

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

LESZEK GUZ

*Hamowanie aktywności proteazowej Aeromonas hydrophila
przez śluz i surowicę karpia (Cyprinus carpio L.)**
I. Wpływ sezonowości

Inhibitory activity of the mucus and serum of the carp
(*Cyprinus carpio* L.) in relation to *Aeromonas hydrophila* proteases
I. Seasonality

STRESZCZENIE

Karpie (*Cyprinus carpio* L.) są kęgowcami, które są ważnym gatunkiem hodowlanym w akwakulturze. Tak więc, jest potrzeba zdobywania wiadomości na temat biologii tego gatunku, a w szczególności układu immunologicznego. Celem niniejszej pracy było zbadanie inhibicyjnej aktywności śluzu i surowicy karpia w stosunku do proteaz *A. hydrophila*, w trzech różnych sezonach roku: wiosną, latem i jesienią.

W stosunku do bakteryjnych kazeinaz, procent inhibicyjnej aktywności (PIA) śluzu karpia pobranego wiosną przedstawia niższą aktywność (59,8% ±4,8), natomiast wyższą aktywność latem (64,7% ±6,7) i jesienią (71,5% ±3,4). W stosunku do elastaz, PIA śluzu był niższy wiosną (37,3% ±5,1) niż latem (47,2% ±6,5) i jesienią (49,1% ±4,7). PIA surowicy w stosunku do kazeinaz było niższe wiosną niż latem i jesienią, natomiast PIA surowicy w stosunku do elastaz wynosił odpowiednio: 40,7% ±5,5, 52,9% ± 3,7 i 55,2% ±3,7.

Wyniki te wskazują, że latem i jesienią inhibicyjna aktywność śluzu i surowicy karpia w stosunku do kazeinaz i elastaz *A. hydrophila* była wyższa. Potwierdza to hipotezę, że odpowiedź immunologiczna ryb zależna jest od pory roku.

Słowa kluczowe: *Aeromonas*, ryby, sezonowość, proteazy

WSTĘP

W odporności nieswoistej, mającej u ryb zasadnicze znaczenie w zwalczaniu czynników patogennych, biorą udział bariery anatomiczne, takie jak: ciągłość powłok skórnych i błon śluzowych przewodu pokarmowego, proces fagocytozy oraz nieswoiste mechanizmy humoralne. Na-

* Praca (cz. I, II i III) sponsorowana przez grant Komitetu Badań Naukowych nr 5 P06K 017 12.

skórek ryb pokryty jest stale odnawianą warstwą śluzu produkowanego przez komórki śluzowe [Fletcher i Grant 1968; Harris i Hunt 1973, Banerjee i Mittal 1975; Datta i Datta 1987]. Wydzielany śluz o dużej gęstości i lepkości utrudnia wnikanie i osiedlanie się mikroorganizmów w tkankach. Jego właściwości fizykochemiczne zwiększające lepkość warunkują wielkocząsteczkowe glikoproteiny, lipidy oraz fosfolipidy [Enomoto i in. 1964; Fletcher i Grant 1968; Fletcher i Grant 1969; Datta i Datta 1987; DiConza i Halliday 1989; Fouz i in. 1989].

Badania ostatnich lat wykazały, że zarówno śluz, jak i surowica krwi zawierają substancje czynne biologicznie, stanowiące składową układu immunologicznego [Fletcher i Grant 1969; Bradshaw i in. 1971; Harrel i in. 1976; Austin i McIntosh 1988; Alexander i Ingram 1992]. Należą do nich: białka antybakteryjne, lizozym, układ dopełniacza, białko C-reaktywne, lektyny, immunoglobuliny naturalne i inhibitory proteaz.

Czynnikami usposabiającymi do wystąpienia choroby u ryb są awitaminozy, organiczne zanieczyszczenia zbiorników wodnych, nadmierne zagęszczenie, gwałtowne zmiany temperatury, deficyt tlenowy, uszkodzenia mechaniczne powłok zewnętrznych, stres manipulacyjny, jak również obecność pasożytów zewnętrznych. Drobnoustrój po przełamaniu wszystkich barier zewnętrznych dociera do tkanki łącznej i wywołuje w niej odczyn zapalny. Choroba występuje jako infekcja miejscowa, objawiająca się przekrwieniami skóry i wrzodami, lub uogólniona, przy której stwierdza się obrzęki ciała, nastroszenie łusek, wysadzenie gałek ocznych, wybroczyny w skrzelach. Dotychczasowa nazwa tej choroby – *erythrodermatitis* [Pourreau 1990] wypierana jest przez nazwy nowe, szczegółowo określające czynnik etiologiczny choroby – bakterie wykazujące ruch z rodzaju *Aeromonas*. Dla choroby, której głównym czynnikiem etiologicznym jest *A. hydrophila*, objawiającej się tylko zmianami skórnymi, używa się nazwy MAI (Motile Aeromonad Infection) [Noga 1996], natomiast dla postaci uogólnionej – nazwy MAS (Motile Aeromonad Septicemia) [Kościńska 1996; Noga 1996].

Bakterie z rodzaju *Aeromonas* produkują pozakomórkowo egzotoksyny (ECP), do których należą: hemolizyny [Ljungh i in. 1981; Titball i Munn 1983], proteazy [Nieto i Ellis 1986], cytotoksyny [Asao i in. 1984; Welch 1991] nukleazy i acetylocholinoesteraza [Nieto i Ellis 1986, 1991; Nieto i in. 1991; Rodriguez i in. 1992, 1993] oraz endotoksyna – lipopolisacharyd obecny w ścianie komórkowej [Merino i in. 1996]. Wielu autorów zwraca szczególną uwagę na rolę hemolizyn i proteaz w patogenezie chorób bakteryjnych [Fletcher i Grant 1968; Shieh i MacLean 1975; Shieh 1982; Titball i Munn 1981, 1983; Howard i Buckley 1985; Sakai 1985]. Większość badań nad proteazami *A. hydrophila* dotyczyła ich izolacji i charakterystyki biochemicznej [Dahle 1971; Thune i in. 1982; Amborski i in. 1984; Leung i Stevenson 1988; Chabot i Thune 1991]. Nieliczne badania zwracają uwagę na rolę proteaz *A. hydrophila* w patogenezie choroby u karpia. Niektórzy uważają, że szczepy bakteryjne o wysokiej aktywności proteolitycznej charakteryzują się wyższą zjadliwością niż szczepy o niższej aktywności proteolitycznej [Kościńska 1996; Guz 1997]. Inni natomiast nie stwierdzają tej zależności [Allan i Stevenson 1981]. Pomimo ogromnego postępu w ostatnich latach w badaniach nad proteazami bakteryjnymi, ich rola w procesie patogenezy chorób bakteryjnych nie jest dotychczas wyjaśniona.

Zmienność metabolizmu u ryb w różnych porach roku jest znacznie wyraźniejsza niż u kręgowców wyższych. Stąd też do obiektywnej oceny aktywności śluzu i surowicy karpia wobec proteaz patogennych dla karpia szczepów bakteryjnych z rodzaju *Aeromonas* było poznanie wpływu na te parametry sezonu wiosennego, letniego i jesiennego.

MATERIAŁ I METODY

Badania wykonano u karpia o masie 150–300 g, odławianych ze stawów hodowlanych w różnych porach roku: wiosną, latem i jesienią. W każdym sezonie przebadano śluz od 240 ryb, natomiast krew od 60 ryb. Śluz i krew pobierano bezpośrednio po odłowieniu. Każdorazowo mierzono

temperaturę wody. Na podstawie badania klinicznego ryby użyte do doświadczenia były uznane za zdrowe. Śluz z powierzchni ciała zbierano mechanicznie (od 20 ryb na próbę), a krew pobierano pipetą pasterowską bezpośrednio z serca.

Przygotowanie śluzu do badania aktywności inhibicyjnej wobec proteaz bakteryjnych wykonano według metody własnej, polegającej na łagodnym wytrząsaniu zebranego śluzu z buforem fosforanowym (1:1) przez 2 godziny w temp. 4°C. Następnie otrzymaną mieszaninę wirowano przy 8000 x g przez 30 min w temp. 4°C. W uzyskanym supernatancie oznaczano poziom białka całkowitego metodą Bradforda [1976]. W badanych próbach doprowadzano poziom białka całkowitego do stężenia 0,125 g% przy użyciu 0,1 M buforu fosforanowego. Po wstępnej inkubacji przygotowanego śluzu (30 min w temp. 28°C) z supernatantem bakterii, postępowano zgodnie z następującą procedurą. Kontrolę stanowiła mieszanina buforu, supernatantu bez śluzu oraz odpowiedniego substratu. Próbę zerową stanowiła mieszanina śluzu, buforu oraz odpowiedniego substratu. Procent aktywności inhibicyjnej śluzu w stosunku do proteaz bakteryjnych wyliczano wg wzoru:

$$\text{AI śluzu} = \frac{(\text{próba badana} - \text{próba zerowa}) \times 100}{\text{próba kontrolna}}$$

Uzyskane surowice służyły do badania ich właściwości inhibicyjnych w stosunku do proteaz (kazeinaz i elastaz) supernatantu patogennych dla karpki bakterii *A. hydrophila* F6/95. W tym celu równą objętość surowicy i supernatantu inkubowano przez 30 min w 28°C. Kontrolę stanowiła mieszanina buforu, supernatantu bez surowicy oraz odpowiedniego substratu, a próbę zerową – mieszanina surowicy, buforu oraz odpowiedniego substratu. Procent aktywności inhibicyjnej surowicy w stosunku do proteaz bakteryjnych wyliczano według wzoru:

$$\text{AI surowicy} = \frac{(\text{próba badana} - \text{próba zerowa}) \times 100}{\text{próba kontrolna}}$$

Określenie stopnia aktywności kazeinazowej. 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 wirowano 30 min przy $8000 \times g$ w temp. 4°C.

Określenie stopnia aktywności kazeinazowej przeprowadzano w obecności azokazeiny (Sigma, St Louis, USA) jako substratu metodą Leunge'a i Stevensona [1988] z niewielkimi modyfikacjami własnymi. Mieszaninę reakcyjną zawierającą 0,1 ml 10% azokazeiny, 0,1 ml supernatantu badanego szczepu bakteryjnego i 2 ml 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,0) inkubowano przez 4 godz. w temp. 28°C. Następnie w celu zatrzymania reakcji dodano 2 ml 10% kwasu trójchlorooctowego i pozostawiono na 30 min, po czym wirowano przy $10\,000 \times g$ przez 15 min. Uzyskany w ten sposób supernatant używano do oznaczeń fotometrycznych. Równe ilości supernatantu i 1 M NaOH mieszano, a następnie mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm. Próbę zerową stanowiła mieszanina reakcyjna danego szczepu bakteryjnego, do której dodano przed inkubacją kwasu trójchlorooctowego. Aktywność oznaczano w jednostkach kazeinazowych wg Mateosa i in. [1993], a następnie przeliczano na procent aktywności kazeinazowej [Guz 1997].

Określenie stopnia aktywności elastazowej. Supernatant patogennego dla karpki szczepu *A. hydrophila* F6/95 uzyskiwano jak poprzednio. Mieszanina reakcyjna zawierała: 1 ml supernatantu z hodowli bakteryjnej, 2 ml 0,1 M buforu tris-maleinianowego o pH 7,0, zawierającego 0,001 M CaCl₂ i 10 mg Elastin-Congo red. Elastin-Congo red (Sigma, St Louis, USA), którego użyto jako substratu według metody Bjorne'a i in. [1979]. Mieszaninę inkubowano w temp. 28°C przez 24 godz. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 2 ml 0,7 M buforu fosforanowego o pH 6,0. Po 30 min wirowano przy $10\,000 \times g$ przez 15 min. Uzyskany supernatant używano do oznaczeń

fotometrycznych przy długości fali 490 nm. Próbę zerową stanowiło 3 ml buforu tris-maleinianowego, pH 7,0, zawierającego 0,001 M CaCl₂ i 10 mg Elastin-Congo red. Aktywność podano w jednostkach elastazowych wg Mateosa i in. [1993], a następnie przeliczano na procent aktywności elastazowej.

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

WYNIKI I OMÓWIENIE

Wpływ śluzu i surowic karpia (uzyskiwanych wiosną, latem i jesienią) na aktywność kazeinazową i elastazową supernatantu patogenego dla karpia szczepu *A. hydrophila* F6/95 przedstawiono na rys. 1 i 2.

W badaniach stwierdzono, że średni procent inhibicji śluzu i surowicy w stosunku do kazeinaz i elastaz supernatantów bakteryjnych był najniższy wiosną. Wartości te dla badanych surowic były statystycznie istotnie niższe wiosną (dla kazeinaz 58,2% ±5,8; dla elastaz 40,7% ±5,5) niż latem (dla kazeinaz 74,5% ±4,8; dla elastaz 52,9% ±3,7) i jesienią (dla kazeinaz 76,3% ±5,0; dla elastaz 55,2% ±3,7).

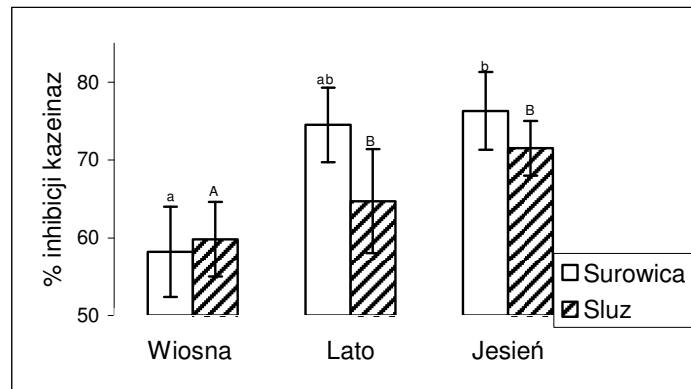
Wyniki uzyskane latem i jesienią nie różniły się między sobą statystycznie istotnie. Wartości dla badanego śluzu w stosunku do kazeinaz były istotnie niższe wiosną (59,8% ±4,8) i latem (64,7% ±6,7) niż jesienią (71,5% ±3,4), natomiast w stosunku do elastaz były istotnie niższe wiosną (37,3% ±5,1) niż latem (47,2% ±6,5) i jesienią (49,1% ±4,7).

Liczne badania zwracają uwagę na uzależnienie procesów metabolicznych ryb i ich aktywności immunologicznej od temperatury wody [Avtalion i in. 1970; Avtalion 1981; Sypek i Burreson 1983, Miller i Clem 1984; Sheldon i Blazer 1991]. Nie prowadzono natomiast badań dotyczących wpływu temperatury wody i pór roku na inhibicyjne właściwości śluzu i surowicy ryb wobec czynników patogennych.

Wyniki badań własnych wskazują, że aktywność inhibicyjna śluzu i surowicy karpia w stosunku do kazeinaz i elastaz supernatantów patogennych szczepów bakteryjnych były niższe wiosną (temperatura wody 8–10°C) niż latem (19–24°C) i jesienią (10–12°C). Na podstawie otrzymanych wyników można tłumaczyć większą podatność ryb na wystąpienie MAI/MAS zależnością głównie od pór roku. Zwraca na to uwagę wielu autorów [Avtalion i in. 1970; Avtalion 1981; Antychowicz 1988; Pourreau 1990].

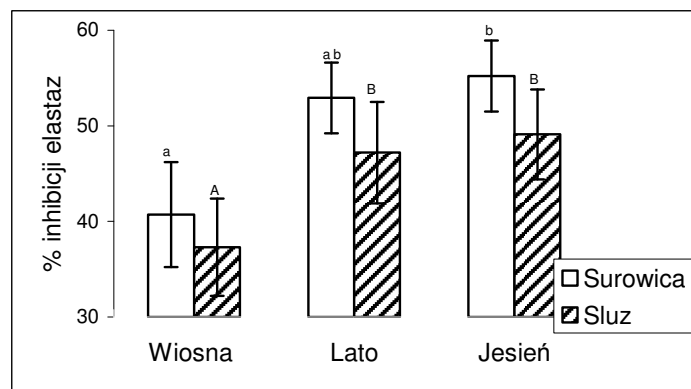
Większość autorów badających parametry odporności nieswoistej u ryb koncentruje uwagę na zależności stanu badanych wskaźników immunologicznych od temperatury, natomiast nie zwraca uwagi na bezpośrednią zależność aktywności inhibicyjnych śluzu i surowicy wobec proteaz bakteryjnych w różnych porach roku, przy różnych temperaturach wody.

Otrzymane wyniki pozwalają ocenić potencjał obronny śluzu i surowicy ryb przeciwko czynnikom patogennym, jakim są proteazy. Jednak niezbędne są dalsze badania do zrozumienia szczegółowych mechanizmów tego procesu.



Rys. 1. Wpływ śluzu i surowic karpia na procent inhibicji kazeinaz szczepów patogennych *A. hydrophila*: a, b – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami surowic pobranych od karpia w różnych sezonach roku; A, B – różnice statystycznie istotne pomiędzy grupami śluzu pobranego od karpia w różnych sezonach roku

Fig. 1. The effect of mucus and serum of carp on the percent inhibitory activity of caseinases pathogenic for carp strains of *A. hydrophila*: a, b – statistically significant differences between groups of serum in different seasons of year; A, B – statistically significant differences between groups of mucus in different seasons of year



Rys. 2. Wpływ śluzu i surowic karpia na procent inhibicji elastaz szczepów patogennych *A. hydrophila*
 Fig. 2. The effect of mucus and serum of carp on the percent inhibitory activity of elastases pathogenic for carp strains of *A. hydrophila*

WNIOSKI

Pory roku mają wyraźny wpływ na aktywność inhibicyjną śluzu i surowicy karpia zdrowych w stosunku do kazeinaz i elastaz supernatantów patogennych dla nich szczepów bakteryjnych.

Aktywność inhibicyjna śluzu i surowicy karpia zdrowych była znacznie niższa wiosną niż latem i jesienią. Obserwowana podobna temperatura wody wiosną i jesienią pozwala wnioskować o większym wpływie pory roku na tę zależność niż temperatury wody. Tym też można tłumaczyć zwiększoną podatność ryb w okresie wiosennym na działanie bakteryjnych czynników patogennych.

PIŚMIENNICTWO

- Alexander J. B., Ingram G. A. 1992: Noncellular nonspecific defence of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 249–279.
- Allan B. J., Stevenson R. M. W. 1981: Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. Microbiol.* 27, 1114–1122.
- Amborski R. L., Borall R., Thune R. L. 1984: Effects of short-term cold storage on recovery of proteases from extracellular products of *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* 18, 456–458.
- Antychowicz J. 1988: Etiologia i patogenezę erythrodermatitis karpia. Rozprawa habilitacyjna. Puławy.
- Asao T., Kinoshita Y., Kozaki S., Uemura T., Sakaguchi G. 1984: Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Inf. Imm.* 46, 122–127.
- Austin D. A., McIntosh D. 1988: Natural antibacterial on the surface of rainbow trout, *Salmon gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.* 14, 864–872.
- Avtalion R. R., Malik Z., Lefler E., Katz E. 1970: Temperature effect on immune resistance of fish to pathogens. *Bamidgeh* 2, 33–38.
- Avtalion R. R. 1981: Environmental control of the immune response in fish. *Crit. Rev. Environ. Control* 11, 163–188.
- Banerjee T. K., Mittal A. K. 1975: Histochemistry and the functional organization of the skin of a live-fish *Clarias batrachus* (Linn.). *Mikroskopie* 3, 333–349.
- Bjorn M. J., Sokol P. A., Iglewski B. W. 1979: Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bact.* 138, 193–200.
- 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.
- Bradshaw C. M., Richard A. S., Sigel M. M. 1971: IgM antibodies in fish mucus. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 136, 1122–1124.
- Chabot D. J., Thune R. L. 1991: Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 14, 2, 171–183.
- Dahle H. K. 1971: The purification and some properties of *Aeromonas* proteinases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Section B.* 79, 726–738.
- Datta S. Datta S. C. 1987: Purification and characterization of fish surface mucin. *Ital. J. Physiol.* 36, 143–152.
- Di Conza J. L., Halliday W. J. 1989: Relationship of catfish serum antibodies to immunoglobulin in mucus secretions. *Austr. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 49, 517–519.
- Enomoto N., Nakagawa H., Tomiyasu Y. 1964: Studies on the external mucous substance of fishes – IX. Preparation of crystalline N-acetylmuramic acid from the external mucous substance of loach. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 6, 495–499.

- Fletcher T. C., Grant P. T. 1968: Glycoproteins in the external mucous secretions of the plaice (*Pleuronectes platessa*) and other fishes. *Biochem. J.* 106, 12P.
- Fletcher T. C., Grant P. T. 1969: Immunoglobulins in the serum and mucus of the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). *Biochem. J.* 115, 65–69.
- Fouz B., Devesa S., Gravningen K., Bareja J. L., Toranzo A. E. 1989: Antimicrobial activity of the skin mucus of turbot. IV E. A. E. P. International Conference „Diseases of fish and shellfish” Santiago de Compostella, 24–28.
- Guz L. 1997: Czynniki wpływające na aktywność śluzu i surowic karpia w stosunku do proteaz *Aeromonas hydrophila*. Praca doktorska. Lublin.
- Harris J., Hunt S. 1973: Histochemical analysis of mucous cells in the epidermis of brown trout *Salmo trutta*, L. *J. Fish Biol.* 5, 345–551.
- Harel L. W., Ettliger H. M., Hodgins H. O. 1976: Humoral factors important in resistance of salmonid fish to bacterial disease. II. Anti-*Vibrio anguillarum* activity in mucus and observations on complement. *Aquacult.* 7, 363–370.
- Howard S. P., Buckley J. T. 1985: Activation of the hole-forming toxin aerolysin by extracellular processing. *J. Bact.* 163, 336–340.
- Kozińska A. 1996: Wskaźniki patogenności *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae* i *Aeromonas sobria*. Praca doktorska. Puławy.
- 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.
- Ljungh A., Wretling B., Molley R. 1981: Separation and characterization of enterotoxin and two haemolysins from *Aeromonas hydrophila*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect B.* 89, 387–397.
- 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.
- Merino S., Rubires X., Aguillar A., Tomas J. M. 1996: The O:34- antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Letters* 138, 97–101.
- Miller N. W., Clem L. W. 1984: Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish in vitro antibody responses to thymus-dependent and thymus independent antigens. *J. Immun.* 133, 2356–2359.
- Nieto T. P., Ellis A. E. 1986: Characterization of extracellular metallo- and serine-proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B51. *J. Gen. Microbiol.* 132, 1975–1979.
- Nieto T. P., Santos Y., Rodriguez L. A., Ellis A. E. 1991: An extracellular acetylcholinesterase produced by *Aeromonas hydrophila* is a major lethal toxin for fish. *Microb. Pathogenesis* 11, 101–110.
- Nieto T. P., Ellis A. E. 1991: Heterogeneity of extracellular proteases produced by different isolates of *Aeromonas hydrophila* and *A. sobria* pathogenic for fish. *J. Fish Dis.* 14, 229–235.
- Noga E. J. 1996: Fish Disease: diagnosis and treatment. Mosby-Year Book, Inc. pp. 141–142.
- Pourreau C. N. 1990: Carp erythrodermatitis: host defense pathogen interaction. Praca doktorska. Wageningen.
- Rodriguez L. A., Ellis A. E., Nieto T. P. 1992: Effects of the acetylcholinesterase toxin of *Aeromonas hydrophila* on the central nervous system of fish. *Microb. Pathogenesis* 13, 17–24.
- Rodriguez L. A., Fernandez A. I. G., Nieto T. P. 1993: Production of the lethal acetylcholinesterase toxin by different *Aeromonas hydrophila* strains. *J. Fish Dis.* 16, 73–78.
- Sakai D. K. 1985: Loss of virulence in a protease-deficient mutant of *Aeromonas salmonicida*. *Inf. Imm.* 48, 146–152.
- Sheldon W. M., Blazer V. S. 1991: Influence of dietary lipid and temperature on bactericidal activity of channel catfish macrophages. *J. Aq. Anim. Health* 3, 87–93.
- Shieh H. S., Mac Lean J. L. 1975: Purification and properties of an extra-cellular protease of *Aeromonas salmonicida*, the causative agent of furunculosis. *Int. J. Biochem.* 6, 653–656.

- Shieh H. S. 1982: Lethal toxicity of *Aeromonas salmonicida* protease to *Atlantic salmon*. Microbios Lett. 20, 137–139.
- Sypek J. P., Burreson M. 1983: Influence of temperature on the immune response of juvenile summer flounder, *Paralichthys dentatus*, and its role in the elimination of *Trypanoplasma bullocki* infections. Dev. Comp. Immunol. 7, 277–286.
- Thune R. L., Graham T. E., Riddle L. M., Amborski R. L. 1982: Extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*: partial purification and effects on age-0 channel catfish. Trans. Am. Fish. Soci. 111, 749–754.
- Titball R. W., Munn C. B. 1981: Evidence for two haemolytic activities from *Aeromonas salmonicida*. FEMS Microbiol. Letters 12, 27–30.
- Titball R. W., Munn C.B. 1983: Partial purification and properties of a haemolytic activity (T-lysin) from *Aeromonas salmonicida*. FEMS Microbiol. Letters 20, 2207–2210.
- Welch R. A. 1991: Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria. Mol. Microbiol. 5, 521–528.

SUMMARY

The carp (*Cyprinus carpio* L.) is a teleost fish which has always been an important species for aquaculture. As such, there is a need for basic data on the biology of this species and in particular for the immune system. Thus, the aim of this study was to investigate the inhibition activity of mucus and serum of carp in relation to *A. hydrophila* proteases in three different seasons: spring, summer, and autumn. In relation to bacterial caseinases, percent inhibition activity (PIA) of carp mucus taken during the spring demonstrated the lowest activity (59.8% \pm 4.8), whilst the greatest activity in summer (64.7% \pm 6.7) and autumn (71.5% \pm 3.4). In relation to elastases, PIA of mucus were lower during the spring (37.3% \pm 5.1) than in summer (47.2% \pm 6.5) and autumn (49.1% \pm 4.7). PIA serum in relation to caseinases were lower in spring (58.2% \pm 5.8) than in summer (74.5% \pm 4.8) and autumn (76.3% \pm 5.0), whilst PIA of serum in relation to elastases were 40.7% \pm 5.5, 52.9% \pm 3.7 and 55.2% \pm 3.7 respectively. These results clearly showed that during the spring and autumn there was a strong increase in inhibitory activity of carp mucus and serum in relation to *A. hydrophila* caseinases and elastases, and are consistent with the hypothesis that immune response of fish is dependent on season of year.

Key words: *Aeromonas*, fish, seasonality, proteases