



Barbara Kazuń<sup>1</sup>, Joanna Grudniewska<sup>2</sup>, Elżbieta Terech-Majewska<sup>3</sup>, Krzysztof Kazuń<sup>1</sup>, Edward Głąbski<sup>1</sup>, Andrzej K. Siwicki<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Patologii i Immunologii Ryb, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

<sup>2</sup>Zakład Hodowli Ryb Łososiowatych, Instytut Rybactwa Śródlądowego w Olsztynie

<sup>3</sup>Katedra Epizootologii, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

## Ocena stanu zdrowotnego tarlaków troci (*Salmo trutta trutta*) z rzek pomorskich na podstawie badań mikrobiologicznych i immunologicznych, prowadzonych w 2010 roku

### Wstęp

Od 2007 roku obserwuje się zmiany chorobowe na powierzchni skóry u łososi (*Salmo salar*) i troci (*Salmo trutta trutta*) wstępujących na tarło do rzek pomorskich. Objawy kliniczne występujące u chorych ryb były charakterystyczne dla wrzodzenia łososiowatych (furunkuloza). Jednakże prowadzone w kolejnych latach badania bakteriologiczne zarówno w Zakładzie Chorób Ryb Państwowego Instytutu Weterynaryjnego - PIB w Puławach, w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Koszalinie, jak i w Zakładzie Patologii i Immunologii Ryb Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Żabieńcu nie potwierdziły tej hipotezy, ponieważ nie wyizolowano czynnika etiologicznego choroby, jakim są pałeczki *Aeromonas salmonicida*. W związku z powyższym istnieje przypuszczenie, iż może to być wrzodziejąca martwica skóry (UDN), choroba o nieznanym etiologii atakująca przede wszystkim skórę głowy dzikich ryb łososiowatych, głównie łososi, troci i pstrągów potokowych (*Salmo trutta fario*). Choroba ta notowana była w rzekach Wysp Brytyjskich, północno-zachodniej Francji oraz w Bałtyku. Pierwsze doniesienia o wystąpieniu wrzodziejącej martwicy skóry miały miejsce jeszcze w XIX wieku, następnie pojawiła się w latach 60. XX wieku w południowo-zachodniej Irlandii, stopniowo rozprzestrzeniając się na prawie wszystkie rzeki na Wyspach Brytyjskich, po czym choroba wygasła w latach 70. UDN notowane było również w Danii w latach 70. u dorsza (*Gadus morhua*) (Larsen i Jensen 1982),

a podobne zmiany u tego gatunku, odłowionego z Bałtyku w latach 2007-2008, opisali Grawiński i in. (2009).

Zmiany chorobowe spowodowane są postępującą martwicą komórek Malpighiego naskórka. Pierwszymi objawami są małe, szare odbarwienia przekształcające się we wrzody zlokalizowane najczęściej na wieczku skrzelowym, pod oczami i na pysku (Roberts i Shepherd 1986). W czasie migracji ryb z morza do wód słodkich zmiany na skórze są zasiedlane przez liczne drobnoustroje oraz grzyby, najczęściej z rodziny Saprolegniaceae. Ryby sną głównie z powodu wtórnej infekcji bakteryjnej lub niewydolności krążenia spowodowanej zaburzeniami równowagi jonowej, wywołanej uszkodzeniem bariery skórnej. Choroba występuje najczęściej w chłodniejszych miesiącach, a wysoka śmiertelność zazwyczaj utrzymuje się 3-4 lata w danej rzece, a następnie stopniowo wygasa (Roberts i Shepherd 1986).



Fot. 1. Troć – początkowe stadium choroby.



Fot. 2. Troć – przebarwienia na skórze.



Fot. 3. Zmiany skórne na głowie troci.



Fot. 4. Troć – wrzody na powierzchni ciała.



Fot. 5. Uszkodzenia skóry pokryte pleśnią.

## Materiał i metody

Badania własne obejmowały ocenę stanu zdrowotnego tarlaków troci pochodzących z rzek pomorskich: Słupi, Wieprzy, Parsęty oraz Regi. W próbie znajdowały się ryby wykazujące zmiany kliniczne (odławiane z rzek Słupi, Wieprzy, Parsęty, Regi) oraz ryby zdrowe (Słupia oraz Wieprza). W badaniu klinicznym stwierdzono zmiany skórne o różnym natężeniu: przebarwienia, owrzodzenia i ubytki skóry pokryte pleśnią (fot. 1-5).

W punkcie odłowy w Słupsku przebadano trzy chore ryby o długości Lt od 64 do 79 cm oraz jedną rybę nie wykazującą objawów chorobowych (Lt 48 cm). U chorych troci obserwowano pojedyncze, różnej wielkości wrzody umiejscowione na głowie (u jednej ryby), grzbiecie oraz płetwie ogonowej. Z Wieprzy przebadano dwa samce o długości Lt 56 i 57 cm z objawami chorobowymi oraz jednego zdrowego (Lt 58 cm). Na powierzchni ciała chorych ryb stwierdzono liczne przekrwienia i wrzody pokryte w większości pleśnią. W Trzebiatowie z rzeki Regi odłowiono cztery trocie ze zmianami chorobowymi. Na skórze ryb (na głowie, grzbiecie i płetwie ogonowej) zaobserwowano przebarwie-

nia, liczne przekrwienia oraz wrzody. Z Parsęty badano dwa samce o długości Lt 51 i 58 cm posiadające rozległe owrzodzenia na powierzchni ciała.

Materiał do badań bakteriologicznych pobrano ze skóry i skrzelii oraz z nerek, dodatkowo w przypadku ryb wykazujących objawy chorobowe pobierano próbki ze zmienionych patologicznie miejsc na powłokach skórnych.

Badania mikrobiologiczne oraz immunologiczne przeprowadzono w Zakładzie Patologii i Immunologii Ryb Instytutu Rybactwa Śródlądowego w Żabieńcu. Bakterie wyizolowane od ryb identyfikowano na podstawie właściwości hodowlanych i biochemicznych z wykorzystaniem odpowiednich podłoży mikrobiologicznych: agar TSA (Merck), podłoże Kinga B (Merck), podłoże Mac Conkeya (Merck), agar Ryan (Oxoid) oraz testów API 20E i API Strep (bio Merieux).

Grzyby wyizolowane na podłożu Sabourauda (Merck) identyfikowano na podstawie cech morfologicznych i biochemicznych.

W celu określenia stanu kondycyjno-zdrowotnego tarlaków troci odłowionych z rzek pomorskich zbadano wybrane parametry hematologiczne oraz nieswoistej

odporności humoralnej u ryb chorych i zdrowych. Uzyskane wyniki poddano standardowej analizie statystycznej ( $P \leq 0,05$ ).

## Wyniki i dyskusja

W trakcie badań ogółem wyizolowano i zidentyfikowano 12 gatunków bakterii Gram-ujemnych. W tkankach chorobowo zmienionych dominowały drobnoustroje z rodziny Pseudomonadaceae (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseomonas luteola*, *Flavimonas oryzihabitans*), które stanowiły ponad 50% bakterii Gram-ujemnych. Poza tym występowały bakterie z rodziny Enterobacteriaceae (*Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens*) oraz bakterie należące do innych rodzin, takie jak: *Aeromonas hydrophila*, *Shewanella putrefaciens*, *Ochrobactrum anthropi*, *Chryseobacterium indologens*. Wyizolowane bakterie Gram-dodatnie należały głównie do rodzaju Streptococcus. U wszystkich ryb, zarówno chorych, jak i zdrowych stwierdzono obecność bakterii w nerkach.

Na powierzchni ciała zdrowych ryb występowały przede wszystkim bakterie *P. fluorescens* oraz *A. hydrophila*. Natomiast z nerek, zarówno chorych, jak i zdrowych ryb wyizolowano głównie bakterie z rodziny Pseudomonadaceae (*P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *C. luteola*, *F. oryzihabitans*) i stanowiły one ponad 80% wszystkich bakterii. Poza tym w posiewie z nerek zidentyfikowano bakterie *A. hydrophila*.

Wszystkie wyizolowane w badaniach bakterie bytują normalnie w środowisku wodnym (w wodzie i osadach), a część z nich uważa się za potencjalnie patogenne dla ryb, np. *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *C. freundii*, *S. liquefaciens*, *S. putrefaciens*, *C. indologens*. Drobnoustroje te stanowią naturalną mikroflorę środowiska wodnego i izolowane są od ryb łososiowatych, a w sprzyjających warunkach mogą wywoływać chorobę. Istnieją doniesienia naukowe potwierdzające zakażenia tymi drobnoustrojami u licznych gatunków ryb dzikich i hodowlanych (McIntosh i Austin 1990, Aydin i in. 2001, Cipriano 2001, Navarrete i in. 2009, Ilardi i in. 2010, Kozińska 2010).

Flora bakteryjna wód Bałtyku składa się głównie z bakterii należących do rodzaju *Pseudomonas* (Bauman 1983, Grawiński i Kraszewski 1991). Liczne publikacje naukowe donoszą, że drobnoustroje należące do tego rodzaju były izolowane jako dominujący składnik flory na skórze i w śluzie różnych gatunków ryb, m.in. u węgorza europejskiego (*Anguilla anguilla*), łososia atlantyckiego, gładzicy (*Pleuronectes platessa*) (Horsley 1973, Gilmour i in. 1976, Cahill 1990, Ugur i in. 2002). Do zakażenia bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* u ryb najczęściej dochodzi, gdy temperatura wody wynosi poniżej 10°C i towarzyszy temu stres wywołany zanieczyszczeniem środowiska wodnego czy podwyższoną koncentracją metali ciężkich. Drobnoustroje

te powodują powstawanie zmian skórnych najczęściej w postaci obrzęków i owrzodzeń (Prost 1989).

W badaniach mykologicznych na uszkodzonej powierzchni ciała ryb stwierdzono również występowanie drożdży z rodzaju *Rhodotorula* oraz grzybów z rodziny Saprolegniaceae. Drożdże *Rhodotorula* to organizmy mezofilne, jednakże niektóre gatunki mogą rozwijać się w niższych temperaturach. Powszechnie występują w glebie, w wodzie, na zwierzętach, a także w powietrzu. W wodach przybrzeżnych, również Bałtyku, stwierdzano po kilka – kilkadziesiąt tysięcy komórek drożdżowych w 1 litrze wody (Rheinheimer 1977). Z kolei grzyby z rodzaju *Saprolegnia* atakują zarówno ryby słodkowodne, jak i morskie o osłabionej odporności, namnażają się przede wszystkim na uszkodzonych tkankach ryb, a wywoływana przez nie pleśniawka zazwyczaj występuje jako zakażenie wtórne wiktające toczący się już proces chorobowy (Bruno i Stamps 1987, Willoughby i Roberts 1992, Bly i in. 1997).

W ramach prowadzonych badań hematologicznych i immunologicznych określano poziom białka całkowitego, poziom gammaglobulin, aktywność ceruloplazminy oraz aktywność lizozymu (tab. 1). Wyniki badań nie wykazały statystycznie istotnych różnic w badanych parametrach, zarówno pomiędzy rybami chorymi, jak zdrowymi oraz pomiędzy rybami pochodzącymi z poszczególnych rzek.

TABELA 1

Wybrane parametry immunologiczne i hematologiczne troci z rzek: Stłupi, Wieprzy, Regi i Parsęty; wartości średnie

Stanowisko	Parametr			
	Lizozym (mg l <sup>-1</sup> )	Ceruloplazmina (IU)	Białko ogólne (g l <sup>-1</sup> )	Gammaglobuliny (g l <sup>-1</sup> )
Stłupia	9,0	70,3	31,1	5,8
Wieprza	7,1	72,0	35,2	5,3
Rega	8,9	67,5	34,9	6,2
Parsęta	7,2	69,5	39,4	6,1

Podczas prowadzonych w 2009 roku badań bakteriologicznych troci pochodzącej z tych samych rzek pomorskich (Stłupia, Wieprza, Rega, Parsęta) izolowano ze zmian skórnych przede wszystkim bakterie należące do rodziny Enterobacteriaceae, głównie *Serratia liquefaciens* oraz *Cedecea davisae*. Natomiast z nerek chorych ryb izolowano w posiewie bakterie *S. liquefaciens* oraz *Pseudomonas* sp. Uzyskane wyniki badań sugerowały, że to *S. liquefaciens* mogła być czynnikiem etiologicznym choroby tarlaków troci. Jednakże wyniki badań wykonanych w 2010 roku nie potwierdziły tej teorii, gdyż *S. liquefaciens* była wyizolowana tylko od ryb z Regi. Przyczyną różnic w uzyskanych wynikach mogła być w pewnym stopniu sytuacja pogodowa, ponieważ w czasie badań ryb w 2009 roku panowała pogoda sztormowa. Wzburzenie osadów przez sztormy mogło prowadzić do wzrostu ilości bakterii z rodziny Ente-

robacteriaceae w wodzie, co z kolei mogło zafałszować obraz kliniczny choroby. Bakterie należące do tej rodziny są głównie związane z jakością wody (Nieto i in. 1984).

Istnieją przypuszczenia, że niesprzyjające czynniki środowiskowe (zanieczyszczenia wody, metale ciężkie) mogą wpływać na stan kondycyjny ryb, osłabiając ich układ immunologiczny. Pogorszenie parametrów środowiska sprzyja temu, że bakterie warunkowo patogenne mogą przełamywać bariery obronne organizmu wywołując infekcje. W przypadku badań tarlaków troci wstępujących na tarło do rzek pomorskich mamy do czynienia z mieszaną infekcją bakteryjną. Jest to zgodne z tezą, iż mikroflora środowiska wodnego znajduje swoje odzwierciedlenie na skórze ryb (Shewan 1977).

## Literatura

- Aydin S., Erman Z., Bilgin Ö.C. 2001 – Investigations of *Serratia liquefaciens* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) – Turk. J. Vet. Anim. Sci. 25: 643-650.
- Bauman P. 1983 – Taxonomy of marine *Pseudomonas* species: *Ps. stanieri* sp. nov., *Ps. perfectomarina* sp. nov. – J. System. Bact. 33: 857-865.
- Bly J.E., Quiniou S.M.A., Lawson L.A., Clem L.W. 1997 – Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens* – J. Fish Dis. 20: 35-40.
- Bruno D.W., Stamps D.J. 1987 – *Saprolegniasis* of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fry – J. Fish Dis. 10: 513-517.
- Cahill M.M. 1990 – Bacterial flora of fishes: a review – Microbial Ecology 19: 21-41.
- Cipriano C.R. 2001 – *Aeromonas hydrophila* and motile aereomonad septiciemias of fish – Fish and Disease Leaflet 68: 1-25.
- Gilmour A., McCallum M.F., Allan M.C. 1976 – A study of the bacterial types occurring on the skin and in the intestines of farmed plaice, *Pleuronectes platessa* – Aquaculture 7: 161-172.
- Grawiński E., Kraszewski A. 1991 – Identyfikacja i charakterystyka pateczek *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella* i *Xanthomonas* izolowanych z ryb, wody i osadów dennych Bałtyku – Medycyna Wet. 47: 58-60.
- Grawiński E., Podolska M., Kozińska A., Pękala A. 2009 – Bakterie chorobotwórcze dla ryb i człowieka izolowane od dorszy bałtyckich – Życie Wet. 84: 409-416.
- Horsley R.W. 1973 – The bacterial flora of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in relation to its environment – J. Appl. Bacteriol. 36: 377-386.
- Ilardi P., Abad J., Rintamäki P., Bernardet J.F., Avendaño-Herrera R. 2010 – Phenotypic, serological and molecular evidence of *Chryseobacterium piscicola* in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Finland – J. Fish Dis. 33: 179-181.
- Kozińska A. 2010 – Bakteryjne choroby ryb hodowlanych - aktualne problemy – W: Szveda W., Siwicki A.K., Terech-Majewska E. (red.). Choroby podlegające obowiązkowi zwalczania oraz inne choroby zagrażające hodowli – diagnostyka, profilaktyka, terapia. Wyd. IRS, Olsztyn: 113-137.
- Larsen J.L., Jensen N.J. 1982 – The ulcus syndrome in cod (*Gadus morhua*). Prevalence in selected Danish marine recipients and a control site in the period 1976-1979 – Nord. Vet.-Med. 34: 303-321.
- McIntosh D., Austin B. 1990 – Recovery of an extremely proteolytic form of *Serratia liquefaciens* as a pathogen of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in Scotland – J. Fish Biol. 36: 765-772.
- Navarrete P., Espejo RT., Romero J. 2009 – Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – Microb. Ecol. 57: 550-561.
- Nieto T.P., Toranzo A.E., Barja J.L. 1984 – Comparison between the bacterial flora associated with fingerling rainbow trout cultured in two different hatcheries in the North – West of Spain – Aquaculture 42: 193-206.
- Prost M. 1989 – Choroby ryb – PWRiL, Warszawa.
- Rheinheimer G. 1977 – Mikrobiologia wód – PWRiL, Warszawa.
- Roberts R.J., Shephard C.J. 1986 – Handbook of trout and salmon diseases. Fishing News Book, Farnham: 222.
- Shewan J.M. 1977 – The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes induced by bacterial action – W: Proceedings of the conference on handling, processing and marketing of tropical fish, Tropical products institute, London: 51-66.
- Ugur A., Yilmaz F., Sahin N. 2002 – Microflora on the skin of European eel (*Anguilla anguilla* L., 1758) sampled from creek Yuvarlakcay, Turkey – Isr. J. Aquacult./Bamidgeh 54: 89-94.
- Willoughby L.G., Roberts R.J. 1992 – Towards strategic use of fungicides against *Saprolegnia parasitica* in salmonid fish hatcheries – J. Fish Dis. 15: 1-13.

Przyjęto po recenzji 27.09.2011r.

## HEALTH ASSESSMENTS OF SEA TROUT, *SALMO TRUTTA TRUTTA*, SPAWNERS FROM POMERANIAN RIVERS IN 2010 BASED ON MICROBIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL EXAMINATIONS

Barbara Kazuń, Joanna Grudniewska, Elżbieta Terech-Majewska, Edward Głąbski, Krzysztof Kazuń, Andrzej K. Siwicki

Abstract. The research objective was to assess the health of sea trout from the Pomeranian rivers Słupia, Wieprza, Parsęta, and Rega in 2010. Microbiological, hematological, and immunological examinations were performed. In total, twelve gram-negative bacteria species were isolated and identified; they belonged to the families Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, and others. The gram-positive bacteria isolated belonged mainly to the genus *Streptococcus*. Immunological and hematological examinations did not reveal statistically significant differences among samples. In comparison to previous examinations, the quantity of infected fish was significantly lower.

Key words: sea trout, ulcerative dermal necrosis, Pomeranian rivers