

**Univerzita Komenského v Bratislave  
Prírodovedecká fakulta**



# **ŠTUDENTSKÁ VEDECKÁ KONFERENCIA**

**1.ZVÄZOK**

**biologická a environmentálna sekcia**



**26. apríl 2006**

**Bratislava, Slovenská republika**



Projekt je spolufinancovaný  
Európskou úniou.

### **Recenzenti**

Biológia: Prof. RNDr. Jozef Halgoš, DrSc.,  
Doc. RNDr. František Golais, CSc., RNDr. Andrea Ševčovičová, PhD.,  
RNDr. Danka Valková, CSc., RNDr. Peter Kabát, CSc.,  
Mgr. Iveta Herichová, PhD.

Environmentalistika: Prof. Ing. Bohdan Juráni, CSc.,  
Prof. Ing. Eva Chmielewská, CSc., Prof. RNDr. Agáta Fargašová, DrSc.

**Redakcia odbornej literatúry**

---

© KARTPRINT, Bratislava 2006

**ISBN 80 - 88870 - 58 - 5**

## Bioakumulace microcystinu-LR v rybí tkáni

Ondřej Adamovský<sup>1,2</sup>, Luděk Bláha<sup>1,2</sup>, Klára Hilscherová<sup>1,2</sup>, Radovan Kopp<sup>3</sup>, Pavel Babica<sup>1,2</sup>,  
Blahoslav Maršálek<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Masarykova univerzita v Brně, Přírodovědecká fakulta, Výzkumné centrum pro chemii životního prostředí a ekotoxikologii-RECETOX, Kamenice 126/3 625 00 Brno, Česká Republika  
ondrej.adamovsky@centrum.cz

<sup>2</sup> CCT, Kamenice 3, Brno, Česká republika

<sup>3</sup> Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Česká republika

### Úvod a formulace cíle

Sinice a jejich toxiny budí zájem vědců celého světa nejen kvůli jejich celosvětovému rozšíření ve vodním ekosystému, ale také kvůli stále častějšímu výskytu otrav divokých i domestikovaných zvířat. Četné výskytů otrav zvířat lze nalézt i v Evropě [1]. Na úhynu se podílí nejen neurotoxické ale i hepatotoxické látky, mezi něž patří nejvíce studovaný microcystin-LR(MC-LR).

Byly uveřejněny již mnohé studie o působení cyanotoxinů na ryby. V těchto studiích byla vysvětlena možná příčina masového úhynu ryb i vodních ptáků po algicidním zásahu. Po takovém zásahu je narušena buněčná integrita sinic a obsah velkého množství buněk je najednou vyplaven do vody. Bakteriální populace nejsou v běžných případech schopny postupně detoxifikovat cyanotoxiny. Při rozkladu biomasy dochází také mimo jiné ke kyslíkovému deficitu, který je v našich zemích nejčastěji uváděn jako příčina úhynu ryb a dalších živočichů po masovém kolapsu vodních květů. Histopatologická vyšetření po algicidních zásazích prokázala, že příčinou úhynu ryb bylo poškození žáber, trávicího ústrojí a hepatopankreatu [2].

V Anglii byly pozorovány masové úhyny pstruhů právě v období odumírání vodního květu. Při 85 – 90% nasycení vody kyslíkem a při pH 9,35 probíhal kolaps populace sinice *Anabaena flos-aquae*. Většinu poškození žáber způsobilo pravděpodobně vysoké pH, vyvolané fotosyntetickou aktivitou sinic, spolu se zvýšenou hladinou amoniaku při jejich rozkladu. Lépe je prostudovaný vliv cyanotoxinů na histopatologii trávicího traktu, pokožky a svalstva. Změny, které jsou dávány do souvislosti s vodními květy sinic, byly nalezeny na játrech, srdci, ledvinách, žlázech, pokožce a slezině [3]. Rodger et al. pozoroval degenerativní změny v ledvinových tubulech a glomerulech u kaprů v souvislosti s výskytem sinic [2]. Bylo zjištěno, že mechanismus toxického účinku MC-LR je velmi podobný u savců i u ryb [4].

Testy na bioakumulaci cyanotoxinů v rybách byly zpravidla prováděny jako laboratorní experimenty s akutní expozicí. Jen málo z nich má charakter polních studií s důrazem na chronickou expozici. Tyto testy s akutní expozicí byly založeny na příjmu cyanotoxinů buď orální cestou, intraperitonální injekcí, nebo přímým dávkováním do dorsální aorty. Toxin takto přijatý organismem však neodráží skutečný přirozený příjem v životním prostředí. Jedna z mála terénních studií prokázala významnou míru bioakumulace MC-LR v rybí tkáni a to i v období, kdy nebyl vodní květ vyvinut [5]. Jak bylo pozorováno na rybách při studiu akumulace cyanotoxinů na pobřeží Brazílie, ryby žijící ve vodě s rozvojem sinic nejsou schopny předejít konzumaci těchto sinic a jsou tak vystaveny expozici microcystiny. Proto i ryby neživící se fytoplanktonem mohou být kontaminovány MC-LR [6].

Cílem této studie bylo na příkladu dvou ekologicky relevantních zástupců hospodářsky významných druhů ryb chovaných v České republice prokázat schopnost ryb akumulovat v sobě hepatotoxin microcystin-LR(MC-LR). Zhodnotit, jak byl tento cyanotoxin distribuován mezi svalovou a jaterní tkání. K tomuto účelu byli vybráni dva zástupci celosvětově nejběžněji chovaných ryb - fytoplanktonní tolstolobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*) a bentovorní kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Tyto ryby byly vybrány také s ohledem na jejich rozdílný způsob života a příjmu potravy. S tím jsou i spojeny rozdílné expoziční cesty cizorodými látkami. Kapr obecný se živí hledáním potravy v bahně, zatímco tolstolobik bílý se živí i fytoplanktonem, který může obsahovat sinice, produkující cyklické heptapeptidy - microcystiny. Při kolapsu těchto sinic pak může dojít k zvýšení obsahu těchto toxinů ve vodě. Koncentrace microcystinu-LR byly analyzovány vysoce citlivou imunochemickou metodou ELISA nově připravenou v laboratořích RECETOX.

### Materiál a metody

Oba druhy ryb byly chovány v rybochovných sádkách v Pohorelicích po dobu dvou měsíců. Ryby byly chovány odděleně v klecích bez dokrmování. Klec byla umístěna asi 20 cm nad dno nádrže. Jak kapři, tak tolstolobici byli umístěni v nádržích bez výskytu sinic(kontrola) i s masivním rozvojem vodního květu sinic(expozice), který byl v době začátku chovu ryb nejvíce vyvinut. Na začátku experimentu, po měsíci (t30=30 dní) a po dvou měsících (t60=60 dní) chovu byly všechny ryby usmrceny, a následně separována svalovina, hepatopankreas,

mozek i vnútornosti. Všetchny separované orgány a tkáňe byly uchovány v mrazicím boxu na  $-80^{\circ}\text{C}$ . Před konečným testem ELISA bylo nutné tyto tkáňe extrahovat a extrakty následně převést do vodné fáze. Poté mohly být takto připravené vzorky použity na detekci microcystinu-LR testem ELISA.

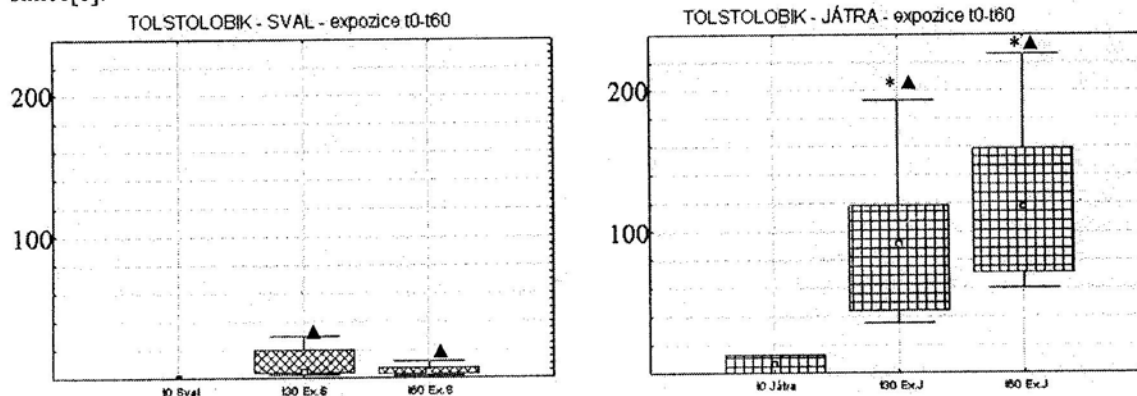
### Výsledky a Diskuze

V rybích tkání byl před začátkem experimentu nalezen velmi malý nebo žádný obsah MC-LR. V průběhu experimentu nebyl v kontrolní nádrži zaznamenán rozvoj vodního květu. Tomu odpovídaly i zanedbatelné hladiny MC-LR v tkáni obou druhů ryb chovaných v kontrolní nádrži. Oba druhy ryb byly umístěny do sádky s velkým rozvojem vodního květu a v této sádce chovány po dobu dvou měsíců. V exponované nádrži bylo pozorováno největší množství sinic na začátku experimentu ( $t_0$ ), s časem ( $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ) množství sinic klesalo. S klesajícím počtem sinic klesala i koncentrace MC-LR v biomase sinic až na 31% v čase  $t_{60}$  v porovnání se stavem v čase  $t_0$ . V čase  $t_0$  bylo v exponované nádrži největší množství vodního květu. Biomasa obsahovala 2.600.000 buněk v mililitru vody. Tomu odpovídala naměřená koncentrace MC-LR v biomase sinic v čase  $t_0$  o hodnotě 451,9  $\mu\text{g/g}$  DW (tab.1).

Tab.1: Vývoj vodního květu v závislosti na čase (množství MC-LR v sušiny)

Čas	MC-LR ( $\mu\text{g/g}$ sušiny), procento
$t_0$	451,9 100%
$t_{30}$	262,6 58,1%
$t_{60}$	141,9 31,4%

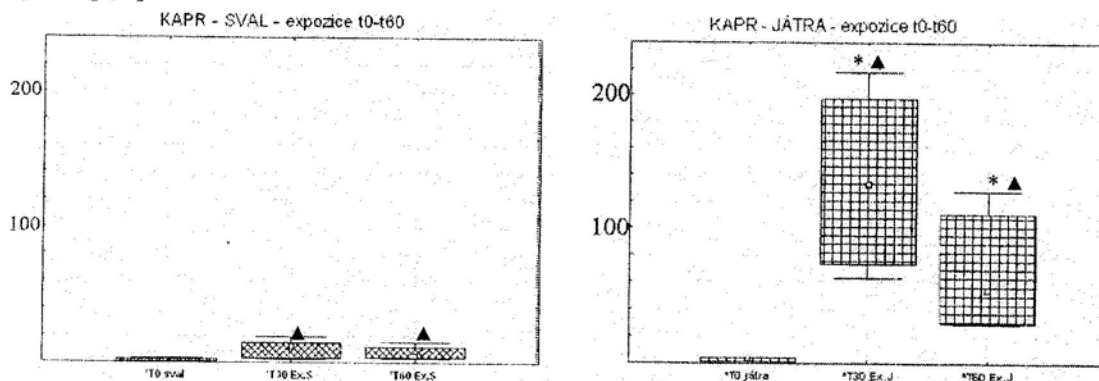
Porovnáme-li tkáňe ryb umístěných v kontrolních nádržích ( $t_0$ ) a tkáňe exponovaných ryb v čase  $t_{30}$  a  $t_{60}$ , lze konstatovat, že tkáňe ryb umístěné v nádržích s rozvinutým květem sinic obsahují prokazatelně větší množství microcystinu-LR (měřeno technikou ELISA). Výsledky byly statisticky srovnány (ANOVA a Dunnett's test). Analýzy ukázaly významný rozdíl hodnot koncentrací ve tkáních u kontrolních a exponovaných ryb ( $t_{30}$ ,  $t_{60}$ ). Lze se proto oprávněně domnívat, že ve tkáni ryb z nádrží, které obsahovaly vodní květ s nejhodnějším rodem *Microcystis*, docházelo k akumulaci MC-LR. Tento zjištěný fakt je v souladu s výsledky jiných studií, které byly prováděny na rybách v souvislosti s akumulací cyanotoxinů. Magalhaes at al. pozoruje ve své studii nárůst koncentrace MC-LR ve tkáni ryb v závislosti na ročním období, kdy se ve vodách prokazatelně vyskytovaly sinice[6].



Obr.1: Porovnání hodnot (ng MC-LR/g tkáňe) exponovaných tkání tolstolobika. Hvězdičky naznačují statisticky významný rozdíl jater oproti svalům, trojúhelníček udává statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

Podle porovnaných hodnot koncentrací MC-LR v exponovaných tkáních svalů a hepatopankreatu tolstolobika (obr.1) i kapra (obr.2) v čase  $t_{30}$  a  $t_{60}$  lze říci, že existují významné rozdíly mezi svaly a játry exponovaných tkání (analýza-Studentův t-test). V těchto grafech jsou znázorněny mediány s oblastí s 25-75% výskytem hodnot. Znázorněny jsou též minimální i maximální hodnoty. Koncentrace MC-LR u svalů exponovaných tolstolobiků v čase  $t_{30}$  a  $t_{60}$  se pohybovala mezi 1,8 – 29,3 ng/g tkáňe s průměrem 10,6 ng/g tkáňe, respektive mezi 1,4 – 11,6 ng/g tkáňe s průměrem 5,2 ng/g tkáňe. Koncentrace v játrech tolstolobika v čase  $t_{30}$  a  $t_{60}$  byla mezi 34,7 – 193,4 ng/g tkáňe s průměrem 93,2 ng/g tkáňe, respektive mezi 60,0 – 226,3 ng/g tkáňe s průměrem 123,9 ng/g tkáňe. Porovnáním koncentrací MC-LR v exponovaných svalech a játrech kapra docházíme k podobným závěrům jako v případě tkání tolstolobika. Koncentrace MC-LR v exponovaných svalech kapra v čase  $t_{30}$  a  $t_{60}$  byly mezi 3,3 – 18,8 ng/g tkáňe s průměrem 9,8 ng/g tkáňe, respektive mezi 3,3 – 15,6 ng/g tkáňe s průměrem 7,3 ng/g tkáňe. Koncentrace MC-LR v exponovaných játrech v čase  $t_{30}$  a  $t_{60}$  byly mezi 62,2 – 217,5 ng/g tkáňe s průměrem 132,3 ng/g tkáňe, respektive mezi 28,8 – 127,5 ng/g tkáňe s průměrem 68,7 ng/g

tkáně. Docházíme k závěru, že v daleko větší míře se MC-LR váže v hepatopankreatu. Tento fakt je dán tím, že MC-LR se dostává do buněk hepatopankreatu, popřípadě jater (u savců) přes selektivní přenašeče žlučových kyselin [7, 8].



Obr.2: Porovnání hodnot (ng MC-LR/g tkáně) exponovaných tkání kapra. Hvězdičky naznačují statisticky významný rozdíl jater oproti svalům, trojúhelníček udává statisticky významný rozdíl oproti kontrole.

Interpretace rozdílů mezi jednotlivými druhy ryb je velmi náročná s ohledem na ekologickou rozdílnost studovaných druhů. Nárůst koncentrace v játrech kapra je mnohem větší než u tolstolobika. Tento fakt je zřejmě dán tím, že tolstolobik má pomalejší metabolismus a proto jsou v jeho játrech hodnoty koncentrace MC-LR menší. Tolstolobik se sinicemi živí, na rozdíl od kapra, a proto dochází v jeho játrech k akumulaci MC-LR i v době (mezi t30-t60), kdy klesal obsah microcystinu v prostředí. Kapr se sinicemi neživí a tudíž lze předpokládat, že koncentrace MC-LR v jeho tkáni bude postupně klesat s poklesem výskytu sinice v prostředí [5, 8]. Tento trend je vysvětlován jako biotransformace MC-LR vázaného v tkáni na konjugáty, které jsou odstraňovány z těla. Snižování koncentrace MC-LR v tkáni s úbytkem sinic v prostředí potvrzuje i náš experiment.

### Závěr

Z výsledků stanovení koncentrací microcystinu-LR vyplývá, že při rozvoji sinic a produkci jejich toxinů (microcystinu-LR) může docházet k akumulaci tohoto toxinu v tkáních ryb. Situace je o to závažnější, že podle výsledků našeho experimentu nedochází k bioakumulaci jen u vodních živočichů, kteří se sinicemi živí, ale i u organismů, které pouze žijí ve vodním prostředí s obsahem microcystinu. Získaná data nám mohou pomoci k nastínění osudu MC-LR ve vodním prostředí a nastínit rizika pro vodní organismy, zvláště ryby.

### Poděkování

V závěru tohoto příspěvku bych chtěl poděkovat Grantové agentuře AV ČR (GA AV KJB6005411) za poskytnutí finančních prostředků.

### Seznam použité literatury:

- [1] CODD, G. A., ET AL., *Fatal Attraction to Cyanobacteria*. Nature, 1992. 359(6391): p. 110-111.
- [2] RODGER, H. D., ET AL., *Cyanobacterial (Blue-Green-Algal) Bloom Associated Pathology in Brown Trout, Salmo-Trutta L, in Loch Leven, Scotland*. Journal of Fish Diseases, 1994. 17(2): p. 177-181.
- [3] RABERGH, C. M. I., BYLUND, G., AND ERIKSSON, J. E., *Histopathological Effects of Microcystin-Lr, a Cyclic Peptide Toxin from the Cyanobacterium (Blue-Green-Alga) Microcystis-Aeruginosa, on Common Carp (Cyprinus-Carpio L)*. Aquatic Toxicology, 1991. 20(3): p. 131-145.
- [4] CODD, G. A., CARMICHAEL, W. W., *Toxicity of a clonal isolate of the cyanobacterium Microcystis aeruginosa from Great Britain*. FEMS Microbiology Letters, 1982. 13(4): p. 409-411.
- [5] MAGALHAES, V. F., ET AL., *Microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ)*. Toxicon, 2003. 42(3): p. 289-295.
- [6] MAGALHAES, V. F., SOARES, R. M., AZEVEDO, SMFO, *Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): ecological implication and human health risk*. Toxicon, 2001. 39(7): p. 1077-1085.
- [7] ERIKSSON, JOHN E., ET AL., *Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 1990. 1025(1): p. 60-66.
- [8] WILLIAMS, DAVID E., ET AL., *14C-labelled microcystin-LR administered to Atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers*. Toxicon, 1997. 35(6): p. 985-989.