التأثيرات النسيجية لاصابة اسماك الزينة الذهبية *Carrassius auratus auratus* بالفطر *Saprolegnia parasitica* مختبريا

سناء قاسم بدر[1] عبد الحافظ الدبون[1] توفيق محمد محسن[2]

[1] قسم الاحياء البحرية، مركز علوم البحار، جامعة البصرة
[2] قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة البصرة

الخلاصة

تمت اصابة اسماك الزينة الذهبية *Carrassius auratus auratus* بالفطر المائي *Saprolegnia parasitica* مختبرياً وتركت الأسماك في الأحواض من غير أي معالجة لغرض دراسة التأثيرات النسيجية التي أحدثتها إلاصابة الفطرية عليها. إذ حضرت مقاطع نسيجية للجلد والعضلات وقد اظهرت النتائج تغيرات نسيجية ومظهرية واضحة تمثلت بانسلاخ طبقة البشرة وتنخر خلاياها وتنكس وتنخر الخلايا العضلية.

المقدمة

من المعلوم أن أصابة الأسماك بالفطريات العائدة للعائلة Saprolegniaceae لا تخلو من أضرار نسيجية (Hussein *et al.*,2002 و Johnson *et al.*, 2002). وهذه ألاضرار التي لوحظت في الأسماك المصابة بالفطر *Saprolegnia* هي تغيرات في عدد الخلايا المخاطية Mucous cells وتغير في سمك ألانسجة الظهارية للجلد ونزف Hemorrhage وتقرح Ulceration بسبب إختراق الخيوط الفطرية Hyphae للأنسجة العضلية (Canales *et al.* , 2001 و Durborow *et al.*, 2003). أما التغيرات النسيجية الحاصلة في الأمعاء تبدأ بحدوث فقدان للطبقة المخاطية (Fregeneda Grandes *et al.*, 2001). وفي بعض الحالات يهاجم الفطر التجويف الأنفي Nasal cavity وتلاحظ زيادة في عدد الخلايا الظهارية فيه وزيادة في عدد الخلايا المخاطية وفي الحالات الشديدة تنفجر الخلايا المخاطية وتصبح متنخرة necrotic (Hussein and Hatai, 2002). ولاحظ العالم Emilio *et al.* (2007) حدوث تغيرات نسيجية واضحة متمثلة بنزف وتقرحات جلدية للاسماك المصابة تجريبيا" بواسطة الابواغ الفطرية الثانوية المعزولة من الفطرين *Aphanomyces invadans* و*Achlya bisexualis*.

مواد وطرق العمل

اصابة الأسماك بالفطر *Saprolegnia parasitica* مختبرياً

تم شراء الأسماك من احواض أسماك الزينة / كلية الزراعة / قسم الأسماك والثروة البحرية / جامعة البصرة في موقع كرمة علي. استخدمت 40 سمكة لغرض الدراسة المختبرية وكان معدل طولها 6 سم ومعدل وزنها 25 غم وقد تمت معالجة الاسماك كافة قبل التعامل معها وذلك بتغطيسها في محلول ملح الطعام NaCl بتركيز 5 % لمدة خمس دقائق لحين ظهور علامات الاجهاد على الاسماك (محسن، 1983) وذلك للتأكد من خلو الأسماك من إلاصابات الفطرية أو أية إصابات أخرى، وضعت الأسماك في أحواض بلاستيكية بأبعاد 42 سم × 33 سم × 20 سم إذ وزعت الأسماك على 4 أحواض وبواقع 10 أسماك في كل حوض، حوض واحد كسيطرة Control، وثلاثة احواض لاصابة (تركت الاسماك في الاحواض لتتأقلم لمدة سبعة أيام قبل البدء بالتجربة). تم إحداث إصابة ثانوية Secondary Infection (أي بعمل خدوش جلدية Cutaneous injuries) على الأسماك بإستخدام شفرة جراحية معقمة، استحدثت إلاصابة بواسطة نشر الوسط الزرعي المائي الحاوي على المستعمرة الفطرية وبعد تقطيعها الى أجزاء في نفس الوسط الزرعي ثم سكبه في الحوض. وتركت الأسماك حتى نهاية التجربة (10 أيام). استخدمت التهوية الصناعية بإستخدام مضخة هواء aerator، وغذيت الأسماك بالغذاء التجاري، مع استبدال نصف حجم ماء الحوض كل ثلاثة أيام ابتداءً من اليوم الرابع لزمن الاصابة لترك الأسماك بتماس مع أبواغ الفطر، واضيفت كل ثلاثة أيام كبسولتان من مضاد الحيوي Chloramphenicol لكل حوض وقد أضيفت نفس الجرعة في اليوم الاول من الاصابة وذلك لمنع النمو البكتيري، ورفعت فضلات الأسماك وبقايا الطعام يومياً باستخدام سيفون.

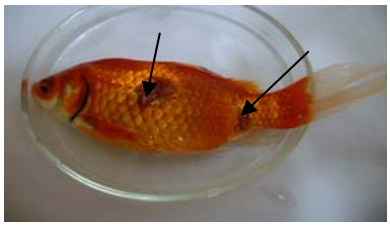
الفحص النسيجي

اخذت أنسجة الجلد والعضلات من أسماك الزينة الذهبي لغرض دراسة التأثيرات المرضية النسيجية للفطر *Saprolegnia parasitica* وحضرت المقاطع النسيجية باتباع طريقة شمع البارافين (Humason, 1972) بعد أصابتها مختبرياً بالفطر. صبغت المقاطع النسيجية بصبغة Periodic Acid Schiff stain (PAS) وحسب الطريقة الموضحة في (الخطيب، 2001).

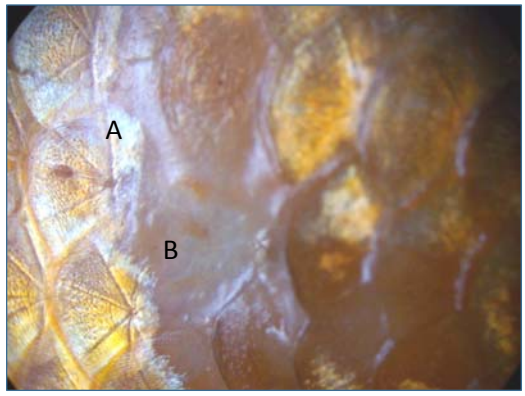
النتائج

الفحص النسيجي لأسماك الزينة المصابة بالفطر *Saprolegnia parasitica* مختبرياً

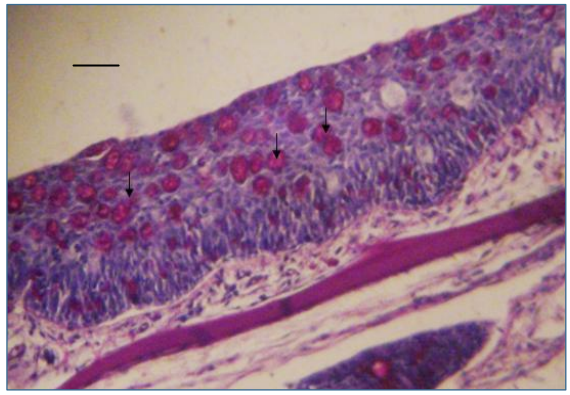
أظهر الفحص المجهري التشريحي والفحص العياني للأسماك المصابة مختبريا" حدوث مواقع للإصابة بالفطر بشكل بقع كبيرة ترى بالعين المجردة توزعت على الجهة الظهرية لجذع السمكة ومنطقة الراس وفي الجهة الجانبية للمضيف الذنبي وقرب الزعانف الحوضية والبطنية (صورة 1 و2). أظهرت دراسة المقاطع النسيجية المحضرة من تلك الأسماك المصابة بعد 25 يوما" من تعرضها للإصابة على وجود تغيرات مرضية نسيجية كبيرة شملت كلا" من منطقة الجلد وطبقة العضلات التي تحت الجلد مباشرة (صورة 3). ففي الجلد لوحظ أن الفطر سبب إزالة طبقة البشرة بأكملها في مواقع إلاصابة نتيجة تنخر خلايا البشرة بالكامل، ولوحظ ان الاسماك المصابة تبدي ردود فعل دفاعية ومناعية ضد تواجد الخيوط الفطرية في بعض مناطق الأدمة اذ لوحظ تجمع الخلايا الالتهابية وارتشاحها حول الاوعية الدموية الصغيرة والكبيرة، فضلا" عن احتقان هذه الاوعية، كما أدى تواجد الفطر في بعض مناطق الادمة التي تتميز بكثافة اليافها الكولاجينية الى تشكيل محافظ حول الفطر تتكون من عدد من الطبقات تتراوح بين 4- 5 طبقة من الخلايا المولدة الليفية والالياف الكولاجينية (صورة 4 و5). لوحظ ان الخيوط الفطرية تخترق الجلد لتصل طبقة النسيج الدهني تحت الجلد مسببة تنخر الخلايا الدهنية اذ حلل الفطر الغشاء البلازمي للخلايا الدهنية ثم اخترقه وحل محل الدهن داخل الخلايا بعد نموه فيها (صورة 6). وتبين ايضا ان الخيوط الفطرية نمت لتستمر بتغلغلها داخل جسم السمكة لتصل طبقة العضلات الهيكلية حيث احتلت الخيوط الفطرية النسيج الرابط المكون لاغلفة العضلات وتغلغلت بين حزمها وخلاياها اذ تفرعت الخيوط الفطرية مع تفرع النسيج الرابط في العضلات مسببة تنكس وتنخر الخلايا العضلية (صورة 7 و8).



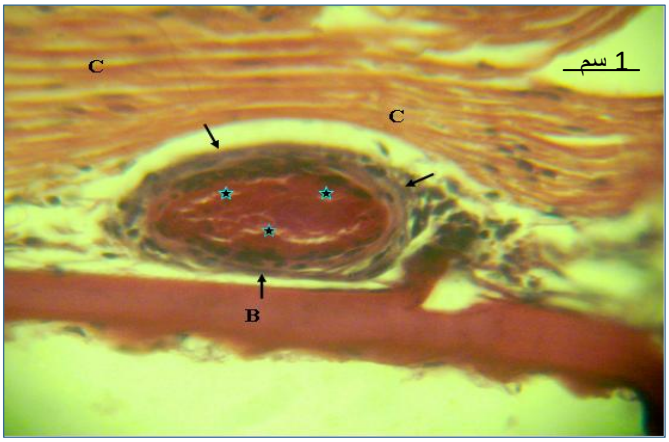
صورة (1): سمكة زينة مصابة بفطر *S.parasitica* السهم يمثل منطقة الإصابة الفطرية.



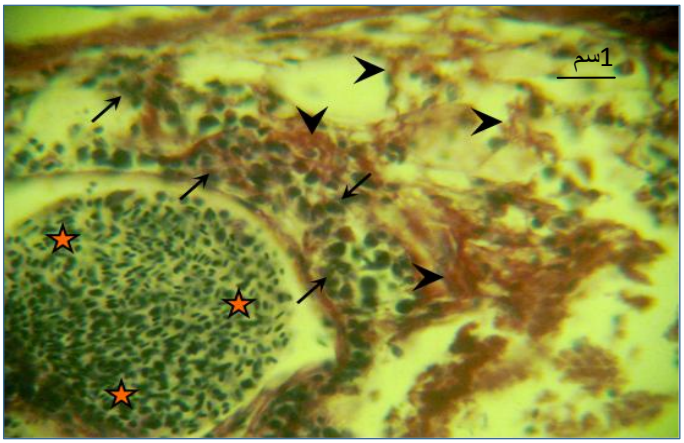
صورة(2): تمثل A : صدفة السمكة وB: نمو الخيوط الفطرية (X 800).



صورة (3): مقطع في جلد سمكة الزينة غير مصابة،لاحظ انطباع الخلايا المخاطية (الأسهم) في البشرة مع صبغة PAS (X 100). ملاحظة: مقياس الرسم للصور (3) هو 1سم

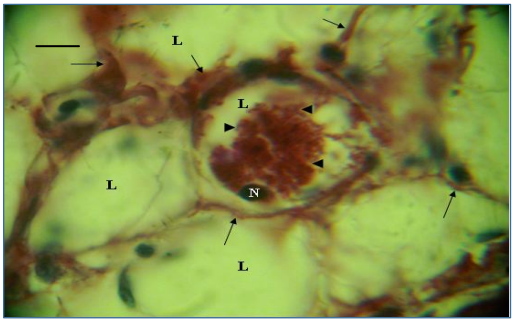


صورة (4): الخيوط الفطرية بشكل كتلة كثيفة (الأنجم) معزولة بمحفظة من نسيج رابط ليفي كثيف.
الأسهم في منطقة الأدمة B = Bone ، C = Collagen fibers (X 100).

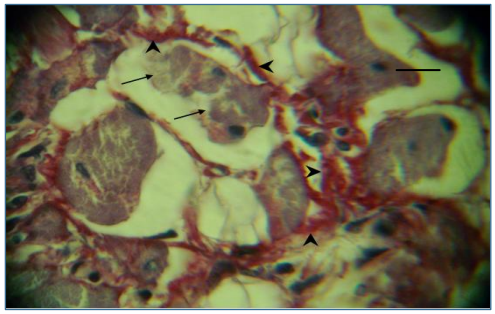


صورة (5): الخيوط الفطرية رأس السهم يمثل المنطقة تحت الأدمة، لاحظ ارتشاح الخلايا الالتهابية (الأسهم) حول الوعاء الدموي المحتقن (الأنجم) (X 100).

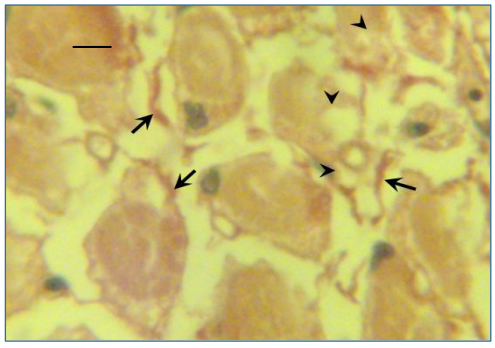
ملاحظة: مقياس الرسم للصور (4، 5) هو 1سم



صورة (6): مقطع في النسيج الدهني في المنطقة تحت الأدمة يوضح الخيوط الفطرية (الأسهم) حول الخلايا الدهنية لاحظ اختراق الفطر لإحدى الخلايا الدهنية ونموه داخلها (رأس السهم). N = Nucleus، L = Lipocyte، (X 100)



صورة (7): تنخر الخلايا العضلية (الأسهم) بعد نمو كثيف للخيوط الفطرية (رأس السهم) ضمن النسيج الرابط للغلاف العضلي الداخلي (X 100).



صورة (8) : الخيوط الفطرية (الأسهم) ضمن النسيج الرابط للغلاف العضلي الداخلي حول الخلايا العضلية لاحظ تنكس الخلايا العضلية (رأس السهم) (X 100).

ملاحظة: مقياس الرسم للصور (6، 7، 8) هو 1سم

المناقشة

الفحوصات المظهرية والنسيجية للاسماك المصابة

كشفت الدراسة الحالية عن تغيرات نسيجية في أسماك الزينة المعرضة للإصابة المختبرية بالفطر *S. parasitica* خلال مدة التجربة، ويمكن أن يعزى ظهور التقرحات الجلدية إلى تحطم ألانسجة الطلائية والناتجة عن الأنزيمات الهاضمة التي يفرزها الفطر ليتمكن من إمتصاص البروتينات والكاربوهيدرات. حيث ذكر Anonymous (2000) ان انواع جنس *Saprolegnia* تحتاج الى بضعة ايام او اسابيع لكي تظهر بقع كبيرة من الاصابات الجلدية، وهذه البقع ناتجة عن فقدان الانسجة الطلائية بسبب متطلبات الفطر الغذائية. كما اشار Fregenda Grandes *et al.* (2000) و Torto - Alalibo *et al.* (2005) و Andersson *et al.* (2006) الى ان ظهور التقرحات الجلدية ناتجة عن النشاط الأيضي الذي تمارسه الفطريات على الأنسجة بإفراز الأنزيمات اللازمة لتحليلها.

اما Fregenda Grandes *et al.* (2001) فقد وجد أن احمرار المناطق المجاورة كان بسبب تمزق الأوعية الدموية بواسطة الخيوط الفطرية التي تنفذ داخل الأنسجة. وان تعرض الأسماك للإصابة بالفطر يكون مرتبطا" مع كمية ماتفرزه الأسماك من مادة المخاطية حيث تزداد فرصة الإصابة بالفطر في حالة نقص إنتاج المخاط من قبل الأسماك والعكس صحيح وهذا يتفق مع النظرية القائلة أن طبقة المخاط في الأسماك هي عبارة عن حاجز كيمياوي فعال (Fregeneda Grandes *et al.*, 2000 و Lategan & Gibson, 2003).

ولوحظ تغيرات سلوكية على الأسماك المصابة بالفطر مختبريا" خلال فترة التجربة في الدراسة الحالية تمثلت بعدم الاستقرار والحركة السريعة ومحاولة الصعود نحو سطح الماء فضلا عن فقدان التوازن وهذا كله حدث قرابة ألايام ألاخيرة قبل الموت، ويعزى هذا إلى تغيرات نسيجية مرضية قد حدثت على الأسماك المصابة. وان موت الاسماك المصابة بالفطريات أو بأي مرض آخر قد يكون ناتجا" عن مشاكل تنافذية او تنفسية ناتجة عن اصابة مساحة واسعة من الجلد أو إصابة كبيرة بالغلاصم (Robert, 2008). وهذا يتفق مع نتائج الدراسة الحالية اذ كانت الاصابة واضحة

على الجلد ولم تكن في الغلاصم لذلك اخذت مقاطع نسيجية بالجلد والعضلات، وان اصابة هاتين المنطقتين غالبا" ما تصاب بالامراض الفطرية لان الاصابة بالفطريات نادرا" ما تصل الى الأعضاء الداخلية للأسماك اذ تحدد دائما بالجلد (منطقة البشرة والادمة) والعضلة السطحية وهذا ما اكده Pickering & Willoughby (1982). وفي الحالات المرضية الحادة جدا قد تخترق الخيوط الفطرية الاعضاء الداخلية لتصل مثلا الى المعدة ولو إنها حالة نادرة (Willoughby, 1994).

اظهرت المقاطع النسيجية في الجلد والعضلات لاسماك الزينة المصابة بالفطر مختبرياً تغيرات مرضية واسعة اثناء التجربة ويمكن ان تعزى التغيرات نسيجية في الجلد الى النشاط الانزيمي للفطر اثناء تغذيته على الانسجة ،فضلا عن الضرر الميكانيكي الناتج عن اختراق الخيوط الفطرية داخل انسجة المضيف. لقد اكد Fregeneda Grandes *et al.* (2001) Lilley & Roberts (1997) ان حالات التنكس في الجلد ناتجة عن انزيمات محللة للبروتين Proteolytic enzymes يفرزها انواع جنس *Saprolegnia* وهي مشابه لعمل انزيم الكيموتربسين Chymotrypsin وان التنكسات ما هي الا تغيرات او اذى حدث في الخلايا قبل موتها وهذا يؤدي الى تغيرات شكلية في الخلايا (Noga *et al.*, 1988 و السلطان ومحمود، 1999).

اما في حالات النزف Hemorrhage المشاهدة في جلد السمكة المصابة فيعود سببها الى خروج الدم من داخل الأوعية الدموية السليمة إلى النسيج أو الى تجاويف الجسم بسبب التنخر الناتج عن اختراق الخيوط الفطرية (Bruno & Wood, 1999 و Canales *et al.*, 2001)، ولوحظ أيضا خلال المقاطع النسيجية للأسماك المصابة بالفطر بأن اختراق الخيوط الفطرية قد وصل الى طبقة النسيج الدهني التي تحت الجلد مسببة تنخر الخلايا الدهنية ليحل الفطر محل الدهن داخل الخلايا وهذا يؤكد قدرة الفطر العالية على افراز انزيمات محللة للدهون ايضا Lipolytic enzymes وتستمر الخيوط الفطرية بالتغلغل الى داخل الجسم لتصل الى طبقة العضلات الهيكلية لتعمل على تنكس وتنخر الخلايا العضلية.

المصـادر

الخطيب، عماد ابو رمان; عاهد، خلود قاسم و المغربي ، نجاة (2001). التحضير النسيجي المجهري. دار اليازوري العلمية للنشر والتوزيع. عمان– الاردن. 286 صفحة.

محيسن، فرحان ضمد (1983). امراض وطفيليات الاسماك. مطبعة جامعة البصرة: 227 صفحة.

السلطان، عماد ابراهيم و محمود، حافظ ابراهيم (1999). علم امراض الحيوان. دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل، 259 صفحة.

Anonymous (2001). Fish fungus *Saprolegnia* http://www.fish doc.co.UK

Andersson, V., Ssecombes, C.J. and Van West, P. (2006). Developing a vaccine against the fish pathogen *Saprolegnia parasitica* in Salmonids. http://www.pmgn.vbi.vt.edu.May

Bruno, D.W. and Wood, B.P. (1999). *Saprolegnia* and other Oomycetes. In: Wood, P.T.K. and Bruno, D.W. (Eds.). Fish diseases and disorders, vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal infections. CAB, Int., Wallingford, Oxon: 599- 659.

Canales , M.L. ; Ortiz , J.B.; Valle, M.G. and Sarasquete, C. (2001). Saprolegniasis in wild fish population. Cienc. Mar, 27: 125 – 137. (Abstract).

Durborow, R.M., Wise, D.J. and Terhune, J.S. (2003).Saprolegniasis (winter fungus)and Branchiomycosis of commercially cultured channel catfish. http:// www. Misstate . edu / dept/ srac.

Emilio, R.S., Jan, H.L., Yasunari, K., Christy, M.S., Theresa, T.C. Angela, K.D. and Heather, P.W. (2007). Pathogenicity studies with the fungi *Aphanomyces invadans* , *Achlya bisexualis* and *Phialemonium dimorphosporum*: Induction of skin ulcer in striped Mullet. Journal of Aquatic Animal Health, 19: 41–48. Copyright by the American Fisheries Society.

Fregeneda Grandes, J.M., Fernandez Diez, M. and Aller Gancedo, J.M. (2000). Ultra structural analysis of *Saprolegnia* secondary zoospore cyst ornamentation from infected wild trout *Salmo trutta* L., and river water indicated two distinct morphotypes amongst long – spined isolates. J. Fish. Dis., 23: 147 – 160.

Fregeneda Grandes, J.M., Fernandez Diez, M. and Aller Gancedo, J.M. (2001). Experimental pathogenicity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (walbaum), of two distinct morphotypes of long–spined *Saprolegnia* isolates obtained from wild brown trout, *Salmo trutta* L., and river water. J. Fish. Dis., 24: 351 – 359.

Humason, G.L. (1972). Animal tissue techniques. 3ed ed; W.H. Freeman Co; San Francesco: 661 pp.

Hussein, M.M.A., Hatai, K. (2002). Pathogenicity of *Saprolegnia* species associated with outbreaks of salmonid Saprolegniasis in Japan. Fish. Sci., 68: 1067–1072.

Hussein, M.M.A., Hatai, K. and Nomura, T. (2001). Saprolegniasis in salmonids and their eggs in Japan J. Wild. Dis., 37: 204–207.

Johnson, J.R., Seymour, R.L. and Padgett, D.E. (2002). Biology and systematics of the Saprolegniaceae. http.//www.ilumina–dlib.org.

Lategan, M.J. and Gibson, L.F. (2003). Antagonistic activity of *Aeromonas* strain A199 against *Saprolegnia sp*., an opportunistic pathogen of the eel, *Anguilla australis* Richardson. J. Fish, Dis., 26: 147 – 153.

Lilley, J.H. and Roberts. R.J. (1997). Pathogenicity and culture studies comparing the *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungus. J. Fish Dis., 20 (2): 135 – 14.

Noga, E.J., Levine, J.F., Dykstra, M.J. and Hawkins, J.H. (1988). Pathology of ulcerative mycosis in Atlantic menhanden, *Brevoortia tyrannas*. Dis. Aqut. Org. 4: 189 – 197.

Pickering, A.D. and Willoughby, L.G. (1982). *Saprolegnia* infection of salmonid fish. In: Roberts, R.J. (Ed) Microbial diseases of fish. Acad. press, London. P 271–297.

Robert, B. Moeller, Jr., DVM (2008). Fungal Diseases of Fish. California Animal Health and Food Safety Laboratory System. Univ. California.

Torto–Alalibo, T., Tian, M., Gajendran, K., Mark, E.W., West, P.V. and Kamoun, S. (2005). Expressed sequence tags from the Oomycetes fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors. http://www.biomedcentral. Com/ 1471 – 2180 / 5146. August.

Willoughby, L.G. (1994). Fungi and fish diseases. Pisces press, Stirling, Scotland. 57 p.

A study on the histological changes in infected gold fish (*Carrassius auratus auratus)* by the parasitic fungus *Saprolegnia parasitica* in vitro

Sana Q. Badr[1] Abdul-Hafiz Al- Duboon[1] Tawfek M. Muhsin[2]

[1]Dept. of Marine Biology, Marine Science Center / Basrah Univ. [2]Dept. of Biology, College of Education / Basrah Univ.

Abstract

The ornamental fish, *Carrassius auratus auratus* was artificially infected by the water mold *Saprolegnia parasitica*. The infected fishes were left in aquariums without treatment until they died for purpose of histological study. Skin and muscle tissues sections have been prepared and stained by PAS. The results showed clear tissue changes represented by erosion and necrosis of the skin epidermis and muscles.

Key words: Saprolegniasis, *Saprolegnia parasitica*, *Carrassius auratus auratus*, Histopathological changes.