

ZMĚNY VYBRANÝCH HEMATOLOGICKÝCH UKAZATELŮ TOLSTOLOBIKA BÍLÉHO (*HYPOPHTHALMICHTHYS MOLITRIX* VAL.) POD VLIVEM PŘÍRODNÍCH POPULACÍ VODNÍCH KVĚTŮ SINIC

R. Kopp, J. Heteša

Došlo: 2. června 2000

Abstract

KOPP, R., HETEŠA, J.: *Changes of haematological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) under the influence of natural populations of cyanobacterial water blooms.* Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno), 2000, XLVIII, No. 5, pp.: 35–39

The goal of the presented works was to evaluate an influence of cyanobacterial water bloom (*Microcystis aeruginosa* 90%, *Microcystis ichthyoblabe* 10%) on blood indices of silver carp. 25 individuals of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) with the average body mass 215,4 g were used in the experiments. The experimental fish were exposed in two different concentrations of water bloom (chlorophyll *a* 68 – 82 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and 128 – 164 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

The water bloom population was characterized by three different Microcystins with total concentration 289,3 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ of dry mass.

Haematological examination showed statistically significant changes of blood indices. Values Hb, PCV, BC, ALT, AST and LDH were increased, values MCHC and TP were decreased in comparison to control fish. Statistically significant ($P < 0,05$) were values PCV and BC, statistically highly significant ($P < 0,01$) was ALT activity.

The observations confirmed an influence of cyanobacterial biomass on silver carp. The effect of toxic water bloom populations was manifested by changes of blood plasma indices. Toxins supply here the role of catalyzers enhancing negative influence of toxic high ammonia values.

silver carp, toxins, ammonia, blue-green algae, blood indices

Rod *Microcystis* patří mezi nejdůležitější rody vytvářející sinicové vodní květy. Jde o výhradně planktonní, kokální sinice, obklopené slizem, s řadou druhů produkujících toxické látky (Komárek 1996).

V důsledku zvyšování eutrofizace vod přibývá masových rozvojů vodních květů sinic v celosvětovém měřítku. V Evropě jsou druhy rodu *Microcystis* považovány za nejtoxičtější sinice a nejčastější úhyny ryb, dříve objasňované kyslíkovými deficitem, byly po vyšetření objasněny právě toxiny sinic (Maršálek a Turánek 1996).

Tolstolobik bílý, přes zjevné rozdíly v názorech na jeho schopnost požírat a trávit sinice, nesporně v různé míře sinice konzumuje (Krupauer 1989).

Schopnost tolstolobiků trávit sinice není dokonalá; bylo prokázáno, že mnohé procházejí trávi-

cím traktem živé a na některé má tento proces dokonce stimulující účinek (Adámek 1981). Voros a kol. (1997) zjistili, že sinice se slizovým obalem jsou pro tolstolobika prakticky nestravitelné.

Hlavní cestou vstupu toxinů sinic do organismu je gastro-intestinální trakt (Tencalla a kol. 1994). Lze tak předpokládat větší zasažení organismu toxinem při vyšší stravitelnosti sinic. Beveridge a kol. (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 a kol. 1998).

MATERIÁL A METODIKA

K pokusu (18. 8. – 20. 8. 1998) byla použita jednorletá násada tolstolobika bílého o průměrné hmotnosti $215,4 \pm 34,6$ g v celkovém počtu 25 ryb (20 pokusných a 5 kontrolních ryb). Tolstolobici byli adaptováni 24 hodin před zahájením pokusu v laminátovém bazénu ($0,5 m^3$).

K vlastnímu pozorování byly ryby umístěny do 100 l skleněných nádrží (5 ks/nádrž). Všechny nádrže byly nepřetržitě vzduchovány. Tolstolobici byli chováni v prostředí dvou různých koncentrací přírodní populace vodního květu sinic po dobu 48 hodin. Jako kontrolní sloužila skupina ryb chovaná v odstáté (24 hodin) vodovodní vodě.

Průměrná teplota vody v pokusném období činila $27,3$ °C, průměrné nasycení vody kyslíkem bylo $5,4 mg \cdot l^{-1} O_2$ a pH 7,9. Zvýšené byly hodnoty amoniaku, které se pohybovaly v intervalu $0,02 - 0,54 mg \cdot l^{-1} N-NH_3$.

Biomasa sinic a řas byla vyjádřena v hodnotách chlorofylu *a* (Štěpánek a kol. 1982) a počtem buněk (Bürkerova komůrka). Vodní květ sinic byl analyzován na obsah microcystinů za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Na závěr experimentu byla všem rybám odebrána krev do heparinizovaných injekčních stříkaček. Množství hemoglobinu (Hb), hematokrit (PCV), leukokrit (BC) a střední barevná koncentrace (MCHC) byly stanovovány dle standardních metod (Svobodová a kol. 1986). Aktivita aminotransferáz (ALT, AST) byla stanovena komerčním setem Humanzym UV test (Human, Germany) a aktivita laktát-dehydrogenázy (LDH) za využití setu LDH 105 UV (Lachema Diagnostika, Czech Republic). Ke zjištění koncentrace celkových bílkovin (TP) v krevní plazmě byl použit komerčně vyráběný set Bio-Lachema-Test (Lachema Diagnostika, Czech Republic).

Po odebrání krve byly všechny ryby usmrceny a byla zjišťována přítomnost sinic v trávicím traktu a žaberním aparátu ryb.

Statistické vyhodnocení výsledků (t-test) bylo provedeno za využití programu Microsoft Excel 97.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Statistické zhodnocení vlivu populace sinic na hematologické ukazatele prokázalo významné zvý-

šení ($P < 0,05$) hodnot PCV a BC a velmi významné zvýšení ($P < 0,01$) aktivity ALT. Statisticky nevýznamně zvýšeny byly hodnoty Hb, AST a LDH, ukazatele MCHC a TP byly sníženy ve srovnání s kontrolními rybami.

Normální fyziologické rozmezí hematologických hodnot pro tolstolobika bílého nebylo dosud publikováno, proto není pro získané údaje srovnání. Změny hematologických hodnot u tolstolobika po intraperitoneální nebo peranální aplikaci toxinu nebo biomasy sinic sledovali Vajcová (1998) a Vajcová a kol. (1998), kdy došlo k statisticky významnému snížení hodnot Hb, BC, PCV a TP, což se rozchází se získanými výsledky, kdy mimo hodnot TP bylo zaznamenáno zvýšení hodnot ukazatelů. 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. Stanovení hematologických ukazatelů u ryb rovněž stěžuje vysoká variabilita těchto parametrů, která je výraznější u teplomilných druhů mezi které patří i tolstolobik bílý.

U sledovaných hematologických ukazatelů se nedalo očekávat tak výrazné zvýšení nebo snížení hodnot jako u publikovaných údajů po intraperitoneální aplikaci, ale signifikantní nárůst ALT v prostředí toxické populace sinic byl u tolstolobika zaznamenán již po 48 hod. Tento výsledek se shoduje s literárními údaji, kdy ve všech případech dochází pod toxickým vlivem sinic k signifikantnímu zvýšení hodnot aktivity jaterních enzymů (ALT, AST, LDH), které zaznamenali u kapra Raberg a kol. (1991), Tencalla a kol. (1994), Navrátil a kol. (1998) a u tolstolobika Vajcová a kol. (1998).

Vysoká koncentrace toxického amoniaku zjištěná v pokusech s největší pravděpodobností ovlivnila stanovované hematologické ukazatele. Svobodová a Groch (1971) pozorovali u kapra histopatologické změny hepatopankreatu pod vlivem amoniaku již při koncentracích $0,1-0,33 mg \cdot l^{-1} NH_3$. Falconer (1998) a Falconer a kol. (1994) uvádějí možnost působení toxinů sinic jako co-faktorů umocňujících negativní vliv některých fyzikálně-chemických parametrů (NH_3 , O_2 , pH). Vysoké hodnoty amoniaku byly zjištěny u všech skupin ryb, pokusných i kontrolních. Statisticky signifikantní rozdíly hematologických ukazatelů mezi pokusnými a kontrolními rybami byly zapříčiněny působením microcystinů, které katalyzovaly negativní hodnoty amoniaku.

I: Hematologické ukazatele krve násady tolstolobika bílého

Pokus (1998)		VKS (48 hod.)		Kontrola
chlorofyl <i>a</i> ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	průměr	74,23	145,60	
počet buněk. ml^{-1}	průměr	$3,4 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$	
N-NH ₃ (mg. l^{-1})	min.-max	0,03–0,54	0,02–0,48	0,05–0,48
Hb (g.l^{-1})	průměr	92,50	103,80	89,00
	SD	12,10	17,40	8,37
BC (l.l^{-1})	průměr	0,0060	0,0055	0,0035
	SD	0,0025	0,0028	0,0009
PCV (l.l^{-1})	průměr	0,35	0,39	0,29
	SD	0,05	0,09	0,06
MCHC (l.l^{-1})	průměr	0,27	0,28	0,33
	SD	0,05	0,05	0,08
TP (g.l^{-1})	průměr	31,38	31,05	33,43
	SD	4,50	4,18	7,01
ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	2,74	4,45	1,91
	SD	1,12	1,89	0,48
AST ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	1,45	2,63	1,44
	SD	0,38	1,38	0,78
LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	8,84	19,18	6,94
	SD	2,65	19,15	4,34

VKS - Vodní květ sinic (*Microcystis aeruginosa* 90%, *Microcystis ichthyoblabe* 10 %). Detekovány tři typy microcystinů, Mcyst 1 ($67,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny), Mcyst 2 ($61,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny) a microcystin LR ($161,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny).

Ze získaných výsledků lze konstatovat nezbytnost základního chemického rozboru vod u případných dalších experimentů podobného typu, kdy především stanovení hodnoty amoniakálního dusíku, pH, obsahu rozpuštěného kyslíku a teploty vody by mělo být samozřejmostí.

U dalších pokusů by bylo vhodné upravit metodiku sledování a pokusit se eliminovat vysoké hodnoty toxického amoniaku, a to nejlépe prodloužením doby adaptace ryb před pokusem (minimálně 48 hodin), vyloučením podávání krmiva v průběhu experimentu, používat nádrže o větším objemu vody, popř. snížit počet pokusných ryb v nádrži. Vhodným řešením se rovněž jeví použití

semistatických metod s využitím několika akvárií o stejné koncentraci sinicových buněk a postupným přelovováním pokusných ryb při vzrůstu hodnot amoniaku na nebezpečnou úroveň.

Analýzou trávicího traktu byla zjištěna přítomnost sinic u dvou ryb ze skupiny s nižším množstvím sinic a u čtyřech ryb ze skupiny s vyšší koncentrací sinic. Celkové množství sinic v trávicím traktu bylo malé a nemělo průkazný vliv na hematologické ukazatele ryb. Všichni tolstolobici ze skupiny s vyšší koncentrací sinic měli sinice v žaberním aparátu. Po celou dobu experimentu nebyly u žádné s pokusných nebo kontrolních ryb zjištěny změny v chování lišící se od normálu.

SOUHRN

Cílem práce bylo zjistit vliv přírodní populace sinic (*Microcystis aeruginosa* 90%, *Microcystis ichthyoblabe* 10 %) na změny krevních ukazatelů tolstolobika bílého.

K pokusům byla použita jednoletá násada tolstolobika o průměrné hmotnosti 215,4 g v celkovém počtu 25 kusů. Ryby byly chovány v nádržích při dvou různých koncentracích vodního květu sinic (chlorofyl *a* 68 – 82 $\mu\text{g.l}^{-1}$ a 128 – 164 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Kontrolní ryby u obou pokusů byly chovány v upravené vodovodní vodě. Po 48 hodinách byla rybám kardiopunkcí odebrána krev a stanoveno množství hemoglobinu (Hb), hematokrit (PCV), leukokrit (BC) a výpočtem střední barevná koncentrace (MCHC). V krevní plazmě byla zjišťována aktivity alanin-aminotransferázy (ALT), aspartát-aminotransferázy (AST), laktát-dehydrogenázy (LDH) a koncentrace celkových bílkovin (TP).

Sledovány byly vybrané fyzikálně-chemické parametry. Průměrný obsah rozpuštěného kyslíku za sledované období činil $5,4 \text{ mg.l}^{-1} \text{ O}_2$, průměrná teplota vody $27,3 \text{ }^\circ\text{C}$ a pH 7,9. Zvýšené byly hodnoty amoniaku, které se pohybovaly v intervalu $0,02\text{--}0,54 \text{ mg.l}^{-1} \text{ N-NH}_3$.

Biomasa sinic byla analyzována na obsah hepatotoxinů za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Byly detekovány tři typy microcystinů o celkové koncentraci $289,3 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny.

Hematologické vyšetření prokázalo změny ukazatelů krevního obrazu. Hodnoty Hb, PCV, BC, ALT, AST a LDH byly zvýšené, hodnoty MCHC a TP snižené ve srovnání s kontrolními rybami. Statisticky významně průkazné ($P < 0,05$) byly ukazatele PCV a BC, velmi významně průkazná ($P < 0,01$) byla aktivita ALT.

Experimenty byly výrazně ovlivněny vysokými hodnotami toxického NH_3 , který má prokazatelný vliv na hematologické ukazatele ryb. Tyto vysoké hodnoty amoniaku byly zjištěny u pokusných i kontrolních ryb, lze tedy předpokládat, že signifikantní rozdíly hematologických parametrů byly zapříčiněny spolupůsobením toxinů a amoniaku. Tento předpoklad podporují literární údaje o katalytickém efektu hepatotoxinů, které zvyšují negativní působení fyzikálně-chemických parametrů.

tolstolobik bílý, hepatotoxiny, sinice, vodní květ, hematologie

Děkuji Dr. Ludku Bláhovi z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně za provedení analýz microcystinů.

LITERATURA

- ADÁMEK, Z. 1981: Ověření možnosti omezení rozvoje fytoplanktonu obsádkou tolstolobika bílého (*Hypophthalmichthys molitrix*) ve vztahu k různým podmínkám prostředí. Kandidátská disertační práce, VŠZ Brno
- 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, pp. 901–907
- FALCONER, R., I. 1998: Algal Toxins and Human Health. The Handbook article czech ok of Environmental Chemistry 5 Part C, Berlin Heidelberg
- FALCONER, R., I., BURCH, D., M., STEFFENSEN, A., D., CHOICE, M., COVERDALE, R., O. 1994: Toxicity of the Blue-Green Alga (Cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in Drinking Water to Growing Pigs, as an Animal Model for Human Injury and Risk Assessment. *An International Journal*, 9, pp.131–139
- CHORUS, I., BARTRAM, J. 1999: Toxic Cyanobacteria in Water. London, WHO Monography
- KOMÁREK, J. 1996: Klíč k určování vodních květů sinic v České republice. In: Vodní květy sinic. Ed.: MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V., MARVAN, P. *Nadatio flos - aquae*, Brno, s. 22–85
- KRUPAUER, V. 1989: Býložravé ryby. SZN Praha, 116 s.
- 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, s. 86–100
- MARŠÁLEK, B. 1996: Perzistence a odstranitelnost cyanotoxinů. In: Vodní květy sinic. Ed.: MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V., MARVAN, P. *Nadatio flos - aquae*, Brno, s. 101–114
- 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, s. 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, s. 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
- ŠTĚPÁNEK, M. a kol. 1982: Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví. Avicenum, Praha, 408 s.
- TENCALLA, G. F., DIETRICH, R. D., SCHLATTER, CH. 1994: Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling ra-

- inbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 30, s. 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, s. 281–287
- VOROS, L., OLDAL, I., PRESING, M., VONBALOGH, K. 1997: Size-selective filtration and taxon-specific digestion of plankton algae by silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val). *Hydrobiologia*, Vol 342, pp. 223–228

Adresa

Ing. Radovan Kopp, Ph. D., Prom. biol. Jiří Heteša, CSc., Ústav rybářství a hydrobiologie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 613 00 Brno, Česká republika