تأثير الاوزون المذاب في الماء في أنسجة اسماك الكارب العادي *Cyprinus carpio* في الاصابة المستحدثة ببكتريا *Aeromonas hydrophila*

عبد الحسين كريم سلمان عبد المطلب جاسم الرديني

الملخص

درس تأثير الاوزون المذاب في الماء في انسجة سمكة الكارب العادي ***Cyprinus carpio*** تم عزل وتنشيط بكتريا ***Aeromonas hydrophila*** ثم احداث التخميج عن طريق الحقن العضلي في اسماك الكارب العادي جميعها ***Cyprinus carpio*** في المعاملات التجريبية في المنطقة الظهرية للجهة اليسرى من جسم السمكة بجرعة 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة **100/CFU** غرام من وزن الجسم . بعدها عرضت الاسماك الى الاوزون المذاب بثلاثة تراكيز (**0.25** و **0.50** و **0.75** ملغم / لتر) للمعاملات الثانية والثالثة والرابعة على التوالي، بينما عدت المعاملة الاولى سيطرة غير معرضة الى الاوزون المذاب وبواقع مكررين لكل معاملة. سجلت التغييرات المرضية العيانية لأعضاء الغلاصم والعضلات والكبد، واخـذت عينات تلك الاعضاء تمهيدا للفحص النسجي. أوضحت الدراسة الحالية ان تعرض الاسماك المخمجة ببكتريا ***A. hydrophila*** الى تراكيز مختلفة من الاوزون المذاب في الماء قد احدث تغييرات مرضية نسجية مختلفة في الاعضاء المفحوصة، اذ كانت التغييرات المرضية تحت تأثير التركيز **0.50** ملغم/لتر اقل مقارنة مع التركيزين (**0.25** و**0.75** ملغم/لتر)، ولم تسجل آفات نسجية شديدة في الأسماك المعاملة بهذا التركيز التي كانت بين حدوث فرط تنسج ظهاري في الخيوط الغلصمية مع ارتشاح الخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة والبلاعم الميلانية لاسيما في المعاملة الثالثة التي أدت الى حدوث انسلاخ وانفصال ظهارة الخيوط الغلصمية الثانوية عند الانتقال الى المعاملة الرابعة التي كانت التغييرات المرضية النسجية فيها اشد مقارنة مع المعاملتين الثانية والثالثة.

المقدمة

تتعرض اسماك الكارب العادي ***Cyprinus carpio*** الى العديد من الأمراض التي تعد من المحددات المهمة للزراعة السمكية، لاسيما نطاق التربية المكثفة المطبقة (حالياً) من اجل زيادة الانتاج السمكي، وادى علاج هذه الأمراض أدى الى الاستعمال العشوائي لكثير من المضادات الحيوية مما افضى الى زيادة ملحوظة في انتشار المقاومة الدوائية بين الانواع البكتيرية المسببة للعديد من امراض الأسماك (**4**). لذا تركـزت جهود الباحثين على ايجـاد البديل لعلاج هذه الإصابات المرضية في محاولة لتقليل الاعتماد على الأدوية المنتجـة صناعيـاً، وبين هذه البدائل برزت تقانة المعالجة بالأوزون، فقد أشـارت الدراسات الى امكان استعماله في مجال الاستزراع السمكي فيما يخص العديد من امراض الاسماك.إن التأثير الفعال للأوزون المذاب في الماء في علاج أمراض الأسماك موثق علميا، فقد أشارت الدراسات إلى نجاح الأوزون في علاج الأسماك من بعض الأمـراض الفيروسيـة والفـطريـة والطفيليـة (**25**، **26**). يتكون الأوزون من ثلاث ذرات من الأوكسجين (O_3) ترتبط اثنتان بآصرة قوية، لكن الذرة الثالثة ترتبط بآصرة ضعيفة غير مستقرة ، ولهذا يوصف الأوزون بأنه غاز فعال غير مستقر بسبب تحوله السريع إلى جزيئه

كلية الطب البيطري– جامعة بغداد– بغداد، العراق.

الأوكسجين المستقرة (8)، فضلاً عن ذلك يمتلك الأوزون طاقة عالية وكثافته تقدر مرة ونصف بقدر كثافة الأوكسجين، وهو يتصف بقابليتـــه على الذوبـان في الماء.

هدفت الدراسة الحالية الى تحديد أفضل تركيز من الأوزون ذو التأثير المعنوي المقبول لاستعماله في معالجة مرض الأنتان النزفي البكتيري في انسجة جسم سمكة الكارب العادي ***Cyprinus carpio*** المصابة مثل الغلاصم والعضلات والكبد.

المواد وطرائق البحث

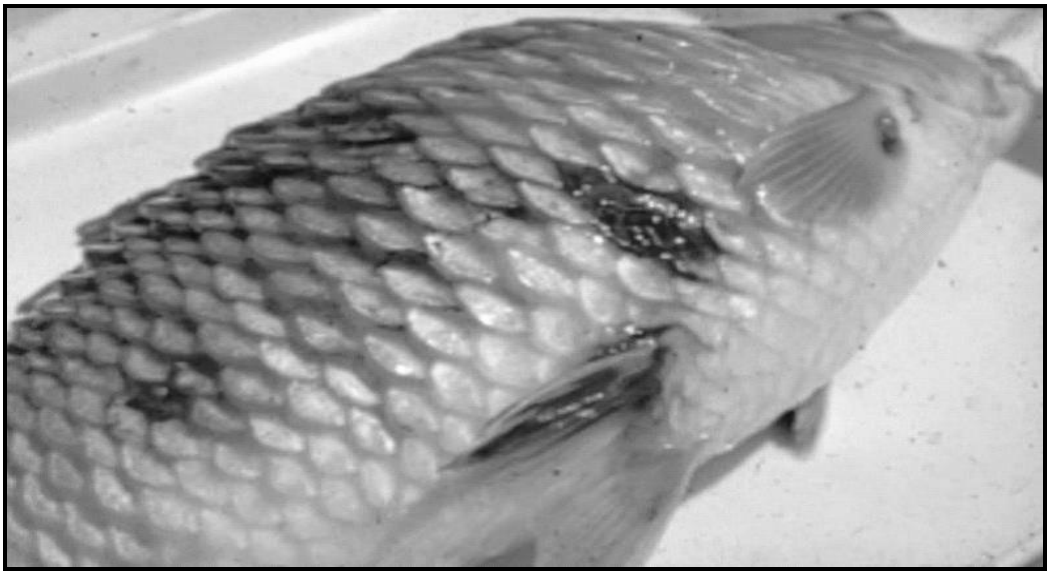
تم عزل بكتريا ***Aeromonas hydrophila*** من اسماك مصابة بمرض الانتان الدموي البكتيري **bacterial hemorrhagic septicemia** في مختبر الاحياء المجهرية في كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد، عزلت من الكلية والكبد بعد تشريح الاسماك بطريقة معقمة وذلك حسب طريقة **Lucky** (12). تم تأكيدها في مختبرات الصحة المركزي في بغداد بعد اجراء الفحوص البايوكيميائية كافة عليها وفحص**API 20E**. تم تنشيط البكتريا الاختبارية عن طريق امرارها خلال اسماك الكارب العادي ثلاث مرات لزيادة ضراوتها (16). حقنت الاسماك خلبيا **I/P** بعالق البكتريا ***Aeromonas hydrophila*** بمقدار **0.5** مل/ سمكة ونشطت حسب طريقة **Cipriano** (7). استعملت **80** سمكةً كارباً عادياً ***Cyprinus carpio*** بمعدلات اوزان بلغت **110**غم. استعملت منظومة الاوزون المذاب التي تتألف من ثلاثة اجزاء رئيسة هي حجرة توليد الاوزون وحجر تجميع الاوزون ودافعة الهواء. 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 عدت المعاملة الاولى سيطرة غير معرضة الى الاوزون المذاب وبواقع مكررين لكل معاملة اثناء مدة التجربة التي استمرت ثلاثة اسابيع . جهزت الاحواض بالاوكسجين عن طريق مضخات هواء كهربائية . تم احداث الخمج البكتيري حقنا داخل العضلة في المنطقة الظهرية في الجهة اليسرى من الجسم خلف الحافة الامامية للزعنفة الظهرية بما يقارب من **1– 2** سم واسفل منها من **2–3** سم (7)، وكانت الجرعة المعطاة10^7 وحدة مكونة للمستعمرة **100/CFU** غرام من وزن الجسم (**10**). سجلت التغييرات المرضية العيانية لأعضاء الغلاصم والعضلات والكبد واخذت عينات من تلك الاعضاء وثبتت وصبغت تمهيداً للفحص النسجي (**13**) .

النتائج والمناقشة

العلامات السريرية

أدى حقن الجرعة البكتيرية عن طريق العضلة إلى ظهور العلامات السريرية بعد ثلاثة الى خمسة أيام في اسماك معاملة السيطرة تمثلت بخمول الأسماك وفقدان الشهية لتناول العلف وبطء في حركة غطاء الغلاصم مع ظهور آفات نزفية شديدة على سطح الجسم والزعانف (شكل **1**) ، وبعض الحالات لوحظ فيها بروز العين **Exophthalmia** ، فضلا عن تمدد في منطقة البطن وتوسعها مع وجود حالة الحبن **Ascitis**، مع تجمع السوائل في جيوب القشور وتساقطها بتقدم الإصابة، وهذا يتفق مع ما أشار إليه**Jeney** (**10**) من وصف للعلامات السريرية للمرض في اسماك الكارب العادي المخمجة عضلياً.

تباينت العلامات السريرية في المعاملات العلاجية باختلاف تراكيز الأوزون المستعملة ، ففي المعاملتين الثانية والثالثة لم تلاحظ أية علامات سريرية مميزة بعد الإصابة التجريبية باستثناء ظهور بعض الآفات النزفية الخفيفة على سطح الجسم ، وماعدا ذلك فقد أبدت الأسماك حالة طبيعية من السباحة وتقبل العلف والابتعاد عند اقتراب الفاحص من الأحواض،تميزت العلامات السريرية في المعاملة الرابعة بتغييرات مهمة في سلوك الأسماك نتيجة تعرضها الى التراكيز العالية من الأوزون ، إذ لوحظ توقف الأسماك عن تناول العلف وتجمعها بالقرب من سطح الماء ومحاولتها أحياناً استنشاق الهواء الجوي من فوق سطح الماء مع عدم انتظام السباحة وزيادة محاولات القفز خارج الأحواض وأخيرا فقدان الأسماك لتوازنها وتصبح شاحبة **Pale** والأسماك التي تصل الى هذه الحالة نادراً ما كانت تنجو من الهلاك ، وهذا يتفق مع ما ذكره **Bullock** وجماعته (**6**) من وصف للعلامات السريرية في أسماك التراوت القزحي المعرضة لتراكيز عالية من الأوزون.

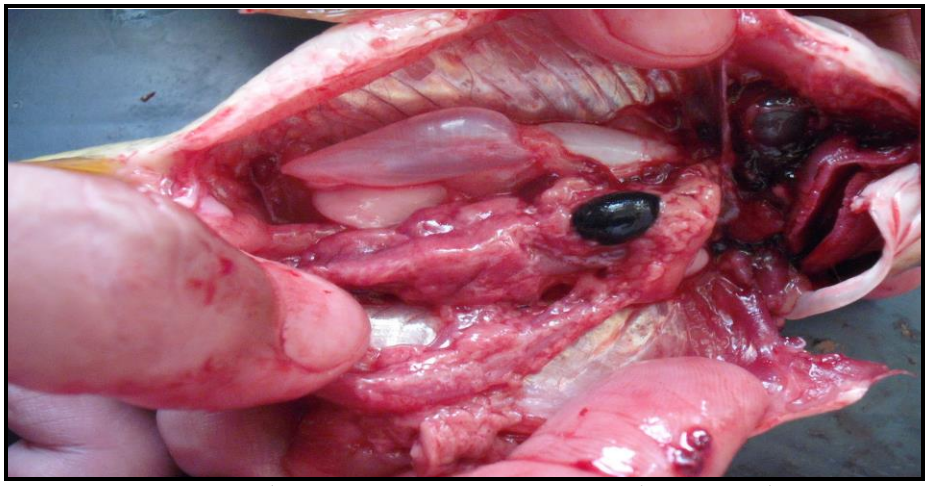


شكل **1**: العلامات الخارجية لسمكة مخمجة ببكتريا ***A. hydrophila***،آفات نزفية شديدة على سطح الجسم والزعانف

الآفات العيانية

تمثلت الآفات العيانية في معاملة السيطرة باحتقان شديد في الكبد والكلية مع وجود بقع نزفية في الكبد وتغيير لونه إلى اللون البني المصفر ، أما الطحال فقد لوحظ عليه احتقان شديد وتضخم مع وجود بقع نزفية (شكل **2**)، بينما تميزت العضلات بوجود النخر التقرحي **Ulcerative necrosis** في منطقة الحقن، وهذا يتفق مع ما ذكره **Rey** (**17**)من وصف للآفات العيانية المصاحبة للمرض في أسماك الكارب والتراوت .

أما الآفات العيانية التي شوهدت في أعضاء اسماك المعاملتين الثانية والثالثة، فقد تمثلت باحتقان بسيط في الكلية والكبد مع شحوب لون الكبد في بعض الحالات. أما في الطحال فلم تشاهد آفات عيانية واضحة ، ولم يظهر في العضلات سوى ندبة صغيرة في منطقة الحقن. فيما يخص الآفات العيانية في المعاملة الرابعة فكانت مشابهة تقريبا لما موجود في معاملة السيطرة .



شكل 2: الافات العيانية لسمكة مخمجة ببكتريا *A.hydrophila* ، تغيير لون الكبد الى اللون البني المصفر مع تضخم واحتقان الطحال.

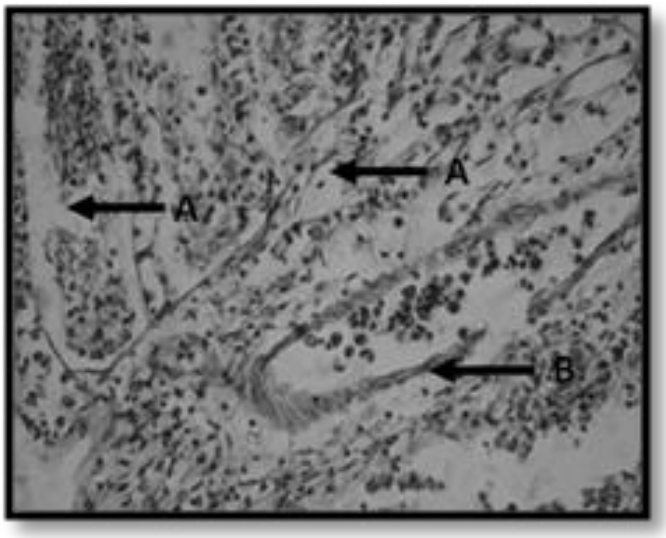
تراوحت نسبة البقاء بين 40% في معاملة السيطرة و90% في المعاملة الثالثة ، بينما بلغت 80% و70% في المعاملتين الثانية والرابعة على التوالي. أثبتت الدراسات كفاءة الأوزون في القضاء على البكتريا المسببة للأمراض ، مما يجعله مضاداً حيوياً ذا فاعلية عالية وبدون آثار جانبية ، وهو ينشط الجهاز المناعي ويرفع من كفاءة وحيوية خلايا الجسم عن طريق زيادة نسبة الأوكسجين المتاح لها وزيادة قدرتها على الإفادة من الأوكسجين الموجود في خلايا الدم الحمر، ويقلل من الالتهابات والألم ويساعد على إفراز كثيرا من الأنزيمات الخلوية الدفاعية المضادة للأكسدة ، وقد أفضت هذه الآليات مجتمعة الى تغلب الجانب المناعي للأسماك المخمجة ضد البكتريا الغازية والتقليل من آثارها المرضية في الأعضاء المستهدفة لاسيما في المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر)، وهذا يتفق مع دراسة Huth وجماعته (9) التي بينت قدرة الأوزون في الحد من الخمج البكتيري عن طريق الآليات المشار اليها.

بينت الدراسة الحالية قدرة العامل العلاجي في تخفيض نسبة الهلاكات في الأسماك المخمجة عن طريق رفع كفاءة الجهاز المناعي للقضاء على البكتريا الغازية والحد من آثارها المدمرة في الأعضاء المستهدفة، إذ اشارBullock وجماعته (6)إلى دور الاوزون المذاب في خفض نسبة الهلاكات في اسماك التراوت المصابة بمرض الغلصمة البكتيري من 30 % الى 1.7 %

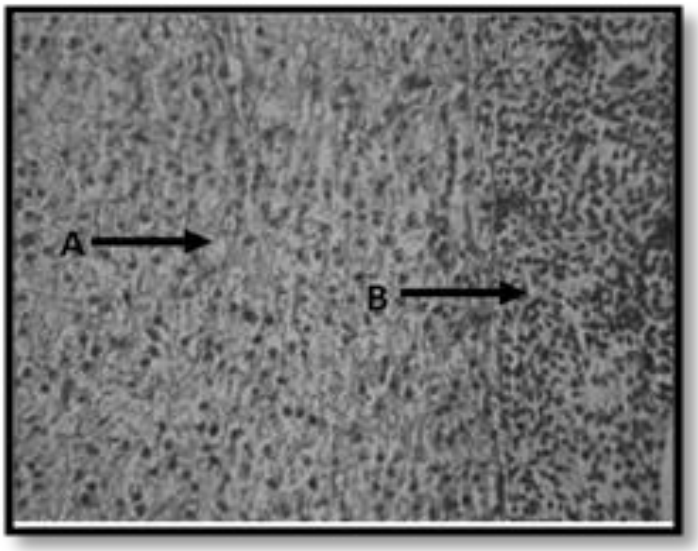
التغييرات المرضية النسجية

المعاملة الاولى (السيطرة)

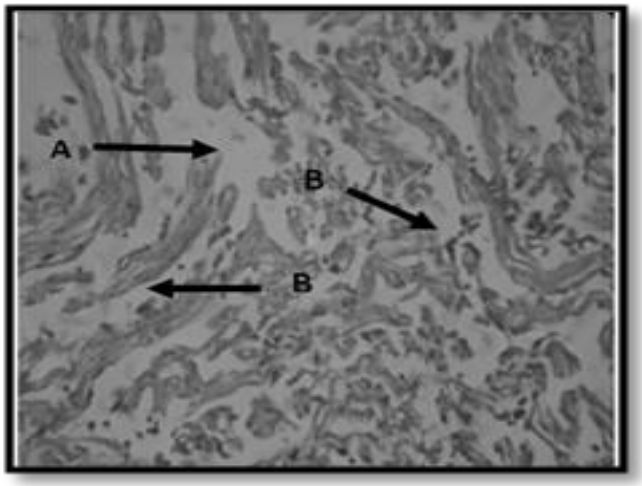
أوضح الفحص المجهري للغلاصم تحطم وانسلاخ الظهارة المبطنة للخيوط الغلصمية الأولية والثانوية ، مع أحتقان الوريد المركزي الجيباني والأوعية الشعرية واحتواء تجاويفها على الخلايا العدلة فضلاً عن ارتشاح خلايا وحيدة النواة لا سيما في الخيوط الغلصمية الثانوية (شكل 3). أما آفات الكبد النسجية فقد تميزت بحدوث النخر مصحوب بتغلظ أنوية الخلايا الكبدية Pyknosis مع وجود التغييرات الفجوية ، لاسيما التغييرات الدهنية Fatty changes فضلاً عن الارتشاح الشديد لخلايا وحيدة النواة في محفظة الكبد (شكل4) . تميزت نتائج الفحص النسجي للعضلات وجود نخرNecrosis وتحطم الحزم العضلية مع حدوث الخزب Edema بين الحزم العضلية المنفصلة Fragmentated Muscles ، فضلاً عن ارتشاح الخلايا الالتهابية في النسيج ما بين العضلات Inter muscular tissue (شكل5).



شكل 3: مقطع نسجي لغلاصم اسماك معاملة السيطرة A يوضح تحطم وانسلاخ الظهارة المبطنة للخيوط الغلصمية الثانوية B احتقان الوريد المركزي الجيباني(H&E stain400x)



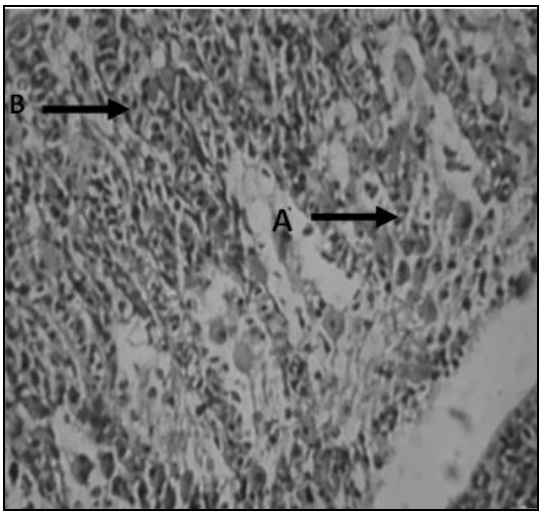
شكل 4: مقطع نسجي لكبد اسماك معاملة السيطرة A يوضح نخر شديد لنسيج الكبد B ارتشاح شديد للخلايا وحيدة النواة في محفظة الكبد (H&E stain 200x).



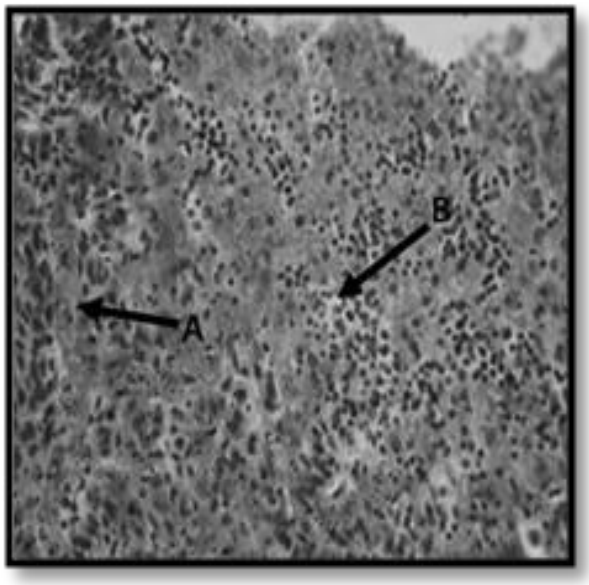
شكل 5: مقطع نسجي لعضلات اسماك معاملة السيطرة A يوضح حدوث خزب شديد بين الحزم العضلية المتنكسة مصحوب B بارتشاح خلوي في النسيج مابين العضلات مصحوب بارتشاح خلايا وحيدة النواة MNCS (H&E stain 400x)

المعاملة الثانية (اوزون 0.25 ملغم/لتر)

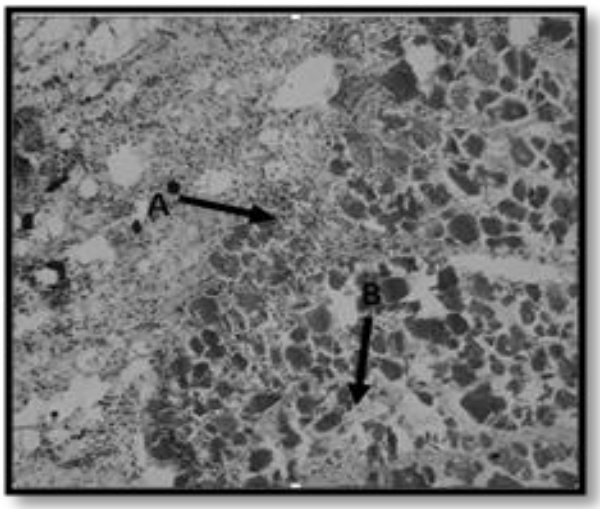
تميزت آفات الغلاصم النسجية بانسلاخ **Sloughy** ونخر شديدين للخلايا الظهارية المبطنة للخيوط الغلصمية الثانوية لاسيما بالقرب من الغشاء القاعدي مصحوباً بخزب مع فرط تنسج في أنسجة الغلاصم المتبقية (شكل **6**) . واظهر الفحص النسجي لأكباد الأسماك وجود نزف شديد في المحفظة مع احتقان الجيبانيات وتوسعها وارتشاحها بالخلايا اللمفية فضلاً عن حدوث النخر البؤري (شكل **7**). أوضح الفحص المجهري لعضلات الأسماك حدوث الخزب مع الارتشاح الشديد لخلايا العدلات بين الحزم العضلية المتنخرة والمتنكسة فضلاً عن عدم انتظام بعض الحزم العضلية **Disorganization of muscle bundles** (شكل **8**).



شكل 6: مقطع نسجي لغلاصم اسماك المعاملة الثانية A يوضح انسلاخ ونخر لظهارة الخيوط الغلصمية الثانوية B فرط تنسج في الانسجة الغلصمية المتبقية(H&E stain 400x)



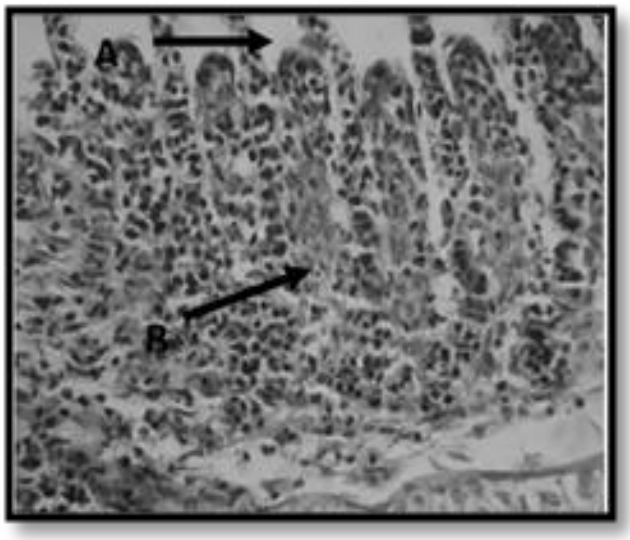
شكل7: مقطع نسجي لاكباد اسماك المعاملة الثانية A يوضح نزف شديد في المحفظة B نخر بؤري في متن الكبد مصحوب بارتشاح خلايا وحيدة النواة MNCS (H&E stain 400x)



شكل 8: مقطع نسجي لعضلات اسماك المعاملة الثانية A يوضح خزب وارتشاح خلايا العدلات بين الحزم العضلية المتنكسة B عدم انتظام disorganization بعض الحزم العضلية(H&E stain 200x)

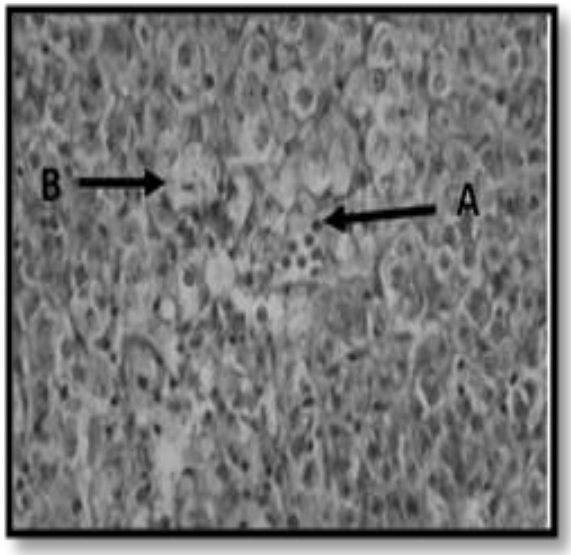
المعاملة الثالثة (اوزون 0.50 ملغم/ لتر)

كانت التغييرات المرضية تحت تأثير هذا التركيز اخف مقارنة مع التركيزين (0.25 و0.75) ولم تسجل آفات نسجية شديدة في الأسماك المعاملة بهذا التركيز. لقد تميز الفحص النسجي لغلاصم الأسماك بحدوث فرط تنسج شديد الى متوسط الشدة في ظهارة الخيوط الغلصمية الثانوية مصحوباً بحدوث التنبت Clubbingلاسيما في قمم الظهارة مع ارتشاح الخلايا اللمفية في الخيوط الغلصمية الأولية والثانوية (شكل 9).

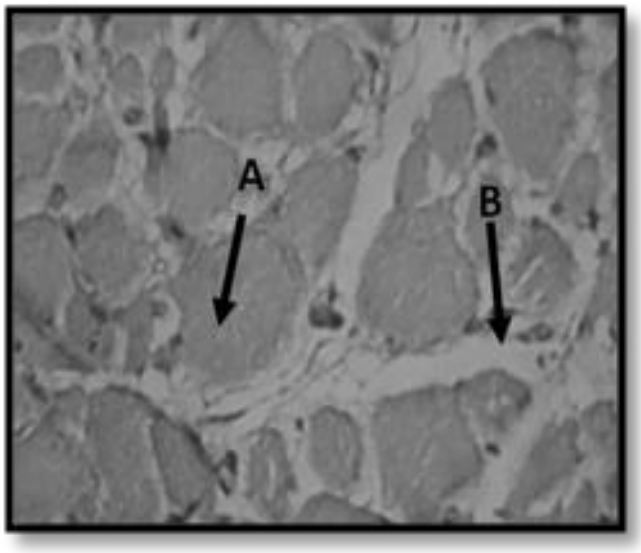


شكل9: مقطع نسجي لغلاصم اسماك المعاملة الثالثة A يوضح فرط تنسج في ظهارة الخيوط الغلصمية مع حدوث التنبتclubbing في قمم الظهارة B ارتشاح خلايا وحيدة النواة (H&E stain 40x)

اظهر الفحص النسجي لأكباد الأسماك أرتشاحاً ملحوظاً للخلايا اللمفية في متن الكبد لاسيما في الجيبانيات المتوسعة واحتقان البعض منها على الرغم من مشاهدة النخر في بعض خلايا الكبد المجاورة (شكل 10) . اظهرت المقاطع النسجية لعضلات الأسماك وجود تنكس زنكرZenker degeneration للخلايا العضلية مصحوباً بخزب وارتشاح عدد قليل من الخلايا الالتهابية (شكل11).



شكل 10: مقطع نسجي لاكباد اسماك المعاملة الثالثة A يوضح ارتشاح الخلايا اللمفية في الجيبانياتB وجود نخر في بعض خلايا الكبد (H&E stain 40x)

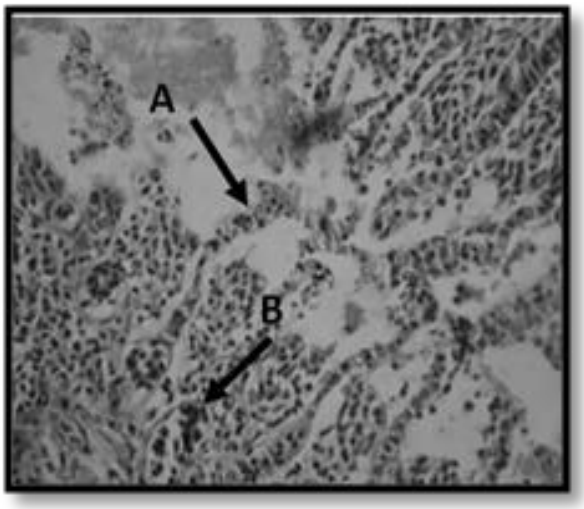


شكل11: مقطع نسجي لعضلات اسماك المعاملة الثالثة A حدوث تنكس زنكر في الحزم العضلية B ارتشاح بسيط للخلايا الالتهابية (H&E stain 400x)

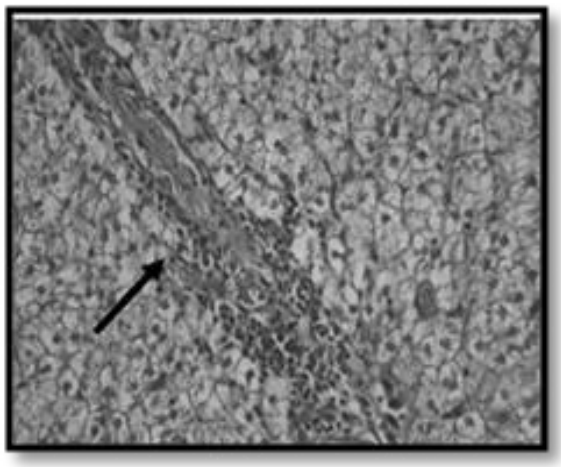
المعاملة الرابعة (اوزون 0.75 ملغم/ لتر)

كانت التغييرات المرضية النسجية تحت تأثير هذا التركيز اشد مقارنة مع التركيزين السابقين، فقد اظهر الفحص النسجي لغلاصم الأسماك وجود انسلاخ لظهارة بعض الخيوط الغلصمية الثانوية مع احتقان الأوعية الشعرية مصحوباً بفرط تنســـج لظهارة الخيوط الغلصمية المجاورة (شكل 12). تميزت آفات الكبد النسجية لأسماك هذه المعاملة بوجود القنييات الصفراوية المتوسعة وبهيئة تراكيب أسطوانية الشكل مع ارتشاح عدد قليل لخلايا وحيدة النواة في الباحة البابية (شكل 13). اوجد الفحص النسجي لعضلات الأسماك وجود نخر وتحزز وانفصال الحزم العضلية بنضحة خزبيةExudative edema مصحوبة بأرتشاح خلايا العدلات والبلازما والخلايا اللمفية وقد بدت بعض الحزم العضلية المتنخرة على هيئة كتل شديدة الحمضة متجانسة Eosinophilichemogenuns masses مع فقدان التخطيط العرضي(شكل 14) . بينت الدراسة المرضية النسجية لأسماك معاملة السيطرة حدوث تغييرات تنكسية شديدة مصحوبة بآفات نخريةNecrotic lesions لاسيما في الكبد والعضلات ، فضلا عن النخر وانفصال الظهارة في الخيوط الغلصمية الثانوية وتعزى هذه التغييرات المرضية الى امتلاك بكتريا *A.hydrophila* العديد من عوامل الضراوة مثل الذيفانات التي تؤدي دورا هاما في إحداث النضوح والنزف والتنكس الخلوي فضلاً عن نخر الأنسجة المصابة ، وهذه النتائج تتفق مع كل من Sha وجماعته (18) و Uma وجماعته (23) الذين اشاروا الى الدور الفعال لهذه الذيفانات في امراضية البكتريا وإحداث آفات مرضية شديدة في الأعضاء المستهدفة .

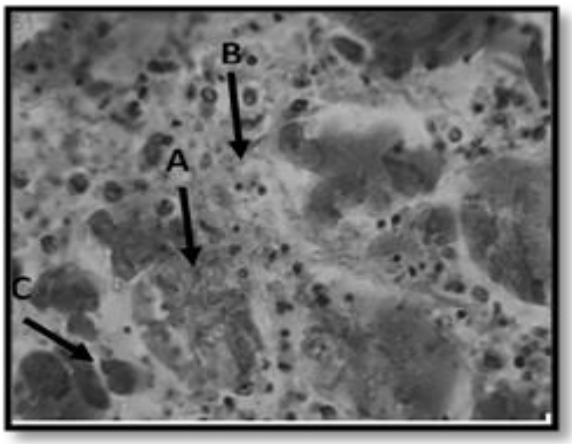
بينت الدراسة الحالية حدوث تغييرات وعائية مصحوبة بخزب، ويعزى ذلك الى تأثير الذيفان الحال للدم Hemolysin الذي يزيد من نفاذية الأوعية الدموية، ويؤدي الى تحطم خلايا الدم الحمر وترسب خضاب الهيموسدرين الكبد وهذا يتفق مع ماتوصلت اليه الحمداني (1) بعد إجراء الخمج التجريبي ببكتريا *A.hydrophila* في اسماك الكارب العادي.



شكل12: مقطع نسجي لغلاصم اسماك المعاملة الرابعة A انسلاخ ظهارة الخيوط الغلصمية الثانوية وتوسف البعض منها B احتقان الاوعية الشعرية (H&E stain 400x)



شكل 13: مقطع نسجي لاكباد اسماك المعاملة الرابعة توسع القنييات الصفراوية مصحوب ارتشاح خلايا وحيدة النواة في الباحات البابية(H&E stain 400 x)



شكل14: مقطع نسجي لعضلات اسماك المعاملة الرابعة A نخر الحزم العضلية مع انفصالها بنضحة خزبية exudative edemaBارتشاح الخلايا الالتهابية C مشاهدة العضلات المتنخرة على هيئة كتل شديدة الحمضة ومتجانسة (H&E stain 400x)

أما دراسة Miyazaki و Jo (15) فقد أشارت الى ان التغييرات المرضية في انسجة الكبد والغلاصم تعزى الى الضرر الخلوي الناجم عن غزو بكتريا *A.hydrophila* لهذه الاعضاء بشكل خفيف Slight ، وانها تتكاثر لتصبح التغييرات المرضية شديدة ، توافقت هذه النتائج مع الدراسة الحالية ، إذ شوهدت بعض المستعمرات البكتيرية في بعض المقاطع النسجية للأسماك المخمجة . اظهرت الدراسة الحالية حدوث تغييرات فجوية شديدة Sever vacuolar changes في أنسجة الكبد ولعل ذلك ناجم من فعل الإنزيم الحال للبروتين Protase الذي تنتجه بكتريا *A.hydrophila* وهذا يتفق مع Bauna وYilmas (2). أوضحت نتائج الدراسة الحالية ان تعرض الأسماك المخمجة ببكتريا *A.hydrophila* الى تراكيز مختلفة من الأوزون المذاب في الماء قد احدث تغييرات مرضية مختلفة بين حدوث فرط تنسج ظهاري في الخيوط الغلصمية مع ارتشاح الخلايا اللمفية والبلاعم الكبيرة لاسيما في المعاملة الثالثة (تركيز 0.50ملغم /لتر) التي ادت الى حدوث انسلاخ وانفصال ظهارة الخيوط الغلصمية الثانوية مع ارتشاح خلوي بؤري عند الانتقال الى المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم /لتر) ، وذلك يعزى الى التاثير الفعال للاوزون في الحد من شدة الخمج الجرثومي، اذ يكون تاثيره في البكتريا قاتلاً Bacteriocidal وينتج هذا التأثير بسبب قدرته في تحطيم غلاف الخلية البكتيرية كما يشير الى ذلك Sunnen (20) مما ينتج عنه تغيير في نفاذية الخلية وتسرب محتوياتها للوسط المحيط، وحدد هذا الفعل عن طريق أكسدة الدهون المفسفرةPhospholipids والبروتينات الدهنيةLipoproteins (21)، إذ أن فعله القاتل ينتج من تفاعله مع الآصرة المزدوجة للأحماض الدهنية للدهون في جدار الخلية البكتيرية التي توجد بنسبة عالية في غلاف الخلية البكتيرية السالبة لصبغة غرام (5)، وقد أيدت الدراسة التي قام بها Thanomsub وجماعته (22) الآلية المقترحة لتثبيط البكتريا بواسطة الأوزون الذي يسبب تدمير غشاء الخلية وذلك باستعمال المجهر الالكتروني ، اذ أظهرت بعض الخلايا البكتيرية أنماط من الانكماش والتقلص ثم تمزقاً شديداً للخلايا وتحللها . جاءت هذه النتائج متفقة مع نتائج الدراسة الحالية، اذ أظهرت الأسماك المخمجة والمعرضة الى الأوزون المذاب في الماء بتركيز(0.25 ملغم /لتر) وجود انسلاخ ونخر شديدين للطبقة الظهارية للخيوط الغلصمية مع وجود الخزب والنزف مقارنة بمجاميع الأسماك المخمجة والمعرضة الى الاوزون المذاب في الماء بتركيز (0.50 ملغم/ لتر) وذلك يعزى الى تأثير الأوزون في تنشيط أنتاج الأنزيمات التي تمنع تأثير الجذور الحرة Free radical وتحمي الخلية السليمة من عملية الأكسدة ، في حين ان الخلايا المتضررة والبكتريا ليس لديها مثل هذه الأنزيمات و الكفاءة بنفسها لتحميها لذا تتأكسد، وبهذه الآلية فأن الأوزون يمتلك القدرة الانتقائيةSelective abilityحيث يهاجم فقط السموم والبكتريا والخلايا التي أصيبت بضرر والخلايا الضعيفة والمصابة (8)، والذي أشار لذلك فالخلايا السليمة جميعها في أنسجة وأعضاء الجسم تمتلك انزيمات كانسة للجذور الحرة Free radical scavengers مثل Superoxidase dermatase and Catalase, لتحميها من الضرر المحتمل الناجم عن ذرة الأوكسجين المفردة، غير ان الخلايا المريضة تفتقر لآلية الحماية هذه، وكذلك الكائنات الحية الخالية من مضادات الأكسدة تكون عرضة للتحطم. وهكذا فان الخلايا جميعها التي تمتلك هذه الكانسات تكنس الجذور الحرة المتكونة وتعادل تاثيرهاNutralization عن طريق تثبيط النشاط غير المسيطر عليه للجذور الحرة وتحطيمها للأنسجة بواسطة ذرة الأوكسجين المفردة ، بينما الخلايا المتنكسة مثل الخلايا المريضة والبكتريا التي لاتملك الحماية بمضادات الاكسدة والكانسات سوف تتاكسد بوساطة الجذور الحرة. من هنا نجد ان الاوزون قادر على تحطيم هذه الخلايا المتنكسة، فضلا عن دوره في تحفيز الخلايا السليمة على زيادة تراكيز مواد الحماية هذه. بينت نتائج الفحص النسجي للدراسة الحالية حدوث فرط تنسج Hyberplasia في السطوح الظهارية للخيوط الغلصمية وتضخم الخلايا المبطنة للتفرعات الثانوية Secondary bronchioles فضلا عن فرط تنسج في خلايا الكلوريد، وظهور

التنبت **Clubbing shape** في قمم الخيوط الغلصمية الثانوية لاسيما في اسماك المعاملة الثالثة (**0.50** ملغم/ لتر). قد يحدث فرط التنسج الكمي الملحوظ واندماج الخيوط الغلصمية الثانوية عن طريق الزيادة في التهاب خلايا الخيوط الغلصمية والنضحة الالتهابية حيث وجد ان الأوزون يؤكسد الطبقة الدهنية التي تقع ضمن الغشاء السايتوبلازمي للخلايا الورمية ويحطمها بعملية التحلل الخلوي **Cytolysis** . بدا فرط التنسج والتضخم صفة مميزة في أنسجة غلاصم اسماك المعاملة الرابعة (**0.75** ملغم/ لتر) وقد توافقت هذه النتيجة مع دراسة **Bullock** وجماعته (**6**) التي أشارت الى ان غلاصم الأسماك المعرضة لتراكيز عالية من الأوزون أظهرت غزارة في المخاط **Excess mucus** وفرط تنسج **Hyperplasia** وتوسع الاوعية الدموية الشعرية **Aneurysms** ، وفي دراسة اخرى وجد ان فرط التنسج في الخيوط الغلصمية الثانوية غالبا يشاهد في الاسماك المعرضة لمركبات كيميائية مختلفة في المياه والرواسب ،واحيانا يؤدي هذا التضخم الى الاندماج الكامل في اثنين او اكثر من الخيوط الغلصمية الثانوية المتجاورة (**3**) . لقد تبين من نتائج الدراسة الحالية وجود بعض التغييرات التنكسية في انسجة الغلاصم والكبد لاسيما في المعاملة الرابعة (**0.75** ملغم / لتر) وكان ذلك متفقا مع **Mallatt** (**14**) الذي اشار الى حدوث بعض التفاعلات الالتهابية في انسجة الغلاصم من جراء التعرض للاجهاد بسبب الاتصال المباشر للانسجةالظهارية بالتلوث المائي ، وهذا ماأكدته دراسة **Kumar** و**Pant** (**11**) التي اشارت الى ان اغلب الخيوط الغلصميةللاسماك المعرضة الى المركبات الكيميائية المختلفة اظهرت التورم الالتهابي على هيئة التنبت**Clubbing** في العديد من الخيوط الثانوية مع الاحتقان في جيبانيات الغلاصم ، وخلصت الدراسة الى ان التعرض المزمن لمثل هذه المركبات الكيميائية قد تسبب في تورم وانتفاخ الخلايا نحو قواعد الخيوط الغلصمية الثانوية . بينت نتائج الدراسة الحالية وجود تغييرات تكاثرية وفرط تنسج **Hyperplastic and proliferative changes** مع توسع وتكاثر قنوات الصفراء في أنسجة الكبد وفرط تنسج ظهارتها في أنسجة الكبد لاسيما في المعاملة الثالثة (**0.50** ملغم/لتر) ويعزى ذلك الى كون الأوزون يسبب زيادة في إنتاج الطاقة المتمثلة بالمركب **ATP** والذي يؤدي بأثره الى رفع معدل الايض البنائي للجسم مما يسرع من عملية شفاء الجسم وتجديد الخلايا التالفة او المتضررة فيه (**19**) . أشارت بعض الدراسات الى دور الأوزون الفعال في زيادة إفراز عوامل النمو الضرورية للالتئام مثل عامل نمو الصفيحات الدمية **PDGF** وعوامل النمو الانتقالية **TGF** (**4**) ، وتنشيطه للتفاعلات المناعية الموضعية كالاستجابة الالتهابية التي تشترك فيها الخلايا الملتهمة ،وزيادة نفاذية الأوعية الدمية لهذه الخلايا مما يفضي الى وجودها في الأنسجة المصابة ، فضلا عن سهولة عبوره وامتصاصه عن طريق الجلد حيث له القابلية في الوصول الى كل أنسجة وخلايا الجلد (**24**)، مما يساعد على التخلص من الإصابة سريعا وإعادة إصلاح الأنسجة المتضررة ، وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية حيث لم نلاحظ أية آفات عيانية في عضلات الأسماك المخمجة لاسيما في المعاملة الثالثة مقارنة بما تم مشاهدته في معاملة السيطرة.

أثبتت نتائج الدراسة الحالية كفاءة الأوزون المذاب في العلاج وتحسن الحالة الصحية لأسماك التجربة لدى استعماله بتراكيز وسطية(**0.50** ملغم/ لتر) ، مما يشجع في الإفادة من هذه التقانة في معالجة الأمراض البكتيرية في أسماك الكارب العادي وان زيادة التراكيز عن ذلك تؤدي الى حالات سلبية.

المصادر

1- الحمداني، آلاء حسين علي (1990). دراسة أمراضيةالأيروموناسهيدروفيلا في الخمج التجريبي لأسماك الكارب الأعتيادي وتقييم كفاءة بعض المضادات البكتيريةفي علاجها. رسالة ماجستير، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد ، العراق.

2- **Bauna, Y. and A. Yilmaz (2011). Pathological findings of experimental *Aeromonas hydrophila* infection in Nile tilapia.Ankara Univ.Vet.F.K (85):47-54.**

3- **Bindon, S.; K. Gilmour; J. Ferwich and S. Perry (1994). The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol.,197:47– 63.**

4- **Bocci, V. (1999). Biological and clinical effects of ozone ,Has ozone therapy a future in medicine ? British J. of Biomedical Sci., 56(3):270–279 .**

5- **Bocci, V.; C. Aldinucci; E. Borrelli; F. Corradeschi; A. Diadori; G. Fanett and G. Valacchi (2001). Ozone in medicine.Ozone Sci. and Egin., 23:207–217 .**

6- **Bullock, G.L.; S.T. Summerfelt; A. Noble; A. Weber; M.D. Durant and J.A. Hankins (1997). Ozonation of recirculating rainbow trout culture system:I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria . Aquaculture,158: 43 – 55 .**

7- **Cipriano, R.C. (2001). *Aeromonas hydrophila* and motile aromonad septicemias of fish . Fish dis. Leaflet 68 , united states department of the interior fish and wildlife service , Division of Fishery Research . Washington, DC. pp 1- 25 .**

8- **Holmes, J. (2008). Ozonated Liquids in Dental practice. A Review.Lime Technologies Holdings Ltd .**

9- **Huth, K.; B. Saugel; F. Jakob; C. Cappello; M.Quirling; E. Pascho,; K. Ern; R. HicKel and K. Brand (2007). Effect of aqueous ozone on the NF – KB system. J. of Dent.Res.,86(5):451-456 .**

10- **Jeney, G. (2011). Resistance of genetically different common carp, *Cyprinus carpio,* families against experimental bacteria challenge with *Aeromonas hydrophila*. J. Fish Dis., 34: 65-70.**

11- **Kumar, S. and S. Pant (1984). Organal damage caused by Aldicarb to a freshwater teleost *Barbusconchonins* Hamilton. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 33 : 50 – 55 .**

12- **Lucky, Z. (1977). The diagnosis of bacterial disease by infection experiments. in : Hoffman, G. L.(Ed), Methods for diagnosis of disease. Amerind, New Delhi , 68-71.**

13- **Luna, L.G. (1968). Manual of Histological Staining Methods of Armed Forces Institute of Pathology .McGraw- Hill, Inc. printed ,USA.,:32-47.**

14- Mallat, J. (1985). Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants : A statistical review . Can. J. Fish Aquat. Sci., 42:630 –648.

15- Miyazaki, T. and Y. Jo (1985). A Histopathological Study of Motile Aeromonad Disease in Ayu. Fish Pathology, 20(1):55-59.

16- Navarre, O. and J. Halver (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout. Aquaculture, 79 (2):207– 221.

17- Rey, A. (2009). Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* Strain KJ 99 infection and its extracellular products in two species of fish .Vet. Record, 164 : 493 – 499

18- Sha, J.; T. Erora; R. Alyea; S. Wang; J. Olano; V. Pancholi and A. Chopr (2009). Surface expressed enolasecontribtes to the pathogenicity of clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*.J .Bacteriol.,191(9) : 3095 – 3107 .

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

20- Sunnen, G.V. (2000). The utilization of ozone for external medical applications ozone. International J.,27 : 75 – 81 .

21- Sunnen, G.V. (2005). A primer of water . Ozone and Health : The Challenge of aqua pollution . Zonics International J., 26 (1):10 –112 .

22- Thanomsub, B.; V. Anupunpisit; S. Chanphetch; T. Watcharachaipong; R. Poonkhum and C. Srisukonth (2002) . Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. J. General and App. Micro., 48(4):193 – 199.

23- Uma, A.; G. Rebecca; S. Meena and K. Saravanabra (2010). PCR delection of putative Aerolysin and Hemolysingene in an *Aeromonas hydrophila* isolation from infected koi carp (*Cyprinus carpio*). Tamilnada J.,6(1) :31-33.

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

25- Velasquez, O.; L. Martinez; I. Ramirez and M. Valencia (2004). Destruction of Helminth (*Ascarissuum*) Eggs by Ozone . J. of the Int. Ozone Association, 26(4):359–366.

26- Wedemeyer, G.A.; N.C. Nelson and W.T. Yasutake (1979). Potentials and limits for the use of ozone as a fish disease control agent. Ozone Sci. and Eng.,(1) :295–318.

IMPACT OF WATER DISSOLVED OZONE ON TISSUES OF COMMON CARP *Cyprinus carpio* INFECTED with *Aeromonash ydrophila*

A.K. Salman **A.J.1 Al-Rudainy**

ABSTRACT

The present study was conducted to investigate the effect of ozone on *Cyprinus carpio* tissues using dissolved ozone in three concentrations (0.25, 0.50 and 0.75 mg / L) for the second, third and fourth treatments respectively, while the first treatment considered as control.

***Aeromonas hydrophila* was isolated , activated and induced the infection by intramuscular injection of the bacteria in the left side behind the front edge of the dorsal fin with a dose of 10^7 CFU/100gm of fish body weight. Treatments except control are exposed to dissolved ozone.**

Macroscopic pathological changes of gills, muscle and liver were recorded. Exposure of infected fish to different concentrations of dissolved ozone in water led to less pathological changes compared with control. Concentration of 0.50 mg / l showed the least pathological changes compared with other concentrations. The pathological changes were epithelial hyperplasia of gills with infiltration of lymphocytes and macrophages especially in third treatment which showed epithelial slaughing of secondary gill filaments. The serve pathological changes were observed in the fourth treatment.

Vet. Med. Coll.- Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq