

مقاله علمی:

تأثیر استفاده توأم از حمام فرمالین - متیلن بلو به عنوان ضد عفونی رایج بر شاخص های خون شناسی و تنش در گربه ماهی زینتی پنگوسی (*Pangasius hypophthalmus*)

سالار درافشان*^۱، فاطمه پیکان حیرتی^۱، امین مخلص آبادی فراهانی^۱

*sdorafshan@iut.ac.ir

۱- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، صندوق پستی ۸۴۱۵۶۸۳۱۱۱

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۴۰۰

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۰

چکیده

کنترل بیماری های ماهیان زینتی می تواند باعث کاهش هزینه درمان و افزایش رشد و سلامت شود. یکی از روش های کنترل بیماری ها استفاده از محلول های ضد عفونی مانند فرمالین و متیلن بلو به صورت حمام است. در این مطالعه ۶۰ قطعه ماهی پنگوسی (*Pangasius hypophthalmus*) به طور تصادفی انتخاب شد. ماهیان در دو تیمار شامل تیمار شاهد و تیمار فرمالین - متیلن بلو هر کدام در سه تکرار، هر تکرار شامل ۱۰ قطعه ماهی تقسیم شدند. میانگین وزن ماهیان $12/67 \pm 83/2$ گرم بود. ماهیان تیمار محلول ضد عفونی کننده به طور همزمان با فرمالین (5 ppm) و متیلن بلو (4 ppm) به مدت ۷۲ ساعت مواجه شدند و در پایان با خون گیری از ساقه دمی ماهیان برخی شاخص های خون شناسی و همچنین مقادیر گلوکز و کورتیزول پلاسما به عنوان شاخص های تنش مورد سنجش قرار گرفتند. استفاده از این محلول تأثیر معناداری بر شاخص های خون شناسی این ماهیان در پایان این دوره سه روزه نداشت ($P > 0.05$)، اما مقادیر کورتیزول و گلوکز پلاسما در تیمار فرمالین - متیلن بلو به صورت معناداری بیش از تیمار شاهد بود ($P < 0.05$). با توجه به نتایج حاصل به نظر می رسد، استفاده از فرمالین - متیلن بلو به صورت توأم اگرچه تغییری در شاخص های خونی گربه ماهی زینتی ایجاد نمی کند، اما منجر به ایجاد تنش در آنها می شود و لذا استفاده مداوم از آن باید با احتیاط صورت گیرد. ارزیابی برخی دیگر از فراسنجه های مرتبط با وضعیت سلامتی ماهیان و نیز بررسی معایب و مزایای سایر ضد عفونی کننده ها، می تواند در انتخاب مناسب ترین ترکیب ضد عفونی کننده در شرایط پرورشی یاری رسان باشد.

کلمات کلیدی: فرمالین، متیلن بلو، کورتیزول، گلوکز، ماهی پنگوسی

مقدمه

با توجه به گسترش صنعت ماهیان زینتی در سال‌های اخیر، متأسفانه اطلاعات مربوط به پیشگیری و درمان ماهیان زینتی در حد لازم توسعه نیافته است و این خلاء باعث بروز مشکلاتی بسیاری در بین دارندگان این دسته از ماهیان شده است (Vanderzwalmen *et al.*, 2021). از مهم‌ترین عوامل زیان‌آور در صنعت پرورش ماهیان زینتی، بیماری‌های قارچی است. بنابراین، در سال‌های اخیر استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده برای درمان این بیماری‌ها، بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است (Msukwa *et al.*, 2021). ضدعفونی، شامل مجموعه عملیاتی است که با هدف نابودی میکروارگانیسم‌های محیطی و کلیه عوامل بیماری‌زا صورت می‌گیرد. ضدعفونی باید باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و انگل‌های محیطی را به حدی برساند که تأثیر نامطلوب آنها بر سلامت ماهیان به حداقل برسد. ضدعفونی‌کننده‌ها عموماً در مدت کمی (طی چند دقیقه) اثر می‌کنند و باکتری‌ها و حتی برخی موارد ویروس‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها را نیز از بین می‌برد. برخی از مواد ضدعفونی‌کننده از جمله: پرمنگنات پتاسیم، فنول‌ها، مالاشیت سبز، متیلن بلو، مواد فعال سطحی^۱، کلرید سدیم، هالوژن‌ها^۲، آلدئیدها، ازون، گوگرد، آب‌اکسیژنه، قلیاها، فلزات سنگین، الکل‌ها، پراستیک اسید^۳، آب الکترولیز شده اسیدی^۴، نانو نقره، نانو سید و اشعه فرابنفش است. به ضدعفونی‌کننده‌های خاصی که برای ضدعفونی سطوح بدن حیوانات و انسان به‌کار می‌روند، "آنتی‌سپتیک"^۵ می‌گویند. ضدعفونی‌کننده‌ها معمولاً به یکی از روش‌های دهیدراتاسیون و خشک‌کردن میکروارگانیسم مثل: حرارت، ایجاد لایه ضخیم‌کننده در سطح میکروارگانیسم، اثر بر نفوذپذیری غشاء پلاسمایی سلول با خاصیت مواد فعال سطحی، اثر تخریب بر پروتئین‌های داخلی به‌خصوص آنزیم‌ها و تغییر شرایط فیزیکی بر میکروارگانیسم‌ها اثر می‌کنند. امروزه علاوه بر بیماری‌های عفونی، باقیمانده‌های سموم

کشاورزی، داروهای دامپزشکی، مواد آلی و غیرآلی در آبزیان از چالش‌های مطرح بوده و ضروری است که تولیدات شیلاتی از دو نظر اقتصادی و بهداشتی مورد بررسی قرار گیرند. ضدعفونی و گندزدایی در ماهیان نه تنها از نظر پیشگیری از بروز مشکلات بهداشتی ضروری است بلکه باعث افزایش بهره‌وری و ارتقاء کیفیت تولیدات می‌شود. در این بین دو مورد از مواد ضدعفونی شامل: متیلن بلو و فرمالین، اهمیت بیشتری دارند. در ادامه به ویژگی‌های هر یک پرداخته خواهد شد (Dodoo-Arhin *et al.*, 2021).

فرمالین: آلدئیدها در برابر باکتری‌ها و ویروس‌ها و حتی اسپور باکتری‌ها بسیار مؤثرند. فرمالدئید به شکل گاز است که حدود ۳۷-۴۰ درصد آن در آب حل می‌شود. بدین ترتیب، به نام فرمالین یا محلول فرمالدئید نامیده می‌شود. اگر فرمالدئید در شرایط مناسب، حرارت و رطوبت به‌کاربرده شود، به یک ماده ضدعفونی‌کننده قوی تبدیل می‌شود که البته به فلزات و رنگ اشیاء آسیبی نمی‌رساند. فرمالین جهت درمان عفونت‌های قارچی و انگلی خارجی پوست و آبشش‌های ماهیان بسیار سودمند است و باید مراقب بود که در اثر ماندن به پارافرمالدهید^۶ تبدیل نشود. پارافرمالدهید رسوب سفیدرنگی را در ته بطری ایجاد می‌کند که برای ماهی بسیار سمی است. فرمالین اکسیژن را از حالت محلول در آب خارج می‌سازد و این اثر با گذشت حدود ۲۴ ساعت پس از افزودن به اوج خود می‌رسد. در صورتی که اندکی پس از درمان امکان محو کامل فرمالین از آب استخر وجود نداشته باشد، باید میزان اکسیژن محلول را در حدی نگه داشت که ماهیان دچار کمبود اکسیژن نشوند. البته یک‌راه حل مناسب، استفاده از هواده است. بعضی از مؤسسه‌های تحقیقاتی ثابت کردند که استنشاق گاز فرمالدئید در انسان ممکن است خطر سرطان‌زایی داشته باشد (Salthammer, 2019). تریپان آبی^۷، متیلن بلو و مالاشیت سبز از جمله ترکیبات رنگی هستند که از گذشته جهت مبارزه با میکروارگانیسم‌ها مورد مصرف قرار می‌گرفتند. رنگ‌های آکریدین^۸ مانند پروفلاوین^۹ و آمیناگرین^۱ به‌عنوان

¹ Surfactant

² Halogen

³ Peracetic Acid

⁴ Electrolysis Acid Of Water

⁵ Antiseptic

⁶ Paraformaldehyde

⁷ Trypan Blue

⁸ Alcidine

⁹ Proflavine

ضد عفونی کننده بر شاخص‌های خون‌شناسی و برخی از شاخص‌های بیوشیمیایی پلاسمای خون نظیر کورتیزول و گلوکز مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نحوه انجام آزمایش

برای انجام این آزمایش، ابتدا حدود ۶۰ قطعه بچه ماهی پنگوسی شکاری با میانگین وزنی $12/67 \pm 83/2$ گرم که از مرکز تکثیر و پرورش آبزیان دولت‌آباد خریداری و به سالن آکواریوم دانشکده منابع طبیعی دانشگاه صنعتی اصفهان طی تابستان ۱۳۹۹، منتقل شد. یک مخزن ۳۰۰ لیتری برای ذخیره‌سازی در نظر گرفته شد و ماهی‌ها به منظور تطابق به مدت دو هفته در این مخزن قرار داده شدند. سالن آکواریوم، دارای نور طبیعی و لامپ‌های مهتابی، مجهز به سیستم ژنراتور برق اضطراری و منبع آب شهری بود. تعویض آب، سیفون از کف کلیه تانک‌ها به میزان یک‌چهارم به‌صورت روزانه انجام گرفت. آکواریوم‌ها دارای هوادهی مداوم بود. در طول دوره آزمایش، میانگین دمای آب $26 \pm 1/5$ (میانگین \pm انحراف از معیار) درجه سانتی‌گراد، اکسیژن محلول $6/8 \pm 0/5$ میلی‌گرم بر لیتر، میزان pH $8/1 \pm 0/7$ ، هدایت الکتریکی $42 \pm 482/2$ میکروزیمنس، آمونیاک $0/4 \pm 1/37$ میلی‌گرم بر لیتر و فسفات کل $0/02 \pm 0/09$ قسمت در میلیون بود.

طراحی آزمایش

ماهیان در دو تیمار شامل تیمار شاهد و تیمار فرمالین-متیلن بلو و سه تکرار، هر تکرار ۱۰ قطعه ماهی تقسیم شدند. هر کدام از تکرارها درون آکواریوم جداگانه با حجم آب ۵۰ لیتر قرار گرفتند. برای تیمار فرمالین و متیلن بلو، ماهی‌ها درون آکواریوم با حجم آب ۵۰ لیتر قرار داده شدند و به مدت ۳ روز، ۷۲ ساعت در معرض محلول فرمالین-متیلن بلو حاوی فرمالین (5ppm) و متیلن بلو (4ppm) قرار گرفتند، درحالی‌که ماهیان گروه شاهد، در آکواریوم‌های یکسان و بدون افزودن هیچ‌گونه ترکیبی نگهداری شدند. طی دوره مطالعه غذادهی متوقف شد.

ضد عفونی کننده هستند، ولی فعالیت کند دارند و در برابر اسپور باکتری‌ها غیرفعال هستند. از رنگ تریفنیل‌متان^۲ مانند: کریستال ویوله^۳ و سبز درخشان (مالاشیت سبز) جهت ضد عفونی موضعی استفاده می‌شود. Zhang و همکاران (۲۰۲۱) به این نتیجه رسید که غلظت ۱ppm مالاشیت سبز در مدت ۱۵ دقیقه زئوسپورها و سیستم‌های قارچ را از بین می‌برد و عفونت‌های قارچی را کنترل می‌کند. به‌علاوه، Salthammer (۲۰۱۹) بیان کرد که مالاشیت سبز برای مدت طولانی در بافت‌ها دوام یافته و در اثر درمان‌های مکرر تجمع افزاینده آن در نسوج فراهم می‌شود. مالاشیت سبز در درمان عفونت‌های قارچی به‌خصوص ساپروولگنیا (*Saprolegnia parasitica*) و بیماری لکه سفید (یک) در ماهی قره برون (*Acipenser persicus*) بسیار مؤثر است. نظر به سرطان‌زا بودن مالاشیت سبز، مصرف آن در اغلب کشورها ممنوع شده است (Zhao et al., 2020).

این مطالعه بر ماهی پنگوسی شکاری با نام علمی *Pangasius hypophthalmus* متعلق به راسته گربه‌ماهی شکلان (Siluriformes) و خانواده Pangasiidae انجام شده است. این ماهی بومی شرق و جنوب شرق آسیا در محدوده کشور تایلند، مالزی و ویتنام هست (Sattang et al., 2021). پنگوسی جزء ماهیان آب شیرین و بزرگ حاره‌ای است که قسمت‌های تاریک و عمیق آبگیرها و رودخانه‌های بزرگ را برای زندگی ترجیح داده و رژیم غذایی آن شامل مواد گیاهی، کرم، نوزاد حشرات مختلف، لاشه ماهیان کوچک و میگوهای آب‌های شیرین است (Khan et al., 2021). این گونه در کشور ما به عنوان ماهی زینتی و در بسیاری از کشورها جنوب شرقی آسیا به عنوان ماهی زینتی و خوراکی مطرح است. ماهی پنگوسی نقش مهمی را در آبی‌پروری آسیا و صید تجاری ایفاء می‌کند و در کشورهای جنوب شرقی آسیا بخش زیادی از تولیدات آبی‌پروری را به‌خود اختصاص می‌دهد (درافشان و همکاران، ۱۳۹۹).

در این مطالعه اثر استفاده از فرمالین و متیلن بلو به‌صورت توأم به‌شکل حمام طولانی مدت به‌عنوان یک دارو

¹ Green Amino

² Triphenylmethane

³ Crystal Violet

خون‌شناسی

پس از دوره سه روز مطالعه، ۵ قطعه ماهی از هر تکرار جهت خون‌گیری با پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بی‌هوش شد. سپس خون‌گیری از ماهیان پس از خشک‌کردن ساقه دم با استفاده از سرنگ ۲/۵ میلی‌لیتری هپارینه انجام شد و شاخص‌های خون‌شناسی به شرح ذیل مورد بررسی قرار گرفت:

هماتوکریت^۱ (Hct) و هموگلوبین^۲ (Hb)

برای تعیین میزان هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد. ابتدا بیش از دوسوم لوله هماتوکریت از خون منعقد نشده پر شده، سپس لوله‌های هماتوکریت درون دستگاه سانتیفریوژ (ساخت شرکت Hettich کشور آلمان) میکروهماتوکریت قرار گرفت و پس از سپری شدن ۳ دقیقه با دور گردش ۱۳۰۰ rpm مقدار هماتوکریت به وسیله صفحه مدرج مخصوص خوانده می‌شد. برای تعیین مقدار هموگلوبین از روش استاندارد سیانومت هموگلوبین استفاده شد (Houston, 1990). مقدار ۲۰ میکرو لیتر خون منعقد نشده با ۵ میلی‌لیتر محلول ابکین (توصیه شده از کمیته بین‌المللی استاندارد آزمایشگاه تشخیص طبی) مخلوط شده و ۵ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. سپس به وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۰ نانومتر مقدار جذب خوانده شد (Kim et al., 2020)

تعداد گلبول قرمز^۳

برای شمارش گلبول‌های قرمز از ملانژور^۴ مخصوص شمارش گلبول و همچنین از لام مخصوص شمارش استفاده گردید. بدین صورت که خون را با محلول دایس یا رقیق‌کننده تا ارتفاع تعیین شده در ملانژور کشیده شده و سپس به وسیله لام هماتوسیتومتری^۵ تعداد گلبول‌های قرمز در پنج‌خانه وسط شمارش گردید. سپس طبق رابطه ذیل تعداد گلبول‌های قرمز

در میلی‌مترمکعب محاسبه گردید. برای تهیه محلول دایس ابتدا ۰/۱ گرم برلیانت کریزل آبی را با ۳/۸ گرم سدیم سیترات و ۰/۲۰ میلی‌لیتر فرمالین ۳۸٪ مخلوط شد و سپس ترکیب حاصل با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید (Dorafshan et al., 2008).

تعداد گلبول‌های قرمز = $۲۰۰ \times (۰/۲۰ / \text{تعداد گلبول‌های شمارش شده})$

تعداد گلبول‌های سفید^۶

برای شمارش تعداد گلبول سفید از ملانژور شمارش استفاده از لام هماتوسیتومتری بعد از رقیق‌سازی خون منعقد نشده با محلول دایس (غلظت ۱/۵۰) شمارش می‌گردد. تعداد گلبول‌های سفید در یک میلی‌متر مکعب خون برحسب فرمول ذیل محاسبه شد (Dorafshan et al., 2008):

$۲۰۰ \times (۰/۲۰ / \text{تعداد گلبول‌های شمارش شده}) = \text{تعداد گلبول‌های سفید}$

سنجش شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی

برای اندازه‌گیری شاخص‌های MCV ($\text{nm}^3 \text{ cell}^{-1}$)، MCH ($\mu\text{g}/\text{cell}$) و MCHC (g/dL) از رابطه ذیل استفاده شد: (Dorafshan et al., 2008):

$$\text{MCV} (\text{nm}^3 \text{ cell}^{-1}) = \text{Hct} (\%) \times 10 / \text{RBC} (10^6 \text{ mm}^3)$$

$$\text{MCH} (\mu\text{g cell}^{-1}) = \text{Hb} / \text{RBC} (10^6 \text{ mm}^3)$$

$$\text{MCHC} (\text{g Hb cell}^{-1}) = \text{Hb} (\text{g}/\text{dl}) / \text{Hct} \times 100$$

سنجش کورتیزول و گلوکز پلاسما

جداسازی پلاسما

سنجش هورمون کورتیزول خون از روش رادیوایمونواسی با استفاده از دستگاه گاما کانتر مدل L.K.B ساخت کشور فنلاند و با به‌کارگیری کیت هورمونی ایمونوتک ساخت کشور فرانسه انجام گردید. برای این منظور ابتدا ۱۰ میکرو لیتر از پلاسما و ۵۰۰ میکرو لیر از هورمون کورتیزول نشان‌دار به میکروتیوپ موجود در کیت اضافه و سپس میکروتیوپ‌ها پس از ورتکس شدن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس محتویات میکروتیوپ‌ها خالی‌شده و پس از

¹ Hematocrit

² Hemoglobin

³ Red Blood Cell

⁴ Blood diluting pipettes

⁵ Hemocytometer

⁶ White Blood Cell

اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، داده‌ها با استفاده از آزمون t -test مستقل استفاده شد و در سطح معنی‌داری ۹۵٪ ارزیابی شدند.

نتایج

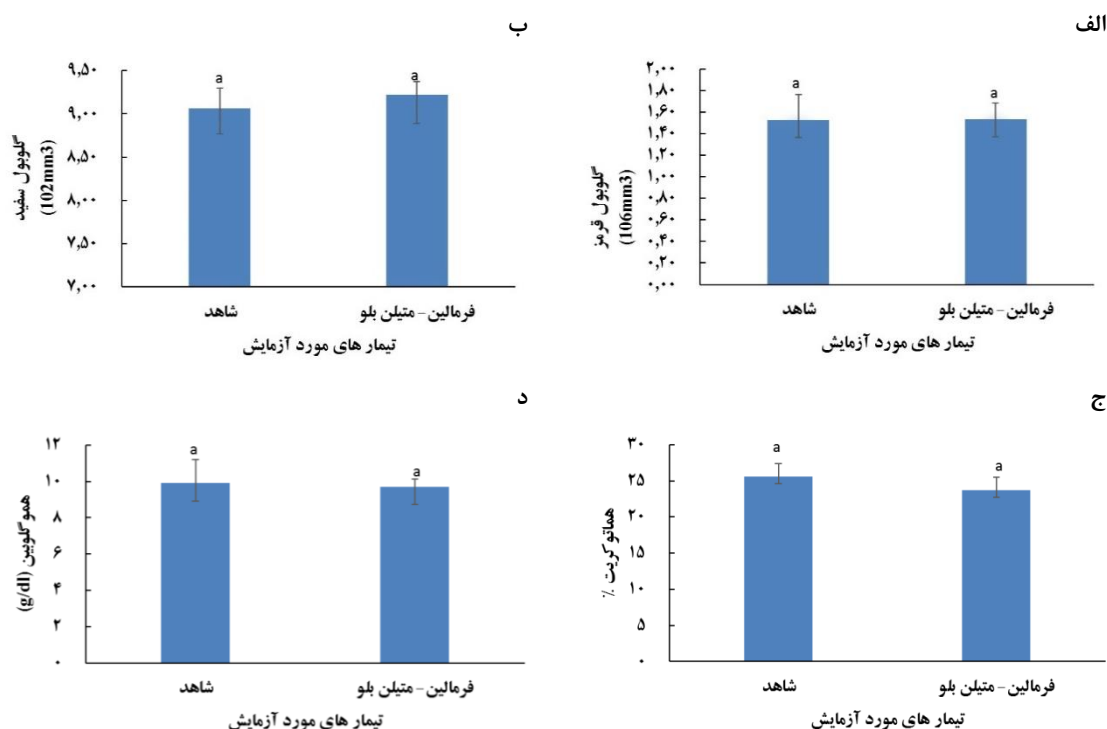
شاخص‌های خون‌شناسی

در این مطالعه برای بررسی شاخص‌های خون‌شناسی، شاخص‌های تعداد گلبول‌های قرمز، تعداد گلبول‌های سفید، هموگلوبین و هماتوکریت مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از آن است که در هیچ‌یک از شاخص‌های خونی اختلاف معناداری مشاهده نشده است ($P > 0.05$) و استفاده از فرمالین و متیلن بلو با غلظت‌های مذکور در پایان یک دوره حمام سه‌روزه تأثیری بر شاخص‌های خونی نداشت (شکل ۱).

خشک شدن میکروتیوپ‌ها، مقدار تشعشعات گامای آنها در دستگاه گاما کانتر اندازه‌گیری شد (Andrade-Porto *et al.*, 2017). گلوکز سرم نیز با استفاده از کیت اختصاصی (پارس آزمون و دستگاه اتوآنالیزر) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده اندازه‌گیری شد.

تحلیل داده‌ها

در این مطالعه داده‌های آماری به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (Mean \pm SEM) گزارش شده است و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2010 استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 و آزمون نرمال بودن نیز با استفاده از آزمون Kolmogorov-Smirnov Test انجام شد. پس از



شکل ۱: شاخص‌های اولیه خون‌شناسی ماهی پنگوسی که به مدت سه روز معرض مخلوط فرمالین-متیلن بلو قرار گرفتند در مقایسه با گروه شاهد. الف: تعداد گلبول‌های قرمز؛ ب: تعداد گلبول‌های سفید؛ ج: هماتوکریت؛ د: هموگلوبین. هیچ تفاوت آماری در شاخص‌های موردبررسی بین دو گروه مشاهده نشد ($P > 0.05$).

قرمز خون منجر شد (Holladay *et al.*, 2010). این کاهش تعداد گلبول‌های قرمز منجر به بروز کم‌خونی می‌شود، این

در ماهی تیلاپیا *Oreochromis niloticu* مواجهه با غلظت‌های تحت‌کشنده از فرمالین به کاهش تعداد گلبول‌های

اثر کاهش حجم پلاسما خون رخ می‌دهد (Beevi and Radhakrishnan, 1987). در مطالعه Wootten و Williams (۱۹۸۱) بر قزل‌آلای رنگین‌کمان، مشاهده شد که تیمار با فرمالین موجب افزایش هماتوکریت می‌شود. نتایج مشابهی در کفشک ماهی زیتونی *Paralichthys olivaceus* به‌دست آمده است. در این ماهی افزایش هموگلوبین و هماتوکریت متعاقب برخورد با غلظت‌های افزایش‌یابنده فرمالین ثبت شده است. اما تعداد گلبول‌های سفید خون تغییری نشان نداده است (Jung et al., 2003). شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی نیز در این مطالعه در تیمار فرمالین-متیلن بلو اختلاف معناداری با تیمار شاهد نداشتند (جدول ۱، $P < 0.05$).

کم‌خون ناشی از رقیق شدن پلاسما به علت اختلال در مکانیسم‌های تنظیمی اسمزی آبشش رخ می‌دهد و البته گزارش‌هایی هم وجود دارد که فرمالین در غلظت‌های تحت کشنده به تخریب گلبول‌های قرمز منجر می‌گردد (Smith and Piper, 1972). در این مطالعه هماتوکریت و هموگلوبین مانند گلبول قرمز و سفید در مواجهه با حمام فرمالین و متیلن بلو تغییر معناداری نشان ندادند ($P < 0.05$). در ماهی *Sarotherodon mossambicus* مواجهه با فرمالین به کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون (آنمی ماکروستیک هیپرکرومیک) منجر شد، اما به طور همزمان محتوای هموگلوبین خون و هماتوکریت افزایش یافته است. این افزایش هماتوکریت هم‌زمان با کاهش تعداد گلبول‌های قرمز خون در

جدول ۱: شاخص‌های ثانویه خون‌شناسی در ماهی پنگوسی که به مدت سه روز در معرض محلول فرمالین-متیلن بلو قرار گرفتند در مقایسه با گروه شاهد (میانگین \pm انحراف معیار)

تیمارهای مورد آزمایش	MCHC (g Hb cell ⁻¹)	MCH ($\mu\text{g cell}^{-1}$)	MCV ($\text{nm}^3 \text{ cell}^{-1}$)
شاهد	۲۵/۳۵ \pm ۰/۳۲	۱۵/۱۱ \pm ۳/۰۵	۳۸۹/۴۱ \pm ۲۷/۷۹
تیمار فرمالین-متیلن بلو	۲۳/۲۵ \pm ۰/۷۱	۱۴/۸۹ \pm ۰/۰۹	۳۶۳/۱۴ \pm ۲۲/۴۴

تفاوت آماری معنی‌داری با آزمون *t*-test بین دو گروه آزمایشی وجود نداشت ($P > 0.05$).

غلظت ترکیبات مورد استفاده دلیل آن دوره کوتاه استفاده از داروها یا غلظت اندک آنها در این مطالعه باشد.

شاخص‌های گلوکز و کورتیزول پلاسما

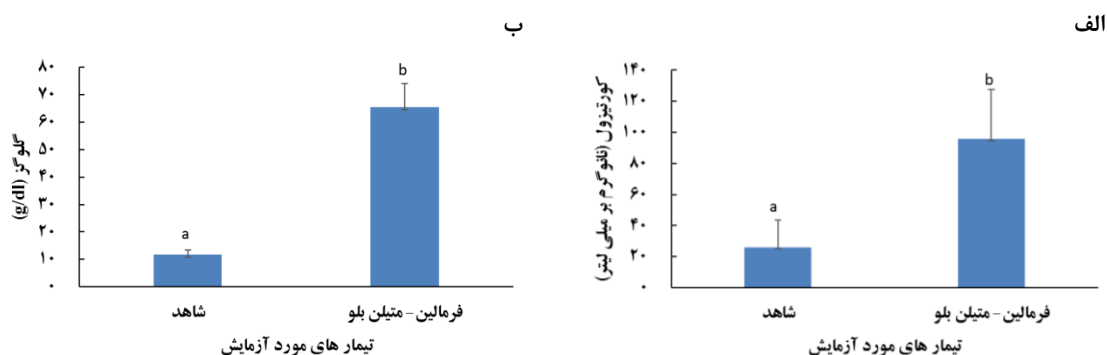
در این مطالعه میزان کورتیزول در تیمار شاهد $26/11 \pm 17/54$ نانوگرم کورتیزول بر میلی‌لیتر بود و میزان این شاخص در تیمار فرمالین-متیلن بلو به صورت معناداری بیشتر و برابر با $95/73 \pm 31/77$ نانوگرم کورتیزول بر میلی‌لیتر بود ($P > 0.05$). شاخص گلوکز در تیمار فرمالین-متیلن بلو در حدود $5/5$ برابر تیمار شاهد بود ($P > 0.05$). شاخص‌های کورتیزول و گلوکز در شکل ۲ نشان داده شده است.

هورمون کورتیزول در اثر تنش‌های مختلفی که ممکن است ترشح گردد و عوامل محیطی و شیمیایی، می‌تواند عامل این تحریک باشند. تقریباً هر نوع تنش موجب یک افزایش فوری و بارز در ترشح ACTH و به دنبال آن در ظرف چند دقیقه منجر به افزایش شدید در ترشح کورتیزول از قشر فوق کلیه

در آزادماهیان نیز محتوای هموگلوبین خون و میزان هماتوکریت پس از تماس با فرمالین افزایش نشان داده است. اما تعداد گلبول‌های قرمز خون تغییر معنی‌داری نشان نداده است (Nieminen et al., 1983). این افزایش هماتوکریت و هموگلوبین مستقل از تعداد گلبول‌های قرمز خون بیانگر افزایش حجم میانگین گلبول‌های قرمز (MCV) است. در تیلاپیا *Oreochromis niloticus* تیمار با فرمالین موجب تغییر فوری در شاخص‌های خون‌شناسی نگردید (Perera and Pathiratne, 2008). در مطالعه یادگاری و همکاران (۱۳۹۰) تغییرات شاخص‌های خونی ماهی بنی *Barbus sharpeyi* که به مدت یک‌هفته در معرض غلظت‌های متفاوت فرمالین قرار گرفتند، تعداد گلبول‌های قرمز و سفید، درصد لنفوسیت‌ها و منوسیت‌ها، هماتوکریت و هموگلوبین با افزایش غلظت فرمالین، کاهش یافت درحالی‌که درصد نوتروفیل‌ها، میانگین حجم گلبول‌های قرمز و میانگین غلظت هموگلوبین روند افزایشی نشان داد. به‌نظر می‌رسد طول دوره حمام یا

۱۲۰ میلی‌گرم بر لیتر بر قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و گربه‌ماهی (*Ichthyophthirius multifiliis*) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که در هر دو گونه فرمالین باعث افزایش گلوکز و کورتیزول می‌شود (Jorgensen et al., 2002). در مطالعه حاضر نیز مشاهده شد که همانند مطالعات مذکور استفاده از فرمالین-متیلن بلو باعث افزایش سطح گلوکز و کورتیزول می‌شود.

شود. یکی از آثار هورمون کورتیزول بالا بردن مقاومت بدن هنگام تنش به‌وسیله کاهش جذب گلوکز و تشدید نیاز به سدیم و آب بدن هست (Zhao et al., 2020). در مطالعه Andrade-Porto و همکاران (2017) اثر فرمالین بر ماهی آراپایما (*Arapaima gigas*) مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشاهده که فرمالین باعث افزایش کورتیزول و گلوکز پلاسما خون این گونه می‌شود و علت آن را تنش ناشی از فرمالین بیان داشتند. در مطالعه دیگری اثر فرمالین با غلظت



شکل ۲: میزان کورتیزول و گلوکز پلاسما ماهی پنگوسی که به مدت سه روز در معرض فرمالین-متیلن بلو قرار گرفتند، در مقایسه با گروه شاهد. الف: کورتیزول ب: گلوکز. وجود حداقل یک حرف مشابه به معنای عدم تفاوت معنادار است ($P > 0.05$).

تغییر در غلظت گلوکز آسیب به کلیه‌هاست (Agrahari and Gopal, 2007). در پایان مطالعه حاضر، نتایج حاصل نشان داد که میزان گلوکز در تیمار فرمالین-متیلن بلو به صورت معناداری بیش از تیمار شاهد است ($P < 0.05$). در مطالعه ملایم رفتار و همکاران (۱۳۹۷) اثر درمان با فرمالین و مسمومیت نیتريت و آمونیاک بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه مشخص شد که قرار گرفتن در معرض فرمالین باعث افزایش معنادار گلوکز این ماهی در مقایسه با تیمار شاهد می‌شود که با نتایج این مطالعه هم‌سو است.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه اثر فرمالین-متیلن بلو به عنوان ترکیب ضد عفونی‌کننده، در مقایسه با گروه شاهد بر ماهیان پنگوسی به عنوان یکی از ماهیان زینتی در ایران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از این ترکیب

گلوکز اصلی‌ترین ماده به‌دست‌آمده از سوخت‌وساز مواد کربوهیدراتی هست (Ren et al., 2015). از سوی دیگر، افزایش غلظت گلوکز می‌تواند به دلیل فرایند گلوکونئوزن باشد، به این صورت که در شرایط نامساعد و تحت تنش سلول‌های کرومافین^۱، هورمون‌های آدرنالین و نورادرنالین^۲ را به خون ترشح می‌کنند. این هورمون به همراه کورتیزول سبب می‌شوند که ماهی با انجام واکنش‌های بیوشیمیایی گلیکوژنولیز، گلیکوژن بافت را به گلوکز تبدیل کرده و وارد جریان خون کنند تا انرژی موردنیاز سلول‌ها طی فرایند تنش فراهم شود (Saravanan et al., 2011). به طور کلی، گلوکز خون شاخصی متغیر است که به میزان زیادی تحت تأثیر دست‌کاری و حمل‌ونقل، تنش محیطی، تغییرات فصلی، وضعیت غذا و بلوغ جنسی قرار دارد. همچنین یکی از علل

¹ Chromaffin Cells

² Norepinephrine

- Ecophysiology and Occupational Health*, 7(3/4):151-162.
- Andrade-Porto, S.M., Affonso, E.G., Kochhann, D., Malta, J.C.O., Roque, R., Ono, E.A., Araújo, C.S.O. and Tavares-Dias, M. 2017.** Antiparasitic efficacy and blood effects of formalin on *Arapaima gigas* (Pisces: Arapaimidae). *Aquaculture*, 479: 38-44.
- Beevi, M.R. and Radhakrishnan, S., 1987.** Haematological effects of sublethal concentration of formalin on *Sarotherodon mossambicus* (Peters). *Proceedings: Animal Sciences*, 96(6): 721-725.
- Dodoo-Arhin, D., Bowen-Dodoo, E., Agyei-Tuffour, B., Nyankson, E., Obayemi, J.D., Salifu, A.A., Yaya, A., Agbe, H. and Soboyejo, W.O., 2021.** Modified nanostructured titanic photocatalysts for aquatic disinfection applications. *Materials Today: Proceedings*, 38: 1183-1190.
- Dorafshan, S., Kalbassi, M.R., Pourkazemi, M., Amiri, B.M. and Karimi, S.S., 2008.** Effects of triploidy on the Caspian salmon, *Salmo trutta caspius* haematology. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34(3): 195-200.
- Holladay, S.D., Smith, B.J. and Gogal Jr, R.M., 2010.** Exposure to formaldehyde at therapeutic levels decreases peripheral blood lymphocytes and hematopoietic progenitors in the pronephros of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Biology*, 10(3): 241-247.
- Houston, A., 1990.** Blood and Circulation. *Methods for Fish Biology*, 273 P.
- Jorgensen, M.E., Bjeregaard, P., Borch-Johnsen, K., Backer, V., Becker, U.,** در غلظت‌های مذکور، تأثیری بر شاخص‌های خون‌شناسی مورد بررسی نداشت. اگرچه در معرض قرارگیری ماهی با ترکیب فرمالین- متیلن بلو منجر به ایجاد تغییراتی در میزان کورتیزول و گلوکز پلاسما شده است که نشان‌دهنده اثرات منفی این ترکیبات به عنوان عامل تنش‌زا بر ماهیان مذکور است. با توجه به نتایج حاصل به نظر می‌رسد استفاده از فرمالین - متیلن بلو باید در کارگاه‌های پرورش ماهیان زینتی با احتیاط صورت گیرد. اگرچه فرمالین از جمله معهود ترکیبات مورد تایید سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) در آبی پروری است و در درمان بسیاری از بیماری‌ها حتی در سایر دام‌های پرورشی تأثیرگذار می‌باشد، اما همواره باید توجه داشت که ترکیبات ضد عفونی‌کننده ممکن است حاوی فلزات سنگینی همچون آلومینیوم یا مس باشند و از این نظر مشکلاتی را برای ماهی پرورشی و کاربر آن در شرایط کارگاهی ایجاد کنند. لذا، استفاده از آنها همواره باید با احتیاط صورت گیرد و بایستی محدودیت‌هایی در خصوص استفاده از آنها در مقیاس وسیع وجود داشته باشد.
- منابع**
- درافشان، س.، مخبر، م. و مخلص آبادی فراهانی، ا.، ۱۳۹۹. اثر گرسنگی کوتاه‌مدت بر برخی شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و بیوشیمیایی سرم ماهی پنگوسی شکاری (*Pangasius sutchi*). آبزیان زینتی، ۷(۳): ۹-۱۷.
- ملایم رفتار، ط.، پیغان، ر.، راضی جلابی، م. و شهریاری، ع.، ۱۳۹۷. بررسی اثر متقابل درمان با سولفات مس و یا فرمالین و مسمومیت نیتريت و آمونیاک بر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم خون ماهی کپور معمولی. دامپزشکی ایران، ۱۴(۱): ۷۰-۸۰.
- یادگاری، ن.، جوهری بابلی، م.، ستاری، ا. و پرویز سلاطی، ا.، ۱۳۹۰. اثر سولفات مس و فرمالین بر پارامترهای خونی ماهی بنی. تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی، ۳(۲): ۱۰۹-۱۱۶.
- Agrahari, S. and Gopal, K., 2007.** Fate and toxicity of cadmium and lead accumulation in different tissues (gills, liver, kidney, brain) of a freshwater fish, *Channa punctatus*. *Journal of*

- Jørgensen, T. and Mulvad, G., 2002.** Diabetes and impaired glucose tolerance among the Inuit population of Greenland. *Diabetes care*, 25(10): 1766-1771.
- Jung, S.H., Sim, D.S., Park, M.S., Jo, Q.T., Kim, Y., 2003.** Effects of formalin on haematological and blood chemistry in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research*, 34: 1269-1275.
- Khan, M.A., Roll, K.H. and Guttormsen, A., 2021.** Profit efficiency of Pangas (*Pangasius hypophthalmus*) pond fish farming in Bangladesh-The effect of farm size. *Aquaculture*, 539: 536-662.
- Kim, J.H., Sohn, S., Kim, S.K. and Hur, Y.B., 2020.** Effects on hematological parameters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by *Edwardsiella tarda*. *Fish & Shellfish Immunology*, 97: 194-203.
- Msukwa, A.V., Cowx, I.G. and Harvey, J.P., 2021.** Vulnerability assessment of Lake Malawi's ornamental fish resources to export ornamental trade. *Fisheries Research*, 238: 105869.
- Nieminen, M., Pasanen, P., Laitinen, M., 1983.** Effects of formalin treatment on the blood composition of salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 76: 265-269.
- Perera, H.A.C.C. and Pathiratne, A., 2008.** Enhancement of immune responses in Indian carp, *Catla catla*, following administration of levamisole by immersion. *Disease in Asian Aquaculture VI*, Fish Health Section, pp.129-142.
- Ren, M., Habte-Tsion, H.M., Xie, J., Liu, B.O., Zhou, Q., Ge, X., Pan, L. and Chen, R., 2015.** Effects of dietary carbohydrate source on growth performance, diet digestibility and liver glucose enzyme activity in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Aquaculture*, 438: 75-81.
- Salthammer, T., 2019.** Formaldehyde sources, formaldehyde concentrations and air exchange rates in European housings. *Building and Environment*, 150: 219-232.
- Saravanan, M., Kumar, K.P. and Ramesh, M., 2011.** Hematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3): 206-211.
- Sattang, S., Amornlerdpison, D., Tongsir, S., Palić, D. and Mengumphon, K., 2021.** Effect of freshwater fish oil feed supplementation on the reproductive condition and production parameters of hybrid catfish (*Pangasius larnaudii* x *Pangasianodon hypophthalmus*, Sauvage, 1878) broodstock. *Aquaculture Reports*, 20: 100-598.
- Smith, C.E. and Piper, G., 1972.** Histopathological effects of formalin treated Rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, 29: 328-329.
- Vanderzwalmen, M., McNeill, J., Delieuvin, D., Senes, S., Sanchez-Lacalle, D., Mullen, C.,**

- McLellan, I., Carey, P., Snellgrove, D., Foggo, A. and Alexander, M.E., 2021. Monitoring water quality changes and ornamental fish behavior during commercial transport. *Aquaculture*, 531: 735-860.
- Williams, H.A. and Wootten, R., 1981. Some effects of therapeutic levels of formalin and copper sulphate on blood parameters in rainbow trout. *Aquaculture*, 24: 341-353.
- Zhang, Y., Huang, Y., Kang, Y., Miao, J. and Lai, K., 2021. Selective recognition and determination of malachite green in fish muscles via surface-enhanced Raman scattering coupled with molecularly imprinted polymers. *Food Control*, 108-367.
- Zhao, B., Nakada, N., Itai, S., Hanamoto, S., Okumura, K. and Tanaka, H., 2020. Diurnal patterns of N-nitrosodimethylamine and formaldehyde behaviors in different seasons in surface water influenced by effluent from sewage treatment plants. *Journal of Hazardous Materials*, 383: 121-155.

Simultaneous exposure to Formalin and Methylene blue water-bath as a common disinfectant on haematological and stress parameters of ornamental *Pangasius hypophthalmus*

Dorafshan S.^{1*}; Paykan Heyrati F.¹; Mokhles Abady Farahany A.¹

*sdorafshan@iut.ac.ir

1- Department of Natural Resources, Isfahan University of Technology, Isfahan, 84156-83111, Iran

Abstract

Controlling ornamental fish disease has a key role in reducing treatment costs and improving growth and health status. Disinfectant solutions such as formalin (F) and methylene blue (MB) are some of the effective disinfectants in the aquaculture industry. In this study the effects of simultaneous exposure to F-MB on some haematological and plasma cortisol and glucose levels on ornamental catfish, *Pangasius hypophthalmus* were analyzed. 60 fish, average body weight 83.2 ± 12.67 g, were randomly chosen and put in two groups, control and F-MB, in 6 separate glass tanks (each 10 fish). The fish in the F-MB groups were exposed to formalin, 5 ppm and methylene blue, 4 ppm for 72 hours. After exposing time, blood was taken from the caudal vein and some haematological parameters plus plasma glucose and cortisol levels were analyzed. The results showed that exposing fish to F-MB disinfectant could not cause any significant changes in preliminary and secondary haematological parameters in fish ($P > 0.05$). Even though, fish in F-MB groups showed higher plasma levels of cortisol and glucose as tension indicators in comparison to the control fish ($P < 0.05$). It could be concluded that although simultaneous exposure to F-MB could not affect haematological parameters of ornamental catfish, it had some negative effects on tension response and need to use under exact stewardship. Study on the other fish welfare parameters as well as exposure to other disinfectants can help us to select the best option under culture condition.

Keywords: Formalin, Methylene blue, Glucose, Cortisol, Pangassius catfish