

BAKTERIJSKA BOLEST AMERIČKOG SOMIĆA (*AMIURUS NEBULOSUS* L.)

E. Teskeredžić, D. Grahek, L. Malnar, Z. Teskeredžić,
M. Hacmanjek

Sažetak

U radu je istražena pojava bakterijske bolesti američkog somića u uzgoju. U tijeku istraživanja riba je obrađena općim kliničkim pregledom i patoanatomskom pretragom. Bolest se očitovala pojavom rana na leđima i perajama, te priraslicama između organa trbušne šupljine. Bakteriološkom analizom (fiziološke i biokemijske osobine uzročnika) obrađeni su uzorci kože, peraja, jetre, slezene, srca i bubrega oboljelih riba.

Utvrđena je prisutnost uzročnika promjena, bakterije *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, koja je antibiogramskim testom pokazala najveću osjetljivost na antibiotike oksitetraciklin i gentamicin.

UVOD

Bakterijske bolesti uzrokuju velik pobol i pomor u slobodnoživućih i uzgajanih riba. Riba dolazi u dodir s bakterijama u vodi preko čestica mulja i fekalija, odnosno izravnim kontaktom s drugom ribom, životinjom ili hranom. Uobičajena bakterijska flora ribe odraz je bakterijske populacije vode (Horsley, 1973; Sakata i sur., 1980), a bakterije se koriste otopljenom organskom i mineralnom tvari za svoj rast i razmnožavanje. Ti ubikvitarni mikroorganizmi postaju patogeni za ribe prigodom različitih stresova. Najčešća su stresna stanja parazitoze i viremije, te prisutnost velike količine organske tvari, transport, velike razlike u temperaturi, prevelika gustoća riba u uzgoju i traume. Pojave bakterijskih bolesti bolje su uočljive u intenzivnom uzgoju riba, gdje je zbog načina rada i gustoće nasada lakše zamijetiti bolest (Roberts, 1982).

Mikroorganizmi ulaze u ribe preko kože, peraja, bočne linije, žučovoda, žučnog mjehura, urogenitalnoga trakta, škrga, spojnice i usta. Prodiranje

Dr. Emin Teskeredžić, viši znan. sur.; Danica Grahek, dipl. vet.; mr. Leon Malnar, znan. asistent; dr. Zlatica Teskeredžić, znan. sur.; mr. Mato Hacmanjek, znan. asistent, Institut »Ruder Bošković«, Centar za istraživanje mora Zagreb, Bijenička 54, Zagreb,

bakterija kroz kožu, odnosno kroz kutikulu, iznimno je važno za nastanak infekcije, a najčešće je omogućeno mehaničkim ili parazitarnim oštećenjima kože. Obrambeni sustav odgovara na infekciju, a Fletcher i Grant (1969) dokazali su postojanje protutijela u sluzi kojom je prekrivena kutikula, a u epidermi se nalaze stanice slične limfocitima, koje imaju sličnu ulogu. Kada uzročnik dospije u kožu, organizam na to odgovara obrambenom reakcijom u obliku upalnoga procesa. Uzročnik se može tu zaustaviti i uzrokovati lokalnu infekciju ili se proširiti dalje uzrokujući opću infekciju. Katkad uzročnik ostane u koži i svojim toksinima uzrokuje opću bolest. U slobodnoživućih riba, za razliku od onih uzgajanih, oštećenja kutikule i epiderme velika su rijetkost pa površina tijela bez ozljeda prekrivena sluzi pruža veliku zaštitu od ulaza infekta (uzročnika), (Roberts, 1982), za razliku od uzgajanih riba, koje su zbog tehnologije uzgoja mnogo češće u stresnim stanjima.

Surha rada

Kod američkog somića, koji je kao nusproizvod prisutan u svim toplovodnim ribnjacima u Hrvatskoj, često dolazi do pojave bolesti pa i uginuća. Pojava bolesti u riba koje smo prebacili u karantenski ribnjak Gračani navelo nas je da istražimo što se o bolesti kod te ribe zna u nas i u svijetu. Pretražujući svjetsku literaturu, te Compact Cambridge ASFA 1982–sept. 1990. nije nađen ni jedan rad koji opisuje bolesti te vrste riba. Samo u pet radova opisana je ta riba, i to s obzirom na fiziologiju i probavu (Gas i Noaillac–Depeyre, 1981; Noaillac–Depeyre i Gas, 1982, 1983; Reutter, 1984, Maniel i Maniel, 1985). To nas je navelo da pokušamo izolirati uzročnika promjena na ribama te vidjeti eventualnu mogućnost liječenja.

MATERIJAL I METODOLOGIJA

Domovina je američkih somića Sjeverna i Srednja Amerika odakle je god. 1885. prenesen u Europu, gdje se dobro aklimatizirao. Po vanjskom obliku podsjeća na našeg soma, od kojeg se razlikuje po tome što ima masnu peraju, osam brkova (četiri dugačka na gornjoj, a četiri kraća na donjoj čeljusti). Repna mu je peraja jasno odvojena od analne i duboko urezana, a prve šipčice ledne i prsne peraje izrazito su mu razvijene i služe kao vrlo uspješno obrambeno sredstvo. U lednoj je peraji jedna negranata i šest granatih zraka, a u podreпноj peraji jedna negranata i 25–30 granatih zraka. Bočno po tijelu ima tamne mrlje, ali odrasle ribe mogu biti djelomično ili potpuno bez mrlja. Tijelo je bez ljusaka. Odgovaraju mu slabo tekuće odnosno stajaće vode, kao što su npr. ribnjaci, šoderice itd., gdje se može jako razmnožiti. Srednja mu je dužina oko 20 centimetara, a u povoljnim prilikama doseže i do 45 centimetara, s masom većom od 0,5 kilograma. U svojoj je domovini mnogo veći i teži.

Mrijesti se u proljeće, a pri tome gradi okruglo gnijezdo u korijenu stabala uz vodu. Ikra mu je 3 milimetra u promjeru. Mužjak čuva ikru, a inkubacijsko vrijeme traje od četiri do šest dana. Hrani se malim životinjama, ikrom, a i sitnom ribom, pa je veliki štetnik. Meso mu je ukusno (Sabioncello, 1967).

Istraživanje patoloških promjena kod američkih somića koji su dopremljeni iz ribnjačarstva Čazma (radna jedinica Sišćani) provedeno je na Gračanskom ribnjaku u Zagrebu. Ribnjak je opskrbljen izvorskom vodom konstantne temperature od 10 °C (+/- 1 °C). Ribe su bile smještene u betonske bazene veličine 2 x 3 metra, u vodi dubine oko 50 centimetara.

Ribe su nakon nekoliko dana od dopreme pokazivale znakove bolesti. Takve su ribe obuhvaćene općim kliničkim pregledom, patoanatomskom pretragom i uzimanjem materijala za bakteriološku pretragu.

Materijal za bakteriološku pretragu uziman je sa žive ribe, i to s promijenjenih dijelova kože i peraja. Prilikom patoanatomske pretrage uzet je materijal iz bubrega, jetre, slezene i srca. Istodobno su napravljeni i razmazi koji su nakon toga obojeni po Gramu. Materijal je nasaden na tryptic-soy agar (TSA) i stavljen na inkubaciju pri temperaturi od 25 °C kroz 24 sata. Izdvojene su kolonije i naciepljene na podloge TSA da bi se dobila kultura bakterija s kojom bi se dalje radila identifikacija. U tu svrhu obavljene su ove pretrage: dokaz razgradnje ugljikohidrata, odnos bakterija prema bjelančevinama i aminokiselinama, tvorba reduktaza, odnos prema nukleinskim kiselinama i sposobnost iskorištavanja citrata.

Razgradnja ugljikohidrata dokazivana je preko razgradnje saharoze, Voges-Proskauerovim pokusom i pokusom s metilnim crvenilom. Razgradnja saharoze ispitivana je s pomoću Andrade saharoza peptonske vode (TORLAK) koja je razlivena u epruvete, a unutra je stavljena Durhamova fermentacijska epruvetica. Pokus s metilnim crvenilom raden je na podlozi MR-VP (GIBCO), koja je upotrijebljena i za Voges-Proskauerov test za dokaz acetona. Odnos prema bjelančevinama ispitivan je testom za dokaz koagulaze koji je napravljen s pomoću kuniće plazme koja je bila razrijeđena u odnosu 1:4. Zatim je 0,8 ml plazme inokulirano s 0,2 ml 24-satne bujonske kulture. Reakcija se provjeravala nakon 1, 3, 6, 24, 48 i 72 sata.

Osim dokaza koagulaze, ispitivana je sposobnost enzimske razgradnje triptofana, pri čemu nastaje indol. Materijal je naciepljivan na hranjivu podlogu Indol Nitrate Broth (GIBCO). Nakon inkubacije dodan je Kovacsev reagens.

Ista vrsta podloge upotrijebljena je i za dokaz redukcije nitrata. Nakon rasta dodan je prvi reagens koji se sastojao od L-naftilamina i 30%-tne octene kiseline, a nakon toga i drugi reagens sastavljen od sulfanilne i octene kiseline.

Odnos bakterija prema nukleinskim kiselinama ispitivan je na kompletu za dokaz termostabilne DNA-ze (TORLAK I BORIS KIDRIĆ-VINČA). Materijal je inkubiran na Mueller-Hintonovu agaru kroz 24 sata na 35 °C. Zatim je Petrijeva ploča s izraslim kolonijama stavljena na 60 °C kroz

dva sata. Za to je vrijeme otopljen IDS reagens na 100 °C. Kad se malo ohladio preliven je preko izraslih kolonija koje su zatim vraćene na inkubaciju na 35 °C kroz dva sata.

Sposobnost iskorištavanja citrata kao izvora ugljika i energije ispitivana je na Simmons–citrata agaru (GIBCO).

Test za dokaz katalaze raden je na Mueller–Hintonovu agaru na kojem su uzgojene kolonije i nakon toga prelivene 3%-tnom otopinom vodikova peroksida. Dokazana je razgradnja želatine na hranjivoj podlozi koja sadrži želatinu.

Za potrebe liječenja napravljen je i antibiogram gel–difuzijskom metodom na Mueller–Hintonovu agaru. Na njega je razlivena kultura uzročnika i s pomoću test–diskova položenih na osušenu podlogu, nakon inkubacije, dobiveni su rezultati osjetljivosti uzročnika na antibiotike. Primijenjeni su: kloramfenikol, ampicilin, streptomycin, gentamicin i tetraciklin test–diskovi.

REZULTATI

Općim je kliničkim pregledom primijećeno da somići u predjelu leđa između leđne i repne peraje imaju ranu veličine 2 x 3 centimetra, koja je imala bijelosivi rub i zacrvenjeno dno koje je dopiralo do mišićnoga sloja. Također su primijećene sitnije rane, veličine glavice pribadače, na prsnim perajama.

Patološkoanatomskim pregledom nađen je zacrvenjeli analni otvor, trbušna je šupljina bila prazna, organi priraslicama spojeni sa stijenkom trbušne šupljine, a probavni organi ispunjeni sadržajem.

Bojenjem po Gramu razmaza jetre i bubrega, nađene su plavo obojene (Gram +) okrugle bakterije koje su tvorile nakupine. Nakon inkubacije nasadenog materijala iz jetre, bubrega i kože, u termostatu na agaru izrasle su kolonije bijele do žute boje, 1–2 milimetra u promjeru, sjajne, mazive konzistencije i konveksne.

Dokaz razgradnje saharoze proveden na Andrade saharoza peptonskoj vodi pokazao je nakon inkubacije ružičastu boju reagensa, a u Durhamovoj epruvetici nije nađen plin. To dokazuje da uzročnik razgrađuje saharozu stvarajući kiselinu.

Pokus s metilnim crvenilom pokazao je nakon inkubacije i dodavanja reagensa žutu boju, što je dokaz negativne reakcije.

Nakon primjene Voges–Proskauera testa nije došlo do promjene boje reagensa pa je i ta reakcija bila negativna.

U epruveti testa za dokaz koagulaze i nakon višekratnih pregleda nije se promijenila konzistencija pa je test pokazao da uzročnik ne tvori koagulazu.

Reakcijom za dokaz tvorbe indola nije došlo do promjene boje indikatora, što dokazuje da bakterija ne razgrađuje triptofan tvoreći indol.

U reakciji za dokaz redukcije nitrata odmah nakon dodavanja reagensa boja podloge promijenjena je u crvenu, što govori o tome da je kalijev nitrat iz podloge reduciran do nitrita.

Tvorba enzima DNA-ze dokazana je pojavom ružičaste boje na mjestu rasta kolonija, dok je ostali dio ploče ostao plave boje.

Na Simmonsovu citratnom agaru nakon inkubacije nađeni su rast i promjena boje podloge u modru, što upućuje na to da uzročnik iskorištava citrat kao izvor ugljika i energije.

Testom za dokaz katalaze došlo je do stvaranja mjehurića plina, pa je time potvrđeno postojanje tog enzima. I testom za dokaz razgradnje želatine dobivena je pozitivna reakcija, jer se nakon inkubacije želatina otopila.

Rezultati dijagnostičkih postupaka prikazani su u tabl. 1.

Tablica 1. Rezultati dijagnostičkih postupaka

Table 1. The results of the diagnostic tests

Proba	H ₂ S	SAH	MR	VP	KOA	IND	NO ₃	DNA	SC	KAT	GEL
Reakc.	-	+K	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Antibiogram, raden na Mueller–Hintonovu agaru, pokazao je da je uzročnik najosjetljiviji na oksitetracilin i gentamicin. Ti su rezultati prikazani u tabl. 2.

Tablica 2. Rezultati antibiograma

Table 2. The results of the antibiogram

Antibiotik	TE-30	KK	TT	G	A	ST
Reakcija (mm)	10	12	20	20	10	0
Reakcija	+	+	+++	+++	+	0

RASPRAVA

Prema dostupnoj literaturi (Compact Cambridge ASFA 1982–sept 1990), američki je somić (*Amiurus nebulosus*) vrsta koje je patologija prilično slabo istražena. Nađeni su radovi koji su više obrađivali fiziologiju te vrste riba (Gas i Noaillac–Depeyre, 1981; Noaillac–Depeyre i Gas, 1982, 1983; Reutter, 1984; Maniel i Maniel 1985), a nisu nađeni radovi koji bi se bavili patologijom.

Nadeni su radovi koji obrađuju pojavu streptokoka u vodama rijeka (Khalaf i Muhammad, 1989) i streptokokne infekcije u riba (Foo et al., 1985; Park et al., 1987; Boonyaratpalin, 1983; Kitao et al., 1979). Također su u nekim radovima obrađene sposobnosti preživljavanja *Streptococcus* sp. prilikom smrzavanja (Jang i Lee, 1987; Choi et al., 1986), prisutnost u probavnome traktu šarana (Stojković-Atanacković i Popović, 1985), te serološke, kulturalne i biokemijske metode otkrivanja streptokoka u gofa (Kitao, 1982; Kusuda et al., 1982). U dva rada obrađena je in vitro aktivnost josamycina i pyridonkarboksilnih kiselina prema *Streptococcus* sp. (Takemaru i Kusuda, 1988; Nakano et al., 1989).

Iz svega je vidljivo da se *Streptococcus* sp. nalazi u vodama rijeka kao uvjetno patogeni organizam, kao i u mikroflori probavnoga trakta šarana. Radovi koji obrađuju probleme streptokoknih infekcija u riba spominju promjene boje tijela, sljepoću, konvulzije, nekoordinirane kretnje u riba (*Siganus canaliculatus*). Kod gofa (*Seriola quinqueradiata*) streptokokne su infekcije izazivale petehije na unutrašnjosti škržnih poklopaca i promjene na prsnim perajama.

Prema našim nalazima riba je imala promjene na koži, perajama i trbušnim organima. Nisu bile zamijećene promjene na škragama ili škržnim poklopcima. Uzročnik je bio osjetljiv na oksitetraciklin i gentamicin, a umjereno osjetljiv na kloramfenikol, što donekle odgovara nalazu Parka i suradnika (1987), koji su ustanovili osjetljivost sojeva *Streptococcus* sp. na kloramfenikol, tetraciklin, penicilin i eritromicin, a rezistenciju na sulfisoxazol.

Uzimajući u obzir zdravstveni pregled riba, patološkoanatomski nalaz i rezultate izvršene bakteriološke pretrage zaključili smo da je uzročnik koji je uzrokovao bolest američkih somića *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*. Ustanovljenje podvrste temeljeno je na sposobnosti uzročnika da razgrađuje želatinu, što nije osobina drugih podvrsta.

S obzirom na sve dosad iznesene činjenice, došli smo do zaključka da se radi o prvoj zabilježenoj pojavi streptokokne infekcije u američkog somića i prvom izoliranju *Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* iz te vrste riba.

Summary

BACTERIAL DISEASE OF THE BROWN BULLHEAD (*AMIURUS NEBULOSUS* L.)

Bacterial disease of the brown bullhead in culture was investigated. The fish were analyzed by standard clinical examinations and pathoanatomical investigations. The disease is characterized by the occurrence of a wound on the backs and fins, and adhesions between the organs of the stomach

cavity. Bacteriological analyses (physiological and biochemical characteristics of the bacteria) were analyzed in samples of skin, fins, liver, spleen, heart and kidneys of the diseased fish.

Determined was the presence of the bacteria *Streptococcus faecalis* subsp. *liquefaciens*, which by antibiogramic tests showed the highest sensitivity to the antibiotics oxytetracycline and gentamycin.

LITERATURA

- Buchanan, R. E.; Gibbons, N. E. (1975): Bergey's manual of determinative bacteriology, (8th ed.). Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1268.
- Freyer, J. L.; Rohovec, J. S. (1984): Principal bacterial diseases of cultured marine fish. Helgolander Meeresuntersuhungen, 37, 533–545.
- Gas, N.; Noaillac-Depeyre, J. (1981): Structure of the digestive tract of freshwater teleosts. Fish nutrition. Proceedings coll. Cnerne, Paris, France, 19–44.
- Livojević, Z.; Bojčić, C. (1967): Priručnik za slatkovodno ribarstvo. Agronomski glasnik, 704, Zagreb.
- Lucky, Z. (1977): Methods for the diagnosis of fish diseases. Amerind publishing Co. Baltimore, 140.
- Maniel, R.; Maniel, A. (1985): Analysis of the secretions of the subcommissural organs of several vertebrate species by use of fluorescent lectins. Cell tissue res., 239 (2) 359–364.
- Noaillac-Depeyre, J.; Gas, N. (1982): Ultrastructure of Endocrine cells in the stomach of two Teleost Fish, *Perca fluviatilis* L. and *Ameiurus nebulosus* L. Cell tissue res., 221 (3) 657–678.
- Noaillac-Depeyre, J.; Gas, N. (1983): Cytophysiological study of the intestinal epithelium of the *Ameiurus nebulosus* L. Can. J. Zool., 61 (11) 2556–2573.
- Rasheed, V.; Plumb, J. A. (1984): Pathogenicity of a non-haemolytic group B *Streptococcus* sp. in gulf killfish (*Fundulus grandis* Baird and Girard). Aquaculture, 37, 97–105.

- Reutter, K. (1984):* Intramembranous particles in the membrans of large and small receptor villi of the *Ameiurus* taste bud, as revealed in freeze-etch preparations. Proceedings of the eighth international symposium on olfaction and taste. August 23rd–26th, 1983, in Melbourne, Australia, Chem. senses., 8 (3) 262–263.
- Roberts, J. R. (1982):* Microbial diseases of fish. Academic Press Inc., London, 305.
- Roberts, J. R. (1989):* Fish pathology (2nd ed.) Bailliere Tindall, London, 467.

Primljeno 6. 11. 1992.