



ПЛОВДИВСКИ УНИВЕРСИТЕТ  
„ПАИСИЙ ХИЛЕНДАРСКИ”  
БИОЛОГИЧЕСКИ ФАКУЛТЕТ,  
КАТЕДРА „ЕКОЛОГИЯ И ОПАЗВАНЕ НА ОКОЛНАТА СРЕДА”

Костадинка Тодорова Тодорова

**”Влияние на тежки метали  
и комбинации от тях върху  
морфофизиологични показатели на шаран  
*Cyprinus carpio* Linnaeus 1758“**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД**

**ЗА ПРИДОБИВАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА И НАУЧНА  
СТЕПЕН „ДОКТОР” В НАПРАВЛЕНИЕ 4.3. БИОЛОГИЧЕСКИ  
НАУКИ**

**ДОКТОРСКА ПРОГРАМА „ЕКОЛОГИЯ И ОПАЗВАНЕ НА  
ЕКОСИСТЕМИТЕ”**

**НАУЧНИ РЪКОВОДИТЕЛИ**

**ПРОФ. Д-Р ИЛИАНА ВЕЛЧЕВА  
ДОЦ. Д-Р ЕЛЕНКА ГЕОРГИЕВА**

**ПЛОВДИВ, 2016**

Дисертационният труд съдържа 207 страници, 32 таблици и 26 фигури. Цитирани са 326 литературни източника, от които 29 на кирилица.

Изследванията от дисертационния труд са проведени в научни лаборатории към ПУ „Паисий Хилендарски”.

За целта на експеримента бяха използвани 1500 риби (720 за единичните експозиции и 780 за комбинираните). Над 450 индивида от тях бяха дисекцирани, а от всеки бяха изготвени по 10 среза за хистологичен анализ на хриле.

Защитата на дисертационния труд ще се състои на 15.06.2016г. в 15 аудитория на Биологическия факултет към ПУ „Паисий Хилендарски”, ул „Тодор Самодумов” №2 на открито заседание на научното жури.

Материалите по защитата са на разположение на интересуващите се в Централна библиотека към ПУ „Паисий Хилендарски”.

С безкрайна благодарност към научните ми ръководители и всички, които ми съдействаха и подкрепяха при реализирането на дисертационния труд!

## 1. УВОД

В резултат на интензивното развитие на промишлеността в последните години, всички среди за живот на организмите са антропогенно повлияни. Замърсителите в тях са с различна природа и като постоянни компоненти са т. нар. **тежки метали**. Те, поради особеностите в химизма, начина на действие и поведението им в екосистемите, се отнасят към групата на особено важните замърсители. Тяхното негативно въздействие се отразява от клетъчно до популационно ниво. Тези метали са особено опасни за живота и здравето, защото се характеризират с устойчивост, токсичност, биоаккумуляция и биомагнификация в живите организми (Велчева, 1998; Арнаудова и кол., 2008; Янчева, 2014). Разглежданият проблем се усложнява от факта, че в замърсена среда токсичните изменения са предизвикани най-често от комбинирано действие на няколко метала, които могат да си влияят взаимно по химичен, биохимичен начин, при метаболизма, на клетъчно и тъканно ниво.

За да се проследи влиянието на тези токсични вещества, е необходимо провеждане на научни изследвания с цел оценка на токсичността им. Необходимо е да се вземат под внимание и формите, под които металите се срещат в природата, и механизмите на комплексното им въздействие, което в голяма степен повлиява и тяхната токсичност. Този подход в голяма степен ще помогне на практическата работа, свързана с разработката на адекватни регионални и национални подходи за управлението на водните системи и екологичен мониторинг, ще допринесе също за извеждане оценка на антропогенното въздействие, свързано с тежките метали и предотвратяване на негативните последици от въздействието им.

## 2. ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

Направеният литературен обзор включва :

- замърсяване с тежки метали на повърхностни води;
- комплексно действие на тежките метали - синергизъм и антагонизъм;
- влияние на тежките метали върху риби – поведение, преживяемост, дихателни функции и хистоструктура на хрилете;
- характеристика на изследваните метали - химична, биотоксикологична, влияние върху рибите;
- характеристика на изследвания вид риби като стопански значим и обект за биомониторингови изследвания.

### 3. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на настоящото изследване е *ex-situ* да се проучи влиянието на някои тежки метали и комбинации от тях върху морфофизиологични показатели при шаран (*Cyprinus carpio*) като стопански значим вид.

За постигането на тази цел бяха поставени следните научно-изследователски задачи:

1. *Ex-situ* провеждане на тест за токсичност на кадмий, никел, олово и цинк с по пет нарастващи концентрации от всеки метал, както и тест за токсичност на комбинации от тези метали, с цел установяване на влиянието им върху поведението, преживяемостта и процесите, свързани с дишането и усвояването на кислород, установяване на синергични и антагонистични отношения при съвместното им влияние върху изследваните морфофизиологични показатели.

2. Хистологичен анализ за проучване влиянието на изследваните метали в зависимост от концентрациите и комбинациите от тях върху хистоструктурата на хриле.

3. Предлагане на математически модели за оценка токсичното действие на тежки метали върху преживяемостта и хистологичните изменения в хрилете на шаран.

## 4. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 4.1. Изследвани метали

В настоящото проучване бяха подбрани за изследване четири метала, които според Доклад на Басейнова дирекция - Пловдив (2009 г.), са приоритетни и характерни замърсители за целия водосбор на р. Арда.

След предварително проучване, избрахме внасянето на металите да се стане чрез техните нитратни соли като най-добре разтворими. Опитните концентрации на  $Cd^{2+}$  внесохме като -  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$ , на  $Pb^{2+}$  като  $Pb(NO_3)_2$ , на  $Ni^{2+}$  като  $Ni(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  и на  $Zn^{2+}$  като  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (MERCK). Изготвени бяха концентрирани изходни разтвори, от които чрез разреждане получихме по пет нарастващи концентрации за йоните на всеки метал представени в Таблица 1. За всяка серия тестваните разтвори внасяхме в опитни аквариуми условно номерирани от 1 до 5, а № 6 е винаги контролата, без внасяне на тежки метали във водата.

### Таблица 1.

*Опитни концентрации на тестваните метали*

аквариум	йони - концентрации			
	$Cd^{2+}$ mg/L	$Ni^{2+}$ mg/L	$Pb^{2+}$ mg/L	$Zn^{2+}$ mg/L
1	0,002	0,05	0,01	0,6
2	0,005	0,1	0,025	1,5
3	<b>0,01</b>	<b>0,2</b>	<b>0,05</b>	<b>3,0</b>
4	0,015	0,3	0,075	4,5
5	0,02	0,45	0,1	7
6	0	0	0	0

### 4.2. Опитни риби

Като експериментален вид риба и обект на настоящото изследване беше избран едногодишен шаран (*Cyprinus carpio*). Опитните риби от еднаква размерно-възрастова група ( $12 \pm 2$  cm и тегло 9,5 - 25 g) бяха доставяни от рибарник за промишлено отглеждане „Веникол” – ОД – гр. Кърджали. Изборът на вида бе направен поради преобладаващото му присъствие и култивирано отглеждане във водните обекти. Карапеткова & Живков (2010) описват шарана като изключително ценен стопански вид и най-важен рибовъден обект в света. Шаранът е предпочитан тест-обект и за експерименти в лабораторни условия поради лесната му адаптация (Ferreira, 2009; Hassan, 2011). Автори като Brumbaugh et al. (2005) и De Voeck et al. (2007) препоръчват шарана като подходящ

експериментален вид за целите на екологичната токсикология и за оценка на ефектите на замърсителите във водните екосистеми.

### **4.3. Опитна постановка**

Лабораторните опити бяха проведени трикратно.

• Бяха използвани шест аквариума със 100 L вода, оборудвани с нагреватели с терморелета и аератори, чрез които във водата се поддържаха постоянни параметри на:

• температура-  $20,2 \pm 0,30\text{C}$  -  $22, 6 \pm 0,40\text{C}$ ;

• наситеност с кислород - 88% – 100%;

• разтворен кислород – 7,0 mg/L – 9,6 mg/L;

Общата твърдост на водата беше ( $\text{CaCO}_3$  mg/L) - 2.8 °dH.

Контрола - аквариум с чиста дехлорирана вода без добавка на йони.

Рибите - без външни патологични изменения и наранявания, бяха разделени на случаен принцип по 10 индивида във всеки от аквариумите, заредени с дехлорирана чешмяна вода. След седемдневен аклиматизационен период, през който бе проследена преживяемостта и през който рибата не бе хранена, внесохме количествата от разтворените соли на металите. В комбинираните експозиции металите участваха със средните си концентрации, съответно –  $0,01 \text{ Cd}^{2+}\text{mg/L}$ ,  $0,2 \text{ Ni}^{2+}\text{mg/L}$ ,  $0,05 \text{ Pb}^{2+}\text{mg/L}$  и  $3,0 \text{ Zn}^{2+}\text{mg/L}$ . Продължителността на единичните експозиции бе 96 часа, а на комбинираните - 96 часа и 21 дни.

### **4.4. Поведение и преживяемост**

В хода на експеримента два пъти дневно следяхме за макроскопски изменения и промени в поведението на опитните риби (АРНА, 2005). Беше проследявана тяхната подвижност, местоположение в аквариума, отваряне и затваряне на хрилните капачета. В първите 12 часа поведението беше проследявано на всеки час, а до края на експеримента – 3 пъти на ден.

Преживяемостта беше отчитана на всеки 24 часа от експеримента, а мъртвите риби бяха отстранявани от аквариумите.

### **4.5. Интензивност на дишане**

Интензивността на дишането на рибите беше установявана след изтичане на експозицията, в аквариум пълен с дехлорирана чешмяна вода по методиката на Строганов (1962). Изследването бе проведено с преживелите индивиди от всички опитни концентрации и

комбинации отделно.

Интензивността на дишане на рибите беше определена 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 (g).

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

#### **4.6. Устойчивост на кислороден дефицит**

Устойчивостта на кислороден дефицит бе изследвана по методиката на Строганов (1962). Използвани бяха по два преживели индивида от всички концентрации и комбинации (предварително маркирани). Краят на изследването беше определяно при спиране хрилните движения на тестваните риби.

#### **4.7. Хистологично изследване на хриле**

При дисекцията на рибите бяха съблюдавани международните препоръки на Европейския парламент и комисия относно хуманното използване на животни за научни цели (Directive 2010/63/EU). Дисекцията на рибите, както и вземане на проби от хрилете бяха извършени по стандартна методика съгласно EMERGE Protocol (Rosseland et al., 2003). След декапитиране на опитните индивиди от хрилете бяха взети по две пластинки, те бяха обработени по класическа хистологична техника и включени в парафин по Алтман. Пробите от хриле бяха нарязани на ротационен микротом на срезове с дебелина 5-7  $\mu\text{m}$  и монтирани върху предметни стъкла. Стъклата бяха предварително обработени. От всяко блокче бяха подготвени по 10 парафинови среза, взети от различни нива, а не последователно и серийно. Целта беше хистологичните изменения да се проследят в максимално по-голяма част от взетата проба. Парафиновите срезове бяха депарафинирани, оцветени с хематоксилин и еозин (H&E), превърнати в траен препарат, като ги включихме в 1-2 капки канадски балсам и покрихме с покривно стъкло. За установяване на хистологични промени препаратите бяха прегледани и анализирани

на светлинен микроскоп. С помощта на дигитална камера снимахме установените морфологични изменения.

Всеки парафинов срез беше анализиран, определени бяха вида и степента на хистологичните изменения, каква част от повърхността заема съответното нарушение спрямо нормалната структура. Хистологичните промени оценихме и категоризирахме като използвахме количествена скала, модифицирана по Reebua et al. (2006). Тя позволява обективна оценка на цялостната структура на хрилете и ясно разграничаване на патологичните изменения от нормалната морфология. Оценката на хистологичните промени беше представена като средна стойност в процент на базата на всички изследвани срезове на проучените индивиди от различните експозиции с използваните токсиканти. Всяка стойност представлява специфична хистологична характеристика в хрилната структура на рибите и беше категоризирана както следва: *липсват хистологични изменения или наличие на изменения до 10% от нормалната хистологична структура – (0); леки хистологични изменения – 10-30% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80% от хистоструктурата на хрилете – (4).*

#### **4.8. Статистическа обработка на данните**

Данните от настоящото изследване бяха обработени статистически с програмния продукт - STATISTIKA (version 7.0 for Windows, StatSoft Inc., New York, NY, USA, 2004).

Въз основа на получените резултати бяха създадени математически модели на преживяемостта и на хистологичните изменения в зависимост от концентрацията на различни токсиканти, както и на комбинациите от тях.

Проследените физико-химични параметри на водата са представени като средна стойност със съответното стандартно отклонение (average±standart deviation).

Приложен беше Pearson Product-moment correlation анализ, за да се установи връзката между концентрациите на съответния тежък метал и преживяемостта на рибите в тях ( $p < 0,05$ ).

Приложените математически модели, разработени въз основа на статистически корелционен анализ са:



**I. Преживяемост** - за обработка на данните от изследването за преживяемост предлагаме статистически метод в математическото моделиране, чрез който изразяваме величината **Усреднен фактор на леталност - L**. Той се прилага след статистическа обработка на първичните данни от експеримента (определяне на средния брой отпаднали индивиди за всяка тествана концентрация от всички повторения). Предложената от нас функция е числен израз на степента на токсичност. Усредненият фактор на леталност **L** представлява отношение на усреднения брой отпаднали индивиди - **K**, към усреднените моларни концентрации от серията разтвори на тествания метал -  $\hat{C}_{Mi}$

$$L = K / \hat{C}_{Mi}, [\text{брой.L / mol}], \text{ където}$$

$\hat{C}_{Mi}$  е усреднената от приложените моларни концентрации, [mol/l]

**K** е усреднения брой отпаднали индивиди, който се получава, като отношение на сумата от отпадналите от всички тествани концентрации към общия брой заложен индивиди

$$K = \sum K_i / n$$

**n** - общ брой заложен индивиди (в нашия случай – 50)

**II. Усреднен фактор на хистологични изменения (F)** е математически модел, разработен въз основа на статистически корелационен анализ, който предлагаме за обработка на данните от установените хистологичните изменения в хрилете на шаран, инициирани от серии единични разтвори на тестваните метали с различни концентрации. След статистическа обработка на първичните данни от хистологичния анализ, предлагаме формулата за **Усреднен фактор на хистологични изменения (F)**. Той представлява отношение на усреднената степен на проследяваните хистологични изменения ( $\bar{H}$ ) към усреднените моларни концентрации на серията от разтвори с различни концентрации на йоните на тествания метал -  $\hat{C}_{Mi}$ .

$$F = \bar{H} / \hat{C}_{Mi}, [\bar{H}. L / mol], \text{ където}$$

$\hat{C}_{Mi}$  е усреднената от приложените моларни концентрации;  $C = \text{mol/l}$

$\bar{H}$  е усреднената степен на хистологичните изменения, която се получава, като отношение на сумата от всички степени на проявените хистологични изменения във всички концентрации  $H_{ij}$  към общия брой проследени изменения  $n$  за хрилете.

$$\bar{H} = \frac{1}{n} \sum_{i,j} H_{ij}$$

Във всяка серия имаме  $i$  – брой изследвани концентрации (в нашия случай максимално 5) и  $j$  - брой проследявани хистологични изменения (в нашия случай – 11)

Предложената от нас функция представлява числен израз на степента на проявените хистологични изменения в хрилете. По стойностите на коефициентите  $F$  могат да се сравнят различни метали по токсичността им. По-голямата стойност на  $F$  означава по-голяма токсичност.

**III.** За да определим **отношенията между два метала** при съвместна експозиция, на база резултати от хистологични анализи на хриле, приложихме **таблица на истинността**. Това е понятие от Булевата алгебра, ползваща алгебрични методи в логиката, където 0 се интерпретира като „невярно“, а 1- като „вярно“. За целите на нашето изследване представихме всяка комбинация в таблица, сравнявайки усреднените степени на проява на измененията на единичните експозиции с тези на комбинацията. Отношението между два метала се определя чрез матрица, след прилагане на логическата функция:

$$f(A, B) = \begin{cases} 1, & \text{ако } C > \max(A, B) \\ 0, & \text{ако } C \leq \max(A, B) \end{cases}$$

За целта приехме условно:

**A** - е числената мярка на хистологично изменение предизвикано от метала **A**;

**B** - е числената мярка на хистологично изменение предизвикано от метала **B**;

**C** - е числената мярка на хистологично изменение предизвикано от комбинацията **AB**

$f(A, B)$  функция от хистологично изменение предизвикано от комбинацията **A** и **B** при съвместна експозиция, като поне едно от трите изменения трябва да е по-голямо от 0.

Когато  $f(A, B) = 1$  това означава, че отношението е синергизъм, а когато е 0 - антагонизъм. Единственият случай, който е изключение от горната дефиниция, е когато няма хистологично изменение и в трите случая, тогава отношението определяме като индиферентност и  $f(A, B) = 0$ . Въз основа на матрицата определяме отношението между металите за всяко конкретното изменение от проследените. Обобщението на получените резултати служи за определяне на преимуществените отношения между металите в хрилете.

## **5. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ**

### **5.1. Физико-химични анализи на водата.**

#### **Резултати**

Една от задачите на експеримента е да се проследи как наличието на тежки метали във вода влияе върху някои нейни физико-химични параметри, както и дали те се променят във времето и в каква посока.

Общата твърдост на водата ( $\text{CaCO}_3$  mg/L) определихме в началото на експеримента като 2.8 dH, което я отнася към меките води.

Ежедневно във всички аквариуми отчитахме температура, рН, електропроводимост и съдържание на кислород.

Преди началото на *ex-situ* експеримента ние изследвахме как проследените параметри на водата се повлияват от добавените количества метали без риби. Целта на изследването беше получените данни да послужат като база за сравнение с резултатите от *ex-situ* експеримента с шарани.

#### **Обсъждане**

Въз основа на получените резултати можем да твърдим, че тестваните тежки метали – кадмий, олово, никел и цинк в изследваните концентрации не влияят съществено върху проследяваните физико-химични параметри на водата – рН, електропроводимост и съдържание на кислород. Затова считаме, че при лабораторни експерименти с тези концентрации на металите и вода с физико-химични характеристики - 2-3 dH, рН~7, температура - 19,0-23°C, наблюдаваните промени при тестваните хидробионти ще се дължат предимно на токсичното действие на металите.

### **5.2. Поведение и преживяемост**

#### **Резултати**

##### **5.2.1.1. Поведение при единични експозиции**

В хода на настоящото изследване проучихме поведението на опитните риби в аквариумите с различни концентрации на тестваните тежки метали. В първите 6 часа от началото на експеримента наблюдавахме еднакви поведенчески реакции при опитните риби от всички концентрации на четирите метала. По-силно те бяха изразени при по-високите концентрации. Установихме проява на поредица от реакции, които водят до асфикция. Наблюдавахме възбудимост, изразяваща се чрез: ускоряване движенията на хрилните капачета, нарастване активността на рибите, стремеж към повърхността на

водата, частични подскоци и стрелкаци се движения, удари в стените на аквариумите. Наблюдавахме и неспецифични и забавени движения, характерни за асфикция: положение в долната половина на аквариума, апатични движения, вертикално положение на рибите с главата надолу, рядко отваряне на хрилните капачета, лягане на една от страните.

По дъното на аквариумите, особено при по-високите концентрации на кадмия, наблюдавахме наличие на люспи. За опаднали люспи съобщават и Yoshitomi et al., (1998) при експеримент с кадмий. Според тях, причината за това са деформации в базалните краища на люспите на шаран, причинени от кадмиева експозиция. По телата на отпадналите риби при тази експозиция наблюдавахме жълто-зелени петна.

### **5.2.1.2. Поведение при комбинации**

#### При експозиции за 96 часа

Най-силно изразени реакции на възбуда бяха установени при комбинации - Cd+Zn, Ni+Pb, Ni+Pb+Zn и Cd+Ni+Pb+Zn. С най-продължителен период на възбудимост бяха рибите от комбинация Pb+Zn. Първи забавиха движенията си опитните шарани от комбинациите Ni+Pb+Zn и Cd+Ni+Zn. По телата на някои от рибите от комбинацията Cd+Ni+Pb+Zn наблюдавахме слуз, движенията бяха ограничени в долната половина на аквариума.

#### При експозиции за 21 дни

При проследяване поведението на опитните индивиди при комбинации за 21 дни бяха наблюдавани същите етапи на поведение до 96<sup>-ия</sup> час. През целия период на експозиция най-подвижни бяха отново рибите от комбинация Pb+Zn. Рибите от комбинацията с четирите метала запазиха разположението си в долната половина на аквариума. Покритието от слуз се прояви по-масово и се засили. Частично наблюдавахме резки тикови движения на единични екземпляри в различните комбинации. Тези движения обикновено предшестваха отпадането на рибите.

#### Обсъждане

Наблюдаваните промени в поведението на тестваните риби като възбудимост и летаргия бяха по-силно изразени при експозициите с единичните метали, отколкото при комбинациите. Вероятно причината за това е взаимното влияние на металите, което ние определяме по-скоро като антагонистично, намаляващо токсичния ефект. В подкрепа на това наше мнение са и констатираните промени във външния вид - при единичните експозиции по-често

наблюдавахме слуз по телата на шараните, особено при тези преди отпадане. Най-рано проявени и най-силно изразени бяха поведенческите реакции при кадмиевите експозиции, следвани от цинковите и оловните, а най-слабо – при никеловите експозиции. Поведенческите реакции при комбинациите от три и четири метала бяха по-силно изразени, отколкото при комбинациите от два метала. По дъното на аквариумите от кадмиевите експозиции констатирахме наличието на опадали люспи.

## **5.2.2. Преживяемост**

### **Резултати**

#### **5.2.2.1. Преживяемост при единични метални експозиции**

В хода на експеримента беше проследен броя на преживелите индивиди във всяка от тестваните концентрации. Резултатите са представени в Таблицы I, II, III и IV от Приложението.

Първите отпаднали индивиди бяха още след 24<sup>-ия</sup> час от началото на експеримента - от кадмиевата експозиция при концентрация 0,01 mg/L Cd<sup>2+</sup> - 3 индивида и от оловната - при концентрация 0,025 Pb<sup>2+</sup> mg/L - 1 индивид.

За рибите подложени на оловна експозиция е критичен 48<sup>-ият</sup> час. От концентрации 0,025, 0,05, 0,075 и 0,1 mg/L Pb<sup>2+</sup> отпадат по 1 екземпляр. Най-значим този час е отново за рибите от кадмиевата експозиция, при които от концентрация 0,01 mg/L Cd<sup>2+</sup> отпадат 5, а от 0,02 mg/L Cd<sup>2+</sup> - 8 екземпляра.

През 72<sup>-ия</sup> час приключи експозицията за кадмиевите концентрации 0,01 и 0,02 mg/L Cd<sup>2+</sup>, като от всяка от тях отпаднаха последните 2 екземпляра. По един индивид отпадна от 0,005 mg/L Cd<sup>2+</sup> и от 0,075 и 0,1 mg/L Pb<sup>2+</sup>. През това време от експеримента отпаднаха и първите индивиди от цинковата експозиция - един индивид от 1,5 mg/L Zn<sup>2+</sup>, шест индивида от 3,0 Zn<sup>2+</sup> mg/L и седем от 7,0 mg/L Zn<sup>2+</sup>. Според нас, критичният час за цинковата серия от експозиции е 72<sup>-ият</sup> час. Най-вероятно токсичното действие на цинка в тестваните концентрации не се проявява така бързо, както при кадмия и оловото.

За индивидите, подложени на концентрациите на цинка отново най-критичен се оказа 96<sup>-ият</sup> час. Докато от 0,015 mg/L Cd<sup>2+</sup>, 0,025 и 0,05 mg/L Pb<sup>2+</sup> отпадат по един индивид, от 0,1 mg/L Pb<sup>2+</sup> - два, то при цинка отпадат общо 10 индивида – от 1,5 и 4,5 Zn<sup>2+</sup> mg/L – по 1, от 7,0 Zn<sup>2+</sup> mg/L – 2, а от 3,0 Zn<sup>2+</sup> mg/L отпадат всички останали шест. Това е времето и на единствения отпаднал индивид от никеловата експозиция.

Като цяло, експериментът приключи в 96<sup>-ия</sup> час с най-добра преживяемост за рибите от експозициите на никела – 98%, следван от рибите от експозициите на оловото с 80%. Преживяемостта от експозициите с кадмий и цинк е еднаква – 56%, но постигната с различна динамика на отпадане.

#### **5.2.2.2. Преживяемост на шаран при комбинации от изследваните метали**

Резултатите от това изследване са представени сравнително за 96 часа и 21 дни в Таблица V от Приложението.

##### При експозиции за 96 часа

Всички комбинации от два и три метала приключиха 96-часовата експозиция със 100% преживяемост на опитните шарани. Само комбинацията от четирите метала приключи със 70% преживяемост на индивидите. След 24<sup>-ия</sup>, 48<sup>-ия</sup> и 72<sup>-ия</sup> час отпадна по един индивид с типични признаци на асфикция и изтощение.

##### При експозиции за 21 дни

При проследяване преживяемостта на рибите по време на 21-дневна експозиция на комбинации от по два изследвани метала, установихме 80%<sup>a</sup> преживяемост за комбинацията Cd+Pb и 90% преживяемост за комбинациите Cd+Ni и Ni+Zn. За рибите от всички други комбинации от два метала отчетохме 100% преживяемост за периода.

От комбинациите с повече от два метала прави впечатление отчетената различна преживяемост. Единствено комбинацията от Ni+Pb+Zn приключи със 100% преживяемост, а комбинацията Cd+Pb+Zn с 0%.

##### Обсъждане

На базата на отчетената преживяемост при единичните и комбинирани експозиции за 96 часа можем да обобщим, че шарана от нашата размерно-възрастова група има по-добра преживяемост при комбинирани експозиции на тестваните метали, отколкото при техните единични. По изразената в проценти преживяемост при единичните експозиции, можем да подредим тестваните метали в следния низходящ ред на преживяемост: никел<олово<цинк=кадмий.

Като сравним преживяемостта при комбинациите от два и повече метала, резултатите показват, че по-добра такава имат комбинациите от два метала. Най-вероятно, при комбинациите с повече от два метала протичат допълнителни въздействия, утежняващи здравословното състояние. Отчетените от нас резултати са основание да подкрепим казаното от Shuhaimi-Othman & Pascoe (2007), че

въздействието на тежки метали в трикомпонентни смеси е по-сложно отколкото при единичните експозиции или при двукомпонентните смеси. Това наше мнение се основава на резултатите от 21-дневната експозиция, тъй като 96-часовата приключи без отпадане на индивиди от комбинациите (с изключение на тази с четирите метала).

Сравнявайки данните от 96-часовите с 21-дневни комбинирани експозиции, установихме намаляване на преживяемостта с нарастване на времето. Ние предполагахме, че причината за това е комплексна - както от задълбочаване уврежданията на хрилете, така и от вероятно негативното въздействие на металите върху други органи.

Според нас, преживяемостта на рибите от нашия експеримент се определя от комплексното действие на тестваните метали като стресори и като токсиканти, влошаващи здравословното състояние на рибите като цяло. По-добрата преживяемост при комбинациите тълкуваме като признак за антагонистични отношения на тестваните метали.

### **5.2.3. Сравнителен анализ за преживяемост чрез прилагане Усреднен фактор на леталност**

За обработка на данните от изследването за преживяемост приложихме математически модел, чрез който изразяваме величината **Усреднен фактор на леталност - L**. По получените стойности за параметъра L сравнихме токсичността на тестваните метали. По-голямата стойност на L означава по-голяма токсичност. Подредени по намаляващи стойности на L тестваните метали образуват следния ред: Cd –  $47 \cdot 10^6$ ; Pb –  $7,9 \cdot 10^6$ ; Zn –  $0,09 \cdot 10^6$ ; Ni –  $0,05 \cdot 10^6$ . Получените стойности за L показват, че кадмият е най-токсичен от четирите тествани метала.

При вече изчислен L за сериите от разтвори на всеки от четирите метала, сравнихме токсичността на тестваните метали по моларната концентрация, предизвикваща усреднен брой на отпадане  $K=1$ . Усреднените моларни концентрации на тестваните метали  $\hat{C}_{Mi}$  показват количеството молове от токсиканта, разтворени в 1 L вода, предизвикващи отпадане на 10% от заложените индивиди [mol/L]. Получените стойности за  $\hat{C}_{Mi}$  са съответно: Ni –  $20 \cdot 10^{-6}$ ; Zn –  $11,1 \cdot 10^{-6}$ ; Pb –  $0,13 \cdot 10^{-6}$ ; Cd –  $0,02 \cdot 10^{-6}$ .

Получените стойности за моларните концентрации на металите показват токсичността на тестваните метали. Отново се потвърждава по-голямата токсичност на кадмия спрямо другите метали. Той може да предизвика отпадане на 10% от заложените индивиди с най-ниска усреднена концентрация от четирите изследвани метала.

Изчислихме и друг показател - за **преживяемост (V)**, изразен чрез количеството вода в литри, в които е разтворен 1 mol от токсиканта и при което 90% от индивидите оцеляват. Той е реципрочен на количеството метални йони, причиняващо отпадане на 10% от опитните индивиди.

$$V=1/\hat{C}_{Mi}; \hat{C}_{Mi} = K /L ; V = L /K, [L/mol], \text{ където}$$

$K=1$ , а  $L$  – предварително изчислено за серия от разтвори.

Получените числа показват количеството вода в литри, в които е разтворен 1 mol от токсиканта и при което 90% от индивидите оцеляват. Подредени по нарастващи стойности за  $V$  металите се подреждат така: Ni –  $1/20 \cdot 10^{-6} = 50000$  L вода; Zn –  $1/11,1 \cdot 10^{-6} = 90090$  L вода; Pb –  $1/0,13 \cdot 10^{-6} = 7692307$  L вода; Cd –  $1/0,02 \cdot 10^{-6} = 50000000$  L вода. От получените стойности се вижда, че един мол вещество от кадмия може да интоксикара най-голямо количество вода, при което 90% от индивидите от нашата размерно-възрастова група да оцелеят. Подредени във възходящ ред по количеството вода, което могат да интоксикират металите, отново образуват ред на токсичност. Това е още един вариант да се покаже, че кадмият е най-токсичният от четирите тествани метала.

Въз основа на представените редове, можем да подредим металите по токсичност така: никел<цинк<олово<кадмий.

### 5. 3. Интензивност на дишане

#### Резултати

Резултатите от проведеното изследване върху усвоен кислород и интензивност на дишане на опитните риби за единични експозиции са представени в Таблица 2.

#### Таблица 2.

*Стойности на усвоения кислород и интензивността на дишане за тествания период от 96 часа при различните концентрации на металите*

Аквариум №	1		2		3		4		5		6	
	Q <sub>2</sub> mgO <sub>2</sub>	I mg/g	Q <sub>2</sub> mgO <sub>2</sub>	I mg/g	Q <sub>2</sub> mgO <sub>2</sub>	I mg/g	Q <sub>2</sub> mgO <sub>2</sub>	I mg/g	Q <sub>2</sub> mgO <sub>2</sub>	I mg/g	Q <sub>2</sub> mgO <sub>2</sub>	I mg/g
<b>Cd<sup>2+</sup></b>	2,43	0,020	2,84	0,022	0*	0	3,50	0,027	0*	0	0,93	0,008
<b>Ni<sup>2+</sup></b>	1,55	0,011	2,30	0,010	1,55	0,008	1,60	0,012	2,37	0,010	2,20	0,010
<b>Pb<sup>2+</sup></b>	1,50	0,028	1,52	0,043	1,45	0,029	1,45	0,034	0,94	0,019	1,10	0,025
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	0,50	0,022	0,44	0,015	0*	0	0,35	0,016	0,33	0,034	0,63	0,016

\*- няма представители поради 100% отпадане на опитните индивиди за 96-часовата експозиция.



Въз основа на данните за количеството консумиран кислород и интензивността на дишане направихме оценка за въздействието на тежките метали върху хрилете.

### **Обсъждане**

#### **Единични експозиции**

От Таблица 2 се вижда, че връзката: концентрация на метални йони ↔ усвоен кислород ↔ интензивност на дишане, е най-ясно изразена при серията кадмиеви експозиции. Регистрираните от нас стойности за усвоен кислород и интензивност на дишане са в права пропорционалност с концентрацията на кадмия, а изчислената въз основа на резултатите стойност на коефициента на Pearson доказва корелация.

Данните от нашия експеримент показват, че по-голямото количество усвоен от рибите кислород е резултат от повишена интензивност на дишане. Най-вероятно, това означава, че по-високите концентрации на кадмий предизвикват по-силен кислороден стрес в организма на рибите, проява на който са вече отбелязаните наблюдавани промени в поведението на рибите от тази експозиция. Според Ferrari et al. (2011), това е резултат от компенсация на увреждания, причинени от метала. Ние приемаме, че отчетената висока интензивност при нашия експеримент най-вероятно е следствие от стреса и от задействания компенсаторен механизъм към токсичността на кадмия и предизвиканите дихателни проблеми.

За разлика от кадмия, при теста с никела и олово не установихме ясна тенденция за промяна в количеството усвоен кислород и интензивността на дишане при рибите от опитните концентрации. При цинковата експозиция установихме, че с повишаване концентрацията на метала, количеството на усвоения от рибите кислород намалява. Статистическата обработка показва, че има корелация между концентрацията на метала и изследвания процес ( $p < 0,05$ ). Повишеният интензитет на дишане вероятно е в следствие на прекомерното увреждане на хрилете и на организма като цяло от тежкия метал.

#### **Комбиниранни експозиции за 96 часа**

Тъй като в хода на нашето изследване отчетохме различия в отчетения консумиран кислород, то ние приехме, че по-малкото количество усвоен кислород в сравнение с контролата подсказва за непълноценно дишане, най-вероятно поради негативното въздействие на металите или комбинациите от тях върху хрилете. По-високата интензивност на дишане от контролата бихме могли да приемем за

компенсаторен механизъм за набавяне необходимото количество кислород, което нараства в състояние на стрес, или за компенсация на увреждания в хрилете чрез учестване на дишането. Според нас, получените данни показват, че между показателите за усвоен кислород и интензитет на дишане съществува пропорционалност, което означава, че по-високите количества усвоен кислород се дължат на по-интензивно дишане.

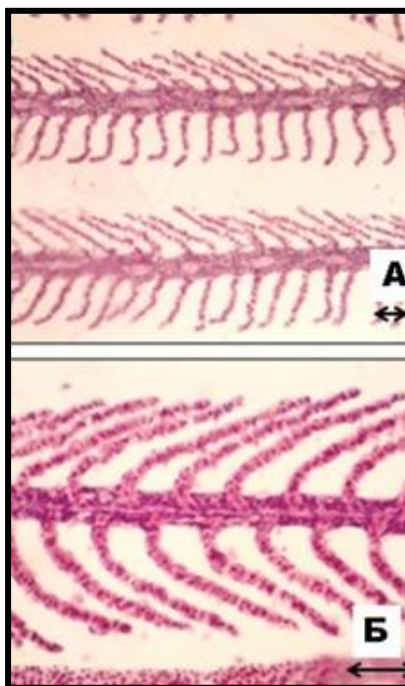
Сравняване на резултатите от изследванията за усвояване на кислород и интензивност на дишане при единичните експозиции с тези от комбинациите с два и повече метали ни помага да определим наличието на отношения между металите при общата им експозиция.

#### Комбинираны експозиции за 21 дни

Според нас, данните от изследването за 21 дни показват, че всички комбинации от тестваните метали предизвикват стрес, отговор на който е по-интензивното дишане на рибите в сравнение с тези от контролата.

### **5.4. Промени в хистоструктурата на хрилете**

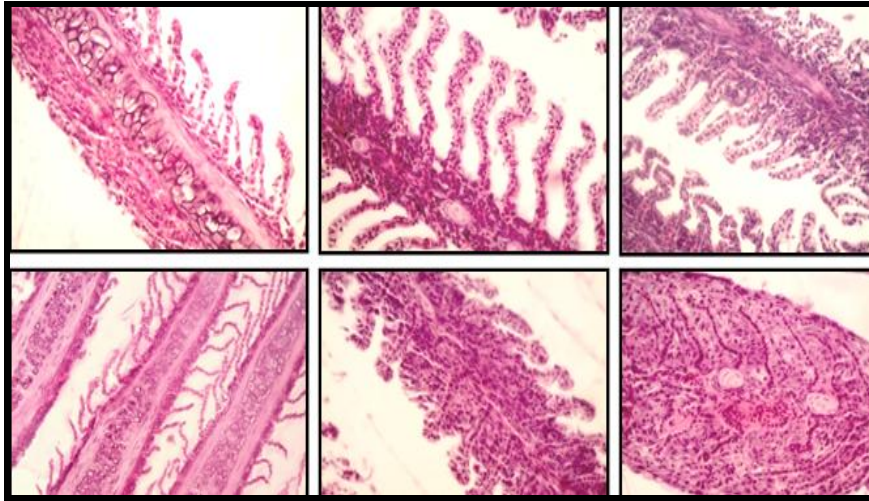
От направените хистологични анализи на хрилете на шарани (*Cyprinus carpio*), след проведени *ex-situ* тестове за токсичност с тежки метали, установихме промени по хрилната им повърхност. Използваните концентрации и комбинации от тестваните метали кадмий, никел, олово и цинк като цяло предизвикват изменения в хрилния епител и в кръвоносната система на органа. Оценка на тези изменения направихме по представената количествена скала и сравнихме с контролните групи риби. При анализирането на парафиновите срезове от контролните групи риби установихме най-често липса на хистологични изменения, като клетъчните компоненти, първичните и вторичните ламели, както и кръвоносните съдове се характеризираха с нормална организация (Фиг.1.). Само в отделни, единични случаи, откривахме нарушение на хрилния епител, но в много лека степен. Като имахме предвид използваната количествена скала, хистоструктурата на хрилете от контролните групи определихме като нормална, а именно – липса на хистологични изменения (0).



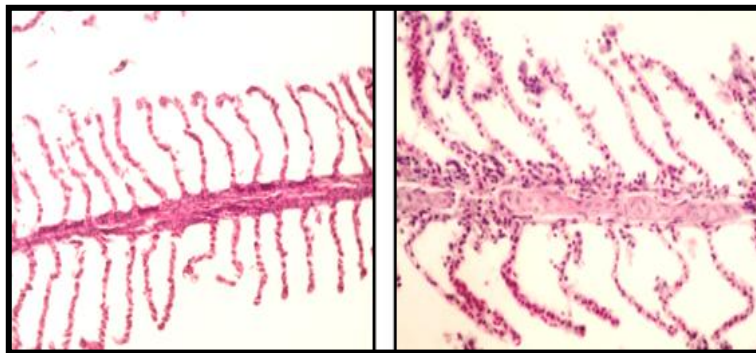
**Фиг. 1.** Нормална хистоструктура на хриле от шаран (*Cyprinus carpio*); А x200;  
Б x400, Н&Е

Резултатите от хистологичните анализи показаха сходни по вид изменения, изразени в различни степени при отделните метали и комбинациите от тях.

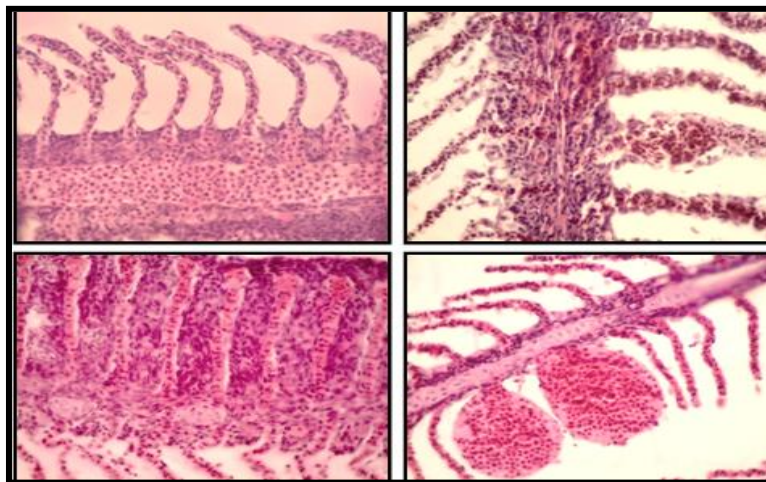
Установените от нас хистологични изменения в хрилете на рибите от експозициите с йони на изследваните тежки метали класифицирахме в три основни групи: **1) пролиферативни изменения** - ламеларен лифтинг, оток (едем), пролиферация на хрилния епител, включваща различните типове клетки, покриващи филаментите и вторичните ламели (покривни плоски, невроепителни, мукозни, хлоридни, пиларни) и фузия; **2) дегенеративни изменения** в покривния епител на хрилните ламели; **3) изменения в кръвоносните съдове** - вазодилатация в основния кръвоносен съд и вторичните ламели, и аневризми.



1) пролиферативни изменения – ламеларен лифтинг, оток (едем), пролиферация на хрилния епител, включваща различните типове клетки, покриващи филаментите и вторичните ламели и фузия



2) Дегенеративни изменения в покривния епител на хрилните ламели



3) Изменения в кръвоносните съдове – вазодилатация в основния кръвоносен съд и вторичните ламели, и аневризми.

## Резултати

Резултатите от влиянието на различни концентрации от йоните на тестваните метали и комбинациите от тях върху хрилната структура са представени в Таблици 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

### Таблица 3.

*Хистологични изменения в хриле на шаран след 96-часова кадмиева експозиция*

Хистологични изменения	Контрола	Концентрация mg/L Cd <sup>2+</sup>				
		0,002	0,005	0,01	0,015	0,02
Епителен лифтинг	0	0	1	-	1	-
Оток	0	0	0	-	0	-
Пролиферация-сквамозен епител	0	4	2	-	4	-
Фузия	0	3	3	-	3	-
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	1	-	1	-
Дегенерация	0	0	0	-	1	-
<u>Вазодилатация-вторични ламели</u>						
- по дължина	0	1	1	-	1	-
- в базалната част	0	0	0	-	0	-
- в апикалната част	0	0	0	-	1	-
Аневризми	0	0	0	-	0	-
Вазодилатация-основен синус	0	0	0	-	0	-

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80% от хистоструктурата на хрилете – (4)

### Таблица 4.

*Хистологични изменения в хриле на шаран след 96-часова никелова експозиция*

Хистологични изменения	Контрола	Концентрация mg/L Ni <sup>2+</sup>				
		0,05	0,1	0,2	0,3	0,45
Епителен лифтинг	0	1	1	1	1	1
Оток	0	1	1	1	1	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	3	3	2	3	2
Фузия	0	2	2	2	2	2
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	1	2	2	2
Дегенерация	0	0	1	1	1	1
<u>Вазодилатация-вторични ламели</u>						
- по дължина	0	2	2	2	2	2
- в базалната част	0	0	0	0	0	0
- в апикалната част	0	0	1	0	0	1
Аневризми	0	1	1	1	1	1
Вазодилатация-основен синус	0	0	1	0	1	1

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80% от хистоструктурата на хрилете – (4)

### **Таблица 5.**

*Хистологични изменения в хриле на шаран след 96-часова оловна експозиция.*

Хистологични изменения	Контрола	Концентрация mg/L Pb <sup>2+</sup>				
		0,01	0,025	0,05	0,075	0,1
Епителен лифтинг	0	1	1	1	0	1
Оток	0	1	0	1	0	0
Пролиферация-сквамозен епител	0	2	2	2	3	2
Фузия	0	2	2	2	2	2
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	2	2	1	2	2
Дегенерация	0	1	1	1	0	1
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>						
- по дължина	0	1	1	2	0	1
- в базалната част	0	0	1	1	0	0
- в апикалната част	0	0	1	1	0	0
Аневризми	0	1	0	1	0	1
Вазодилатация-основен синус	0	0	0	1	0	0

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80% от хистоструктурата на хрилете – (4)

### **Таблица 6.**

*Хистологични изменения в хриле на шаран след 96-часова цинкова експозиция*

Хистологични изменения	Контрола	Концентрация mg/L Zn <sup>2+</sup>				
		0,6	1,5	3,0	4,5	7,0
Епителен лифтинг	0	0	0	-	0	-
Оток	0	1	0	-	0	-
Пролиферация-сквамозен епител	0	2	1	-	0	-
Фузия	0	2	1	-	1	-
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	2	2	-	0	-
Дегенерация	0	3	3	-	4	-
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>						
- по дължина	0	1	1	-	0	-
- в базалната част	0	0	1	-	0	-
- в апикалната част	0	0	0	-	1	-
Аневризми	0	2	1	-	0	-
Вазодилатация-основен синус	0	1	1	-	0	-

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80% от хистоструктурата на хрилете – (4)

## Таблица 7.

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при двойните комбинации след 96-часова експозиция.

Хистологични изменения	Конт рола	Концентрации mg/L					
		0,01 Cd +0,2 Ni	0,01 Cd +0,05 Pb	0,01 Cd +3,0 Zn	0,2 Ni +0,05 Pb	0,2 Ni +3,0 Zn	0,05 Pb +3,0 Zn
Епителен лифтинг	0	0	1	1	1	1	1
Оток	0	1	1	1	1	1	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	2	0	2	1	1	1
Фузия	0	0	0	0	2	1	1
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	0	0	1	0	2	1
Дегенерация	0	1	0	0	1	1	1
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	0	0	3	1	1	1
- по дължина	0	0	0	1	1	1	1
- в базалната част	0	0	1	1	0	1	0
- в апикалната част	0	0	1	1	1	1	1
Аневризми	0	0	1	1	1	1	1
Вазодилатация-основен синус	0	2	2	2	0	1	1

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (4)

## Таблица 8.

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинациите с повече от два метала при 96-часова експозиция

Хистологични изменения	Контрола	Концентрация mg/L				
		0,01Cd +0,2Ni +0,05 Pb	0,01 Cd +0,2 Ni +3,0 Zn	0,01 Cd +0,05 Pb +3,0 Zn	0,2 Ni +0,05 Pb +3,0 Zn	0,01Cd+0,2Ni + 0,05Pb+3,0Zn
Епителен лифтинг	0	1	1	0	0	1
Оток	0	1	1	1	1	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	3	2	2	3	1
Фузия	0	1	0	0	1	1
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	0	1	1	1
Дегенерация	0	0	0	1	1	1
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	1	1	2	2	1
- по дължина	0	0	0	1	1	0
- в базалната част	0	1	0	1	1	0
- в апикалната част	0	1	0	1	1	0
Аневризми	0	1	0	1	1	0
Вазодилатация-основен синус	0	1	0	0	1	0

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (4)

## Таблица 9

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинации от два метала след 21-дневна експозиция

Хистологични изменения	Контр рола	Концентрации mg/L					
		0,01 Cd +0,2 Ni	0,01 Cd +0,05 Pb	0,01 Cd +3,0 Zn	0,2 Ni +0,05 Pb	0,2 Ni +3,0 Zn	0,05Pb +3,0 Zn
Ламеларен лифтинг	0	1	1	1	1	1	2
Оток	0	1	1	1	1	0	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	2	2	1	2	2	2
Фузия	0	1	2	0	2	1	1
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	1	1	0	0	2
Дегенерация	0	1	2	0	0	0	1
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	1	2	1	1	1	2
- по дължина							
- в базалната част	0	0	0	1	0	0	0
- в апикалната част	0	1	0	0	1	0	0
Аневризми	0	0	0	1	0	1	1
Вазодилатация-основен синус	0	1	0	0	0	0	0

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (4)

## Таблица 10

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинациите с повече от два метала след 21-дневна експозиция.

Хистологични изменения	Контрола	Концентрация mg/L				
		0,01Cd +0,2Ni +0,05 Pb	0,01 Cd +0,2 Ni +3,0 Zn	0,01 Cd +0,05 Pb +3,0 Zn	0,2 Ni +0,05 Pb +3,0 Zn	0,01Cd +0,2Ni + 0,05Pb+3,0Zn
Ламеларен лифтинг	0	2	1	-	2	1
Оток	0	1	1	-	2	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	3	1	-	2	2
Фузия	0	1	0	-	0	0
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	1	-	2	2
Дегенерация	0	1	1	-	0	0
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	1	1		1	1
- по дължина						
- в базалната част	0	1	0	-	0	0
- в апикалната част	0	0	1	-	0	0
Аневризми	0	1	1	-	0	1
Вазодилатация-основен синус	0	1	0	-	0	0

липса на хистологични изменения, т.е. нормална хистологична структура – до 10% (0); леки хистологични изменения – 10-30<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете - (1); средни хистологични изменения – 30-50<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (2); тежки хистологични изменения – 50-80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (3); много тежки хистологични изменения – над 80<sup>0</sup>% от хистоструктурата на хрилете – (4)



### Обсъждане

**Кадмий** - липсват данни за 0,01 и 0,02 mg/L Cd<sup>2+</sup>, поради 100%<sup>тно</sup> отпадане на опитните индивиди от тези експозиции. От констатираните изменения при хистологичните анализи можем да обобщим, че кадмият предизвиква изменения в хрилния епител и в кръвоносните съдове, като най-изявени са пролиферацията на сквамозния епител, фузията и хиперплазията, обхващаща вторичните ламели. Комбинациите на измененията и степените им на изява варират при различните концентрации на кадмиевите йони. Не е намерена ясно изразена тенденция между степента на изява на отделни хистологични изменения и концентрацията. Установено е увеличаване разновидностите на хистологичните изменения с увеличаване на концентрацията на кадмиевите йони. Според нас, за тестваните риби те са своеобразни защитно-адаптивни механизми за намаляване вредното действие на метала. Всяка по-висока концентрация «отключва» още защитни изменения, които да препятстват негативното въздействие на токсиканта.

**Никел** - при наблюдаване на парафиновите срезове от хриле на тестваните индивиди шаран, третирани с никелови йони, установихме разнообразие в измененията и техните степени на проява. Резултатите ни дават основание да считаме, че и петте изследвани концентрации на никелови йони предизвикват пролиферативни и дегенеративни изменения, както и такива в кръвоносните съдове. По-масово и в по-висока степен са проявени пролиферативните изменения както в първичните, така и във вторичните ламели. Наблюдава се и морфологична промяна на епителните клетки, които от плоски се преобразуват в кубични. Това още веднъж подсказва за активиране на пролиферативните процеси в областта на покривния епител. Като цяло, ясно изразена тенденция на пропорционална зависимост между използваните концентрации и степента на проява на измененията не беше установена. Изключение откриваме само при хиперплазията на хрущялната тъкан, която в трите високи концентрации е с една степен по-висока от предходните, а именно - умерена. Различията на някои наши резултати от такива на други автори са в подкрепа на изказаното от Birge & Black (1990), според които токсичността на никела върху водните организми се различава значително в зависимост от вида организми, твърдост и рН на водата (по Palanisamy et al., 2011).

**Олово** - резултатите от оловните експозиции показваха различия в степента на изява на всяко хистологично изменение в изследваните

риби. От резултатите за влиянието на тестваните концентрации олово се вижда (Табл. 5), че измененията, засягащи хрилния епител, преобладават над тези от кръвоносната система, а пролиферативните процеси преобладават над дегенеративните и циркуляционните.

Наблюдаваните лифтинг и оток са изменения на хрилния епител, посочени от редица автори като първа защитна реакция на рибите срещу токсиканти (Olojo et al., 2005; Khan et al., 2011; Adeogun, 2012). Установяването им в екземпляри от различни концентрации на оловото потвърждава вредното въздействие на метала. Посоката на адаптация е по-скоро към увеличаване дебелината на покривния епител, отколкото към неговото изтъняване. Като цяло, имайки предвид всички наблюдавани нарушения, не установихме зависимост между измененията, тяхната степен на изразеност и концентрацията на оловните йони, за разлика от Adeyemo (2008).

**Цинк** - в хрилете на опитните индивиди шаран от цинковите експозиции, наблюдаваните хистологични изменения бяха проявени най-често от лека до много тежка степен (Табл. 6). Липсват данни за 3,0 и 7,0 mg/L Zn<sup>2+</sup>, поради 100% отпадане на опитните индивиди от тези експозиции. Получените резултати ни дават основание да определим дегенерацията като преимуществено изменение при цинковата експозиция. Пролиферативните изменения са представени от хиперплазия на хрилния епител и хрущялната тъкан, както и от фузия, основно в лека и умерена степен. Същата изявеност имат и измененията в кръвоносните съдове. Като цяло, получените резултати на хистопатологични изменения при 96-часова експозиция, не показват зависимост между концентрацията на метала и степента на изменение.

### **Сравнителен анализ чрез прилагането на Усреднен фактор на хистологични изменения (F)**

Приложихме математически модел за изчисляване усреднения фактор на хистологичните изменения в хрилете – F. Чрез него, ние сравнихме степента на токсичност на отделните тествани тежки метали. След прилагането на формулата за F за всеки метал, получихме следните стойности за него: кадмий –  $1,3 \cdot 10^7 \bar{H} \cdot L / mol = 13 \cdot 10^6 [\bar{H} \cdot L / mol]$ ; олово –  $3,9 \cdot 10^6 \bar{H} \cdot L / mol$ ; никел –  $3,2 \cdot 10^5 \bar{H} \cdot L / mol = 0,32 \cdot 10^6 \bar{H} \cdot L / mol$ ; цинк –  $2,7 \cdot 10^4 \bar{H} \cdot L / mol = 0,0027 \cdot 10^6 \bar{H} \cdot L / mol$ . Получените резултати показват кадмия като метал, инициращ в най-висока степен проследените хистологични

изменения в хрилете на шарана като отговор на токсичното му действие.

Друг начин, по който сравнихме токсичността на експерименталните метали, е като приравнихме усреднената степен на хистологичните изменения на всеки метал към единица ( $\bar{H}=1$ ). Така получихме, че за да предизвика усреднена степен на проследените хистологични изменения  $\bar{H}=1$ , 1 mol кадмиеви йони трябва да се разтворят в 13 000 000 L вода, 1 mol оловни йони да се разтворят в 3900000 L вода, 1 mol никелови йони – в 320000 L. Същата, най-ниска усреднена степен на хистологични изменения, 1 mol цинкови йони предизвиква, като се разтвори в 27917 L вода. Това още веднъж потвърждава извода за много по-голямата токсичност на кадмия спрямо цинка.

#### Комбинирани експозиции за 96 часа

Като имаме предвид резултатите, посочени в Таблица 11 за настъпили хистологични изменения при комбинациите от два метала след 96 часова експозиция, се забелязва разнообразие по отношение броя и степента на установените изменения. По степента на пролиферативните изменения не може да се изведе обща тенденция за най-висока токсичност при различните комбинации. Обобщавайки резултатите за проява на дегенеративни изменения, не можем да бъдем категорични коя от комбинациите провокира с най-голяма сила това нарушение, тъй като се откриваше в лека степен или изцяло липсваше. По отношение измененията в кръвоносната система, се забелязва голямо разнообразие на локализацията и степента на изява. Не може да се посочи коя от комбинациите предизвиква в най-голяма степен тези нарушения.

Установените преимуществени изменения, провокирани от единичните експозиции, а именно – пролиферативните изменения за кадмий, дегенеративните за цинк и в кръвоносната система за никел, при двойните комбинации се наблюдава известно взаимно потискане и повлияване в посока по-скоро към намаляване степента на измененията. Вероятно поради тази причина, най-често проявената степен на изява беше умерена и лека. За разлика от единичните експозиции, при двойните комбинации трудно може да се изведе тенденция за преимущественото им повлияване. Предполагаме, че това има връзка и със 100% преживяемост при комбинациите от два метала.

**Таблица на истинността за определяне отношенията между тестваните метали при комбинации от два метала за експозиция от 96 часа**

На база хистологичните анализи на хриле, чрез таблица на истинността, определихме отношенията между тестваните метали в комбинации по два (Таблица VIII в Приложението). Чрез матрица определихме отношението между изследваните тежки метали в комбинация, за всяко от проследените изменения поотделно. Например, за комбинацията Cd+Zn от таблицата се вижда, че при тази експозиция цинкът потиска проявата на характерните за кадмия пролиферация в сквамозния епител и фузия, а кадмият от своя страна намалява проявата на най-изявеното за цинка изменение в хрилете - дегенерация. Тези и още три други изменения ние определихме като резултат от антагонистични отношения. За епителния лифтинг, вазодилатацията в основния венозен синус и още четири други изменения, чрез матрицата определихме отношение на синергизъм между кадмия и цинка, поради завишаване степента на проява при комбинацията. Резултатите за установените антагонистични и синергични отношения представяме обобщено в Таблица 11. Прави впечатление преимущественото проявление на антагонистичните отношения.

**Таблица 11.**

*Таблица на истинността за проявените отношения при комбинации от по два от тестваните метали след 96-часова експозиция*  
*антагонизъм* *синергизъм*

	Cd	Ni	Pb	Zn
Cd	XXXX	8	6	5
Ni	8	XXXX	9	7
Pb	6	9	XXXX	7
Zn	5	7	7	XXXX
Σ	19	24	22	19

	Cd	Ni	Pb	Zn
Cd	XXXX	2	5	6
Ni	2	XXXX	2	4
Pb	5	2	XXXX	4
Zn	6	4	4	XXXX
Σ	13	8	11	14

От таблиците се вижда, че от 66 възможни отношения между тестваните метали (6 комбинации по 11 изменения) в 42 са антагонистични отношения, в синергични - 23 и 1 е индеферентна. В най-голям брой антагонистични отношения участва никелът. Той, при съвместна експозиция с някои от другите три метала, потиска в известна степен проявата на тяхната токсичност. По броя на антагонистичните отношения, представяме следния низходящ ред: никел>олово>кадмий=цинк. Еднаквото проявление на

антагонистичност при кадмия и цинка най-вероятно се дължи на сходния строеж и свойства на двата метала. Въз основа на отбелязаните отношения проявени в проследените 11 изменения в хрилете, можем да подредим комбинациите в следните низходящи редове:

за антагонизъм:  $Ni+Pb > Cd+Ni > Ni+Zn = Pb+Zn > Cd+Pb > Cd+Zn$ ;

за синергизъм:  $Cd+Zn > Cd+Pb > Ni+Zn = Pb+Zn > Cd+Ni = Ni+Pb$

Този ред потвърждава никела като въздействащ най-често антагонистично спрямо другите тествани метали.

Въз основа на резултатите от комбинациите от три метала при 96-часова експозиция, се забелязва обща тенденция, свързана с намаляване степента на изява на проследените изменения в хистоструктурата на хрилете, в сравнение с тези при единичните експозиции. Това предполага взаимно влияние между експерименталните метали, което е в посока към намаляване степента на изява. Такава тенденция откриваме при проявата на хистологичните изменения и при комбинациите от два метала. Като имаме предвид представените в Таблица 8 резултати се забелязва, че при всички комбинации от три метала изявата на пролиферативни процеси в сквамозния епител се проявяваше с най-висока степен в сравнение с останалите нарушения, а именно - умерена и тежка.

Като имаме предвид проявените хистологични изменения се забелязва, че при всички тройни комбинации пролиферативните изменения преимуществено се проявяват по-често от дегенеративните и тези в кръвоносната система.

#### Комбиниранни експозиции за 21 дни

При анализиране резултатите от настъпили хистологични изменения в хрилете на едногодишни шарани под влияние на комбинации за 21 дни, най-общо можем да кажем, че и комбинациите от експерименталните метали проявяват токсичност, като провокират подобни изменения, вариращи по степен на изява.

#### **Таблица на истинността за определяне отношенията между тестваните метали при комбинации от два метала за експозиция от 21 дни**

В Таблица IX от Приложението са представени конкретните отношения между двойките метали в комбинация по проследените изменения, на база резултати от хистологичния анализ. Таблица 12 показва обобщено проявените отношения на синергизъм и антагонизъм.

## Таблица 12.

Таблица на истинността за проявените отношения при комбинации от два тествани метала след 21-дневна експозиция

антагонизъм

синергизъм

	Cd	Ni	Pb	Zn		Cd	Ni	Pb	Zn
Cd	XXXXX	8	7	7	Cd	XXXXX	2	4	4
Ni	8	XXXXX	10	11	Ni	2	XXXXX	1	0
Pb	7	10	XXXXX	7	Pb	4	1	XXXXX	4
Zn	7	11	7	XXXXX	Zn	4	0	4	XXXXX
Σ	22	29	24	25	Σ	10	3	9	8

От възможните 66 отношения между тестваните метали (6 комбинации по 11 изменения) 50 са в антагонистични отношения, в синергични – 15 и 1 индиферентно. Отново, както при 96-часовите експозиции, в най-голям брой антагонистични отношения участва никелът. От възможните 33 отношения по проследените показатели в комбинациите си с другите три метала, никелът въздейства при 29 от измененията антагонистично. След него са цинкът, оловото и накрая кадмият. И след 21-дневна експозиция никелът затвърждава антагонистичното си действие спрямо другите три метала. В най-много синергични отношения участва кадмият, следван от оловото, цинкът и накрая – никелът. На база отбелязаните отношения проявени в проследените 11 изменения в хрилете можем да подредим комбинациите от 21 дни в следните низходящи редове:

за антагонизъм: Ni+Zn>Ni+Pb>Cd+Ni >Cd+Pb=Cd+Zn=Pb+Zn

за синергизъм : Cd+Pb=Cd+Zn=Pb+Zn>Cd+Ni>Ni+Pb

От констатираните изменения при прегледа на парафиновите срезове от екземпляри след 21-дневна експозиция с повече от два метала са различни по брой и степен на изява не са установени тенденции и зависимости.

От проведеното хистологично изследване структурата на хриле можем да заключим, че тестовите концентрации на тежките метали – кадмий, никел, олово и цинк, повлияват негативно върху хистоструктурата на хрилете на шаран като активизират компенсаторно-адаптивни механизми и дегенеративни, водещи до патологични изменения. Това се отразява върху здравословното състояние на хрилете като нарушава тяхната функция. Не се установи обща тенденция към засилване изявата на хистологичните изменения с увеличаване концентрацията на металите. Пропорционалност между концентрация и степен на изява установихме частично, проявена само

за някои изменения, различни за тестваните метали – дегенерация при цинка, хиперплазия на хрущялната тъкан при никела.

Като имаме предвид усреднените резултати, можем да подредим четирите метала по степен на токсичност в следните низходящи редове:

- пролиферативни изменения: кадмий>никел>олово>цинк;
- дегенеративни изменения: цинк>кадмий=никел>олово;
- изменения в кръвоносната система: никел>олово=цинк>кадмий

Въз основа на това, в нашето изследване ние правим опит да покажем преимущественото инициране проявата на определено изменение от даден метал в хистоструктурата на хрилете. Тази възможност ни дава използваната скала за оценка степента на изява на наблюдаваните изменения в хрилете на експерименталните риби. Например, кадмият въздейства най-силно върху пролиферативните изменения в хрилния покривен епител, никелът – върху измененията в кръвоносната система, докато цинкът върху дегенеративни нарушения.

## ИЗВОДИ

1. Изследваните концентрации и комбинации от йони на кадмий, никел, олово и цинк предизвикват промени в поведението на едногодишни шарани при кратковременна и дълговременна експозиции, изразяващи се в: безпокойство, скокове бавни и летаргия, загуба на равновесие, опадване на люспи, отделяне на слуз.
2. Поведенческите промени установени в хода на експеримента бяха по-силно изразени при експозициите с въздействие на единичните йони от тестваните метали, отколкото при комбинациите от тях, като най-добре изразени са при кадмия, следван от оловото и цинка, а най-слабо - при никела. Проявлението на поведенческите реакции е в зависимост от концентрациите при единичните експозиции, а при комбинациите от времето и броя на комбинираните йони. По-слабо изразени са поведенческите промени при комбинациите от по два метала, отколкото при комбинациите от три и четири метала
3. Тестваните йони на металите и комбинациите от тях водят до намаляване преживяемостта на опитните риби, като по-силно е негативното въздействие на единичните експозиции отколкото комбинираното им въздействие. Според Фактора на леталност, тестваните йони при единични кратковременни въздействия могат да се подредят в следния низходящ ред: Cd>Pb>Zn>Ni.
4. Изследваните йони на тежки метали и комбинациите от тях влияят негативно върху процеса на дишане, което може да се свърже със състояние на оксидативен стрес и увреждания в хрилете, проявяващи се чрез: учестяване на дишането; намаляване количеството на усвоения кислород; увеличаване интензивността на дишане; намаляване устойчивостта на кислороден дефицит.
5. В хрилете на едногодишни шарани при експозиции с единични концентрации на йони на Cd, Ni, Pb, Zn и комбинациите от тях се предизвикват хистологични изменения, разпределени в три групи: 1) пролиферативни изменения, включващи епителен лифтинг, оток, пролиферация в сквамозния епитител, фузия, пролиферация в хрущялната тъкан; 2) дегенеративни изменения и 3) изменения в кръвоносната система.
6. При единичните експозиции за 96 часа на тестваните метали пролиферативните изменения преобладават над



дегенеративните и тези в кръвоносната система на хрилете. Най-висока степен на пролиферативни изменения предизвиква кадмият. Пролиферативните изменения в хрилете на шаран са преимуществено проявени при комбинациите кадмий и никел, никел и олово, никел и цинк, а в кръвоносната система - при комбинациите от кадмий и олово, кадмий и цинк.

7. Хистологичните изменения в хрилете на шаран имат по-висока степен на изява при единичните експозиции за 96 часа в сравнение с тези при комбинациите от йони на тестваните метали. При комбинациите от йони на изследваните тежки метали за 21 дни в сравнение с тези от 96 часа не се открива обща тенденция по отношение степента и посоката на изява на установените групи хистологични изменения в хрилете на шарана.
8. Приложените математически модели, описващи влиянието на комбинациите от йони на два метала върху броя на хистологичните изменения в хрилете на шаран, показват, че никелът се проявява най-често като антагонист спрямо другите тествани метали, докато кадмият участва най-често в синергични отношения с тях.
9. Усредненият фактор на хистологичните изменения в хрилете – F показва, че при кратковременни единични експозиции кадмият е метал, иницииращ в най-висока степен проследените хистологични нарушения в хрилете на шаран.

## ПРИНОСИ

### С оригинален характер:

- ✓ Проведено е първото комплексно морфофизиологично изследване с риби в лабораторни условия за изясняване степента на токсичност на четири приоритетни за река Арда тежки метала върху стопанско значим за района вид риба – шаран (*Cyprinus carpio L.*).
- ✓ Проведено е първото комплексно морфофизиологично изследване с риби в лабораторни условия за изясняване степента на токсичност при съвместна експозиция на кадмий, никел, олово и цинк в различни комбинации между тях и въздействието им върху едногодишен шаран (*Cyprinus carpio L.*)
- ✓ Направен е сравнителен анализ на тестове за поведение, преживяемост и процеси на дишане при единични и комбинирани експозиции с тестваните метали в лабораторни условия с отчитане на фактора време.
- ✓ Направен е сравнителен анализ на хистологични изменения в хриле от шаран (*Cyprinus carpio L.*) за влияние на тестваните концентрации и комбинации на четирите метала в лабораторни условия.
- ✓ Приложени са оригинални нови математически модели:
  - за обработка на данните от изследването за преживяемост - Усреднен фактор на леталност – L;
  - за доказване и сравняване токсичността на тестваните метали и влиянието им върху хрилете - Усреднен фактор на хистологични изменения (F);
  - за определяне отношенията между два метала при съвместна експозиция, на база резултати от хистологични анализи на хриле - Таблица на истинността;
- ✓ Установени са отношения на антагонизъм и синергизъм между тестваните метали чрез комплексен подход.
- ✓ Установено е по-силно въздействие на единичните експозиции от комбинираните по отношение на изследваните морфофизиологични показатели на шаран.

### **С потвърдителен характер:**

- ✓ Рибите могат да бъдат използвани като добри биоиндикатори за замърсяване с тежки метали на водни екосистеми.
- ✓ Промените в поведението, преживяемостта и дишането могат да се използват като маркери за отчитане токсичността на тежките метали.
- ✓ Под влиянието на тестваните тежки метали са установени хистологични изменения в хриле: пролиферативни – ламеларен лифтинг, оток, пролиферация на сквамозния епител и жлезистите клетки в него, фузия и пролиферация на хрущялна тъкан; дегенеративни в епителната тъкан, както и такива в кръвоносната система – вазодилатация на вторичните ламели и на основния кръвоносен съд и аневризми.
- ✓ Установените хистологични изменения представляват компенсаторно-адаптивни механизми за преживяването на рибите в замърсена с тежки метали вода.

### **С методичен и приложен характер:**

- ✓ Потвърдени са преимуществата на количествената скала за определяне степента на настъпилите изменения в хистоструктурата на хрилете.
- ✓ Предложен е един интегративен подход от лесни и бързи за изпълнение методи за установяване токсичността на водна среда чрез стопански значим вид като шаран (*Cyprinus carpio L.*) чрез съчетаването на наблюдения върху поведенчески реакции, изследване процеса дишане и хистологични анализи на хриле.
- ✓ Комплексният метод, отчитащ влиянието на тежки метали върху риби, е подходящ за оценка на замърсяване с тежки метали във водна среда.

## ПРЕПОРЪКИ

- ✓ При мониторинг на замърсени с тежки метали водни екосистеми да се прилага комплексно проучване, включващо, освен химични анализи, също и хистологични показатели в качеството им на надеждни биомаркери.
- ✓ Необходимо е прилагане на мерки, насочени към строг контрол на ПОВ в близост до водни басейни за промишлено отглеждане на риби, поради негативните ефекти от тяхната широка употреба.
- ✓ Проследяване на поведението, изследване усвояването на кислород и интензивността на дишане като бърз и евтин начин за ранно откриване и предупреждение за предстоящи последици от замърсяване на водите с тежки метали.
- ✓ Проведеното изследване може да се използва в практиката като база за разработване на методология за проследяване и намаляване вредното въздействие на залпови замърсявания от единични експозиции на кадмий, никел, олово или цинк.
- ✓ При оценка състоянието на водни екосистеми, замърсени с тежки метали, и мерките за опазването им да се вземат предвид процесите на синергизъм и антагонизъм между йоните на металите.

### **Научни публикации във връзка с дисертационния труд:**

- Todorova K, Velcheva I, Petrova S, Yancheva V, Stoyanova S, Georgieva E. 2014. Effects of Heavy Metals on Survival and Oxygen Consumption in Common Carp. Oxidation Communications, 37(2): 563-571
- Todorova K, Velcheva I, Yancheva V, Stoyanova S, Petrova S, Georgieva E. 2015. Effect of nickel and combination with other heavy metals (Cd, Pb, Zn) on Common carp (*Cyprinus carpio Linneaus, 1785*). Trakia Journal of Sciens, 13(2): 324-328

### **Участия в конференции**

- Седмата Национална Студентска Научна конференция „Екологията-начин на мислене - 7”, 9 май 2015 год., гр. Пловдив. Представих доклад на тема „Влияние на тежки метали върху шаранови риби“.
- Юбилейната научна конференция „20 години Тракийски университет”, 19-20.05.2015 г., гр. Ст. Загора с постер „Effect of nickel and its combination with other metals (Cd, Pb, Zn) on Common carp (*Cyprinus carpio L*)”.
- Участвах в Студентска научна конференция „Науката – предизвикателство за младите“, 20.11.2015, гр. Кърджали, с доклад в съавторство на тема «Мониторингово изследване качеството на атмосферния въздух в района на град Кърджали преди и след спиране работата на ОЦК - АД»

## **ПРИЛОЖЕНИЯ**

**Таблица I***Преживяемост при експозиция с кадмий*

аквариум №	концентр. Cd <sup>2+</sup> mg/L	начален брой	24ч.	48ч.	72ч.	96ч.	живи	
							брой	%
1	0,002	10	10	10	10	10	10	100
2	0,005	10	10	10	9	9	9	90
3	0,01	10	7	2	0	0	0	0
4	0,015	10	10	10	10	9	9	90
5	0,02	10	10	2	0	0	0	0
6	0	10	10	10	10	10	10	100

**Таблица II***Преживяемост при експозиция с никел*

аквариум №	концентр. Ni <sup>2+</sup> mg/L	начален брой	24ч.	48ч.	72ч.	96ч.	живи	
							брой	%
1	0,05	10	10	10	10	10	10	100
2	0,1	10	10	10	10	10	10	100
3	0,2	10	10	10	10	9	9	90
4	0,3	10	10	10	10	10	10	100
5	0,45	10	10	10	10	10	10	100
6	0	10	10	10	10	10	10	100

**Таблица III***Преживяемост при експозиция с олово*

аквариум №	концентр. Pb <sup>2+</sup> mg/L	начален брой	24ч.	48ч.	72ч.	96ч.	живи	
							брой	%
1	0,01	10	10	10	10	10	10	100
2	0,025	10	9	9	9	8	8	80
3	0,05	10	10	9	9	8	8	80
4	0,075	10	10	9	8	8	8	80
5	0,1	10	10	9	8	6	6	60
6	0	10	10	10	10	10	10	100

**Таблица IV***Преживяемост при експозиция със цинк*

аквариум №	концентр. Zn <sup>2+</sup> mg/L	начален брой	24ч.	48ч.	72ч.	96ч.	живи	
							брой	%
1	0,6	10	10	10	10	10	10	100
2	1,5	10	10	10	9	8	8	80
3	3	10	10	10	4	0	0	0
4	4,5	10	10	10	10	9	9	90
5	7	10	10	10	3	1	1	10
6	0	10	10	10	10	10	10	100

**Таблица V***Преживяемост при експозиции с комбинации от металите за 96*

часа и 21 дни

Комбинация	начален брой	96 часа			21 дни		
		ден-брой отпаднали	бр.	%	ден-брой отпаднали	бр.	%
контрола	10	0	10	100	0	10	100
Cd+Ni	10	0	10	100	21-1;	9	90
Cd+Pb	10	0	10	100	19-1; 21-1;	8	80
Cd+Zn	10	0	10	100	0	10	100
Ni+Pb	10	0	10	100	0	10	100
Ni+Zn	10	0	10	100	5-1	9	90
Pb+Zn	10	0	10	100	0	10	100
Cd+Ni+Pb	10	0	10	100	7-1;8-1	8	80
Cd+Ni+Zn	10	0	10	100	6-1;7-1; 8-1;14-1; 20-2;21-1;	4	40
Cd+Pb+ Zn	10	0	10	100	16-1; 17-1; 18-1; 19-5;20-2	0	0
Ni+Pb+Zn	10	0	10	100	0	10	100
Cd+Ni +Pb+Zn	10	2,3,и4дени x1	7	70	2-2;3-1;6-1;8-1;10-1	4	40

**Таблица VI - А**

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинации от два метала след 96-часова и 21-дневна експозиция.

Хистологични изменения	Контрола	Концентрации mg/L					
		0,01 Cd +0,2 Ni-96ч	0,01 Cd +0,2 Ni-21д	0,01 Cd +0,05Pb-96ч	0,01 Cd +0,05Pb-21д	0,01 Cd +3,0 Zn-96ч	0,01 Cd +3,0 Zn-21д
Ламеларен лифтинг	0	0	1	1	1	1	1
Оток	0	1	1	1	1	1	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	2	2	0	2	2	1
Фузия	0	0	1	0	2	0	0
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	0	1	0	1	1	1
Дегенерация	0	1	1	0	2	0	0
<u>Вазодилатация-вторични ламели</u>	0	0	1	0	2	3	1
- по дължина	0	0	0	0	0	1	1
- в базалната част	0	0	1	1	0	1	0
- в апикалната част	0	0	0	1	0	1	1
Аневризми	0	0	0	1	0	1	1
Вазодилатация-основен синус	0	2	1	2	0	2	0

**Таблица VI - Б**

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинации от два метала след 96-часова и 21-дневна експозиция.

Хистологични изменения	Контрола	Концентрации mg/L					
		0,2 Ni +0,05 Pb 96ч	0,2 Ni +0,05 Pb 21д	0,2 Ni +3,0 Zn-96ч	0,2 Ni +3,0 Zn-21д	0,05Pb +3,0 Zn-96ч	0,05Pb +3,0Zn-21д
Ламеларен лифтинг	0	1	1	1	1	1	2
Оток	0	1	1	1	0	1	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	1	2	1	2	1	2
Фузия	0	2	0	1	1	1	1
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	0	0	2	0	1	2
Дегенерация	0	1	0	1	0	1	1

<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	1	1	1	1	1	2
- по дължина	0	1	0	1	0	1	0
- в базалната част	0	0	1	1	0	0	0
- в апикалната част							
<b>Аневризми</b>	0	1	0	1	1	1	1
<b>Вазодилатация-основен синус</b>	0	0	0	1	0	1	0

### Таблица VII - А

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинациите с повече от два метала след 96-часова и 21-дневна експозиция

Хистологични изменения	Конт рола	Концентрации mg/L					
		0,01Cd +0,2Ni +0,05 Pb 96ч	0,01Cd +0,2Ni +0,05 Pb 21д	0,01 Cd +0,2 Ni +3,0 Zn -96ч	0,01 Cd +0,2 Ni +3,0 Zn -21д	0,01 Cd +0,05Pb +3,0 Zn -96ч	0,01 Cd +0,05 Pb +3,0 Zn -21д
Ламеларен лифтинг	0	1	2	1	1	0	-
Оток	0	1	1	1	1	1	-
Пролиферация-сквамозен епител	0	3	3	2	1	2	-
Фузия	0	1	1	0	0	0	-
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	1	0	1	1	-
Дегенерация	0	0	1	0	1	1	-
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	1	1	1	1	2	
- по дължина	0	0	1	0	0	1	-
- в базалната част	0	1	0	0	1	1	-
- в апикалната част							
<b>Аневризми</b>	0	1	1	0	1	1	-
<b>Вазодилатация-основен синус</b>	0	1	1	0	0	0	-

### Таблица VII - Б

Сравняване хистологичните изменения в хрилете при комбинациите с повече от два метала след 96-часова и 21-дневна експозиция

Хистологични изменения	Контрола	Концентрации mg/L			
		0,2 Ni +0,05 Pb +3,0 Zn - 96ч	0,2 Ni +0,05 Pb +3,0 Zn -21д	0,01Cd +0,2Ni + 0,05Pb+ 3,0Zn -96ч	0,01Cd +0,2Ni + 0,05Pb+ 3,0Zn -21д
Ламеларен лифтинг	0	0	2	1	1
Оток	0	1	2	1	1
Пролиферация-сквамозен епител	0	3	2	1	2
Фузия	0	1	0	1	0
Пролиферация на хрущялната тъкан	0	1	2	1	2
Дегенерация	0	1	0	1	0
<b>Вазодилатация-вторични ламели</b>	0	2	1	1	1
- по дължина	0	1	0	0	0
- в базалната част	0	1	0	0	0
- в апикалната част					
<b>Аневризми</b>	0	1	0	0	1
<b>Вазодилатация-основен синус</b>	0	1	0	0	0

### Таблица VIII



Определяне отношенията между два метала в изследваните комбинации от 96-часовите експозиции.

изм №	Cd	Ni	Cd+Ni	f(A,B)	отношение	изм №	Cd	Pb	Cd+Pb	f(A,B)	отношение
1	0,7	1	0	0	Антагон.	1	0,7	0,8	1	1	Синерг.
2	0	1	1	0	Антагон.	2	0	0,4	1	1	Синерг.
3	3,3	2,6	2	0	Антагон.	3	3,3	2,2	0	0	Антагон.
4	3	2	0	0	Антагон.	4	3	2	0	0	Антагон.
5	1	1,6	0	0	Антагон.	5	1	1,8	0	0	Антагон.
6	0,3	0,8	1	1	Синерг.	6	0,3	0,8	0	0	Антагон.
7	1	2	0	0	Антагон.	7	1	1	0	0	Антагон.
8	0	0	0	0	Индефер.	8	0	0,4	0	0	Антагон.
9	0,3	0,4	0	0	Антагон.	9	0,3	0,4	1	1	Синерг.
10	0	1	0	0	Антагон.	10	0	0,6	1	1	Синерг.
11	0	0,6	2	1	Синерг.	11	0	0,2	2	1	Синерг.

изм №	Cd	Zn	Cd+Zn	f(A,B)	отношение	изм №	Ni	Pb	Ni+Pb	f(A,B)	отношение
1	0,7	0	1	1	Синерг.	1	1	0,8	1	0	Антагон.
2	0	0,3	1	1	Синерг.	2	1	0,4	1	0	Антагон.
3	3,3	1	2	0	Антагон.	3	2,6	2,2	1	0	Антагон.
4	3	1,3	0	0	Антагон.	4	2	2	2	0	Антагон.
5	1	1,3	1	0	Антагон.	5	1,6	1,8	0	0	Антагон.
6	0,3	3,3	0	0	Антагон.	6	0,8	0,8	1	1	Синерг.
7	1	0,7	3	1	Синерг.	7	2	1	1	0	Антагон.
8	0	0,3	1	1	Синерг.	8	0	0,4	1	1	Синерг.
9	0,3	0,3	1	1	Синерг.	9	0,4	0,4	0	0	Антагон.
10	0	1	1	0	Антагон.	10	1	0,6	1	0	Антагон.
11	0	0,7	2	1	Синерг.	11	0,6	0,2	0	0	Антагон.

изм №	Ni	Zn	Ni+ Zn	f(A,B)	отношение	изм. №	Pb	Zn	Pb+Zn	f(A,B)	отношение
1	1	0	1	0	Антагон.	1	0,8	0	1	1	Синерг.
2	1	0,3	1	0	Антагон.	2	0,4	0,3	1	1	Синерг.
3	2,6	1	1	0	Антагон.	3	2,2	1	1	0	Антагон.
4	2	1,3	1	0	Антагон.	4	2	1,3	1	0	Антагон.
5	1,6	1,3	2	1	Синерг.	5	1,8	1,3	1	0	Антагон.
6	0,8	3,3	1	0	Антагон.	6	0,8	3,3	1	0	Антагон.
7	2	0,7	1	0	Антагон.	7	1	0,7	1	0	Антагон.
8	0	0,3	1	1	Синерг.	8	0,4	0,3	1	1	Синерг.
9	0,4	0,3	1	1	Синерг.	9	0,4	0,3	0	0	Антагон.
10	1	1	1	0	Антагон.	10	0,6	1	1↓	0	Антагон.
11	0,6	0,7	1	1	Синерг.	11	0,2	0,7	1↓	1	Синерг.

Таблица IX

*Определяне отношенията между два метала в изследваните комбинации от 21-дневните експозиции.*

изм №	Cd	Ni	Cd+Ni	f(A,B)	отношение	изм №	Cd	Pb	Cd+Pb	f(A,B)	отношение
1	0,7	1	1	0	Антагон.	1	0,7	0,8	1	1	Синерг.
2	0	1	1	0	Антагон.	2	0	0,4	1	1	Синерг.
3	3,3	2,6	2	0	Антагон.	3	3,3	2,2	2	0	Антагон.
4	3	2	1	0	Антагон.	4	3	2	2	0	Антагон.
5	1	1,6	1	0	Антагон.	5	1	1,8	1	0	Антагон.
6	0,3	0,8	1	1	Синерг..	6	0,3	0,8	2	1	Синерг..
7	1	2	1	0	Антагон.	7	1	1	2	1	Синерг.
8	0	0	0	0	Индефер.	8	0	0,4	0	0	Антагон.
9	0,3	0,4	1	0	Антагон.	9	0,3	0,4	0	0	Антагон.
10	0	1	0	0	Антагон.	10	0	0,6	0	0	Антагон.
11	0	0,6	1	1	Синерг.	11	0	0,2	0	0	Антагон.

изм №	Cd	Zn	Cd+Zn	f(A,B)	отношение	изм №	Ni	Pb	Ni+Pb	f(A,B)	отношение
1	0,7	0	1	1	Синерг.	1	1	0,8	1	0	Антагон.
2	0	0,3	1	1	Синерг.	2	1	0,4	1	0	Антагон.
3	3,3	1	1	0	Антагон.	3	2,6	2,2	2	0	Антагон.
4	3	1,3	0	0	Антагон.	4	2	2	0	0	Антагон.
5	1	1,3	1	0	Антагон.	5	1,6	1,8	0	0	Антагон.
6	0,3	3,3	0	0	Антагон.	6	0,8	0,8	0	0	Антагон.
7	1	0,7	1	0	Антагон.	7	2	1	1	0	Антагон.
8	0	0,3	1	1	Синерг.	8	0	0,4	0	0	Антагон.
9	0,3	0,3	0	1	Синерг.	9	0,4	0,4	1↓	1	Антагон.
10	0	1	1	0	Антагон.	10	1	0,6	0	0	Антагон.
11	0	0,7	0	0	Антагон.	11	0,6	0,2	0	0	Антагон.

изм №	Ni	Zn	Ni+ Zn	f(A,B)	отношение	изм. №	Pb	Zn	Pb+Zn	f(A,B)	отношение
1	1	0	1	0	Антагон.	1	0,8	0	2	1	Синерг.
2	1	0,3	0	0	Антагон.	2	0,4	0,3	1	1	Синерг.
3	2,6	1	2	0	Антагон.	3	2,2	1	2	0	Антагон.
4	2	1,3	1	0	Антагон.	4	2	1,3	1	0	Антагон.
5	1,6	1,3	0	0	Антагон.	5	1,8	1,3	2	1	Синерг.
6	0,8	3,3	0	0	Антагон.	6	0,8	3,3	1	0	Антагон.
7	2	0,7	1	0	Антагон.	7	1	0,6	2	1	Синерг..
8	0	0,3	0	0	Антагон.	8	0,4	0,3	0	0	Антагон.
9	0,4	0,3	0	0	Антагон.	9	0,4	0,3	0	0	Антагон.
10	1	1	1	0	Антагон.	10	0,6	1	1	0	Антагон.
11	0,6	0,7	0	0	Антагон.	11	0,2	0,6	0	0	Антагон.

## ИЗПОЛЗВАНА ЛИТЕРАТУРА

1. **Арнаудова Д, Томова Е, Велчева И, & Арnaudов А.** 2008. Проучване на съдържанието на олово, цинк и кадмий в някои органи на риби от сем. *Cyprinidae* и сем. *Percidae* в язовирите “Студен Кладенец,, и „Кърджали,,. Юбилейна научна конференция по Екология (Сборник с доклади), 327–335.
2. **Велчева И.** 1998. Екологично проучване на съдържанието на кадмий, олово и цинк в уклейка, шаран и костур от язовир „Кърджали” и „Студен кладенец”. Автореферат на дисертация за получаване на научна и образователна степен „доктор”. Пловдивско университетско издателство, 1998, 32.
3. **Доклад** на Басейнова дирекция за Източнобеломорски район за 2009г.
4. **Карапеткова М, Живков М.** 2010. Рибите в България. Гей-Либрис, България, стр. 82-83
5. **Строганов Н.** 1962. Экологическая физиология рыб. Изд. МГУ, Москва, 200-207
6. **Янчева В.** 2014. Автореферат на Дисертация за присъждане на научно-образователна степен „доктор”, ПУ.
7. **Adeyemo OK.** 2008. Histological alterations observed in the gills and ovaries of *Clarias gariepinus* exposed to environmentally relevant lead concentrations. J Environ Health, 70(9): 48–51.
8. **Adeogun AO.** 2012. Impact of industrial effluent on water quality and gill pathology of *Clarias gariepinus* from Alaro Stream, Ibadan, Southwest, Nigeria. European Newspapers Research, 76(1): 83–94.
9. **APHA.** 2005. Standard methods for examination of water and wastewater, 21st Ed. Washington, American Public Health Association
10. **Brumbaugh WG, Schmitt CJ & May TW.** 2005. Concentration of cadmium, lead and zink in fish from mining-influenced waters of northeastern Oklahoma: sampling of blood, carcass and liver for aquatic biomonitoring. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 49, 76-88.
11. **De Boeck G, Van der Ven K, Meeus W, & Blust R.** 2007. Sublethal copper exposure induces respiratory stress in common and gibel carp but not in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol., Part C, 144, 380-390.
12. **Directive 2010/63/EU** of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes

13. **Ferrari L, Eissa BL, Salibián A.** 2011. Energy balance of juvenile *Cyprinus carpio* after a short-term exposure to sublethal water-borne cadmium. *Fish Physiol Biochem*, 37(4): 853–862
14. **Ferreira Pollyanna de Moraes, Milton J, Elton S, Rikarte M, Cabral GA.** 2009. Efeito da temperatura sobre a taxa metabólica da carpa-comum, (*Cyprinus carpio Linnaeus*, 1758). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca*, 4(2).
15. **Hassan W.** 2011. The effect of copper and cadmium on oxygen consumption of juvenile carp *Cyprinus carpio* (L.). *Mesopot J Sci*, 26(1): 25–34.
16. **Khan HA, Sikdar-bar M, Kamlesh B, Adil Ahmad W, Ahmed P.** 2011. Lead nitrate-induced histopathological changes in the gills of *African catfish Clarias batrachus*. *J Appl Sci Res*, 7(7): 1087–1092.
17. **Olojo EAA, Olurin KB, Mbaka G, Oluwemim AD.** 2005. Histopathology of the gill and liver tissue of the *African catfish, Clarias gariepinus* exposed to lead. *Afr J Biotechnol*, 4(1): 117–122.
18. **Palanisamy P, Sasikala G, Mallikaraj D, Bhuvaneshwari N, Natarajan GM.** 2011. Histopathological lesions in the gill of Cat air breathing fish *Mystus Cavasius* at industrial electroplating wastewater nickel. *Int J Appl Biol Pharm Technol*, 150.
19. **Peebua P, Kruatrachue M, Pokethitiyook P & Kosyachind P.** 2006. Histological effect of contaminated sediments in Mae Klong River Tributaries, Thailand, on *Nile tilapia, Oreochromis niloticus*. *Sci. Asia*, 32, 143-150.
20. **Rosseland BO, Massabuau JC, Grimalt J, Hofer R, Lackner R, Raddum G, Rognerud S & Vives I.** 2003. *Fish Ecotoxicology: European Mountain Lake Ecosystems Regionalisation, Diagnostic and Socio-economic Evaluation (EMERGE)*. *Fish Sampling Manual for Live Fish*, Norwegian Institute for Water Research (NIVA), Oslo, Norway: 1-7
21. **Shuhaimi-Othman, M. & Pascoe D.** 2007. Bioconcentration and depuration of copper, cadmium, and zinc mixtures by the freshwater amphipod *Hyaella azteca*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 66(1):29–35.
22. **Yoshitomi T, Koyama J, Iida A, Okamoto N, Ikeda Y.** 1998. Cadmium-Induced Scale Deformation in Carp (*Cyprinus carpio*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60: 639-644.