

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Robert PIKL

**UPORABA TANINA ZA PREPREČEVANJE RAZVOJA
PLESNI NA IKRAH ŠARENKE (*Oncorhynchus mykiss*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Robert PIKL

**UPORABA TANINA ZA PREPREČEVANJE RAZVOJA PLESNI NA
IKRAH ŠARENKE (*Oncorhynchus mykiss*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE INFLUENCE OF TANNIN ON THE GROWTH OF FUNGUS IN
RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) HATCHERY**

GRADUATION THESIS
University Studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. Delo je bilo opravljeno na Katedri za znanost o rejah živali na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, poskus pa je bil izveden v ribogojnici Pšata.

Komisija za dodiplomski študij je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Jurija Poharja.

Recenzent: prof. dr. Janez SALOBIR

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof.dr. Andrej LAVRENČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Janez SALOBIR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Jurij POHAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Robert Pikl

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 597.2/.5(043.2)=163.6
KG	ribe/postrvi//šarenka/ <i>Oncorhynchus mykiss</i> /ikre/plesni/Saprolegnia/tanin
KK	AGRIS L01/8130
AV	PIKL, Robert
SA	POHAR, Jurij (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2014
IN	UPORABA TANINA ZA PREPREČEVANJE RAZVOJA PLESNI NA IKRAH ŠARENKE (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	VII, 30 str., 14 pregl., 5 sl., 22 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Cilj raziskave je bil ugotoviti, ali lahko z uporabo tanina preprečimo razvoj plesni (<i>Saprolegnia</i>) na ikrah šarenke. Prvi poskus je potekal v dveh fazah. V prvi fazi smo uporabili posode za inkubacijo, v katerih smo ikre razdelili v tri skupine. Skupina tretirana s formalinom, z vodno raztopino Farmatana koncentracije 10 g/l in kontrolna skupina. V drugi fazi smo iz vsake skupine po tem, ko smo odstranili ikre prerasle s plesnijo in bele ikre, vzeli po 400 iker. Razdelili smo jih v dve skupini po 200 iker za boljši pregled nad poskusom. Ikre v drugi fazi poskusa nismo več tretirali s formalinom in vodno raztopino Farmatana, ampak smo jih do valjenja le opazovali. Pretok vode v valilnikih je bil konstanten 4 litre/minuto. Drugi poskus je bil razdeljen na dva dela, ki sta potekala vzporedno. Vsak del poskus je potekal v dveh koritih. Uporabili smo 2400 oplojenih iker. Te ikre smo razdelili v košarice po 200 iker. V enem koritu smo ikre tretirali z sredstvom za preprečevanje nastajanja plesni, drugo korito pa je bilo kontrolno korito, v katerem so ikre skozi celotni potek poskusa ostale nedotaknjene. Pretok vode je bil konstanten 4 l/min. Razlika med obema deloma poskusa je bila v sredstvu za preprečevanje nastajanja plesni. Pri prvem delu smo kot sredstvo uporabili vodno raztopino Farmatana koncentracije 10 g/l, pri drugem delu pa vodno raztopino preparata taninske kisline koncentracije 5 g/l. Nato smo ikre prelivali z vodnima raztopinama vsakič po 10 minut. Pri vsakem delu poskusa smo ikre prelili 11 krat. Po 21. dnevu smo prenehali s prelivanji. Na koncu obeh delov smo zabeležili število živali, ki so bile zdrave ter so splavale. Rezultati prvega poskusa so pokazali, da je Farmatan preprečil razvoj plesni in ni imel vpliva na valjenje in razvoj rib. Pri drugem poskusu so rezultati pokazali, da je preparat taninske kisline nekoliko boljše sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 597.2/.5(043.2)=163.6
- KG fish/rainbow trout/*Oncorhynchus mykiss*/fish eggs/fungus/Saprolegnia/tannin
- CC AGRIS L01/8130
- AU PIKL, Robert
- AA POHAR, Jurij (mentor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
- PY 2014
- TI THE INFLUENCE OF TANNIN ON THE GROWTH OF FUNGUS IN RAINBOW TROUT (*Oncorhynchus mykiss*) HATCHERY
- TD Graduation thesis (University studies)
- NO VII, 30 p., 14 tab., 5 fig., 22 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The aim of our experiment was to determine the effect of tannin on the growth of *Saprolegnia* in rainbow trout eggs. The first experiment was carried out in two successive cycles. In phase one we used three tanks for egg incubation. The tanks were treated with formalin, Farmatan in concentration of 10 g/l and the last one was a control tank. At phase two we took 400 eggs from each tank. All eggs were inspected (there were no white eggs or infected eggs with *Saprolegnia*). For the better overview of development we formed two groups of 200 eggs. In phase two we stopped with the treatment and we only observed the eggs until they started to hatch. The water flow was constant of 4 l/min. The experiment two was carried out in two parts. Each part was held in two California incubators. We used 2400 fertilized eggs. The difference between parts of experiments was in the agent we used. In first part we used water solution of Farmatan (concentration 5 g/l) and in second part we used water solution of tannin acid (concentration 5 g/l). Eggs were treated for 10 minutes. Each part of experiment was treated eleven times. We stopped the treatments on 21st day. At the end of both parts of experiment we counted all animals which were healthy. Results of the first experiment indicate that Farmatan treatment prevents the growth of *Saprolegnia* and does not harm the fish. With the second experiment we proved that tannin acid is a bit better agent to prevent growth of *Saprolegnia* in trout eggs compared to Farmatan.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 METODE PREPREČEVANJA NASTAJANJA PLESNI NA IKRAH	3
2.2 TANIN	8
2.2.1 Vrste tanina	9
3 MATERIALI IN METODE	10
3.1 MATERIAL, OPREMA	10
3.1.1 Sestava preparata Farmatan 75	12
3.1.2 Sestava preparata taninske kisline.....	13
3.2 PRIPRAVA IN POTEK PRVEGA POSKUSA	14
3.3 PRIPRAVA DRUGEGA POSKUSA	16
3.4 IZRAČUN DELEŽA PREBRANIH IKER IN PREŽIVETJA.....	19
4 REZULTATI.....	20
4.1 REZULTATI PRVEGA POSKUSA	20
4.2 REZULTATI DRUGEGA POSKUSA.....	21
4.2.1 Rezultati dela poskusa s Farmatanom.....	21
4.2.2 Rezultati dela poskusa s preparatom taninske kisline	22
5 RAZPRAVA.....	24
6 SKLEPI	26
7 POVZETEK.....	27
8 VIRI	28
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Načini uporabe zelenega malahita (vsak drugi dan, tedensko in s formalinom) z deleži izvaljenih iker ter splvanih rib, ter število prelivanj in vsebnosti malahita v vzorcih	3
Preglednica 2: Vpliv koncentracije formalina na odstotek izvalitve	5
Preglednica 3: Vpliv koncentracije vodikovega peroksida na odstotek izvalitve	5
Preglednica 4: Vpliv formalina, vodikovega peroksida in soli na odstotek izvalitve	6
Preglednica 5: Vpliv koncentracije ozona na odstotek izvalitve	7
Preglednica 6: Vpliv koncentracije ozona in formalina na odstotek izvalitve	7
Preglednica 7: Kemijska sestava po navedbi proizvajalca – Farmatan 75	13
Preglednica 8: Kemijska sestava preparata taninske kisline po navedbi proizvajalca izdelka	13
Preglednica 9: Masa ter odstotek prebranih iker iz pretočnih posod za inkubacijo 21. dan po oploditvi	20
Preglednica 10: Število in odstotek rib, ki so splavale	20
Preglednica 11: Število in odstotek izvaljenih iker pri tretiranju iker s Farmatanom	21
Preglednica 12: Število in odstotek rib, ki so splavale pri prelivanju iker s Farmatanom	22
Preglednica 13: Število in odstotek izvaljenih iker tretiranih s taninsko kislino	22
Preglednica 14: Število in odstotek rib, ki so splavale pri prelivanju iker s taninsko kislino	23

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Pretočna posoda za inkubacijo	11
Slika 2: Kalifornijski valilnik razdeljen z manjšima košaricama	12
Slika 3: Shema poteka prvega poskusa	15
Slika 4: Shema poteka poskusa s Farmatanom	17
Slika 5: Shema poteka poskusa s preparatom taninske kisline	18

1 UVOD

Prisotnost vodnih glivičnih okužb pri ikrah in zarodu povzroča velike probleme v ribogojstvu pri nas in po svetu. V ribogojstvu poznamo več vrst glivičnih okužb. V največji meri prisotna povzročiteljica težav je skupina gliv iz rodu *Saprolegnia* (v nadaljevanju *saprolegnija*). *Saprolegnija* prihaja iz vrst fakultativnih parazitov, ki se naselijo na gostitelju in tam živijo vse dokler gostitelj ne umre. Medtem pa se lahko razširi še na ostale živali, ki živijo v bližini obolele živali. *Saprolegnija* se rada naseli tudi na poškodovane in odmrle ikre. S poškodovanih in odmrlih iker se nato zelo hitro razširijo tudi na zdrave ikre, ki so v neposredni bližini okuženih iker.

Saprolegnija pri ikrah se običajno pojavi kot vati podobna, bela do temno siva ali rjava rast, ki postopoma preraste celotno površino ikre. Takšna okužba lahko brez hitrega in učinkovitega preprečevanja razvoja okužbe povzroči izgubo velikega števila iker. V preteklosti je bilo najučinkovitejše sredstvo v boju proti *saprolegniji* zeleni malahit. Uporabljali so ga tako za preprečevanje nastajanja plesni na ikrah kot tudi za zdravljenje obolelih rib. Leta 1991 je FDA (Food and Drug Administration) v Ameriki prepovedal uporabo zelenega malahita v ribogojstvu zaradi njegovih teratoloških učinkov. Od takrat in vse do danes se kot sredstvo proti okužbam uporablja formalin. Formalin je vodna raztopina formaldehida, ki je brezbarven plin ostrega vonja in je dobro topen v vodi. Je vmesni produkt pri oksidaciji metana in drugih ogljikovih spojin. Industrijsko se proizvaja s katalitsko oksidacijo metanola.

Vendar pa naj bi bil formalin po nekaterih podatkih zelo strupen. Je zelo hlapen, zato lahko njegovo vdihavanje prizadene in poškoduje dihalne poti pri človeku (www.epa.gov). V večjih količinah pa je lahko tudi strupen za ribe (Marking in sod., 1994). Zato bo njegova uporaba verjetno v naslednjih letih omejena oziroma celo prepovedana.

V sladkovodnem ribogojstvu je torej potrebno najti nova sredstva proti glivičnim okužbam, ki so učinkovita in hkrati nimajo vpliva na živali ter na okolje in ljudi, ki v takšnem okolju delujejo.

V svetu so za zaščito ribjih iker pred saprolegnijo preizkušali različne spojine. Vendar pa rezultati ne kažejo boljših ali pa vsaj podobnih rezultatov, kot so jih dosegali z zelenim malahitom in sedaj z formalinom.

Z našo raziskavo smo hoteli ugotoviti, kakšen vpliv ima tanin, kot eno izmed možnih sredstev pri preprečevanju nastajanja glivičnih okužb pri ikrah ameriške postrvi. V poskusu smo učinkovitost formalina primerjali z učinkovitostjo taninske kisline in ekstrakta lesa pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) Farmatan 75 (v nadaljevanju Farmatan).

Delovna hipoteza raziskave je bila, da sta Farmatan in taninska kislina kot razkužilni sredstvi za tretiranje postrvjih iker v določenih koncentracijah učinkovitejša kot formalin.

2 PREGLED OBJAV

2.1 METODE PREPREČEVANJA NASTAJANJA PLESNI NA IKRAH

Malahit

Nowak in de Guingand (1997) sta se ukvarjala s preventivnim zdravljenjem z zelenim malahitom in formalinom v zgodnji fazi pri postrvih. Želela sta določiti učinkovitost ter toksičnost zelenega malahita in količino malahita, ki se zaradi zdravljenja naloži v meso rib. Oplojene ikre sta preštela in jih položila v valilnike, tako da je bilo v vsakem valilniku po 300 iker. Ikre so bile zdravljene z zelenim malahitom brez dodanega cinka. Formalin pa sta pred uporabo filtrirala, da sta zmanjšala toksičnost.

Nowak in de Guingand (1997) sta uporabila štiri skupine: kontrolna skupina, zeleni malahit koncentracije 5 mg/l (prelivanje za eno uro vsak drugi dan), zeleni malahit koncentracije 5 mg/l (eno urno prelivanje enkrat tedensko), ter zeleni malahit / formalin koncentracije 0,08/25 mg/l (eno urno prelivanje vsak drugi dan). Prelivanja so se začela takoj po oploditvi iker. Od faze razvoja, ki jo poimenujemo faza »iker z očmi« so mrtve ikre odstranjevali, da bi preprečili širitev saprolegnije na zdrave ikre. Dobila sta naslednje rezultate predstavljene v tabeli 1.

Preglednica 1: Načini uporabe zelenega malahita (vsak drugi dan, tedensko in s formalinom) z deleži izvaljenih iker ter splavanih rib, ter število prelivanj in vsebnosti malahita v vzorcih (Nowak in de Guingand 1997)

	Kontrola	Zeleni malahit (vsak drugi dan)	Zeleni malahit (enkrat tedensko)	Zeleni malahit/ formalin
Izvaljene (%)	93,8	51,9	68,7	94,9
Splavale (%)	71,9	47,2	57,8	84,9
Število prelivanj	0	20	6	20
Vsebnost malahita v vzorcu iker (mg/kg)	0	0,34	0,18	0,014

Iz preglednice 1 je razvidno, da sta največji odstotek izvaljenih iker dosegla pri skupini, kjer sta bila zmešana zeleni malahit in formalin in sicer 94,9 %, sledila je kontrola s 93,8 %. Obe skupini, kjer sta uporabila 5 ml/l zelenega malahita (vsak drugi dan in enkrat tedensko) sta precej zmanjšali odstotek izvaljenih iker. Najslabši odstotek izvaljenih iker,

in sicer 51,9 %, pa je dosegla skupina, v kateri so zeleni malahit prelivali vsak drugi dan. Največji odstotek rib, ki so splavale je dosegla skupina zeleni malahit/formalin (84,9 %), sledila je kontrola s 71,9 %. Najslabši rezultat pa sta zopet pridobila pri zelenem malahitu uporabljenemu vsak drugi dan in sicer 47,2 %.

Zdravljenje je imelo statistično značilne učinke na vsebnost zelenega malahita v telesu zaroda. Skupina tretirana z zelenim malahitom/formalinom je vsebovala znatno nižje ravni zelenega malahita v njihovih telesih (0,014 mg/kg) kot skupini, kjer sta uporabila samo malahit. Obe skupini sta imeli od deset do petindvajset krat večjo vsebnost (skupina zdravljena vsak drugi dan 0,34 mg/kg in skupina enkrat tedensko 0,18 mg/kg) kot skupina zeleni malahit/formalin. Kontrolna skupina pa ni vsebovala nobenih zaznanih vsebnosti zelenega malahita. S tem sta dokazala, da je bila prepoved uporabe zelenega malahita upravičena, saj se nalaga v mesu živali.

Formalin, vodikov peroksid, natrijev klorid

Schreier in sod. (1995) so preučevali učinkovitost formalina, vodikovega peroksida in natrijevega klorida na s saprolegnijo okužene postrvje ikre. Poskus je potekal v treh delih. V prvem poskusu so ocenjevali učinkovitost formalina pri treh koncentracijah; uporabili so koncentracije 500, 1000 in 1500 $\mu\text{l/l}$. V drugem poskusu so ocenjevali učinkovitost vodikovega peroksida pri uporabljenih koncentracijah 100, 250 in 500 $\mu\text{l/l}$. Pri tretjem poskusu pa so primerjali tri komponente med seboj; formalin s koncentracijo 1500 $\mu\text{l/l}$, vodikov peroksid s koncentracijo 1000 $\mu\text{l/l}$ in sol s koncentracijo 30000 mg / l. Pred začetkom izvajanja poskusa so število okuženih iker v vseh proučevanih skupinah izenačili na 10 %, tako da so iz valilnikov, ki so imeli večje število okuženih iker predstavili okužene ikre v valilnike z manjšim odstotkom okuženih iker. Oblikovali so tudi skupino, v kateri ni bilo nobene ikre okužene s plesnijo. Oblikovali so tudi kontrolno skupino, to je skupino, ki je niso zdravili z nobenim od preparatov. Rastopine z določenimi spojinami so vlili v valilnike z ikrami vsak drugi dan za 15 minut vse dokler se ikre niso začele valiti.

Preglednica 2: Vpliv koncentracije formalina na odstotek izvalitve (Schreier in sod., 1995)

Koncentracija formalina ($\mu\text{l/l}$)	Odstotek izvaljenih iker (%)
Neokužene ikre	
0 (kontrola)	89,1
500	88,8
1000	90,2
1500	89,6
Okužene ikre	
0 (kontrola)	23,8
500	56,2
1000	74,3
1500	83,9

Rezultati vpliva različnih koncentracij formalina so prikazani v preglednici 2, vpliva različnih koncentracij vodikovega peroksida v Preglednici 3, rezultati primerjave treh učinkovin pa v Preglednici 4. Odstotki izvaljenih iker v primeru, ko so neokužene ikre tretirali z različnimi koncentracijami formalina, so bili precej podobni. V vseh skupinah se je gibal med 88,8 in 90,2 %. Preprečevanje nastajanja plesni s formalinom pri ikrah, okuženih s plesnijo, se je izboljševalo z večanjem koncentracije formalina. Najnižji odstotek izvalitve so zabeležili pri najmanjši koncentraciji 500 $\mu\text{l/l}$ (56,2 %), največje število izvaljenih iker (83,9 %) pri koncentraciji 1500 $\mu\text{l/l}$ formalina. Najmanjši odstotek iker se je izvalil v skupini, ki ni bila zdravljena (23,8 %).

Preglednica 3: Vpliv koncentracije vodikovega peroksida na odstotek izvalitve (Schreier in sod., 1995)

Koncentracija vodikovega peroksida ($\mu\text{l/l}$)	Odstotek izvaljenih iker (%)
Neokužene ikre	
0 (kontrola)	95,6
100	95,1
250	95,5
500	95,3
Okužene ikre	
0 (kontrola)	50
100	56,1
250	64,6
500	80

Pri poskusu z vodikovim peroksidom je bil odstotek izvaljenih iker v skupini iker, ki niso bile okužene s saprolegnijo visok. Pri vseh skupina je bil višji od petindevetdeset

odstotkov. Odstotek izvaljenih iker okuženih z 10 % plesnijo se je višal z višanjem koncentracije vodikovega peroksida. Najnižji odstotek iker se je izvalil pri koncentraciji 100 µl/l (izvaljenih 56,1%), pri koncentraciji 250 µl/l se je izvalilo 64,6 %. Največ iker se je izvalilo pri koncentraciji 500 µl/l vodikovega peroksida (80,0 %). Odstotek pri kontrolni skupini (skupini, ki je bila okužena in ni bila zdravljena) je bil 50,0 %.

Preglednica 4: Vpliv formalina, vodikovega peroksida in soli na odstotek izvalitve (Schreier in sod., 1995)

Način preprečevanja okužbe	Koncentracija	Odstotek izvaljenih iker (%)
Neokužene ikre		
kontrola	0	90,6
formalin (µl/l)	1500	88,9
H ₂ O ₂ (µl/l)	1000	90,6
sol mg/l	30000	86,6
Okužene ikre		
kontrola	0	27,3
formalin (µl/l)	1500	73,5
H ₂ O ₂ (µl/l)	1000	68,3
sol mg/l	30000	60,3

Iz preglednice 4 je razvidna primerjava vpliva formalina, vodikovega peroksida in soli pri ikrah, ki niso bile predhodno okužene s saprolegnijo. Vidimo lahko, da ni večjih razlik v odstotku izvaljenih iker. Odstotek izvalitve se je gibal med 86,6 in 90,6 % in se praktično ni razlikoval od odstotka izvalitve v skupini, ki ni bila tretirana. Poskus, kjer so bile ikre predhodno okužene z 10 % plesni, je pokazal, da so vse tri raztopine za zdravljenje bistveno izboljšale odstotek izvalitve iker v primerjavi s kontrolo. Formalin in vodikov peroksid sta v veliki meri preprečila širjenje plesni na zdrave iker. Natrijev klorid ni bil tako učinkovit, kot ostali dve raztopini.

Ozon

Leta 2002 so Forneris in sodelavci raziskovali vpliv ozona (O₃) kot sredstva za preprečevanje okužbe iker s saprolegnijo pri postrvjih ikrah. Napravo za proizvodnjo ozona so opremili z instrumentom za merjenje koncentracije ozona, ki so ga dovajali neposredno v valilnike. Poskus je potekal v dveh delih. Ikre so inkubirali v manjših košarah vstavljenih v pet kalifornijskih valilnikov. Dovajanje ozona so prekinili takoj po

začetku valjenja iker. Ikre so pregledovali dnevno. Tiste, ki so bile okužene, so prešteli in odstranili. Vpliv ozona so primerjali z vplivom formalina.

Prvi del poskusa se je začel dva tedna po inkubaciji iker, ko se je začela pojavljati okužba s saprolegnijo. Ozon in formalin so dodajali vsak drugi dan za 10 do 15 minut. Pri prvem delu poskusa so uporabili 4 različne koncentracije ozona in eno koncentracijo formalina. Vsaka skupina pa je imela pet ponovitev. Dobili so rezultate, ki jih prikazujemo v preglednici 5.

Preglednica 5: Vpliv koncentracije ozona na odstotek izvalitve (Forneris in sod. 2002)

Skupina	Koncentracija O ₃ (ppm)	Odstotek izvaljenih iker (%)
1	0 (kontrola)	9
2	0,01	42,6
3	0,03	47,3
4	0,2	49,1
5	formalin (1-2 ml/l)	58,6

Drugi del poskusa se je začel naslednji dan po oploditvi iker. Ozon in formalin so dodajali za 10 do 15 min vsak dan, z izjemo koncentracije 0,01 ppm ozona, kjer so ozon dodajali vsak drugi dan. Tretiranje s formalinom so izvajali na enak način kot v prvem delu poskusa. Tretirali so jih v petih skupinah in z različnimi koncentracijami ozona in formalina. Vsaka skupina pa je imela pet ponovitev, dobili so rezultate, ki jih prikazujemo v preglednici 6.

Preglednica 6: Vpliv koncentracije ozona in formalina na odstotek izvalitve (Forneris in sod, 2002)

Skupina	Koncentracija O ₃ (ppm)	Odstotek izvaljenih iker (%)
1	0,01 vsak drugi dan	44
2	0,01	57,6
3	0,1	69,4
4	0,3	39,5
5	formalin (1-2 ml/l)	74,7

Rezultati kažejo, da je bil v obeh delih poskusa najbolj učinkovit formalin. Ikre brez tretiranja so bile močno okužene s saprolegnijo in so se izvalile le v 9 % primerih.

Iz rezultatov drugega dela poskusa je razvidno, da je najnižji odstotek izvalitve dosegla četrta skupina, kjer je bila koncentracija ozona 0,3 ppm dnevno. V tej skupini se je izvalilo 39,5 % iker. Odmerek 0,3 ppm za 10 minut vsak dan pa je bil očitno nad pragom toksičnosti.

Na splošno so rezultati drugega poskusa, ko so ozon uporabljali dnevno, precej boljši, kot rezultati uporabe ozona vsak drugi dan. To je lahko posledica dejstva, da se je razkuževanje iker z ozonom začelo že takoj pri inkubaciji iker v valilnike in je ozon deloval preventivno že pred začetkom razvoja saprolegnije na ikrah. Odmerek 0,1 ppm vsak dan kaže podoben učinek na ikre, kot formalin pri preprečitvi okužbe s saprolegnijo pri postrvjih ikrah.

2.2 TANIN

Tanini so rastlinski polimeri sestavljeni iz fenolnih enot. Zaradi spremenljivega števila monomernih enot je najmanjša molekulska masa okoli 500, največje molekulske mase pa so večje od 20000. Tanini so na splošno topni v vodi, njihova topnost se lahko spreminja z večanjem molekulske mase. Molekulam z veliko molekulsko maso je topnost močno omejena (Lavrenčič, 2001). Zaradi velikega števila hidrosilnih skupin tvorijo tanini različne vrste vezi z beljakovinami (encimi), aminokislinami, ogljikovimi hidrati, kovinskimi ioni in vitamini (Makkar, 2003; Butter in sod., 1999).

S tanini so rastline zaščitene pred patogenimi mikroorganizmi ter pred gnitjem. Tanine najdemo v drevesih (lesu, plodovih, lubju, listju in koreninah) (Scalbert, 1991). Vsebnost in struktura taninov se med rastlinskimi vrstami razlikuje. Večje količine taninov vsebujejo tudi semena nekaterih rastlin, ki jih ne uvrščamo med drevesa. Lahko jih najdemo v različnih krmilih, v žitu (sirek, ječmen, proso), metuljnicah (lucerna, črna in plazeča detelja, bob, fižol, grah, leča...) in ogrščici (Jansman, 1993; Jansman in Longstaff, 1993; Chung in sod., 1998b). Na vsebnost taninov v rastlini in njihovo kemijsko strukturo vplivajo zrelost rastlin, okolje, stresni dejavniki. Najbolj pomembni pa so rastni dejavniki (temperatura, količina padavin, vsebnost hranil v tleh) (Jansman, 1993). Tanini imajo adstringen (trpek) okus, ki zmanjšuje okusnost ter zauživanje krme (Butter in sod., 1999; Kumar in Vaithyanathan, 1990).

2.2.1 Vrste tanina

Tanini se delijo v skupine glede na vsebnost sladkorjev, stopnjo polimerizacije in esterifikacije. Tako ločimo kondenzirane, hidrolizirajoče in kompleksne tanine (Aguilera-Carbo in sod., 2008). Natančne oziroma poenotene definicije taninov ni oziroma je le-ta po mnenju določenih avtorjev preveč poenostavljena (Jansman, 1993; Mueller-Harvey, 1999), Osnovna struktura kondenziranih taninov je zgrajena iz flavanov, hidrolizirajoči tanini pa so sestavljeni iz molekule galne kisline vezane na sladkor (Mueller-Harvey, 1999). Znano je veliko primerov, kjer so v spojinah združene molekule tako kondenziranih kot hidrolizirajočih taninov (Mueller-Harvey, 1999). Kondenzirani in hidrolizirajoči tanini se med seboj razlikujejo po reakcijah, ki so odvisne od dostopnosti fenolne skupine in prostorske konfiguracije molekul (Mangan, 1988).

3 MATERIALI IN METODE

Poskus je bil izveden v ribogojnici Pšata. Ribogojnica Pšata leži ob vznožju Krvavca in ob istoimenskem potoku Pšata. Potok Pšata je kraški izvir. Voda ima skozi vse leto konstantno temperaturo, ki je približno 10 °C. Kakovost vode se spreminja ob večjih neurjih in obilnih padavinah. Takrat postane voda motna in prinaša manjše delce iz struge.

3.1 MATERIAL, OPREMA

Za poskus smo uporabili ekstrakt lesa pravega kostanja (*Castanea sativa* Mill.) Farmatan proizvajalca Tanin Sevnica in taninsko kislino proizvajalca Merck. Tako Farmatan kot taninska kislina sta v trdni obliki (prah). V našem poskusu smo uporabljali vodno raztopino obeh učinkovin. Uporabljali smo tudi plastične posode za raztapljanje preparatov, posodo za prelivanje vodne raztopine, štoparico, tehtnico, ploščico za štetje iker.

Za inkubacijo iker v začetni fazi smo uporabili pretočne posode za inkubacijo (slika 1). To so posode ovalne oblike. Uporabljajo se za inkubacijo velikega števila iker. Pritok vode je urejen skozi cev s spodnje strani posode, tako da voda enakomerno prehaja iz dna posode do vrha in obliva ikre. Pomembno je, da pretok vode ni premočan, saj morajo ikre v začetni fazi inkubacije mirovati. Pri izvajanju poskusa smo v cev, skozi katero priteka voda, injicirali vodno raztopino Farmatana in formalina v določenih odmerkih.



Slika 1: Pretočna posoda za inkubacijo (foto: R. Pikl, 2012)

Po končani inkubaciji večjega števila iker v inkubacijskih posodah smo dali ikre v tako imenovane pretočne kalifornijske valilnike. To so podolgovata plastična korita, dolga približno tri metre in globoka 20 centimetrov. Izdelana so tako, da je v njih pretok vode konstanten in so ikre vseskozi v vodi. V korita smo nato vstavili manjše posode (valilnike) za lažji pregled in nadzor nad ikrami. Ti valilniki so zasnovani tako, da voda teče enakomerno skozi, pretok uravnavamo z odpiranjem ali zapiranjem pipe. Dno posode in stranica valilnika sta luknjičasta, zaradi pretoka vode. Luknjice pa so zelo majhne, tako da se ikre ne poškodujejo ali padejo skozi. Da pa smo si delo še nekoliko olajšali in dobili še boljši pregled nad poskusom, smo ikre znotraj valilnika razdelili še z manjšimi košaricami (slika 2).



Slika 2: Pretočni kalifornijski valilnik razdeljen z manjšima košaricama (foto: R. Pikl, 2012)

Za prelaganje iker smo uporabili večje in manjše cedilo. Manjše cedilo smo na koncu poskusa potrebovali tudi za štetje izvaljenih iker. Za prebiranje iker, smo uporabljali pincete in pipete. Na pipete smo pritrdili gumijasto cev in tako z učinkom sesanja iz valilnikov prebirali ikre.

3.1.1 Sestava preparata Farmatan 75

Farmatan je naravni izvleček lesa pravega kostanja (*Castanea Sativa Mill*). Je zmes etrsko in glikozidno vezanih taninov, ki vsebuje 75 % hidrolizirajočih taninov in 15 % enostavnih sladkorjev. Farmatan se uporablja kot dodatek h krmi in je naravni antioksidant. Znano je njegovo antimikrobno delovanje na številne mikroorganizme (Farmatan ..., 2013).

Preglednica 7 : Kemijska sestava po navedbi proizvajalca izdelka – Farmatan 75

Parametri	Enota	Metoda	Vsebnost
Aktivna komponenta - Tanin	%	Filter metoda Freiberg	73 ± 2
Ogljikovi hidrati (sladkorji)	%	Filter metoda Freiberg	18 ± 2
Netopno	%	Filter metoda Freiberg	do 2
Voda	%	Filter metoda Freiberg	6 ± 2
pH (10 % raztopine)			3,3± 0,25

3.1.2 Sestava preparata taninske kisline

Taninska kislina je rumen prah. Kemijsko je taninska kislina penta-m-digalo-glukoza z visoko molekulsko maso. Je hidrolizirajoči tanin, ki ga pridobivajo iz hrastovih šišek. Taninska kislina se raztaplja v etanolu (100 mg/ml), vodi (2,8 g/ml), topnem glicerolu in acetonu (1 mg/ml). Raztopina je bistra in rumeno rjave barve. V benzenu, kloroformu, etru, petrol etru, ogljikovem disulfidu in ogljikovem tetrakloridu se taninska kislina ne topi (Product Information, 2003)

Preglednica 8: Kemijska sestava taninske kisline po navedbi proizvajalca izdelka

Opis parametri	Enota	Vsebnost
Voda	%	20
Težke kovine - Arzen	%	≤ 0.0003
Težke kovine - Svinec	%	≤ 0.004
Pepel žvepla	%	≤ 0.1
Izgube ob izsušitvi pri 105 ⁰ C	%	≤ 0.2

3.2 PRIPRAVA IN POTEK PRVEGA POSKUSA

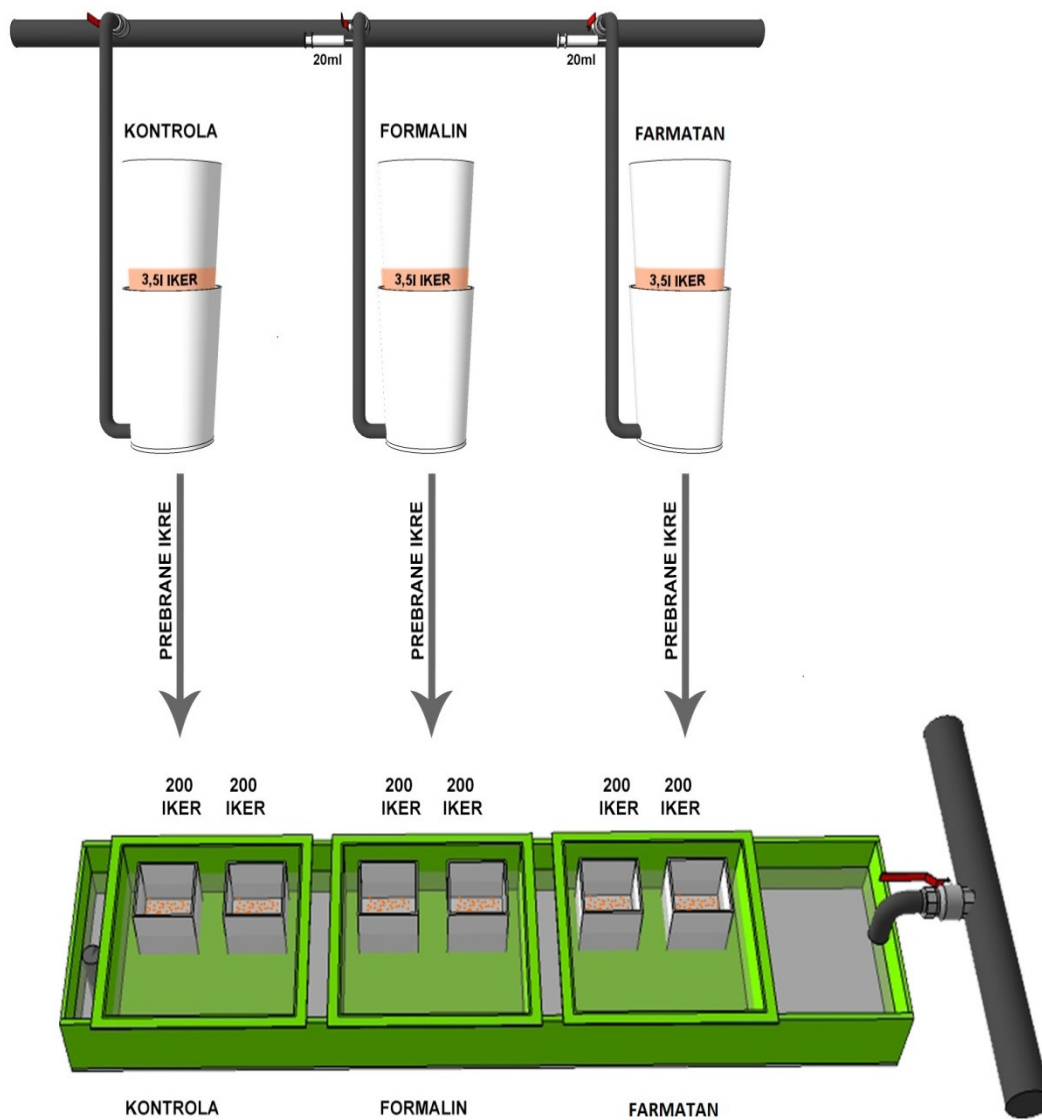
Prvi poskus je potekal v dveh fazah. V prvi fazi poskusa smo ikre inkubirali v inkubacijskih posodah. Uporabili smo 10,5 litra oplojenih iker kalifornijske postrvi. Ikre smo razdelili v tri skupine: (1) kontrola brez tretiranja iker; (2) skupina tretirana s formalinom; (3) skupina tretirana z vodno raztopino Farmatana. V vsaki skupini je bilo po 3,5 l oplojenih iker. Teža 3,5 l iker je znašala 2.800g. V inkubacijskih posodah je bil konstanten pretok vode 4 l/min.

Pri poskusu smo kot sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni uporabili formalin oziroma vodno raztopino Farmatana (koncentracija 10 g/l), ki smo ju injicirali skozi cev za dotok vode v posodo (2) oziroma posodo (3). Posodo (1) pa smo pustili nedotaknjeno. Raztopini smo injicirali z odmerkom 60 ml/dan. To smo ponavljali 21 dni.

Po 21 dnevu smo ikre pregledali in prebrali. Ikre prerasle s plesnijo in bele ikre (ikre, ki so bile neoplojene ali v katerih je zarodek zamrl) smo odstranili. Ostale ikre iz vsake skupine smo stehtali.

V drugi fazi poskusa smo iz vsake skupine po odstranitvi iker preraslih s plesnijo in belih iker, vzeli po 400 iker, ki smo jih namestili v tri pretočne kalifornijske valilnike. Vsaka skupina je imela po dve ponovitvi; v ta namen smo v vsak valilnik vstavili po dve manjši košari, v katere smo namestili po 200 iker, za boljši pregled in lažje opazovanje poskusa.

Iker v drugi fazi poskusa nismo več tretirali z raztopino Farmatana ali formalina, ampak smo jih do valjenja samo opazovali. V valilnikih je bil pretok vode 4 l/min. Dnevno smo le odstranjevali in beležili plesnive, neoplojene in kakorkoli poškodovane ikre. Po pričetku valjenja smo odstranili tudi poškodovane larve (tako imenovane spačke). Tako smo na koncu dobili število zdravih rib, ki so splavale.



Slika 3: Shema poteka prvega poskusa

3.3 PRIPRAVA DRUGEGA POSKUSA

Drugi poskus je bil dejansko razdeljen na dva dela, ki sta potekala vzporedno. Pri obeh delih so bili zagotovljeni enaki pogoji za izvedbo.

Vsak del poskusa je potekal v dveh koritih. V enem koritu smo ikre tretirali s sredstvom za preprečevanje nastajanja plesni, v drugem koritu, ki je predstavljal kontrolo, smo ikre pustili nedotaknjene.

Pretok vode je bil konstanten in je znašal 4 l/min. Razlika med obema deloma poskusa je bila v sredstvu, ki smo ga uporabili za preprečevanje nastajanja plesni. Pri prvem delu poskusa smo kot sredstvo uporabili vodno raztopino Farmatana, pri drugem delu pa vodno raztopino preparata taninske kisline.

Prvi del poskusa s Farmatanom

Pri prvem delu poskusa smo kot sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni uporabili vodno raztopino Farmatana. V vsako korito smo postavili po tri pretočne kalifornijske valilnike. Valilnike pa smo še dodatno razdelili z manjšimi košaricami za boljši pregled. Tako smo v vsakem valilniku dobili dve ponovitvi.

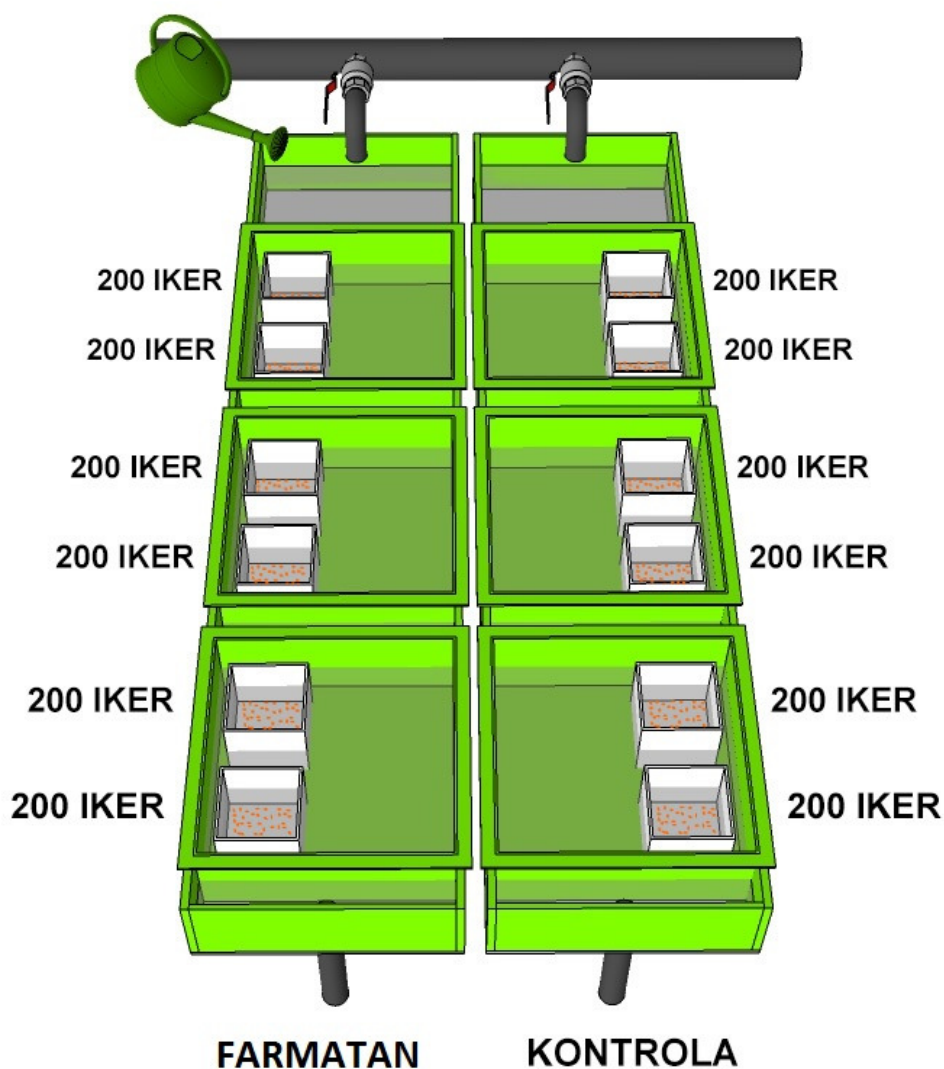
V vsako košarico smo dali 200 oplojenih iker, skupaj 2.400 iker. Prvo korito je bilo kontrolno korito (kontrola) brez tretiranja iker. To korito smo skozi celotno trajanje poskusa pustili nedotaknjeno. Drugo korito (Farmatan) pa je bilo korito, v katerega smo vnašali vodno raztopino Farmatana (slika 4). Ikre smo z vodno raztopino Farmatana tretirali vsak drugi dan. Z vodno raztopino so bile ikre tretirane vsakič po 10 minut, koncentracija Farmatana je bila 10 g/l. Takšno koncentracijo smo dosegli tako, da smo v koritu za 10 minut zaprli dotok vode in v tem času enakomerno vlivali 40 litrov vode, v kateri smo raztopili 400 g Farmatana. Po pretečenem času 10 minut smo dotok vode zopet odprli.

Prelivanje smo izvajali vsak drugi dan od dneva oploditve do 21 dneva, ko smo ikre zadnjič prelili. Skupaj smo jih prelili 11 krat. Po 21 dnevu smo prenehali s kopanjem (tretiranjem) iker, ker se je začelo valjenje. Takrat smo ikre pregledali, zabeležili število

plesnivih iker in iker, ki niso bile oplojene ali v katerih je zarodek zamrl. Te ikre smo odstranili. Enako smo storili tudi v koritu s kontrolno skupino.

Pri valjenju smo vseskozi spremljali spremembe, ki so se dogajale v valilnikih. Beležili smo število plesnivih in neoplojenih iker, ki smo jih dnevno odstranjevali. To smo počeli, dokler se niso izvalile vse ikre.

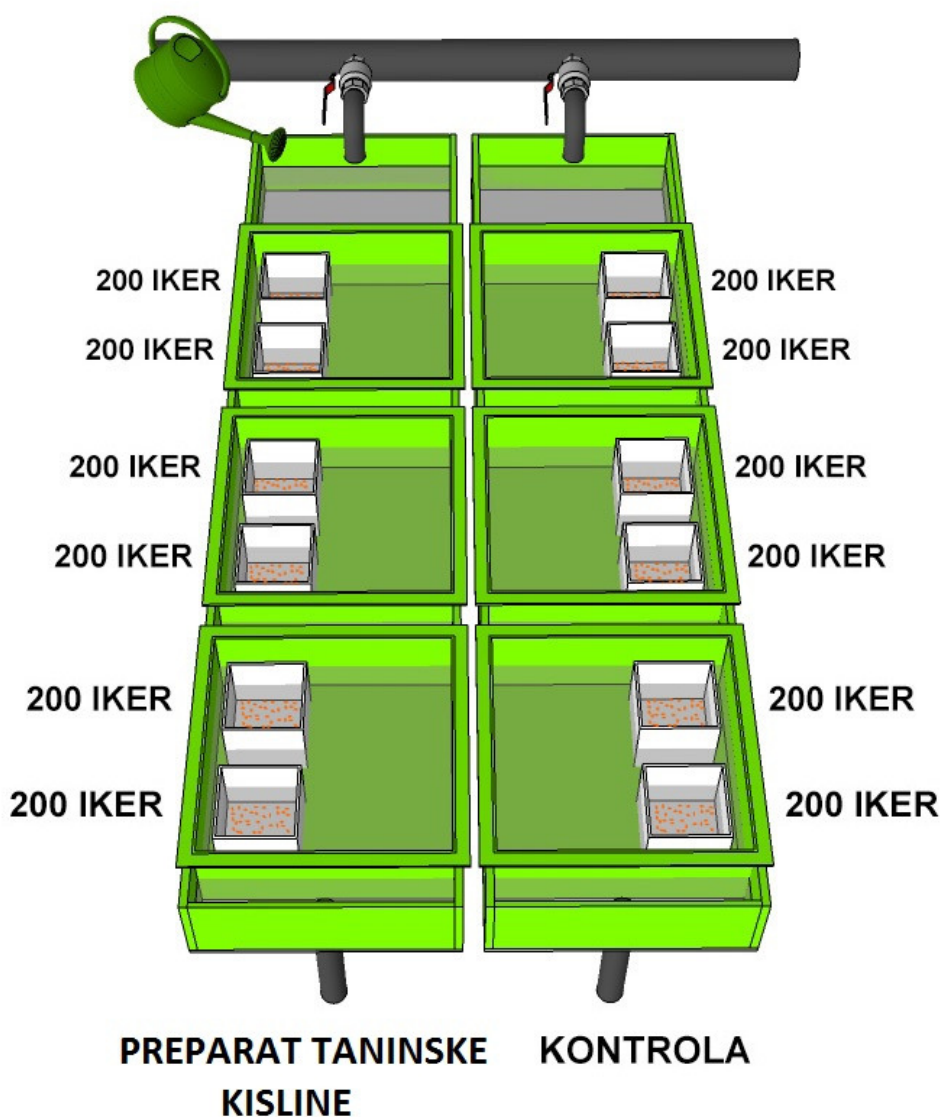
Po končanem valjenju smo še vedno spremljali spremembe, ki so se dogajale v valilnikih in beležili število larv, ki smo jih izločili. Te larve niso bile dokončno izvaljene, plesnive ali bolne. Na koncu smo prešteli ribe, ki so splavale.



Slika 4: Shema poteka poskusa s Farnatanom

Drugi del poskusa s preparatom taninske kisline

Izvedba dela poskusa s preparatom taninske kisline je bila enaka kot pri Farmatanu le, da smo zamenjali sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni. Namesto Farmatana, smo uporabili preparat taninske kisline. Koncentracija preparata v vodni raztopini je bila 5 g/l. Pri delu poskusa s preparatom taninske kisline smo zagotovili enake pogoje kot pri delu s Farmatanom. Na koncu poskusa smo zabeležili število zdravih živali.



Slika 5: Shema poteka poskusa s preparatom taninske kisline

3.4 IZRAČUN DELEŽA PREBRANIH IKER IN PREŽIVETJA

Enačba 1: Izračun odstotka preživelih iker, ki smo jih stehali po 21 dnevu iz pretočnih posod za inkubacijo.

$$D_p (\%) = \frac{M_p(g)}{2800 (g)} \times 100 \quad \dots (1)$$

D_p - odstotek preživelih iker 21. dan iz pretočnih posod za inkubacijo

M_p - masa preživelih iker 21. dan iz pretočnih posod za inkubacijo v gramih

2800 g - masa 3,5 litra iker

Enačba 2: Izračun odstotka rib (zaroda), ki so se izvalile in splavale iz prebranih iker iz pretočnih posod za inkubacijo 60 dni po oploditvi

$$D_z (\%) = \frac{\check{s}t_z}{200} \times 100 \quad \dots (2)$$

D_z – odstotek preživelega zaroda

$\check{s}t_z$ – število rib , ki so splavale

Enačba 2 smo uporabili tudi pri izračunu odstotka preživelega zaroda pri drugem poskusu s prelivanjem iker s Farmatanom in preparatom taninske kisline. Uporabili smo ga izračun odstotka izvaljenega zaroda po 21 dnevu po oploditvi in končnem številu zaroda, ki je splaval po 60 dnevu po oploditvi.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI PRVEGA POSKUSA

V preglednici 9 so prikazani podatki o masi in odstotku prebranih iker, ki so bile v pretočni posodi za inkubacijo od oploditve, do 21 dneva (faza oči). Pod izrazom »prebrane ike« pojmujeemo ike, ki niso spadale v skupino tako imenovanih belih iker ali iker, okuženih s plesnijo in bi bile zato odstranjene. Preglednica 10 pa prikazuje rezultate valjenja prebranih iker. Prikazano je število in odstotek živih, normalnih larv šestdeset dni po oploditvi

Preglednica 9: Masa ter odstotek prebranih iker iz pretočnih posod za inkubacijo 21. dan po oploditvi

	Kontrola (g)	%	Formalin (g)	%	Farmatan (g)	%
Masa prebranih iker	510,8	18,2	2440,3	87,2	1730,7	61,8

V preglednici 9 lahko vidimo, da je bil formalin najboljše sredstvo za preprečevanje rasti plesni. Iz pretočne posode za inkubacijo, v kateri smo ike tretirali s formalinom, smo po 21 dneh dobili kar 2440,3 grame prebranih iker od začetne teže 2800 gramov, kar je znašalo 87,2 %. Najslabše rezultate pa smo pričakovano dobili pri pretočni posodi za inkubacijo, kjer nismo uporabljali nobenega razkužila. Ostalo nam je le 510,8 gramov prebranih iker od začetno nastavljene teže 2800 gramov, kar je znašalo 18,2 %. Pri uporabi Farmatana nam je na 21. dan od skupno 2800 gramov ostalo 1730,7 gramov prebranih iker, kar je znašalo 61,8 %.

Preglednica 10: Število in odstotek rib, ki so splavale

Ponovitev	Kontrola		Formalin		Farmatan	
	Število	%	Število	%	Število	%
1	176	88	173	86,5	163	81,5
2	164	82	161	80,5	167	83,5
Povprečje	170	85	167	83,5	165	82,5

Iz preglednice 10 je razvidno, da med vsemi skupinami ni bilo velikih razlik v odstotku zaroda, ki je splaval. Vse tri skupine so v povprečju dosegle zelo podobne rezultate; od 85 % pri kontrolni skupini, do 83,5 % pri skupini, tretirani s formalinom s in 82,5 % pri skupini, tretirani s Farmatanom.

4.2 REZULTATI DRUGEGA POSKUSA

4.2.1 Rezultati dela poskusa s Farmatanom

Preglednica 11: Število in odstotek izvaljenih iker pri tretiranju iker s Farmatanom

Valilnik	Ponovitev	Farmatan		Kontrola	
		Število ob izvalitvi	% ob izvalitvi	Število ob izvalitvi	% ob izvalitvi
1	1	142	71	104	52
	2	139	69,5	128	64
2	1	138	69	101	50,5
	2	151	75,5	117	58,5
3	1	155	77,5	78	39
	2	144	72	97	48,5
Povprečje		144,8	72,4	104,2	52,1

V preglednici 11 prikazujemo rezultate vpliva Farmatana na preprečevanje okužbe s plesnijo. Povprečni odstotek izvaljenih iker je bil v skupini, ki smo jo tretirali z vodno raztopino Farmatana višji kot v kontrolni skupini in je znašal 72,4 %. Rezultati med ponovitvami v skupinah se niso zelo razlikovali. Najvišji odstotek izvaljenih iker po 21 dnevju je dosegla prva ponovitev v tretji skupini in sicer 77,5 %. Najnižji odstotek izvaljenih iker pa je s 69 % dosegla prva ponovitev v drugi skupini. Pri kontrolni skupini smo dobili precej slabše rezultate izvalitve iker. V povprečju se je v kontrolni skupini izvalilo 20,3 % manj iker kot v skupini Farmatan. Najvišje število izvaljenih iker smo dosegli pri prvi skupini druge ponovitve, kjer se je izvalilo 64 % iker. Najslabši rezultat pa smo zabeležili pri prvi ponovitvi tretje skupine, v tej skupini se je izvalilo le 78 iker, kar je znašalo 39 %.

Preglednica 12: Število in odstotek rib, ki so splavale pri prelivanju iker s Farmatanom

Valilnik	Ponovitev	Farmatan		Kontrola	
		število ob splavanju	% ob splavanju	število ob splavanju	% ob splavanju
1	1	93	46,5	53	26,5
	2	122	61	88	44
2	1	77	38,5	40	20
	2	99	49,5	45	22,5
3	1	121	60,5	18	9
	2	106	53	23	11,5
Povprečje		103	51,5	44,5	22,3

Preglednica 12 pa prikazuje število rib, ki so splavale. V povprečju so v skupini, kjer smo ikre tretirali s Farmatanom, splavale 103 ribe, kar predstavlja 51,5 % vseh iker. Pri kontrolni skupini pa je v povprečju splavalo 44,5 rib, kar znaša 22,3 % vseh iker.

4.2.2 Rezultati dela poskusa s preparatom taninske kisline

Preglednici 13 in 14 prikazujeta rezultate pridobljene iz drugega dela poskusa, kjer smo ikre 21 dni prelivali z raztopino taninske kisline v koncentraciji 5 g/l.

Preglednica 13: Število in odstotek izvaljenih iker, tretiranih s taninsko kislino

Valilnik	Ponovitev	Preparat taninske kisline		Kontrola	
		število ob izvalitvi	% ob izvalitvi	število ob izvalitvi	% ob izvalitvi
1	1	142	71	162	81
	2	158	79	155	77,5
2	1	134	67	133	66,5
	2	172	86	130	65
3	1	165	82,5	109	54,5
	2	156	78	114	57
Povprečje		154,5	77,3	133,8	66,9

Iz preglednice 13 je razvidno število izvaljenih iker po 21 dnevu. Povprečno se je pri kontrolni skupini po 21 dnevu izvalilo 133,8 iker oziroma 66,9 %. Nekoliko boljše

rezultate smo dobili pri skupini tretirani s taninsko kislino. V povprečju se je v tej skupini izvalilo 154,5 iker, kar je 77,3 %. To je bilo za 10,4 % boljše kot pri kontrolni skupini.

Preglednica 14: Število in odstotek rib, ki so splavale pri prelivanju iker s taninsko kislino

Valilnik	Ponovitev	Preparat taninska kislina		Kontrola	
		število ob splavanju	% ob splavanju	število ob splavanju	% ob splavanju
1	1	105	52,5	80	40
	2	129	64,5	120	60
2	1	106	53	81	40,5
	2	130	65	80	40
3	1	124	62	44	22
	2	110	55	53	26,5
Povprečje		117,3	58,7	76,3	38,2

V preglednici 14 vidimo, da se povprečno število rib, ki so splavale med skupinama, tretirano s taninsko kislino ter kontrolno skupino precej razlikuje. Pri skupini tretirani s taninsko kislino je v povprečju splavalo 117,3 rib, kar je znašalo 58,7 %. Rezultati kontrolne skupine so bili slabši. V povprečju so preživele 76,3 ribe, kar znaša 38,2 % vseh iker.

5 RAZPRAVA

Cilj diplomske naloge je bil ugotoviti, ali je tanin učinkovito sredstvo za preprečevanje razvoja plesni na postrvjih ikrah. V poskusu smo uporabili preparat Farmatana in taninsko kislino in učinkovitost pri preprečevanju primerjali z učinkovitostjo formalina. V prvem poskusu, pri katerem je inkubacija iker potekala v pretočnih posodah smo ugotovili, da Farmatan preprečuje nastajanje in širjenje saprolegnije med ikrami v pretočnih posodah za inkubacijo. Rezultati so bili nekoliko slabši kot pri uporabi formalina, saj je pri uporabi Farmatana do 21 dne preživel 61,8 % iker, pri uporabi formalina pa 87,2 %. Rezultati, ki smo jih dosegli z vnašanjem formalina so primerljivi z rezultati, ki so jih dosegli Schreier in sod. (1995). Razliko med njihovimi ter našimi rezultati lahko razložimo z dejstvom, da so v njihovem poskusu ikram takoj po oploditvi dodali 10 % iker, ki so bile okužene s plesnijo. Zato se je plesen takoj začela prenašati na ostale ikre. Pri našem poskusu pa je moralo do okužbe najprej priti, da se je lahko potem širila in razraščala naprej.

Da bi ugotovili ali je tretiranje s Farmatanom in formalinom vplivalo na razvoj embrijev, smo preživele ikre iz pretočnih posod za inkubacijo prenesli v pretočne valilnike in za vsako skupino določili odstotek izvalitve. Ikre smo namestili v košarice, ki smo jih vstavili v valilna korita. V vsako košarico smo namestili po 200 iker. V vseh skupinah je bil odstotek izvalitve visok in se je v obeh skupinah približal rezultatu kontrolne skupine, to je skupine, kjer ikre niso bile tretirane in kjer je odstotek izvalitve znašal 85 % preživelih iker. Visok odstotek izvalitve v vseh skupinah je verjetno tudi posledica dejstva, da se ikre v košaricah med seboj niso dotikale, kot se to dogaja v pretočnih posodah za inkubacijo in se zato plesen, kljub temu, da iker nismo več tretirali, tudi v kontrolni skupini ni prenašala z okuženih iker na neokužene. Drugi razlog pa je verjetno tudi, da smo v košarice naselili le tako imenovane prebrane ikre, torej ikre, ki so bile zdrave, oplojene in nepoškodovane. Na podlagi naših rezultatov je mogoče trditi, da bi bil Farmatan primerno sredstvo za preprečevanje razvoja plesni na ikrah.

V drugem poskusu smo primerjali učinkovitost Farmatana in taninske kisline. Ikre, ki so bile nameščene v valilna korita, smo prelivali z vodno raztopino Farmatana in vodno raztopino taninske kisline. Učinkovitost obeh preparatov smo ugotavljali na podlagi primerjave odstotka izvalitve iker v obeh skupinah in odstotka izvalitve v kontrolni skupini. Ikre smo prelivali vsak drugi dan; v času poskusa smo ikre 11 krat prelili z

razkužilom. Pri prelivanju s Farmatanom smo po 21 dneh po oploditvi zabeležili kar precejšnje izgube (27,6 % vseh iker). Še večje izgube pa smo zabeležili pri kontrolni skupini, kjer smo izgubili 47,9 % vseh iker. Izgube so se po 21 dnevu še povečevale saj smo takrat prenehali s prelivanjem z razkužili. Na koncu poskusa smo pri kontrolni skupini zabeležili 77,7 % izgubo, pri skupini tretirani s Farmatanom pa smo izgubili 48,5 % iker.

Če smo kot razkužilo uporabili preparat taninske kisline je izguba do konca poskusa znašala 41,3 % V skupini, ki smo jo uporabili kot kontrolno skupino pri tretiranju s taninsko kislino, pa so izgube znašale 61,8 %. Vzrokov za takšne razlike med rezultatoma obeh kontrolnih skupin je lahko več. Tretiranje iker s taninsko kislino in Farmatanom ni potekalo istočasno, pač pa smo ga izvajali s časovnim zamikom. Tako se je lahko razlikovala kvaliteta iker in odstotek oploditve, kar precej vpliva na odstotek iker, ki jih je okužila plesen. V času poskusa se je spreminjala tudi kakovost vode.

Ta del poskusa je pokazal, da je verjetno taninska kislina nekoliko boljše razkužilo kot Farmatan. Potrebni bi bili še nadaljnji poskusi, v katerih bi preizkusili nekoliko večji odmerek taninske kisline. S tem bi verjetno odstotek preživelih iker nekoliko izboljšali in dosegli rezultate, ki bi bili že precej primerljive s formalinom.

Odstotki izvalitve so bili pri uporabi Farmatana in taninske kisline nekoliko nižji kot pri uporabi formalina, vendar pa so bistveno boljši od rezultatov doseženih v skupinah, kjer za preprečevanje razvoja saprolegnije nismo uporabili nobenega preparata. To pomeni, da bi v primeru prepovedi uporabe formalina, ko bi ribogojci ostali brez sredstev za preprečitev razvoja saprolegnije, tako Farmatan kot taninsko kislino uporabili za preprečevanje razvoja plesni.

6 SKLEPI

- Učinkovitost Farmatana in taninske kisline za preprečevanje razvoja plesni pri ikrah postrvi se približuje učinkovitosti formalina.
- Farmatan in preparat taninske kisline ne vplivata na razvoj embrijev od oploditve do izvalite.
- Taninska kislina je nekoliko bolj učinkovita kot Farmatan.
- Potrebno bi bilo izvesti še nadaljnje teste, v katerih bi preverili učinkovitost obeh preparatov ob različnih koncentracijah in različnih intervalih.
- Taninska kislina in Farmatan bi ob prepovedi uporabe formalina lahko nadomestila formalin kot sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni.

7 POVZETEK

V ribogojstvu predstavlja plesen v začetni fazi inkubacije iker postrvi velik problem. Trenutno se v ribogojstvu uporablja le eno sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni in to je formalin. Ker pa je formalin potencialno nevaren za človeka, smo poskušali z našim poskusom najti alternativno sredstvo za preprečevanje nastajanja plesni. Uporabili smo Farmatan in taninsko kislino.

V prvem poskusu, pri katerem je inkubacija iker potekala v pretočnih posodah smo ugotovili, da je Farmatan preprečil nastajanje in širjenje plesni med ikrami. Rezultat preživelih iker pri Farmatanu je bil do 21 dneva nekoliko slabši (61,8 % preživelih iker), kot pri formalinu kjer je preživel 87,2 % iker.

Z nadaljevanjem poskusa, kjer smo ikre prenesli iz pretočnih posod za inkubacijo v pretočne valilnike smo dokazali, da Farmatan in taninska kislina nimata vpliva na izvalitev in nadaljnji razvoj postrvi. Odstotek izvaljenih iker, ki so bile tretirane s formalinom (83,5 % izvaljenih) in odstotek iker, ki so bile tretirane s Farmatanom (82,5 % izvaljenih), je podoben odstotku izvalitve iker, ki so bile skozi celotno trajanje poskusa nedotaknjene (85 % izvaljenih). Na podlagi tega, bi lahko trdili, da bi bil Farmatan primerno sredstvo za preprečevanje razvoja plesni na ikrah.

V drugem poskusu smo primerjali učinkovitost Farmatana in taninske kisline. To smo ugotovili tako, da smo primerjali odstotke izvalitve iker v obeh skupinah. Z rezultati smo dokazali, da sta Farmatan in taninska kislina uspešni sredstvi za preprečevanje nastajanja plesni na ikrah postrvi. Kot nekoliko boljše sredstvo se je pokazala taninska kislina, kjer je splavalo 58,7 % rib. Pri Farmatanu pa je splavalo 51,5 % rib. Ti rezultati so dokaj primerljivi z rezultati, ki jih dosegamo z zdravljenjem s formalinom.

Tako bi lahko ob prepovedi uporabe formalina uporabili tako Farmatan kot taninsko kislino kot sredstvi za preprečevanje nastajanja plesni. Skozi potek raziskave smo ugotovili, da bi lahko s povečanjem koncentracije taninske kisline verjetno dosegli še nekoliko boljše rezultate. Vendar so za potrditev tega potrebne še nadaljnje raziskave.

8 VIRI

- Aguilera-Carbo A., Augur C., Prado-Barragan L.A., Favela-Torres E., Aguilar C.N. 2008. Microbial production of ellagic acid and biodegradation of ellagitannins. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, 2: 189-199
- An Introduction to Indoor Air Quality (IAQ): Formaldehyde. US Environment Protection Agency.
<http://www.epa.gov/iaq/formaldehyde.html> (24. jun. 2013)
- Butter N.L., Dawson J.M., Buttery P.J., 1999. Effects of dietary tannins on ruminants. V: Secondary plant products: antinutritional and beneficial action in animal feeding. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 51-72
- Chung K.T., Wei C.Y., Johnson M.G. 1998b. Are tannins a double-edged sword in biology. *Trends in Food Science and Technology*, 9, 4: 168-175
- Farmatan – naraven izvleček pridobljen iz zdravega kostanjevega lesa. 2003. Tanin Sevnica.
http://www.tanin.si/podstrani_slo/prehrana_zivali/farmatan.php (23. jun. 2013)
- Forneris G., Bellardi S., Palmegiano G.B., Saroglia M., Sicuro B., Gasco L., Zoccarato I. 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. *Aquaculture*, 221: 157-166
- Jansman A.J.M. 1993. Tannins in feedstuff for simple-stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 6: 209-236
- Jansman A.J.M., Longstaff M. 1993. Nutritional effects of tannins and vicine/convicine in legume seeds. V: Recent advantages of research in antinutritional factors in legume seeds. Wageningen, Pudoc: 95-106
- Kumar R., Vaithyanathan S. 1990. Occurrence, nutritional significance and effect on animal productivity of tannins in tree leaves. *Animal Feed Science and Tehnology*, 30: 21-38

- Lavrenčič A. 2001. Razgradljivost beljakovin v predželodcih prežvekovalcev. V: 9. Tradicionalno posvetovanje "Uporaba kostanjevega tanina v prehrani živali", Podčetrtek, 22. mar. 2001. Sevnica, Tanin: 39-47
- Makkar H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49: 241-256
- Mangan J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*, 1: 209-231
- 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
- Mueller-Harvey I. 1999. Tannins: their nature and biological significance. V: *Secondary plant products*. Caygill J.C., Mueller-Harvey I. (eds.). Nottingham, Nottingham University Press: 17-39
- Nowak B., de Guingand P. 1997. Effects of prophylactic treatments with malachite green on early life stages of rainbow trout. *Australasian Journal of Ecotoxicology*, 3: 141-146
- Product Information. 2003. Sigma[®]. Sigma Aldrich.
<http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=SI&language=sl&productNumber=16201&brand=SI&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fproduct%2Fisial%2F16201%3Flang%3Den>
(23. jun. 2013)
- Scalbert A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30, 12: 3875-3883
- Schreier M.T., Rach J.J., Howe G.E. 1995. Efficacy of formalin, hydrogen peroxide, and sodium chloride on fungal-infected rainbow trout eggs. *Aquaculture*, 140: 323-331

ZAHVALA

Na koncu se iskreno zahvaljujem mentorju, prof. dr. Juriju Poharju, najprej za idejo o izvedbi poskusa, prav tako pa tudi za vso strokovno pomoč in podporo pri izdelavi diplomske naloge. Za strokovno pomoč ter pomoč pri izvedbi poskusa se zahvaljujem Janezu Vidmarju iz ribogojnice Pšata, ki je bil vseskozi na razpolago in pripravljen pomagati.

Recenzentu prof. dr. Janezu Salobirju se zahvaljujem za pregled in kritično presojo diplomske naloge.

Hvala še ga. Nataši Siard za pomoč pri oblikovanju in pregledu diplomske naloge.

Velika zahvala gre tudi ga. Sabini Knehtl za vso pomoč pri urejanju študijskih zadev tekom celotnega študija.

Največja zahvala gre mojim staršem, Marjani in Aljoši, ki sta mi omogočila študij in mi vedno stala ob strani ter potrpežljivo pomagala po svojih najboljših močeh. Hvala vama.

Ne smem pa pozabiti na dekle Sandro, ki mi je s svojo spodbudo in pomočjo pomagala rešiti vse težave.