

OBSAH MICROCYSTINU VE VYBRANÝCH TKÁNÍCH U RŮZNÝCH DRUHŮ RYB

The content of microcystin in the chosen tissues at different fish species

J. HLÁVKOVÁ, O. ADAMOVSKÝ, M. ORAVEC, L. BLÁHA, J. MAREŠ, R. KOPP, M. PALÍKOVÁ

Summary: In terms of this project the content of microcystin in different tissues of fishes was tracked. Microcystins belong to the most commonly assessed cyanotoxins (cyclic heptapeptids), produced by cyanobacterial water blooms. Microcystin- LR and –RR occur most frequently in our country.

The aim of this study was to assess quantity of microcystins in muscle and hepatopancreas of different fish species (*Cyprinus carpio*, *Oreochromis niloticus*, *Sander lucioperca* and *Esox lucius*) that belong to commercially best selling fish in our country. Experimental fish species were selected in the way to include phytophagous so benthophagous and predaceous species. The fishes before the start of experiment were not exposed to cyanotoxins. At the beginning of experiment *Oreochromis niloticus* and *Cyprinus carpio* were transferred to the environment with cyanobacterial water blooms, where were kept for a period of 4 weeks, next 4 weeks were displaced to the environment without cyanobacterial water blooms. During the vegetative season samples of muscle and hepatopancreas as well as water and cyanobacterial biomass samples were taken. Furthermore *Sander lucioperca* and *Esox lucius* were used for the experiment. Predaceous fishes were exposed to long-term exposure in the Novoveský pond. Their tissues samples were taken once per the season during the autumn harvest but water and biomass samples were taken regularly along the season. Obtained samples were analysed to determine the presence of cyanotoxins.

Ours study confirmed, that the fish are capable cumulate microcystins (cyclic heptapeptides of cyanobacteria) but also they are capable to wash them out from bodies. Analysis of experimental fish species confirmed the presence of microcystin in liver/hepatopancreas (as far as hundreds of nanograms per gram of tissue) but also in muscle. Levels of microcystins in muscle were found only in low quantity (nanograms per gram of tissue) and only in couple of samples. It seems as though that accumulation of microcystins in eatable parts of fishes represent only small health risk to man.

Úvod

V důsledku zvyšování eutrofizace vod přibývá masových rozvojų vodních květů sinic v celosvětovém měřítku. Sinice jako nejstarší organismy s fotosyntézou rostlinného typu uvolňují do svého okolí biologicky aktivní látky – cyanotoxiny (především microcystin), které mohou ovlivnit růst a vývoj ostatních vodních organismů, tak i jejich fyzikálně - chemické vlastnosti a samozřejmě i fyzikálně – chemické vlastnosti vody (Maršálek et al., 1996). Řada prací z humánní a veterinární medicíny popisuje zdravotní poškození nebo otravy, které jsou dávány do souvislosti se sinicemi a jejich toxickými produkty (Carmichael, 1992). Sinice vodního květu jsou dominantní složkou fytoplanktonu, tím tvoří i součást potravy mnoha druhů organismů. Jejich chemické složení je značně závislé na podmínkách prostředí a výrazně se liší i mezi jednotlivými

druhy, proto také i různě ovlivňují okolní organismy. Hlavní cestou vstupu biologicky aktivních látek sinic do organismu je gastrointestinální trakt (Tencalla et al., 1994). Touto cestou pokračují až do svaloviny, kterou mohou z hlediska chemického složení ovlivnit a zároveň se v organismu kumulovat. Záleží ovšem na míře stravitelnosti sinicové populace.

Kumulace microcystinu v organismech vodního prostředí byla popsána hned několika autory (Amorim and Vasconcelos, 1999; Magalhaes et al., 2003; Thstrup and Christoffersen, 1999; Williams et al., 1997). Existuje více laboratorních než terénních studií umožňujících odhad reálného zdravotního rizika pro lidi při konzumaci vodních živočichů, kteří přijímali a kumulovali microcystiny (Magalhaes et al., 2001).

Toxiny sinic nejsou lidmi přijímány v takovém množství, které odpovídá letální dávce. V lidské populaci se lze častěji setkat s účinky dlouhotrvající expozice. Na ochranu zdraví a snížení zdravotního rizika doporučuje Světová zdravotnická organizace (WHO) jako maximální bezpečnou koncentraci MC-LR v pitné vodě $1 \mu\text{g.l}^{-1}$ (WHO, 1998). Tento limit byl odvozen z experimentálně prokázaného maximálního tolerovaného denního příjmu (TDI) MC-LR a to $0,04 \mu\text{g}$ na kilogram tělesné hmotnosti a den (Chorus and Bartram, 1999).

Přijmeme-li tento fakt, je velmi důležité monitorovat obsah těchto látek v rybách a jiných vodních živočiších právě v době rozvoje toxických druhů sinic. Toto tvrzení podporuje i sílící trend masového rozvoje květu toxických sinic (Maršálek et al., 1996).

Materiál a metodika

Cílem projektu bylo zjistit množství microcystinů ve svalovině a v hepatopankreatu u různých druhů ryb (kapr obecný, tilapie nilská, candát obecný a štika obecná), které patří u nás mezi komerčně nejprodávanější. Pokusné druhy ryb jsme volili tak, aby se jednalo o zástupce jak planktonofágních, tak bentotrofních i dravých druhů.

Ryby před vstupem do experimentu nebyly vystaveny toxickým sinicím. Tilapie nilská a kapr obecný byly na začátku experimentu přemístěny do prostředí s vodním květem sinic (na sádce Rybníkářství Pohořelice, a.s.), kde byly chovány po dobu 4 týdnů. Zároveň ve vedlejší sádce byla umístěna druhá část ryb téhož druhu, sloužící jako kontrola. V průběhu vegetační sezóny a v závislosti na rozvoji přírodních populací vodních květů sinic byly odebírány vzorky jejich svaloviny a hepatopankreatu. První vstupní odběr vzorků byl proveden u těchto dvou druhů ryb dříve, než byly přemístěny do prostředí s vodním květem sinic. Po 4 týdnech byly ryby ze sádek přemístěny do kruhových nádrží na MZLU v Brně bez výskytu vodního květu sinic. Zde byly chovány rovněž po dobu 4 týdnů za účelem vyplavení toxinů z těla ryb. Kapr obecný byl použit jako pokusná ryba, která běžně sinice v potravě nepřijímá a rovněž nemá schopnost sinice účinně trávit. Tilapie nilská byla druhou pokusnou rybou, v jejímž potravním spektru tvoří sinice významný podíl a z určité části je schopna sinice trávit.

Dále byly použity k pokusu candát obecný a štika obecná, jako zástupci ryb dravých, žijících se například již uvedenými druhy ryb. Tyto druhy ryb byly dlouhodobě exponované v Novoveském rybníku, ovšem jejich vzorky byly odebrány pouze 1x za sezónu při podzimních výloveh rybníka.

Odebrané vzorky byly analyzovány na přítomnost toxinů sinic. Koncentrace MCs (celkový microcystin) v rybích tkáních byly měřené každé dva týdny výkonnou kapalinovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem (HPLC/MS) (Chorus and Bartram, 1999).

Zmražené vzorky (0,5 g čerstvá váha) byly homogenizované s methylalkoholem (3 ml), poté byly podrobeny vibracím v ultrazvukové koupeli po dobu 30 min. Dále byly odstředěny při 4.000 otáčkách po dobu 10 minut. Vzniklý extrakt byl odebrán do jiné zkumavky a do zbylého vzorku byl přidán opět methylalkohol. Veškeré procedury byly opakované celkem 3x. Získaný extrakt (dohromady 9 ml) byl přečištěn pomocí hexanu, který slouží k odstranění balastních lipidických sloučenin. Nakonec byl extrakt dán do sušárny a vysušen při teplotě 55°C. Vysušený extrakt byl rozpuštěn v 300 µl 50% MeOH a analyzován nejčastěji citovanou metodou HPLC/MS. Pro naše analýzy byl využit Triple-Quad LC/MS Agilent. Odloučení MCs bylo dosaženo na Supelco ABZ+ sloupci skokovou elucí mobilní fází voda-methanol, okyselenou octanem amonným. Identifikace byla provedena v MRM modu pomocí charakteristických transnitních iontů pro microcystin.

V průběhu experimentu byla také sledována voda a biomasa sinic vodního květu a jejich toxicita. Biomasa sinic a řas byla ještě analyzována každý týden pomocí koncentrace chlorofylu-a (ISO 10260, 1992) a počtu buněk spočítaných pomocí Bürkerovy komůrky.

Základní statistické hodnoty sledovaných parametrů u ryb byly zpracované v programu Excel 2003. Statické významnosti rozdílů mezi experimentálními skupinami byly ohodnocené analýzou rozptylu (ANOVA) sledované Tukey post-testem. Hodnoty s průkazností ($p \leq 0.05$) nebyly považované za statisticky významné.

Výsledky a diskuze

V experimentálních sádkách (s dominancí kokálních sinic *Microcystis aeruginosa* a *M. ichthyoblabe*), se koncentrace buněčného chlorofylu pohybovala od 65 do 206 µg.l⁻¹ (169 – 971 · 10³ buněk v 1 ml). V kontrolních sádkách (s dominancí chlorokokálních řas) se koncentrace buněčného chlorofylu pohybovala od 5 do 203 µg.l⁻¹ (1.5 -107 · 10³ buněk v 1 ml). V Novoveském rybníku (s dominancí vláknitých druhů sinic *Pseudanabaena limnetica* a *Planktothrix agardhii*) se koncentrace buněčného chlorofylu pohybovala od 179 do 2309 µg.l⁻¹ (3,0 - 21,7 · 10⁶ buněk v 1 ml).

Koncentrace microcystinů v tkáních ryb, které byly vystaveny vodnímu květu sinic v sádkách, se zvýšila s dobou expozice. Nejvyšší koncentrace (určené pomocí HPLC/MS) byly stanoveny v hepatopankreatu tilapie (až 350 ng.g⁻¹ tkáně). U kapra maximální hodnota koncentrace microcystinů v hepatopankreatu dosahovala 316 ng.g⁻¹ tkáně a to pouze ve 2 týdnů expozice. V ostatních týdnech byly hodnoty pod limitem detekce. Koncentrace ve svalovině byla u obou druhů pod limitem detekce (méně než 2 ng.g⁻¹ tkáně), pouze ve třech vzorcích u tilapie ve 2 týdnů expozice byla nalezená ve svalovině vyšší koncentrace microcystinů (15 ng.g⁻¹ tkáně). Tyto koncentrace byly mnohem nižší než koncentrace nalezené v *Tilapia rendalli* po experimentálním krmení toxickým *Microcystis aeruginosa* (Soares et al., 2004). Koncentrace nalezené v kontrolních rybách ve 2, 4, 6 a 8 týdnů byly vždy nižší ($p \leq 0.05$) než koncentrace v exponovaných rybách v příslušných týdnech.

Prezentace výsledků koncentrace microcystinů v hepatopankreatu u tilapií nilských se statistickou analýzou je znázorněno v grafu č. 1. V grafu č. 2. je znázorněna koncentrace microcystinů v hepatopankreatu kapra. Celkové množství microcystinů ve vodě v sádkách i v rybníku je uvedeno v tab. 1.

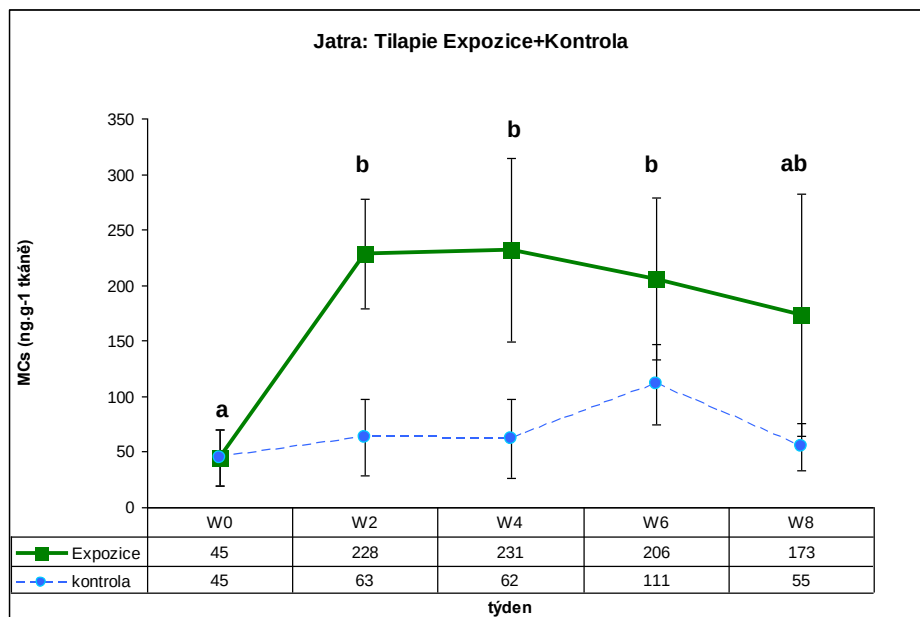
Tab. č. 1. Koncentrace microcystinů ve vodě ($\mu\text{g.l}^{-1}$) a v biomase ($\mu\text{g.g}^{-1}$) v sádkách Rybníkářství Pohořelice, a.s. a v Novoveském rybníku.

sádky Pohořelice, a.s.			Novoveský rybník		
Týden		koncentrace MCs	Datum		koncentrace MCs
W0	Biomasa	1211,1	10.7.2007	Biomasa	180,9
	Voda	17,4		Voda	5,3
W2	Biomasa	1200,4	24.7.2007	Biomasa	104,7
	Voda	25,4		Voda	4,8
W4	Biomasa	1187,3	7.8.2007	Biomasa	38,8
	Voda	20,5		Voda	2,3
			21.8.2007	Biomasa	26,8
				Voda	1,7
			6.9.2007	Biomasa	20,2
				Voda	2,3
			18.9.2007	Biomasa	88,8
				Voda	2,4
			2.10.2007	Biomasa	41,3
				Voda	9,5
			16.10.2007	Biomasa	38,3
				Voda	4,3
			14.11.2007	Biomasa	-
				Voda	0,3

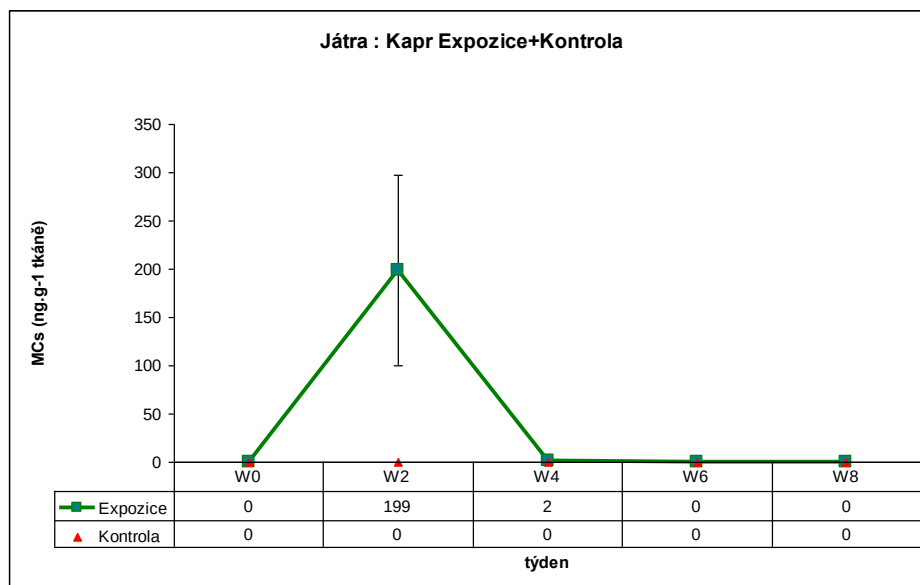
Velmi významné je také snížení MCs po přemístění ryb do dechlorované pitné vody. Podobné výsledky byly popsány u kapra obecného a tolstolobika bílého (Adamovský et al., 2007). Snížení MCs v játrech bylo nalezeno i u nedospělých karasů stříbřitých po 48-96 h, kdy byl podán rybám MC-LR intraperitoneální injekcí (Malbrouck et al., 2003).

Koncentrace microcystinů ve tkáních u karnivorních ryb (candát obecný, štika obecná) byla ve všech odebraných vzorcích pod limitem detekce (2 ng.g^{-1} tkáně). Ovšem Xie L., et al. (2005) dokonce zaznamenal vyšší hodnoty microcystinů ve tkáních karnivorních a omnivorních ryb než u býložravých ryb. Koncentrace toxinů ale závisí na množství přijaté potravy, které bývá podstatně nižší u karnivorních než u býložravých ryb (Gkelis et al., 2006). Vliv na kumulaci toxinů mohou mít také rozdíly mezi gastrointestinálním traktem karnivorních ryb ve srovnání s planktonofágními a býložravými rybami (Fischer et al., 2000), jako je např. délka střeva, absorpční kapacita střeva nebo rozdílné pH v trávicím traktu těchto ryb (Carbis et al., 1997).

Graf č. 1. Koncentrace microcystinů (ng.g^{-1} tkáně) v hepatopankreatu tilapií se statistickou analýzou. Popisy (a,b) signalizují výsledky ANOVA+Tukey testu - skupiny označené stejným popisem nejsou statisticky významné, W0 - W8 vyjadřují počet týdnů (4 týdny expozice, 4 týdny vyplavování).



Graf č. 2. Koncentrace microcystinů (ng.g^{-1}) v hepatopankreatu u kapra obecného, W0 - W8 vyjadřují počet týdnů (4 týdny expozice, 4 týdny vyplavování).



Závěr

Závěrem lze konstatovat, že ryby z Novoveského rybníka, které byly dlouhodobě v nízkých koncentracích MCs, se mohly lépe adaptovat a rychleji MCs odbourávat, v jejich tkáních proto byly hladiny MCs pod limitem detekce. Ryby v pohořelických sádkách byly krátkodobě ve vysokých koncentracích MCs, jejich organismus se ještě nestačil adaptovat a proto u nich byly ve tkáních nalezeny nadlimitní hodnoty MCs.

Poděkování

V závěru tohoto příspěvku bychom chtěli poděkovat za trvalou podporu od Výzkumného centra RECETOX, Botanického ústavu AVČR, VFU a Rybníkářství Pohořelice a.s. Tento výzkum je rovněž podporován grantem NAZV QH71015 "Minimalizace rizik výskytu metabolitů sinic v technologických procesech rybářského sektoru" a grantem IGA AF DP 22/2008 „Vliv cyanotoxinů na kvalitu masa u různých druhů ryb“.

Literatura

- ADAMOVSKEÝ, O., KOPP, R., HILSCHEROVÁ, K., BABICA, P., PALÍKOVÁ, M., PAŠKOVÁ, V., NAVRÁTIL, S., BLÁHA, L. (2007): Microcystin kinetics (bioaccumulation, elimination) and biochemical responses in common carp and silver carp exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environ Toxicol Chem* 26:2687-2693.
- AMORIM, A., VASCONCELOS, V. (1999): Dynamics of microcystins in the mussel *Mytilus galloprovincialis*, *Toxicon* 37, 1041-1052.
- CARBIS, C. R., SIMONS, J. A., GRANT, P., MITCHELL, G. F., ANDERSON, J. W., McCAULEY, I. (1997): A study of feral carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implications for fish health. *Journal of Fish Diseases* 20(2): 81-91.
- CARMICHAEL, W.W. (1992): Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins, *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445-449.
- FISCHER, W. J., DIETRICH, D. R. (2000): Pathological and biochemical characterization of microcystin-induced hepatopancreas and kidney damage in carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 164(1): 73-81.
- GKELIS, S., LANARAS, T., SIVONEN, K. (2006): The presence of microcystins and other cyanobacterial bioactive peptides in aquatic fauna collected from Greek freshwaters. *Aquatic Toxicology* 78(1): 32-41.
- CHORUS, I., BARTRAN, J. (1999): Toxic Cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management, E&F N Spon, London.
- ISO 10260 (1992): Water quality. Measurement of biochemical parameters. Spectrometric determination of the chlorophyll-a concentration. Int. Org. Standard, 1st ed, Geneva, Switzerland, 6 pp.
- MAGALHAES, V. F., MARINHO, M. M., DOMINGOS, P., OLIVEIRA, A. C., COSTA, S. M., AZEVEDO, L. O., AZEVEDO, S. (2003): Microcystins (Cyanobacteria hepatotoxins) bioaccumulation in fish and crustaceans from Sepetiba Bay (Brasil, RJ), *Toxicon* 42, 289-295.
- MAGALHAES, V. F., SOARES, R. M., AZEVEDO, S. M. F. O. (2001): Microcystin contamination in fish from the Jacarepagua Lagoon (Rio de Janeiro, Brazil): Ecological implication and human health risk, *Toxicon* 39, 1077-1085.
- MALBROUCK, C., TRAUSCH, G., DEVOS, P., KESTEMONT, P. (2003): Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comp Biochem Physiol C* 135:39-48.
- MARŠÁLEK, B., KERŠNER, B., MARVAN, P. (1996): Vodní květy sinic, p. 141, *Nadatio Flos-aque*, Brno.
- SOARES, R. M., MAGALHAES, V. F., AZEVEDO, S. M. F. O. (2004): Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 70(1):1-10.

- TENCALLA, F., DIETRICH, D., SCHLATTER, C. (1994): Toxicity of microcystis-aeruginosa peptide toxin to Yearling Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquatic Toxicology* 30, 215-224.
- THOSTRUP, L., CHRISTOFFERSEN, K. (1999): Accumulation of microcystin in *Daphnia magna* feeding on toxic microcystis, *Arch. Hydrobiol.* 145, 447-467.
- WHO (1998): Guidelines for drinking water quality. World health organisation, Geneva.
- WILLIAMS, D. E., CRAING, M., DAWE, S. C., KENT, M. L., ANDERSEN, R. J., HOLMES, C. F. B. (1997): Bioaccumulation and clearance of microcystins from salt water mussels, *Mytilus edulis*, and in vivo evidence for covalently bound microcystins in mussel tissues, *Toxicon* 35, 1617-1625.
- XIE, L., XIE, P., GUO, L., LI, L., MIYABARA, Y., PARK, H. D. (2005): Organ distribution and bioaccumulation of microcystins in freshwater fish at different trophic levels from the eutrophic Lake Chaohu, China. *Environ Toxicol* 20:293–300.

Adresy autorů:

Ing. Jana Hlávková, Doc. Dr. Ing. Jan Mareš, Ing. Radovan Kopp, Ph.D., Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 613 00 Brno, Česká republika, Botanický ústav Akademie věd, CCT (RECETOX, MU), Kamenice 3, 625 00 Brno, Česká republika, e-mail: janahlavkova@centrum.cz

Mgr. Ondřej Adamovský, Mgr. Michal Oravec, Doc. Mgr. Luděk Bláha, Ph.D., Centrum pro cyanobakterie a jejich toxiny (Botanický ústav Akademie věd; RECETOX, Masarykova univerzita), Kamenice 3, 625 00 Brno, Česká republika

MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno