اثرات ضد قارچی تراف نانوسیلور بر روی تخم ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) و لارو تا وزن یک گرمی

مهدی کهیش اسفندیاری[1]*؛ مهدی سلطانی[2]؛ میر مسعود سجادی[3]

m_esfandiary60@yahoo.com

۱- دانش آموخته دانشگاه آزاد اسلامی واحد بندر عباس، صندوق پستی : ۱۳۱۱-۷۹۱۵۹

۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صندوق پستی : ۶۴۵۲-۱۴۱۵۵

۳- استادیار و عضو هیئت علمی دانشگاه هرمزگان، صندوق پستی : ۳۹۹۵

چکیده

به منظور ارزیابی تراف نانوسیلور در کنترل آلودگی های ناشی از میکروارگانیسم ها در شرایط کارگاهی پرورش قزل آلای رنگین کمان، استحصال تخمک و اسپرم از ماهیان مولد ۵-۴ ساله مطابق روش معمول کارگاهی صورت گرفت. میزان بقاء تخم های حاصله تا مرحله چشم زدگی و از مرحله چشم زدگی تا مرحله تفریخ تخم ها و نیز میزان بقاء لارو تا وزن ۱/۲-۱ گرم، در یک تراف ۲ متری با ۴ تکرار وگروه کنترل منفی(شاهد) با ۳ تکرار بدون هرگونه مداخله دارویی به کار گرفته شد. در این مطالعه میزان فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب مورد استفاده شامل درجه حرارت (۱۳/۲ ـ ۱۲/۵ درجه سانتیگراد)، اکسیژن (۹-۸ میلی گرم در لیتر)، (دی اکسیدکربن ۲ ± ۷/۵ میلی‌گرم در لیتر)، آمونیاک (کمتر از ۰/۰۱ میلی گرم در لیتر)، نیتریت (کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر) و درجه سختی (۱۷۰ میلی گرم در لیتر کربنات کلسیم) بوده است. در این مطالعه میزان ۱۸۰۰ گرم تخم در تراف حاوی نانوسیلور (نانونصب پارس) انکوبه شد. نتایج حاصل از بقاء تخم و لارو تا یک گرمی در تراف نانوسیلور به ترتیب ۶۹/۴ و ۹۱/۸ درصد بود، که از نظر آماری در مقایسه با گروه شاهد در بقاء تخم تفاوت معنی داری داشت ($P<0/05$) . ولی میزان بقاء لارو تا یک گرمی تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشت ($P>0/05$). با توجه به نتایج مذکور و خواص خارق العاده نانوسید از قبیل خوراکی بودن، غیر مضر بودن، دوستدار محیط زیست بودن و غیره و نیز اثرات سوء و ممنوعیت استفاده از مالاشیت گرین می توان تراف نانوسیلور را به عنوان جایگزین مناسب برای مالاشیت گرین در نظر گرفت.

لغات کلیدی : تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان*(Oncorhynchus mykiss)*، تراف نانوسیلور و شاهد ، لارو قزل‌آلای رنگین کمان

* **نویسنده مسئول**

۱. مقدمه

رشد روز افزون جمعیت و نیاز به تأمین پروتئین مورد نیاز جوامع بشری زمینه توسعه سیستمهای مختلف پرورش دام، طیور و آبزیان را فراهم نموده است. تکثیر و پرورش آبزیان و به ویژه ماهیان سردآبی در اکثر نقاط کشور در حال انجام بوده و طبق آمار رسمی سال (۱۳۸۶) بالغ بر ۵۸۷۶۱ تن ماهی قزل آلا در کشور تولید شده که بر اساس برنامه ریزی انجام شده این رقم در سال پایانی برنامه چهارم (۱۳۸۸) به بیش از ۵۹۰۰۰ تن خواهد رسید (۴). با عنایت به گسترش فعالیتهای تکثیر و پرورش ماهی در کشور، همچنین پرداختن به موضوع افزایش تولید در واحد سطح، توجه به مسائل بهداشتی و بیماریهای ماهی بسیار ضروری است. چرا که عدم توجه کافی در این زمینه، می تواند خسارات جبران ناپذیری به همراه داشته باشد. تجربیات سایر کشورها مؤید این موضوع است که علیرغم پیچیدگی های درمان بیماریها پس از حادث شدن، رعایت مسائل بهداشتی در مراکز تکثیر و پرورش ماهی به منظور پیشگیری از ورود آلودگی به محیط آبزی بسیار ساده است (۱۰).

در این میان برخی از میکروارگانیزم های بالقوه بیماری زا، مانند باکتریها، قارچها و تک یاختها از جمله عوامل مشکل زایی هستند که معمولاً در کارگاههای تکثیر و پرورش آبزیان موجب کاهش تولید می شوند (۸). یکی از موانع و مشکلات اساسی تولید، بروز عارضه قارچ زدگی تخم های قزل آلا در مرحله تکثیر مصنوعی آنها می باشد (۴). قارچ زدگی یک عفونت ثانوی است و در اکثر موسسات تکثیر و پرورش و تمامی آبهای شیرین وجود دارد و یکی از گسترده ترین بیماریهای ماهیان می باشد (۳). قارچ های بوجود آورنده بیماریهای قارچی که اکثراً از خانواده ساپرولگنیا هستند از طریق چسبیدن و نفوذ به دیواره سلولی تخمهای مرده (۲۴) و سپس از طریق تخمهای مرده به تخمهای سالم سرایت می‌کند (۱۳).
اگر چه آمار دقیقی در این خصوص در دست نمی باشد اما شواهد نشان دهنده این واقعیت است که حدود نیمی از تخم های تولیدی مراکز تکثیر کشور که بالغ بر ۶۰ مرکز در ۱۴ استان کشور می باشند ، بدلیل قارچ زدگی از چرخه تولید خارج می شوند (۴).

این بیماری باعث بوجود آمدن مشکلات اقتصادی عمده ای در زمینه تکثیر و تولید قزل آلا در کشور می شود. پس باید بدنبال راه حل مناسبی برای حل این معضل مهم در مراکز تکثیر قزل آلا بود. مالاشیت گرین از سال ۱۹۳۶ میلادی به عنوان داروی قارچ کش به کار رفت و موفقیت زیادی در مداوای ماهی قزل آلا حاصل نمود (۲). به دلیل روشن شدن اثرات و عوارض سوء مالاشیت گرین بر روی انسان و انواع آبزیان از جمله کاهش قدرت باروری، سرطانزایی و جهش زایی و همچنین اثرات سوء زیست محیطی، FDA [۱] بکار بردن این دارو را برای آبزیانی که مصرف انسانی دارند از سال ۱۹۹۱ میلادی ممنوع اعلام کرده است (۱۸ و ۲۱). بیان شده است که باقیمانده های مالاشیت گرین در ماهیان بازاری که در مرحله انکوباسیون تخم خود در معرض این ماده بوده اند وجود دارد (۲۰). طبق تحقیقات Wendy و همکاران (۲۰۰۵) مالاشیت گرین پس از جذب در بافتهای بدن ماهی به لوکومالاشیت گرین احیاء می شود که یک ماده چربی دوست و دارای خاصیت ماندگاری طولانی در بافتها بوده و بیشتر خواص سمی آن را به این متابولیک احیاء شده نسبت می دهند (۲۳). اثرات سوء زیست محیطی ناشی از استفاده مکرر از آلاینده های شیمیایی در سیستم تکثیر و پرورش آبزیان،همچنین روج و گرایش جهانی آبزی پروری سبز و توسعه سیستم های پرورش ارگانیک، توجه و علاقه فزاینده ای را برای پیدا کردن جایگزین های مناسب طبیعی که دوستدار محیط زیست باشند و کمترین وارض سوء را بر روی گونه پرورشی داشته باشند، ایجاد کرده است. از جمله این مواد می توان به نانوسید اشاره نمود.

در راستای تحولات اخیر زندگی انسان، علم نانوتکنولوژی توسعه یافته و تقریباً در همه رشته های علمی،

[۱] – سازمان غذا و داروی آمریکا
(Food and Drug Administration)

نشانه‌هایی از آن یافت می شود. واژه نانو (Nano) کلمه ای به معنی کوچک است. نانوفناوری، دستیابی به فناوری کار بر روی ذراتی با ابعاد 10^{-9} متر (نانومتر) می‌باشد. زمانی که اندازه مواد در این مقیاس قرار می‌گیرد، خصوصیات ذاتی آن ها از جمله استحکام، قدرت آنتی باکتریالی و... تغییر می یابد (۹ ، ۷ ، ۱و ۵). با بررسی تاریخچه بکارگیری نقره توسط انسان، شواهد بسیاری دال بر باورهای علمی یا عقیدتی انسان نسبت به فلز نقره موجود می باشد در قدیم پادشاهان آب و خوراک خود را در ظروف نقره‌ای نگهداری و تناول می-کردند، داد و ستدهای دول و پانسمان زخم سربازان به وسیله سکه های نقره انجام می گرفت. همچنین در اروپا از ترکیبات نقره به عنوان یک آنتی بیوتیک استفاده می شده است(۹ و ۶). در فناوری نانوسیلور (Nanosilver)، یون های نقره در اندازه های ۱۰۰-۱۰ نانومتر به صورت کلوئیدی در محلولی به حالت سوسپانسیون قرار دارند که خاصیت آنتی باکتریال، آنتی فونگال (ضد قارچی) و آنتی ویروس آنها نسبت به نقره در ابعاد بزرگتر، بیش از ۹۹ درصد افزایش می یابد . نانوسید(نانوسیلور) دارای خواص آنتی میکروبیالی است و از تکثیر و رشد میکروارگانیزم ها جلوگیری بعمل می آورد که عملکرد اجمالی مکانیزم اثر نانوسید را می توان به دو صورت مکانیسم کاتالیستی و مکانیسم یونی عنوان نمود.

از ویژگی های منحصر به فرد نانوسید می توان به غیر مضر و غیر شیمیایی بودن و ایمن بودن آن برای انسان، دام، طیور، آبزیان و محیط زیست، قابلیت خوراکی برای انسان و دیگر موجودات زنده، قدرت بالای میکروب کشی، قارچ کشی، باکتری کشی و ویروس کشی، ماندگاری طولانی بدون ایجاد سازگاری و مقاومت در میکروارگانیزم ها، کاربرد آسان و تأثیر بسیار زیاد و سریع اشاره نمود (۶ و ۹) .

از مطالعات انجام شده در مورد خاصیت ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی نانوسید میتوان به موارد ذیل اشاره نمود: بررسی اثر کنترل کنندگی بر روی قارچهای Rhizoctonia، Verticillium و فوزاریوم(۹).

همچنین اخیراً پژوهشهای گسترده ای بر روی نانو نقره به عنوان یک دارو انجام شده و اثرات مثبت آن بر روی بیماریهای MS، HIV و HPC و از بین بردن ویروسها و بیماریهای ویروسی همچون سارس و آنفولانزا دیده شده است.

علاوه بر این پژوهشگران ایرانی، محلول های آنتی باکتریال شست و شوی زخم و پانسمان های ترمیمی با استفاده از نانوذرات نقره تولید کردند.به علاوه می توان از ساخت محصول آنتی باکتریال «سیلوسپت» جهت ضد عفونی کردن و شستشو که متوقف کننده قوی ویروس، قارچ و باکتری می باشد نام برد که از نانو ذرات نقره در این محصول استفاده شده است (۶). حتی می‌توان به ساخت ظروف (۵) و یخچالهای آنتی باکتریال با استفاده از نانوسید برای حفظ مواد غذایی اشاره نمود (۶).

تیمارهای ۷۵ و ۱۰۰ ppm از نانوسید به میزان ۵۰ و ۷۱٪ در کنترل قارچ Aspergillus sp موفق بودند (۹).

در مطالعه Asharani و همکاران (۲۰۰۸) بیان شد که جنین هایی از Zebra fish که با نانو ذرات نقره تیمار شده بودند دارای مرگ و میر کمتر و تفریخ بیشتر بودند (۱۱) .

در مطالعه kim و kuk (۲۰۰۷) نشان داده شد که نانوذرات نقره می توانند بعنوان ممانعت کننده رشد میکروارگانیسم ها عمل نمایند (۱۷) .

مطالعات مختلفی بر روی اثر ضد میکروبی (خاصیت ضد قارچی، ضد باکتریایی و ضد ویروسی) نانوسیلور توسط Jover و همکاران (۲۰۰۴)، Breytenbach (۲۰۰۵)، Hogstrand و Wood (۱۹۹۸)، Lok و Ho (۲۰۰۷)، See و همکاران (۲۰۰۷) و Karen و همکاران (۲۰۰۷) انجام گرفته است . (۱۵ ، ۱۲، ۱۴ ، ۱۹ ، ۲۲ و ۱۶)

ولی متاسفانه به علت نوپا بودن علم نانوتکنولوژی در ایران، هیچگونه استفاده ای از نانوسید در آبزی پروری انجام نگرفته است.

هدف از مطالعه حاضر به منظور ارزیابی اثر ضد قارچی تراف نانوسیلور در شرایط آب چشمه و با کیفیت مطلوب بر روی تخم و لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان تا وزن یک گرمی صورت گرفت تا بتوان جایگزین مناسبی برای مالاشیت گرین تعیین نمود.

۲. مواد و روش ها

تهیه مولد و استحصال تخم

از مولدین قزل آلای ۵-۴ ساله بر اساس روش اعمال دوره نوری تهیه شده از یکی از کارگاههای تکثیر و پرورش با سابقه سلامت بهداشتی، مرکز تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا واقع در استان لرستان شهرستان الیگودرز ـ شرکت ماهیاران و طی ایام بهار و تابستان ۱۳۸۷ استفاده گردید. پس از انتخاب مولدین نر و ماده و انجام معاینات لازم، نسبت به جداسازی مولدین رسیده اقدام گردید. تخم گیری از مولدین به روش معمول کارگاه مذکور بود به این صورت که پس از بیهوشی بوسیله پودر میخک گرفتن تخمک از مولدین ماده انجام شد. این کار به صورت یکنفره انجام گرفت. سپس اسپرم نرها به آن اضافه شد. در اینجا باید خاطرنشان کرد که انتخاب نر و ماده ها به صورت تصادفی انجام پذیرفت و تخمهای مربوط به همه تیمارها همزمان استحصال و استفاده شدند. سپس به روش لقاح خشک، اسپرم و تخمکها با هم مخلوط گردید و بعد به سالن انکوباسیون منتقل شد. پس از شستشوی تخمها با آب، اسپرم های اضافی جدا شده، تخم ها پس از جذب آب وارد ترافها شدند.

کیفیت آب و سایر شرایط نگهداری دوران تفریخ و رشد لاروها

برای انجام این مطالعه، کلیه شرایط معمول کارگاهی در مرکز تکثیر مربوطه مورد استفاده قرار گرفت. بخصوص اقداماتی مانند کنترلی دبی آب روزانه، مراقبت برای جلوگیری از تابش نور در دوران انکوباسیون تخم ها و عدم دستکاری تخم و تنظیم آب ورودی روی تخم ها و تراف های حاوی لاروها به طور مرتب صورت گرفت. آب کارگاه مرکز تکثیر شامل آب چشمه و درجه حرارت ۱۳/۲ ـ ۱۲/۵ درجه سانتیگراد، اکسیژن ۹-۸ میلیگرم در لیتر و دی اکسید کربن ۲ ± ۷ میلی گرم در لیتر، آمونیاک کمتر از ۰/۰۱ میلیگرم در لیتر، نیتریت کمتر از ۰/۱ میلی گرم در لیتر و سختی ۱۷۰ میلی گرم در لیتر بود. میزان آب ورودی روی تراف تخم ها و نیز بر روی لاروها بر اساس مقادیر توصیه شده ۸-۷/۵ لیتر در دقیقه برای تخم ها و ۵۰-۴۵ لیتر در دقیقه برای لاروها تنظیم گردید(۸). در مورد لاروها نیز تغذیه فعال، برابر برنامه معمول کارگاه با شنای فعال حدود ۵۰٪ لاروها و آمدن آنها به سطح آب شروع و در ابتدا لاروهای تفریخ شده، تا وزن ۰/۵ گرمی به میزان ۴/۸ درصد وزن بدن به استفاده از غذای تجاری SFTOO به تعداد حداقل ۱۲ بار در روز تغذیه و سپس تا وزن ۱/۲ گرمی به میزان ۴/۴ درصد وزن بدن با استفاده از غذاهای SFTO1 و SFT1 تغذیه شدند.

عملیات بیومتری (وزن کشی) از لاروهای تفریخ شده نیز به تعداد ۵ بار برای ۱۵-۱۰ روز یک مرتبه انجام شد. برای انجام بیومتری در هر مرتبه حداقل وزن ۱۰۰ عدد لارو تعیین و میانگین وزن آنها با دقت ۰/۰۰۱ گرم محاسبه و ثبت گردید.

تیمارها

الف- تیمار تراف حاوی نانوسیلور

از آنجائیکه از تراف مذکور تنها ۱ عدد (با طول ۲ متر) و ظرفیت خواباندن ۴ سینی تخم در اختیار بود لذا هر سینی تخم به عنوان ۱ تکرار (جمعاً در ۴ تکرار) و هر سینی حاوی ۴۵۰ گرم تخم لقاح یافته (مجموعاً ۱۸۰۰ گرم) استفاده شد.

بنابراین با حذف ۷۲ گرم تلفات تخم در ۲۴ ساعت اولیه پس از انکوباسیون، میزان کل تخم استفاده شده برابر ۱۷۲۸ گرم بود که برابر ۲۴۳۶۵ عدد تخم و به ازاء هر سینی ۶۰۹۱ تخم بود. تخمهای لقاح یافته به روش معمول کارگاه به آرامی بر طبق روال عملیات تکثیر کارگاه به سینی ها منتقل گردید.

ب-گروه شاهد (شاهد منفی)

برای شاهد نیز از ۳ تراف (هر تراف حاوی ۳ سینی و هر سینی حاوی ۳۵۰ گرم تخم لقاح یافته) استفاده شد که با حذف تلفات تخم در ۲۴ اولیه پس از انکوباسیون میزان کل تخم استفاده شده برای تیمار شاهد برابر ۴۱۴۱۱ عدد تخم (۲۹۳۷ گرم) بود.

شرح فعالیت ها و عملیات روزانه

۲۴ ساعت پس از انتقال تخم ها به تراف ها، به وسیله شیلنگ(پوآر) تخم های لقاح نیافته و سفید رنگ جدا شدند. پس از طی ۱۶ روز تخم ها شروع به چشم زدگی کردند. پس از چشم زدگی تخم های قارچ زده و تخم های سفید شده توسط شیلنگ (پوآر) به طور روزانه جمع آوری می شدند. تخم های جمع آوری شده، وزن می شدند و از میزان اولیه تخم ها کسر می گشتند.

پس از گذشت ۱۱-۱۰ روز پس از مرحله چشم زدگی و ۲۶ روز پس از لقاح، تخم ها تفریخ شدند و لاروها که کیسه زرده به آنها چسبیده بود، از تخم ها خارج شدند. در این زمان نیز تلفات به طور روزانه به وسیله پنس و یا شیلنگ (پوآر) جمع آوری می شد و تعداد تلفات شمرده و از تعداد کل لاروها کم می شد. بعد از گذشت ۱۵-۱۴ روز لاروها شروع به شنای فعال کردند در این مرحله ۵۰٪ لاروها حدود ۸۰٪ کیسه زرده شان جذب شده است و رنگ بدنشان از حالت شفاف به تیره تبدیل شد. سپس لاروها از سبدها به درون تراف ها منتقل شدند.

در این مرحله که آغاز تغذیه بود، به مدت ۵ روز بصورت دستی از جیره کور برای آشنایی و عادت کردن لاروها به گرفتن و خوردن غذا استفاده شد.که در این مرحله از غذای SFTOO استفاده شد.از این مرحله به بعد به علت کاهش تلفات هر ۳-۲ روز یکبار به وسیله ابر تمیز کننده (اسفنج تمیز کننده) کف ترافها و خروجیها تمیز می شد و با سیفون کردن به وسیله شیلنگ مانده های غذا و آشغال ها به همراه تلفات جمع آوری می شدند. پس از گذشت ۵ روز اولین بیومتری و ثبت جیره غذایی برای لاروها انجام گرفت.

$$\frac{\text{وزن ماهی}}{\text{تعداد ماهی}} = \text{میانگین وزن هر ماهی}$$

برای تعیین میزان غذا ، بیوماس ماهی در ضریب غذا دهی ضرب شد.

میانگین وزنی هر ماهی × (مجموع تلفات ــ تعداد کل ماهی ها) = بیوماس

پس از حدود ۳ ماه از لقاح تخمها وزن لاروها به حدود ۰/۲ ± ۱ گرم رسید که پایان آزمایشات این مرحله بود.

تعیین درصد تفریخ تخم

تعداد تخم تلف شده تا مرحله تفریخ ــ تعداد تخم اولیه = تعداد تخم تفریخ شده

تعداد تخم اولیه ÷ (۱۰۰ × تعداد تخم تفریخ شده) = درصد تفریخ تخم

تعیین درصد بقای لاروها تا وزن یک گرمی و یا بالای یک گرم

تعداد لارو تلف شده تا خاتمه آزمایش - تعداد لارو اولیه پس از تفریخ = تعداد لارو باقی مانده تا یک گرمی یا بالای یک گرم

تعداد لارو اولیه پس از تفریخ ÷ (۱۰۰ × تعداد لارو باقیمانده تا یک گرمی یا بالای یک گرم) = درصد بقاء لارو تا یک گرمی یا بالای یک گرم

آنالیز آماری

نتایج حاصله با استفاده از برنامه Excel و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) مقایسه و اختلاف مربوطه در حد P=0/05 محاسبه گردید.

۴. نتایج

نتایج تلفات تخم از زمان لقاح تا مرحله چشم زدگی :

نتایج حاصل از تلفات تخم تا مرحله چشم زدگی را برای تراف نانوسیلور و شاهد در جدول (۱) نشان داده است .

با توجه به نتایج مذکور میزان تلفات تخم تا مرحله چشم زدگی برای تراف نانوسیلور و شاهد به ترتیب (۱۳۲ گرم) ۱۸۶۲ و (۵۶۰ گرم) ۷۸۹۶ عدد تخم بود (شکل ۱) . به عبارت دیگر میزان بقاء تخم تا مرحله چشم زدگی برای تراف نانوسیلور ۹۲/۳۵٪ (۲۲۵۰۳ عدد) و برای شاهد ۸۰/۹۳٪ (۳۳۵۱۵ عدد) بود. بررسی این نتایج نشان می دهد که نتایج از نظر آماری از اختلاف معنی داری برخوردار بود (P<0/05) و در تیمار شاهد بیشتر از تراف نانوسیلوری بود.

جدول ۱ : میزان تلفات و بازماندگی تخم در تراف های نانوسیلور و شاهد

تیمار	تعداد تخم اولیه (گرم)	تعداد تخم تلف شده تا چشم زدگی (گرم)	تعداد تخم تلف شده از چشم زدگی تا تفریخ (درصد)	مجموع تخم تلف شده تا تفریخ (گرم)	تعداد بازماندگی تخم تا چشم زدگی (درصد)	تعداد بازماندگی تخم تا تفریخ (تعداد لاور اولیه)	درصد بازماندگی تخم تا مرحله تفریخ
تراف نانوسیلور	۲۴۳۶۵	۱۸۶۲	۵۵۸۳	۷۴۴۵	۲۲۵۰۳	۱۶۹۲۰	۶۹/۴
	(۱۷۲۸)	(۱۳۲)	(۳۰/۵)	(۵۲۸)	(۹۲/۳۵)	...	(....)
شاهد	۴۱۴۱۱	۷۸۹۶	۱۱۷۸۸	۱۹۶۸۴	۳۳۵۱۵	۲۱۷۲۷	۵۲/۵
	(۲۹۳۷)	(۵۶۰)	(۴۷/۵)	(۱۳۹۶)	(۸۰/۹۳)	...	(....)

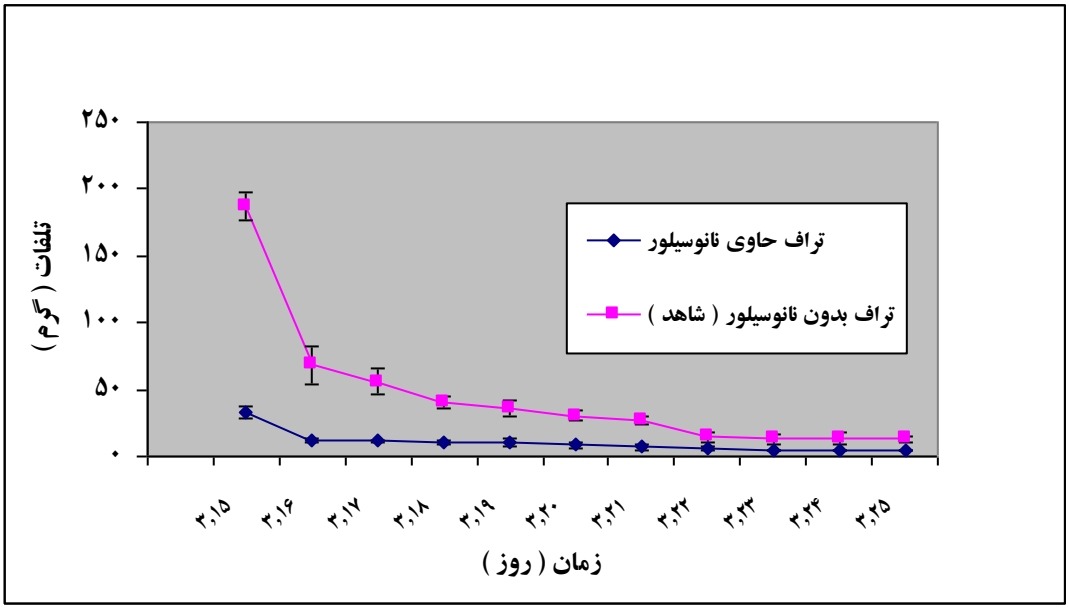
نتایج تلفات تخم از مرحله چشم زدگی تا مرحله تفریخ تخم ها :

نتایج حاصل از تلفات تخم از مرحله چشم زدگی تا تفریخ تخم ها در جدول (۱) نشان داده شده است. با توجه به نتایج میزان تلفات تخم در فاصله چشم زدگی تا تفریخ برای تراف نانوسید ، ۳۰/۵٪ (۵۵۸۳ عدد) و برای شاهد ، ۴۷/۵٪ (۱۱۷۸۸ عدد) بود.

نتایج مجموع تلفات تخم و میزان بازماندگی آن تا مرحله تفریخ :

با توجه به جدول (۱) می توان دریافت که مجموع تلفات تخم تا مرحله تفریخ در تراف نانوسیلور ۵۲۸ گرم برابر ۷۴۴۵ عدد تخم بود در حالی که برای تراف های شاهد مجموعاً ۱۳۹۶ گرم تخم برابر ۱۹۶۸۴ عدد تخم بود. به عبارت دیگر میزان بازماندگی تخم برای تراف نانوسیلور ۱۶۹۲۰ و

برای تراف های شاهد ۲۱۷۲۷ عدد بود. مقایسه آماری روند تلفات (نمودار ۳) نشان می دهد که تا ۴ روز قبل از تفریخ از اختلاف معنی داری برخوردار بوده است (P<0/05) به عبارت دیگر میزان بقاء تخم در تراف های نانوسیلور در طی دوران انکوباسیون تا مرحله تفریخ تخم به طور معنی داری بیشتر از تراف های شاهد بوده است(P<0/05)، به گونه ای که با توجه به تعداد تخم اولیه برای هریک از گروه های تیمار و شاهد، در مجموع میزان درصد بازماندگی تخم تا مرحله تفریخ برای تراف نانوسیلور ۶۹/۴ درصد و برای شاهد ۵۲/۵ درصد برآورد گردید که از اختلاف معنی‌داری برخوردار بود (P<0/05) .



شکل ۱ : مقایسه میانگین تلفات تخم قزل آلا در تراف های حاوی نانو سیلور و شاهد

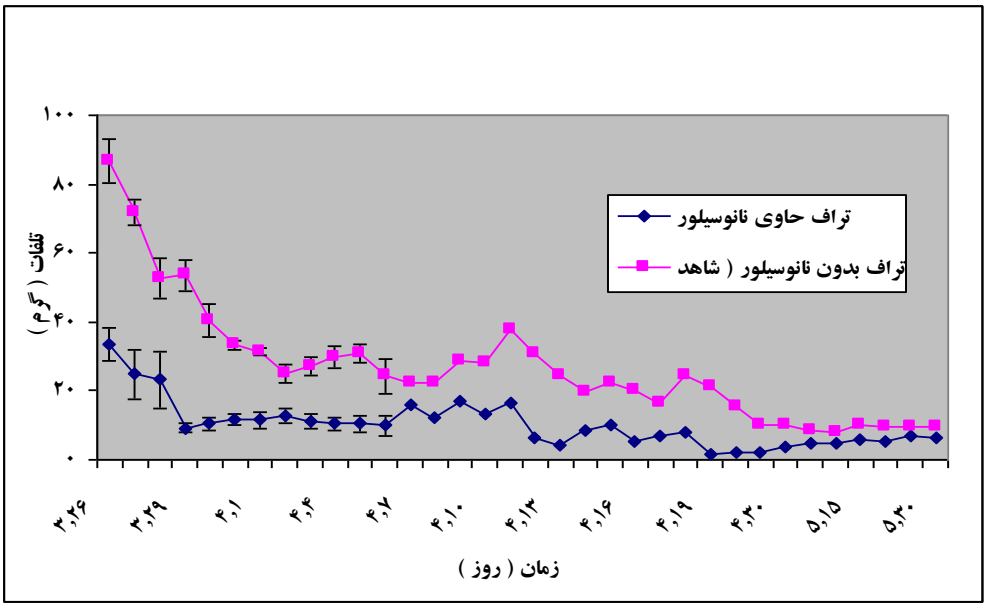
نتایج تلفات و میزان بازماندگی لارو از مرحله تفریخ تا وزن یک گرمی :

نتایج حاصل از بقاء لارو تا یک گرمی در جدول ۲ آمده است. بر اساس نتایج مذکور میزان تلفات لارو در تراف نانوسیلور جمعاً ۱۳۹۱ عدد (۸/۲۲ ٪) در حالیکه برای شاهد جمعاً برابر ۲۷۵۰ عدد (۱۲/۶۷ ٪) لارو بوده است (شکل ۲). به عبارت دیگر میزان بقاء لارو در تراف نانوسیلور برابر ۹۱/۸ درصد(۱۵۵۲۹ عدد) می باشد در حالیکه برای شاهد برابر ۸۷/۳۴ درصد (۱۸۹۷۷ عدد) بود.

مقایسه بازماندگی لاروها پس از تفریخ تا وزن یک گرمی در ترافهای نانوسید و شاهد (معمولی) فاقد اختلاف معنی دار بوده است (P>0/05) .

جدول ۲ : نتایج حاصل از تلفات و بازماندگی لارو قزل آلای تولیدی تا وزن یک گرمی حاصل از تراف های نانوسیلور و تیمار شاهد

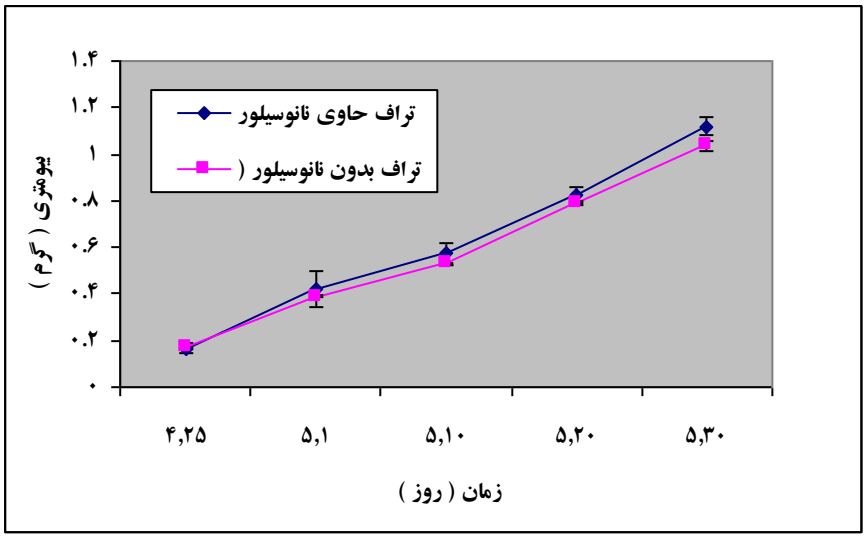
تیمار	تعداد لارو اولیه	تعداد لارو تلف شده (درصد)	تعداد لارو باقی مانده (درصد)
تراف نانوسیلور	۱۶۹۲۰	۱۳۹۱	۱۵۵۲۹
	۲۱۷۲۷	(۸/۲۲)	(۹۱/۷۸)
شاهد		۲۷۵۰	۱۸۹۷۷
		(۱۲/۶۷)	(۸۷/۳۴)



شکل ۲ : مقایسه ی نتایج میانگین میزان تلفات لارو قزل آلا (تعداد) از مرحله تفریخ تا وزن ۱ گرمی پرورش داده شده در تراف های نانوسیلور و شاهد

نتایج وزن کشی(بیومتری) لاروها

نتایج بیومتری لاروهای پرورش داده شده در تراف نانوسیلور و تراف شاهد (معمولی) در شکل ۳ نشان داده شده است. با توجه به نتایج مذکور در انتهای آزمایش (آخرین بیومتری) میانگین وزن بچه ماهیان پرورش داده شده در تراف نانوسیلور برابر ۱/۱۲۰ گرم و برای تراف شاهد ۱/۰۳ گرم برآورد شد که از نظر آماری فاقد اختلاف معنی داری ($P>0/05$) می باشد. به هر حال به طور کلی نگهداری لارو تا وزن ۱ گرم در تراف نانوسیلور از رشد بالاتری برخوردار بوده است.



شکل ۳ : مقایسه میانگین نتایج بیومتری (گرم) بچه ماهیان قزل آلادر تراف های حاوی نانو سیلور و شاهد

۴. بحث

با توجه به توسعه سریع و قابل توجه صنعت آبزی پروری در کشور به ویژه تکثیر و پرورش قزل آلا و مشکلات عمده مراکز تکثیر آن به ویژه تلفات شدید دوران انکوباسیون تخم و نیز با توجه به ممنوعیت استفاده از برخی مواد شیمیایی نظیر مالاشیت گرین یافتن داروی جایگزین مناسب امری ضروری است. بویژه استفاده از مواد گیاهی و یا ترکیباتی که کمترین مشکل زیست محیطی را در بر داشته و برای گونه های پرورشی نیز واجد حداقل عارضه باشد، یکی از نیازهای امروز مراکز تکثیر می باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده میزان تلفات تراف نانوسیلور نسبت به شاهد منفی تا مرحله چشم زدگی بسیار کمتر بوده است به طوری که اختلاف معنی داری بین این تیمار با شاهد مشاهده گردید ($P<0/05$) . همچنین مجموع تلفات تخم تا مرحله تفریخ بین تراف نانوسیلور و شاهد مقایسه گردید که مشاهده شد تا ۴ روز قبل از تفریخ اختلاف معنی‌داری بین تیمار و شاهد مشاهده گردید ($P<0/05$) . به عبارت دیگر میزان بقاء تخم در تراف های نانوسیلور در طی دوران انکوباسیون تا مرحله تفریخ تخم به طور معنی‌داری بیشتر از تراف های شاهد بود ($P<0/05$).

البته اگر به میزان بازماندگی لاروها پس از تفریخ تا مرحله یک گرمی دقت شود می بینیم که اختلاف معنی داری بین تراف نانوسیلور و تراف های شاهد وجود ندارد($P>0/05$).

علاوه بر این از نظر مقایسه وزنی تا یک گرمی می توان گفت که لاروهای تراف نانوسیلور از رشد بیشتر و مطلوب تری نسبت به شاهد برخوردار بودند. هرچند که این رشد اختلاف معنی داری نداشت ولی در کل لاروهای نگهداری شده در تراف نانوسیلوری، وزن بیشتری نسبت به لاروهای همسن خود در تراف های شاهد داشتند.

علی رغم اینکه مالاشیت گرین دارای کارآیی زیادی در کنترل انواع آلودگی های قارچی، باکتریایی و انگلی سیستم های تکثیر و پرورش آبزیان می باشد، به دلیل اثرات سوء زیست محیطی، استفاده از آن در کارگاه های پرورش آبزیانی که مصرف انسانی دارند منع شده است(۲۳ و ۲۱) .

با توجه به اثرات سوء آن، عدم استفاده از این ماده در مراکز تکثیر کشور می باید به طور جدی در برنامه کاری دستگاه های اجرایی و نظارتی قرار گیرد. پس باید سعی کرد به سراغ موادی رفت که مناسب و دوستدار محیط زیست باشند و کمترین عوارض جانبی را برای صنعت آبزی پروری داشته باشند. در این میان یکی از موادی که دوست دار محیط زیست است و برای انسان و آبزیان غیرمضر و ایمن می باشد و قابلیت خوراکی برای انسان و آبزی را دارد نانوسیلور(ذرات نانو نقره) می باشد (۹).

البته از این مورد نباید چشم پوشی کرد که خواص ضد قارچی و باکتریایی نانوسید توسط افراد بسیاری از جمله Jover و همکاران(۲۰۰۴)، Breytenbach (۲۰۰۵)، Hogstrand و Wood (۱۹۹۸)، Lok و Ho (۲۰۰۷)، See و همکاران (۲۰۰۷) و Karen و همکاران (۲۰۰۷)، Asharani و همکاران (۲۰۰۸)، kim و kuk (۲۰۰۷) و ... مورد مطالعه قرار گرفته است. (۱۵، ۱۲، ۱۴، ۱۹، ۲۲، ۱۶ ، ۱۱ و ۱۷)

البته از نظر تحقیقاتی و کاربرد نانوسیلور، بخصوص تراف نانوسیلوری بعنوان ماده ضد باکتری و ضد قارچ هیچگونه فعالیتی در ایران انجام نشده بود و می توان از مطالعه حاضر به عنوان اولین پژوهش در این زمینه نام برد.

در خاتمه باید این نکته را خاطر نشان کرد که ممکن است با تغییر در میزان نانوسید بکار رفته در تراف نانوسیلور و نیز استفاده از اشکال مختلف نانوسید از جمله سرامیک، رنگ، الیاف، کلوئید و ... بتوان به نتایج مطلوبتری دست یافت تا در نتیجه کارآیی و امنیت زیستی و بهداشتی مراکز تکثیر و پرورش در سطح بالاتری نسبت به سطوح کنونی قرار گیرد.

بعلاوه پیشنهاد می گردد که از این ماده در مراکز تکثیر بجای ماده ممنوع شده مالاشیت گرین استفاده گردد تا انسانها بتوانند از گوشت سالم ماهی بدون عوارض جانبی بهره مند گردند.

منابع

۱- ارجمندی، ب،۱۳۸۶. نانو مواد و نانو ساختارها. باشگاه نانو. سایت www.Nanoclub.com.

۲- رسولی، ا، م. رضایی. ۱۳۸۰. مقایسه تأثیر ضد میکروبی آمپی سیلین و اسانس آویشن شیرازی. مجله پژوهشی حکیم. ۴(۳) :ص ۲۲۵-۲۱۹.

۳- شریف روحانی، مصطفی،۱۳۷۴. تشخیص، پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیتهای ماهی . چاپ اول. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان. ۲۵۶ صفحه

۴- شریف روحانی، م، ۱۳۸۳. بررسی کاربرد برخی اسانس‌های گیاهی در کنترل آلودگی‌های قارچی تخم ماهیان قزل آلای رنگین کمان به عنوان جایگزین مالاشیت گرین در شرایط کارگاهی. پایان نامه دکترای تخصصی . دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. ۷۲ صفحه .

۵- شریفی، ن، ۱۳۸۶. رشد نانو ذرات نقره و پوشش دهی بر روی الیاف و سطوح. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده فیزیک دانشگاه صنعتی شریف. ۷۴ صفحه .

۶- صدری، م، ا. خزایی. ۱۳۸۶. تثبیت آنزیم بوتیریل کولین استراز بر روی نانو ذرات نقره. دومین همایش دانشجویی فن آوری نانو. ۷ صفحه.

۷- عرفانی فر، ق،۱۳۸۵. تاریخچه فناوری نانو. مقالات علمی ایران. سایت www.Articles.ir

۸- فروزانفر، ع، ۱۳۸۴. تکثیر و پرورش آزاد ماهیان. انتشارات مؤسسه تحقیقات شیلات ایران. صفحه .۱۶۷

۹- کتاب گستره کاربردهای نانوسید. شرکت نانو نصب پارس، سایت WWW.Nanocid.com.

۱۰- کدخدایی، ز، ۱۳۸۳. بررسی اثر داروی فرمالین و پراکسید هیدروژن بر روی پوسیدگی باله در ماهیان و نیز بر روی تغییرات فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب. پایان نامه کارشناسی شیلات. دانشکده منابع طبیعی کرج . ۷۲ صفحه.

11- Asharani, P. V., Y. L. Wu, , Z. Gong, , S.Valiyaveettil. 2008 . Toxicity of Silver
12-nanoparticles in Zebrafish models . Nanotechnology. 19. P :

13-Breytenbach, J. H. 2005 . Savian Influenza control the meritsof vaccination. International poultryproduction. vol 13. No 4. pages 15-17.

14-Bruno, D. W. and B.P. wood . 1994 . Fish dis. & disorders. vol 3. CABI publishing,U K. pp: 599-659.

15-Hogstrand., C., C.M. Wood . 1998. Toward a better understanding of the bioavailability. Physiology and toxicity of silver in fish : Implications for water quality criteria . Environmental Toxiciology and Chemistry , vol : 17. PP: 547-561.

16- Jover, A., R . Manvell, R . Gackson, S .Nedrano . 2004. Screening for Avian influenza . World poultry. Vol 20, No 3. pp 26-27.

17- Karen, D. J., D. R.. Ownby , B. L . Forsythe , T. P . Bills, T. W. Lapoint, , G. B. Cobb , S. J. Klain . 1999. Influence of water quality on silver toxicity to rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) , fathead minnows (Pimephales Promelas) , and water fleas (Daphnia magna) . Environmental Toxicology and chemistry . vol 18 . No 1. PP: 63-70.

18-Kim , J. S., E. Kuk, , K.. N.Yu, J. H. Kim, S. J.Park , H. J. Lee, S. H .Kim, Y. K.. Park, Y.H. Park , C. Y .H wang , Y.k. Kim , Y. S. Lee , D. H. Jeong , M. H. Cho. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles . Nanomedicine. Vol : 3 . No : 1. PP : 95-101.

19-Kitancharoen, N., A.. ono, , A. Yamamoto & K.. Hatai. 1997. The fungistatic effect of Nacl on Rainbow trout egg Saprolegniasis. Fish pathology. 32 (3) : 159-162.

20-Lok, C. N., , C. M .Ho, R.. Chen, Q. Y. He, W. Y. Yu, H. Sun, , P. K.. Tam, , J. F. Chiu, C. M. Che. 2007. Silver nanoparticles : Partial Oxidation and antibacterial activites . J. Biol Inorg CHem. 12(4) : 527-34.

21-Meinerts, J. R..,G. R.. Stehley, W. H. Gingerich and J. L . Allen 1995. Residues of [14 C] malachite green in eggs and fry of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*, after treatment of eggs. J. of fish Dis. 18; 239-246.

22-Plakas. S. M., J. Can 1996. Found general background information about toxicity of malachite green and its uptake in Cat fish. J. fish. Aquat. S ci. 53: 1427-1433

23-See , P.S., et al . 2007. Does andtibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of nanoparticle ? Astudy of the Gram-Negative Bacterium Eschericha coli. Applied Environmental Microbiology. Vol: 73. No: 6. PP: 1712-20.

24-Wendy, C., S. B.T. Andesen and J. E. Roybal. 2005 . Quantitative and confirmatory analyses of malachite green and leucomalachite green residues in fish and shrimp. Laboratory Information Bulletin. LIB No. 4363. Volume 21.

25-willough by, L. G. 1994. Fungi and fish dis. pisces press sterling, Scotland. 57p.

Antifungal effect of nanosilver trauph on Rainbow trout egg and larvae up to 1 gr

kahiesh esfandiary M.[1)*]; Soltani M.[(2)]; sajadi M.M.[(3)]

M_esfandiary60@yahoo.com

1-Islamic Azad University Bandar Abbas Branch,P.O.Box:7467147158 Bandar Abbas,Iran

2-fisheries departeman و Hormozgan university - BandarAbbas

3-faculty of Reterinary science, Tehran University,P.O.Box:14155-6452 Tehran. Iran

Abstract

Nanosilver trauph were used to assess its effects on rainbow trout egg hatchability and survival percent of larvae up to 1-1.2 body weight using spring water at 12.5-13.2 c, 2 mg/l, ammunia <0.01, nitrit <0.1 and , dissolved oxygen 8-9 mg/l , carbon dioxide 7Total hardness was about 170 mg/l Caco3. Nanosilver trauph was provided in four replicates but normal control without any treatment was also included in three replicates. In this study, the amount of 1800 gr eggs incubated in the nanosilver trauph. Results of egg survival and larva to 1 gr in the nanosilver trauph respectively,was 69.4 and 97.8 percent, statistically, compared to the control group, difference in survival of the eggs had significantly (P<0/05) .but in larva survival to 1 garam with control group, difference wasent significant(P>0/05) .acording to the results above and extraordinary properties of nanosilver as food being non harmful,environmental friendly and etc and also ill effects and prohibition of malachite green can considered nanosilver trauph for suitable alternative of malachite green.

Keywords: Rainbow trout egg(*Onchorhynchus mykiss*), Rainbow trout larva, nanosilver trauph, normal control.

*Corresponding author