

# HEMATOLOGICKÉ UKAZATELE TOLSTOLOBIKA BÍLÉHO (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) CHOVANÉHO V PROSTŘEDÍ VODNÍCH KVĚTŮ SINIC

*Hematological indicators of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) grown in natural populations of cyanobacterial water blooms*

R. KOPP, J. MAREŠ, Z. KUBÍČEK

**Summary:** The aim of the presented work was to evaluate an influence of cyanobacterial water bloom on blood indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). Silver carps, the body mass 15,9-73,4 g, were used in the experiments. The experimental fish were exposed to natural populations of cyanobacterial water blooms (*Microcystis aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* and *M. viridis*). Hematological indices showed changes of fish exposed to the cyanobacterial population in comparison with the control group. The results obtained from these experiments don't always correspond with literature sources. These data pointed to these hematological indicators that fluctuated in large interval. Toxicity and density of cyanobacterial water blooms had important role at individual hematological indices as well.

## Úvod

V důsledku zvyšování eutrofizace vod přibývá masových rozvoju vodních květů sinic v celosvětovém měřítku. Sinice jako nejstarší organizmy s fotosyntézou rostlinného typu uvolňují do svého okolí biologicky aktivní látky, které mohou ovlivňovat růst a vývoj ostatních vodních organismů i fyzikálně chemické vlastnosti vody (Maršálek and Turánek 1996).

Hlavní cestou vstupu biologicky aktivních látek sinic do organismu je gastro-intestinální trakt (Tencalla et al. 1994). Lze tak předpokládat větší zasažení organismu toxinem při vyšší stravitelnosti sinic. Beveridge et al. (1993) zjistil u tolstolobika bílého průkazné rozdíly v příjmu sinice *Microcystis aeruginosa* v závislosti na toxicitě, kdy s rostoucí toxicitou sinicové populace klesalo množství přijatých buněk.

Šesterenko (1979) upozorňuje na výrazné snížení hemoglobinu v krvi a na změny v leukogramu, signalizující příznaky anemie u tolstolobiků živících se výhradně sinicemi. Při intraperitoneální aplikaci čistého microcystinu LR tolstolobiku bílému došlo

k statisticky významnému snížení počtu leukocytů, lymfocytů, hodnot hematokritu, leukokritu, hemoglobinu, celkových bílkovin a výraznému zvýšení hodnot jaterních enzymů (ALT, AST, LDH) (Vajcová 1998, Vajcová et al. 1998).

Po intraperitoneální aplikaci microcystinu LR dochází k indukované nekróze jater, což dokazují signifikantně zvýšené hodnoty enzymů alanin-aminotransferázy (ALT), aspartát-aminotransferázy (AST) a laktát-dehydrogenázy (LDH) (Rabergh et al. 1991; Navrátil et al. 1998).

Při chovu ryb v prostředí s rozptýleným microcystinem se většinou toxický účinek projeví se zpožděním, způsobeným určitou limitací vniku toxinu do zdravých ryb. Toxicita po perorálním podání je přibližně 10krát nižší oproti intraperitoneální aplikaci (Carbis et al. 1996a).

Dlouhodobý vliv sinic s microcystiny v nižších koncentracích je poměrně obtížné detekovat u jednotlivých ryb, ale je vhodné sledovat početnější vzorek populace kapra. Doporučeno je sledování aminotransferáz (ALT, AST), žlučových kyselin, bilirubinu, sodíku a chloridů z krevního séra (Carbis et al. 1996b).

## **Materiál a metodika**

K experimentům byla použita násada tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) z Rybníkářství Pohořelice a.s. Všechny skupiny ryb o kusové hmotnosti 15,9-73,4 g byly umístěny do 1 m<sup>3</sup> kovových klecí. Experimentální ryby byly chovány v prostředí sinic vodního květu (*Microcystis aeruginosa*, *M. ichthyoblabe* a *M. viridis*), ryby kontrolní v prostředí bez sinic s běžnými druhy rozsivek a chlorokokálních řas.

V průběhu pokusů byly sledovány základní fyzikálně-chemické parametry vodního prostředí. Obsah rozpuštěného kyslíku byl u sledovaných skupin v rozsahu 80-255 % nasycení, hodnota pH se pohybovala v rozsahu 7,4-10,5 a teplota vody od 13,8 do 24,7 °C.

Biomasa sinic a řas byla vyjádřena v hodnotách chlorofylu *a* (ISO 10260) a počtem buněk (Bürkerova komůrka).

Rybám byla odebrána krev do heparinizovaných injekčních stříkaček. Množství hemoglobinu (Hb) a hematokrit (PCV), byly stanovovány dle standardních metod (Svobodová a kol. 1986). Ostatní biochemické ukazatele krevní plazmy - albumin (ALB), alkalická fosfatáza (ALP), aspartátaminotransferáza (AST), bilirubin (BIL), amyláza (AMS) alaninaminotransferáza (AST), cholinesteráza (CHS), ultrasenzitivní c-reaktivní protein (CRPus), laktátdehydrogenáza (LD), celkové bílkoviny (TP), glukóza (Glu), močovina (UREA), vápník (Ca), hořčík (Mg), fosfor (P), železo (Fe) a laktát byly

stanovovány pomocí přístroje ADVIA 1650 (Bayer-USA), který pracuje na fotometrickém principu a tvoří otevřený analytický systém.

## Výsledky

Stanovení a správné vyhodnocení hematologických ukazatelů u ryb je značně problematické. Jednotlivé hodnoty jsou silně ovlivněny endogenními a exogenními faktory, a proto není snadné stanovit jejich fyziologické rozmezí, vliv toxických látek apod. Během roku se hodnoty řady parametrů v závislosti na podmínkách prostředí mění, a pokud chceme vysledovat působení dané toxické látky na ryby, nutně potřebujeme i hematologické údaje stejných ryb z prostředí bez daného toxikantu (kontrolní skupina).

Nové přístroje k stanovení hematologických parametrů umožňují v současnosti z minimálního množství odebraného vzorku plazmy stanovit širokou škálu biochemických ukazatelů. Výsledky z těchto přístrojů, běžně používaných v humánní medicíně, však většinou nelze srovnávat s dříve publikovanými údaji dosaženými pomocí ručně zpracovávaných testů.

Cílem našich experimentů bylo sledovat kolísání vybraných hematologických parametrů u ryb v jednotlivých experimentálních skupinách a na základě zjištěných údajů vybrat vhodné ukazatele, které nejlépe odrážejí negativní působení sinic vodního květu. Průměrné, minimální a maximální hodnoty jednotlivých parametrů jsou uvedeny v tabulce.

## Diskuze

Normální fyziologické rozmezí většiny hematologických hodnot pro tolstolobika bílého nebylo dosud publikováno, proto není pro získané údaje srovnání. Ukazatele červeného krevního obrazu (Hb, PCV) se ve srovnání s literárními údaji Golovina and Trombeckij (1989) pohybují na nebo pod dolní hranici fyziologického rozmezí hodnot pro tolstolobika bílého.

Změny hematologických hodnot u tolstolobika po intraperitoneální nebo peranální aplikaci toxinu nebo biomasy sinic sledovali Vajcová (1998) a Vajcová et al. (1998), kdy došlo k statisticky významnému snížení hodnot Hb a TP a zvýšení aktivity jaterních enzymů (ALT, AST, LDH), což se ve srovnání se získanými výsledky ne vždy potvrdilo. Pouze hodnota AST vykazovala nárůst hodnot u všech skupin ryb chovaných v prostředí sinic vodního květu.

Zajímavé jsou výsledky u bilirubinu, kdy námi zjištěné hodnoty se v nejlepším případě pohybovaly na dolní hranici měřitelnosti použité metody a většina hodnot byla pod

0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ . Carbis et al (1996a) doporučuje bilirubin jako perspektivní ukazatel toxického působení sinicových toxinů, kdy po intraperitoneální aplikaci microcystinu dochází k nárůstu hodnot bilirubinu (3-9  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ), kontrolní skupina (0,6-1,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ).

**Tabulka č. 1:** Vybrané hematologické ukazatele krve a krevní plazmy násady tolstolobika bílého. Uvedena je průměrná, minimální a maximální hodnota sledovaného parametru.

Datum		8.7.2003	26.8.2003	1.8.2004	31.8.2004	31.8.2004	8.10.2004	8.10.2004
Skupina	(n = 10)	Tb vstup	Tb sinice	Tb vstup	Tb kontrola	Tb sinice	Tb kontrola	Tb sinice
Sinice	buňky.ml <sup>-1</sup>	-	3.625.000	-	-	1.145.833	-	249.167
Chlorofyl a	$\mu\text{g.l}^{-1}$	-	938,14	-	40,05	451,76	16,02	387,68
PCV	$\text{g.l}^{-1}$	32 27-37	26 20-33	23 17-30	27 22-35	32 28-37	28 22-33	33 28-37
Hb	$\text{g.l}^{-1}$	70 61-79	55 45-66	53 44-68	58 46-73	64 53-77	63 44-80	75 60-87
ALB	$\text{g.l}^{-1}$	5,2 4,2-6,2	4,1 2,7-5,1	4,1 3,2-5,2	5,9 5,1-6,7	6,0 4,8-7,0	6,0 5,0-6,8	6,1 4,8-7,2
ALP	$\mu\text{kat.l}^{-1}$	0,38 0,20-0,65	0,88 0,58-1,13	0,40 0,17-1,60	1,95 0,98-3,65	0,86 0,54-1,40	0,48 0,25-0,74	0,38 0,03-0,60
ALT	$\mu\text{kat.l}^{-1}$	0,55 0,37-1,04	2,26 0,52-4,10	0,45 0,33-0,59	0,98 0,40-1,93	0,69 0,32-1,22	0,54 0,30-1,68	0,35 0,12-0,94
BIL	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,0 0,0-0,0	0,5 0,0-0,9	0,0 0,0-0,0	0,0 0,0-0,0	0,0 0,0-0,0	- -	- -
AMS	$\mu\text{kat.l}^{-1}$	- -	- -	1,74 1,37-2,19	5,41 3,63-9,36	5,30 4,44-6,33	3,24 1,91-3,87	4,53 2,63-10,86
AST	$\mu\text{kat.l}^{-1}$	2,64 0,75-5,83	3,67 1,80-5,71	1,55 0,55-2,55	2,87 1,07-6,93	3,16 1,23-7,12	1,63 0,98-2,45	2,99 1,28-6,89
Ca	$\text{mmol.l}^{-1}$	- -	- -	2,09 1,90-2,23	2,27 2,09-2,43	2,56 2,22-2,86	2,11 1,92-2,32	1,96 1,70-2,40
TP	$\text{g.l}^{-1}$	20,88 17,41-23,94	15,10 12,96-17,12	16,71 13,93-20,59	24,75 20,93-27,65	24,98 22,12-29,29	25,77 21,22-30,24	26,35 21,07-31,21
Glu	$\text{mmol.l}^{-1}$	- -	- -	2,59 1,93-3,43	4,81 3,37-6,37	3,36 2,46-6,77	3,29 2,66-3,90	3,16 2,10-4,09
Mg	$\text{mmol.l}^{-1}$	1,21 0,95-1,47	1,10 0,86-1,51	0,87 0,84-0,94	1,16 1,06-1,29	1,15 1,07-1,28	1,11 0,98-1,23	0,90 0,85-1,01
Laktát	$\text{mmol.l}^{-1}$	- -	- -	3,35 1,36-5,07	4,10 2,03-5,24	5,29 2,28-6,91	5,15 3,40-7,24	4,21 2,51-6,89
LD	$\mu\text{kat.l}^{-1}$	19,33 7,49-36,99	18,51 8,42-34,81	9,39 4,49-14,17	12,19 7,22-16,78	13,17 7,83-16,66	11,77 7,85-15,67	13,52 9,17-16,57
P	$\text{mmol.l}^{-1}$	4,35 3,10-6,52	3,66 2,89-4,38	1,88 1,55-2,37	2,51 2,22-2,74	2,89 2,27-3,27	1,78 1,49-2,00	1,71 1,36-1,90
Fe	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	- -	- -	6,1 3,6-9,1	11,3 6,6-22,0	15,4 11,7-19,3	8,0 3,9-13,0	14,0 9,4-20,1
UREA	$\text{mol.l}^{-1}$	0,24 0,03-0,42	0,58 0,36-0,74	0,54 0,44-0,77	0,61 0,40-0,82	0,70 0,50-1,03	0,25 0,00-0,53	0,25 0,10-0,50
CHS	$\mu\text{kat.l}^{-1}$	21,45 12,50-28,51	46,81 20,95-66,16	15,75 9,08-25,10	84,33 58,70-99,86	82,75 71,74-98,96	43,12 29,37-62,87	66,65 29,67-100,34
CRPus	$\text{mg.l}^{-1}$	- -	- -	0,05 0,02-0,09	0,03 0,01-0,06	0,00 0,00-0,02	0,00 0,00-0,00	0,00 0,00-0,00

Tyto údaje ukazují na poměrně široké kolísání hematologických parametrů a na možné ovlivnění jinými endogenními nebo exogenními faktory, proto je nutno při použití krevní analýzy sledovat početnější vzorky pokusných ryb. U sledovaných hematologických ukazatelů se rovněž nedalo očekávat tak výrazné zvýšení nebo snížení hodnot jako u publikovaných údajů po intraperitoneální nebo peranální aplikaci toxinu nebo biomasy sinic. Důležitou roli při kolísání jednotlivých parametrů hraje rovněž míra toxicity a hustota sinicových populací.

### Poděkování

Výzkum působení sinic vodního květu na tolstolobika bílého je podporováno grantem GAČR 206/02/D031

### Literatura

- BEVERIDGE, M. C. M., BAIRD, D. J., RAHMATULLAH, S. M., LAWTON, L. A., BEATTIE, K. A., CODD, G. A. 1993: Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 43: 901 - 907
- CARBIS, C. R., MITCHELL, G. F., ANDERSON, J. W., McCAULEY, I. (1996a): The effects of microcystins on the serum biochemistry of carp, *Cyprinus carpio* L., when the toxins are administered by gavage, immersion and intraperitoneal routes. *Journal of Fish Diseases*, 19: 151 - 159
- CARBIS, C. R., RAWLIN, G. T., MITCHELL, G. F., ANDERSON, J. W., McCAULEY, I. (1996b): The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*, 19: 199 - 207
- ČSN ISO 10260, 1995: Měření biochemických ukazatelů – Spektrofotometrické stanovení koncentrace chlorofylu-a. Praha, 12 s.
- GOLOVINA, N., A., TROMBICKIJ, I., D. 1989: Gematologija prudovych ryb., Kišiněv, 156 p.
- MARŠÁLEK, B., TURÁNEK, J. 1996: Biologicky aktivní látky produkované sinicemi vodního květu. In: Vodní květy sinic. Ed.: MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V., MARVAN, P. *Nadatio flos - aquae*, Brno, 86 - 100

- NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M., VAJCOVÁ, V. 1998: The Effect of Pure Microcystin LR and Biomass of Blue-green Algae on Blood indices of Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta vet. Brno*, 67, 273-279
- RABERGH, C. M. I., BYLUND, G., ERIKSSON, J. E. 1991: Histopathological effect of microcystin LR a cyclic polypeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic toxicology*, 20, 131-146
- SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., PALAČKOVÁ, J. 1986: Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik VÚRH ve Vodňanech, Vodňany, 36 s.
- ŠESTERENKO, A. E. (1979): Nekotoryje gematologičeskije pokazateli rastitelnojadnych ryb pri skarmlivanii im sinezelenych vodoroslej. *Rybn. choz.*, Kiev, 28: 29 - 33
- TENCALLA, G. F., DIETRICH, R. D., SCHLATTER, CH. (1994): Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 30: 215 - 224
- VAJCOVÁ, V. (1998): Studium vlivu eutrofizace vod na zdravotní stav ryb na základě hodnocení fyziologických ukazatelů a morfologických změn. Vliv cyanotoxinů na zdravotní stav tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.), Disertační práce, VFU Brno
- VAJCOVÁ, V., NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M. (1998): The Effect of Intraperitoneally Applied Pure Microcystin LR on Haematological, Biochemical and Morphological Indices of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta vet. Brno*, 67: 281 - 287

Ing. Radovan **Kopp**, Ph.D., Dr. Ing. Jan **Mareš**

Ústav rybářství a hydrobiologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně,

Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

Prim. RNDr. Zdeněk **Kubíček**

Oddělení klinické biochemie, Nemocnice Třinec, Kaštanová 268, 739 61 Třinec, Česká republika