

VLIV VYSOKÝCH KONCENTRACÍ VODNÍCH KVĚTŮ SINIC NA ZMĚNY HEMATOLOGICKÝCH PARAMETRŮ PLŮDKU KAPRA OBECNÉHO (*Cyprinus carpio* L.).

Influence of high cyanobacterial water bloom concentrations on changes of haematological indices of juvenile carp (Cyprinus carpio L.).

R. KOPP, J HETEŠA

Summary: The goal of the presented works was to evaluate an influence of cyanobacterial water blooms common in eutrophic reservoirs on blood indices of carp

180 individuals of juvenile carp (*Cyprinus carpio* L.) with the average body mass 36,9 g (1996) and 26,3 g (1997) were used in the experiments. The experimental fish were exposed to 4 different natural populations of cyanobacterial water blooms with the different toxic activity.

Haematological examination showed statistically significant changes in leucocrit (BC), haematocrit (PCV), total protein concentration (TP), alanine aminotransferase activity (ALT), aspartate aminotransferase activity (AST), and lactate dehydrogenase activity (LDH).

The observations confirmed an influence of cyanobacterial biomass on juvenile carp. The effect of toxic water bloom populations was manifested by changes of blood plasma indices.

Úvod

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 a Turánek 1996). V posledních letech patří mezi nejsledovanější působení toxinů sinic na ryby, zkoumají se klinické příznaky otravy toxinem, patologické změny, vliv na ukazatele krevního obrazu.

Hlavní cestou vstupu toxinů do organismu je gastro-intestinální trakt, zatím co přestup toxinů přes kůži nebo žábry je zanedbatelný (Tencalla a kol. 1994). Toxické působení microcystinu LR na kapra po perorální aplikaci se projevovalo apatií a ztrátou reflexů, vyskytovaly se hemoragie v kůži, komoře oční a vnitřních orgánech. Značné poškození bylo zjištěno u ledvin a hepatopankreatu (Navrátil a kol.. 1995, 1996, 1997).

Dobrou reflexi na indukované nekrózy jater u ryb ukazují změny v aktivitě krevní plazmy. Hodnoty alanin-aminotransferázy (ALT), aspartát-aminotransferázy (AST) a laktát-dehydrogenázy (LDH) se po intraperitoneální aplikaci microcystinu LR signifikantně zvyšují (Rabergh a kol. 1991; Navrátil a kol. 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 10 krát nižší oproti intraperitoneální aplikaci (Carbis a kol. 1996a).

Dlouhodobý vliv sinic s microcystiny v nižších koncentracích je poměrně obtížné detekovat u jednotlivých ryb, ale v určité populaci kapra se analýza krevního séra jeví jako vhodná. Doporučeno je sledování aminotransferáz (ALT, AST), žlučových kyselin, bilirubinu, sodíku a chloridů (Carbis a kol. 1996b).

Materiál a metodika

Plůdek kapra, chovaný 48 hod. před zahájením pokusů v laminátových bazénech (0,5m³), byl k vlastním experimentům umístěn do 100 l skleněných nádrží (10 ks/nádrž). Všechny nádrže byly nepřetržitě vzduchovány.

V pokusu A (29. 7. – 5. 8. 1996) bylo použito 100ks kapřího plůdku (90 pokusných, 10 kontrolních ryb) o průměrné hmotnosti 36,9±7,9g. Ryby byly krmeny běžným granulovaným krmivem pro kapra v množství 2% z hmotnosti obsádky. Posledních 48 hod. experimentu nebylo krmení aplikováno. Pokusné ryby byly chovány v různých koncentracích dvou přírodních populací vodních květů sinic po dobu 168 resp. (96) hod.

Teplota vody se v průběhu pokusu pohybovala v rozmezí 22,8 – 26,8 °C, obsah rozpuštěného kyslíku 3,3 – 8,1 mg.l⁻¹ O₂ a pH 7,7 - 8,4.

V pokusu B (12. 8. – 14. 8. 1997) bylo použito 80ks kapřího plůdku (70 pokusných, 10 kontrolních ryb) o průměrné hmotnosti 26,3±7,8g. Pokusné ryby byly chovány v prostředí dvou přírodních populací vodních květů sinic o různé koncentraci buněk po dobu 48 hod bez příkrmování.

Teplota vody během experimentu kolísala mezi 23,7 – 26,9 °C, obsah rozpuštěného kyslíku 4,7 – 10,7 mg.l⁻¹ O₂ a pH 7,7 – 8,5.

Kontrolní ryby u obou pokusů byly chovány v pitné vodě, napuštěné 24 hod. před začátkem sledování.

Biomasa sinic byla vyjadřována v hodnotách chlorofylu *a* (Štěpánek a kol. 1982) a počtem buněk spočítaných v počítací komůrce (Bürker). Všechny populace sinic byly

analyzovány na obsah microcystinů za využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Po ukončení všech pokusů byla rybám kardiopunkcí odebrána krev do heparinizovaných kapilár. Množství hemoglobinu (Hb), hematokrit (PCV), leukokrit (BC) a střední barevná koncentrace (MCHC) byly stanovovány dle standartních metod Svobodová et al. (1986). K zjištění koncentrace celkových bílkovin (TP) v krevní plazmě byl použit komerčně vyráběný set Bio-Lachema-Test (Lachema Diagnostika, Czech Republic). 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).

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

Výsledky

Výsledky hematologických vyšetření jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2.

Tab. 1

Hematologické ukazatele krve kapřího plůdku (pokus A).

Experiment A	(1996)	VKS I. (168 hod.)				VKS II. (96 hod.)				Kontrola
chlorofyl <i>a</i> ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	průměr	16,32	30,21	48,94	65,25	15,47	16,95	27,57	55,34	
Počet buněk.ml ⁻¹	průměr	$5,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$	$2,2 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^6$	$3,6 \cdot 10^6$	
Hb (g.l^{-1})		53,00	52,33	61,00	56,67	48,29	49,71	59,50	54,00	55,17
	SD	6,16	5,34	7,00	8,22	8,12	14,22	1,50	7,70	6,26
BC (l.l^{-1})	průměr	0,0085	0,0080	0,0052	0,0075	0,0092	0,0086	0,0077	0,0080	0,0096
	SD	0,0014	0,0021	0,0003	0,0022	0,0006	0,0007	0,0016	0,0010	0,0015
PCV (l.l^{-1})	průměr	0,23	0,20	0,39	0,29	0,23	0,23	0,27	0,26	0,29
	SD	0,04	0,05	0,01	0,02	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
MCHC (l.l^{-1})	průměr	0,12	0,14	0,10	0,12	0,15	0,14	0,15	0,14	0,12
	SD	0,03	0,05	0,00	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02	0,03
TP (g.l^{-1})	průměr	25,16	26,54	36,56	29,13	22,38	22,49	26,11	22,03	25,76
	SD	4,71	1,21	0,30	1,06	2,53	4,15	2,35	3,67	1,31
ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	1,19	1,05	1,06	0,95	1,69	1,51	1,50	1,08	1,12
	SD	0,76	0,18	0,14	0,41	0,94	0,35	0,40	0,33	0,12
AST ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	4,44	4,76	8,35	4,71	4,15	4,74	8,44	8,66	4,36
	SD	2,60	1,71	1,56	1,10	1,78	1,90	2,85	3,23	1,61
LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	16,37	17,11	36,84	19,72	19,33	17,93	34,47	39,95	17,91
	SD	1,07	1,43	0,00	3,67	5,23	4,79	14,17	14,48	3,64

VKS I. - Vodní květ sinic (*Anabaena flos-aquae* 90% a *Aphanizomenon gracile* 10%).

Přítomnost microcystinů nezjištěna.

VKS II. - Vodní květ sinic (*Microcystis ichthyoblabe* 80% a *Microcystis aeruginosa* 20%).

Detekován microcystin LR ($17,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny).

Statistické zhodnocení vlivu netoxické populace (VKS I) prokázalo ve srovnání s kontrolními hodnotami významné snížení leukokritu (BC) ($P < 0,05$). Hodnoty všech ostatních, statisticky neprůkazných ukazatelů, byly v případě Hb, PCV a ALT nižší, než hodnoty kontrolních ryb, v případě MCHC, TP, AST a LDH vyšší. Ukazatele červeného krevního obrazu a celkových plazmatických proteinů (TP) se pohybovaly na dolní hranici variačního rozpětí normálních hodnot pro kapra nebo mírně pod touto hranicí. Aktivita enzymů krevní plazmy byla ve srovnání s normálními hodnotami vyšší.

Působení toxické populace sinic (VKS II) vykazovalo statisticky signifikantní změny u hodnot PCV, TP, ALT, AST ($P < 0,05$) a LDH ($P < 0,01$) ve srovnání s kontrolními rybami. Ukazatele PCV a TP byly sníženy a aktivita enzymů krevní plazmy zvýšena. Neprůkazné bylo snížení hodnot BC a zvýšení Hb a MCHC. Srovnání dosažených hematologických údajů populace sinic (VKS II) s variačním rozpětím normálních hodnot pro kapra je stejné jako u předchozí populace sinic (VKS I).

Tab. 2

Hematologické ukazatele krve kapřího plůdku (pokus B).

Experiment B (1997)		VKS III. (48 hod.)			VKS IV. (48 hod.)			Kontrola
chlorofyl a ($\mu\text{g.l}^{-1}$)	průměr	41,79	56,73	87,70	57,77	70,40	131,83	
počet buněk.ml ⁻¹	průměr	$5,3 \cdot 10^4$	$6,0 \cdot 10^4$	$7,9 \cdot 10^4$	$1,8 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^7$	
Hb (g.l^{-1})	průměr	62,67	59,40	69,67	62,00	66,40	57,50	57,57
	SD	4,96	5,20	5,68	6,96	2,87	6,60	8,57
TP (g.l^{-1})	průměr	24,65	24,22	22,07	23,88	23,30	24,20	25,50
	SD	2,76	1,10	1,15	1,65	3,13	2,36	1,20
ALT ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	2,73	1,96	2,78	2,28	2,38	2,50	1,51
	SD	0,64	0,76	1,24	0,33	0,49	0,52	0,55
AST ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	6,51	12,19	12,77	9,77	6,33	6,66	6,65
	SD	1,77	6,76	4,74	1,79	1,79	2,80	1,64
LDH ($\mu\text{kat.l}^{-1}$)	průměr	30,08	43,16	60,68	40,12	30,42	33,04	28,89
	SD	5,44	25,17	39,43	6,71	12,17	10,98	5,13

VKS III. - Vodní květ sinic (*Anabaena flos-aque* 100%). Detekovány dva typy microcystinů, microcystin LR neprokázán. Mcyst 1 ($3,22 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny), Mcyst 2 ($48,80 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny).

VKS IV. - Vodní květ sinic (*Microcystis ichthyoblabe* 40%, *Microcystis aeruginosa* 30% a *Anabaena flos-aque* 30%). Detekovány tři typy microcystinů, Mcyst 1 ($34,48 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny), Mcyst 2 ($82,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny) a microcystin LR ($77,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ sušiny).

Obě sledované populace sinic v pokusu B obsahovaly toxiny, které ovlivnily především ukazatele krevní plazmy. Statisticky průkazné rozdíly ve srovnání s kontrolními rybami byly zjištěny u hodnot TP ($P < 0,05$) a ALT ($P < 0,01$). U monokulturní populace sinic (VKS III.) bylo navíc prokázáno i statisticky významné zvýšení aktivity AST ($P < 0,05$). Hodnoty Hb a TP byly nižší ve srovnání s kontrolními hodnotami a pohybovaly se na dolní hranici variačního rozpětí normálních hodnot pro kapra. Aktivita AST, ALT a LDH u všech sledovaných skupin byla zvýšená a pohybovala se nad hranicí variačního rozpětí normálních hodnot.

Diskuze

Výsledky hematologických parametrů korespondují s publikovanými údaji jiných autorů zabývajících se touto problematikou. Většina rozdílů je způsobena rozdílným způsobem podání toxinu nebo biomasy sinic a různým fyziologickým stavem populace sinic vodního květu.

Po intraperitoneální aplikaci toxinu začínají hodnoty enzymů krevní plazmy (ALT, AST a LDH) stoupat již po 2 hodinách jako důsledek nekrózy jaterních buněk (Rabergh a kol. 1991). Tencalla a kol. (1994) zjistila již po 48 až 78 hodinách pokles jejich aktivity, jenž je možno vysvětlit faktem, že v důsledku protržení většiny hepatocytů se již enzymy nemohou uvolňovat do krevního řečiště. Carbis a kol. (1996b) uvádějí zpoždění projevu toxického účinku při chovu ryb ve vodě s rozptýleným microcystinem, což odpovídá dosaženým výsledkům v pokusu A, kdy obě populace sinic postupně odumíraly a vliv microcystinu LR u populace sinic (VKS II) byl zaznamenán ve zvýšené aktivitě enzymů ještě po 96 hodinách.

Toxiny sinic jsou látky sekundárního metabolismu, tedy látky, které sinice nemohou aktivně vylučovat do okolního prostředí, kam se dostanou až po rozkladu buněčné stěny (Maršálek a Turánek 1996). Kapr, který přijímá sinice v potravě pouze výjimečně a jehož pH trávicího traktu je mírně zásadité, není schopen svými trávicími enzymy rozložit sinicový slizový obal, k jehož účinnějšímu rozkladu je nutné kyselé prostředí. Největší nebezpečí tak rybám hrozí v pozdním stádiu populace sinic, kdy je obal částečně rozložen a sinice jsou tak stravitelnější (Carbis a kol. 1997).

Tato zjištění objasňují výsledky v pokusu B, kde bylo dosaženo průkaznějších hodnot u populace sinic s nižším obsahem toxinů (VKS III), která ale byla ve stadiu odumírání buněk, proti populaci s vyšším obsahem toxinů (VKS IV), kde docházelo k nárůstu biomasy sinic v průběhu pokusu a počet lyzujících buněk byl malý.

Navrátil a kol. (1998) zjistil statisticky průkazné změny u hodnot PCV a Hb po perorální aplikaci biomasy sinic o známém obsahu microcystinu LR. Hodnocení ukazatelů červeného krevního obrazu je obtížné především pro značné ovlivnění endogenními a exogenními faktory. Signifikantní rozdíly u leukokritu netoxické populace (VKS I) ve srovnání s kontrolními hodnotami je proto nutno posuzovat obezřetně.

Jako lepší indikátory se jeví ukazatele krevní plazmy. Nejčastěji jsou u ryb sledované jaterní enzymy (ALT, AST a LDH), které ukazují dobrou reflexi na indukované nekrózy jater (Raberg a kol. 1991; Tencalla a kol. 1994; Navrátil a kol. 1998). Tyto údaje potvrzují i výsledky obou pokusu A a B.

Diskutabilní je statisticky průkazné snížení hodnot celkových bílkovin u všech sledovaných toxických populací sinic. Carbis a kol. (1996b) nezjistili průkazné rozdíly v hodnotách TP u kapra pod vlivem microcystinů z přírodního prostředí. Naopak, Navrátil a kol. (1998) u kapra a Vajcová a kol. (1998) u tolstolobika bílého zjistili vysoce průkazné snížení plazmatických proteinů po intraperitoneální aplikaci čistého microcystinu LR.

Provedené pokusy s plůdkem kapra chovaným v prostředí různých populací vodního květu sinic ukázaly ovlivnění hematologických ukazatelů i bez přímé aplikace biomasy sinic nebo čistých toxinů rybám.

Literatura

- CARBIS, C. R., MITCHELL, G. F., ANDERSON, J. W., McCAULEY, I. 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*, 1996a, 19, p.151-159
- CARBIS, C. R., RAWLIN, G. T., MITCHELL, G. F., ANDERSON, J. W., McCAULEY, I. The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*, 1996b, 19, p.199-207
- CARBIS, C. R., RAWLIN, G. T., GRANT, P., MITCHELL, G. F., ANDERSON, J. W., McCAULEY, I. A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases*, 1997, 20, p. 81–91
- MARŠÁLEK, B., TURÁNEK, J. Biologicky aktivní látky produkované sinicemi vodního květu. In: *Vodní květy sinic*. Ed.: MARŠÁLEK, B., KERŠNER, V., MARVAN, P. Nadatio flos - aquae, Brno, 1996, s. 86-100

- NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M., VAJCOVÁ, V. Studium vlivu toxinů produkovaných sinicemi na zdravotní stav ryb. Závěrečná zpráva institucionálního výzkumu děkana FVHE VFU Brno, 1995, 62 s.
- NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M., VAJCOVÁ, V., ŠTĚRBA, F., TICHÝ, F. Vliv toxinů sinic na kapří násadu po perorální aplikaci. In: Sborník referátů z II. české ichtyologické konference. VÚRH JU se sídlem ve Vodňanech, Vodňany, 1996, s. 56-62
- NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M., VAJCOVÁ, V., TICHÝ, F., ŠTĚRBA, F., MARŠÁLEK, B., NEČA, J. Současné vědomosti o působení cyanotoxinů na ryby. In: Sborník z konference „Ochrana zdraví ryb“. Vodňany, 1997, s. 166–171
- NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M., VAJCOVÁ, V. The Effect of Pure Microcystin LR and Biomass of Blue-green Algae on Blood indices of Carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta vet. Brno*, 1998, 67, p. 273-279
- RABERGH, C. M. I., BYLUND, G., ERIKSSON, J. E. Histopathological effect of microcystin LR a cyclic polypeptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquatic toxicology*, 1991, 20, p. 131-146
- SVOBODOVÁ, Z., PRAVDA, D., PALAČKOVÁ, J. Jednotné metody hematologického vyšetřování ryb. Edice metodik VÚRH ve Vodňanech, Vodňany, 1986, 36 s.
- ŠTĚPÁNEK, M. a kol. Biologické metody vyšetřování vod ve zdravotnictví. Avicenum, Praha, 1982, 408 s.
- TENCALLA, G. F., DIETRICH, R. D., SCHLATTER, CH. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin to yearling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 1994, 30, p. 215–224
- VAJCOVÁ, V., NAVRÁTIL, S., PALÍKOVÁ, M. The Effect of Intraperitoneally Applied Pure Microcystin LR on Haematological, Biochemical and Morphological Indices of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.). *Acta vet. Brno*, 1998, 67, p. 281-287

Ing. Radovan Kopp, MZLU Brno, Ústav rybářství a hydrobiologie,
 Nejdecká 600, 691 44 Lednice, Česká republika
 Prom. biol. Jiří Heteša Csc.,
 sídl. Osvobození 578, 691 44 Lednice, Česká republika