

O utjecaju temperature i fiziološkog stanja šarana na umjetnu infekciju s *Pseudomonas punctata*

I. Tomašec i J. Karlović

Mišljenja o ulozi bakterije *Pseudomonas punctata* kod nastanka i razvoja zarazne vodene bolesti šarana (z. v. b. s.) nisu jednodusna. Njemački istraživači W. Schäperclaus¹⁾, W. Wunder i H. Dombrowsky²⁾ su glavni pobornici stajališta da je *P. punctata* primarni uzročnik te bolesti, pa taj svoj nazor iznose i u svojim najnovijim publikacijama. Na drugoj strani A. Pješkov³⁾, G. D. Gončarov⁴⁾, E. M. Ljajman i A. J. Spoljanskaja⁵⁾ i I. Tomašec⁶⁾ smatraju, da je uzročnik z. v. b. š. virus, a bakterija *P. punctata* da imade tek sekundarno značenje. Svakako da ta bakterija može u izvjesnoj mjeri utjecati na daljni razvoj i tok te bolesti. S. Koenig-Aust, G. Brunner i R. Jaxtheimer⁷⁾ iznose misljenja, da bi ta bolest mogla nastati zajedničkim djelovanjem virusa i *P. punctata*.

Ne ulazeći ovdje u sve pojedinosti toga problema želimo dati jedan dalji prilog razjašnjenju uloge bakterije *P. punctata* u vezi s nastankom i razvojem z. v. b. š. Općenito je poznato, da se z. v. b. š. javlja u proljeće, i da najžešće vlada u vrijeme kad temperatura vode iznosi 15 do 20°C. Ugrije li se voda preko 25°C uginanje obično naglo prestaje. Tokom ljeta, pa i tokom jeseni i zime, bolest se javlja posve iznimno odnosno u mnogo blažem obl.ku. Prema tome tokom proljeća postoje neki faktori za koje možemo smatrati, da pogoduju nastanku i razvoju z. v. b. š. Među njima jasno se ističu dva faktora: temperatura vode (pa posljedično tome i temperatura tijela šarana) i fiziološko stanje šarana, koji iza zimskog mirovanja iz razdoblja gladovanja i mirovanja prelazi u ljetno razdoblje, kada se izdašno hrani. Stoga smo smatrali potrebnim, da točnije ustanovimo kako šarani reagiraju na umjetnu infekciju tom bakterijom kod različite temperature vode i u razno godišnje doba.

INFEKCIJA ŠARANA S *P. PUNCTATA* KOD RAZLIČITE TEMPERATURE VODE

Za taj pokus upotrebljeni su jednogodišnji šarančići, teški oko 2 dkg, koji su potjecali iz ribogojilišta u kojemu nije vladala z. v. b. š. Sredinom travnja izvađeni su iz zimovnjaka i preneseni u zavod, gdje su do početka pokusa i tokom njega (druga polovica travnja i prva polovica svibnja) živjeli u vodovodnoj vodi bez hrane. Bili su dakle u sličnom fiziološkom stanju kao i šarani iza zimovanja u prirodi. Šarančići su inficirani intramuskularno sa splavinama 24 satne agarske kulture *P. punctata*, koja je izolirana iz šarana bolesnog od z. v. b. š. Raspoređeni su u tri skupine, od kojih je jedna držana kod temperature vode od 28—30°C, druga kod 18—20°C, a treća kod 10—12°C. Šarančići pojedine skupine inficirani su različitim dozama *P. punctata* i to s 0,05, 0,01, 0,005 i 0,001 cm² agarske kulture. Sa svakom dozom u svakoj skupini inficirana su po 4 šarana.

Tabela 1: Ugibanje šarančića iza intramuskularne infekcije s agarskom kulturom *P. punctata* kod različite temperature vode

Doza <i>P. punctata</i> u cm ²	I (28—30°C)	II (18—20°C)	III (10—12°C)
	Uginulo šarančića		
0,05	4 (iza 1, 1, 2, i 2 dana)	4 (1, 1, 3 i 3 d.)	4 (1, 2, 3 i 4 d.)
0,01	3 (2, 2, 4 d.)	4 (1, 2, i 10 d.)	
0,005	4 (1, 1, 4 i 4 d.)	4 (1, 2, i 3 d.)	
0,001	—	1 (4 d.)	

Rezultate pokusa prosuđivat ćemo prema uginanju i prema proizvedenim lokalnim promjenama. Ugibanje šarančića u pojedinim skupinama prikazano je u tabeli 1. Vidimo da nije bilo bitne razlike između šarančića držanih kod 28—30°C, i onih kod 18 do 20°C, dok se rezultat skupine kod 10—12°C jasno razlikuje od prednjih dviju. Najveći je dio šarančića inficiranih s 0,01 cm² agarske kulture u prvim dvjema skupinama uginuo već prvih dana iza infekcije, a u skupini kod 10—12°C nije uginuo ni jedan od posljedica infekcije. Stoga u toj skupini nije ni izvršena infekcija s nižim dozama, t. j. s 0,005 i 0,001 cm² agarske kul-

1) Öster. Fischerei 5 (11) 243—250, 1953.

2) Allg. Fischerei-Ztg. 76, 8, 1951.

3) Der Fischwirt 3, 1953.

4) Bakteriološke zabojevanja ryb, 1939.

5) Rybnoje hozjajstvo 25 (4) 45, 1949.

6) Rybnoje hozjajstvo 25 (4) 38—41, 1949.

7) O problemu etiologije i patogeneze zarazne vodene bolesti šarana. Zagreb, 1953.

8) Allg. Fischerei-Ztg. 75, 17, 1950.

ture, kao što je to učinjeno u drugim dvjema skupinama.

Jednak naizaz bio je i kod lokalnih promjena izazvanih na mjestu aplikacije bakterijske kulture. Općenito su na mjestu aplikacije nastale gnojne upale potkožja i mišića, uz stvaranje apscesa (obično iza 2 dana), pa kasnije i čirova kože. Između skupine šarančića držanih kod 28—30 °C i skupine kod 18—20 °C nije bilo uočljivih razlika. Kod temperature vode kod 10—12 °C reakcije su bile znatno slabije. Dok su reakcije kod prve dvije skupine uz dozu od 0,05 i 0,01 cm² agarske kulture bile voma jake, tako da su katkad zahvatile i cijelu stranu inficiranog šarančića, dotle su reakcije kod temperature vode od 10—12 °C s dozom od 0,05 cm² bile znatno slabije od prednjih, a reakcije s dozom od 0,01 cm² agarske kulture bile su prvi dan posve neznatne, a iza par dana su uopće nestale. Od šarančića inficiranih s 0,001 cm² uginuo je samo jedan kod temp. od 18—20 °C, dok je kod sviju ostalih kod 18—20 °C i kod 28—30 °C nisu ustanovljene nikakove lokalne promjene.

Ti postignuti rezultati su u skladu s mogućnostima razmnažanja bakterije *P. punctata*. Ona se u umjetnoj kulturi najbolje razmnaža kod temperature između 20—30 °C. Pa i u ribnjacima je *P. punctata* najviše raširena u ljetnim mjesecima (T. Ehrlich, usmeno saopćenje). Međutim ti rezultati nisu u skladu s pojavom z. v. b. š. u prirodi. Dok su kod umjetne infekcije s *P. punctata* rezultati infekcije kod 18—20 °C i 28—30 °C bili približno jednaki, dotle prirodna z. v. b. š. kod temperature vode od 20 °C počinje jenjaviti, a kod 25 °C ugibanje obično naglo prestaje. Kod preboljelih šarana, koji u ribnjacima u to vrijeme počinju opet dobro jesti nalazimo čirove kože i mišića, a katkad i gnojne procese, koji tokom daljih nekoliko tjedana zacjeljuje. Ugibanje dakle prestaje baš kod one temperature vode, kad se ta bakterija u ribnjacima počinje dobro razmnažati. Prema tome ova činjenica, ako ju promatramo samu za sebe, govori u prilog stajalištu, da *P. punctata* ne bi bila primarni uzročnik z. v. b. š. Gnojni procesi i čirovi kože koje kod šarana nalazimo u vezi s z. v. b. š. i kod više temperature vode, a kod čijeg stvaranja sudjeluje u velikoj mjeri i *P. punctata*, ne govore protiv takvog stajališta. Te sekundarne promjene su posve razumljive kraj obilne bakterijske flore u ribnjacima, u kojoj *P. punctata* zauzima vidno mjesto.

INFEKCIJA ŠARANA U GODIŠNJE DOBA KADA Z. V. B. Š. OBIČNO NE VLADA U AKUTNOM OBLIKU

Već smo uvodno istaknuli, da ulogu temperature vode ne možemo promatrati samu za sebe, jer se s povišenjem temperature vode bolje razmnaža flora i fauna u njoj, a time se povećava i prirodna hrana šarana. Pored toga s povišenjem temperature vode povišuje se i temperatura tijela šarana,

koji počinju bolje uzimati hranu, pa se time mijenja i njihovo fiziološko stanje. To svakako može u vezi s promjenom temperature vode također imati izvjestan utjecaj na nastanak i razvoj te bolesti. Stoga smo proveli nekoliko pokusa umjetne infekcije s *P. punctata* na šaranima u vrijeme kada z. v. b. š. u prirodi obično ne vlada. Infekcija je vršena s istim sojem *P. punctata* kao u prethodnom pokusu.

Pokus 1. Za pokus su upotrebljeni šarani koji su izvađeni iz jezera M. u vrijeme kad je temperatura vode bila viša od 25 °C (27. lipnja). Ovi šarani potjecali su iz ribogojilišta u kojemu inače vlada z. v. b. š., i na nekoliko njih primijećeni su ožiljci na koži, pa se može sumnjati da su preboljeli z. v. b. š. Pokusi su provedeni u zavodskim bazenima u vodovodnoj vodi kod temperature vode 18—20 °C. Šarani su inficirani odmah drugi dan iza kako su izvađeni iz jezera i to različitim dozama kulture 8 intraperitonealno, a 8 intramuskularno. Težina šarana kretala se je između 4 i 10 dkg. U svakoj skupini bilo je šarana razne težine. Intraperitonealno su inficirani po 2 šarana s 2, 1, 0, 5 i 0,1 cm², a intramuskularno po 2 s 0,1 i 0,01 cm², a 4 s 0,001 cm² agarske kulture.

Svi intraperitonealno inficirani šarani uginuli su unutar jednog dana iza infekcije (toksično djelovanje kulture, upalne promjene organa u trbušnoj šupljini, kao i kože i mišića oko mjesta aplikacije kulture). Od intramuskularno inficiranih šarana uginuo je samo jedan inficiran s 0,1 cm² agarske kulture. Kod intramuskularno inficiranih šarana ustanovljene su na mjestu aplikacije kulture upalne promjene razne jačine. Kod oba šarana inficirana s 0,1 cm² nastale su jake upalne promjene, mišićje se je raspadalo, a iza nekoliko dana nastali su apscesi i čirovi. Kod šarana inficiranih s 0,01 cm² bile su upalne promjene nešto slabije. Kod jednog šarana stvorio se je apsces, a kod drugog je upala iza 4 dana nestala. Samo kod jednog šarana inficiranog s 0,001 cm² primijećen je laki upalni edem na koži iznad mjesta aplikacije, dok ostala 3 šarana nisu pokazivali nikakove reakcije.

Pokus 2. 1. VII. inficirali smo 8 šarana teških oko 40 dkg iz ribnjaka u kojem je tokom proljeća vladala z. v. b. š. Na nekim šaranima primijećene su zaraslice na koži, pa se može zaključiti da su preboljeli z. v. b. š. Voda je u to vrijeme već prelazila temperaturu od 25 °C. Infekcija je izvršena intramuskularno i to kod 2 šarana s 0,1 cm², a kod 3 s 0,01 i 0,001 cm² agarske kulture. Šarani su držani u vodi odvodnog kanala ribnjaka, a pregledani su 48 sati iza aplikacije kulture.

Kroz navedeno vrijeme nije uginuo ni jedan šaran. Kod šarana inficiranih s 0,1 i 0,01 cm² nastala je na mjestu aplikacije gnojna upala u promjeru od nekoliko centimetara. Kod 2 šarana koja su inficirana s 0,001 cm² nisu na mjestu aplikacije ustanovljene nikakove promjene, a kod jednog je ustanovljen mali apsces.

Pokus 3. Šarani za taj pokus potjecali su također iz ribnjaka u kojem je tokom proljeća vladala z. v. b. š. Iz ribnjaka su izvađeni 7. XI. i dopremljeni u zavod, gdje su pokusi odmah provedeni u vodovodnoj vodi

kod temperature 18—28°C. Šarani su bili približno jednake težine oko 30 dkg. Intraperitonealno su inficirani po 3 šarana s 4, 2 i 0,5 cm², a intramuskularno po 3 šarana s 0,1, 0,01 i 0,001 cm² agarske kulture.

Od intraperitonealno inficiranih šarana s dozom od 4 cm² uginula su sva trojica unutar 24 sata, a od inficiranih s 2 cm² uginula su dvojica unutar 24 sata, a jedan unutar 48 sati, od šarana inficiranih s 0,5 cm² uginuo je jedan unutar 24 sata, a dvojica su ostali živi. Znakovi bolesti kod uginulih šarana bili su jednaki znakovima kod šarana koji su uginuli iza intraperitonealne infekcije u prethodnom pokusu. Kod trojice šarana inficiranih intramuskularno s 0,1 cm² nastali su jaki upalni procesi na mjestu aplikacije, mišićno tkivo je propalo, a iza tri dana stvoreni su apscesi promjera 3—5 cm. Kod 2 šarana inficiranih s 0,01 cm² bile su upalne promjene nešto slabije, a jedan nije uopće reagirao. Kod trojice šarana inficiranih s 0,001 cm² nisu ustanovljene nikakove upalne promjene.

Iz ovih pokusa vidimo, da šarani tokom ljeta i jeseni prilično dobro reagiraju na umjetnu infekciju s *P. punctata*. Nema nekih uočljivijih razlika između reakcija u ljeti i u jesen. Lokalne reakcije su kod intramuskularne infekcije s jednakim dozama bile približno jednake. Uginanje kod intraperitonealne infekcije bilo je u ovim pokusima kod ljetnih šarana veće nego kod jesenskih, ali to je i razumljivo, jer su ljetni šarani bili znatno manji.

No obzirom na svrhu ovoga rada najvažnije je da se ustanovi, da li šarani tokom ljeta ili jeseni jednako reagiraju na infekciju kao šarani tokom proljeća. Naše ljetne i jesenske skupine šarana teško je uspoređivati sa skupinom u proljeće (kod 18—20°C i 28—30°C), jer su potonji šarančići bili mnogo manji. Za pokus o ulozi temperature mi smo hotimice izabrali takove šarane, da bi taj pokus mogli uspješnije provesti. Donekle možemo za uspoređivanje uzeti u obzir lokalne reakcije kod intramuskularne infekcije. Te reakcije bile su kod proljetnih, ljetnih i jesenskih skupina šarana približno jednake. Radi boljeg prosuđivanja usporedit ćemo ove rezultate infekcije kod ljetnih i jesenskih skupina šarana sa rezultatima infekcije kod šarana koje smo tokom proljeća kroz nekoliko godina provodili u velikom broju, a koji pokusi su djelomice objavljeni u radovima I. Tomašeca⁹⁾). Tako su na pr. u jednom pokusu od 13 šarana teških 40 dkg inficiranih intraperitonealno s 4 cm² agarske kulture raznih sojeva *P. punctata* od posljedica infekcije uginula 7, a od 13 šarana inficiranih s 1 cm² uginula su 6. U drugom jednom pokusu uginjali su šarani težine 35—40 dkg nakon intraperitonealne infekcije s raznim sojevima *P. punctata* ovako: od 6 šarana svake skupine uginulo je od inficiranih intraperitonealno s 4 cm² njih 5, s 2 cm² 5, s 1 cm² 3, s 0,5 cm² 3, s 0,2 cm² 2, a s 0,1 cm² agarske kulture jedan šaran. Usporedimo li sve te rezultate tada vidimo,

da nije bilo vidnijih razlika između reakcije kod šarana u proljeće i onih u ljeti i jeseni. Potrebno je još istaknuti, da su šarani na kojima smo provodili pokuse u ljeti i u jesen potjecali iz zaraženih ribnjaka, pa se može predmijevati da imaju i neki imunitet protiv z. v. b. š. Kad bi *P. punctata* bio primarni uzročnik bolesti morao bi taj imunitet u izvjesnoj mjeri u ovim pokusima doći do izražaja. Međutim to se u ovim pokusima nije dogodilo.

Z a k l j u č a k

Temperatura vode u kojoj žive šarani utječe u izvjesnoj mjeri na umjetnu infekciju s *P. punctata*. Reakcije kod temperature vode od 28—30°C i 18—20°C približno su jednake, a one kod temperature s 10—12°C znatno su slabije. Nije bilo vidnijih razlika kod umjetne infekcije s *P. punctata* između proljetnih šarana s jedne strane i ljetnih i jesenskih s druge strane. Ovi rezultati umjetne infekcije nisu u skladu s prirodnom pojavom i tokom zarazne vodene bolesti šarana, pa stoga oni govore u prilog stajališta, da *P. punctata* nije primarni uzročnik ove bolesti.

Iz Zavoda za biologiju i patologiju riba, pčela i svilaca
Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
Predstojnik: prof. dr. Ivo Tomašec

I. Tomašec und J. Karlović

UEBER DEN EINFLUSS DER TEMPERATUR UND DES PHYSIOLOGISCHEN ZUSTANDES DES KARPENS AUF DIE KÜNSTLICHE INFESTION MIT PSEUDOMONAS PUNCTATA

Da die infektiöse Bauchwassersucht des Karpfens in akuter Form im Frühling bei einer Wassertemperatur von 15—20°C herrscht, so kann man vermuten dass die Temperatur und der physiologische Zustand des Karpfens einen gewissen Einfluss auf das Entstehen und den Verlauf dieser Krankheit hat. Wäre *P. punctata* der primäre Erreger dieser Krankheit, so müssten diese Faktoren auch einen gewissen Einfluss auf die Infektion mit *P. punctata* haben. Dieses Problem wurde in dieser Arbeit erforscht. Es wurde festgestellt, dass die Temperatur einen Einfluss auf die künstliche Infektion der Karpfen mit *P. punctata* hat. Bei der Wassertemperatur von 28—30°C und 18—20°C waren die Reaktionen ungefähr gleich, während bei 10—12°C die Reaktionen viel schwächer waren. Es sind keine bemerkbaren Unterschiede zwischen den Reaktionen im Frühling, Sommer und Herbst festgestellt worden. Diese Resultate bei der künstlichen Infektion mit *P. punctata* sind nicht im Einklang mit dem natürlichen Verlauf der infektiösen Bauchwassersucht des Karpfens, und sie sprechen zu Gunsten des Standpunktes, dass *P. punctata* nicht der primäre Erreger der infektiösen Bauchwassersucht ist.

9) Veterinarski arhiv 21 (3/4) 101—143, 1950.