

CYANOBAKTERIE A RYBY

Cyanobacteria and fish

M. PALÍKOVÁ, R. KOPP, J. MAREŠ, S. NAVRÁTIL, R. KREJČÍ, L. BLÁHA

Summary: Cyanotoxins can markedly negatively influence early life stages of fish depending on the quantity and kind of cyanobacterial biomass. They increase embryonal and larval mortality and amount of malformed individuals, decrease fry size, cause abnormal behaviour and may damage chromosomes. Chronic exposure of larvae also to lower doses of cyanotoxins exhibits higher death during the following rearing. Dystrophic changes of liver were observed up to older stages of fry, in younger larval stages high mortality and retarded development may be due to increased energy demand of detoxication processes. Histological damage is not evident. By the study of cyanobacterial fractions the most pronounced toxic effects were found at the complex biomass and the crude aqueous extract regardless of microcystin content and permeate fractions of two samples dominated by *Aphanizomenon* sp. and *Planktothrix* sp. The results of the experiments with different oxygen saturation clearly showed important impact of oxygen saturation in water on the extent of cyanobacterial biomass toxicity. Experimentally applied cyanobacteria influence the haematological indices (red blood cells count, activities of enzymes) and act immunosuppressively in higher doses. The modulation of haematologic indices in natural conditions exists and is species-specific. Next, it can be conclude that although the accumulation of microcystins in the fish tissues exists, concentrations of microcystins from monitored localities are low and they do not represent serious health risk to humans in our country. Moreover, microcystins are eliminated within one to two weeks from muscles after the transfer of fish with accumulated toxins to clear water. On the other hand the presence of water bloom may decrease the dietetic value of fish muscle. Composition of the muscle affected by toxic cyanobacteria analyse high species-specific sensitivity of different fish.

Úvod

Výskyt sinic v povrchových vodách se stal v posledních desetiletích celosvětovým problémem. Je to způsobeno stále se zvyšující eutrofizací, resp. hypertrofizací vod související s antropogenní činností. Paralelně se vzrůstajícím rozvojem sinic se začaly objevovat i první práce věnované této problematice, zejména jejich negativním projevům a účinkům.

Na Ústavu veterinární ekologie a ochrany životního prostředí se této problematice věnujeme od roku 1994. Byly prováděny experimentální práce i terénní studie a monitoring. Spektrum prací je zaměřeno na monitorování negativních účinků toxických metabolitů cyanobakterií na ryby a jejich vývojová stádia pomocí histologických, hematologických, biochemických, imunologických a cytogenetických metod. Další práce jsou věnovány

zhodnocení potenciálního rizika pro člověka konzumací rybích produktů s obsahem microcystinů, resp. ovlivněním kvality rybích produktů cyanobakteriemi.

Cílem tohoto příspěvku je shrnout naše dosavadní práce věnované problematice cyanobakterií.

Materiál a metodika

1. Působení na vývojová stádia ryb

Embryonální, případně embryo-larvální testy (Palíková a kol., 2003; Palíková a kol., 2004; Palíková a kol., 2007): do pokusu byly nasazeny jikry kapra obecného (*Cyprinus carpio*) do osmi hodin po oplození a jikry piskoře pruhovaného (*Misgurnus fossilis*) ve stadiu očních bodů. Pokusným skupinám byl přidáván do vody extrakt sinic se známými koncentracemi microcystinů (1,3; 13; 50; 130 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$) nebo cyanobakteriální biomasa a její frakce (vodný cyanobakteriální extrakt, buněčný pelet, permeát – bez microcystinů a eluát – většinou microcystiny) v koncentracích 3, 10, 40, 80 a 120 mg sušiny $\cdot \text{l}^{-1}$. Doba působení byla 96 hodin u piskoře pruhovaného a 8 nebo 30 dnů u kapra obecného. Vybraní kapří jedinci byli po roce vystaveni opakované expozici extraktu sinic (Palíková a kol., 2004) na dobu 48 hodin s kumulativním obsahem microcystinů 13 $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$. Vyhodnocení testů bylo prováděno dle směrnice OECD 210 z r. 1992. Bylo prováděno histologické vyšetření preparátů barvených hematoxylin-eosinem, byly detekovány apoptotické buňky TUNEL testem. Sledovali jsme vliv různé saturace kyslíkem (Palíková a kol., 2007). U piskoře pruhovaného byla rovněž prováděna detekce chromozomálních aberací (Palíková a kol., 2007). U kaprů podrobených opakované expozici jsme prováděli hematologické (ukazatelé červeného a bílého krevního obrazu včetně stanovení fagocytární aktivity pomocí chemiluminiscence, množství celkových bílkovin v krevní plazmě a aktivita jaterních enzymů ALT, LDH a AST) a histologické vyšetření.

2. Působení na hematologické a imunologické parametry

- Násadě kapra obecného a tolstolobika bílého byl intraperitoneálně aplikován microcystin LR v dávce 400 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. hm. Biomasa sinic byla aplikována do střeva perorálně, resp. perianálně v dávkách 3, 300, 600 a 1200 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ž. hm. V krvi byl po 24 a 48 hodinách stanovován celkový počet leukocytů (WBC), leukokrit, diferenciální počet leukocytů, počet sIg⁺ a cytotoxických lymfocytů a fagocytární aktivita. Dále byl stanovován počet erytrocytů (RBC), hematokrit (PCV), hemoglobin (Hb) a výpočtem dále hemoglobin

erytrocytu (MCH), objem erytrocytu (MCV) a střední barevná koncentrace (MCHC). Dále byla zjišťována aktivita alanin-aminotransferázy (ALT), aspartát-aminotransferázy (AST) a laktát-dehydrogenázy (LDH). Bylo zjišťováno množství celkových bílkovin krevní plasmy (TP) (Palíková a kol., 1998; Navrátil a kol., 1998; Vajcová a kol., 1998).

- Experimentální skupiny ryb (kapr obecný, tolstolobik bílý, tilapie nilská) byly vystaveny přírodní populaci cyanobakteriálního vodního květu (zejména *Microcystis aeruginosa* a *M. ichthyoblabe*), jenž obsahoval microcystiny (celková koncentrace 133 - 284 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (DW), koncentrace ve vodě 2,8 – 7,4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ u kapra a u tolstolobika a celková koncentrace 1187 - 1211 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (DW), koncentrace ve vodě 17,4 – 25,4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ u tilapie). Expozice trvala 28 dní, poté byly ryby přeloženy do čisté vody na stejnou dobu. Hodnoty byly porovnávány s hodnotami ryb kontrolních, chovaných v sádce bez sinic (Kopp a kol., accepted; Kopp a kol., 2009; Kopp a kol., accepted).

3. Působení na kvalitu rybích produktů

- U ryb vystavených přírodní populaci cyanobakteriálního vodního květu (kapr obecný, tolstolobik bílý, tilapie nilská) byla rovněž detekována koncentrace microcystinů ve svalovině a v hepatopankreatu a byly stanovovány základní ukazatele chemického složení svaloviny (sušina, obsah proteinů, tuků a popelovin), spektrum aminokyselin (AA) a mastných kyselin (FA). Tyto ryby byly rovněž podrobeny vyplavovacímu experimentu (28 dní) pro zjištění rychlosti depurace microcystinů z tkání (Adamovský a kol., 2007; Mareš a kol., 2008).

- Byly stanovovány koncentrace microcystinů v játrech, případně svalovině různých druhů ryb získaných přímým odlovem z vodárenských nádrží Vír, Mostiště a Plumlov, dále z výlovu rybníka Novoveského. Microcystiny ve tkáních ryb byly stanovovány ELISA metodou nebo kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HPLC-MS).

Výsledky a diskuze

1. Působení na vývojová stadia ryb

Cyanobakterie mohou významně negativně ovlivnit raná vývojová stadia ryb v závislosti na množství a druhu: zvyšují embryonální a larvální mortalitu a množství malformovaných jedinců, snižují velikost plůdku, způsobují poruchy chování a mohou poškodit chromozomy. Nižší koncentrace mohou způsobit zvýšenou mortalitu během následného vývoje při chronickém působení. U plůdku byly zjištěny dystrofické změny jater, u mladších larválních stádií vysoká mortalita a retardovaný vývoj může být způsoben

zvýšenými energetickými výdaji na detoxikační procesy a nejsou patrné histologické změny. Vedle celkové biomasy nejvíce toxickou cyanobakteriální frakcí je surový vodný extrakt nezávisle na obsahu microcystinů. Nejzávažnější účinek byl naopak nalezen u biomas bez dominance *Microcystis* sp. Tato skutečnost může být způsobena buď přítomností neidentifikovaných toxických složek cyanobakteriální biomasy nebo možným synergickým působením mezi různými složkami biomasy. Vysokou mortalitu rovněž způsobila frakce permeát u vzorků s dominancí *Aphanizomenon* sp. a *Planktothrix* sp. Na míru toxicity biomasy sinic byl rovněž prokázán vysoký vliv koncentrace kyslíku ve vodě.

2. Působení na hematologické a imunologické parametry

Experimentálně aplikované cyanobakterie, resp. microcystiny, ovlivňují některé hematologické ukazatele (červený krevní obraz, aktivita jaterních enzymů) a ve vyšších koncentracích působí imunosupresivně (snížení celkového počtu leukocytů – u kaprů toto snížení postihovalo zejména oblast lymfocytární, u tolstolobiků zejména oblast myelocytární). Nejvýraznějšími změnami se projevila aplikace biomasy sinic v nejvyšší dávce, naopak nevýrazné změny byly zaznamenány po aplikaci čistého toxinu. Modulace hematologických ukazatelů v přírodních podmínkách byla prokázána a je druhově specifická. Nejvíce byly přítomností vodního květu ovlivněny hematologické parametry u tolstolobika bílého (viz Tab. č.1).

Tab. č. 1: Ovlivněné hematologické parametry u sledovaných druhů ryb vystavených přírodní populaci vodního květu sinic.

	Signifikantní snížení	Signifikantní zvýšení
Tolstolobik bílý	ALT	Hb, PCV, RBC, WBC, albumin, alkalická fosfatáza, cholesterol, glukóza, TP, kreatinin, laktát, LDH, P, Fe, cholinesteráza
Kapr obecný	Hb, PCV, MCH, MCHC, laktát	Albumin, ALT, bilirubin, Ca, cholesterol, glukóza, P, Fe
Tilapie nilská	Alkalická fosfatáza, urea, bilirubin, kreatinin, laktát	-

3. Působení na kvalitu rybích produktů

Ačkoliv byla prokázána akumulace microcystinů v rybích tkáních, námi zjištěné koncentrace v monitorovaných lokalitách jsou nízké a zdravotní riziko spojené s konzumací ryb je zanedbatelné. Vezmeme-li v úvahu, že většina lidí konzumuje rybu pouze v období vánoc (několik týdnů sádkovanou) ve formě kapřího filetu, pak není toto riziko prakticky

žádné. Navíc, microcystiny jsou z podstatné části velice rychle ze svaloviny vyplaveny. Porovnáme-li koncentrace microcystinů ze stejných lokalit v závislosti na druhu ryby, je patrné, že nejvyšší koncentrace se nacházejí v hepatopankreatu ryb dravých, zejména čeledi okounovitých (okoun říční, candát obecný).

Na druhou stranu, přítomnost vodního květu může negativně ovlivnit dietetickou hodnotu svaloviny. V chemickém složení svaloviny tolstolobika došlo ke zvýšení obsahu vody a snížení obsahu tuku a proteinů. U kapra i tolstolobika došlo ke statisticky významným změnám ve spektru mastných kyselin, což se statisticky odrazilo zejména v poměru n-3/n-6 (snížení u pokusných skupin). Zatímco u kapra vycházely zachycené rozdíly z dynamiky změn obou řad, u tolstolobika se na poklesu poměru podílela pouze řada n-6. Spektrum aminokyselin bylo ovlivněno pouze nepatrně, více u tolstolobika. Účinek cyanobakterií (ačkoliv celkové koncentrace microcystinů byly několikanásobně vyšší) na složení svaloviny tilapie byl pouze malý. To nasvědčuje tomu, že toxický vodní květ sinic často se vyskytující v prostředí produkčních rybníků neovlivňuje dietetickou hodnotu svaloviny tilapie. Ovlivnění složení svaloviny je vysoce druhově specifické a velmi závislé na složení a množství vodního květu.

Závěr

Celkově lze shrnout, že cyanobakterie nejsou hrozbou pro člověka jako konzumenta našich sladkovodních ryb, vzhledem k ohrožení lidského zdraví zůstává v našich podmínkách zejména přímý kontakt, např. při koupání. Stejně tak jsou nebezpečím pro vodní živočichy jak nepřímo tím, že ovlivňují chemizmus vody, tak přímo svými toxickými produkty.

Poděkování

Předložená práce vznikla díky finanční podpoře Výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky MSM 62 15712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin a díky podpoře projektu MZe Národní agentury pro zemědělský výzkum QH 71015.

Literatura

- ADAMOVSKEÝ, O., KOPP, R., HILSCEROVÁ, K., BABICA, P., PALÍKOVÁ, M., PAŠKOVÁ, V., NAVRÁTIL, S., MARŠÁLEK, B., BLÁHA, L. (2007): Microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(12): 2687 - 2693
- KOPP, R., MAREŠ, J., PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., KUBÍČEK, Z., ZIKOVÁ, A., HLÁVKOVÁ, J., BLÁHA, L. (2009): Biochemical parameters of blood plasma and content of microcystins in tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) from hypertrophic pond with cyanobacterial water bloom. *Aquaculture Research* 40: 1683-1693
- KOPP, R., PALÍKOVÁ, M., MAREŠ, J., NAVRÁTIL, S., KUBÍČEK, Z., ZIKOVÁ, A., ŘEZNÍČEK, J. (accepted): Haematological indices are modulated in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) exposed to microcystins produced by cyanobacterial water bloom. *Journal of Fish Diseases*
- KOPP, R., PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., KUBÍČEK, Z., ZIKOVÁ, M., MAREŠ, J. (accepted): Haematological indices are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) exposed to toxic cyanobacterial water bloom. *Acta Veterinaria Brno*
- MAREŠ, J., PALÍKOVÁ, M., KOPP, R., NAVRÁTIL, S., PIKULA, J. (2008): Changes in the nutritional parameters of muscles of the common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) following environmental exposure to cyanobacterial water bloom. *Aquaculture Research* 40:148-156
- PALÍKOVÁ, M., KOVÁŘŮ, F., NAVRÁTIL, S., KUBALA, L., PEŠÁK, S., VAJCOVÁ, V. (1998): The effects of pure Microcystin LR and biomass of blue-green algae on selected immunological indices of carp (*Cyprinus carpio*, L.) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.). *Acta Vet. Brno* 67: 265 – 272
- PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., MARŠÁLEK, B., BLÁHA L. (2003): Toxicity of crude extract of cyanobacteria for embryos and larvae of carp (*Cyprinus carpio* L.) *Acta Veterinaria Brno* 72(3): 437-443
- PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., ŠTĚRBA, F., TICHÝ, F., MARŠÁLEK, B., BLÁHA, L. (2004): Histopathology of carp (*Cyprinus carpio* L.) larva exposed to cyanobacteria extrakt. *Acta Veterinaria Brno* 73: 253-257

- PALÍKOVÁ, M., NAVRÁTIL, S., KREJČÍ, R., ŠTĚRBA, F., TICHÝ, F., KUBALA, L., MARŠÁLEK, B., BLÁHA, L. (2004): Outcomes of repeated exposure of the carp (*Cyprinus carpio* L.) to cyanobacteria extrakt. *Acta veterinaria Brno* 73: 259-265
- PALÍKOVÁ, M., KREJČÍ, R., HILSCHEROVÁ, K., BURÝŠKOVÁ, B., BABICA, P., NAVRÁTIL, S., KOPP, R., BLÁHA, L. (2007): Effects of different oxygen saturation to activity of complex biomass and aqueous crude extract of cyanobacteria during embryonal development in carp (*Cyprinus carpio* L.) *Acta Veterinaria Brno* 76: 291-299
- PALÍKOVÁ, M., KREJČÍ, R., HILSCHEROVÁ, K., BURÝŠKOVÁ, B., BABICA, P., NAVRÁTIL, S., KOPP, R., BLÁHA, L. (2007): Effect of different cyanobacterial biomasses and their fractions with variable microcystin content on embryonal development of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic Toxicology* 81(3): 312 - 318
- PALÍKOVÁ, M., RÁBOVÁ, M., KREJČÍ, R., NAVRÁTIL, S., BLÁHA, L. (2007): Chromosomal aberrations in early embryos of loach fish (*Misgurnus fossilis* L.) exposed to crude cyanobacterial extract and semipurified compound of microcystins. *Acta Veterinaria Brno*, 76: S55 – S60
- 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
- VAJCOVÁ, V., NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M. (1998): The effect of intraperitoneally applied pure Microcystin LR on haematological and morphological indices of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*, Val.). *Acta Vet. Brno* 67: 281 – 287

Adresy autoru:

MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D., Doc. MVDr. Stanislav Navrátil, CSc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: palikovam@vfu.cz; navratils@vfu.cz

Ing. Radovan Kopp, Ph.D., Doc. Ing. Jan Mareš, Ph.D., Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika, e-mail: mares@mendelu.cz; fcela@seznam.cz

Ing. Roman Krejčí, Ph.D. Moravský rybářský svaz, Soběšická 83, 600 00 Brno, Česká republika, e-mail: krejcar@seznam.cz

Doc. Mgr. Luděk Bláha, Ph.D., Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta, RECETOX, Kamenice 3, 62500 Brno, Česká republika, e-mail: ludek.blaha@recetox.muni.cz