

تعیین غلظت نیمه کشندگی ۹۶ ساعته داروی ویرکن-اس بر میگوی پا سفید (*Litopenaeus vannamei*)

محمد سعید کنجور

msg_isrc@yahoo.com

پژوهشکده میگوی کشور، بوشهر صندوق پستی: ۱۳۷۴

کلمات کلیدی: میگوی وانامی، *Litopenaeus vannamei*، LC50 96h، ضدعفونی کننده، ایران

بررسی یک تحقیق نشان می‌دهد که میزان غلظت ۵۰ درصد کشندگی داروی ویرکن-اس بر پست لارو مرحله ۱۵ میگوی ببری سیاه تقریباً ۱۱ میلی‌گرم بر لیتر و برای میگوی بالغ ۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر است (Suphamat, 2004). تحقیقی در ایران نشان داد که مقدار غلظت نیمه کشندگی ۹۶ ساعته داروی ویرکن-اس برای چهار گروه وزنی از میگوی سفید هندی پرورشی با میانگین‌های ۰/۷۵، ۵/۴، ۷/۴۱ و ۱۲/۱ گرم بترتیب ۳۶/۳، ۳۶/۹، ۴۰/۵ و ۷۹/۹ میلی‌گرم در لیتر است (یزدانپناه، ۱۳۸۴). در مورد میگوی وانامی سابقه‌ای مبنی بر اندازه‌گیری غلظت نیمه‌کشندگی این دارو در ایران مشاهده نشده است.

این تحقیق جهت تعیین اثر نیمه‌کشندگی داروی ویرکن-اس بر میگوی سفید هندی (*Litopenaeus vannamei*) انجام شد. این دارو دارای اثرات ضدعفونی‌کنندگی است و در پیشگیری و کنترل برخی بیماریهای عفونی در صنایع مختلف دامداری، طیور و آبزیان بکار می‌رود.

ویرکن-اس پودر صورتی رنگ و ماده شیمیایی جامد و محلول در آب است که برای ضدعفونی بکار می‌رود و در ایران در بسته‌بندی‌های ۵ کیلوگرمی بسته‌بندی و توزیع می‌گردد. ویرکن-اس در آب محلول است و محلول آن بویی شبیه به لیمو دارد. طبق اظهارات سازنده آن، این دارو موثر بر علیه باکتریهای بیماریزا در طیور، گاو، گوسفند، حیوانات خانگی و آبزیان است. همچنین موثر بر ارگانوسمهای آلوده‌کننده مواد غذایی نظیر سالمونلا، کامپیلوباکتر و لیستریا است و اظهار می‌گردد که این دارو علیه قارچهای شایع مانند آسپرگیلوس، کاندیدا و قارچهای پوستی (تریکوفیتون و میکروسپوروم) موثر است (Suphamat, 2004).

بکارگیری منابع آبی سالم و ضد عفونی شده، جلوگیری از انتقال عوامل بیماریزا، ضدعفونی وسایل و تجهیزات، مطلوب سازی شرایط محیطی و کنترل منظم وضعیت سلامتی آبزیان از مهمترین اصول پیشگیری از عفونت در آبزیان است (شریف روحانی، ۱۳۷۴).

داروی ویرکن-اس یک ماده ضدعفونی کننده بوده و تحقیقات متعددی در داخل و خارج از کشور تاثیرات سمی و کشندگی این دارو و سایر داروها را مورد بررسی قرار داده است. از جمله تحقیقی که میزان نیمه کشندگی ۹۶ ساعته فنل و ۱- نفتول برای ماهی سفید را ۲۱/۵۹ و ۲/۱۵ میلی‌گرم در لیتر و برای ماهی سیم ۲۵/۱۹ و ۲/۸۵ میلی‌گرم در لیتر تعیین نموده است (شریعتی، ۱۳۸۲). براساس تحقیقی دیگر غلظت ۵۰ درصد کشندگی ۹۶ ساعته سم آندوسولفان بر فیل ماهی ۲ تا ۵ گرمی معادل ۰/۰۰۰۳ میلی‌گرم در لیتر تعیین شده است (شریف‌پور، ۱۳۸۲). بررسی اثرات فلزات سنگین مانند کرم، روی و جیوه (Wang, 2005)، بررسی اثرات حاد آمونیاک (Lin, 2001) و مطالعه اثرات سمی و هیستوپاتولوژیکی بنومیل (Lightner, 1996) بر میگوی بالغ پا سفید از جمله تحقیقاتی است که در این زمینه انجام شده است. علاوه بر تحقیق در خصوص غلظت نیمه‌کشندگی عوامل ضدعفونی کننده و سمی بر میگو، تحقیقات متعددی در زمینه اثرات و غلظت مهارکنندگی داروهای مختلف بر عوامل بیماریزا در آبزیان از قبیل بازماندگی جمعیت باکتری لومینسنت گونه (*Vibrio campbellii*) در مجاورت دو داروی آنروفلوکساسین و فلوروفنی کول انجام شده است (Rodriguez, 2006).

(2004).

(جدول ۱). جمعاً تعداد ۱۸ تانک مورد استفاده قرار گرفت. میزان آبیگری ۷۰ لیتر بود. آبیگری با آب تصفیه و ضد عفونی شده دریا با شوری ۳۷ گرم در لیتر انجام شد.

غلظت‌های مختلف از دارو با استفاده از آب مقطر تهیه و سپس به تانکها افزوده شد. برای تعیین این غلظت‌ها، ابتداءً با تکرار چندین آزمایش اولیه غلظتی از دارو که برای میگو کشنده بود مشخص و بعنوان بالاترین رقت در نظر گرفته شد. در طول آزمایش عوامل مهم فیزیکی و شیمیایی نظیر درجه حرارت، اکسیژن محلول آب، pH و شوری اندازه‌گیری و حتی‌الامکان ثابت نگهداشته شد (جدول ۱).

هوادهی تانکها توسط سیستم هواده مرکزی صورت گرفت و اکسیژن محلول همواره بیش از ۴/۸ میلی‌گرم در لیتر حفظ شد. پس از افزودن دارو، هر ۱۲ ساعت مرگ و میر میگوها ثبت و میگوهای مرده جدا و بررسی شدند. این آزمایش بمدت ۹۶ ساعت برای هر تکرار انجام شد (TRC, 1984). در پایان، داده‌های حاصله به کمک برنامه نرم‌افزاری LC50ModelSystem, Ver1.0 و بروش Spearman-Kärber تجزیه و تحلیل و مقادیر سمی دارو برای سنین مختلف در دوره‌های زمانی مختلف تعیین شد. در طول آزمایش، میگوها تغذیه نشدند.

نتایج اثر ظاهری ویرکن - اس بر میگوها نشان داد که میگوها در مقابل دارو حالت غیرعادی و شتاب زده داشتند. مخصوصاً در هنگام افزودن دارو با غلظت‌های بالا برخی از میگوها حرکات شدید و حتی پرشی به بیرون آب داشتند. در طول آزمون مشاهده شد که بدن میگوها قبل از مرگ کمی کدر (شیری رنگ) می‌شود این حالت بلافاصله پس از مرگ کاملاً مشهود بود. مقادیر LC50 ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ ساعته ویرکن - اس برای سنین مختلف در جدول ۲ ارائه شده است. منحنی غلظت نیمه‌کشندگی در ساعات مختلف و برای سنین مختلف میگو در نمودار ۱ ارائه شده است.

میانگین وزن میگوها با استفاده از روش ساده آماری ۲/۳۹ گرم محاسبه و میزان غلظت نیمه‌کشندگی داروی ویرکن - اس برای میگو وانامی با وزن فوق‌الذکر و پس از ۹۶ ساعت ۴۳/۲۳ میلی‌گرم در لیتر محاسبه گردید.

نتایج بدست آمده نشان داد که صرفنظر از سن میگو و غلظت دارو، سایر شرایط فیزیکی و شیمیایی تانکها نسبت به یکدیگر مشابه بوده است.

با بکارگیری PCR مشخص گردید که داروی ویرکن - اس، هالامید و کلیدوکس جهت ضد عفونی سطوح علیه ویروس پومالا موثر است (Maes, 2006). طی تحقیق در یک درمانگاه آموزشی دامپزشکی مشخص شد که اسپری نمودن محلول ۱ درصد ویرکن - اس می‌تواند سبب کاهش تعداد سالمونلا و استافیلوکوک موجود بر سطوح بترتیب بمیزان حداقل ۳ و ۴ لوگ (log) گردد (Dunowska, 2005). براساس تحقیقات McCormick در سال ۲۰۰۴، مشخص گردید که می‌توان آدنو ویروس تیپ ۵ و ۶ را به کمک محلول ۰/۹ درصد ویرکن - اس پس از ۵ دقیقه غیرفعال نمود.

اسید پراکسیژنیک که با نام تجاری ویرکن عرضه می‌گردد قادر است طیف وسیعی از میکروبها را از بین ببرد. محلول یک درصد این ماده علیه باکتریهای سودوموناس، اشرشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس هیرا و میکو باکتریوم مگماتیس در شرایط آزمایشگاهی موثر است. این محلول بر علیه ویروس پولیو (فلج اصفال) نیز موثر است (Hernandez, 2000). محلول یک درصد ویرکن - اس بر علیه فرم رویشی باکتریها و مخمرها موثر بوده و به نظر نمی‌آید اثر قابل توجهی بر اسپور داشته باشد (Hernandez, 2000).

اثر ۳۰ ماده شیمیایی بر علیه بیماری انگلی تریکودین (Trichodiniasis) در مارهای پرورشی در سیستم مدار بسته آزمایش شده است از جمله می‌توان ویرکن - پی اف، آکریفلوین، بیوتینول، کلرامین، دیتاروکس، مالاویت گرین، سیر خام، پرمنگنات پتاسیم را نام برد که بنا بر تحقیقات، ویرکن - پی اف، دیتاروکس و بیوتینول اثر درمانی داشتند (Madsen, 2000).

برای انجام آزمایش بر روی پودر خالص ویرکن - اس، پنج تیمار آزمون و یک تیمار شاهد هر یک با سه تکرار در نظر گرفته شد. میگوهای وانامی از ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه (متعلق به پژوهشکده میگوی کشور) تهیه و در شرایط آزمایشگاهی ایستگاه با حمام فرمالین ضد عفونی شدند. میگوها حداقل یک هفته در ایستگاه تحقیقاتی بندرگاه نگهداری شدند تا به شرایط آزمایشگاه سازگار شوند.

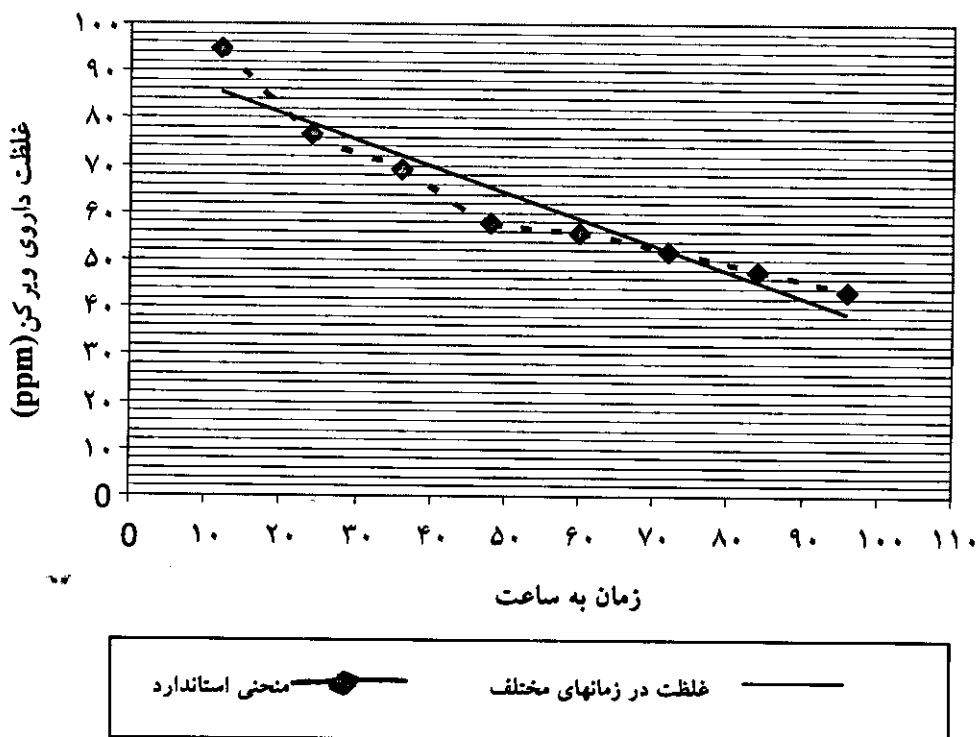
سی عدد میگو بصورت تصادفی صید و وزن آنها با ترازو به دقت ۰/۰۱ گرم توزین و میانگین وزنی آنها محاسبه گردید

جدول ۱: متغیرهای اندازه‌گیری شده

پارامتر (متغیر)	مقدار
میانگین وزنی میگوها	۲/۳۹ گرم
میزان اکسیژن محلول	۴/۸ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر
pH	۷/۲ تا ۷/۹
نوسانات دما در طی روز	۲۸ تا ۳۳ درجه سانتیگراد
شوری آب در ابتدای آزمون	۳۷ گرم در لیتر

جدول ۲: غلظت نیمه‌کشدگی ویرکن - اس بر میگوی وانامی ۲/۳۹ گرمی به تفکیک دوره‌های زمانی

زمان (ساعت)	۱۲	۲۴	۴۸	۶۰	۷۲	۸۴	۹۶
غلظت نیمه‌کشدگی محاسبه شده برای میگوی وانامی با میانگین وزنی ۲/۳۹ گرم ($P \leq 0.05$)	۹۴/۶۸	۷۶/۴۸	۵۷/۸۸	۵۵/۷۷	۵۱/۶۵	۴۷/۶۱	۴۳/۲۳



نمودار ۱: غلظت نیمه‌کشدگی ویرکن - اس در زمانهای متفاوت

که بیش از غلظت نیمه کشندگی دارو برای میگوی سفید هندی ۵/۴ گرمی است که دال بر حساسیت بیشتر میگوی سفید هندی نسبت به داروی مذکور است.

هدف اصلی این تحقیق تعیین غلظت نیمه کشندگی دارو بر روی میگوی پا سفید بود اما شایسته است تا تاثیرات ضد عفونی کنندگی و باکتری کشی دارو بر روی عوامل بیماریزا در میگوی آب شور و شیرین مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

شریعتی، ف.؛ اسماعیلی ساری، ع.، ۱۳۸۲. تعیین سمیت و LC50 فنل و ۱-خفتول روی ماهیان انگشت قد سیم و سفید. مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۲، صفحات ۵۷ تا ۶۸.

شریف پور، ع. و سلطانی، م.، ۱۳۸۲. تعیین LC50 و ضایعات بافتی ناشی از سم آندوسولفان در بچه فیل ماهی. مجله علمی شیلات ایران، سال دوازدهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۸۲، صفحات ۶۹ تا ۸۴.

شریف روحانی، م.، ۱۳۷۴. تشخیص پیشگیری و درمان بیماریها و مسمومیتهای ماهی. معاونت تکثیر و پرورش شیلات ایران، ۲۵۶ صفحه.

یزدان پناه، ف.، ۱۳۸۴. بررسی میزان LC50 ضد عفونی کننده Virkon-S بر روی سنین مختلف (۱ تا ۴ ماهه) میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*). پایان نامه دکترای عمومی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، ۶۲ صفحه.

Dunowska, M. ; Morley, P.S. and Hyatt, R.D. , 2005. The effect of Virkon®S fogging on survival of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* on surfaces in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*. Vol. 105, No. 3-4, pp.281-289.

Dupont Animal Health Solution Europe , 2006. www.antecint.co.uk/main/virkon.htm.

Hernndez, A. ; Martró, E. ; Matas, L. ; Martín, M. and Ausina, V. , 2000. Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon® against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR

بررسی منابع علمی نشان می دهد که غلظت ۵۰ درصد کشندگی ۹۶ ساعته داروی ویرکن-اس برای میگوی ببری سیاه در مرحله پست لارو ۱۵ معادل ۱۰/۳۱ ppm است. در حالی که برای نوع بالغ آن ۱۲۰/۳۳ ppm عنوان شده است (Suphamat, 2004). همچنین طبق تحقیقات انجام شده توسط شرکت سازنده، غلظت نیمه کشندگی داروی ویرکن-اس برای پست لارو ۱۵ میگوی پا سفید ۲۸/۲ ppm و برای میگوی ۵ و ۱۰ گرمی همان گونه بترتیب ۵۷/۸ و ۷۱/۷ ppm بوده است (Dupont Animal Health Solution Europe, 2006). طبق این تحقیق با افزایش وزن میگوی پرورشی پا سفید بر مقاومت آن در مقابل دارو افزوده می شود. این در حالی است که نتایج نهایی حاصل از تحقیق یزدان پناه در سال ۱۳۸۴ نشان می دهد که میزان غلظت ۵۰ در صد کشندگی ۹۶ ساعته این دارو برای میگوی سفید هندی ۱، ۲، ۳ و ۴ ماهه که دارای میانگین وزنی ۵/۴۰۰/۷۵، ۷/۴۱ و ۱۳/۱۰ بودند بترتیب ۳۶/۳۳، ۳۶/۹۳، ۴۰/۵۱ و ۷۹/۹۸ میلی گرم در لیتر بوده است. یزدان پناه در سال ۱۳۸۴ در این خصوص نتیجه گیری نمود که با افزایش وزن میگو بر مقاومت میگو در مقابل اثرات کشندگی دارو افزایش می یابد. تحقیق حاضر نشان داد که غلظت نیمه کشندگی داروی ویرکن-اس برای میگوی وانامی با میانگین وزنی ۲/۳۹ گرم برابر با ۴۲/۲۳ میلی گرم در لیتر یا عبارتی معادل ۴۲/۲۳ ppm است. با بررسی نمودار ۱ می توان به رابطه غلظت دارو و زمان تاثیر دارو و میزان تلفات پی برد. هرگاه مدت زمان مجاورت میگو با دارو طولانی تر شود بالطبع غلظتی از دارو که سبب بروز تلفات در میگو می شود، کاهش می یابد.

مقدار نیمه کشندگی بنومیل که یک ماده ضد قارچ است برای میگوی بالغ پا سفید ۱۰ ppm گزارش شده است (Lightner, 1996). این در حالی است که طبق تحقیق حاضر مقدار نیمه کشندگی ویرکن-اس بر میگوی پا سفید نابالغ ۴۳ ppm می باشد. با توجه به این موضوع بنظر می آید بنومیل برای میگو سمی تر از ویرکن است.

مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج حاصل از تحقیق یزدان پناه در سال ۱۳۸۴ نشان داد که مقاومت میگوی پا سفید نسبت به داروی ویرکن-اس بیشتر از مقاومت میگوی سفید هندی است. بعبارت دیگر انتظار می رود که غلظت نیمه کشندگی دارو برای میگوی ۵/۴ گرمی بیش از میگوی ۲/۳۴ گرمی باشد. این در حالی است که مقدار نیمه کشندگی ویرکن-اس برای میگوی پا سفید ۲/۳۴ گرمی معادل ۴۲/۲ ppm است

- Soto-Rodriguez, S. ; Armenta, M. and Gomez-Gil, B. , 2006. Effects of enrofloxacin and florfenicol on survival and bacterial population in an experimental infection with luminescent *Vibrio campbellii* in shrimp larvae of *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture. Vol. 255, No. 1-4, pp.48-54.
- Suphamat, K. , 2004. Research into the level of toxicity of virkon S which affect giant tiger prawn at different stages. www.antecint.co.uk.
- TRC, 1984. OECD guideline for testing of chemicals. Section 2. Effects on biotic system. pp.1-39.
- Wang, Z. ; Gantang, L. ; Xu, Jun and Aihua, Z. , 2005. Study on the acute toxicity and joint toxicity of Cr super(6+), Zn super(2+), Hg super(2+) acting on *Litopenaeus vannamei* juvenile. Marine Fisheries Research. Haiyang Shuichan Yanjiu. Vol. 26, No. 2, pp.6-12.
- guidelines. Journal of Hospital Infection. Vol. 46, No.3, pp.203-209.
- Lightner, D.V. ; Hasson, K.W. ; White, B.L. and Redman, R.M. , 1996. Chronic toxicity and histopathological studies with Benlate super(registered), a commercial grade of benomyl, in *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). Aquatic Toxicology. Vol. 34, No. 2, pp.105-118.
- Lin, Y.C. and Chen, J.C. , 2001. Acute toxicity of ammonia on *Litopenaeus vannamei* Boone juveniles at different salinity levels. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. Vol. 259, No. 1, pp.109-119.
- Madsen, C.K. ; Buchmann, K. and Møllergaard, M. , 2000. Treatment of trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) reared in recirculation systems in Denmark: Alternatives to formaldehyde. Aquaculture. Vol. 186, No. 3-4, pp.221-231.
- Maes, P. ; Li, S. ; Verbeeck, J. ; Keyaerts, E.; Clement, J. and Ranst, M.V. , In Press. Evaluation of the efficacy of disinfectants against *Puumala hantavirus* by real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods.
- McCormick, L. and Maheshwari, G. , 2004. Inactivation of adenovirus types 5 and 6 by Virkon® S. Antiviral Research. Vol. 64, No.1, pp.27-33.

**LC50 determination of Virkon-S for
the shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles**

Ganjoor M.S.

msg_isrc@yahoo.com

Iran Shrimp Research Centre, P.O.Box: 1374 Bushehr, Iran

Keyword: *Litopenaeus vannamei*, LC50 96h, Virkon-S, Iran

Abstract

The LC50 of Virkon-S which is an antimicrobial agent for the shrimp *Litopenaeus vannamei* juveniles with mean body weight 2.39g was determined. The study was conducted in Iran Shrimp Research Centre in Bushehr City, south Iran in 2006. The LC50 96h value of Virkon-S was 43.23mg/lit corresponding to 43.23ppm. All of important physicochemical parameters of sea water were monitored and maintained at a constant value so that temperature was 28-33 degrees centigrade, pH was between 7.2-7.9, dissolved oxygen was ≤ 4.8 and salinity was around 37ppt. Five treatments and three replicates were run for each treatment. The software used was LC50ModelSystem version 1.0 that let the estimation of LC50 values by Spearman-Kärber rule with ($P \leq 0.05$).