

Effect of the frequency of morphological changes in sperm on ejaculate characteristics and the dimensions and shape of sperm of Polish Landrace boars

Stanisław Kondracki, Katarzyna Łącka, Michał Stachniak

Summary

The study was carried out on 30 ejaculates collected from 15 Polish Landrace boars and subjected to macro- and microscopic examination. In each ejaculate the morphology of 500 sperm was evaluated, indicating the number of sperm with normal structure and with morphological changes. Forms with major and minor defects were distinguished according to Blom's classification. According to the criterion of frequency of morphological changes, two groups of ejaculates were distinguished: group I – ejaculates with a low frequency of sperm with morphological changes, i.e. not exceeding 1%, and group II – ejaculates with a high frequency of morphological changes, i.e. 9% or higher. Morphometric measurements of the heads of 15 randomly selected sperm from each ejaculate were made automatically using the CASA system, determining the length, width, perimeter, and surface area of the sperm head. Statistical analysis of the material was performed by analysis of variance. The significance of differences between groups was determined with Tukey's test. The frequency of morphological changes in sperm was shown to influence ejaculate traits and the percentage of sperm with normal structure. In the group of ejaculates with low frequency of morphological changes in the sperm, sperm motility was 2.77% higher than in group II. In ejaculates with a high frequency of morphological changes, the sperm dimensions, including head length, width, area, and perimeter, were somewhat greater than in ejaculates with a low frequency of morphological changes. On the other hand, the frequency of morphological changes in sperm had a negligible influence on the shape indices of the sperm heads (elongation, ellipticity, regularity and roughness).

KEY WORDS: ejaculate, sperm, Polish Landrace boars

Łuski jako wskaźnik bioakumulacji rtęci u ryb

Izabela Dębska¹, Marta Kołnierzak¹,
Ewa Skibniewska¹, Michał Skibniewski²,
Iwona Lasocka¹

¹Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Instytut Nauk o Zwierzętach, Katedra Biologii Środowiska Zwierząt

²Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Instytut Medycyny Weterynaryjnej, Katedra Nauk Morfologicznych

Wprowadzenie

Rtęć jest wysoce toksycznym pierwiastkiem, który ulega bioakumulacji i biomagnifikacji, zwiększając z czasem swój szkodliwy wpływ na organizmy żywe. Proble-

matyka monitoringu skażenia środowiska rtęcią jest wciąż aktualna, ponieważ zdarzają się incydenty związane z jej niekontrolowanym uwalnianiem ze źródeł przemysłowych, a pierwiastek ten pozostaje zagrożeniem nie tylko dla systemów wodnych [7, 12, 15]. Wysoka lipofilność i stabilność metylortęci sprawia, że nie jest łatwo metabolizowana i eliminowana, a jej biologiczny okres półtrwania w rybach wynosi od 6 do 8 lat, w zależności od gatunku [3]. Bioakumulacja przez organizmy wodne odbywa się w trzech procesach: pierwszy polega na pobieraniu rtęci przez skrzela w procesie oddychania, drugi to wchłanianie substancji z wody przez powierzchnię ciała, a trzeci odbywa się poprzez pobieranie pokarmu i jest najistotniejszą drogą wchłaniania rtęci, tutaj bowiem bioakumulacja łączy się z biomagnifikacją [3, 6, 15].

Z raportu FAO (2022) wynika, że w 2020 roku światowa produkcja z akwakultury osiągnęła 122,6 mln ton (w tym 87,5 mln stanowiły zwierzęta wodne) i szacuje się, że do 2030 roku produkcja zwierząt wodnych wzrośnie o kolejne 14% [5]. W 2021 roku połowy ryb

słodkowodnych w Polsce wynosiły 56,8 tys. ton [11], z czego ze stawów hodowlanych w Polsce pozyskano 44,7 tys. ton ryb [3]. Spożycie ryb słodkowodnych w Polsce w 2021 roku wynosiło 1,5 kg/mieszkańca [11]. Zgodnie z uchwałą Nr 2/2023 Komisji Zarządzającej Funduszu Promocji Ryb z dnia 14 czerwca 2023 r. w sprawie przyjęcia strategii promocji dla branży rybnej na rok 2024 rekomendowane jest zwiększenie spożycia ryb wyhodowanych przez polską akwakulturę. Ryby są bowiem źródłem wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, witamin z grupy A, D i B oraz składników mineralnych takich jak jod, fosfor, selen, magnez, potas. Z drugiej strony należy nadzorować i monitorować poziomy niebezpiecznych dla zdrowia substancji (np. Hg) kumulowanych przez ryby konsumpcyjne.

Celem pracy było określenie całkowitej zawartości rtęci (THg) w łuskach i mięśniach szkieletowych dwóch gatunków konsumpcyjnych ryb słodkowodnych, należących do ryb drapieżnych – szczupaka (*Esox lucius*) i bentosożernej ryby z rodziny karpiowatych – leszcza (*Abramis brama*). Zarówno łuski szczupaka, jak i leszcza zalicza się do łusek elastycznych typu cykloidalnego [10]. Założono, że łuski będą odzwierciedlać bioakumulację rtęci u badanych gatunków ryb i stanowić cenny materiał biologiczny, uzyskiwany nieinwazyjną metodą, w monitoringu skażenia środowiska wodnego rtęcią.

Materiał i metody badań

Leszcze ($n = 5$) [fot. 1] i szczupaki ($n = 5$) [fot. 2] pozyskano ze stawu hodowlanego w Knyszynie (woj. podlaskie) w maju 2023 roku. Ryby uśmiercono poprzez uderzenie w głowę. Następnie nacinano łuk skrzelowy w celu skrwawienia. Przed pobraniem materiału osobniki zostały zważone i zmierzone. W tabelach nr 1 A i B zestawiono badane gatunki ryb wraz z wymiarami (masa i długość ciała). Następnie pobrano materiał do analizy: mięśnie szkieletowe i łuski z części grzbietowej tułowia. W przypadku łusek zastosowano dodatkową procedurę, polegającą na wstępnym oczyszczeniu w celu usunięcia zanieczyszczeń powierzchniowych, śluzu, pozostałości skóry i innych tkanek znajdujących się na łuskach oraz płukaniu łusek w wodzie dejonizowanej przez około 5 minut [1, 2, 6]. Wszystkie próby przechowywano w temperaturze -20°C do czasu analiz. Pobrane tkanki (naważki 20-40 mg) badano przy użyciu analizatora rtęci AMA 254 ALTECH Czechy. Zasada działania urządzenia polega na spektrometrii absorpcji atomowej. Określono całkowitą zawartość rtęci (THg) w mięśniach i łuskach i wyrażono w $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ świeżej masy. Szczegółowa metodyka została przedstawiona w pracy Skibniewska i Skibniewski [12].



Fot. 1. Leszcz (*Abramis brama*), zbliżenie łusek (prostokąt w prawym dolnym rogu) [3 zmodyfikowane]



Fot. 2. Szczupak (*Esox lucius*), zbliżenie łusek (prostokąt w prawym dolnym rogu) [3 zmodyfikowane]

Analiza statystyczna

Analiza statystyczna uzyskanych wyników została opracowana przy użyciu programu Statistica 13. Rozkład danych analizowano z wykorzystaniem testu W Shapiro-Wilka. W celu porównania różnic międzygrupowych wykonano test U Manna-Whitney'a przy poziomie istotności $p \leq 0,05$ oraz $p \leq 0,01$.

Współczynnik korelacji Pearsona i współczynnik determinacji (R^2) między zawartością THg w mięśniach i łuskach ryb obliczono przy użyciu programu Excel.

Wyniki i dyskusja

Tkanki ryb (mięśnie, wątroba, skrzela) są dobrym wskaźnikiem zanieczyszczenia środowiska, między innymi metalami ciężkimi, w tym rtęcią [2, 9, 15]. Autorzy wskazują, że wartym uwagi wskaźnikiem obciążenia organizmu ryb rtęcią są także łuski [1, 6, 14]. Wśród tkanek pobieranych metodą nieinwazyjną do analizy zawartości THg wyróżniamy poza łuskami również wycinki płetw, krople krwi i biopsje niewielkich prób różnych tkanek [6, 13]. Podjęto się wobec powyższego oceny zawartości THg w łuskach leszcza i szczupaka celem potwierdzenia lub wykluczenia zasadności stosowania łusek w monitoringu zanieczyszczenia środowiska wodnego rtęcią. Ponadto istnieje możliwość wykorzystania archiwalnych łusek ryb jako predyktorów przeszłych zanieczyszczeń [6]. Autorzy wskazują także na łuski ryb jako lepsze bio wskaźniki w porównaniu z płetwami, które wymagają dłuższego czasu gojenia, po pobraniu wycinka tkanki do badania [6, 14].

Średnia masa ciała i długość ryb wynosiła u szczupaka odpowiednio ($n = 5$) 831 ± 76 g i 52 ± 2 cm, natomiast u leszcza ($n = 5$) 708 ± 86 g i 40 ± 4 cm. Szczegółowe wartości masy ciała i długości ciała podano w tabeli dla szczupaków (A) i leszczy (B).

Tabela

Długość i masa ciała badanych szczupaków (A) i leszczy (B)

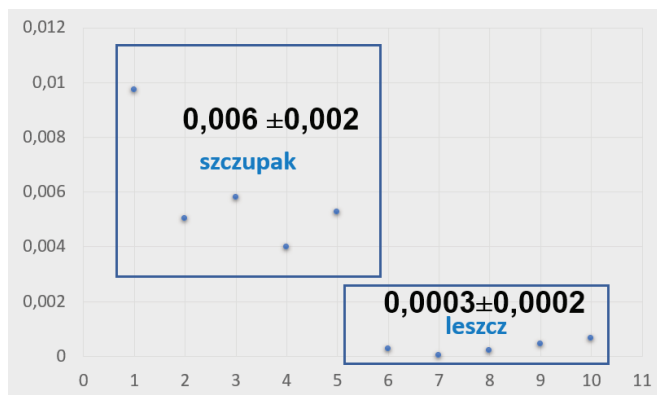
A szczupak		B leszcz	
masa ciała (g)	długość ciała (cm)	masa ciała (g)	długość ciała (cm)
800	52	600	39
814	52	640	38
960	56	739	41
820	52	759	40
760	51	800	42

Wykazano wysoce istotny ($p \leq 0,01$) 20-krotny wzrost zawartości rtęci w łuskach szczupaka względem łusek leszcza (wykres 1), w przypadku mięśnia ten wzrost był blisko 6-krotny przy $p \leq 0,01$ (wykres 2). Wyniki te potwierdzają zjawisko bioakumulacji oraz biomagnifikacji rtęci w łańcuchu troficznym. Ponadto wskazują, że badane ryby konsumpcyjne nie stanowią zagrożenia dla zdrowia człowieka zgodnie z aktualnymi limitami zawartości rtęci w mięsie ryb [4] (wykres 3). Jovičić i wsp., [6] notowali podobną tendencję zawartości THg u ryb, czyli wyższą w mięśniach i znacznie niższą w łuskach oraz wykazali także kilkakrotnie wyższą zawartość THg u ryb rybożernych (okoń, szczupak) w porównaniu do bentosożernych (leszcz) pochodzących ze stawów na terenie Czech. Pavla i wsp. [8] otrzymali zbliżony rozkład średnich zawartości rtęci w mięśniach i łuskach szczupaka; nie analizowali jednak zawartości THg u leszcza.

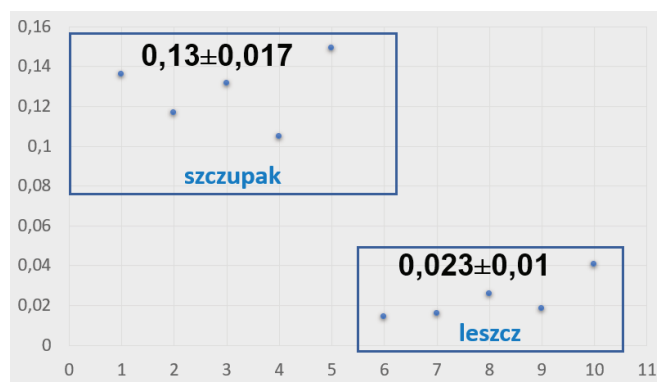
Między THg w mięśniach i łuskach szczupaka i leszcza łącznie występują silne dodatnie korelacje 0,91 ($n = 10$) przy $R^2 = 0,84$. Natomiast rozpatrując korelację w obrębie gatunku, wyniki przedstawiają się następująco dla szczupaka 0,48 ($n = 5$) przy $R^2 = 0,23$ i dla leszcza 0,7 ($n = 5$) przy $R^2 = 0,49$. Należy jednak podkreślić, że zawartość THg w łuskach leszczy była bardzo niska. Warto również zaznaczyć, że większa liczebność w obrębie gatunków badanych ryb mogłaby wpłynąć na wzrost współczynników korelacji i determinacji. Behrooz i wsp. [1] wykazali silną korelację 0,94 ($n = 6$) między zawartością THg w mięśniach i łuskach u amura białego (*Ctenopharyngodon idella*) i 0,45 ($n = 6$) u tołpygi białej (*Hypophthalmichthys molitrix*). Z kolei Jovičić i wsp. [6] wykazała statystycznie istotną korelację ($p \leq 0,01$) między mięśniami a łuskami jedynie u sandacza pospolitego (*Sander lucioperca*).

Wnioski

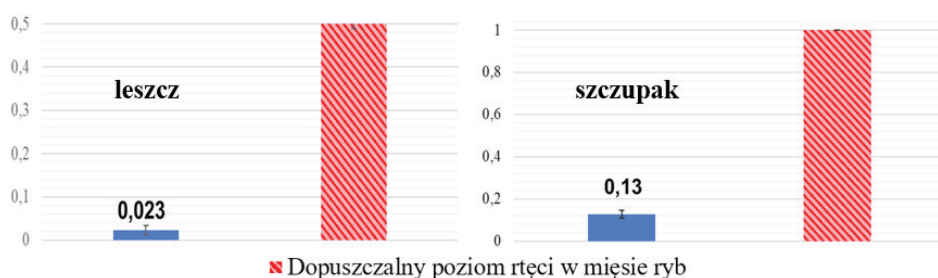
Uzyskane wyniki wskazują, że łuski, w szczególności ryb drapieżnych (szczupak), mogą stanowić godny uwagi



Wykres 1. Zawartość rtęci ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) w łuskach poszczególnych osobników z gatunku szczupak i leszcz



Wykres 2. Zawartość rtęci ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) w mięśniach szkieletowym poszczególnych osobników z gatunku szczupak i leszcz



Wykres 3. Porównanie zawartości ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) rtęci w mięśniach szkieletowych badanych gatunków ryb zgodnie z rozporządzeniem z dnia 12 kwietnia 2022 r. w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów zawartości rtęci w rybach i soli

wskaźnik zanieczyszczenia środowiska rtęcią, a być może także innymi metalami ciężkimi. Jednakże łuski będą wskazywać raczej generalny trend zawartości THg w organizmie ryb. Ponadto pozyskanie łusek jest metodą mniej inwazyjną niż pozostałych tkanek i należy wziąć to pod uwagę przy monitorowaniu zanieczyszczenia środowisk wodnych, w szczególności w populacji ryb zagrożonych. Należy podkreślić, że analizując łuski pod kątem zanieczyszczenia rtęcią, istotne jest ich uprzednie dokładne oczyszczenie (np. płukanie wodą dejonizowaną).

Literatura: 1. Behrooz R.D., Sahebi S. Sepehrikiya S., 2012 – Mercury Contamination in Muscle and Scales of Grass Carp

(*Ctenopharyngodon idella*) and Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) of Zabol Chahnimeh Reservoirs (Iran). *World Applied Sciences Journal* 20(4): 565-569. **2. Červenka R., Bednařík A., Komárek J., Ondračková M., Jurajda P., Vítek T., Spurný P.**, 2011 – The relationship between the mercury concentration in fish muscles and scales/fins and its significance. *Open Chemistry* 9(6): 1109-1116. **3. Dębska I.**, 2023 – Bioakumulacja rtęci w tkankach wybranych gatunków ryb konsumpcyjnych i ozdobnych. Praca magisterska, SGGW, 2023. **4. Dz. Urz. UE L 115/60:** z dnia 13.04.2022: Rozporządzenie Komisji (UE) 2022/617 z dnia 12 kwietnia 2022 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 w odniesieniu do najwyższych dopuszczalnych poziomów zawartości rtęci w rybach i soli. **5. FAO** – 2022 (Organizacja Narodów Zjednoczonych do spraw Wyżywienia i Rolnictwa; ang. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), „Statystyki produkcji akwakultury – Polska”. **6. Jovičić K., Janković S., Nikolić D.M., Dikanović V., Skorić S., Krpo-Četković J., Jarić I.**, 2023 – Prospects of fish scale and fin samples usage for nonlethal monitoring of metal contamination: a study on five fish species from the Danube River. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 424, 4. **7. Łuczyńska J., Łuczyński M.J., Nowosad J., Kowalska-Górska M., Senze M.**, 2022 – Total Mercury and Fatty Acids in Selected Fish Species on the Polish Market: A Risk to Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19, 10092. **8. Pavla S., Danko H., Premysl M. Denisa M., Kristyna M., Zdenka S.**, 2022 – Do the total mercury concentrations detected in fish from Czech ponds represent a risk for consumers? *Scientific Reports* 12, 553. **9. Pavlo-**

va E., Ivanova E., Bazhenova D., 2023 – Peculiarities of mercury content in the muscle tissue of fish of the Vologda Region. *E3S Web of Conferences* 407, 01008. **10. Piprek R.P.**, 2021 – Historia naturalna łusek ryb – budowa, ewolucja i rozwój. *KOSMOS* 70(4): 625-635. **11. Rocznik Statystyczny Rolnictwa 2022** – Główny Urząd Statystyczny, Warszawa, Polska. **12. Skibniewska E.M., Skibniewski M.**, 2023 – Mercury Contents in the Liver, Kidneys and Hair of Domestic Cats from the Warsaw Metropolitan Area. *Applied Sciences* 13, 269. **13. Stahl L.L., Snyder B.D., McCarty H.B., Cohen T.R., Miller K.M., Fernandez M.B., Healey J.C.**, 2021 – An Evaluation of Fish Tissue Monitoring Alternatives for Mercury and Selenium: Fish Muscle Biopsy Samples Versus Homogenized Whole Fillets. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 81(2): 236-254. **14. Sultana T., Siddique A., Sultana S., Mahboob S., Al-Ghanim K., Ahmed Z.**, 2017 – Fish scales as a non-lethal tool of the toxicity of wastewater from the River Chenab. *Environmental Science and Pollution Research International* 24(3): 2464-2475. **15. Teunen L., Belpaire C., De Boeck G., Blust R., Bervoets L.**, 2022 – Mercury accumulation in muscle and liver tissue and human health risk assessment of two resident freshwater fish species in Flanders (Belgium): a multilocation approach. *Environmental Science and Pollution Research International* 29(5): 7853-7865.

Artykuł opracowany na podstawie badań zaprezentowanych podczas XXVI Warsztatów Zootechnicznych pt. „Nowe wyzwania w hodowli i chowie zwierząt w praktyce”.

Scales as an indicator of mercury bioaccumulation in fish

Izabela Dębska, Marta Kołnierzak, Ewa Skibniewska, Michał Skibniewski, Iwona Lasocka

Summary

Mercury is a highly toxic element that bioaccumulates and biomagnifies, so that its harmful effects on living organisms increase over time. Fish are a valuable source of essential polyunsaturated fatty acids, A, D and B vitamins, and minerals such as iodine, phosphorus, selenium, magnesium and potassium. On the other hand, levels of substances accumulated by food fish which are hazardous to health, including Hg, should be monitored. Fish scales, which can be obtained non-invasively, may be a valuable biological material in monitoring mercury contamination of the aquatic environment. The aim of the study was to determine the total mercury content (THg) in the scales and skeletal muscles of two species of freshwater food fish – pike (*Esox lucius*), a predatory fish, and bream (*Abramis brama*), a benthic feeder of the family Cyprinidae. The mercury content in pike scales was found to be highly significantly ($p \leq 0.01$) higher – a 20-fold difference – than in bream scales. In the muscle tissue, the difference was nearly six-fold ($p \leq 0.01$). The results indicate that scales, especially those of predatory fish (pike), may be a promising indicator of environmental pollution with mercury and perhaps with other heavy metals as well. However, the scales will indicate only a general trend in the THg content in the body of fish.

KEY WORDS: biomagnification, pike, bream, mercury