# تأثير الأوزون المذاب في الصورة الدمية لأسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* المصابة ببكتريا *Aeromonas hydrophila*

**عبد المطلب جاسم الرديني وعبد الحسين كريم سلمان**
فرع الامراض - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد - العراق
E-Mail: alrudainy612003@yahoo.com
قبل للنشر:2012/9/12

## الخلاصة

استعمل 80 أنموذجا من اسماك الكارب الاعتيادي *Cyprinus carpio* بمديات اوزان تراوحت بين 100 - 120 غم ومديات اطوال تراوحت 20-27سم لمعرفة تاثير الاوزون المذاب في بكتريا *Aeromonas hydrophila* والصورة الدمية لاسماك التجربة . وزعت الاسماك عشوائيا بواقع 10 اسماك لكل حوض زجاجي (ابعاد الحوض الواحد 70×40×40 سم ) ، قسمت الى اربع معاملات اذ استعمل الاوزون المذاب 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 حقن جميع الاسماك ببكتريا *Aeromonas hydrophila* عن طريق الحقن العضلي I/M وبجرعة تعادل $10^7$ وحدة مكونة للمستعمرة CUF/ 100غرام من وزن الجسم . اشارت نتائج فحص الصورة الدمية لاسماك التجربة وجود فروقات معنوية ($p<0.01$) في المعاملات العلاجية مقارنة بمعاملة السيطرة . يستنتج من الدراسة الحالية امكانية تحسين الصورة الدمية للأسماك المصابة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* .

**الكلمات المفتاحية: اسماك الكارب، الاوزون المذاب، الصورة الدمية، بكتريا.**

---

## المقدمة

انطلاقا من أهمية تنمية الاستزراع السمكي على أسس علمية سليمة والافادة من نتائج الممارسات العلمية في هذا المجال ، توجه المختصون بعلوم وتربية الأسماك نحو استعمال الوسائل الحديثة والصحية للسيطرة على الأمراض وتقليل الهلاكات ورفع كفاءة الانتاج ، ومن بين تلك الوسائل استعمال تقنية العلاج بالأوزون في السيطرة على الأمراض والحد من الهلاكات وتحجيم الخسائر الفادحة في مزارع الأسماك (1 ) . ان الاستعمال الناجح للأوزون المذاب في علاج الأمراض التي تصيب مفاقس ومزارع الأسماك يعود لقدرته العالية على تحطيم فعالية الممرضات التي تصيب الأسماك ، وتفاعله مع اغلب الملوثات في مياه التربية ، وأكسدة النفايات العضوية وغير العضوية ( 2 - 4 ) .

تعاني العديد من مفاقس ومزارع الأسماك المنتشرة بالعراق من خسائر فادحة نتيجة الهلاكات العالية التي يحدثها مرض الأنتان النزفي البكتيري المسبب ببكتريا *Aeromonas.hydrophila* ، ويلجأ المربون عادة الى استعمال العديد من المضادات الحيوية كوسائل للعلاج مما يزيد من كلف الانتاج ، غير إن الاستعمال الجائر لهذه المضادات الحيوية أدى الى ظهور العتر المقاومة للدواء Drug resistance، فضلا عن الآثار السمية للجرع المتراكمة والتأثيرات المثبطة لجهاز المناعة (5 و 6 ) . هدفت الدراسة الحالية الى تحديد أفضل تركيز من الأوزون المذاب في علاج المرض عن طريق دراسة بعض صفات الدم لاسماك المعاملات العلاجية ومقارنتها بمجموعة السيطرة .

## المواد وطرائق العمل

استعمل 80 انموذجا من اسماك الكارب الأعتيادي *Cyprinus carpio* بمديات اوزان تراوحت بين 100 - 120 غم ، ومديات اطوال كلية تراوحت من 20- 27 سم لمعرفة تاثير الاوزون المذاب في بكتريا *Aeromonas hydrophila* والصورة الدمية لاسماك التجربة. وزعت الاسماك عشوائيا بواقع 10 اسماك لكل حوض زجاجي (ابعاد الحوض الواحد 70×40×40 سم ) . جهزت الاحواض بالاوكسجين عن طريق مضخات هواء كهربائية. قسمت الى اربع معاملات اذ استعمل الاوزون المذاب 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 .

استعملت في الدراسة بكتريا *Aeromonas hydrophila* والتي تم عزلها من اسماك مصابة بمرض الانتان النزفي البكتيري Bacterial haemorrhagic septiceamia في مختبر الأحياء المجهرية في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد وتم تاكيد هوية البكتريا في مختبر الصحة العامة المركزي التابع لوزارة الصحة عن طريق اجراء فحص api20E (7) . تم استحداث الاصابة بالمرض بتخميج جميع اسماك التجربة ببكتريا *Aeromonas hydrophila* عن طريق الحقن العضلي I/M في المنطقة الظهرية في الجهة اليسرى من الجسم خلف الحافة الامامية للزعنفة الظهرية حوالي 1-2 سم واسفل منها 2-3 سم (8 )، وكانت جرعة الحقن تعادل $10^7$ وحدة مكونة للمستعمرة CUF/ 100غرام من وزن الجسم (9) .

تم قياس درجة حرارة الماء يوميا والاس الهيدروجيني وتركيز الاوكسجين المذاب في الماء اسبوعيا . سحبت الفضلات من احواض التربية باستبدال 80% من ماء الاحواض يوميا بطريقة السيفون .

لدراسة الصورة الدمية لاسماك التجربة تم سحب الدم من اسماك المعاملات جميعا اسبوعيا وبواقع خمسة أسماك لكل معاملة من الوريد الذنبي Caudal vein بوساطة محقنة بلاستيكية سعة 1 مللتر رطبت من الداخل بمانع التخثر EDTA . اجري عد خلايا الدم الحمر (RBC) وخلايا الدم البيض (WBC) وقياس تركيز الهيموغلوبين (Hb) ونسبة حجم الخلايا المرصوص (PCV) على الدم المسحوب (10) . اجري التحليل الاحصائي لمعرفة الفروقات المعنوية بين المعاملات التجريبية (11) .

## النتائج والمناقشة

تراوحت قيم درجات حرارة ماء احواض التجربة بين 25-28مْ ، كما تراوحت قيم الاس الهيدروجيني بين 7.2-7.6 والاوكسجين المذاب بين 7.3- 7.7 ملغم / لتر لماء احواض التجربة وجميعها ضمن مديات الحدود الملائمة لنمو ومعيشة اسماك الكارب الاعتيادي (12) .

يتضح من (جدول ، 1 ) ان المعاملة الثانية (0.25 ملغم/لتر) سجلت ارتفاعا بسيطا في اعداد خلايا الدم الحمر اذ ارتفعت من 1.32× $10^6$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الأول الى 1.33×$10^6$خلية/ملم$^3$ في الأسبوع الثالث من التجربة على الرغم من عدم وجود فروق معنوية بين الأسابيع الثلاث لهذه المعاملة.

اما المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر) فقد شهدت ارتفاعا ملحوظا في اعداد خلايا الدم الحمر إذ ارتفعت من 1.33× $10^6$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الأول إلى 1.60 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الثالث الذي اكتسب الدلالة المعنوية (P<0.01) عن الاسبوعين الاول والثاني ، بينما اظهرت المعاملة الرابعة (0.75 ملغم/لتر) انخفاضا في اعداد خلايا الدم الحمر تراوح من 1.34 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الأول إلى 1.30 × $10^6$ خلية / ملم$^3$ في الأسبوع الثالث من التجربة مع عدم وجود فروق معنوية بين الأسابيع الثلاث لهذه المعاملة . كما لوحظ من الجدول نفسه حصول انخفاضا في اعداد خلايا الدم الحمر في معاملة السيطرة اذ انخفضت من 1.15 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الأول إلى 0.61 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الثالث من التجربة مع وجود فروق معنوية (P<0.01) بين الأسابيع الثلاث من التجربة لمعاملة السيطرة .

يتبين من (جدول ، 1 ) حصول اختلاف في اعداد خلايا الدم الحمر لأسماك التجربة باختلاف تراكيز المعاملات العلاجية ، فقد تراوحت إعدادها بين 1.32 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في المعاملة الثانية إلى 1.34 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في المعاملة الرابعة في الأسبوع الأول من التجربة . بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين المعاملات العلاجية لكنها تفوقت معنويا (P<0.01) مقارنة بالمعاملة الأولى الخالية من الاوزون المذاب ، بينما اختلفت إعداد خلايا الدم الحمر بين معاملات التجربة في الأسبوع الثاني نسبيا مع اختلاف تراكيز الاوزون مقارنة بالأسبوع الأول من التجربة ، فقد تراوحت إعدادها بين 0.85× $10^6$ خلية / ملم $^3$ في المعاملة الأولى و 1.32 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ في المعاملة الثالثة ، وتطابقت نتائج التحليل الإحصائي لمعاملات هذا الاسبوع مع سابقاتها في الاسبوع الاول تماما .

تميز الاسبوع الثالث بحصول تباين واضح في اعداد خلايا الدم الحمر تجسد في انخفاضها الملحوظ في المعاملة الاولى ، اذ كانت 0.61 × $10^6$ خلية / ملم $^3$ وارتفاعها الملحوظ في المعاملة الثالثة ، اذ كانت 1.60 × $10^6$ خلية/ ملم$^3$ . اشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى تفوق المعاملة الثالثة معنويا (P<0.01) عن المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا (P<0.01) عن المعاملة الاولى .

بينت قيم نتائج الدراسة الحالية ان التراكيز المتوسطة من الاوزون المذاب (0.50 ملغم/لتر) سببت زيادة في اعداد خلايا الدم الحمر ولعل ذلك يعزى الى ان الاوزون يعمل على تنشيط الدورة الدموية في الجسم عن طريق اكسدة الدهون ومادة الكوليسترول المترسبة في جدران الاوعية الدموية ويحولها الى مركبات بسيطة يسهل للجسم التخلص منها وبالتالي يزيد من معدل سريان الدم ، كما يعمل على زيادة مرونة خلايا الدم الحمر ويرفع من كفاءتها لحمل الأوكسجين مما ينتج عنه زيادة في مستوى الأوكسجين الممتص في الأنسجة الحية ، فضلا عن دوره في زيادة انتاج مادة الاديوسين ثلاثي الفوسفات التي تجهز الخلايا بطاقة كبيرة يزداد معها معدل الايض البنائي وتحسن وظائف الجسم المختلفة مما يترك اثرا ايجابيا في التصدي للاصابة المرضية وتسريع الشفاء ، وتحتاج هذه التفاعلات الايضية الكثيرة المزيد من الأوكسجين لإتمامها مما يتطلب تصنيع المزيد من خلايا الدم الحمر لتلبية تلك الاحتياجات، وهذا يتفق مع كل من (13 و14) اللذين اشارا الى ان الأوزون يعمل على أكسدة السدادات الدموية plaques في الأوعية

الدموية مما يساعد على إزالتها ومن ثم سرعة سريان الدم واللمف فيها . فضلا عن ذلك يحفز الأوزون على توسع الأوعية الدموية Vasodilator وزيادة أنتاج Prostacyclin الذي يثبط تجمع الأقراص الدموية (15).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية ان التراكيز العالية من الأوزون المذاب (0.75 ملغم/لتر) سببت انخفاض في إعداد خلايا الدم الحمر مع مرور وقت التجربة ، ويكمن السبب في ان التراكيز العالية من الأوزون لها فعل مؤكسد ضد بعض الإنزيمات الضرورية المنظمة لنمو وتمايز خلايا الدم فضلا عن قدرته على اختراق أغشية الخلايا الدمية مسببا تحللها ، وهذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه (16) الذي وجد ان تركيز 0.70 ملغم/لتر من الاوزون احدث انخفاضا في العدد الكلي لخلايا الدم الحمر.

أشارت بعض الدراسات الى أن خلايا الدم الحمر في الأسماك هي الهدف الأساسي المتضرر من الاستعمال المفرط Excessive use للأوزون وليس أنسجة الغلاصم كما كان يعتقد سابقاً (17) . ويعزز هذا الرأي دراسة (18) التي تناولت تعريض خلايا الدم الحمر لاسماك *Oncorhynchus mykiss* الى الاوزون بتركيز 20 ملغم / لتر لمدة 120 دقيقة ، واظهرت النتائج ان الأوزون لا يهاجم خلايا الدم مباشرة من خارج الخلية ولكن مثل هذه التراكيز العالية تسمح له باختراق اغشية الخلايا الدمية والتفاعل مع الهيموغلوبين داخل الخلايا ملحقا أضرارا فيها ، مما يوحي بان سمية الأوزون داخل الخلايا الدمية تؤدي دورا هاما في تقدير هذه الإضرار، في حين اتفقت أغلب الدراسات على كون الأوزون ضمن الحدود المسموح بها طبياً أمين للاستعمال والعلاج ولا يلحق اية اضرار في النسيج الدموي ومكوناته ( 19 - 21 ) .

**جدول ،1 : معدل أعداد خلايا الدم الحمر ± الخطأ القياسي $\times 10^6$**

| الأسبوع / المعاملة | الأول | الثاني | الثالث |
|---|---|---|---|
| المعاملة الأولى (السيطرة ) | b<br>0.04±1.15<br>A | b<br>0.06±0.85<br>B | c<br>0.02±0.61<br>C |
| المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/لتر) | a<br>0.05±1.32<br>A | a<br>0.01±1.31<br>A | b<br>0.01±1.33<br>A |
| المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/لتر) | a<br>0.03±1.33<br>B | a<br>0.03±1.32<br>B | a<br>0.05±1.60<br>A |
| المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/لتر) | a<br>0.07±1.34<br>A | a<br>0.01±1.31<br>A | b<br>0.03±1.30<br>A |

**الأحرف الصغيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون (P<0.01) .**
**الأحرف الكبيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة (P<0.01) .**

يوضح (الجدول ، 2 ) معدلات اعداد خلايا الدم البيض للأسماك المخمجة والمعالجة بتراكيز مختلفة من الأوزون المذاب ومقارنتها بمعاملة السيطرة حيث اتضح ارتفاع اعداد خلايا الدم البيض في المعاملة الثانية (0.25 ملغم/لتر) من $24.05 \times 10^3$ خلية /ملم $^3$ في الأسبوع الأول إلى $25.96 \times 10^3$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الثالث ، وبينت نتائج التحليل الاحصائي عدم وجود فروق معنوية بين الأسبوعين الثاني والثالث لكنهما تفوقا معنويا ( P<0.01 ) عن الاسبوع الأول من التجربة . كما لوحظ ارتفاع في اعداد خلايا الدم البيض في المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر) من $25.60 \times 10^3$خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الأول إلى $29.99 \times 10^3$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الثالث الذي اكتسب الدلالة المعنوية ( P<0.01) عن الاسبوع الثاني الذي تفوق بدوره معنويا ( P<0.01) عن الاسبوع الاول. شهدت المعاملة الرابعة (0.75 ملغم/لتر) انخفاضا في اعداد خلايا الدم البيض تراوح بين $26-01 \times 10^3$ خلية /ملم $^3$ في الاسبوع الاول و $25.88 \times 10^3$خلية /ملم $^3$ في الأسبوع الثالث من التجربة ، مع عدم وجود فروق معنوية بين اسابيع التجربة الثلاثة . كما بين الجدول نفسه انخفاض اعداد خلايا الدم البيض في معاملة السيطرة من $22.06 \times 10^3$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الأول إلى $15.97 \times 10^3$ خلية / ملم $^3$ في الأسبوع الثالث من التجربة ، أظهرت نتائج التحليل الإحصائي وجود فروق معنوية ( P<0.01 ) بين الأسابيع الثلاثة لمعاملة السيطرة .

يتبين من (الجدول ، 2 ) حصول اختلاف في اعداد خلايا الدم البيض لأسماك التجربة باختلاف تراكيز المعاملات العلاجية ، فقد كانت إعدادها $24.05 \times 10^3$خلية / ملم $^3$ في المعاملة الثانية و$26.01 \times 10^3$خلية/ملم$^3$ في المعاملة الرابعة ضمن الاسبوع الاول من التجربة . بينت نتائج التحليل الإحصائي عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين الثالثة والرابعة لكنهما تفوقا معنويا ( P<0.01 ) عن المعاملة الثانية التي تفوقت بدورها معنويا ( P<0.01 )

عن المعاملة الاولى ، وشهدت معاملات التجربة ضمن الأسبوع الثاني تباينا في اعداد خلايا الدم البيض اذ سجلت المعاملة الاولى اقل قيمة 17.90 ×$10^3$خلية /ملم$^3$ ، بينما سجلت المعاملة الثالثة اعلى قيمة 28.14 × $10^3$ خلية / ملم$^3$ ، واشارت نتائج التحليل الإحصائي الى تفوق المعاملة الثالثة معنويا ( P<0.01) عن المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا ( P<0.01) عن المعاملة الاولى ، ولوحظت نفس الظاهرة في معاملات التجربة ضمن الاسبوع الثالث حيث تباينت اعداد خلايا الدم البيض وسجلت معاملة السيطرة اقل قيمة 15.97 × 10 $^3$ خلية / ملم $^3$ ، بينما سجلت المعاملة الثالثة اعلى قيمة 29.99 × $10^3$ خلية / ملم $^3$ ، وتطابقت نتائج التحليل الإحصائي لمعاملات التجربة ضمن الاسبوع الثالث مع سابقاتها في الاسبوع الثاني تماما.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها زيادة في إعداد خلايا الدم البيض عند التراكيزالواطئة والمتوسطة (0.25 و0.50 ملغم/لتر) ، في حين ان التراكيز العالية منه (0.75 ملغم/لتر) كان لها تاثيرمثبط نتج عنه حصول انخفاض في اعداد خلايا الدم البيض وهذا يتفق مع كل من (22) الذي اشار بان الاوزون مادة لها فعل محفز للاستجابة المناعية الخلوية والخلطية للجهاز المناعي بشكل عام عند التراكيز القليلة منه ، في حين ان تراكيزه العالية لها تأثير مثبط عليها.

يعزى التاثير المحفز للأوزون المذاب في الماء عند التراكيز المنخفضة والمتوسطة الى فعله في زيادة انتاج السايتوكاينات مثل الانترفيرون والعامل التنخري للأورام والانترلوكينات لاسيما IL-2 والتي لها دور مهم في زيادة انتاج الخلايا اللمفاوية بنوعيها T و B وتمايزها وتحفيزها وتنظيم عملها مما يرفع من كفاءة الجهاز المناعي في مقاومة الامراض وكبح البكترياالغازية للجسم والحد من أثارها في الأنسجة المصابة وهذا يتفق مع كل من (23 و24) اللذين أشارا إلى حصول زيادة في عدد الخلايا اللمفاوية التائية لاسيما T4 او ما يعرف CD4 عند التعرض لتراكيز آمنة من الأوزون في حين التراكيز العالية منه قد ثبطت عددها.

كما بينت بعض الدراسات ان تعريض الحيوانات المختبرية للأوزون نتج عنه زيادة في انتاج البروتينات المناعية Immunoglobulins مثل IgG و IgA وIgM ، والتي لها دور مهم في محاربة الخمج وزيادة الاستساغة للخلايا الملتهمة إثناء عملية الالتهام ( 25 و26).

اما الفعل التثبيطي لغاز الاوزون المذاب في الماء على الاستجابة المناعية عند التراكيز العالية والمتجسد في نقصان العدد الكلي لخلايا الدم البيض قد يعود الى تأثيره السمي الخلوي على الخلايا الطبيعية عموما لاسيما خلايا الدم البيض ، وهذا ناجم عن فعله المؤكسد على المكونات الدهنية في الأغشية السايتوبلازمية للخلايا البلعمية ( 27) ، وهذا قد يفسر التأثير المثبط للتراكيز العالية من الأوزون في عمل الخلايا البلعمية حيث ان تأثر أغشيتها السايتوبلازمية والتي لها دور مهم في بداية عملية البلعمة عن طريق عملية الالتصاق يؤثر سلبا في عملها بسبب غلق مواقع المستقبلات وعدم حدوث الاستساغة الممهدة لعملية الالتهام (28) .

وبسبب امتلاك التراكيز العالية من الأوزون القدرة على الفعل المؤكسد للدهون المفسفرة والذي يؤدي الى تحللها ، مما يفضي الى انخفاض إعداد الخلايا الملتهمة ومن ثم تثبيط الاستجابة المناعية (29 ) ، ويؤكد ذلك دراسة (30) التي لاحظت تثبيط عدد من الفعاليات المناعية من ضمنها العدد الكلي لكريات الدم البيض في الفئران المعرضة لتركيز 0.80 ملغم /لتر من الاوزون بشكل مستمر ولمدة ثلاثة أيام ، وهذا يتفق مع ما توصلت اليه الدراسة الحالية.

**جدول ،2: معدل أعداد خلايا الدم البيض± الخطأ القياسي ×$10^3$**

| المعاملة / الأسبوع | الأول | الثاني | الثالث |
|---|---|---|---|
| المعاملة الأولى (السيطرة ) | c 0.40±22.06 A | c 0.60±17.90 B | c 0.13±15.97 C |
| المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/لتر) | b 0.35±24.05 B | b 0.40±25.85 A | b 0.21±25.96 A |
| المعاملة الثالثة(تركيز 0.50 ملغم/لتر) | a 0.10±25.60 C | a 0.41±28.14 B | a 0.32±29.99 A |
| المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/لتر) | a 0.07±26.01 A | b 0.05±25.90 A | b 0.35±25.88 A |

**الأحرف الصغيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون (P<0.01) .**
**الأحرف الكبيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة (P<0.01) .**

يشير (جدول ، 3 ) إلى ارتفاع تركيز الهيموغلوبين من 8.25 غم / 100 مل دم في الأسبوع الأول إلى 8.99 غم / 100 مل دم في الأسبوع الثالث من التجربة في المعاملة الثانية (0.25 ملغم/لتر) . واظهرت نتائج التحليل الاحصائي تفوق الاسبوعين الثاني والثالث معنويا (P<0.01) عن الاسبوع الاول من التجربة ، ولوحظ ارتفاع لتركيزالهيموغلوبين في المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر) ، إذ ارتفع المعدل من 8.96غم / 100 مل دم في الأسبوع الأول إلى 9.20 غم /100مل دم في الأسبوع الثالث الذي اكتسب الدلالة المعنوية (p<0.01) مقارنة بالاسبوعين الاول والثاني . اما المعاملة الرابعة (0.75 ملغم/لتر) فقد سجلت ارتفاعا في تراكيز الهيموغلوبين تراوح من 8.47

– 9.05 غم / 100مل دم في الأسبوعين الأول والثالث على التوالي ، وبينت نتائج التحليل الاحصائي اكتساب الاسبوعين الثاني والثالث الدلالة المعنوية (p<0.01) مقارنة بالاسبوع الاول من التجربة ، ويوضح الجدول نفسه انخفاض تركيز الهيموغلوبين في معاملة السيطرة من 7.76غم /100مل دم في الأسبوع الأول إلى 4.66غم /100مل دم في الأسبوع الثالث من التجربة ، مع وجود فروق معنوية (P<0.01) بين أسابيع التجربة الثلاثة .

يتبين من (جدول ، 3 ) حصول اختلاف في تراكيز الهيموغلوبين لأسماك التجربة باختلاف المعاملات العلاجية ، اذ كانت التراكيز 8.25 غم / 100 مل دم في المعاملة الثانية و 8.96غم /100 مل دم في المعاملة الثالثة و8.47 غم/100 مل دم في المعاملة الرابعة في الاسبوع الاول من التجربة، واظهرت نتائج التحليل الإحصائي تفوق المعاملة الثالثة معنويا (P<0.01 ) على المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا (P<0.01) على المعاملة الاولى ( السيطرة) ، بينما اختلفت تراكيز الهيموغلوبين بين معاملات التجربة في الأسبوع الثاني نسبيا مع اختلاف تراكيز الأوزون مقارنة بالأسبوع الأول ، إذ تراوحت تراكيزها بين 5.16 غم / 100 مل دم في المعاملة الأولى و 8.92 غم / 100 مل دم في المعاملة الرابعة ، اذ لم تظهر نتائج التحليل الإحصائي فروق معنوية بين المعاملة الثالثة والرابعة مع ذلك أظهرت هاتان المعاملتان فروق معنوية (P<0.01) مع كل من المعاملة الثانية والأولى . اما في الأسبوع الثالث من التجربة فقد تراوحت تراكيز الهيموغلوبين بين 4.66 غم / 100 مل دم في معاملة السيطرة إلى 9.05 غم / 100 مل دم في المعاملة الرابعة. أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى اكتساب المعاملة الثالثة الدلالة المعنوية (P<0.01) بالمقارنة مع المعاملتين الثانية والرابعة اللتان تفوقتا بدورهما معنويا (P<0.01) عن المعاملة الاولى .

بينت الدراسة الحالية الاثر الفعال للاوزون المذاب بتراكيزه المختلفة في المحافظة على مستويات تراكيز الهيموغلوبين مقارنة مع معاملة السيطرة وهذا يعود الى دور الاوزون المعروف في رفع المناعة الخلوية والخلطية في اجسام الأسماك المخمجة عن طريق الحقن العضلي ، كما يعمل على توفير الظروف المثالية للخلية من أوكسجين ومواد غذائية للقيام بوظائفها الفسلجية الطبيعية الامر الذي انعكس ايجابا في صحة الاسماك المعالجة وجعلها تتمكن من الافادة القصوى لما تحويه المواد الغذائية من الأملاح والمعادن لاسيما عنصري الحديد والنحاس وهما من المواد الاساسية في صناعة خلايا الدم الحمر وصبغة الهيموغلوبين، وهذا يتفق مع دراسة (31) التي اشارت الى ارتفاع نسبة الهيموغلوبين في عينات دم الفئران وخنازير غينيا المعالجة بتراكيز عالية من الاوزون في الجسم الحي In vivo .

**جدول ،3: معدلات تركيز الهيموغلوبين في الدم ± الخطأ القياسي (غم/100مل )**

| الأسبوع / المعاملة | الأول | الثاني | الثالث |
|---|---|---|---|
| المعاملة الأولى (السيطرة ) | c<br>0. 18±7.76<br>A | c<br>0. 40±5.16<br>B | c<br>0.20±4.66<br>C |
| المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/لتر) | b<br>0.27±8.25<br>B | b<br>0.50±8.82<br>A | b<br>0.10±8.99<br>A |
| المعاملة الثالثة( تركيز 0.50 ملغم/لتر) | a<br>0.32±8.96<br>B | a<br>0.34±8.95<br>B | a<br>0.40±9.20<br>A |
| المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/لتر) | b<br>0.22±8.47<br>B | a<br>0.40±8.92<br>A | b<br>0.18±9.05<br>A |

**الأحرف الصغيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون (P<0.01) .**
**الأحرف الكبيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة (P<0.01) .**

يتبين من (جدول ، 4 ) ارتفاع حجم خلايا الدم المرصوص من 26.30% في الأسبوع الأول الى 27% في الأسبوع الثالث من التجربة تحت تاثير المعاملة الثانية (0.25 ملغم/لتر) ، ولم نجد فروقا معنوية بين الأسبوعين الثاني والثالث لكنهما تفوقا معنويا (p<0.01) مقارنة بالأسبوع الأول . اظهرت المعاملة الثالثة (0.50 ملغم/لتر) ارتفاعا في حجم خلايا الدم المرصوص تراوح بين 26.50 % في الأسبوع الأول و 29.60% في الأسبوع الثالث ، وتطابق التحليل الإحصائي لهذه المعاملة بشكل واضح مع المعاملة الثانية ، وسجلت المعاملة الرابعة (0.75 ملغم/لتر) ارتفاعا تراوح بين 27% - 29.20 في الأسبوعين الأول والثالث على التوالي ، واكتسب الأسبوع الثالث الدلالة المعنوية (p<0.01) مقارنة مع الأسبوعين الأول والثاني ، اما معاملة السيطرة فقد شهدت انخفاضا ملحوظا في حجم خلايا الدم المرصوص تراوح بين 24.40 % في الأسبوع الأول و13.20% في الأسبوع الثالث من التجربة مع وجود فروق معنوية (p<0.01) بين أسابيع التجربة الثلاثة.

يتضح من (جدول ، 4 ) حصول تغير في حجم خلايا الدم المرصوص لأسماك التجربة بتغيير تراكيز الأوزون ، فقد كان 26.30% في المعاملة الثانية و 27% في المعاملة الرابعة في الأسبوع الأول من التجربة ،ولم تظهر المعاملات العلاجية الثلاث فروقا معنوية فيما بينها ضمن الأسبوع نفسه ، لكنها أظهرت تفوقا معنويا (p<0.01 ) بالمقارنة مع المعاملة الاولى (السيطرة) . تباينت احجام خلايا الدم المرصوص بتباين المعاملات في الاسبوع الثاني من التجربة

فكانت 18 % في المعاملة الأولى و 27 % في المعاملة الرابعة ، وتطابقت نتائج التحليل الإحصائي لمعاملات الاسبوع الثاني مع سابقاتها في الاسبوع الاول تماما ، اما احجام خلايا الدم المرصوص تحت تاثير المعاملات في الاسبوع الثالث من التجربة فكانت 13.20% في معاملة السيطرة و 29.20% في المعاملة الرابعة . أشارت نتائج التحليل الإحصائي إلى عدم وجود فروق معنوية بين المعاملتين الثالثة والرابعة اللتان تفوقتا معنويا ( $p<0.01$ ) عن المعاملة الثانية التي تفوقت بدورها معنويا ( $p<0.01$ ) عن المعاملة الاولى .

بينت النتائج ارتفاع إحجام خلايا الدم المرصوص في المعاملات العلاجية مع مرور الوقت ويعزى ذلك الى دور الأوزون في جعل البيئة المحيطة بالأسماك غنية بالأوكسجين مما يؤثر بصورة مباشرة على الأجزاء الخارجية والأعضاء الداخلية للأسماك، حيث انه يزيد من كمية الأوكسجين الداخلة للخلايا ويزيد من معدل الايض البنائي فضلا عن دوره في زيادة عمل بيوت الطاقة Mitochondria مما يفضي الى تحسن أداء العمليات الحيوية وبالتالي وفرة في انتاج خلايا الدم الحمر ومايتبعه من زيادة الحجم الخلوي المرصوص، وهذا يتفق مع دراسة (32) التي سجلت ارتفاع حجم خلايا الدم المرصوص في عينات دم الانسان المعالجة بالأوزون خارج الجسم In vitro .

**جدول ،4: معدلات قيم حجم خلايا الدم المرصوصة ± الخطأ القياسي (%)**

| الأسبوع / المعاملة | الأول | الثاني | الثالث |
|---|---|---|---|
| المعاملة الأولى (السيطرة ) | b<br>0.70±24.40<br>A | b<br>0.50±18.00<br>B | c<br>0.66±13.20<br>C |
| المعاملة الثانية (تركيز 0.25 ملغم/لتر) | a<br>0.58±26.30<br>B | a<br>0.76±26.90<br>A | b<br>0.40±27.00<br>A |
| المعاملة الثالثة (تركيز 0.50 ملغم/لتر) | a<br>0.90±26.50<br>B | a<br>0.85±27.05<br>A | a<br>0.33±29.60<br>A |
| المعاملة الرابعة (تركيز 0.75 ملغم/لتر) | a<br>0.73±27.00<br>B | a<br>0.23±27.00<br>B | a<br>0.05±29.20<br>A |

**الأحرف الصغيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين معاملات الأوزون (P<0.01) .**
**الأحرف الكبيرة المختلفة تدل علي وجود فروقات معنوية بين الأسابيع داخل كل معاملة (P<0.01)**

## المصادر


1. Bullock, G.L.; Summerfelt, S.T.; Noble, A.; Weber, A.; Durant, M.D. and Hankins, J.A. (1997). Ozonation of circulating rainbow trout culture System: I. Effects on bacterial gill disease and heterotrophic bacteria. Aquaculture, 158:43 – 55.
2. Colt, J.E. and Tomasso, J.R. (2001). Hatchery water supply and treatment. Wedemeyer, G. A. (ed.) Fish hatchery management. 2nd ed. Bethesda, MD: American Fisheries Society, PP: 91 – 181.
3. Summerfelt, S.T. (2003). Ozonation and Uv Irradiation–an introduction and examples of current applications. Aquacultural Engineering, 28: 21-36.
4. Ghomi, M.; Esmaili, A.; Vossoughi, G.; Key van, A. and Nazari, R. (2007). Comparison of Ozone, hydrogen peroxide and removal of infected eggs for prevention of fungal infection in sturgeon hatchery. Fisheries Sci., 73(6):1332–1337.
5. Alexander, F. (1985). Veterinary pharmacology, 4th edition, Churchill Livingstone Inc ., New York , P:429.
6. Gunsalam, J.W.; Radu, S.; Benjamin, P.G.; Selamat, and Robin, T. (2006). Evidence of Cross – contamination of *Aeromonas hydrophila* by fingerprinting : Significanace for food safety. J. food safety, 26: 302 – 312.
7. Nester, E.; Anderson, D.; Roberts, C. and Nester, M. (2007). Microbiology. 5th ed. mc Graw hill, New York. Ch. 10., PP: 252 -254.
8. Lucky, Z. (1977). The diagnosis of bacterial disease by infection experiments. In: Hoffman, G. L. (Ed), Methods for diagnosis of disease. Amerind, New Delhi, PP:68-71.
9. Littler, T. (2007). Frequency of Aero *Monas* spp. Detection in Rainbow Trout and Recirculation Aquaculture Systems and the storage Stability of fillets. Msc.

Thesis College of Agricuiture – Virginia University.

10. Blaxhall, P. and Dalslly, K.(1973). Routine hematological methods for use with fish blood. J. Fish Biol., 5:771-781.
11. Duncan, D.B. (1955). Multiple range F-test. Biom., 11(1):1-14.
12. FAO (1981). New development in the utilization of heated effluent and recirculation system for intensive aquaculture, report of the symposium, 29-30 May, 1980.Roma, EIFAC/T39.
13. Bocci, V. (2002). Oxygen – Ozone Therapy A critical review. Kluwer Academic press, Dordrecht, The Netherlands.
14. Paolo, N.; Bocci, V. and Gaggiotti, E. (2004). Ozone therapy. The International J. Artificial Organs, 27: 168 – 175.
15. Pressman, S. (1998). The story of Ozone. 1st ed., A Free book on the internet.
16. Schulz, E.; Moore, G. and Calabrese, E . (1981) .Studies on the Biological effects of Ozone. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26 : 273.
17. Wedemeyer, G.A.; Nelson, N.C. and Yasutake, W.T. (1979). Potentials and limits for the use of ozone as a fish disease control agent Ozone. Sci. and Engineer., (1): 295 – 318.
18. Fukunaga, K.; Nakazono, N.; Suzuki, T. and Takama, K. (1999). Mechanism of oxidative. Damege to Fish Red Blood Cell by Ozone. JUBMB Life, 48: 631 – 634.
19. Wells, K.H.; Latino, J.; Gavalchin, J. and Poiesz, B. (1991). Inactivation of human immune deficiency Virus type 1 by ozone in Vitro. Blood J., 78: 1882 – 1890.
20. Gornicki, A. and Cutsze, A. (2000). In vitro effects of ozone on human erythrocyte membranes: Anepr study. Acta. Biochimica. Polonica., 47(4):963–971.
21. Travagli, ; Zanardi, I .; Silvietti, A. and Bocci, V. (2007). A physicochemical investigation on the effects of ozone on blood. Inter. J. Biol. Macromolecules, 41: 504 – 511.
22. Bocci, V. (1999). Biological and Clinical effects of ozone , Has Ozone therapy a future in medicine? Br. J. Biomed. Sci.,, 56(3): 270 – 279.
23. Null, G. (1995). Ozone: Awide spectrum Healer. Ozone Sci. and Engineering, 9: 65-72
24. Yamaguchi, T.; Katakura, F.; Shitands, S.; Niids , Y.; Maki, H.; Yaba, O.; Suetake, H.; Moritomo, T. and Nakanishi, T. (2011). Clonal growth of carp (*cyprinus carpio*) T. cell in vitro. Developmental and Comparative Immunology, 35(2):193-202.
25. Gilmon, M.I. and Jakab, G.J. (1991). Modulation of immune function in mice exposed to 0.8 ppm ozone. in Halation Toxicol., 3: 293-308
26. Mello, R.C. and Mello, R.D. (2001).Ozone therapy in female in fertility. 15th Ozone medical Conference. London.
27. Lurini, A. and Bocci, V. (2005). Effects of Ozone on isolated Peripheral Blood mononuclear cells in Vitro . Toxicol., 19: 55 – 61.
28. Haen, P.S. (1995). Principles of Haematology. W. B. Publishers, London.
29. Dohmetal, M.; Mautz, W.; Andrade, J.; Gellert, K.; Ferguson, L.; Nicolaisen, N. and Fujie, N. (2005). Effects of Ozone exposure on non – specific phagocytic of Capacity of Pulmonary Macrophages from an amphibian , Bufo marinus . Environ. Toxicol. Chemistry, 24(1): 205 – 210.
30. Fujimaki, H.; Shiraishi, F.; Ashikawa, T. and Muyakami, M. (1987). Changes in delayed hypersensitivity reaction in mice exposed to O3. Enviro. Res., 43:186 –190.
31. Rakovsky, S. and Zaikov, G. (2009). Application of Ozone in Medicine. Chemistry and Chemical Technology, 3(3): 237 – 248.
32. Plessis, I.H.; Westhuizen, F. H. and Kotze, H.F. (2008). The protective effect of plasma anti-oxidants during ozone outo hemo therapy. African J. Biotech. , 7(14):2472-2477.

# Effect of ozonated water on the blood picture of the common carp *Cyprinus carpio* infected with *Aeromonas hydrophila*

**Abdulmotalib J. Al-Rudainy and Abdulhussien K. Salman**
Department of Pathology, College of Veterinary Medicine, Baghdad University, Iraq

## Summary

A total of 80 specimens of common carp *Cyprinus carpio* were used ranged in weight between 100-120g and in length between 20-27 cm. Effect of ozonated water were investigated on the fish as well as Aeromonas *hydrophila* pathogenic bacteria. Fish were distributed randomly between eight aquariums (70x40x40 cm) with two replicates for each treatment. Three concentrations of ozonated water were used (0.25, 0.50 and 0.75 mg / L), the last two aquarium were the control with no ozonated water through the period of three weeks. All four groups were injected intramuscularly by *Aeromonas hydrophila* at $10^7$ CUF /100 gm body weight. Results of blood picture test showed a significant differences ($p<0.01$) between the three treatments containing ozonated water compared with control treatment .It can be concluded that the possibility improvement the blood picture of fish affected with *Aeromonas hydrophila* .

**Keywords: *Cyprinus carpio,* Ozonated water, Hematology, *Aeromonas hydrophila.***