

Hanna Lutnicka*, Alicja Kozińska**

PYRETROIDY JAKO CZYNNIK USPOSABIAJĄCY W CHOROBAK RYB

PYRETHROIDS AS A PREDISPOSING FACTOR IN FISH DISEASES

Słowa kluczowe: karp *Cyprinus carpio* L., cypermetryna (pyretroid), infekcja bakterii *Aeromonas bestiarum*, inwazja *Chilodonella* sp.

Key words: carp *Cyprinus carpio* L., cypermethrin (pyrethroid), *Aeromonas bestiarum* bacteria infection, *Chilodonella* sp. invasion.

*The pyrethroids are very toxic to fish. The aim of the study was to get to know if the pyrethroid – cypermethrin, in subtoxic concentrate, is a predisposing factor for bacterial disease. Fish – carp *Cyprinus carpio* L. were exposed to cypermethrin for 3 or 14 days. The next each group was experimentally infected by two different concentrates of *Aeromonas bestiarum* bacteria: 5×10^7 and 5×10^6 . The fish were observed during 6 weeks after the bacteria infection. The parasitic disease – chilodonellosis appeared in a short time, after the first injection of bacteria. The symptoms of two fish diseases and their coexistence in relation to the time of exposure to cypermethrin and the concentrates of *Aeromonas bestiarum* bacteria were observed, and documented by photos.*

*Fish exposure to subtoxic concentrate of cypermethrin seems to be a predicting factor in pathogenesis of the bacterial and the parasitic fish diseases. The time of fish exposure to cypermethrin seems to decide about the prognosis of the diseases and the concentrate of bacterial factor, too. The bacterial factor revealed the latent invasion of *Chilodonella* sp. The parasitic disease seems to be a factor which disturbs the expansion of bacterial disease for a time.*

* Dr hab. Hanna Lutnicka – Katedra Hodowli Drobiu Zwierząt Futerkowych i Zoohigieny, Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków; tel.: 12 662 41 09; e-mail: lutnicka@op.pl

** Dr Alicja Kozińska – Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; tel.: 81 889 33 75; e-mail: koala@piwet.pulawy.pl

1. WPROWADZENIE

Syntetyczne pyretroidy stanowią chronologicznie czwartą klasę insektycydów. Obecnie należy do nich ok. 42 czynnych substancji, a globalnie stanowią one 20–30% rocznej produkcji insektycydów [Katsuda 1999]. Mechanizm ich toksycznego działania polega na modulowaniu kinetyki otwierania i zamykania bramkowanych napięciem kanałów sodowych błon neuronalnych Centralnego Układu Nerwowego (CUN). Pyretroidy utrzymują kanały sodowe w stanie otwarcia przez ekstremalnie długi czas, prowadząc do przedłużonej depolaryzacji błon komórek nerwowych [Narahashi i in. 1992]. Toksyczny wpływ pyretroidów na zwierzęta jest zróżnicowany. Nie wykazują na nie wrażliwości ptaki, a w stosunku do ssaków pyretroidy wykazują niewielką toksyczność [Róžański 1992]. Największa wrażliwość na te substancje cechuje zwierzęta wodne: skorupiaki i ryby [Haya 1989, Hill 1989]. U ryb pyretroidy, poza wpływem na błony neuronalne CUN, oddziałują także na mitochondria różnych komórek, powodując destrukcję grzebieni czy całkowity ich rozpad [El-Elamy i in. 1993, Lutnicka 2001, Sakr i Gabr 1992]. Wpływają ponadto destrukcyjnie na ultrastrukturę leukocytów krwi obwodowej [Lutnicka 2001]. Ryby poddane działaniu tych związków mogą być więc bardziej podatne na infekcje.

2. CEL, MATERIAŁ I METODY

Celem badań było określenie wpływu pyretroidu – cypermetryny – na odpowiedź organizmu karpia na infekcję bakterii *Aeromonas bestiarum* (*A. bestiarum*). Infekcja bakteryjna była powikłana naturalną inwazją pasożyta *Chilodonella* sp.

Doświadczenia wykonano na osiemdziesięciu karpkach K_1 o masie ciała 70 ± 10 g, w warunkach akwaryjnych, w sezonie wiosennym, w temperaturze wody $14 \pm 1^\circ\text{C}$. Na podstawie mikroskopowego badania śluzu i badania klinicznego dziesięciu losowo wybranych zwierząt wszystkie ryby uznano za klinicznie zdrowe. Po okresie dwutygodniowej aklimatyzacji umieszczono je w 100 l akwariach, z ciągłym przepływem i napowietrzaniem wody.

Ryby użyte w doświadczeniu podzielono na liczące po 10 sztuk grupy: 4 – doświadczalne (nr I–IV) oraz 4 – kontrolne (nr 1–4). Następnie ryby doświadczalne i 2 grupy ryb kontrolnych (nr 3 i 4) poddano ekspozycji na subtoksyczne stężenie cypermetryny (izomer 8 stereoisomerów estru α -cyjano-3-fenoksybenzylowego kwasu 3-(2',2'-dibromowinylo)-2,2-dimetylocyklopropanokarboksylowego $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{Cl}_2\text{O}_3$). Badany pyretroid zawierał 99,7% substancji czynnej i pochodził z Promochem Sp. z o.o. w Warszawie. Pyretroid podano do wody jednorazowo, w stężeniu $0,02 \mu\text{g/l}$. Okres ekspozycji ryb na czynnik toksyczny wyniósł 3 doby (I część eksperymentu) lub 2 tygodnie (II część eksperymentu).

W okresach ekspozycji ryby karmiono co drugi dzień, jak również zamknięto przepływ wody. Wznowiono go po okresach ekspozycji i zakażeniu ryb bakterią *A. bestiarum*.

Wybór stężenia pyretroidu i czasów ekspozycji ryb wynikał z analizy dawek stosowanych na polach uprawnych do ochrony roślin, ze stopnia przenikania pestycydów do wód powierzchniowych, kinetyki rozkładu i biodegradacji cypermetryny w ekosystemie wodnym oraz notowanych ich stężeniach i czasem utrzymywania się po ich aplikacji w środowisku wodnym. W okresie 3 dni (a nawet krótszym) pyretroidy wykazują najsilniejsze działanie toksyczne i jednocześnie zanika zdecydowana większość ich dawki. Okres dwóch tygodni jest wystarczający do całkowitego zaniku cypermetryny, zastosowanej w subtoksycznym jej stężeniu [Hil 1989, Lutnicka i in. 1999, Lutnicka 2001].

I część eksperymentu. Ryby grupy I i II poddano 3-dniowej ekspozycji na cypermetrynę, a następnie zakażano je bakterią *A. bestiarum*. Każdej rybie wstrzyknięto podskórnie 0,2 ml zawiesiny bakteryjnej zawierającej odpowiednio: 5×10^7 (grupa I) i 5×10^6 (grupa II) komórek/ml⁻¹. Jednocześnie wznowiono w akwariach przepływ wody.

Dla wymienionych grup doświadczalnych utworzono 2 grupy kontrolne (nr 1 i 2), które zakażono analogicznie do ryb doświadczalnych grupy I i II. Utworzono też grupę kontrolną nr 3, która była eksponowana przez 3 dni na pyretroid. Ta grupa kontrolna służyła do monitorowania ewentualnej śmiertelności zwierząt spowodowanej ekspozycją na cypermetrynę. Przyjęto sześciotygodniowy okres obserwacji ryb po zakażeniu.

II część eksperymentu. W tej części badań grupy doświadczalne nr III i IV poddano dwutygodniowej ekspozycji na cypermetrynę, a następnie zakażono je bakterią *A. bestiarum*, analogicznie jak w I części badań, z zastosowaniem tych samych jak uprzednio stężeń bakterii: 5×10^7 (grupa III) i 5×10^6 komórek/ml⁻¹ (grupa IV). Jednocześnie, po zakażeniu ryb, wznowiono stały przepływ wody w akwariach. W celu porównania rezultatów badań uzyskanych w grupie doświadczalnej III i IV, wykorzystano wyniki otrzymane w grupie kontrolnej 1 i 2 z I części eksperymentu. Ryby eksponowane przez 2 tygodnie na cypermetrynę, ale niezakażone bakterią *A. bestiarum* stanowiły grupę kontrolną nr 4, która służyła do monitorowania, jak wyżej, ewentualnej śmiertelności ryb spowodowanej ekspozycją na pyretroid. W całym okresie doświadczalnym notowano rozwój zmian chorobowych i śmiertelność ryb. Wykonano dokumentację fotograficzną.

W trakcie wykonywania pierwszej części badań, w 10 dobie po zakażeniu bakterią *A. bestiarum*, pojawiły się u ryb grupy II objawy kliniczne w postaci zwiększonego wydzielania śluzu na powierzchni ciała i złuszczenia się naskórka, szarego i połyskującego nalotu na skórze grzbietu oraz czerwonych plam na skórze (fot. 2). Zmiany te nie były charakterystyczne dla infekcji bakteryjnej. Badanie mikroskopowe śluzu ryb wykazało masową inwazję orzęska – *Chilodonella* sp., którego obecność nie została stwierdzona podczas badania wstępnego, wykonanego przed rozpoczęciem właściwych eksperymentów. Objawy chilodonellozy pojawiły się też nieco później i u pozostałych ryb, z wyjątkiem ryb grupy I. Ujawnienie się chilodonellozy było sygnałem osłabienia ryb. Pomimo jej pojawienia się postanowiono kontynuować badania.



Fot. 1. Widoczne duże i głębokie wrzody na skórze ryb eksperymentalnie zakażonych bakterią *Aeromonas bestiarum*.

Phot. 1. Large and deep ulcers on fish skin experimentally infected by *Aeromonas bestiarum* bacteria



Fot. 2. Wczesne objawy kliniczne chilodonellozy w formie małych, czerwonych plam na skórze ryb

Phot. 2. Premature clinical symptoms of chilodonellosis in form of small, red spots on fish skin

3. WYNIKI I OMÓWIENIE

Wpływ subtoksycznej dawki cypermetryny na podatność ryb na infekcję bakteryjną badano przy użyciu zjadliwego szczepu (P1S) bakterii *A. bestiarum*, identyfikowany wcześniej jako *A. hydrophila* [Koziańska 2000; Koziańska i in. 2002]. Wybór tego gatunku bakterii użytych w doświadczeniu podyktowany był ich powszechnym występowaniem na rybach, w środowisku wodnym i osadach dennych [Ali i in. 1996, Seidler i in. 1980], a także stanowią one element fizjologicznej flory przewodów pokarmowych ryb [Suita i in. 1995]. Szczepy patogenne

są często przyczyną chorób ryb i mogą wywoływać uogólnione zakażenia, określane obecnie jako posocznica MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*) [Candam i in. 1995, Kozińska i in. 2002]. W wielu wypadkach zakażenia ograniczają się do powłok skórnych, płetw i/lub skrzel. Zakażenia skóry objawiają się najczęściej obecnością wrzodów tworzących się w wyniku zmian martwiczych w tkance [Kozińska 2002, Sioutas i in. 1991]. *Aeromonas bestiarum* jest jednym z gatunków *Aeromonas* najczęściej izolowanych od chorych karp w Polsce [Kozińska 2000, Kozińska i in. 2002]. Otrzymane wyniki badań eksperymentalnych przedstawiają tabele 1 i 2.

Tabela 1. Zachorowalność i śmiertelność w grupach kontrolnych ryb

Table 1. Incidence and mortality of fish in control groups

Ryby zakażone <i>Aeromonas bestiarum</i> w stężeniu (komórki/ml ⁻¹)		Ryby po 2-tygodniowej ekspozycji na cypermetrynę		Ryby po 3-dniowej ekspozycji na cypermetrynę
Objawy chorobowe	Grupa 1 5x10 ⁷	Grupa 2 5x10 ⁶	Grupa 3	Grup 4
A	100 (5)	60 (7)	0	0
B	50 (5)	40 (42)	0	0

A – zachorowalność i czas pojawienia się pierwszych objawów choroby (doby) w %.

B – śmiertelność oraz czas trwania choroby (doby) w %.

Tabela 2. Zachorowalność i śmiertelność ryb w grupach doświadczalnych

Table 2. Incidence and mortality of fish in experimental groups

Objawy chorobowe	Grupa I 5x10 ⁷	Grupa II 5x10 ⁶	Grupa III 5x10 ⁷	Grupa IV 5x10 ⁶
A	100 (4)	100 (5)	100 (1)	100 (2)
B	100 (15)	100 (31)	100 (9)	100 (10)

A – zachorowalność i czas pojawienia się pierwszych objawów choroby (doby) w %.

B – śmiertelność oraz czas trwania choroby (doby) w %.

W grupach kontrolnych ryb eksponowanych na cypermetrynę, ale nie zakażonych bakterią *A. bestiarum* nie obserwowano żadnych zmian chorobowych i śmiertelności (tab. 1, grupa 3 i 4).

W pierwszej części badań objawy infekcji bakteryjnej: obrzęki lub wrzody w miejscu wkłucia, pojawiły się najwcześniej, tj. w czwartym dniu po zakażeniu u wszystkich ryb grupy I. W dalszym przebiegu choroby w miejscach obrzęku skóra ulegała martwicy, a pod warstwą martwiczej tkanki rozwijały się rozległe wrzody penetrujące w głąb mięśni (fot.1). W okresie 15 dni po zakażeniu usnęło 100% ryb. W odpowiedniej grupie kontrolnej typowe objawy infekcji bakteryjnej zaobserwowano u 100% ryb, a śnięcia 50% z nich trwały 5 dni. W trakcie dalszej obserwacji (do 6 tygodni po zakażeniu) zmiany chorobowe u pozostałych 50% ryb tej grupy stopniowo cofały się i nie notowano już przypadków śmiertelnych.

W II grupie doświadczalnej początkowe objawy infekcji bakteryjnej (wybrzuszenia w miejscu iniekcji) pojawiły się w piątym dniu po iniekcji. W ciągu następnych 2 dni wybrzuszenia zmieniły się we wrzody, które były wyraźnie mniejsze w stosunku do obserwowanych u ryb grupy I. W dziesiątym dniu po zakażeniu ryby przedstawiały bardzo zróżnicowany obraz. U trzech spośród dziesięciu ryb obserwowano wrzody skórne, a u pozostałych pojawiły się wyraźne, połyskujące naloty gęstego śluzu na grzbiecie, a następnie niewielkie, czerwone plamy na skórze (fot. 2). Objawy te wskazywały na inwazję pasożytów *Chilodonella* sp. Objawy kliniczne chilodonellozy stawały się dominujące i maskowały mało wyraźne zmiany towarzyszące infekcji bakteryjnej (niewielkie obrzęki czy ubytki skóry). Ryby chętnie pobierały pokarm w tym czasie i sprawnie pływały. Dopiero w 14 dniu po eksperymentalnym zakażeniu zaczęły u ryb przeważać objawy infekcji bakteryjnej w formie powiększających się i głęboko drążących wrzodów skórnych, a zanikały objawy chilodonellozy. Ryby stopniowo słabły, a następnie pojawiły się śnięcia, które trwały do 31 doby po zakażeniu (tab. 2). Śnięcia ryb były prawdopodobnie następstwem infekcji *A. bestiarum* i chilodonellozy. W odpowiedniej grupie kontrolnej objawy chilodonellozy były bardzo słabo zaznaczone, a zmiany typowe dla infekcji bakteryjnej wystąpiły u sześciu ryb. W okresie obserwacji usnęło 40% ryb w tej grupie.

W grupach doświadczalnych: III i IV objawy chorobowe typowe dla infekcji *A. bestiarum* pojawiły się w 1 i 2 dniu po zakażeniu, odpowiednio. Jednocześnie obserwowano, szczególnie w pierwszych trzech dniach po zakażeniu, zwiększone wydzielanie śluzu i zaczerwienienie skóry, wskazujące na obecność pasożytów. W następnych dniach objawy te ustąpiły, czemu towarzyszył jednocześnie rozwój objawów infekcji bakteryjnej w formie rozległych i głęboko drążących wrzodów skórnych w 7 dniu po zakażeniu (fot. 1). Śnięcia u 100% ryb wystąpiły w 9 i 10 dniu po zakażeniu.

Ekspozycja ryb na subtoksyczne stężenie cypermetryny wpłynęła na odpowiedź organizmu ryb na czynnik zakaźny i inwazyjny. Modulujący wpływ cypermetryny wyraźnie korelował ze stężeniem bakterii użytym do zakażenia ryb i czasem ekspozycji na pyretroid. Obecność w organizmie ryb najwyższych koncentracji bakterii bardziej sprzyjała wystąpieniu objawów typowych dla infekcji bakteryjnej, hamując jednocześnie ujawnienie się i/lub rozwój ukrytej inwazji pasożytniczej. Niższe koncentracje bakterii w organizmie ryb wydają się natomiast dawać pierwszeństwo w ujawnieniu się i rozwoju chilodonellozy, a w następnej kolejności – po ich ustąpieniu – objawów infekcji bakteryjnej.

Krótszy czas ekspozycji ryb na pyretroid wydaje się sprzyjać dłuższemu okresowi inkubacji choroby i wolniejszemu jej przebiegowi, a śmiertelność ryb wydaje się być zależna od koncentracji bakterii. W przypadku ukrytego nosicielstwa pasożyta *Chilodonella* sp. ekspozycja ryb na czynnik toksyczny stała się czynnikiem wyzwalającym wystąpienie choroby.

Szybszy i bardziej gwałtowny rozwój choroby bakteryjnej u ryb eksponowanych na cypermetrynę i zakażonych najwyższą dawką bakterii (grupa I i V) w stosunku do ryb kontrolnych grupy 1 i 2 wydaje się potwierdzać supresyjny wpływ cypermetryny na układ immuno-

logiczny ryb. O supresji układu immunologicznego wydaje się świadczyć też znacznie krótszy czas wystąpienia objawów infekcji bakteryjnej i szybszy jej przebieg oraz 100% śmiertelność u ryb po 2-tygodniowej ekspozycji na cypermetrynę w porównaniu do obserwowanych u ryb po 3-dniowej ekspozycji. Rezultaty badań [Lutnicka 2001, Sopińska i in. 1995, Sopińska i Guz 1998] nad wpływem innych pyretroidów na układ immunologiczny ryb również wskazują na obniżenie ich odporności. Eksponowane na deltametrynę, zwłaszcza na jej wyższe koncentracje, myszy wykazywały mniejszą odporność na inwazję *Plazmodium berghei*. Skracał się ich czas przeżycia szczególnie wtedy, kiedy w trakcie inwazji pasożyta lub po niej myszy zostały narażone na ten pyretroid [Suwanchaichinda i in. 2005].

Koegzystencja infekcji bakteryjnej i inwazji pasożytniczej wydaje się zależeć od ilości bakterii użytych do zakażenia ryb i czasu ekspozycji na pyretroid. Wydaje się, że pojawienie się dwóch jednostek chorobowych jest czynnikiem znacznie wyniszczającym organizm ryb, zwłaszcza po wcześniejszym narażeniu ich na pyretroid. Trudno wyciągać jednoznaczne wnioski z przeprowadzonego doświadczenia ze względu na inwazje wklajającą zaplanowany eksperyment. Jednakże należy stwierdzić, że istnieje niebezpieczeństwo zwiększenia wrażliwości ryb na czynniki zakaźne i inwazyjne w przypadku obecności w wodzie pyretroidów, w subtoksycznych ich koncentracjach.

Praca wykonana w ramach projektu badawczego PO 4G 079 19.

PIŚMIENNICTWO

- ALI A., CARNAHAN A.M., ALTWEGG M., LÜTHY-HOTTENSTEIN J., JOSEPH S.W. 1996. *Aeromonas bestiarum* sp.nov. (formerly genomospecies DNA group 2 *A. hydrophila*) a New species isolated from non-human sources. *Med Microbiol Lett.* 5: 156–165.
- CANDAN A., KÜCÜKER M.A., KARATAS S. 1995. Motile aeromonad septicemia in salmo salar cultured in the black sea in Turkey. *Bull Europ Ass Fish Pathol.* 15: 195–196.
- EL-ELAMY A., SAKR S.A., EL-SAADANY M.M., GABR S.A. 1993. Elektron mocrosopic study of the liver of *Tilapia nilotica* exposed to Neopybuthrin. *Bull Environ Contam Toxicol.* 50: 682–688.
- HAYA K. 1989. Toxicity of pyrethroid insecticides to fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 381–391.
- HILL I.R. 1989. Aquatic organisms and pyrethroids. *Pestic. Sci.* 27: 429–465.
- KATSUDA Y. 1999. Development of and future prospects for pyrethroid chemistry. *Pest Sci.* 55: 775–782.
- KOZIŃSKA A. 2000. Problemy diagnostyki chorób ryb wywołanych przez bakterie *Aeromonas*. *Medycyna Wet.* 56: 435–439.
- KOZIŃSKA A., FIGUERAS M.J., CHARON M.R., SOLER R. 2002. Phenotypic characteristics and pathogenicity of *Aeromonas* genomospecies isolated from common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Appl. Microbiol.* 93: 1034–1041.

- LUTNICKA H. 2001. Wpływ zanieczyszczenia wód pyretroidami na organizm ryb. Rozprawy Naukowe AR Lublin, Wydział Med. Wet., z. 252.
- LUTNICKA H., BOGACKA T., WOLSKA L. 1999. Degradation of pyrethroids in an aquatic ecosystem model. *Wat. Res.* 33: 3441–3446.
- NARAHASHI T., FREY J.M., GINSBURG K.S., ROY M.L. 1992. Sodium GABA-activated channels as the targets of pyrethroids and cyclodienes. *Toxicol. Lett.* 64/65: 429–436.
- RÓŻAŃSKI L. 1992. Przemiany pestycydów w organizmach żywych i środowisku. PWRiL Warszawa.
- SEIDLER R. J., LOCKMAN H., COLWELL R.R., JOSEPH S.W., DAILY O.P. 1980. Isolation, enumeration and characterization of *Aeromonas* from polluted waters encountered in diving operations. *Appl Environ Microbiol.* 39: 1010–1018.
- SIOUTAS S., HOFFMANN R.W., PFELL-PUTZIEN C., FISCHER-SCHERL TH. 1991. Carp erythrodermatitis (CE) due to an *Aeromonas hydrophila* infection. *J. Vet Med B*, 38: 186–194.
- SOPIŃSKA A., LUTNICKA H., GUZ L. 1995. Wpływ permetryny na układ odpornościowy karpia. *Medycyna Wet.* 51: 747–750.
- SOPIŃSKA A., GUZ L. 1998. Wpływ permetryny na aktywność fagocytów karpia. *Medycyna Wet.* 54: 126–128.
- SUITA H., TANAKA K., YOSHINAMI M., DEGUCHI Y. 1995. Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish. *Appl Environ Microbiol.* 61: 4128–4130.
- SUWANCHAICHINDA CH., KHAMKONG P., WORASUTTAYANGKURN L., SATAYAVIVAD J. 2005. Deltamethrin exposure affects host resistance to *Plasmodium* infection in mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20: 77–82.
- TAYLOR R., BOGACKA T. 1979. Transport of pesticides to the sea by the Vistula River. *Oceanology* 11: 129–138.