطمئن است که در صنعت و کشاورزی و طب به عنوان ضد عفونی کننده وسیع الطیف شناخته می‌شود (Mirvaghefi *et al*., 2006). با وجود ترکیبات شیمیایی مختلف در بازار، جهت کنترل و از بین بردن آلودگی‌های قارچی در آبزی‌پروری به ویژه در آب‌های شیرین هنوز نیاز به توسعه روش‌ها و مواد شیمیایی موثر به چشم می‌خورد و این مواد باید بتوانند حداقل با همان کارایی مالاشیت سبز عمل نمایند. به طور کلی ضد عفونی کردن تخم‌ها و تجهیزات سالن انکوباسیون از جمله اقدامات پیشگیری کننده در کنترل عفونت‌های قارچی بوده و ضروری است که در صنعت پرورش ماهی، ضد عفونی کننده‌هایی را بکار برد تا ضمن کاهش عوامل بیماری‌زا تا سطح قابل قبول و جلوگیری از ازدیاد آن‌ها و کنترل ورود عوامل بیماریزا در طی دوران پرورش، کمترین اثرات سوء را بر روی ماهی، انسان و محیط زیست داشته باشد (Mitchell and Collins, 1997).

این پژوهش با هدف بررسی غلظت کشنده ماده ضد عفونی کننده هوواسان به اجرا درآمد. این ماده در زمره نسل جدید ترکیبات ضدعفونی کننده اکولوژیکی تولید شرکت Roam Technology بلژیک بوده و تحت نام تجاری هواسان تی آر۵۰ (Huwa.San TR-50) عرضه می‌شود. با توجه به این که این ترکیب شامل پراکسید هیدروژن به عنوان ضدعفونی کننده اصلی و نقره کلوئیدی به عنوان پایدار کننده است. ضرورت دارد تا غلظت کشندگی این دو ماده در ترکیب با هم بر تخم‌های قزل‌آلای رنگین کمان بررسی شود تا با دقت و اطمینان بیشتری در شرایط پرورشی کشور محاسبات دز موثر آن انجام گیرد.

مواد و روش‌ها

ماده ضد عفونی کننده هواسان TR50 ساخت شرکت Roam Technology کشور بلژیک از شرکت رادین صنعت رایان تهیه شد. این ماده حاوی پراکسید هیدروژن (۵۰ درصد) و نقره کلوئیدی (۰/۰۳۳ درصد) می‌باشد. برای تعیین غلظت نیمه کشنده (LC_{50}) این ماده از روش استاندارد Organization Economic Cooperation and Development (OECD) (TRC, 1984) به صورت ساکن استفاده شد که در آن غلظت‌های ماده هواسان در مدت ۹۶ ساعت در محیط‌های آزمایشی ثابت بود. برای تعیین محدوده کشندگی ابتدا از غلظت ۲۰۰ppm که حدوسط غلظت مورد نظر بود، استفاده گردید. سپس مقادیر ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ قسمت در میلیون به شکل تصاعدی محاسبه و استفاده شد. در

طول دوره آزمایش با هر یک از غلظت‌های یاد شده میزان مرگ و میر تخم‌ها ثبت شد.

در این تحقیق از ۴۰۰۰ عدد تخم لقاح یافته قزل‌آلای رنگین کمان بلافاصله بعد از لقاح استفاده شد. تخم‌ها در ۵ تیمار دارویی و یک تیمار شاهد و هر گروه با ۳ تکرار و در ۱۸ ظرف پلاستیکی توزیع شدند. درطول مدت آزمایش دمای آب ۱۱±۰/۵°C و اکسیژن محلول ۸/۶±۰/۳۲ میلی‌گرم در لیتر و pH حدود ۷/۷±۰/۴۱ و سختی آب ۱۳۰ میلی‌گرم در لیتر بود. در طول دوره آزمایش آب موجود در ظروف به وسیله پمپ‌ها هوادهی شد و هر ۲۴ ساعت یکبار جمع‌آوری و ثبت مرگ و میر انجام شد. داده‌ها با استفاده از برنامه SPSS نسخه ۲۶ پردازش و با استفاده از روش آماری Probit Analysis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در این روش با استفاده از معادله خطی ضریب همبستگی LC_{50} ۹۶ ساعته ماده ضدعفونی کننده هواسان در تخم قزل‌آلای رنگین کمان تعیین شد.

نتایج

نتایج تعیین دوز نیمه کشنده در ساعات مختلف در جدول ۱ ارائه شده است. درصد تلفات در تیمارهای مختلف دارای تفاوت معنی‌اری در مقایسه با گروه شاهد می‌باشد ($P<۰/۰۵$). به طوری که میزان تلفات در ۲۴ ساعت اول به ترتیب در گروه شاهد و دوزهای ۲۰۰ و ۵۰۰ قسمت در میلیون از ۲/۵ تا ۳ درصد متغیر بود و در دوز ۳۰۰۰ قسمت در میلیون به ۹۵/۷۵ درصد رسید. درصد تلفات در زمان ۴۸ ساعت بعد از مواجهه در دوز ۳۰۰۰ قسمت در هزار به ۱۰۰ درصد رسید و در دوز ۲۰۰۰ قسمت در میلیون به ۹۶/۲۵ ساعت رسید، در حالی که در گروه شاهد ۳/۵ درصد بود. در ۷۲ ساعت میزان تلفات دوز ۲۰۰۰ قسمت در میلیون به ۱۰۰ درصد و دوز ۱۰۰۰ قسمت در میلیون به ۹۳ درصد رسید ولی در گروه شاهد ۴/۷۵ درصد بود. در نهایت در زمان ۹۶ ساعت بعد از مواجهه در سه دوز ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ تلفات ۱۰۰ درصد بود و در دوزهای ۲۰۰ و ۵۰۰ درصد تلفات به ترتیب ۳۶/۷۵ و ۷۷/۵ درصد بود. با این حال گروه شاهد در مجموع ۵ درصد تلفات طی دوره ۹۶ ساعته از خود نشان داد.

غلظت کشنده ۲۴ ساعته: با توجه به نتایج بیشترین درصد مرگ و میر ۲۴ ساعته در غلظت ۳۰۰۰ ppm به میزان ۹۲/۸ درصد و در دوز ppm ۲۰۰۰ ۱۵/۸ درصد بود. مرگ و میر ۲۴ ساعته در سایر دوزها از ۴/۷ درصد کمتر بود. دوز ۰/۱ درصد کشنده این ماده طی ۲۴ ساعت ۱۲۹۹/۶، دوز نیمه کشنده (یا همان LC_{50}) ۲۲۷۸/۱ و غلظت ۰/۹۹ درصد کشنده نیز ۴۰۵۴/۴ قسمت در میلیون به دست آمد (جدول ۱).

غلظت کشنده ۴۸ ساعته: بیشترین درصد مرگ و میر ۴۸ ساعته در غلظت ۳۰۰۰ ppm به میزان ۱۰۰ درصد بود و در دوز ۲۰۰۰ ppm نیز ۹۳/۲ درصد و در غلظت ۱۰۰۰ppm برابر با ۲۵/۸ درصد بود. مرگ و میر ۴۸ ساعته غلظت‌های ۵۰۰ ppm، ۲۰۰ و شاهد نیز به ترتیب ۶/۷، ۱/۸ و ۰/۶ درصد بود. دوز ۰/۱ درصد کشنده این ماده طی ۴۸ ساعت ۶۰۷/۶۶، دوز نیمه کشنده ۱۲۵۱/۳۵ و غلظت ۰/۹۹ درصد کشنده ۲۴۱۹/۱۲ قسمت در میلیون به دست آمد (جدول ۱).

غلظت کشنده ۷۲ ساعته: با توجه به نتایج بیشترین درصد مرگ و میر ۷۲ ساعته به جز غلظت-های ۲۰۰۰ و ۳۰۰۰ ppm که برابر با ۱۰۰ درصد است، در غلظت ۱۰۰۰ppm به میزان ۹۸/۲ درصد، در ۵۰۰ppm ۴۳/۱ درصد و در ۲۰۰ppm برابر ۱۲/۲ درصد و در گروه شاهد نیز ۳/۴ درصد بود. براین اساس دوز ۰/۱ درصد کشنده این ماده طی ۷۲ ساعت ۱۶۴/۰۲، دوز نیمه کشنده ۵۵۲/۳۲ و غلظت ۰/۹۹ درصد کشنده نیز /۱۲۵۷ قسمت در میلیون به دست آمد (جدول ۱).

غلظت کشنده ۹۶ ساعته: درصد مرگ و میر ۹۶ ساعته به جز غلظت‌های ۳۰۰۰ ppm و ۲۰۰۰ که

جدول ۱ - جدول نتایج غلظت‌های کشنده در ساعت مختلف ماده هواسان در تخم قزل آلای رنگین کمان (قسمت در میلیون).

مقدار LC	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC_{10}	۱۲۹۹/۶۰	۶۰۷/۶۶	۱۶۴/۰۲	۲۹/۱۳
LC_{50}	۲۲۷۸/۱۲	۱۲۵۱/۳۵	۵۵۲/۳۱	۳۱۲/۴۰
LC_{90}	۴۰۵۴/۳۹	۲۴۱۹/۸۱	۱۲۵۷/۱۷	۸۲۶/۳۱

برابر ۱۰۰ درصد است، در غلظت ppm۱۰۰۰ تلفات ۹۹/۹ درصد بود. همچنین مرگ و میر دوز ppm۵۰۰ نیز ۸۰/۲ و در غلظت ppm ۲۰۰ برابر ۳۰/۶ بوده و در گروه شاهد ۷/۹ درصد بود. بر این اساس دوز ۰/۱ درصد کشنده این ماده طی ۹۶ ساعت ۲۹/۱۴، دوز نیمه کشنده ۳۱۲/۴۱ و غلظت ۰/۹۹ درصد کشنده ۸۲۶/۶۱ قسمت در میلیون به دست آمد (جدول ۱).

براساس نتایج غلظت کشنده ۱۰، ۵۰ و ۹۹ درصد جمعیت در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعته ماده هواسان در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته این ماده در تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان ۳۱۲/۴۰۶ قسمت در میلیون به دست آمد.

بحث

به کار بردن داروی مناسبی که ضمن کارایی مطلوب، دارای کم‌ترین اثرات سمی باشد، در جهت مبارزه با بیماری‌های قارچی از اهمیت بالایی برخوردار است. این مسأله به ویژه در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان که گونه اصلی پرورشی در کشور ما است، اهمیتی مضاعف دارد. بیشترین خسارت اقتصادی در آبزی-پروری ناشی از بروز بیماری‌های باکتریایی و قارچی است (Meyer, 1991) که ضررهای اقتصادی قابل ملاحظه‌ای را در صنعت تکثیر و پرورش ماهی ایجاد کرده است (Pottinger and Day, 1999; Hussein and Hatai, 2002). به علت دمای پائین آب و همچنین مدت زمان طولانی انکوباسیون، همواره آلودگی قارچی تخم‌های لقاح یافته تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان یکی از عمده‌ترین دلایل تلفات می‌باشد (Sharifpour *et al*., 2016).

علاوه بر ترکیبات شیمیایی قبلی، ترکیبات جدید هم جهت ضدعفونی تخم ماهیان برای پیشگیری از بیماری‌های مختلف استفاده می‌شود. مطالعات متعددی در خصوص تأثیر پراکسید هیدروژن بر پیشگیری و درمان بیماری‌های آبزیان صورت گرفته که در تمامی آن‌ها به عنوان ضد عفونی کننده جهت جایگزینی با سبز مالاشیت و فرمالین معرفی گردیده است (Gaikowski *et al*., 1998). مصرف پراکسید هیدروژن با دز ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر روزانه به مدت ۱۵ دقیقه درصد تفریخ تخم در قزل‌آلای رنگین کمان را بین ۱/۵ تا ۱/۹درصد کاهش داد. در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر روزانه به مدت ۱۵ دقیقه میانگین درصد تفریخ ۱۵/۸ تا ۴/۴ درصد کاهش داده و در غلظت ۳۰۰۰ میکرولیتر در لیتر روزانه به مدت ۱۵ دقیقه میانگین درصد تفریخ از ۲۵/۲ تا ۱۳/۳ درصد کاهش پیدا کرد. پرورش دهندگان ماهی باید بدانند که تخم گونه‌های مختلف ماهی ممکن است از قزل آلای رنگین کمان حساس‌تر باشد. گونه‌ها دیگر ماهیان باید ابتدا با پراکسید هیدروژن ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر درمان شده و بعد از نظارت بر مرگ و میر تخم مقدار مناسب مشخص شود (Mark *et al*., 1998). همچنین در یک بررسی اثرات قارچ‌کشی پراکسید هیدروژن سنجیده شد و غلظتی از پراکسید هیدروژن که برای کنترل رشد قارچ بر روی تخم قزل آلای رنگین کمان در یک کارگاه موثر تشخیص داده می‌شود، ممکن است بسته به نوع منبع آبی، خصوصیات شیمیایی آب و تراکم اسپورهای قارچی در کارگاه دیگر متفاوت باشد. به طوری که این محققین در یک کارگاه دوز ppm۲۵۰ و در دیگری دوز ppm ۱۰۰۰ را برای کنترل کامل قارچ به دست آوردند که دلیل آن را مرتبط با سختی آب عنوان

نمودند (Mirvaghefi *et al*., 2006). همچنین درمان ماهیان با غلظت‌های یکسان پراکسید هیدروژن در دماهای متفاوت ۱۰ و ۱۳/۵ درجه سانتی‌گراد بر میزان مرگ و میر تاثیرگذار است (Bruno and Raynard, 1994).

استفاده از پراکسید هیدروژن به تنهایی می‌تواند اثرات فوق الذکر را بر تخم قزل‌آلای رنگین کمان داشته باشد ولی پایدار کردن پراکسید هیدروژن در محیط و به تبع آن کاهش دز موثر و بهره‌گیری از اثرات ذرات نقره می‌تواند با ایجاد اثرات سینرژیستی روند تاثیر این ماده را تغییر داده و تاثیرات متفاوتی بالینی داشته باشد، دلیل این ادعا نتایج محققین که دز توصیه شده برای هواسان TR50 در پیشگیری از قارچ زدگی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان ppm ۳۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه یک روز درمیان در طول دوره انکوباسیون بیان نمودند (Sepahdari *et al*., 2020). اگر این نتایج را با دز ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر روزانه به مدت ۱۵ دقیقه در طول دوره انکوباسیون که در مطالعات فوق به آن اشاره شده، مقایسه نماییم خواهیم دید که از نظر مدت مجاورت تقریباً یکسان بوده ولی از نظر غلظت فاصله نسبتاً زیادی دارند که این موضوع می‌تواند مزیت ارزشمندی برای ماده هواسان باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که تخم‌های قزل‌آلا در بازه زمانی ۹۶ ساعته بعد از مواجهه با دز ۲۰۰ ppm، ۳۶/۷۵ درصد تلفات داشتند که در مقایسه با میزان ۱/۵ تا ۱/۹ درصد کاهش تفریخ در طول دوره انکوباسیون با غلظت ppm ۵۰۰ از پراکسید هیدروژن ۳۵ درصد در مطالعه Mark و همکاران (۱۹۹۸) مقدار بسیار ناچیزی بوده و علاوه بر علظت پراکسید هیدروژن که به ppm ۲۰۰ کاهش یافت، غلظت پراکسید هیدروژن در ماده هواسان ۵۰ درصد بود و معنی آن افزایش میزان تفریخ به دو برابر میزان گزارش شده در سایر مطالعات می‌باشد که این موضوع می‌تواند به تاثیرات ذرات نقره در همراهی با پراکسید هیدروژن مرتبط باشد. بررسی منابع و مقایسه آن با نتایج این پژوهش نشان می دهد که محدوده گسترده‌ای برای غلظت نیمه کشنده پراکسید هیدروژن وجود دارد. اگرچه نتایج پژوهش حاضر با نتایج برخی محققین که غلظت نیمه کشنده پراکسید هیدروژن را محاسبه کرده اند همخوانی دارد. با این حال، دلایل مختلفی برای این اختلاف می‌توان عنوان نمود: دمای آب، بار مواد آلی و معدنی، مراحل تکوینی متفاوت، غلظت موثر و روش درمان و حضور ذرات نقره و افزودن بر پایداری اکسیژن نوزاد همگی می-توانند تاثیر گذار بوده باشند.

ذرات نقره کلوئیدی دیگر ماده تشکیل دهنده هواسان TR50 در درمان عفونت‌های باکتریایی و قارچی تخم قزل‌آلای رنگین کمان تاثیر گذار است. بر اساس نتایج بررسی‌های مختلف سمیت حاد، LC_{50}، ۹۶ ساعته نیترات نقره ($AgNO_3$) در مراحل مختلف تکوینی قزل آلای رنگین کمان از ۵/۳ تا ۲۰/۲ میکروگرم در لیتر متغیر بوده است (Grosell *et al*., 2000) همچنین بر اساس نتایج، غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته نانوذرات نقره (AgNPs) در مراحل مختلف تکوینی قزل‌آلای رنگین کمان از ۰/۱۸ تا ۲/۴۳ میلی گرم در لیتر متغیر بود (Johari *et al*., 2013). بر این اساس واضح است که غلظت‌های در حد میکروگرم در لیتر نیترات نقره در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سمیت ایجاد می‌کند در حالی که در مورد نانوذرات نقره غلظت‌های در حدود میلی‌گرم در لیتر (mg/L) سمی است، بنابراین به نظر می‌رسد نانوذرات نقره در مقایسه با یون نقره سمی‌تر است.

در یک بررسی استفاده از ۴ میلی گرم در لیتر نقره کلوئیدی (AgNPs) به مدت ۳۰ دقیقه و به صورت روزانه، میانگین درصد تفریخ تخم قزل‌آلا را به ۴۸/۱±۶/۵ درصد رساند و در گروه شاهد مثبت با تیمار مالاشیت سبز با دوز ۲ میلی‌گرم در لیتر به مدت ۲۰ دقیقه دارای میانگین درصد تفریخ ۶۴/۰±۷/۲ بود و گروه کنترل منفی بدون استفاده از ماده ضدعفونی کننده ۵/۱±۰/۲ بود (Soltani *et al*., 2011). آن چنان که مشخص است دز استفاده

شده در این بررسی بسیار بالاتر از دز نقره کلوئیدی در ماده هواسان می‌باشد و از سوی دیگر این ماده به تنهایی و بدون در نظر گرفتن اثرات پراکسید هیدروژن استفاده شده است.

همچنین محققان نشان دادند که در مورد جنین ماهی قنات سرچرب (*Pimephales promelas*)، سمیت نیمه کشنده ۹۶ ساعته AgNPs نسبت به نیترات نقره کمتر بوده و بر اساس قوانین اتحادیه اروپا (EU European Union legislation, 2008) هر ماده‌ای با غلظت نیمه کشنده ۹۶ ساعته کمتر از یک میلی‌گرم در لیتر (برای ماهیان) باید در زمره مواد خیلی سمی برای موجودات آبزی قرار گیرد (Laban *et al*., 2010). همان طورکه از نتایج مطالعه حاضر مشخص شد این عدد در مورد هواسان معادل ppm ۳۰۰ می‌باشد. اگرچه اغلب ویژگی‌هایی که ذرات نقره را به عنوان مواد موثر قلمداد می‌کنند، همان ویژگی‌ها ممکن است خطراتی برای انسان و محیط زیست ایجاد کنند. بنابراین باید ارزیابی احتمال خطر همراه با ویژگی‌های مثبت این مواد در نظر گرفته شود که در مورد هواسان با در نظر گرفتن جمیع جهات استفاده آن از استفاده انفرادی نقره و پراکسید هیدروژن اثرات بهتری به همراه داشته و با توجه به اینکه LC_{50} 96 h در مورد هواسان در حدود ppm ۳۰۰ محاسبه شد و دز توصیه شده برای این ماده نیز ppm ۳۰۰ میباشد (Rach *et al*., 1997). این یافته برای ماده هواسان بسیار ارزشمند بوده و فاصله دز موثره با دزهای سمی هواسان را می‌توان اصلی‌ترین دلیل ارجحیت هواسان بر پراکسید هیدروژن و نقره در استفاده انفرادی دانست. به منظور بررسی کارایی یک ماده جدید در درمان آبزیان، آگاهی جامع از غلظت‌ها و مدت زمان درمان و همچنین غلظت‌های کشنده در جانوران تحت تیمار مورد نیاز است. سلامتی داروها را از دیدگاه‌های مختلف می‌توان مورد بررسی قرار داد. اگر صرفاً قابلیت و سهولت کاربرد در کارگاه تکثیر مدنظر باشد، می‌توان جنبه سمیت حاد و سلامتی دارو برای عوامل انسانی ذیربط را مورد توجه قرار داد. لیکن از جنبه اکولوژیک، سلامتی دارو ابعاد به مراتب وسیع‌تری را در بر می‌گیرد که مطالعه کوتاه مدت نمی‌تواند جوابگوی آن باشد. از این دیدگاه بررسی اثر دارو بر سطوح مختلف زیستی محیط‌های آبی که در معرض هستند و اثر دارو بر فرآیندهای فیزیولوژیک ماهی در مدت‌های بلندتر باید بررسی شوند (Katzung, 1998).

در این پژوهش اثرات استفاده همزمان از دو ترکیب تشکیل دهنده ماده هواسان یعنی پراکسید هیدروژن و نقره کلوئیدی مورد توجه قرار گرفت و نتایج حاصله در اثر ترکیب خاص این ماده ضد عفونی کننده می‌باشد. در هر حال برای اطمینان از بی خطر بودن تیمارهای درمانی یک آزمایش اولیه قبل از انجام تیمار دارویی در مقیاس وسیع توصیه می شود؛ چرا که داروهای شیمیایی را نمی‌توان همیشه با یک معیار به کار برد، زیرا کارایی و سمیت این مواد در حضور مواد آلی و شرایط فیزیکوشیمیایی آب متغیر است. اگرچه تحقیقات مختلفی بر روی تک تک اجزاء این ضدعفونی کننده انجام شده و نتایج مختلفی داشته ولی با نتایج این تحقیق می‌توان در خصوص ترکیب فوق اظهار نظر نمود و استفاده از این ترکیب در دزهای توصیه شده را مناسب مزارع پرورش ماهی ایران دانست. یکی از اثرات مهم مواد ضدعفونی کننده مقابله با فلور باکتریایی نیز می باشد، بنابراین توصیه می‌شود در مصرف مواد ضدعفونی کننده این مهم نیز در نظر گرفته شده و بررسی گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت‌های شرکت رادین صنعت رایان که در راستای انجام این مطالعه انجام شده سپاسگزاری خویش را اعلام نمایند

منابع

Atanasov A., Rusenova N., Staykov Y., Nikolov G., Pavlov A., Stratev D., Raichev E. 2011. Chemical surface disinfection of fungal type fish egg incubators.

Mark P., Gaikowski J., Rach J., Olson T., Wolgamood M. 1998. Toxicity of hydrogen peroxide treatments to rainbow trout eggs. *Journal of Aquatic Animal Health* 10(3), 221-310.

Meinertz J.R., Stehly G.R., Gingerich W.H., Allen J.L. 1995. Residues of [^{14}C]-malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), after treatment of eggs. *Journal of Fish Diseases* 18, 239-247.

Meyer F.P, Jorgenson T.A. 1983. Teratological and other effects of malachite green on development of rainbow trout and rabbits. *Transactions of the American Fisheries Society* 112:818-824

Meyer F.P. 1991. Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Sciences* 69, 4201-4208.

Mirvaghefi A., Azari Takami G., Jafarpuor S.A. 2006. A comparative study of the effect of hydrogen peroxide as against mallachite green used for prevention and control of fungal infection during hatching period in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) eggs. *Iranian Journal of Natural Resources* 58(4), 853-860. (In Persian)

Mitchell A.J., Collins C.B. 1997. Review of the therapeutic uses of hydrogen peroxide in fish production. *Aquaculture Magazine* 23, 74-79.

Pottinger T.G, 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. *Diseases of Aquatic Organisms* 36, 129-141.

Rach J.J., Schreier T.M., Howe G.E., Redman, S.D. 1997. Effect of species, life stage, and water temperature on the toxicity of hydrogen peroxide to fish. *Progress in Fish Culture* 59, 41-46.

Schreier T.M., Rach J.J., Howe G.E. 1996. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture* 140, 323-331.

Sepahdari A., Salahi M., Zorriezahra, J., Hosseni A., Falahat naserabad I., Rastiannasab A. 2020. Comparison of Huwa-San TR-50 solution efficiency with malachite green and Formalin on fungal contamination control of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs in incubation stage, Journal of aquaculture development, 14(1), 53-61. (In Persian)

Agricultural Science and Technology 3, 21-284.

Aydin I., Polat H., Sahin T., Kolotoglu L., Kucuk E. 2011. Effect of iodine treatment on the hatching rate of Black sea turbot (*Psetta maxima*) eggs. *Journal of Fisheries Sciences* 5, 73-78.

Bruno D.W., Raynard R.S. 1994. Studies on the use of hydrogen peroxide as a method for the control of sea lice on Atlantic salmon. *Aquaculture International* 2, 10-18.

Czeczuga B., Bartel R., Kiziewicz B., Godlewska A., Muszynska E. 2005. Zoosporic fungi growing on the eggs of sea trout (*Salmo trutta m. trutta L.*) in river water of varied trophicity. *Polish Journal of Environmental Studies* 14, 295-303.

Das K. 2001Evaluating the life cycle environmental performance of chlorine disinfection and ultraviolet technologies. *Springer* 41, 32-43.

Gaikowski M.P., Rach J.J., Olson R., Ramsay T., Wolgamood M. 1998. Toxicity of hydrogen peroxide treatments to rainbow trout eggs. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 241-251.

Grosell M., Hogstrand C., Wood C., Hansen H. 2000. A nose-to-nose comparison of the physiological effects of exposure to ionic silver versus silver chloride in the European eel (*Anguilla anguilla*) and the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 48(2–3), 327-342.

Hussein M.M.A., Hatai K. 2002. Pathogenicity of Saprolegnia species associated with outbreaks of salmonidsaprolegniasis in Japan. *Fisheries Sciences* 68, 1067-1072.

Johari S.A, Kalbassi M.R, Soltani M., Yu I.J. 2013. Toxicity comparison of colloidal silver nanoparticles in various life stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12, 76 -95.

Katzung B.G. 1998. Basic and clinical pharmacology 7th. Edition, Appleton & Lange pub. pp: 28-33.

Kjorsvik E., Mangor-Jensen A., Holmefjord I. 1990. Egg quality in fishes. *Advances in Marine Biology* 26, 71-113.

Laban G., Nies L.F., Turco R.F., Bickham J. W., Sepulveda M.S. 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology* 19, 185-195.

Shahbazian N., Ebrahimzadeh Mousavi H.A., Soltani M., Khosravi A.R., Mirzargar S. Sharifpour I. 2010. Fungal contamination in rainbow trout eggs in Kermanshah province propagations with emphasis on Saprolegniaceae, *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 9(1), 151-160

Sharifpour I., Kakoolaki S., Mehrabi M.R. Gheyasi M., NajjarLashkari S. 2016. Evaluation of the effects of different concentrations of neutral anolyte on fungal infected eggs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in comparison with green malachite. *Iranian Journal Fisheries Sciences* 15(1), 91-99.

Soltani M., Esfandiary M., Sajadi M.M., Khazraeenia S., Bahonar A.R., Ahari H. 2011. Effect of nanosilver particles on hatchability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) egg and survival of the produced larvae. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 10(1), 167-176.

TRC. 1984. OECD guideline for testing of chemicals. Section 2. Effects on biotic systems. 39 p.

Willoughby L.G, Roberts R.J. 1992. Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries. *Journal of Fish Diseases* 15, 1-13.

Determination of HUWA-SAN TR-50 (Hydrogen peroxide+silver) LC_{50} in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) eggs

Nader Vojdanifar[1], Mehrdad Shirinabadi[2], Ali Parsa[*1], Kazem Abdi[3]

[1]Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.
[2]Department of fisheries, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran.
[3]Iranian Veterinary Organization, Tehran, Iran.
*Corresponding author: a.parsa@iausdj.ac.ir

Received: 2020/7/12 Accepted: 2021/3/15

Abstract

Fungal infections are important in the destruction of freshwater fishes and their eggs in the wild and commercial fish farms. This study aimed to investigate the lethal concentration of HUWA-SAN TR50, which is among the new generation of ecological disinfectant compounds. For thispropouse, atotalof 4000 fertilized eggs of rainbow trout were used in 5 treatments and one control, and each group with 3 repetitions. During the experiment, the water temperature, DO, Ph and hardness were 11±0.5°C, 8.6±0.32 mg/L, 7.7±0.41 and 130 mg/l, respectively. During the experiment, the incubators were oxygenated by aeration pumps and mortality was recorded every 24 hours. The results showed that the mortality percentage in treatments was significant different compared to the control one (P<0.05). Therefore, LC_{50} of this substance was calculated in 24 hours as 2278.12, in 48 hours as 1251.35, in 72 hours as 552.31 and in 96 hours 312.40 ppm. Hence the LC_{50} 96 h concentration of HUWA-SAN TR50, is close to therapeutic dosage and it has a relatively more different than its toxic doses. Therefiren, this can be recommended in practical treatment in Rainbow trout hatcheries.

Keywords: Egg, LC_{50}, Hydrogen peroxide, Silver.