

# Wpływ jonów metali na aktywność proteolityczną bakterii z rodzaju *Aeromonas*

LESZEK GUZ

Zakład Chorób Ryb i Biologii Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,  
ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin

Guz L.

## Influence of metal ions on *Aeromonas* supernatant protease activity

### Summary

*Aeromonas* organisms are widely distributed in aquatic environments and are also recognized as being pathogens in a variety of animals and humans. The aim of the study was to determine the effect of metal ions ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) and protease inhibitors (PMSF, EDTA, E-64) on the activity of *Aeromonas* supernatant caseinase and elastase activity. Sixteen strains of bacteria isolated from MAI/MAS diseased carp, identified as *A. hydrophila* (n=13) and *A. sobria* (n=3) were used in the study. Zinc and copper inhibited *Aeromonas* supernatant caseinase activity, where zinc, copper and iron inhibited elastase activity.

**Keywords:** *Aeromonas*, fish, protease

Bakterie z rodzaju *Aeromonas* powszechnie występują w środowisku wodnym i są czynnikiem etiologicznym wielu chorób ryb, a także płazów i ssaków. Produkują one egzotoksyny, do których należą m.in. proteazy, hemolizyny, lipazy, enterotoksyny, cytotoksyny (1, 10, 11). Wielu autorów zwraca uwagę na rolę hemolizyn i proteaz w patogenezie choroby MAI/MAS (motile *Aeromonas* infection/motile *Aeromonas* septicemia) karpia. Proteazy bakterii z rodzaju *Aeromonas* odgrywają ważną rolę w patogenezie choroby MAI/MAS u wielu gatunków ryb. Szczepy bakteryjne o wysokiej aktywności proteolitycznej charakteryzują się zazwyczaj wyższą zjadliwością niż szczepy o niższej aktywności proteolitycznej (7, 8).

Wykazano, że aktywność inhibicyjna śluzu i surowicy karpia zdrowych w stosunku do proteaz *A. hydrophila* jest niższa wiosną niż latem i jesienią (4). Również transport, będąc przyczyną stresu u ryb, znacznie obniża stopień hamowania aktywności proteolitycznej bakterii przez śluz i surowicę karpia. Zależność tę stwierdzono wiosną, latem i jesienią (5). Stwierdzono również, że stosowanie siarczanu miedzi, trichlorfonu i wapna palonego w leczeniu ryb obniża właściwości inhibicyjne śluzu i surowicy karpia w stosunku do proteaz supernatantów patogennych dla karpia bakterii z rodzaju *Aeromonas* (6).

Celem badań było określenie inhibicyjnego wpływu jonów metali ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ ) oraz wybranych inhibitorów proteaz (EDTA, PMSF i E-64) na aktywność proteolityczną supernatantów patogennych dla karpia bakterii z rodzaju *Aeromonas*.

## Material i metody

Materiał do badań stanowiły supernatanty patogennych dla karpia szczepów bakteryjnych z rodzaju *Aeromonas* izolowanych od chorych na MAI/MAS karpia. Do badań użyto 16 szczepów bakteryjnych (13 *A. hydrophila* i 3 *A. sobria*). Supernatanty uzyskiwano z 24-godzinnej hodowli bakterii w bulionie tryptozowo-sojowym (TSB) w temp. 28°C. Zawiesinę hodowli bakteryjnej doprowadzano do gęstości  $1 \times 10^7$  jtk w 1 ml przy użyciu metody spektrofotometrycznej, a następnie dwukrotnie wirowano (pierwsze wirowanie: 30 min. przy  $6000 \times g$  w temp. 4°C; drugie wirowanie: 10 min. przy  $10\,000 \times g$  w temp. 4°C) w celu uzyskania supernatantu do dalszych badań.

Określenie stopnia aktywności kazeinazowej przeprowadzono w obecności azokazeiny jako substratu, według metody Leung i Stevenson (9). Badano wpływ następujących związków chemicznych na aktywność proteolityczną supernatantów:  $\text{CuSO}_4$  (2 mM),  $\text{MgCl}_2$  (10 mM),  $\text{MgSO}_4$  (10 mM),  $\text{CaCl}_2$  (5 mM),  $\text{ZnSO}_4$  (2 mM),  $\text{FeCl}_2$  (1 mM),  $\text{FeSO}_4$  (1 mM), PMSF (1 mM), EDTA (10 mM), E-64 (10  $\mu\text{M}$ ).

W tym celu równą objętość odpowiedniego stężenia badanego związku i poszczególnych supernatantów bakteryjnych inkubowano przez 30 min. w temp. 28°C. Następnie w celu określenia aktywności kazeinazowej supernatantów poddanych działaniu tych związków dodawano do poszczególnych próbek 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,2) oraz azokazeiny jako substratu. Mieszaniny te inkubowano przez 4 godz. w temp. 28°C. Następnie reakcje zatrzymywano przez dodanie 2 ml 10% kwasu trójchlorooctowego i mieszaniny pozostawiano na okres 30 min., po czym odwirowano przy  $10\,000 \times g$  przez 15 min. Uzyskane supernatan-

ty mieszano w równej objętości z 1 M NaOH i mierzono absorbancję przy użyciu fotometru Epol-2T, przy długości fali 450 nm. Kontrolę stanowiła mieszanina odpowiedniego supernatantu niepoddanego działaniu badanego związku chemicznego, buforu fosforanowego i azokazeiny. Uzyskany wynik służył do wyliczenia procentu aktywności kazeinazowej supernatantów.

Określenie stopnia aktywności elastazowej przeprowadzono w obecności Elastin Congo red jako substratu, według metody Bjorna i wsp. (2). Badano wpływ związków chemicznych na aktywność proteolityczną supernatantów (jak przy badaniu aktywności kazeinazowej).

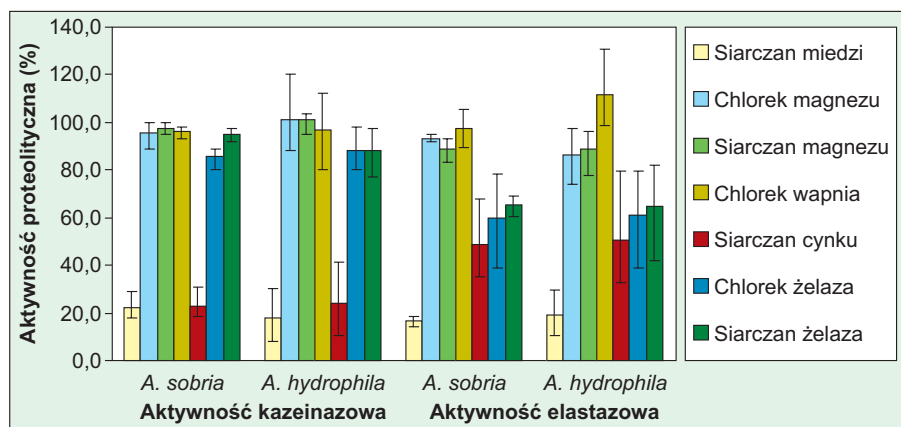
W tym celu równą objętość odpowiedniego stężenia badanego związku i poszczególnych supernatantów bakteryjnych inkubowano przez 30 min. w temp 28°C. Następnie w celu określenia aktywności elastazowej supernatantów poddanych działaniu tych związków dodawano do poszczególnych prób 0,1 M buforu tris-maleinianowego (pH 7,0) oraz Elastin Congo red jako substratu. Mieszaniny te inkubowano przez 24 godz. w temp 28°C. Następnie reakcje zatrzymywano przez dodanie 2 ml 0,7 M buforu fosforanowego, pH 6,0. Mieszaniny te pozostawiano na okres 30 min., po czym odwirowywano przy  $10\ 000 \times g$  przez 15 min. Uzyskanych supernatantów używano do oznaczeń fotometrycznych przy długości fali 490 nm. Kontrolę stanowiła mieszanina odpowiedniego supernatantu niepoddanego działaniu badanego związku chemicznego, buforu tris-maleinianowego i Elastin Congo red. Uzyskany wynik służył do wyliczenia procentu aktywności elastazowej supernatantów.

Nie badano hamowania aktywności elastazowej supernatantów przez PMSF ze względu na krótki okres półtrwania 1 mM roztworu PMSF w pH 7,5 wynoszącym 1 godzinę.

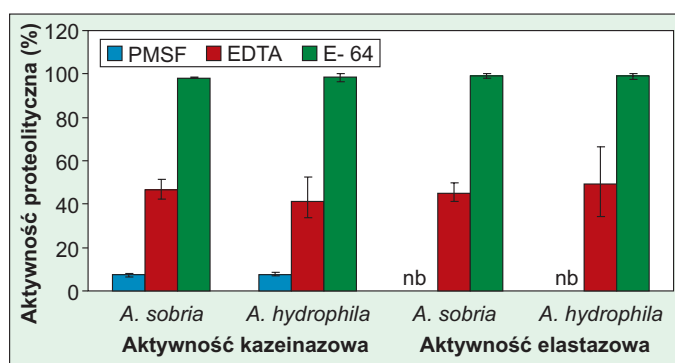
## Wyniki i omówienie

Wyizolowane od chorych na MAI karpi patogenne szczepy bakteryjne zaklasyfikowano, zgodnie z Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (wyd. IX), do rodzaju *Aeromonas*: 13 szczepów oznaczono jako *A. hydrophila*, 3 szczepy jako *A. sobria*. Wpływ związków chemicznych na aktywność kazeinazową i elastazową supernatantów badanych szczepów bakteryjnych przedstawiają ryc. 1 i 2.

Procent aktywności kazeinazowej supernatantów wszystkich badanych szczepów bakteryjnych był wyraźnie obniżony w obecności  $\text{CuSO}_4$  – 18,5% (22,2% dla *A. sobria* i 17,7% dla *A. hydrophila*) i  $\text{ZnSO}_4$  – 23,8% (23,1% dla *A. sobria* i 24,1% dla *A. hydrophila*). Nie stwierdzono obniżenia aktywności kazeinazowej badanych supernatantów pod wpływem działania pozostałych związków chemicznych, wynoszących dla:  $\text{MgCl}_2$  – 100,2% (95,7% dla *A. sobria* i 101,3% dla *A. hydrophila*),  $\text{MgSO}_4$  – 100,6% (97,3% dla



Ryc. 1. Wpływ  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  i  $\text{Zn}^{+2}$  na aktywność kazeinazową i elastazową supernatantów patogennych dla karpi bakterii z rodzaju *Aeromonas* (*A. hydrophila*, n = 13 i *A. sobria*, n = 3). Zaznaczono wartości minimalne i maksymalne



Ryc. 2. Wpływ EDTA, PMSF i E-64 na aktywność kazeinazową i elastazową supernatantów patogennych dla karpi bakterii z rodzaju *Aeromonas* (*A. hydrophila*, n = 13 i *A. sobria*, n = 3)

Objaśnienie: nb – nie badano

*A. sobria* i 101,4% dla *A. hydrophila*),  $\text{CaCl}_2$  – 96,5% (96,2% dla *A. sobria* i 96,7% dla *A. hydrophila*),  $\text{FeCl}_2$  – 88,2% (85,5% dla *A. sobria* i 88,1% dla *A. hydrophila*) i  $\text{FeSO}_4$  – 89,3% (95,0% dla *A. sobria* i 88,1% dla *A. hydrophila*).

Procent aktywności elastazowej supernatantów wszystkich badanych szczepów bakteryjnych był wyraźnie obniżony w obecności  $\text{CuSO}_4$  – 18,4% (16,6% dla *A. sobria* i 18,9% dla *A. hydrophila*),  $\text{ZnSO}_4$  – 50,2% (48,6% dla *A. sobria* i 50,7% dla *A. hydrophila*),  $\text{FeCl}_2$  – 60,8% (59,8% dla *A. sobria* i 61,1% dla *A. hydrophila*) i  $\text{FeSO}_4$  – 64,8% (65,5% dla *A. sobria* i 64,7% dla *A. hydrophila*). Nie stwierdzono wyraźnego obniżenia aktywności elastazowej badanych supernatantów pod wpływem działania pozostałych związków chemicznych wynoszących dla:  $\text{MgCl}_2$  – 88,6% (93,4% dla *A. sobria* i 86,3% dla *A. hydrophila*),  $\text{MgSO}_4$  – 88,6% (88,9% dla *A. sobria* i 88,6% dla *A. hydrophila*) i  $\text{CaCl}_2$  – 109,1% (97,7% dla *A. sobria* i 111,8% dla *A. hydrophila*) (ryc. 1).

Wpływ syntetycznych inhibitorów proteaz PMSF, EDTA i E-64 na aktywność kazeinazową i elastazową supernatantów patogennych dla karpi szczepów bakteryjnych przedstawiono na ryc. 2. Najsilniejszym inhi-

bitorem kazeinaz i elastaz bakteryjnych okazał się inhibitor metaloproteaz – EDTA, wobec którego średnia aktywność kazeinazowa i elastazowa była najniższa i wynosiła odpowiednio 42,4% (46,8% dla *A. sobria* i 41,4% dla *A. hydrophila*) i 48,5% (45,1% dla *A. sobria* i 49,3% dla *A. hydrophila*). Silne właściwości inhibicyjne w stosunku do kazeinaz bakteryjnych wykazywał inhibitor proteaz serynowych – PMSF (w stosunku do elastaz bakteryjnych nie był badany), natomiast inhibitor proteaz cysteinowych E-64 nie hamował aktywności kazeinaz i elastaz (ryc. 2).

Wyniki badań własnych dotyczących wpływu syntetycznych inhibitorów proteaz, tj. PMSF, EDTA i E-64, na ogół są zgodne z badaniami Chabot i Thune (3). Wiadomo, że zdolność hamowania proteaz przez EDTA świadczy o obecności metaloproteaz, przez PMSF – o obecności proteaz serynowych, natomiast przez E-64 – o obecności proteaz cysteinowych. Wyniki badań własnych, które wskazują, że EDTA jest najsilniejszym inhibitorem proteaz patogennych dla karpia szczepów bakteryjnych, świadczą o obecności głównie metaloproteaz w supernatantach badanych bakterii.

Ocena aktywności kazeinazowej, elastazowej patogennych dla karpia szczepów bakteryjnych okazała się przydatną metodą do oceny stopnia zjadliwości tych bakterii dla karpia. Wykazano korelację pomiędzy aktywnością kazeinazową i elastazową supernatantów bakterii z rodzaju *Aeromonas* ze stopniem patogenności dla ryb (7, 8, 11). Według niektórych autorów, jednym z ważniejszych czynników patogenności bak-

terii z rodzaju *Aeromonas* są proteazy (7, 8). Mechanizmy działania proteaz i hamowania ich aktywności nie są do końca poznane i będą przedmiotem dalszych badań.

### Piśmiennictwo

1. Allan B., Stevenson R. M. W.: Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Can. Microbiol.* 1981, 27, 1114-1122.
2. Bjorn M. J., Sokol P. A., Iglewski B. W.: Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bact.* 1979, 138, 193-200.
3. Chabot D. J., Thune R. L.: Proteases of the *Aeromonas hydrophila* complex: identification, characterization and relation to virulence in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Dis.* 1991, 14, 171-183.
4. Guz L.: Hamowanie aktywności proteazowej *Aeromonas hydrophila* przez śluz i surowicę karpia (*Cyprinus carpio* L.). I. Wpływ sezonowości. *Annales UMCS* 2005, LX, 95-102.
5. Guz L.: Hamowanie aktywności proteazowej *Aeromonas hydrophila* przez śluz i surowicę karpia (*Cyprinus carpio* L.). II. Wpływ stresu transportowego. *Annales UMCS* 2005, LX, 103-108.
6. Guz L.: Hamowanie aktywności proteazowej *Aeromonas hydrophila* przez śluz i surowicę karpia (*Cyprinus carpio* L.). III. Wpływ siarczanu miedzi, trichlorfonu i wapna palonego. *Annales UMCS* 2005, LX, 109-115.
7. Guz L.: Hamowanie aktywności elastazowej *Aeromonas hydrophila* F6/95 przez śluz i surowicę karpia zakażonych MAI/MAS. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 607-610.
8. Kozłowska A.: Problemy diagnostyki chorób ryb wywołanych przez bakterie *Aeromonas*. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 435-439.
9. Leung K. Y., Stevenson R. M. W.: Tn 5-induced protease-deficient strains of *Aeromonas hydrophila* with reduced virulence for fish. *Infect. Immun.* 1988, 56, 2639-2644.
10. Nieto T. P., Ellis A. E.: Characterization of extracellular metallo- and serine-proteases of *Aeromonas hydrophila* strain B<sub>51</sub>. *J. Gen. Microbiol.* 1986, 132, 1975-1979.
11. Rogulska A., Antychowicz J., Żelazny J.: Aktywność hemolityczna i proteolityczna jako wskaźnik patogenności bakterii *Aeromonas hydrophila* i *A. sobria* dla karpia (*Cyprinus carpio* L.). *Medycyna Wet.* 1994, 50, 55-58.

Adres autora: dr Leszek Guz, ul Akademicka 13, 20-950 Lublin; e-mail: leszek.guz@ar.lublin.pl