اثر ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره بر چهار مرحله از رشد میگوی سفید هندی (*Fenneropenaeus indicus*)

محمد رضا مهرابی(۱)؛ مهدی سلطانی(۲)*؛ حسینعلی ابراهیم‌زاده موسوی(۳)؛ سید سعید میرزرگر(٤)؛
عیسی شریف پور(۵)؛ شهرام قاسمی(٦)؛ عقیل دشتیان نسب(۷) و بابک قائدنیا(۸)
msoltani@ut.ac.ir

۱، ۵ و ٦- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ٦١١٦-١٤١٥٥
۲، ۳ و ٤- گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، صندوق پستی: ٦٤٥٣-١٤١٥٥
۷ و ۸ - بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان، پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر صندوق پستی: ١٣٧٤

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۸۸   تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۸

چکیده

یون نقره دارای خاصیت میکروب‌کشی قوی است و در صورت ترکیب با پراکسید هیدروژن اثرات ضدعفونی‌کنندگی آنها افزایش خواهد یافت. در این تحقیق، به منظور ارزیابی امکان کاربرد ضدعفونی‌کننده حاوی ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره در صنعت تکثیر و پرورش میگو نسبت به بررسی تاثیر این ترکیب بر چهار مرحله از رشد میگوی سفید هندی و ارزیابی زیستی آن اقدام شد. برای تعیین میانه غلظت تاثیرگذاری بر ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت ($EC_{50}/96h$) و تعیین میانه غلظت‌کشندگی در ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت ($LC_{50}/96h$) با ۹۵ درصد اطمینان، از نرم‌افزار Trimmed Spearman-karber استفاده گردید. آزمایشها بر روی مجموعاً ۶۰۰۰ عدد میگو براساس روش تعیین سمیت حاد طبق دستورالعمل سازمان توسعه و همکاری اقتصادی اروپا (OECD) بصورت ساکن و بدون تعویض آب (Static) طی سالهای ۱۳۸۵-۱۳۸۴ در پژوهشکده میگوی کشور اجرا شدند. طبق نتایج بدست آمده، میانه غلظت تاثیرگذاری ترکیب مذکور بر ۵۰ درصد پس‌نوزادهای ۱۵روزه (PL_{15}) طی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، بترتیب ۱۳۲/۵، ۶۷/۸۹، ۵۵/۵۶، ۵۱/۹۵، ۴۸/۶، در پس‌نوزادهای ۴۵روزه (PL_{45}) بترتیب ۱۴۷/۵۷، ۷۰/۸۳، ۶۰/۰۱، ۵۴/۸۹، ۴۱/۱۹، در میگوی جوان (۱±۱۲ گرمی) بترتیب ۳۰۶/۴۳، ۱۷۴/۱۴، ۱۱۳/۶۲، ۷۸/۲۱، ۶۱/۹۶ و در میگوی بالغ (۲±۲۰ گرمی) بترتیب ۲۴۳/۲۵، ۱۳۰/۵۵، ۷۵/۵۶، ۶۱/۱۸، ۵۱/۵۹ قسمت در میلیون (ppm) بود. همچنین میانه غلظت کشندگی در ۵۰ درصد پس‌نوزادهای ۱۵روزه طی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بترتیب ۲۳۹/۸۱، ۱۰۱، ۷۴/۲۸، ۶۵/۷۲، ۶۱/۴۵، در پس‌نوزادهای ۴۵ روزه بترتیب ۳۰۴/۵۶، ۱۶۰/۱۲، ۱۱۳/۱، ۹۳/۶۹، ۷۹/۳۸، در میگوی جوان بترتیب ۷۱۲/۱۳، ۵۱۸/۴۴، ۲۶۵/۲۹، ۱۴۵/۵۳، ۱۰۳/۷۶ و در میگوی بالغ بترتیب ۸۲۷/۷۵، ۵۰۸/۹۱، ۳۱۷/۳، ۱۳۹/۴۴، ۸۵/۸۸ قسمت در میلیون بود. بررسیهای آماری نشان داد، غلظتی از ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره که هیچ اثر قابل توجه معنی‌داری بر نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با نمونه‌های شاهد ندارد، ۲۰ppm و پایین‌ترین غلظتی که اثر قابل توجه دارد، ۴۰ppm می‌باشد. در نتیجه حداکثر غلظت مجاز آن ۲۸/۸ppm بدست آمد. دامنه غلظت بی‌خطر و موثر دارو کم بوده و از ترکیب مذکور برای ضدعفونی نمودن آب استخرها یا تانکهای حاوی میگوی سفید هندی بایستی با احتیاط کامل و با غلظت مجاز تعیین شده استفاده نمود.

لغات کلیدی: میکروب، ضدعفونی، ارزیابی زیستی، میگوی سفید هندی، *Fenneropenaeus indicus*

---

*نویسنده مسئول

مقدمه

پرورش میگو در آسیا، آمریکای لاتین و اخیراً در آفریقا به سرعت در حال گسترش است. در سال ۲۰۰۸ تولید جهانی آبزیان پرورشی ۵۱/۶ میلیون تن و میگوی پرورشی ۲/۸ میلیون تن بوده است. حفظ و توسعه پتانسیل تولید، مستلزم توجه بیش از پیش به مخاطراتی است که این صنعت را تهدید می‌نماید، بخصوص مخاطرات زیست محیطی و بیماریهای آبزیان (FAO, 2009).

میزان تولید میگوی کشور در سال ۱۳۸۸حدود ۵۲۰۰ تن بوده است. حداکثر میزان تولید میگوی پرورشی کشور در اوج فعالیت (سال ۱۳۸۳) به ۸۹۳۰ تن رسیده بود که استان بوشهر با ۵۶۰۰ تن (۶۳ درصد کل کشور) در این امر پیشرو بود (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۸). طی سالهای اخیر بروز بیماریهایی مانند سندرم لکه سفید در استانهای خوزستان، بوشهر، سیستان و بلوچستان تولید میگو را کاهش داده و باعث شد تا این صنعت با تنگناهای بسیاری روبرو شود (مهرابی و همکاران، ۱۳۸۸). یکی از مهمترین روشهای پیشگیری و کنترل بیماریهای آبزیان، ضدعفونی آب، آبزی و وسایل می‌باشد. طبق تائید سازمان بهداشت جهانی (WHO) و جامعه اقتصادی اروپا (EEC) و اداره دارو و غذای آمریکا (FDA) استفاده از ضدعفونی‌کننده‌های حاوی پراکسید هیدروژن در آبزی‌پروری مجاز است و مصرف آبزیانی که در معرض این ماده قرار گرفته‌اند برای سلامتی انسان بی‌خطر می‌باشند (FDA, 2007). برای ضدعفونی آب در سیستمهای پرورش آبزیان می‌توان از پراکسید هیدروژن جهت کنترل تلفات ناشی از ساپرولگنیازیس تخمهای تمام ماهیان آب شیرین، کنترل تلفات ناشی از بیماری B.G.D در سیستمهای پرورش آزاد ماهیان آب شیرین و کنترل تلفات ناشی از بیماری کولومناریس خارجی در تمام ماهیان سردآبی و گربه ماهی آبراهه Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) استفاده کرد (Schmidt *et al.*, 2006 ;Larry *et al.*, 2006). برخی محققین نیز اعتقاد دارند با وجودیکه پراکسید هیدروژن در غلظتهای غیرکشنده برای ماهی می‌تواند تاثیر ضدعفونی‌کنندگی مناسبی بر روی عوامل بیماریزا داشته باشد اما بدلیل ایجاد استرس بخصوص در ماهیان آب شور ممکن است سبب گسترش برخی عفونت‌ها شود (Avendano- Herrera *et al.*, 2006).

پراکسید هیدروژن، رادیکال هیدروکسیل آزاد می‌کند که مسئول اکسیدکنندگی آن است. علاوه بر این، در غلظتهای پایین، مولکول DNA را می‌شکنند. تصور بر این است که اثر آن بر روی باکتری‌ها به علت تبدیل آن به رادیکال‌های هیدروکسیل و بر روی تک‌یاخته‌ها و شاید ترماتودها به علت اکسیداسیون خارج سلولی است. پراکسید هیدروژن بصورت محلولهای آبی با غلظت ۳۵ یا ۵۰ درصد تولید می‌شود (وهاب‌زاده رودسری و همکاران، ۱۳۸۴). قدرت اثر دارو در اثر افزایش دما، فزونی می‌یابد، اما بروز سمیت در جانداران، حتی بیشتر از آن افزایش می‌یابد. دامنه غلظت بی‌خطر و موثر دارو کم است (فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۶).

مکانیسم تأثیر نقره بر باکتری‌ها شامل مداخله در جابجایی الکترونی درون باکتری، مداخله و تخریب DNA باکتری و فعل و انفعال با جداره یاخته بدون اینکه وارد سلول شود و تشکیل ترکیبات هیستیدیل و ممانعت از فرآیند تنفس می‌باشد. اثر ضد میکروبی نقره بواسطه ترکیب یونهای آن با پروتئین‌های میکروبی است. یون نقره از مجتمع پروتئین‌های مذکور نیز به آهستگی جدا می‌شود و این امر پایه دوام فعالیت باکتریواستاتیکی نقره و املاح آن می‌باشد. املاح نقره در زمرهٔ باکتریسیدهای قوی و مؤثر می‌باشند ولی بدلیل خاصیت سوزانندگی بافت‌ها، کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. در ضدعفونی نمودن آب آشامیدنی از غلظت‌های کم نقره استفاده می‌شود (کسری کرمانشاهی و حسین‌خانی، ۱۳۸۶). برخلاف آنتی بیوتیکها که پس از واکنش با سلول تغییر شکل یافته و بی‌اثر می‌شوند، ذرات نقره پس از اثر بر میکروبها آزاد شده و بر سایر میکروارگانیسم‌ها تاثیر می‌گذارند (Raffi *et al*, 2008 ;Brady *et al*, 2003).

مس، جیوه و نقره از فلزاتی هستند که دارای قدرت‌کشندگی زیاد در ماهیان می‌باشند. دلیل اهمیت آنها، حساسیت آبشش، کبد و ماهیچه‌های ماهیان به این فلزات و تجمع بخش اعظم آنها در این اندامهاست (جلالی جعفری و مهزاد، ۱۳۸۵). در صورت ترکیب نقره با پراکسید هیدروژن اثرات ضدعفونی‌کنندگی آنها افزایش خواهد یافت (Pedahzur *et al*, 1995 ;Pedahzur *et al*, 1997).

ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره، یک ضدعفونی‌کننده بسیار قوی و دارای طیف اثر وسیع بر عوامل بیماریزا نظیر ویروسها، باکتریها، قارچها، آمیبها و جلبکهاست، کاملاً تجزیه‌پذیر بوده و سازگار با محیط‌زیست است، دوام اثر طولانی دارد، بیوفیلمها را از بین می‌برد، برای مصرف انسانی از نظر بهداشتی بدون اشکال است (Armon *et al.*, 2000). جهت ضدعفونی آب آشامیدنی مناسب است و از آلودگی مجدد ویروسی و

باکتریایی آب جلوگیری می‌نماید، تاثیر آن بلافاصله پس از مصرف شروع می‌شود، سرطان‌زا و موتاژن نمی‌باشد، مقاومت باکتریایی ایجاد نمی‌کند، به آبکشی و شستشوی وسایل پس از استفاده نیازی نیست. (نبی‌زاده و همکاران، ۱۳۸۴).

با توجه به اینکه گزارشی از بررسی تاثیر ترکیب حاوی۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره، بر میگو در داخل و خارج کشور وجود نداشت، لذا در این تحقیق به منظور تعیین امکان استفاده از آن بعنوان ضدعفونی‌کننده در مراکز تکثیر و مزارع پرورش میگوی کشور نسبت به آزمایش تعیین سمیت حاد و ارزیابی زیستی آن در میگوی سفید هندی که گونه بومی و پرورشی کشور می‌باشد، اقدام شد.

مواد و روش کار

در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۴ طی چند مرحله، حدود ۱۵۰۰ عدد میگوی سفید هندی جوان ۱۲±۱ گرمی و۱۵۰۰ عدد میگوی بالغ ۲۰±۲ گرمی از میگوهای پرورش یافته در مزرعه گروه مبارک در منطقه رود شور استان بوشهر از استخرها صید شد و به درون تانکهای مدور فایبرگلاس ۴ تنی مخصوص نگهداری میگو مجهز به سیستمهای هوادهی و سیفون مرکزی پژوهشکده میگوی کشور منتقل شدند. به منظور رفع استرس ناشی از حمل و نقل و دستکاری، قبل از هر آزمایش، میگوها از تانکهای نگهداری به تانکهای درون سالن آزمایش منتقل و به مدت یک هفته درون سالن آزمایش غذادهی شده و پس از سازگاری با محیط، آزمایش بقای آنها انجام شد. در صورت عدم بروز تلفات بیش از ۵ درصد طی ۸ روز، طبق دستورالعملهای استاندارد سازمان توسعه و همکاری اقتصادی اروپا (OECD) برای آزمایش تعیین سمیت حاد مواد شیمیایی در آبزیان، اقدامات بعدی صورت گرفت (TRC, 1992a). در بهار سال ۱۳۸۵ نیز حدود ۳۰۰۰ عدد پس نوزاد ۸ روزه، از کارگاه تکثیر میگوی رنگین کمان استان بوشهر تامین و طبق روشهای رایج در داخل کیسه‌های پلاستیکی بسته‌بندی و به تانکهای مدور۳۰۰ لیتری مخصوص نگهداری در سالن آزمایش منتقل شدند و پس از یک هفته نگهداری برای آزمایش بقاء، به سن ۱۵ روزه رسیدند و آزمایشهای تعیین سمیت حاد بر روی تعدادی از آنها در این سن انجام شد و بقیه نیز یک ماه دیگر نگهداری شدند و در سن ۴۵ روزگی برای آزمایشهای تعیین سمیت حاد مورد استفاده قرار گرفتند (TRC, 1992b).

در طول دوره نگهداری، غذادهی میگوهای جوان و بالغ در ساعات ۹ صبح و ۵ بعدازظهر توسط غذای فرموله شده میگو (شماره ۴۰۰۵ هووراش) معادل ۶ درصد وزن بدن در روز و غذادهی به پس‌نوزادها روزی ۴ وعده (هر ۶ ساعت یکبار با پلیت‌های غذایی مخصوص پس نوزاد، (ساخت کارخانه هووراش) معادل ۵ درصد وزن بدن در روز انجام شد. سیفون کردن و تعویض۲۰ درصد آب تانکهای نگهداری هر دو روز یکبار صورت پذیرفت. میزان مورد نیاز اکسیژن آب در تانکهای نگهداری و هر یک از تیمارها و تکرارها با هوادهی مداوم تامین گردید. دوره نوری بنحوی تنظیم شد که ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی وجود داشته باشد (شکوری، ۱۳۷۶). برای کلیه آزمایشها از میگوهای به ظاهر سالمی که در مرحله بین دو پوست‌اندازی و دارای پوسته سفت بودند، استفاده شد ولی توزیع آنها در هر یک از تیمارها و تکرارها کاملاً تصادفی بود. تیمار شاهد و تیمار آزمایش میگوهای جوان و بالغ در تمامی بررسیها درون تانکهای مدور پلاستیکی ۳۰۰ لیتری حاوی ۲۰۰ لیتر آب، هرکدام با سه تکرار و ۲۰ عدد میگو در هر تانک انجام گرفت ولی در مورد پس‌نوزادها درون تشتهای مدور پلاستیکی ۵۰ لیتری حاوی۲۰ لیترآب انجام شد. در مقاطع زمانی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت میگوهای تلف شده در آزمایشات بقاء، محدوده‌کشندگی و تعیین میانه غلظت کشندگی ۵۰ درصد جمعیت (یا میگوهای بیحال در آزمایش تاثیرگذاری بر۵۰ درصد جمعیت)، پس از ثبت تعداد، از مخازن خارج گردیدند.

در این بررسی از ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره با نام تجاری SANOSIL SUPER 25® محصول شرکت داروسازی کیمیا فام (تحت لیسانس سانوسیل سوئیس) مورد تائید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی (مجوز شماره ۵۱۷۶/۲/۱/د) استفاده شد. براساس برچسب شرکت سازنده، این ماده حاوی ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) (H_2O_2) و ۰/۰۵ درصد یون نقره (Ag^+) است. غلظتهای تهیه شده و مورد استفاده در این تحقیق بر مبنای رقیق‌سازی ترکیب خالص تجاری مذکور بود.

آب با پمپ از دریا به ایستگاه تحقیقاتی تکثیر و پرورش میگوی بندرگاه استان بوشهر منتقل و آماده‌سازی شد. نحوهٔ آماده‌سازی بدین ترتیب بود که ابتدا آب دریا به حوضچه ذخیره و پس از گذشت ۲۴ ساعت به حوضچه فیلتراسیون و سپس به استخر کلرزنی منتقل گردید. کلرزنی به میزان ۲۵ppm و خنثی کردن آن با استفاده از ۱۰ppm تیوسولفات و برای رسوب

دادن فلزات سنگین موجود در آب EDTA ۲-۳ppm استفاده گردید. پس از طی شدن مراحل ذکر شده، آب به مخازن چهار مترمکعبی منتقل و شوری آن حدود ۴۰ppt تنظیم و سپس به محل آزمایش حمل شد. سختی آب ۱/۰۳۰ بود. دمای سالن حدود ۲۵ درجه سانتیگراد تثبیت گردید و با استفاده از هواده‌های ایربلوئر، اکسیژن آب بیش از ۶ میلیگرم در لیتر حفظ شد. دما ، شوری، اکسیژن و pH آب در طول دوره بررسی در سالن آزمایش روزی یکبار اندازه‌گیری و ثبت شد.

پس از سازگاری میگوها با شرایط محیطی سالن، آزمایشهای بقاء بر روی ۶۰ عدد از میگوهای جوان، بالغ، پس‌نوزادهای ۱۵ و ۴۵ روزه انجام شد. تعداد تلفات میگوها (فاقد هرگونه حرکت یا واکنشی نسبت به محرکها) بعنوان شاخص برای آزمایش بقاء طی هشت روز ثبت شد.

برای تعیین محدوده کشندگی (Limit Test)، براساس دستورالعمل سازمان OECD، در تیمار آزمایش میگوهای جوان و بالغ تاثیر غلظت ۱۰۰ppm ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره مورد بررسی قرار گرفت و در تیمار شاهد، ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره به آب اضافه نگردید. همین عملیات برای پس‌نوزادها نیز به مورد اجرا گذاشته شد (TRC, 1992a,b).

پس از اتمام آزمایشهای بقاء و تعیین محدودهٔ کشندگی، برای هر دو آزمایش تعیین میانه غلظت تاثیرگذاری بر ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت و تعیین میانه غلظت‌کشندگی در ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت (LC_{50}/96h & EC_{50}/96h) به روش ساکن (بدون تعویض آب) از غلظتهای صفر، بعنوان تیمار شاهد و ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ قسمت در میلیون ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره بعنوان تیمارهای آزمایش میگوهای جوان و بالغ استفاده شد. در مورد پس‌نوزادها، به همین منوال عمل شد ولی اثر غلظت ۱۰۰۰ppm بررسی نشد.

استقرار بی‌حال میگوها به پهلو در بستر مخازن و تحرک خفیف در صورت تحریک (وارد نمودن ضربه به جداره مخازن)، بعنوان شاخص تاثیرگذاری در نظر گرفته و تعداد آنها بصورت تجمعی ثبت گردید. هم چنین استقرار بی‌حرکت میگوها به پهلو در بستر مخازن و عدم هرگونه فعالیت و واکنش به تحریکات خارجی بعنوان شاخص تلفات، برای آزمایش تعیین میانه غلظت کشندگی در نظر گرفته و تعداد آنها بصورت تجمعی ثبت شد، سپس کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Trimmed Spearman-karber Method (Hamilton *et al.*, 1977) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و با ۹۵ درصد حد اطمینان، میانه غلظت تاثیرگذاری و میانه غلظت کشندگی در ۵۰ درصد جمعیت طی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت تعیین گردید. جهت چیدمان تیمارها از روش بلوکهای تصادفی استفاده شد. کلیه داده‌ها در برنامه Excel ثبت و به روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) با نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۳ بررسی شدند. آنالیز توزیع نرمال بودن داده‌ها به روش کولموگراف- اسمیرنف انجام شد و اختلاف آماری نتایج بصورت جداگانه با استفاده از آزمون توکی (Tukey HSD Test) مورد ارزیابی قرار گرفت. اختلاف تیمارها زمانی معنی‌دار در نظر گرفته شد که $P<0.05$ بود.

نتایج

نتایج اندازه‌گیری و ثبت مشخصات آب مورد استفاده در طول دوره نگهداری میگوها و انجام آزمایشهای مختلف، در جدول ۱ آمده است.

نرخ تلفات میگوهای جوان در آزمایش بقاء طی مدت ۸ روز، ۳/۳۳ درصد تعیین گردید (۲ عدد از ۶۰ عدد میگوی تحت آزمایش تلف شدند) و در سایر گروهها تلفاتی مشاهده نگردید. طبق دستورالعملهای OECD سایر مراحل آزمایشات قابل انجام بود، زیرا عدم بروز تلفات بیش از ۵ درصد طی ۸ روز ملاک ادامه سایر مراحل است (TRC, 1992a).

جدول ۱: مقادیر اندازه‌گیری شده شاخصهای کیفی آب مورد استفاده در مراحل مختلف آزمایشها

فاکتور	مقدار
شوری	۴۱±۱ قسمت در هزار
سختی کل	۱/۰۳۰ گرم در لیتر
اکسیژن محلول	۷±۱ میلیگرم در لیتر
دمای آب	۲۵±۱ درجه سانتیگراد
pH	۸±۰/۵

نتایج آزمایش تعیین محدوده کشندگی بیانگر آن بود که در گروه شاهد هیچگونه تلفاتی اتفاق نیافتاده است در حالیکه تعداد کل تلفات در گروه آزمایش که میگوهای جوان در غلظت ۱۰۰ppm از ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره بمدت ۹۶ ساعت نگهداری شده بودند، ۲۸ عدد (۴۶/۶ درصد) بود. بنابراین پیش‌بینی گردید غلظت کشندگی ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت حدود ۱۰۰ppm است. بر این اساس ۴ غلظت بالاتر و ۴ غلظت پایین‌تر از آن بعنوان تیمارهای آزمایش تعیین سمیت حاد انتخاب شدند. در مورد پس نوزادهای ۱۵ در گروه شاهد هیچگونه تلفاتی مشاهده نشد ولی تعداد کل تلفات در گروه آزمایش ۴۸ عدد (۸۰ درصد) بود، بنابراین پیش‌بینی گردید غلظت کشندگی ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت کمتر از ۱۰۰ppm است. بر این اساس ۴ غلظت پایین‌تر و ۳ غلظت بالاتر از آن بعنوان تیمارهای آزمایش تعیین سمیت حاد انتخاب شدند.

علائم رفتاری و بالینی مشاهده شده در میگوهایی که تحت تاثیر غلظتهای مختلف ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره قرار گرفته بودند شامل کاهش تحرک، شنای نامتعادل و گاهی روی یک پهلو در سطح آب، بی‌حالی و استقرار در ته مخزن بصورت متعادل ولی حساس به تحریکات خارجی، حرکت جهشی در صورت وارد شدن ضربه به جدار مخزن و در مرحله بعدی بی‌حالی و استقرار در ته مخزن بصورت نامتعادل و روی یک پهلو با واکنشهای آرام و تاخیری به تحریکات خارجی بود، که این حالت، بعنوان شاخص برای تعیین میانه غلظت تاثیرگذاری در نظر گرفته شده بود. نتایج حاصل از آزمایش تعیین میانه غلظت تاثیرگذاری بر ۵۰ درصد جمعیت (EC50) طی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت توسط نرم‌افزار رایانه‌ای محاسبه گردید که جمع‌بندی کلی آن در جدول ۲ آمده است. لازم به ذکر است میگوهایی که در معرض غلظتهای ۳۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ قسمت در میلیون ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره قرار گرفتند، در برخی مراحل اولیه مواجهه از خود واکنشهای تهیجی و سریع نیز بروز دادند. نتایج حاصل از محاسبه مقادیر میانه غلظت کشندگی در ۵۰ درصد میگوهای سفید هندی طی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت (LC50) نیز در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۲: مقادیر میانه غلظت تاثیرگذاری ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره بر ۵۰ درصد جمعیت میگوی سفید هندی برحسب (ppm) در زمانهای مختلف

گروههای آزمایشی	١٢ ساعت	٢٤ ساعت	٤٨ ساعت	٧٢ ساعت	٩٦ ساعت
پس‌نوزاد ١٥	١٣٢/٥٠	٦٧/٨٩	٥٥/٥٦	٥١/٩٥	٤٨/٦٠
پس‌نوزاد ٤٥	١٤٧/٥٧	٧٠/٨٣	٦٠/٠١	٥٤/٨٩	٤١/١٩
میگوی جوان	٣٠٦/٤٣	١٧٤/١٤	١١٣/٦٢	٧٨/٢١	٦١/٩٦
میگوی بالغ	٢٤٣/٢٥	١٣٠/٥٥	٧٥/٥٦	٦١/١٨	٥١/٥٩

جدول ۳: مقادیر میانه غلظت کشندگی ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره، برحسب (ppm) در ۵۰ درصد جمعیت میگوی سفید هندی طی زمانهای مختلف

گروههای آزمایشی	١٢ ساعت	٢٤ ساعت	٤٨ ساعت	٧٢ ساعت	٩٦ ساعت
پس نوزاد ١٥	٢٣٩/٨١	١٠١	٧٤/٢٨	٦٥/٧٢	٦١/٤٥
پس‌نوزاد ٤٥	٣٠٤/٥٦	١٦٠/١٢	١١٣/١٠	٩٣/٦٩	٧٩/٣٨
میگوی جوان	٧١٢/١٣	٥١٨/٤٤	٢٦٥/٢٩	١٤٥/٥٣	١٠٣/٧٦
میگوی بالغ	٨٢٧/٧٥	٥٠٨/٩١	٣١٧/٣٠	١٣٩/٤٤	٨٥/٨٨

میانگین تعداد میگوهای بی‌حال در تیمارهای مختلف پس از ۹۶ ساعت به روش آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) بررسی شدند و اختلاف آنها با استفاده از تست توکی (Tukey HSD Test) مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به اینکه $P<0.05$ بعنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد، لذا برحسب مرحله رشد میگوها، چند گروه مجزا تشکیل گردید که نشان داد تیمارهای درون گروهها با یکدیگر فاقد اختلاف معنی‌دار هستند ولی تیمارهای هر گروه با دیگر گروهها دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (جدول ۴).

به همین طریق میانگین تعداد میگوهای تلف شده در تیمارهای مختلف پس از ۹۶ ساعت نیز مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت که نتایج آن در جدول ۵ مشخص شده است.

بحث

تاکنون گزارشی از بررسی تاثیر ضدعفونی کننده‌های حاوی پراکسید هیدروژن و یون نقره بر میگوها در منابع علمی منتشر نشده و این تحقیق اولین مورد آن محسوب می‌گردد. در مورد ارزیابی اثر پراکسید هیدروژن بر ماهیان مختلف تحقیقات زیادی انجام شده و اثر مثبت آن در کنترل برخی عوامل بیماریزا و درمان تعدادی از بیماریهای عفونی باکتریایی و انگلی ثابت شده است، حتی روش کاربرد آن نیز توصیه گردیده است (وهاب‌زاده رودسری و همکاران، ۱۳۸۴؛ Schmidt ; Larry *et al.*, 2006 *et al.*, 2006) ولی در مورد تاثیر این ماده ضدعفونی کننده بر مراحل مختلف زندگی میگو یا درمان بیماریهای آن گزارش‌های بسیار کمی در دسترس است که امکان مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با سایر محققان را فراهم نمی‌آورد.

جدول ٤: گروه‌بندی تیمارهای دارای اختلاف معنی‌دار براساس میانگین تعداد میگوهای بی‌حال در هر تیمار پس از ۹۶ ساعت (غلظت‌ها برحسب ppm و $P<0.05$ می‌باشد).

تیمار ← مرحله رشد میگو ↓	گروه اول	گروه دوم	گروه سوم	گروه چهارم
پس‌نوزاد ۱۵	۰، ۱۰، ۲۰	٤۰	۸۰،۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰	-
پس‌نوزاد ٤۵	۰، ۱۰، ۲۰	٤۰	۸۰	۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰
میگوی جوان	۰، ۱۰، ۲۰	٤۰	۸۰	۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰
میگوی بالغ	۰، ۱۰، ۲۰	٤۰	۸۰	۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰

جدول ۵: گروه‌بندی تیمارهای دارای اختلاف معنی‌دار براساس میانگین تعداد میگوهای تلف شده در هر تیمار پس از ۹۶ ساعت (غلظت‌ها برحسب ppm و $P<0.05$ می‌باشد).

تیمار ← مرحله رشد میگو ↓	گروه اول	گروه دوم	گروه سوم	گروه چهارم
پس‌نوزاد ۱۵	۰، ۱۰، ۲۰	٤۰	۸۰	۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰
پس‌نوزاد ٤۵	۰، ۱۰، ۲۰، ٤۰	۸۰	۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰	-
میگوی جوان	۰،۱۰،۲۰، ٤۰*	٤۰*، ۸۰	۱۵۰،۳۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰	-
میگوی بالغ	۰، ۱۰، ۲۰	٤۰، ۸۰	۱۵۰	۳۰۰،۵۰۰،۱۰۰۰

*: همپوشانی (Overlap) دارند.

Larry و همکاران (۲۰۰۶) بدون ذکر درصد خلوص پراکسید هیدروژن مورد استفاده، مقدار میانه غلظت‌کشندگی پراکسید هیدروژن در ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت ($LC_{50}/96h$) را در گربه ماهی آبراهه، ماهی قنات سرچرب Fathead minnow (*Pimephales promelas*) و ماهی آزاد چینوک Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) بترتیب ۷۴/۸، ۳۲/۸ و ۱۰۵ قسمت در میلیون و $LC_{50}/24h$ در ماهی گیش ژاپنی پرورشی Jack mackerel (*Trachurus japonicus*) و پس‌نوزاد میگوی ببری سیاه Giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) بترتیب ۸۹ و ۳۰/۶ قسمت در میلیون گزارش نمودند. در مطالعه حاضر، مقدار $LC_{50}/24h$ در پس‌نوزادهای میگوی سفید هندی ۱۵ روزه و ۴۵ روزه بترتیب ۶۷/۸۹ و ۷۰/۸۳ بدست آمده که بیش از دو برابر گزارش مذکور می‌باشد، لذا به احتمال زیاد، میگوی ببری سبز در مقایسه با میگوی سفید هندی نسبت به پراکسید هیدروژن حساس‌تر است.

نتایج تعیین مقادیر میانه غلظت تاثیرگذاری و میانه غلظت کشندگی در ۵۰ درصد جمعیت طی ۹۶ ساعت در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که مطابق روند منطقی، هر چقدر مدت تماس میگوها با ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره بیشتر و طولانی‌تر باشد، غلظت کمتری از این ماده لازم است تا ۵۰ درصد از جمیعت میگوها را بترتیب بی‌حال و سپس تلف نماید.

همانگونه که در جداول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود، می‌توان بیان نمود که میگوی جوان از نظر تاثیرپذیری و مرگ و میر ناشی از مجاورت با ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره، از سایر مراحل رشد در میگوی سفید هندی مقاوم‌تر است، بغیر از دو مورد که غلظت کشنده در ۱۲ و ۴۸ ساعت می‌باشد، در این حالت میگوی بالغ از سایر مراحل مقاوم‌تر است. بطور کلی بیشترین تا کمترین میزان حساسیت میگوهای مورد آزمایش به ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره بترتیب در پس‌نوزاد ۱۵ روزه ، پس‌نوزاد ۴۵ روزه، میگوی بالغ و میگوی جوان مشاهده گردید.

Sprague در سال ۱۹۷۱، ابراز داشته حداکثر غلظت مجاز Highest Observed no Effect Concentration (HOEC) یا Maximum Allowable Toxicant Concentration (MATC) بطور متوسط ۰/۱ مقدار LC50 در ساعات مختلف می‌باشد، حداکثر غلظت مجاز در واقع غلظتی از ماده است که هیچ اثر سویی بر میگوها نداشته باشد و سلامتی آنها را به خطر نیاندازد. براین اساس پیش‌بینی می‌شود حداکثر غلظت مجاز ترکیب مذکور در میگوی سفید هندی در دمای ۲۵±۱ درجه سانتیگراد طی ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ ساعت در مرحله پس‌نوزاد ۱۵ روزه، بترتیب ۲۳/۹، ۱۰/۱، ۷/۴، ۶/۵ و ۶/۱ در پس‌نوزاد ۴۵ روزه، بترتیب ۳۰/۴، ۱۶، ۱۱/۳، ۹/۳ و ۷/۹، در میگوی جوان ۷۱/۲، ۵۱/۸، ۲۶/۵، ۱۴/۵ و ۱۰/۳و در میگوی بالغ ۸۲/۷، ۵۰/۸، ۳۱/۷، ۱۳/۹و ۸/۵ قسمت در میلیون باشد.

این در حالی است که Rand (۱۹۹۵) بیان نموده حداکثر غلظت قابل قبول را می‌توان از معدل هندسی غلظت با کمترین تاثیر و غلظت بدون تاثیر آن محاسبه نمود (ریشه دوم حاصل ضرب آنها). No Observed Effect Concentration (NOEC) بالاترین غلظتی از یک ماده است که در آزمایش تعیین سمیت استفاده شده و از نظر آماری هیچ اثر قابل توجه معنی‌داری بر نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با نمونه‌های شاهد نداشته است. Lowest Observed Effect Concentration (LOEC) نیز کمترین غلظتی از یک ماده است که در آزمایش تعیین سمیت استفاده شده و از نظر آماری اثر قابل توجه معنی‌داری روی نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با نمونه‌های شاهد داشته است. حداکثر غلظت مجاز، بیشتر از غلظتی است که هیچ اثری ندارد و کمتر از غلظتی است که حداقل اثر را دارد، بعبارت دیگر NOEC<MATC<LOEC می‌باشد. بنابراین طبق تجزیه و تحلیل‌های آماری مندرج در جداول ۴ و ۵، مقادیر EC50 و LC50 با ۹۵ درصد اطمینان، می‌توان بیان داشت تیمار با غلظت ۲۰ppm از ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره هیچ اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد در تمامی چهار مرحله از زندگی میگوی سفید هندی مورد آزمایش نداشته و لذا NOEC ترکیب مذکور برابر با ۲۰ppm می‌باشد. از طرفی ۴۰ppm نیز کمترین غلظتی است که از نظر آماری اثر قابل توجه معنی‌داری روی نمونه‌های مورد آزمایش در مقایسه با نمونه‌های شاهد داشته است، بنابراین می‌توان پیش‌بینی نمود حداکثر غلظت مجاز ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره در تمامی چهار مرحله از زندگی میگوی سفید هندی مورد آزمایش ۲۸/۸ppm باشد.

در سال ۲۰۰۰، در کشور تایلند، ۱۳ نوع ماده شیمیایی و بیولوژیک مختلف در ۷۶ مزرعه پرورش میگو مورد مصرف قرار گرفت که ضدعفونی‌کننده‌ها در ۷۳ مزرعه و از جمله پراکسید هیدروژن در ۲۳ مزرعه استفاده شد (Graslund *et al.*, 2003). یکی از دلایل عدم رواج استفاده از پراکسید هیدروژن و محدودیت مصرف آن می‌تواند به این دلیل باشد که دامنه غلظت بی‌خطر و موثر دارو کم است (فاطمی و میرزرگر، ۱۳۸۶). بعبارت دیگر احتمال دارد غلظت‌هایی از پراکسید هیدروژن که توانایی نابودی عوامل بیماری‌زا را دارند، بر روی میگو نیز تاثیر منفی

ایجاد کنند و در نتیجه محدودیت مصرف پدید آید. بطور مثال در بررسی اثر غلظتهای مختلف پراکسید هیدروژن بر باکتری‌های مهم مشخص شده، ویبریو هاروی که یکی از عوامل مهم ایجاد کننده بیماری ویبریوزیس در میگوها هستند از حساس‌ترین باکتریها و اشریشیاکلی از مقاوم‌ترین باکتری‌ها در مقابل پراکسید هیدروژن می باشند و حداقل غلظت ممانعت‌کننده از رشد Minimum Inhibitory Concentration (MIC) آنها توسط پراکسید هیدروژن بترتیب ۹/۵۷ppm و ۲۵۰ppm می‌باشد (Srisapoom *et al.*, 1999). در نتیجه می‌توان انتظار داشت باکتری ویبریو هاروی با استفاده از غلظت‌های حتی کمتر از حداکثر غلظت مجاز ترکیب ۵۰ درصد پراکسید هیدروژن و ۰/۰۵ درصد یون نقره (کمتر از ۲۸/۸ppm) قابل نابودسازی باشد. ولی برخی از باکتری‌ها بخصوص آنهایی که فعالیت کاتالازی زیادی دارند، می‌توانند براحتی پس از ۴۸ ساعت مجاورت با غلظتهای ترکیب ۳۰ppm پراکسید هیدروژن و ۳۰ppb یون نقره زنده بمانند (Armon *et al.*, 2000).

بدیهی است مطالعات آتی درخصوص تعیین اثر غلظت‌های موثر ترکیب پراکسید هیدروژن و یون نقره بر ویروسها، باکتریها، قارچها و انگلهای بیماریزای میگو می‌تواند تکمیل کننده مطالعه حاضر بوده و دامنه کاربرد این ضدعفونی کننده در صنعت تکثیر و پرورش میگو را مشخص‌تر سازد. با توجه به بررسی‌های انجام شده و نتایج حاصل از این مطالعه که نشان از فاصله کم دامنه غلظت بی‌خطر و موثر آن دارد، بایستی اظهار داشت از ترکیب مذکور برای ضدعفونی نمودن آب استخرها یا تانکهای حاوی میگوی سفید هندی می‌توان با احتیاط کامل و با رعایت حداکثر غلظت مجاز پیش‌بینی شده استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با تامین اعتبارات مورد نیاز توسط شرکت داروسازی کیمیا فام و موسسه تحقیقات شیلات ایران اجرا شده است، بدینوسیله از مسئولین محترم آنها کمال تشکر را دارد. همچنین از کلّیه کارکنان محترم پژوهشکده میگوی کشور (بوشهر)، بویژه سرکار خانم دکتر میربخش و آقایان مهندس گنجور، مهندس یگانه و مهندس کشتکار، بخاطر همکاریهای بیدریغ، قدردانی می‌گردد. بخش اولیه عملیات اجرایی پروژه با همکاری محقق فقید مرحوم مهندس مختار حق نجات انجام شد، روحش قرین رحمت الهی و یادش گرامی باد.

منابع

جلالی جعفری، ب. و آقازاده، م.، ۱۳۸۵. مسمومیت ماهیان در اثر فلزات سنگین و اهمیت آن در بهداشت عمومی. انتشارات مان کتاب، تهران. ۱۳۸ صفحه.

سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۸۸. سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه‌ریزی و توسعه مدیریت، دفتر برنامه و بودجه. تهران (در دست چاپ).

شکوری، م.، ۱۳۷۶. فناوری تکثیر و پرورش متراکم میگو. معاونت تکثیر و پرورش آبزیان (ترجمه). تالیف: جیمز ویبان. اداره کل آموزش و ترویج، شرکت سهامی شیلات ایران، تهران. ۱۸۶ صفحه.

فاطمی، ا. و میرزرگر، س.س.، ۱۳۸۶. فارماکولوژی کاربردی ماهیان (ترجمه) /تالیف: تروس براون، موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران، شماره ۲۸۱۹، ۶۲۴ صفحه.

کسری کرمانشاهی، ر. و حسین‌خانی، ب.، ۱۳۸۶. نانو بیوتکنولوژی (از دیدگاه میکروبیولوژی). انتشارات دانشگاه اصفهان، چاپ اول. ۱۵۰ صفحه.

مهرابی، م.ر. ؛ یگانه، و. ؛ کوثری‌نژاد، ع. ؛ افشارنسب، م. ؛ دشتیان‌نسب، ع.؛ کشتکار، ع.؛ قائدنیا، ب.؛ محمدنژاد، ج.؛ قاجاری، ا.؛ شریفی، ع.؛ بحرانی، م.؛ صیدی، آ.؛ براتی نبی، ع. و مقاتلی، م.، ۱۳۸۸. بررسی آلودگی منابع وحشی (خرچنگها و میگوها) به ویروس لکه سفید در محدوده آبهای استان بوشهر. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی به شماره ثبت ۸۸/۱۲۵۱. موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران. ۵۴ صفحه.

نبی‌زاده، ر.؛ علیمحمدی، م.؛ نظم آرا، ش.؛ قصری، آ.؛ خیری، ا.؛ امین‌زاده، س.؛ حسین‌پور، ش. و موسوی، س.ن.، ۱۳۸۴. جوانب کاربری سانوسیل (سوپر ۲۵ و HWP) در فرآیند گندزدایی آب آشامیدنی. فصلنامه کیمیافام، شماره ۳، زمستان ۸۴، صفحات ۱۷ تا ۱۹.

وهاب‌زاده رودسری، ح.؛ احمدی، م.ر.؛ کیوان، ا. و معصومیان، م.، ۱۳۸۴. ارزیابی کارآیی پراکسید هیدروژن در مقابله با آلودگی قارچی تخمهای تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*). مجله علمی شیلات ایران، سال چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۴، صفحات ۱۶۱ تا ۱۷۶.

Armon R., Laot N., Lev O., Shuval H. and Fattal B., 2000. Controlling biofilm formation by hydrogen peroxide and silver combined disinfectant. Water Science Technology, 42:187–192.

Avendano-Herrera R., Magarinos B., Irgang R. and Toranzo A.E., 2006. Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and it's effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture, 257:104-110.

Brady M.J., Lisay C.M., Yurkovetskiy A.V. and Sawan S.P., 2003. Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. American Journal of Infection Control, 31(4):208-214.

FAO, 2009. FAO Aquaculture Statistics. www.aquacopia.com/2009/05/25.

FDA, 2007. Enforcement priorities for drug use in aquaculture. Part A: Enforcement priorities for drug use in non-food fish. FDA center for veterinary medicine program policy and procedures manual. No. 1240.4200, 16P.

Gaikowski M.P., Rach J.J. and Ramsay R.T., 1999. Acute toxicity of hydrogen peroxide treatments to selected life stages of cold, cool and warm water fish. Aquaculture, 178:191-207.

Graslund S., Holmstrom K. and Wahlstrom A., 2003. A field survey of chemicals and biological products used in shrimp farming. Marine Pollution Bulletin. 46(1):81–90.

Larry J.S., Gaikowski M.P. and Gingerich W.H., 2006. Environmental assessment for the use of hydrogen peroxide in aquaculture for treating external fungal and bacterial diseases of cultured fish and fish eggs. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Upper Midwest Environmental Sciences Center. La Crosse, Wisconsin, USA. 180P.

Pedahzur R., Ovadial L., Fattal B. and Shuval H., 1995. The interaction of silver ions and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli*. Water Science and Technology, 31(5-6):123-129.

Pedahzur R., Shuval H.I. and Ulitzur S., 1997. Silver and hydrogen peroxide as potential drinking water disinfectants: Their bactericidal effects and possible modes of action. Water Science and Technology, 35(11-12):87-93.

Pedahzur R., 2002. The efficacy of long lasting residual drinking water disinfectants based on hydrogen peroxide and silver. Water Science & Technology, 42(1-2):293-298.

Raffi M., Hussain F., Bhatti T.M., Akhter J.I., Hameed A. and Hasan M.M., 2008. Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC15224. Journal of Mater Science Technology, 24(2):192P.

Rand G.M., 1995. Fundamental of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment. Second Edition. Tylor & Francis, Washington D.C., USA. 1125P.

Schmidt L.J., Gaikowski M.P. and Gingerich W.H., 2006. Environmental assessment for the use of hydrogen peroxide in aquaculture for treating external fungal and bacterial diseases of cultured fish and fish eggs. U.S Geological Survey, Biological Resources Division upper Midwest Environmental Science Center. 180P.

Sprague J.B., 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish: III. Sublethal effects and "safe" concentrations. Water Research, 5:245-266.

Srisapoorn P., Areecho N. and Tookwinas S., 1999. Acute toxicity of hydrogen peroxide in *Penaeus monodon* larvae and efficacy on controlling *Vibrio spp.* and *Osacillatoria sp.* Proceedings of the 37th Kasetsart University Annual Conference. pp.107-117.

T.R.C., 1992a. OECD guidelines for testing of chemicals. Fish Acute Toxicity Test. OECD, Paris. No. 203, 9P.

T.R.C., 1992b. OECD guidelines for testing of chemicals. Fish Early-life Stage Toxicity Test. OECD, Paris. No. 210, 18P.

Iranian Scientific Fisheries Journal **Vol. 19, No. 1, Spring 2010**

Bioassay of combined hydrogen peroxide and silver ion at four life stages of Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*)

Mehrabi M.R.$^{(1)}$; Soltani M.$^{(2)*}$; Ebrahimzadeh Mosavi H.A.$^{(3)}$;
Mirzargar S.S.$^{(4)}$; Sharifpour I.$^{(5)}$; Ghasemi S.$^{(6)}$; Dashtian Nasab A.$^{(7)}$
and Ghaednia B.$^{(8)}$
msoltani@ut.ac.ir
1,5, 6 - Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116 Tehran, Iran
2, 3, 4 -Fish Health Dep., Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University,
P.O.Box: 14155-6453 Tehran, Iran
7 & 8 – Iran Shrimp Research Center, P.O.Box: 1374 Bushehr, Iran

Received: September 2009 Accepted: March 2010

Keywords: Microbe, Disinfect, Bioassay, Indian white shrimp, *Fenneropenaeus indicus*

Abstract

Silver ion and hydrogen peroxide act synergistically as a strong disinfectant. The purpose of this study was to assess the effect of combined hydrogen peroxide 50% and silver ion 0.05% at four life stages of Indian white shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) and to evaluate the feasibility of using this substance in shrimp culture. The Trimmed Spearman-karber software was applied for determining EC_{50}/96h and LC_{50}/96h with 95% confidence limit on the 6000 shrimp based on OECD static method. The experiments were conducted in Iran Shrimp Research Center, Bushehr, during 2005 -2006. The EC_{50} values of 132.5, 67.89, 55.56, 51.95 and 48.6ppm were obtained in PL_{15} stage after 12, 24, 48, 72 and 96 hours, respectively. Also these were 147.57, 70.83, 60.01, 54.89, 41.19 for PL_{45} stage, and 306.43, 174.14, 113.62, 78.21, 61.96 for sub adult stage (12±1 grams), respectively. In addition, the EC_{50} values of 243.25, 130.55, 75.56, 61.18 and 51.59ppm were obtained at adult stage (20±2 grams), respectively. The LC_{50} values of 239.81, 101, 74.28, 65.72 and 61.45ppm were obtained in PL_{15} stage after 12, 24, 48, 72 and 96 hours, respectively. Also these were 304.56, 160.12, 113.1, 93.69, 79.38 for PL_{45} stage, and 712.13, 518.44, 265.29, 145.53, 103.76 for sub adult stage, respectively. In addition, the LC_{50} values of 827.75, 508.91, 317.3, 139.44 and 85.88ppm were obtained at adult stage, respectively. The statistical results showed that the "no observed effect concentration" (NOEC) of this substance was 20ppm, and the "lowest observed effect concentration" (LOEC) was 40ppm, thus "maximum allowable concentration" (MAC) value was determined 28.8ppm on the Indian white shrimp. Therefore this combined chemical should be used under determined MAC value with a complete precautionary as a disinfectant for Indian white shrimp.

---

[*] Corresponding author