

Słowa kluczowe: pstrąg tęczowy, dysmutaza ponadtlenkowa, reduktaza glutationowa, katalaza, kwas moczowy, mocznik, bilirubina, magnez, wapń, miedź, cynk, wapń, żelazo

Ewa BRUCKA-JASTRZĘBSKA\*, Dorota KAWCZUGA\*,  
Monika RAJKOWSKA\*\*, Jolanta KEMPTER\*\*\*

## **WPLYW WARUNKÓW HODOWLI NA POZIOM WEWNĄTRZUSTROJOWYCH ANTYOKSYDANTÓW I ZAWARTOŚĆ MAKRO - I MIKROELEMENTÓW U PSTRAĞA TĘCZOWEGO (*Oncorhynchus mykiss* Rich.)**

Pstrągi należą do najbardziej wrażliwych gatunku ryb na zmiany klimatyczne jak i antropogeniczne. Celem pracy była ocena wpływu warunków i miejsca prowadzenia hodowli na organizm pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Rich.), co dokonano w oparciu o oznaczenie aktywności enzymatycznych (SOD, GPx, CAT) i nieenzymatycznych (kwas moczowy, mocznik, bilirubina) antyoksydantów. Zbadano również poziom biopierwiastków: Mg, Ca, Cu, Fe, Zn oraz określono wpływ zakażeń wirusowych i bakteryjnych na organizm pstrąga.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić dodatnią współzależność pomiędzy aktywnością enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w badanych narządach pstrąga tęczowego. U pstrągów, u których zdiagnozowano zakażenie wirusowe lub bakteryjne, obserwowano niższą aktywność enzymatycznych antyoksydantów w nerkach, wątrobie i krwi. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że miejsce i warunki prowadzenia hodowli mają istotny wpływ na stan fizjologiczny organizmu pstrąga tęczowego.

W procesie rozwoju organizmów żyjących w środowisku lądowym jak i wodnym zasadniczą rolę odgrywają warunki, w jakich jest prowadzona hodowla. W wyniku działalności człowieka obserwujemy coraz większy wzrost antropopresji na środowisko przyrodnicze. Efektem tego jest wzrost zanieczyszczeń ekosystemów wodnych jak i lądowych. Ryby żyjąc w środowisku wodnym są najbardziej narażone na czynniki antropogeniczne.

---

\* Uniwersytet Szczeciński, Wydział Nauk Przyrodniczych, Katedra Fizjologii, Szczecin, Polska, ewabrucka@poczta.onet.pl

\*\* Akademia Rolnicza, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Katedra Toksykologii, ul. Papieża Pawła VI, Szczecin

\*\*\* Akademia Rolnicza, Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa, Zakład Akwakultury, ul. Kazimierza Królewicza 4, Szczecin

Pstrągi należą do gatunków ryb bardzo wrażliwych na zmiany klimatyczne jak i antropogeniczne. Wiadomo, że antyoksydanty potrzebne są aby nie dopuścić do zbyt dużej produkcji wolnych rodników w organizmie. Wiele zależy od tego, jaki jest sposób działania antyutleniaczy. Działanie antyoksydantów może bezpośrednio hamować wolne rodniki lub stymulować naturalne wewnętrzne systemy przeciwoksydacyjne komórki, np.: aktywacja genów kodujących peroksydazę glutationową (GPx) i dysmutazę ponadtlenkową (SOD) [4]. Utleniający nacisk jest zdefiniowany jako zakłócenie bilansu antyoksydantów prowadzący do potencjalnego uszkodzenia komórek organizmu. Jest to skutek jednego z trzech czynników: wzrostu reaktywnych form tlenu (RFT), osłabienia systemów obrony antyutleniacza i niezdolności naprawy uszkodzeń w komórce. Jako konsekwencja ludzkiej działalności różne trucizny docierają do wodnych ekosystemów. Mogą one oddziaływać na siebie co może zmieniać ich toksyczność. Dużo ryb jest narażonych na znaczne zanieczyszczenie i koncentracje środków toksycznych [8].

Celem pracy była ocena wpływu warunków i miejsca prowadzenia hodowli na organizm pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Rich.). Stan fizjologiczny organizmów przedstawiono w oparciu o oznaczenie aktywności enzymatycznych antyoksydantów (SOD, GPx, CAT) i nieenzymatycznych antyoksydantów (kwas moczowy, mocznik, bilirubina). Zbadano również u pstrągów poziom makroelementów (Mg, Ca) i mikroelementów (Cu, Fe, Zn) w różnych tkankach. Dodatkowo wykazano czy osobniki są zakażone wirusami czy bakteriami oraz jaki jest wpływ zakażenia na organizm pstrąga.

Badaniu poddano 90 pstrągów tęczowych (*Oncorhynchus mykiss* Rich.) w 6 i 12 miesiącu życia. Ryby były hodowane w Polsce, w trzech różnych stacjach hodowlanych znajdujących się na terenie województwa zachodniopomorskiego. Masa pojedynczych ryb wynosiła 289,5–395,4 g, a długość 28,7–38,5 cm. Ryby w warunkach hodowlanych były żywione granulatem paszowym Aller Aqua o zawartości 37% białka i 12% tłuszczu.

Z każdej ryby do analiz chemicznych, biochemicznych, bakteriologicznych i wirusologicznych pobrano próbki: krwi, wątroby, nerek, skrzel i skóry.

Enzymy antyoksydacyjne i parametry biochemiczne oznaczono standaryzowanymi metodami przy użyciu odczynników firmy SIGMA. Próbki narządów zmineralizowano na mokro w stężonym HNO<sub>3</sub> w piecu mikrofalowym CEM MDS 2000. Próbki poddano analizie na zawartość Mg, Ca, Cu, Fe, Zn przy użyciu emisyjnej spektrometrii atomowej w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-AES) w aparacie Jobin Yvon typ JY-24. Wykonano badania w kierunku detekcji wirusów z wykorzystaniem reakcji PCR. Badania w kierunku zakażenia bakteryjnego wykonano standaryzowanymi metodami bakteriologicznymi.

Główne zmiany wywołane przez reaktywne formy tlenu (RFT/ROS) to zmiany w lipidach błony komórkowej, DNA i/albo białka. Wynikające z tego uszkodzenie może zmienić funkcje komórki zmieniając np.: pH, co w końcu prowadzi do zgonu komórki [3]. Raz wyprodukowane RFT mogą uszkodzić komórkowe komponenty

i tkanki, często prowadząc do łącznego uszkodzenia organizmu [5]. RFT są wygenerowane przez warunki fizjologiczne (łańcuch oddechowy), patologiczne (określone choroby, czynniki chorobotwórcze) lub toksyczne (metale ciężkie, związki utleniające) [7]. Informacja o obronie enzymatycznych i nieenzymatycznych antyutleniaczy w organizmie pstrągów jest bardzo uboga, pomimo że ryby stale są wystawione na oddziaływanie środowiska [1].

Badania zostały przeprowadzone w trzech różnych ośrodkach hodowlanych. Dwie grupy pstrągów były hodowane w kanale pochłoniczym zaopatrywanym w wody zrzutowe pochodzących z elektrowni Dolna Odra. Za kryterium podziału na grupy przyjęto odległość miejsca hodowli od punktu zrzutu wód pochłoniczych. I grupę doświadczalną stanowiły ryby hodowane w bezpośredniej odległości od punktu zrzutu wód pochłoniczych (I grupa). Drugą grupę stanowiły ryby hodowane w odległości około 1500 m od punktu zrzutu wód pochłoniczych (II grupa). Natomiast trzecia grupa ryb była hodowana w prywatnym ośrodku hodowli pstrągów przeznaczonych do konsumpcji oddalonym o 65 km od elektrowni (III grupa). W prowadzonych badaniach określono aktywność enzymów antyoksydacyjnych na przykładzie: katalazy (CAT), dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i peroksydazy glutationowej (GPx) w wybranych tkankach pstrągów tęczowych między 6 a 12 miesiącem życia hodowanych w 3 różnych ośrodkach (tab. 1).

Tab. 1. Poziom enzymatycznych i nieenzymatycznych antyoksydantów w różnych tkankach pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Rich.) hodowanego w trzech ośrodkach województwa zachodniopomorskiego w okresie od 6 do 12 miesiąca życia

Parametr	Badana tkanka	I grupa	II grupa	III grupa
		średnia±SD	średnia±SD	średnia±SD
CAT [U/mg białka]	krw	67,8 ± 33,4a	65,1 ± 28,9	86,8 ± 25,4
	wątroba	181,7 ± 177,6	180,2 ± 181,4	231,7 ± 75,6
	nerka	327,3 ± 167,5	313,3 ± 198,2	386,3 ± 143,3
	skrzela	318,1 ± 179,4	328,1 ± 183,4	367,1 ± 155,4
SOD [U/mg białka]	krw	6,5 ± 2,1	6,9 ± 2,6	8,4 ± 2,5
	wątroba	8,2 ± 18,2	7,8 ± 16,5	9,6 ± 4,4
	nerka	3,9 ± 0,9	4,0 ± 0,7	5,3 ± 1,1
	skrzela	4,6 ± 2,1	4,3 ± 1,7	6,2 ± 1,3
GPx [U/mg białka]	krw	7,1 ± 2,6	7,7 ± 1,9	9,3 ± 1,9
	wątroba	1,6 ± 0,8	1,8 ± 1,1	2,3 ± 0,9
	nerka	33,6 ± 22,8	35,8 ± 19,7	41,6 ± 16,8
	skrzela	3,6 ± 1,4	3,9 ± 1,6	4,7 ± 0,7
Kwas moczowy [mg/dl]	surowica	0,95 ± 0,24	0,91 ± 0,33	0,85 ± 0,43
Mocznik [mg/dl]	surowica	8,6 ± 1,54	8,9 ± 1,87	848 ± 1,42
Bilirubina [mg/dl]	surowica	0,27 ± 0,34	0,29 ± 0,21	0,26 ± 0,24

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że aktywność enzymatycznych antyutleniaczy ulega podwyższeniu wraz ze wzrostem odległości od punktu zrzutu wód

pochłodniczych z elektrowni i spadkiem temperatury wody. Średnio aktywność CAT w grupie III wzrosła 10–30%, względem grupy I i II. Natomiast aktywność SOD i GPX w grupie III wzrosła średnio 20–35% względem grupy I i II. Uzyskane różnice pozwalają stwierdzić, że warunki hodowli mają istotne znaczenie dla aktywności enzymatycznych antyutleniaczy. Natomiast stężenie nieenzymatycznych antyoksydantów (bilirubina, kwas moczowy, mocznik) nie uległo statystycznie istotnej zmianie w zależności od miejsca hodowli. Parametry te zmieniają się wraz z wzrostem zanieczyszczenia wody i zwiększonym ryzykiem wystąpienia chorób bakteryjnych i/lub wirusowych ryb. Dochodzi wtedy często do komórkowych uszkodzeń, a w konsekwencji do śmierci organizmu.

Ryby, a także inne organizmy wodne są w dużej mierze narażone nie tylko na toksyny, ale także na wirusy, bakterie i pasożyty żyjące w wodzie. Każdy czynnik z osobna jest w stanie wywołać olbrzymie zmiany prowadzące początkowo do choroby, a kończąc nawet na śmierci ryb. Wpływ wielu szkodliwych czynników, w tym wirusów czy bakterii na organizm ryb uruchamia kaskadę reakcji, w których uczestniczy system obrony antyutleniacza. Najbardziej podatnymi na choroby rybami słodkowodnymi naszej fauny są pstrągi tęczowe. W zbiornikach wodnych występuje szereg gatunków bakterii bądź wirusów zdolnych samoistnie lub jako czynniki wniknąć do organizmu i wywoływać zakażenie u ryb słodkowodnych. Straty wywołane zakażeniem są szczególnie duże latem, gdy wzrost temperatury wody powyżej 15°C zwiększa wrażliwość ryb na różne infekcje. Potwierdza to uzyskany w prowadzonych badaniach spadek aktywności enzymatycznych antyoksydantów wraz ze wzrostem temperatury wody u ryb hodowanych w zrzutowych wodach pochłodniczych.

Różne gatunki bakterii (*Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*) towarzyszą rybom przez całe życie, nie tylko szkodząc ale i pomagając, np.: w procesie trawienia. Do rozwoju choroby najczęściej przyczynia się obniżenie odporności ryb, które następuje w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Dlatego bakterie te są powszechnie nazywane jako warunkowo chorobotwórcze [9]. Pstrągom tęczowym (*Oncorhynchus mykiss*) najczęściej zagrażają takie choroby bakteryjne, jak: wrzodzienica wywołana przez drobnoustroje z grupy *Aeromonas* i *Pseudomonas*, bakteryjna choroba nerek (BKD) wywołana przez *Renibacterium salmoninarum* oraz jersinioza wywołana przez *Yersinia ruckeri* [2]. Istnieje pogląd, że pstrąg tęczowy jest pierwotnym nosicielem *A. salmonicida* i dlatego z biegiem czasu organizm ryby przystosował się do obecności tej bakterii.

U pstrągów hodowanych w zbiorniku zasilanym przez wody zrzutowe z Dolnej Odry (I i II grupa) zdiagnozowano wirusowe zakażenie posocznicą wirusową łososiowatych (VHS) oraz zakażenia bakteriami grupy *Aeromonas* i *Pseudomonas*. Jest to wynikiem zmiennych warunków termicznych wody. Zakażenia wirusowe powodują obniżenie całkowitego statusu antyoksydacyjnego organizmów jednakże nie wpływają na poziom biopierwiastków. U osobników zakażonych bakteriami

obserwuje się fluktuacyjne zmiany w poziomie antyutleniaczy i biopierwiastków, co związane jest z intensywnością i przebiegiem procesu chorobowego.

W prowadzonych badaniach określono poziom makro- i mikroelementów w wybranych tkankach pstrągów tęczowych między 6 a 12 miesiącem życia hodowanych w 3 różnych ośrodkach (tab. 2).

Tab. 2. Poziom makroelementów (Mg, Ca) i mikroelementów (Fe, Zn, Cu) w różnych tkankach pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss* Rich.) hodowanego w trzech ośrodkach województwa zachodniopomorskiego w okresie od 6 do 12 miesiąca życia

Biopierwiastki	Badana tkanka	I grupa	II grupa	III grupa
		średnia±SD	średnia±SD	średnia±SD
Mg [mg/kg m.m]	krw	36,6 ± 16,1	38,1 ± 18,1	35,4 ± 11,4
	wątroba	79,0 ± 14,1	78,0 ± 13,1	77,6 ± 15,3
	nerka	66,3 ± 19,2	63,2 ± 13,6	67,3 ± 14,6
	skrzela	146,1 ± 17,6	158,1 ± 13,6	153,3 ± 14,5
Ca [mg/kg m.m]	krw	76,5 ± 8,1	72,2 ± 11,1	76,8 ± 12,8
	wątroba	118,2 ± 18,2	122,2 ± 13,3	127,1 ± 15,2
	nerka	103,9 ± 5,9	112,3 ± 25,4	123,2 ± 22,9
	skrzela	2214,6 ± 62,1	1989,6 ± 88,3	2054,6 ± 92,1
Fe [mg/kg m.m]	krw	27,1 ± 5,6	26,7 ± 3,9	29,3 ± 3,9
	wątroba	23,6 ± 3,7	24,8 ± 4,1	22,3 ± 2,9
	nerka	33,6 ± 6,8	35,8 ± 9,7	41,6 ± 6,8
	skrzela	36,6 ± 6,4	33,9 ± 3,6	34,7 ± 5,7
Cu [mg/kg m.m]	krw	2,8 ± 0,4	4,1 ± 0,9	3,8 ± 0,4
	wątroba	101,7 ± 17,6	87,2 ± 8,4	98,7 ± 5,6
	nerka	2,3 ± 0,5	3,3 ± 0,8	3,3 ± 0,3
	skrzela	3,1 ± 0,4	3,6 ± 0,9	3,4 ± 0,4
Zn [mg/kg m.m]	krw	17,8 ± 3,4	16,1 ± 2,9	18,8 ± 2,4
	wątroba	57,7 ± 7,6	68,2 ± 18,2	69,7 ± 7,6
	nerka	98,3 ± 17,5	83,3 ± 18,2	86,3 ± 13,3
	skrzela	76,1 ± 17,4	77,1 ± 18,4	67,1 ± 15,4

U przebadanych pstrągów nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w poziomie makro- i mikroelementów pomiędzy trzema badanymi grupami. Również nie stwierdzono statystycznie istotnych zależności pomiędzy stężeniem pierwiastków a wystąpieniem zakażeń bakteryjnych i wirusowych u ryb.

Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić dodatnią współzależność pomiędzy aktywnością enzymatycznych antyoksydantów a poziomem nieenzymatycznych antyoksydantów w badanych narządach pstrąga tęczowego. Wykazano, że miejsce hodowli ma statystycznie istotny wpływ na aktywność enzymatycznych antyoksydantów. Wykazano również wzrost aktywności SOD, GPx i CAT wraz ze wzrostem stabilności warunków hodowli. Wzrost natlenienia i temperatury wody w zbiornikach hodowlanych przyczynił się do spadku aktywności SOD, GPx i CAT. Otrzymane wyniki sugerują, że wzrost stężenia miedzi i cynku powoduje wzrost aktywności SOD i CAT w organizmie ryb. U pstrągów, u których zdiagnozowano

zakażenie wirusowe lub bakteryjne, obserwowano niższą aktywność enzymatycznych antyoksydantów w nerkach, wątrobie i krwi. Otrzymane wyniki pozwalają stwierdzić, że miejsce i warunki prowadzenia hodowli mają istotny wpływ na stan fizjologiczny organizmu pstrąga tęczowego. Enzymatyczne i nieenzymatyczne antyutleniacze są podstawowymi substancjami, które utrzymują stan równowagi pomiędzy aktywnością antyutleniaczy a ilością powstających RFT w komórkach ryb i służą jako ważna biologiczna obrona przeciw utleniającemu naciskowi. Antyutleniacze ryb mogą być przydatnymi bioindykatorami w zatruciu organizmu środkami zanieczyszczającymi [6].

#### LITERATURA

- [1] Ahmad I., Hamid T., Fatima M., Hitendra S., Chand, Jain S.K., Athar M., Raisuddin S. 2000. *Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (Channa punctatus Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure.* Bioch. Bioph. Acta 1523: 37-48.
- [2] Brylińska M. 2000: Ryby słodkowodne Polski. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2000
- [3] Dorval J., Hontela A. 2003. *Role of glutathione redox cycle and catalase in defense against oxidative stress induced by endosulfan in adrenocortical cells of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss).* Toxicol. App. Pharmacol. 192: 191-200.
- [4] Le Clen F. 2006. *Przeciwtleniacze, rewolucja w medycynie XX wieku.* Tom I, 22-197.
- [5] Lushchak V.I., Bagnyukova T.V. 2006. *Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish.* Comp. Biochem. Physiol. Part B 144: 283-289.
- [6] Monteiro D.A., Almeida J.A., Rantin F.T., Kalinin A.L. 2006. *Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, Brycon cephalus, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion).* Comp. Biochem. Physiol. Part C 143: 141-149.
- [7] Peña-Llopis S., Ferrando M.D., Peña J.B. 2002. *Impaired glutathione redox status in associated with decreased survival in two organophosphate - poisoned marine bivalves.* Chemosphere 47: 485-497.
- [8] Varanka Z., Rojik I., Varanka I., Nemcsok J., Abraham M. 2001. *Biochemical and morphological changes in carp (Cyprinus carpio L.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid.* Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 128: 467-478.
- [9] Żelazny J. 2007: Ochrona zdrowia w gospodarce rybackiej. Monografia Puławy.

#### THE EFFECT OF CULTURE CONDITIONS OF LEVELS OF SYSTEMIC ANTIOXIDANTS STATUS, MACROELEMENTS AND MICROELEMENTS IN RAINBOW TROUT (*ONCORHYNCHUS MYKISS* RICH.)

Salmonids are fish extremely sensitive to climate changes and anthropogenic pressure. The aim of this study was to estimate the effect of the fish culture site and culture conditions on organism of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Rich.). Effects of culture conditions were estimated on the basis of activities of enzymatic (SOD, GPx, CAT) and non-enzymatic (uric acid, urea, bilirubin) antioxidants. Additionally, levels of bioelements (Mg, Ca, Cu, Fe, Zn) were determined and effects of viral and bacterial infections were assessed.