"Research article" **DOI: 10.30495/JVCP.2022.1945881.1341**

Pathologic study of probiotic effect of *Bacillus subtilis* in experimental contamination of Goldfish with *Ichthyophthirius multifilis* parasite

Hashemzadeh Farhang, H.[1*], Khordadmehr, M.[2], Hemmatpur, S.[3], Shahbazi, P.[4]

1- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran.
3- Graduate of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
4- Associate Professor, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author's email: hfarhang.h@gmail.com
(Received: 2022/5/6 Accepted: 2022/8/23)

Abstract

This study was conducted to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* probiotic on experimental infection of gold fish by *Ichthyophthirius multifiliis*. For this purpose, 32 nearly same sized gold fish was used in two groups of 16 fish as the control and treatment groups. The treatment group was fed with Bacillus subtilis probiotic enriched pellets for eight weeks and after this period, the fish were experimentally infected with *Ichthyophthirius multifiliis* parasite and underwent parasitological and histopathological investigations. Parasitological examinations revealed that the infection rate of the parasitic disease was significantly lower (p<0.05) in the treated group compared to the control group, in such a manner that the number of the parasites were 107 and 276 in the treatment and control groups, respectively. Histopathological examinations also showed that the fish in the control group had more lesions than the treated group (p<0.05). It can be concluded from this study that Bacillus subtilis probiotic as feed additive of gold fish has inhibitory effects against the parasitological infection and histopathological lesions by stimulating and strengthening the immune system.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Gold fish, Ichthyophthirius, Tabriz.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2022.1945881.1341

بررسی آسیب‌شناختی اثر پروبیوتیکی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در آلودگی تجربی ماهی قرمز (Goldfish) به انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس*

حسین هاشم‌زاده‌فرهنگ[1*]، منیره خردادمهر[2]، سولماز همت‌پور[3]، پریسا شهبازی[2]

۱- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- دانشیار گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۳- دانش‌آموخته دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: hfarhang.h@gmail.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۲/۱۶ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۶/۱)

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر پروبیوتیکی باکتری *باسیلوس سابتیلیس* در آلودگی تجربی ماهی قرمز (Goldfish) به انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* بود. به‌این منظور تعداد ۳۲ قطعه ماهی قرمز در ۲ گروه جداگانه ۱۶تایی کنترل و تیمار قرار گرفتند. گروه تیمار توسط پلت‌های غنی‌شده با پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* به مدت ۸ هفته مورد تغذیه قرار گرفتند و پس از این زمان، مرحله آلوده‌سازی ماهی‌ها با انگل انجام گردید و سپس بررسی‌های انگل‌شناسی و آسیب‌شناختی از ماهی‌های گروه کنترل و تیمار به‌عمل آمد. بر اساس نتایج، میزان آلودگی در ماهیان گروه تیمار به‌طور معنی‌داری کمتر از ماهیان گروه کنترل بود، به‌طوری که در گروه درمان، ۱۰۷ عدد و در گروه کنترل، ۲۷۶ عدد انگل مشاهده شد ($p<0/05$). در بررسی‌های هیستوپاتولوژی میزان ضایعات در ماهی‌های کنترل که مورد تغذیه با پروبیوتیک قرار نگرفته بودند، به‌طور معنی‌داری بیشتر از ماهیان گروه تیمار بود و در ماهیان گروه تیمار، ضایعات پاتولوژیک پوست و آبشش به‌صورت قابل‌توجه و معنی‌داری کاهش داشته و اغلب خفیف بودند ($p<0/05$). به‌نظر می‌رسد پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* با تحریک و افزایش قدرت ایمنی سبب کاهش عوارض ناشی از انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهی قرمز می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ایکتیوفتیریوس، ماهی قرمز، تبریز.

مقدمه

انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* یکی از مهم‌ترین انگل‌های خارجی در ماهی پرورشی و زینتی است که سبب ایجاد خسارات زیادی در سراسر دنیا و ایران می‌گردد. اگر چه روش‌های درمانی مختلف برای کاهش شیوع این بیماری به‌کار می‌رود، اما تاکید اصلی بر روش‌های پیشگیرانه می‌باشد که از طریق استفاده از مواد محرک ایمنی برای تقویت سیستم ایمنی در ماهی انجام می‌گردد. در مطالعات انجام‌شده قبلی، استفاده از انواع ترکیبات مختلف گیاهی علیه انگل ایکتیوفتیریوس مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مفیدی به‌دست آمده است (Jorgensen *et al*., 2018). در مطالعه اکانم و همکاران کاهش تعداد انگل ایکتیوفتیریوس متعاقب مصرف عصاره تام گیاه لوبیای مخملی (*Mucuna pruriens*) و گیاه پاپایا (*Carica papaya*) در ماهی قرمز (Goldfish) مشاهده شده است (Ekanem *et al*., 2004).

ماهی قرمز به صورت طبیعی در آب‌های شیرینِ ساکن و تقریباً ساکن با سرعت ناچیز که پوشیده از گیاهان آبزی و دارای بستر نرمی هستند زندگی می‌کند و غالباً همراه ماهیان برکه‌ای دیده می‌شود. زیستگاه اصلی آن در سیبری و آسیای جنوب شرقی است و انتشار این ماهی توسط انسان صورت گرفته و امروزه در اکثر کشورها وجود دارد و لذا انجام بررسی‌های مختلف در خصوص پیشگیری و درمان بیماری‌های آنها ضروری می‌باشد.

پروبیوتیک‌ها فرآورده‌های طبیعی هستند که مصرف کردن آن‌ها قادر به بهبود وضعیت میکروفلور دستگاه گوارش و برگرداندن آن به حالت طبیعی می‌باشد. در رویکردی نوگرایانه، امروزه پروبیوتیک‌ها بخش جدایی‌ناپذیر در فعالیت آبزی‌پروری شده‌اند که قادر به تقویت رشد، ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌ها و افزایش تولید هستند. در ضمن این ترکیبات با فراهم‌نمودن مواد مغذی، ویتامین‌ها و آنزیم‌ها، در تغذیه میزبان نیز نقش دارند (Ecerezuelakanem *et al*., 2004). سرزولا و همکاران نشان داده‌اند که پروبیوتیک قادر به بهبود ساختار روده و جمعیت میکروبی در مخاط آن می‌باشد (Cerezuela *et al*., 2013). در آبزی‌پروری پروبیوتیک‌ها برای پیشگیری از بیماری‌ها و در برخی موارد به‌عنوان جایگزین ترکیبات ضد میکروبی یا آنتی‌بیوتیک‌ها مورد مصرف قرار می‌گیرند. همچنین پروبیوتیک‌ها برای افزایش رشد و بهبود سلامتی حیوانات از طریق افزایش مقاومت آن‌ها در برابر بیماری، به جیره غذائی نیز اضافه می‌شوند (Mohamed and Refet, 2011).

با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک جنس باسیلوس بر بافت‌های مخاطی گونه‌های انواع ماهی‌ها و همچنین اثرات تقویت سیستم ایمنی پروبیوتیک‌ها در ماهی‌های آلوده به انگل خارجی (Cerezuela *et al*., 2013) و لزوم بررسی‌های بیشتر در این رابطه، تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر استفاده از پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* به عنوان محرک سیستم ایمنی در پیشگیری از ابتلا به انگل تک‌یاخته‌ای ایکتیوفتیریوس، در سطح آسیب‌شناسی و انگل‌شناسی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این بررسی تجربی در سال ۱۳۹۸ و در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز انجام گرفت. در بررسی

حاضر، تعداد ۳۲ قطعه ماهی قرمز (Goldfish) در دو گروه جداگانه ۱۶تایی کنترل و تیمار قرار گرفتند. ماهی‌های گروه‌های کنترل و تیمار هم‌اندازه و هم‌وزن انتخاب گردیدند. میانگین وزنی ماهی‌ها ۲/۸۱ گرم و طول متوسط آن‌ها ٤/۹۷ سانتی‌متر بود.

همه ماهیان گروه تیمار توسط پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* که از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شده بود، مورد تغذیه قرار گرفتند. در تغذیه ماهیان گروه کنترل از پروبیوتیک مذکور استفاده نشد.

بعد از خوراندن پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* به مدت دو ماه، در ماهیان گروه تیمار، مرحله آلوده‌سازی ماهی‌ها با انگل *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* به مدت ۲ هفته انجام گردید که بدین منظور از انگل‌های جداشده از ماهی‌های آلوده تیپیک آکواریومی که قبلاً تهیه شده بود، به مقدار ۵۰۰۰ ترونت انگل برای هر ماهی استفاده گردید. نحوه آلوده‌سازی ماهی‌ها نیز بر اساس مطالعه انجام‌شده توسط یورگنسون و همکاران (Jorgensen *et al.*, 2018) انجام گرفت. بدین منظور، ماهی‌های آلوده به انگل ایکتیوفتیریوس که وجود انگل در آن‌ها با میکروسکوپ نوری به اثبات رسیده‌بود، با دوز بالای عصاره گل میخک یا دنتول (۵۰ میکرولیتر در لیتر) آسان‌کُشی شده و به مدت ٤ ساعت در آب داخل تانک رها شدند تا تروفونت‌ها، بدن ماهی‌ها را ترک کنند. سپس ماهی‌های کشته‌شده از تانک خارج گردید و تومونت‌های کیسه‌دارشده انگل به مدت یک شب در داخل تانک‌ها نگه‌داری شدند تا به مرحله توموسیت و سپس آزادسازی ترونت‌ها برسند. روز بعد ترونت‌های آزادشده انگل با میکروسکوپ نوری (Nikon Eclipse E400 Microscope) شمارش شده و آلوده‌سازی ماهی‌های گروه‌های تیمار و کنترل با استفاده از این ترونت‌های انگلی انجام گردید. جهت انجام چالش، ٤۰۰۰ ترونت به ازای هر ماهی در داخل تانک‌ها ریخته شد و تعویض آب به مدت ۳ روز انجام نشد تا تماس انگل‌ها با سطح بدن ماهی‌ها تسهیل گردد.

ده روز بعد از چالش با انگل، همه ماهی‌ها مورد بررسی قرار گرفتند، به‌طوری‌که مطالعات انگل‌شناسی و آسیب‌شناختی لازم، از ماهیان گروه‌های کنترل و تیمار به‌عمل آمد.

-نمونه برداری جهت انجام مطالعات آسیب‌شناختی: به منظور بررسی ضایعات بافتی، نمونه‌گیری از بافت‌های پوست و آبشش همه ماهی‌ها در دو نوبت انجام شد. یک نوبت بعد از تجویز پروبیوتیک و قبل از چالش با انگل ایکتیوفتیریوس و نوبت دوم، بعد از دریافت پروبیوتیک و چالش با انگل ایکتیوفتیریوس انجام گردید. در هر نوبت هم نمونه‌های بافتی در فرمالین بافر ۱۰ درصد به میزان ۱۰ برابر حجم نمونه تثبیت شد. بعد از ٢٤ ساعت فرمالین نمونه‌ها تعویض شد و برش‌های بافتی طبق روش‌های معمول تهیه مقاطع با رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین آماده گردید. در ادامه مقاطع بافتی تهیه‌شده، به وسیله میکروسکوپ نوری معمولی (OLYMPUS-CH30) و با در نظر گرفتن ضایعات پاتولوژیک ذکرشده در مطالعه پیشین (Jorgensen, 2016)، مورد بررسی قرار گرفتند. پارامترهای مورد مطالعه در بافت آبشش شامل همجوشی تیغه‌های ثانویه (fusion of secondary lamellae)، کوتاه شدن تیغه‌های ثانویه، هایپرپلازی سلول‌های پوششی تیغه‌های ثانویه، باریک شدن کانال‌های آبی (narrow water channels)، هایپرپلازی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس (mucus

cells)، خونریزی و حضور انگل در مقاطع بافتی بود. در بافت پوست هم، هایپرپلازی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس و افزایش ضخامت پوست مورد ارزیابی قرار گرفت.

لازم به یادآوری است که در تمامی موارد ذکرشده، مقاطع بافتی بررسی‌شده به صورت حالت نرمال (عدم حضور ضایعه مورد نظر) با درجه صفر، دارای ضایعه خفیف با درجه +۱، واجد ضایعه متوسط با درجه +۲ و در صورت مشاهده ضایعه بافتی شدید، با درجه +۳ گزارش می‌شد.

- **تحلیل آماری داده‌ها**: آنالیز آماری داده‌های به‌دست آمده از ضایعات هیستوپاتولوژیک مشاهده‌شده (به صورت داده‌های نیمه‌کمی) با استفاده از نرم افزار SPSS version 22, IL, USA و آزمون‌های آماری غیرپارامتریک کروسکال والیس (Kruskal- wallis H)، با در نظر گرفتن درجه اطمینان ۹۵ درصد انجام شد.

یافته‌ها

در جدول ۱ نتایج مشاهده مستقیم انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* با استفاده از میکروسکوپ نوری، در ماهیان گروه کنترل که پروبیوتیک دریافت نکردند، ارائه شده‌است.

جدول ۱ - نتایج مشاهده مستقیم انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهیان گروه کنترل

شماره ماهی	تعداد انگل مشاهده‌شده در میدان دید میکروسکوپی اول	تعداد انگل مشاهده‌شده در میدان دید میکروسکوپی دوم	تعداد انگل مشاهده‌شده در میدان دید میکروسکوپی سوم
۱	۱٤	۱۰	۱۳
۲	۳	٤	–
۳	٦۳	۱٦	۱
٤	–	–	–
٥	–	–	–
٦	۱	٦	–
۷	–	–	–
۸	۲	۹	–
۹	–	–	–
۱۰	۲	۳	–
۱۱	۲	۱	۳
۱۲	۲	۱٦	–
۱۳	۱۷	۲۲	۱۲
۱٤	۲	۳	–
۱٥	۸	۳	٥
۱٦	۱٥	۱۸	۹

در جدول ۲ نیز نتایج مشاهده مستقیم انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* با استفاده از میکروسکوپ نوری، در ماهیان گروه تیمار (دریافت‌کننده پروبیوتیک) ارائه شده‌است.

جدول ۲- نتایج مشاهده مستقیم انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهیان گروه تیمار

شماره ماهی	تعداد انگل مشاهده‌شده در میدان دید میکروسکوپی اول	تعداد انگل مشاهده‌شده در میدان دید میکروسکوپی دوم	تعداد انگل مشاهده‌شده در میدان دید میکروسکوپی سوم
۱	-	-	-
۲	۳۶	۲۷	۲۸
۳	-	-	-
٤	-	-	-
٥	-	-	-
٦	-	-	-
۷	-	-	-
۸	۳	۱	-
۹	۲	۱	-
۱۰	-	-	-
۱۱	-	-	-
۱۲	-	-	-
۱۳	-	-	-
۱٤	-	-	-
۱٥	-	-	-
۱٦	۷	۱	-

طبق نتایج ارائه‌شده در جداول ۱ و ۲، جمع‌بندی یافته‌های انگل‌شناسی به شرح زیر می‌باشد:

۱) تعداد ماهی آلوده در گروه دریافت‌کنندهٔ پروبیوتیک، ٤ مورد بود اما در گروه کنترل هر ۱٦ ماهی آلوده بودند.

۲) با محاسبهٔ میانگین از نظر تعداد انگل‌ها، میزان انگل در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک به شکل معنی‌داری ($p<۰/۰٥$) کمتر بود و بر اساس تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نتایج آزمون مربع کای هم، میزان آلودگی به انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهیان گروه تیمار، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از آلودگی مذکور در ماهیان گروه کنترل بود. یعنی از نظر تعداد ماهی آلوده در هر گروه و میزان بار آلودگی در هر ماهی نیز، در گروه تیمار آلودگی کمتر بوده و در میزان میانگین اندازه تروفونت‌های انگل در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده شد ($p<۰/۰٥$).

۳) با محاسبهٔ میانگین اندازه انگل‌ها، ملاحظه گردید که اندازه آن‌ها در گروه تیمار یا گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک، به شکل معنی‌داری کوچک‌تر بودند ($p<۰/۰٥$).

در نمودار ۱ نیز که در واقع نشان‌دهنده جمع‌بندی نتایج ارائه‌شده در جداول ۱ و ۲ می‌باشد، تعداد انگل‌های مشاهده‌شده در ماهیان در گروه‌های کنترل و

تیمار مورد مقایسه قرار گرفته‌است. همان‌گونه که در نمودار مذکور مشاهده می‌شود، فراوانی تعداد انگل مشاهده شده در ماهیان گروه درمان ۱۰۷ عدد و در ماهیان گروه کنترل ۲۷٦ عدد می‌باشد.

نمودار ۱- تعداد انگل‌های خارجی مشاهده‌شده در ماهیان گروه‌های کنترل و تیمار

-نتایج حاصله از ارزیابی آسیب‌شناختی بافت‌های بررسی‌شده: جزئیات مربوط به مشاهدات ضایعات پاتولوژیک و درجه‌بندی آن‌ها در بافت آبشش و پوست ماهیان گروه‌های مورد مطالعه، در جدول ۳ و اَشکال ۱ تا ٤ ارائه شده‌است.

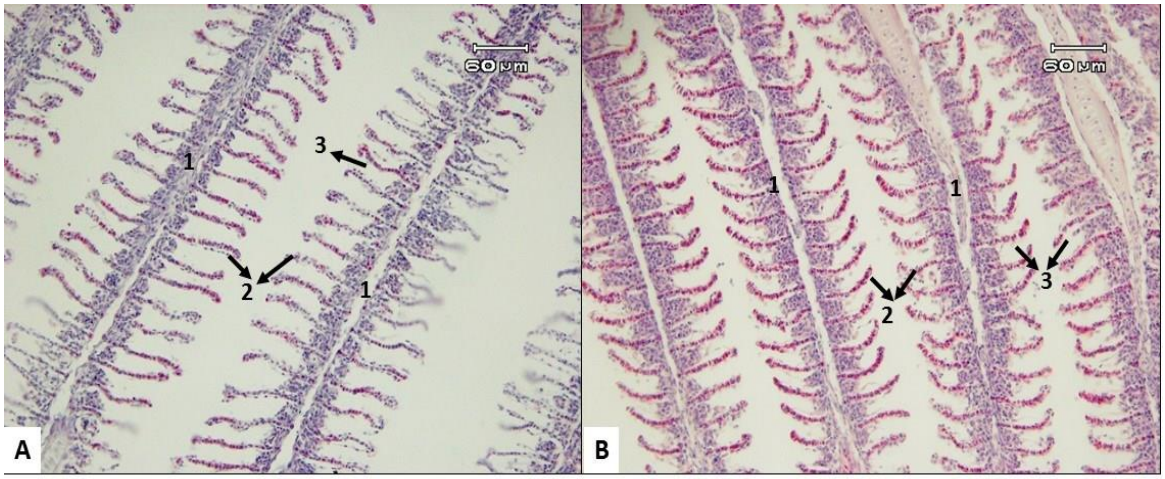
بر این اساس در ماهیان گروه‌های کنترل و تیمار، قبل از چالش با انگل، ساختار طبیعی آبشش (شامل تیغه‌های اولیه و ثانویه، کانال‌های آبی عریض (wide water chanels)، یک ردیف سلول اپیتلیال و تعداد کمی سلول‌های موکوسی در تیغه‌های ثانویه) (شکل ۱) و پوست (شامل اپیدرم با سلول‌های سنگفرشی، مکعبی، موکوسی و فلس و درم)، تحت میکروسکوپ مشاهده شد (شکل ۲). در بافت پوست ماهیان گروه کنترل هم بعد از مواجهه با انگل، هایپرپلازی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس و افزایش ضخامت پوست و در مواردی خونریزی سطحی مشاهده شد (شکل ۳). اما در گروه ماهیان تیمار، ضایعات پاتولوژیک پوست به صورت قابل توجهی کاهش یافت و اغلب در گرید خفیف (+۱) بودند. سلول‌های موکوسی نیز علاوه بر هایپرپلازی (افزایش تعداد سلول‌ها)، درجاتی از هایپرتروفی (افزایش اندازه سلول‌ها) را نشان دادند.

همچنین در بافت آبشش ماهیان گروه کنترل بعد از چالش با انگل، ضایعات پاتولوژیک با گرید متوسط (+۲) تا شدید (+۳) شامل همجوشی تیغه‌های ثانویه، کوتاه شدن (آتروفی) تیغه‌های ثانویه، هایپرپلازی سلول‌های پوششی تیغه‌های ثانویه، تنگ شدن کانال‌های آبی، هایپرپلازی سلول‌های ترشح‌کننده موکوس، خونریزی و حضور انگل در مقاطع بافتی مشاهده‌شد (شکل ٤). اما در گروه ماهیان تیمار، ضایعات پاتولوژیک آبشش و حضور انگل به صورت قابل توجهی کاهش داشته و اغلب در گرید خفیف (+۱) و متوسط (+۲) قرار داشتند (شکل ٤).

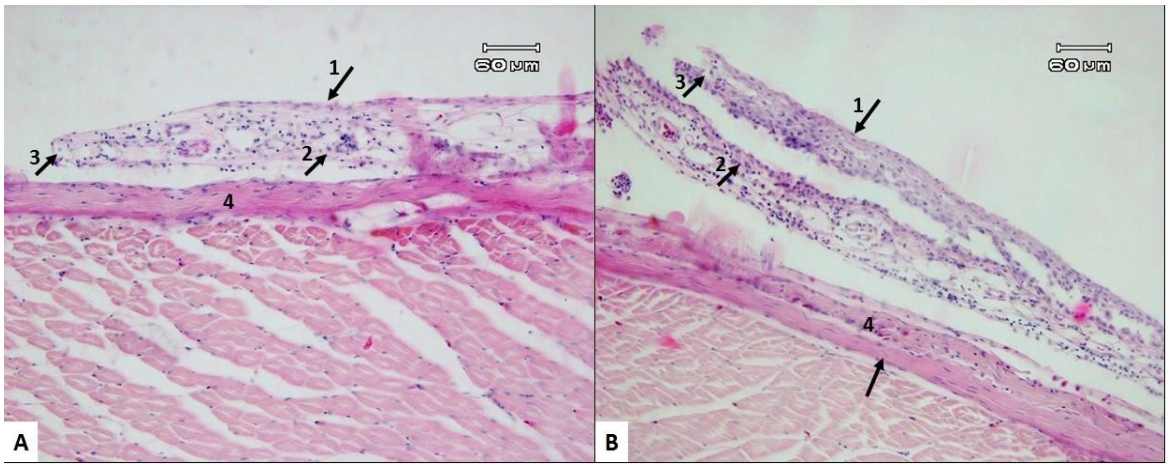
تحلیل آماری تمام فاکتورهـای مـورد بررسـی بـین گروه‌های کنترل و تیمار نیز اختلاف آماری معنی‌داری را نشان دادند ($p<۰/۰۵$).

جدول ۳- نتایج گریدبندی ضایعات پاتولوژیک مشاهده‌شده در گروه کنترل و گروه دریافت‌کننده باکتری بعد از مواجهه با انگل

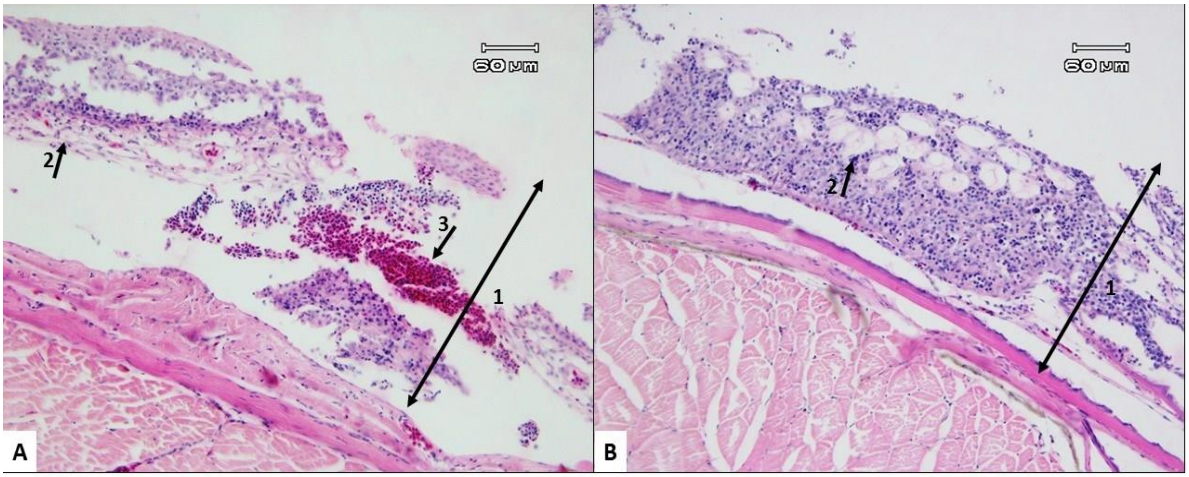
گروه مورد نظر/ درجه آسیب بافتی		گروه شاهد				گروه تیمار			
بافت مطالعه‌شده/ ضایعه مشاهده‌شده		۰	۱+	۲+	۳+	۰	۱+	۲+	۳+
آبشش	فیوژن تیغه‌های ثانویه	۱۶/۱	۱۶/۳	۱۶/۴	۱۶/۸	۱۶/۰	۱۶/۴	۱۶/۶	۱۶/۶
	کوتاه‌شدن تیغه‌های ثانویه	۱۶/۱	۱۶/۲	۱۶/۳	۱۶/۱۰	۱۶/۰	۱۶/۶	۱۶/۴	۱۶/۶
	هایپرپلازی سلول‌های پوششی تیغه‌های ثانویه	۱۶/۰	۱۶/۲	۱۶/۳	۱۶/۱۱	۱۶/۰	۱۶/۷	۱۶/۵	۱۶/۴
	تنگ شدن کانال‌های آبی	۱۶/۰	۱۶/۲	۱۶/۳	۱۶/۱۱	۱۶/۰	۱۶/۷	۱۶/۵	۱۶/۴
	هایپرپلازی سلول‌های موکوسی	۱۶/۰	۱۶/۲	۱۶/۴	۱۶/۱۰	۱۶/۰	۱۶/۷	۱۶/۴	۱۶/۵
	خونریزی	۱۶/۱	۱۶/۳	۱۶/۶	۱۶/۶	۱۶/۲	۱۶/۹	۱۶/۳	۱۶/۲
	حضور انگل	۱۶/۴	۱۶/۳	۱۶/۳	۱۶/۵	۱۶/۹	۱۶/۴	۱۶/۰	۱۶/۳
پوست	افزایش ضخامت پوست	۱۶/۱	۱۶/۳	۱۶/۴	۱۶/۸	۱۶/۲	۱۶/۵	۱۶/۵	۱۶/۴
	هایپرپلازی سلول‌های موکوسی	۱۶/۲	۱۶/۴	۱۶/۴	۱۶/۶	۱۶/۲	۱۶/۷	۱۶/۴	۱۶/۳
	حضور انگل	۱۶/۰	۱۶/۰	۱۶/۰	۱۶/۰	۱۶/۰	۱۶/۰	۱۶/۰	۱۶/۰



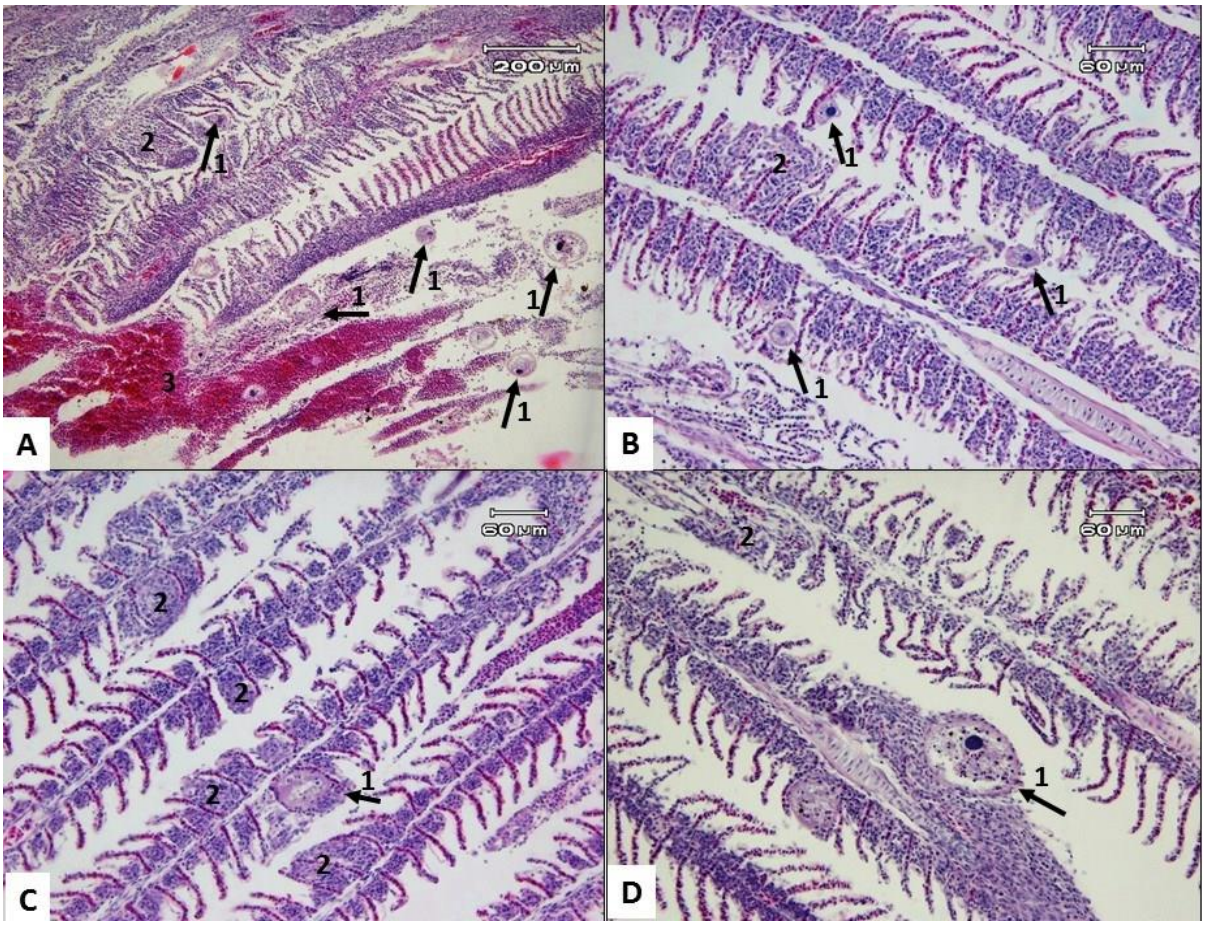
شکل ۱- منظره میکروسکوپی از بافت آبشش، A: ماهیان گروه کنترل قبل از مواجهه با انگل، B: ماهیان گروه تیمار قبل از مواجهه با انگل که در آن‌ها ساختار طبیعی آبشش شامل تیغه‌های اولیه (۱) و ثانویه (۲) و کانال‌های آبی عریض (۳) در تیغه‌های ثانویه، مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).



شکل ۲- منظره میکروسکوپی از بافت پوست، A: ماهیان گروه کنترل قبل از مواجهه با انگل، B: ماهیان گروه تیمار قبل از چالش با انگل که در آن‌ها ساختار طبیعی پوست شامل اپیدرم با سلول‌های سنگفرشی (۱)، مکعبی (۲) و موکوسی (۳) و درم (٤) مشاهده می‌شود (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).



شکل ۳- منظره میکروسکوپی از بافت پوست، A: ماهیان گروه کنترل بعد از مواجهه با انگل B: ماهیان گروه تیمار قبل از مواجهه با انگل که در آن‌ها تغییرات پاتولوژیک در پوست شامل افزایش ضخامت اپیدرم (۱) و هایپرپلازی سلول‌های موکوسی (۲) مشاهده می‌شود. البته در سطح پوست ماهیان گروه کنترل، خونریزی (۳) نیز وجود داشت (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۲۰۰).



شکل ٤- منظره میکروسکوپی از بافت آبشش. A و B: ماهیان گروه کنترل بعد از مواجهه با انگل، C و D: ماهیان گروه تیمار بعد از مواجهه با انگل که در آن‌ها مقاطع مختلف انگل در هر دو گروه وجود داشت (۱). همچنین تغییرات پاتولوژیک شامل هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیال همراه با همجوشی تیغه‌های ثانویه و متعاقب آن تنگ شدن کانال‌های آبی (۱) مشاهده می‌شود. در گروه کنترل، علاوه بر ضایعات ذکرشده، خونریزی شدید (۳) نیز ملاحظه می‌گردد (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، برای همه شکل‌ها / درشت‌نمایی شکل A ×۱۰۰ و شکل‌های B، C و D ×۲۰۰).

بحث و نتیجه‌گیری

ماهی گلدفیش که به ماهی قرمز هم معروف است، یک ماهی تزئینی محسوب می‌شود و از جنبه‌های مختلف واجد اهمیت می‌باشد. افراد زیادی به این ماهی علاقه‌مند بوده و مبادرت به نگه‌داری آن می‌نمایند و لذا در صنعت ماهیان آکواریومی ماهی بسیار مهمی محسوب می‌شود. از طرفی دیگر به عنوان یک مدل تحقیقاتی برای بررسی‌های بیولوژیکی و ایمنولوژیکی اعم از ساخت واکسن و دیگر جنبه‌های بیوتکنولوژیکی کاربرد بسیار وسیعی دارد و لذا در کشورهای پیشرفته تحقیقات زیادی روی آن صورت می‌گیرد.

در رابطه با بیماری‌های انگلی تک‌یاخته‌ای ماهی‌ها، *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* یکی از مهم‌ترین انگل‌های خارجی در ماهی پرورشی و زینتی است که سبب ایجاد خسارات زیادی در سراسر جان و ازجمله ایران می‌گردد. اگر چه روش‌های درمانی مختلف برای کاهش

شیوع این بیماری به کار می‌رود، اما تاکید اصلی بر روش‌های پیشگیری از طریق استفاده از مواد محرک ایمنی برای تقویت سیستم ایمنی در ماهی می‌باشد. در مطالعات قبلی که توسط سایر محققین صورت گرفته است نیز استفاده از انواع ترکیبات مختلف گیاهی علیه انگل مذکور مورد بررسی قرار گرفته و نتایج مفیدی به‌دست آمده است. در مطالعه اکانم و همکاران در سال ۲۰۰٤ کاهش تعداد انگل متعاقب مصرف عصاره تام گیاهان *Mucuna pruriens* و *Carica papaya* در ماهی قرمز مشاهده شده است (Ekanem *et al*., 2004).

امروزه پروبیوتیک‌ها بخش جدایی‌ناپذیر در فعالیت آبزی‌پروری شده‌اند که قادر به تقویت رشد، مقاومت در برابر بیماری و افزایش تولید هستند. مطالعات زیادی در خصوص اثرات مفید پروبیوتیک‌ها در کنترل بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی در گونه‌های مختلف ماهی وجود دارد (Pérez-Sánchez *et al*., 2013) ، اما تنها در یک مطالعه اثر مثبت پروبیوتیک GC۲ (*ائروموناس سوبریا*) علیه انگل جلدی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* نشان داده شد، به‌طوری‌که میزان بازماندگی و فاکتورهای ایمنی در گروه تیمار با این پروبیوتیک به صورت معنی‌داری افزایش یافت (Pieters *et al*., 2008). پروبیوتیک‌های جنس باسیلوس در آبزی‌پروری مورد استفاده قرار می‌گیرند. از باکتری‌های مربوط به این جنس می‌توان به *باسیلوس سابتیلیس* اشاره نمود که اثرات مفید آن در رشد، تقویت سیستم ایمنی، اثرات ضد توموری و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف در گونه‌های مختلف ماهی ها مشاهده و به اثبات رسیده است (Liu *et al*., 2013; Geng *et al*., 2011). در تعداد کمی از مطالعات نیز اثرات مثبت این پروبیوتیک بر مخاط پوست و روده گونه‌های ماهی نیز نشان داده شده است. به عنوان مثال، محمد و رافت در سال ۲۰۱۱ گزارش نمودند که پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* قادر به بهبود ضایعات مربوط به باکتری جلدی *فلاووباکتریوم کولومناریس* (*Flavobacterium coclomonaris*) در ماهی *تیلاپیای نیل* است (Mohammad and Refet, 2011). سرزولا و همکاران در سال ۲۰۱۳ نیز نشان دادند که این پروبیوتیک قادر به بهبود ساختار روده و جمعیت میکروبی در مخاط روده است (Cerezuela *et al*., 2013). با توجه به اثرات مفید این پروبیوتیک بر بافت‌های مخاطی گونه‌های ماهی، به‌نظر می‌رسد که این پروبیوتیک در تقویت سیستم ایمنی در ماهی‌های آلوده به انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* نیز موثر باشند.

بر اساس نتایج حاصله از تحقیق حاضر، تعداد ماهی آلوده در گروه دریافت‌کننده‌ٔ پروبیوتیک، ٤ مورد بود، اما در گروه کنترل هر ١٦ ماهی آلوده بودند. همچنین با محاسبه‌ٔ میانگین از نظر تعداد انگل‌ها، میزان انگل در گروه دریافت‌کننده پروبیوتیک به شکل معنی‌داری کمتر بود و بر اساس تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نتایج آزمون مربع کای هم، میزان آلودگی به انگل خارجی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهیان گروه تیمار، به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از آلودگی مذکور در ماهیان گروه کنترل بود. یعنی از نظر تعداد ماهی آلوده در هر گروه و میزان بار آلودگی در هر ماهی نیز، در گروه تیمار آلودگی کمتر بوده و در میزان میانگین اندازه تروفونت‌های انگل در مقایسه با گروه کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده شد.

در نتیجه‌گیری کلی باید ذکر نمود که پروبیوتیک *باسیلوس سابتیلیس* با دارا بودن قابلیت‌های مختلف مانند توانایی شکستن پروتئین‌ها و کربوهیدرات‌ها و تولید برخی ویتامین‌های گروه B مانند بیوتین و B12 و برخی ویژگی‌های دیگر، علاوه بر تقویت متابولیسم کلی بدن و افزایش رشد، سبب تحریک سیستم ایمنی و افزایش کفایت ایمنی شده و موجبات جلوگیری از ابتلا به بیماری‌ها و یا کاهش عوارض بیماری‌ها را سبب می‌شود.

سپاسگزاری

این تحقیق در قالب یک پایان نامه دانشجویی با کد ۱۰۲۱۰۵۰۱۹۷۲۰۳۴ انجام گرفته و لذا از واحد علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی تبریز برای پشتیبانی معنوی و مالی از این پایان نامه دانشچویی کمال تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Alishahi, M. and Buchmann, K. (2006). Temperature-dependent protection against Ichthyophthirius multifiliis following immunisation of rainbow trout using live theronts. Diseases of Aquatic Organisms, 72(3): 269-270. [In Persian]
- Alvarez, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. Veterinary Immunology and Immunopathology, 126(3): 171-198.
- Bauer, O.N., Musselius, V.A. and Strelkov, Yu.A. (1981). Diseases of Pond Fishes. palestine program for scientific translation, Jerusalem, 9(3): 8-10.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia, S.T., Meseguer, J., Moriñigo, M.A. and Esteban, M.A. (2013). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and Bacillus subtilis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. Fish and Shellfish Immunology, 7(3): 1-10.
- Ekanem, A.P., Obiekezie, A., Kloas, W. and Knopf, K. (2004). Effects of crude extracts of Mucuna pruriens (Fabaceae) and Carica papaya (Caricaceae) against the protozoan fish parasite Ichthyophthirius multifiliis. Parasitology Research, 92(3): 361-366.
- Ellis, A.E. (1988). Fish Vaccination. 1st ed., London Academic Press, pp: 225-226.
- Epple, M., Ganesan, K., Heumann, R., Klesing, J., Kovtun, A., Neumann, S., *et al*. (2010). Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. Journal of Materials Chemistry, 20(1): 18-23.
- Fletcher, G.L. and Rise, M.L. (2012). Aquaculture Biotechnology. Chichester: Wiley-Blackwell. Publisher: Wiley-Blackwell, pp: 22-98.
- Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., *et al.* (2011). Effects of dietary chitosan and Bacillus subtilis on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, Rachycentron canadum. Fish and Shellfish Immunology, 31(1): 400-406.
- Garedaghi, Y., Nouri, M.K., Kakekhani, S. and Nazeri, M. (2011). Survey of experimental contamination to Ichthyophthirius multifiliis in cultural rainbow trout consequently vaccination with Aquavac garvetil. Journal of Animal Veterinary Advances, 10: 1473-1476. [In Persian]

- He, J., Yin, Z., Xu, G., Gong, Z., Lam, T.J. and Sin, Y.M. (1997). Protection of goldfish against Ichthyophthirius multifiliis by immunization with a recombinant vaccine. Aquaculture, 158(1): 1-10.
- Jaafar, R.M., Skov, J., Kania, P.W. and Buchmann, K. (2011). Dose dependent effects of dietary immunostimulants on rainbow trout immune parameters and susceptibility to the parasite Ichthyophthirius multifiliis. Journal of Aquaculture Research and Development, 3: S3-001.
- Jørgensen, L.V.G., Korbut, R., Jeberg, S., Kania, P.W. and Buchmann, K. (2018). Association between adaptive immunity and neutrophil dynamics in zebrafish (*Danio rerio*) infected by a parasitic ciliate. Plos one Journal, 31(1): 1-18.
- Kabata, Z. (1985). Parasites and Diseases of Culture in the Tropics. 1st ed., Taylor and Francis Press, pp: 8-98.
- Kennedy, C.R. (1975). Ecological Animal Parasitology. 1st ed., London, Blackwell Scientific Publication, pp: 67.
- Ling, F., Wang, J.G., Lu, C., Wang, G.X., Hui, Y.H. and Gong, X.N. (2012). Effects of aqueous extract of Capsicum frutescens (Solanaceae) against the fish ectoparasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitology Research, 11(1): 841-848.
- Liu, C.H., Chiu, C.H., Wang, S.W. and Cheng, W. (2012). Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, Epinephelus coioides. Fish and Shellfish Immunology, 33(1): 699-706.
- Lom, J. (1973). The adhesive disc of *Trichodinella epizootica* ultrastructure and injury to the host tissue. Folia Parasite Journal, 20(1): 193- 202.
- Lom, J. and Dykora, I. (1992). Protozoan for fishes, Elsevier science publisher Amsterdam. 1st ed., Elsevier Amsterdam Press, pp: 314-315.
- Mohamed, M.H. and Refat, N.A.A. (2011). Pathological evaluation of probiotic, *Bacillus subtilis*, against *Flavobacterium columnare* in *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) fish in Sharkia Governorate, Egypt. The Journal of American Science, 7(2): 244-256.
- Mohammad, R., Skov, J., Kania, P.W. and Buchmann, K. (2014). Dose dependent effects of dietary immunostimulants on *Rainbow trout* immune parameters and susceptibility to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. Aquaculture Research and Development S, 3: S3-001.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., Blas, I. and Balcázar, J.L. (2013). Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture, 5(1): 1-14.
- Poulin, R. and Chappel, L.H. (2002). Parasites in marine systems. 1st ed., Cambridge University Press, pp: 216.