

Ensímavirkni (EROD) hornsíla í Reykjavíkurtjörn

Markmið verkefnisins var að kanna ensímavirkni hornsíla (*Gasterosteus aculeatus*) í Reykjavíkurtjörn í tengslum við hugsanlegt mengunarálag á lífríki tjarnarinnar. Verkefnið var unnið af Rannsóknasetri Háskóla Íslands á Suðurnesjum skv samningi við Reykjavíkurborg. Halldór Pálmar Halldórsson forstöðumaður og Hermann Dreki Guls rannsóknamaður hjá Rannsóknasetri HÍ á Suðurnesjum báru ábyrgð á og sáu um allar mælingar, úrvinnslu og samantekt gagna ásamt sýnatökum en veiðar í Reykjavíkurtjörn og Hústjörn voru framkvæmdar af Náttúrufræðistofu Kópavogs sem liður í árlegri vöktun stofunnar á lífríki tjarnarinnar.

Samantekt

- Ensímavirkni (EROD) var margfalt hærri í lifur hornsíla úr Reykjavíkurtjörn og Hústjörn borið saman við viðmiðunarstaðina Urriðakotsvatn og Sandgerðistjörn
- Innan Reykjavíkurtjarnar var ensímavirkni hornsíla hæst í Reykjavíkurtjörn norður, næst hæst í Reykjavíkurtjörn suður og lægst í Hústjörn. Marktækur munur var á Reykjavíkurtjörn norður og Hústjörn.
- Lifrarstuðull (þyngd lifrar/heildarþyngd) hornsíla var marktækt hærri í Reykjavíkurtjörn (norður og suður) og Hústjörn borið saman við Urriðakotsvatn og Sandgerðistjörn
- Hornsíli í Reykjavíkurtjörn (norður og suður) og Hústjörn virðast vera undir töluverðu mengunarálagi sem kemur fram í aukinni ensímavirkni í lifur og háum lifrarstuðli miðað við viðmiðunarstaði

Inngangur

Cýtókróm P450 mónó-oxýgenasar (CYP P450) er hópur ensíma sem finnst allstaðar í dýraríkinu. Hryggdýr hafa jafnan meira magn CYP P450 ensíma í samanburði við hryggleysingja og er virknin oftast mest í lifur dýra. P450 ensímin taka þátt í fyrsta fasa niðurbrotsferla á fjölda mismunandi efna, þar á meðal utanaðkomandi efna svo sem lífrænna mengandi efna. Ensímin eru hvatar við oxun sameinda og ef um utanaðkomandi efni er að ræða þá er oxun fyrsta skref afeitrunar og undirbýr lífræna sameind fyrir næsta skref afeitrunar sem er fasa tvö (e. *conjugation*) umbreyting. Þar taka aðrir hópar ensíma við og gera sameindirnar vatnsleysanlegri svo að unnt sé að losa þær úr líkamanum.

CYP1A tilheyrir CYP P450 fjölskyldunni og tekur þátt í afeitrunarferlum á fjölda flatra sameinda, þar á meðal fjölhringja kolvetna (PAH), fjöklóraðra bifényl efna (PCB), díoxín o.fl. Fiskar geta orðið fyrir váhrifum sökum fyrrnefndra efna ef þau eru líffræðilega aðgengileg í umhverfinu. Við slíkar aðstæður örvast tjáning á CYP1A í lifur fiska sem leiðir til aukinnar framleiðslu prótína og mælanlegri aukningu í ensímavirkni. Með því að skoða ensímavirkni í lifur fiska er því hægt að sjá hvort þeir séu undir álagi af völdum mengandi efna.

Í aðferð Burke og Mayer (1974) til að mæla ensímavirkni er notast við efnið 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) sem hvarfast einungis við CYP1A með þeim afleiðingum að 7-ethoxyresorufin

umbreyttist í resorufin. Resorufin er flúrljómandi efni og því hægt með mælingum á flúrljómun að fylgjast með myndun efnisins og áætla ensímavirkni.

Aðferðir

Veiðar

Hornsíli voru veiddir í vírnetsgildrur (e. *minnow traps*) á fimm stöðum í ágúst 2018 (tafla 1). Náttúrufræðistofa Kópavogs sá um gildruveiðar í Reykjavíkurtjörn (norður og suður) og Hústjörn. Gildrur voru endurheimtar eftir 24 klst. frá því að þær voru settar út. Til viðmiðunar var sambærilegum gildrum komið fyrir í Urriðakotsvatni og Sandgerðistjörn og þær látnar liggja í sólarhring og sá Rannsóknasetur HÍ á Suðurnesjum um þær veiðar.

Tafla 1. Sýnatökustaðir og dagsetning hornsílaveiða

Heiti stöðvar	Staðsetning	Dags. sýnatöku
Urriðakotsvatn	64°04.200'N; 21°54.800'V	24.8.2018
Reykjavíkurtjörn norður	64°08.670'N; 21°56.520'V	22.8.2018
Reykjavíkurtjörn suður	64°08.530'N; 21°56.530'V	22.8.2018
Hústjörn	64°08.313'N; 21°56.750'V	22.8.2018
Sandgerðistjörn	64°02.709'N; 22°42.562'V	1.8.2018

Á hverjum stað voru 25-30 fiskar af sambærilegri stærð valdir og frystir á staðnum í fljótandi köfnunarefni (-196°C). Dýrin voru geymd þannig fram að krufningu og mælingum sem fóru fram á Rannsóknasetri HÍ á Suðurnesjum.

Undirbúningur sýna

Fiskarnir voru teknir úr köfnunarefninu og færðir yfir á ís. Í kjölfarið voru þeir lengdarmældir og vigtaðir og fór krufning fram á frosnum fiskum. Lifrin ásamt sníkjudýrum (bandormurinn *Schistocephalus solidus*), voru krufin út og vigtuð sér. Lifrin var færð yfir í 0.1M kalíumfosfat lausn (e. *homogenization buffer*) í hlutföllum 1:20 votvigt/rúmmál og brotin niður þangað til lausnin varð einsleit og komið fyrir í cryotúpum. Hlutsýnin voru tekin úr lausninni til prótínmælinga. Túpunar voru svo aftur frystar í fljótandi köfnunarefni fram að mælingu.

7-ethoxyresorufin O-deethylase virkni (EROD)

Eftirfarandi aðferð, aðlöguð frá Burke og Mayer (1974) var framkvæmd í samræmi við ICES TIMES leiðbeiningar (Stagg o.fl., 2016) fyrir mælingar á EROD virkni í fiskum. Sýnin voru þídd á ís og sett í skilvindu á 10.000g í 20min. Aðskilið sýni (e. *S9 fraction*) var fært yfir á 96 hólfa plötu (e. *microplate*), 20µL úr hverju sýni í þremur endurtekningum. Hvert hólf innihélt 140 µL af 0.1M kalíumfosfat lausn auk 20µL af 25µM ethoxyresorufin (7-EH). Að lokum voru 20µL af 2,4µM β-NADPH bætt út í hólf. EROD virkni var mæld á mínútu fresti í 12 mínútur með BioTek© Flx800 flúrljómunarmæli (örvun við 530nm / útgeislun mæld við 590nm). Staðallína var gerð fyrir hverja plötu með resorufin sodium salti, leyst upp í 0.1M kalíumfosfat lausn í styrki á bilinu 0nM- 500nM.

Prótínmælingar

Prótíninnihald í lifur var mælt með "NanoOrange™ Protein Quantitation Kit" (CAS. N6666) sem er aðferð til magngreininga prótína, aðlöguð til notkunar í flúrljómunarmælum. Sýnin til prótínmælinga voru þídd á ís og sett í skilvindu á 10.000g í 20 mín. Úr hverju sýni voru 10µL færðir yfir í hólfina á plötu

í tveimur endurtekningum með NanoOrange™ lausn. Staðallína fékkst með því að nota sermisalbúmín úr nautgripum (*e. Bovine Serum Albumin - BSA*) í styrkjum 0-10 µg/mL.

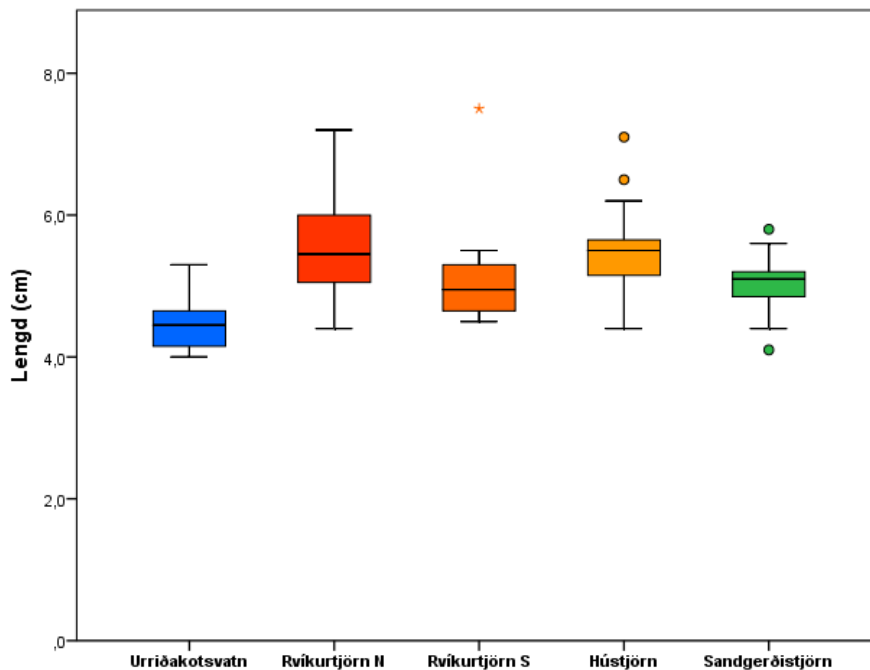
EROD virkni var að útreiknuð og sýnd sem: nanómólar (nM) resorufín / mínútu / mg prótín í sýni

Tölfræði

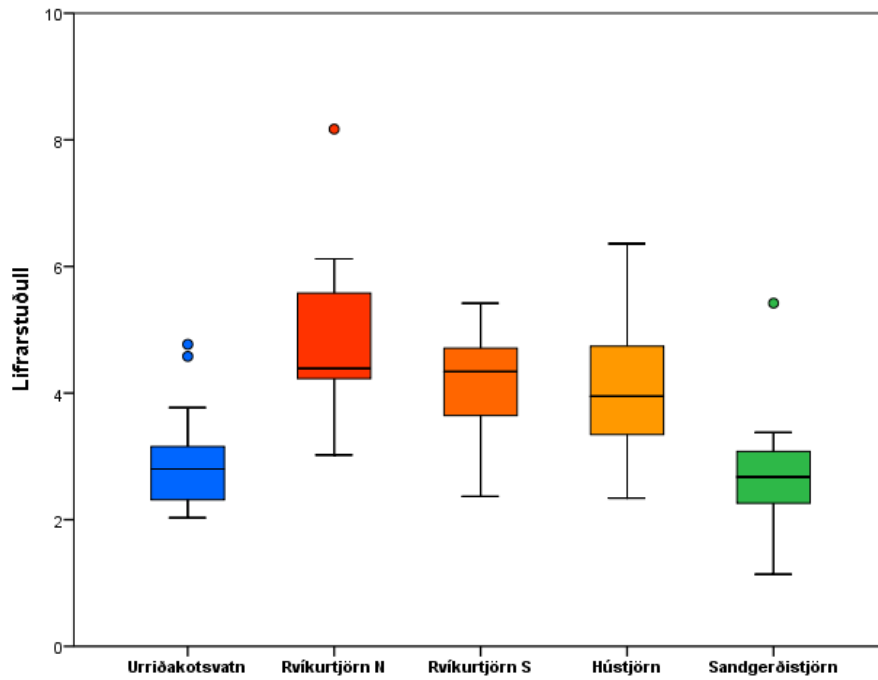
Niðurstöður voru unnar í SPSS þar sem lengd hornsíla, lifrarstuðull og EROD gildi voru borin saman á milli stöðva. Gögn voru log-umbreytt til að uppfylla skilyrði um normaldreifingu og einsleitni breytileikans fyrir einþátta ferveikagreiningu. Tukey HSD post hoc próf var notað til að kanna mun á milli stöðva þegar marktækni ($p < 0,05$) fékkst með einþátta ferveikagreiningu.

Niðurstöður

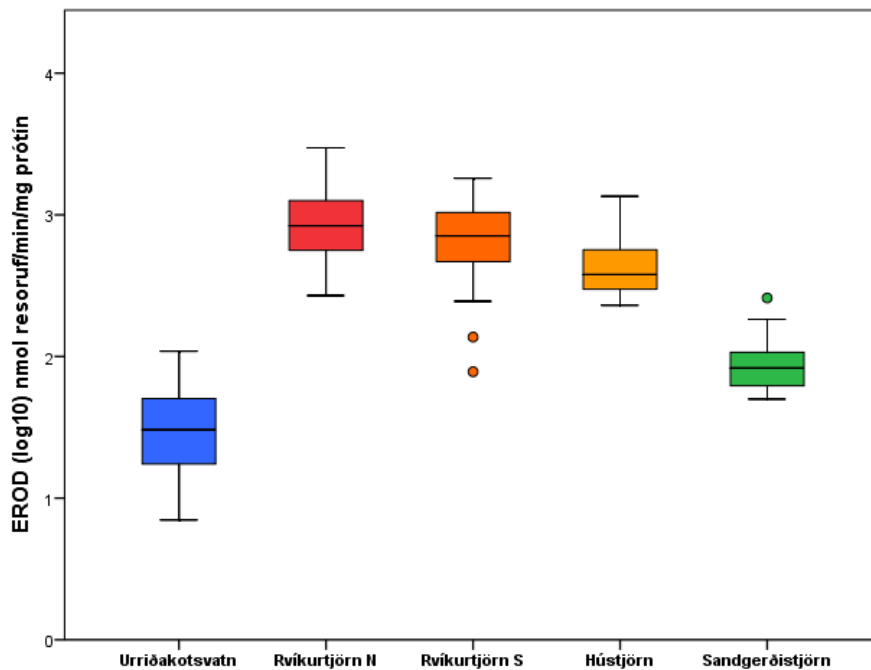
Sýndar eru niðurstöður og samanburður á milli stöðva á lengd (cm), lifrarstuðli (lifur/heildarþyngd fisks) og EROD ensímavirkni í hornsílum. Við þyngdarmælingar var tekið tillit til bandormasýkingar í fiskunum og voru bandormarnir fjarlægðir fyrir vigtun þar sem þyngd þeirra getur verið yfir helmingur af heildarþyngd hornsíla. Af 20 fiskum mældum per stöð var fjöldi sýkra fiska eftirfarandi: Urriðakotsvatn = 2, Reykjavíkurtjörn norður = 2, Reykjavíkurtjörn suður = 1, Hústjörn = 0 og Sandgerðistjörn = 20.



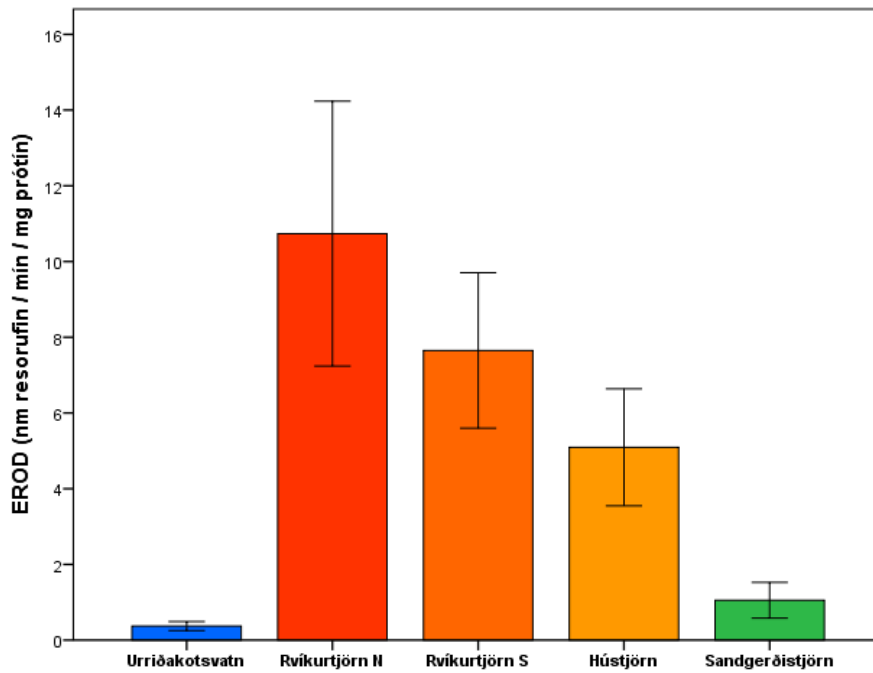
Mynd 1. Stærðardreifing hornsíla milli stöðva. Umbreytt gögn (Log10) sýndu fram á marktækan mun milli stöðva (einþátta ferveikagreining, $F_{4,95}=14,192$; $p < 0,001$). Tukey HSD sýndi að Hornsíli í Urriðakotsvatni voru marktækt minni en á öllum hinum stöðvum ($p < 0,003$). Marktækni sást einnig milli Reykjavíkurtjarnar norður og suður ($p=0,046$). Enginn marktækur munur sást við samanburð á milli annara stöðva.



Mynd 2. Myndin sýnir dreifingu lifrarstuðuls milli stöðva. Stuðullinn mældist hæstur í Norðanverðri Reykjavíkurtjörn en lægstur í Sandgerðistjörn. Lifrarstuðull var fenginn með því að deila þyngd lifrar með þyngd fiska (án bandorma). Marktækur munur var á milli stöðva (Einþátta fervikagreining, $F_{4,95}=20,230$; $p < 0,001$). Tukey HSD sýndi að ekki var marktækur munur milli viðmiðunarstöðva þ.e. Urriðakotsvatns og Sandgerðistjarnar ($p=0,739$) en þær voru marktækt frábrugðnar Reykjavíkurtjörn (norður og suður) og Hústjörn ($p < 0,001$). Ekki var marktækur munur á milli Reykjavíkurtjarnar (norður og suður) og Hústjarnar ($p>0,193$).



Mynd 3. Umbreytt gildi ($\log_{10}+2$) á CYP1A virkni í lifur hornsíla milli stöðva. Virkniin mældist lægst í Urriðakotsvatni (viðmið) en var hæst í Reykjavíkurtjörn norður. Marktækur munur var á milli stöðva (Einþátta fervikagreining, $F_{4,84}=90,713$; $p < 0,001$). Tukey HSD próf sýndi marktækan mun milli allra stöðva ($p < 0,01$) nema á milli Reykjavíkurtjarnar norður og suður annars vegar ($p=0,412$) og Reykjavíkurtjarnar suður og Hústjarnar hins vegar ($p=0,519$).



Mynd 4. CYP1A virkni í lifur hornsíla milli stöðva. Myndin sýnir raungildi.

Umræða

CYP1A ensímavirknin í lifur hornsíla var mest í tjörnum í Reykjavík eins og búast mátti við og mældust hæstu EROD gildin í hornsílum úr norðanverðri Reykjavíkurtjörn, að meðaltali 10.73 (nm resorufin/mín/mg prótín). Sunnanverð Reykjavíkurtjörn og Hústjörn fylgdu því næst með meðalgildin 7,65 og 5,09 (nm resorufin/mín/mg prótín). Til samanburðar sýndu hornsíli frá viðmiðunarstöðvum margfalt lægri EROD gildi eða að meðaltali 0,37 í Urriðakotsvatni og og 1,05 í Sandgerðistjörn sem gefur sterkelega til kynna að hornsílin í Reykjavíkurtjörn séu undir töluverðu mengunarálagi af völdum hvarfgjarnra lífrænna efna en t.d. fjölhringa kolvetni (PAH) og klórlífræn efni (PCB, díoxín) eru efnahópar sem er vel þekkt að valda aukningu í CYP1A ensímavirkni hjá fiskum (Stagg o.fl., 2016).

Lifrarstuðull var marktækt hærri í Reykjavíkurtjörn og Hústjörn í samanburði við viðmiðunarstaðina. Þessi lífræðilegi mælikvarði á heilbrigði fiskanna er almennari en ensímavirknin, þ.e. ýmis efni geta haft áhrif á hann en rannsóknir á mörgum tegundum fiska hafa sýnt fram á tengsl mengandi efna í búsvæði þeirra og hás lifrarstuðuls (Oost o.fl., 2003).

Þessi rannsókn er sú fyrsta sinnar tegundar hér á landi á EROD virkni í villtum stofnum ferskvatnsfiska og því ekki hægt að fullyrða um bein tengsl mengandi efna og aukinnar ensímavirkni. Hornsíli virðast henta vel til slíkra umhverfissrannsókna hér á landi en huga þarf vel að stöðlun við allar sýnatökur og mælingar. Í þessari rannsókn var reynt eftir fremsta megni að staðla sýnatökur með tilliti til stærðar hornsíla, veiðitíma og staða en breytileiki í umhverfisaðstæðum er þó alltaf til staðar á milli tjarna/vatna. Munurinn sem kom í ljós, bæði í EROD gildum og lifrarstuðli, gefur þó ótvírætt til kynna að lífríkið í Reykjavíkurtjörn (norður og suður) og Hústjörn sé undir mengunarálagi af völdum hvarfgjarnra efna.

Heimildir

Oost, R. van der, Beyer, J., Vermeulen, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149

Stagg, R., McIntosh, A., and Gubbins, M. J. 2016. Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity in S9 or microsomal liver fractions. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* No. 57, 21 pp.