

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

BAKTERIJE RODA *PSEUDOMONAS* KAO UZROČNICI BOLESTI U RIBA

**BACTERIA OF THE GENUS *PSEUDOMONAS* AS CAUSATIVE AGENTS
OF FISH DISEASE**

SEMINARSKI RAD

Miočić-Stošić Jure
Preddiplomski studij molekularne biologije
Undergraduate Study of Molecular Biology
Mentor: doc. dr. sc. Jasna Hrenović

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	BAKTERIJE RODA <i>PSEUDOMONAS</i>	3
3	PATOGENE VRSTE RODA <i>PSEUDOMONAS</i>	4
3.1	<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	4
3.2	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	6
3.3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	7
3.4	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	9
3.5	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	10
3.6	<i>Pseudomonas putida</i>	12
4	ZAKLJUČAK	13
5	LITERATURA	15
6	SAŽETAK	16
7	SUMMARY	16

1 UVOD

Bolesti životinja koje nastanjuju vodeni okoliš stoljećima su izazivale pažnju ljudi, ali je povećano zanimanje za njih, posebice onih uzrokovanih bakterijama, zadnjih godina potaknuto razvojem morske i slatkovodne akvakulture te rastom zabrinutosti za okoliš. Kako akvakultura postaje sve intenzivnija te se širi u nova područja, problemi sa zdravljem riba vjerojatno će postajati sve značajniji (Buller, 2004).

Nijedna skupina morskih ili slatkovodnih životinja, uključujući sisavce, ptice, mekušce, vodozemce pa tako i ribe, nije izbjegla utjecaj bakterijskih oboljenja. Stotine vrsta mogu biti patogeni divljih ili uzgojenih vodenih organizama te predstavljaju potencijalnu opasnost od oboljenja u za to povoljnim uvjetima (Buller, 2004). Međutim, od tih bakterija nisu svi primarni patogeni. Mnoge se mogu kategorizirati kao oportunistički patogeni koji koloniziraju i uzrokuju bolesti kod već ozlijeđenih domaćina. Inicijalno slabljenje može biti prouzročeno zagađenjem ili prirodnim fiziološkim stanjem kao što je to primjerice reproduktivna faza životnog ciklusa ribe (Austin & Austin, 2007).

Ribe i druge uzgojene ili divlje vodene životinje su podložne bakterijskim infekcijama na isti način kao i kopneni organizmi, a pogotovo u stresnim uvjetima. Bolest se može pojaviti sistemski ili može biti ograničena na vanjske površine kao što su koža ili škrge. U mnogim su slučajevima bakterije sveprisutne u okolišu ili mogu sačinjavati dio normalne flore vodene životinje (Buller, 2004). Pojava i razvoj bolesti je rezultat međudjelovanja patogena, domaćina i okoliša. Stoga samo multidisciplinarne studije koje uključuju karakteristike za ribe potencijalno patogenih mikroorganizama, aspekte biologije domaćina kao i bolje razumijevanje okolišnih faktora koji utječu na te kulture mogu omogućiti provedbu primjerenih mjera za sprječavanje i kontrolu bolesti (Toranzo *et al.*, 2004).

Bolesne jedinke mogu pokazivati mnoge fizičke promjene kao i promjene u ponašanju od kojih neke daju vrijedne tragove o prirodi bolesti. Treba naglasiti da su mnogi simptomi uobičajeni kod više bakterijskih oboljenja. Također je bitno napomenuti i da ona ne mora nužno biti izazvana jednom skupinom bakterija već može doći do sinergističkog međudjelovanja između dviju ili više skupina. Mogu se uočiti mnogi vanjski znakovi bolesti koji su odlike pojedinih bakterijskih patogena riba (Austin & Austin, 2007). Primjetan je cijeli niz znakova kao što je primjerice nekontrolirano kretanje, blijeda/tamna pigmentacija,

propadanje peraja, krvarenja, lezije, oštećenja očiju ili škrga, napuhnuti abdomen i još mnogo drugih (Slika 1.).

Prilikom utvrđivanja vrste patogene bakterije potrebno je voditi računa o općim kliničkim znakovima bolesti na ispitivanoj jedinki, unutarnjim promjenama koje su očite tokom pregleda primjerka nakon njegove smrti, histopatološkim promjenama oboljelog tkiva te bakterijskom ispitivanju tkiva koje zahtjeva posebnu spretnost kako bi se izbjegla kontaminacija bakterijama iz normalne mikroflore na površini ribe, probavnog sustava kao i iz vode (Austin & Austin, 2007).

Uzorci za analizu se uzimaju sa živih, bolesnih riba ili sa onih koje su nedavno uginule. Životinje koje su bile mrtve dulje vrijeme obično imaju vrlo kontaminirane organe zbog brzog rasta bakterija nakon smrti. Uzorci iz određenog okruženja kao što je to hladna ili morska voda mogu zahtijevati specifičnu temperaturu inkubacije ili dodatak NaCl mediju. Mikroflora na površini riba je heterogena s obzirom na slanost potrebnu za rast koja se obično zadržava i nakon serije nasađivanja u kulturi. Stoga se prilikom pokušaja uzgoja patogena u kulturi moraju uzeti u obzir potrebe za slanošću. Za identifikaciju se kasnije koriste primarni testovi koji uključuju mikroskopska ispitivanja razmaza te sekundarni biokemijski testovi koji su neophodni za determinaciju do razine vrste (Buller, 2004).

Predstavnici više od 25 porodica bakterija su povezivani sa oboljenjima riba neke od kojih su pripadnici rodova *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, a u ovom seminaru pažnja je na rodu *Pseudomonas*.



Slika 1. Primjer vanjskog znaka oboljenja – propadanje repa i peraja kalifornijske pastrve uzrokovano *Aeromonas hydrophila* (Austin & Austin, 2007)

2 BAKTERIJE RODA *PSEUDOMONAS*

Bakterije roda *Pseudomonas* su široko rasprostranjene i u pravilu nastanjuju zemlju i vodu. Kao skupina imaju vrlo različite biokemijske sposobnosti. Neke mogu koristiti više od 80 različitih supstrata uključujući šećere, aminokiseline i spojeve sa aromatskim prstenovima. Zbog toga igraju važnu ulogu u degradaciji mnogih sintetičkih i prirodnih tvari koje su otporne na degradaciju drugim mikroorganizmima. Sposobnost za razlaganje nekih od ovih tvari je kodirana plazmidima (Nester *et al.*, 2004). Ipak, većina vrsta, ako ne i sve, ne rastu u kiselim uvjetima ispod pH 4,5 (Holt *et al.*, 1994).

Vrste roda *Pseudomonas* su ravni ili lagano zakrivljeni, ali ne i zavijeni štapići, veličine 0,5-1,0 x 1,5-5,0 μm . Bojaju se Gram-negativno, nisu okruženi kapsulom te nije poznato da stvaraju endospore. Pokretljivi su pomoću jednog ili nekoliko polarnih bičeva, a rijetko su i nepokretni. Kod nekih vrsta mogu postojati kraće lateralne flagele (Holt *et al.*, 1994). Često proizvode pigmente topive u vodi (Nester *et al.*, 2004). Pritom ne stvaraju ksantomonadine. Aerobne su, sa strogo respiratornim tipom metabolizma i kiskom kao krajnjim akceptorom elektrona iako se u nekim slučajevima nitrat može koristiti kao alternativni elektron akceptor što omogućuje rast u anoksičnim uvjetima. Većina vrsta ne zahtjeva organske faktore rasta. Mogu biti oksidaza pozitivne ili negativne. Katalaza su pozitivne i kemoorganotrofne, a neke su vrste fakultativni kemolitotrofi te mogu koristiti H_2 ili CO kao izvore energije. Mnoge vrste akumuliraju poli- β -hidroksibutirat kao materijal za pričuvu ugljika koji se pojavljuje u obliku sudanofilnih uklopina. Za rast nekih vrsta potreban je dodatak NaCl u medij (0,1% ili više) (Holt *et al.*, 1994).

Većina ih je bezopasna dok neke mogu izazvati bolesti biljaka i životinja pa tako i riba. Tipična je i medicinski najznačajnija vrsta *Pseudomonas aeruginosa*. Čest je oportunistički patogen što znači da prvenstveno zaražava ljude koji već imaju neke zdravstvene probleme. Nažalost, može rasti u okolišu koji je siromašan hranjivim tvarima, kao što je voda koja se koristi u respiratorima i otporna je na mnoge dezinficijense i antimikrobne lijekove. Zbog toga bolnice moraju poduzimati mjere opreza kako bi spriječile njeno širenje među pacijentima (Nester *et al.*, 2004).

Mnoge vrste koje su bile klasificirane kao pripadnici roda *Pseudomonas* su nedavno premještene u neke od novih rodova. Do ove revizije je došlo djelomično zbog ispitivanja ribosomalne RNA (Nester *et al.*, 2004).

3 PATOGENE VRSTE RODA *PSEUDOMONAS*

Do sada je iz oboljelih primjeraka različitih riba izolirano šest vrsta bakterija koje pripadaju rodu *Pseudomonas* (Austin & Austin, 2007).

3.1 *Pseudomonas anguilliseptica*

Prvobitno je uočena kod jegulja, kada se bolest koju izaziva navodila kao Sekiten byo (crvena mrlja) (Lönnström *et al.*, 1994). Otada se razvila u jednu od najrazornijih bolesti jegulja u Japanu. Patogen je identificiran u širokom rasponu drugih vrsta uključujući baltičku haringu (*Clupea harengus membras*) (Lönnström *et al.*, 1994), podlanicu (*Sparus aurata*), okana (*Pagellus bogaraveo*), narančasto pjegastu kirnju (*Epinephelus coioides*) i bakalara (*Gadus morhua*). Neki podaci ukazuju na to da su japanske jegulje podložnije obolijevanju od europskih. Razumljivo, bolest se širi, a to može biti odraz prirodnih migratornih uzoraka populacija divljih jegulja ili ubrzanog povećanja uzgoja jegulje tokom sredine 1970-ih (Austin & Austin, 2007).

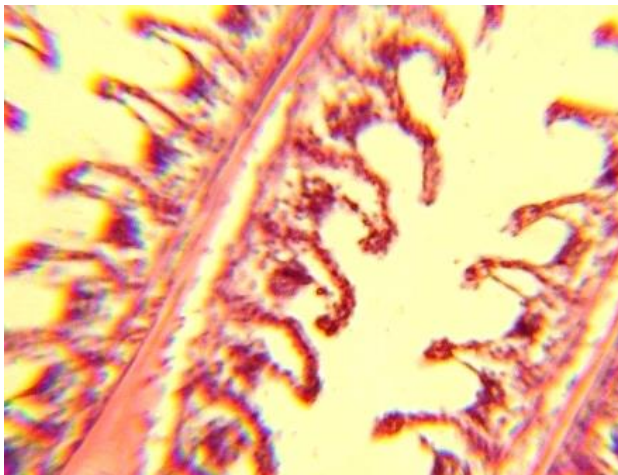
Tipično se očituje u obliku petehijalnih (točkastih) krvarenja na koži oko usta, škržnih poklopaca i na trbušnoj strani tijela. Zabilježen je i edem te hiperplazija epitelnih stanica škržnih lamela (Slika 2. i Slika 3.). Krvarenje u oku je uočeno kod inficiranih baltičkih haringi. Crvenilo peraja (kao što je to slučaj sa vibriozom ili infekcijom sa *Aeromonas hydrophila*) se obično ne pojavljuje. Malena petehijalna krvarenja se mogu razviti u trbušnoj šupljini, a jetra može biti blijeda i sa krvarenjima. Bubrež može biti mekan i tekućinast. Ostali simptomi bolesti su uključivali abdominalno rastezanje kod nekih životinja, krvarenje bubrega, blijedu jetru i crijevo puno žućkaste tekućine. Niska razina mortaliteta, iako u odsutnosti vanjskih znakova bolesti, je zabilježena kod okana u Španjolskoj. Zimska bolest podlanice, kod koje bolesne ribe čudno i sporo plivaju prije nego li potonu na dno i uginu, također je povezana sa ovim patogenom (Austin & Austin, 2007).

Jako se malo zna o epizootiologiji Sekiten-byo bolesti. Smatra se da bolest prevladava u brakičnoj vodi, pri temperaturi između 20°C i 27°C. Temperatura se smatra glavnim faktorom koji utječe na epizootiku. Prisutnost subletalnih koncentracija bakra (100-250 mg/l) u vodi pogoršava bolest. Rezultati ukazuju na redukciju u limfocitima i granulocitima što dovodi do smanjene fagocitoze. Sve dostupne informacije upućuju na ozbiljnost bolesti s obzirom na visoke mortalitete. U jednoj pojavi bolesti u Škotskoj, 67000 mladih jegulja (96% od ukupnog broja) zajedno sa 154 odrasle jegulje (3,9% od ukupnog broja) je uginulo. Općenito gledano

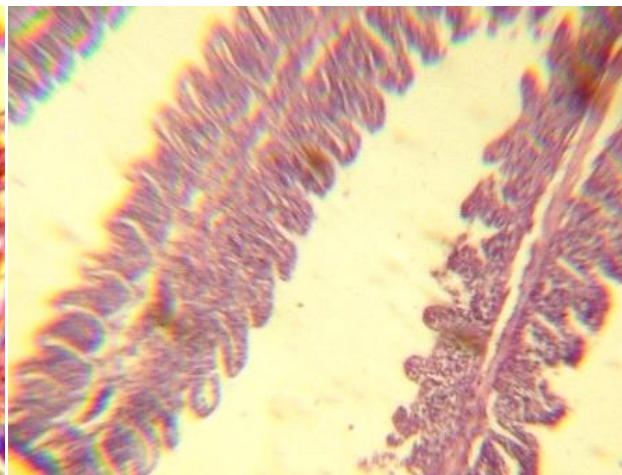
mortalitet većih odraslih jedinki bio je veći od onoga manjih odraslih jedinki. Ipak, najviša je bila smrtnost mlađi. To predstavlja značajan gubitak za proizvodnju i iziskuje ulaganja te ukazuje na to da bi „Sekiten-byo“ mogao postati teški ekonomski problem (Austin & Austin, 2007).

Pseudomonas anguilliseptica je Gram-negativni, nesporogeni štapić, koji se pokreće jednim polarnim bičem. Elektronska mikroskopija uzgajanih kultura otkriva prisutnost dugih, lagano zakrivljenih štapića sa zaobljenim krajevima. Veličina ovih stanica je procjenjena na 5-10 x 0,8 µm. Ne stvaraju fluorescentni pigment te nema reakcije u oksidativno-fermentacijskom testu. Katalaza su i oksidaza pozitivni, ali ne i arginin dihidrolaza, β-galaktozidaza, H₂S ili indol pozitivni. Ne reduciraju nitrate, kiselina ne nastaje iz arabinoze, fruktoze, galaktoze, glukoze, glicerola, inozitola, laktoze, maltoze, manitola, manoze, rafinoze, ramnoze, salicina, saharoze ili ksiloze. Citrat koriste neki izolati. Rast se odvija pri 5-30°C ali ne i 37°C, u 0-4% NaCl i pri pH 5,3-9,7. G + C omjer DNA je 56,5-57,4 mol % (Austin & Austin, 2007).

Izolacija *Pseudomonas anguilliseptica* se postiže iz uzoraka krvi, bubrega, jetre i slezene koristeći agar sa nutrijentima i dodatkom 10% konjske krvi ili hranjivi agar koji sadrži 0,5% NaCl pH vrijednosti 7,4. Inkubacija bi trebala biti 20-25°C u trajanju od barem 7 dana kada se razviju male (promjer <1 mm), okrugle, uzdignute, cjelovite, sjajne i blijedo sive kolonije (Austin & Austin, 2007).



Slika 2. Edem škržnih lamela uzrokovan infekcijom *O. niloticus* sa *P. anguilliseptica* (Sakr & Abd El-Rhman, 2008)



Slika 3. Hiperplazija epitelnih stanica sekundarnih škržnih lamela uzrokovana infekcijom *O. niloticus* sa *P. anguilliseptica* (Sakr & Abd El-Rhman, 2008)

3.2 *Pseudomonas chlororaphis*

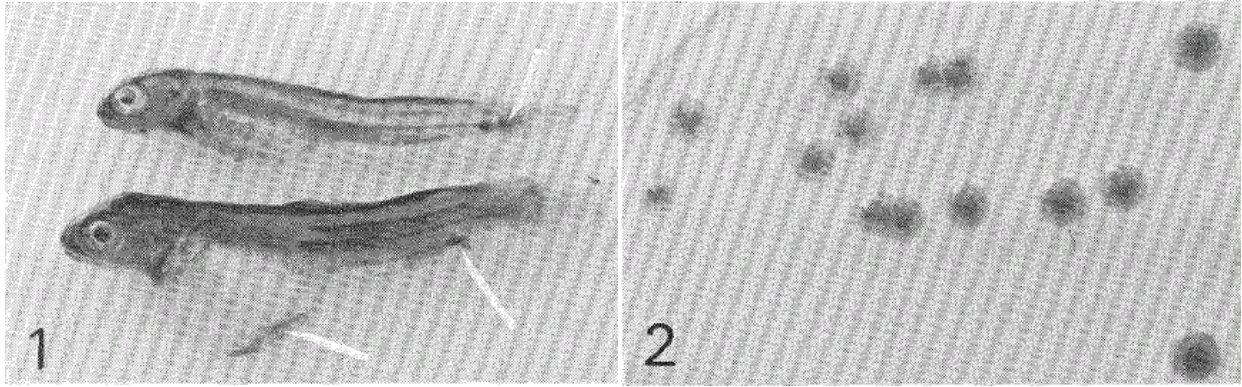
Do danas je *Pseudomonas chlororaphis* zabilježen kao patogen samo jedanput. To je uključivalo visok mortalitet uzgojne Amago pastrve (*Oncorhynchus rhodurus*) u Japanu. Za sada je još nejasno da li *Pseudomonas chlororaphis* predstavlja problem koji je na pomolu ili je to sekundarni patogen već bolesnih domaćina. Bakteriju se može pronaći u vodi koja se smatra rezervoarom infekcije. Drugi podaci ne postoje (Austin & Austin, 2007).

Kod umirućih mladih jedinki, simptomi bolesti su uključivali rastegnut abdomen sa ascitičnom tekućinom te krvarenja na površini tijela (Slika 4.) (Hatai *et al.*, 1975).

Bakterija je Gram-negativni štapić koji je pokretan polarnim bičevima. Ono po čemu je karakteristična jest činjenica da proizvodi zeleni pigment koji se u koloniji igličasto kristalizira. Na temelju tih i drugih biokemijskih svojstava ustanovljeno je da bakterija pripada vrsti *Pseudomonas chlororaphis* (Hatai *et al.*, 1975). Nije navedeno koja su to druga biokemijska svojstva.

Izolacija se može postići inokulacijom homogenata, pripremljenih iz cijele ribe, na površinu ploča hranjivih agara, sa inkubacijom na 25°C u trajanju od 5 dana (Slika 5.) (Hatai *et al.*, 1975). Iznenadjuće je da ovako jednostavna metoda omogućuje izolaciju čistih kultura budući da se može očekivati da ima kontaminanata u crijevu i na površini tijela (Austin & Austin, 2007).

Izolati iz Amago pastrve i kulture *Pseudomonas chlororaphis* su se pokazali letalnima za šarane, jegulje i pastrve nakon izazivanja infekcije intramuskularnim injiciranjem. Potpuni mortalitet se dogodio unutar 48 h pri temperaturi vode od 22°C sa simptomima bolesti koji su bili slični onima kod prirodno inficiranih riba. Međutim, mehanizam patogenosti nije poznat (Hatai *et al.*, 1975).



Slika 4. Rastezanje abdomena i krvarenja (strelice) mlađi *Onchorhynchus rhodurus* iz koje je izoliran *P. chlororaphis* (Hatai *et al.*, 1975)

Slika 5. Kolonije *P. chlororaphis* na hranjivom agaru nakon inkubacije u trajanju od 5 dana pri temperaturi od 25°C (Hatai *et al.*, 1975)

3.3 *Pseudomonas fluorescens*

Zabilježen je kao uzročnik bolesti u velikom rasponu ribljih vrsta uključujući bijelog tolstolobika (*Hypophthalmichthys molitrix*) i crnog tolstolobika (*Hypophthalmichthys nobilis*), zlatnu ribicu (*Carassius auratus*), linjaka (*Tinca tinca*), bijelog amura (*Ctenopharyngodon idella*) i crnog amura (*Mylopharyngodon piceus*), neimenovane vrste šaranki i kalifornijsku pastrvu. Općenito, *Pseudomonas fluorescens* je povezan sa propadanjem peraja ili repa gdje se inficirana površina gubi nagrizanjem. Kod mlađi linjaka su zabilježeni visoki mortaliteti (do 90% populacije), a kod kojih su vidljivi znakovi bolesti uključivali krvave lezije na koži i osnovici peraja. Ascitička tekućina se nakupljala u trbušnoj šupljini, a petehijalna krvarenja su bila očita na škragama, bubregu, jetri i u lumenu submukoze crijeva, tj. nastupila je tipična opća bakterijska septikemija. Slični simptomi su bili očiti i kod bijelog i crnog tolstolobika. Stres, kao i snižena temperatura vode mogla bi biti okidač za nastup bolesti. Kod kalifornijske pastrve je zabilježena prisutnost krvavih ulkusa na škragama i perajama (Austin & Austin, 2007).

Ova bakterija je dominantna sastavnica slatkovodnog ekosustava. Više je puta smatrana organizmom koji se pojavljuje kod kvarenja ribe, kontaminantom ili sekundarnim patogenom oštećenih ribljih tkiva, kao i primarnim, ali slabim patogenom. Svi objavljeni opisi organizma se blisko slažu sa definicijom *Pseudomonas fluorescens* (Austin & Austin, 2007).

To su Gram-negativni (Slika 7.), arginin-dihidrolaza, katalaza i oksidaza pozitivni štapići, koji su pokretani polarnim bičevima te koriste oksidativnu fosforilaciju za mineralizaciju organske tvari. Rast se odvija na 4°C, ali ne i na 42°C. Proizvodi se fluorescentni pigment (fluorescein), ali ne i β-galaktozidaza, H₂S, indol, amilaza ili ureaza. Voges Proskauer reakcija je negativna. Citrat se koristi te nastaje kiselina iz arabinoze, inozitola, maltoze, manitola, sorbitola, saharoze, trehaloze i ksiloze, ali ne i adonitola ili salicina (Austin & Austin, 2007).

S obzirom na njenu široku rasprostranjenost u vodenom okolišu, *Pseudomonas fluorescens* se vjerojatno širi kroz vodu koja služi kao primarni izvor infekcije. Bolest je posebno problematična pri niskim temperaturama vode, odnosno pri otprilike 1°C. U jednom su eksperimentu postigli 100% mortalitet u mlađi linjaka unutar 10 dana pri temperaturi vode od 10°C. Ribe su bile zaražene intraperitonealnim injektiranjem bakterijske suspenzije. Vrijedno je zabilježiti da se problem u tolstolobika razvio nakon stresnog zimskog razdoblja, kada je temperatura vode varirala oko točke smrzavanja. U ovom slučaju, stopa mortaliteta je bila 5% od populacije po danu. Nakon ulaska u ribu, izvanstanične proteaze su vjerojatno odgovorne za proisteklu štetu pa je tako u jednom istraživanju dobiven LD₅₀ (srednja letalna doza) za kalifornijsku pastrvu u iznosu od 4.2x10⁵ stanica pri 18°C i 1.1x10⁵ stanica pri 12°C (Austin & Austin, 2007).

Pseudomonas fluorescens je izoliran iz većine organa kao čista kultura na standardnim bakteriološkim medijima, kao što su to Pseudomonas F agar, krvni agar (Slika 6.), tripton soja agar (Tryptone Soya Agar, TSA) te hranjivi agar, nakon inkubacije na 22-28°C u trajanju od 24-28 h (Austin & Austin, 2007).

U jednom ispitivanju, izolati su pokazali podložnost antibioticima kanamicinu, nalidiksičnoj kiselini i tetraciklinu. Drugo istraživanje je pokazalo široku podložnost na antibiotike gentamicin, kanamicin i neomicin, manje na amikacin i oksitetraciklin i potpunu otpornost na kloramfenikol, eritromicin, penicilin i potencirani sulfonamid (Austin & Austin, 2007).



Slika 6. *Pseudomonas fluorescens* na krvnom agaru, 24 h (Buller, 2004)



Slika 7. *Pseudomonas fluorescens*, bojanje po Gramu (Buller, 2004)

3.4 *Pseudomonas plecoglossicida*

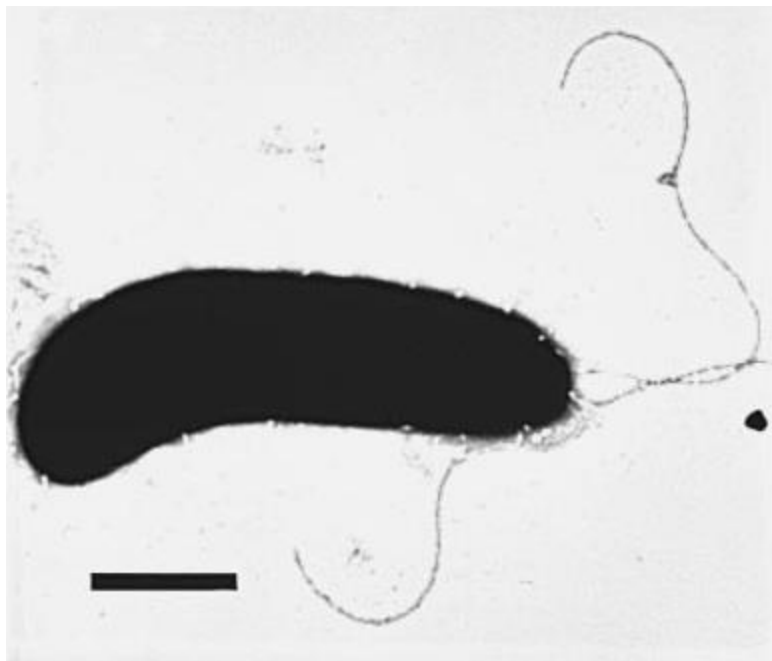
Nova se bakterijska bolest pojavila tijekom 1990-ih i uzrokovala masovne mortalitete kod ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) uzgajanog u ribnjacima u Japanu (Nishimori *et al.*, 2000). Uveden je termin bakterijski krvareći asciti, sa inficiranim ayu koji su imali lezije na škragama, srcu, crijevima, bubregu, jetri i slezeni. Posebno su duboke bile lezije na jetri i slezeni te hematopoetskim tkivima. One u bubregu, jetri i slezeni su bile nekrotične. Također su postojali čirevi na jetri. Nasuprot tome, mozak nije otkrivao prisutnost lezija (Austin & Austin, 2007).

Šest ispitivanih kultura čine homogenu grupu strogo aerobnih, Gram negativnih, pokretnih (više polarnih bičeva) štapića (Slika 8.) koji su katalaza i oksidaza pozitivni, reduciraju nitrat u nitrit i rastu na 10-30°C, ali ne na 4°C ili 41°C, u 0,5% NaCl. Arginin-dehidrolaza se proizvodi, ali ne i lizin ili ornitin-dekarboksilaza. Krv se hemolizira, ali ne lecitin, škrob ili Tween 80. Kaprat, citrat, D-fruktoza, 2-ketoglukonat, L-alanin, glukoza, D-malat, propilen glikol, L-lizin, sukcinat i L-citrulin se koriste, ali ne i L-arabinoza, m-inozitol, manitol, D-manoza, saharoza, D-tartrat, testosteron, trehaloza, L-triptofan ili D-ksiloza. Slabi fluorescentni pigment se stvara na mediju King B. G + C omjer DNA je 62,8 mol % (Nishimori *et al.*, 2000).

Uranjanje dovodi do infekcije ayu-a, sa škragama kao vjerojatnim mjestom ulaska kao što je to utvrđeno sa kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze (polimerase chain

reaction, PCR) u stvarnom vremenu. Šest sati nakon infekcije, patogen je pronađen u bubregu, jetri i slezeni; septikemija je bila očita nakon 48 h kada je organizam pronađen u krvi (Austin & Austin, 2007).

Tijekom istraživanja mrtvih ayu (sa krvavim ascitima) u Japanu tijekom 1999. i 2001. sa izuzetkom jednog izolata svi su bili nepokretni. Štoviše, nepokretne stanice su injicirane intramuskularno u ayu što je dovelo do izolacije kako pokretnih tako i nepokretnih stanica iz bubrega. Međutim, pokretne stanice su izolirane i nakon injiciranja pokretnih kultura. Koristeći GFP-označene stanice, uočeno je da se patogen ponajviše priljubljuje uz mjesto mikroskopskih ozljeda na perajama i koži (Austin & Austin, 2007).



Slika 8. Elektronski mikrograf negativno obojane stanice *Pseudomonas plecoglossicida*, oznaka 1 µm (Nishimori *et al.*, 2000)

3.5 *Pseudomonas pseudoalcaligenes*

Tokom 1992., na lokalitetu u Engleskoj uočene su kalifornijske pastrve (prosječna težina = 100 g) sa opsežnim lezijama na koži i znacima enteričke bolesti crvenih usta (iz koje je izolirana vrsta bakterije *Yersinia ruckeri*). Riba je imala opsežne lezije na koži, koje su se pružale po boku cijelom dužinom tijela od operkuluma do repa. Koža i mišići ispod nje do dubine od otprilike 1 mm su bili u potpunosti nagriženi. Organizam je izoliran iz mješovitih

kultura sa *Serratia plymuthica* iz ascitične tekućine i površinskih lezija nakon inkubacije na tripton soja agaru (Tryptone Soya Agar, TSA) pri temperaturi od 22°C u trajanju od 3-4 dana. Uz pomoć kompjuterske matrice vjerojatnosti za identifikaciju Gram negativnih, aerobnih, nefermentativnih bakterija, procijenjeno je da je odgovara vrsti *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Jedine nepodudarnosti su se odnosile na degradaciju želatine i škroba te produkciju ornitin dekarboksilaze (Austin & Austin, 2007).

Kremasto obojene kolonije sa gumastom konzistencijom sačinjavaju pokretni, oksidativni, kratki, Gram negativni štapići (Slika 9.) koji stvaraju arginin dehidrolazu, katalazu, ornitin-dekarboksilazu i oksidazu, ali ne β -galaktozidazu, H₂S, indol, lizin-dekarboksilazu ili triptofan-deaminazu, degradiraju želatinu, tirozin, (sa produkcijom melanina) i Tween 80, ali ne DNA, škrob ili ureu i rastu na 15°C i 25°C, ali ne na 4°C ili 40°C. Kiselina se stvara iz arabinoze i glukoze, ali ne iz amigdalina, inozitola, manoze, melibioze, ramnoze i sorbitola. Koriste citrat. Voges Proskauer reakcija je negativna (Austin & Austin, 2007).

Injekcija 10⁵ stanica intraperitonealno ili intramuskularno u kalifornijsku pastrvu (prosječna težina = 12g) pri temperaturi od 15°C je rezultirala potpunim mortalitetom unutar 7 dana. Ribe na samrti su imale krvarenja (unutarnja i oko otvora) i ascitičnu tekućinu u peritonealnoj šupljini (Austin & Austin, 2007).

Bakterije roda *Pseudomonas* dolaze u onečišćenoj/eutroficiranoj slatkoj vodi koja se smatra izvorom *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Štoviše, bilo je očito da su vode farmi riba imale prtok kanalizacije iz obližnje septičke jame. Antibiogrami su otkrili osjetljivost na antibiotike oksitetraciklin, oksolinsku kiselinu i potencirane sulfonamide (Austin & Austin, 2007).



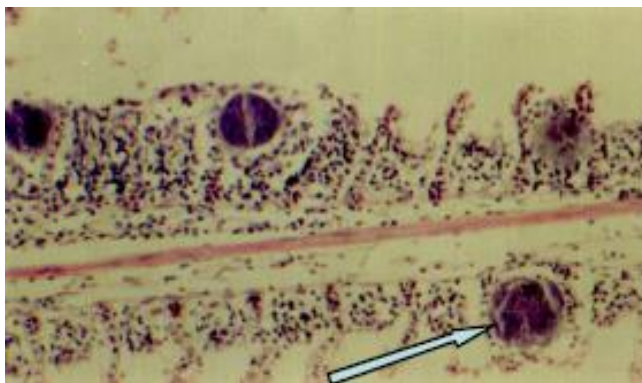
Slika 9. *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, bojanje bičeva po Leifsonu
(<http://www.medicalhealthcareinfo.com>)

3.6 *Pseudomonas putida*

Ova se bakterija kao patogen riba usputno spominjala u Japanu. Organizam je izoliran iz oboljelih ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) u Japanu. Bolest je opisana kao bakterijski hemoragijski asciti. Zabilježene su sličnosti izoliranih bakterija sa ovom vrstom, ali je fluorescentni pigment bio odsutan te je izostajala aglutinacija sa antiserumom pripremljenim za tipski soj (*Pseudomonas putida*). U kasnijem istraživanju je patogen označen kao *Pseudomonas putida* na bazi 16S rRNA sekvencioniranja (homologija = 99,8%) i fenotipskih karakteristika (Austin & Austin, 2007).

Opisana je protruzija oka, melanoza i čirevi na leđnoj površini kalifornijske pastrve u jezercima Turske. Unutrašnji organi su izgledali normalno, ali je crijevo bilo puno žućkaste tekućine (Austin & Austin, 2007). Kod eksperimentalno inficirane kalifornijske pastrve zabilježena je tamna pigmentacija kože, pogotovo na bazi leđne peraje, blijede škrge i jetra te krvarenja raznih mjesta na koži, najčešće na mjestu infekcije koja su popraćena ulkusima. Neke su ribe pretrpile raspadanje repne te prsnih peraja. Veliki volumeni mutne tekućine su pronađeni u abdomenu. Najviše bakterija se moglo izolirati iz bubrega (Bektas & Ayik, 2009). Jednaki su simptomi zabilježeni i kod eksperimentalno inficiranih *Oreochromis niloticus* (Slika 10. i Slika 11.).

Kulture su fluorescentni, pokretni, Gram-negativni štapići koji proizvode arginin-dehidrolazu i oksidazu, ali ne i β -galaktozidazu, H_2S ili indol. Rastu pri $4^\circ C$, ali ne i pri $41^\circ C$. Ne degradiraju eskulin, želatinu ili ureu te proizvode kiselinu iz arabinoze, kaprične kiseline, glukoze, malata, klijevog glukonata i trinatrijevog citrata, ali ne i adipične kiseline, maltoze, manitola, D-manoze, ramnoze, sorbitola ili saharoze (Austin & Austin, 2007).



Slika 10. Škrge *Oreochromis niloticus* eksperimentalno inficirane sa *Pseudomonas putida*, aneurizma krvnih žila (Abdel-Hadi *et al.*)



Slika 11. *Oreochromis niloticus*, tamnjenje, zamućenost očiju, gubitak ljusaka i propadanja repa (Abdel-Hadi *et al.*)

4 ZAKLJUČAK

Bakterijske vrste roda *Pseudomonas* široko su rasprostranjene u okolišu i stoga ne iznenađuje da neke od njih izazivaju bolesti raznih životinja pa tako i riba. Uočljivo je, međutim, da se patogene vrste koje pripadaju ovome rodu smatraju većinom oportunističkim patogenima ili slabim primarnim patogenima. Za razvoj bolesti uzrokovane ovim mikroorganizmima potrebno je da jedinke budu izložene stresnim uvjetima ili oslabljene prethodnim bolestima te primjerice reproduktivnim ciklusom. Kavezni uzgoj u akvakulturi pruža odlične uvjete za pojavu takvih bolesti s obzirom na veliku gustoću riba koje su u stalnom međusobnom kontaktu, kojima se redovno manipulira i tako ozljeđuje. Oštećenja mogu djelovati kao ishodišta infekcija, a čest je i izostanak kvalitetne prihrane što dodatno umanjuje sposobnost obrane organizma. Štoviše, može se dogoditi da uz to još postoji i onečišćenje kanalizacijskom vodom koja može biti izvor patogena kao što je to zabilježeno

kod *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. Smatra se da je niska temperatura vode jedan od najvažnijih faktora kod pojave bolesti.

Simptomi su vidljivi kako makroskopski, vanjskim pregledom jedinke, tako i kasnijim seciranjem uginule ribe i pregledavanjem histoloških preparata pojedinih dijelova tijela. Zajedničko im je da izazivaju krvarenje u širokom rasponu organa uključujući škrge, srce, bubreg, jetru te samu površinu tijela gdje se vrlo često pojavljuju lezije. Dolazi do nakupljanja tekućine u peritonealnoj šupljini, nagrizanja peraja i pojave čireva. Posljedica toga je visoka stopa mortaliteta kao što je to primjerice slučaj kod bolesti crvenih mrlja koju izaziva bakterija *Pseudomonas anguilliseptica*.

Budući da su neki od ovih patogena identificirani na temelju samo jednog ili nekoliko izolata (primjerice *Pseudomonas chlororaphis*), nije isključeno da na taj način dobiveni rezultati ne pokazuju pravu prirodu bolesti te da su posljedica onečišćenja uzorka ili predstavljaju samo dio uzroka bolesti. Moguće je da uvjeti u kojima su kulture uzgajane nisu omogućili rast primarnog patogena. Postojećim metodama izolacije teško je dobiti čiste kulture i razlučiti između patogena i bakterija koje pripadaju normalnoj mikroflori organizma pa je stoga i problematično sa sigurnošću utvrditi ulogu ispitivanog organizma u razvoju bolesti.

S obzirom na porast zanimanja za suzbijanje bolesti riba, poglavito zbog širenja akvakulture te zbog sveprisutnosti bakterija roda *Pseudomonas* u vodenom okruženju, možemo očekivati da će se u dogledno vrijeme pronaći i identificirati novi patogeni koji pripadaju ovome rodu bakterija.

5 LITERATURA

- Abdel-Hadi Y.M , El-Bouhy Z.M., Diab A.S., Prevalence of some bacterial agents affecting the gills of some cultured fishes in Egypt, <http://www.sciencedev.net>
- Austin B., Austin D.A, 2007. Bacterial fish pathogens: Diseases of farmed and wild fish, Praxis Publishing Ltd, Chichester
- Bektas S., Ayik O., 2009. Hematological parameters and erithrocyte osmotic fragility in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, experimentally infected with *Pseudomonas putida*, *Journal of Fisheries and Aquatic Science* **5**, 246-253
- Buller N.B., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual, CABI Publishing, Wallingford
- Hatai K., Egusa S., Nakajima M., Chikahata H., 1975. *Pseudomonas chlororaphis* as a fish pathogen, *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* **41**, 1203
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T., 1994: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore
- Lönström L., Wiklund T., Bylund G., 1994. *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from Baltic herring *Clupea harengus membras* with eye lesions, *Diseases of aquatic organisms* **18**, 143-147
- Nester E.W., Anderson D.G., Evans Roberts C., Pearsall N.N., Nester M.T., 2004. Microbiology: A human perspective, McGraw-Hill, New York
- Nishimori E., Kita-Tsukamoto K., Wakabayashi H., 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**, 83–89
- Sakr S.F.M., Abd El-Rhman A.M.M., 2008. Contribution on *Pseudomonas* septicemia caused by *Pseudomonas anguilliseptica* in cultured *Oreochromis niloticus*, *8th International symposium on tilapia in aquaculture 2008*
- Toranzo A.E., Magariños B., Romalde J.L., 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems, *Aquaculture* **246**, 37– 61
- <http://www.medicalhealthcareinfo.com>

6 SAŽETAK

Ribe su kao i druge skupine životinja podložne bakterijskim infekcijama, pogotovo u stresnim uvjetima. Bolest se može pojaviti sistemski ili može biti ograničena na vanjske površine kao što su to koža ili škrge. Pritom su vidljive mnoge promjene na zaraženom primjerku koje se očituju fiziološki ili bihevioralno.

Predstavnici više od 25 porodica bakterija su povezivani sa oboljenjima riba pa tako i oni roda *Pseudomonas*. Do sad je zabilježeno šest vrsta koje su primarni ili sekundarni patogeni: *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* te *Pseudomonas putida*. Sveprisutne su u vodenom okolišu te se uglavnom smatraju oportunističkim ili slabim primarnim patogenima. Izazivaju ponajviše krvarenja u velikom broju organa, nakupljanje peritonealne tekućine te lezije i ulkuse, a bolest često završava smrću jedinke. Ekonomski najznačajnija zbog velikih gubitaka u akvakulturi je *Pseudomonas anguilliseptica*.

7 SUMMARY

Fish are, as well as other groups of animals, susceptible to bacterial infections, especially under stressfull conditions. The disease may present itself sistemically or be constrained to the outer surfaces such as gills or the skin. Many changes can be observed concerning the diseased individual, physiological or behavioral.

Representatives of over 25 families of bacteria have been linked to fish diseases including the genus *Pseudomonas*. So far, there have been six species identified as causative agents of fish disease: *Pseudomonas anguilliseptica*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* te *Pseudomonas putida*. They are ubiquitous in the environment and are mainly thought of as oportunistic or weak primary pathogens. These bacteria cause mostly haemorrhages in a number of organs, the accumulation of ascitic fluid in the abdomen as well as lesions and ulcers. Due to the losses in aquaculture *Pseudomonas anguilliseptica* is economically most significant.