

MARIA PROST, ANTONINA SOPIŃSKA

Reakcja komórek śluzowych karpia (*Cyprinus carpio* L.) na działanie insektycydu jako indykator biologiczny skażenia wody

Zakład Chorób Ryb Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR
w Lublinie, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

Produkcja śluzu w naskórku i skrzelach ryb odbywa się w wyspecjalizowanych do tej funkcji komórkach śluzowych. W naskórku komórki te wytwarzane są w warstwie podstawowej i stąd wędrują ku powierzchni ciała ryby. W ich błonie komórkowej tworzy się otwór, przez który śluzowa substancja jest wydalana na zewnątrz. Wiele komórek śluzowych ginie po wykonaniu tej funkcji wydalniczej (3, 10). Stąd też liczba ich w naskórku jest zmienna: zwiększa się w czasie intensywnej, a zmniejsza w czasie nieznacznej sekrecji.

Zmiany liczby komórek śluzowych jako reakcji na działanie chemicznych środków toksycznych były przedmiotem badań u karpia (5) oraz u pstrąga tęczowego (8). U ryb tych stwierdzono zmniejszenie liczby komórek śluzowych w naskórku, skrzelach i błonie śluzowej jelita pod wpływem siarczanu miedzi aż do zupełnego zaniku po długotrwałym działaniu tego związku. Wpływ innego rodzaju stresora związanego z odłowem ryb stwierdzono u *Salvelinus alpinus* (10). Działanie tego rodzaju stresu na komórki śluzowe naskórka wywoływało zwiększenie ich liczby.

Celem pracy było określenie wpływu insektycydu Gamakarbatox na liczbę komórek śluzowych karpia oraz próba oceny przydatności tego zjawiska jako biologicznego indykatora wskazującego na chemiczne zanieczyszczenie wody.

Materiał i metody

Ryby i warunki ich bytowania w czasie badań.

Materiałem użytym do badań był narybek karpia (*Cyprinus carpio* L.) o masie 40–80 g, pochodzący z gospodarstwa Podlódow (woj. lubelskie). Ryby były w dobrym stanie zdrowotnym, co ustalono na podstawie kontrolnego badania makro- i mikroskopowego wykonywanego u 10 sztuk z każdej przywiezionej ze stawów populacji. W razie stwierdzenia u tych ryb zmian w skórze lub narządach wewnętrznych, a także silnych inwazji pasożytniczych ryby pochodzące z danego stawu nie były użyte do dalszych badań.

Karpie doświadczalne poddawano adaptacji do warunków akwariowych przez okres co najmniej tygodnia. W czasie prowadzonych badań były one karmione dwa razy w tygodniu.

Ryby doświadczalne i kontrolne przebywały w akwariach 80 i 100-litrowych. Woda wodociągowa w tych akwariach miała w czasie prowadzonych doświadczeń temperaturę 14–17°C, pH 7,0–7,5, zawartość tlenu 7,8–8,0 mg/dm³ i twardość ogólną 6,0 mval/dm³.

Toksyczny środek chemiczny i sposób jego stosowania.

Środkiem chemicznym użytym do badań był insektycyd Gamakarbatox zawieszinowy. Jest to preparat zawierający 40% karbarylu (N-metylo-karbaminian

1-naftyłu) i 10% lindanu (izomer 1,2,3,4,5,6-sześcioclorocykloheksanu). Przed wyborem stężeń użytych ostatecznie do badań wykonano liczne próby reakcji narybku karpia na ten preparat, badając toksyczność ostrą oraz przewlekłą. Biorąc pod uwagę wyniki tych badań oraz dane piśmiennictwa na temat toksyczności Gamakarbatoxu dla karpia (1, 12) ostatecznie do badań własnych wybrano trzy stężenia Gamakarbatoxu: 0,4 mg/l wody, 1,0 mg/l oraz 1,5 mg/l. To ostatnie stężenie było subletalne. Według badań Sopińskiej i wsp. (12) LC₅₀ Gamakarbatoxu dla karpia po 96 godzinach wynosi 1,86.

W stężeniu 0,4 mg/l karpie przebywały przez 42 dni i w ciągu tego okresu pobierano próbki ich skóry i skrzeli. Próbki skóry były pobierane po 6, 12, 24, 48 godzinach oraz 14, 28 i 42 dniach. Próbki skrzeli pobierano po 6, 24, 48 godzinach oraz po 7, 28 i 42 dniach.

W stężeniu 1 mg/l karpie przebywały przez 8 dni. W tym czasie pobierano próbki skóry po 24, 48, 72 i 96 godzinach oraz po 8 dniach. Ze skrzeli pobrano próbki po 6, 24, 48, 72 i 96 godzinach oraz po 5 i 8 dniach.

W stężeniu 1,5 mg/l przetrzymywano karpie przez 3 dni i w tym czasie pobierano próbki skóry po 6, 24 i 72 godzinach, zaś skrzeli po 24, 48 i 72 godzinach.

W czasie przebywania ryb w poszczególnych wariantach stężeń i czasu działania Gamakarbatoxu obserwowano i notowano zachowanie się ryb oraz występujące u nich objawy toksyczności.

Ryby przebywały w akwariach bez przepływu wody. W celu zapewnienia stałego poziomu stężenia Gamakarbatoxu w zawieszinie wodnej, a także w celu uniknięcia wpływu nagromadzających się wydaliny ryb przenoszono je co dwa, a najwyżej co trzy dni do innego akwarium, zawierającego świeżo sporządzoną zawieszinę Gamakarbatoxu.

Ryby kontrolne, nie poddane działaniu Gamakarbatoxu, przebywały w tych samych warunkach i były karmione i przenoszone do kolejnych akwariów w tym samym czasie, jak ryby doświadczalne. Próbki skóry i skrzeli pobierano każdorazowo równocześnie od ryb doświadczalnych i kontrolnych.

Pobieranie próbek, sporządzanie preparatów mikroskopowych oraz sposób liczenia komórek śluzowych.

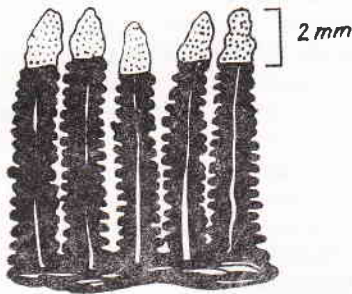
Skrawki skóry ryb doświadczalnych i kontrolnych o powierzchni około 1 cm² pobierano tuż za brzegiem okryw skrzelowej na wysokości linii nabocznej po lewej stronie ciała. Tego sposobu przestrzegano bardzo uważnie, gdyż wyniki badań niektórych autorów (2, 9) wskazują na zmienną liczbę komórek śluzowych ryb w różnych okolicach ciała. Próbki utrwalano w roztworze 5% formaldehydu w 0,6% NaCl przez 48 godzin, następnie zatapiało w parafinie (9). Skrawki parafinowe grubości 8 µm barwiono 1% błękitem Alcyanu w 1% kwasie octowym (pH barwnika wynosiło 3,0). Komórki śluzowe zabarwiają się tą metodą na kolor błękitny. Skrawki mikrotomowe cięto prostopadłe do powierzchni skóry. Taśmy skrawków sporządzano każdorazowo z pięciu ryb doświadczalnych poddanych danemu stężeniu Gamakarbatoxu oraz danemu czasowi działania tego insektycydu, a także każdorazowo z pięciu ryb kontrolnych. W ten sposób do badań użyto 155 ryb doświadczalnych oraz 155 ryb kontrolnych (31 wariantów stężeń i czasów ekspozycji,

w każdym po 5 ryb oraz każdorazowo 5 ryb kontrolnych).

Liczbę komórek śluzowych obliczano w całej warstwie naskórka na odcinku o długości 0,5 cm. W naskórku każdej ryby doświadczalnej i kontrolnej liczone były komórki w 10 skrawkach mikrotomowych. W ten sposób uzyskiwano 10 wyników liczbowych z każdej ryby, a 50 wyników dla każdego wariantu stężenia i czasów ekspozycji. W celu wykluczenia kilkakrotnego liczenia tych samych komórek w kolejnych skrawkach, obliczeń dokonywano w co trzecim skrawku (średnica komórek śluzowych nie przekraczała 17 μm , grubość skrawków wynosiła 8 μm).

Liczbę komórek śluzowych w skrzelach obliczano na szczytach listków skrzelowych w polu, którego podstawę stanowiła linia poprzeczna odległa o 0,2 mm od szczytu listka (ryc. 1). Podobnie jak w naskórku liczbę komórek śluzowych w skrzelach liczone w 10 skrawkach u każdej ryby doświadczalnej i kontrolnej.

Wszystkie uzyskane wyniki liczbowe zostały poddane analizie statystycznej przy pomocy testu t Studenta dla prób nie połączonych.



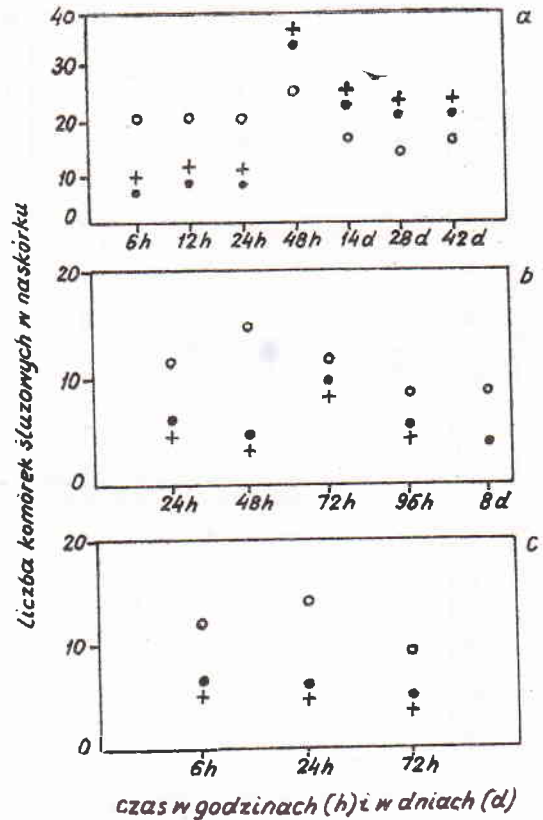
Ryc. 1. Pole na szczytach listków skrzelowych, w którym liczone komórki śluzowe

Wyniki i omówienie

Komórki śluzowe naskórka karpia wykazały bardzo wyraźną reakcję na działanie Gamakarbatou. Porównanie liczby tych komórek u ryb doświadczalnych i kontrolnych (ryc. 2) poddanych wszystkim trzem stężeniom oraz wszystkim zastosowanym czasom działania insektycydu wykazało statystyczną istotność różnic. Dla większości prób różnica była istotna na poziomie $\alpha=0,001$, a tylko w jednym przypadku w stężeniu 0,4 mg/l dla czasu 28 dni na poziomie $\alpha=0,01$, zaś w stężeniu 1 mg/l dla czasu 72 godziny na poziomie $\alpha=0,02$. W wyniku działania stężenia 0,4 mg/l Gamakarbatou średnia liczba komórek śluzowych w naskórku ryb doświadczalnych uległa początkowo zmniejszeniu w porównaniu do ryb kontrolnych. Reakcją taką obserwowano w ciągu pierwszych 24 godzin. Następnie liczba komórek śluzowych zwiększała się i po 48 godzinach do końca obserwacji była większa u ryb doświadczalnych niż u kontrolnych.

W stężeniu 1 mg/l oraz 1,5 mg/l liczba komórek śluzowych w naskórku była zawsze istotnie niższa niż u ryb kontrolnych.

Komórki śluzowe skrzeli karpia, chociaż wyraźnie reagowały na działanie insektycydu, nie wykazały regularności tej reakcji. Wyrażało się to brakiem statystycznie istotnych różnic niektórych wyników oraz nieregularnym



Ryc. 2. Średnia liczba komórek śluzowych w naskórku karpia poddanych działaniu Gamakarbatou oraz karpia kontrolnych. Stężenia: a — 0,4 mg/l, b — 1,0 mg/l, c — 1,5 mg/l

Objaśnienia: O = karpie kontrolne, ● = karpie doświadczalne, + = różnica statystycznie istotna.

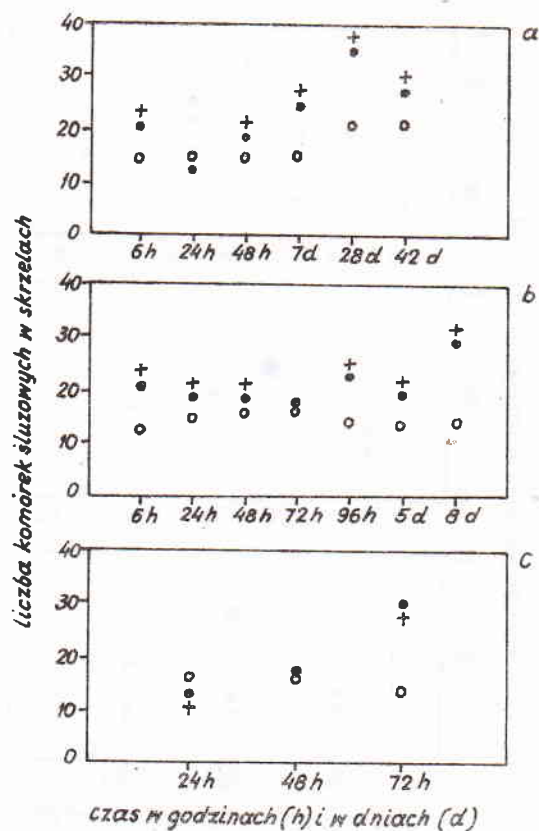
występowaniem wyższej lub niższej liczby komórek w porównaniu do ryb kontrolnych (ryc. 3).

Zachowanie się ryb podczas doświadczeń zależało od stężenia zawiesiny Gamakarbatou. W stężeniu 0,4 mg/l ryby zachowywały się normalnie aż do końca doświadczenia (42 dni). Jedyнным objawem wpływu insektycydu była nieznaczna duszność: ryby pływały bliżej powierzchni wody.

W stężeniu 1,0 mg/l po trzech godzinach u ryb pojawiały się pierwsze objawy podniecenia, utrzymujące się do końca obserwacji (8 dni). Po pięciu dniach u niektórych ryb występowały zaburzenia równowagi.

W stężeniu 1,5 mg/l podniecenie u ryb pojawiało się już po 1,5 godzinie. Do końca obserwacji (72 godziny) podniecenie to utrzymywało się, a u niektórych ryb wystąpiły zaburzenia równowagi, porażenia mięśni oraz pojedyncze snięcia.

Ogólna reakcja komórek śluzowych w naskórku karpia na działanie Gamakarbatou polega na obniżeniu liczby tych komórek. W stężeniu niskim (0,4 mg/l) nagła zmiana tej reakcji po 48 godzinach (ryc. 2) była, jak się wydaje, pewnego rodzaju odczynem obronnym. Wyższe stężenia będące silniejszym czynnikiem stresowym uniemożliwiały tę reakcję



Ryc. 3. Średnia liczba komórek śluzowych na szczetykach listków skrzelowych karpia poddanych działaniu Gamakarbatoxu oraz karpia kontrolnych. Stężenia: a — 0,4 mg/l, b — 1,0 mg/l, c — 1,5 mg/l

Objaśnienia: ○ = karpie kontrolne, ● = karpie doświadczalne, + = różnica statystycznie istotna.

obronną i powodowały nagłe i utrzymujące się trwale zmniejszenie mukosekrecji. Podobne wyniki otrzymał Smart (11) działając amoniakiem na pstrągi tęczowe. Wyższe stężenia amoniaku powodowały zmniejszenie, zaś niższe zwiększenie mukosekrecji.

W badaniach własnych komórki śluzowe skrzelu karpia nie wykazywały w niskim stężeniu insektycydu tego rodzaju reakcji obronnej.

Wydzielniczość śluzowa komórek u ryb jest regulowana działaniem hormonu prolaktyny wydzielanego przez przysadkę mózgową (4, 6, 7). Początkowa reakcja komórek śluzowych naskórka pod wpływem niskiego stężenia Gamakarbatoxu była przypuszczalnie wynikiem inhibującego działania tego stresora na aktywność hormonalną w pierwszych 24 godzinach. Dłuższe działanie insektycydu powodowało przypuszczalnie wzmocnienie aktywności hormonalnej prolaktyny. Wyższe stężenia Gamakarbatoxu miały, jak się wydaje, uderzeniowe i trwale inhibujące działanie na aktywność hormonalną. Brak jednak eksperymentalnych danych na potwierdzenie tej hipotezy.

Wyniki badań własnych wykazały jednoznacznie, że komórki śluzowe naskórka i skrzelu karpia cechuje silna wrażliwość na działanie

użytego do badań środka chemicznego. Wielokrotne pobieranie prób i wykonywane w niewielkich odstępach czasu obliczenia liczby komórek śluzowych wykazały, że wrażliwość ta objawia się bardzo szybką zmianą liczby tych komórek, przy czym zmiana ta utrzymuje się przez dłuższy okres czasu. Wskazuje to zarówno na przydatność tego zjawiska do oceny skażenia wody związkami chemicznymi, jak i na czułość tego indykatora biologicznego.

Wnioski

1. Jednoznaczna reakcja ryb na działanie zawiesiny Gamakarbatoxu, wyrażająca się statystycznie istotną różnicą liczby komórek śluzowych w naskórku, świadczy o możliwości użycia jej jako biologicznego testu, wskazującego na skażenie chemiczne wody.

2. Zmienna reakcja komórek śluzowych skrzelu karpia na działanie Gamakarbatoxu nie jest dostatecznie pewnym wskaźnikiem reakcji ryby na tego rodzaju zanieczyszczenie wody.

3. Ogólna przydatność reakcji komórek śluzowych jako testu biologicznego, wskazującego na zanieczyszczenie chemiczne wód, może być określona ostatecznie po wykonaniu dalszych badań doświadczalnych dotyczących innych środków chemicznych.

Piśmiennictwo

1. Antychowicz J., Szymbor E., Roszkowski J.: Bull. Vet. Inst. Puław 23, 124, 1979.
2. Blum V., Fiedler K.: Gen. comp. Endocr. 5, 186, 1965.
3. Brown M.: The physiology of fishes. Academic Press, New York, 1957.
4. Hoar W. S., Randall D. J.: Fish physiology. II. Academic Press, New York, 1968.
5. Labat R. J., Pequignot J., Chatelet A.: Anns Limmol. 10, 109, 1974.
6. Marshall W. S.: Gen. comp. Endocr. 37, 358, 1979.
7. Olivereau M., Olivereau J.: C.r. Séance Soc. Biol. 165, 2267, 1971.
8. Pequignot J., Labat R., Chatelet A.: J. Europ. Toxicol. 8, 52, 1975.
9. Pickering A. D.: J. Fish Biol. 6, 111, 1974.
10. Pickering A. D., Macey D. J.: J. Fish Biol. 10, 505, 1977.
11. Smart G.: J. Fish Biol. 8, 471, 1976.
12. Sopińska A., Niezgoda J., Jamroz M.: Bromatol, w druku.

Adres autora: prof. dr Maria Prost, Akademicka 12, 20-033 Lublin.

Прост М., Сопинская А. — Реакция слизистых клеток карпа (*Cyprinus carpio* L.) на действие инсектицида как биологический индикатор заражения воды

Исследовали число слизистых клеток в эпидермисе и жабрах карпа как реакцию на действие инсектицида Gamakarbatox. Применили 3 концентрации этого соединения (0,4 мг/л, 1,0 мг/л и 1,5 мг/л) и разное время его экспозиции. Слизистые клетки показали большую чувствительность к действию инсектицида, причем более однозначная реакция наблюдалась в эпидермисе. В каждой исследуемой пробе появлялись статистически существенные различия между числом этих клеток у подопытных и контрольных рыб. Эти результаты показывают, что число клеток в эпидермисе карпа может служить индикатором химического биологическим загрязнения воды. Необходимы однако дальнейшие исследования реакции слизистых клеток рыб на другие химические средства.

Prost M., Sopińska A. — Reaction of mucosal cells of the carp (*Cyprinus carpio L.*) on an insecticide as a biological indicator of pollution water

It was studied the number of epidermal and gills mucosal cells as a reaction on the insecticide Gamacarbatox. Three concentrations of the compound (0.4 mg/l; 1.0 mg/l and 1.5 mg/l) and various times of exposition were used. The mucosal cells revealed a high sensitivity to the action of the insecticide, ho-

wever, the most pronounced reaction was observed in epidermis. In each examined sample were noted statistically significant differences between the number of the examined cells in the experimental and control animals. The obtained results point that the number of cells in the carp epidermis may serve as a biological indicator of chemical pollution of water. Further studies are necessary on the reaction of mucosal cells of fish on other chemicals.

ANTONI KOPCZEWSKI

Badania nad zapobieganiem urazowemu zapaleniu czepca za pomocą magnezu u buhajów

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk

W ostatnim trzydziestolecu wprowadzono do profilaktyki urazowego zapalenia czepca (uzc) luźne magnesy zaproponowane przez Coopera (13) i Carrolla (2, 3). Na podstawie późniejszych doświadczeń zaczęto podkreślać celowość zapobiegawczego stosowania magnesów w stadach zwierząt wysokoprodukcyjnych, bądź w przypadku szczególnego narażenia bydła na polykantanie ferromagnetycznych przedmiotów (1, 2, 15, 28, 33, 36).

W piśmiennictwie polskim pierwsze publikacje o zastosowaniu sond magnetycznych oraz luźnych magnesów w zapobieganiu i leczeniu uzc u bydła przedstawił Cakała (4), a następnie Tarkiewicz (28). Przydatność luźnych magnesów, a w mniejszym zakresie również sond magnetycznych do wychwytywania ciał obcych (c.o.) w czepcu bydła była w naszym kraju przedmiotem licznych badań (5, 6, 10, 11, 12, 18, 20—22, 24, 25, 37, 39). Pierwsze krajowe prace doświadczalne nad możliwością zapobiegania urazom przedzwoładek za pomocą magnesów oraz ocena korzyści z tym związanych pochodzą z Zakładu Badań Chorób Bydła Instytutu Weterynarii w Puławach (11). Z tego okresu pochodzą również prace, które wykazały brak ujemnego wpływu magnezu zalegającego w przedzwoładekach na stan zdrowia bydła młodego (20, 24). Nie prowadzono w naszym kraju badań nad przydatnością luźnych magnesów w profilaktyce uzc u buhajów w Stacjach Hodowli i Unasienniania Zwierząt (SHiUZ), u których choroba ta występuje dość często, zaś jej diagnozowanie ze względu na dużą masę tych zwierząt jest trudne. Należy zaznaczyć, że są to zwierzęta o wyjątkowej wartości, nierzadko importowane z zagranicy jako wysoce cenny materiał hodowlany.

Celem pracy była ocena:

- skuteczności profilaktycznego stosowania magnezu „Alnico” u buhajów oraz
- wpływu różnych typów magnesów zalega-

jących w czepcu na stan zdrowia młodego bydła.

Materiał i metody

Pierwszą grupę stanowiły 182 klinicznie zdrowe buhaje pochodzące ze SHiUZ w wieku od 2 do 10 lat. 112 buhajom podano profilaktycznie magnez „Alnico”, zaś pozostałe 70 zwierząt stanowiło kontrolę. Wszystkie zwierzęta poddano kilkuletniej (od 2 do 6 lat) obserwacji i okresowej kontroli w kierunku niestrawności urazowej.

W drugiej grupie znalazło się 70 buhajów w wieku od 16 do 18 miesięcy, które poddano obserwacji klinicznej przez okres 184 dni. W celu określenia ewentualnego ujemnego wpływu zalegających magnesów na stan zdrowia, kondycję i przyrosty masy ciała buhajów, 30 z nich podano doustnie (po najedzeniu i ustawieniu zwierząt na płaszczyźnie poziomej) 3 różnej budowy magnesy — hanowerski (koszyczkowy), „Alnico” i typu rosyjskiego (23). Każdy rodzaj magnezu otrzymało 10 buhajów. Pozostałe 40 buhajów stanowiło grupę kontrolną. U wszystkich zwierząt oprócz badań klinicznych przeprowadzono badanie anatomopatologiczne. Miejsce pobytu magnezu w przedzwoładekach kontrolowano przyżyciowo w odniesieniu do przestrzeni międzyżebrowych (pmż), za pomocą kompasu (6, 8, 20, 21).

Wyniki i omówienie

U 112 buhajów doświadczalnych w grupie pierwszej, które otrzymały doustnie magnez „Alnico”, przez okres kilkuletniej (2—6 lat) obserwacji nie notowano żadnych poważniejszych ogólnych objawów chorobowych ani zaburzeń ze strony przewodu pokarmowego. Z powyższej liczby zwierząt 33 buhaje (29,98%) poddano ubojowi w wyniku selekcji hodowlanej. Wydobyto u nich z czepca liczne c.o. unieruchomione na powierzchni magnezu. U 4 zwierząt w miejscu zalegania magnesów na dnie czepca stwierdzono nieznaczne odczyny zapalne.

Wśród 70 zwierząt kontrolnych zachorowało z powodu c.o. 6 buhajów (8,5%). Jeden buhaj padł, zaś 4 dalszych skierowano do uboju z konieczności. U buhaja padłego na skutek peri-