



## ИЗСЛЕДВАНЕ ВЛИЯНИЕТО НА ОТПАДЪЧНИ ВОДИ, СЪДЪРЖАЩИ ПОЛИХЛОРИРАНИ БИФЕНИЛИ ВЪРХУ НЯКОИ ПОКАЗАТЕЛИ НА ЧЕРВЕНАТА КРЪВНА КАРТИНА НА КА-РАКУДА (*Carassius gibelio*) И ШАРАН (*Cyprinus carpio*)

*Дора М. Иванова, Атанас Д. Арnaudов, Ангел Г. Цеков*

*ПУ „Паисий Хилендарски“, Биологически факултет,  
ул. „Цар Асен“ 24, 4000 Пловдив*

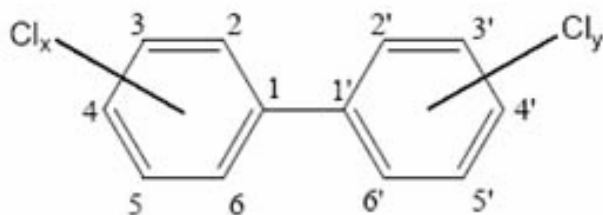
*E-mail: dora4@abv.bg, arnaudov@uni-plovdiv.bg, a\_tsekov@abv.bg*

**Abstract.** The influence of waste waters and bed sediments, containing polychlorinated biphenyls, from a woodwork factory on hemoglobin content and erythrocyte morphology of Crucian carp (*Carassius gibelio* Bloch.) and Common carp (*Cyprinus carpio*) was studied. It was found that they cause serious destructive alterations, appearing of micronuclei and increasing of the percentage of dividing erythrocytes in peripheral blood of both species. The waste waters and bed sediments cause decreasing of hemoglobin concentration, but with low level of significance. It was suggested that these results can be used for the aims of ecological biomonitoring of water ecosystems, polluted with polychlorinated biphenyls.

**Key words:** polychlorinated biphenyls, Cyprinidae, hemoglobin, erythrocyte morphology.

### ВЪВЕДЕНИЕ

Полихлорираните бифенили (ПХБ) са изкуствено синтезирани органични съединения, които попадат в групата на промишлените устойчиви органични замърсители. Теоретично могат да съществуват 209 техни изомери (конгенери), но само около 130 от тях се произвеждат като търговски продукти. Полихлорираните бифенили са химически устойчиви съединения, топлинно устойчиви, много трудно запалими, с ниска диелектрична проникваемост, което обуславя и тяхното широко използване в индустрията най-вече като охладители и диелектрици във високо волтови трансформатори. Те оказват дълготрайно негативно въздействие върху околната среда поради слабото биологично разграждане, както и поради високата степен на акумулиране в организмите. Попаднали в организма на човека, предизвикват разнообразни патологични ефекти, включително и ракови заболявания (GRAFTON *et al.*, 2008).



**Фиг. 1.** Структурна формула на ПХБ,  $Cl_n$ ,  $n = \text{от } 1 \text{ до } 10$

При изследване на проби от месо от есетрови риби, отглеждани в садкова база на язовир Копринка се установи наличието на полихлорирани бифенили в анцентрация  $572.63 \mu\text{g/kg}$ , при норма  $200 \mu\text{g/kg}$  (Протокол № 27692/15.11.2006 г. на ЦЛВСЕЕ–София). Основен замърсител на язовира са отпадъчните води от дървообработвателното предприятие на фирма „Габровница“ АД – с. Горно Сахране.

Цел на настоящото проучване е да получим данни за влиянието на използваните при преработката на дървесина химикали от дървообработвателното предприятие върху концентрацията на хемоглобина в кръвта и върху морфологията на еритроцитите на два сравнително устойчиви на токсични въздействия вида – *Carassius gibelio* и шаран *Cyprinus carpio*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Като материал за провеждане на настоящото проучване бяха използвани води и утайка (грунд) от дървообработвателното предприятие на фирма „Габровница“ АД в с. Горно Сахране, община Павел Баня, обл. Стара Загора взети от канала заустващ отпадъчните води от предприятието в пречиствателното и съоръжение. При вземане на пробите за изследване, предприятието не извършваше производствена дейност от няколко дни.

### Опитни животни

За целите на изследването бяха използвани екземпляри от видовете каракуда *Carassius gibelio* и шаран *Cyprinus carpio*. Опитните индивиди бяха без външни патологични промени и с тегло, съответно  $35.6\text{--}47.6 \text{ g}$  за каракудата и  $9.5\text{--}16 \text{ g}$  за шарана. По време на експеримента рибите не бяха хранени.

### Опитна постановка

При провеждането на експеримента, бяха сформирани две опитни групи и една контролна, разпределени в три аквариума:

**Аквариум № 1.** Съдържаше 23 литра вода взета от канала заустващ водите след пречиствателното съоръжение в реката и 7 литра чешмяна вода (общо 30 литра). В него бяха поставени по 10 бр. каракуда и шаран. Температурата на водата бе  $20\text{--}21^\circ\text{C}$ , кислородното съдържание –  $8 \text{ mg/l}$ , рН – 7 до 7.5 и твърдост  $9.5 \text{ dH}$ .

**Аквариум №2.** Съдържаше 15 литра утаена вода след промиване на дънната маса (утайката) от канала, в който се заустват водите от пречиствателното

съоразение и 15 литра чиста чешмяна вода (общо 30 литра). В него бяха поставени по 10 бр. каракуда и шаран. Температура на водата 17.3° С, кислородно съдържание 7.3 mg/l. рН – 7 до 7,5 и твърдост 9.5 dH.

*Аквариум № 3* (контролна проба). Съдържаше отстояла чешмяна вода със същите физико-химични характеристики. В него бяха поставени по 10 бр. каракуда и шаран.

Към аквариумите бяха включени аератори. Продължителността на експозицията беше 72 часа.

#### *Хематологично изследване*

Кръвни проби бяха получавани чрез сърдечна пункция. Пробите събирахме с моновети с антикоагулант (EDTA). Съдържанието на хемоглобина определяхме по цианхемоглобиновия метод, описан от ИБРИШИМОВ и ЛАЛОВ (1984). Морфологичното изследване на еритроцитите извършвахме чрез изготвяне на кръвни натривки, които оцветявахме с помощта на набор за експресно оцветяване на кръвни натривки ДКК Колор (Вива–МТ). На кръвните натривки с помощта на светлинен микроскоп (Olympus CX 21) определяхме процента на нормалните клетки, на клетките с деформации (променена форма, промени в ядрото, протоплазмата и мембраните), както и процента на дялящите се клетки. От всяка проба изброявахме по 1000 еритроцита.

#### *Математическа обработка на резултатите*

Получените резултати от хематологичното изследване обработихме вариационно-статически по методики, описани от СЕПЕТЛИЕВ (1986). За достоверни разлики между сравняваните резултати приемахме тези при степен на достоверност  $p \leq 0,05$ .

## РЕЗУЛТАТИ

Резултатите от определянето на хемоглобиновото съдържание са представени на Таблица 1.

**Таблица 1.** Стойности на хемоглобиновата концентрация (в g %) при каракуда (*Carassius gibelio*) и шаран (*Ciprinus caprio*)

| вид      | Аквариум № 3 | Аквариум №1. | Аквариум №2  |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| каракуда | 8.25±2.65    | 8.15±2.84 *  | 7.85±3.16 ** |
| шаран    | 5.57±2,16    | 4.01±1,43 *  | 5.52±1.83 *  |

\* –  $P < 0.1$ , \*\*,  $P < 0.01$

В резултат на извършеното изследване се установи, че наличието във водата на токсикантите (полихлорни бифенили) предизвиква намаляване на хемоглобиновото съдържание на периферната кръв, но с ниска степен на достоверност.

Резултатите от определянето на морфологичния състав на еритроцитите са представени на Таблица 2.

**Таблица 2.** Морфологичен състав на еритроцитите на каракуда (*Carassius gibelio*) и шаран (*Ciprinus caprio*) (%)

| Опит-ни групи | каракуда  |              |           |                 | шаран    |              |           |                |
|---------------|-----------|--------------|-----------|-----------------|----------|--------------|-----------|----------------|
|               | нормални  | дегенерирани | делящи се | микронуклеи     | нормални | дегенерирани | делящи се | микронуклеи    |
| Аквариум №3   | 88.3±6.2  | 10.6±3.1     | 1.1±0.4   | -               | 91.6     | 7.5          | 0.9       | -              |
| Аквариум №1   | 44.6±3.7* | 33.9±5.0*    | 14.6±1.8* | ++ <sup>2</sup> | 48.2*    | 42.0*        | 9.8*      | + <sup>1</sup> |
| Аквариум №2   | 50.6±4.2* | 42.1±3.3*    | 8.1±*     | -               | 29.6*    | 65.9*        | 4.5*      | +              |

1- само при някои индивиди, 2- при всички индивиди

\* -P<0.001

Резултатите от изследването показват, че полихлорните бифенили водят до сериозни промени в морфологичния състав на периферната кръв. Водата от отводнителния канал на предприятието предизвиква достоверно намаляване на нормалните еритроцити и при двата вида, за сметка на увеличаването на дегенериралите и на дялящите се клетки. Докато водите сред пречиствателното съоръжение също предизвикват намаляване на процента на нормалните еритроцити, като тази тенденция е много по-силно проявена при шарана 29.6% нормални клетки спрямо 65.9% дегенерирани. Действието на водите на отводнителният канал водят до по-изразено увеличаване броя на дялящите се клетки, докато водите след пречиствателното съоръжение на предприятието водят до по-силно увеличаване процента на дегенериралите клетки.

В еритроцитите на каракуда и на шарана и в двете опитни групи (аквариуми №1 и №2) наблюдавахме и такива с допълнително малко ядро (микронуклей). Микронуклеи установихме най-много при каракуда в аквариум №1 (при всички изследвани индивиди), докато в аквариум №2 не установихме такива. При шарана и в двете опитни групи се установи появата на микронуклеи, но не при всички индивиди.

## ДИСКУСИЯ

Голяма част от органичните водни замърсители предизвикват в организма на рибите неспецифични (обща) клетъчни увреждания, като генотоксичност, поява на допълнително малко ядро (микронуклей), както и проявява на естрогенна активност. Установяването на тези промени е маркер за наличието на замърсители във водата (DEGUCHI *et al.* 2008, ÇAVA & KÖNEN, 2007, TUVIKENE *et al.*, 1999). Проявата на увреждащото действие на бифенилите се изразява основно в две насоки – поява на микронуклеи в еритроцитите, хипохромна анемия и развитие на патологични процеси в черния дроб, бъбреците и слезката на различни видове морски и сладководни риби (NESTEL *et al.*, 1975, BARĐIENĖ *et al.*, 2005, BOON *et al.*, 1992).

В този аспект, настоящото изследване, наред с откриването на микронуклеи в еритроцитите, разкрива още два ефекта на бифенилните замърсители върху еритроцитите на сладководните риби – предизвикване на деструктивни процеси и увеличаване процента на делящите се клетки. Получените резултати се различават в известна степен с данните на BOON *et al.* (1992), според които пероралното третиране на писия (*Pleuronectes platessa*) с полихлорирания бифенилен препарат Clophen A40 води до намаляване на хемоглобиновото съдържание и на МСНС. Тези разлики вероятно се дължат на различните концентрации на токсикантите, използвани в двата експеримента, както и на голямата устойчивост на шарана и особено на каракудата по отношение на антропогенни повлиявания.

### ИЗВОДИ

Отпадъчните води от дейността на дървообработвателното предприятие на фирма „Габровница“ АД, с. Горно Сахране, съдържащо полихлорирани бифенили, предизвикват сериозни дегенеративни изменения, поява на микронуклеи и повишаване процента на делящите се еритроцити в периферната кръв на каракуда (*Carassius gibelio*) и шаран (*Cyprinus carpio*).

Същите отпадъчни води водят и до намаляване на хемоглобиновото съдържание на кръвта на двата вида, но с ниска степен на достоверност. Установените изменения в морфологията на еритроцитите на каракудата и на шарана позволяват те да се посочат като възможни за използване за целите на биомониторинга на водни екосистеми, замърсени с органични съединения.

## ЛИТЕРАТУРА

ИБРИШИМОВ Н., ХР.ЛАЛОВ 1984. Клинично-лабораторни изследвания във ветеринарната медицина, Земиздат, София, 363 р.

СЕПЕТЛИЕВ Д. 1986. Медицинска статистика, Медицина и физкултура, София, 110 р.

BARDIENĖ J., V. DEDONYTĖ, AL. RYBAKOVAS, L. ANDREIKĖNAITĖ, O.-K. ANDERSEN. 2005. Induction of micronuclei in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) after treatment with bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. – *Ekologija*, 4: 1–7.

BOON J. P., J. M. EVERAARTS, M. T. J. HILLEBRAND, M. L. EGGENS, J. PIJNENBURG, A. GOKSOYR. 1992. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and hemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes-Platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). – *Science of the Total Environment*, 114: 113–133.

ÇAVA T., S. KÖNEN. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. – *Mutagenesis*, 22, 4: 263–268.

DEGUCHI Y., N. X. WU, T. TOYOIZUMI, SH. MASUDA, H. NAGAOKA, T. WATANABE, Y. TOTSUKA, K. WAKABAYASHI, N. KINAE. 2008. Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. – *Environ. Toxicol.*, 23, 6: 720–727.

GRAFTON AL., D. LEE, D. LIBERO, J. MILLER, AND KR. RAPKO. November 2008. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) in Fish Roe. – *The Journal of Young Investigators*, 19, 5 (WEB based).

NESTEL H., J. BUDD. 1975. Chronic oral exposure of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to a polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254): pathological effects. – *Can. J. Comp. Med.*, 39, 2: 208–215.

TUVIKENE A., S. HUUSKONEN, K. KOPONEN, O. RITOLA, U. MAUER, AND P. LINDSTRÖM-SEPPÄ. 1999. Oil shale processing as a source of aquatic pollution: monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. – *Environ. Health Perspect.*, 107, 9: 745–752.

**A STUDY ON THE INFLUENCE OF WASTE WATERS,  
CONTAINING POLYCHLORIC BIPHENYLS  
ON SOME PARAMETERS OF THE RED BLOOD PICTURE  
OF THE PRUSSIAN CARP (*Carassius gibelio*)  
AND THE COMMON CARP (*Cyprinus carpio*)**

***Dora M. Ivanova, Atanas D. Arnaudov, Angel G. Tsekov***

*University of Plovdiv „St. Paisii Hilendarski“, Faculty of Biology,  
24 Tzar Assen Str., 4000 Plovdiv, BULGARIA*

*E-mail: dora4@abv.bg, arnaudov@uni-plovdiv.bg, a\_tsekov@abv.bg*

**(Summary)**

The influence of waste waters and bed sediments, containing polychlorinated biphenyls, from a woodwork factory on hemoglobin content and erythrocyte morphology of Prussian carp (*Carassius gibelio* Bloch.) and Common carp (*Cyprinus carpio*) was studied. It was found that they cause serious destructive alterations, appearing of micronuclei and increasing of the percentage of dividing erythrocytes in peripheral blood of both species. The waste waters and bed sediments cause decreasing of hemoglobin concentration, but with low level of significance. It was suggested that these results can be used for the aims of ecological biomonitoring of water ecosystems, polluted with polychlorinated biphenyls.