In-vitro effects of Aquastart on theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract:

Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the economically and nutritionally important famed species of cold-water fish in Iran. *Ichthyophthirius multifiliis* is a parasitic infection; that causes economic losses in aquaculture industry. The present study aimed to investigate the *in-vitro* effect of Aquastart on *I. multifiliis* theronts isolated from Rainbow trout. From a rainbow trout fish farm, 20 infected fish (average weight: 20±4 gr and average length: 14±2 cm) with *I. multifiliis* were trapped. They were exposed to 80 non-infected fingerling fish in three phases. The theronts were isolated from throphonts on the skin and gills of infected fish and counted. The concentrations of 5, 10, 20, 50, 100, and 200 mg/kg of Aquastart were provided from stock Aquastart (400 mg/kg), and 300 theronts were added. The lethal effect of Aquastart against the examined theronts were determined along with two control groups of Malachite green (0.05 mg/kg), and 50 ml dechlorinate water without Aquastart. The minimum and maximum lethal effects of Aquastart were at 0.67 ± 0.038 (200 mg/L) and 150 ± 1.2 (5 mg/L), respectively. The duration of the lethal effect of Aquastart had a significant association with concentration. From the results of this study, it was concluded that Aquastart had a toxic effect on theronts of *I. multifiliis* isolated from Rainbow trout and different concentrations of Aquastart at different time durations eliminated them.

KEY WORDS: Aquastart, *Ichthyophthirius multifiliis*, Rainbow trout, Theront

غیر قابل استناد

مطالعه اثرات برون‌تنی آکوااستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

چکیده:

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از گونه‌های پرورشی با اهمیت اقتصادی و غذایی از ماهیان سردآبی ایران است. *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* آلودگی انگلی است که موجب بروز خسارت‌های اقتصادی زیادی در صنعت آبزی‌پروری می‌شود. مطالعه حاضر برای بررسی تاثیر برون‌تنی آکواستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. از یک مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به ایک، ۲۰ قطعه ماهی زنده (میانگین وزن بدن ۴±۲۰ گرم و طول ۲±۱۴ سانتی‌متر) آلوده به تروفونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* صید شدند. ۸۰ قطعه بچه ماهی انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان بدون آلودگی در ۳ مرحله مجاورت داده شدند. ترونت‌ها از تروفونت‌های جدا شده از پوست و آبشش ماهیان آلوده تهیه و شمارش گردیدند. از غلظت پایه آکواستارت (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه و ۳۰۰ ترونت اضافه شد. میزان کشندگی آکواستارت در حضور دو گروه شاهد شامل مالاشیت‌سبز (۰/۰۵ میلی‌گرم در میکرولیتر) و آب بدون آکواستارت (۵۰ میکرولیتر) ارزیابی گردید. کمترین زمان بروز اثر کشندگی آکواستارت در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۰/۰۳۸ ± ۰/۶۷ و بیشترین زمان اثر آن در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر ۱/۲ ± ۱۵۰ ثانیه بود. مدت زمان بروز اثر کشندگی آکواستارت با غلظت آن ارتباط معنی‌داری داشت. نتایج این مطالعه نشان داد که آکواستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اثر سمی دارد و غلظت‌های مختلف آن در زمان های مختلف موجب از بین رفتن آن‌ها می گردد.

کلید واژه: آکواستارت، *ایکتیوفتیریوس مولتی فیلیس*، ترونت، قزل‌آلای رنگین‌کمان

مقدمه:

ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس یک تک‌یاخته مژه‌دار و انگل پوست و آبشش ماهی محسوب می‌شود. این انگل عامل لکه‌سفید در ماهی است (Gholipour-Kanani et al., 2012; Raissy & Ansari, 2012). *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* یک چرخه زندگی مستقیم و دارای سه مرحله ترونت عفونی، تروفونت انگلی و تومونت زایشی است. ترونت‌ها فعالانه در آب شنا می‌کنند و برای تغذیه با ورود به مخاط، بافت آبشش و پوست به تروفونت تبدیل می‌شوند. تروفونت‌ها پس از رشد به تروفونت بالغ تبدیل می‌شوند. تروفونت انگل (۱ – ۰/۵ میلی متر) در روی پوست به صورت لکه‌های سفید ظاهر می‌شود. تروفونت‌های بالغ به طور فعال پوست و آبشش ماهی را ترک و به تومونت کپسوله تبدیل می‌شود و برای تشکیل تومیت‌ها تقسیم و به شکل ترونت، آزاد می‌شوند (Matthews, 2005; Abdel-Hafez et al., 2014). *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* به دلیل تحمل تغییرات دمایی گسترده و حساسیت میزبانی پایین می‌تواند موجب بروز خسارات اقتصادی زیادی پرورش دهندگان ماهی شده است (Traxler et al., 1998; Aihua & Buchmann, 2001; Matthews, 2005; Jorgensen et al., 2008). البته گزارش ثبت شده‌ای از خسارات اقتصادی بیماری ایک (بیماری لکه‌سفید، ایکتیوفتیریازیس) با اینکه می‌تواند یک معضل بزرگ آبزی پروری باشد، نبود.

توانایی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در انطباق با میزبان‌ها و محیط‌های متفاوت، انتشار آن را در گونه‌های آب شیرین در سراسر جهان تسهیل کرده است. تاکنون هیچ گونه مقاومی گزارش نشده است (Dickerson, 2006; Chang et al., 2001). این انگل توانایی مرگ و میر در ماهیان یک مزرعه حتی در بین مولدین را دارد (Rintamäki-Kinnunen, 1997). آلودگی به *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* از ماهیان پرورشی بیشتر مناطق دنیا به استثنای آمریکا گزارش شده است (Ogut et al., 2005). *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* برای اولین بار در فرانسه گزارش شد (Picón-Camacho et al., 2012). حضور تک‌یاخته *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* عامل بیماری ایک برای اولین بار در ایران در سال ۱۳۵۹ گزارش شد (Mokhir, 1980).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از جمله ماهیان حساس به بیماری ایک است (Maki, 2003). زمانی که ترونت‌های انگل در مرحله شنای آزادند، انگل در حساس‌ترین شرایط تکاملی خود قرار دارد، به طوری که تومنت‌های کف استخر و تروفونت‌های واقع در عمق اپیدرم می‌توانند خود را از خطر مواد شیمیایی پنهان سازند (Tucker & Robinson, 1990).

شناسایی ترکیبات ضدانگلی مؤثر بر ترونت‌ها و قطع چرخه‌ی زندگی انگل حائز اهمیت می‌باشد. درمان شیمیایی در سیستم‌های آبی با دو مشکل بروز سمیت برای ماهی و آلودگی زیست‌محیطی همراه است (Ling et al., 2010). استفاده از مالاشیت‌گرین به همراه خوراک ماهی، به دلیل اثرات سرطان‌زایی و تراتوژنیک در انسان، در بسیاری از کشورها ممنوع گردیده است (Picón-Camacho *et* al., 2012). همچنین استفاده از برخی ترکیبات مانند کلریدسدیم، فرمالین و سولفات‌مس، باعث نگرانی‌های زیست‌محیطی شده است (Picón-Camacho et al., 2012). بنابراین، ارزیابی ترکیبات مختلف ضد انگل جهت شناسایی و کاربرد ترکیباتی با نفوذ و بقای کم در بافت ماهی و همچنین حداقل آسیب به محیط زیست مورد نیاز است.

آکواستارت یک ضدعفونی کننده عمومی بر پایه پراسیداستیک (۳–۵ درصد)، اسید استیک (۱۵–۵ درصد) و پراکسید هیدروژن (۲۳–۲۵ درصد) است که به صورت تجاری در ایران تولید می شود. فعالیت ضدمیکروبی آکواستارت ناشی از اکسیداسیون و اختلال در غشای سلولی است (Marchand et al., 2012). استفاده از آکواستارت و پراکسید هیدروژن در محیط‌های آبی را جهت کنترل و درمان عوامل بیماری‌زای ماهیان نظیر یرسینیا توصیه شده است (Gesto et al., 2018). این ترکیب به سرعت به اکسیژن، اسیداستیک و آب تجزیه شده و به سرعت توسط میکروارگانیسم‌ها متابولیزه می‌شود و پتانسیل جایگزینی با سایر مواد شیمیایی مضر مانند فرمالین، سولفات‌مس و ترکیبات آمونیوم چهارتایی را دارد (Pedersen et al., 2013; Lieke et al., 2020). بنابراین هدف از مطالعه حاضر، مجاورت دادن آکواستارت با ترونت های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و بررسی اثرات ضد ترونت و ارزیابی زمان و میزان مرگ و میر ترونت ها در غلظت های مختلف آکواستارت در شرایط برون تنی بود.

روش‌شناسی پژوهش:

روش نمونه برداری:

از یک مزرعه پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان مبتلا به ایک ، ۲۰ قطعه ماهی زنده آلوده (میانگین وزن بدن ۴±۲۰ گرم و طول ۲±۱۴ سانتی‌متر) به تروفونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* با علایم پرش و شنا در سطح آب استخر، ناراحتی تنفسی، ترشح موکوس، فرسایش باله‌ها و پوست، تیرگی پوست و زخم جمع‌آوری شدند. شاخص‌های دما (۰/۵±۱۳ درجه سانتی‌گراد)، اکسیژن محلول (۸ میلی‌گرم در لیتر) و pH (۰/۲±۷/۲) آب مزرعه نیز ثبت شدند. ماهی‌های جمع‌آوری شده در مخازن آب با منبع تامین اکسیژن به آزمایشگاه منتقل شدند.

روش جداسازی ترونت‌ها:

جهت آلودگی تجربی به تک‌یاخته *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس*، در ۳ مرحله ۸۰ قطعه بچه ماهی انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان عاری از آلودگی به ماهیان آلوده در آکواریوم مجاورسازی شدند. بعد از ۱۰ روز که ماهی‌ها به انگل آلوده شدند، تعداد ۴ قطعه ماهی آلوده صید شدند. برای جدا کردن تروفونت‌ها، پوست و آبشش آن‌ها به آرامی در یک پتری‌دیش حاوی آب بدون کلر خراش داده شدند و به پتری‌دیش حاوی آب بدون کلر (آب چاه قبل از استفاده در تانکر ۲۰مترمکعبی وارد و با ایرجت هوادهی شد). منتقل گردیدند. بعد از ۲ ساعت تومنت‌ها به کف پتری‌دیش چسبیدند و با آب بدون کلر سه بار شستشو داده شدند و ۲۴ ساعت در ۲۳ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آزاد شدن ترونت‌ها، تعداد آن‌ها با گذاشتن ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی انگل بر روی لام و افزودن ۲ میکرولیتر فرمالین ۱درصد شمارش گردیدند (Zhang et al., 2013).

روش آزمایش:

از غلظت پایه آکواستارت ۵ درصد (۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) (ماده ضدعفونی کننده با نام تجاری پراستیک اسید (رامیار شیمی تهران) و اجزای تشکیل دهنده پراسید استیک (۳–۵ درصد)، آب‌اکسیژنه (۲۳–۲۵ درصد) استیک اسید (۱۵–۵ درصد)؛ غلظت‌های ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۰، ۱۰ و ۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه گردید. به هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ چاهکی، ۵۰ میکرولیتر آب بدون کلر در حدود ۳۰۰ ترونت اضافه شد. برای هر غلظت از آکواستارت ۳ تکرار و برای هر تکرار دو چاهک شامل۵۰ میکرولیتر مالاشیت‌سبز (فرمول

شیمیایی$C_{۲۳}H_{۲۵}CIN_{۲}$) به عنوان کنترل مثبت از غلظت پایه ۰/۰۵ میلی‌گرم در میکرولیتر و آب بدون کلر و فاقد آکواستارت به عنوان کنترل منفی (۵۰ میکرولیتر) تهیه شدند. سپس مدت زمان کشندگی آکواستارت بر حسب ثانیه (عدم حرکت و دفورمه شدن ترونت‌ها) در هر چاهک در فاصله زمانی ۳ دقیقه برای هر غلظت در هر تکرار در نگاه ریزبینی با لوپ (نیکون مدل SMZ۶۴۵) در دمای۲۳ درجه سانتی‌گراد ارزیابی و ثبت گردید (Zhang et al., 2013).

روش ارزیابی آماری:

به منظور تعیین میزان کشندگی آکواستارت، پردازش آماری داده‌ها با استفاده از بسته آماری SPSS (version 26, Chicago, USA) به روش ANOVA دو طرفه تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری (p <۰/۰۵) بود.

یافته‌های پژوهش:

در این تحقیق، اثر کشندگی آکواستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* با کاهش در سرعت تحرک ترونت‌ها آغاز می‌شد و سپس ترونت‌ها به دور خود می چرخیدند تا اینکه بعد از مرگ به حالت کروی در آمدند **(شکل ۱):**

غیر قابل استناد

شکل شماره ۱. *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان . (الف)تروفوفت (بزرگنمایی X۱۰)، (ب) تومونت (بزرگنمایی x۵۰)، (ج) ترونت رنگ آمیزی شده با گیمسا (بزرگنمایی X۱۰۰)، (د) ترونت بدون رنگ آمیزی (بزرگنمایی ۱۰۰×) و (ه) ترونت مواجهه یافته با آکواستارت (بزرگنمایی ۱۰۰×).

اثر کشندگی آکواستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* رابطه مستقیمی با غلظت آن داشت. به طوری که در شرایط آزمایشگاهی مدت زمان لازم برای از بین بردن کامل ترونت‌ها در غلظت‌های بالای آکواستارت به طور معنی‌داری کمتر از غلظت‌های پایین آن بود و در طول مدت آزمایش در گروه کنترل منفی هیچ مرگ و میری مشاهده نشد ($p < ۰/۰۵$) (شکل ۱). کمترین زمان بروز اثر کشندگی آکواستارت در غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر ۰/۰۳۸ ± ۰/۶۷ و بیشترین زمان اثر آن در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر ۱/۲ ± ۱۵۰ ثانیه بود **(جدول ۱)**:

جدول ۱. نتایج اثر آکواستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در غلظت‌های مختلف در شرایط آزمایشگاهی.

غلظت (میلی گرم در لیتر)	میانگین زمان مرگ و میر (ثانیه، میانگین± انحراف معیار)	سطح اطمینان	
		حد پایین	حد بالا
۵	۱/۲ ±۱۵۰	۱۴۷/۰۲	۱۵۲/۹۸
۱۰	۵۶/۴۳ ± ۰/۹۰۷	۵۴/۱۸	۵۸/۶۹
۲۰	۲۵/۱۷ ± ۰/۳۰۶	۲۴/۴۱	۲۵/۹۳
۵۰	۱۲/۱۰ ± ۰/۲۶۵	۱۱/۴۴	۱۲/۷۶
۱۰۰	۰/۸۷ ± ۰/۰۴۴	۰/۷۶	۰/۹۸
۲۰۰	۰/۶۷ ± ۰/۰۳۸	۰/۵۷	۰/۷۶
کنترل مثبت (مالاشیت سبز)	۳۹۳/۳ ± ۱۵/	۳۵۵/۳۸	۴۳۱/۲۷
کنترل منفی (آب فاقد کلر)	۰۰ ± ۰۰	۰۰ ± ۰۰	۰۰ ± ۰۰

بحث:

واکسیناسیون به عنوان یک روش پیشگیری بالقوه در برابر بیماری ایک در آبزی پروری مطرح است (Jørgensen, 2017; Xu et al., 2009). ولی تاکنون واکسنی برای بیماری ایک به صورت تجاری ارایه نشده است (Dickerson and Findly, 2014). بنابراین مطالعات متعددی برای درمان ماهیان آلوده و یا آب حاوی ترونت‌های فعال انجام شده است (Jørgensen, 2017). امروزه در مزارع پرورشی ماهیان سردآبی از ضدعفونی کننده‌ها برای درمان و کنترل آلودگی‌های ناشی از انگل‌های خارجی استفاده می‌شود (Roque et al., 2010; Pedersen et al., 2013). غلظت و نسبت آکواستارت اثر میکروب‌کشی آن را تعیین می‌کند. فعالیت ضدمیکروبی آن ناشی از اکسیداسیون و متعاقب آن اختلال در غشای سلولی میکروب است و در طیف وسیعی از دماها عمل می‌کند ولی در شرایط قلیایی فعالیت آن کاهش می‌یابد (Marchand et al., 2012). باتوجه به مدت زمان تولید و اضمحلال آکواستارت، آن را جایگزینی مناسب برای سایر ضدعفونی‌کننده‌های رایج در آبزی‌پروری معرفی کرده‌اند (Danner & Merrill, 2005;

(Pedersen et al., 2009; Lahnsteiner & Kletzl, 2016; Liu et al., 2017). Hooshangi et al. (2016) مرگ و میر برای آکواستارت در تیمارهای با غلظت ۱، ۱۰ و ۶۵میلی‌گرم در لیتر ثبت نشد و حداکثر غلظت مجاز استفاده از آکواستارت در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را ۸/۹ میلی‌گرم در لیتر در شرایط اپتیمم زیستی توصیه کردند. آکواستارت به دلیل سرعت تجزیه شدن به اکسیژن و آب نسبت به سایر ضد عفونی کننده ها یک ماده ضد عفونی کننده عمومی با رفتار و اثرات پاتولوژیک ایمن برای استفاده در مزارع پرورشی ماهی قزال آلا گزارش نمودند.

در این مطالعه، غلظت‌های مورد استفاده آکواستارت موجب از بین رفتن ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در کمتر از ۳ دقیقه شدند. در تحقیقی Meinelt et al. (2007) نشان دادند آکواستارت در غلظت کمتر از ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر در مدت ۵ دقیقه تعداد ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* جدا شده از ماهی *ساندر لوسیوپرکا* را در مقایسه با گروه شاهد ۲۴ درصد کاهش داد. Rintamäki-Kinnunen et al. (2005a,b) آلودگی به *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در ماهیان قزل‌آلا و آزاد با مخلوطی از آکواستارت و فرمالین کاهش دادند. Straus & Meinelt (2009) اثر سمی آکواستارت بر ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در غلظت ۴/۵ درصد در شرایط برون‌تنی گزارش کردند. Gesto et al. (2018) نیز اثر سمی آکواستارت بر ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* را در غلظت‌های ۰/۳ میلی‌گرم در لیتر و ۰/۸ میلی‌گرم در لیتر گزارش نمودند. در تحقیقی Meinelt et al. (2009) اثر آکواستارت ۴۰ درصد را بر تومونت آزاد و کپسول‌دار و تومیت‌های در حال رشد را بررسی کردند و نشان دادند آکواستارت در غلظت کمتر از ۲ میلی‌گرم در لیتر موجب مرگ تمامی تومونت‌ها در ۴۸ ساعت شد. ولی تومونت‌های تازه آزاد شده و در حال رشد تعداد ترونت‌های کمتری تولید کردند.

Sudová et al. (2010) گزارش کردند که غلظت ۱ میلی‌گرم در لیتر آکواستارت قادر به حذف *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در آبشش، پوست و باله کپور ماهیان آلوده بود. ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با کاهش سطح کورتیزول پلاسمایی می‌تواند به قرار گرفتن مکرر در معرض آکواستارت عادت کند و با حضور استرس‌زای *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* مقابله نماید (Gesto et al., 2018).در مطالعه Hoshangi et al. (2016) در تیمارهای با غلظت ۱، ۱۰، ۶۵ میلی‌گرم در لیتر مرگ و میر *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* ثبت نشد و رفتارشان طبیعی بود. حداقل غلظت کشنده ۵۰ درصد برای آکواستارت را ۴/۹۶ میلی‌گرم در لیتر گزارش کردند. NekuieiFard et al. (2018) استفاده از آکواستارت در مقایسه با فرمالین و مالاشیت گرین را برای کنترل بار قارچی آب و تخم سبز قزل‌آلای رنگین کمان گزارش کردند و غلظت ۱۰۰میلی گرم در لیتر را برای کاهش بار قارچی در آلودگی تخم و آب پیشنهاد نمودند. Weitkamp et al. (2016) انگل‌های خارجی ماهیان پرورشی از جمله تریکودینا و ژیروداکتیلوس را با استفاده از

غلظت ۲/۶ میلی‌گرم در لیتر آکواستارت در طی۳ روز از بین بردند. بنابراین آکواستارت بر مراحل آزادزی و غیر انگلی *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* موثر می‌باشد.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها:

نتایج این مطالعه نشان داد در شرایط برون‌تنی غلظت‌های مختلف آکواستارت ۵ درصد موجب از بین رفتن کامل ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* شده و غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر آن ضدعفونی کننده مناسبی بر ضد ترونت‌های *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* بود. از آنجایی که هچ شدن تومونت و ترونت *ایکتیوفتیریوس مولتی‌فیلیس* در روی بدن ماهی همزمان نیست، غلظت مناسب آکواستارت در مقیاس طولانی‌مدت باید در هنگام درمان برضد این تک یاخته انگل خارجی در شرایط میدانی تعیین شود. البته به دلیل ناپایداری آکواستارت، بایستی درمان ماهیان آلوده در شرایط دینامیکی انجام شود تا از در معرض قرار گرفتن آن‌ها با غلظت‌های ثابت این ترکیب اطمینان حاصل شود.

سپاسگزاری:

بدین وسیله نویسندگان از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ارومیه که با تصویب و حمایت مالی از پایان نامه به شماره ۱-۱۴۰۰ امکان انجام مطالعه را فراهم آوردند و نیز همکاران سازمان آرتمیای کشور و اداره کل دامپزشکی استان آذربایجان‌غربی، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱- جلالی جعفری، بهیار (۱۳۷۷) . *انگل ها و بیماری های انگلی ماهیان آب شیرین ایران*. اداره کل آموزش و ترویج، ۱۳۱-۱۶۷.

۲- جلالی، بهیار.، محبوبی صوفیانی، نصراله.، اسدالله، سعید و برزگر، مریم (۱۳۹۱). بررسی انگل های ماهیان تالاب حنا، سمیرم، اصفهان. *مجله علمی شیلات ایران*، شماره ۱، صفحات ۲۵-۳۸.

غیر قابل استناد

۳- خلجی، مهتاب.، سرخوش، جعفر.، امینی، شهره.، صیامی، مسعود.، زنگنه، مسعود و اسدالهی، سعید (۱۳۹۵). مطالعه رابطه بین اندازه ماهی و شدت آلودگی به برخی تک یاختگان انگلی ماهیان مولی (*Poecilia latipinna*) قنات جرقویه اصفهان. *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۵(۳) ،۲۵۱- ۲۵۷.

۴- مخیر، بابا (۱۳۵۹). بررسی انگل های ماهیان حوزه سفید رود. نامه دانشکده دامپزشکی، ۳۶(۴)، ۷۴-۶۱.

۵- نکوئی فرد، علی.، سپهداری، ابوالفضل.، دادگر، شهرام.، عبدی، کاظم.، رهنما، شهرام (۱۳۹۸). مطالعه اثر مقایسه ای آکواستارت (*Aqua start*) در تخم سبز و لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورشی با مالاشیت سبز و فرمالین. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور ، فیپاک، شماره فروست ۵۶۸۱۵، ۶۴ صفحه.

۶- هوشنگی، رامتین.، سلطانی، مهدی.، حسینی شکرابی.، سید پژمان (۱۳۹۶). تعیین غلظت کشندگی متوسط (LC۵۰) داروی ضدعفونی کننده آکواستارت و بررسی آسیب شناسی آبشش در بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). *پاتوبیولوژی مقایسه ای*، ۱۴ (۲)، ۲۲۱۶-۲۲۰۷.

References

1- Abdel-Hafez, G., Lahnsteiner, F., & Mansour, N. (2014). Possibilities to control *Ichthyophthirius multifiliis* infestation with medicated feed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and chub (*Leuciscus cephalus*). *Parasitology Research*, 113(3), 1119-1126. https://doi.org/10.1007/s00436-013-3749-9.

2- Aihua, L., & Buchmann, K. (2001). Temperature-and salinity-dependent development of a Nordic strain of *Ichthyophthirius multifiliis* from rainbow trout. *Journal of Applied Ichthyology*, 17(6), 273-276. https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2001.00279.x.

3- Chang, C. F., Yang, C. H., Shu, Y. O., Chen, T. I., Shu, M. S., & Liao, I. C. (2001). Effects of temperature, salinity and chemical drugs on the in vitro propagation of the Dinoflagellate parasite, *Amylodinium ocellatum*. *Asian Fish Soc*, 31.

4- Danner, G. R., & Merrill, P. (2005). Disinfectants, disinfection, and biosecurity in aquaculture. *Aquaculture Biosecurity: Prevention, Control, and Eradication of Aquatic Animal Disease*, Wiley Online Library, pp: 91-128.

5- Dickerson, H. W. (2006). *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (phylum Ciliophora). Fish diseases and disorders: Protozoan and metazoan infections, Vol. 1, pp. 116-153.

6- Dickerson, H. W., & Findly, R. C. (2014). *Immunity to Ichthyophthirius infections in fish: a synopsis*. *Developmental & Comparative Immunology*, 43(2), 290-299.

7- Gesto, M., Liu, D., Pedersen, L. F., Meinelt, T., Straus, D. L., & Jokumsen, A. (2018). Confirmation that pulse and continuous peracetic acid administration does not disrupt the acute stress response in rainbow trout. *Aquaculture*, 492, 190-194. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.04.009.

8- Gholipour-Kanani, H., Sahandi, J., & Taheri, A. (2012). Influence of garlic (*Allium sativum*) and Mother worth (*Matricaria chamomilla*) extract on *Ichthyophtirius multifilus* parasite treatment in Sail Fin Molly (*Poecilia latipinna*) ornamental fish. *APCBEE Procedia*, 4, 6-11.
9- Hooshangi, R., Soltani, M., & Hosseini Shokrabi., S.P. (2016). Determining the average lethal concentration (LC50) of Aquastart disinfectant and investigating gill pathology in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Pathobiology*, 14(2), 2207-2216. (In Persian).
10- Jalali Jafari, B. (1998). *Parasites and parasitic diseases of Iranian freshwater fish*. General Directorate of Education and Promotion, pp: 131-167. (In Persian).
11- Jalali, B., Mahbobi Soofiani, N., Asadollah, S., and Barzegar, M. (2012). An investigation on fish parasites in Hanna Wetland, Semirom, Isfahan Province. . *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 21(1), 25-38. (In Persian).
12- Jorgensen, T. R., Larsen, T. B., & Buchmann, K. (2008, November). Parasitic infections in model trout farms. In Control of pathogens in warm water aquaculture and recirculated model trout farms. Proceedings of the SCOFDA Workshop. November 4 and 5, 2008. University of Copenhagen, Frederiksberg, Denmark. Printed by Frederiksberg Bogtrykkeri, Denmark (www.fishnet.dk/scofda).
13- Jørgensen, L. (2017). The fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis* host immunology, vaccines and novel treatments. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 586-595. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.044.
14- Khalaji, M., Sarkhosh, J., Amini, S. H., Siyami, M., Zangene, M., & Asadolahi, S. (2016). The relation between size and parasite load in the Molly fish (*Poecilia latipinna*) of Jarghoyeh qanat, Isfahan Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 25(3) 251-257. (In Persian).
15- Lahnsteiner, F., & Kletzl, M. (2016). Investigations on the effect of formalin and iodophor on embryo and larvae development in pikeperch, *Sander lucioperca*. *Journal of Applied Aquaculture*, 28(1), 47-51.
16- Lieke, T., Meinelt, T., Hoseinifar, S. H., Pan, B., Straus, D. L., & Steinberg, C. E. (2020). Sustainable aquaculture requires environmental-friendly treatment strategies for fish diseases. *Reviews in Aquaculture*, 12(2), 943-965. https://doi.org/10.1111/raq.12365.
17- Ling, F., Wang, J. G., Liu, Q. F., Li, M., Ye, L. T., & Gong, X. N. (2010). Prevention of *Ichthyophthirius multifiliis* infestation in goldfish (*Carassius auratus*) by potassium ferrate (VI) treatment. *Veterinary Parasitology*, 168(3-4), 212-216.
18- Liu, D., Pedersen, L. F., Straus, D. L., Kloas, W., & Meinelt, T. (2017). Alternative prophylaxis/disinfection in aquaculture-adaptable stress induced by peracetic acid at low concentration and its application strategy in RAS. *Aquaculture*, 474, 82-85. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.03.027.
19- Maki, J. L., & Dickerson, H. W. (2003). Systemic and cutaneous mucus antibody responses of channel catfish immunized against the protozoan parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(5), 876-881.
20- Marchand, P. A., Phan, T. M., Straus, D. L., Farmer, B. D., Stüber, A., & Meinelt, T. (2012). Reduction of in vitro growth in *Flavobacterium columnare* and *Saprolegnia parasitica* by products containing peracetic acid. *Aquaculture Research*, 43(12), 1861-1866.
21- Matthews, R. A. (2005). *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and *ichthyophthiriosis* in freshwater teleosts. *Advances in parasitology*, 59, 159-241.
22- Meinelt, T., Richert, I., Stüber, A., & Bräunig, I. (2007). Application of peracetic acid to the parasite *Ichthyophthirius multifiliis* in Sander (*Sander lucioperca*) breeding. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 114, 244–251. https://doi.org/10.2377/0341-6593-114-244.

23- Meinelt, T. H. O. M. A. S., Matzke, S., Stüber, A., Pietrock, M., Wienke, A., Mitchell, A. J., & Straus, D. L. (2009). Toxicity of peracetic acid (PAA) to tomonts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86(1), 51-56. https://doi.org/10.3354/dao02105.
24- Mokhir, B. (1980). Survey of fish parasites of Sefidroud basin. *College of Veterinary Medicine Letters*, 36(4), 61-74. (In Persian).
25- NekuieiFard, Ali, Sephadari, Abolfazl, Dadgar, Shahram, Abdi, Kazem, Rahmana, Shahram (2018). Studying the comparative effect of *Aquastart* on green eggs and larvae of rainbow trout reared with malachite green and formalin. *Fisheries Science Research Institute of the country*, FIPAK, Frost number 56815, 64 pages. (In Persian).
26- Ogut, H., Akyol, A., & Alkan, M. Z. (2005). Seasonality of *Ichthyophthirius multifiliis* in the trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms of the eastern black sea region of Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 5(1), 23-27.
27- Pedersen, L. F., Meinelt, T., & Straus, D. L. (2013). Peracetic acid degradation in freshwater aquaculture systems and possible practical implications. *Aquacultural Engineering*, 53, 65-71.
28- Pedersen, L. F., Pedersen, P. B., Nielsen, J. L., & Nielsen, P. H. (2009). Peracetic acid degradation and effects on nitrification in recirculating aquaculture systems. *Aquaculture*, 296(3-4), 246-254. https://doi.org/10.1023/A:1009277012959.
29- Picon-Camacho, S. M., Marcos-Lopez, M., Bron, J. E., & Shinn, A. P. (2012). An assessment of the use of drug and non-drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. *Parasitology*, 139(2), 149-190. https://doi.org/10.1017/S0031182011001867.
30- Raissy, M., & Ansari, M. (2012). Parasites of some freshwater fish from Armand river, chaharmahal va Bakhtyari province, Iran. *Iranian Journal of Parasitology*, 7(1), 73.
31- Rintamäki-Kinnunen, P., & Valtonen, E. T. (1997). Epizootiology of protozoans in farmed salmonids at northern latitudes. *International Journal for Parasitology*, 27(1), 89-99. https://doi.org/10.1016/S0020-7519(96)00162-2.
32- Rintamäki-Kinnunen, P., Rahkonen, M., Mannermaa-Keränen, A. L., Suomalainen, L. R., Mykrä, H., & Valtonen, E. T. (2005a). Treatment of *ichthyophthiriasis* after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64(1), 69-76. https://doi.org/10.3354/dao066015.
33- Rintamäki-Kinnunen, P., Rahkonen, M., Mykrä, H., & Valtonen, E. T. (2005b). Treatment of *ichthyophthiriasis* after malachite green. II. Earth ponds at salmonid farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 66(1), 15-20.
34- Roque, A., Yildiz, H. Y., Carazo, I., & Duncan, N. (2010). Physiological stress responses of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) to hydrogen peroxide (H2O2) exposure. *Aquaculture*, 304(1-4), 104-107. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.03.024.
35- Straus, D. L., & Meinelt, T. (2009). Acute toxicity of peracetic acid (PAA) formulations to *Ichthyophthirius multifiliis* theronts. *Parasitology Research*, 104(5), 1237-1241. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1361-9.
36- Sudová, E., Straus, D. L., Wienke, A., & Meinelt, T. (2010). Evaluation of continuous 4-day exposure to peracetic acid as a treatment for *Ichthyophthirius multifiliis*. *Parasitology Research*, 106(2), 539-542. https://doi.org/10.1007/s00436-009-1666-8.
37- Traxler, G. S., Richard, J., & McDonald, T. E. (1998). *Ichthyophthirius multifiliis* (Ich) epizootics in spawning sockeye salmon in British Columbia, Canada. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10(2), 143-151. https://doi.org/10.1577/1548-8667.
38- Tucker, C. C., & Robinson, E. H. (1990). *Channel catfish farming handbook*. Springer Science & Business Media.

39- Weitkamp, H., Meinelt, T., Bräunig, I., Staaks, J., Jander, G. (2007). Einsatz von Peressigsäure bei Fisch-Ektoparasitosen. In: Wahli, T., Segner, H., Schmidt-Posthaus, H., Bernet, D. (eds) Tagungsband XI. Gemeinschaftstagung der Deutschen, der Österreichischen und der Schweizer Sektion der European Association of Fish Pathologists (EAFP). EAFP, Murten, pp. 1–21.
40- Xu, D. H., Klesius, P. H., & Shoemaker, C. A. (2009). Effect of immunization of channel catfish with inactivated trophonts on serum and cutaneous antibody titers and survival against *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish & Shellfish Immunology*, 26(4), 614-618.
41- Zhang, Q., Xu, D. H., & Klesius, P. H. (2013). Evaluation of an antiparasitic compound extracted from *Galla chinensis* against fish parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Veterinary Parasitology*, 198(1-2), 45-53. https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.08.019.

غیر قابل استناد

In-vitro effects of Aquastart on theronts of *Ichthyophthirius multifiliis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Abstract:

Introduction: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is one of the economically and nutritionally important famed species of cold-water fish in Iran. *Ichthyophthirius multifiliis* is a parasitic protozoan infection; causes economic losses in to both aquaculture and ornamental fish industries. Rainbow trout is a sensitive fish to white spot disease. *Ichthyophterius multifiliis* is a ciliate protozoan with global distribution and low host specificity. It has the potential to destroy all fish in a farm. There are different levels of resistance among different hosts. So far, no vaccine and resistance has been reported in farmed fish against *I. multifiliis* infection. In earlier years, green malachite was applied as an effective compound against *I. multifiliis*, but it has been prohibited in many countries because of its carcinogenic and teratogenic effects in humans. In addition, other chemical compounds like copper sulfate, sodium chloride, potassium permanganate, and formalin, have some environmental issues such as aquatic ecosystems changes with lower efficiency and higher cost. Thus, the seeking for effective and environmental agents and management procedures to prevent *I. multifiliis* infection is essential. Aquastart is as an effective antimicrobial agent against other fish pathogens in aquaculture. Additionally, production time and degradation of Aquastart were introduced it as a suitable disinfectants in aquaculture. The present study aimed to investigate *in-vitro* effect of Aquastart (antiseptic solution) on *I. multifiliis* isolated from rainbow trout.

Material & Methods: From a rainbow trout fish farm, a total number of 20 infected rainbow trout fish with body weight average 20±4 gr and length 14±2 cm and *I. multifiliis* trophont were trapped from a rainbow trout breeding farm suffering from ICH disease. Then, 80 uninfected fingerling rainbow trout were gotten exposed to each other in three stages. To isolate trophonts, their skin and gills were gently scraped in a petri dish containing chlorine-free water and the scarps transferred to a petri dish containing chlorine-free water. After 2 hours, the tomonts were attached to the bottom of the Petri dish, washed three times with chlorine-free water, and incubated for 24 hours at 23°C. Afterwards to release and counting the theronts, 2 µL of parasite containing suspension were placed on the slide and 2 µL of 1% formalin were added. Concentrations of 200, 100, 50, 20, 10 and 5 mg/L were prepared from the stock concentration of Aquastart (400 mg/L) and 300 theronts were added. The lethality level of aquastart was evaluated with presence of control groups, i.e. malachite green (0.05 mg/ µL) and water without Aquastart (50µL).

Results and discussion: The minimum time of occurrence of the lethal effect of Aquastart at concentration of 200 mg/L was 0.67 ± 0.038 and the maximum time of its effect at a concentration of 100 mg/liter was 150 ± 1.2 seconds. The minimum and maximum lethal effect of Aquastart were at 0.67 ± 0.038 (200 mg/L) and 150 ± 1.2 (5 mg/L), respectively. The duration of lethal effect of Aquastart had significant association with concentration.

Conclusion: From the results of this study, it was concluded that Aquastart had toxic effect on theronts of *I. multifiliis* and different concentrations of Aquastart at different time durations eliminated them.

KEY WORDS: Aquastart, *Ichthyophthirius multifiliis*, Rainbow trout, Theront