تعیین غلظت کشندگی متوسط (LC_{50}) داروی ضد عفونی کننده آکوا استارت و بررسی آسیب‌شناسی آبشش در بچه ماهی قزل‌آلای‌رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

رامتین هوشنگی[۱]، مهدی سلطانی[۲]، سیدپژمان حسینی‌شکرابی[۱*]

چکیده

آکوا استارتیک ماده ضدعفونی کننده بر پایه پراسید استیک برای اولین بار در ایران با قابلیت استفاده در صنعت آبزی پروری تولید شده است. این مطالعه به منظور تعیین میزان غلظت کشندگی متوسط(LC_{50}) آکوا استارت طی ۹۶ ساعت و سپس بررسی ضایعات احتمالی آسیب‌شناسی بافت آبشش در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت گرفت. این مطالعه با تعداد ۵۱۰ عدد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۰۱± ۱/۳۳ گرم در ظروف ۳۰ لیتری در شرایط استاتیک انجام شد. ماهیان به مدت ۹۶ ساعت تحت تاثیر غلظت‌های ۶۵، ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۱۵ میلی گرم در لیتر آکوا استارت قرار گرفتند. LC50داروی آکوا استارت با جمع آوری میزان تلفات در تیمارها در طول ۹۶ ساعت با استفاده از آنالیز پروبیت برابر ۸۹/٤ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد. تغییرات رفتاری مشاهده شده در ماهیان طی دوره آزمایش در مقایسه با گروه شاهد شامل شنای دهان باز، حرکات جهشی، کف‌زنی شدن، واژگونی، شنا درسطح آب، تجمع در اطراف پمپ هوا، افزایش ترشح موکوس و مرگ دهان باز بود. پس از قرارگیری بچه ماهیان تحت غلظت‌های کشنده آکوا استارت بافت آبشش از لحاظ آسیب‌شناسی بافتی با پدیده‌هایی نظیر نکروز سلول‌های پوششی، هیپرپلازی، پرخونی و چسبندگی و چماقی شدن تیغه‌های آبششی ثانویه همراه بوده اما در غلظت‌های بالاتر، صدمات شدیدتری ازجمله نکروز وسیع سلولی مشاهده شد. درصد مرگ و میر بچه ماهیان با افزایش مدت زمان مواجهه و افزایش غلظت آکوا استارت افزایش یافت که بیانگر افزایش اثرات سمیت این ماده است. این تحقیق می تواند پایه انجام آزمایشات مزرعه‌ای برای این محصول ضدعفونی‌کننده باشد.

واژگان کلیدی: *ضدعفونی، غلظت کشندگی متوسط(LC_{50})، قزل‌آلای رنگین‌کمان، پراسید استیک، آکوا استارت*

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۵

مقدمه

توسعه صنعت آبزی‌پروری، مستلزم آشنایی با شاخه‌های مختلـف علوم، از جمله مسائل بهداشتی و کنترل بیماری‌ها بوده که یکی از راه‌های کنترل و یا پیشگیری بیماری ها استفاده از مواد ضدعفونی کننده در محیط پرورش است. ضدعفونی کننده‌ها برای کنترل عفونت‌های ناشی از موجودات زنده در سطح خارجی بدن ماهیان، ریشه کن کردن و یا کاهش عوامل بیماری زا در کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان به کار می رود(۱۹ و ۱٦). ضدعفونی کننده‌های زیادی در این زمینه تولید شده‌اند که برای استفاده در کارگاه های پرورش ماهی مناسب و ایمن هستند(۱۹).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) از خانواده آزاد ماهیان جزء مهم ترین ماهیان اقتصادی بوده که در نقاط مختلف ایران و جهان پراکنش داشته و بخش مهمی ازتولیدات آبزی پروری ایران را دربر می‌گیرد. به نحوی که در آخرین سالنامه آماری در سال ۱۳۹۲، مقدار ۳۸/۸۰ درصد از تولیدات آبزی پروری در ایران را به خود اختصاص داده است. بنابراین با پیشرفت صنعت پرورش ماهیان سردآبی در کشور و لزوم پیشگیری و کنترل بیماری‌ها با استفاده از مواد شیمیایی موثر و از طرفی دوستار محیط زیست بیش از پیش احساس می‌شود.

آکوا استارت به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده عمومی بر پایه استیک اسید، پراستیک اسید وآب اکسیژنه به صورت تجاری در ایران تولید می‌شود. محققان متعددی بیان کرده‌اند که استفاده از پراستیک اسید و پراکسید هیدروژن در محیط‌های آبی جهت کنتـرل و حـذف عوامل بیماری‌زا ماهیان نظیر انگل‌های بیرونـی

* ۱- گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران hosseini@srbiau.ac.ir
۲- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

موثر بوده و این ترکیبات به سرعت به اکسیژن و آب تجزیه شده و دارای پتانسیل جایگزینی مناسبی با سایر مواد شیمیایی مضر مانند فرمالین هستند(۱۶). نگرانی‌های اخیر در خصوص اثرات بالقوه زیست محیطی، تخلیه مقادیر بالای فرمالدهید در محیط آبی و همچنین مسائل مربوط به امنیت بهداشتی، سرطان زایی و مشکلات تنفسی در افراد در تماس با این ماده شیمیایی باعث شده تا امروزه استفاده از فرمالدهید به عنوان ماده ضدعفونی کمتر ویا به صورت محدود توصیه شود و باید به دنبال جایگزین مناسب برای آن در صنعت آبزی پروری بود(۱۲). پراستیک اسید جزء اسیدهای آلی محسوب شده و یک ماده ضدعفونی کننده و تمیز کننده قوی با طیف وسیعی از فعالیت های ضد میکروبی است(۱۰). این ماده به عنوان ترکیب ضدعفونی کنندگی ایمن و دوستار محیط زیست در آژانس حفاظت از محیط زیست برای کشاورزی، فرآوری محصولات غذایی و تجهیزات پزشکی ثبت شده است(۲۲).

به طورکلی تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که استفاده از مواد ضدعفونی کننده از جمله آب اکسیژنه در صنعت آبزی پروری قابلیت کنترل برخی بیماری‌های باکتریایی و ویروسی شامل بیماری سپتی سمی هموراژیک ویروسی (VHS)(۵)، نکروز هماتوپویتیک عفونی (IHNV)(۲۶)، نکروز لوزالمعده ای عفونی (IPN)(۵)، آب آوردگی عفونی کپورماهیان(SVC)(۵)، کم خونی عفونی ماهی آزاد (ISAV)(۲۱) و بیماری باکتریایی کلیه (BKD)(۱۵) را دارد.

میزان سمیت یک ماده شیمیایی از طریق آزمایش سنجش زیستی ارزیابی شده که به وسیله آن غلظت لازم جهت ایجاد تلفات نیمی از موجودات زنده مورد آزمایش در یک دوره زمانی معلوم (LC_{50}) مشخص می‌شود(۷). در همین راستا تحقیقات مشابهی برای به دست آوردن میزان LC_{50} مواد ضدعفونی کننده در آبزیان انجام شده که از نمونه آن‌ها می‌توان به جوینده وهمکاران (۱۳۹۲) اشاره نمود که با تعیینLC_{50} و ارزیابی اثرات ضد عفونی کنندگی پرمنگنات پتاسیم بر بار میکروبی پوست و بافت‌شناسی آبشش بچه ماهی کپور علف‌خوار (Ctenopharyngodon idella)نشادن دادند که LC50 ۹۶ ساعته این ضد عفونی کننده برای بچه ماهی کپور علفخوار ۳ تا ۵ گرمی، ۱/۰۵ میلیگرم در لیتر به دست آمد(۲). همچنین Altinok (۲۰۰٤) در پژوهشی نشان داد که LC50 کلرآمین-T در ماهی قرمز (Carassius auratus) در عرض ۲٤ ساعت برابر ۲٤/۳ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد(۷). فتح‌الهی و همکاران (۱۳۸۹) در تحقیقی میزان LC_{50} کلرید سدیم را طی ۹٦ ساعت با آنالیز پروبیت روی تاس ماهی ایرانی ۷/٦۷ گرم بر لیتر گزارش کردند(۳). همچنین مشتاقی وهمکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که LC_{50} مواد ضدعفونی کننده سولفات مس و پرمگنات پتاسیم طی ۹٦ ساعت برای تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) به ترتیب برابر ۰/۱۵، ۰/٤۱ میلی گرم در لیتر است(٤).

آکوا استارت به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده که در ساختار آن از مواد شیمیایی ایمن و دوستار محیط زیست استفاده شده برای اولین بار در ایران ساخته و اثرات آن روی آبزیان هنوز آزمایش نشده است. بنابراین هدف از این مطالعه تعیین میزان غلظت کشندگی متوسط (LC_{50}) آکواستارت طی ۹٦ ساعت و بررسی آسیب‌شناسی آبشش در بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان است.

مواد و روش کار

این تحقیق در آزمایشگاه زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران اجرا گردید. ماده ضدعفونی آکوا استارت با اجزاء تشکیل دهنده پراسیداستیک (۵-۳٪)، آب اکسیژنه (۲۳-۲۵٪)، استیک اسید (۵-۱۵٪) از شرکت رامیارشیمی (تهران، ایران) تهیه گردید. جهت اجرای این تحقیق تعداد ۵۱۰ عدد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نژاد فرانسوی (Aqualand, France) با میانگین وزنی ۰/۰۱± ۱/۳۳ گرم و میانگین طول کل ۱±۵/۵۸ سانتی متر از مزرعه تهران قزل، واقع در فیرزوکوه خریداری شد و به ظروفی با گنجایش ٤۰ لیتر با شرایط هوادهی مناسب تعداد ۱۰ عدد لارو ماهی قزل‌آلا در ۳ تکرار براری هر تیمار (هر تیمار ۳۰ عدد ماهی) انتقال یافتند.

یک هفته پس از انتقال، بچه ماهیان با شرایط آزمایشگاهی تطبیق داده شدند و به میزان ۱٪ وزن بدن در دو وعده توسط غذای تجاری بیومار (BioMar, France) تغذیه شدند. کلیه آزمایشات تقریبا در دمایی با میانگین ۱۲ درجه سانتی گراد، در شرایط اکسیژنی با میانگین ۷ میلی گرم در لیتر، pH حدود ۷ و در شرایط نوری ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی در شرایط آب ساکن (استاتیک) انجام شد. از سنگ هوا جهت هوادهی استفاده شد. کلیه فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب توسط دستگاه پرتابل مدل FL-T 90(TPS, Australia) به صورت روزانه اندازه گیری شد.

ماهی‌های مورد آزمایش۲٤ ساعت قبل از شروع آزمون آزمایش قطع غذا شدند و سپس از آنجایی‌که اطلاعات منتشره در خصوص سمیت و محدوده کشندگی این ماده روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دسترس نبود، جهت تعیین غلظت کشندگی حاد آکوا استارت در این مطالعه ابتدا از تست تعیین محدوده کشندگی بصورت لگاریتمی بر ماهیان مورد مطالعه استفاده شد و سپس تست LC50 صورت گرفت(۲۹). بدین منظور ٤ غلظت لگاریتمی و به صورت ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر و همچنین یک شاهد برای تیمارها تعیین گردید. پس از تعیین محدوده کشندگی و به منظور انجام تست سمیت حاد، ماهیان در معرض غلظت‌های ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۱۰ میلی گرم در لیتر قرار گرفتند. در این مرحله نیز یک تانک به عنوان شاهد درنظر گرفته شد. در زمان‌های مشخص میزان مرگ و میرو همچنین رفتار و علائم بالینی ماهیان ثبت شد.

جهت بررسی آسیب شناسی بافت آبشش ماهیان از تلفات هر تیمارکه با دو تکرار همراه بود به صورت تصادفی دو عدد بچه ماهی و همچنین از هر تیماری که در مدت ۹٦ ساعت زنده ماند نیز دو عدد بچه ماهی زنده بصورت تصادفی انتخاب و داخل فرمالین (مجللی، ایران)بافر ۱۰٪ فیکس و پس از گذشت ۲٤ ساعت محلول تعویض وپس از ٤۸ ساعت به آزمایشگاه بافت شناسی آزمایشگاه زکریای رازی دانشگاه علوم و تحقیقات انتقال یافت. در مرحله بعد اقدام به قالب گیری و تهیه بلوک‌های پارافنی شد و پس از آن برش گیری با دستگاه میکروتوم (Leica RM2235, Germany)، با ضخامت ٦ میکرون انجام شد.در نهایت لام‌های تهیه شده با هماتوکسین و ائوزین (آلمان، میکروم HMS70، ١٦ مرحله) رنگ آمیزی شدند و در زیر میکروسکوپ نوری در بزرگ نمایی‌های ٤، ٤۰ و ۱۰۰برابر مورد مطالعه قرار گرفتند(۱۸).

پردازش آماری داده‌ها با استفاده از برنامه نرم‌افزاری SPSS (نسخه ۲۰) توسط روش تحلیل آماریProbit analysis با سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. رسم نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel نسخه ۲۰۱۳ صورت گرفت.

نتایج

بچه ماهیان در معرض دو سطح کلی از دارو ضدعفونی‌کننده قرارگرفتند که ابتدا جهت تعیین محدوده غلظت کشندگی و بر اساس آن طی انجام آزمایشات مربوط به تعیین محدوده غلظت کشندگی، تغییرات رفتاری ماهیان نسبت به شاهد و همچنین میزان تلفات در زمان‌های مشخص ثبت شد (جدول ۱). درطول دوره سازش‌پذیری وآزمایش اصلی هیچگونه تلفات و رفتار غیرمعمولی در گروه شاهد مشاهده نشد.

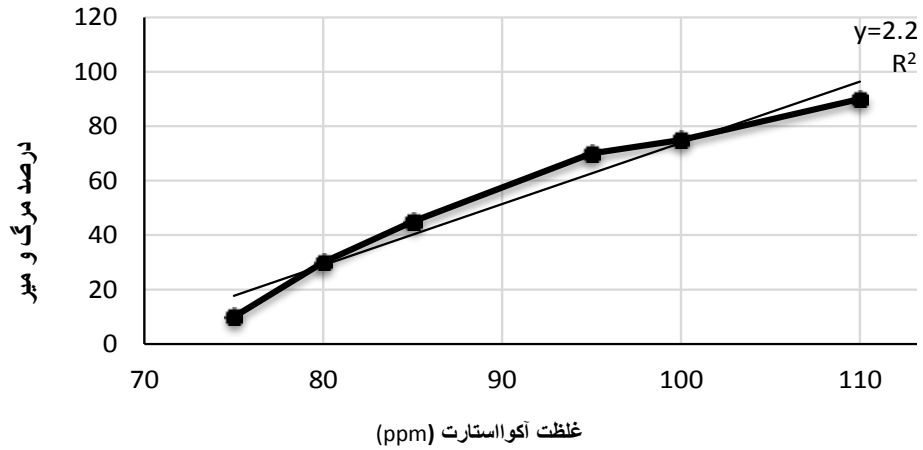
جهت تعیین میزان مرگ و میر و غلظت کشندگی متوسط آزمایشاتی روی غلظت‌های مختلف آکوا استارت طی ۹٦ ساعت انجام گرفت (جدول ۲). معادله خط رگرسیون در طی ۹٦ ساعت برای غلظت‌های ٦۵، ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۱۵ میلی گرم در لیتر با درصد مرگ و میر بچه ماهیان ترسیم شد و نشان داد که بین غلظت های ماده مورد نظر با تلفات بچه ماهیان ارتباط مستقیم بالایی وجود دارد (R2=0.960) و با افزایش غلظت میزان تلفات افزایش پیدا می‌کند (نمودار ۱).

جدول ۱ـ درصد مرگ و میر بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان طی ۹۶ ساعت در مواجهه با ماده ضدعفونی آکوا استارت

غلظت (ppm)	ساعت						
	۱	۶	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۱۰۰۰۰	۱۰۰	–	–	–	–	–	–
۱۰۰۰	۱۰۰	–	–	–	–	–	–
۸۰۰	۱۰۰	–	–	–	–	–	–
۶۰۰	۱۰۰	–	–	–	–	–	–
۴۰۰	۸۰	۱۰۰	–	–	–	–	–
۲۰۰	۰	۲۰	۱۰۰	–	–	–	–
۱۰۰	۰	۰	۵۰	۷۰	۷۵	–	۷۵
۱۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول ۲ـ میزان مرگ و میر بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان جهت تعیین غلظت کشندگی متوسط در غلظت‌های مختلف ماده ضدعفونی آکوا استارت

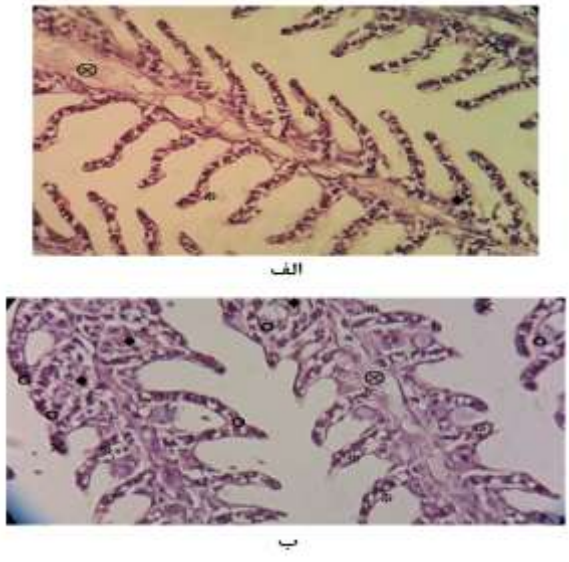
غلظت (ppm)	ساعت						
	۱	۶	۱۲	۲۴	۴۸	۷۲	۹۶
۱۱۵	۰	۴۰	۸۰	۹۰	۱۰۰	–	۱۰۰
۱۱۰	۰	۰	۳۰	۸۰	۹۰	–	۹۰
۱۰۰	۰	۰	۵۰	۷۰	۷۵	–	۷۵
۹۵	۰	۰	۶۵	۷۰	–	–	۷۰
۸۵	۰	۰	۲۰	۴۵	–	–	۴۵
۸۰	۰	۰	۳۰	–	–	–	۳۰
۷۵	۰	۰	۰	۱۰	–	–	۱۰
۶۵	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰



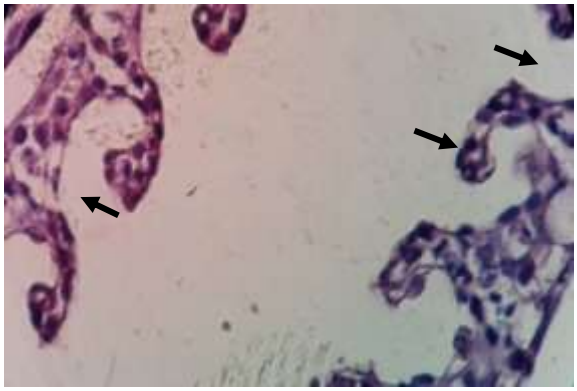
نمودار ۱ـ معادله خط رگرسیون تلفات و غلظت‌های متفاوت ماده ضدعفونی آکوا استارت طی ۹۶ ساعت

تغییرات رفتاری و علایم بالینی در دوزهای ۱۱۵ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر تقریبا بعد از ٦ ساعت از در معرض دارو قرار گرفتن ماهیان در مقابل آکوا استارت نمایان شد اما در دوزهای بالاتر (٤٠٠، ٦٠٠، ٨٠٠، ١٠٠٠، ١٠٠٠٠) در کمتر از یک ساعت بعد از شروع آزمایش علایمی چون تنفس نامنظم، شنای چرخشی، شنا متمایل به سطح آب و شنای دهان باز و حرکات جهشی شدید قابل مشاهده بود که در نهایت ماهیان به شکل دهان باز تلف شدند. در مقابل گروه شاهد و همچنین تیمارهای با غلظت ۱، ۱۰ و ٦٥ میلی‌گرم در لیتر طی مدت آزمایش رفتار طبیعی را نشان دادند. در ماهیان مسموم شده در غلظت‌های ٦٥، ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۱۰ و ۱۱۵نسبت به تیمار شاهدرفتارهای شنای دهان باز، حرکات جهشی، کف‌زی شدن، واژگونی، شنا در سطح آب، تجمع در اطراف پمپ هوا، افزایش ترشح موکوس و مرگ دهان باز ثبت شد.

نتایج مربوط به بررسی آسیب‌شناسی آبشش بچه ماهیان شاهد و مقایسه آن با بافت آبشش ماهیان در معرض غلظت‌های ٦٥، ۷۵، ۸۰، ۸۵، ۹۵، ۱۰۰، ۱۱۰، ۱۱۵و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر دارو ضدعفونی آکوا استارت ضایعاتی مانند نکروز سلول‌های پوششی، پرخونی، عریض شدن لاملای اولیه و چسبندگی و چماقی شدن تیغه‌های آبششی ثانویه مشاهده شد (نگاره ۱ و ۲). در غلظت‌های بالاتر که با ۱۰۰٪ تلفات در مدت زمان کمتر از ۱۲ ساعت مواجه بود این صدمات شدیدتر شده و بصورت نکروز وسیع سلولی همراه بود.



نگاره ۱ـ تغییرات بافت آبشش بچه ماهیان قزل‌آلا رنگین‌کمان الف) ماهیان در معرض غلظت‌های الف) ppm ۷۵ و (ب) ppm ۹۵ آکوا استارت در طی ۹٦ ساعت. * نکروز سلولی، ♦هیپرپلازی، °چسبندگی لاملاهای ثانویه به یکدیگر، ⊗ عریض شدن لاملای اولیه و ×پرخونی. (هماتوکسیلین‌وائوزین ×٤٠).



نگاره ۲ـ چماقی شدن رشته‌های ثانویه آبشش (پیکان‌ها) در بچه ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان در معرض غلظت ۸۵ میلی‌گرم در لیتر (هماتوکسیلین و ائوزین ×۱۰۰).

بحث

جهت دستیابی به امنیت زیستی در مزارع پرورش ماهیان استفاده از مواد ضد عفونی کننده جهت از بین بردن عوامل بیماری‌زا از سطح تجهیزات، تانک‌ها و بیوماس ماهیان امری ضروری است(۲۳). این مسأله به ویـژه درصنعت پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان کـه غالبا بصورت متراکم پروش داده می‌شود و دارای ارزش اقتصادی بالایی در ایران اسـت، اهمیتی مضاعف دارد. باتوجه به اینکه میزان سمیت مواد ضدعفونی کننده در محیط‌های آبی با فاکتورهای زیستی و غیرزیستی همچون سن، اندازه، توان سازگاری و تفاوت‌های بین گونه‌ای و درون‌گونه‌ای، شوری و درجه حرارت در ارتباط مستقیم بوده اما در اکثر موارد،گونه‌های آزاد ماهیان بویژه در سنین پایین، آسیب‌پذیری بیشتری را در مقایسه با گونه‌های مقاوم مثل کپور ماهیان نشان می‌دهند(٦). بنابراین اثر سمیت ماده ضدعفونی کننده آکوا استارت روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در سنین پایین یعنی بچه ماهی انجام گرفت. بـا وجـود اینکـه به وسیله آزمایشات سمیت حاد و تعیین LC50 می‌توان مقدار حـداکثر غلظـت مجاز (۱۰ برابر مقدار غلظت کشندگی متوسط) و درجه سمیت یک ترکیب شیمیایی را محاسـبه نمود(۲۹)، در این مطالعه حـداکثر غلظـت مجاز استفاده از آکوا استارت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ۸/۹ میلی‌گرم در لیتر در شرایط اپتیمم زیستی توصیه می‌شود.

برای اولین بار این مطالعه به منظور تعیین غلظت نیمه کشنده و تغییرات بافت آبشش بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مواجه شده با داروی ضد عفونی آکوا استارت انجام شد که در این تحقیق میزان LC_{50} آکوا استارت به مدت ۹٦ ساعت برابر با ۸۹/٤ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد. میزان LC_{50} ۹٦ ساعته کلرآمین و گاز کلر برای ماهی قزل‌آلای جوان به ترتیب ۲/۸ و ۰/۲۸ میلی‌گرم در لیتر گزارش شده(۸) که نسبت به آکوا استارت سمیت بالاتری را برای ماهی قزل‌آلا به همراه دارد.

جوینده و همکاران (۱۳۹۲) نشان دادند که LC_{50} ۹٦ ساعته ماده ضد عفونی کننده پرمنگنات پتاسیم برای بچه ماهی کپور علفخوار (۳ تا ۵ گرم)، ۱/۰۵ میلیگرم در لیتر است که نسبت به آکوا استارت دارای سمیت بیشتری می‌باشد(۷). همچنین Altinok (۲۰۰٤)در پژوهشی نشان داد که LC_{50} ماده ضد عفونی کننده کلرآمین-T در ماهی قرمز(*Carassius auratus*)در عرض ۲٤ ساعت برابر۲٤/۳ میلی گرم در لیتر می باشد. همچنین فتح الهی و همکاران (۱۳۸۹)در تحقیقی میزان LC_{50} کلرید سدیم را طی ۹٦ ساعت با آنالیز پروبیت روی تاس ماهی ایرانی ۷/٦۷ گرم بر لیتر گزارش کردند(۳). علاوه‌براین، مشتاقی وهمکاران (۱۳۹۱) نشان دادند که LC_{50}مواد ضدعفونی کننده سولفات مس و پرمگنات پتاسیم طی ۹٦ ساعت برای تاس ماهی ایرانی (Acipenser persicus) به ترتیب برابر ۰/۱۵، ۰/٤۱ میلی گرم در لیتر است(٤). نتایج تحقیقات ذکر شده درخصوص میزان LC50مواد ضدعفونی کننده روی ماهیان نشان می‌دهد که مواد ضدعفونی کننده کلرآمین، کلرید سدیم، سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم نسبت به آکواستارت احتمالاً دارای سمیت بیشتری بوده البته سن، گونه و شرایط محیطی در میزان سمیت مواد شیمیایی برای آبزیان تاثیر گذار است(۸). در

تحقیقی که روی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با میانگین وزنی ۱۲-۱٤/٤ گرم انجام شد، میزان LC_{50} ماده ضد عفونی کننده کلرید سدیم ۲۰/۳۸ گرم بر لیتر به دست آمد که نشان می دهد نسبت به آکواستارت سمیت بیشتری دارد. براساس سیستم جهانی هماهنگ طبقه‌بندی و برچسب‌زنی مواد شیمیایی (GHS)، میزان سمیت مواد شیمیایی و فرآورده‌های دارویی بر اساس LC_{50} ۹٦ ساعته برای ماهیان تعیین شده که آکوا استارت جز مواد با سمیت متوسط (۱۰۰≤LC50>۱۰) در این رده‌بندی قرار می‌گردد، اما اکثر مواد شیمیایی ضدعفونی کننده تجاری جزء مواد با سمیت زیاد تا بی‌نهایت سمی (۱۰≤LC50>۱ تا ۰/۱≤ LC50) طبقه‌بندی می‌شوند(۲۳).

با توجه به ضریب همبستگی بالا (R2=0.960) ارتباط مستقیم بین غلظت‌های آکوا استارت با تلفات بچه ماهیان بدست آمده که همسو با نتایج جوینده و همکاران (۱۳۹۲)(۳) و مشتاقی و همکاران (۱۳۹۱)(٤) بوده که بیان کردند ارتباط مثبت و قوی (همبستگی بالا) بین افزایش غلظت ماده ضدعفونی‌کننده و افزایش میزان تلفات وجود دارد.

ورود مواد شیمیایی به بدن موجود زنده مطمئنا تغییرات مورفولوژیکی را حداقل در سطح سلول ایجاد می نماید، بنابراین بررسی بافت‌شناسی، یک پارامتر مناسب برای تشخیص سلامت ماهی می باشد و به بیان دیگر، تغییرات بافتی واکنشی از موجود زنده است، که اطلاعاتی در مورد ماهیت یک ماده مورد بررسی را به ما خواهد داد(۱۱). در این میان آبشش اولین اندامی است که پس از قرار گرفتن ماهی در معرض استرس‌های محیطی تحریک شده و دچار تغییر می گردد و آبشش پر خون می باشد و به دلایلی مانند موقعیت نسبتا خارجی و تماس مستقیم با آب، مرتبا تحت تاثیر محرک‌های مختلف قرار گرفته و ضایعات احتمالی را نسبت به تغییرات محیطی و عوامل خارجی بروز دهد(۱).

نتایج آسیب شناسی آبشش ماهیان این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت آکوا استارت تغییرات عمده ای در ساختار آبشش بچه ماهیان ایجاد می‌شود. این نتایج همسو با تحقیقات انجام شده توسط جوینده و همکاران در سال ۱۳۹۲ که از ماده پرمنگنات پتاسیم روی ماهی کپور علفخوار بود(۲) اما ضایعاتی مثل تحلیل رفتن رشته‌های اولیه در این تحقیق مشاهده نشد. احتمالاً علت عریض شدن رشته‌های اولیه در این مطالعه به دلیل پرخونی سرخرگ‌های و وابران مستقر در تیغه‌های آبششی اولیه باشد. بطورکلی عوارض دیده شده در آبشش ماهی در واقع یک پاسخ عمومی به تحریکات شرایط محیط آبی جهت محافظت یا سازش بوده و برحسب گونه، سن، شرایط محیطی و همچنین میزان ترشح موکوس متغییر است.

چماقی شدن تیغه های آبشش همسو با مشاهدات مشتاقی و همکاران در سال۱۳۹۱ که تاثیر سمیت حاد سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم را روی آبشش و کبد بچه ماهی تاس ماهی ایرانی انجام دادند بوده(٤) اما طویل شدن رشته‌های آبششی ونازک و ضخیم شدن لاملای اولیه در این تحقیق مشاهده نشد. تشدید این عوارض بر تنفس ماهیان تاثیر گذاشته و می‌تواند سبب جلوگیری از تبادلات گازی شده و در نهایت منجر به مرگ ماهی در اثر خفگی شود.

مطالعه تغییرات رفتاری در ماهیان برای پایش وجود استرس‌ها و شرایط محیطی آبکاربرد فراوانی دارد(١٤). نتایج مطالعات رفتارشناسی بچه ماهیان نشان داد که ماهیان تحت معرض غلظت‌های حاد آکوا استارت، دچار رفتارهای غیر طبیعی مثل شنای دهان باز، حرکات جهشی، کف‌زی شدن، واژگونی، شنا در سطح آب، تجمع در اطراف پمپ هوا، افزایش ترشح موکوس باز و بسته شدن سریع سرپوش آبششی و تیره شدن بدن قابل مشاهده بود که در نهایت در غلظت‌های بالا ماهیان به شکل دهان باز تلف شدند. این رفتارها مشابه اثرات غلظت‌های تحت کشنده ماده ضدعفونی

کننده پرمنگنات پتاسیم در بچه ماهی کپور علفخوار است(۲). همسو با نتایج این تحقیق، افزایش غلظت ماده ضدعفونی فرمالین در محیط آبی با علایمی چون افزایش نرخ تنفس، شنای دهان باز و شنا در سطح آب در ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان، قزل‌آلای نقره‌ای (Oncorhynchus kisutch) و گربه ماهی آفریقایی بروز کرده که این رفتارهای غیرطبیعی احتمالاً به دلایل بروز آسیب‌های بافتی آبشش و درنتیجه عدم توانایی جذب اکسیژن محلول توسط آبشش و همچنین کمبود اکسیژن در محیط رخ می‌دهد(۲۸). بطور مشابه مرگ دهان باز در ماهی سفید نیز تحت مواجهه با غلظت‌های کشنده ماده ضدعفونی سولفات مس در اثر کمبود اکسیژن و خفگی گزارش شده است(۹).

شناسایی و استفاده از ماده‌های ضدعفونی کننده عمومی مناسب بد و اثرات جانبی برمحیط زیست برای پیشگیری و کاهش اثرات زیان‌بار اقتصادی که ناشی از بار آلودگی در سیستم‌های پرورش متراکم ماهیان است می‌تواند راهکار موثری در جهت ارتقای کیفیت محصولات شیلاتی و توسعه آبزی‌پروری پایدار باشد. بطور کلی، پرورش دهندگان با تشخیص اشتباهی نوع بیماری ماهیان از داروها و مواد شیمیایی اشتباهی استفاده نموده و زمانی که یک ماده شیمیایی مفید نباشد داروهای مختلف را آزمایش می‌کنند، که انتخاب نادرست دارو زیان آورتر از نوع بیماری خواهد بود(۱۲). بطوریکه استفاده اشتباه از ماده‌های شیمیایی ضدعفونی کننده منجر به ایجاد مشکلاتی جدی از جمله مقاومت به بیماری، آلودگی‌های زیست‌محیطی و تجمع در بدن ماهی می‌گردد(۱۲). از ضدعفونی کننده‌های شیمیایی عمومی پر استفاده می‌توان به فرمالین، سولفات مس، کلرآمینT، پراستیکاسید و هیدروژن پراکسید نام برد(۸). کاربرد این مواد از ضدعفونی تخم ماهیان گرفته(۲٤) تا گندزدایی تجهیزات سیستم پرورشی(۱۷) گسترده بوده و در کنترل رشد قارچ‌ها، انگل‌های خارجی و باکتری‌ها استفاده می‌شوند(۱۷). اما نگرانی‌ها در خصوص استفاده از این مواد شیمیایی پراستفاده رو به افزایش است. برای مثال محققان متعددی گزارش شده است که قرارگیری مکرر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مجاورت کلرآمین-T باعث کاهش نرخ رشد آن می‌شود(۲۰). همچنین استفاده از سولفات مس به علت تجمع زیستی مس در بافت ماهی در برخی کشورهای اروپایی محدود شده است(۲۵). در مقایسه، تحقیقات متعددی نشان داده است که پراکسید هیدروژن و اسید پراستیک پس از واکنش با مواد آلی هیچ مواد سمی و آلوده کننده‌ای تولید نکرده و از نظر زیست محیطی در آب بصورت زیستی تجزیه و تاثیر منفی برجای نمی‌گذارند(۱۳). زیرا این مواد به راحتی قابل تجزیه به مولکول اکسیژن و آب تجزیه شده و ترکیبات جانبی آن در مقایسه با موارد مشابه مثل فرمالین آسیب کمتری را به محیط زیست وارد می‌نماید(۱۳). بنابراین باتوجه به اینکه ماده ضدعفونی کننده آکوا استارت به عنوان یک ماده ضدعفونی کننده شامل اسید استیک، اسید پراستیک و آب اکسیژنه است، احتمالاً می‌تواند جایگزین مناسبی برای سایر مواد شیمیایی مضر تلقی گردد. زیرا این مواد به راحتی در محیط آبی تجزیه و ترکیبات جانبی تولید شده از آن غیرمضر بوده و آسیبی به محیط زیست وارد نمی‌کند(۲۷). در حقیقت این مطالعه و مباحث مرتبط با اندازه‌گیری LC50 جنبه‌های کمی اثر دارو را مورد توجه قرار داده ولی جهت بررسی جنبه‌های زیست‌محیطی، کیفیت اثر دارو و روند درمان بیماری نیازمند انجام آزمایشات تکمیلی بوده و همچنین تحقیقات مزرعه‌ای جهت مطالعه اثرات کوتاه مدت و بلند مدت این ماده روی ماهیان پرورشی ضروری است.

تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله نویسندگان از تمامی مسئولین و کارکنان محترم شرکت رامیار شیمی و جناب آقایان مهندس شیرازی و دکتر رهنما تشکر و قدردانی می‌نمایند.

فهرست منابع

۱. افضلی، ف.، شریف پور، ع.، سلطانی، م.، ابطحی، ب. (۱۳۸۹): بررسی تغییرات بافتی کبد، کلیه و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Oncorhynchus mykiss). ناشی از حمام با ماده ضد عفونی کننده آکواجرم. فصلنامه علمی تحقیقات منابع طبیعی تجدید شونده، ۱(۱): ۷۰-۶۳.

۲. جوینده، ف.، صادق پور، ع، خارا، ح.، پژند، ذ. (۱۳۹۲): تعیین LC50 و ارزیابی اثرات ضد عفونی کنندگی پرمنگنات پتاسیم بر بار میکروبی پوست و بافت شناسی آبشش بچه ماهی کپور علفخوار (Ctenopharyngodon idella). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی وتکوین جانوری، ۷(۱): ٦٦-٤٩.

۳. فتح الهی، ر.، خارا، ح.، پژند، ذ.، ماسوله، ع.، حلاجیان، ع.، مشتاقی، ب. (۱۳۸۹): تعیین غلظت کشندگی Lc5096h کلرید سدیم و اثرات آن بر بافت آبشش بچه تاس ماهی ایرانی (Acipenser persicus). مجله علوم زیستی واحد لاهیجان،٤(۳): ٦٥-۷۲.

٤. مشتاقی، ب.، نظامی، ش.، خارا، ح.، پژند، ذ.، حلاجیان، ع.، فتح الهی، ر.، حویق، ز. (۱۳۹۱): تاثیر سمیت حاد سولفات مس و پرمنگنات پتاسیم بر آبشش و کبد بچه تاس ماهی ایرانی (Acipenser persicus). مجله علمی-پژوهشی زیست شناسی دریا، ٤(۱۵): ۱-۱۲.

5. Ahne, W., Held, C., (1980): Untersuchungen über die viruzide Wirkung von Actomarâ K30 auf fish pathogene Viren. Tierärztl. Umsch 35: 308–318.

6. Alam, M. S., Teshima, S., Ishikawa, M., Koshio, S., Yaniharto, D. (2001): Methionine requirement of juvenile Japanese flounder Paralichthys olivaceus estimated by the oxidation of radioactive methionine. Aquacult.Nutr.7(3): 201-210.

7. Altinok, I., (2004): Toxicity and therapeutic effects of chloramine-T for treating Flavobacterium columnare infection of goldfish. Aquacult. 239(1): 47-56.

8. Bills, T. D., Marking, L. L., Dawson, V. K., Rach, J.J., Howe, G.E. (1988): Effects of Environmental Factors on the Toxicity of Chloramine-T to Fish. US Fish Wildl Serv Invest Fish Control 96:1–6.

9. Farhangi, M. (2014): Effect of Copper sulphate on behavioral and histopathological changes in roach, Rutilus rutilus caspicus. Caspian J. Environ. Sci. 12(1): 73-79.

10. Garcia, L. M. B., Garcia, C. M. H., Pineda, A. F. S., Gammad, E. A., Canta, J., Simon, S. P. D., Santiago, C.B. (1999): Survival and growth of bighead carp fry exposed to low salinities. Aquacult. Int. 7(4): 241-250.

11. Jayachandran, K., Pugazhendy, K.(2009): Histopathological changes in the gill of Labeo rohita (Hamilton) fingerlings exposed to atrazine. American-Eurasian J. Sci. Res. 4: 219-221.

12. Klinger, R., Floyd, R. F. (2002): Introduction to freshwater fish parasites. Document CIR716. Institute of Food and Agricultural Science. University of Florida, 1-13.

13. Monarca S., Richardson S.D., Feretti D., Grottolo M., Thruston A.D., Zani C., Navazio G., Ragazzo P., Zerbini I., Alberti A.(2002): Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. Environ. Tox. Chem. 21: 309-318.

14. Mohammed, V. S. N., Sheriff, A. M., Mohideen, S. A., Azmathullah, M. N. (2012): Toxicity of formalin on behaviour and respiration in Danio rerio. Int. J. Environ. Sci. 2(4): 1904.

15. Pascho, R.J., Landolt, M.L., Ongerth, J.E.(1995): Inactivation of Renibacterium salmoninarum by free chlorine. Aquacult. 131: 165–175.

16. Pedersen, L. F., Meinelt, T., Straus, D. L. (2013): Peracetic acid degradation in freshwater aquaculture systems and possible practical implications. Aquacult.Engin. 53: 65-71.

17. Rach, J. J., Gaikowski, M. P., Ramsay, R. T. (2000): Efficacy of hydrogen peroxide to control parasitic infestations on hatchery-reared fish. J. Aquat. Anim. Health 12(4): 267-273.

18. Roberts, R.J.(2012): Fish pathology. 4th edition. Wiley-Blackwell, UK. 590 p.

19. Roque, A., Yildiz, H. Y., Carazo, I., Duncan, N.(2010): Physiological stress responses of sea bass (Dicentrarchus labrax) to hydrogen peroxide (H2O2) exposure. Aquacult. 304(1): 104-107.

20. Sanchez-Ruiz, C., Martínez-Royano, S., Tejero-Monzón, I., (1995): An evaluation of the efficiency and impact of raw wastewater disinfection with peracetic prior to oceandischarge. Water Sci. Technol. 32:159–169.
21. Smail, D. A., Grant, R., Simpson, D., Bain, N., Hastings, T. S. (2004): Disinfectants against cultured Infectious Salmon Anaemia (ISA) virus: the virucidal effect of three iodophors, chloramine T, chlorine dioxide and peracetic acid/hydrogen peroxide/acetic acid mixture. Aquacult. 240(1): 29-38.
22. USEPA (U.S. Environmental Protection Agency).,(2007): Anthrax spore decontamination using hydrogen peroxide andperoxyacetic acid. Available at: http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/chemicals/hydrogenperoxide_peroxyaceticacid_factsheet.htm (Accessed September 2011).
23.United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) (2009): Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). United Nations Publications.
24. Wagner, E. J., Arndt, R. E., Billman, E. J., Forest, A., Cavender, W. (2008): Comparison of the efficacy of iodine, formalin, salt, and hydrogen peroxide for control of external bacteria on rainbow trout eggs. North Am. J. of Aquacult. 70(2): 118-127.
25. Wakabayashi, H.,(1993): Columnaris disease. In: Inglis, V., Roberts, R.J., Bromage, N.R. (Eds.), Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Scientific, Osney Mead, Oxford, UK, 23-39.
26. Waldrop,T., Gearheart, M., Good, C., (2009): Disinfecting recirculating aquaculture systems: postharvest cleaning. Hatch. Int. 3: 38-39.
27. Warner, J.C., Anastas, P.T. (1998): Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University PressInc.,NewYork,p. 135.
28. Wedemeyer, G. (1971): The stress of formalin treatments in rainbow trout (Salmo gairdneri) and coho salmon (Oncorhynchus kisutch). J. Fish. Res. Board Can.28(12): 1899-1904.
29 .OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). (1993): OECD Guidelines for Testing of Chemicals OECD, Organization for Economic. Paris.