

## Zn hatásának vizsgálata szivárványos guppi lárvák túlélésére és szívverésének intenzitására

Holis Diana\*, Simon Edina

Debreceni Egyetem, Ökológiai tanszék, Debrecen, Magyarország

\*Corresponding author. E-mail: holis.diana@gmail.com

Paper received 05.12.15; Accepted for publication 14.12.15.

**Abstrakt.** Napjainkban a nehézfém ionok vizsgálata a különböző felszíni, felszín alatti vizekben létfontosságúvá vált az ökológia terén, mivel különböző antropogén hatások következtében a vízi ökoszisztémát veszélyeztető jelentős szennyezések alakultak, illetve alakulnak ki. Vizsgálatunk során különböző koncentrációjú Zn-oldatok (0,5 és 1,0 mg/L) hatását tanulmányoztuk szivárványos guppi lárvák (*Poecilia reticulata*) túlélésére és szívverésük intenzitására. A vizsgálatokat 3-szoros ismétléssel végeztük, kontroll oldatként ásványvizet használtunk. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy ugyan a Zn-re való érzékenység csökken a halak korával, de nem válnak teljes mértékben rezisztenssé rá, mivel mind a túlélésre, mind a szívverés intenzitásra hatással lehetnek.

**Keywords:** *Poecilia reticulata*, toxicitás, nehézfémek

**Bevezetés.** A nehézfémekkel szennyezett vizek különböző fejlődési rendellenességeket okozhatnak a halak esetében. Korábbi vizsgálatok már bizonyították, hogy mind a juvenilis, mind az adult halegyedek esetében fejlődési rendellenességek tapasztalhatóak a nehézfém szennyezések hatására [1, 2]. Mivel az újszülött halak hasonló metabolikus folyamatokkal rendelkeznek, mint a juvenilis és az adult szervezetek, ezért már embrionális fejlődési stádiumban is kiválóan alkalmasak indikátor szervezetnek nehézfém szennyezések hatásának becslésére [2]. Összességében a nehézfémek leggyakrabban toxikus hatást fejtenek ki a halakra, ha a mennyiségük meghalad egy bizonyos koncentrációt, de okozhatnak fejlődési rendellenességeket, morfológiai és funkcionális abnormalitásokat. Egyes enzimek lokális vagy egész szervezetre kiterjedő hipo-, illetve hiperfunkcióját válthatják ki, ezáltal a kiváltott hatás függvényében vagy lokalizált hatást fejthetnek ki egyes szervekben, szervrendszerekben, vagy az egész szervezetre kiterjedő hatást válthatnak ki. Az egyedi érzékenységtől, illetve nehézfémeknek való kitettség mértékétől és idejétől függően pusztulást okozhatnak. [1, 2, 3, 4, 5, 11]

Az Egészségügyi Világszervezet, vagyis a WHO bevezette a megfelelő vízminőség érdekében a nehézfémekre és más komponensekre vonatkozó maximális megengedhető koncentrációt, amely a természetes vizekben nagyobb, tengerekben kisebb koncentrációban jelen lévő Zn-re is vonatkozik. A WHO által meghatározott maximális megengedhető Zn-koncentráció 5 mg/L. A Zn, mint ahogy az összes többi, vízben található elem is, részt vesz a halak egészséges homeosztázisának kialakításában. Természetesen a Zn koncentrációjának megváltozása maga után vonja a halak homeosztázisának változását, akár felborulását is, ez történhet akár közvetlenül – a koncentráció változása miatt, és a Zn más, a szervezet számára fontos ionokkal való kompetíciója miatt, vagy közvetetten, a már fent említett enzimaktivitás befolyásolásán keresztül [2, 7, 9 10].

A cink hatásának vizsgálatát a legjobban olyan szervezeten lehet tanulmányozni, amely gyors reprodukcióra képes. Ezért választottuk vizsgálatainkhoz a szivárványos guppit (*Poecilia reticulata*, Peters 1859). A szivárványos guppi egy elevelenszülő faj, amely nagyszámú utódot hoz világra, és az újszülöttek már születésükkor nagy hasonlóságot mutatnak a felnőtt egyedekkel, s a felnőttekéhez hasonló metabolikus folyamatok játszódnak le a testükben. Ennek köszönhetően a szivárványos guppi kiválóan alkalmas az édesvízi halakat érő különböző antropogén hatásokra adott reakcióik tanulmányozására. Ezzel modellezhetővé válik az

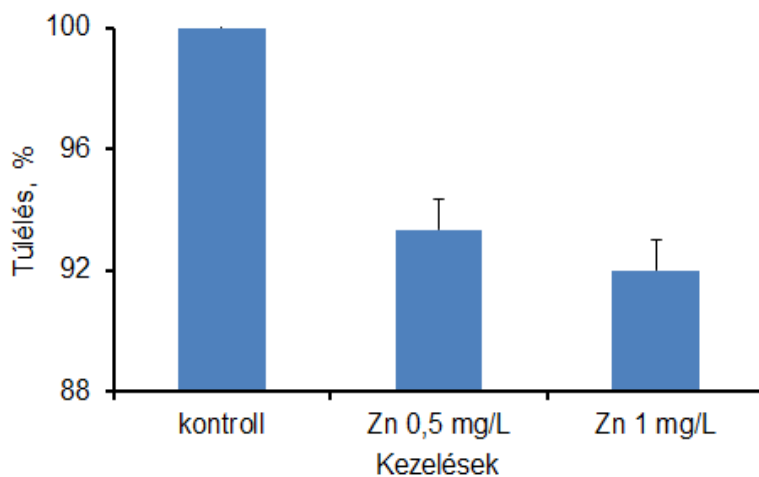
esetleges környezeti változások (akár természetes, akár antropogén hatás által kiváltott) hatása egyes szervezetekre és fajokra [5]. A lárvák születése után a halak szíve jól látszik mikroszkóp alatt, mivel még nem ment végbe a végleges pigmentáció. Vizsgálatunk során különböző koncentrációjú Zn oldatok (0,5 és 1,0 mg/L) hatását tanulmányoztuk szivárványos guppi lárvák (*Poecilia reticulata*) túlélésére és szívverésük intenzitására. Hipotézisünk szerint a nagyobb Zn-koncentrációjú oldat eltérő hatással lesz az egyedek túlélésére és a szívverés intenzitására, mint a kontroll és kisebb koncentrációjú Zn oldat.

**Anyag és módszer.** A kísérlet során cink-szulfátból ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 0,5 és 1mg/L koncentrációjú Zn oldatot készítettünk. Az oldatokat csapvízzel oldottuk, mivel a desztillált víz nem volt megfelelő. A lágy víz (a desztillált víz) erősíti a cink toxicitását, ezzel szemben a Mg és a Ca – vagyis a víz keménységét elsődlegesen kiváltó két ion – pedig gyengítheti a toxicitás mértékét [7]. Kontroll oldatként ásványvizet (Nestlé Aquarel) használtunk, mivel korábbi méréseink során ebben a kontrollként használt oldatban tapasztaltuk a legnagyobb túlélési arányt. A hallárvákat külön-külön tartályokba helyeztük; 1 db tartályba 5 db hal került, és valamennyi kezelés esetében (kontroll, Zn 0,5 mg/L, Zn 1.0 mg/L) 3-szoros ismétléssel végeztük a kísérletet. Majd 24 óra elteltével a laborban Keyence VHX 2000-es mikroszkóppal 30 sec-os videofelvételeket készítettünk minden egyedről 50x-es nagyításban. A halakat minden vizsgálatnál a hátukra fektettük egy nedves vattacsomón, így a hasi oldalán, a kopolyuk alatt jól látható az újszülöttek szívdobogása, mivel még nem következett be a halak pigmentációja. A vizsgálatot az 1. ábra szemlélteti, ahol a piros körön belül jól látható a szív elhelyezkedése.

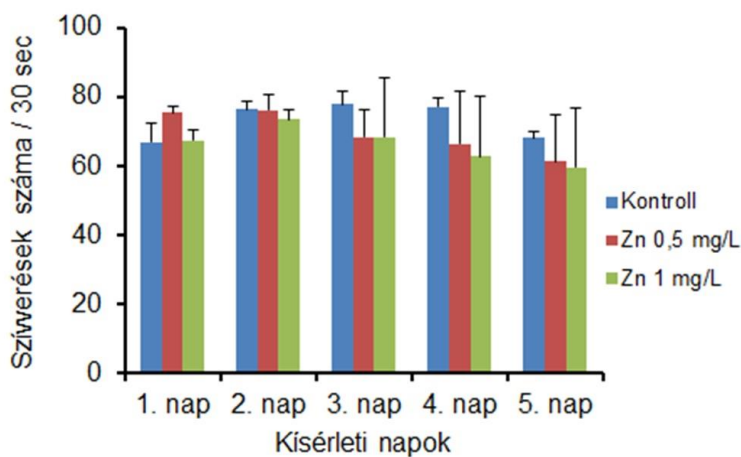
A kísérlet egymást követő 5 napon át tartott, minden mérés ugyanabban az időben zajlott, megszakítások nélkül. Fontos volt, hogy betartsuk a vizsgálatok során az azonos időpontban történő mérést, mivel a halak cirkadián ritmusa már az újszülöttek esetében is befolyást gyakorolhat a szívverésre. Az azonos időpontokban való méréssel kiküszöbölhetjük a cirkadián ritmus hatását a szívverésre a vizsgálatunk során [6]. A halivadékokat minden második nap megfelelő mennyiségű mikrotáppal etettük, ezzel is csökkentve az esélyét annak, hogy éhezés miatt pusztulnak el. Ezután a videofelvételek kiértékelése következett, minden videót VHL videoplayer programmal nyitottunk meg, mivel ez a program biztosította a legjobban a munkához szükséges, könnyen irányítható kezelő



1. ábra. Szivárványos guppi lárva szívverésének vizsgálata Keyence VHX 2000-es típusú mikroszkóppal.



2. ábra. A guppi lárva túlélése (átlag ± SD) a különböző Zn koncentrációjú oldatokban.



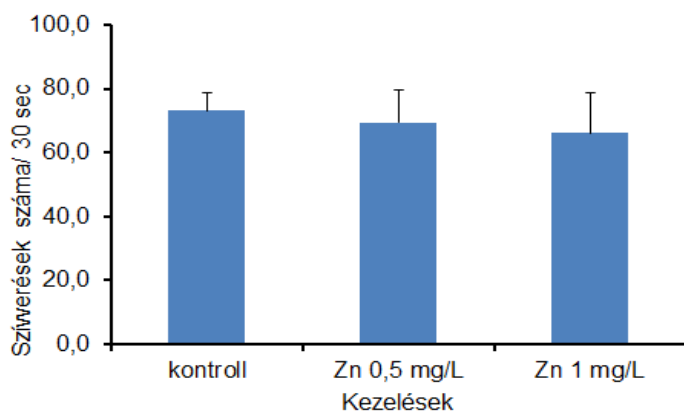
3. ábra. A szívverések száma a (átlag ± SD) kísérleti napok függvényében.

felületet, és a videók elemzéséhez szükséges lassítás funkció irányítását. Az egyedek szívverését vizuális módszerrel számoltuk. Az adatokat Excel fájlba írtuk, ahol a halak pusztulását/túlélését is feljegyeztük, napi szinten. Statistica 7.0 statisztikai programmal végeztük a statisztikai kiértékelést. A különböző Zn koncentrációjú oldatok hatását a halak túlélésére és szívintenzitására Kruskal-Wallis nem-parametrikus teszttel értékeltük.

**Eredmények.** A kontroll oldatokban a vizsgált egyedek túlélése 100%-os volt, ezt követte a Zn 0,5 mg/L koncentrációja, majd, a várt eredményeknek megfelelően, a legnagyobb pusztulás a Zn 1 mg/L koncentrációjú oldatban történt (2. ábra), bár szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk az egyedek túlélésében a különböző oldatokban való tartás során ( $H = 2,146$ ;  $P = 0,342$ ).

A szívverés intenzitás vizsgálatát az eltelt idő (napok) függvényében is vizsgáltuk. A 3. ábrán láthatjuk, hogy mind a 0,5 mg/L mind az 1 mg/L koncentrációjú oldatban a halak szívverése folyamatosan csökkenő tendenciát mutat, ellentétben azzal, amit a kontroll oldatban tapasztaltunk, ahol is az első nap után a halak szívverése stabilizálódott egy bizonyos értéken, és a rátája nem csökkent az utolsó napig. Az utolsó napon megfigyelt csökkenést a vízben felhalmozódott étel- és anyagcseretermékek hatásának tulajdoníthatjuk, mivel az egész kísérlet során a halak ugyanabban a vízben tartózkodtak. A Zn oldatok esetén kizárhatjuk, hogy kizárólagosan az ételmaradék és anyagcseretermékek felhalmozódása volna a felelős a szívverés rátájának csökkenéséért, mivel ezeknél a csoportoknál a csökkenő tendencia már rögtön az első nap után jelentkezik és az egész kísérlet alatt megmarad. Összességében szignifikáns különbséget tapasztaltunk az eltelt napok függvényében az egyedek szívverése számában ( $H = 11,528$ ;  $P = 0,021$ ).

A fent említettek mellett megfigyelhetjük azt is, hogy míg a kontroll csoport halainál a szívverés értékének a szórása – az első nap kivételével – nem haladta meg az 5 szívverést (első nap 5,2), és a szórás értéke csökkenő tendenciát mutatott, addig a Zn 0,5 mg/L-es csoportnál a szórás értéke meghaladta a 15 szívverést, és a maximális értékét a negyedik napon érte el (15,1). A Zn 1 mg/L-es csoportnál a szórás értéke az első 2 napon 5 szívverésen belül maradt, majd harmadik napon ugrásszerűen megnőtt, és meghaladta a 17 szívverést. A maximális értéket a Zn 0,5 mg/L-es oldathoz hasonlóan a negyedik napon érte el, 17,2 értékkel.



4. ábra. Szivárványos guppi lárvák szívverésének száma (átlag ± SD) különböző Zn koncentrációjú oldatokban

**Következtetések.** A kísérlet során kapott eredmények egyértelműen mutatják, hogy az alkalmazott Zn mennyiségek jelenléte a vízben befolyással van mind a halak túlélési rátájára, mind a pulzuszgyakoriságukra, illetve a szívverés stabilitására.

A Zn ionokról ismert, hogy ha nagyobb mennyiségben jutnak be a szervezetbe, akkor egyes ioncsatornákon, illetve receptorokon és kötőhelyeken kompetíció alakul ki a Ca és Zn ionok között, vagyis egy olyan hatás jön létre, mintha a Ca ionok szintje csökkent volna a szervezetben, annak ellenére, hogy a mennyiségük változatlan. Ez egyértelműen magyarázza azt, hogy a kemény (azaz magas Ca tartalmú) vízben miért gyengülnek a Zn mérgezés tünetei. Továbbá arra is magyarázatot ad, hogy miért csökken a pulzusszám a Zn oldatokba helyezett halaknál, illetve miért voltak megfigyelhetőek egyes halaknál görcsökre utaló tünetek. [8]

A Ca a szervezet működése számára egy nélkülözhetetlen ion. Az egyik legfontosabb szerepe az izomműködés szabályozásában áll. Hiszen a Ca ionok troponin C fehérjéhez való kötődése teszi lehetővé a kereszthidak létrejöttét az aktin és miozin filamentumok között, ezáltal biztosítja a megfelelő izomműködést. Ebből kifolyólag a Ca hiánya izomgyengeséghez, izomgörcsökhöz és helytelen

A 4. ábrán látható, hogy a legnagyobb szívverésszám a kontroll csoportban volt mérhető. A cinket tartalmazó oldatokban, mind a Zn 0,5, mind a Zn 1 mg/L oldatban a szívverésszám kisebb volt, mint a kontrollban. Továbbá a Zn 1 mg/L oldatban kisebb volt az átlag szívverésszám, mint a Zn 0,5 mg/L oldatban. A fent leírt tünetek mellett egyes halaknál, melyeket a Zn 1 mg/L-es oldatba helyeztünk, görcsökre emlékeztető mozgások és rángások voltak megfigyelhetők, habár szignifikáns különbséget nem tapasztaltunk a különböző oldatokban tartott egyedek szívverésében ( $H = 2,872$ ;  $P = 0,238$ ).

izomműködéshez vezet. Ez igaz mind a szív-, mind a vázizmokra. Így a Zn kompetíciója a Ca ionokkal megmagyarázza az általunk kapott eredményeket, a pulzusszám terén, illetve arra is magyarázatot ad, miért figyeltünk meg egyes halaknál az egész testükre kiterjedő görcsöket a töményebb Zn oldatban.

Mindent egybevetve a magas Zn ion koncentráció a vízben csökkenti a guppi lárvák túlélési rátáját, csökkenti a pulzusszámot, rendszertelenné teszi a szívverést, sőt, akár egész testre kiterjedő izomgörcsöket és rángásokat idézhet elő. Eredményeink a korábbi vizsgálatok eredményeihez hasonlóan azt bizonyítják, hogy ugyan a Zn-re való érzékenység csökken a halak korával, de nem válnak teljes mértékben rezisztenssé rá. A korrallal történő rezisztencia-kialakulás mértékének ismeretében az újszülött halakon szerzett eredmények alkalmazhatóakká válnak a felnőtt halakra is. [2, 5]

**Köszönetnyilvánítás:** Ezúton szeretnék köszönetet nyilvánítani a Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft-nek a támogatásért, amely nélkül a kutatást nem lehetett volna kivitelezni. A Bay Zoltán Alkalmazott Kutatási Közhasznú Nonprofit Kft által rendelkezésünkre bocsátott Keyence VHX 2000-es mikroszkóp segítségével kiváló minőségű felvételeket készíthettünk.

#### REFERENCES

1. Alam, M.K., Maughan, O.E. The effect of malathion, diazinon, and various concentrations of zinc, copper, nickel, lead, iron, and mercury on fish. *Biological Trace Element Research*. 1992. 34(3): 225-236.
2. Clearwater, S.J., Farag, A.M. et al. Bioavailability and Toxicity of Dietborne Copper and Zinc to Fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology*. 2002. 132(3): 269-313.
3. Franco, J.L., Posser, T., Mattos, J.J., Sánchez-Chardi, A., Trevisan, R., Oliveira, C.S., Carvalho, P.S., Leal, R.B., Marques, M.R., Bairy, A.C., Dafre, A.L. Biochemical alterations in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) exposed to zinc: glutathione reductase as a target. *Mar Environ Res*. 2008. 66(1):88-9.
4. Giardina, A, Larson, S.E., Wisner, B., Wheeler, J., Chao, M. Long-term and acute effects of zinc contamination of a stream on fish mortality and physiology. *Environ Toxicol Chem*. 2009. 28(2):287-95. / URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937529>
5. Halver, J.E., Hardy, R.W. *Fish Nutrition*. 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press 2002. 264-294.
6. Kneis, P., Siegmund, R. Heart rate and locomotor activity in fish: Correlation and circadian and circannual differences in *Cyprinus carpio* L. 1976. 32(4):474-476.
7. Lenntech – Zinc and water: reaction mechanisms, environmental impact and health effects. Online source: <http://www.lenntech.com/periodic/water/zinc/zinc-and-water.htm> Accessed: 2015.12.14.
8. Reed, P., Richey, D, Roseboom, D. Acute Toxicity of Zinc to Some Fishes in High Alkalinity Water. Illinois Institute Of Natural Resources, Urbana 1980. <http://www.sws.uiuc.edu/pubdoc/C/ISWSC-142.pdf>
9. Witeska, M., Kosciuk, B. "The changes in common carp blood after shortterm zinc exposure." *Environmental Science and Pollution Research*. 2003. 10(5): 284-286.
10. WHO/SDE/WSH/03.04/17. Zinc in Drinking-water. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1996.
11. Zang Weiling, Ye Lin, Xu Xuancheng, Gong Shuchun. Toxic effects of zinc on four species of freshwater fish. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 1991. 9(1):64-70. <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF02849791>

**Influence of Zn on the survival rate and heart rate of guppy larvae**

**D. Holis, E. Simon**

**Abstract:** Nowadays the research of different heavy metals in surface and ground waters became a crucial part of ecological researches. Because of different anthropogenic factors that caused and still cause the pollution of all aquatic systems. In our research we used different concentrations of Zn solutions (0,5 and 1 mg/l) to study the influence of Zn on the guppy (*Poecilia reticulata*) survival rate and heart rate. The examinations were repeated 3 times. Mineral water with optimal ion concentration was used as control solution. Our results showed that Zn influences both the survival rate and the heart rate of guppy, though the Zn sensitivity decreases with age of fish fry. Both survival rate and heart rate significantly decreased in solutions containing Zn.

**Keywords:** *Poecilia reticulata*, toxicity, heavy metals