تحديد المستوى المثالي للاوزون في معالجة أمراض سمكة الكارب الشائع *Cyprinus carpio* في مياه ملوثة ببكتريا *Aeromones hydrophila*

عبد المطلب جاسم الرديني وعبد الحسين كريم سلمان

كلية الطب البيطري، جامعة بغداد، بغداد، العراق

الخلاصة. وزعت اسماك الكارب الشائع *Cyprinus carpio* على ثمانية أحواض زجاجية بحجم 70 لتر للحوض الواحد بواقع عشرة اسماك لكل حوض. قسمت المعاملات التجريبية الى اربع معاملات، إذ استعمل الاوزون في المعاملة الثانية بتركيز0.25 ملغم/ لتر والثالثة بتركيز 0.50 ملغم/ لتر والرابعة بتركيز 0.75 ملغم/ لتر، بينما اعتبرت المعاملة الاولى سيطرة غير معرضة الى الاوزون المذاب، وبواقع مكررين لكل معاملة اثناء مدة التجربة التي استمرت ثلاثة اسابيع. تم استحداث الاصابة بالمرض بتخميج جميع اسماك التجربة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* عن طريق تلويث مياه التربية بالعالق الجرثومي من البكتريا بجرعة مقدارها 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة /10 لتر من ماء الحوض، اجري العد البكتيري لعينات الماء المأخوذة من كافة المعاملات التجريبية. فحصت الصورة الدمية لاسماك التجربة لمعرفة تاثير الاوزون في تلك المعاملات. أبدى الاوزون المذاب في الماء كفاءة مؤثرة في معالجة مرض الانتان النزفي البكتيري في سمكة الكارب الشائع عن طريق تقليل اعداد بكتريا *A. hydrophila*، وتميزت المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/ لتر) من الاوزون المذاب في الماء كفاءة عالية في تحسين الحالة الصحية والمناعية للاسماك المعالجة متمثلة في زيادة اعداد خلايا الدم البيض ومعايير الدم المدروسة الاخرى بمرور الوقت فضلا عن ارتفاع نسبة البقاء لهذه المعاملة مقارنة ببقية المعاملات.

Key words: *Cyprinus carpio*, ozonated water, *Aeromonas hydrophila*

المقدمة

تعد اسماك الكارب الشائع .*Cyprinus carpio* L من الأسماك المرغوبة للاستهلاك في عموم العراق، ونظرا لطبيعة التربية المكثفة لها ضمن مساحة محددة وبيئة خاصة كان لابد من ظهور مشكلات عدة تواجه مربي الأسماك، تأتي في مقدمتها مشكلة الأمراض التي تشكل السبب الأكبر للخسائر الاقتصادية في عملية الاستزراع السمكي مما يعرض الثروة السمكية للضياع والهدر. ان زيادة أعداد الجراثيم بالماء تظهر بالمستوى نفسه على سطح جسم الأسماك (12)، ومن بين تلك الجراثيم بكتريا *Aeromonas hydrophila*، التي سببت آفات مرضية لاسماك الكارب الشائع في المزارع السمكية العراقية، مثل مرض الأنتان النزفي البكتيري Bacterial Haemorrhagic Septicaemia وهو أسوأ الأمراض البكتيرية المعدية وأكثرها شيوعا في مزارع الأسماك (22).

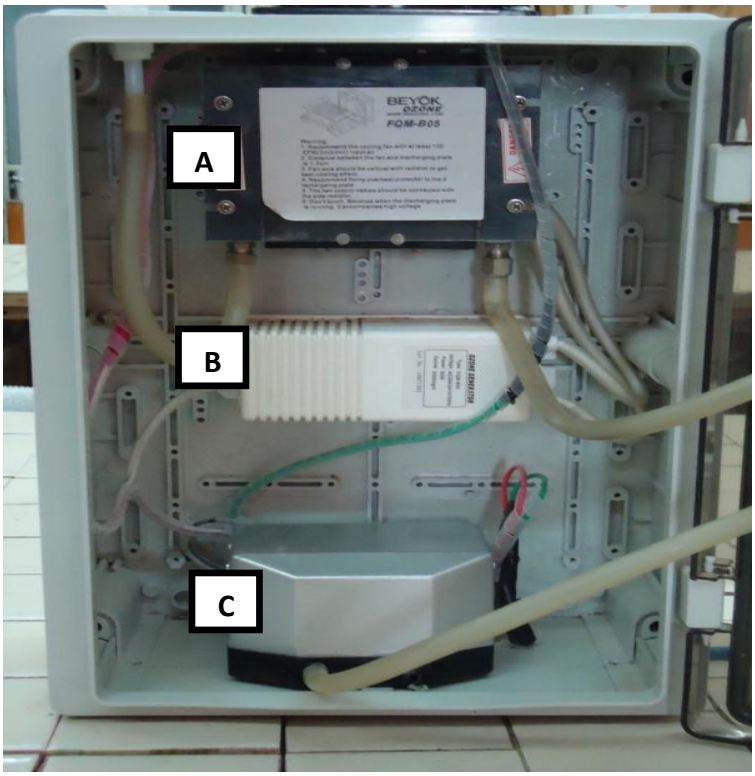
توجه المختصون نحو استعمال الوسائل الحديثة والصحية للسيطرة على الأمراض وتقليل الهلاكات ورفع كفاءة الإنتاج، ومن بين تلك الوسائل استعمال تقانة العلاج بالأوزون الذي يعد أداة علاجية ذات قوة كبيرة تساعد جسم الكائن الحي في الشفاء والتخلص من عدد كبير من الأمراض، كما يتصف الاوزون بسهولة استعماله بدون أضرار جانبية وانخفاض كلفته الاقتصادية مقارنة بالمواد الكيميائية والعقاقير، علماً انه يعطي نتائج ايجابية في العلاج والتطهير Disinfection لعدد كبير من المسببات المرضية Pathogens عن طريق تنشيطه لفعاليات

الجهاز المناعي وتنظيم فعاليات الجسم وتوازنه (23). هدفت الدراسة الحالية الى التعريف باستعمال تقانة الأوزون وامكانيته في تقليل الحمل الجرثومي في الماء الملوث وتأثيره في سوك الاسماك، فضلا عن تحديد أفضل تركيز من الأوزون يمكن استعماله في علاج المرض.

مواد وطرائق العمل

وزعت اسماك الكارب الشائع على ثمانية أحواض زجاجية بحجم 70 لتر للحوض الواحد وبواقع عشرة اسماك لكل حوض. استعملت منظومة الاوزون المذاب والذي يتالف من ثلاثة اجزاء رئيسة هي حجرة توليد الاوزون وحجرة تجميع الاوزون ودافعة الهواء (صورة، 1). قسمت المعاملات التجريبية الى اربع معاملات إذ استعمل الاوزون في المعاملة الثانية بتركيز 0.25 ملغم/ لتر والثالثة بتركيز 0.50 ملغم/لتر والرابعة بتركيز 0.75 ملغم / لتر، بينما اعتبرت المعاملة الاولى سيطرة غير معرضة الى الاوزون المذاب وبواقع مكررين لكل معاملة اثناء مدة التجربة التي استمرت ثلاثة اسابيع. تراوحت مديات اوزان الأسماك بين 90–133 غم ومعدل وزن 100 غم وجهزت الاحواض بالاوكسجين عن طريق مضخات هواء كهربائية.

استعملت في الدراسة بكتريا *A. hydrophila* والتي تم عزلها من اسماك مصابة بمرض الانتان النزفي البكتيري في مختبر الأحياء المجهرية في كلية الطب البيطري/جامعة بغداد وتم تاكيد هوية البكتريا في مختبر الصحة العامة المركزي التابع لوزارة الصحة. تم استحداث الاصابة بالمرض بتخميج جميع اسماك التجربة ببكتريا *A. hydrophila* عن طريق تلويث مياه التربية بالعالق الجرثومي من البكتريا بجرعة مقدارها 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة / 10 لتر من ماء الحوض وذلك طبقا لـ (16)، ثم اجري العد البكتيري لعينات الماء المأخوذة من كافة المعاملات التجريبية. ثبتت درجة حرارة الماء اثناء مدة التجربة بين 26–28°م والاوكسجين بين 6.5–8 ملغم/لتر. تم إعطاء العلف بنسبة 3% من الوزن الكلي للأسماك وبواقع مرتين باليوم بنسبة بروتين كلي بلغت 26%، ووصف سلوك الاسماك وحركتها ومدى تقبلها للعلف وحسبت نسبة البقاء، علما ان الفضلات تم سحبها من احواض التربية باستبدال 80% من ماء الاحواض يوميا بطريقة السيفون. يتم سحب الدم من جميع اسماك المعاملات اسبوعيا وبواقع خمسة أسماك لكل معاملة من الوريد الذنبي Caudal vein بوساطة محقنة بلاستيكية سعة 1 مللتر رطبت من الداخل بمانع التخثر EDTA لغرض دراسة الصورة الدمية لاسماك التجربة. اجري عد خلايا الدم الحمر (RBC) وخلايا الدم البيض (WBC) وقيس تركيز الهيموغلوبين (Hb) ونسبة حجم الخلايا المرصوص (PCV) على الدم المسحوب تبعا لـ (2)، واجري التحليل الاحصائي لمعرفة الفروقاتات المعنوية بين المعاملات التجريبية حسب (7).



صورة (1). مكونات منظومة توليد الأوزون المستعملة في الدراسة الحالية (A) حجرة توليد الأوزون، (B) حجرة تجميع الأوزون، (C) دافعة الهواء.

النتائج والمناقشة

العد البكتيري

يوضح جدول (1) تأثير المياه المعالجة بالأوزون المذاب على العد البكتيري لبكتريا *A. hydrophila*، إذ حصل انخفاض في إعداد البكتريا من 8.10 وحدة مكونة للمستعمرة (CFU) /مل في أحواض معاملة السيطرة التي تحوي على ماء غير معالج بالأوزون الى 3.30 وحدة مكونة للمستعمرة (CFU) /مل في احواض المعاملة الرابعة المعالجة بالأوزون المذاب بتركيز 0.75 ملغم/لتر، ويلاحظ أيضاً وجود علاقة عكسية بين أعداد البكتريا وتراكيز الأوزون المستعملة، فكلما أرتفع التركيز أدى الى انخفاض في اعداد البكتريا. بينت النتائج ان أعداد البكتريا في أحواض المعاملة الثانية المعالجة بالأوزون المذاب بتركيز 0.25 ملغم/لتر كانت 6.05 وحدة مكونة للمستعمرة (CFU) /مل بينما انخفضت الى 4.58 وحدة مكونة للمستعمرة (CFU) /مل في أحواض المعاملة الثالثة المعالجة بالأوزون المذاب بتركيز 0.50 ملغم/ لتر.

أشارت نتائج التحليل الإحصائي الى وجود فروقات معنوية ($P\leq 0.01$) بين معاملات التجربة جميعها، مما يدل على امتلاك الأوزون القدرة الواضحة في خفض إعداد البكتريا. يعدّ التطهير بالأوزون من الوسائل التي تمكن من الحد من ارتفاع الحمل الجرثومي وتصلح لمعاملة مياه نظم الاستزراع السمكي لاسيما المغلقة منها، فهي تعاني من الزيادة التدريجية في أعداد البكتريا نتيجة زيادة محتوى المياه من المواد العضوية الصلبة والذائبة، إذ تشكل خطورة على صحة وحيوية الأسماك وتضعف مقاومة الأسماك للأمراض (8). اشار Hsieh *et al.* (14) الى

فعالية الية التطهير بالاوزون في الحد من الجراثيم الممرضة للاسماك في انظمة الاستزراع المغلقة، إذ استعمل تركيز 0.52 ملغم/لتر من الاوزون المذاب لتخفيض الحمل الجرثومي في مياه تربية اسماك *Opsanus tau* والمحافظة على المستوى الآمن في العلاقة بين الاسماك والمسببات المرضية، وهذا يتفق ونتائج الدراسة الحالية. توصل Sugita *et al.* (25) الى ان المعالجة بالاوزون المذاب بتراكيز تتراوح بين 0.50 – 1.0 ملغم/لتر كانت فعالة في تطهير مياه البحر من ثلاثة انواع من البكتريا الممرضة للاسماك هي*Enterococcus seriolicida* و *Pasteurella piscicida* و*Vibrio anguillarum* وهذا يتفق ايضا مع ما توصلت اليه الدراسة الحالية. استعمل الأوزون في انظمة الاستزراع السمكي المفتوحة لتطهير إمدادات المياه المستعملة فيها إذ تكون قادرة على خفض أعداد الجراثيم الممرضة للأسماك من 10^3 الى 10^4 (26).

جدول (1). تأثير المياه المعالجة بالأوزون المذاب على العد البكتيري (لوغارتم) في أحواض التجربة ± الإنحراف المعياري.

المعاملة	العد البكتيري (لوغارتم)
المعاملة الأولى (السيطرة)	d 8.10 ± 0.03
المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/ لتر)	c 6.05 ± 0.17
المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/ لتر)	b 4.58 ± 0.07
المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/ لتر)	a 3.30 ± 0.01

الأحرف الصغيرة المختلفة تشير الى وجود فروقات معنوية بين تراكيز معاملات الأوزون عند مستوى المعنوية ($P\leq0.01$).

الصورة الدمية

خلايا الدم الحمر

يتضح من جدول (2) تباين في معدلات اعداد خلايا الدم الحمر ضمن المعاملة الواحدة بمرور الوقت، فقد ارتفعت اعداد خلايا الدم الحمر من 1.40×10^6 خلية/ ملم^3 في الاسبوع الاول الى 1.52×10^6 خلية/ ملم^3 في الاسبوع الثالث من التجربة تحت تاثير التركيز 0.25 ملغم/ لتر من الاوزون المذاب. اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى عدم وجود فروقات معنوية بين الاسبوعين الثاني والثالث لكنهما تفوقا معنويا ($p\leq0.01$) على الاسبوع الاول من التجربة، ولوحظت الظاهرة نفسها تحت تاثير التركيز 0.50 ملغم/ لتر من الاوزون المذاب اذ ارتفعت اعداد الخلايا الحمر من 1.51×10^6 خلية/ ملم^3 في الاسبوع الاول الى 1.64×10^6 خلية/ ملم^3 في الاسبوع الثالث من التجربة.

اشارت نتائج التحليل الاحصائي الى تفوق الاسبوع الثالث معنويا ($p\leq0.01$) عن الاسبوعين الاول والثاني من التجربة. اما في المعاملة الرابعة التي تناولت تاثير التركيز 0.75 ملغم/لتر من الاوزون المذاب فقد ارتفعت

اعداد خلايا الدم الحمر من 1.46×10^6خلية/ ملم^3 في الاسبوع الاول الى 1.50×10^6 خلية/ ملم^3 في الاسبوع الثالث من التجربة . اظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين الاسابيع الثلاث من التجربة. تبين النتائج انخفاض اعداد خلايا الدم الحمر في معاملة السيطرة من 1.35×10^6 خلية/ملم^3 في الاسبوع الاول الى0.75×10^6 خلية/ ملم^3 في الاسبوع الثالث مع وجود فروقات معنوية ($p\leq0.01$) بين الاسابيع الثلاث من التجربة لهذه المعاملة. يشير جدول (2) الى حصول اختلاف في اعداد خلايا الدم الحمر لاسماك التجربة باختلاف المعاملات العلاجية مع مرور الوقت، فقد سُجلت اقل قيمة لها (1.40×10^6 خلية/ ملم^3) في المعاملة الثانية (0.25 ملغم/ لتر) واعلى قيمة (1.51×10^6 خلية/ ملم^3) في المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/ لتر) في الاسبوع الاول من التجربة وبينت نتائج التحليل الإحصائي تفوق المعاملة الثالثة معنويا ($p \leq 0.01$) على المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا ($p \leq 0.01$) على المعاملة الاولى (السيطرة).

اختلفت اعداد خلايا الدم الحمر بين معاملات التجربة في الأسبوع الثاني نسبياً مع اختلاف تركيز الاوزون المذاب مقارنة بالأسبوع الأول من التجربة، فقد كانت أعدادها بين 1.15×10^6 خلية /ملم^3 في المعاملة الأولى و1.49×10^6 خلية/ملم^3 في المعاملة الرابعة للأسبوع الثاني ولم تظهر نتائج التحليل الإحصائي فروقات معنوية بين المعاملات الثانية والثالثة والرابعة، ومع ذلك اظهرت هذه المعاملات فروقاتا معنوية ($P\leq0.01$) مع المعاملة الاولى. أظهرت النتائج أن أعداد خلايا الدم الحمر كانت 0.75×10^6خلية /ملم^3 في معاملة السيطرة و1.50×10^6 خلية /ملم ^{3} في المعاملة الرابعة للاسبوع الثالث من التجربة وأشارت نتائج التحليل الإحصائي الى تفوق المعاملة الثالثة معنويا ($p\leq0.01$) على المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورها معنويا ($p\leq0.01$) على المعاملة الاولى.

تشير نتائج تاثير الاوزون المذاب على اعداد خلايا الدم الحمر الى ان التراكيز المستعملة قد سببت زيادة في اعداد هذه الخلايا مقارنة مع معاملة السيطرة ولعل ذلك يعزى الى فعل الاوزون المثبط ضد العديد من الاحياء المجهرية الممرضة (1) والذي يعود الى كونه عامل مؤكسد يمزق تكامل خلية الكائن المجهري مما ينتج عنه تغيير في نفاذية الخلية وتسرب محتوياتها للوسط المحيط وبالتالي يعمل على خفض الاعداد البكتيرية في احواض التربية مما ادى الى التقليل من شدة حدوث المرض(20). ان جرعات منخفضة من الأوزون المذاب في الماء (0.3 –0.5) ملغم/لتر وأوقات تعرض قليلة (0.5 –1) دقيقة أستطاعت ان تخفض الجراثيم المحمولة على الماء بشكل واضح (26)، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

ان التاثير المحفز لغاز الاوزون المذاب في الماء في زيادة اعداد خلايا الدم الحمر قد يعزى الى حصول نشاط في النسيج المكون للدم والذي بدوره يسبب تدفق الخلايا التي نشات عنه الى الدم (5 و 10)، ومن ناحية اخرى فان عملية انتاج الدم بمختلف انواعها تنظم بعدد من العوامل والتي تشمل الانترلوكينات Interleukins والتي منها IL–1 و IL–2 و IL–3 والعوامل المحفزة لنمو وتمايز المستعمرات الخلوية Colony stimulating factors، وقد وجد ان للاوزون تاثير محفز لانتاج الانترلوكينات 1 و2 و3 و6 (21)، مما يفضي الى حصول زيادة في انتاج خلايا الدم وطرحها في الجهاز الوعائي. عند مقارنة نتائج أعداد خلايا الدم الحمر بين الأسابيع لوحظ وجود تأثير أيجابي متمثلاً بزيادة معنوية بأعداد خلايا الدم الحمر وتحسن الصورة الدمية في الأسبوع الثالث وهذا يعزى الى امتلاك الاوزون القدرة العلاجية للعديد من الحالات المرضية بسبب فعله المزدوج وعمله المطهر وكذلك فعله في زيادة مستوى الاوكسجين في الانسجة وبالتالي فانه يسرع من عملية الشفاء والتئام الإصابة (29).

بينت الدراسات أن خلايا الدم الحمر في الأسماك هي المتضررة اساسا من الاستعمال المفرط للأوزون وليس أنسجة الغلاصم كما كان يعتقد سابقاً، ويعزز هذا الرأي دراسة (9) Fukunaga *et al.* التي تناولت تعريض خلايا الدم الحمر لأسماك *Oncorhynchus mykiss* الى الاوزون بتركيز 20 ملغم /لتر لمدة 120 دقيقة التي اظهرت ان الأوزون لا يهاجم خلايا الدم مباشرة من خارج الخلية ولكن مثل هذه التراكيز العالية تسمح له باختراق أغشية الخلايا الدمية والتفاعل مع الهيموغلوبين داخل الخلايا ملحقا أضرارا فيها، مما يوحي بان سمية الأوزون داخل الخلايا الدمية تؤدي دورا هاما في تقدير هذه الاضرار، في حين اتفقت دراستان اخريتان على كون الأوزون ضمن الحدود المسموح بها طبياً أمين للاستعمال والعلاج ولا يلحق اية اضرار في النسيج الدموي ومكوناته (4 و28).

جدول (2). معدل أعداد خلايا الدم الحمر± الانحراف المعياري × 10^6 لأسماك التجربة.

المعاملة	الأسبوع		
	الأول	الثاني	الثالث
المعاملة الأولى (السيطرة)	c 0.04±1.35 A	c 0.01±1.15 B	C 0.03±0.75 C
المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/ لتر)	b 0.04±1.40 B	a 0.02±1.50 A	B 0.01±1.52 A
المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/ لتر)	a 0.04±1.51 B	a 0.06±1.53 B	A 0.02±1.64 A
المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/ لتر)	b 0.06±1.46 A	a 0.04±1.49 A	b 0.02±1.50 A

الأحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون ($P\leq0.01$).

الأحرف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين الأسابيع للمعاملة الواحدة ($P\leq0.01$).

تركيز الهيموغلوبين

يوضح جدول (3) النتائج الخاصة بمعدلات تركيز الهيموغلوبين (غم/ 100 مللتر دم) لاسماك التجربة المخمجة والمعالجة بتراكيز مختلفة من الاوزون المذاب بالماء ومقارنتها بمعاملة السيطرة، اذ نلاحظ وجود علاقة ايجابية بين تركيز الهيموغلوبين مع مرور الوقت، فقد شهدت المعاملة الثانية (0.25 ملغم/ لتر) ارتفاعا نسبيا في تراكيز الهيموغلوبين بلغ 10.25 و 10.38 غم /100 مل في الاسبوعين الأول والثالث على التوالي، وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقاتات معنوية بين الاسابيع الثلاث من التجربة. اما المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر) فقد ارتفعت تراكيز الهيموغلوبين فيها من 10.45 غم/ 100 مل في الأسبوع الأول الى 11.08غم/ 100 مل في الأسبوع الثالث، واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى تفوق الاسبوع الثالث معنويا ($p\leq0.01$) عن الاسبوعين الاول والثاني من التجربة، بينما سجلت المعاملة الرابعة (0.75 ملغم/ لتر) ارتفاعا في تراكيز الهيموغلوبين تراوح من 10.40غم / 100 مل في الأسبوع الأول الى 10.55 غم/100 مل في الأسبوع الثالث

من التجربة، واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى عدم وجود فروقاتات معنوية بين الاسابيع الثلاث من التجربة. تبين النتائج ايضا انخفاض تراكيز الهيموغلوبين في معاملة السيطرة من 9.22 غم/100 مل في الأسبوع الأول الى 5.15 غم/100 مل في الأسبوع الثالث من التجربة، وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروقات معنوية ($P\leq0.01$) بين الأسابيع الثلاث من التجربة لمعاملة السيطرة.

تبين من النتائج حصول اختلاف في تراكيز الهيموغلوبين لأسماك التجربة باختلاف تراكيز الاوزون المذاب في الاسبوع الاول، فقد تميزت المعاملة الثالثة بتسجيل اعلى معدل (10.45 غم/100 مل) بينما سجلت المعاملة الاولى اقل معدل (9.22 غم/100 مل) وبينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملات الثانية والثالثة والرابعة للأسبوع نفسه مع وجود فروقات معنوية ($P\leq0.01$) بين تلك المعاملات مع المعاملة الأولى. اختلفت تراكيز الهيموغلوبين بين معاملات التجربة في الأسبوع الثاني نسبياً مع اختلاف تراكيز الاوزون مقارنة بالأسبوع الأول من التجربة، اذ تراوحت تراكيزها بين 7.02غم/100 مل في المعاملة الأولى و 10.45 غم/100 مل في المعاملة الرابعة للأسبوع الثاني، واظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملتين الثالثة والرابعة اللتان تفوقتا معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملة الثانية التي تفوقت بدورها معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملة الأولى. اما في الاسبوع الثالث فقد تراوحت معدلات تراكيز الهيموغلوبين بين 5.15 غم/100مل في المعاملة الاولى و10.55غم/100مل في المعاملة الرابعة، وأشارت نتائج التحليل الإحصائي الى تفوق المعاملة الثالثة معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملة الاولى.

تعزى اسباب هذه النتائج الى تأثير الأوزون المذاب في خفض أعداد البكتريا المسببة للأصابة (27) والتقليل من شدة تأثير السموم الحالية لخلايا الدم الحمر وطردها عن طريق الفعالية العالية للأوزون في تخليص الجسم من السموم الضارة، وهذا يتفق مع ما توصل اليه (24) Sorge الذي أشار الى قدرة الاوزون في طرد السموم وتخليص الخلايا منها. عند مقارنة نتائج قيم تراكيز الهيموغلوبين بين الأسابيع نلاحظ وجود تأثير ايجابي للاوزون المذاب بتراكيزه المختلفة عن طريق المحافظة على مستويات الهيموغلوبين مقارنة مع معاملة السيطرة، وهذا يعود الى امكانية الاوزون المذاب في رفع مستوى دورة انحلال الكلوكوز glycolysis في خلايا الدم الحمراء مما ينتج عنه تنشيط مركب 2,3- Diphosphoglycerate الذي يعمل بالنهاية على زيادة كمية الأوكسجين المطروح الى الأنسجة (13) ومن ثم تنشيط ايض الكاربوهيدرات والبروتينات والدهون (6) مما يفضي الى التحسن في امتصاص المواد الغذائية والمعادن لاسيما عنصر الحديد الذي له اهمية في تصنيع خلايا الدم الحمر وصبغة الهيموغلوبين وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية.

جدول (3). معدلات تركيز الهيموغلوبين في الدم ± الانحراف المعياري (غم/ 100مل) لأسماك التجربة.

المعاملة	الأسبوع		
	الأول	الثاني	الثالث
المعاملة الأولى (السيطرة)	b 0.40±9.22 A	c 0.30±7.02 B	c 0.60±5.15 C
المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/ لتر)	a 0.25±10.25 A	b 0.22±10.27 A	b 0.20±10.38 A
المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/ لتر)	a 0.70±10.45 B	a 0.36±10.60 B	a 0.60±11.08 A
المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/لتر)	a 0.30±10.40 A	a 0.45±10.45 A	b 0.70±10.55 A

الأحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون ($P\leq0.01$).
الأحرف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة ($P\leq0.01$).

حجم خلايا الدم المرصوص

يوضح جدول (4) حصول زيادة في نسبة حجم خلايا الدم المرصوص في المعاملة الثانية (0.25 ملغم/لتر) من 29.80% في الأسبوع الأول الى 31.25% في الأسبوع الثالث على الرغم من عدم وجود فروقات معنوية بين الاسابيع الثلاث للتجربة، وسجلت المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر) ارتفاعا في حجم خلايا الدم المرصوص تراوح من 32.20% في الاسبوع الاول الى 34.30% في الاسبوع الثالث الذي تفوق معنويا ($P\leq0.01$) على الاسبوعين الاول والثاني. اما في المعاملة الرابعة (0.75ملغم/لتر) فقد كانت قيم خلايا الدم المرصوص 31.35% و31.80% في الاسبوعين الاول والثالث على التوالي.

ولم تظهر نتائج التحليل الاحصائي اية فروقات معنوية بين اسابيع التجربة الثلاث. تبين النتائج ان حجم خلايا الدم المرصوص في معاملة السيطرة قد انخفض من 29.30% الى 16.25% في الاسبوعين الاول والثالث على التوالي مع وجود فروقاتات معنوية ($P\leq0.01$) بين الاسابيع الثلاث للتجربة. يتضح من جدول (4) حصول اختلاف في حجم خلايا الدم المرصوص للاسماك المخمجة باختلاف تراكيز الاوزون المذاب المستعملة، فقد سجلت المعاملة الثالثة اعلى معدل (32.40%) بينما سجلت المعاملة الثانية اقل معدل (31.25%) في الاسبوع الاول من التجربة. بينت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين المعاملتين الثالثة والرابعة اللتان تفوقتا معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملة الثانية التي تفوقت بدورها معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملة الاولى، اما الاسبوع الثاني من التجربة فقد شهد اختلافا نسبيا في قيم خلايا الدم المرصوص مقارنة بالاسبوع الاول، واظهر التحليل الاحصائي تفوق المعاملة الثالثة معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا ($P\leq0.01$) على المعاملة الاولى، وتطابقت نتائج التحليل الاحصائي في الاسبوع الثالث من التجربة مع نتائج الاسبوع الثاني. يعزى التحسن الحاصل في حجم خلايا الدم المرصوص في المعاملات العلاجية الى قدرة الاوزون

المذاب في اعادة التوازن الداخلي للجسم عن طريق تعديل مستوى الهرمونات والأنزيمات الى المستوى الطبيعي مما له علاقة وثيقة في عملية انتاج الدم لاسيما ان العوامل المؤثرة في هذه العملية تؤثر بدورها في حجم خلايا الدم المرصوص (3).

جدول (4). معدلات قيم حجم خلايا الدم المرصوصة ± الانحراف المعياري (%) لأسماك التجربة.

المعاملة	الاسبوع		
	الأول	الثاني	الثالث
المعاملة الأولى (السيطرة)	b 0.40±29.30 A	c 0.20±22.10 B	C 0.70±16.25 C
المعاملة الثانية(تركيز 0.25 ملغم/ لتر)	B 0.10±29.80 A	b 0.20±29.85 A	B 0.10±31.25 A
المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/ لتر)	A 0.85±32.20 B	a 0.50±32.40 B	A 0.65±34.30 A
المعاملة الرابعة(تركيز 0.75 ملغم/ لتر)	A 0.65±31.35 A	b 0.30±31.00 A	b 0.40±31.80 A

الأحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون ($P\leq0.01$).
الأحرف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة ($P\leq0.01$)

خلايا الدم البيض

يوضح جدول (5) اعداد خلايا الدم البيض لاسماك التجربة المخمجة والمعالجة بتراكيز مختلفة من الاوزون المذاب ومقارنتها بمعاملة السيطرة ، اذ يتضح ارتفاع اعداد خلايا الدم البيض من 27.05×10^3 خلية/ملم^3 في الاسبوع الاول الى $28.50\times10_3$خلية/ملم^3 في الاسبوع الثالث من التجربة في المعاملة الثانية، وبينت نتائج التحليل الاحصائي ان الاسبوع الثالث قد اكتسب الدلالة المعنوية ($p\leq0.01$) مقارنة بالاسبوعين الاول والثاني، اما المعاملة الثالثة فقد شهدت ارتفاعا ملحوظا في اعداد خلايا الدم البيض حيث تراوحت من 28.80×10^3 خلية/ملم^3 في الاسبوع الاول الى 31.76×10^3خلية/ملم^3 في الاسبوع الثالث من التجربة، وتطابقت نتائج التحليل الاحصائي لهذه المعاملة مع المعاملة الثانية. سجلت المعاملة الرابعة ارتفاعا في اعداد خلايا الدم البيض تراوح بين 27.80 $\times10^3$خلية/ملم^3 و28.15×10^3خلية/ملم^3 في الاسبوعين الاول والثالث على التوالي، واظهرت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين اسابيع التجربة الثلاث. اظهرت النتائج انخفاض عدد خلايا الدم البيض في معاملة السيطرة من 22.60×10^3 خلية/ملم^3 في الأسبوع الأول إلى 17.95×10^3 خلية/ملم^3 في الأسبوع الثالث من التجربة، واتضح من التحليل الإحصائي عدم وجود فروقات معنوية بين الاسبوعين الاول والثاني لكنهما تفوقا معنويا ($P\leq0.01$) على الاسبوع الثالث.

تبين من جدول (5) حصول تباين في اعداد خلايا الدم البيض لأسماك التجربة باختلاف المعاملات العلاجية بمرور الوقت، ففي الاسبوع الاول سجلت المعاملة الثالثة اعلى قيمة (28.80×10^3خلية/ ملم^3) للخلايا البيض بينما سجلت المعاملة الثانية اقل قيمة (27.05×10^3 خلية/ ملم^3 واكتسبت المعاملة الثالثة الدلالة المعنوية ($p\leq0.01$) عن بقية المعاملات ضمن الاسبوع نفسه، بينما اختلفت اعداد خلايا الدم البيض بين معاملات التجربة في الأسبوع الثاني مع اختلاف تراكيز الاوزون المذاب مقارنة بالأسبوع الأول من التجربة وقد تراوحت إعدادها بين 21.45×10^3خلية/ملم^3 في المعاملة الأولى و 28.50×10^3 خلية/ملم^3 في المعاملة الرابعة وأظهرت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروقات معنوية ($P\leq0.01$) بين المعاملة الثالثة والرابعة مع ذلك أظهرت هاتين المعاملتين فروقات معنوية ($P\leq0.01$) مع كل من المعاملة الثانية والأولى. سجل النتائج تباينا واضحا في اعداد الخلايا البيض بين المعاملات في الاسبوع الثالث اذ كانت 31.76×10^3خلية/ملم^3 في المعاملة الثالثة مقارنة بالمعاملة الاولى التي كانت 17.95×10^3خلية/ملم^3، واشارت نتائج التحليل الاحصائي الى تفوق المعاملة الثالثة معنويا ($p\leq0.01$) عن المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا ($p\leq0.01$) على المعاملة الاولى.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية زيادة في اعداد خلايا الدم البيض في المعاملات العلاجية بمرور الوقت وتعزى هذه النتائج إلى امكانية الاوزون في رفع قدرات الجهاز المناعي عن طريق زيادة اعداد خلايا الدم البيض التي لها دور مهم في محاربة الممرضات الغازية للجسم وتخليصه منها وهذا يتفق مع كل من (15) Johnston *et al.* و(19) Maniar *et al.* اللذان اشاروا الى دور الاوزون في زيادة إنتاج عدد من السايتوكينات Cytokines مثل الانترفيرون والانترلوكينات وبالأخص (IL−1, 2, 3) مما له علاقة بتحفيز زيادة إعداد خلايا الدم بمختلف انواعها، هذا بالإضافة لما يعرف عن هذه الوسائط المناعية في تنشيط وتنظيم عدد من التفاعلات المناعية المتسلسلة التي يحتاج اليها الجسم لمحاربة الإمراض (11)، والتي منها تنشيط وتحفيز وتنظيم فعالية الخلايا البلعمية Macrohages والخلايا القاتلة الطبيعية Natural killer cells حيث وجد ان الأوزون يعمل على زيادة فعالية القتل بوساطة هذه الخلايا لان غاز الأوزون المذاب في الماء سرعان ما يتحلل الى الأوكسجين وذرة الأوكسجين المفردة مسببا زيادة في مستوى بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) وجذر الهيدروكسيل (OH−) داخل الخلايا البلعمية والتي تعد عوامل فعالة في قتل الأحياء المجهرية في المسار المعتمد على الأوكسجين وبالتالي فانه يزيد من الفعل القاتل للخلايا البلعمية في الدقائق التي تم ابتلاعها (3)، ويمكن الجسم من التصدي لهجوم الجراثيم المرضية وتقليل آثارها المرضية في أعضائه المختلفة مما انعكس ايجابا في تحسن صحة أسماك المعاملات العلاجية في تجربة العالق الجرثومي.

سلوك الأسماك

تميز اسماك معاملة السيطرة بعد الاسبوع الاول من التجربة بخمولها وسباحتها قرب سطح الحوض بشكل غير متوازن ومحاولة سحب الهواء من فوق سطح الماء وعدم تقبلها للعلف وبطئ في حركة الغطاء الغلصمي. بلغت نسبة البقاء إثناء مدة التجربة 50%، وهذه النتائج تتفق مع ما ذكره (18) Littler الذي اشار الى ان شدة المرض تعتمد على ضراوة البكتريا وطريقة دخولها الجسم فضلا عن نوع ومستوى الاجهاد والحالة الفسيولوجية للاسماك المخمجة، وتتفق هذه النتائج مع دراسة (9) Fukunaga *et al.* التي سجلت في اسماك الكارب الشائع المخمجة تجريبيا ببكتريا *A. hydrophila* . اما في المعاملات الثانية والثالثة والرابعة فتميزت الاسماك بالحركة السريعة عند اقتراب الأشخاص من الأحواض واقبالها على تناول العلف بشكل طبيعي.

ان من الاهمية بمكان معرفة ان عملية تلويث المياه بالعالق الجرثومي قد استهلكت جزءا من تركيز الاوزون المذاب في الماء للقضاء على المسببات المرضية والباقي استهلك لتحفيز الجهاز المناعي وفعالياته البنائية لتجديد الخلايا المصابة وتسريع عملية الشفاء، وبالتالي فان تركيز الاوزون المستعمل في بدء المعاملة يختلف ويقل عما بدأ به ومن ثم فان الاستجابة لهذا التركيز سوف تختلف طبقا لذلك (13)، وهذا منسجم مع ما توصلت اليه الدراسة الحالية حيث ابدت الاسماك المعالجة القدرة بنسب متقاربة في البقاء على قيد الحياة والتغلب على المرض مقارنة مع معاملة السيطرة، حيث بلغت نسبة البقاء في المعاملتين الثانية والرابعة إثناء مدة التجربة 90%، في حين لم تسجل اي هلاكات في المعاملة الثالثة نتيجة الدور الايجابي للاوزون المذاب في خفض الحمل الجرثومي في مثل هذه المياه وهذا يتفق مع ما توصل اليه كل من Liltvid and Landfald (17) و Summerfelt *et al.* (27).

جدول (5). معدل أعداد خلايا الدم البيض ± الانحراف المعياري $\times 10^3$ لأسماك التجربة.

المعاملة	الأسبوع		
	الأول	الثاني	الثالث
المعاملة الأولى (السيطرة)	d 60±22.60 A	c 1.40±21.45 A	c 0.30±17.95 B
المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/ لتر)	c 0.70±27.05 B	B 0.70±26.70 B	b 0.33±28.05 A
المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/ لتر)	a 0.28±28.80 B	A 0.20±28.60 B	a 0.27±31.76 A
المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/ لتر)	b 0.35±27.80 A	A 0.50±28.50 A	b 0.46±28.15 A

الأحرف الصغيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون ($P\leq0.01$).

الأحرف الكبيرة المختلفة تدل على وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة ($P\leq0.01$).

المصادر

1. Allen, B.; Wu, J. and Doan , H. (2003). Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous Ozone. J. Environ. Sci. Helith B., 38(5): 617-630.

2. Blaxhall, P. and Dalslly, K. (1973). Routine heamatological methods for use with fish blood. J. Fish Biol., 5: 771-781.

3. Bocci,V. (1996). Ozone as a bioregulator pharmacology and toxicology of ozone therapy today. J. Biol. Regul. Homecst. Agents, 10: 31-53.

4. Bocci,V. (2005).Ozone anew medical drug. Springer, Netherlands.

5. Bocci,V.; Aldinucci, C.; Borrelli, E.; Corradeschi, F.; Diadori, A.; Fanetti, G. and Valacchi, G. (2001). Ozone in Medicine. Ozone Sci. and Engin., 23: 207- 217 .

6. Chow, P. (2001). Healing ozone. Can. J. Health Nut., 56(1): 26 –27.

7. Duncan, D. B. (1955). Multiple range F- test. Biom., 11(1): 1-14.

8. Eshchar, M.; Lahav,O.; Mozes, N.; Peduel, A. and Ron, B. (2006). Intensive fish culture at high ammonium and low Ph. Aquaculture, 255(1-4): 301-313.

9.Fukunaga, K.; Nakazono,N.; Suzuki,T. and Takama, K. (1999). Mechanism of oxidative damage to fish red blood cell by ozone. JUBMB Life,48: 631-634.

10. Gornicki, A. and Coutsze, A. (2000). In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes :An EPR study. Acta Bioch. Polon., 47(4): 963-971 .

11. Goldsby, R.; Kindt, T. and Osborn, B.(2000). Kuby. Immunology,4thed ., W. H. Freeman Co. NewYork.

12. Gonzalez, C. J.; Santas , J. A. ;Garcia, M. L.; Gonzalez, N. and Otero, A. (2001). Mesophilic aeromonads in wild and aquacultured freshwater fish. Sci. Food Prot., 64(5): 687- 691.

13. Hansler, R. (2003).The use of ozone in medicine of action. 2nd ozone congress, European Cooperation of the Medical Ozone Societies. Munich, Germany.

14. Hsieh,L.; Chikarmane, H.; Smolowitz, R.; Uhlinger, K.; Mebane,W. and Kuzirian, A. (2002). Microbial analysis of ozone disinfection in a recirculating seawater system. Biol. Bull., 203: 266-267.

15. Johnston, R.; Mizgerd , J.; Flynt, L.; Quinton, L.;Williams, E. and Shore, S. (2007). Type I interleukin–1 Receptor is required for pulmonary responses to subacute ozone exposure in mice. Amer. J. Resp. Cell Mole. Biol., 37(4): 477-484.

16. Kuge,T.; Takahashi, K. and Barcs, I. (1992). *Aeromonas hydrophila* acausative agent of mass mortality in cultured Japanese catfish larvae (*Silurus asotus*). Gyobyo Kenkyu, 27(2): 57-62.

17. Liltvid, H. and Landfald , B. (1995). Use of alternative disinfectants individually and in combination in aquacultural wastewater treatment. Aquac. Res., 26(8): 567-576.

18. Littler,T.(2007). Frequency of *Aeromonas* spp. detection in rainbow trout and recirculation aquaculture systems and the storage stability of fillets. Msc. Thesis, Davis Agriculture College,Virginia University.

19. Maniar, K.; Postlethwait, E.; Fanucchi, M.; Ballinger, C.; Evan, M.; Harkema, J.; Carey, S. M.; Donald, R.; Bartolucci, A. and Miller, L. (2011). Postnatal episodic

ozone resulta in persistent attenuation of pulmonary and peripheral blood responses to LPS shallenge. AJP., 300(3): 462-271.

20. Mario, C. (2004). Ozone in cooling water treatment. The Analyst,11(2):12-13.

21. Menendez, S.(2000). Biochemical mechanisms present in medical ozone application. 2nd International Symposia on Ozone Applications, Havana, Cuba.

22. Paniagua, C.; Rivero, O.; Anguita, J. and Naharro, G. (1990). Pathogenicity factors and virulence for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of motile *Aeromonas* spp. isolated from a river. J. Clin. Micr., 28(2): 350-355.

23. Rakovsky, S. and Zaikov, G. (2009). Application of ozone in medicine. Chem. and Chem.Tech., 3(3):237-248.

24. Sorge, R. H. (2004). Introduction to ozone therapy. Ozone Sci. and Eng. , 8: 47-55.

25. Sugita, H.; Asai , T.; Hayashi, K.; Mitsuya,T.; Amanuma , K.; Maruyama, C. and Deguchi,Y.(1992). Application of ozone disinfection to remove *Enterococcus Seriolicida,Pasteurella Piscicida* and *Vibrio anguillarum* from seawater. Applied and Envir. Micro., 58(12): 4072-4075.

26. Summerfelt, S. T. and Hochheimer, J. N. (1997). Review of ozone processes and applications as an oxidizing agent in aquaculture.Prog. Fish Cult., 59(1): 94-105.

27. Summerfelt,S. T.; Bebak, J.; Fletcher, J.; Carta, A. and Creaser, D. (2008). Description of the surface water filtration and ozone treatment system at the northeast fishery center. In: Amaral , S.V.; Mathur, D. and Taft, E. p. (eds.). Advance in Fish. Bioengin. Amer. Fish.Soc., Symposium, 61, Bethesda MD., :97-121.

28. Travagli,V.;Zanardi, I.; Silvietti, A. and Bocci, V. (2007). A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. J. Biol. Macr.,41: 500-511.

29. Valacchi , G. ; Fortino ,V. and Bocci, V. (2005). The dual action of ozone on the skin. British J. Dermat.,153:1365-1371.

Determination Optimal Level of Ozone in the Treatment of Disease of Common Carp *Cyprinus carpio* in Water Contaminated with the Bacteria *Aeromonas hydrophila*

Abdulmotalib J. Al-Rudainy and Abdul-Hussien K. Salman

College of Veterinary Medicine, University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Abstract. Eighty Common carp fish *Cyprinus carpio* were putting in eight 70 liters aquarium. Four treatments with two replicates were used for three weeks, the second treatment used soluble ozone concentration of 0.25 mg/L, the third with concentration of 0.50 mg / l and the fourth with 0.75 mg/L, while first treatment considerd as control without using soluble ozone. Bacteria *Aeromonas hydrophila* was introduced into water by contaminating water with bacteria at a dose of 10^7 CFU / 10 liters. Bacteria was counted for all all samples of treatments. Results showed that ozone dissolved in water had very good effect in treatement Bacterial Haemorrhagic Septicaemia diseases in common carp by reducing numbers of bacteria *A. hydrophila*. Third treatment (0.50 mg/L) characterized by highly efficient in improving the health status and immune of fish throw increasing numbers of white blood cells and improving other blood parameters, and this led to increasing survival ratio of fish compaired with other treatments.