



ВЛИЯНИЕ НА МЕД ВЪРХУ ДИХАТЕЛНИ И ХЕМАТОЛОГИЧНИ ПОКАЗАТЕЛИ НА КАРАКУДА (*Carassius gibelio*)

*Веселина С. Добрева**, *Атанас Д. Арnaudов**, *Илиана Г. Велчева***,
*Ангел Г. Цеков***, *Богдан Н. Николов***

*Пловдивски университет „Паисий Хилендарски“,
Факултет по Биология, Катедра „Анатомия и физиология на човека“*,
Катедра „Екология и ООС“, ул. „Цар Асен“ 24, 4000 Пловдив
E-mail: arnaudov@uni-plovdiv, anivel@abv.bg, a_tsekov@abv.bg,
nikolov81bg@yahoo.com*

Abstract: The current study analyzes the pathological changes in the tissues, as well as the oxygen deficit in the Prussian carp (*Carassius gibelio*), treated with different concentrations of heavy metals. The experiments are carried out in laboratory conditions with crescent concentrations of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. We observed an average 30 – 45 % decrease in the breathing intensity corresponding to the concentrations. Changes in the hemoglobin and the haematocrit in the studied organisms were also recorded.

Key words: aquatic toxicology, hematology, heavy metals, oxygen deficit, Prussian carp.

ВЪВЕДЕНИЕ

При проследяване на сублеталните хронични концентрации на тежки метали се провеждат наблюдения върху настъпващите промени в някои структури и процеси в хидробионтите. Това е свързано с ранната диагностика на патологичните изменения, което позволява използването на определени групи хидробионти в това число и риби, като тест-обекти за определяне степента на замърсяване на водните екосистеми с тежки метали.

Влиянието на тежките метали върху рибите е свързано с нарушаване на биохимичните и физиологичните процеси в организма (АНГЕЛОВ *и др.*, 1993; HOLLIS *et al.*, 1999; VILELLA *et al.*, 1999; LIONETTO *et al.*, 2000; TYAGI & SRIVASTAVA, 2005; FERNANDES *et al.*, 2007; GIODA *et al.*, 2007;) при наблюдения на отравяния с амоняк и тежки метали установяват увеличаване и усилен разпад на еритроцити в периферната кръв. Намаляване на дихателната активност на сребриста каракуда под действието на различни концентрации цинк се посочва в проучване на DOBREVA *et al.* (2008). Промени във

физиологични процеси в организма на хидробионти и риби под влияние на тежки метали установяват VELCHEVA *et al.* (2006) и ТОМОВА *et al.* (2007).

Целта на настоящата работа е да установим настъпващите промени в дихателна активност и хематологични показатели на кръвта на *Carassius gibelio* под влияние на различни концентрации мед, с оглед прилагането им за целите на биомониторинга.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Експериментът е проведен с мед в периода от 22.02 до 25.02. 2008 година. Преди него извършихме изследване на интензивност на дишане по методиката на СТРОГАНОВ (1962), като заложихме 5 броя рибки (190 гр.) във вана с обем 25 l при температура на водата 15,7 °C и O₂ съдържание 10,2 mg/l – (255,1 mg общо).

За целта работихме със следната поредица от нарастващи концентрации на меден сулфат (CuSO₄.5H₂O):

- №1 – 0,1 mg/l
- №2 – 1 mg/l
- №3 – 2 mg/l

За контрола използвахме също дехлорирана чешмяна вода.

Във всеки аквариум поставихме по 10 индивида от опитните риби от вида *Carassius gibelio*. Опитните индивиди бяха без външни патологични промени и от еднаква размерно – възрастова група. По време на експеримента рибите не бяха хранени. Продължителността на опита за всяка концентрация бе 96 часа. В хода на експеримента се следяха поведенчески реакции на опитните животни и показателите – кислород и температура за всяка една от опитните концентрации.

След 96 часа преустановихме третирането. Бяха взети кръвни проби чрез сърдечна пункция за хематологично изследване. За възпирането на хемокоагулацията използвахме EDTA, в крайна концентрация 0,5%. Изследвани бяха следните кръвни показатели:

- съдържание на хемоглобин – по цианхемоглобиновия метод
- определяне на хематокрита – чрез центрофугиране на кръвта в капилярни тръбички

Хематологичните изследвания бяха извършени по методики, описани от ПЕНЕВ & ДУКОВА-ПЕНЕВА (2007).

След опита заложихме експеримент за изследване на интензивността на дишане на рибата. В съдове с чешмяна вода поставихме индивиди от опитните концентрации. Рибите от различните концентрации бяха маркирани. С оксиметър измерихме кислородното съдържание на водата в началото на опита. Съдовете бяха покрити плътно. Продължителността на опита бе 60 минути. В края на опита отново отчетохме кислородното съдържание и изчислихме усвояния кислород (ЦЕКОВ, 1989; ЦЕКОВ & КОВАЧЕВА, 1991).

След изследване интензивността на дишане заложихме експеримент за устойчивост на кислороден дефицит при следната постановка: във вана с обем

25 l, t – 17,9°C и O₂ – 8,3 mg/l. поставихме индивиди от всички опитни концентрации и от контролата . Продължителността на опита беше 120 минути.

Същата методика приложихме за изследване влиянието на мед, при 96 часов експеримент, проведен от 22.02 до 25.02.2008 година.

Интензивността на дишане на рибата определихме по формулата :

$$I = \frac{Q_2}{G}$$

където:

I – интензивност на дишане (количество кислород в mg/g тегло за 1 час);

G – теглото на рибата в грамове;

Q₂ – общо изразходвано количество кислород по време на експеримента (разликата между количеството на кислорода във ваната преди и след експеримента $Q_2 = Q - Q_{1час}$).

Получените резултати от хематологичното изследване обработихме вариационно-статически по методики, описани от СЕПЕТЛИЕВ (1972). За достоверни разлики между сравняваните резултати приемахме тези при степен на достоверност $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В хода на експеримента бяха спазвани еднакви физични параметри на водата в контролния аквариум и в опитните такива. Температурата бе поддържана в рамките 20–21°C, рН – 7 до 7,5 и твърдост 9,5 dH (Таблица 1):

Таблица 1. Физични показатели на водата

Параметри	Контрола	Опит
Температура	20°C	20–21°C
рН	7	7 – 7.5
Твърдост	9.5 dH	9.5 dH

Един ден след залагане на експеримента в аквариума с концентрация №3 установихме 1 бр. умряла от малките рибки. По-късно от същата концентрация отпадна още 1 бр. До края на експеримента от тази концентрация отпаднаха общо 11 бр. от малките и всички 4 бр. от големите рибки. При останалите концентрации нямаше отпаднали.

Наблюдавахме различна по степен замътненост (намалена прозрачност) на водата при различните концентрации мед, дължаща се на отделена слуз от рибата .Най-голяма прозрачността беше при контролата и при концентрация 0,1 mg/l, а най-малка – при 2 mg/l. Влиянието на медта върху отделянето на слуз от рибките (като стресова реакция) има отрицателно значение и поради факта, че

рибките, на които тялото е освободено от слуз, след това по-лесно могат да бъдат подложени на бактериално и гъбно заразяване. Наблюдавахме още масово опадване на люспи.

Резултатите от изследването на интензивността на дишане след експеримента с мед са представени в Таблица 2

Таблица 2. Интензивност на дишане след експеримента с мед

КОНЦ. CuSO ₄ mg/l	ОБЩО ТЕГЛО НА РИБАТА	O ₂ -начало t=21,9	O ₂ -край t=22,5	УСВОЕН O ₂ (O ₂ нач. – O ₂ край)
контрола	39g	7,3 mg/l 36,5 mgO ₂	4,7 mg/l 23,5 mgO ₂	13 mgO ₂ 0,333mg/g. тегло
0,1 mg/l	46g	7,3 mg/l 39,01 mgO ₂	5,0 mg/l 26,5 mgO ₂	12,5 mgO ₂ 0,272mg/g. Тегло
1 mg/l	44,1g	7,3 mg/l 38,7 mgO ₂	5,2 mg/l 27,6 mgO ₂	11,1 mgO ₂ 0,252mg/g. Тегло
2 mg/l	27g	7,3 mg/l 47,4 mgO ₂	6,3 mg/l 41,0 mgO ₂	6,4 mgO ₂ 0,237mg/g. тегло

Получените резултати от изследване на интензивността на дишане след проведения експеримент показват, че след 96 часово въздействие рибите от всички концентрации мед са с по-слаба интензивност на дишане (по-ниски стойности на усвояния кислород) – **0,237 – 0,272 mg/g. тегло** за 1 час, в сравнение с контролните – **0,333 mg/g. тегло** за 1 час.

Резултати от експеримента за устойчивост на кислороден дефицит.

В началото на експеримента кислородът беше 6,7 mg/l; t – 22°C. Един час по-късно кислорода спадна до 1,5 mg/l; след още 2 часа – под 0,6 mg/l. В края на експеримента кислородът беше под 0,4 mg/l, т.е 16,6 пъти по-малко в сравнение с установеният кислород в началото на опита.

При кислород 0,6 mg/l индивидите от конц. №2 и №3 започнаха да извършват реактивни (стрелкаци) движения и да полягат на една страна. Дихателните им движения (отваряне на хрилните капаци) намаляха. Останалата риба стоеше в горния слой на водата – под полиетилен, като се блъскаше с него. Отделни екземпляри падаха към дъното на ваната, като все още извършваха дихателни движения.

Резултатите от изследване на устойчивостта на рибките от различните концентрации на кислороден дефицит са отразени в Таблица 3

Таблица 3. Устойчивост на *Carassius gibelio* на кислороден дефицит при различни концентрации мед

КОНЦ. CuSO ₄ mg/l	ОТПАДНАЛИ – %	
	НАЧАЛО	КРАЙ
Контрола	0	0
0,1 mg/l	0	0
1.0 mg/l	0	54,5 %
2.0 mg/l	0	75 %

От таблицата става ясно, че влиянието на концентрации 1,0 и 2,0 mg/l мед е силно негативно върху дихателните процеси в организма на рибите. При тях установихме 54,5 и 75 % отпаднали (с летален изход) в сравнение с контролата, където % е равен на 0.

Резултатите от хематологичните изследвания са представени в Таблицы 4 и 5.

Таблица 4. Хематокрит на кръвта на *Carassius gibelio*

Концентрации CuSO ₄ mg/l	Контрола	0.1 mg/l	1.0 mg/l	2.0 mg/l
Хематокрит ht	0.230±0.001	0.195±0.02***	0.105±0.04***	0.224 ±0.03

* – P<0.05, ** – P<0.01, *** – P<0.001

При по-ниските концентрации мед количеството му намалява достоверно, а при най-високата концентрация хематокрита се повишава и е сравним с този на контролната група .

Таблица 5. Хемоглобин в кръвта на *Carassius gibelio*

Концентрации CuSO ₄ mg/l	Контрола	0.1 mg/l	1.0 mg/l	2.0 mg/l
Хемоглобин mmol/l	4.874±0.85	3.495±0.82**	2.479±1.19***	2.011±0.5***

* – P<0.05, ** – P<0.01, *** – P<0.001

Получените резултати за промените в количеството хемоглобин под влияние на нарастващи концентрации мед напълно съвпадат с установените

тенденции за влияние на цинк. Под действието на нарастващи концентрации мед, количеството на хемоглобина в кръвта на опитните риби достоверно намалява при всички концентрации ($p < 0.001$). При най-високата концентрация цинк – 2.0 mg/l той е приблизително 2 пъти по-нисък от този в контролата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение можем да отбележим, че влиянието на мед в сублетални концентрации предизвиква негативни промени в организма на *Carassius gibelio*. Те са свързани със затрудняване на дихателните процеси, породено от нарушаване на достъпа на кислород в организма. Настъпващата поради това асфикция в организма се компенсира с усилено отделяне на слюз и промени в хематологичните показатели на кръвта, която най-бързо включва компенсаторни механизми в действие. Тези механизми са свързани с увеличаване на хематокрита, които е показател за активна хемопоеза, но на млади, непълни с хемоглобин клетки. Потвърждение на това становище е установеното от нас достоверно намаляване на хемоглобина с увеличаване на количествата на цинк и мед. Също така се наблюдават и промени в поведенческите реакции на *Carassius gibelio* във вода с нарастващи концентрации на мед. Концентрациите на мед (0,1 mg/l; 1,0 mg/l и 2,0 mg/l), въпреки че не са летални, предизвикват нарушения в интензивността на дишане на *Carassius gibelio*, като снижават разхода на кислород с 31 до 48 %. Всички индивиди от *Carassius gibelio*, третирани с мед, показват по-ниска устойчивост на Установява се намаляване на хемоглобина в кръвта на *Carassius gibelio* под въздействието на нарастващи концентрации мед.

Установяват се промени в хематокрита на кръвта на *Carassius gibelio* след въздействие на мед, като с повишаването на концентрациите на тежките метали той се увеличава.

Установените от нас изменения в дихателната активност и хемоглобина в кръвта на *Carassius gibelio* дават възможност този широко разпространен вид, считан за устойчив на ксенобиотици, да се посочи като възможен за използване за целите на биомониторинга в замърсени водни екосистеми за установяване наличието на цинк и мед в тях.кислороден дефицит в сравнение с контролните. Отпада при опитите е 54,5 до 75%.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящото проучване е финансирано от НПД – ПУ „Паисий Хилендарски“, Договор 07Б11 и 07Б59.

ЛИТЕРАТУРА

АНГЕЛОВ А., Р. АТАНАСОВА, В. ЖЕЛЯЗКОВА. 1993. Влияние на параквата, метадиона и медния сулфат върху някои биохимични показатели при шарана (*Cyprinus carpio* L.). – Ветеринарномедицински науки, XXVII, 3: 78-86.

ПЕНЕВ М., П. ДУКОВА–ПЕНЕВА. 2007. Лабораторна хематология, АРТИК – 2001, 649 с.

СЕПЕТЛИЕВ Д. 1972. Медицинска статистика, София, изд. Медицина и физкултура: 195с.

ЦЕКОВ А. 1989. Изследвания върху трансфериновия полиморфизъм при шарана и устойчивостта му на кислороден дефицит. – Генетика и селекция, 22(6): 517-522.

ЦЕКОВ А., Н. КОВАЧЕВА. 1991. Ресурсосберегающая эффективность селекционно – качественного и физиологически полноценного посадочного материала карпа. Сборник научных трудов МСХА: 57 – 60.

DOBREVA V., A. TSEKOV, I. VELCHEVA. 2008. Study of the effect of Zink on gill functions of the crucian carp *Carassius gibelio* Bloch. – Bulgarian Journal of Agricultural Science, 14 (2): 182-185.

FERNANDES C., S. MONTEIRO, M. SALGADO. 2007. Histopathological gill changes in wild leaping grey mullet (*Liza saliens*) from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. – Environ Toxicol. 22: 443-448.

GIODA C. R., LISSNER L. A., PRETTO A., DA ROCHA J. B., SCHETINGER M. R., NETO J. R., MORSCH V. M., LORO V. L., 2007. Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. Federal University of Santa Maria, Brazil, – Chemosphere, 69(1): 170-175.

HOLLIS L., J. MCGEER, C. McDONALD, WOOD. 1990. Cadmium accumulation and physiological effect during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout – Aquat. Tox., 46: 101-119.

LIONETTO M., M. MAFFIA, M. CAPPELLO, M. GIORDANO, C. STORELLI, T. SCHETTINO. 1988. Effect of cadmium on carbonic anhydrase and Na⁺ – K⁺ – ATPase in eel, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. – Comp. Biochem. and Physiol. – Part A : Molecular and Int. Physiol., 120(1): 89-91.

ТОМОВА Е., А. АРНАУДОВ, И. ВЕЛЧЕВА. 2007. Morphophysiological Alterations in Erythrocytes and Spleen of *Carassius auratus gibelio* under the Influence of Zinc – Journal of Biology, in press

TYAGY A., N. SRIVASTAVA. 2005. Haematological response of fish *Channa punctatus* (Bloch) to chronic zinc exposure. – Journal of Environmental Biology, 26: 429-432.

VIELLA S., L. INGROSSO, M. LIONETTO, T. SCHETTINO, V. ZONNO, C. STORELLI. 1999. Effect of cadmium and zink on the Na/H exchanger on the brush border membrane vesicles isolated from eel kidney tubular cells. – Aquatic Toxicology, 48: 25-36.

VELCHEVA I., A. ARNAUDOV, G. GECHEVA, I. MOLLOV. 2006. A study on some physiological parameters of three hydrobiotic species under the influence of copper. – In: *II international symposium of ecologists of the republic of Montenegro*, 155-161.

**THE INFLUENCE OF COPPER ON BREATHING AND
HAEMATOLOGY INDEXES ON PRUSSIAN CARP
(*Carassius gibelio*)**

Veselina S. Dobрева, *Atanas D. Arnaudov**, *Iliana G. Velcheva***,
*Angel G. Tsekov***, *Bogdan N. Nikolov*****

University of Plovdiv „Paisii Hilendarski“,
*Faculty of Biology, Department of “Human anatomy and physiology”**, *Department*
*of „Ecology and environmental conservation“***,
24 Tzar Asen str., 4000 Plovdiv, E-mail: arnaudov@uni-plovdiv, anivel@abv.bg,
a_tsekov@abv.bg, nikolov81bg@yahoo.com

(Summary)

In the current publication we analyze the changes in the Prussian carp's behaviors in water with growing concentrations of copper. Concentrations of copper (0,1mg/l; 1,0mg/l and 2,0mg/l) are not lethal, but going to decrease in the breathing with 30 – 50 percent. All specimen treatments with copper have lower stability on oxygen deficit then normal specimen.

We determinate changes in blood parameters on Prussian carp (hematocrit's is growing and hemoglobin's is decreasing). With rise of the concentrations of copper this changes are growing.

Determinations changes on oxygen activity and hemoglobin's in blood of Prussian carp (*Carassius gibelio*) has opportunity this species, to be used for biomonitoring copper pollution in water ecosystems.