
ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN – POLONIA

VOL. LX, 13

SECTIO DD

2005

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.)
II. Wpływ stresu transportowego*

Inhibitory activity of the mucus and serum of carp (*Cyprinus carpio* L.)
in relation to *Aeromonas hydrophila* proteases
II. Effect of transport stress

STRESZCZENIE

Wiadomo, że odpowiedź immunologiczna zwierząt zmiennocieplnych zależy od pory roku. W celu określenia jak zmienia się antyproteolityczna aktywność surowicy i śluzu z powierzchni ciała karpia w różnych porach roku pod wpływem stresu wykonaną niniejszą pracę.

Zbadano poziom hamowania aktywności bakteryjnych proteaz przez śluz i surowice karpia zdrowych poddanych działaniu stresu transportowego. Wpływ śluzu karpia poddanych stresowi transportowemu w sezonie wiosennym, letnim i jesiennym na procent hamowania bakteryjnych kazeinaz był statystycznie niższy u ryb poddanych stresowi niż w grupach kontrolnych. Hamowanie bakteryjnych elastaz było znacząco niższe w porównaniu z grupą kontrolną u ryb poddanych stresowi, tylko w sezonie wiosennym. Wpływ surowicy karpia na procent hamowania bakteryjnych proteaz, kazeinaz i elastaz był znacząco niższy u ryb poddanych stresowi w sezonie wiosennym, letnim i jesiennym.

Słowa kluczowe: *Aeromonas*, stres, proteazy

WSTĘP

W gospodarstwach hodujących ryby jednym z bardziej ważnych czynników oddziałujących ujemnie na zdrowotność ryb są ich częste odłowy i stres wywołany transportem [Ross i Ross 1999; Urbinati i in. 2004]. Szczególnie niekorzystnie działa na ryby odłów wiosenny, kiedy ryby mają osłabioną odporność ogólną po długim okresie zimowania [Stegman i Wieniawski 1956].

Pomimo postępu w badaniach nad proteazami bakteryjnymi, ich rola w patogenezie chorób ryb nie jest dokładnie poznana [Shotts i in. 1985; Pourreau 1990; Chabot i Thune 1991]. Również nie jest dokładnie poznana rola inhibitorów proteaz bakteryjnych zawartych w śluzie i surowicy

ryb, jak również rola czynników mogących powodować osłabienie aktywności tych inhibitorów. Poznanie tych zależności wyjaśniłoby przyczyny osłabienia inhibicyjnych właściwości śluzu i surowicy ryb w stosunku do proteaz bakteryjnych i wystąpienia choroby. Dotychczasowe badania skupiają się głównie na charakterystyce poszczególnych wskaźników odporności immunologicznej ryb zdrowych i chorych, natomiast w niewielkim stopniu dotyczą wzajemnych zależności pomiędzy układem proteolitycznym bakterii a układem inhibicyjnym śluzu i surowicy ryb. Wydaje się, że układ ten powinien być zależny od szeregu czynników środowiskowych, a wyjątkowa wrażliwość ryb na wpływ tych czynników (temperatura, pory roku, stres manipulacyjny) może być przyczyną okresowych zmian w ich podatności na wystąpienie chorób wirusowych, bakteryjnych i pasożytniczych.

Ryby hodowlane, a w tym karpie, są narażone w znacznie większym stopniu niż ryby niehodowlane na czynniki stresowe. Podczas cyklu produkcyjnego w stawach odbywa się kilkakrotny odłów i transport ryb. Dlatego też założeniem pracy było poznanie wpływu tych czynników stresowych na aktywność śluzu i surowicy karpia w stosunku do proteaz szczepów bakteryjnych z rodzaju *Aeromonas* patogennych dla karpia.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem do badań był śluz i krew pobrane od karpia bezpośrednio po transporcie do Lublina z obiektu hodowlanego w Zagrodzie (odległość ok. 80 km). Badania prowadzono wiosną, latem i jesienią. Jednorazowo w każdym sezonie pobierano śluz od około 120 ryb do 6 prób (od 20 ryb do każdej), natomiast krew od 50 ryb. Kontrolę stanowiły ryby, od których pobrano śluz i krew bezpośrednio po odłowieniu. Uzyskany śluz i surowice służyły do badania ich właściwości inhibicyjnych w stosunku do aktywności kazeinazowej i elastazowej supernatantu patogennej dla karpia bakterii *A. hydrophila* F6/95. Supernatant uzyskiwano z 24-godzinnej hodowli bakterii na bulionie tryptozowo-sojowym (TSB, Sigma i 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 [Guz 1997].

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

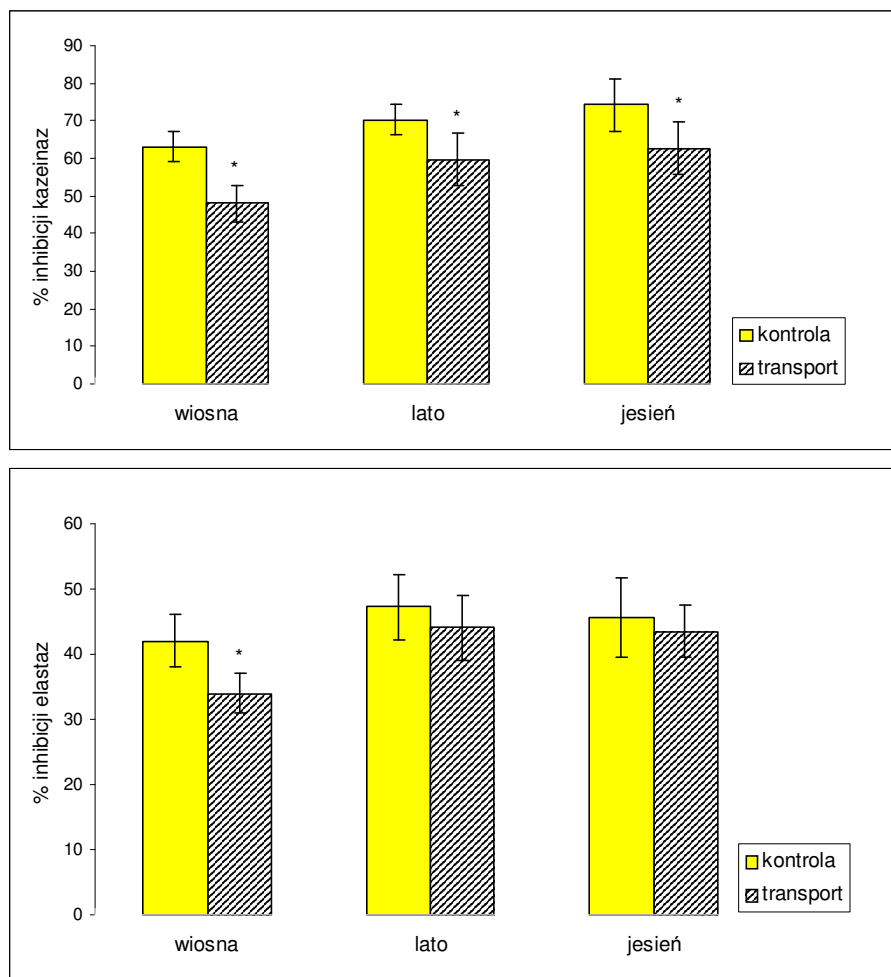
Uzyskane wyniki badań poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy użyciu programu InStat.

WYNIKI

Średni procent inhibicji aktywności kazeinazowej supernatantu *A. hydrophila* F6/95 przez śluz karpia był statystycznie istotnie niższy po transporcie ryb zarówno wiosną, latem i jesienią niż u ryb grupy kontrolnej, niepoddanej działaniu tego czynnika. Różnice statystycznie istotne kształtowały się na poziomie $p > 0,05$ (rys. 1).

Średni procent inhibicji aktywności elastazowej supernatantu *A. hydrophila* F6/95 przez śluz karpia był statystycznie istotnie niższy po transporcie ryb wiosną niż u ryb grupy kontrolnej ($p < 0,05$). Wyniki uzyskane latem i jesienią nie różniły się statystycznie istotnie od wyników grupy kontrolnej (rys. 1).

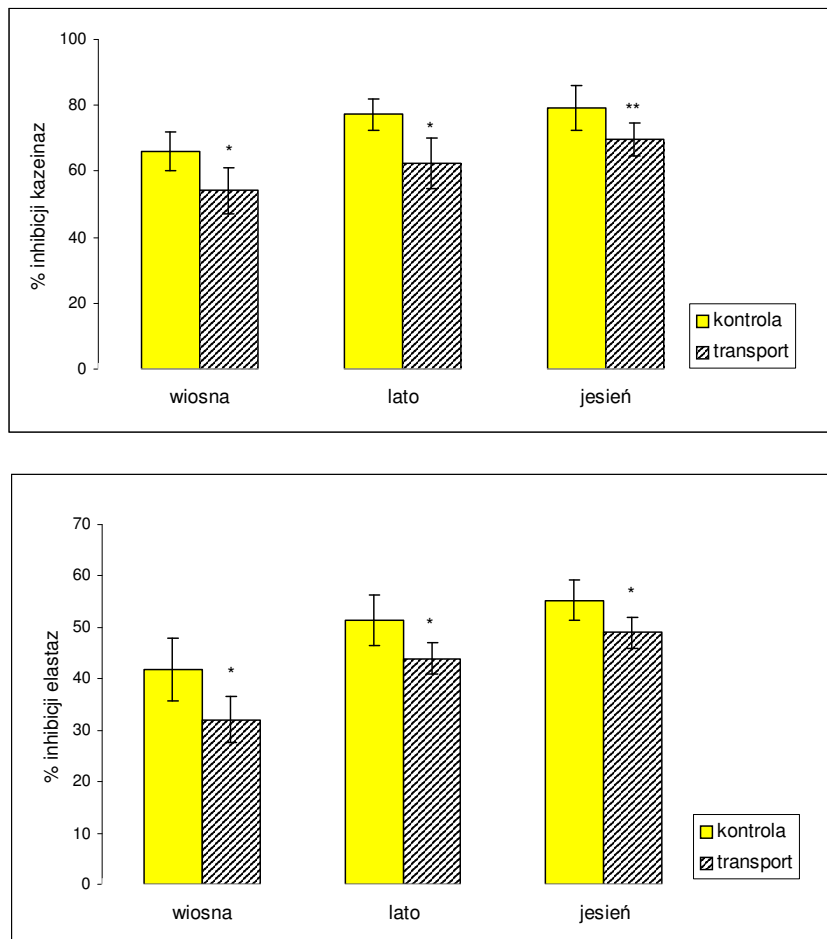
Średni procent inhibicji aktywności kazeinazowej i elastazowej supernatantu bakterii *A. hydrophila* przez surowice karpia był statystycznie istotnie niższy po transporcie ryb zarówno wiosną, latem i jesienią niż u ryb grupy kontrolnej (rys. 2).



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

Rys. 1. Wpływ śluzu karpi transportowanych w okresie wiosennym, letnim i jesiennym na procent inhibicji aktywności bakteryjnych kazeinaz i elastaz

Fig. 1. The effect of mucus of carps under the influence of transport stress in such seasons as: spring, summer, and autumn, on the percentage of inhibition of bacterial caseinases and elastases activity



*($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) – różnice statystycznie istotne w porównaniu z grupą kontrolną
– statistically significant differences in comparison with control group

Rys. 2. Wpływ surowic karpí transportowanych w okresie wiosennym, letnim i jesiennym na procent inhibicji aktywności bakteryjnych kazeinaz i elastaz

Fig. 2. The effect of serum of carps under the influence of transport stress in such seasons as: spring, summer, and autumn, on the percentage of inhibition of bacterial caseinases and elastases activity

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Intensywna hodowla ryb powoduje, że zwierzęta te są narażone na działanie wielu czynników stresotwórczych, do których należą: duże zagęszczenie ryb, deficyt tlenu,

wysoki poziom szczególnie toksycznych metabolitów, np. amoniaku, oraz wszelkie manipulacje jak odłów i transport [Rottmann i in. 1992]. Udowodniono, że ryby przebywające w dużym zagęszczeniu wydzielają feromonopodobne substancje, które wpływają supresyjnie na układ immunologiczny [Avtalion 1981]. Niektóre prace zwracają szczególną uwagę na transport jako silny czynnik stresotwórczy dla ryb [Wohlfarth i in. 1970; Pickering i in. 1982; Sopińska 1983, 1984; Zapata i in. 1992; Yin 1995]. W następstwie działania tego czynnika stwierdzano wzrost zachorowalności i śmiertelności u ryb. Przyczyną tego jest przypuszczalnie, podobnie jak u kręgowców wyższych, osłabienie układu immunologicznego.

Wyniki badań własnych dotyczące aktywności inhibicyjnej śluzu i surowicy karpia na aktywność kazeinazową i elastazową supernatantów patogennych dla karpia szczepów bakteryjnych z rodzaju *Aeromonas* wskazują na znaczne obniżenie stopnia hamowania aktywności proteolitycznej bakterii przez śluz i surowicę karpia transportowych zarówno wiosną, latem i jesienią (rys. 1, 2). Badania te szczegółowo wyjaśniają bezpośrednią zależność aktywności obronnej ryb przeciw drobnoustrojom od działania czynników stresotwórczych.

WNIOSKI

Transport, będąc przyczyną stresu u ryb, znacznie obniża stopień hamowania aktywności proteolitycznej bakterii przez śluz i surowicę karpia zdrowych. Zależność tę stwierdzano wiosną, latem i jesienią. Dlatego też można przypuszczać, że w następstwie działania czynnika stresowego nastąpił wzrost podatności ryb na infekcje bakteryjne.

PIŚMIENNICTWO

- Avtalion R. R. 1981: Environmental control of the immune response in fish. *Crit. Rev. Environm. Control* 11, 163–188.
- 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, 171–183.
- Guz L. 1997: Czynniki wpływające na aktywność śluzu i surowicy karpia w stosunku do proteaz *Aeromonas hydrophila*. Praca doktorska. Lublin.
- Leung K. Y., Stevenson R. M. W. 1988: Characteristics and distribution of extracellular proteases from *Aeromonas hydrophila*. *J. gen. Microbiol.* 134, 151–160.
- 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.
- Pickering A. D., Pottinger T. G., Christie P. 1982: Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.* 20, 229–244.
- Pourreau C. N. 1990: Carp erythrodermatitis: host defense pathogen interaction.
- Ross L. G., Ross B. 1999: Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals. Blackwell Science, Oxford, p. 159.
- Rottmann R.W., Francis-Floyd R., Durborow R. 1992: The role of stress in fish disease. SRAC Publication 474, 1–3.

- Shotts E. B. Jr., Hsu T. C., Waltman W. D. 1985: Extracellular proteolytic activity of *Aeromonas hydrophila* complex. *Fish Pathol.* 20, 37–44.
- Sopińska A. 1983: Effect of physiological factors, stress, and disease on hematological parameters of carp, with a particular reference to leucocyte pattern. I. Variability of haematological indices of carp in relation to age and gonad maturity stage. *Acta Ichtiol. et Piscat.* 13, 59–81.
- Sopińska A. 1984: Effect of physiological factors, stress, and disease on haematological parameters of carp, with a particular reference to leucocyte pattern. II. Hematological results of stress in carp. *Acta Ichtiol. et Piscat.* 14, 121–139.
- Stegman K., Wieniawski I. 1956: *Hodowla karpia*. W: *Hodowla ryb stawowych*. W. Gościński, A. Rudnicki (red). S. 147-317. PWRiL, Warszawa.
- Urbinati E. C., de Abreu J. S., de Silva-Camargo A. C., Parra M.A.L. 2004: Loading and transport stress of juvenile matrinxa (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* 229, 389–400.
- Wohlfarth G., Lachman M., Moav R. 1970: The effects of transport and rough handling on growth rate of carp fingerlings. *Bamidgeh* 22, 39–41.
- Yin Z., Lam T. J., Sin Y. M. 1995: The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L). *Fish Shellfish Immunol.* 5, 519–529.
- Zapata A. G., Varas A., Torroba M. 1992: Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. *Immunol. Today*, 13, 142–147.

SUMMARY

It is known that immune response of ectothermal animals varies seasonally. The present study was investigated in order to understand how the carp skin mucus and serum antiproteolytic activity changes in different seasons under the influence of transport stress. In this study, the level of inhibition of bacterial proteases activities by serum and mucus of healthy carps under the influence of transport stress, was investigated. The effect of mucus of carps being under the influence of transport stress in such seasons as: spring, summer and autumn, on the percentage of inhibition of bacterial caseinases was significantly lower in case of fish being under the influence of stressful conditions than in control groups. On the other hand, only in spring the inhibition of bacterial elastases was significantly lower in case of fish being under the influence of stressful conditions than in the control group. The effect of carp serum on the percentage of inhibition of bacterial proteases, caseinases and elastases was significantly lower in case of fish being under the influence of stressful conditions in such seasons as: spring, summer and autumn.

Key words: *Aeromonas*, stress, proteases