

Innowacje w nowoczesnej gospodarce rybackiej

Innowacje w nowoczesnej gospodarce rybackiej

pod redakcją:
Agaty A. Cejko
Agnieszki Napiórkowskiej-Krzebietke



Olsztyn 2023

Recenzent: dr hab. inż. Adam Tański, prof ZUT

Redakcja techniczna: Henryk Chmielewski

Projekt okładki: Henryk Chmielewski

Skład, łamanie, grafika: Jarmila Grzegorzczak, Henryk Chmielewski

© Copyright by

Institut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza
– Państwowy Institut Badawczy
Olsztyn 2023

ISBN 978-83-66805-14-9

Wydawnictwo Institutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza
– Państwowy Institut Badawczy
10-719 Olsztyn-Kortowo, ul. Oczapowskiego 10
tel. 89 524 01 71, 89 524 10 15
E-mail: wydawnictwo@infish.com.pl

Druk: TOM ACTIVE, 10-080 Olsztyn, ul. Profesorska 9

Innowacje w nowoczesnej gospodarce rybackiej

Autorzy:

dr hab. Agata Anna CEJKO, dr hab. Beata Irena CEJKO,
dr inż. Grzegorz J. DIETRICH, prof. dr hab. Dorota FOPP-BAYAT,
dr hab. Dariusz KACZMARCZYK, Agnieszka KOŁASIŃSKA,
dr hab. Agnieszka NAPIÓRKOWSKA-KRZEBIETKE, prof. IRS-PIB,
mgr inż. Iwona PIOTROWSKA, dr inż. Maciej ROŻYŃSKI

Spis treści

Agata Cejko - Mikrobiomy – potencjał i zagrożenia efektywnych mikroorganizmów w produkcji rybackiej	9
Beata Irena Cejko, Dorota Fopp-Bayat, Agnieszka Kołasińska - Kontrola jakości nasienia w rozrodzie ryb jesiotrowatych	23
Agnieszka Napiórkowska-Krzebietke, Grzegorz J. Dietrich - Katastrofa ekologiczna w rzece Odrze i w wodach hydrologicznie związanych z Odrą latem 2022 roku – przyczyny, skutki i rekomendacje	43
Dariusz Kaczmarczyk - Bazy danych genetycznych ryb i ich zastosowanie w ochronie ryb wędrownych	59
Iwona Piotrowska - Technologia podchowu larw i narybku ryb jesiotrowatych w systemie RAS	69
Maciej Rożyński - Wskaźniki hematologiczne i biochemiczne w ocenie stanu zdrowotnego ryb	83

Mikrobiomy – potencjał i zagrożenia efektywnych mikroorganizmów w produkcji rybackiej

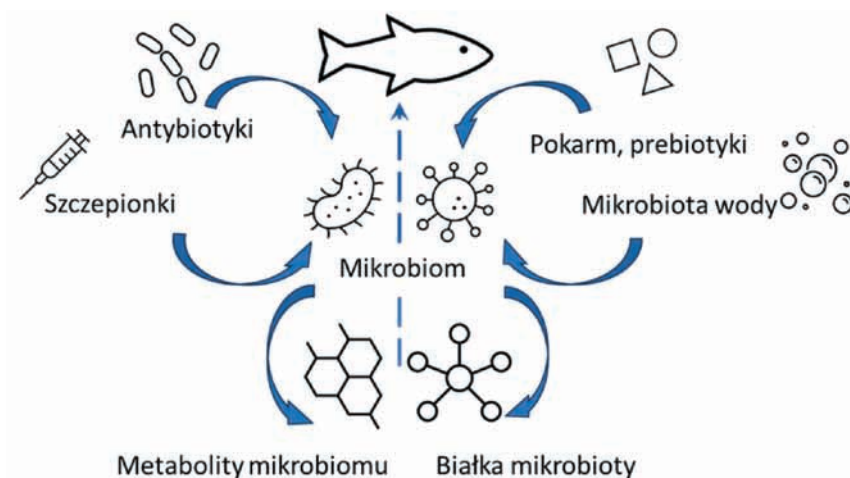
Agata Cejko

Zakład Bioekonomiki Rybactwa, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza –
Państwowy Instytut Badawczy w Olsztynie

Wstęp

Ekosystemy wodne cechuje swoista dynamika populacji mikroorganizmów w czasie, a specyficzna struktura składu i liczebności populacji zależna jest od szeregu czynników biotycznych (np. genotyp, stan fizjologiczny, aktywność żerowania) i abiotycznych (środowiskowych) (Yaima i in. 2023). Wykazano, że stan zdrowotny ryb, przeżywalność czy wydajność np. produkcji w dużym stopniu determinowane są mikrobiotą środowiska zewnętrznego jak i mikrobiomem środowiska wewnętrznego ryb (rys. 1).

Zdecydowana większość badań nad mikrobiomem koncentruje się na bakteriach. Niewiele informacji dotyczy innych mikroorganizmów, w tym grzybów/drożdży, pierwotniaków, wirusów, archeoców, które tworzą mikrobiotę czy mikrobiom. Dużym wyzwaniem w analizach mikrobiologicznych pozostaje nadal zidentyfikowanie spośród tysięcy gatunków Prokaryota, tych o kluczowym wpływie na organizm ryb. Długoterminowe (128 dni) badania Yaima i in. (2023) prowadzone w pięciu systemach modelowych akwakultury wykazały istotne czasowe zmiany dynamiki populacji 303 gatunków szczepów mikroorganizmów. Obserwując drastyczny spadek dotyczący liczebności populacji mikrobioty środowiska zewnętrznego w czasie stwierdzono, że niektóre taksony mikroorganizmów wpływają znacząco na behavior ryb, w tym ich aktywność. Badanie własne na gatunku modelowym (medaka) potwierdzają również korzystny wpływ mikroorganizmów na odpowiedź immunologiczną (tabela 3, Cejko i in., dane niepublikowane). Yaima i in. (2023) udowodnili, że w szczególności bakterie produkujące witaminę B12 (np. *Cetobacterium somerae*) odpowiedzialne były za poziom aktywności ryb. Może się to wiązać z tym, że u kręgowców, w tym ryb kobalamina (witamina B12) odgrywa istotną rolę w



Rys. 1. Interakcje mikrobiotyczne między ekosystemem a organizmem ryby w akwakulturze.

funkcjonowaniu układu nerwowego czy dojrzewaniu erytrocytów (Huang i in. 2018, Kim i in. 2021). Badania mikrobiologiczne dowodzą też, że może być ona syntetyzowana tylko przez określone klady bakterii i archeowców (LaFrentz i in. 2020). Z kolei najwięcej genów odpowiedzialnych za syntezę kobalaminy u *C. somerae*, decyduje o tym, że wytwarza ona najwyższe stężenia tej witaminy w porównaniu do innych bakterii obserwowanych w mikrobiomach obecnych u ryb (Sugita i in. 1991, Tsuchiya i in. 2008). Wspomniana bakteria, ale i blisko spokrewnione z nią mikroorganizmy (z rodziny *Flavobacteriaceae*) tworzą tzw. mikrobiom rdzeniowy, z potencjalnie pozytywnym wpływem na behavior ryb. Ponadto ww. autorzy wykazali bezpośrednią (zajęcie niszy) jak i pośrednią (aktywacja odporności ryb) konkurencyjność „mikrobiomu rdzeniowego” dla szczepów bakterii chorobotwórczych. Jakkolwiek cytowane wyniki dotyczyły jednego gatunku ryby hodowanego w akwakulturze (węgorz japoński) to wskazują na zasadność badań podkreślających złożoność szerokorozumianego dobrostanu ryb, w tym interakcje z dynamiką mikrobioty ekosystemu.

Mikrobiom ekosystemu – podchowy kontrolowane

Punktem wyjścia w badaniach wpływu mikrobioty ekosystemu na kondycję ryb jest śledzenie jego składu gatunkowego i dynamiki tych populacji (Borges i in. 2021). Wiedza w jakim stopniu zmienia się struktura mikrobioty w czasie, ściśle powiązanego z organizmem ryb jest bardzo ograniczona i wymaga podjęcia prób monitorowania. Przedsięwzięcie takie wymaga jeszcze opracowania metodyki takich badań. Niemniej jednak

coraz częściej wskazuje się, że dla zachowania dobrostanu ryb i modelowaniu systemów podchowu niezbędna jest analiza choćby podstawowych (dominujących/podlegających fluktuacji w strukturze populacji) bakterii i/lub archeowców spośród szeregu gatunków mikroorganizmów kandydujących do wpływowych dla ichtiofauny. Stąd też w najnowszych badaniach stosuje się już pobieranie próbek wody do analiz mikrobiologicznych. Ponadto znajdujące się w wodzie niestrawione resztki pokarmu mogą być jednocześnie podstawą do wnioskowania o mikrobiomie jelitowym ryb (Klase i in. 2019, Stoeck i in. 2018). Analiza mikrobiologiczna próbek wody jest też źródłem informacji nt. warunków środowiska, paszy, procesu jej rozkładu i stąd potencjalnego źródła mikrobiomu jelitowego (Bartelme i in. 2019, Rud i in. 2017, Infante-Villamil i in. 2021). W 2023 roku w systemach recyrkulacyjnych akwakultury węgorza japońskiego ustalono, na podstawie analiz DNA skład kilkuset gatunków organizmów prokariotycznych. Następnie na podstawie spadku i wzrostu liczebności kilku populacji określono, które gatunki ściśle powiązane są ze stanem zdrowotnym ryb i wydajnością podchowu. W przytaczanych badaniach określono okresy podchowu, w których dominowały konkretne taksony bakterii. Okazało się, że przesunięcia między etapami obfitującymi w *Fusobacteriaceae*, następnie zdominowanymi przez *Flavobacteriaceae* i kolejno przez *Chitinophagaceae* miały wpływ na aktywność podchowowanego gatunku. Jakkolwiek wymienione rodziny bakterii obecne były przez cały okres podchowu w systemach recyrkulacyjnych, to fluktuacje ich liczebności były znaczące. Ponadto wpływ miały także dominujące *Cetobacterium* sp. (w rodzinie *Flavobacteriaceae*). Autorzy cytowanego eksperymentu udowodnili, że właśnie ten gatunek wykazywał najsilniejsze powiązania z aktywnością ryb w całym okresie podchowu. Warto podkreślić, że *Cetobacterium* sp. identyfikowane jest w mikrobiomie jelitowym gatunków ryb słodkowodnych (Kim i in. 2021).

Dynamika liczebności populacji wszystkich Prokaryota wynika z preferencji tych organizmów do określonego odczynu wody i jej natlenienia. Ustalenie struktury i dynamiki liczebności „mikrobiomów rdzeniowych” pozwala opracować model efektywności podchowu ryb zależny od mikroorganizmów. Cytowane wyżej doniesienia sugerują, że utrzymywanie mikrobiomu obfitującego w *Cetobacterium* sp. może być kluczowe dla utrzymania stabilności w systemach akwakultury ryb słodkowodnych. Z pewnością te najnowsze i pionierskie badania pokazują nie tylko interdyscyplinarne ale i innowacyjne podejście do fizjologicznych i ekologicznych procesów towarzyszących produkcji ryb.

Mikrobiom ryb – perspektywa produkcji akwakultury

Mikrobiom u ryb obecny jest na skórze, w jamach ciała, skrzelałach czy jelicie. Różnice w składzie mikrobiomu w różnych tkankach są spowodowane specjalizacją niszową i presją selekcyjną (Lorgen-Ritchie i in. 2023). Dla mikrobiomu utrzymanie homeostazy

ich żywicieli jest gwarantem przetrwania i ekspansji (Ley i in. 2008). Z kolei mikrobiomy są istotnym czynnikiem życia wszystkich kręgowców, w tym ryb gdyż odgrywają kluczową rolę w ich rozwoju, funkcjonowaniu układu immunologicznego i nerwowego, metabolizmie, zachowaniach żywieniowych (Yukgehnaish i in. 2020). Fizjologiczny wpływ mikrobiomu jelitowego na żerowanie i prewencje chorób odnotowano już u wielu gatunków ryb słodko- i słonowodnych, w tym łososiowatych czy karpowatych (Barko i in. 2018, Legrand i in. 2020, Tarnecki i in. 2017). Należy jednak pamiętać, że organizm ryby stale kontaktuje się z licznymi drobnoustrojami pato- i niepatogennymi bytującymi w wodzie, mogącymi mieć wpływ na kondycję ryb niezależnie od mikrobiomu jelitowego (LeGrand i in. 2020). Pojawienie się bakterii opornych na różne środki przeciwdrobnoustrojowe czy też chorób trudnych w wyeliminowaniu/niewiadomym pochodzeniu uzasadnia stosowanie mikroorganizmów jako probiotyków w prewencji infekcji. Jest to przyjazna dla środowiska alternatywa, tym bardziej że oporność na antybiotyki chorobotwórcze jest istotnym problemem biologicznym i ekologicznym. Jednocześnie uważa się, że stymulowanie rozwoju określonych mikroorganizmów, w tym jelitowych jest korzystne dla wzrostu gospodarza, zwłaszcza w początkowym etapie ontogenezy. Bezpośredniej przyczyny upatruje się w modyfikacji metabolitów bakteryjnych (rys. 1). Aktualnie używając skomplikowanych narzędzi bioinformatycznych możliwe jest zbadanie drobnoustrojów jelitowych. Przy pomocy tzw. analizy metagenomicznej określa się precyzyjnie materiał genetyczny zasiedlający niszę – dany mikrobiom (tu jelita). Izolowany materiał klonuje się *in vitro*, a następnie sekwencjonując fragmenty całego genomu, ocenia genetyczną różnorodność mikroorganizmów. Wyniki sekwencjonowania mikrobiomu i możliwość utrzymania jego homeostazy są cenną informacją dla produkcji. Obejmuje ona bowiem wpływ mikrobiomu jelitowego na fizjologię ryb (1), skład drobnoustrojów jelitowych różnych gatunków (2), czynniki wpływające na skład mikroorganizmów jelitowych (3) oraz działanie immunomodulujące drobnoustrojów jelitowych (4).

Różnorodność drobnoustrojów jelitowych jest specyficzna dla poszczególnych gatunków, a różne czynniki fizykochemiczne, takie jak: temperatura, odczyn pH, dostępność składników odżywczych czy warunki środowiskowe, wpływają na profil drobnoustrojów jelitowych. Dlatego interakcja mikrobiomu nie jest statyczna. W zależności od czasu przebywania danych bakterii (w tym w dominacji) określa się je jako mikrobiom przejściowy lub trwały (Prasanth i in. 2018, Shade i Handelsman 2012). Czasowo pewne mikroorganizmy pojawiają się np. w procesie pobierania pokarmu, który jest ich źródłem. Następnie w jelicie są one wypierane przez rezydujące tam stale bakterie, mające symbiotyczny związek z żywicielem (Zhang i in. 2016). Tabela 1 ilustruje różnice międzygatunkowe trwałego mikrobiomu jelitowego w dominacji u wybranych gatunków ryb.

TABELA 1

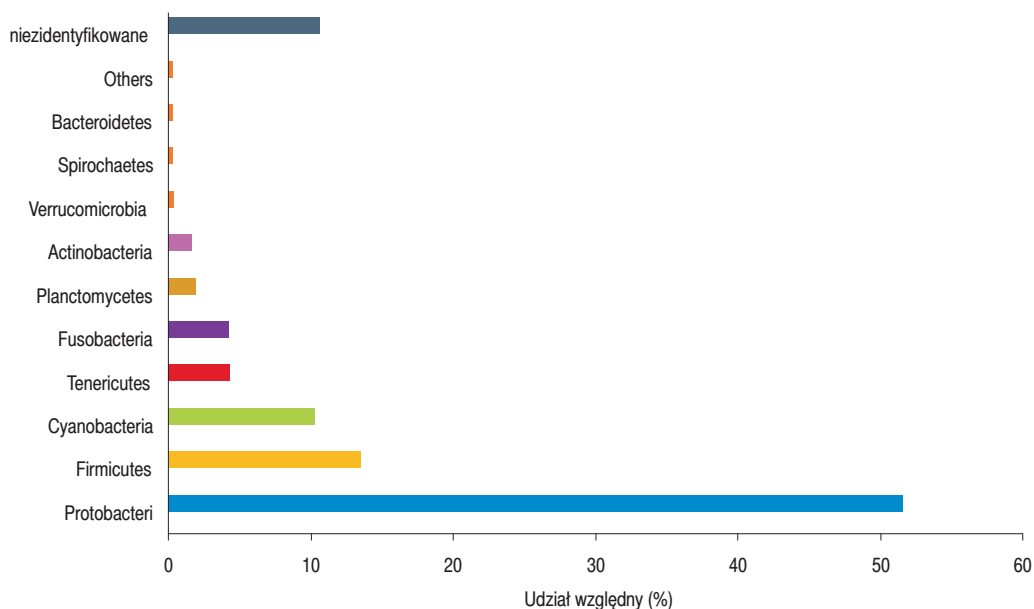
Skład mikrobiomu jelitowego (trwałego, w dominacji) wybranych gatunków ryb (Yukgehnaiš i in. 2020, Zhou i in. 2022).

Gatunek ryb	Rodzina, rodzaj, gatunek bakterii
Jesiotr syberyjski	<i>Cetobacterium somerae</i>
Łosoś atlantycki	<i>Acinetobacter junii</i> , <i>Mycoplasma</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>P. phosphorus</i> , <i>Bacillus</i> sp.
Pstrąg tęczy	<i>Cloacibacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Morganella</i>
Troć wędrowna	<i>Peromonas sobria</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.
Dorsz atlantycki	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Vibrio</i> sp.
Halibut	
stadia larwalne i młodociane	<i>Vibrionaceae</i>
ryby dorosłe	<i>Photobacterium phosphoreum</i>
Makrela atlantycka	<i>Psychrobacter</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Shewanella</i> sp.
Śledzie	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Alteromonas</i> sp., <i>Psychrobacter</i> sp.
Sardynki	<i>Achromobacter</i> , <i>Vibrio</i> sp., <i>Pseudomonas</i>
Błyszczak (ryba maślana)	<i>Clostridium</i> sp., <i>Eubacterium</i> sp.
Kulbak	<i>Mycoplasmataceae</i> , <i>Photobacterium</i> sp., <i>Cetobacterium</i> sp., <i>Clostridiaceae</i> , <i>Vibrio</i> sp.
Stornia	<i>Clostridium</i> sp., <i>Photobacterium</i> sp., <i>Clostridiaceae</i>
Lagodon	<i>Clostridium</i> sp., <i>Mycoplasma</i> sp., <i>Photobacterium</i> sp., <i>Propionibacterium</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Corynebacterium</i> sp.

Skład mikrobiomu jelitowego jest wypadkową sposobu odżywiania się ryb i homeostazy organizmu ryby. Czynnikiem decydującym o symbiotycznym mikrobiomie jest przede wszystkim środowisko zewnętrzne, przy czym u ryb karpiowatych ta korelacja jest najsilniej zaznaczona (zróżnicowana zawartość mikrobiomu danego gatunku pochodzącego z różnych ekosystemów, tj. jezior, rzek, akwakultury). Wynika to z faktu, że pokarm tych ryb oddziałując prebiotycznie stymuluje do podziału bakterie jelitowe. Stąd też sugerowano, że to poziom troficzny, anatomia przewodu pokarmowego ma duży wpływ na mikrobiom jelita. Różne doniesienia mogłyby wskazywać, że jelito ryb roślinożernych jest siedliskiem bakterii z rodzajów *Leptotrichia*, *Clostridium* i *Citrobacter*, ryb mięsożernych – *Halomonas* i *Cetobacterium*, a ryb wszystkożernych *Halomonas*, *Clostridium* i *Cetobacterium* (Liu i in. 2016). Obserwuje się też wzrost tendencji różnorodności mikrobiomu, kolejno u ryb drapieżnych, wszystko – i roślinożernych.

Mikrobiom ryb dzikich

Bardzo szczegółowo scharakteryzował mikrobiom ryb dzikich Kim i in. (2021). Obejmuje on 21 rodzajów bakterii, wśród których najczęściej dominują trzy gromady *Proteobacteria*, *Firmicutes* i *cyjanobakterie*. W badaniu przeanalizowano 85 gatunków ryb,



Rys. 2. Udział względny gromad bakterii identyfikowanych w grupie 227 gatunków ryb (Kim i in. 2021).

reprezentujących 79 rodzajów z 42 rodzin i 14 rzędów. Pomimo różnorodności taksonów ryb wyodrębniono wspólne cechy dla gromady ryb (rys. 2). Otóż mikrobiom jelita ryb jest zdominowany przez *Proteobacteria* (51.7%) i *Firmicutes* (13.5%). Najczęstszym bowiem taksonem w jelitach ryb (w 219 próbkach ryb na 227 analizowanych) były *Proteobakterie* i następnie *Firmicutes*. Z kolei u ryb słodkowodnych wykrywano bakterie nieobecne u gatunków morskich (*Fusobacteria*). Stwierdzono też, że różnorodność (i ilość) drobnoustrojów u ryb słodkowodnych jest większa niż u ryb morskich. Jednakże, niektóre taksony obecne u ryb morskich nie były spotykane u ryb słodkowodnych. Co ciekawe, na tej podstawie taksony różniące się składem i liczebnością mogą posłużyć jako biologicznie istotne biomarkery dla wody/ryb słodkiej i morskiej.

Według (Kim i in. 2021) skład mikroorganizmów w jelicie jest silniej ukształtowany przez siedlisko żywiciela, niż takson czy poziom troficzny, przy czym woda morska vs. woda słodka odgrywa najsilniejsze znaczenie w kształtowaniu mikrobiomu. Wskazuje to na silny symbiotyczny związek między mikrobiomem a organizmem w procesie adaptacji. Różnica w składzie mikrobiologicznym w odniesieniu do zasolenia wynika z aktywności metabolicznej, enzymatycznej czy odpornościowej danego gatunku ryby. Na przykład obecność szeroko rozpowszechnionych u ryb słodkowodnych *Fusobakterie* jest ujemnie skorelowane z dostępnością w diecie witaminy B12 (*Cetobacterium somerae*, rząd *Fusobacteriale* są zdolne do syntezy witaminy B12). Ponadto inne bakterie ryb słodkowodnych wykazywały stosunkowo dużą obfitość genów związanych z metaboli-

zmem kofaktorów i witamin czy aminokwasów. Sugeruje to, że dostępność podstawowych składników odżywczych w środowisku wpływa na kształtowanie się mikrobiomu, który uwzględnia niedobory żywieniowe gospodarza.

Zależna od taksonu gospodarza zmienność w profilu drobnoustrojów jelita jest też większa na niższych poziomach taksonomicznych (gatunek, rodzaj) niż na wyższych poziomach taksonomicznych (rzęd, rodzina). Analizy u ryb karpiowatych i okoniowatych, z różnych siedlisk wskazały jednoznacznie, że w kształtowaniu mikrobiomu jelitowego u ryb większą rolę odgrywa środowisko niż czynniki genetyczne żywiciela (Kim i in. 2021).

Na różnych etapach rozwoju, skład mikrobiomu gatunku jest zmienny, przy czym w stadium larwalnym środowisko ma decydujący wpływ. Z profilem mikrobiomu jelitowego korelują w tym przypadku takie czynniki środowiskowe, jak: odczyn pH wody, zawartość azotanów, fosforanów oraz minerałów. Ponadto u suma, karpia, tołpygi, karasia skład jelitowy bakterii kwasu mlekowego zmienia się wraz z porami roku. Zanieczyszczenia środowiska w każdym przypadku zaburzają jego skład, niszcząc tzw. mikrobiom rdzeniowy. Behavior ryb, genotyp, stan fizjologiczny i środowisko wodne decydują o składzie, różnorodności i aktywności metabolicznej mikrobiomu jelitowego wpływając w ten sposób na aktywność żerowania, wzrost, magazynowanie energii i stan zdrowotny ryb. Biorąc pod uwagę powyższe zmienne zasadne jest przeprowadzanie eksperymentalnych badań dotyczących stosowania dostępnych na rynku probiotyków w celu określenia ich faktycznego wpływu na efekty podchowu.

Eksperymentalne wzbogacanie paszy i wody komercyjnymi mikroorganizmami

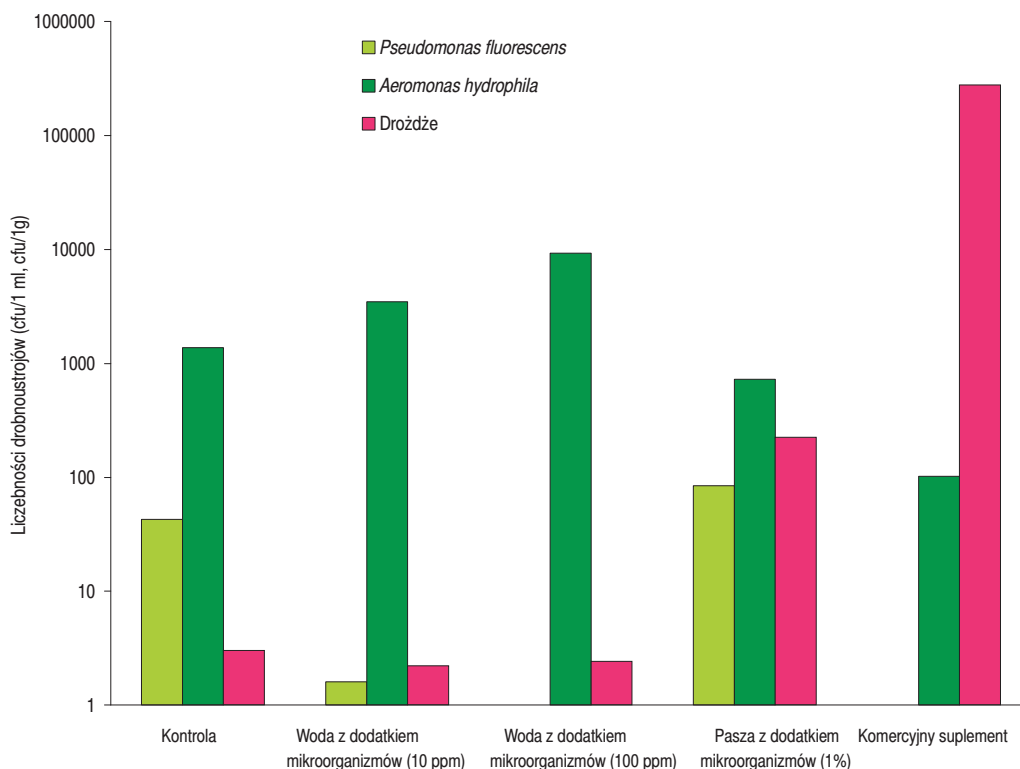
Krótkoterminowe badania przeprowadzone na organizmie modelowym (medaka) wyraźnie wskazały na istotny wpływ efektywnych mikroorganizmów w paszy (komercyjny produkt zawierający bakterie i drożdże) na parametry immunologiczne ryb, a podane do wody dodatkowo ukształtowały mikrobiotę środowiska (tab. 2, rys. 3, fot. 1). Parametry fizykochemiczne wody z dodatkiem efektywnych mikroorganizmów (100 ppm) znacznie różniły się od parametrów gdzie dodatek ten był niższy (10 ppm) lub podany do paszy. Największe różnice dotyczyły zawartości jonów potasu, magnezu, wapnia, sodu oraz azotu amonowego i azotanowego (Cejko i in., dane niepublikowane).

Mikroorganizmy podawane w okresie rozrodczym zmieniły też płodność ryb (Cejko i in. dane nie publikowane). W podchowcie trwającym 10 dni udział trących się samic karmionych paszą z dodatkiem mikroorganizmów był istotnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. Jeszcze większe różnice w ilości podchodzących do tarła ryb odnotowano u samic podchowiwanych w wodzie z dodatkiem mikroorganizmów (10 i 100 ppm). Nie

TABELA 2

Parametry immunologiczne medaki karmionej paszą z komercyjnym suplementem z mikroorganizmami i podchowyaney w wodzie z jego dodatkiem. Różne indeksy literowe wskazują na różnice statystycznie istotne ($P < 0,05$) (Cejko i in. dane niepublikowane).

Parametry immunologiczne	Kontrola	Pasza z dodatkiem mikroorganizmów (1%)	Woda z dodatkiem mikroorganizmów (10 ppm)	Woda z dodatkiem mikroorganizmów (100 ppm)
Aktywność fagocytów (RBA)	3,89 ^a ± 0,77	5,80 ^b ± 1,02	4,23 ^a ± 0,76	2,04 ^a ± 0,57
Aktywność fagocytów (PKA)	1,74 ^a ± 0,23	3,03 ^b ± 0,70	2,15 ^a ± 0,62	1,81 ^a ± 0,26
Aktywność proliferacyjna limfocytów (ConA)	1,20 ^a ± 0,06	1,49 ^b ± 0,16	1,32 ^a ± 0,12	1,30 ^a ± 0,11
Aktywność proliferacyjna limfocytów (LPS)	1,47 ^a ± 0,19	1,6 ^a ± 0,24	1,3 ^a ± 0,10	1,30 ^a ± 0,07



Rys. 3. Średnie liczebności oznaczanych drobnoustrojów w wodzie i paszy z komercyjnym suplementem.

odnotowano negatywnego wpływu stosowanego suplementu (do wody i paszy) na płodność samic. Jednakże procent jaj zapłodnionych był najniższy w grupie ryb hodowanych w wodzie, do której dodano większą dawkę mikroorganizmów (100 ppm).

Powyższe badania wskazują, że jakkolwiek układ immunologiczny ryb jest stymulowany przez mikroorganizmy podane w paszy i w niewielkim stopniu do wody, to efekt ten może wynikać z odpowiedzi organizmu/obrony na zmiany środowiskowe, w tym fizyko-



Fot. 1. Podchów medaki w akwariach bez i z dodatkiem do wody komercyjnych mikroorganizmów (fot. A. Cejko).

chemiczne wody. Wzrost parametrów immunologicznych wiązał się jednocześnie z niekorzystną zmianą w parametrach rozrodu. Mogły one wynikać ze zmiany profilu mikroorganizmów w wodzie. Wyniki mogą sugerować, że dla podniesienia odporności organizmu lepsze efekty uzyskuje się przez suplementację diety. Jednakże przy takiej modulacji karmienia należy mieć na uwadze okres rozrodczy ryb.

Mikrobiomy w zrównoważonej akwakulturze

W celu zapewnienia rozwoju akwakultury zrównoważonej, konieczne staje się sprostanie aktualnym wyzwaniom dotyczącym produkcji żywności. W ochronie przed drobnoustrojami, a nawet zwiększaniu przyrostu ryb, coraz częściej implikuje się wiedzę dotyczącą funkcji mikrobiomu. Przy dużych zagęszczeniach sprzyjających wystąpieniu chorób wywołanych przez patogeny (bakterie, wirusy, pierwotniaki, grzyby, pasożyty) istnieje ryzyko strat ekonomicznych i potencjalne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywnościowego. Jakkolwiek szczepionki czy antybiotyki są strategią terapeutyczną, to zastosowanie szczepów bakterii w leczeniu chorób wpisuje się w globalne trendy produkcji ryb. Pierwsze badania nad izolacją bakterii w 1993 roku pokazały, że pewien szczep *Pseudomonas fluorescens* poprzez współzawodnictwo hamuje rozwój patogennej *Aeromonas salmonicida* (Smith i Davery 1993). Niespełna dwie dekady później Teplitskiet i in. (2009) oraz Sequeiros i in. (2015) wyizolowali z ryb morskich szczepy *Lactococcus lactis* i spokrewnione z *Bacillus* sp., wytwarzające bakteriocynę hamującą

wzrost patogennych bakterii oraz o działaniu bójczym przeciwko ośmiu chorobotwórczym bakteriom (w tym *Salmonella Typhi-murium*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*). Pozyskane szczepy rekomenduje się już jako alternatywę w zapobieganiu chorob w akwakulturze.

Zamknięte systemy hodowlane są specyficzne, odbiegające znacznie od warunków naturalnego środowiska ryb. Jednakże istnieje możliwość kontrolowania i manipulowania mikrobiotą obiegów zamkniętych. Jakie cechy mikroorganizmów należy wykorzystać, aby zoptymalizować produkcję w zrównoważonej akwakulturze? Wiadomo, że pewne mikroorganizmy bezpośrednio przyczyniają się do poprawy wzrostu, odporności na choroby i w konsekwencji dobrostanu zwierząt. Stosowanie prebiotyków i probiotyków wykazało korzystny wpływ, w tym na wzrost, przeżywalność, odpowiedź immunologiczną, proces trawienia i przyswajania pokarmu (tab. 3) Coraz częściej jednak stosowanie pro- czy prebiotyków traktuje się jako naruszenie mikrobiomu żywiciela, nie zawsze uzasadnione (Lorgen-Ritchie i in. 2023). Stosowanie specyficznych probiotyków nawet ukierunkowanych na określone patogeny niesie bowiem ze sobą pewien stopień ryzyka.

TABELA 3

Wpływ probiotyków, prebiotyków i symbiotyków na efekty podchowu ryb hodowlanych (Lorgen-Ritchie i in. 2023).

Gatunek	Suplement diety	Składnik funkcjonalny	Modyfikacja mikrobiomu jelitowego
Jesiotr syberyjski	Probiotyk	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>	Poprawa tempa wzrostu, współczynnika kondycji, wykorzystania paszy, wzrost parametrów immunologicznych
Pstrąg tęczowy	Probiotyk i symbiotyk	<i>Pediococcus acidilactici</i> , galaktooligosacharydy	Zmniejszenie liczebności patogenów <i>Candidatus</i> , <i>Mycoplasma</i>
Tilapia nilowa	Prebiotyk	oligosacharydy	Poprawa tempa wzrostu, wzrost długości kosmków jelita, różnorodności mikroflory
Łosoś atlantycki	Probiotyk	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Wzrost odpowiedzi immunologicznej

Interakcje między mikroorganizmami i organizmem ryb

Wspólną cechą wewnętrznego mikrobiomu błony śluzowej jelita ryb jest jego rola w trawieniu i wchłanianiu składników odżywczych, podczas gdy zewnętrzny mikrobiom błony śluzowej odgrywa głównie rolę obronną. Zewnętrzne powierzchnie błony śluzowej są najpierw kolonizowane przez drobnoustroje środowiskowe wkrótce po wykluciu. Warunki wylęgarni odgrywają więc kluczową rolę dla różnorodności i bogactwa mikroorganizmów. Z kolei wewnętrzna błona śluzowa jelita nie jest skolonizowana aż do czasu pobierania pokarmu. Jakkolwiek układ odpornościowy ryb selekcjonuje symbionty to drobnoustroje ze środowiska mają przewagę w kolonizowaniu gospodarza. W późniejszym etapie układ odpornościowy (immunoglobuliny), uczestniczy w ustaleniu składu

mikrobiomu. Proces ten może być jednak zaburzony stresem. U golca warunki stresowe zmniejszyły liczebność pożytecznych komensali (*Methylobacterium* i *Propionibacterium*) odpowiedzialnych za syntezę inhibitorów wzrostu patogenów. W konsekwencji oportunistyczne patogeny wywołały infekcję u ryb (Lorgen-Ritchie i in. 2023). U łosia atlantyckiego z chorobą skrzeli widoczne było z kolei znaczne zmniejszenie różnorodności mikrobiomu w porównaniu ze zdrowymi osobnikami. Zasiedlanie mikroorganizmami w celu wyparcia chorobotwórczych bakterii jest więc uzasadnione.

Jedną z metod unikania kolonizacji patogenów w akwakulturze jest wykorzystanie bezpośredniej interakcji między bakteriami komensalnymi/symbiotycznymi a chorobotwórczymi. Obie grupy mikroorganizmów rywalizując o nisze ekologiczną i składniki odżywcze dążą do rozprzestrzeniania się np. w jelitach ryb. Wzajemna konkurencja opiera się na wytwarzaniu toksyn np. hamujących wzrost innych bakterii lub na modyfikacji środowiska np. poprzez zmianę odczynu pH w świetle narządów żywiciela. Inna strategia dotyczy bakterii komensalnych/symbiotycznych i polega na wzmacnianiu mechanizmów obronnych żywiciela i pośredniego zwalczania konkurencyjnych bakterii. Mikrobiom ryb tworzy barierę ochronną (np. błony śluzowych) oraz stymuluje wrodzoną odpowiedź immunologiczną. W akwakulturze eksperymentalnej probiotyki wykazały szeroki zakres działania, mimo że wybór probiotyku nie zawsze opierał się na wcześniejszych analizach naturalnego mikrobiomu ryb (tab. 1 i 4). Bakterie jelitowe *Pseudomonas fluorescens* i *P. putida* zostały uznane za degradujące ksenobiotyki; *Clostridia*, zdolne do syntezy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych za wspomagające wzrost ryb; *Lactobacillus sakei*, *L. lactis*, *L. rhamnosus* i *Clostridium butyricum*, za zwiększające poziom immunoglobulin ryb; *Pediococcus acidilactici* syntetyzujące kwasy organiczne i bakteriocyny, za zwalczające patogeny.

TABELA 4

Mikroorganizmy wykorzystane w akwakulturze i ich wpływ na efekty podchowu ryb (Yukgehnaish i in. 2020)

Gatunek mikroorganizmu	Gatunek ryby	Efekt podchowu
<i>Bacillus circulans</i>	Jesiotr syberyjski	Stymulacja odpowiedzi immunologicznej i tempa wzrostu
<i>Vibrioanguillarum alginolyticus</i>	Łosoś atlantycki	Wzrost przeżywalności po zakażeniu bakterią chorobotwórczą, wzrost parametrów immunologicznych
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Pstrąg tęczowy	Wzrost odpowiedzi immunologicznej i przeżywalności po zakażeniu patogenem
<i>Aeromonas sobria</i>	Pstrąg tęczowy	Poprawa tempa wzrostu i przeżywalności
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Pstrąg tęczowy	Wzrost parametrów odpowiedzi immunologicznej
<i>Rhodococcus</i> sp.	Pstrąg tęczowy	Wzrost odporności i ochrona przed infekcją bakteryjną
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Tilapia nilowa	Ochrona przed patogenami
<i>Lactobacillus fructivorans</i> + <i>L. plantarum</i>	Dorada	Produkcja białek odpornościowych
<i>Shewanella putrefaciens</i>	Dorada	Poprawa tempa wzrostu stadiów jwenalnych

Zdefiniowanie „zdrowego” mikrobiomu w odniesieniu do akwakultury, spójnego nawet w obrębie jednego gatunku, w jednym systemie hodowlanym jest mało prawdopodobne. Pożądany mikrobiom dla akwakultury to taki, który ma zdolność dostosowywania się do środowiska i utrzymywania korzystnych relacji symbiotycznych z organizmem ryb. Homeostazę mikrobiomu należy też rozważyć w kategoriach jego funkcjonalności a nie taksonomicznej tożsamości z gatunkiem w warunkach naturalnych. Dlatego w najnowszych doniesieniach naukowych obok metagenomiki rozważa się stosowanie hologenomiki, tj. badań genetycznych całego zbioru genów w akwakulturze. Hologenom, tj. cały zestaw genomu holobiontu, organizmu ze współistniejącymi mikroorganizmami stwarza możliwość bardzo szczegółowej analizy wzajemnej zależności (Lorgen-Ritchie i in. 2023).

Podsumowanie

Rola mikroorganizmów w ekosystemach jak i organizmach żywych jest coraz lepiej poznana. Sprzyja to prowadzeniu badań pod kątem modelowania ich składu czy zachowania naturalnej dynamiki i struktury populacji. W ostatnich latach podjęto próby zdefiniowania składników chemicznych obecnych/syntetyzowanych w drobnoustrojach w postaci biomolekuł/związków bioaktywnych wraz z ich funkcjami biologicznymi i przydatnością w akwakulturze. Badania jednoznacznie wskazują, że wykorzystanie potencjału mikrobiologicznego w poprawie wydajności metabolicznej i immunologicznej organizmu ryb jest zasadne. Za celowe uznaje się więc prowadzenie badań metagenomicznych i opracowanie probiotycznych szczepów dla ryb ważnych z ekonomicznego i żywieniowego punktu widzenia. Wskazuje się jednocześnie na zagrożenia w naruszaniu mikrobiomu jelitowego pro- i prebiotykami, który pełni istotne fizjologiczne funkcje dla organizmu ryb. Analiza mikrobioty w akwakulturze i jej bezpośredni związek z organizmem ryby pozwala lepiej kontrolować i chronić ten specyficzny ekosystem wodny i co istotne rozwijać technologie zrównoważonej produkcji i bezpieczeństwa żywnościowego.

Literatura

- Barko P.C., McMichael M.A., Swanson K.S., Williams D.A. 2018 – The gastrointestinal microbiome: a review – *J. Vet. Intern. Med.* 32: 9–25.
- Bartelme R.P., Smith M.C., Sepulveda-Villet O.J., Newton R.J. 2019 – Component microenvironments and system biogeography structure microorganism distributions in recirculating aquaculture and aquaponic systems – *mSphere* 4:e00143–19.
- Borges N., Keller-Costa T., Sanches-Fernandes G.M.M., Louvado A., Gomes N.C.M., Costa R. 2021 – Bacteriome structure, function, and probiotics in fish larviculture: the good, the bad, and the gaps – *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 9: 423–52.

- Huang W., Cheng Z., Lei S., Liu L., Lv X., Chen L. 2018 – Community composition, diversity, and metabolism of intestinal microbiota in cultivated European eel (*Anguilla anguilla*) – Appl. Microbiol. Biotechnol. 102: 4143–4157.
- Infante-Villamil S., Huerlimann R., Jerry D.R. 2021 – Microbiome diversity and dysbiosis in aquaculture – Rev. Aquac. 13: 1077–1096
- Kim P.S., Shin N.R., Lee J.B., Kim M.S., Whon T.W., Hyun D.W. 2021 – Host habitat is the major determinant of the gut microbiome of fish – Microbiome 9 (166): 1-16.
- Klase G., Lee S., Liang S., Kim J., Zo Y.G., Lee J. 2019 – The microbiome and antibiotic resistance in integrated fish farm water: implications of environmental public health – Sci. Total. Environ. 649: 1491–1501.
- LaFrentz B.R., LaFrentz S.A., Beck B.H., Arias C.R. 2020 – Draft genome sequences of *Cetobacterium somerae* 2G large and two novel *Cetobacterium* Isolates from intestines of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) – Microbio. Resour. Announc. 9:e01006–20.
- Legrand T.P., Wynne J.W., Weyrich L.S., Oxley A.P. 2020 – A microbial sea of possibilities: current knowledge and prospects for an improved understanding of the fish microbiome – Rev. Aquac. 12: 1101–1134.
- Ley R.E., Lozupone C.A., Hamady M., Knight R., Gordon J.I. 2008 – Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota – Nat. Rev. Microbiol. 6:776–788.
- Liu H., Guo X., Gooneratne R., Lai R., Zeng C., Zhan F. 2016 – The gut microbiome and degradation enzyme activity of wild freshwater fishes influenced by their trophic levels – Sci. Rep. 6: 1–12.
- Lorgen-Ritchie M., Webster T.U., McMurtrie J., Bass D. Tyler Ch., Rowley A., Martin S. 2023 – Microbiomes in the context of developing sustainable intensified aquaculture – Front. Microbiol. 14: 1200997/ doi: 10.3389/fmicb.2023.1200997.
- Prasanth B., Venkatesh K., Rajesh P., Gayathri R., Kanchana M. 2018 – A mini review on immune role of chemokines and its receptors in snakehead Murrel *Channa striatus* – Fish Shell. Immunol. 72: 670–678.
- Rud I., Kolarevic J., Holan A.B., Berget I., Calabrese S., Terjesen B.F. 2017 – Deep sequencing of the bacterial microbiota in commercial-scale recirculating and semi-closed aquaculture systems for Atlantic salmon post-smolt production – Aquac. Eng. 78:50–62.
- Sequeiros C., Garces M.E., Vallejo M., Marguet E.R., Olivera N.L. 2015 – Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae* – Arch.f Microbiol. 197: 449–458.
- Shade A., Handelsman J. 2012 – Beyond the venn diagram: the hunt for a core microbiome – Environ. Microbiol. 14(1): 4–12.
- Smith P.R., Davey S. 1993 – Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad – J. Fish Dis. 16: 521–524.
- Stoeck T., Frühe L., Forster D., Cordier T., Martins C.I.M., Pawlowski J. 2018 – Environmental DNA metabarcoding of benthic bacterial communities indicates the benthic footprint of salmon aquaculture – Mar. Pollut. Bull. 127: 139–49.
- Sugita H., Miyajima C., Deguchi Y. 1991 – The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish – Aquaculture 92: 267–76.
- Tarnecki A.M., Burgos F.A., Ray C.L., Arias C.R. 2017 – Fish intestinal microbiome: diversity and symbiosis unraveled by metagenomics. J. Appl. Microbiol. 123: 2–17.
- Teplitski M., Wright A.C., Lorca G. 2009 – Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens – Cur. Biotech. 20: 185–190.

- Tsuchiya C., Sakata T., Sugita H. 2008 – Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish – *Lett. Appl. Microbiol.* 46: 43–8.
- Yajima D., Fujita H., Hayashi I., Shima G. Suzuki K., Toju H 2023 – Core species and interactions prominent in fish-associated microbiome dynamics – *Microbiome* 11 (53): 1-15.
- Yukgehnash K., Kumar P., Sivachandran P., Marimuthu K., Arshad A., Paray B.A. 2020 – Gut microbiota metagenomics in aquaculture: factors influencing gut microbiome and its physiological role in fish – *Rev. Aquac.* 12:1903–1927.
- Zhang C., Derrien M., Levenez F., Brazeilles R., Ballal S.A., Kim J. 2016 – Ecological robustness of the gut microbiota in response to ingestion of transient food-borne microbes – *ISME J.* 10(9): 2235–2245.
- Zhou C., Yang S., Ka W., Gao P., Li Y., Long R., Wang J. 2022 – Association of gut microbiota with metabolism in rainbow trout under acute heat stress – *Front. Microbiol.* 13:846336/doi.org/10.3389/fmicb.2022.846336.

Kontrola jakości nasienia w rozrodzie ryb jesiotrowatych

Beata Irena Cejko¹, Dorota Fopp-Bayał², Agnieszka Kołasińska²

¹Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowy Instytut Badawczy w Olsztynie

²Katedry Ichtiologii i Akwakultury, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wprowadzenie

Ryby jesiotrowate są cennym obiektem akwakultury zarówno ze względu na walory smakowe ich mięsa, ale także ze względu na pozyskiwaną od nich ikrę, z której produkowany jest kawior (Bronzi i in. 2019). Większość gatunków jesiotrowatych uważana jest jako gatunki krytycznie zagrożone lub przypisuje się im wysokie ryzyko wymarcia w nie-dalekiej przyszłości, co związane jest z postępującą od lat degradacją środowiska naturalnego, niekorzystnie wpływającą na migrację tych ryb oraz ich rozród. Przyczyny zniknięcia tych gatunków w środowisku naturalnym to zanieczyszczenia wód, ale także ograniczenie naturalnych siedlisk dla wzrostu i rozwoju stadiów młodocianych oraz przełowienia (Bronzi i in. 2019). Obecnie za wyjątkiem kilku krajów (Rosja, Iran, Kazachstan, USA, Kanada) gdzie ryby jesiotrowate mogą być nadal legalnie poławiane, podlegają one całkowitej ochronie przed nadmierną eksploatacją, a ich rozród prowadzi się w warunkach kontrolowanych (Lopez i in. 2019). Światowymi liderami w produkcji ryb jesiotrowatych są Chiny, Rosja, Armenia oraz Iran, natomiast wśród krajów europejskich dominują pod tym względem Włochy.

Biorąc pod uwagę krajową produkcję ryb jesiotrowatych to zarówno sama procedura tworzenia stad tarłowych, przygotowywania tarlaków do rozrodu oraz postępowania z nimi podczas całej akcji tarłowej, opisana została szczegółowo w licznych opracowaniach (Szczepkowski 2013, 2018, Szczepkowski i Kolman 2011) oraz instrukcjach doradczych dostępnych m.in. na stronie internetowej IRS-PIB (<https://doradztwo.infish.com.pl/content/publikacje>). Wszystkie one mają na celu produkcję materiału

zarybieniowego o wysokiej jakości ponieważ chów i hodowla jesiotrów w akwakulturze cieszy się dużym zainteresowaniem wśród rodzimych hodowców ryb. Efektem tego jest nie tylko intensywny wzrost globalnej produkcji ryb jesiotrowatych, ale także tworzenie hybryd międzygatunkowych (Fopp-Bayat i in. 2023a, b).

Stymulacja hormonalna samców ryb jesiotrowatych

W warunkach kontrolowanych nasienie ryb jesiotrowatych pozyskuje się po stymulacji termicznej oraz hormonalnej. Stymulację hormonalną prowadzi się na poziomie przysadki mózgowej (podawanie gonadoliberyn lub jej syntetycznych analogów) lub na poziomie gonad (podawanie gonadotropin). Pierwsza metoda stymuluje wydzielanie endogennej gonadotropiny poprzez manipulację osią podwzgórze-przysadka-jądra, natomiast druga stymuluje ostateczne dojrzewanie plemników poprzez bezpośredni wpływ na steroidogenezę jąder (Alavi i in. 2012a). W praktyce hodowlanej wykorzystuje się różne preparaty hormonalne, a iniekcję przeprowadza się domięśniowo w jednej dawce, masując uprzednio miejsce wkłucia preparatu (tab. 1 i 2). Istotne znaczenie w rozrodzie ryb jesiotrowatych odgrywa nie tylko rodzaj i dawka preparatu jakim stymuluje się ostatnie etapy dojrzewania oocytów oraz spermatocytów. Nie mniej ważny jest także czas latencji, rozumiany jako czas od przeprowadzenia stymulacji hormonalnej (wykonania iniekcji) do momentu pozyskania dojrzałych gamet. W pracach hodowlanych szczególną rolę kładzie się na czas latencji samic, jednakże czynnik czasu jest nie mniej istotny w odniesieniu do samców ryb jesiotrowatych. Wpływ na czas latencji u ryb jesiotrowatych ma głównie temperatura i w zależności od gatunku czas pozyskania nasienia mieści się w zakresie od 14 do 72 godz. od przeprowadzenia iniekcji (tab. 1 i 2).

Czas po stymulacji hormonalnej, a jakość nasienia ryb jesiotrowatych

Ze względu na fakt, że dostępność tarlaków ryb jesiotrowatych zwykle jest ograniczona, po stymulacji hormonalnej nasienie pozyskuje się kilkakrotnie (od indywidualnych osobników) zachowując wybrane odstępy czasowe. Praktyka ta ma na celu, z jednej strony określenie optymalnego czasu latencji po przeprowadzeniu stymulacji hormonalnej, a z drugiej, pozyskanie wystarczającej objętości nasienia o jakości gwarantującej sukces zapłodnienia. W literaturze niewiele jest danych na temat jakości nasienia ryb jesiotrowatych uwzględniających różny czas po stymulacji hormonalnej. Z dostępnych informacji wynika, że do stymulowania spermacji jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*) oraz sterlety (*Acipenser ruthenus*) testowano różne preparaty hormonalne, tj. Ovopel, implanty z ago-

TABELA 1

Preparaty hormonalne, ich dawki oraz czas pozyskania nasienia po wykonaniu stymulacji hormonalnej u wybranych gatunków ryb jesiotrowatych

Gatunek	Preparat hormonalny	Dawka (kg)	Czas pozyskania nasienia (godz.)	Źródło
Jesiotr syberyjski	Przysadka karpiowa	2 mg	32-34	Williot i in. (2002)
		4-5 mg	48	Pšenicka i in. (2008)
	Ovurelin	5 µg	32-34	Williot i in. (2002)
	LHRHa	0,03 mg	24	Judycka i in. (2015a, b)
	Ovopel	1 granulka	24	Sieczyiński i in. (2015)
			24	Słowińska i in. (2015)
			24	Sarosięki in. (2015)
			24	Glogowski in. (2002)
24			Piros i in. (2002)	
Przysadka jesiotrowa	2 mg	24	Tsvetkova i in. (1996)	
Jesiotr jeziorny	Przysadka karpiowa	1 mg	24	Ciereszko i in. (2006)
jesiotr rosyjski	LHRHa	30 µg	24	Yamaneri in. (2014)
		20 µg	24-30	Igna i in. (2022)
Jesiotr ostronosy	Przysadka karpiowa	1 mg	24	Horvathi in. (2005)
		3-4 mg	14	Park i Chapman (2005)
Jesiotr kaspijski	Przysadka jesiotrowa	50-70 mg	24	Alavi i in. (2004)
	LHRHa	5 µg	18	Aramli i in. (2014)
Sterlet	Przysadka karpiowa	6 mg	24	Piros i in. (2002)
	Przysadka karpiowa	4 mg	48	Pšenicka i in. (2008)
	Przysadka jesiotrowa	2 mg	24	Tsvetkova i in. (1996)
	LHRHa	0,1 mg	16-20	Fopp-Bayat i in. (2023a)
Siewruga	Przysadka karpiowa	4-5 mg	48	Li i in. (2011)
	Przysadka karpiowa	2-3 mg	16-24	Sadeghi i in. (2013)
Bieluga	LHRHa	0,1 mg	16-20	Fopp-Bayat i in. (2023b)

Oznaczenia:

Ovurelin – (D-Phe⁶-NH₂-mGnRH);

LHRHa – analog gonadoliberyny ssacej;

Ovopel – ((D-Ala⁶,Pro⁹NEt)-mGnRH+metoclopramide))

nistą gonadoliberyny, przysadkę karpiową oraz mikrocząsteczki biodegradowalnego polimeru PLGA zawierające alarelinę, tj. hormon uwalniający gonadotropinę będącą syntetycznym agonistą GnRH. Efektywność ich stosowania, mierzona jakością pozyskanego nasienia, uzależniona jest zarówno od dawki podanego preparatu hormonalnego oraz czasu po jakim pozyskano nasienie po stymulacji hormonalnej (tab. 2).

W oparciu o prezentowane dane stwierdzić można, że w odniesieniu do jesiotra syberyjskiego oraz sterleta czas latencji nie powinien przekraczać 48 godz. i to bez względu na zastosowany preparat hormonalny (tab. 2). Świadczą o tym wyniki objętości pozyskanego nasienia, koncentracji plemników ich ruchliwości (MOT) oraz prędkości

TABELA 2

Preparaty hormonalne, ich dawki, czas pozyskania nasienia, objętość pozyskanego nasienia, koncentracja plemników, ruchliwość (MOT) oraz prędkość krzywoliniowa plemników (VCL) jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baeri*) oraz sterleta (*Acipenser ruthenus*)

Gatunek	Preparat hormonalny	Dawka (kg)	Czas pozyskania nasienia (godz.)	Objętość nasienia (ml)	Koncentracja plemników (ml/ml)	MOT (%)	VCL (µm/s)	Źródło
Jesiotr syberyjski	Ovopel	1 granulka	24	-	1,7	76,8	-	Piros i in. (2002)
			36	-	2,4	85,0	-	
Sterlet	Ovopel	3 granulki	24	12,3	2,7	99,5	182,9	Alavi i in. (2012a)
			48	16,5	3,8	99,0	188,1	
			72	9,8	1,3	97,6	183,4	
	Przysadka karpiovia	4 mg	24	14,2	3,7	95,4	154,4	
			48	12,5	1,9	97,3	169,4	
			72	4,8	0,7	84,0	158,2	
	Przysadka karpiovia	4 mg	24	15,0	0,9	80,0	160,0	Podhorec i in. (2021)
			48	18,0	0,5	80,0	140,0	
			72	-	-	-	-	
	mGnRH _a	25 µg	24	4,1	0,02	89,9	166,2	Alavi i in. (2012a)
			48	1,9	0,1	92,4	166,4	
			72	0,8	0,02	91,0	162,9	
		75 µg	24	5,8	0,5	99,5	165,9	
			48	5,9	0,4	96,7	161,1	
			72	2,5	0,2	87,8	167,0	
	PLGA+A	35 µg	24	19,0	0,3	82,0	155,0	Podhorec i in. (2021)
			48	18,0	0,5	82,0	145,0	
			72	12,0	1,1	82,0	150,0	
200 µg		24	17,0	0,1	75,0	155,0		
		48	31,0	0,3	75,0	145,0		
		72	20,0	0,3	60,0	150,0		

Oznaczenia:

Ovopel – ((D-Ala⁶, Pro⁹NEt)-mGnRH+metoclopramide));

mGnRH_a – implanty z agonistą [(D-Ala⁶-Pro⁹-LHRH)];

PLGA+A – mikrocząsteczki biodegradowalnego polimeru PLGA (poly(dl-lactic-co-glycolic acid) zawierające Alarelinę tj. hormon uwalniający gonadotropinę będącą syntetycznym agonistą GnRH

krzywoliniowej (VCL). Spośród parametrów określających jakość nasienia, najistotniejsze znaczenie dla skuteczności zapłodnienia ikry ma parametr MOT i VCL (Lahnsteiner i in. 1998, Gage i in. 2004). Na podstawie ich wartości określić można nie tylko samą dojrzałość nasienia oraz zdolność plemników do zapłodnienia, ale także potencjał i wydajność reprodukcyjną samców po stymulacji hormonalnej.

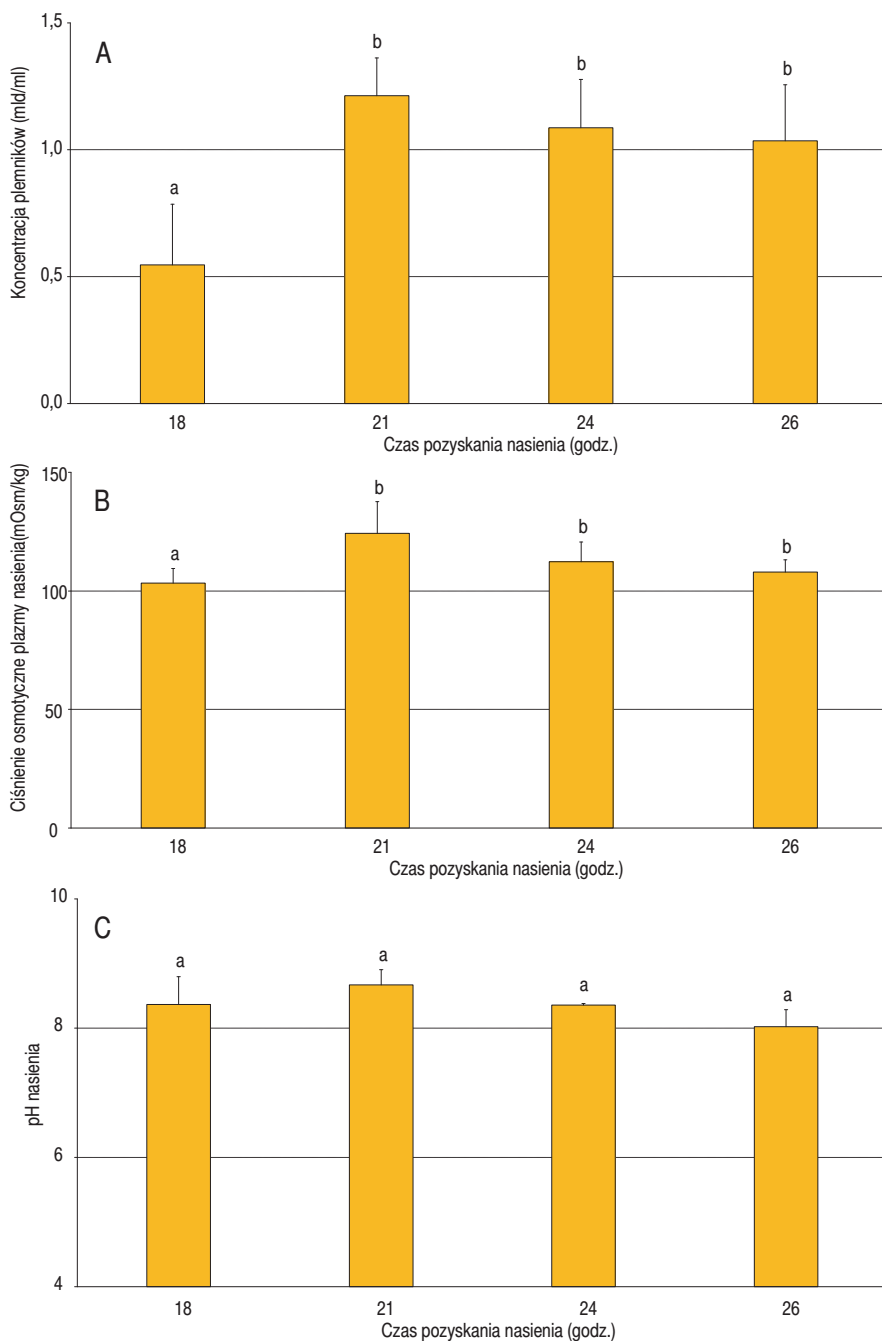
W praktyce hodowlanej czas latencji uzależniony jest od wielu czynników, w tym kondycji tarlaków przeznaczonych do rozrodu oraz stopnia ich dojrzałości. Każdy zatem hodowca planujący rozród ryb jesiotrowatych powinien zoptymalizować biotechnikę roz-

rodu, która uwzględnia nie tylko liczbę tarlaków oraz ich możliwości produkcyjne, ale także dostępność preparatów hormonalnych oraz zaplecze techniczne wykorzystywane podczas całej akcji tarłowej. Przykładem takim są nasze badania przeprowadzone nad rozrodem jesiotra syberyjskiego, które wskazują, że po stymulacji hormonalnej samców nasienie pozyskać można już po 18 godz. od zastosowania 6 mg przysadki karpiowej (tab. 1). Co warto podkreślić, od tych samych osobników jesiotra syberyjskiego pozyskano nasienie po 21, 24 oraz 26 godz. od przeprowadzenia iniekcji. Z przeprowadzonych przez nas badań wynika, że jakość poszczególnych porcji pozyskanego nasienia różni się zarówno pod względem ilości pozyskanych plemników oraz ich jakości. Najwyższą koncentracją plemników charakteryzowało się nasienie pozyskane po 21 godz. (1,2 mld/ml), natomiast najniższą po 18 godz. (0,5 mld/ml) od przeprowadzenia stymulacji hormonalnej samców (rys. 1A, $P < 0,05$). Wartości koncentracji plemników jesiotra syberyjskiego na poziomie 1,2-1,8 mld/ml charakterystyczne są dla dojrzałego nasienia jesiotra syberyjskiego, zatem z praktycznego punktu widzenia takie nasienie winno być przeznaczone do zapłodnienia (Cejko i Fopp-Bayat 2023). Potwierdzeniem tego są wyniki pomiarów ciśnienia osmotycznego plazmy nasienia kształtujące się na najwyższym poziomie po 21 godz. (124,3 mOsm/kg) od przeprowadzenia stymulacji hormonalnej (rys. 1B, $P < 0,05$). Wzrost taki wiązać można z wpływem stymulacji hormonalnej na syntezę i sekrecję steroidów płciowych, które doprowadziły do finalnego dojrzewania plemników jesiotra syberyjskiego w nasieniowodach. W wartościach pH nasienia różnic takich nie stwierdzono, co świadczy najprawdopodobniej o tym, że pH nasienia jest mniej czułym markerem dojrzałości plemników u ryb jesiotrowatych.

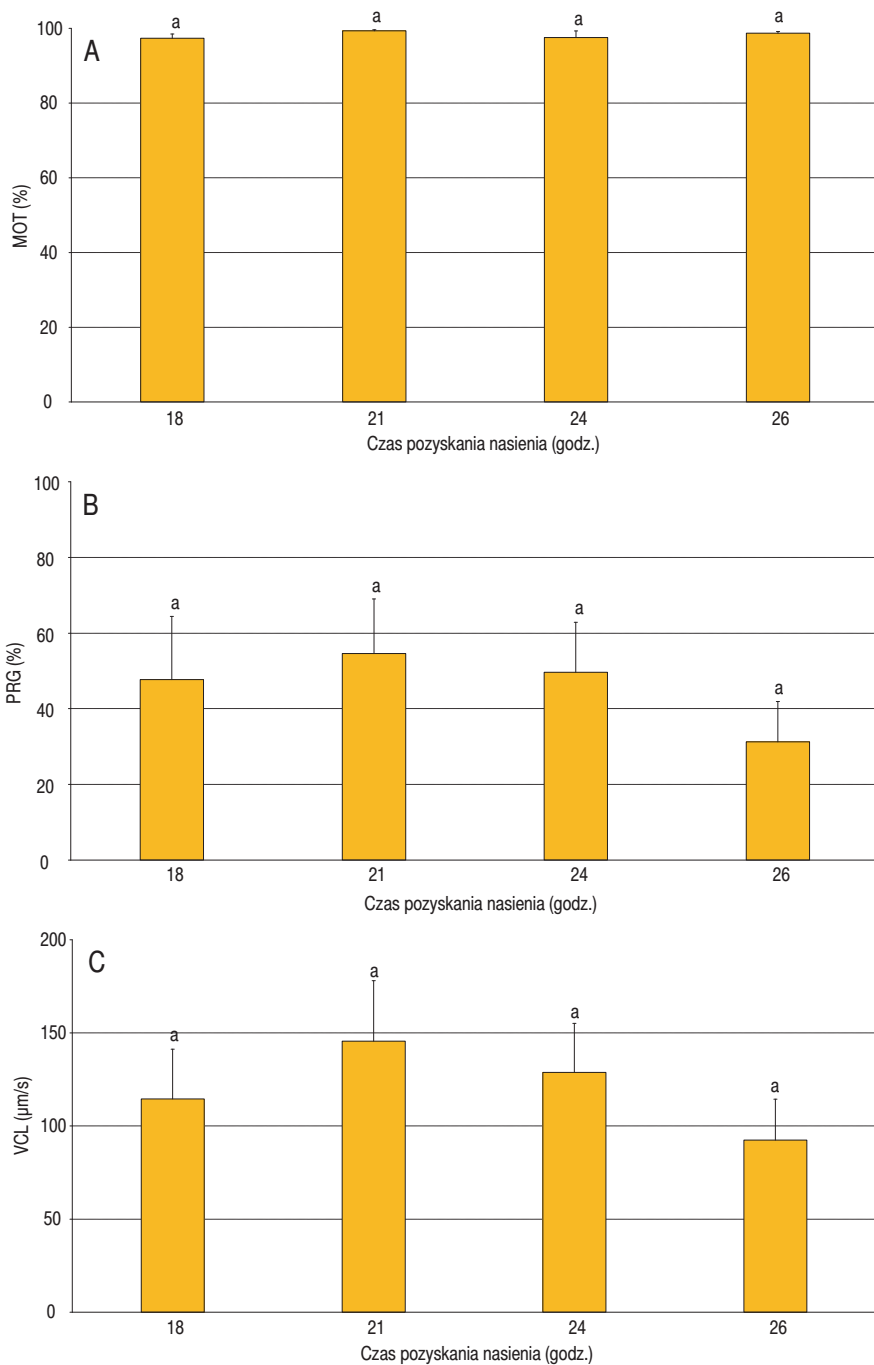
Pod względem ruchliwości (MOT) i parametrów kinetycznych plemników, tj. odsetek plemników o ruchu progresywnym (PRG) i VCL nie stwierdziliśmy różnic istotnych statystycznie bez względu na czas pozyskania nasienia jesiotra syberyjskiego (rys. 2A-C, $P > 0,05$). Brak różnic może wynikać z ograniczonej ilości tarlaków, od których pozyskano nasienie po stymulacji hormonalnej ($n = 3$). Aczkolwiek najwyższe wartości PRG (54,6%) oraz VCL (145,5 $\mu\text{m/s}$) stwierdziliśmy po 21 godz. od zastosowania przysadki mózgowej w dawce 6 mg/kg m.c. (rys. 2B, C). Wartości te zbliżone są do wartości stwierdzonych w badaniach dotyczących rozrodu jesiotra syberyjskiego w warunkach kontrolowanych i wskazują, że nasienie tych ryb charakteryzuje się właściwą jakością (Cejko i Fopp-Bayat 2023).

Konfekcjonowanie nasienia ryb jesiotrowatych

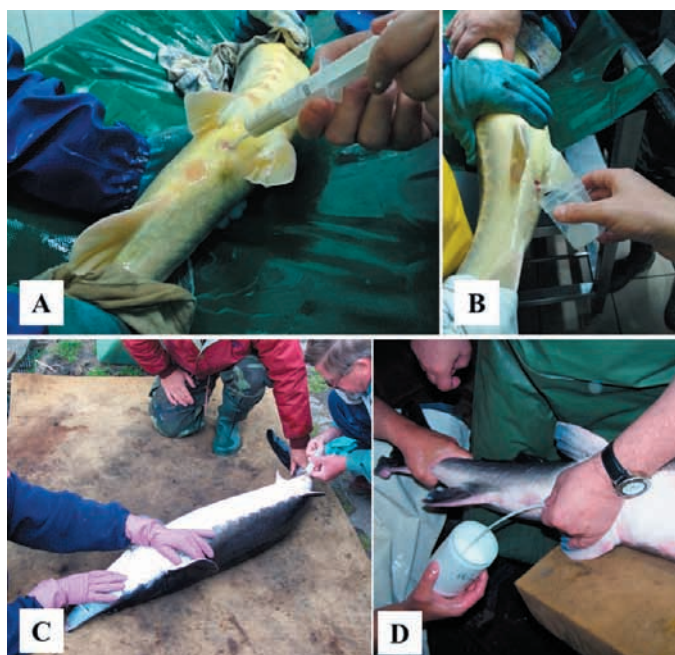
Nasienie ryb jesiotrowatych pozyskuje się za pomocą masażu powłok brzusznych do sterylnej strzykawki lub moczówki (fot. 1A-D). Ze względu na fakt, że objętość nasienia jaką pozyskuje się od indywidualnych osobników jest dość duża i może wynieść od 20 ml



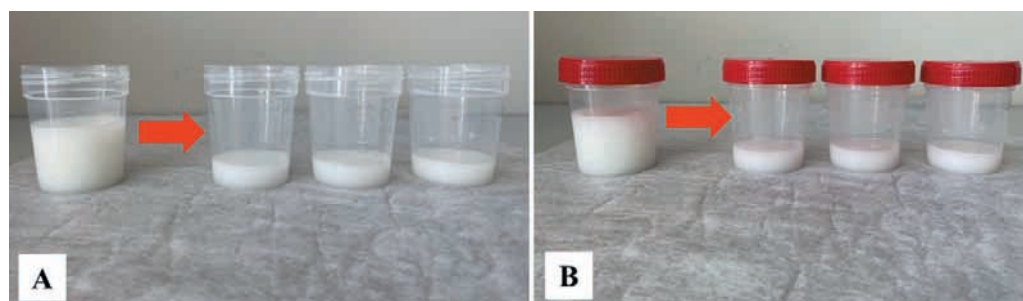
Rys. 1. Koncentracja plemników (A), ciśnienie osmotyczne plazmy nasienia (B) oraz pH nasienia (C) po 18, 21, 24 oraz 26 godz. po stymulacji hormonalnej jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*, n = 3) za pomocą przysadki karpiowej (6 mg/kg). Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic między czasem pozyskania nasienia dla badanych parametrów ($P < 0,05$).



Rys. 2. Odsetek plemników ruchliwych (A), odsetek plemników o ruchu progresywnym (B) oraz prędkość krzywoliniowa plemników (C) po 18, 21, 24 oraz 26 godz. po stymulacji hormonalnej jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*, n = 3) za pomocą przysadki karpiowej (6 mg/kg). Te same indeksy literowe wskazują na brak istotnych różnic między czasem pozyskania nasienia dla badanych parametrów ($P > 0,05$).



Fot. 1. Pozyskiwanie nasienia jesiotra rosyjskiego (*Acipenser guldenstaedtii*) oraz białugi (*Huso huso*) za pomocą strzykawki (A, C) oraz moczówki (B,D).



Fot. 2. Porcja nasienia jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*) rozdzielona na poszczególne pojemniki (A) oraz ich zabezpieczenie przed transportem (B).

(jesiotr kaspijski, *Acipenser persicus*) do 365 ml (jesiotr rosyjski, *Acipenser guldenstaedtii*) pozyskane porcje należy rozdzielić do kilku pojemników w celu uniknięcia przyduszenia plemników i utraty przez nie zdolności zapładniającej (fot. 2A, B). Do czasu zapłodnienia, nasienie należy przechowywać w warunkach chłodniczych (4-8°C) wykorzystując do tego celu lodówkę, która powinna znajdować się na wyposażeniu każdej wylęgarni. Jeśli nasienie ma być transportowane na dalszą odległość, warto zabezpieczyć je w styropianowym pudełku lub w lodówce turystycznej (tzw. coolerze) zaopatrzonej w chłodzące wkładki. Umożliwi to utrzymanie stałej temperatury podczas transportu nasienia, co ma wpływ na zachowanie jakości plemników na właściwym poziomie (Cejko i Kowalski 2018).

Czas przechowywania, a jakość nasienia ryb jesiotrowatych

Wraz z upływem czasu, jakość pozyskanego nasienia, a co za tym idzie zdolność zapładniająca plemników ulega obniżeniu. Wiąże się to ze zmianami warunków w jakich dotychczas znajdowały się plemniki w warunkach *in vivo*, tj. w nasieniowodach. Po ich uwolnieniu do środowiska zewnętrznego dochodzi do wzrostu tempa metabolizmu, który wpływa m.in. na wystąpienie stresu oksydacyjnego, wynikiem którego, jest powstawanie wolnych rodników, reaktywnych form tlenu oraz azotu. Produkty uboczne tlenowego metabolizmu komórkowego modyfikują niekorzystnie związki białkowe odpowiedzialne m.in. za utrzymanie stabilności błon komórkowych plemników zmieniając tym samym ich właściwości fizykochemiczne. Stres oksydacyjny doprowadza także do fragmentacji DNA, która negatywnie wpływa na strukturę plemników oraz ich funkcję. Co więcej, zmiany DNA plemników mogą mieć negatywny wpływ na jakość potomstwa (Kopeika i in. 2004). Stres oksydacyjny jest także kluczowym czynnikiem doprowadzającym do zaburzeń motoryki ruchu plemników, co stwierdzono m.in. u jesiotra rosyjskiego, syberyjskiego oraz kaspijskiego (*Acipenser persicus*) (Shaliutina i in. 2013, Aramli i in. 2013).

W tabeli 3 zaprezentowano zmiany ruchliwości i prędkości plemników w czasie przechowywania nasienia nierozrzedzonego u wybranych gatunków ryb jesiotrowatych. Z zaprezentowanych danych wynika, że w nierozrzedzonym nasieniu ryb jesiotrowatych dochodzi do obniżenia ruchliwości oraz prędkości plemników, ale dynamika tych zmian uzależniona jest od gatunku. Najdłuższy czas przechowywania nasienia zanotowano w przypadku jesiotra ostronosego (*Acipenser oxyrinchus*), tj. do dwóch tygodni, ale ruchliwość plemników nie przekraczała wówczas 40% (tab. 3). W przypadku innych gatunków ryb jesiotrowatych, tj. jesiotr syberyjski, rosyjski czy kaspijski czas przechowywania nierozrzedzonego nasienia nie trwał dłużej niż 7 dni (tab. 3). W przeprowadzonych przez nas ostatnio badaniach nad przechowywaniem nasienia jesiotra syberyjskiego, czas przechowywania był jeszcze krótszy ponieważ już w trzecim dniu przechowywania stwierdziliśmy obniżenie nie tylko ruchliwości plemników (MOT, PRG), ale także ich prędkości (VCL), (rys. 3A-C, $P < 0,05$).

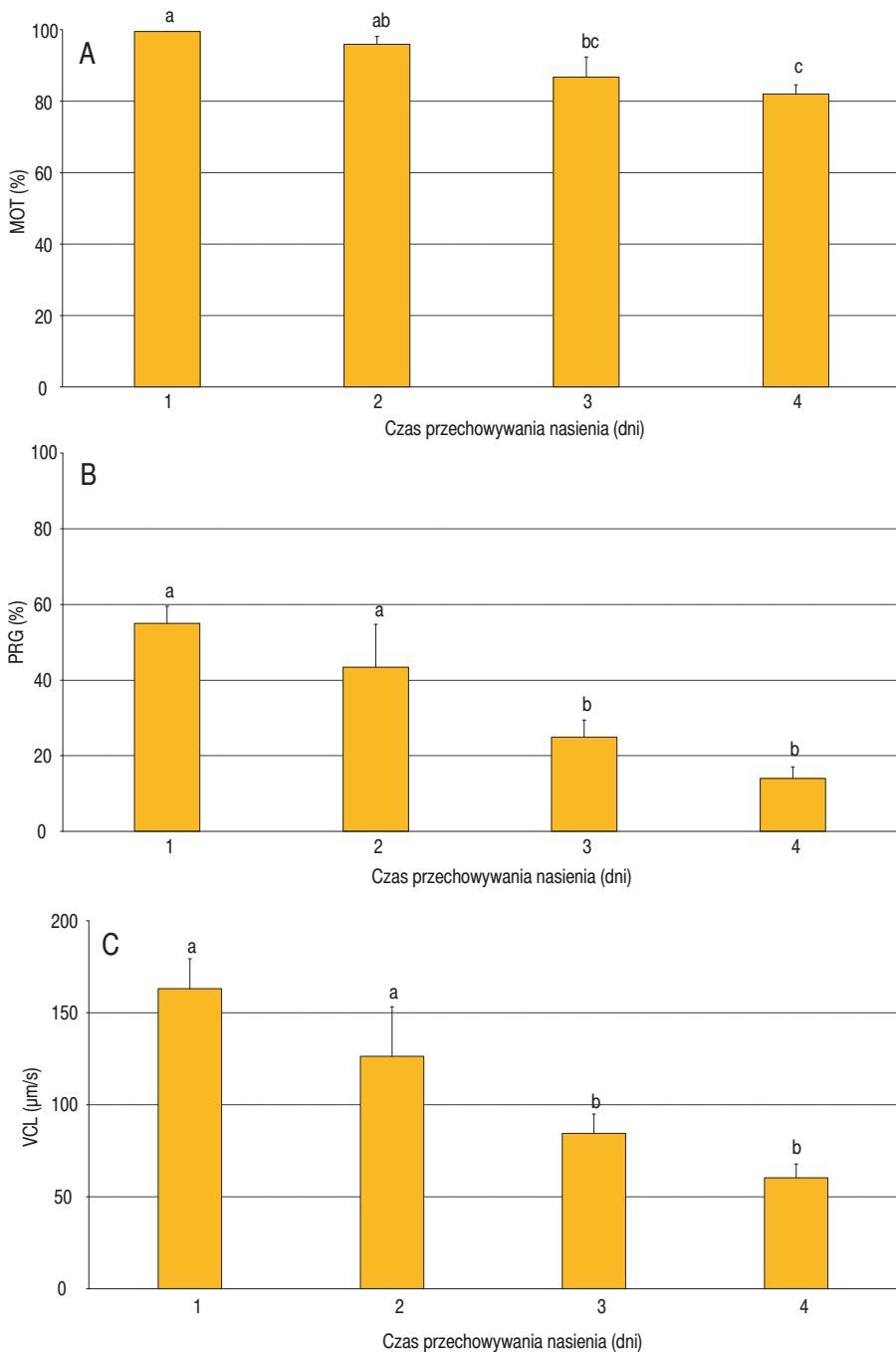
Różnice w efektywności przechowywania nasienia między poszczególnymi gatunkami ryb jesiotrowatych mogą wynikać z wielu czynników, w tym kondycji tarlaków oraz ich dojrzałości. Dojrzewanie plemników jest ważnym krokiem do nabycia zdolności zapładniającej, do której dochodzi podczas przechodzenia plemników z jąder wzdłuż przewodu nasiennego. W dojrzewaniu plemników istotną rolę odgrywa skład plazmy nasienia, charakterystyczny dla danego gatunku. Plazma nasienia ryb jesiotrowatych charakteryzuje się przede wszystkim zawartością związków mineralnych i nieorganicznych oraz w niewielkim stopniu zawartością związków białkowych. Wśród składników mineralnych plazmy nasienia ryb jesiotrowatych dominuje sód (Na^+) oraz chlorki (Cl^-)

TABELA 3

Ruchliwość (MOT) oraz prędkość krzywoliniowa (VCL) plemników wraz z upływem czasu przechowywania nierozrzedzonego nasienia wybranych gatunków ryb jesiotrowatych w stanie schłodzonym

Gatunek	Temp. przechowywania (°C)	Czas przechowywania (dni)	MOT (%)	VCL (µm/s)	Źródło
Jesiotr syberyjski	4	1	98	180	Shalutina i in. (2013)
		2	98	160	
		3	98	150	
		6	80	130	
		9	0	0	
Jesiotr rosyjski	4	1	98	180	Shalutina i in. (2013)
		2	98	160	
		3	98	150	
		6	80	130	
		9	0	0	
Sterlet	4	1	90	180	Dzyuba i in. (2016)
		2	60	160	
Jesiotr kaspijski	4	1	90	-	Aramli i in. (2013)
		2	88	-	
		3	85	-	
		6	80	-	
		1	90	-	Halimi i Norousta (2014)
		3	90	-	
		6	70	-	
9	0	-			
Jesiotr ostronosy	4	1	80	-	Park i Chapman (2005)
		3	60	-	
		7	50	-	
		14	25	-	
		21	0	-	
		1	90	-	Dorsey i in. (2011)
		3	80	-	
		6	70	-	
		9	60	-	
		12	50	-	
		15	40	-	
		18	30	-	
		21	20	-	

natomiast w mniejszym stopniu potas (K^+), wapń (Ca^{2+}) oraz magnez (Mg^{2+}). Stężenie związków mineralnych w plazmie nasienia zależne jest m.in. od rodzaju hormonu użytego do stymulowania spermacji, jego dawki jak również częstotliwości pobierania nasienia (Alavi i in. 2012b). Co więcej, większość jonów plazmy nasienia ryb jesiotrowatych (K^+ , Ca^{2+} , Na^+) zaangażowanych jest w regulację ruchliwości plemników, zatem proces



Rys. 3. Odsetek plemników ruchliwych (A), odsetek plemników o ruchu progresywnym (B) oraz prędkość krzywoliniowa plemników (C) w ciągu czterech dni przechowywania nierozrzedzonego nasienia jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*, n = 3) w warunkach chłodniczych (8°C). Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic między czasem pozyskania nasienia dla badanych parametrów (P < 0,05).

dojrzwania indukowany stymulacją hormonalną ma bezpośredni wpływ nie tylko na dojrzałość nasienia, ale także na zdolność zapładniającą plemników.

Płyny aktywujące/zapładniające w rozrodzie ryb jesiotrowatych

W rozrodzie ryb jesiotrowatych kluczowym aspektem jest opracowanie optymalnego płynu aktywującego ruch plemników. W optymalnym środowisku plemniki osiągają najwyższą prędkość, doprowadzając tym samym do skutecznego zapłodnienia ikry. W kontroli ruchliwości plemników ryb jesiotrowatych kluczową rolę odgrywa wysokie stężenie jonów K^+ , które hamuje taki ruch, natomiast w mniejszym stopniu ciśnienie osmotyczne plazmy nasienia (Jähnichsen i in. 1999, Toth i in. 1997). Istotny wpływ na ruchliwość plemników ryb jesiotrowatych mają także jony wapnia oraz sodu. Ruchliwość plemników ryb jesiotrowatych może być zatem odpowiednio modulowana przy zastosowaniu odpowiednich płynów aktywujących. Jest to szczególnie istotne przy dysponowaniu nasieniem, które charakteryzuje obniżona jakość.

Z danych literaturowych wynika, że do aktywacji plemników ryb jesiotrowatych wykorzystać można kilka płynów o odmiennym składzie oraz pH (tab. 4). Spośród płynów zbuforowanych najbardziej polecanym jest płyn o składzie 10 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ o pH 8,5 (Jähnichsen i in. 1999), który stosowano z powodzeniem zarówno u jesiotra syberyjskiego, sterleta oraz białugi. Co warto odnotować, powszechnie, w celu aktywacji plemników oraz zapłodnienia ikry jesiotrów stosuje się wodę wylęgarnianą, a nawet destylowaną (tab. 4). Zabieg ten wynika najprawdopodobniej z braku możliwości przygotowania w wylęgarni odpowiednich płynów przy wykorzystaniu odczynników chemicznych.

Brak natomiast odpowiedniej standaryzacji procedury rozrodu ryb jesiotrowatych w warunkach kontrolowanych sprawia, że uzyskane wyniki trudno interpretować, a co więcej aplikować w badaniach prowadzonych na rybach jesiotrowatych. Opracowanie optymalnego płynu aktywującego odgrywa istotną rolę w kontroli jakości nasienia ryb jesiotrowatych w warunkach kontrolowanych. Ma to znaczenie nie tylko podczas analizy dojrzałości nasienia po stymulacji hormonalnej, ale także podczas jego przechowywania czy wyboru prób, które cechuje najlepsza jakość, a które planuje się wykorzystać m.in. do zapłodnienia. Płyny aktywujące nie tylko indukują sam ruch plemników, ale również (w zależności od składu) wpływają na wydłużenie czasu jego trwania. W celu poprawy ruchliwości plemników, skład płynów aktywujących powinien nie tyle wiernie naśladować skład plazmy nasiennej czy płynów owaryjnych danego gatunku, ale przede wszystkim odzwierciedlać funkcjonalne ich cechy. Właśnie owe cechy zdają się mieć największy wpływ na jakość i ruchliwość plemników ryb jesiotrowatych podczas aktywacji.

TABELA 4

Płyny aktywujące o różnym składzie oraz pH wykorzystane do aktywacji plemników wybranych gatunków ryb jesiotrowatych.

Gatunek	Płyn aktywujący	pH	MOT (%)	PRG (%)	VCL (μm/s)	Źródło
Jesiotr syberyjski	woda wylegarniana	-	76-85	-	-	Piros i in. (2002) ¹
	woda destylowana	-	98	-	200	Shalutina i in. (2013)
	10 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂	8,5	60	-	100	Dietrich i in. (2012)
		8,5	90	60	230	Sarosiek i in. (2015)
		8,5	41	-	122	Sieczynski i in. (2015)
		8,5	70	-	200	Judycka i in. (2015a) ²
		8,5	95	-	300	Judycka i in. (2015a) ³
Jesiotr rosyjski	woda destylowana	-	98	-	200	Shalutina i in. (2013)
	10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂	8,5	83	-	-	Yamaner i in. (2015)
Sterlet	woda wylegarniana	-	58	-	-	Piros i in. (2002)
		7,8	90	-	160	Dzyuba i in. (2016)
	10 mM Tris-HCl	8,0	60-82	-	140-160	Podhorec i in. (2021) ¹
	10 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂	8,5	45	-	120	Sieczynski i in. (2015)
		8,5	70	39	150	Fopp-Bayat i in. (2023a)
	10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂	8,5	97	-	161	Boryshpolets i in. (2011)
Jesiotr kaspijski	0,3% NaCl	-	90	-	-	Aramli i in. (2013)
	woda wylegarniana	-	90	-	-	Halimi i in. (2014)
		-	50	-	-	Alavi i Cosson (2005)
	25 mM NaCl, 1 mM CaSO ₄ , 0,2 mM KCl, 20 mM Tris-HCl	8,0	60	-	-	
	25 mM NaCl, 1 mM CaSO ₄ , 3 mM MgSO ₄ , 20 mM Tris-HCl	8,0	50	-	-	
	Jesiotr ostronosy	woda wylegarniana	-	80	-	-
20 mM Tris-NaCl		8,0	80	-	-	Dorsey i in. (2011)
Bieluga	10 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂	8,5	68	37	125	Fopp-Bayat i in. (2023b)

Oznaczenia:

¹w zależności od preparatu hormonalnego, ich dawki oraz czasu pozyskania nasienia (patrz tab. 2);

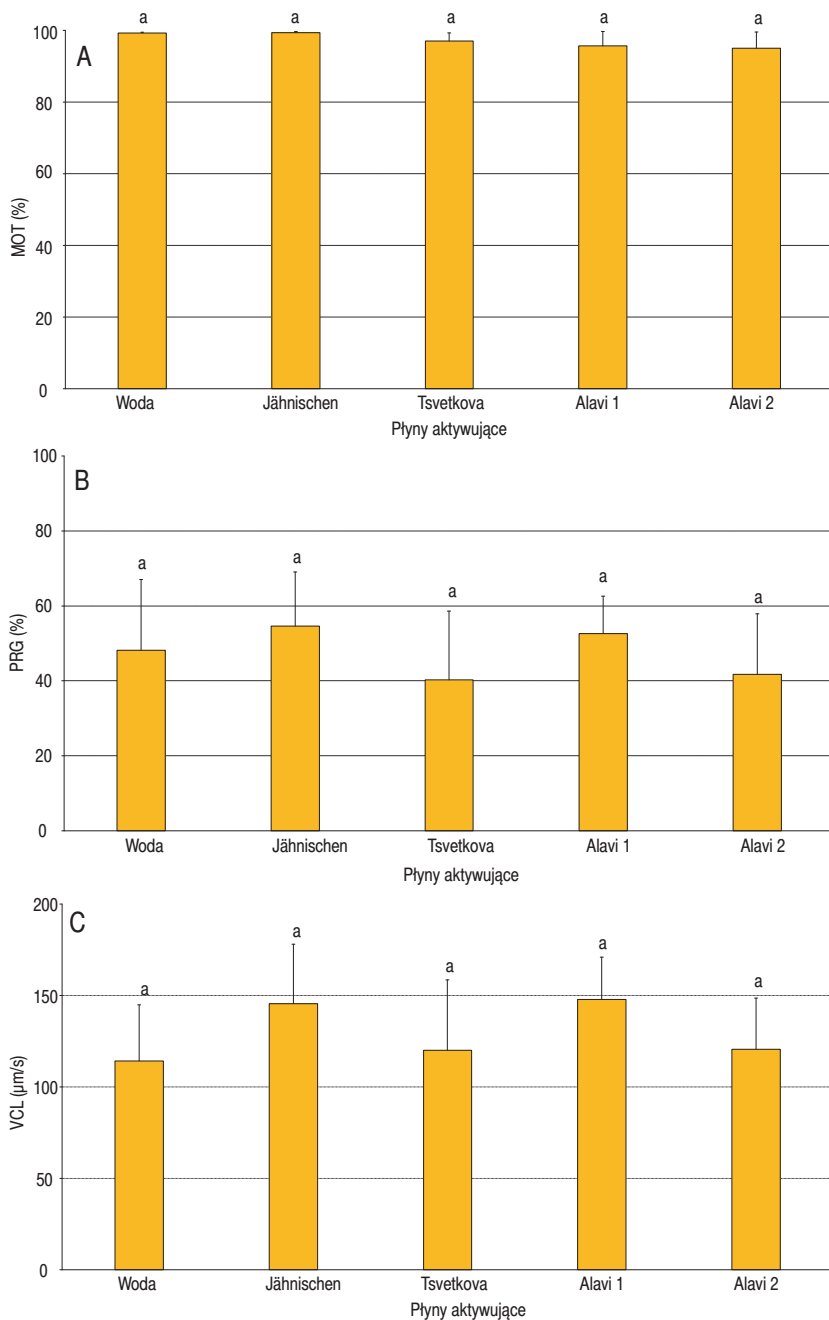
²w sezonie rozrodczym (kwiecień);

³poza sezonem rozrodczym (grudzień)

TABELA 5

Płyny aktywujące o różnym składzie, pH oraz osmolalności wykorzystane do aktywacji plemników jesiota syberyjskiego (*Acipenser baeri*). *Każdy płyn aktywujący zawierał w sobie dodatek 0,5% albuminy (BSA)

Płyny aktywujące*	Skład płynów	pH	Osmolalność (mOsm/kg)	Źródło
Woda wylegarniana	-	9,0	45	Dzyuba i in. (2016)
Jähnischen	10 mM Tris, 20 mM NaCl, 2 mM CaCl ₂	8,5	90	Jähnischen i in. (1999)
Tsvetkova	50 mM Tris-HCl	8,0	120	Tsvetkova i in. (1996)
Alavi 1	25 mM NaCl, 1 mM CaSO ₄ , 0,2 mM KCl, 20 mM Tris-HCl	8,0	110	Alavi i Cosson (2005)
Alavi 2	25 mM NaCl, 1 mM CaSO ₄ , 3 mM MgSO ₄ , 20 mM Tris-HCl	8,0	120	Alavi i Cosson (2005)

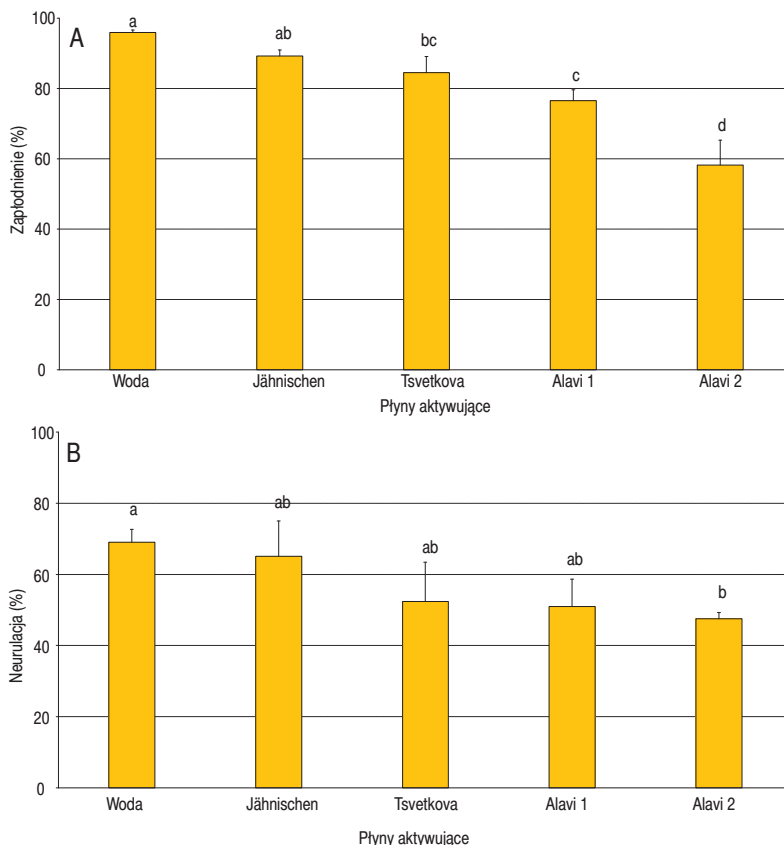


Rys. 4. Odsetek plemników ruchliwych (MOT), odsetek plemników o ruchu progresywnym (PRG) oraz prędkość krzywoliniowa plemników (VCL) jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*) po aktywacji za pomocą wybranych płynów aktywujących. Te same indeksy literowe wskazują na brak istotności różnic między badanymi grupami ryb ($P > 0,05$).

W ostatnio przeprowadzonych przez nas badaniach w rozrodzie jesiotra syberyjskiego porównaliśmy kilka płynów aktywujących stosowanych wcześniej u innych gatunków ryb jesiotrowatych (tab. 5).

W toku przeprowadzonych przez nas badań stwierdziliśmy brak różnic w wartościach parametru MOT (zakres: 95-99%), PRG (zakres: 40-54%) oraz VCL (zakres: 114-147 $\mu\text{m/s}$) dla plemników jesiotra syberyjskiego po zastosowaniu do aktywacji ruchliwości wybranych płynów aktywujących (rys. 4A-C, $P > 0,05$).

Badania prowadzone przez nas dotyczyły również analizy wpływu wybranych płynów aktywujących na zapłodnienie ikry oraz rozwój embrionalny jesiotra syberyjskiego. Badania te dotyczyły sprawdzenia odsetka zapłodnionych jaj w czasie 4 godz. po zapłodnieniu oraz odsetka żywych embrionów w stadium neurulacji (50 godz. po zapłodnieniu). W trakcie prowadzonych prac eksperymentalnych stwierdzono najwyższy odsetek zapłodnienia w grupach aktywowanych wodą wylęgarnianą oraz płynem Jähnsichena (rys. 5A, $P < 0,05$). W tych grupach obserwowano również najwyższy odse-



Rys. 5. Odsetek zapłodnienia (A) oraz neurulacji (B) jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*) po aktywacji za pomocą wybranych płynów aktywujących. Różne indeksy literowe wskazują na istotności różnic między badanymi grupami ryb ($P > 0,05$).

tek prawidłowo rozwijających się embrionów (rys. 5B, $P < 0,05$). Na podstawie uzyskanych wyników wytypowano płyny aktywujące, które optymalizują proces zapłodnienia oraz wpływają pozytywnie na rozwój embrionalny jesiotra syberyjskiego.

Podsumowanie

Kontrola jakości nasienia jest jednym z kluczowych elementów w rozrodzie ryb jesiotrowatych w warunkach kontrolowanych. Uwzględnić powinna nie tylko ilość pozyskanego nasienia, ale przede wszystkim jego jakość, którą charakteryzuje ruchliwość plemników oraz ich prędkość. Opracowanie efektywnych metod stymulacji hormonalnej wraz z określeniem czasu latencji wydaje się punktem wyjścia w skutecznym i racjonalnym zarządzaniu nasieniem w warunkach wylęgarni. Mnogość opracowań uwzględniających to zagadnienie wydaje się pomocna w zarządzaniu stadem tarłowym oraz planowaniu rozrodu tych ryb. Przechowywanie nasienia nierozrzedzonego, do jego późniejszego wykorzystania w zapłodnieniu, wydaje się z kolei mało praktyczne i pomocne przede wszystkim ze względu na brak danych dotyczących skuteczności wykorzystania takich prób w zapłodnieniu. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że badania uwzględniające możliwość przechowywania nasienia są podejmowane, co przede wszystkim stanowi źródło wiedzy na temat fizjologii rozrodu ryb jesiotrowatych oraz dynamiki zmian jakości plemników do jakich dochodzi w warunkach *in vitro*. Jednym z kluczowych elementów kontroli jakości nasienia jest określenie jego zdolności zapładniającej. Dlatego też stosowanie wystandaryzowanych płynów aktywujących wydaje się najbardziej zasadne i polecane w praktyce wylęgarniczej. Płyny takie ze względu na swój skład tworzą optymalne środowisko nie tylko dla samej kinetyki ruchu plemników, ale przede wszystkim kształtują ich zdolność zapładniającą. Prezentowane opracowanie z pewnością nie wyczerpuje zagadnienia związanego ze skuteczną kontrolą jakości nasienia w rozrodzie ryb jesiotrowatych. Autorki zdają sobie sprawę z wielości zagadnień jakie warto poruszyć i które nadal znajdują się w sferze badań licznych grup badawczych. Mamy jednak nadzieję, że poruszona w opracowaniu tematyka przyczyni się do zgłębienia wiedzy na temat jakości nasienia ryb jesiotrowatych, ułatwiając tym samym organizację i planowanie prac związanych z rozrodem tych ryb w warunkach kontrolowanych.

Piśmiennictwo

Alavi S.M.H., Cosson J. 2005 – Sperm motility and fertilizing ability in the Persian Sturgeon *Acipenser persicus* – *Aquacult. Res.* 36: 841-850.

- Alavi S.M.H., Cosson J., Karami M., Abdoulhay H., Amiri B.M. 2004 – Chemical composition and osmolality of seminal fluid of *Acipenser persicus*; their physiological relationship with sperm motility – *Aquacult. Res.* 35: 1238–1243.
- Alavi S.M.H., Hatef A., Mylonas C.C., Gela D., Papadaki M., Rodina M., Kašpar V., Pšenička M., Podhorec P., Linhart O. 2012a – Sperm characteristics and androgens in *Acipenser ruthenus* after induction of spermiation by carp pituitary extract or GnRH α implants – *Fish Physiol. Biochem.* 38:1655-1666.
- Alavi S.M.H., Rodina M., Gela D., Linhart O. 2012b – Sperm biology and control of reproduction in sturgeon: (I) testicular development, sperm maturation and seminal plasma characteristics – *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 22: 695–717.
- Aramli M.S., Kalbassi M.R., Nazari R.M., Aramli S. 2013 – Effects of short-term storage on the motility, oxidative stress, and ATP content of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) sperm – *Anim. Reprod. Sci.* 143: 112–117
- Aramli M.S., Nazari R.M. 2014 – Motility and fertility of cryopreserved semen in Persian sturgeon, *Acipenser persicus*, stored for 30-60min after thawing – *Cryobiology* 69: 500-502.
- Boryshpolets S., Dzyuba B., Rodina M., Alavi S.M.H., Gela D., Linhart O. 2011 – Cryopreservation of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa using different cryoprotectants – *J. Appl. Ichthyol.* 27: 1147–1149.
- Bronzi P., Chebanov M., Michaels J.T., Wei Q., Rosenthal H., Gessner J. 2018 – Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017 – *J. App. Ichthyol.* 35: 257-266.
- Cejko B.I., Kowalski R.K. 2018 – Przechowywanie i transport nasienia karpia jako alternatywny sposób zarządzania stadem tarłowym – W: *Aspekty ekonomiczne, ekologiczne i prawne w akwakulturze karpia.* (Red.) M. Kowalska-Górska, Wyd. PTR, Poznań: 145-152.
- Cejko B.I., Fopp-Bayat D. 2023 – Charakterystyka jakości nasienia ryb jesiotrowatych – wyznaczniki determinujące efektywność zapłodnienia – W: *Innowacje w gospodarce rybackiej* (Red.) A. Napiórkowska-Krzebietke, A.A. Cejko, Wyd. IRS, Olsztyn: 23-35.
- Ciereszko A., Dabrowski K., Froschauer J., Wolfe T.D. 2006 – Cryopreservation of semen from lake sturgeon – *Trans. Am. Fish. Soc.* 135: 232–240.
- Dietrich G.J., Ciereszko A., Kowalski R.K., Rzemieniecki A., Bogdan E., Demianowicz W., Dietrich M., Kujawa R., Glogowski J. 2012 – Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed sperm of Siberian sturgeon after a short-time exposure of fresh semen to mercury and cadmium – *J. Appl. Ichthyol.* 28: 973–977.
- Dorsey K.M., Guthrie H.D., Welch G.R., Mohler J., Theisen D.D., Siewerdt F., Vinyard B.T., Woods L.C. 2011 – Quality assessment of wild Atlantic Sturgeon semen under conditions of short-term storage – *N. Am. J. Aquac.* 73: 418–425.
- Dzyuba V., Cosson C., Dzyuba B., Yamaner G., Rodina M., Linhart O. 2016 – The antioxidant system of seminal fluid during in vitro storage of sterlet *Acipenser ruthenus* sperm – *Fish Physiol. Biochem.* 42: 563–568.
- Fopp-Bayat D., Ciemniewski T., Cejko B.I. 2023a – Embryonic development and survival of Siberian sturgeon \times Russian sturgeon (*Acipenser baerii* \times *Acipenser gueldenstaedtii*) hybrids cultured in a RAS system – *Animals* 13, 42; <https://doi.org/10.3390/ani13010042>.
- Fopp-Bayat D., Nitkiewicz A., Sarosiek B., Kowalski R.K. 2023b – The successful production of “sterbel” hybrids using beluga (*Huso huso*) cryopreserved sperm – *Anim. Reprod. Sci.* 249, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2023.107197>.
- Gage M.J.G., Macfarlane C.P., Yeates S., Ward R.G., Searle J.B., Parker G.A. 2004 – Spermatozoal traits and sperm competition in Atlantic salmon: relative sperm velocity is the primary determinant of fertilization success – *Curr. Biol.* 14: 44-47.

- Glogowski J., Kolman R., Szczepkowski M., Horvath A., Urbanyi B., Sieczynski P., Rzemieniecki A., Domagala J., Demianowicz W., Kowalski R., Ciereszko A. 2002 – Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol – *Aquaculture* 211: 367-373.
- Halimi M., Norousta R. 2014 – Penicillin improves the milt quality of Persian sturgeon, *Acipenser persicus* during short-term storage – *Int. J. Aquat. Biol.* 2: 53-57.
- Horvath A., Wayman W.R., Urbanyi B., Ware K.M., Dean J.C., Tiersch T.R. 2005 – The relationship of cryoprotectants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species – *Aquaculture* 247: 243–251.
- Igna V., Telea A., Florea T., Popp R., Grozea A. 2022 – Evaluation of Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) semen quality and semen cryopreservation – *Animals* 12, 2153. <https://doi.org/10.3390/ani12162153>.
- Jähnichen H., Warnecke D., Trölsch E., Kohlmann K., Bergler H., Pluta H.J. 1999 – Motility and fertilizing capability of cryopreserved *Acipenser ruthenus* L. sperm – *J. Appl. Ichthyol.* 15: 204–206.
- Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A., Słowińska M., Bodek G., Dietrich G.J. 2015a – Characterization of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt 1869) sperm obtained out of season – *J. Appl. Ichthyol.* 31: 34-40.
- Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A., Dietrich G.J. 2015b – New extender for cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) semen – *Cryobiology* 70: 184-189.
- Kopeika J., Kopeika E., Zhang T., Rawson D.M., Holt W.V. 2004 – Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm – *Theriogenology* 61: 1661–1673.
- Lahnsteiner F., Berger B., Weismann T., Patzner R.A. 1998 – Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoa metabolism – *Aquaculture* 163: 163-181.
- Li P., Rodina M., Hulak M., Li Z-H., Linhart O. 2011 – Spermatozoa concentration, seminal plasma composition and their physiological relationship in the endangered stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) and Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) – *Reprod. Domest. Anim.* 46:247-252.
- Lopez A., Vasconi M., Bellagamba F., Mentasti T., Moretti V.M. 2019 – Sturgeon meat and caviar quality from different cultured species – *Fishes* 5, 9; <https://doi.org/10.3390/fishes5010009>.
- Park C., Chapman F.A. 2005 – An extender solution for the shortterm storage of sturgeon semen – *N. Am. J. Aquac.* 67: 52–57.
- Piros B., Glogowski J., Kolman R., Rzemieniecki A., Domagala J., Horvath A., Urbanyi B., Ciereszko A. 2002 – Biochemical characterization of Siberian sturgeon *Acipenser baeri* and starlet, *Acipenser ruthenus*, milt plasma and spermatozoa – *Fish Physiol. Biochem.* 26: 289–295.
- Podhorec P., Knowles J., Vysloužil J., Boryshpolets S., Kubová K., Rodina M., Kholodnyy V., Sotnikov A., Gela D., Dzyuba B. 2021 – Induction of spermiation in sterlet *Acipenser ruthenus* by PLGA microparticle delivery with sustained slarelin release – *Animals* 11, 3305, <https://doi.org/10.3390/ani11113305>.
- Pšenicka M., Alavi S.M.H., Rodina M., Cicova Z., Gela D., Cosson J., Nebesarova J., Linhart O. 2008 – Morphology, chemical contents and physiology of chondrosteian fish sperm: A comparative study between Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and sterlet (*Acipenser ruthenus*) – *J. Appl. Ichthyol.* 24: 371–377.

- Sadeghi A., Imanpoor M.R., Shahriari R., Khalili M., Abedi M. 2013 – Cryopreservation of stellate (*Acipenser stellatus*) sperm: effect of different concentrations of DMSO and dilution rates on sperm mobility and motility duration after longterm storage – *Glob. Vet.* 10: 26-30.
- Sarosiek B., Dryl K., Judycka S., Szczepkowski M., Kowalski R.K. 2015 – Influence of acid phosphatase and arylsulfatase inhibitor additions on fertility rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) – *J. Appl. Ichthyol.* 31: 154–158.
- Shaliutina A., Hulak M., Gazo I., Linhartova P., Linhart O. 2013 – Effect of short-term storage on quality parameters, DNA integrity, and oxidative stress in Russian (*Acipenser gueldenstaedtii*) and Siberian (*Acipenser baerii*) sturgeon sperm – *Anim. Reprod. Sci.* 139: 127–135.
- Słowińska M., Liszewska E., Dietrich G.J., Judycka S., Szczepkowski M., Ciereszko A. 2015 – Effect of season on proteases and serine protease inhibitors of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) semen – *J. Appl. Ichthyol.* 31: 125-131.
- Sieczynski P., Cejko B.I., Grygoruk C., Glogowski J. 2015 – Cryopreservation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) and sterlet (*Acipenser ruthenus*, Linnaeus, 1758) semen and its influence on sperm motility parameters assessed using a computer-assisted sperm analysis (CASA) system – *J. Appl. Ichthyol.* 31: 99-103.
- Szczepkowski M. 2013 – Praktyczne aspekty sztucznego rozrodu jesiotrów – W: *Innowacje w wylęgarnictwie organizmów wodnych* (Red.) Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, A. Kowalska. Wyd. IRS Olsztyn: 59-66.
- Szczepkowski M. 2018 – Sztuczny rozród jesiotra syberyjskiego (*Acipenser baerii*) i jesiotra rosyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*) – wpływ wybranych czynników na jego efektywność – W: *Wylęgarnictwo i podchowy ryb oraz raków* (Red.) Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś. Wyd. IRS, Olsztyn: 37-44.
- Szczepkowski M., Kolman R. 2011 – A simple method for collecting sturgeon eggs using a catheter – *Arch. Pol. Fish.* 19: 123-128.
- Toth G.P., Ciereszko A., Christ S.A., Dabrowski K. 1997 – Objective analysis of sperm motility in the Lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*: activation and inhibition conditions – *Aquaculture* 154: 337–348.
- Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O., Billard R. 1996 – Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser baeri* and *A. ruthenus* – *J. Appl. Ichthyol.* 12: 107–112.
- Williot P., Gulyas T., Ceapa C. 2002 – An analogue of GnRH is effective for induction of ovulation and spermiation in farmed Siberian sturgeon, *Acipenser baerii* Brandt – *Aquacult. Res.* 33: 735–737.
- Yamaner G., Memis D., Baran A. 2015 – Sperm quality and effects of different cryomedia on spermatozoa motility in first-time spawning of cultured Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) – *J. Appl. Ichthyol.* 31: 71-74.

Katastrofa ekologiczna w rzece Odrze i w wodach hydrologicznie związanych z Odrą latem 2022 roku – przyczyny, skutki i rekomendacje

Agnieszka Napiórkowska-Krzebietke, Grzegorz J. Dietrich

Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowy Instytut Badawczy w Olsztynie

Wstęp

Długość rzeki Odry wynosi 854,3 km, w tym na długości 742 km przepływa na obszarze Polski przez województwa: śląskie opolskie, dolnośląskie, lubuskie, zachodniopomorskie. Razem z Kanałem Gliwickim współtworzy Odrzańską Drogę Wodną, stanowiącą element europejskiego systemu dróg wodnych wchodząc w skład MDW E30 (https://mdwe70.pl/drogi-wodne/akweny/odra/?doing_wp_cron=1690108901.496542-9306030273437500). Na długości około 180 km stanowi granicę państwową polsko-niemiecką, natomiast w swoim górnym odcinku jest uregulowana (25 śluz).

Latem 2022 roku w rzece Odrze i w wodach hydrologicznie związanych z Odrą wystąpiła katastrofa. To zdarzenie można interpretować jako katastrofa ekologiczna, skutkiem której były i są „*trwałe (nieodwracalne w naturalny sposób) uszkodzenie lub zniszczenie dużego obszaru środowiska przyrodniczego, wpływające negatywnie, bezpośrednio lub pośrednio, na zdrowie, często życie ludzi*” (<https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/katastrofa-ekologiczna;3921133.html>).

W związku z faktem zanotowania masowych śnięć ryb oraz makrobezkręgowców bentosowych w rzece Odrze oraz w wodach hydrologicznie związanych z Odrą, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowy Instytut Badawczy (IRS-PIB) podjął natychmiastowe działania w celu oceny wpływu katastrofy ekologicznej na zespoły tych organizmów. Prowadzono szczegółowe badania, dotyczące niemal wszystkich poziomów troficznych w ekosystemach wodnych, począwszy od fitoplanktonu i wpływu inwazyjnego ichtiotoksycznego haptofitu *Prymnesium parvum* N.Carter

(Carter 1937), przez zooplankton i makrobezkręgowce bentosowe do ryb oraz parametry fizykochemiczne wody. Szeroko podjęte badania naukowe pracowników IRS-PIB skutkowały powstaniem kilku raportów oraz rozdziałów do raportów. Wśród nich najważniejszymi są: „Wstępny Raport Zespołu ds. sytuacji na rzece Odrze” pod redakcją A. Kolady 2022, „Raport kończący prace zespołu ds. sytuacji w Odrze” pod redakcją Instytutu Ochrony Środowiska – Państwowego Instytutu Badawczego 2023 oraz „Raport z prowadzenia badań oraz połowów ryb w rzece Odrze w celu oceny skutków katastrofy ekologicznej” pod redakcją A. Napiórkowskiej-Krzebietke 2022. Powstały również raporty pt. „Ocena skali ubytku gatunków chronionych ryb i mięczaków w wyniku masowego spływu śniętych ryb w Odrze w roku 2022” pod redakcją A. Napiórkowskiej-Krzebietke i P. Parasiewicza 2023 oraz „Badania parametrów jakościowych wody rzeki Odry na bazie lotniczych danych hiperspektralnych zebranych na wybranych odcinkach poniżej kanału Gliwickiego w trakcie masowego spływu śniętych ryb i mięczaków” pod redakcją P. Parasiewicza, K. Suskiej i A. Napiórkowskiej-Krzebietke 2023, dotyczące szczegółowych zagadnień. Ogólnie, 39 pracowników z 6 zakładów naukowych i pracownicy naukowej IRS-PIB było zaangażowanych w bezpośrednie badania terenowe, laboratoryjne i/lub analizy wyników. Listę osób podano w w/w raporcie z prowadzenia badań oraz połowów ryb w rzece Odrze w celu oceny skutków katastrofy ekologicznej pod redakcją A. Napiórkowskiej-Krzebietke 2022.

Celem niniejszej pracy było przedstawienie wybranych wyników oraz głównych wniosków i rekomendacji z badań, prowadzonych w okresie trwania katastrofy oraz po wystąpieniu katastrofy ekologicznej, tj. w okresie sierpień – listopad 2022 roku. W pracy powołano się na badania Instytutu wykorzystane do przygotowania raportów i rozdziałów w raportach.

Zakres badań i metodologia

Ogólnie, zakres prowadzonych przez IRS-PIB badań obejmował prace wstępne, terenowe i laboratoryjne. W terenie, przeprowadzono m.in. wizję lokalną, inwentaryzację śniętych ryb i makrobezkręgowców bentosowych, pomiary podstawowych parametrów fizykochemicznych wody *in situ*, badania sonarowe dna, odłowy kontrolne, badania rozmieszczenia i zachowania populacji ryb, badania i pomiary siedlisk (w tym naloty dronowe RGB). Pobierano również materiał do badań ichtiopatologicznych i makrobezkręgowców bentosowych, pod kątem ich ogólnej kondycji, a także materiał tkankowy ryb do badań genetycznych. Równocześnie pobierano próbki wody do analiz parametrów fizykochemicznych, biologicznych w tym fitoplanktonu pod kątem obecności i liczebności glonu *Prymnesium parvum* (tzw. złotej algi) oraz zawartości ichtiotoksyn, tj. prymnezyn

z grupy B w jego komórkach, a także zooplanktonu z uwzględnieniem glonożernych pierwotniaków oraz wrotków i skorupiaków planktonowych.

W pracy uwzględniono m.in.:

1. badania ichtiopatologiczne;
2. ogólne badania ichtiologiczne;
3. badania makrobezkręgowców bentosowych i zespołów zooplanktonu;
4. badania fizykochemiczne;
5. badania obecności i liczebności *Prymnesium parvum* i zawartości ichtiotoksycznych prymnezyn.

Badania prowadzono w okresie trwania katastrofy i kontynuowano po wystąpieniu katastrofy ekologicznej, tj. w okresie sierpień – listopad 2022 roku. Pierwszy wyjazd terenowy odbył się w dniu 12 sierpnia 2022 roku na stanowiska usytuowane w rzece Odrze na wysokości miasta Słubice w miejscach, w których zaobserwowano masowe śnięcia ryb. Pobrano pierwsze próbki wody do badań fitoplanktonu, w tym na obecność *Prymnesium parvum* oraz dokonano poboru żywych ryb do badań ichtiopatologicznych. Następnie badania biologiczne i fizykochemiczne kontynuowano do 25 listopada 2022 roku. Próbkę wody dostarczano do laboratorium IRS-PIB przez pracowników Instytutu oraz przez Regionalne Dyrekcje Ochrony Środowiska w Katowicach, Opolu, Wrocławiu, Gorzowie Wielkopolskim i Szczecinie. Wszystkie badania laboratoryjne prowadzono zgodnie z metodami standardowymi (Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022).

Wyniki i dyskusja

Prymnesium parvum i prymnezyny

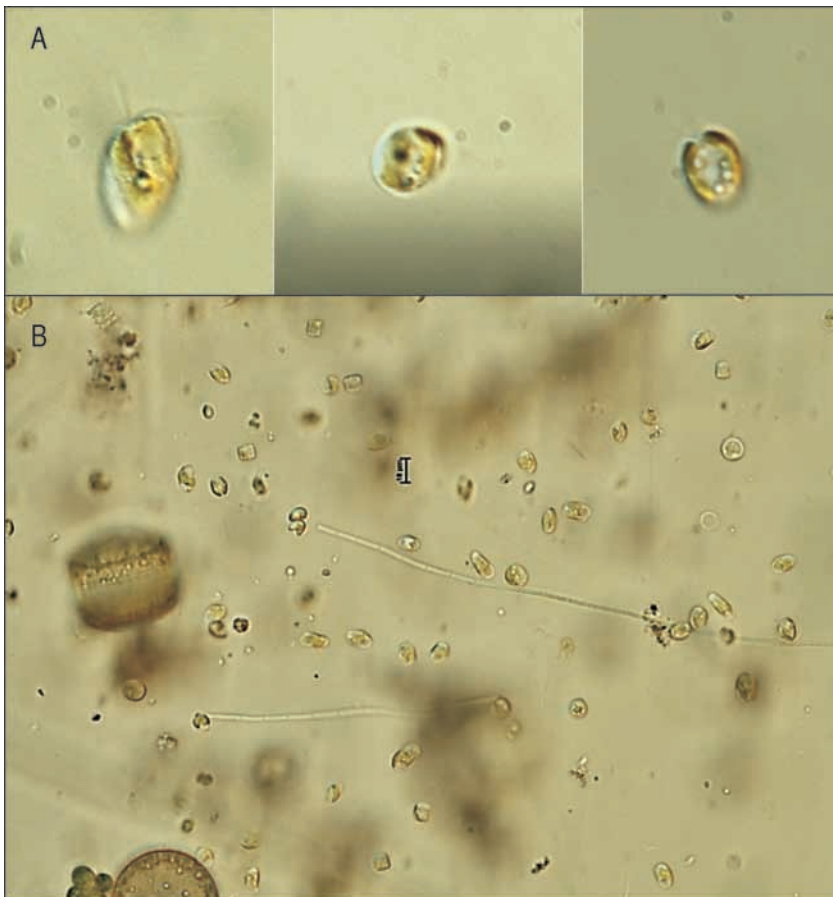
W próbkach wody, pobranych z rzeki Odry w okolicach Słubic (województwo lubuskie) w dniu 12 sierpnia 2022 roku wykryto po raz pierwszy w wodach śródlądowych Polski obecność wiciowego glonu *Prymnesium parvum* (tzw. złotej algi), należącego do gromady Haptophyta. W słonych wodach, w tym wodach w Zatoce Gdańskiej Morza Bałtyckiego był on odnaleziony pod koniec lat 30. („*Notatka o kilku godnych uwagi gatunkach planktonowych dotychczas nieznanymi z Zatoki Gdańskiej*” A. Bursa, 1938, <https://rcin.org.pl>). Wówczas hodowle *Prymnesium parvum* utrzymywały się w wodzie morskiej o zasoleniu 7‰, a nawet 21‰ do 28‰.

Analiza mikroskopowa potwierdziła następujące jego cechy diagnostyczne:

1. jednokomórkowy nanoplanktonowy organizm wiciowy: dwie równej wielkości wici (12-15 (maks. 20) μm), usytuowane na szczycie komórki i służące do poruszania się oraz sztywna haptionema, usytuowana pomiędzy tymi nićmi (długość 3-5 μm) służąca głównie do przyczepiania się do podłoża;

2. kształt komórki jest wydłużony lub obły oraz na szczycie ścięty;
3. długość komórek: 10,6-14,4 (maks. 15,0) μm ; szerokość komórek: 6,9-8,9 (maks. 10,0) μm oraz grubość komórek: 4,5-5,5 (maks. 6,0) μm ;
4. komórki posiadają dwa chloroplasty oraz płytki celulozowe, okrywające komórkę (widoczne pod zwykłym mikroskopem jako zarysy płytek).

Powyższe cechy odpowiadają opisom taksonomicznym gatunku *Prymnesium parvum*, zawartym w kluczach do oznaczania glonów (Thronsdén 1996, Preisig 2011). Jest to gatunek, który tworzy toksyczne zakwity i jest związany z masowymi śnięciami ryb oraz skorupiaków i mięczaków notowanymi na całym świecie (Manning i La Claire 2010). Z danych literaturowych wynika, iż jego toksyczność potwierdza produkcja wtórnych metabolitów – prymnezyn, które wykazują silne działanie cytotoksyczne, hemolityczne, neurotoksyczne i ichtiotoksyczne. Są one szczególnie szkodliwe dla organizmów oddychających skrzelami i oddziałują bezpośrednio z błonami komórkowymi, naruszając ich



Rys. 1. *Prymnesium parvum* (powiększenie 1000x (A) i 200x (B)) (fot. A. Napiórkowska-Krzebietke).

integralność silnie ukrwionych naczyń, powodując mikrokrwotoki. Badania nad tym gatunkiem wskazują, że kilka czynników wpływa na aktywację i siłę działania prymnezy, w tym zasolenie, pH, dostępność jonów oraz faza wzrostu. Prymnezy mogą działać też jako związki obronne, zapobiegające wyżeraniu *Prymnesium*, a niektóre badania sugerują, że pełnią one role allelopatyczne ułatwiające objęcie dominacji w środowisku wodnym. Ponadto, jest uważany za gatunek inwazyjny (gatunek allochtoniczny), czyli gatunek, który rozprzestrzenia się naturalnie lub z udziałem człowieka i stanowi poważne zagrożenie dla fauny i flory danego ekosystemu wodnego, konkurując z gatunkami autochtonicznymi o niszę ekologiczną, a także przyczyniając się do wyginięcia gatunków miejscowych.

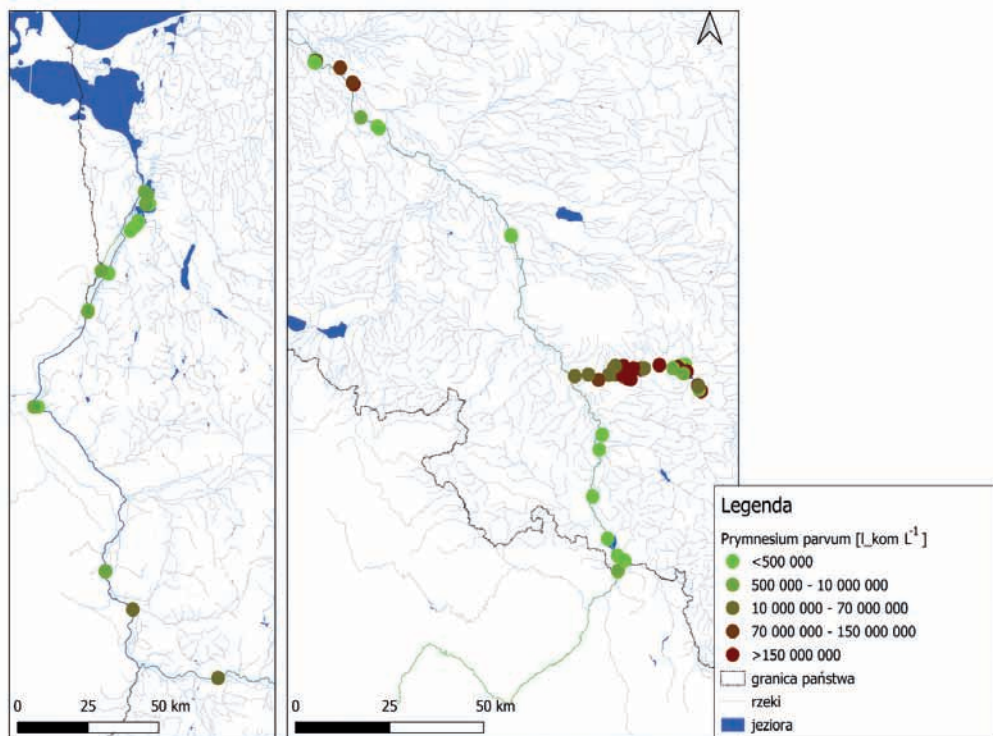
W celu lepszego poznania wymagań środowiskowych obecności glonu *Prymnesium parvum*, wykonano szereg dodatkowych badań laboratoryjnych, obejmujących główne parametry fizykochemiczne wody (tab. 1). W tabeli 1 podano zakresy parametrów, pochodzące z danych literaturowych (He 1989) oraz wyniki własne IRS-PIB, pochodzące z badań prowadzonych w okresie sierpień-listopad 2022 roku w rzece Odrze. Spośród najważniejszych parametrów należy wymienić: temperaturę wody w zakresach 2-30 oraz 2,8-27,0°C; pH w zakresach 7,2-9,3 oraz 6,5-9,1; przewodnictwo elektrolityczne w zakresie 230-5260 $\mu\text{S cm}^{-1}$ (dane IRS-PIB) oraz stosunek azotu do fosforu wynoszący najczęściej N/P 2-10 a maksymalnie N/P 14.

TABELA 1

Uwarunkowanie fizykochemiczne środowiska wodnego, w którym zanotowano występowanie i tworzenie się zakwitów *Prymnesium parvum* (dane literaturowe: He 1989 i dane IRS-PIB z badań rzeki Odry: Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022)

Parametr	Zakres wartości	
	dane za He (1989)	dane z badań rzeki Odry (IRS-PIB)
Temperatura wody, °C	2-30	2,8-27,0
Przezroczystość wody, cm	20-70	-
pH	7,2-9,3	6,5-9,1
Zasolenie, ‰	2,2-20	-
Zasadowość, meq L ⁻¹	5-17,22	-
Cl ⁻ , mg L ⁻¹	339-10800	25,9-3345,9
SO ₄ ²⁻ , mg L ⁻¹	375-7590	28,2-964,4
HCO ₃ ⁻ , mg L ⁻¹	0-68,5	64,2-562,4
Ca ²⁺ , mg L ⁻¹	45,9-547,6	34,1-376,7
Mg ²⁺ , mg L ⁻¹	187,5-905,9	6,1-216,2
Na ⁺ i K ⁺ , mg L ⁻¹	75,8-3054,9	14,6-3435,6
ChZT, mg L ⁻¹	23,4-42,2	3,3-42,7
Nasylenie wody tlenem, %	-	8,2-137,1
N/P	-	2-14
Przewodnictwo elektrolityczne, $\mu\text{S cm}^{-1}$	-	230-5260

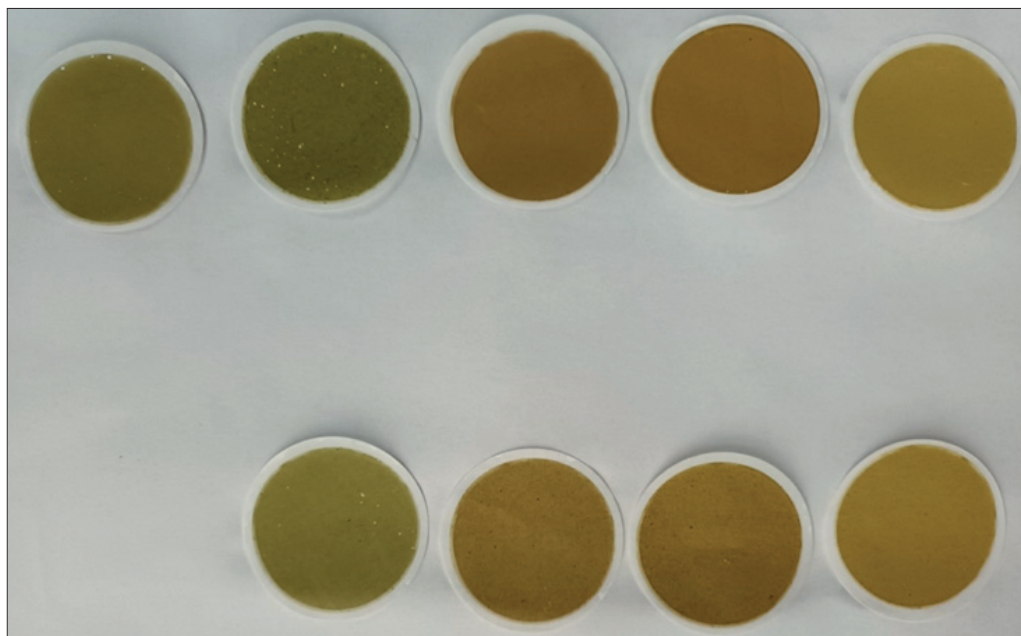
Objaśnienia: Cl⁻ – jony chlorkowe, SO₄²⁻ – jony siarczanowe, HCO₃⁻ – wodorowęglany, Ca²⁺ – jony wapniowe, Mg²⁺ – jony magnezowe, Na⁺ – jony sodu, K⁺ – jony potasu, ChZT – chemiczne zapotrzebowanie na tlen, – brak danych



Rys. 2. Liczebność *Prymnesium parvum* w rzece Odrze oraz wodach hydrologicznie związanych z rzeką Odrą (rozmieszczenie punktów pomiarowo kontrolnych dotyczy również miejsc poboru próbek wody do oznaczeń fizykochemicznych).

Wartości parametrów fizykochemicznych, w tym szczególnie skład jonowy wód rzeki Odry wskazuje wyraźnie na znaczące zanieczyszczenie wodami o charakterze poprodukcyjnym i/lub pokopalnianym. Wysokie wartości przewodnictwa elektrolitycznego są związane z ponadnormatywnymi stężeniami jonów chlorkowych i siarczanowych, ale także jonów sodu i potasu. Największe ich stężenia notowano w silnie zanieczyszczonych wodach Kanału Gliwickiego, odbierającego wody poprodukcyjne i/lub pokopalniane.

Badania algologiczne rzeki Odry i wód hydrologicznie związanych z rzeką wskazują, iż spośród przebadanych 420 próbek wody w 369 próbkach (88% ogółu próbek) zaobserwowano obecność *Prymnesium parvum* (Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022). Natomiast jego liczebność zawierała się w przedziale od 3000 do 610800000 komórek L^{-1} (rys. 2). Maksymalną wartość notowano w Kanale Gliwickim na stanowisku Pyskowice w obrębie województwa śląskiego w dniu 14.09.2022 r. Ogólnie, największe liczebności tego glonu notowano w Kanale Gliwickim na stanowiskach: Marina, Pyskowice i Śluza Łabędy. Kolejne stanowiska, na których stwierdzano duże liczebności były usytuowane w zbiornikach: Bajkał, Czernica i Łacha Jelcz. Przy pierwszej identyfikacji z miejsca masowych śnięć ryb w rzece Odrze w pobliżu Słubic (12.08.2022 r.) stwierdzono około 160800771 komó-



Rys. 3. Materiał planktonowy przesączony na sączkach GF/C (żółtawy kolor świadczy o dominacji *Prymnesium parvum* w fitoplanktonie (fot. A. Napiórkowska-Krzebietke).

rek L^{-1} . W sierpniu i na początku września 2022 roku w miejscach masowych śnięć najczęściej również notowano największe liczebności *Prymnesium parvum*, powyżej 50000000 komórek L^{-1} .

Wartości liczebności przekraczające 50 mln komórek L^{-1} stwierdzono w około 40%, a wartości powyżej 100 mln komórek L^{-1} odnotowano w 30% ogólnej liczby próbek. Z danych literaturowych wynika, że przy liczebności *Prymnesium parvum* powyżej 50-100 mln komórek L^{-1} odnotowano najczęściej masowe śnięcia ryb (np. Aquatic Invasive Species Control Plan Division of Environmental Services, Golden Alga 2021).

Równocześnie z badaniami liczebności *Prymnesium parvum* przeanalizowano próbki na zawartość toksyn w komórkach glonu. Każdorazowo w laboratorium IRS-PIB przygotowano materiał planktonowy przesączony na sączkach GF/C (rys. 3) w celu dalszych analiz na zawartość toksyn – prymnezyn. Tak przygotowane na sączkach i zamrożone przesącza (420 sztuk) przetransportowano do Zakładu Biotechnologii Morskiej, Wydziału Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego w Gdyni do wykonania analiz toksykologicznych. Natomiast część sączków (28 sztuk) po dalszym przygotowaniu próbki do analiz, już na Uniwersytecie Gdańskim, przestano do laboratorium Zakładu Chemii Żywności i Toksykologii, Wydziału Chemii, Uniwersytetu w Wiedniu celem przeprowadzenia analiz zawartości toksyn w drugim niezależnym laboratorium.

Analizy toksyn w obydwu laboratoriach wykazały, iż w próbkach materiału planktonowego z obszarów rzeki Odry i wód hydrologicznie związanych z rzeką, w których wystąpiły zakwity *Prymnesium parvum*, zostały wyodrębnione co najmniej trzy rodzaje toksyn z grupy prymnezyn-B, zawierające: (1) jedną jednostkę chloru i jedną jednostkę heksozy, (2) jedną jednostkę chloru i dwie jednostki heksozy oraz (3) jedną jednostkę chloru bez dołączonego cukru. Ich sumaryczna zawartość wynosiła od 0,2 do 83,0 nmoL L⁻¹ (Marzec-Mazur i in. 2022, Napiórkowska-Krzebietke (Red) 2022). Wykazano również ścisłą zależność pomiędzy liczebnością *Prymnesium parvum* a zawartością prymnezyn w komórkach, szczególnie w miejscach, w których odnotowano śnięcia ryb i makrobezkręgowców bentosowych.

Ichtiofauna

W trakcie trwania katastrofy, od końca lipca 2022 do 12 września 2022 roku w rzece Odrze udokumentowano śnięcia ponad 249 ton różnych gatunków ryb łącznie na terenie 5 województw: śląskie, opolskie, dolnośląskie, lubuskie i zachodniopomorskie (Kolada (Red.) 2022). Chociaż rzeczywiste straty w populacji ryb mogły być znacznie większe, o czym świadczą wyniki i porównania z odłowów monitoringowych przeprowadzonych w okresach przed i po wystąpieniu katastrofy, opisane w dalszej części pracy. Masowe śnięcia objęły gatunki ryb o różnej wielkości. Wśród nich były zarówno dużych rozmiarów sumy, szczupaki i sandacze (rys. 4) jak i drobne osobniki, w tym głównie okoń, jazgarz



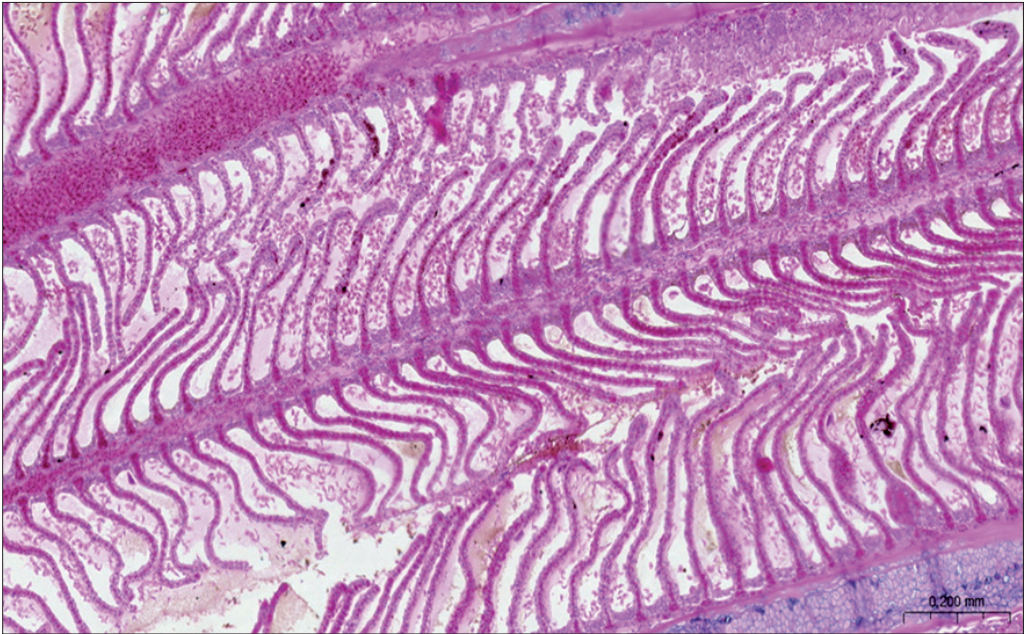
Rys. 4. Śnięte większych rozmiarów ryby: sumy, szczupaki i sandacze, zinwentaryzowane w dniu 19.08.2022 r. w rzece Odrze na wysokości Szczecin-Klucz (fot. J. Szlakowski; Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022)



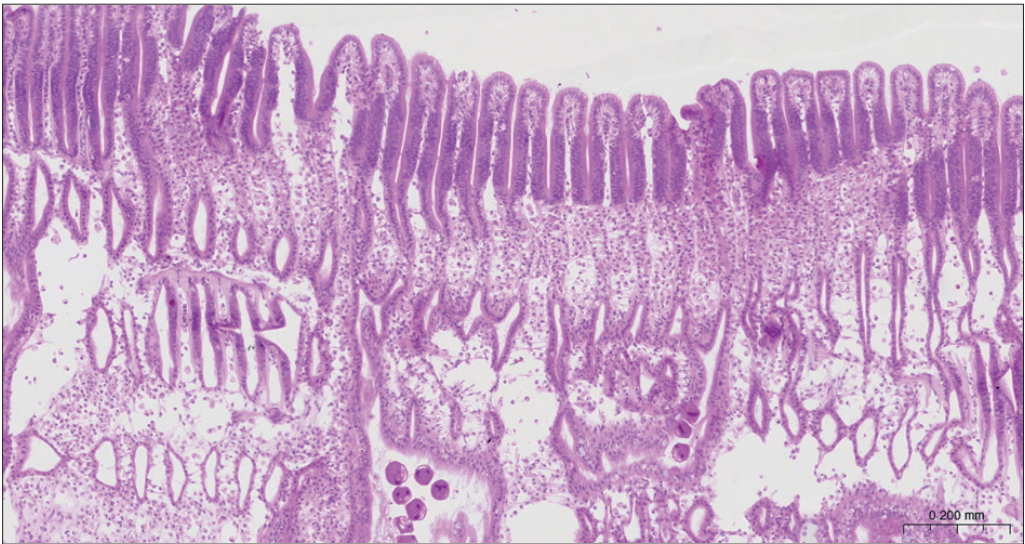
Rys. 5. Śnięte drobne ryby (głównie okoń, jazgarz i płoć) zinwentaryzowane w dniu 19.08.2022 r. w rzece Odrze na wysokości Szczecin-Klucz (fot. J. Szlakowski, Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022).

i płoć (rys. 5). Z danych pozyskanych od użytkowników obwodów rybackich, w trakcie utylizacji martwych ryb stwierdzono 28 gatunków. Wśród nich były: amur biały, boleń, brzana, certa, jaź, jazgarz, jesiotr ostronosy, karaś srebrzysty, karp, kleń, kietb, koza, krąp, leszcz, lin, miętus, okoń, płoć, różanka, rozpiór, sandacz, sum, świnka, szczupak, tołpyga, ukleja, węgorz i wzdręga (Napiórkowska-Krzebietke, Parasiewicz (Red.) 2023).

Badania stanu zdrowia ryb i mały, pobranych w miejscach masowych śnięć, prowadzone przez zespół pod kierownictwem Prof. dr hab. Andrzeja Siwickiego (Zakład Ichtiopatologii i Ochrony Zdrowia Ryb IRS-PIB) wykazały, iż pomimo braku zmian klinicznych w obrazie histopatologicznym u wszystkich ryb i mały zaobserwowano ostre uszkodzenia narządów, które są najsilniej ukrwione. Były to głównie skrzela np. u węgorza (rys. 6) i szczeżui (rys. 7), chociaż obserwowano również rozsianą martwicę śledziony u szczupaka i węgorza. Zaobserwowane zaburzenia procesów hematopoetycznych, a także uszkodzenie skrzeli mogły być, z bardzo dużym prawdopodobieństwem, związane z działaniem toksyn hemolitycznych, w tym prymnezyn wydzielanych przez *Prymnesium parvum* (Johnsen i in. 2010, Southard i in. 2010, Wagstaff i in. 2021).



Rys. 6. Zmiany na skrzelach u węgorza – przekrwienie i silny wysięk zapalny (fot. K. Duk).



Rys. 7. Zmiany na skrzelach u szczepki – uszkodzenia i pasożytujące orzęski z rodzaju *Trichodinella* (fot. K. Duk).

Porównanie wyników z odłowów monitoringowych (państwowy monitoring środowiska prowadzony na zlecenie Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska) w obrębie 14 odcinków rzeki Odry, przeprowadzonych w trakcie i po wystąpieniu katastrofy, z danymi pozyskanymi z wielolecia (2014-2021), wskazuje wyraźnie na różnice wielkości połowów dotyczące m.in. średniej masy połowu na stanowisku i średniej liczby ryb złowionych na stanowisku. W wyniku katastrofy nastąpiło zmniejszenie się średniej liczby ryb i masy połowu o ok. 50% (Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022).

Natomiast, odnosząc się do struktury ichtiofauny z odłowów gospodarczych prowadzonych przez rybaków w wodach obwodów rybackich rzeki Odra nr 3 i 4, których użytkownikiem rybackim jest Spółdzielnia Rybacka Regalica w Gryfinie, w latach 2017-2021 oraz w 2022 roku, w okresie tuż po wystąpieniu katastrofy ekologicznej stwierdzono istotne zmiany w ilości odławianych tych samych gatunków w omawianych okresach. Odnotowano głównie znaczny spadek odłowów płoci (sortyment S), krąpia, leszcza (sortyment D), szczupaka, lina, suma, okonia (sortymenty D+S), bolenia, jazia, karasia srebrzystego, karpia, tołpygi, siei, miętusa, klenia i amura. Natomiast zaznaczył się znaczny wzrost udziału rozpióra, sandacza i węgorza w strukturze biomasy połowów gospodarczych po katastrofie ekologicznej. Leszcz (sortymenty D+S), krąp i sandacz stanowiły, więc przeważającą część w biomacie połowów gospodarczych ryb w analizowanym rejonie rzeki Odry (Napiórkowska-Krzebietke (Red.) 2022).

Straty w ichtiofaunie dotyczyły również gatunków chronionych. Na podstawie powtórzonych badań odcinków rzeki Odry z 2017 roku w 2022 roku, czyli w trakcie wystąpienia katastrofy była możliwa ocena stanu zachowania populacji tych ryb (Napiórkowska-Krzebietke, Parasiewicz (Red.) 2023). Wśród gatunków chronionych odnotowano: jesiotra ostronosego (*Acipenser oxyrinchus* Mitchell, 1815) (martwe osobniki), bolenia (*Leuciscus aspius* Linnaeus, 1758), brzanę (*Barbus barbus* Linnaeus, 1758), piekielnicę (*Alburnoides bipunctatus* Bloch, 1782), różankę (*Rhodeus amarus* Bloch, 1782), kozę pospolitą (*Cobitis taenia* Linnaeus, 1758), kietbia białopłetwego (*Romanogobio belingi* Slastenenko, 1934), śliza (*Barbatula barbatula* Linnaeus, 1758) i piskorza (*Misgurnus fossilis* Linnaeus, 1758) (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:PL:PDF>).

W 2022 roku zanotowano wyraźny spadek liczebności gatunków chronionych oraz nie zaobserwowano kozy złotawej *Sabanejewia baltica* (Witkowski, 1994), notowanej w 2017 roku. Ogólnie w porównaniu obydwu lat, zaobserwowano spadek liczebność różanki z 7872 do 183 szt. ha⁻¹ (o 98%), kozy pospolitej z 1999 do 55 szt./ha (o 97%), brzany z 139 do 2 szt. ha⁻¹ (o 99%), natomiast śliza z 34 do 3 szt. ha⁻¹ (o 91%). Natomiast nieznaczny wzrost liczebności dotyczył kietbia białopłetwego z 3 do 42 szt. ha⁻¹ i bolenia z 6 do 44 szt. ha⁻¹ (Napiórkowska-Krzebietke, Parasiewicz (Red.) 2023). Porównując odłowy na odcinku Odry Swobodnie Płynącej, wykazano znaczący spadek (o około

86%) udziału procentowego gatunków ryb objętych ochroną, który w 2017 roku wyniósł około 66% wszystkich złowionych osobników, natomiast w 2022 roku jedynie 9%.

Zooplankton i makrobezkręgowce bentosowe

Badania pierwotniaków potwierdziły dominację w zespole glonożernych gatunków z rodzaju *Rimostrombidium*, przede wszystkim *Rimostrombidium humile* (Penard 1922) niewielkich rozmiarów (20-30 μm) oraz drobnych bakteriożernych Scuticociliatida (głównie *Cyclidium glaucoma* Möller). W Kanale Gliwickim, w których notowano intensywne zakwity *Prymnesium parvum*, wśród orzęsków dominowały drobne, odżywiające się bakteriami i glonami gatunki z rodzaju *Urotricha*, *Cyclidium*, *Halteria*, *Mesodinium* i *Balanion*. Wrotki i skorupiaki planktonowe były reprezentowane przez 50 gatunków z dominacją Rotifera. Ważnym odkryciem było zidentyfikowanie wcześniej nie notowanych gatunków, tj. *Keratella ticinensis* (Callerio, 1920), *Keratella valga valga* (Ehrenberg, 1834) i *Brachionus bidenta* Anderson, 1889, preferujących wody lekko kwaśnie lub występujących pospolicie w wodach żyznych, odżywiających się detrytusem oraz zielenicami, okrzemkami, złotowiciowcami czy też haptofitami.

Przeprowadzone w sierpniu 2022 roku, czyli w trakcie wystąpienia katastrofy ekologicznej, badania na wybranych stanowiskach w rzece Odrze wykazały bardzo dużą śmiertelność makrobezkręgowców bentosowych (Napiórkowska-Krzebietke [Red.] 2022). Największą śmiertelność zanotowano w przypadku małży (*Bivalvia*) z rodzajów *Anodonta* oraz *Unio*, która wynosiła blisko 100% (rys. 8). Obecność ich w ekosystemie



Rys. 8. Próbkę z makrobezkręgowcami bentosowymi (fot. IRS-PIB).

rzecznym jest bardzo istotna dla rozwoju ryb ostrakofilnych, które składają ikrę do jamy płaszczowej małży. Niskie liczebności tych małży przekładają się znacząco na gwałtowne ograniczenie potencjału rozrodczego różanki, tj. gatunku ryby wykorzystującego małże z rodziny skójkowatych w swoim procesie rozrodu. Ponadto, różanka należy do gatunków podlegającym ochronie częściowej (załącznik II dyrektywy siedliskowej).



Rys. 9. *Faxonius limosus* Rafinesque 1817 (https://pl.wikipedia.org/wiki/Rak_pręgowaty).

Nieznacznie niższą śmiertelność stwierdzono u rącznicy zmiennej *Dreissena polymorpha* (Pallas 1771), a na każdym badanym stanowisku stwierdzono również żywe osobniki. Natomiast najniższą śmiertelnością charakteryzował się obcy azjatycki gatunek małża z rodzaju *Corbicula*. Bardzo wysoką śmiertelność wykazano również w przypadku ślimaków wodnych (Gastropoda), wśród których od 95 do 100% martwych osobników zanotowano z rodziny błotniarkowatych, zatoczkowatych oraz zagrzebkowatych. Ponadto, na każdym badanym stanowisku wśród martwych makrobezkręgowców bentosowych stwierdzano również martwe raki pręgowe *Faxonius limosus* Rafinesque 1817 (rys. 9) z gromady Malacostraca, a jedynie nieliczne, pojedyncze osobniki były żywe. W kolejnych badaniach, przeprowadzonych jesienią, tj. w wrześniu Bivalvia i Gastropoda stanowiły najliczniejszą grupę żywych organizmów, zaś w listopadzie dominowały żywe Malacostraca, Insecta i Annelida. Różnice te mogą dotyczyć zmian sezonowych i/lub pojawieniu się dla nich niszy ekologicznej.

Badania ryb i makrobezkręgowców bentosowych wskazywały na największe ich bogactwo w polach międzyostrogowych. Użyteczność tego siedliska potwierdziły również wypracowane wstępne modele hydrodynamiczne siedliska. W trakcie katastrofy obserwowano, iż z powodu niskiej prędkości przepływu wody w tych strefach, śnięte ryby i makrobezkręgowce bentosowe były masowo zgromadzone na dnie, a rozkładająca się biomasa przyczyniała się do tworzenia warunków beztlenowych, które odnotowano w drugiej fazie katastrofy w dolnym odcinku rzeki. Mogło to spowodować wtórne skażenie rzeki Odry.

Podsumowanie i rekomendacje

Od 12 sierpnia 2022 roku, notowane podczas katastrofy ekologicznej w rzece Odrze i wodach hydrologicznie związanych z rzeką masowe śnięcia ryb oraz makrobezkręgowców bentosowych zapoczątkowały prowadzenie intensywnych i szczegółowych badań fizykochemicznych i biologicznych w IRS-PIB. Szereg czynników meteorologicznych (wysoka temperatura, niskie stany wód), niska jakość wód, w tym głównie wysoka przewodność elektrolityczna, znacząco przekraczająca wartości normatywne na niemal wszystkich badanych punktach pomiarowych oraz podwyższone wartości pH i dobowe zmiany stężenia tlenu rozpuszczonego sprzyjały wystąpieniu intensywnych i ichtiotoksycznych zakwitów *Prymnesium parvum*. Zarówno wysokie wartości liczebności jak i zawartości prymnezyn istotnie korelowały z miejscami masowych śnięć ryb oraz makrobezkręgowców bentosowych. Dodatkowo, badania ichtiopatologiczne potwierdziły, w stopniu najbardziej prawdopodobnym, możliwość łączenia tych faktów i wskazywały, iż zmiany hemolityczne w najsilniej ukrwionych narządach organizmów skrzelodysznych mają związek z działaniem prymnezyn, produkowanych przez *Prymnesium parvum*. Ogółem w trakcie trwania katastrofy, latem w 2022 roku w rzece Odrze udokumentowano śnięcia ponad 249 ton różnych gatunków ryb łącznie na terenie 5 województw: śląskie, opolskie, dolnośląskie, lubuskie i zachodniopomorskie. Straty w ichtiofaunie mogły być znacznie większe, a część z nich dotyczyły również gatunków chronionych. W porównaniu wyników badań w ramach PMŚ 14 odcinków (jako jednolitych części wód powierzchniowych) rzeki Odry w 2022 roku oraz w latach 2014-2021, straty dotyczyły około 50% populacji ryb.

Wykazano również bardzo dużą śmiertelność makrobezkręgowców bentosowych, która na badanych stanowiskach maksymalnie wynosiła blisko 100%, szczególnie w przypadku małży z rodzajów *Anodonta* oraz *Unio*. Ich bardzo niskie liczebności przekładają się na znaczące ograniczenie potencjału rozrodczego różanki, tj. gatunku ryby wykorzystującego małże z rodziny skójkowatych w procesie rozrodu.

Jako rekomendacje, spójnie wypracowane przez wszystkie zespoły badające skutki powstałej katastrofy ekologicznej w rzece Odrze i wodach hydrologicznie związanych z rzeką latem 2022 roku (według wyżej cytowanych raportów), można wskazać konieczność:

1. wdrożenia stałego systemu monitoringu jakości wód Odry w zakresie parametrów, związanych z zakwitami *Prymnesium parvum*, w tym głównie przewodnictwo elektrolityczne i odczyn pH wody wraz z systemem wczesnego ostrzegania i reagowania, w połączeniu z rozszerzonym monitoringiem biologicznym rzeki w warunkach silnie przekształconych;

2. wdrożenia programu monitoringu stanu populacji ryb wraz z rejestracją efektów rozrodu naturalnego i struktury wiekowej;
3. ochrony i podjęcia programu renaturyzacji i udroźnienia dopływów rzeki Odry dla ryb, które znalazły je jako refugium w trakcie katastrofy ekologicznej;
4. rozpoznania mechanizmów wywołujących szok środowiskowy u *Prymnesium parvum*, tzw. złotych alg, których toksyny – prymnezyny mogły być przyczyną katastrofy, następnie kontrolowania warunków go wywołujących oraz opracowania skutecznych metod ograniczenia i/lub wyeliminowania masowego rozwoju ichtiotoksycznego glonu;
5. kontroli punktowych zrzutów wód zanieczyszczonych do rzeki Odry i jej dopływów, ustalenia podmiotów odpowiedzialnych za zły stan jakości wód rzeki Odry oraz likwidacja nielegalnych zrzutów;
6. przygotowania podstaw odtworzenia różnorodności koryta i stworzenia siedlisk refugialnych w korycie rzeki Odry, zwiększających odporność systemu rzeki na zagrożenia spowodowane zanieczyszczeniami i zmianami klimatu, szczególnie dla gatunków chronionych włącznie ze stworzeniem banku genów i odtworzeniem populacji odrzańskich ryb i innych grup organizmów, które ucierpiały w wyniku katastrofy;
7. wspierania inwestycji celem podwyższenia stopnia oczyszczania ścieków komunalnych i przemysłowych.

Podziękowania

Praca została przygotowana w ramach zadania badawczego Z-014 Instytutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowego Instytutu Badawczego. Część danych o ichtiofaunie pochodzi z państwowego monitoringu środowiska prowadzonego na zlecenie Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska.

Literatura

- Aquatic Invasive Species Control Plan Division of Environmental Services, Golden Alga 2021 – <https://www.fishandboat.com/Resource/AquaticInvasiveSpecies/Documents/ais-control-plan-golden-alga.pdf>
- Carter N. 1937 – New or interesting algae from brackish water – Arch. Protistemk. 90: 1-68.
- Encyklopedia PWN – Katastrofa ekologiczna – <https://encyklopedia.pwn.pl/haslo/katastrofa-ekologiczna;3921133.html>
- <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1992L0043:20070101:PL:PDF>
- https://mdwe70.pl/drogi-wodne/akweny/odra/?doing_wp_cron=1690108901.49654293060302-73437500
- Johnsen, T.M., Eikrem, W., Olseng, C.D., Tollefsen, K.E., i Bjerknes, V. 2010 – *Prymnesium parvum*: The norwegian experience – Journal of the American Water Resources Association, 46(1), 6–13. <https://doi.org/10.1111/J.1752-1688.2009.00386.X>

- Manning, S. R., La Claire, J. W. 2010 – Prymnesins: toxic metabolites of the golden alga, *Prymnesium parvum* Carter (Haptophyta). *Marine drugs*, 8(3), 678–704. <https://doi.org/10.3390/md8030678>
- Mazur-Marzec H., Konkel R., Varga E., Napiórkowska-Krzebietke A. 2022 – Oznaczanie prymnezyn (prm) produkowanych przez *Prymnesium parvum* – W: A. Kolada [Red.] Wstępny Raport Zespołu ds. sytuacji na rzece Odrze. Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, ss. 217-230.
- Napiórkowska-Krzebietke A. [Red.] 2022 – Raport z prowadzenia badań oraz połowów ryb w rzece Odrze w celu oceny skutków katastrofy ekologicznej – IRS-PIB Olsztyn, ss. 237.
- Napiórkowska-Krzebietke A., Parasiewicz P. [Red.] 2023 – Ocena skali ubytku gatunków chronionych ryb i mięczaków w wyniku masowego spływu śniętych ryb w Odrze w roku 2022 – Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowy Instytut Badawczy, Olsztyn, ss. 1-109.
- Napiórkowska-Krzebietke A., Parasiewicz P. [Red.] 2023 – VIII. Analiza stanu ryb i mięczaków po katastrofie – W: IOŚ-PIB [Red.] Raport kończący prace zespołu ds. sytuacji w Odrze. Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy Warszawa, ss. 141-180.
- Napiórkowska-Krzebietke, A., Kalinowska K. 2022 – Identyfikacja obecności i zakwitu *Prymnesium parvum* – W: A. Kolada [Red.] Wstępny Raport Zespołu ds. sytuacji na rzece Odrze. Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa, ss. 187-204.
- Parasiewicz P., Suska K., Napiórkowska-Krzebietke A. [Red.] 2023 – Badania parametrów jakościowych wody rzeki Odry na bazie lotniczych danych hiperspektralnych zebranych na wybranych odcinkach poniżej kanału Gliwickiego w trakcie masowego spływu śniętych ryb i mięczaków – Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowy Instytut Badawczy, Olsztyn, ss. 1-165.
- Preisig H.R. 2011 – Phylum Haptophyta (Prymnesiophyta) – In: *The freshwater algal flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae. Second edition.* (John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. Eds), pp. 277-279. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rozdział przygotowany przez Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy na podstawie danych przekazanych przez Główny Inspektorat Ochrony Środowiska, Instytut Rybactwa Śródlądowego – Państwowy Instytut Badawczy i Uniwersytet Gdański 2023 – V. Występowanie *Prymnesium parvum* na tle fizyko-chemicznych warunków środowiskowych – W: IOŚ-PIB [Red.] Raport kończący prace zespołu ds. sytuacji w Odrze. Instytut Ochrony Środowiska – Państwowy Instytut Badawczy Warszawa, ss. 101-108.
- Southard, G. M., Fries, L. T., i Barkoh, A. 2010 – *Prymnesium parvum*: The texas experience *Journal of the American Water Resources Association*, 46(1), 14–23. <https://doi.org/10.1111/J.1752-1688.2009.00387.X>
- Thronsdon J., 1996 – The planktonic marine flagellates – W: *Identifying marine phytoplankton.* (Tomas, C.R. Eds), pp. 591-730. San Diego: Academic Press.
- Wagstaff B.A., Pratscher J., Rivera P.P.L., Hems E.S., Brooks E., Rejzek M., Todd J.D., Murrell J.C., Field R.A. 2021 – Assessing the Toxicity and Mitigating the Impact of Harmful *Prymnesium* Blooms in Eutrophic Waters of the Norfolk Broads – *Environ. Sci. Technol.* 55: 16538-16551.

Bazy danych genetycznych ryb i ich zastosowanie w ochronie ryb wędrownych

Dariusz Kaczmarczyk

Zakład Rybactwa Stawowego, Instytutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza –
Państwowy Instytut Badawczy w Olsztynie

Wstęp

Ryby wędrowne, w tym dwuśrodowiskowe spędzające część swojego życia w rzece i morzu są gatunkami szczególnie zagrożonymi konsekwencjami zabudowy hydrotechnicznej oraz zmianami w środowisku wodnym (Rosimeire i in. 2010). Niejednokrotnie zmiany dokonane w rzece powodują odcięcie ich od tarlisk, zatem utrzymanie populacji gatunków wędrownych jest zależne od człowieka (Koljonen i in. 2002). Zachowanie populacji ryb łososiowatych i jesiotrów wpisuje się w obszar zainteresowania biologii konserwacyjnej, będącej multidyscyplinarną dziedziną nauki skupioną na celu jakim jest ochrona różnorodności gatunków i populacji zamieszkujących ziemię (Vitt i Caldwell 2009). Obejmuje ona zabiegi takie jak: usuwanie barier w rzece, odtworzenie dróg wędrówki i tarlisk ryb wędrownych, zwalczanie kłusownictwa (Wohl i in. 2015) oraz szereg metod wspierających utrzymanie populacji gatunków ryb wędrownych.

Jedną z technik biologii konserwacyjnej, stosowanych w ochronie populacji gatunków ryb wędrownych jest produkcja i podchów materiału zarybieniowego w warunkach akwakultury, a następnie zasilanie nim chronionych populacji (Brown i Day 2002). Skuteczność prowadzonych zarybień weryfikuje się poprzez połowy w morzu lub podczas wędrówek tarlaków w rzekach (Duponchelle i in. 2021, Wąs-Barcz i Bernaś 2023). W trakcie tych prac kluczowa jest identyfikacja pochodzenia danego osobnika w szczególności czy pochodzi on z naturalnego tarła czy dostał się do rzeki w wyniku zarybień (Wąs-Barcz i Bernaś 2023). Identyfikacja pochodzenia ryb jest tradycyjnie wykonywana za pomocą znaczków zaaplikowanych na zewnątrz lub wewnątrz ciała ryby (Thorstad i in. 2013). Z przyczyn technicznych metoda ta nie zawsze może być stosowana i dlatego

potrzebuje alternatywy. Może nią być zastosowanie bazy genetycznej rozumianej jako zbiór profili ryb użytych w procesie produkcji materiału zarybieniowego. Baza taka może być użyta do identyfikacji pochodzenia osobników wracających na wędrówki tarłowe do rzek (Wąs-Barcz i Bernaś 2023) a także zastosowana do szeregu innych działań związanych z ochroną zmienności genetycznej gatunków zagrożonych wyginięciem.

W niniejszej pracy przedstawiono bazę profili genetycznych ryb, informacje jakie zawiera i do czego może być użyta w procesach ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem, w szczególności ryb jesiotrowatych i łososiowatych.

Tworzenie bazy genetycznej, aktualizacja i dostępność informacji

Baza genetyczna w swojej najprostszej formie jest zbiorem profili genetycznych grupy osobników. W skład każdego profilu genetycznego wchodzi wykaz alleli przebadanych markerów genetycznych wykrytych u osobników pochodzących z danego stada lub populacji. Baza genetyczna może zawierać profile genetyczne tarłaków, selektów lub materiału zarybieniowego uzupełnione o informacje dodatkowe umożliwiające ich identyfikację (tab. 1) (Kaczmarczyk 2016).

Markerem genetycznym użytecznym w tworzeniu bazy genetycznej może być dowolny odcinek DNA, w którym obserwujemy polimorfizm długości lub sekwencji wykrywalny za pomocą technik molekularnych. Obecnie najpowszechniej stosowane są dwie klasy markerów genetycznych. Są nimi: polimorficzne odcinki DNA zawierające powtarzające się sekwencje nukleotydowe np. DNA jak np. mikrosatelitarne DNA oraz odcinki, w których występuje polimorfizm pojedynczych sekwencji nukleotydów (SNP) (Zemanová i in. 2015). Niezależnie od klasy, markery te umożliwiają sporządzenie indywidualnych profili genetycznych osobników, które mogą być użyte np. w badaniach związanych z rejestracją i zarządzaniem zmiennością genetyczną danego stada lub populacji (Kaczmarczyk i Wolnicki 2016). Badania prowadzące do opracowania profili genetycznych obejmują etapy takie jak: pobranie fragmentu tkanki np. płetwy od osobników, izolacja DNA, powielenie odcinków DNA metodą PCR i ustalenie genotypów przebadanych osobników (Fopp 2003).

Dostęp do bazy profili genetycznych może być prowadzony poprzez umieszczenie ich na serwerach i udostępnienie naukowcom, jednostkom badawczym i instytucjom zaangażowanym w programy ochrony gatunkowej (Gilbey i in. 2018). Baza profili genetycznych jest strukturą otwartą, która może być dostosowywana, rozbudowywana i aktualizowana o kolejne przebadane osobniki, stada lub populacje. Odpowiednio liczna grupa profili genetycznych zdeponowanych w bazie jest źródłem informacji o charakterystyce genetycznej ryb, w tym i ich pochodzeniu. Charakterystyki te opisane są zarówno poprzez występowanie w genotypach osobników tzw. alleli własnych charakterystycz-

TABELA 1

Baza danych genetycznych zawierająca profile genetyczne tarlaków wiosłonosza amerykańskiego (*Polyodon spathula*) utrzymanych w gospodarstwie rybackim Pogórze (Kaczmarczyk 2016)

ryba		locus												
nr osobnika	pleć	nr znacznika	Psp18	Psp28	Psp26	Psp21	Psp20	Psp32	Psp29		Psp29			
pog 1	♀	0633 31F7	170	250	138	152	150	210	179	181	195	203	211	215
pog 2	♀	0633 329C	170	244	136	138	146	210	181	181	195	203	211	215
pog 3	♀	0633 590A	170	244	138	142	146	210	181	181	195	203	211	211
pog 5	♀	0633 C4BE	170	244	136	142	150	210	181	181	195	203	211	215
pog 6	♀	0633 4AA4	170	230	136	142	146	210	181	181	195	203	211	215
pog 10	♀	0634 2D37	170	230	138	152	150	210	181	181	195	203	211	215
pog 14	♀	0635 FC74	170	244	138	142	150	210	181	181	195	195	211	211
pog 15	♀	0634 34B1	170	244	136	142	150	210	181	181	195	195	211	215
pog 16	♀	0634 1C42	170	230	138	142	150	210	179	181	195	195	211	215
pog 17	♀	0636 225B	170	230	138	142	150	210	179	181	195	203	211	215
pog 21	♀	0634 540F	170	230	138	152	150	208	179	181	195	203	211	215
pog 9	♂	0637 E64B	168	244	138	152	150	210	181	181	195	203	211	215
pog 13	♂	0636 0E12	170	246	136	142	146	210	179	181	195	203	211	215
pog 19	♂	0633 285E	170	246	138	138	150	210	181	181	195	203	211	215
pog 20	♂	0633 2E73	170	246	138	138	150	210	181	181	195	203	211	215
pog 22	♂	0633 3078	170	246	138	138	150	210	181	181	195	203	211	215
pog 23	♂	0636 213F	170	246	138	138	150	210	181	181	195	195	211	215
pog 24	♂	0633 5782	170	230	152	160	150	208	179	181	195	195	211	211

nych dla danej populacji lub stada oraz różnic w frekwencji alleli wspólnych. Bazy profili genetycznych mające w swojej strukturze informacje, dotyczące charakterystyki genetycznej tarlaków użytych do uzyskania materiału zarybieniowego lub ryb, którymi wykonano zarybienia mogą być użyte do oszacowania prawdopodobieństwa pochodzenia złowionej ryby z zarybień lub tarła naturalnego (Wąs-Barcz i Bernaś 2023).

Zastosowania baz genetycznych

Zastosowanie baz danych genetycznych w biologii konserwacyjnej nie jest tematem nowym i jest realizowane w ochronie gatunków zagrożonych wyginięciem (Hogg i in. 2022). Obejmuje ono działania, związane z monitoringiem przeżywalności, migracji oraz zróżnicowania genetycznego chronionych populacji (Schmidt i in. 2023) oraz szereg innych aspektów, związanych z utrzymaniem zróżnicowania genetycznego chronionych populacji i gatunków. W tym opracowaniu skupiono się na opisie wybranych zastosowań, które są najważniejsze z perspektywy ochrony ryb jesiotrowatych i łososiowatych.

A. Zastosowanie baz genetycznych w ocenie skuteczności prac zarybieniowych

W przypadku ryb łososiowatych i jesiotrów oraz innych gatunków rozradzanych w warunkach kontrolowanych, przeżywalność uzyskanych osobników wypuszczonych do środowiska naturalnego jest wskaźnikiem brany pod uwagę w trakcie oceny skuteczności programów ich ochrony. Bazy profili genetycznych mają w swojej strukturze informacje, dotyczące profili genetycznych tarlaków użytych do uzyskania materiału zarybieniowego. Mogą też zawierać charakterystyki genetyczne ryb, którymi wykonano zarybienia. W ten sposób stanowią narzędzie, które może być użyte do oszacowania prawdopodobieństwa pochodzenia złowionej ryby z zarybień lub tarła naturalnego (Martínez i Fernández 2008, Wąs-Barcz i Bernaś 2023). Połączenie bazy danych obejmujących profile genetyczne osobników użytych w rozrodzie oraz zastosowanie oprogramowania komputerowego, takie jak np. SPAGeDi (Hardy i Vekemans 2002) lub COLONY (Jones i Wang 2009) umożliwia oszacowanie skuteczności prowadzonych programów i ochrony lub odbudowy populacji. Technika ta została wykorzystana w ocenie wpływu zarybień pstrągiem potokowym (*Salmo trutta L.*) uzyskanym w warunkach wylęgarnicznych na charakterystykę genetyczną duńskiej populacji tego gatunku (Hansen i in. 2000) oraz w monitorowaniu skuteczności programów ochrony troci wędrownej (*Salmo trutta morpha trutta*) i łososia (*Salmo salar*) (Wąs i Wenne 2002, Nilsson i in. 2008, Jones i in. 2010, ICES WGBAST 2017). Zbudowanie bazy profili genetycznych tarlaków może być użyteczne w programach ochrony i restytucji każdego gatunku ryby zależnego od człowieka, w tym ryb jesiotroształtnych (Kirshbaum i Gessner 2000, Gessner 2000, Popović i in. 2014).

B. Identyfikacja pochodzenia produktów uzyskiwanych z ryb oraz hybryd międzygatunkowych

Bazy danych genetycznych zawierające listy alleli charakterystycznych dla poszczególnych gatunków, stad, populacji lub ich grup umożliwiają identyfikację produktów uzyskiwanych z ryb jesiotroksształtnych lub łososiowatych (na przykład mięsa i ikry). Metoda ta może być użyta do wykrywania zafałszowań i oszustw handlowych, takich jak np. inne pochodzenie danego produktu niż deklarowane (Fopp 2003, Ogden 2009, Cermakova i in. 2023).

Poszczególne gatunki i populacje ryb należące do rzędu Acipenseriformes lub Salmoniformes są często bardzo podobne do siebie pod względem cech fenotypowych. Określenie gatunku na podstawie ich fenotypu jest często niemożliwe. Dodatkowo w przypadku Acipenseriformes, ryby należące do tego rzędu posiadają zdolność naturalnej hybrydyzacji międzygatunkowej. Porównanie profilu genetycznego osobnika ze znajdującymi się w bazie profili genetycznych danej grupy taksonomicznej umożliwia identyfikację osobników należących do poszczególnych gatunków i populacji ryb oraz ich mieszańców (Fopp 2003, Cermakova i in. 2023). Metoda ta została między innymi zastosowana w identyfikacji *Huso huso*, *Acipenser stellatus*, *Acipenser gueldenstaedtii* i *Acipenser ruthenus* i ich hybryd w rzece Dunaj (Dudu i in. 2011).

C. Monitorowanie zmienności genetycznej w populacjach

Produkcja narybku przeznaczonego do zasilania populacji zagrożonych wyginięciem w warunkach kontrolowanych może zwiększyć prawdopodobieństwo rozrodu osobników blisko spokrewnionych (Kaczmarczyk i in. 2012). Tak prowadzony rozród może zmniejszyć zmienność genetyczną stada lub populacji zależnej od człowieka. Baza danych zawierająca profile genetyczne materiału zarybieniowego może być stosowana w monitorowaniu zasobu zmienności genetycznej jako podczas zarybienia trafia do środowiska. W połączeniu z programami takimi jak: ARLEQUIN (Excoffier i Lischer, 2010), MSA (Dieringer i Schlötterer 2003), STRUCTURE (Falush i in. 2003, 2007, Hubisz i in. 2009), GENEPOP (Rousset 2007) baza profili genetycznych ryb może być użyta do obliczania i porównywania wartości wskaźników zmienności genetycznej wewnątrz i pomiędzy stadami oraz populacjami. Porównanie aktualnych i historycznych wartości wskaźników zmienności genetycznej, takich jak: heterozygotyczność obserwowana (H_o) i oczekiwana (H_e), procent loci polimorficznych (P), średnia liczba alleli w locus (A) oraz bogactwo alleli (R) w materiale zarybieniowym (Kaczmarczyk i Wolnicki 2016, Long i in. 2017), jak i wśród ryb powracających na tarło jest informacją wskazującą na tendencje zmian w poziomie zróżnicowania genetycznego populacji. Ten sposób użycia baz genetycznych umożliwia podjęcie działań mających na celu przeciwdziałanie utracie różno-

rodności genetycznej (Kim i in. 2004). Działania takie mogą być podjęte, zanim redukcja zmienności genetycznej stada tarłowego spowoduje obniżenie żywotności chronionej populacji (Taniguchi 2008).

D. Rozród i akwakultura

Niewielkie zróżnicowanie genetyczne jest problemem w ochronie wielu populacji zależnych od człowieka. Może ono wpływać niekorzystnie na zdolności adaptacyjne populacji do zmian środowiskowych (Charlesworth i Willis 2009, Chapman i in. 2009, Nielsen i in. 2012). Ponadto może prowadzić do ekspresji defektów genetycznych kodowanych przez allele recesywne (Charlesworth i Willis 2009, Gao i in. 2015) i tym samym upośledzenia żywotności ryb wchodzących w skład populacji.

Wskazane jest więc prowadzenie doboru do rozrodu osobników rodzicielskich, które różnią się między sobą genetycznie, i których potomstwo będzie heterozygotyczne w wielu *loci*. Wymaga to poznania genotypów osobników wchodzących w skład stada rozrodczego i różnic genetycznych między nimi. Utworzenie bazy genetycznej zawierających profile genetyczne tarłaków może być pomocne w unikaniu kojarzenia ze sobą osobników podobnych genetycznie (Kaczmarczyk 2016).

Zarządzanie bazami danych zawierającymi genotypy tarłaków wiąże się z koniecznością przeanalizowania ogromnej liczby danych. Połączenie baz profil genetycznych tarłaków z oprogramowaniem komputerowym takim jak GENEASSEMBLAGE (Kaczmarczyk 2015, Kaczmarczyk i Wolnicki 2020) umożliwia optymalizację doboru osobników w pary tarłowe. Na podstawie spodziewanej zmienności genetycznej ich potomstwa można tak zaprojektować skład par tarłowych lub grup tarłaków, aby otrzymać materiał możliwie zróżnicowany genetycznie. Koncepcja tworzenia baz genetycznych indywidualnych profili genetycznych i zastosowania narzędzi bioinformatycznych została sprawdzona w praktyce (Kaczmarczyk i in. 2017) i może być stosowana zarówno dla organizmów diploidalnych, jak i tetraploidalnych lub częściowo tetraploidalnych, jakimi są ryby wędrowne, dwuśrodowiskowe, w tym jesiotry i łososioвате (Kaczmarczyk i Fopp-Bayat 2012, Kaczmarczyk 2016, Kaczmarczyk i in. 2017). Technika ta jest więc zalecana w rozrodzie ryb prowadzonym jako część programów ochrony gatunkowej jak i w produkcji towarowej w warunkach akwakultury.

Podsumowanie

Bazy profili genetycznych w połączeniu z technikami bioinformatycznymi są uniwersalnym narzędziem współczesnej biologii konserwacyjnej. Ich zastosowanie wymaga współpracy pomiędzy instytucjami naukowymi i ośrodkami zarybieniowymi. Wynikiem tak prowadzonej współpracy jest możliwość oceny efektów prowadzonych prac ochron-

nych i restytucyjnych gatunków ryb zależnych od człowieka, jaki i pozostałych prac mających na celu zachowanie zmienności genetycznej ryb rozradzanych w warunkach akwakultury. Użyteczność tej metody rozszerzona o możliwość identyfikacji pochodzenia ryb oraz hybryd międzygatunkowych sprawia, że budowa, aktualizacja i zastosowanie baz profili genetycznych jest istotna w osiągnięciu celów programów ochrony ryb łososiowatych, jesiotrów oraz innych gatunków zagrożonych wyginięciem.

Podziękowania

Powstanie pracy wsparła Agencja Restrukturyzacji i Modernizacji Rolnictwa w ramach projektu: Zarybienia oparte na wiedzy – opracowanie procedur zarybieniowych w oparciu o badania molekularne poprzez utworzenie zaplecza laboratoryjnego, prowadzenie analiz molekularnych na potrzeby budowy baz genetycznych populacji troci wędrownych łososi, ocena obecności migrantów i badanie efektywności zarybień na podstawie analizy rodzinowej, nr projektu 00003-6521.1-OR1400001/20/21.

Literatura

- Brown C., Day R. 2002 – The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology – *Fish and Fisheries* 3: 79-94.
- Cermakova E., Lencova S., Mukherjee S., Horka P., Vobruba S., Demnerova K., Zdenkova K. 2023 – Identification of Fish Species and Targeted Genetic Modifications Based on DNA Analysis: State of the Art – *Foods* 12, no. 1: 228.
- Charlesworth D., Willis J.H. 2009 – The genetics of inbreeding depression – *Nature Reviews Genetic* 10: 783-796.
- Chapman J.R., Nakagawa S., Coltman D.W., Slaters J., Sheldon B.C. 2009 – A quantitative review of heterozygosity-fitness correlations in animal populations – *Molecular Ecology* 18: 2746-2765.
- Dieringer D., Schlötterer C. 2003 – Microsatellite analyzer (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets – *Molecular Ecology Notes* 3: 167-169.
- Duponchelle F., Isaac V.J., Rodrigues Da Costa D.C., Van Damme P. A., Herrera R-G.A., Anderson E.P., Cruz R.E.A., Hauser M., Hermann T. W., Agudelo E., Bonilla-Castillo C., Barthem R., Freitas C. E.C., García-Dávila C., García-Vasquez A., Renno J-F., Castello L. 2021 – Conservation of migratory fishes in the Amazon basin – *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 5: 1087-1105.
- Excoffier L., Lischer, H.E. 2010 – Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows – *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2003 – Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies – *Genetics* 164: 1567-1587.
- Falush D., Stephen M., Pritchard J.K. 2007 – Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles – *Molecular Ecology Resources* 7: 574-578.
- Fopp D. 2003 – Zastosowanie analizy mikrosatelitarnego DNA do genetycznej identyfikacji ryb jesiotrowatych – Praca doktorska, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Ochrony Środowiska i Rybactwa, Olsztyn, 84 str.

- Gao Z., Waggoner D., Stephen, M., Ober C., Przeworski M. 2015 – An estimate of the average number of recessive lethal mutations carried by humans – *Genetics* 199: 1243-1254.
- Gessner J. 2000 – Reasons for decline of *Acipenser sturio* L., 1758 in central Europe, and attempts of its restoration – *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 16: 117-126.
- Gilbey J., Coughlan J., Wennevik V., Prodöhl P., Stevens J.R., De Leaniz G., Ensing D., Cauwelier E., Cherbonnel C., Consuegra S., Coulson M.W., Cross T.F., Crozier W., Dillane E., Ellis J.S., García-Vázquez E., Griffiths A.M., Gudjonsson S., Hindar K., Karlsson S., Knox D., Machado-Schiaffino G., Meldrup D., Nielsen E.E., Ólafsson K., Primmer C.R., Prusov S., Stradmeyer L., Vähä J-P., Je Veselov A., Webster L.M., McGinnity P., Verspoor E. 2018 – A microsatellite baseline for genetic stock identification of European Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – *ICES Journal of Marine Science* 75(2): 662–674.
- Hansen M.M., Nielsen E.E., Ruzzante D.E., Bouza C., Mensberg K. 2000 – Genetic monitoring of supportive breeding in Brown trout (*Salmo trutta* L.), Using microsatellite DNA markers – *Can. J. Fish. Aqua. Sci.* 57: 2130-2139.
- Hardy O.J., Vekemans X. 2002 – SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels – *Mol. Ecol. Note.*, 2: 618–620.
- Hogg C.J., Ottewell K., Latch P., Rossetto M., Biggs J., Gilbert A., Richmond S., Belov K. 2022 – Threatened Species Initiative: Empowering conservation action using genomic resources – *Proceedings of National Academy of Science US A.* 25;119(4): e2115643118.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. 2009 – Inferring weak population structure with the assistance of sample group information – *Molecular Ecology Resources* 9: 1322-1332.
- ICES WGBAST. 2017 – Report of the Baltic Salmon and Trout, Assessment Working Group. 27 March–4 April 2017. Gdansk, Poland.
- Jones A.G., Small C.M., Paczolt K.A., Ratterman N.L. 2010 – A practical guide to methods of parentage analysis – *Molecular Ecology Resources* 10: 6-30.
- Jones O., Wang J. 2009 – COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data – *Molecular Ecology Resources*, 10: 551–555.
- Kaczmarczyk D. 2015 – Genassemblage software, a tool for management of genetic diversity in human dependent population – *Conservation Genetics Resources* 7: 49-51.
- Kaczmarczyk D. 2016 – Selection of optimal set of spawner-pairs American paddlefish (*Polyodon spathula*) based on the polymorphism of microsatellite loci – *Archives of Polish Fisheries* 24: 77-84.
- Kaczmarczyk D., Dobosz S., Kaczor A. 2017 – Prediction of Genetic Variation in Stocks of Offspring and Its Correlation with Viability and Growth Rate – *Journal of the World Aquaculture Society* 1: 1-8.
- Kaczmarczyk D., Fopp-Bayat D. 2012 – Assemblage of spawning pairs based on their individual genetic profiles – as tool for maintaining genetic variation within sturgeon populations – *Aquaculture Research*: 1-6
- Kaczmarczyk D., Luczynski M., Brzuzan P. 2012 – Genetic variation of three paddlefish (*Polyodon spathula*) stocks based on microsatellite DNA – *Czech Journal of Animal Science* 8: 345-352.
- Kaczmarczyk D., Wolnicki J. 2016 – Genetic diversity of the endangered cyprinid fish lake minnow *Eupallasella percnurus* in Poland and its implications for conservation – *PLoS One* 12: 1-16.
- Kaczmarczyk D., Wolnicki, J. 2020 – Genassemblage 2.0 software facilitates conservation of genetic variation of captive propagated species – *Scientific Reports* 10, 17871.
- Kim J.E., Withler R.E., Ritland C., Cheng K.M. 2004 – Genetic variation within and between domesticated chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, strains and their progenitor populations – *Developments in Environmental Biology of Fishes* 23: 371-378.
- Kirshbaum F., Gessner J. 2000 – Re-establishment programme for *Acipenser sturio* L., 1758: The German approach – *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 16: 149-156.

- Koljonen M-L., Tähtinen J., Säisä M., Koskiniemi J. 2002 – Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programs and the geographic distribution of microsatellite variation – *Aquaculture* 212: 69-92.
- Long A., Qing Y., Gu T., Zhu Q., Liu Y., Wang Y., Yin H., Shu G., Zhang Y., Lai S., Zhao X. 2017 – Genetic variation of nine chicken breeds collected from different altitudes revealed by microsatellites – *Journal of Poultry Science* 54: 18-25.
- Martínez P., Fernández J. 2008 – Estimating parentage relationships using molecular markers in aquaculture – W: S.H. Schwartz, (ed.) *Aquaculture research trends*, pp. 59–112. New York, USA, Nova Science Publishers, Inc.
- Nielsen J.F., English S., Goodall-Copestake W.P., Wang J., Walling C.A., Bateman A.W., Flower T.P., Sutcliffe R.L., Samson J., Thavarajah N.K., Kruuk L.E.B., Clutton-Brock T.H., Pemberton J.M. 2012 – Inbreeding and inbreeding depression of early life traits in a cooperative mammal – *Molecular Ecology* 21: 2788-2804.
- Nilsson J., Östergren J., Lundqvist H., Carlsson U. 2008 – Genetic assessment of Atlantic salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta* stocking in a Baltic Sea river – *Journal of Fish Biology* 73: 1201-1215.
- Popović D., Panagiotopoulou H., Baca M., Stefaniak K., Mackiewicz P., Makowiecki D., King T.L., Gruchota J., Weglenski P., Stankovic A. 2014 – The history of sturgeon in the Baltic Sea – *Journal of biogeography* 41: 1590-1602
- Rosimeire R.A., Agostinho A.A., Pelicice F.M., Bailly D., Kioshi E., João O., Dias H.P. 2007 – Blockage of migration routes by dam construction: Can migratory fish find alternative routes? *Neotropical Ichthyology* – *Neotropical Ichthyology* 5: 10.1590/S1679-62252007000200012.
- Rousset F. 2001 – Inferences from spatial population genetics – W: *Handbook of Statistical Genetics* (red. Balding D., Bishop M., Cannings C.), John Wiley, Chichester, UK: 239–269.
- Schmidt C., Hoban S., Hunter M., Paz-Vinas I., Garraway C.J. 2023 – Genetic diversity and IUCN Red List status – *Conservation Biology*, 00, e14064.
- Taniguchi N. 2008 – Broodstock Management for Stock Enhancement Programs of Marine Fish with Assistance of DNA Marker (A Review) – W (red.) Leber K.M., Kitada S., Blankenship H.L., Svísand T. *Stock Enhancement and Sea Ranching: Developments, Pitfalls and Opportunities*, second edition (327-338) Wiley-Blackwell Publishing, USA.
- Thorstad E.B., Rikardsen A.H., Alp A., Økland F. 2013 – The Use of Electronic Tags in Fish Research – An Overview of Fish Telemetry Methods – *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 13: 881-896.
- Vitt L.J., Caldwell J.P. 2013 – *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles* (Fourth Edition) – Academic Press. UK. 757pp.
- Wąs A., Wenne R. 2002 – Genetic differentiation between hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci – *Aquaculture* 204: 493-506.
- Wąs-Barcz A., Bernaś R. 2023 – Parentage-based tagging and parentage analyses of stocked sea trout in Vistula River commercial catches – *Journal of Applied Genetics* 64: 341–350.
- Wohl E., Lane S.N., Wilcox A.C. 2015 – The science and practice of river restoration – *Water Resources Research* 51: 5974–5997.
- Zemanová B., Hájková P., Hájek B., Martínková N., Mikulíček P., Zima J., Bryja J. 2015 – Extremely low genetic variation in endangered Tatra chamois and evidence for hybridization with an introduced alpine population – *Conservation Genetics* 16: 729-741.

Technologia podchowu larw i narybku ryb jesiotrowatych w systemie RAS

Iwona Piotrowska

Zakład Hodowli Ryb Jesiotrowatych w Pieczarkach, Instytut Rybactwa Śródlądowego –
Państwowy Instytut Badawczy w Olsztynie

Wstęp

Ryby jesiotrowate należą do jednej z najstarszych rodzin ryb na świecie (Hung 2017, Kolman 2014). Silny wpływ antropogeniczny na środowisko naturalne oraz wysokie połowy spowodowały, że 85% naturalnych populacji ryb jesiotrowatych zagrożona jest wyginięciem (IUCN 2023). Wszystkie gatunki ryb jesiotrowatych są objęte ścisłą ochroną i w większości przypadków zakazem połowów (regulacje CITES). Między innymi dlatego jedynym legalnym źródłem pozyskiwania kawioru i mięsa pochodzącym od tych ryb jest akwakultura (Bronzi i in. 2019). Obecnie istniejące populacje mają niewielkie szanse na przetrwanie bez prowadzenia hodowli i zrównoważonych programów hodowlanych w warunkach kontrolowanych. Dlatego dynamicznie rozwijający się sektor akwakultury na świecie może wspomagać działania związane z czynną ochroną zagrożonych i ginących gatunków ryb (Naylor i in. 2021). Globalna produkcja jesiotrów na świecie wynosi 102327 ton (Bronzi i in. 2019), natomiast w Polsce 1000 ton (Lirski i Myszkowski 2021). Podstawowym gatunkiem hodowanym w Polsce jest jesiotr syberyjski *Acipenser baerii* (Brandt). Natomiast mniejsze znaczenie mają jesiotr rosyjski *Acipenser gueldenstaedtii* (Brandt i Ratzeburg), sterlet *Acipenser ruthenus* (L.) oraz jesiotr ostronosy *Acipenser oxyrinchus* (Mitchill), podchowwany w celu restytucji. W wyniku dużego zainteresowania hodowców tymi gatunkami intensywnie prowadzone są prace mające na celu zoptymalizowanie chowu i hodowli tych ryb na różnych etapach ich rozwoju w systemach recyrkulacyjnych (RAS). Jednym z najtrudniejszych etapów chowu ryb jesiotrowatych jest okres larwalny, w trakcie którego u części gatunków odnotowuje się wysokie straty (Mohler i in. 2000, Gisbert i in. 2018). Wśród potencjalnych przyczyn tego zjawiska

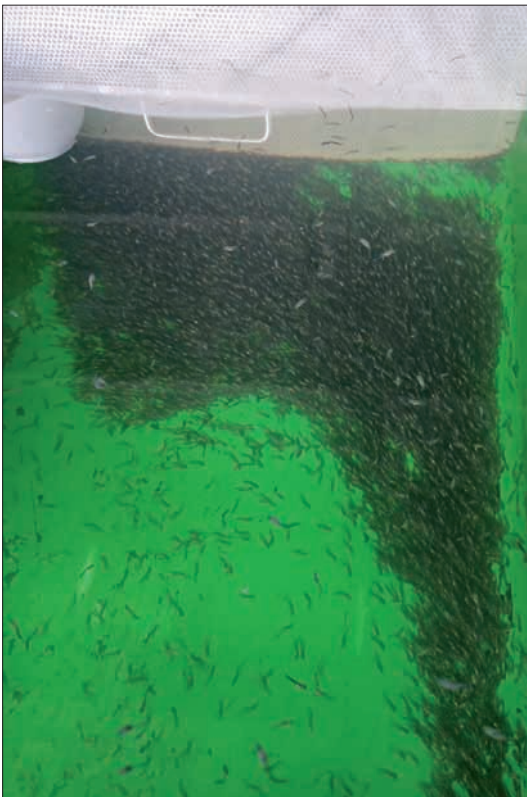
wymienia się stosowanie nieodpowiednich procedur żywienia larw. Problematicznym momentem jest samo rozpoczęcie pobierania pokarmu egzogenego, którym najczęściej jest pokarm żywy, a następnie stopniowe przejście na paszę komponowaną (Gisbert i in. 2018, Kolman i Kapusta 2018). Optymalizacja technik podchowu, w tym zastosowanie odpowiednich procedur żywienia może znacząco wpłynąć na parametry podchowowe ryb.

W opracowaniu przedstawiono wybrane zagadnienia związane głównie z żywieniem larw i narybku ryb jesiotrowatych hodowanych w systemie recyrkulacyjnym.

Początek żywienia egzogenego

Za jeden z najtrudniejszych etapów podchowu uważa się moment rozpoczęcia pobierania pokarmu przez ryby. Wiedza na temat momentu, w jakim należy wprowadzać pokarm jest istotna, ponieważ umożliwia synchronizację etapów hodowli ze stanem rozwoju larw, maksymalizując ich przeżywalność i wzrost, a także minimalizując zróżnicowanie

wielkości pomiędzy larwami na dalszych etapach podchowu (Gisbert i in. 2018). Moment i sposób wprowadzania pierwszego pokarmu jest specyficzny dla poszczególnych gatunków, ale zazwyczaj hodowcy kierują się zmianami w zachowaniu larw. Początek pobierania pokarmu przypada na rozptywanie się larw z tzw. roje (fot. 1). Larwy stopniowo rozpraszają się na dnie zbiornika, przy czym wykazują typowe zachowania poszukiwawcze. Jednocześnie stopniowo wykorzystywane są zapasy zgromadzone w woreczku żółtkowym. Według Dettlaff i in. (1993) larwy ryb jesiotrowatych odżywiają się endogennie przez okres około 6-9 dni po wykluciu (dpw). Wielkość resorbowanego woreczka może być wykorzystywana jako wskazówka, kiedy należy wprowadzić pierwszy pokarm, co jest powszechnie praktykowane w przypadku innych gatunków ryb (Gisbert i in.



Fot. 1. Larwy jesiotrów gromadzące się w tzw. roje (fot. I. Piotrowska).

2018). Na tym etapie podchowu można zaobserwować także wydalanie korków melaninowych wypełniających spiralną końcówkę przewodu pokarmowego (fot. 2). Zazwyczaj jest to sygnał dla hodowców do rozpoczęcia żywienia larw. Według Dettlaff i in. (1993) pokarm należy wprowadzać gdy 2-3% larw ma wydany korek melaninowy. Wskazówkę tę wykorzystywano również do określenia momentu wprowadzania pokarmu u larw jesiotra ostronosego i jesiotra rosyjskiego (Ostaszewska i in. 2011, Dettlaff i in. 1993). Natomiast według Gisbert i Williot (1997) larwy jesiotra syberyjskiego powinny otrzymać pierwszy pokarm po resorpcji woreczka żółtkowego. W praktyce dokładne określenie momentu wprowadzania pokarmu sprawia jednak trudność, ponieważ okres resorpcji woreczka jak i moment wydalania korka melaninowego u poszczególnych larw jest bardzo zróżnicowany. Duży wpływ na te procesy między innymi ma temperatura wody (tab. 1) oraz wielkość samych larw (Gisbert i in. 2018). Dlatego dobrą praktyką jest wprowadzanie pokarmu w małych dawkach, stymulując larwy do rozpoczęcia pobierania pokarmu, co znacząco zwiększa ich szanse na przeżycie (Chebanov i Galich 2011). Na tym etapie podchowu może dochodzić do wysokich strat, najczęściej spowodowanych różnego rodzaju wadami rozwojowymi larw lub brakiem akceptacji podawanego pokarmu. Gwałtowny wzrost śmiertelności larw ma miejsce zazwyczaj około 10-19 dnia po wyklu-

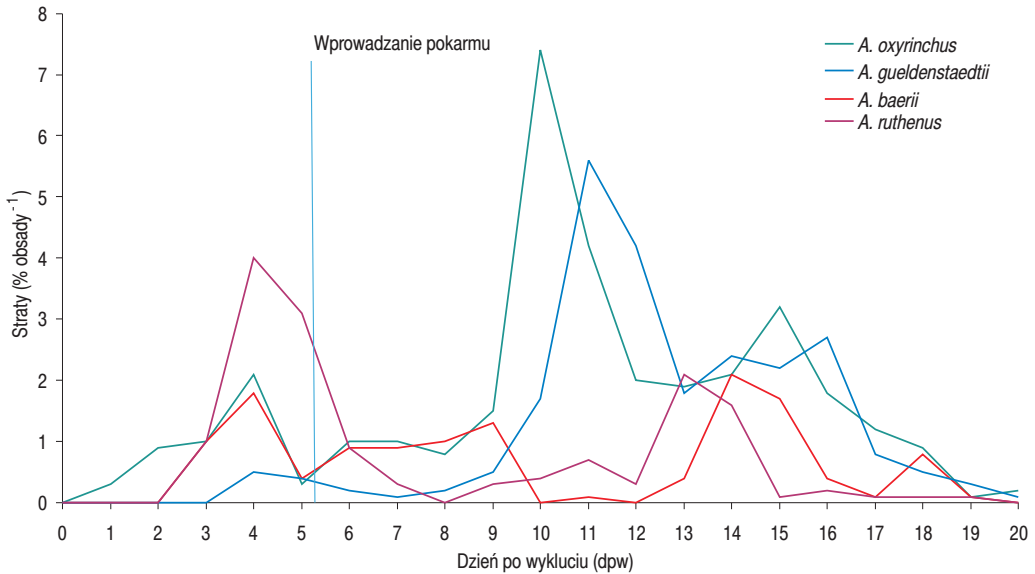


Fot. 2. Larwa jesiotra syberyjskiego w trakcie resorpcji woreczka żółtkowego i z obecnym korkiem melaninowym (fot. M. Szczepkowski).

TABELA 1

Czas resorpcji woreczka żółtkowego i wydalania korka melaninowego u larw czterech gatunków ryb jesiotrowatych

Gatunek	Woreczek żółtkowy (dpw)	Temperatura wody (C°)	źródło	Korek melaninowy (dpw)	Temperatura wody (C°)	źródło
Jesiotr syberyjski <i>Acipenser baerii</i>	8-9	18	Gisbert i in. (2018)	8	18,3	Gisbert i Williot (1997)
Jesiotr rosyjski <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	6	17	Gökçek i in. (2016)	9	20	Kim i in. (2019)
				8	18,6	Dettlaff i in. (1993)
Sterlet <i>Acipenser ruthenus</i>	7	16-17	Laczynska i in. (2020)	7	20,5-22,5	Rónyai i Feledi(2013)
Jesiotr ostronosy <i>Acipenser oxyrinchus</i>	10	21	Hardy i Litvak (2004)	6	22	Szczepkowski i in. (2007)
	25	15		9-10	17-19	Kolman i in. (2008)



Rys. 1. Przebieg strat podczas wstępnego podchowu czterech gatunków ryb jesiotrowatych (Piotrowska i in. 2018, Szczepkowska i in. 2000, Szczepkowska – dane niepublikowane).

ciu (dpw) i ma podobny przebieg u większości gatunków ryb jesiotrowatych (rys. 1) (Gisbert i in. 2018, Kolman i in. 2018).

Żywienie larw pokarmem żywym

Najczęściej wykorzystywanym pokarmem żywym w podchowcie wielu gatunków ryb są naupliusy *Artemia* sp. Wiele badań wykazało, że stosowanie pokarmu naturalnego we wstępnym podchowcie wpływa na lepszy rozwój i przeżywalność larw (Laczynska i in. 2020). Dodatkowo żywy pokarm może być suplementowany preparatami zawierającymi np. wielonienasycone kwasy tłuszczowe. Przeprowadzone badania wykazały, że karmienie larw jesiotra rosyjskiego, jesiotra ostronosego i sterleta pokarmem wzbogaconym stymulowało ich wzrost i przeżywalność (Kolman i in. 2018, Kamaszewski i in. 2014, Lundova i in. 2018). Do podchowtu larw jesiotra rosyjskiego i sterleta wykorzystywany jest również *Tubifex* sp. i *Chironomus* sp., ale stosowanie ich wiąże się z koniecznością rozdrabniania (Gökçek i in. 2016, Memiş i in. 2009, Rónyai i Feledi 2013). W początkowym okresie podchowtu dobrą praktyką jest obniżenie poziomu wody w zbiorniku. W ten sposób larwy mają łatwiejszy dostęp do podawanej żywności (Chebanov i Galich 2011), jak również unikamy nadmiernego wypłukiwania naupliusów *Artemia* sp. ze zbiornika.

Zazwyczaj pokarm naturalny podajemy ręcznie przy ściankach zbiornika (fot. 3). Można również zastosować karmniki automatyczne przeznaczone do pokarmu płynnego (Szczepkowska i Szczepkowski 2018). Innym rozwiązaniem może być chwilowe wyłączenie przepływu wody przez basen na czas karmienia. Według Prusińskiej i in. (2011) i Kolmana i in. (2014) karmienie w systemie ciągłym w małych dawkach larw jesiota ostronosego i rosyjskiego istotnie wpłynęło na ich wzrost i przeżywalność. W praktyce całodobowe ręczne karmienie żywym pokarmem jest uciążliwe, dlatego podaje się go od 2 do 7 razy na dobę (Piotrowska i in. 2018, Memiś i in. 2009, Lundova i in. 2018). Określenie odpowiedniej dawki pokarmu żywego jest również bardzo ważne, ponieważ mała ilość pokarmu może skutkować słabymi przyrostami, kaniibalizmem a w skrajnych przypadkach ścięciami. Natomiast nadmierne karmienie ryb prowadzi do obniżenia jakości wody oraz do śnięć wywołanych przez infekcje bakteryjne lub przejedzenie (Gisbert i in. 2018, Piotrowska i in. 2018). Również aspekt ekonomiczny jest istotny, ponieważ koszt naupliusów jest około 10-krotnie wyższy niż paszy komponowanej (Rożyński i Zakęś 2017). W interesie hodowców jest więc jak najkrótsze stosowanie pokarmu żywego. Zazwyczaj larwy ryb jesiotrowatych karmione są *ad libitum*, ale stosowane są również dawki: 9, 50, a nawet 100% biomasy ryb na dobę (Kolman i in. 2018, Laczynska i in. 2017, Lundova i in. 2018).



Fot. 3. Karmienie ręczne *Artemia* sp. larw jesiota ostronosego (fot. I. Piotrowska).

Przy podchowcie ryb jesiotrowatych można zastosować kilka różnych strategii wprowadzania pokarmów. Zazwyczaj przy podchowcie jesiota ostronosego i rosyjskiego na początku wykorzystywany jest wyłącznie pokarm żywy, który powinien być stosowany przez okres odpowiednio 5-11 i 4-12 dni (Nathanailides i in. 2002, Memiś i in. 2009, Piotrowska i in. 2018, Szczepkowski i in. 2010). Po tym czasie, stopniowo wprowadzana jest pasza komponowana (tab. 2). Okres karmienia mieszanego szczególnie u larw jesiota ostronosego jest bardzo istotny. Według badań Piotrowskiej i in. (2018) larwy, które otrzymywały pokarm mieszany dłużej (15-20 dni) miały czas do przyzwyczajenia się do

TABELA 2

Terminy wprowadzania pokarmu żywego i paszy komponowanej dla czterech gatunków jesiotrów

Gatunek	Temperatura wody (°C)	Termin rozpoczęcia podania pokarmu (dpw)		Karmienie mieszane (dni)	Źródło
		pokarm żywy	pasza komponowana		
Jesiotr syberyjski <i>Acipenser baerii</i>	16-17	np.	5	np.	Gisbert i in. (2018)
	18	np.	9	np.	Gisbert i in. (1997)
	19	6	6	7	Król i in. (2015)
Jesiotr rosyjski <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	19	7-10	11-14	3	Nathanailides i in. (2002)
	17-18	8	17	15	Mamis i in. (2009)
	18	7-9	19-21	8	Prusińska i in. (2011)
Sterlet <i>Acipenser ruthenus</i>	17-19	5	5	7	Rybnikár i in. (2011)
	21,5	np.	9	np.	Napora-Rutkowski i in. (2009)
	18	7	7	np.	Laczynska i in. (2017)
	18	7	15	8	Laczynska i in. (2020)
	19	8	14-21	7-14	Lundova i in. (2018)
Jesiotr ostronosy <i>Acipenser oxyrinchus</i>	17	9	20	20	Piotrowska i in. (2018)
	20	10	15	22	Szczepkowski i in. (2010)

np. – nie podawano pokarmu żywego

nowego pokarmu, co wpłynęło na wyższe przyrosty masy ciała. Natomiast przy podchowcie larw jesiota syberyjskiego i sterleta można stosować strategię polegającą na podawaniu od samego początku pokarmu mieszane, stopniowo zmniejszając udział pokarmu żywego, a zwiększając paszy komponowanej (Rybnikár i in. 2011, Król i in. 2015). W przypadku obu wyżej wymienionych gatunków pokarm naturalny można stosować przez 7 dni podchowu (Król i in. 2015, Lundova i in. 2018). Kolejna strategia zakłada stosowanie tylko paszy komponowanej i również może być wykorzystywana przy hodowli larw jesiota syberyjskiego (najmniej wymagającego) i sterleta (Kolman i Kapusta 2018, Napora-Rutkowski in. 2009). W przypadku podchowu ryb przeznaczonych na zarybienie można zastosować wyłącznie pokarm żywy np. *Artemia* sp., a następnie *Chironomus* sp. (fot. 4) (Fazekas i in. 2022). W większości proponowanych strategii żywieniowych należy zastosować stopniowe przechodzenie z jednego pokarmu na drugi. Według Chebanov i Galich (2011), takie przejście może trwać do 14 dni. Dłuższe stosowanie pokarmu naturalnego wiąże się z większymi kosztami, dlatego podchowów jesiota ostronosego i rosyjskiego jest droższy niż podchów pozostałych gatunków.

Początkowa dawka paszy komponowanej podczas karmienia mieszane powinna wynosić 10-25% biomasy ryb (jesiotr rosyjski, jesiota ostronosy, sterlet) (Napora-Rutkowski in. 2009, Paschos i in. 2008, Piotrowska i in. 2018, Ak 2023). Przy podchowcie jesiota syberyjskiego początkowa dawka paszy również jest wysoka 20-25% biomasy



Fot. 4. Karmienie narybku jesiota ostronosego mrożoną ochotką (fot. I. Piotrowska).

ryb. Pasza podawana jest całodobowo w nadmiarze w celu zwiększenia dostępności dla wszystkich ryb i zmniejszenia agresywnych zachowań. Wiąże się to z koniecznością codziennego usuwania resztek nie zjedzonej paszy, odchodów oraz martwych osobników. Po rozpoczęciu żerowania, należy stopniowo zmniejszać dawkę paszy, która jest aktualizowana codziennie (Kolman 2010). Przy optymalnych temperaturach wody i żywienia pokarmem mieszanym dobowe przyrosty masy ciała u jesiota ostronosego mogą wynieść $7-8\% d^{-1}$, u sterleta $7-18\% d^{-1}$, a u jesiota rosyjskiego $9-12\% d^{-1}$ (Mamiś i in. 2009, Szczepkowski i in. 2010, Dediu i in. 2011, Rónyai i Feledi 2013, Piotrowska i in. 2018, Laczynska i in. 2020). Natomiast u jesiota syberyjskiego mogą przekraczać $20\% d^{-1}$ (Szczepkowski i in. 2021).

Żywienie larw i narybku paszą komponowaną

W trakcie podchowu larw i narybku ryb jesiotrowatych istotne jest zastosowanie pasz komponowanych o odpowiednim składzie i rozmiarze granuli. Również bardzo duże znaczenie mają cechy sensoryczne pasz, tj. smak i zapach, ponieważ są to najważniejsze zmysły, którymi ryby posługują się przy poszukiwaniu i pobieraniu pokarmu (Kasymyan 2018). Larwy jesiotrów są stosunkowo mało aktywne, dlatego sposób podania paszy ma bardzo duże znaczenie. Jesiotry pobierają paszę z dna, a podawane początko-



Fot. 5. Karmnik typu KDRH-P do dozowania karmy o strukturze pylistej (fot. I. Piotrowska).

wo drobne frakcje długo unoszą się na powierzchni wody. Dlatego najlepsze efekty w początkowym okresie karmienia ryb uzyskuje się podając paszę ręcznie przy ściankach basenów, 1-2 razy na godzinę. Na późniejszym etapie podchowu można zastosować karmniki automatyczne (fot. 5). Dodatkowo przy intensywnym przyroście ryb należy kontrolować wielkość obsady. Zbyt wysokie zagęszczenie jest czynnikiem stresotwórczym i wpływa negatywnie na przyrosty i przeżywalność ryb (Mohler i in. 2000, Aidos i in. 2019, Fazekas i in. 2022). Optymalna początkowa obsada larw przy intensywnym chowie powinna wynosić: 5000-6000 larw m^{-2} (jesiotr syberyjski i jesiotr rosyjski), 3000-4000 larw m^{-2} (sterlet), 1000-2000 larw m^{-2} (jesiotr ostronosy) (Szczepkowski i in. 2015, Chebanov i Galich 2011). Przy intensywnym podchowu ryb jesiotrowatych w systemie recyrkulacyjnym, należy stale kontrolować parametry jakości wody. Zawartość tlenu rozpuszczonego nie powinna spadać poniżej 60% nasycenia, chociaż tolerowane są krótkotrwałe spadki do około

30-40% nasycenia. Również należy mieć na uwadze fakt, że jesiotry są bardzo wrażliwe na wzrost koncentracji azotu amonowego i azotynów. Wyższa zawartość powoduje zwiększenie wrażliwości narybku na inne czynniki, w tym choroby bakteryjne (Szczepkowski i in. 2011, Szczepkowski 2018).

Obecnie na rynku dostępne są pasze komponowane dedykowane dla larw i narybku ryb jesiotrowatych. Według Kolmana i Kapusty (2018) zawartość podstawowych składników pokarmowych powinna mieścić się w zakresie 48-56% białka, 16% tłuszczu, 7-12% popiołu. Większość larw ryb jesiotrowatych jest stosunkowo duża i może rozpocząć żywienie paszą o granulacji 0,2-0,4 mm. Natomiast do podchowu larw jesiotra ostronosego wykorzystywana jest pasza o granulacji 0,1-0,3 mm. Ryby o wadze 0,2-0,5 g mogą być karmione paszą o granulacji 0,4-0,6 mm, a przy wadze 1g o rozmiarze 0,6-0,8 mm. Natomiast osobnikom o średniej masie 2 g można podawać pasze o rozmiarze granuli w zakresie: 1,0-2,0 mm (Kolman i Kapusta 2018). Zmiana granulacji pasz w trakcie podchowu nie

powinna być gwałtowna i może zajmować do kilku dni. Dobowa dawka paszy dla ryb o wadze 1 g powinna wynosić 14-15% biomasy ryb, natomiast dla ryb o masie ciała 15 g powinna wynosić 5% (Kolman i in. 2008). Dla ryb o masie powyżej 28 g odpowiednią dawką jest 3-4% biomasy (Jodun i in. 2004, Mihoc i in. 2021). Dobbowe przyrosty masy ciała wraz ze wzrostem ryb maleją u ryb 5 g wynoszą 4,3-5,0% d^{-1} (Mamiś i in. 2009, Ak 2023). Natomiast u kilkunastogramowych jesiotrów dobbowe przyrosty masy ciała wynoszą około 2,3-3,8 % d^{-1} (Kozłowski i in. 2017, Mihoc i in. 2021, Ramezani i in. 2021). Na tym etapie podchówu zazwyczaj dochodzi do dużego zróżnicowania wielkości pomiędzy rybami, ponieważ poszczególne osobniki w różnym tempie rozpoczynają pobieranie paszy komponowanej. Duże zróżnicowanie wielkości wpływa negatywnie na podchów ryb i może prowadzić do agresywnych zachowań większych osobników, co w konsekwencji może skutkować śnięciem słabszych ryb. Dlatego konieczne jest systematyczne odławianie wolniej rosnących osobników, których charakterystyczną cechą zachowania jest pływanie w toni wody. Takie ryby umieszczone w oddzielnym basenie i odpowiednio żywione mogą prawidłowo przyrastać. Według Kolmana i Kapusty (2018) częstotliwość sortowania młodocianych jesiotrów zanim osiągną masę około 50 g powinna być wyższa. Sortowanie ryb na poszczególnych etapach podchówu jest różne. W okresie larwalnym ryby są zasypane podczas czyszczenia basenu, najczęściej są to mniejsze i słabsze osobniki. Na póź-



Fot. 6a. Sortowanie larw i narybku jesiotrów sortownicami ręcznymi (fot. I. Piotrowska).



Fot. 6b. Sortowanie larw i narybku jesiotrów sortownicami ręcznymi (fot. I. Piotrowska).

niejszym etapie do sortowania można wykorzystać sortownice ręczne przeznaczone do sortowania ryb o różnej wielkości (fot. 6a i 6b). Natomiast sortowanie narybku przy użyciu sortownic mechanicznych jest bardzo utrudnione ze względu na specyficzną budowę ciała. Skutkiem takich zabiegów mogą być zakażenia bakteryjne, będące najprawdopodobniej wynikiem urazów mechanicznych w wyniku wzajemnego ocierania się ryb ostrymi płytkami kostnymi. Podchów jesiotrów w systemach RAS prowadzony jest najczęściej do osiągnięcia przez ryby masy ciała 5-20 g, a dalszy podchów odbywa się w stawach betonowych lub ziemnych.

Podsumowanie

Podsumowując, wiele aspektów technologii podchowu ryb jesiotrowatych jest już opracowanych, jednak dynamiczny rozwój akwakultury powoduje konieczność prowadzenia dalszych badań. Badania te powinny być ukierunkowane między innymi na opracowanie nowych lub optymalizacji już istniejących strategii żywienia ryb. Należy zwrócić szczególną uwagę na żywienie larw i narybku. Maksymalizacja ich wzrostu i przeżywalności ma znaczący wpływ na opłacalność ekonomiczną całego cyklu hodowlanego.

Opracowanie zrealizowano w ramach zadania statutowego S-007 Instytutu Rybactwa Śródlądowego – Państwowego Instytutu Badawczego w Olsztynie.

Literatura

- Aidos L., Vasconi M., Abbate F., Valente L.M.P., Lanfranchi M., Di Giancamillo 2019 – Effects of stocking density on reared Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) larval growth, muscle development and fatty acids composition in a recirculating aquaculture system – *Aquacult. Res.* 50: 588-598.
- Ak K. 2023 – Effects of size grading on growth performance, survival rate and cannibalism in russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) larvae under small-scale hatchery conditions – *AquatSci Eng.* 38: 47-52.
- Bronzi P., Chebanov M., Michaels J.T., Wei Q., Rosenthal H., Gessner J. 2019 – Sturgeon meat and caviar production: Global update 2017 – *J. Appl. Ichthyol.* 35: 257-266.
- Chebanov M.S. Galich E.V. 2011 – Sturgeon hatchery manual – FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 558. Ankara, FAO. 303 p.
- Dediu L., Maereanu M., Cristea V., Maereanu D. 2011 – Effects of formulated diet versus live food on growth and survival of Russian sturgeon (*Aipenser gueldenstaedti*) larvae starting exogenous feeding – *Bulletin UASVM Animal Socience and Biotechnologis* 68:130-136.
- Dettlaff T.A., Ginsburg A.S., Schmalhausen O.I. 1993 – Sturgeon fishes. Developmental biology and aquaculture – Berlin, Springer-Verlag. 300 p.
- Fazekas G., Káldy J., Kovács G., Müller T., Ljubobratović U. 2022 – The effect of stocking density on starlet *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758) larvae in the recirculating aquaculture system – *J. Appl. Ichthyol.* 38: 479-486.
- Gisbert E., Solovyev M., Bonpunt E., Mauduit Ch. 2018 – Weaning in Siberian sturgeon larvae – In: *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 – Farming.* (Eds.) Williot P. et al. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature: 59-72.
- Gisbert E., Williot P. 1997 – Larval behavior and effect of the timing of initial feeding on growth and survival of Siberian Sturgeon (*Acipenser baeri*) larvae under small scale hatchery production – *Aquaculture* 156: 63-76.
- Gökçek K., Szabó T., Alptekin C., Kurt R., Töre Y., Urbányi B. 2016 – A preliminary study on protease activity of Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii* Brandt and ratzenburg, 1833, at early life stages – *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 16: 1025-1029.
- Hardy R.S., Litvak M.K. 2004 – Effects of temperature on the early development, growth, and survival of shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum*, and Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, yolk-sac larvae – *Environ. Biol. Fish*70:145-154.
- Hung S.S.O. 2017 – Recent advances in sturgeon nutrition – *Animal Nutrition* 3: 191-204.
- Jodun W.A. 2004 – Growth and feed conversion of sub-yearling Atlantic Sturgeon, *Acipenser oxyrinchus*, at three feeding rates – *J. Appl. Aquacult.* 15: 141-150.
- IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN Red List of Threatened Species – Available online: www.iucnredlist.org (accessed on 06.03.2023).
- Kamaszewski M., Wójcik M., Ostaszewska T., Kasprzak R., Kolman R., Prusińska M. 2014 – The effect of essential fatty acid (EFA) enrichment of *Artemia* sp. nauplii on the enzymatic activity of Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill, 1815) larvae – preliminary study – *J. Appl. Ichthyol.* 30: 1256-1258.

- Kasumyan A. 2018 – Olfaction and Gustation in *Acipenseridae*, with Special References to the Siberian Sturgeon – In: The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 1 – Biology. (Eds.) Williot P. et al. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature: 173-206.
- Kim E.J., Park Ch., Nam Y. K. 2019 – Ontogenetic behavior of farm-bred Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedtii*) prelarvae in a diel photoperiodic cycle: behavioral modifications in response to light intensity – Fish. Aquatic. Sci. 22: 4.
- Kolman R. 2010 – Jesiotry. Chów i hodowla. Podręcznik hodowcy – Wyd. IRS, Olztyn: 134 s.
- Kolman R., Kapusta A., Szczepkowski M., Bogacka-Kapusta E. 2014 – Jesiotr ostronosy- bałtycki (*Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitchell). Program restytucji bałtyckiej populacji jesiotra ostronoszego – Wyd. IRS, Olsztyn: 5-94.
- Kolman R., Khudiy O., Kushniryk O., Khuda L., Prusińska M., Wiszniewski G. 2018 – Influence of temperature and Artemia enriched with x-3 PUFAs on the early ontogenesis of Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus* Mitchell, 1815 – Aquacult. Res. 49: 1740-1751.
- Kolman R. Kapusta A. 2018 – Food characteristics and feeding management on sturgeon with a special focus on the Siberian sturgeon – In: The Siberian Sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt, 1869) Volume 2 – Farming. (Eds.) Williot P. et al. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature: 75-84.
- Król J., Wittbrodt M., Wysocki D., Zieliński E., Łakomiak Sz., Hliwa P. 2015 – Zastosowanie paszy Aller ArtEX 2 we wczesnym etapie podchowu wybranych gatunków ryb – W: Podchowu organizmów wodnych – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy (Red.) Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A. Wyd. IRS, Olsztyn: 97-113.
- Kozłowski M., Szczepkowski M., Wunderlich K., Piotrowska I., Szczepkowska B. 2017 – Effect of visible implant elastomers on the growth, survival and tag retention in juvenile Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus*) in laboratory conditions – Aquacult. Res. 48: 1849-1855.
- Laczynska B., Siddique M. A. M., Liszewski T., Kucinski M., Fopp-Bayat D. 2017 – Effects of feeding rate on the growth performance of gynogenetic albino sterlet, *Acipenser ruthenus* (Linnaeus, 1758) larvae – J. Appl. Ichtiol. 33: 323-327.
- Laczynska B., Siddique M. A. M., Ziomek E., Shelton W.L., Fopp-Bayat D. 2020 – Early weaning effects on survival, growth, and histopathology of larval starlet *Acipenser ruthenus* – N. Am. J. Aquacult. 82: 181-189.
- Lirski A., Myszkowski L. 2021 – Polska akwakultura w 2020 na podstawie analizy kwestionariuszy RRW-22. Część 1 – Komun. Ryb. 6: 2-9.
- Lundova K., Kouril J., Sampels S., Matousek J., Stejskal V. 2018 – Growth, survival rate and fatty acid composition of sterlet (*Acipenser ruthenus*) larvae fed fatty acid-enriched *Artemia* nauplii – Aquacult. Res. 49: 3309-3318.
- Mamiş D., Ercan E., Çelikkale M.S., Timur M., Zarkua Z. 2009 – Growth and survival rate of Russia Sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) larvae from fertilized eggs to artificial feeding – Turkish J. Fish. Aquat. Sci. 9: 47-52.
- Mihoc N., Mihailov S., Lalescu D., Grozea A. 2021 – Study on the effects of polyculture of the sterlet (*Acipenser ruthenus*) fingerlings and European catfish (*Silurus glanis*) on bioproductive performances of these species in recirculating aquaculture systems – Scientific papers: Animal Science and Biotechnologies 54: 197-203.
- Mohler J.W., Kim King M., Farrell P.R 2000 – Growth and survival of first-feeding and fingerling Atlantic Sturgeon under culture conditions – N. Am. J. Aquacult. 62: 174-183.
- Nathanailides C., Tsoumani M., Papazogloy A., Paschos I. 2002 – Hatching time and post-hatch growth in Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii* – J. Appl. Ichthyol. 18: 651-654.
- Napora-Rutkowski L., Kamaszewski M., Bielawski W., Ostaszewska T., Wegner A. 2009 – Effects of starter diets on pancreatic enzyme activity in juvenile sterlet (*Acipenser ruthenus*) – Isr. J. Aquac. Bamidgeh 61: 143-150.

- Naylor R.L., Hardy R.W., Buschmann A.H., Busz S.R., Cao L., Klinger D.H., Little D.C., Lubchenco J., Shumway S.E., Troell M. 2021 – A 20-year retrospective review of global aquaculture – *Nature* 591: 551–563.
- Ostaszewska T., Kolman R., Kamaszewski M., Wiszniewski G., Adamek D., Duda A. 2011 – Morphological changes in digestive tract of Atlantic sturgeon *Acipenser oxyrinchus* during organogenesis – *Int. Aquat. Res.* 3: 101-105.
- Paschos I, Perdikaris C., Gouva E., Nathanailides C. 2008 – Sturgeons in Greece: a review – *J. Appl. Ichthyol.* 24: 131-137.
- Piotrowska I., Szczepkowska B., Szczepkowski M., Kozłowski M. 2018 – Assessment of the impact of the timing of first feeding with live and formulated feeds on the survival and growth of larvae Atlantic sturgeon (*Acipenser oxyrinchus* Mitchill) in recirculating systems – *Fish. Aquat. Life* 26: 111-120.
- Prusińska M., Chepurkina M., Duda A., Wiszniewski G., Kolman R. 2011 – Wstępne wyniki podchowu larw jesiotra rosyjskiego (*Acipenser gueldenstaedtii*) karmionych żywym, wzbogaconym pokarmem – W: Nowe gatunki w akwakulturze – rozród, podchów, profilaktyka (Red) Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Kowalska A. Wyd. IRS, Olsztyn: 45-52.
- Ramezani F., Shekarabi S. P. H., Mehrgan M. S., Foroudi F., Islami H. R. 2021 – Supplementation of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) diet with barberry (*Berberis vulgaris*) fruit extract: Growth performance, hemato-biochemical parameters, digestive enzyme activity, and growth-related gene expression – *Aquaculture* 540: 736750.
- Rożyński M., Zakęś Z. 2017 – Efekty stosowania różnych procedur żywienia larw sandacza (*Sander lucioperca*) w warunkach kontrolowanych – W: Wylęgarnictwo i dywersyfikacja produkcji akwakultury (Red.) Zakęś Z., Demska- Zakęś K. Wyd. IRS, Olsztyn: 65-105.
- Rónyai A. Feledi T. 2013 – Co-feeding as a weaning procedure in starlet (*Acipenser ruthenus* L.) larvae – *Aquacult. Res.* 44: 1-3.
- Rybnikár J., Prokeš M., Mareš J., Čileček M. 2011 – Early development and growth of sterlet (*Acipenser ruthenus*) in the Czech Republic – *Acta Univ. Agric. Silv. Mendel. Brun.* 59: 217-226.
- Szczepkowska B., Szczepkowski M. 2018 – Wykorzystanie nowego typu karmnika w podchowalni ryb – W: Wylęgarnictwo i podchow ryb oraz raków (Red.) Zakęś Z., Demska- Zakęś K. Wyd. IRS, Olsztyn: 281-289.
- Szczepkowski M. 2018 – Nitrogen Excretion in Sturgeons with Special Emphasis on the Siberian Sturgeon: Methods and Effect of Food, Feeding and Size of Fish – In: *The Siberian Sturgeon (Acipenser baerii, Brandt, 1869) Volume 2 – Farming.* (Eds.) Williot P. et al. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature: 151-157.
- Szczepkowski M., Kolman R., Szczepkowska B. 2007 – Podchów wylęgu i narybku jesiotra ostronosego *Acipenser oxyrinchus oxyrinchus* Mitch. – wstępne wyniki i obserwacje – W: Restytucja jesiotra bałtyckiego (Red.) R. Kolman. Wyd. IRS, Olsztyn: 27-36.
- Szczepkowski M., Kolman R., Szczepkowska B. 2015 – Impact of feed ration on growth and the results of sterlet, *Acipenser ruthenus* L., artificial reproduction – *Aquacult. Res.* 46: 2147-2152.
- Szczepkowski M., Szczepkowska B., Kolman R., Piotrowska I. 2010 – Zastosowanie solowca (*Artemia salina*) we wstępnym podchowcie larw jesiotra ostronosego (*Acipenser oxyrinchus*) – wyniki i obserwacje larw jesiotra chowu w skali półtechnicznej – W: Rozród, podchów, profilaktyka ryb rzadkich i chronionych oraz innych gatunków. (Red.) Z. Zakęś, K. Demska-Zakęś, A. Kowalska. Wyd. IRS, Olsztyn: 143-149.
- Szczepkowski M., Szczepkowska B., Kreiszeff S., Hopko M. 2021 – Podchów jesiotra syberyjskiego i sterleta w warunkach kontrolowanych – Instrukcja doradcza nr. 5/RD/2021.
- Szczepkowski M., Szczepkowska B., Piotrowska I. 2011 – Impact of higher stocking density of juvenile Atlantic sturgeon, *Acipenser oxyrinchus* Mitchill, on fish growth, oxygen consumption, and ammonia excretion – *Arch. Pol. Fish.* 19 : 59-67.

Wskaźniki hematologiczne i biochemiczne w ocenie stanu zdrowotnego ryb

Maciej Rożyński

Zakład Akwakultury, Instytut Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – PIB

Wstęp

Akwakultura jest znaczącym, dynamicznie rozwijającym się segmentem gospodarki rolnej mającej na celu zaspokojenie coraz większego zapotrzebowania żywnościowego stale rosnącej światowej populacji ludzkiej. Jednocześnie obawy budzi stan zasobów naturalnych, których eksploatacja umożliwia prowadzenie intensywnej produkcji akwakultury, np. surowce pozyskiwane do produkcji mączki i oleju rybnego. Obawy budzi również wpływ intensywnej akwakultury na środowisko naturalne oraz na dobrostan ryb. Biorąc te zagadnienia pod uwagę przyszła hodowla/produkcja ryb powinna opierać się na rozwiązaniach przyjaznych zarówno środowisku naturalnemu jak i dobrostanowi, tj. powinna obejmować systemy, które będą mogły monitorować i w szybki sposób reagować na wystąpienie negatywnych czynników podczas podchowu, które w destrukcyjny sposób mogłyby wpływać na zdrowie i kondycję ryb, tj. czynniki chorobotwórcze, źródła stresu itp. (Seibel i in. 2021). W systemach recyrkulacyjnych (RAS), w których produkowana jest większość ryb pochodząca z akwakultury, ryby są narażone na liczne, nieuniknione czynniki (zmiany środowiskowe, zmiany fizykochemiczne wody). Te z kolei, niepodważalnie mogą być dla nich źródłem stresu, który w negatywny sposób mógłby oddziaływać na zdrowie ryb. Z tego względu, podczas podchowu ryby należy chronić przed kontaktem z czynnikami stresogennymi poprzez dobre zarządzanie i praktyki hodowlane oraz szybkie wykrywanie i leczenie chorób. Ocena stanu zdrowia ryb w akwakulturze polega głównie na obserwowaniu zachowań i zewnętrznego wyglądu ryb oraz zaburzeń ich podstawowych funkcji życiowych. W tym celu, głównie obserwuje się zmiany w ubarwieniu ciała, zwiększone tempo oddychania, zmiany w pływaniu i utrzymaniu

naturalnej pozycji ciała, zmniejszone pobieranie paszy, obrażenia ciała oraz zmniejszone tempo wzrostu, stany chorobowe czy wystąpienie upośledzonej zdolności reprodukcyjnej. Zmiany zaobserwowane w tych obszarach mogą być oznaką wystąpienia zjawiska stresu oraz nieprawidłowego dobrostanu podczas podchowu. Ponadto, w większości przypadków występują one dopiero po dłuższym oddziaływaniu stresora lub czynnika pogarszającego stan zdrowia, co negatywnie wpływa na efektywność podchowu. Z tego względu podczas produkcji ryb w RAS wskazane jest systematyczne monitorowanie oznak stresu, kondycji i stanu zdrowia (Esmaeili 2021). Ryby o lepszej kondycji i zdrowiu mają większe szanse na szybsze przyrosty masy ciała, ponieważ zużywają mniej energii na inne cele, np. na procesy odpornościowe czy regeneracyjne (Esmaeili 2021). Podczas kontaktu organizmu z czynnikiem stresogennym znaczna część energii jest przekierowywana na uruchomienie reakcji obronnej organizmu. Najpierw, w wyniku aktywacji współczulnego układu nerwowego do krwi uwalniany jest kortyzol i katecholaminy, m.in. adrenalina, następnie glukoza i ostatecznie mleczan. Zwiększone zapotrzebowanie na energię uruchamia dodatkowo proces glikogenolizy w wątrobie (Davis 2006). Reakcja organizmu na stres może objąć również swoim działaniem zmiany we wskaźnikach hematologicznych (liczba czerwonych krwinek, liczba białych krwinek, liczba hematokrytowa, stężenie hemoglobiny, średnia objętość krwinki czerwonej, średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej i średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej) jak i wskaźnikach biochemicznych krwi (np. kortyzol, glukoza, białko całkowite, albuminy, globuliny, trójglicerydy, cholesterol, itp.). Podczas zaburzeń zdrowotnych i kondycyjnych zmiany w wartościach wskaźników hematologicznych i biochemicznych można zaobserwować znacznie szybciej niż zmiany np. w ubarwieniu, wyglądzie, utrzymaniu prawidłowej pozycji ciała czy pływaniu, podczas których może być już za późno na podjęcie odpowiednich kroków, co może wpływać znacząco na przeżywalność i końcową efektywność produkcji. Parametry hematologiczne i biochemiczne krwi z powodzeniem wykorzystuje się do określenia pierwotnej i wtórnej reakcji na stres. Podczas reakcji stresowej organizmu często obserwuje się również zaburzenia w gospodarce wodno-elektrolitowej (Davis 2006).

Krew pełni w organizmie szereg istotnych funkcji, do najważniejszych z nich należy dostarczanie tlenu i składników odżywczych do komórek (glukoza, aminokwasy, kwasy tłuszczowe), usuwanie produktów przemiany materii (dwutlenek węgla, mocznik, kwas mlekowy), funkcje immunologiczne, tworzenie skrzepów i utrzymanie homeostazy. Dodatkowo krew odgrywa ważną rolę w transporcie hormonów, minerałów, składników odpornościowych, mikroorganizmów, wody, gazów, a nawet toksyn (Ciesla 2007). Tak szeroki zakres funkcji krwi sprawia, że pomiar wartości poszczególnych jej parametrów może odzwierciedlać wiarygodny obraz stanu zdrowia organizmu oraz innych procesów ustroju, np. metabolizmu. Wskaźniki hematologiczne i biochemiczne krwi (fot. 1) mogą



Fot. 1 Pobieranie krwi z żyły ogonowej u sandacza za pomocą heparynizowanej strzykawki (fot. M. Hopko).

dostarczyć przydatnych informacji na temat dobrostanu, zdrowia, odpowiedzi układu odpornościowego, krótkoterminowych i długoterminowych skutków „nieoptymalnych” warunków hodowli, jakości wody, potencjalnego wybuchu choroby i stanu odżywienia (Seibel i in. 2021). Jednak pomimo możliwości uzyskania tak wartościowych informacji jakich mogłaby dostarczyć analiza wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi wykonywanie tych oznaczeń nadal nie jest rutynowo przeprowadzane w celu oceny zdrowia i/lub dobrostanu zarówno podczas prowadzenia badań naukowych, jak i podczas hodowli. Ręczne wykonywanie analiz hematologicznych jest czasochłonne, wymaga zaangażowania kilku wysoce wykwalifikowanych laborantów, wymaga również posiadania specjalistycznej aparatury badawczej (wirówka hematokrytowa, wysokiej jakości mikroskopy itp.). Do zmiany tego stanu rzeczy z pewnością mogą przyczynić się coraz popularniejsze automatyczne/półautomatyczne analizatory hematologiczne i biochemiczne powszechnie wykorzystywane w laboratoriach weterynaryjnych do analizy wskaźników krwi innych grup zwierząt (fot. 2, 3) (Bienzle i in. 1994). Wykorzystanie analizatorów do oznaczeń wskaźników krwi znacząco skraca czas wykonywania analiz (kompletny wynik otrzymujemy już po kilku minutach), obniża koszt pracy oraz daje bardziej powtarzalne wyniki w porównaniu do ręcznie przeprowadzanych analiz (Fazio et al.



Fot. 2 Półautomatyczny analizator hematologiczny wykorzystywany do oznaczeń wskaźników hematologicznych u ryb (fot. M. Hopko).



Fot. 3 Automatyczny analizator biochemiczny wykorzystywany do oznaczeń wskaźników biochemicznych w osoczu/surowicy krwi u ryb (fot. M. Hopko).

2019). Pomimo tego, że większość analizatorów hematologicznych jest zaprojektowana do pracy z krwią gatunków, których eryocyty nie posiadają jąder komórkowych, to liczne badania dowodzą, że wartości wskaźników hematologicznych u ryb uzyskane za pomocą analizatorów automatycznych są porównywalne z wynikami otrzymanymi po przeprowadzeniu oznaczeń metodami ręcznymi (Fazio i in. 2012, Faggio i in. 2013, Fazio i in. 2013, Yilmaz i Ergün 2018). Wg Witeskiej i in. (2022) automatyczne metody analizy hematologicznej są odpowiednie do analizy krwi ryb, jednak wyniki otrzymane tą drogą należy interpretować z ostrożnością. Z kolei Fazio i in. (2019) podaje, że porównanie wyników uzyskanych z analizatora automatycznego i otrzymanych w wyniku ręcznych oznaczeń wykazało dobrą korelację wyników uzyskanych obiema metodami tylko dla liczby czerwonych krwinek i liczby białych krwinek, ale nie dla liczby płytek krwi (Fazio i in. 2019). Zastosowanie zautomatyzowanych metod hematologicznych w każdym laboratorium powinno być poprzedzone walidacją z wykorzystaniem tradycyjnej analizy manualnej, zwłaszcza gdy krew pobierana jest od gatunków ryb wcześniej nie badanych (Witeska i in. 2022).

Ważniejsze markery hematologiczne i biochemiczne stresu, stanu zdrowotnego i kondycyjnego u ryb

Ocena wskaźników krwi obejmuje: liczbę białych krwinek, stężenie hemoglobiny, liczbę hematokrytową, średnią objętość krwinki czerwonej, średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej i średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej. Parametry krwi obejmują również liczbę białych krwinek, a czasem także różnicową liczbę leukocytów – (leukogram) procentowy udział lub liczbę różnych rodzajów leukocytów: limfocytów, neutrofilii lub heterofilii, monocytów, eozynofili i bazofili. Liczba płytek krwi i morfologia krwinek czerwonych rzadko są poddawane analizie. Analiza krwi obejmuje również pomiary parametrów biochemicznych. Wskaźniki te najczęściej są poddawane ocenie w osoczu lub surowicy krwi, ale ich poziom jest możliwy do oznaczenia również w krwi pełnej. Do podstawowych analizowanych wskaźników zalicza się: stężenie kortyzolu, stężenie glukozy, mleczanów, białka całkowitego, albumin, globulin, cholesterolu, trójglicerydów, aktywność aminotransferazy alaninowej, aminotransferazy asparaginianowej, fosfatazy zasadowej, stężenia jonów, np.: jonu magnezu, sodu itp. (Witeska i in. 2022).

Markery hematologiczne

Czerwone krwinki są najczęstszym typem komórek krwi występującym u kręgowców. U ryb w skrzelach pochłaniają cząsteczki tlenu (O_2), które poprzez naczynia krwio-

nośne są transportowane do tkanek organizmu, gdzie cząsteczki te zostają uwolnione i zastąpione cząsteczkami dwutlenku węgla (CO_2), które z kolei transportowane są do skrzelu w celu wydalenia z organizmu. W przeciwieństwie do zwierząt stałocieplnych, np. ssaków u znacznej większości ryb erytrocyty posiadają jądro komórkowe. Liczba erytrocytów jest zależna od wielu czynników środowiskowych, np. temperatury wody, zasolenia, itp. Na wartość tego parametru u ryb wpływać mogą również płeć, wiek, aktywność, stan odżywienia organizmu, pora roku (Witeska i in. 2016). Dowiedziono, że osobniki o wyższej wartości liczby czerwonych krwinek charakteryzują się szybszym wzrostem, co wynika bezpośrednio z większych możliwości transportowych tlenu (Esmaeili 2021). Wyższe wartości liczby erytrocytów obserwuje się również często podczas reakcji stresowej organizmu. Podczas działania stresora organizm uwalnia czerwone krwinki z narządów krwiotwórczych (np. śledziony) do układu krążenia (Phuong i in. 2017). Zjawisko to jest bezpośrednio związane ze spowolnieniem oddychania przy jednoczesnym niezmiennym lub zwiększonym ogólnoustrojowym zapotrzebowaniu na tlen w sytuacjach stresowych (Pereira i in. 2013). Krótkotrwała erythrocytoza, której towarzyszy zwiększenie wartości pozostałych wskaźników hematologicznych krwi może wynikać nie tylko z podwyższonego poziomu liczby erytrocytów, ale także z zaburzeń gospodarki wodno-elektrolitowej (nieznaczne odwodnienie), które są następstwem stresu chemicznego (Rożyński i in. 2018a). Jako, że erytrocyty są najliczniej występującymi komórkami w krwi z ich liczbą ściśle związany jest inny parametr hematologiczny, tj. liczba hematokrytowa, który obrazuje objęściowy udział elementów morfotycznych, głównie właśnie erytrocytów do całej objętości krwi. Przyjmuje się, że wyższe wartości tego parametru, które świadczą o większej lepkości krwi są dla organizmu korzystniejsze. Uznaje się, że wyższe wartości liczby hematokrytowej pozwalają na uzyskanie lepszych wyników produkcyjnych. Zwiększenie wartości tego parametru w normalnym zakresie może świadczyć o zoptymalizowaniu transportu tlenu w krwiobiegu oraz stanowić oznakę dobrego zdrowia, jednak nie nieograniczonego wzrostu (Esmaeili 2021). Z drugiej strony, zbyt wysoki poziom tego parametru może wskazywać na różne problemy zdrowotne, np. odwodnienie lub dysfunkcję nerek (Chakraborty i in. 2017). Bardzo duże fluktuacje wartości liczby hematokrytowej obserwuje się przy różnego rodzaju stresie. Parametr ten jest ściśle zależny od ilości osocza we krwi. Zwiększenie ilości osocza (obniżenie wartości liczby hematokrytowej) ułatwia przepływ elektrolitów, białek itp. w krwiobiegu, co jest istotne podczas reakcji stresowej organizmu w celu zaspokojenia zapotrzebowania tkanek. Z drugiej jednak strony, obniżenie wartości tego wskaźnika wpływa istotnie na pojemność minutową serca, a tym samym na zdolność transportu tlenu i dwutlenku węgla przez erytrocyty (Esmaeili 2021). Kolejnym ważnym wskaźnikiem hematologicznym jest wspomniane wcześniej stężenie hemoglobiny. Hemoglobina wchodząca w skład erytrocytów odgrywa kluczową rolę w dystrybucji tlenu transportowanego ze

skrzeli do tkanek organizmu oraz dwutlenku węgla i ciepła w kierunku przeciwnym (Weber 2000). Gazy te są wykorzystywane przez tkanki jako ostateczny receptor elektronów pochodzących z oksydacyjnych reakcji katabolicznych i metabolizmu ATP (Wells 2009). Każdy bodziec, zarówno wewnętrzny, jak i zewnętrzny, może wpływać na metabolizm, który z kolei wpływa na zapotrzebowanie na tlen. W rezultacie ilość i funkcja hemoglobiny odgrywają kluczową rolę w podstawowym metabolizmie, a ostatecznie we wzroście i zdrowiu ryb (Esmaeili 2021). Dowiedziono, że podobnie jak w przypadku wyższych wartości liczby czerwonych krwinek, większa ilość hemoglobiny we krwi skutkuje szybszym tempem wzrostu i lepszą kondycją ustroju (Esmaeili 2021). Białe krwinki, zwane też leukocytami, zaraz po erytrocytach i płytkach krwi są najliczniejszą grupą elementów morfotycznych spotykaną w krwiobiegu u ryb. Krwinki te pełnią ważne funkcje zarówno we wrodzonych, jak i nabytych odpowiedziach immunologicznych, dlatego ich liczba i jakość są ogólnie wykorzystywane do określania reakcji immunologicznych (Cagirgan i Yildirim 1990). Liczba leukocytów w krwiobiegu wzrasta zazwyczaj u osobników, u których występują stany zapalne, różnego rodzaju infekcje czy uszkodzenia mechaniczne ciała. Z tej przyczyny parametr ten jest często wykorzystywany z powodzeniem jako wskaźnik stanu zdrowia i kondycji ryb (Siddiqui i in. 2020). Fluktuacje wartości liczby białych krwinek są również obserwowane podczas reakcji organizmu na czynnik stresogenny. Podczas reakcji stresowej w wyniku oddziaływania endogennych glukokortykoidów, takich jak kortyzol, z narządów krwiotwórczych (np. śledziona) do krwiobiegu uwolnione zostają białe krwinki (Phuong i in. 2017). Pomimo tego, że sama leukocytoza czy leukopenia dostarcza już pewnych informacji o występującej reakcji immunologicznej organizmu, to większe znaczenie dla interpretacji funkcjonowania ustroju posiadają zmiany ilościowe poszczególnych typów leukocytów, określane poprzez wykonanie leukogramu w rozmazie krwi. Główny typ leukocytów rozróżniany u większości gatunków ryb stanowią limfocyty (50-99%), chociaż niektóre dane literaturowe donoszą, że najliczniejszą grupą białych krwinek u ryb są neutrofile (60-70%) (Sopinka i in. 2016, Witeska i in. 2016, Esmaeili 2021, Rozas-Serri i in. 2022). Wśród pozostałych rodzajów białych krwinek wyróżnia się eozynofile, bazofile i monocyty (Esmaeili 2021). Poszczególne rodzaje leukocytów są odpowiedzialne za różne funkcje obronne organizmu. Na przykład limfocyty i makrofagi, które powstają z monocytów podczas stanów zapalnych, są odpowiedzialne przede wszystkim za fagocytozę, zgodnie z klasyfikacją Metchnikoffa (Tauber 2003, Hodgkinson et al. 2015). Ponadto oba te typy leukocytów poprzez oczyszczanie ran z uszkodzonej tkanki odgrywają kluczową rolę w procesie gojenia się urazów (Sveen et al. 2019). Liczba komórek zapalnych w ranie bezpośrednio po jej wystąpieniu szybko wzrasta, a następnie, wraz z jej gojeniem stopniowo maleje (Richardson i in. 2013). Ważną rolę obronną pełnią również neutrofile, w których ziarnistościach występuje mieloperoksydaza. Enzym należący do peroksydaz, który w mniejszych ilościach

występuje również w monocytach i eozynofilach, a który poprzez katalizowanie powstania kwasu podchlorowego wykazuje silne właściwości bakteriobójcze i przeciwwirusowe (Claver i Quaglia 2009, Seibel i in. 2021, Witeska i in. 2022). Wartość zarówno liczby białych krwinek jak i udziału poszczególnych typów leukocytów w leukogramie jest zależna od wielu czynników środowiskowych. Na wielkości tych parametrów istotny wpływ może mieć wiek, płeć, pora roku, temperatura, stan odżywienia, zanieczyszczenia wody, stres i choroby (Ahmed i in. 2020). Ponadto wyższymi wartościami WBC charakteryzują się osobniki przejawiające większą aktywność (Tandon i Joshi 1976). Niekorzystne zmiany w liczebności białych krwinek oraz funkcjonowaniu układu odpornościowego może wykazywać reakcja na ostry stres. Odpowiedź stresowa może prowadzić nawet do leukopenii z limfopenią, a czasem do neutrofilii (Kristan i in. 2012). Na wartość liczby białych krwinek istotny wpływ może mieć poziom kortyzolu we krwi, który wydzielany podczas reakcji na stres skraca żywotność limfocytów i sprzyja ich apoptozie (Wyets i in. 1998, Verburg van Kemenade i in. 1999), a także redukować ich proliferację (Espelid i in. 1996). Dlatego zmniejszenie liczby białych krwinek oraz ich aktywności jest często obserwowanym skutkiem stresu.

Markery biochemiczne

Zły stan zdrowia i pogorszony stan kondycyjny, podobnie jak u innych grup zwierząt również u ryb, w większości przypadków jest związany z chronicznie występującym zjawiskiem stresu. Stres sam w sobie nie jest jednak szkodliwy dla organizmu. Staje się dla niego niebezpieczny dopiero gdy jest zbyt silny lub długotrwały. W takiej sytuacji zaburzone mogą zostać mechanizmy i reakcje fizjologiczne prowadzące do osłabienia organizmu (Barton i Iwama 1991). Zmiany obserwowane u organizmów w warunkach stresowych obejmują reakcje pierwszo-, drugo- i trzeciorzędowe. U ryb, pierwsza odpowiedź zaczyna się w podwzgórze, gdzie stres jest rozpoznawany, a odpowiedź w postaci impulsu nerwowego przekazywana jest przez układ autonomiczny. Następnie pobudzona zostaje oś podwzgórze-przysadka mózgowa-nadnercza, co skutkuje wydzielaniem m.in. kortyzolu oraz katecholamin jako odpowiedzi hormonalnych (Alsop i Vijayan 2008, Nematollahi i in. 2013). Działanie tych hormonów oprócz wpływania na wskaźniki hematologiczne i immunologiczne manifestuje się również istotnym oddziaływaniem na inne procesy fizjologiczne i metaboliczne organizmu istotnie wpływając również na wskaźniki biochemiczne krwi. W niektórych przypadkach chroniczne działanie stresora może być przyczyną końcowego, krytycznego etapu odpowiedzi (wyczerpanie, choroba a nawet śmierć organizmu) (Barton i Iwama 1991, Barton 2002, Smircich i Kelly 2014). Jednym z ważniejszych wskaźników poddawanych analizie podczas określania reakcji stresowej organizmu i stanu zdrowia jest kortyzol, którego wzrost stężenia we krwi obwodowej

określa się jako pierwszorzędową reakcję na stres (Ramsay i in. 2009, Piato i in. 2011, Ghisleni i in. 2012, Zakęś i in. 2022). Podwyższony poziom kortyzolu obserwuje się zwykle kilka godzin po wystąpieniu ostrej reakcji stresowej (Martínez-Porchas i in. 2009). Chociaż stężenie kortyzolu jest używane głównie jako marker w badaniach nad ostrymi reakcjami na stres, może również dostarczyć cennych danych uzupełniających w badaniach nad stresem przewlekłym. W celu wiarygodnego określenia przebiegu reakcji stresowej organizmu zaleca się kilkukrotne mierzenie wartości tego wskaźnika w czasie (Martínez-Porchas i in. 2009). Zwiększenie poziomu kortyzolu oraz katecholamin we krwi obwodowej powoduje wystąpienie drugorzędowych reakcji na stres, do których zalicza się fluktuacje w wartościach stężeń we krwi, np.: glukozy, amoniaku, mleczanów, itp. Glukoza jest jednym z ważniejszych wskaźników pozwalających określić nie tylko wystąpienie reakcji stresowej organizmu ale również pozwala monitorować stan odżywienia i metabolizmu organizmu. Podczas reakcji stresowej w wyniku działania hormonów w organizmie uruchomiony zostaje proces glukoneogenezy, dzięki któremu do krwi uwolniona zostaje glukoza celem zrekompensowania zwiększonego zapotrzebowania na energię w organizmie (Simon i in. 1983). Obok glukozy ważnym wskaźnikiem analizowanym podczas reakcji stresowej organizmu jest również poziom stężenia mleczanów. Reakcja stresowa organizmu wymusza zwiększenie wydatku energetycznego organizmu, a tym samym powoduje znaczny wzrost zapotrzebowania na tlen. Ponieważ system dystrybucji tlenu często nie jest w stanie pokryć tego zapotrzebowania, glikoliza w komórkach zachodzi w warunkach beztlenowych, w wyniku czego w mięśniach uwolniony zostaje kwas mlekowy. Dzięki syntezie kwasu mlekowego mięsień może chwilowo osiągnąć moc przekraczającą maksymalną wydajność układu krążenia lub układu oddechowego. Jednak gromadzenie się tego związku w tkance mięśniowej szybko zmusza organizm do przerwania aktywności. Jeśli wysiłek nie przekracza możliwości dostarczania tlenu przez ustrój, kwas mlekowy nie jest syntezowany. Związek ten jest dobrze wykrywalny w krwi obwodowej ponieważ właśnie tą drogą jest on odprowadzany z tkanki mięśniowej do wątroby (Rożyński i in. 2018b). Do drugorzędowych reakcji na stres, które są wiarygodnymi biomarkerami zdrowia i stanu kondycyjnego organizmu zalicza się również stężenie białka całkowitego, albumin, globulin i amoniaku. W wyniku wystąpienia reakcji stresowej organizmu w krwi obwodowej często obserwuje się fluktuacje wartości stężeń białek osocza, tj. białka całkowitego, albumin i globulin. Oznaczanie stężenia białka całkowitego jest jednym z najpowszechniejszych i najużyteczniejszych parametrów krwi wykonywanych podczas oceny zdrowia i stanu kondycyjnego organizmu u ryb. Białka osocza pełnią szeroki zakres funkcji w ustroju: utrzymują ciśnienie osmotyczne oraz pH, transportują niektóre metabolity, a także pełnią szereg funkcji immunologicznych, tj. odgrywają ważną rolę w odporności humoralnej i wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (Jha i in. 2007, Zheng i in. 20017). Wahania wartości stężenia tego parametru

we krwi są przede wszystkim konsekwencją zjawiska ograniczonej syntezy białek podczas reakcji stresowej lub nasilenia ich katabolizmu (Cooke i in. 2011, Luo i in. 2014). Wzmoczony rozpad białek osocza może nieść za sobą również inne konsekwencje. Proces ten może prowadzić do wzrostu stężenia amoniaku we krwi. Wzrost tego metabolitu w krwiobiegu obserwuje się również w wyniku nasilenia glukoneogenezy z aminokwasów, która jest wskaźnikiem silnej reakcji stresowej, przy jednoczesnym zaburzeniu procesów usuwania amoniaku z ustroju (Svoboda 2001, Martínez-Porchas i in. 2009). Podczas oceny zdrowia i stanu kondycyjnego u ryb oprócz stężeń białek osocza i amoniaku analizie poddaje się również inne wskaźniki, które pozwalają m.in. monitorować stan odżywienia organizmu i aktywność metaboliczną (Caputo i in. 2009, Luo i in. 2014). Ważniejszymi markerami tego typu są cholesterol i trójglicerydy. W ustroju, cholesterol jest przede wszystkim składnikiem błon komórkowych, bierze również udział w tworzeniu hormonów steroidowych. Jego synteza przebiega głównie w wątrobie. Na jego stężenie we krwi wpływa kilka czynników: aktywność metaboliczna wątroby, odżywianie, płeć i dojrzałość płciowa (Banaee i in. 2016). Z kolei trójglicerydy to główne lipidy ustroju, w którym są podstawową formą magazynowania tłuszczów. Mogą również służyć jako alternatywne źródło energii. Ponieważ poziom trójglicerydów we krwi odzwierciedla spożycie tłuszczów w diecie, wskazane jest aby parametr ten monitorować za każdym razem, gdy dieta ryb zostanie poddana modyfikacji (Van der Boon i in. 1991). Obniżenie wartości stężeń obu tych parametrów we krwi może wskazywać na pogarszający się stan odżywienia organizmu (Luo i in. 2014). Istotnymi biomarkerami stanu zdrowia i stanu kondycyjnego organizmu odpowiedzialnymi za pełnienie ważnych funkcji w ustroju są enzymy. Do enzymów, których aktywność jest najczęściej oznaczana podczas monitorowania funkcjonowania ustroju należą aminotransferaza asparaginianowa, aminotransferaza alaninowa oraz fosfataza alkaliczna. Obie transaminazy regulują transaminację, czyli jeden z głównych szlaków syntezy i deaminacji aminokwasów i białek w ustroju, natomiast fosfataza alkaliczna aktywna przy zasadowym pH odpowiada za transfosforylację, mineralizację szkieletu organizmów wodnych oraz transport błonowy (Zikic i in. 2001). Analiza fluktuacji aktywności tych enzymów we krwi obwodowej u ryb jest często wykorzystywana również jako narzędzie diagnostyczne w toksykologii do badania stanu zdrowia i określania stopnia uszkodzenia narządów narażonych na działanie toksycznych substancji, np. herbicydów (Zikic i in. 2001). Wartościowymi biomarkerami zdrowia i stanu kondycyjnego organizmu u ryb oznaczanymi w krwi są również jony, m.in. jony magnezu i sodu. Jony krążące w krwiobiegu pełnią w organizmie szereg istotnych funkcji. Magnez bierze udział w transporcie glukozy, wytwarzaniu energii, wpływa na przewodzenie impulsów nerwowych oraz pracę (skurcz-rozkurcz) mięśni. Jak wspomniano wyżej, hormony stresu, kortyzol i katecholaminy, powodują mobilizację organizmu, wzrost zapotrzebowania na energię i uruchamiają szereg reakcji enzymatycznych i bio-

chemicznych. W wielu z nich udział bierze magnez, co w efekcie może prowadzić do zubożenia, a nawet wyczerpania rezerw tego jonu. Z kolei sód bierze czynny udział, np. podczas stanów niedoboru tlenu w organizmie. Niedotlenienie organizmu obserwowane często w pierwszym etapie reakcji stresowej organizmu wynikające ze zwiększonego zapotrzebowania na energię i tlen powoduje przenikanie tego jonu do wnętrza krwinek czerwonych. Wzrostowi stężenia wewnątrzkomórkowego sodu towarzyszy zwiększenie zdolności przenoszenia tlenu przez erytrocyty (Nikinmaa i in. 1987, Fuchs i Albers 1988, Wang i in. 1999). W wyniku migracji jonów sodu do wnętrza erytrocytów stężenie tego jonu rozpuszczonego w osoczu krwi maleje w pierwszej fazie reakcji stresowej organizmu nawet o 30% (Martemyanov 2013).

Podsumowanie

Jak udowodniono analizy hematologiczne i biochemiczne krwi są wartościowymi biomarkerami mogącymi dostarczyć cennych informacji na temat zdrowia podchowowanych ryb, ich stanu kondycyjnego, reakcji stresowej oraz odpowiedzi immunologicznej. Należy jednak mieć na uwadze, że badania ww. parametrów nie dostarczają odpowiedzi na wszystkie aspekty zdrowia ryb. W celu uzyskania pełniejszych informacji na ten temat ważne jest również równoległe obserwowanie oraz analiza innych biomarkerów zdrowia, np. wskaźników hodowlanych. Co więcej, parametrów hematologicznych oraz biochemicznych nie należy analizować pojedynczo, a traktować je raczej jako kompleks wskaźników, poddając ocenie większą liczbę markerów jednocześnie (Esmaili 2021). Na uwadze należy mieć również, że na ww. wskaźniki nieprzerwanie oddziałuje bardzo duża liczba czynników mogąca wpływać na ich ocenę. Większość wskaźników hematologicznych i biochemicznych jest zależna również od płci, wieku, stanu odżywienia organizmu, pory dnia i pory roku, aktywności, zagęszczeń stosowanych podczas podchowu, temperatury, odczynu pH oraz innych czynników fizykochemicznych wody, a także czynników środowiskowych. Ocena omawianych wskaźników może być również istotnie skorelowana z wyszkoleniem i zaangażowaniem zespołu dokonującego pomiarów, zastosowanej aparatury, sprzętu laboratoryjnego oraz testów, a także sposobu i części ciała, z której pobierana jest próbka. Dla przykładu aktywności niektórych enzymów występujących w dużych stężeniach w mięśniach, tj. aminotransferaza alaninowa, aminotransferaza asparaginianowa mogą być wyższe we krwi pobranej z żyły ogonowej w porównaniu do krwi pobranej z serca (Folmar 1993). Na chwilę obecną, dużym utrudnieniem jest również brak wartości referencyjnych poszczególnych wskaźników dla większości gatunków ryb podchowowanych w akwakulturze. Do tej pory, wartości referencyjne niektórych wskaźników zostały oszacowane jedynie dla gatunków ryb najczęściej podchowowanych w akwakulturze, np. łososia (*Salmo salar*) czy pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus myki-*

ss) (Rozas-Serri i in. 2022). Z tego powodu ważne jest aby poszczególne hodowle możliwie często dokonywały pomiarów wskaźników hematologicznych i biochemicznych krwi podchowiwanych ryb, co pozwoli na wypracowanie własnych, prawidłowych dla danego stada/populacji zakresów wartości tych biomarkerów i przyczyni się do poprawy dobrostanu w akwakulturze (Seibel i in. 2021).

Badania sfinansowano w ramach zadania badawczego Nr Z-013 Instytutu Rybactwa Śródlądowego im. Stanisława Sakowicza – Państwowy Instytut Badawczy.

Literatura

- Ahmed I., Reshi Q.M., Fazio F., 2020 – The influence of the endogenous and exogenous factors on hematological parameters in different fish species: a review *A – quaculture International*, 28: 869-899.
- Alsop D., Vijayan M.M. 2008 – Development of the corticosteroid stress axis and receptor expression in zebrafish – *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294: 711-719.
- Banaee M., Nemadoost Haghi B., Tahery S., Shahafve S., Vaziriyani M. 2016 – Effects of sub-lethal toxicity of paraquat on blood biochemical parameters of common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758) – *Iranian Journal of Toxicology*, 10: 1-5.
- Barton B.A. 2002 – Stress in Fish: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids – *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517-525.
- Barton B.A., Iwama G.K. 1991 – Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids – *Annual Review of Fish Diseases*, 1: 3-26.
- Bienzle D., Jacobs R.M., Lumsden J.H., Griff E., Tarasov L. 1994 – Comparison of two automated multichannel haematology analysers in domestic animals *Comparative Hematology International*, 4: 162-166.
- Cagirgan M.I., Yildirim M.B. 1990 – An application of factor analysis to data from control and macro mutant populations of „Quantum” barley – *Journal Faculty Agriculture*, 4: 125-138.
- Caputo M., O'Connor C.M., Hasler C.T., Hanson K.C., Cooke S.J. 2009 – Long-term effects of surgically implanted telemetry tags on the nutritional physiology and condition of wild freshwater fish – *Diseases of Aquatic Organisms*, 84: 35-41.
- Chakraborty S., Rout S.K., Anupama R.R., Milli K., Sona R.R., Behera L. 2017 – Response of salinity (brine solution) induced stress on cortisol hormone in Indian major carp, *Labeo rohita* – *Journal of Experimental Zoology, India*, 20: 1377-1381.
- Ciesla B. 2007 – *Hematology in Practice* F – A Davis Company; Philadelphia, Pennsylvania, USA: s. 230.
- Claver J.A., Quaglia A.I.E. 2009 – Comparative Morphology, Development, and Function of Blood Cells in Nonmammalian Vertebrates – *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18: 87-97.
- Cooke S.J., Woodley C.M., Eppard M.B., Brown R.S., Nielsen J.L. 2011 – Advancing the surgical implantation of electronic tags in fish: a gap analysis and research agenda based on a review of trends in intracoelomic tagging effects studies – *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 21: 127-151.

- Davis K.B. 2006 – Management of physiological stress in finfish aquaculture – North American Journal of Aquaculture, 8: 116-121.
- Jha A.K., Pal A., Sahu N., Kumar S., Mukherjee S. 2007 – Haemato-immunological responses to dietary yeast RNA, ω -3 fatty acid and β -carotene in *Catla catla* juveniles – Fish and Shellfish Immunology, 23: 917-927.
- Esmaeili M. 2021 – Blood Performance: A New Formula for Fish Growth and Health – Biology, 10: 1236.
- Espelid S., Lokken G.B., Steiro K., Bogwald J. 1996 – Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) – Fish and Shellfish Immunology, 6: 95-110.
- Faggio C., Casella S., Arfuso F., Marafioti S., Piccione G., Fazio F. 2013 – Effect of storage time on haematological parameters in mullet, *Mugil cephalus* – Cell Biochemistry & Function, 31: 412-416.
- Fazio F., Filiciotto F., Marafioti S., Di Stefano V., Assenza A., Placenti F., Buscaino G., Piccione G., Mazzola S. 2012 – Automatic analysis to assess haematological parameters in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) – Marine and Freshwater Behaviour and Physiology 45: 63-73.
- Fazio F., Marafioti S., Filiciotto F., Buscaino G., Panzera M., Faggio C. 2013 – Blood hemogram profiles of farmed onshore and offshore gilthead sea bream (*Sparus aurata*) from Sicily, Italy – Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13: 415-422.
- Fazio F., Saoca C., Costa G., Zumbo A., Piccione G., Parrino V. 2019 – Flow cytometry and automatic blood cell analysis in striped bass *Morone saxatilis* (Walbaum, 1792): a new hematological approach – Aquaculture, 513: 734398.
- Folmar L.C. 1993 – Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: A bibliography and synopsis of selected effects – Environmental Toxicology and Chemistry, 12: 337-375.
- Fuchs D.A., Albers C. 1988 – Effect of Adrenaline and Blood Gas Conditions on Red Cell Volume and Intra Erythrocytic Electrolytes in the Carp, *Cyprinus carpio* – Journal of Experimental Biology, 137: 457-476.
- Ghisleni G., Capiotti K.M., Da Silva R.S., Osés J.P., Piato A.L., Soares V., Bogo M.R., Bonan C.D. 2012 – The role of CRH in behavioral responses to acute restraint stress in zebrafish – Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 36: 176-182.
- Hodgkinson J.W., Grayfer L., Belosevic M. 2015 – Biology of bony fish macrophages – Biology, 4: 881-906.
- Kristan J., Stara A., Turek J., Policar T., Velisek J. 2012 – Comparison of the effects of four anaesthetics on haematological and blood biochemical profiles in pikeperch (*Sander lucioperca* L.) – Neuroendocrinology Letters, 33: 66-71.
- Luo H., Duan X., Liu S., Chen D. 2014 – Effects of surgically implanted dummy ultrasonic transmitters on physiological response of bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* – Fish Physiology and Biochemistry, 40: 1521-1532.
- Martemyanov V.I. 2013 – Patterns of changes in sodium content in plasma and erythrocytes of freshwater fish at stress – Journal of Ichthyology, 53: 220-224.
- Martínez-Porchas M., Martínez-Córdova L.R., Ramos-Enriquez R. 2009 – Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? – Pan-American Journal of Aquatic Sciences, 4: 158-178.
- Nematollahi M.A., de Van Pelt H., Komen H. 2013 – Response to Stress in 17 alpha-hydroxylase Deficient Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) – Journal of Agricultural Science and Technology, 15: 303-310.

- Nikinmaa M., Cech J.J., Ryhanen E.L., Salama A. 1987 – Red Cell Function of Carp (*Cyprinus carpio*) in Acute Hypoxia – *Journal of Experimental Biology*, 47: 53-58.
- Pereira S., Pinto A.L., Cortes R., Fontainhas-Fernandes A., Coimbra A.M., Monteiro S.M. 2013 – Gill histopathological and oxidative stress evaluation in native fish captured in Portuguese northwestern rivers – *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90: 157-166.
- Phuong L.M., Huong D.T.T., Nyengaard J.R., Bayley M. 2017 – Gill remodeling and growth rate of striped catfish *Pangasianodon hypophthalmus* under impacts of hypoxia and temperature – *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 203: 288-296.
- Piato Â.L., Capiotti K.M., Tamborski A.R., Osés J.P., Barcellos L.J., Bogo M.R., Lara D.R., Vianna M.R., Bonan C.D. 2011 – Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiologic responses – *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 35: 561-567.
- Ramsay J.M., Feist G.W., Varga Z.M., Westerfield M., Kent M.L., Schreck C.B. 2009 – Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress – *Aquaculture*, 297: 157-162.
- Richardson R., Slanchev K., Kraus C., Knyphausen P., Eming S., Hammerschmidt M. 2013 – Adult zebrafish as a model system for cutaneous wound healing research – *Journal of Investigative Dermatology*, 133: 1655-1665.
- Rozas-Serri M., Correa R., Walker-Vergara R., Coñuecar D., Barrientos S., Leiva C., Ildefonso R., Senn C., Peña A. 2022 – Reference Intervals for Blood Biomarkers in Farmed Atlantic Salmon, Coho Salmon and Rainbow Trout in Chile: Promoting a Preventive Approach in Aquamedicine – *Biology*, 11: 1066.
- Rożyński M., Demska-Zakęś K., Sikora A., Zakęś Z. 2018a – Impact of inducing general anesthesia with Propiscin (etomidate) on the physiology and health of European perch (*Perca fluviatilis* L.) – *Fish Physiology and Biochemistry*, 44: 927-937.
- Rożyński M., Ziomek E., Demska-Zakęś K., Zakęś Z. 2018b – Impact of inducing general anaesthesia with MS-222 on haematological and biochemical parameters of pikeperch (*Sander lucioperca*) – *Aquaculture Research*, 50: 2125-2132.
- Seibel H., Baßmann B., Rebl A. 2021 – Blood Will Tell: What Hematological Analyses Can Reveal About Fish Welfare – *Frontiers in Veterinary Science*, 8: 616955.
- Siddiqui U., Shah R.H., Rani A., Tudu K., Kumar S., Bisht H.C.S., Pandey N. 2020 – Comparative study of Hematological variation in healthy and fungal infected Kalabans, *Bangana dero* (Hamilton, 1822) – *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 19: 501-509.
- Simon L.M., Nemcsok J., Boross L. 1983 – Studies on the effect of paraquat on glycogen mobilization in liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) – *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 75: 167-169.
- Smircich M.G., Kelly J.T. 2014 – Extending the 2% rule the effects of heavy internal tags on stress physiology, swimming performance, and growth in brook trout – *Animal Biotelemetry*, 2: 16.
- Sopinka N.M., Donaldson M.R., O'Connor C.M., Suski C.D., Cooke S.J. 2016 – Stress indicators in fish – *W: Biology of stress in fish* (Red.) C.B. Schreck, L. Tort, A.P. Farrell, C.J. Brauner, Academic Press, San Diego, Kalifornia, USA: 405-462,
- Sveen L.R., Timmerhaus G., Krasnov A., Takle H., Handeland S., Ytteborg E. 2019 – Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) – *Scientific Reports*, 9: 3565.
- Svoboda M. 2001 – Stress in fish – review – *Bulletin Research Institute of Fish Culture and Hydrobiology Vodňany*, 37: 169-191.
- Tandon R., Joshi B.D. 1976 – Total red and white blood cell count of 33 species of fresh water teleosts – *Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd*, 37: 293-297.

- Tauber AI 2003 – Metchnikoff and the phagocytosis theory – *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 897-901.
- Van der Boon J., Van Den Thillart G.E., Addink A.D. 1991 – The effects of cortisol administration on intermediary metabolism in teleost fish – *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 100: 47-53.
- Verburg van Kemenade B.M., Nowak B., Engelsma M.Y., Wyets F. A. 1999 – Differential effects of cortisol on apoptosis and proliferation of carp B-lymphocytes from head kidney, spleen and blood – *Fish & Shellfish Immunology*, 9: 405-415.
- Wang T., Cossins A.R., Nielsen, O.B. 1999 – Metabolism of Trout Red Blood Cells: Correlation between Cation Transport and Oxygen Uptake Following Adrenergic Stimulation – *Aquaculture*, 177: 267-275.
- Weber R.E. 2000 – Adaptations for Oxygen Transport: Lessons from Fish Hemoglobins – *W: Hemoglobin Function in Vertebrates. Molecular Adaptation in Extreme and Temperate Environments.* (Red.) G. Di Prisco, B. Giardina, R. E. Weber. Springer-Verlag, Włochy: 23-38.
- Wells R.M. 2009 – Chapter 6 Blood-Gas Transport and Hemoglobin Function: Adaptations for Functional and Environmental Hypoxia – *Fish Physiology*, 27: 255-299.
- Witeska M., Ługowska K., Kondera E. 2016 – Reference values of hematological parameters for juvenile *Cyprinus carpio* – *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36: 169-180.
- Witeska M., Kondera E., Ługowska K., Bojarski B. 2022 – Hematological methods in fish – Not only for beginners *Aquaculture*, 547: 737498.
- Wyets F.A., Flikt G., Verburg van Kemenade B.M. 1998 – Cortisol inhibits apoptosis in carp neutrophilic granulocytes – *Developmental & Comparative Immunology*, 22: 563-572.
- Yilmaz S., Ergün S. 2018 – Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses – *Fish & Shellfish Immunology*, 78: 140-157.
- Zakęś Z., Demska-Zakęś K., Rożyński M., Gomułka P., Rożyński R. 2022 – Influence of intraperitoneal implantation of 12 mm PIT on the welfare of juvenile brown trout (*Salmo trutta*) – *Fisheries Research*, 255: 106458.
- Zheng K., Wu L., He Z., Yang B., Yang Y. 2017 – Measurement of the total protein in serum by biuret method with uncertainty evaluation – *Measurement*, 112: 16-21.
- Zikic R.V., Stajn S., Pavlovic Z., Ognjanovic B.I., Saicic Z.S. 2001 – Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocyte and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium – *Physiological Research*, 50: 105-111.