

تعیین غلظت کشنده (LC50) فرمالین بر ماهی کوی (*Cyprinus rubrofuscus*)

بابک تیزکار^{۱*}، سهیل علی‌نژاد^۲، رضا تندرو صف‌سری^۱

* btizkar@yahoo.com

- ۱- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گیلان، ایران
- ۲- موسسه آموزش و ترویج کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

چکیده

فرمالین ترکیب شیمیایی موثر برای ضد عفونی سطوح و تجهیزات و نیز مبارزه با چندین عامل عفونی در ماهیان پرورشی خوراکی و زینتی می‌باشد. تعیین مقدار دقیق این ماده برای درمان ماهیان گران قیمت و دارای اهمیت بسیار مهم است. به دلیل تنوع زیاد در ماهیان زینتی این مساله اهمیت بیشتری پیدا می‌کند. در این مطالعه از روش استاندارد OECD برای تعیین غلظت کشنده (LC₅₀) فرمالین برای ماهی کوی استفاده شد. پس از انجام یکسری آزمایش‌های مقدماتی، ۷ غلظت به روش لگاریتمی تعیین گردید که به همراه یک گروه شاهد و ۳ تکرار برای هر غلظت مورد آزمایش قرار گرفتند. تلفات در هر ۲۴ ساعت ثبت و در پایان ۹۶ ساعت با استفاده از آنالیز Probit مقادیر LC₁₀، LC₅₀ و LC₉₀ محاسبه شد که نتایج به دست آمده برای این مقادیر به ترتیب ۱۴۸/۳۹، ۱۷۲/۸۱ و ۲۰۰/۵۲ میلی گرم در لیتر تعیین گردید. مقادیر حداکثر غلظت مجاز، حداقل غلظت مؤثر و غلظت غیرمؤثر فرمالین برای ماهی کوی به ترتیب ۱۷/۲۸، ۱۴۸/۳۹ و ۱۷/۲۸ محاسبه شد.

کلمات کلیدی: فرمالین، غلظت کشنده، ماهی کوی، ماهیان زینتی

مقدمه

ماهیان منبع غنی از پروتئین قابل هضم می‌باشند و از گذشته‌های دور به‌عنوان شاخص زیستی عالی برای کیفیت آب به حساب می‌آمدند، ضمن اینکه علاوه بر موارد ذکر شده به‌عنوان ماهی زینتی نیز توجه بسیاری را به خود جلب نموده‌اند (Varusai et al., 2012). نگهداری ماهیان زینتی به عنوان حیوان خانگی تبدیل به یک سرگرمی عمومی در دنیا شده است. در حدود ۷/۲ میلیون خانه در ایالات متحده آمریکا و ۳/۲ میلیون در اتحادیه اروپا دارای یک آکواریوم هستند و این کار روز به روز در حال افزایش است. همراه با این افزایش، پرورش ماهیان زینتی نیز در پاسخ به این نیاز در حال رشد است. تنوع بسیار زیاد این ماهیان و سرمایه گذاری کم در کسب و کار از عوامل مؤثر در گسترش این صنعت به حساب می‌آیند (Chanda et al., 2011). در کشور ما نیز نگهداری حیوانات خانگی و توجه به این جانوران رو به افزایش است. در این میان آبزیان و ماهیان زینتی به‌دلایل بهداشتی و فرهنگی از توجه خاصی برخوردار هستند که موجب رشد این صنعت و افزایش تولید در کشور شده است. به‌عنوان مثال تولید ماهیان زینتی در سال ۱۳۹۵ ۲۳۲،۴۱۶،۰۰۰ قطعه بود (جدول ۱) که از افزایش قابل توجهی نسبت به سال‌های قبل برخوردار می‌باشد (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۳ و ۱۳۹۶).

جدول ۱: میزان تولید ماهیان زینتی (هزار قطعه) از سال ۱۳۸۸

لغات ۱۳۹۶		
ردیف	سال	تولید (هزار قطعه)
۱	۱۳۸۸	۹۳۲۳۲
۲	۱۳۹۰	۱۳۲۰۳۶
۳	۱۳۹۲	۱۸۶۳۰۱
۴	۱۳۹۴	۲۱۳۹۰۱
۵	۱۳۹۵	۲۳۲۴۱۶
۶	۱۳۹۶	۲۴۴۱۰۳

این رشد در میزان تولید از دو طریق امکان‌پذیر است اول افزایش مساحت زیر کشت و دوم افزایش تولید در واحد سطح زیر کشت، که با توجه به محدودیت منابع، مسیر این افزایش به سمت پرورش‌های متراکم و بالا بردن تولید و افزایش بهره‌وری خواهد بود، چنین تراکمی نیاز به مدیریت بهداشتی را نیز

افزایش می‌دهد (ابراهیم‌زاده موسوی و همکاران، ۱۳۸۶). بیماری‌های ماهی ممکن است باعث ایجاد خسارات زیادی در مزارع ماهی شود. این خسارات شامل کاهش رشد ماهی و تولید، افزایش هزینه‌های تغذیه‌ای ناشی از عدم اشتها و تبدیل به ضایعات شدن غذا به دلیل عدم مصرف توسط ماهی، افزایش خسارات توسط شکارچیان، افزایش حساسیت به کیفیت پایین آب و در نهایت تلفات ماهیان هستند. جلوگیری از بروز بیماری‌های ماهی به طور کامل کاری دشوار است، بنابراین بهتر است قبل از آنکه فرصت توسعه به بیماری داده شود از وقوع آن‌ها جلوگیری شده و درمان در مرحله بعد قرار گیرد. درمان ماهی بیمار کاری بسیار دشواری است و نیاز به خدمات متخصص فن دارد. در بعضی موارد ماهی بیمار بسیار ضعیف بوده و انجام درمان مؤثر کاری سخت و مشکل است. با این حال چندین درمان ساده و مؤثر هم برای پیشگیری و هم برای کنترل بیماری قبل از آنکه به شکل جدی تبدیل شود وجود دارد و می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد (FAO). در آبی‌پروری، عواملی مانند آب نامناسب، تراکم بیش از حد، مصرف مکرر دارو، استرس ناشی از هندلینگ و حمل و نقل موجب رشد نامناسب در ماهیان، آلودگی انگلی و مرگ و میر دستجمعی می‌شود. برای پیشگیری و درمان بیماری‌های ماهی، تعداد زیادی ترکیبات ضدعفونی کننده، بیهوشی، آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای دیگر برای مدتی طولانی استفاده شده‌اند (Varusai et al., 2012). استفاده از مواد شیمیایی یکی از راه‌های مؤثر برای کنترل بیماری‌های عفونی و انگل‌های ماهی در آبی‌پروری می‌باشد (Reardon and Harrell, 1990). ماهیان ارتباط بسیار نزدیکی با محیط آبی اطراف خود دارند، به همین جهت نسبت به سموم منتقله از طریق آب آسیب‌پذیرند. اغلب ماهیان آکواریومی در یک محیط و سیستم بسته زندگی می‌کنند و آب بطور دستی تعویض و جابجا می‌شود، بنابراین اثرات این سموم می‌تواند جمع شده و بسیار مخرب باشد. تلفات ناشی از آب با کیفیت بد، بیشتر از تلفات ناشی از عوامل عفونی است. مسمومیت در ماهیان زینتی اغلب ناشی از ناهنجاری در کیفیت آب است. کیفیت بد آب یکی از مهم‌ترین عوامل ابتلا به بیماری و تلفات در ماهیان زینتی است. در معرض آب با کیفیت بد قرار گرفتن می‌تواند منجر به مرگ و میر ناگهانی و قابل توجه شود. به همین جهت تجویز نادرست ترکیبات شیمیایی نیز می‌تواند

منجر به مسمومیت ماهیان آکواریومی شود. حساسیت به سمیت ناشی از ترکیبات شیمیایی درمانی با توجه به گونه، کیفیت آب و داروی استفاده شده متفاوت است. استفاده از ترکیبات شیمیایی جهت درمان می‌تواند به بیوفیلتر، ماهی و سایر موجودات زنده ساکن آکواریوم آسیب بزند. ترکیبات شیمیایی معمول که می‌توانند در ماهیان زینتی موجب مسمومیت شوند شامل مس، فرمالین، پرمنگنات پتاسیم، مالاشیت گرین، ترکیبات آمونیوم چهارتایی، ارگانوفسفرها و آنتی‌بیوتیک‌ها مانند جنتامایسین، سولفونامیدها و اکسی‌تتراسایکلین هستند (Roberts and Palmeiro, 2008). جستجو و به کار بردن داروی مناسبی که ضمن کارایی مطلوب، دارای حداقل اثرات سمی باشد همواره در جهت مبارزه با بیماری‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است. این مسئله به ویژه در ماهیان دارای ارزش اقتصادی بالا، اهمیت مضاعفی دارد (ابطحی و همکاران، ۱۳۸۴). ورود مواد آلوده کننده به آب‌ها و تجمع آن‌ها در آبزیان به واسطه خطراتی که برای انسان و موجودات دیگر ایجاد می‌کند از دیدگاه بهداشتی، اقتصادی و اکولوژیکی بسیار حائز اهمیت است. فرمالین از دسته ترکیباتی است که دائماً در مزارع پرورش ماهی جهت درمان عفونت‌های انگلی، قارچی و باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد (فرخ‌روز و همکاران، ۱۳۹۲). سازمان غذا و دارو در کشور آمریکا ۵ دارو و ترکیب شیمیایی را در آبی‌پروری این کشور قانونی اعلام کرده است، که شامل اکسی‌تتراسایکلین، سولفامرازین، اورمتوپریم، فرمالین و تری کائین متان سولفونات می‌باشد (Chanda et al., 2011). فرمالین یکی از رایج‌ترین مواد شیمیایی است که به طور گسترده برای کنترل انگل‌های خارجی و بیماری‌های قارچی در ماهیان مورد استفاده قرار می‌گیرد (Fajer-Avila et al., 2003). فرمالین محلول مایع ۴۰-۳۷٪ گاز فرمالدئید (که معادل ۱۰۰ درصد در نظر گرفته می‌شود) می‌باشد. فرمالین یک ماده فرار و محرک است. این ماده باعث ایجاد سرطان در موش خرماهای آزمایشگاهی شده و هم چنین می‌تواند باعث ایجاد ازدیاد حساسیت پوستی و آسیب ریوی در انسان گردد. این محلول بایستی در حین انبار کردن خوب مهروموم گردیده و از تماس آن‌ها با پوست انسان خودداری گردد. فرمالین را بایستی تنها در اماکن با تهویه مناسب استفاده کرد (عبدی، ۱۳۸۵). محلول فرمالدئید ۴۰-

۳۷٪ تحت عنوان فرمالین تجاری در بازار موجود است. در صنعت پرورش ماهی از این ترکیب به عنوان ضدعفونی کننده سطوح و تجهیزات و همچنین در پیشگیری و درمان آلودگی‌های قارچی و انگل‌های خارجی استفاده می‌شود (پیغان، ۱۳۸۴). این ترکیب در ضد عفونی تخم‌های ماهیان نیز کاربرد زیادی دارد و جهت درمان انگل‌های خارجی و تخم‌های قارچ زده بسیار مناسب است (ابراهیم‌زاده موسوی و همکاران، ۱۳۹۲). فرمالین ترکیبی شیمیایی موثر برای مبارزه با چندین عامل عفونی در ماهیان پرورشی مهم و زینتی به حساب می‌آید و به صورت مختلف حمام، شستشو و اضافه کردن در جریان آب استخر به کار می‌رود (Varusai et al., 2012). در اغلب موارد دوزهای درمانی بر مبنای تجربه و نتیجه‌گیری‌های عاقلانه است، به همین جهت مسمومیت می‌تواند ناشی از دوزهای قید شده نیز رخ دهد. اطلاعات فارماکوکینتیکی به ندرت برای عوامل استفاده شده جهت درمان ماهیان زینتی در دسترس هستند (Roberts and Palmeiro, 2008). به‌عنوان مثال دوز درمانی برای قزل‌آلای رنگین‌کمان در درمان ساپروولگنیوز ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر (شمس قهفرخی و همکاران، ۱۳۸۴) و LC₅₀ آن طی مدت ۴۸ ساعت ۶/۱ میلی‌گرم در لیتر تعیین شده است، که این عدد برای *Bluespotted corydora*، بالاتر و برابر ۵۰/۷۶ میلی‌گرم در لیتر است (Tisler and Koncan, 1997). Rach و همکاران (۱۹۹۷) برای ضدعفونی تخم تاس‌ماهی دریاهای (*Acipenser fulvecenc*) غلظت ۱۵۰۰ ppm فرمالین را ۳۶ ساعت پس از لقاح و به مدت ۴۵ دقیقه، بصورت یک روز در میان را مناسب معرفی کردند. Marking و همکاران (۱۹۹۴) غلظت‌های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm فرمالین را برای مبارزه با قارچ ساپروولگنیاز در تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان مفید گزارش کردند. سلطانی و همکاران (۱۳۸۰) تحت شرایط کارگاهی غلظت ۲۰۰۰ ppm را ۴۰ ساعت پس از انکوباسیون برای ضد عفونی به مدت ۳۰ دقیقه برای ضد عفونی تخم کپورماهیان توصیه کردند. فرمالین برای درمان گروه متنوعی از انگل‌های خارجی در ماهیان زینتی، با رایج‌ترین دوز درمانی ۲۵ میلی‌گرم در لیتر استفاده می‌شود (Roberts and Palmeiro, 2008).

فرمالین اکسیژن محلول آب را کاهش می‌دهد و می‌تواند باعث تحریک آبشش‌ها شود. بنابراین آب باید به‌خوبی در طی

دوره درمان اکسیژن‌دهی شود. سمیت فرمالین در آب‌های سبک، اسیدی و دمای بالا افزایش می‌یابد (FAO.org). این‌ها همه نشان از این دارند که تعیین دوز دقیق در مورد ماهیان گرانبه‌ای و با اهمیت بسیار مهم است و برای هر کدام باید به‌طور مجزا تعیین شود. مثلاً ابطحی و همکاران (۱۳۸۴) EC_{50} و LC_{50} ۹۶ ساعت و شاخص درمانی فرمالین را برای تخم‌های لقاح یافته تاس ماهی ایرانی (قره برون) به‌دست آوردند. ماهیان زینتی از تنوع بسیار زیادی برخوردارند و با توجه به این تنوع باید این بررسی حداقل در مورد انواع مهم آن انجام شود و البته مطالعاتی هم صورت گرفته است اما با توجه به گستردگی و تنوع زیاد ماهیان زینتی نیاز به تحقیقات بسیار بیشتری دارد. یک مطالعه اخیر دامنه تحمل نسبت به چندین ضد عفونی کننده را در ماهیان معمول آکواریومی ارزیابی نمود. طی این تحقیق مشخص شد که ماهی قرمز (*Carassius auratus*) نسبت به ماهی زبرا (*Danio rerio*) در برابر اثرات فرمالین حساس‌تر است. وقتی این دو ماهی در معرض فرمالین با دوز درمانی گزارش شده (غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر طی مدت یک ساعت) قرار گرفتند اثرات مسمومیت در ماهی قرمز مشاهده شد اما در ماهی زبرا مشاهده نگردید. علایم مسمومیت در ماهی قرمز با افزایش زمان در معرض فرمالین بودن بیشتر شد اما همچنان در ماهی زبرا علائمی دیده نشد. میانگین دوز کشنده (LD_{50}) در ماهی زبرا ۶۴۸ ppm و در ماهی قرمز ۲۷۲ ppm در یک ساعت بود (Intorre et al., 2007). تاثیرات فرمالین روی ماهی زینتی آمازون (*Corydoras melanistius*) Bluespotted *coridora* نیز آزمایش شد. این ماهی به مدت ۹۶ ساعت در معرض دوزهای مختلف از صفر تا ۲۵۰ میلی گرم در لیتر فرمالین قرار گرفت. در غلظت‌های ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۵ میلی گرم در لیتر تلفاتی مشاهده نشد. اما در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۶۵، ۸۶، ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ درصد تلفات مشاهده گردید. میزان LC_{50} برای این ماهی در ۹۶ ساعت ۵۰/۷۶ میلی گرم در لیتر به دست آمد. در غلظت‌های بالاتر تغییرات ریختی در آبشش، به هم ریختگی نظم سلول کبدی و نکروز کلیوی مشاهده شد. در این مطالعه اثرات سمی خفیف فرمالین روی ماهی زینتی آمازون و نیز تغییرات مورفولوژیکی زیاد در مواجهه با غلظت‌های بالا مشخص شد (Santos et al., 2012). در تحقیق دیگری

سمیت فرمالین روی رفتار و تنفس ماهی آکواریومی زبرا طی ۹۶ ساعت بررسی شد و مشخص شد که LC_{50} آن ۳۰ ppm است. رفتار و شنای غیرطبیعی، کاهش تنفس، افزایش ترشحات موکوسی و تلفات ناشی از اثر سمی فرمالین روی ماهی زبرا در این تحقیق ثبت شد (Varusai et al., 2012). تحقیقاتی چند در مورد چندین گونه ماهی بطور خاص انجام شده است (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۰؛ حکیمی و همکاران، Reardon and Harrell, 1990; Marking et al., ۱۳۹۴; Rach et al., 1997; Varusai et al., 1994; Santos et al., 2012) اما با توجه به تعدد و تنوع گونه‌های ماهی که با اهداف مختلف نگهداری و پرورش داده می‌شوند، ضروری به نظر می‌رسد تا اطلاعات پایه در مورد آثار داروها و ترکیبات مختلف مورد استفاده در آبی‌پروری در گونه‌های مختلف در دسترس باشد و در صورت نیاز به استفاده بهترین ترکیب با مقدار مناسب و حداکثر کارایی انتخاب شود. از مشکلات مهم در آبی‌پروری عدم وجود این اطلاعات کافی است، که پرورش دهنده را مجبور می‌سازد از اطلاعات مربوط به گونه‌های مشابه استفاده کند. مشکلی که استفاده از این اطلاعات ایجاد می‌کند بالاتر یا پایین‌تر بودن حساسیت گونه‌ای، بویژه در مقابل سموم است که می‌تواند منجر به تلفات و مرگ و میر ماهیان گردد (یادگار و همکاران، ۱۳۹۰). با توجه به کارهای بسیار کمی که روی سمیت فرمالین در ماهی انجام شده است، لازم است برای استفاده آگاهانه از ترکیبات شیمیایی در ماهی مانند فرمالین و تاثیر آن روی ماهی بحث و بررسی صورت گیرد (Varusai et al., 2012). این تحقیق جهت تعیین مقدار مناسب فرمالین در ماهی کوی با نام علمی *Cyprinus rubrofuscus* صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

جهت تعیین غلظت کشنده میانی (LC_{50}) فرمالین برای ماهی کوی، از فرمالین تجاری با غلظت ۳۷ درصد فرم آلدئید استفاده شد.

بدین منظور تعداد ۲۱۰ قطعه ماهی کوی با میانگین وزنی $1/8 \pm 0/21$ گرم و طول $2/2 \pm 0/5$ سانتی متر از بخش خصوصی تهیه و به کارگاه آبی‌پروری مرکز آموزش کشاورزی گیلان منتقل گردید. ماهیان به مدت یک هفته در مخزن پلی‌اتیلنی ۱۰۰۰ لیتری جهت سازگاری به شرایط کارگاه نگهداری و

مقدار pH، اکسیژن محلول در آب و دمای آب به طور روزانه اندازه گیری شد.

در پایان ۹۶ ساعت پس از تعیین تعداد مرگ و میر در غلظت‌های مورد آزمایش با استفاده از روش آماری Probit analysis مقدار LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} در هر ۲۴ ساعت محاسبه شد. حداکثر غلظت مجاز^۲ فرمالین برای ماهی کوی با تقسیم LC_{50} ۹۶ بر عدد ۱۰ به دست آمد. سپس حداقل غلظت موثر^۳ و مقدار غلظت غیر موثر^۴ تعیین گردید. حداقل غلظت موثر را در بعضی منابع همان میزان LC_{10} ۹۶ ساعت و نیز مقدار غلظت غیر موثر را همان حداکثر غلظت مجاز در نظر می‌گیرند (حکیمی و همکاران، ۱۳۹۴).

نتایج

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که دامنه حداقل و حداکثر غلظت کشندگی فرمالین برای ماهی کوی بین ۱۵۰ تا ۲۲۰ میلی گرم بر لیتر بوده به طوری که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر هیچ تلفاتی در ماهیان تحت آزمایش مشاهده نشد و در غلظت ۲۲۰ میلی گرم در لیتر تمامی ماهیان طی ۷۲ ساعت تلف شدند.

اثر ماده فرمالین ۳۷ درصد در غلظت‌های مختلف در فواصل زمانی ۱۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر ماهی کوی مورد آزمایش نشان می‌دهد که مصرف غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر لیتر این ماده هیچ اثر کشندگی روی ماهیان نداشته است و تا پایان ۹۶ ساعت هیچ ماهی تلف نشد. در غلظت ۱۵۰ میلی گرم بر لیتر، بعد از ۲۴ ساعت ۱۴ درصد ماهیان تلف شدند ولی تا پایان ۹۶ ساعت این تلفات از ۳۶ درصد تجاوز نکرد. در غلظت ۲۲۰ میلی گرم در لیتر، ۲۹ درصد ماهیان در همان ۱۰ ساعت اول تلف شدند و پس از ۷۲ ساعت همه ماهیان از بین رفتند (جدول ۲).

روزانه دو نوبت با غذای ویژه‌ی ماهی کپور مورد تغذیه قرار گرفتند. نور محیط آزمایشگاه ۱۴ ساعت در حالت روشن و ۱۰ ساعت در حالت خاموش در نظر گرفته شده بود. طی مدت نگهداری میزان اکسیژن محلول به کمک دستگاه هوا ده در حد ۵ میلی گرم در لیتر و دما در حد ۲۶ درجه سانتی گراد ثابت نگه داشته شد. ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش غذا دهی قطع گردید.

این تحقیق بر اساس روند استاندارد O.E.C.D^۱ برنامه ریزی و اجرا شد. در این روش آزمایش‌ها به صورت استاتیک (ثابت) انجام می‌شود. به عبارتی در طول دوره آزمایش، افزایشی در غلظت ماده سمی ایجاد نشد. تعداد مرگ و میر ماهیان در طی ۴ شبانه روز و هر ۲۴ ساعت یک بار اندازه گیری شد. جهت تعیین غلظت‌های اصلی فرمالین برای تعیین مقدار اثرگذاری بر ماهیان، آزمایش‌های اولیه با دزهای ۴ تا ۲۸۰ میلی گرم در لیتر فرمالین روی ۳۰ قطعه ماهی در مخازن ۳۰ لیتری صورت گرفت. پس از تعیین دز کشنده که در طی تاثیر غلظت‌های اشاره شده بدست آمد، غلظت‌های آزمایش به روش لگاریتمی برای ۷ غلظت تعیین شد.

غلظت‌های بدست آمده جهت آزمایش به میزان ۱۰۰، ۱۵۰، ۱۶۱/۱۹، ۱۷۳/۲۱، ۱۸۶/۱۲، ۲۰۰ و ۲۲۰ میلی گرم در لیتر تعیین شد که برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. مخازن آزمایشی، از نوع پلی اتیلن و با حجم آبگیری ۳۰ لیتر بودند که در ۷ تیمار به همراه یک گروه شاهد و ۳ تکرار و به صورت تصادفی در محیط آزمایشگاه چیده شدند. تعداد ۱۴ قطعه ماهی کوی در هر مخزن قرار گرفته و مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲. Maximum Allowable Concentration(MAC)
۳. Lowest Observed Effect Concentration(LOEC)
No observed / ۴. No Observed Effect Concentration(NOEC)
level adverse effect

جدول ۲: درصد تلفات ماهی کوی در طی ساعات مختلف اثر گذاری فرمالین در غلظت های مختلف

تیمار	غلظت فرمالین (ppm)	۱۰ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
شاهد	۰	۰	۰	۰	۰	۰
۱	۱۰۰	۰	۰	۰	۰	۰
۲	۱۵۰	۰	۱۴	۱۴	۲۱	۳۶
۳	۱۶۱/۱۹	۰	۲۱	۲۱	۲۱	۳۶
۴	۱۷۳/۲۱	۵	۲۱	۲۱	۳۶	۵۷
۵	۱۸۶/۱۲	۵	۳۶	۴۳	۵۰	۶۴
۶	۲۰۰	۲۱	۴۳	۴۳	۵۷	۸۶
۷	۲۲۰	۲۹	۵۷	۸۶	۱۰۰	۱۰۰

بر اساس نتایج به دست آمده از میزان تلفات بچه ماهیان کوی در مواجهه با غلظت های مختلف فرمالین و مقایسه آن با جدول Value Probit میزان LC₁₀, LC₅₀, LC₉₀ در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر حسب میلی گرم بر لیتر برای ماهی کوی بر اساس جدول ۳ تعیین گردید.

جدول ۳: مقادیر LC₁₀, LC₅₀, LC₉₀ فرمالین برای ماهی کوی بر حسب میلی گرم بر لیتر

زمان	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت	۹۶ ساعت
LC				
۱۰	۱۵۵/۱۶	۱۵۲/۶۹	۱۵۲/۷۰	۱۴۸/۳۹
۵۰	۲۱۹/۵۰	۱۹۳/۰۷	۱۸۰/۵۰	۱۷۲/۸۱
۹۰	۳۲۸/۷۲	۲۴۲/۸۰	۲۱۲/۵۲	۲۰۰/۵۲

بر اساس نتایج جدول ۳، حداکثر غلظت مجاز و غلظت غیر موثر فرمالین برای ماهی کوی ۱۷/۲۸ میلی گرم بر لیتر و حداقل غلظت موثر فرمالین ۱۴۸/۳۹ میلی گرم بر لیتر تعیین گردید.

بحث

مواد شیمیایی متعددی وجود دارد که معمولاً توسط پرورش دهندگان ماهی برای پیشگیری و درمان بیماری های ماهی استفاده می شود. با وجود موارد متعدد مصرف فرمالین، محدودیت هایی نیز برای آن وجود دارد. فرمالین به ویژه در آب های نرم برای ماهی سمی است. فرمالین می تواند به آبشش های ماهی آسیب بزند، این سمیت در صورت بالا رفتن

نتایج حاصل از مشاهدات رفتاری ماهیان نشان داد که در غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تا پایان ۹۶ ساعت، ماهیان دارای شنای معمولی بودند. در غلظت ۱۵۰ میلی گرم در لیتر، بعد از ۲۴ ساعت، شنای ماهیان کمی تند و همراه با حرکات جهشی و ناگهانی بود و این حالت تا پایان ۹۶ ساعت ادامه داشت. در غلظت ۱۶۱/۱۹ میلی گرم در لیتر تا پایان ۴۸ ساعت ماهیان شنای تند داشتند ولی پس از این ساعت و تا زمان ۷۲ ساعت شنای تند تبدیل به حالت سکون در بعضی از ماهیان شد. در غلظت ۱۷۳/۲۱ میلی گرم در لیتر تا ۴۸ ساعت، رفتار عصبی و شنای تند در ماهیان مشاهده می شد و این رفتار تا ۹۶ ساعت افزایش یافت. در غلظت ۱۸۶/۱۲ میلی گرم در لیتر بعد از ۲۴ ساعت، در بعضی از ماهیان رفتار عدم تعادل در شنا مشاهده می شد. این رفتار در ساعت ۴۸ و ۹۶ بیشتر به چشم می خورد. در این ساعات اکثر ماهیان حالت سکون داشتند و در صورت اعمال استرس به سرعت و با تندی شنا می کردند. در غلظت ۲۰۰ میلی گرم در لیتر در ۱۰ ساعت اول بعضی از ماهیان حالت سکون به خود گرفته و بعضی دیگر شنای تند و عصبی داشتند. بعد از ۲۴ ساعت تعدادی از ماهیان حالت گیجی داشته و شنای نامتعادل از خود نشان می دادند. این رفتار تا پایان ۷۲ ساعت ادامه داشت. در پایان ۹۶ ساعت اکثر ماهیان دارای شنای نامتعادل و رفتار سکون و در پی آن شنای تند داشتند.

در غلظت ۲۲۰ میلی گرم در لیتر در همان ۱۰ ساعت اول رفتارهای نامتعارف همراه با شنای تند و نامتعادل دیده می شد و ماهیان در ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار به صورت کج شنا می کردند و این رفتار در ساعات بعد تشدید شد که نهایتاً پس از گذشت ۴۸ ساعت منجر به مرگ ماهیان گردید.

دمای آب افزایش می‌یابد (FAO). این نشان دهنده این موضوع است که استفاده از فرمالین برای جنس و حتی گونه‌های مختلف ماهی نمی‌تواند از الگوی ثابتی پیروی کند. اگر گونه‌ای از ماهی به کاهش اکسیژن حساس باشد با توجه به اثر کاهنده فرمالین بر میزان اکسیژن آب، ماهی تحت درمان را خطر مرگ به دلیل خفگی تهدید خواهد کرد. در این تحقیق میزان تلفات ماهی با غلظت‌های مختلف و در ساعات مختلف قرار گرفتن در معرض فرمالدئید، مورد بررسی قرار گرفت. میزان تلفات و رفتار ماهی در طی مدت آزمایش وابسته به مدت زمان در معرض بودن و میزان غلظت فرمالین است (Varusai et al., 2012) البته این موضوع در مواجهه با سایر ترکیبات سمی نیز صادق است (Vutukuru, 2005). در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تلفاتی مشاهده نشد. ۱۰۰٪ مرگ و میر در غلظت ۲۲۰ میلی‌گرم در لیتر فرمالین رخ داد که نسبت به ماهی *Corydoras melanistius* از مقاومت بیشتری برخوردار است. این ماهی در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر دچار تلفات کامل شد (Santos et al., 2012). در صورتی که ماهی کوی در غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر فرمالین طی مدت ۹۶ ساعت ۳۶٪ تلفات داشت.

ماهی‌های کوی که در معرض تیمارهای مختلف فرمالین قرار گرفتند دو الگوی کلی رفتاری را از خودشان نشان دادند. در تیمارهایی که مواجهه با غلظت‌های کم‌تر بودند در مراحل اولیه شنای عادی و سپس شنای عصبی و تند از خود نشان می‌دادند. در غلظت‌های بالاتر مانند ۱۸۶/۱۲ میلی‌گرم در لیتر و بیش از آن علائم شنای عصبی زودتر دیده شد و بعد از آن عدم تعادل و شنای نامتعادل مشاهده شد که تا حدودی با نتایج به دست آمده توسط Santoz و همکاران (۲۰۱۲) بر روی ماهی *Bluespotted corydora* مطابقت دارد. اختلالات داخلی بدن مانند مهار آنزیم‌ها، اختلال در انتقال عصبی، اختلال در مسیرهای متابولیکی و اختلال تنفسی (Shah and Altindag, 2005) از دلایل تغییرات رفتاری غیر طبیعی مانند شنای نامتعادل، افزایش ترشحات موکوسی، کاهش حرکات سرپوش آبششی ناشی از در معرض قرار گرفتن فرمالین در ماهی زبرا ذکر شد (Varusai et al., 2012) که می‌تواند در تحقیق فعلی بر روی ماهی کوی نیز صادق باشد به همین جهت است که از سم شناسی رفتاری بعنوان ابزاری مهم برای ارزیابی خطرات آلودگی آب و کمک در فهمیدن

اثرات استرس‌های محیطی روی ماهی استفاده می‌شود (Rao and Rao, 1987). LC_{50} به دست آمده برای ماهی کوی در تحقیق حاضر در ساعات ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به ترتیب برابر با ۲۱۹/۵۰، ۱۹۳/۰۷، ۱۸۰/۵۰ و ۱۷۲/۸۱ بود که در مقایسه با *Bluespotted corydora* (۵۰/۷۵ در ۹۶ ساعت) و لارو *H. lacerdae* با LC_{50} ۲/۰۲ مقاومتر است.

اثرات فرمالین در کنترل انگل‌های خارجی ماهی Bullseye با نام علمی *Sphaeroides annulatus* ارزیابی و LC_{50} در ۷۲ ساعت، ۷۹ میلی‌گرم در لیتر اعلام شد (Fajer et al., 2003). در ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) LC_{50} برای فرمالین طی مدت ۹۶ ساعت، ۴۲۹/۶۸ میلی‌گرم در لیتر محاسبه شد (Macniven and Little, 2001) که هردو نسبت به ماهی کوی از حساسیت بیشتری برخوردار بودند. البته فاکتورهای زیستی مانند وضعیت فیزیولوژیکی، شرایط تغذیه و مرحله زندگی ممکن است در میزان جذب شیمیایی دخالت کند. به همین جهت لاروهای ماهی، حساسیت بیشتری نسبت به بچه‌ماهیان و بالغین دارند. در هر حال واکنش هر یک از گونه‌ها در پاسخ به ماده شیمیایی متفاوت است و این آزمایشات باید با موجودات مختلف انجام شود (Santos et al., 2012). به عنوان مثال فرمالین برای ماهیان مناطق معتدل خاصیت سمی بودن بیشتری در دامنه ۱۵ تا ۳۰ میلی‌گرم در لیتر دارد. برای قزل‌آلای رنگین کمان LC_{50} طی مدت ۴۸ ساعت غلظت ۶/۱ میلی‌گرم در لیتر بود (Tisler and Koncan, 1997).

مقادیر LC_{10} ، LC_{50} و LC_{90} فرمالین در ۹۶ ساعت برای ماهیان انگشت قد تاسماهی ایرانی به ترتیب ۴/۸۱، ۲۴/۵۸ و ۱۲۵/۵۷ میلی‌گرم در لیتر و برای ماهیان انگشت قد ازون برون به ترتیب ۱۱/۴۸، ۲۰/۳۲ و ۳۵/۹۹ میلی‌گرم در لیتر می‌باشد. مقادیر حداکثر غلظت مجاز فرمالین برای گونه تاسماهی ایرانی ۲/۴۶ و برای ازون برون ۲/۰۳ و حداقل غلظت موثر به ترتیب ۴/۸۱ و ۱۱/۴۸ میلی‌گرم در لیتر تعیین شد (حکیمی و همکاران، ۱۳۹۴) که درمقایسه با ماهی کوی (به ترتیب ۱۷/۲۸ و ۱۴۸/۳۹) بسیار کمتر است و نشان از حساسیت بالای این ماهیان نسبت به ماهی کوی دارد. به طورکلی سطح تحمل ماهیان دریایی (آب شور) در معرض فرمالین نسبت به ماهیان آب شیرین بسیار بیشتر است (حکیمی و همکاران، ۱۳۹۴). که نتایج به دست آمده روی

خامه ماهی تایید کننده این موضوع است. طی تحقیقی میزان LC_{50} ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت فرمالین برای بچه ماهیان انگشت قد خامه ماهی به ترتیب ۳۲۲، ۲۶۰، ۲۴۱ و ۲۳۲ میلی گرم در لیتر به دست آمد (Cruz and Pitogo, 1989).

در این تحقیق حداکثر غلظت مجاز، غلظت موثر و حداقل غلظت موثر فرمالین بر روی ماهی کوی به دست آمد، اما از آنجائیکه نمی توان اثرات زیانباری را که این ماده به بدن ماهی مورد آزمایش ایجاد می کند را اندازه گیری کرد، مصرف این ماده علاوه بر اینکه گفته شده سمیت پائینی دارد باید با احتیاط باشد (Santos et al., 2012). اثرات بافتی و به دنبال آن تغییرات هیستوپاتولوژی ایجاد شده در بافت ماهی می تواند به عنوان یک ابزار برای شناسایی اثرات سمی مستقیم ترکیبات شیمیایی در اندام های هدف استفاده شود (Schwaiger et al., 1997). زیرا آن ها منعکس کننده آسیب های ایجاد شده ناشی از برآیند زمان و شدت در معرض قرار گرفتن با ماده شیمیایی و میزان ظرفیت سازش بافت هستند (Ferreira et al., 2004). بنابراین تحقیقات مشابه همراه با بررسی های بافت شناسی در آینده پیشنهاد می گردد. توصیه نهایی به پرورش دهندگان و دوستداران ماهیان زینتی این است، در هنگام استفاده از فرمالین برای کارهای درمانی ماهیان زینتی از غلظت تعیین شده در منابع معتبر استفاده نمایند. در صورتی که راجع به گونه های مورد نظر غلظت فرمالین به طور خاص ذکر نشده بود از حداقل دز درمانی استفاده نمایند. در ضمن تاکید می گردد همانند سایر داروها و ترکیبات شیمیایی، در ابتدا عملیات درمانی روی تعداد کمی از ماهیان استفاده شود و در صورت عدم مشاهده عوارض نامناسب برای بقیه گله نیز استفاده شود.

منابع

ابراهیم زاده موسوی، ح.، حسینی فرد، س.م.، خسروی، ع.، سلطانی، م. و یوسفیان، م.، ۱۳۸۶. جداسازی و شناسایی قارچ های ساپروفیت از آلودگی قارچی تخم ماهی قزل آلا ی رنگین کمان در مزارع تکثیر استان مازندران. مجله تحقیقات دامپزشکی، دوره ۶۲، شماره ۳، صص ۱۶۸-۱۶۱.

ابراهیم زاده موسوی، ح.، ذبیحی محمودآبادی، ع.، قره باغی، ع. و منصوری دانشور، م.، ۱۳۹۲. بیماری های ماهی های زینتی. انتشارات علمی آریان. تهران. چاپ دوم، ۳۸۲ ص.

ابطحی، ب.، نظری، ر.م.، رسولی، ع. و شفیع زاده سماکوش، پ.، ۱۳۸۴. مقایسه شاخص درمانی داروهای ضد قارچی فرمالین، سبز ملاشیت و پرمنگنات پتاسیم در تاس ماهی ایرانی. مجله پژوهش و سازندگی. شماره ۶۷، صص ۴۹-۴۲.

پیغان، ر.، ۱۳۸۴. بیماری های ماهی، انتشارات دانشگاه شهید چمران. اهواز چاپ دوم، ۲۸۱ ص.

حکیمی، ب.، خارا، ح. و پژند، ذ.، ۱۳۹۴. تعیین غلظت کشنده فرمالین بر روی بچه ماهیان تاس ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*). مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر. سال نهم، شماره دوم، صص ۶-۱.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۶-۱۳۹۱. ۱۳۹۶. تهیه و تدوین: دفتر برنامه و بودجه، واحد آمار و مطالعات توسعه شیلاتی، سازمان شیلات ایران. ۵۴ ص.

سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۲-۱۳۸۲. ۱۳۹۳. تهیه و تدوین: دفتر برنامه و بودجه، واحد آمار و مطالعات توسعه شیلاتی، سازمان شیلات ایران.

سلطانی، م.، کلباسی، م.، نظری، ر.م. و مصطفوی، ح.، ۱۳۸۰. مطالعه اثر درمانی فرمالین بر میزان تفریح تخم ماهی کپور معمولی در شرایط کارگاهی ایران (مرکز شهید رجایی ساری). مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۶، شماره ۴، صص ۶۹-۷۱.

شمس قهفرخی، م.، علی نژاد، س. و رزاقی ابیانه، م.، ۱۳۸۴. قارچ شناسی و بیماری های قارچی آریان. انتشارات موسسه آموزش عالی علمی کاربردی جهاد کشاورزی، تهران. ۱۹۲ صفحه.

عبدی، ک.، ۱۳۸۵. اطلاعات و کاربرد داروهای آریان، انتشارات پرتو واقعه با همکاری انتشارات دانش نگار. ۴۳۰ ص.

فرخ روز، م.، زمینی، ع. و مظفری، ا.، ۱۳۹۲. بررسی تأثیرات فرمالین و سولفات مس بر بافت های آبشش بچه

- formalin, malachite green, and potassium permanganate in goldfish and zebrafish. Journal of the American Veterinary Medical Association, 231(4), 590-5.
- Macniven, A. and Little, D.C., 2001.** Development and evaluation of a stress challenge testing methodology for assessment of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.) fry quality. Aquaculture Research, 32, 671-679.
- Marking, L.L., Rach, J.J. and schreier, T.M. 1994.,** Evaluation of antifungal agents for fish culture. The Progressive Fish-Culturist, 56, 225-231.
- Rach, J.J., How, G.E. and Schreier, M.T., 1997.** Safety of formalin treatments on warm and cool water fishes eggs. Aquaculture, 149, 183 – 191.
- Rao K.R.S.S. and Rao J.C., 1987.,** Independent and confined action of carbaryl and phenthoate on snake head *Channa punctatus* (Bioch.). Current Science, 56(7), 331-332.
- Reardon, I.S. and Harrell, R.M., 1990.** Acute toxicity of formalin and copper sulfate to Striped Bass fingerlings held in varying salinity. Aquaculture, 87, 255-270.
- Roberts, H. and Palmeiro, B.S., 2008.** Toxicology of aquarium fish. Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 11, 359–374.
- Santos, R.F.B., Dias, H.M. and FujimotoI, R.Y., 2012.** Acute toxicity and histopathology in ornamental fish amazon bluespotted corydora (*Corydoras melanistius*) exposed to formalin. Anais da Academia Brasileira de Ciências, 84 (4), 1001-1007.
- ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، شماره پیاپی ۲۳، جلد ۶، شماره ۴، صص ۲۷-۳۵.
- یادگار، ن.، جواهری بابلی، م.، ستاری، ا. و سلاطی، ا.پ.، ۱۳۹۰. اثر سولفات مس و فرمالین بر پارامترهای خونی ماهی بنی. مجله دامپزشکی و آزمایشگاه، دوره ۳، شماره ۲. صص ۱۰۹-۱۱۶.
- Chanda, M., Paul, M., Maity, J., Dash, G. and Gupta, S.S., 2011.** The use of antibiotics and disinfectants in ornamental fish farms of West Bengal, India. Journal of Natural Science, Biology and Medicine, 2(2), 139-140.
- Cruz, E.R. and Pitogo, C.L., 1989.** Tolerance level and histopathological response of Milkfish (*Chanos chanos*) fingerlings to formalin. Aquaculture, 78, 135-145.
- Fajer-Avila, E.J., Abdo-de la Para, I., Aguilar-Zarate, G., Contreras-Arce, R., ZaldivarRamirez, J. and Betancourt-Lozano, M., 2003.** Toxicity of formalin to Bullseye Puffer fish (*Sphoeroides annulatus* Jernyns, 1843) and its effectiveness to control ectoparasites. Aquaculture, 223, 41-50.
- www.fao.org/fishery/static/FAO_Training/FAO_Training/General/x6709e/x6709e15.htm. FISH DISEASE PREVENTION AND TREATMENT. 220 P.
- Ferreira, M., Antunes, P., Gil, O., Vale, C. and Reis-henriques, MA., 2004.** Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. Aquatic Toxicology, 69, 347-357.
- Intorre, L., Meucci, V., Di Bello, D., Monni, G., Soldani, G. and Pretti, C., 2007.** Tolerance of benzalkonium chloride,

Schwaiger, J., Wanke, R., Adam, S., Pawert, M., Honnen, W. and Triebkorn, R., 1997.

The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery, 6, 75-86.

Shah, S. and Altindag, A., 2005. Alterations in the immunological parameters of Tench (*Tinca tinca* L) after acute and chronic exposure to lethal and sub lethal treatments with mercury, cadmium and lead. Turkey Journal of Veterinary Animal Science, 29, 1163-1168.

Tisler, T. and Koncan, J.Z., 1997. Comparative assessment of toxicity of phenol, formaldehyde, and industrial wastewater to aquatic organisms. Earth and Environmental Science, 97, 315-322.

Varusai Naina Mohammed, S., Asrar Sheriff, M., Sultan Mohideen, A.K. and Azmathullah, N.Md., 2012. Toxicity of formalin on behaviour and respiration in *Danio rerio*. International Journal of Environmental Sciences, 2(4), 1904-1908.

Vutukuru, S.S., 2005. Acute effects of hexavalent chromium on survival oxygen consumption, haematological parameters and some biochemical profiles of the Indian major carp, *Labeo rohita*. International Journal Environmental Research and Public Health, 2 (3), 456-462.

Determining the lethal concentration of formalin to koi fish (*Cyprinus carpio*)

Teizkar B.^{1*}; Alinezhad S.²; Tondro Safsari R.¹

* btizkar@yahoo.com

1-Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). Rasht. Iran.

2- Institute of Agricultural Education and Extension, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Abstract

Formalin is a chemical disinfectant for surface and premises beside its effect on several infective pathogens in ornamental and food fishes. Determination of formalin concentration for precious fish is critical. This problem is so important because of the aquarium fish varieties. In this study, OECD standard method was used for Koi fish formalin LC₅₀ assessment. After a series of basic experiments, seven logarithmic concentrations plus a control group in three repeats were determined. Mortality were recorded per day and by using "Probit analysis", LC₁₀, LC₅₀ and LC₉₀ were calculated after 96 hrs, e.g., 148.93, 172.81 and 200.52 mg L⁻¹ respectively. MAC, MIC and NOEC were estimated 17.28, 148.39 and 17.28 mg L⁻¹ in turn for Koi.

Keywords: Formalin, LC₅₀, Koi, Ornamental fish