

ALICJA KOZIŃSKA, JERZY ANTYCHOWICZ

# Izolacja nowej bakterii patogennej dla karpia

Zakład Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

## Summary

### Isolation of a new bacteria pathogenic to carp

The taxonomy and virulence of four unknown bacterial isolates (11S9306, 16S9306, 12E9306, 13E9306) associated with *erythrodermatitis*-like symptoms of carp have been examined. The isolates differed from currently known bacteria pathogenic for carp. Characteristics of the isolates were nearly identical with those of *Chromobacterium violaceum*. Differences concern indole production and d-mannitol utilization (isolates+, *Ch. violaceum* -). In virulence tests (subcutaneous injection of  $1 \times 10^7$  cfu, and intraperitoneal injection of  $5 \times 10^5$  cfu) the isolates appeared to be more pathogenic than pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *A. salmonicida* var. *achromogenes*. This phenomenon was a little more pronounced at 21°C than at 13°C.

Obecnie uważa się, że dla karpia mogą być patogenne następujące bakterie: *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes* (4, 12), *A. hydrophila* (4), *Edwardsiella tarda* (11), *Pseudomonas fluorescens* (13), *Flexibacter columnaris* (3), *Flavobacterium branchiophila* (9), *Streptococcus* sp. (10) i *Mycobacterium* sp. (16).

W czerwcu 1993 r. od chorych karpia, pochodzących z dwóch obiektów stawowych, wyizolowano bakterie, której nie udało się zaklasyfikować do żadnego z dotychczas znanych rodzajów bakterii patogennych dla karpia. Badania wstępne wykazały związek pomiędzy obecnością tej bakterii w narządach wewnętrznych karpia i w zmianach skórnych u tych ryb, a objawami chorobowymi. Karpie wykazywały rozległe przekrwienia powłok zewnętrznych i owrzodzenia (podobnie jak w przebiegu zakażeń patogenami szczepami *Aeromonas hydrophila* lub *A. salmonicida* ssp. *achromogenes*) oraz krwiste wysięki w jamie ciała. Objawy chorobowe występowały u około 30% ryb stanowiących obsady poszczególnych stawów. W stawach stwierdzono duży stopień zanieczyszczenia wody ściekami z przemysłu spożywczego. W okresie choroby karpia temperatura wody wynosiła  $16^\circ\text{C} \pm 2$ .

Celem pracy była identyfikacja taksonomiczna wyizolowanej bakterii i określenie jej właściwości chorobotwórczych.

### Materiał i metody

Izolacja bakterii. Posiewy sporządzano z wycinków skóry pobranych od 8 karpia (na granicy tkanki zmienionej chorobowo i tkanki niezmienionej). Do posiewów użyto płytek z agarom odżywczym zawierającym 5% odwłóknionej krwi końskiej. Inkubację przeprowadzano w temperaturze 27°C i 37°C. Po 24-godzinnej inkubacji w posiewach sporządzonych od 3 karpia stwierdzono jednolity wzrost małych (1-1,5 mm średnicy), bezbarwnych, okrągłych, kładkich kolonii. W posie-

wach z pozostałych ryb, kolonie tego typu występowały w wyraźnej przewadze nad pozostałą florą bakteryjną. Pojedyncze kolonie izolowano na skosy agarowe z dodatkiem krwi i przetrzymywano w temperaturze 4°C. Cztery izolaty oznaczone symbolami 11S9306, 16S9306, 12E9306 i 13E9306 poddano testom identyfikacji taksonomicznej oraz badaniom właściwości chorobotwórczych dla karpia.

Identyfikacja bakterii. Wstępna identyfikacja obejmowała barwienie metodą Grama, określenie rodzaju urzęsienia przy użyciu mikroskopu elektronowego, badanie ruchu w agarze półpłynnym i w kropli wiszącej, określenie typu oddychania i metabolizmu glukozy na podłożu Hugh-Leifsona i próbę na oksydazę cytochromową wg Kovacs. Poza tym przeprowadzono testy aktywności wogec argininy na podłożu Thornley oraz wobec lizyny i ornityny na podłożu Moellera. Oprócz tego określono minimalną i maksymalną temperaturę wzrostu, zdolność wzrostu w podłożu o różnej koncentracji NaCl w zakresie 0-6% oraz wrażliwość na czynnik wibriostacyjny 0/129 (2,4-diamino-6,7-dizopropylpteridine, 30 µg).

Celem dalszej identyfikacji przeprowadzono badania szeregu innych właściwości biochemicznych i fizjologicznych: produkcja katalazy, ureazy, H<sub>2</sub>S, dezaminacja fenyloalaniny i tryptofanu, redukcja NO<sub>3</sub><sup>-</sup> i NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, produkcja indolu, produkcja acetyloiny (reakcja Voges-Proskauera) próba z czerwieńią metylową (MR), fermentacja glukozy, fruktozy, trehalozy, maltozy, laktozy, ksylozy, ramnozy, arabinozy, sacharozy, sorbitolu, inozytolu, ducytolu, adonitolu, mannitolu i salicyny, hydroliza żelatyny, kazeiny, skrobi i eskuliny, wykorzystanie L-arabinozy, L-argininy, D-mannitolu, salicyny, ornityny i cytrynianu jako jedyne źródła węgla. W badaniach posługiwano się metodami klasycznymi (7, 8, 15) oraz równocześnie gotowymi testami API20E (firmy bio Merieux). W identyfikacji uwzględniono wcześniejsze opracowania dotyczące różnicowania i identyfikacji pałeczek gramujemnych (1, 14, 17, 18).

Badanie chorobotwórczości. Chorobotwórcze właściwości izolatów określano na podstawie wyników eksperymentalnego zakażenia dwuletnich karpia, pochodzących z wolnych od chorób gospodarstw rybackich. Karpie adaptowano do warunków laboratoryjnych przez okres 3 tygodni, przy czym część karpia przetrzymywano w temperaturze  $13^\circ\text{C} \pm 1$ , część natomiast w temperaturze  $21^\circ\text{C} \pm 1$ . Doświadczenie przeprowadzono w 4 wariantach (w każdym z nich zakażano po 10 karpia): a) podskórna inokulacja ryb przetrzymywanych w temperaturze 13°C; b) podskórna inokulacja ryb w temperaturze 21°C; c) dootrzewnowa inokulacja ryb w temperaturze 13°C; d) dootrzewnowa inokulacja ryb w temperaturze 21°C. Do zakażeń podskórnych użyto 0,1 ml zawiesiny bakterii w PBS o końcowym mianie  $1 \times 10^7$ , natomiast do zakażeń dootrzewnowych 0,5 ml zawiesiny bakterii o końcowym mianie  $5 \times 10^7$ . Kontrolę stanowiły karpie inokulowane jałowym płynem fizjologicznym.

Celem porównania właściwości chorobotwórczych badanych izolatów, równocześnie zakażano dwie inne grupy ryb patogenymi szczepami *Aeromonas hydrophila* 13S9306 i *A. salmonicida* ssp. *achromogenes* 18S9304 (z kolekcji własnej), zachowując identyczne warunki doświadczenia.

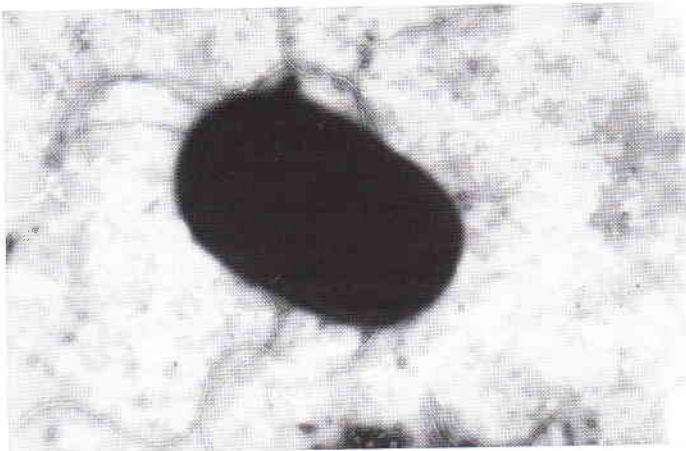
### Wyniki i omówienie

Identyfikacja. Izolaty 11S9306, 16S9306, 12E9306 i 13E9306 były prawie identyczne w zakresie badanych cech.

Tab. 1. Porównanie morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych cech badanych izolatów z chorych karp i *Chromobacterium violaceum*

Cechy	Badane izolaty 11S9306, 16S9306, 12E9306, 13E9306	<i>Chromobacterium violaceum</i> (Bergey's Manual)
Barwienie metodą Grama	-	-
Ruch	+	+
1 lub 2 rzęski biegunowe i 2-6 rzęsek bocznych	+	+
Oksydaza cytochromowa	+	+
Katalaza	+	+
o/F test	F	F
Wzrost w bulionie z % NaCl:		
0	+	+
3	+	+
6	-	-
Wzrost w temperaturze:		
8°C	-	-
10°C	±	R
27°C	+	+
43°C	±	R
Optymalna temperatura	35°C	30-35°C
Dihydrolaza argininy	+	R (50)
Dekarboksylaza lizyny	[-/+] <sup>c)</sup>	-
Dekarboksylaza ornityny	-	-
Ureaza	-	± albo -
H <sub>2</sub> S	-	- albo ±
Dezaminaza fenyloalaniny	3-, 1+	-
Dezaminaza tryptofanu	+	-
β-galaktozydaza (test ONPG)	±	-
Redukcja NO <sub>3</sub>	+	+ (95)
Redukcja NO <sub>2</sub>	+	+ (80)
Reakcja MR	-	-
Reakcja Voges Proskauera	-	-
Produkcja indolu	+	- <sup>a)</sup>
Jedyne źródła węgla:		
L-arabinoza	-	-
L-arginina	-	R (60)
L-ornityna	+	+
D-mannitol	+ <sup>b)</sup>	-
Cytrynian	[+ <sup>b)</sup> /-] <sup>c)</sup>	+ <sup>b)</sup>
Fermentacja:		
glukozy, fruktozy, trahalozy	+	+
maltozy	+	R (50)
laktozy, ksylozy, dulcytolu	-	-
m-inozytolu	-	-
ramnozy	-	R (50)
sacharozy	+	- (25)
sorbitolu	-	R (60)
L-arabinozy, galaktozy	-	-
adonitolu, raffinozy	-	-
mannitolu	+ <sup>b)</sup>	-
salicyny	-	- (10)
Hydrolyza:		
żelatyny	[±/+] <sup>c)</sup>	+
kazeiny	±	+
skrobi	±	± albo -
eskuliny	-	-
Rozkład malonianu	-	-
Hemoliza krwinek końskich	+	+
Wrażliwość na 0/129 (30 µg)	-	-

Objaśnienia: + - reakcja dodatnia, - - reakcja ujemna, ± - reakcja słabo dodatnia, R - różnice pomiędzy szczepami, a) - w pewnych warunkach środowiskowych może być reakcja dodatnia, b) - powolny wzrost, c) - różne wyniki w zależności od metody badania [metoda klasyczna na podłożu Simmons'a/testy API20E], ( ) - w nawiasach % szczepów wykazujących reakcję dodatnią.



Ryc. 1. Komórka bakteryjna izolatu 16S9306 z rzęską biegunową i rzęskami bocznymi. Mikr. elektr. pow. 24 000×

Były to proste pałeczki o wymiarach 2-3,5×0,6-1 μm, gram-ujemne, oksydazododatnie. Wzrost w podłożu Hugh-Leifsona wskazywał na względnie beztlenowy typ oddychania i fermentację glukozy. Pałeczki wykazywały ruch zarówno w kropli wiszącej jak i w agarze półpłynnym. W mikroskopie elektronowym obserwowano większość komórek z 1 rzęską umieszczoną na biegunie i 2-6 rzęskami bocznymi (ryc. 1). Niektóre komórki miały po 1 rzęście na obu biegunach i kilka rzęsek bocznych. Badane izolaty wykazywały dobry wzrost w bulionie nie zawierającym NaCl, nie rosły natomiast w obecności NaCl powyżej 3%. Znacznie lepszy wzrost obserwowano w temperaturze 37°C niż 27°C. Maksymalna temperatura, w której bakterie wykazywały żywotność wynosiła 43°C; nie obserwowano natomiast wzrostu w temperaturze poniżej 8°C. Izolaty wykazywały obecność dihydrolazy argininy, natomiast brak dekarboksylazy lizyny i ornityny. Powyższe cechy były niemal identyczne jak te, które wykazują *Chromobacterium violaceum* (18). Zarówno te, jak i inne badane cechy izolatów przedstawione są w tab. 1, w zestawieniu z charakterystyką *Chromobacterium violaceum*.

**Chorobotwórczość.** W tab. 2 przedstawione są wyniki badań, określające liczbę zachorowań i śnięć karpia po zakażeniu izolatami 11S9306, 16S9306, 12E9306 i 13E9306 oraz patogennymi szczepami *A. hydrophila* 13S9306 i *A. salmonicida ssp. achromogenes* 18S9304, w poszczególnych wariantach doświadczenia (a, b, c, d). Każdy z czterech badanych izolatów, we wszystkich wariantach, wywoływał zmiany chorobowe u 8-10 karpia. Liczba śnięć w wariantach a i c była

nieco niższa (4-8) niż w wariantach b i d (7-10). Liczba karpia wykazujących zmiany chorobowe po inokulacji *A. hydrophila* i *A. s. ssp. achromogenes* w poszczególnych wariantach wynosiła 0-8, a liczba śnięć 0-6.

W temperaturze 13°C, po zakażeniu podskórnym przebieg choroby był podobny u karpia zakażanych badanymi izolatami oraz *A. hydrophila* i *A. s. ssp. achromogenes*. Tworzenie się mniej lub bardziej rozległych wrzodów skórnych następowało po 5-7 dniach. W temperaturze 21°C, u ryb zakażonych izolatami, już po 2-3 dniach pojawiały się silne obrzęki i rozległe



Ryc. 2. Zmiany chorobowe w 3 dniu po podskórnej inokulacji izolatem 12E9306



Ryc. 3. Zmiany chorobowe w 2 dniu po dootrzewnowej inokulacji izolatem 16S9306

Tab. 2. Liczba karpia wykazujących zmiany chorobowe i śnięcia po zakażeniu izolatami od chorych karpia (11S9306, 16S9306, 12E9306 i 13E9306) oraz patogennym szczepem *A. hydrophila* (13S9306) i *A. s. ssp. achromogenes* (18S9304), w poszczególnych wariantach doświadczenia (a, b, c, d)

Inokulaty	a n = 10		b n = 10		c n = 10		d n = 10	
	zmiany chorobowe	śnięcia	zmiany chorobowe	śnięcia	zmiany chorobowe	śnięcia	zmiany chorobowe	śnięcia
11S9306	10	4	10	8	8	7	9	8
16S9306	8	6	10	10	8	6	8	10
12E9306	10	8	10	10	10	8	10	8
13E9306	9	8	9	7	8	6	8	10
13S9306 ( <i>A. hydrophila</i> )	7	5	5	0	0	4	4	0
18S9304 ( <i>A. s. ssp. achromogenes</i> )	8	4	6	0	6	6	4	4
PBS	0	0	0	0	0	0	0	0

Objaśnienia: a – inokulacja podskórna, temperatura 13°C ± 1, b – inokulacja podskórna, temperatura 21°C ± 1, c – inokulacja dootrzewnowa, temperatura 13°C ± 1, d – inokulacja dootrzewnowa, temperatura 21°C ± 1.

przekrwienia skóry (ryc. 2), po czym wkrótce większość ryb snęła. Zakażenia *A. hydrophila* i *A. s. ssp. achromogenes*, początkowo powodowały wystąpienie miejscowych zmian skórnych, w późniejszym jednak okresie obserwowano zahamowanie procesu chorobowego, a nawet zabliznianie się ran.

Ryby zakażane dootrzewnowo badanymi izolatami, zarówno w temperaturze  $13^{\circ}\text{C}\pm 1$  jak i w  $21^{\circ}\text{C}\pm 1$  wykazywały silne obrzęki i przekrwienie brzusznej części ciała oraz wysadzenie odbytu (ryc. 3). Objawy występowały po 2-4 dniach, wkrótce potem następowały śnięcia ryb. Sekcja wykazała płyn w jamie ciała, a z narządów wewnętrznych reizolowano wstrzyknięte uprzednio bakterie. Podobne objawy, aczkolwiek nieco łagodniejsze, obserwowano u karpia zakażanych *A. s. ssp. achromogenes*. Natomiast u ryb zakażanych *A. hydrophila* w temperaturze  $21^{\circ}\text{C}$  zmiany chorobowe występowały dopiero po 10-12 dniach. Miały one postać niewielkich wrzodów skórnych, rozsianych po całym ciele.

Wyniki badania cech morfologicznych oraz właściwości biochemicznych i fizjologicznych wykluczały możliwość zaklasyfikowania izolatów do któregośkolwiek z dotychczas znanych rodzajów bakterii patogennych dla karpia. Izolaty te, jako względnie beztlenowce, fermentujące glukozę nie mogą być zaliczone do rodzajów *Pseudomonas*, *Flexibacter* i *Flavobacterium*. Typ urzęsienia i dodatnia reakcja na oksydazę cytochromową wykluczają przynależność izolatów do rodziny *Enterobacteriaceae*. Najważniejszymi cechami różnicującymi izolaty od *A. salmonicida ssp. achromogenes* to zdolność ruchu oraz wzrost w temperaturze  $37^{\circ}\text{C}$ . Obecność kilku bocznie umieszczonych rzęsek, oprócz rzęski biegunowej, jest jedną z cech odróżniających izolaty od ruchliwych gatunków *Aeromonas*. Poza tym, w przeciwieństwie do bakterii z tego rodzaju, badane izolaty miały zdolność redukcji azotynów do wolnego azotu, wykazywały ujemną reakcję MR i obecność dezaminazy tryptofanu.

Badania wykazały duże podobieństwo izolatów do bezbarwnych form *Chromobacterium violaceum* (18). W zakresie badanych cech, różnice pomiędzy izolatami a *Ch. violaceum* wystąpiły jedynie w reakcji na indol (izolaty +; *Ch. violaceum* -) i w zdolności do wykorzystania mannitolu jako jedyne źródła węgla oraz jego fermentacji (izolaty +; *Ch. violaceum* -). Cechy te wymieniane są, między innymi, jako kryterium odróżniania bezbarwnych form *Ch. violaceum* od bakterii z rodzaju *Aeromonas* i *Vibrio*, z którymi są czasem mylone (18). Wydaje się jednak, że są to cechy mało charakterystyczne, bowiem w obrębie bakterii *Aeromonas* i *Vibrio* występują szczepy indolo-dodatnie jak i indolo-ujemne (1, badania własne nieopublikowane), a szczepy *Ch. violaceum* mogą, w pewnych warunkach środowiska, wykazywać dodatnią reakcję na indol (6). Wzrost izolatów w obecności mannitolu jako jedyne źródła węgla, jak i fermentacja przebiegały powoli (2 dni), co wskazuje, że cecha ta jest słabo wyrażona. Pozostałe cechy izolatów i *Ch. violaceum* były identyczne (tab. 1) Na uwagę zasługuje podobieństwo w typie urzęsienia; zarówno izolaty, jak i *Ch. violaceum* mogą posiadać jedną lub dwie rzęski biegunowe oraz 2-6 długich rzęsek umieszczonych bocznie. Charakterystyczna jest także wspólna dla nich zdolność wzrostu w temperaturze  $43^{\circ}\text{C}$ , przy braku wzrostu w temperaturze  $8^{\circ}\text{C}$ , co pozwala określić je jako ciepłolubne. Izolaty, podobnie jak *Ch. violaceum*, mają zdolność redukcji azotynów do wolnego azotu. Wśród bakterii należących do grupy względnie beztlenowych, fermentujących pałeczek gramujemnych, właściwość tę posiada jedynie *Chromobacterium violaceum* (2).

*Ch. violaceum* występuje w glebie i w wodzie. Może powodować posocznicę u zwierząt stałocieplnych oraz u ludzi (18). Dotychczas, w dostępnym piśmiennictwie brak jest doniesień o izolacji tej bakterii od ryb. Chore karpie, od których pochodzą izolaty, przebywały w środowisku wodnym, zanieczyszczonym przez ciągły napływ ścieków z przemysłu spożywczego, które prawdopodobnie spowodowały nagromadzenie azotanów i azotynów, a to z kolei mogło przyczynić się do rozwoju bakterii wykorzystujących azotyny jako źródło energii. Równocześnie ocieplanie się klimatu w Polsce mogło przyczynić się do propagacji bakterii ciepłolubnych, jakimi są *Ch. violaceum*.

Pomimo, że przypadek izolacji tej bakterii jest dotychczas odosobniony, to jednak zasługuje na uwagę ze względu na niewątpliwą, dużą patogenność tych bakterii dla karpia. W poszczególnych stawach, śnięcia związane z infekcją tej bakterii dotyczyły 20-30% karpia. Eksperymentalne zakażenia karpia wykazały, że izolaty 11S9306, 16S9306, 12E9306 i 13E9306 są patogenne dla tych ryb. Izolaty te wykazywały przy tym większą zjadliwość niż patogenne szczepy *A. hydrophila* i *A. salmonicida ssp. achromogenes*. Wyrażała się ona w większej liczbie karpia wykazujących zmiany chorobowe i śnięcia oraz w większej intensywności zmian. Izolaty, w przeciwieństwie do *A. hydrophila* i *A. s. ssp. achromogenes*, powodowały nieco silniejsze zmiany chorobowe i bardziej liczne śnięcia u karpia przebywających w temperaturze  $21^{\circ}\text{C}$  niż u karpia w temperaturze  $13^{\circ}\text{C}$ . Wskazuje to na większe zagrożenie karpia infekcją tej bakterii w miesiącach letnich, kiedy wzrasta temperatura wody w stawach.

W świetle przeprowadzonych badań wydaje się bardzo prawdopodobne, że izolaty pochodzące od chorych karpia, wykazujących zmiany typu *erythrodermatitis*, należą do *Chromobacterium violaceum*. Jest to nowy czynnik chorobotwórczy dla karpia, który w warunkach podwyższonej temperatury wody może powodować znacznie większe straty w hodowli karpia niż bakterie rodzaju *Aeromonas*.

#### Piśmiennictwo

- Bauman P., Schubert R. H. W.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. t. 1, Williams Wilkins, Baltimore/London 1984, s. 516.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. t. 1, Williams Wilkins, Baltimore/London 1984, s. 408.
- Bootsma R., Clerx J. P. M.: Aquaculture 7, 371, 1976.
- Bootsma R., Fijan N. N., Blommaert H.: Vet. Arch. Zagreb, 47, 291, 1977.
- Bullock G. L., Herman R. L.: Antimicrob. Agents Chemother. 31, 1281, 1987.
- Corpe W. A.: Appl. Microbiol. 11, 145, 1963.
- Eddy B. P.: J. appl. Bact., 23, 216, 1960.
- Eddy B. P.: J. appl. Bact., 25, 137, 1962.
- Farkas J.: Aquaculture, 44, 1, 1985.
- Farkas J., Olah J.: Aquaculture 58, 17, 1986.
- Fijan N.: Symposium of the Zoological Society of London. Academic Press, London 1972, s. 39.
- Fijan N., Petrinc L., Stancl Z., Dorson M., Le Berre M.: Off. Epizoot. 87, 439, 1977.
- Inglis V., Hendrie M. S.: Bacterial disease of fish. Blackwell Sci. Publ., Oxford 1993, s. 169.
- Popoff M.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, t. 1, Williams Wilkins, Baltimore/London 1984, s. 545.
- Popoff M., Veron M.: J. Gen. Microbiol. 94, 11, 1976.
- Reichenbach-Klinke H. H.: Symp. Zool. Soc. London 30, 17, 1972.
- Shewan J. M., Hoibbs G., Hodgkiss W.: J. appl. Bact. 23, 379, 1960.
- Sneath P. H. A.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams Wilkins, Baltimore/London, t. 1, 1984, s. 580.

Adres autora: mgr Alicja Kozińska, ul. Kusocińskiego 1/25, 24-100 Puławy