

Zakład Chorób Ryb i Biologii, Instytut Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych
Akademii Rolniczej w Lublinie

LESZEK GUZ

*Hamowanie aktywności proteazowej Aeromonas hydrophila
przez śluz i surowicę karpia (Cyprinus carpio L.)
III. Wpływ siarczynu miedzi, trichlorfonu i wapna palonego*

Inhibitory activity of the mucus and serum of carp (*Cyprinus carpio* L.)
in relation to *Aeromonas hydrophila* proteases
III. Influence of copper sulphate, trichlorfon and burnt lime

STRESZCZENIE

Siarczan miedzi, Neguvon[®] i wapno palone są używane w profilaktyce i leczeniu infekcji pasożytniczych ryb. Wpływ tych związków na infekcje pasożytnicze był już badany. Wpływ siarczynu miedzi, Neguvonu i wapna palonego na inhibicyjną aktywność śluzu i surowicy w stosunku do proteaz *A. hydrophila* wymaga wyjaśnienia. Niniejsze badania dowodzą, że czasowa ekspozycja ryb na siarczan miedzi (0,3 mg/l; 12 godz), Neguvon[®] (1 ppm; 48 h) i wapno palone (3 d i 10 d; pH 8,5–8,8) hamowała inhibicyjne aktywności śluzu i surowicy w stosunku do kazeinaz i elastaz *A. hydrophila* w porównaniu z grupą kontrolną.

Słowa kluczowe: *Aeromonas*, ryby, proteazy, siarczan miedzi, trichlorfon, wapno palone

WSTĘP

Intensyfikacja procesu hodowlanego ryb sprzyja rozwojowi wielu chorób zakaźnych, co sprawia, że ryby często poddawane są zabiegom profilaktycznym i leczniczym. Spośród środków profilaktycznych i leczniczych ciągle jeszcze używa się w akwakulturze: siarczynu miedzi, trichlorfonu (Neguvon[®]) i wapna palonego.

Siarczan miedzi jest używany do zwalczania w stawach glonów [Schnick i in. 1986; Straus 2003]. Stosuje się go do niszczenia glonów nitkowatych, jak *Chara*, *Cladophora*, *Spirogyra*, oraz przeciwko „zakwitom” tzw. planktonu roślinnego. Stężenie siarczynu miedzi wymagane do niszczenia glonów zależy od temperatury wody oraz od jej zasobności w związki organiczne i mineralne. W wodach kwaśnych używa się stężeń 0,4–1 mg L⁻¹, natomiast w wodach alkalicznych 1,5–2 mg L⁻¹.

Stężenie $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ CuSO_4 w wodzie o pH 7,2 i temperaturze 16°C nie wywołuje skutków groźnych dla życia karpia, pstrągów tęczowych, lipieni, linów, wioślarek, larw skąposzczetów i ślimaków [Bernatowicz i Wolny 1969]. Granica toksyczności CuSO_4 wynosi około 300 mg na kg masy organizmów żywych, zaś dawka Cu $0,2 \text{ g m}^{-3}$ wody jest szkodliwa dla organizmu człowieka [Guziur 2001]. Siarczan miedzi stosowany jest również do zwalczania pasożytniczych dla ryb pierwotniaków i pijawek [Straus 2003].

Trichlorfon – O,O-dwumetylofosfonian 2,2,2-trójkloro-1-hydroksyetylu – jest substancją krystaliczną o temperaturze topnienia 80°C . Słabo rozpuszczalny w wodzie (15%) ma III klasę toksyczności dla ludzi i zwierząt stałocieplnych. Stosowany jest głównie do ochrony roślin. W akwakulturze Neguvon® (trichlorfonem) leczy niektóre choroby pasożytnicze ryb, wywołane przez płazińce, obleńce, pijawki i skorupiaki [VanDuijn 1973; Antychowicz 1990; Prost 1994; Noga 1996].

Wapnowanie stawów, poza dostarczeniem wapnia potrzebnego roślinom i zwierzętom do rozwoju, wpływa również na poprawę właściwości fizykochemicznych wody. Ma działanie odkwaszające poprzez wiązanie powstających w wodzie kwasów. Odgrywa rolę czynnika magazynującego dwutlenek węgla, który jest potrzebny roślinom do produkcji masy organicznej. Stabilizuje również wartość pH wody, jak również wykazuje właściwości odkażające. Wapno używa się najczęściej w postaci tlenku wapnia, otrzymanego poprzez wypalanie węglanów wapnia. Przy wapnowaniu stawów bezpośrednio na wodę używa się najczęściej dawki $100\text{--}200 \text{ kg CaO/ha}$ [Stegman i Wieniawski 1956].

Ryby hodowlane są narażone na działanie różnych środków chemicznych stosowanych do wody w celach profilaktycznych i leczniczych. Mając to na uwadze, założeniem pracy było poznanie wpływu siarczanu miedzi, trichlorfonu i wapna palonego na aktywność śluzu i surowicy karpia w stosunku do proteaz szczepów bakteryjnych z rodzaju *Aeromonas* patogennych dla karpia.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań były karpie w ilości 150 sztuk, o masie $350\text{--}400 \text{ g}$, które podzielono na cztery grupy doświadczalne (każda po 30 sztuk) oraz piątą grupę kontrolną, obejmującą 30 ryb:

– grupę I stanowiły ryby poddane działaniu siarczanu miedzi w kąpeli trwającej 12 godz. w stężeniu $0,3 \text{ mg L}^{-1}$ wody;

– grupę II – ryby poddane działaniu trichlorfonu (Neguvon®) w kąpeli trwającej 2 dni w stężeniu 1 ppm;

– grupę III – ryby poddane działaniu wapna palonego dodawanego do wody w akwarium do uzyskania pH $8,5\text{--}8,8$; czas trwania kąpeli wynosił 2 dni;

– grupę IV – ryby poddane działaniu wapna palonego dodawanego do wody w akwarium do uzyskania pH $8,5\text{--}8,8$; czas trwania kąpeli wynosił 10 dni;

– grupę V – stanowiły ryby kontrolne, które nie poddano działaniu żadnego z wymienionych związków.

Podczas doświadczenia ryby przetrzymywano w akwariach dobrze napowietrzanych, temperatura wody wynosiła 18°C , pH $7,0\text{--}7,4$, a zawartość tlenu $7 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$. Materiał do badań (śluz i krew) pobierano bezpośrednio po zakończeniu kąpeli.

Śluz zbierano z powierzchni ciała mechanicznie, a krew pobierano pipetą pasterowską bezpośrednio z serca. Śluz do badania aktywności inhibicyjnej wobec proteaz bakteryjnych przygotowywano według metody własnej, polegającej na łagodnym wytrząsaniu zebranego śluzu z buforem fosforanowym (w stosunku 1:1) przez 2 godz. w temp. 4°C . Następnie tę mieszaninę wirowano przy $8000 \times \text{g}$ przez 30 min w temp. 4°C . W uzyskanym supernatancie oznaczano poziom białka całkowitego metodą Bradforda [1976]. W badanych próbkach doprowadzano poziom białka całkowitego do stężenia $0,125 \text{ g\%}$ przy użyciu $0,1 \text{ M}$ buforu fosforanowego. Po inkubacji przygoto-

wanego śluzu (30 min w 28°C) z supernatantem bakterii z rodzaju *Aeromonas* badano aktywność kazeinazową i elastazową.

Uzyskane surowice służyły do badania ich właściwości inhibicyjnych w stosunku do kazeinaz i elastaz supernatantów bakterii z rodzaju *Aeromonas*. W tym celu równą objętość surowicy i supernatantu inkubowano przez 30 min w 28°C, a następnie badano aktywność kazeinazową i elastazową.

Badanie stopnia aktywności kazeinazowej wykonano zgodnie z Leunge'em i Stevensonem [1988] z niewielkimi modyfikacjami własnymi [Guz 1997], natomiast aktywność elastazową zgodnie z Mateosem i in. [1993] z niewielkimi modyfikacjami własnymi [Guz 1997].

Supernatant *A. hydrophila* F6/95 uzyskiwano z 24-godzinnej hodowli bakterii na bulionie tryptozowo-sojowym (TSB, Sigma, St Louis, USA) w temp. 28°C. Zawiesinę hodowli bakteryjnej doprowadzano do gęstości 1×10^7 CFU w 1 ml metodą spektrofotometryczną, a następnie wirovano 30 min przy 8000 x g w temp. 4°C.

Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy użyciu programu InStat.

WYNIKI

Zastosowanie siarczanu miedzi (grupa I) w kąpeli leczniczej dla ryb (0,3 mg L⁻¹ wody przez 12 godzin) spowodowało statystycznie istotne obniżenie inhibicyjnych właściwości śluzu i surowicy w stosunku do kazeinaz (43,0% dla śluzu; 65,0% dla surowic) w porównaniu z grupą kontrolną (64,2% dla śluzu; 79,2% dla surowic) i elastaz (31,5% dla śluzu; 32,0% dla surowic) supernatantu *A. hydrophila* F6/95 w porównaniu z grupą kontrolną (44,0% dla śluzu; 43,2% dla surowic) – rys. 1, 2.

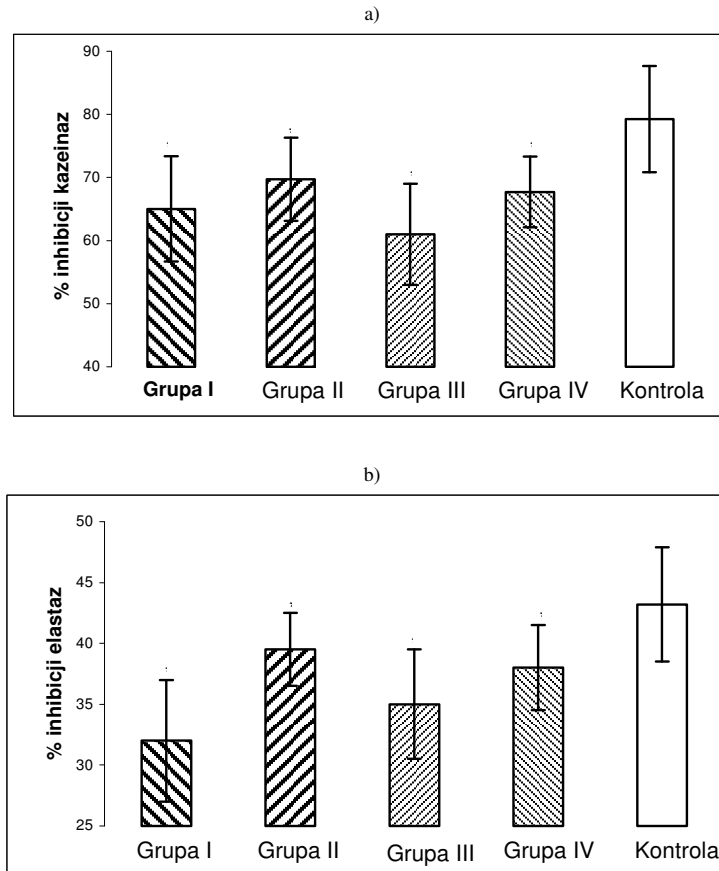
Zastosowanie Neguvonu (grupa II) w dawce 1 ppm w kąpeli trwającej 48 godzin spowodowało statystycznie istotne obniżenie inhibicyjnych właściwości śluzu i surowicy w stosunku do kazeinaz (57,0% dla śluzu; 69,7% dla surowic) w porównaniu z grupą kontrolną (64,2% dla śluzu, 79,2 dla surowic) i elastaz supernatantu *A. hydrophila* F6/95 (38,0% dla śluzu; 39,5% dla surowic) w porównaniu z grupą kontrolną (44,0% dla śluzu; 43,2% dla surowic) – rys. 1, 2.

Przebywanie ryb przez 3 i 10 dni w wodzie o pH 8,5–8,8 (grupa III i IV) spowodowało statystycznie istotne obniżenie inhibicyjnych właściwości śluzu i surowicy w stosunku do kazeinaz (w grupie III: 48,3% dla śluzu i 61,0% dla surowic; w grupie IV: 53,3% dla śluzu i 67,7% dla surowic) w porównaniu z grupą kontrolną (64,2% dla śluzu, 79,2 dla surowic) i elastaz supernatantu *A. hydrophila* F6/95 (w grupie III: 33,7% dla śluzu i 35,0% dla surowic; w grupie IV: 38,0% dla śluzu i 38,0% dla surowic) w porównaniu z grupą kontrolną (44,0% dla śluzu; 43,2% dla surowic) – rys. 1, 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

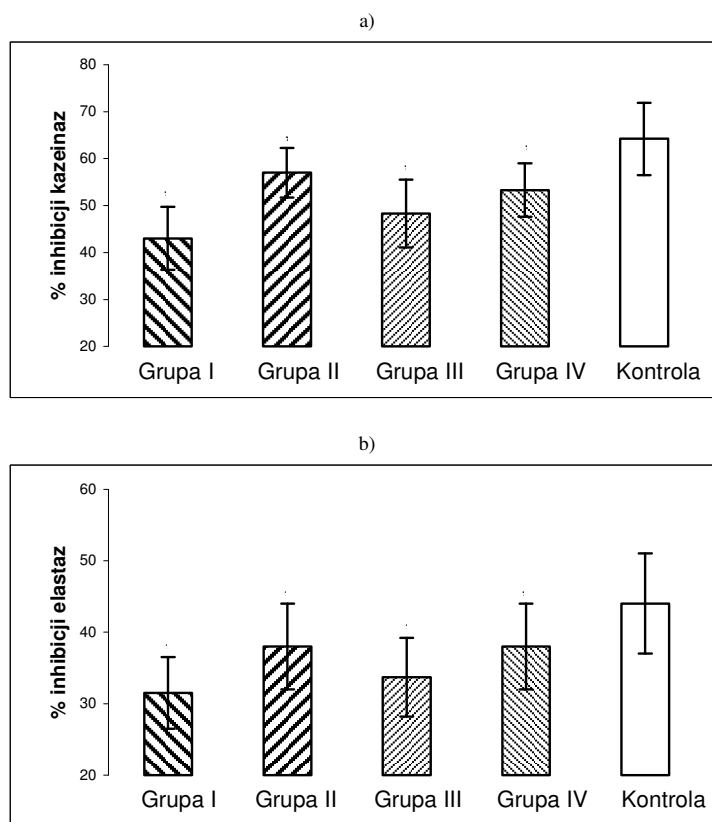
Uzyskane wyniki badań nad stopniem hamowania aktywności kazeinazowej i elastazowej supernatantu *A. hydrophila* F6/95 przez śluz i surowicę karpia poddanych w kąpeli działaniu siarczanu miedzi, w dawce 0,3 mg/l wody, wskazują na statystycznie istotne obniżenie inhibicyjnych właściwości śluzu i surowicy ryb. Należy przypuszczać, że po zastosowaniu kąpeli leczniczych u ryb przeciwko chorobom wywołanym przez grzyby, pierwotniaki i glony zwiększy się ich podatność na działanie bakteryjnych czynników

patogennych. Potwierdzają to badania innych autorów [Rodsæther i in. 1977; Knittel 1981; Baker i in. 1983]. Na działanie osłabiające układ odpornościowy ryb i zwiększenie podatności węgorzy na infekcje bakterii warunkowo chorobotwórczych po działaniu miedzi zwracają uwagę także inni autorzy [Rodsæther i in. 1977].



* ($p < 0,05$) różnica statystycznie istotna w porównaniu z grupą kontrolną – statistically significant difference in comparison with control group

Rys. 1. Hamujący wpływ surowic karpia poddanych działaniu: siarczanu miedzi, Neguvonu® i wapna palonego w stosunku do kazeinaz (a) i elastaz (b) bakterii z rodzaju *Aeromonas hydrophila* caseinases and elastases. Influence of copper sulphate, trichlorfon and burnt lime



* ($p < 0,05$) różnica statystycznie istotna w porównaniu z grupą kontrolną – statistically significant difference in comparison with control group

Rys. 2. Hamujący wpływ śluzu karpia poddanych działaniu: siarczaniu miedzi, Neguvonu® i wapna palonego w stosunku do kazeinaz (a) i elastaz (b) bakterii z rodzaju *Aeromonas*

Fig. 2. Inhibitory activity of the mucus of carp (*Cyprinus carpio* L.) in relation to *Aeromonas hydrophila* caseinases and elastases. Influence of copper sulphate, trichlorfon and burnt lime

Już wiele lat temu udowodniono, że preparaty fosforoorganiczne stosowane w leczeniu pasożytów zewnętrznych u karpia nie są bezpieczne, zarówno dla zdrowia ryb, jak i ludzi. Niektóre badania udowadniają ich supresyjne działanie na układ immunologiczny ryb [Cossarini-Dunier i in. 1987, 1990, 1991; Siwicki i in. 1990], jak również na zdrowie człowieka [Czeizel 1996]. W wielu krajach zachodnich zakazano stosowania trichlorfonu w akwakulturze. Badania własne dotyczące inhibicyjnego wpływu surowicy i śluzu karpia poddanych działaniu Neguvonu® w stosunku do kazeinaz i elastaz supernatantów *A. hydrophila* również zwracają uwagę na spadek potencjału obronnego karpia poprzez obniżenie hamującego działania śluzu i surowicy wobec bakterii patogennych.

W cyklu hodowlanym karpi wapno palone stosuje się często bezpośrednio do stawów w celach profilaktycznych i leczniczych. W dostępnym piśmiennictwie brak danych dotyczących wpływu wapna palonego na aktywność układu immunologicznego ryb. Na podstawie wyników uzyskanych w badaniach własnych należy przypuszczać, że wapno palone stosowane bezpośrednio do stawów obsadzonych rybami będzie miało niekorzystny wpływ na stan obronny ryb. Spadek aktywności inhibicyjnej śluzu i surowicy karpi w stosunku do kazeinaz i elastaz *Aeromonas hydrophila* powoduje obniżenie progę pierwszej bariery obronnej ryb, pozwalając na kolonizację i inwazję bakterii.

WNIOSKI

Stosowanie siarczanu miedzi, Neguvonu[®], jak również wapna palonego bezpośrednio do stawów w celach profilaktycznych i leczniczych znacznie obniża właściwości inhibicyjne śluzu i surowicy karpi w stosunku do proteaz supernatantów patogennych szczepów bakteryjnych. Spadek aktywności inhibicyjnej śluzu i surowicy karpi powoduje również obniżenie progę pierwszej bariery obronnej organizmu przeciwko drobnoustrojom.

PIŚMIENICTWO

- Antychowicz J. 1990: Choroby ryb akwariowych. PWRiL, Warszawa.
- Baker R. J., Knitte M. D., Fryer J. L. 1983: Susceptibility of chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum) and rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to infection with *Vibrio anguillarum* following sublethal copper exposure. J. Fish Dis. 6, 267–275.
- Bernatowicz S., Wolny P. 1969: Botanika rybacka. PWRiL, Warszawa.
- Blakley B., Brousseau P., Fournier M., Voccia I. 1999: Immunotoxicity of pesticides a review. Tox. Ind. Health 15, 119–132.
- Bradford M. M. 1976: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72 248–254.
- Cossarini-Dunier M., Monod G., Damael A., Lepot D. 1987: Effect of γ -hexachloro-cyclohexane (lindane) on carp (*Cyprinus carpio*). I. Effect of chronic intoxication on humoral immunity in relation to tissue pollution levels. Ecotoxicol. Environ. Saf. 13, 339–345.
- Cossarini-Dunier M., Damael A., Siwicki A. K. 1990: In vivo effect of an organophosphorus insecticide: Trichlorfon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). I. Effect of contamination on antibody production with residue levels in organs. Ecotoxicol. Environ. Saf., 19, 93–99.
- Cossarini-Dunier M., Siwicki A. K., Damael A. 1991: Effect of organophosphorus insecticides: Trichlorfon and dichlorvos on immune response of carp (*Cyprinus carpio*). III. In vitro effect on humoral response. Ecotoxicol. Environ. Saf. 22, 79–87.
- Czeizel A. E. 1996: Human germinal mutagenic effects in relation to international and accidental exposure to toxic agents. Environ. Health Prospect. 104, Suppl. 3, 615–617.
- Guz L. 1997: Czynniki wpływające na aktywność śluzu i surowicy karpi w stosunku do proteaz *Aeromonas hydrophila*. Praca doktorska. Lublin.
- Guziur J. 2001: Chów ryb w małych stawach. Oficyna Wydawnicza 'Hoza'. Warszawa.
- Knittel M. D. 1981: Susceptibility of steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson to redmouth infection *Yersinia ruckeri* following exposure to copper. J. Fish Biol. 4, 33–40.

- Leung K. Y., Stevenson R. M. W. 1988: Tn 5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Inf. Imm.* 56, 2639–2644.
- Mateos D., Anguita J., Naharro G., Paniagua C. 1993: Influence of growth temperature on the production of extracellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. appl. Bact.* 74, 111–118.
- Noga E. J. 1995: *Fish Disease: diagnosis and treatment*. Mosby-Year Book, Inc. pp. 141–142.
- Prost M. 1994: *Choroby ryb*. PTNW, Lublin.
- Schnick R. A., Meyer F. P., Walsh D. F. 1986: Status of fishery chemicals in 1985. *Prog. Fish-Cult.* 48, 1–17.
- Siwicki A. K., Cossarini–Dunier M., Studnicka M., Demael A. 1990: *In vivo* effect of an organophosphorus insecticide: Trichlorphon on immune response of carp (*Cyprinus carpio*): II. Effect of trichlorphon on nonspecific immune response in carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Safety* 19, 98–105.
- Stegman K., Wieniawski I. 1956: *Hodowla karpia*. W: *Hodowla ryb stawowych*. W. Gościński, A. Rudnicki (red). S. 147–317. PWRiL, Warszawa.
- Straus D. L. 2003: The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond water. *Aquaculture* 219, 233–240.
- Rodsæther M. C., Olafsen J., Raa J., Myhre K., Steen J. B. 1977: Copper as an initiating factor of vibriosis (*Vibrio anguillarum*) in eel (*Anguilla anguilla*). *J. Fish Biol.* 10, 17–20.
- Van Duijn C. 1973: *Diseases of fishes*. Iliffe Books Ltd., London.

SUMMARY

Copper sulphate, Neguvon and burnt lime are used for control and prophylaxis of parasitic infections in fish farms, and the effects of these chemicals on parasite infections have already been studied. However, the effect of copper sulphate, Neguvon and burnt lime on the serum and skin mucus inhibitory activity in relation to *A. hydrophila* proteases still needs elucidation. The present study revealed that the exposure of carp to copper sulphate, Neguvon and burnt lime affected the mucus and serum antiproteolytic activity. Limited exposure of fish on copper sulphate (0.3 mg L⁻¹; 12 h), Neguvon (1 ppm; 48 h) and burnt lime (3 d and 10 d; pH 8.5–8.8) inhibited inhibitory activity of mucus and serum in relation to *A. hydrophila* caseinases and elastases compared with control group.

Key words: *Aeromonas*, fish, proteases, copper sulphate, trichlorphon, burnt lime