

# AZ EZÜST NANORÉSZECSKÉK ANTIBAKTERIÁLIS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA PONTYOK (*CYPRINUS CARPIO*) *FLAVOBACTERIUM JOHNSONIAE* FERTŐZÉSE SORÁN

Mohamed Shaalan<sup>1</sup>, Boglárka Sellyei\*<sup>2</sup>, Mansour El-Matbouli<sup>3</sup>, Csaba Székely<sup>2</sup>

\*levelező szerző elérhetősége:sellyei.boglarka@agrar.mta.hu

1 Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Cairo University, Egypt

2 Institute for Veterinary Medical Research, Centre for Agricultural Research, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

3 Clinical Division of Fish Medicine, University of Veterinary Medicine, Vienna, Austria

## Kivonat

A *Flavobacterium*ok által okozott fertőzés egyike a haltermelésben jelentős gazdasági károkat okozó megbetegedéseknek, melynek jelentősége a bakteriális antibiotikum rezisztencia terjedésével tovább fokozódik. Az ezüst nanorészecskék (Ag NPs) különféle baktériumokra gyakorolt antibakteriális hatása már régóta ismeretes.

Kísérletünkben az ezüst nanorészecskék (d = 23 nm) antibakteriális tulajdonságait vizsgáltuk pontyok (*Cyprinus carpio*) *Flavobacterium johnsoniae* fertőzésével szemben.

A kísérlet a halak mesterséges *F. johnsoniae* fertőzését, majd Ag NP-al (bemerítés, ill. intraperitoneális injekció formájában) való kezelését foglalta magába. A nanorészecskék antibakteriális aktivitását és a halszövetre gyakorolt esetleges toxikus hatását közvetlen vizsgálatokban is értékeltük. A vizsgálat során a mortalitás aránya a fertőzött, kezeltlen csoportban bekövetkező 45% -hoz képest 30%, illetve 15% -ra csökkent az intraperitoneális injekcióval, valamint a fürdetéssel kezelt csoportokban. Klinikai tünetek megjelenését vagy kórszövettani elváltozást egyik kezelt csoportban sem észleltünk. Esetünkben az egyszeri Ag NPs kezelés a korai *F. johnsoniae*-fertőzés során hatékonyan elősegítette a veszteségek minimalizálását.

## Bevezetés

A *Flavobacterium* fajok által okozott fertőzések világszerte jelentős gazdasági károkat okoznak a haltermelésben (Crump et al. 2005, Flemming et al. 2007). A nemzetség tagjai elsősorban a talajban és a vízi környezetben szabadon élő formában vannak jelen, de néhányuk képes klinikai tünetekkel járó megbetegedését előidézni halakban.

A *Flavobacterium johnsoniae* fajról, halak megbetegedésével kapcsolatban először Christensen (1977) közölt adatokat, majd Carson et al. (1993) mutatták ki jelenlétét tenyésztett barramundi (*Lates calcarifer*) ivadékok test szerte előforduló fekélyes elváltozásaiából Ausztráliában. Később nyilvánvalóvá vált, hogy a *F. johnsoniae* az akvakultúra-ágazatban világszerte előforduló, jelentős kórokozó (Loch & Faisal 2015). Az utóbbi időben, fekélyes (Columnaris) betegségekből sikerült *F. johnsoniae* és ahhoz hasonló baktériumokat kimutatni tenyésztett afrikai angolnából (*Anguilla mossambica*), szírvárványos pisztrángból (*Oncorhynchus mykiss*), koi pontyból Dél-Afrikában (Flemming et al. 2007); vágótokból (*Acipenser gueldenstaedtii*) Törökországban (Karatas et al. 2010), valamint szírvárványos pisztrángból Koreában (Suebsing & Kim 2012). Antibiotikum rezisztens *F. johnsoniae* törzseket pontyból (*Cyprinus carpio*) Magyarországon is sikerült kitenyészteni (Varga et al. 2016).

A flavobacteriumok okozta fertőzések elleni védekezés nehéz, mivel a talajban és a vizekben mindenütt jelen vannak, a víz szervesanyag tartalmának növekedése vagy a vízhőmérséklet hirtelen csökkenése pedig kedvező körülményeket teremt a betegség kialakulásának az intenzív haltermelés során.

Jelenleg, a haltermelés során az optimális haltartási gyakorlat kialakítása és az állategészségügyi előírások betartása mellett, a különböző antibiotikumok alkalmazása a leginkább elterjedt kezelési mód a bakteriális fertőzések kiküszöbölésére. Az antibiotikumok korlátlan használata azonban kedvez a gyógyszer rezisztens törzsek kialakulásának, ami azt eredményezi, hogy a *Flavobacterium* fertőzések kezelése továbbra is jelentős kihívást jelentenek (Aly et al. 2013, Declercq et al. 2013, Miranda et al. 2016, Varga et al. 2016). Továbbá, komoly aggodalomra ad okot az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát meghatározó gének átvitelének lehetősége a környezeti és az emberi flórát alkotó baktériumok között (Cabello et al. 2016).

A nanorészecskék (NP-k) alkalmazása a baktérium fertőzések kezelésében, az antibiotikumok új alternatívájaként egyre elterjedtebb (Wang et al. 2017). Az ezüst nanorészecskék (AgNP-k) a sejtmembrán károsítása révén fejtik ki hatásukat, mely az intracelluláris tartalom kiszivárgását, vagyis a teljes sejtlyízist eredményezi (Shaalán et al. 2017). A nanorészecskék *in vitro* antimikrobiális hatékonyságát a vízi környezetben előforduló kórokozó baktériumokra is igazolták (Soltani et al. 2009, Swain et al. 2014, Dananjaya et al. 2016, Shaalan et al. 2017).

Vizsgálatunk célja az ezüst nanorészecskék hatékonyságának értékelése volt az antibiotikum-rezisztens *Flavobacterium* fajok által előidézett fertőzések kezelésében.

## **Anyag és módszer**

### **Az ezüst nanorészecskék előállítása és jellemzése**

Az ezüst nanorészecskék szintézise kémiai redukciós módszerrel történt, melyben redukálószerként nátrium-bór-hidridet és trinátrium-citrátot, stabilizáló komponensként pedig polivinil-pirrolidont (PVP) alkalmaztunk (El-Mahdy et al. 2015, Shaalan et al., 2017).

Az újonnan előállított nanorészecskék alakját transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) vizsgáltuk, míg koncentrációjukat induktív csatolású plazma tömegspektrometriával (ICP-MS) határoztuk meg.

### **A felhasznált baktérium törzsek és tenyésztésük**

A nanorészecskék minimális gátló koncentrációjának (MIC) meghatározásához és a mesterséges fertőzés céljából a Leibnizi Mikrobiológiai Intézet (DSMZ) törzsgyűjteményéből származó *F. johnsoniae* (DSM-szám: 2064) törzset használtuk. A liofilizált baktériumot előbb fiziológiás sóoldatban feloldottuk, majd Hsu-Shott agarra szélesztettük. A lemezeket nedves kamrában, aerob módon, szobahőmérsékleten (22-24°C) 72 órán át inkubáltuk. Ezt követően, egyedi baktérium telepeket oltottunk 10 ml táplevesbe (Nutrien broth), melyeket szobahőmérsékleten rázógépen (180 rpm) 48 órán át inkubáltuk.

### **Haltartási körülmények**

A kísérlethez használt kórokozó mentes és klinikailag egészséges fiatal (hossza:  $6 \pm 1,2$  cm, súlya:  $4,5 \pm 1,6$  g) ponty (*Cyprinus carpio*) egyedeket ( $n = 70$ ) egy 100 liter űrtartalmú akváriumban 2 hétig akklimatizáltuk. A kezeléseket során az akváriumokat folyamatosan levegőztettük, a tartás természetes foto-periodus ciklus mellett történt. A víz hőmérsékletét  $15 \pm 2,0$  °C-on és pH = 7,4 értéken tartottuk. A halakat naponta a 1% / testtömeg arányban megfelelő kereskedelmi táppal etettük.

### **Fertőzési kísérletek**

A kísérleteket, melyben fertőző ágensként az *F. johnsoniae* (DSM: 2064) törzset használtuk, a hatályos állatkísérleti engedélyünkben (PEI / 001 / 1002-13 / 2015) foglaltakkal összhangban hajtottuk végre.

A kísérletbe bevont egyedeket ( $n = 60$ ) a tartóvízbe 20 ppm mennyiségű szegfűszeg-olajjal cseppentésével bódítottuk (Javahery et al., 2012), majd 0,1 ml baktérium szuszpenzió ( $10^7$  / ml) hasüregbe való befecskendezésével fertőztük és tízesével 6 különálló akváriumba helyeztük el. A negatív kontroll csoportot képező 10 halat 0,1 ml foszfátpuffer oldattal (PBS) oltottuk be. Az ezüst nanorészecskékkel való kezelés a fertőzést követő harmadik napon történt. Kétszer tíz halat 100  $\mu$ l ezüst nanorészecske-oldat ( $34 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) hasüregbe való injektálásával, kétszer tízet 3 órán át tartó fürdetéssel ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$  ezüst nanorészecske koncentráció), a pozitív kontroll csoportokba tartozó halakat ( $n = 20$ ) pedig 0,1 ml PBS hasüregbe való injektálásával kezeltünk. A kísérleti időszakban a halakat nem etettük, de a klinikai tünetek, rendellenes viselkedés észlelése érdekében naponta többször megfigyeltük. A frissen elhullott halakból kopolytú és fejvese (esetenként hasi folyadék) mintákat gyűjtöttünk a baktériumok jelenlétének PCR-rel való kimutatásához.

A fertőzést követő 15. és 30. napon, mindegyik kísérleti csoportból szövetmintákat (kopolytú, máj, lép, vese, izom) gyűjtöttünk kórszövettani kiértékelés céljából.

#### **Molekuláris vizsgálatok**

A vizsgált halak kopolytúiból és veséjéből történt kioltásból Hsu-Shott's-agaron kinőtt egyedi baktérium telepek taxonómiai hovatartozásának megerősítésére a Bader Shoemaker & Klesius (2003) által a 16S rRNS génhez tervezett fajspecifikus PCR-t használtuk. A sokszorosított géntermékeket elektroforézissel etidium-bromiddal festett, 1% -os agaróz gélen választottuk el, és UV-fényben jelenítettük meg. A PCR-fragmensek hosszát a GeneRuler 100bp Plus DNS molekula marker (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mellett futtatva ellenőriztük.

#### **Kórszövettani vizsgálatok**

A kórszövettani vizsgálatokhoz a kontroll és a kezelt halakat a mintavétel előtt szegfűszeg-olajjal felhasználásával túlaltattuk. A kopolytúból, májból, lépből, fejveséből kimetszett szövetmintákat 10% -os pufferolt formalinban rögzítettük (24 óra), majd feldolgoztuk. A beágyazott szövetekből 4-5  $\mu$  mm vastagságú metszetek készültek, melyeket hematoxin - eozin (H&E) kombinációjával festettünk (Suvarna et al. 2018).

### **Eredmények és következtetések**

#### **Az ezüst nanorészecskék jellemzése alak, méret és koncentráció szempontjából**

A TEM felvételeken az ezüst nanorészecskék (elektronenz részecskék) gömb alakúnak mutatkoztak. a részecskék számított átlagos átmérője 23 nm volt. ICP-MS mérés során a szintetizáló elegy Ag NP-k koncentrációja  $34 \mu\text{g ml}^{-1}$ -nak adódott.

#### **Fertőzési kísérlet**

Az ezüst nanorészecskék kezelésének hatékonyságát a *F. johnsoniae* okozta fertőzés ellen *in vivo* vizsgálatban is teszteltük. A mesterségesen, a hasüregbe való befecskendezéssel (I / P) fertőzött fiatal pontyokat két módon, fürdetéssel ( $100 \mu\text{g l}^{-1}$ ; 3 óra) illetve 100  $\mu$ l ezüst nanorészecskéket tartalmazó ( $34 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) I / P injekcióval kezeltük. A fertőzést I / P injekcióval hajtottuk végre, mivel a bemerítéses eljárással a betegség kialakulását nem sikerült indukálni. Ez megfelelt, Moyer & Hunnicutt (2007) eredményeinek, mely szerint *F. johnsoniae* fertőzést csak injektálás útján sikerült kiváltani zebrahal esetében. Az első elhullásokat követően, az ezüst nanorészecskékkel való kezelést két úton kíséreltük meg (fürdetés ill. I / P injekció), annak

érdekében, hogy összevessük a módszerek hatékonyságát. A fürdetésnél alkalmazott ezüst nanorészecske koncentráció  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  volt. Korábban, Lee et al. (2012) arról számoltak be, hogy az ezüst nanorészecskéket  $200 \text{ ng ml}^{-1}$  koncentrációban tartalmazó kezelő vízbe történő bemelegítés után a pontyokon nem tapasztaltunk semmilyen károsodást vagy elhullást. Egy korábbi kísérletben a  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  koncentrációban ezüst nanorészecskéket tartalmazó vízfürdetés nem okozott károsodást a kezelt szivárványos pisztrángokban (Shaalan et al., 2018). Az I / P injektálás során az *in vitro* vizsgálatban (MIC) hatékonyan talált dózist alkalmaztuk.

A kísérletbe állított pontyoknál elhullásokat főként a fertőzést követő első 15 napon tapasztaltunk. Az érintett halak szabálytalanul úsztak vagy erősen meghajlított testtel lebegtek, sokszor a testszínük sötétebbre váltott, gyakran tapasztaltunk pikkelyborzolódást, pontszerű bevérzéseket a bőrön, vagy a folyadék felhalmozódást a hasüregben.

Vizsgálatunk során az elhullások mértékének jelentős csökkenését figyeltük meg mindkét kezelt csoportban, különösen a fürdetéssel történt kezelés során. Ez a megfigyelés összhangban áll, Shaalan et al. (2018) *Aeromonas salmonicida*-val mesterségesen fertőzött szivárványos pisztrágon ezüst nanorészecskékkal elvégzett kezelési eredményeivel.

Az elhullott halakból származó kopoltyú- és vesemintákban a *F. johnsoniae* jelenlétét a bakteriológiai és a PCR vizsgálatok egyaránt igazolták.

### **Kórszöveti vizsgálatok**

A fertőzést követő 15. napon vett szövetmintákban a kóros elváltozások főként a pozitív kontrollcsoportból származó egyedekre korlátozódtak. A kopoltyúkon kiterjedt, súlyos elhalás volt megfigyelhető, míg a kezelt csoportokban legfeljebb enyhe lamelláris fúziót tapasztaltunk. A pozitív kontrollcsoport egyedekben a vese vérképző szövetének súlyos károsodását lehetett kimutatni, hasonló elváltozásokat figyelt meg Marancik et al. (2014) *F. psychrophilum*-mal végzett kísérleti fertőzés után, míg a kezelt csoportokban nem jelentkeztek tubuláris léziók. A májban a hepatociták diffúz vakuolizációját lehetett megfigyelni.

Vizsgálatainkban, kóros elváltozások a kopoltyú-, a vese- és a májszövetben csak a pozitív kontrollcsoportokban voltak megfigyelhetők, mely megerősíti *F. johnsoniae* fertőzés korai szakaszában alkalmazott az ezüst nanorészecske kezelés előnyös terápiás hatását.

### **Összefoglalás**

Összefoglalásként elmondható, hogy az ezüst nanorészecskékkal való kezelés az antibiotikumokkal való kezelés ígéretes alternatívájának bizonyult, különösen a bakteriális fertőzés kezdeti szakaszában alkalmazva, beleértve az antibiotikumokkal szemben rezisztenciát mutató baktériumokkal történő fertőzéseket is. Az antibiotikumok esetében szükséges többszöri kezeléshez képest a nanopartikulomok esetében már az egyszeri kezelés is hatékonyan bizonyult. Az ezüst nanorészecskék kezelését sötétben kell végezni, mivel az ezüst nanorészecskék (nap)fény hatására bekövetkező bomlása a sejtvonalakra és a zebrafish embriókra toxikus hatását fejthet ki (George et al. 2014).

**Kulcsszavak:** *Flavobacterium johnsoniae*, ezüst nanorészecske, ponty, baktérium ellenes hatás, halbetegség

### **Köszönetnyilvánítás**

A szerzők köszönetet mondanak Pataki Györgyinek a kórszöveti metszetek elkészítéséért és Doszpoly Andornak a hal sejtvonalak rendelkezésünkre bocsájtásáért a kísérletek során.

Köszönet a TEMPUS (kétoldalú államközi) ösztöndíj támogatásáért, mely biztosította Mohamed Shaalan PhD (AK-00362-002/2018) egyiptomi kolléga magyarországi tartózkodását a kísérletek idejére. A kutatási költségeket az Európai Regionális és Fejlesztési Alap és a Magyar Kormány által fedezte a GINOP-2.3.2-15-2016-00025 (GOODFISH) projekt támogatása keretében.

## Irodalom

- Aly SM, Nough WG, Atti NA, Ahmed M (2013) Pathological and electron microscopic studies on cold water disease among cultured rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss* Walbaum). *Veterinary Science Development*, 3(1), e2-e2.
- Bader JA, Shoemaker CA, Klesius PH (2003) Rapid detection of columnaris disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) with a new species-specific 16-S rRNA gene-based PCR primer for *Flavobacterium columnare*. *Journal of Microbiological Methods*, 52, 209–220.
- Carson J, Schmidtke LM, Munday BL (1993) *Cytophaga johnsonae*: a putative skin pathogen of juvenile farmed barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *Journal of Fish Diseases*, 16, 209–218.
- Christensen PJ (1977) The history, biology, and taxonomy of the Cytophaga group. *Canadian Journal of Microbiology*, 23(12), 1599-1653.
- Crump EM, Perry MB, Clouthier SC, Kay WW (2001) Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 750–759.
- Dananjaya SHS, Godahewa GI, Jayasooriya RGPT, Lee J and others (2016) Antimicrobial effects of chitosan silver nano composites (CAGNCs) on fish pathogenic *Aliivibrio (Vibrio) salmonicida*. *Aquaculture*, 450, 422–430.
- Declercq AM, Boyen F, Van den Broeck W, Bossier P and others (2013) Antimicrobial susceptibility pattern of *Flavobacterium columnare* isolates collected worldwide from 17 fish species. *Journal of Fish Diseases*, 36(1), 45–55.
- El Mahdy MM, Eldin TAS, Aly HS, Mohammed FF and others (2015) Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats. *Experimental and toxicologic pathology*, 67(1), 21-29.
- Flemming L, Rawlings D, Chenia H (2007) Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. *Research in Microbiology*, 158, 18–30.
- George S, Gardner H, Seng EK, Chang H and others (2014) Differential effect of solar light in increasing the toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles to a fish cell line and zebrafish embryos. *Environmental science & technology*, 48(11), 6374-6382.
- Javahery S, Nekoubin H, Moradlu AH (2012) Effect of anaesthesia with clove oil in fish (review). *Fish Physiology and Biochemistry*. 38(6), 1545-1552.
- Karatas S, Ercan D, Steinum TM, Turgay E and others (2010) First isolation of a *Flavobacterium johnsoniae* like bacteria from cultured Russian sturgeon in Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(14), 1943–1946.
- Lee B, Duong CN, Cho J, Lee J and others (2012) Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *BioMed Research International*, 2012.
- Loch TP, Faisal M (2015) Emerging flavobacterial infections in fish: A review. *Journal of Advanced Research*. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2014.10.009>
- Marancik DP, Leeds TD, Wiens GD (2014) Histopathologic changes in disease-resistant-line and disease-susceptible-line juvenile rainbow trout experimentally infected with *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of aquatic animal health*, 26(3), 181-189.
- Miranda CD, Smith P, Rojas R, Contreras-Lynch S and others (2016) Antimicrobial susceptibility of flavobacterium psychrophilum from Chilean salmon farms and their epidemiological cut-off values using agar dilution and disk diffusion methods. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1880.
- Moyer TR, Hunnicutt DW (2007) Susceptibility of zebra fish *Danio rerio* to infection by *Flavobacterium columnare* and *F. johnsoniae*. *Diseases of aquatic organisms*, 76(1), 39-44.
- Shaalán MI, El-Mahdy MM, Theiner S, El-Matbouli M and others (2017) In vitro assessment of the antimicrobial activity of silver and zinc oxide nanoparticles against fish pathogens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 1–11.
- Shaalán M, El-Mahdy M, Theiner S, Dinhopf N and others (2018) Silver nanoparticles: Their role as antibacterial agent against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Research in veterinary science*, 119, 196-204.
- Soltani M, Ghodrathema M, Ahari H, Mousavi E and others (2009) The inhibitory effect of silver nanoparticles on the bacterial fish ruckeri and *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Yersinia ruckeri*, 3(2), 137–142.
- Suebsing R, Kim J.-H (2012) Isolation and Characterization of *Flavobacterium johnsoniae* from Farmed Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 15(1), 83–89.
- Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD (Eds.). (2018) *Bancroft's theory and practice of histological techniques*. Elsevier Health Sciences.

- Swain P, Nayak SK, Sasmal A, Behera T and others (2014) Antimicrobial activity of metal based nanoparticles against microbes associated with diseases in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 2491–2502.
- Varga Z, Sellyei B, Paulus P, Papp M and others (2016) Isolation and characterisation of flavobacteria from wild and cultured freshwater fish species in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 64(1), 13–25.
- Wang L, Hu C, Shao L (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine*, 12:1227-1249