

CERCETĂRI PRIVIND FLORA BACTERIANA BUCALA ȘI BRANHIALA LA CRAP, SOMN, ȘALAU ȘI STIUCA *

Dr. George TUDOR și Dr. med. vet. Mihail APRILESCU

Se știe că microflora întâlnită la pești este dependentă de mediul în care trăiesc aceștia și de contaminările, care pot avea loc în timpul pescuitului și după pescuit. Gradul de puritate al apei prezintă deci o importanță deosebită, iar poluarea ei cu diferite reziduuri de natură organică din mediul înconjurător mărește enorm posibilitățile de contaminare a peștilor. Contaminarea poate fi realizată și prin păsările ichtiofage când, în zborul lor, scapă un pește bolnav într-o apă pînă atunci liberă de microbi, sau prin gropile de iernat, când peștii sînt siliți să viețuiască într-un spațiu foarte restrîns.

Pătrunderea bacteriilor în organismul peștelui se poate face pe cale cutanată în urma lezionării epidermei prin mușcăturile provocate de răpitori, prin acțiunea diferiților ectoparaziți, prin plăgile produse prin sculele de pescuit, prin operațiunile de transportare, manipulare etc., precum și pe cale digestivă (calea cea mai obișnuită), cînd o dată cu alimentele contaminate, peștele ingeră și microbii respectivi, care — în cazul existenței unor leziuni la nivelul mucoasei digestive — pot pătrunde în circulația generală realizînd îmbolnăvirea.

Dar peștele poate constitui și o sursă de îmbolnăvire a omului și a animalelor cu germeii unor boli ca lepra, holera, rujetul, salmonelozele, leptospirozele, tuberculoza, botulismul, antrax-ul etc., care deși, în majoritatea lor, nu afectează peștele, găsesc totuși în organismul acestuia condiții de conservare îndelungată, putînd fi astfel răspinși pe mari distanțe prin intermediul peștilor (2).

Este drept că mucusul de pe suprafața peștelui viu are proprietăți antibacteriene remarcabile și constituie un mijloc important de apărare, dar după moartea peștelui mucusul se modifică și devine un mediu

*) Prezentată în ședința de comunicări din 12 aprilie 1971 a Cercului Științific al Laboratorului Sanitar Veterinar jud. Tulcea.

foarte bun pentru înmulțirea microorganismelor, rapiditatea de înmulțire fiind în funcție de gradul de prospețime a peștelui, de temperatura de păstrare a lui și de condițiile de umiditate (5).

Importanța pe care o prezintă deci rolul microorganismelor în îmbolnăvirea peștilor, precum și posibilitatea de contaminare a omului și a animalelor prin consumul peștelui au determinat întreprinderea unor cercetări ihtiopatologice, vizînd atît studiarea bolilor, cît și stabilirea măsurilor de profilaxie necesare pentru păstrarea și dezvoltarea fondului piscicol.

În acest scop, au fost efectuate, atît în țară, cît și în străinătate, numeroase cercetări privind izolarea și studiarea florei bacteriene la pești, fie de apă dulce, fie de mare sau ocean, fie în stare proaspătă, fie în stare de conservare prin congelare, saramurare, uscare, afumare etc., dar aproape toate aceste studii s-au făcut pe flora bacteriană izolată din musculatură, intestin, organe interne.

În ceea ce privește însă izolarea și identificarea germenilor din căile respiratorii și digestive anterioare la peștii de apă dulce literatura de specialitate, cel puțin în țara noastră, este destul de săracă.

Cum în afară de suprafața pielii, gura și branhiile sînt cele care vin în permanent contact cu apa, deci și cu microorganismele existente în acest mediu de viață, am considerat că n-ar fi lipsit de interes să cercetăm flora bacteriană izolată la nivelul acestor regiuni, care prin rolul lor anatomo-funcțional, sînt cele mai expuse contaminării. S-a observat chiar, că la peștele eviscerat, la care nu se scot branhiile, apare o alterare mai rapidă, de unde rezultă că branhiile peștelui constituie o sursă importantă de contaminare (5).

CERCETĂRI PROPRII

Material și metodă. Pentru izolarea florei bacteriene din cavitatea bucală și branhiile am folosit ca material de studiu patru specii de pești : crap, somn, șalău și știucă, cîte 50 și respectiv 44, 52 și 54 exemplare din fiecare specie, în total 200 capete.

Peștii au fost recoltați din diferite puncte ale Dunării, precum și din bălțile și lacurile limitrofe, în marea lor majoritate situate în apropierea municipiului Tulcea, cercetările fiind efectuate din luna iulie pînă în luna decembrie 1969 și 1970.

Instrumentarul pentru recoltarea și prelucrarea materialului s-a folosit în toate cazurile steril, iar camera în care se efectuau aceste operațiuni era supusă în prealabil sterilizării prin iradiere cu raze ultraviolete.

Ca medii de cultură pentru izolarea germenilor am utilizat bulionul nutritiv și agarul în tuburi și plăci Petri. Pentru evidențierea proprietăților fermentative ale bacteriilor s-au folosit medii lichide cu glucoză, lactoză și zaharoză, iar ca indicator albastrul de bromtimol.

Pentru punerea în evidență a proprietăților proteolitice ale unor tulpini izolate s-a folosit testul gelatinolizei, iar pentru identificarea

indolului și a producției de hidrogen sulfurat s-au utilizat apa peptonată, reactivul Ehrlich-Kovacs și respectiv banda de hîrtie de filtru îmbibată cu acetat de plumb.

Pe scurt, s-a folosit următoarea tehnică de lucru : raclatul bucal și lamelele branhiale erau recoltate și cîntărite steril, apoi trecute separat în cîte un tub cu ser fiziologic în cantitate fixă. După agitarea conținutului din primul tub, materialul era diluat succesiv în alte tuburi pînă la diluția finală de 1/1.000.000, apoi din fiecare tub se trecea 1 ml. diluție în cîte o placă Petri cu agar, peste care se adăuga imediat un strat subțire de agar moale topit la 45°C. Prin mișcări vii circulare ale plăcii pe o suprafață plană se asigura răspîndirea materialului în sămîntat pe toată suprafața agarului.

După o incubare de 18—24 ore la 37°C, se efectuau treceri din coloniile mai reprezentative în mai multe tuburi cu bulion și agar pînă la epuizarea încărcăturii de pe ansă, obținîndu-se astfel colonii izolate pe agar.

Se studia aspectul cultural al coloniilor și aspectul morfologic al germenilor din bulion și de pe agar colorați prin metod. Gram. Microbii Gram negativi erau cercetați în toate cazurile sub raportul prezenței indolului, a hidrogenului sulfurat, cît și al activității zaharolitice și gelatinolitice.

Pentru tulpinile de bacillus cereus s-a determinat și toxicitatea lor. Obținerea toxinei și inocularea ei la șoarece s-a efectuat după tehnica expusă de Crasovschi-Tudor (3). Șoarecii inoculați au prezentat în timpul vieții dispnee, spumozități serosangvinolente în jurul nărilor și gurii, iar la autopsie edem pulmonar.

Pentru ceilalți germeni, tulpinile izolate au fost supuse testului patogenității prin inocularea culturii în bulion de 24 ore la iepuri sau șoareci, intravenos sau intraperitoneal, în funcție de natura germenului și după tehnicile curente de laborator.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Examenle bacteriologice efectuate la cele patru specii de pești menționate au pus în evidență prezența în cavitatea bucală și branhiile a unei flore bacteriene variate formată din coci, sarcine, stafilococi, bacili aerobi sporulați, germeni din grupul coli, pseudomonas, proteus, bacillus cereus și b. corynebacterium (tabel Nr. 1 și Nr. 2). Aspectul lor cultural, morfologic, afinitățile tinctoriale și caracterele biochimice corespund datelor din literatura de specialitate pentru genul sau specia respectivă.

Din analiza tabelelor 1 și 2 se constată, că, indiferent de specie, toți peștii cercetați sînt purtători de germeni atît în cavitatea bucală, cît și în branhiile. Explicația este dată de existența permanentă a microorganismelor în apă, mediu care le oferă condiții favorabile de viață prin substanțele organice ce le conține, temperatură, pH, iluminare etc. (5). Cum gura și branchiile, ca și suprafața pielii, vin permanent în

Flora microbiană izolată de la crap, somn, șalău și știucă după gradul de prospețime al peștelui.

TABEL Nr. 1

SPECIA DE PEȘTE	TOTAL pești cercetați	Nr. de pești după gradul de prospețime	Gradul de pros- pețime (ore)	Numărul peștilor și germentii izolați																
				Gură								Branhii								
				Coci	Sarcina	Stafilococi	Bacillus cereus	B. corynebacter.	B. aerobi spor.	Grup Coli	Pseudomonas	Proteus	Coci	Sarcina	Stafilococi	Bacillus cereus	B. corynebacter.	B. aerobi spor.	Grup Coli	Pseudomonas
Crap	50	10	0-12	1	—	1	—	—	—	8	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—
		11	13-24	1	—	1	—	—	—	10	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—
		15	25-36	2	1	2	—	—	1	13	—	—	2	—	—	2	—	—	—	—
		14	37-48	5	—	4	—	1	2	14	2	7	6	—	3	—	—	4	3	6
Somn	44	11	0-12	1	—	1	—	—	—	9	—	—	1	—	1	—	—	—	—	—
		13	13-24	3	1	2	—	—	1	10	—	—	3	—	2	—	—	1	11	—
		11	25-36	3	—	2	—	—	1	10	—	—	3	1	2	—	—	1	10	—
		9	37-48	3	2	3	—	—	1	9	3	6	4	2	2	—	—	1	9	3
Șalău	52	10	0-12	—	—	2	—	—	1	7	—	—	1	—	1	—	—	1	7	—
		14	13-24	2	—	2	—	—	—	12	—	—	2	—	2	—	—	2	12	—
		16	25-36	4	2	3	—	—	1	14	—	—	4	2	4	—	—	1	14	—
		12	37-48	5	2	6	—	—	3	12	—	2	5	2	6	—	—	2	12	1
Știucă	51	12	0-12	1	1	1	—	—	—	10	—	—	1	1	1	2	—	—	10	—
		11	13-24	2	—	2	—	—	2	8	—	—	2	—	2	1	—	2	8	—
		16	25-36	5	2	5	—	—	2	12	—	1	5	1	5	—	—	2	13	—
		15	37-48	6	1	3	—	—	3	15	4	4	7	1	4	—	—	3	15	4
TOTAL	200	43	0-12	3	1	5	—	—	1	34	—	—	4	1	4	2	—	1	34	—
		44	13-24	8	1	7	—	—	3	41	—	—	8	—	7	1	—	4	41	—
		58	25-36	14	5	12	—	—	5	49	—	1	14	5	12	—	—	7	50	—
		50	37-48	19	5	16	—	1	9	50	9	19	22	5	15	—	—	8	50	11

*Prezența procentuală a germenilor izolați din cavitatea bucală
și branșii după gradul de prospețime al peștelui*

TABEL Nr. 2

Germenii izolați	Specia și nr. exemplare de pește și procentul de contaminare după gradul de prospețime (ore) al peștelui									
	Crap		Somn		Șalău		Știucă		TOTAL	
	21	29	24	20	24	28	23	31	92	108
	0—24	25—48	0—24	25—48	0—24	25—48	0—24	25—48	0—24	25—48
Coci	9,1	27,5	16,7	35,0	12,5	32,1	13,0	38,7		33,3
Sarcina	—	3,4	4,2	15,0	—	14,3	4,3	9,7		9,3
Stafilococi	9,1	20,7	12,5	25,0	16,7	35,0	13,0	29,0	13,0	25,0
B. cereus	—	—	—	—	—	—	13,0	—	3,3	—
B. corynebact.	—	3,4	—	—	—	—	—	—	—	0,9
B. aer. spor.	—	13,8	4,2	10,0	8,1	14,3	8,7	16,1	5,4	13,9
Grup coli	85,7	93,1	83,3	95,0	79,2	92,8	78,3	90,3	81,5	92,6
Pseudomonas	—	11,3	—	15,0	—	3,6	—	12,9	—	10,2
Proteus	—	24,8	—	30,0	—	10,7	—	16,1	—	18,5

contact cu apa în care trăiește peștele, este firesc ca aceste regiuni să fie și cele mai expuse contaminării.

Observațiile noastre au scos în evidență că încărcătura microbiană a fost mai mare la peștii recoltați din lacuri și bălți, decât la cei din Dunăre. Aceasta s-ar explica prin faptul că apele bălților, având o adâncime mai mică, un strat de mil mai la suprafață, precum și o vegetație mai bogată, constituie un mediu mai favorabil pentru microorganismele.

Încărcătura cu germeni a acestor ape, observație de altfel valabilă și pentru Dunăre, se mărește foarte mult prin poluarea apelor după ploii, care aduc uneori viituri mari, mijloc sigur de transport al microorganismelor de la distanțe, care pot fi destul de apreciabile. În unele perioade în care am efectuat cercetările s-au înregistrat ploii destul de abundente, care au putut polua apele Dunării și ale bălților, viiturile antrenând în calea lor, din localitățile prin care au trecut, cantități mari de gunoaie, substanțe organice cu un conținut, desigur ridicat în germeni.

La aceasta se mai pot adăuga posibilitățile de contaminare a peștelui prin manipulare în timpul pescuitului și în continuare prin diverse operațiuni de încărcare și descărcare în și din barcă, cîntărire, ambalare în lăzi, contactul cu aerul și gheața, cu mâinile manipulanților etc. De menționat că o parte din peștii cercetați de noi (cei mai proaspeți) au fost pescuiți cu undița, instrument care a produs leziuni și contaminări consecutive ale cavității bucale și uneori chiar ale brachiilor.

În ordinea descrescîndă a frecvenței lor la peștii cercetați se înscriu germeni din grupul coli (81,5—92,6%), urmați de coci (13—33,3%), stafilococi (13—25%), proteus (18,5%), bacili aerobi sporulați (5,4—13,9%), pseudomonas (10,2%), sarcina (2,2—9,3%), b.cereus (3,3%) și b.corynebacterium (0,9%). (tabel 2).

Germenii cei mai frecvent izolați, după cum s-a menționat, au fost cei din grupul coli (la 87,5% din pești), prezență prioritară explicabilă prin caracterul ubicvitar al organismelor din acest grup, din care unele specii (ex. Esch. coli) se găsesc răspîndite în mediul ambiant ca saprofite.

Se observă că numărul peștilor contaminați, cit și varietatea și frecvența florei bacteriene izolate crește în raport direct cu timpul scurs de la pescuit. O înmulțire mai accentuată se înregistrează după 24 ore și mai ales după 36 ore, cînd, desigur, mucusul protector își pierde proprietatea sa antibacteriană și devine, prin transformările suferite în acest răstimp, un mediu de cultură prielnic pentru dezvoltarea microorganismelor. Numărul peștilor de la care s-au izolat diferiți germeni se dublează și unii chiar se triplează după 36 ore de la pescuit. În plus, unii germeni ca pseudomonas, proteus și corynebacterium au fost izolați numai de la peștii care aveau în jur de 48 ore de la pescuit, observație ce confirmă de altfel constatările altor autori (5) (numai de la una știucă s-a izolat un proteus între 25—36 ore).

Excepție face *b. cereus*, care a fost tizolat de la 33 știuci în stare proaspătă (pînă la 24 ore).

În cadrul cercetărilor noastre, am urmărit și încărcătura aproximativă cu germeni în raport cu gradul de prospețime a peștelui. Fără a efectua numărători de germeni, am observat totuși că numărul coloniilor crescute în plăcile Petri era mult mai mare, chiar în ultimile diluții, la peștii care depășeau durata de 24 și mai ales 36 ore de la pescuire.

Nu s-au observat diferențe esențiale între flora bacteriană izolată din cavitatea bucală și cea izolată din branhii, ea fiind aceeași în marea majoritate a cazurilor și la toate cele patru specii de pește cercetate. Se pot menționa doar două excepții: toate cele trei tulpini de *b. cereus* au fost izolate numai din branhii și numai de la știucă, iar singura tulpină de *b. corynebacterium* a fost izolată din cavitatea bucală de la crap.

În ceea ce privește patogenitatea germenilor izolați, *b. cereus* este singurul care a dovedit un potențial patogen, de altfel destul de ridicat la cele două tulpini cercetate. Administrarea toxinei la cîte 4 șoareci a produs moartea a 2 și respectiv 3 șoareci în 12—30 minute cu semne și leziuni specifice (dispnee, edem pulmonar).

Întrucît literatura de specialitate citează cazuri de toxiinfecții alimentare cu *proteus* și *bacillus cereus*, nu se exclude posibilitatea intoxicării omului cu acești germeni prin consumul peștelui infectat, cu atît mai mult, cu cît noi am izolat *b. cereus* de la peștele proaspăt. Ar fi deci necesară efectuarea examenului bacteriologic la peștele ce se dă în consum, cel puțin pentru colectivitățile mai mari și cel puțin pentru peștele de relativă prospețime.

CONCLUZII

1. Toți peștii cercetați, indiferent de specie sau grad de prospețime, s-au dovedit purtători de germeni atît în cavitatea bucală, cît și în branchii, regiuni care, ca și învelișul cutanat, sînt cele mai expuse contaminării, ele venind în contact direct cu apa, mediul de viață al peștelui.

2. În ordinea descrescîndă a frecvenței lor, s-au izolat de la peștii cercetați germeni din grupul coli, urmați de coci, stafilococi, *proteus*, bacili aerobi sporulați, *pseudomonas*, *sarcina*, *b. cereus* și *b. corynebacterium*.

3. Cu mici excepții, nu s-au constatat diferențe esențiale între flora bacteriană izolată din cavitatea bucală și cea izolată din branhii, ca fiind aceeași în marea majoritate a cazurilor și la toate cele patru specii de pește cercetate.

4. Numărul peștilor contaminați, cît și varietatea și frecvența florei bacteriene izolate crește în raport direct cu timpul scurs de la pescuit, o înmulțire mai accentuată a acestora înregistrîndu-se după 24 ore și mai ales după 36 ore.

5. Încărcătura microbiană este mai mare la peștii recoltați din lacuri și bălți, decît la cei din Dunăre, această încărcătură mărindu-se prin poluarea apelor după ploii.

6. Întrucît literatura de specialitate citează cazuri de toxiinfecții alimentare la om cu *b. proteus* și *B. cereus*, germeni izolați de noi de la peștii cercetați, considerăm că ar fi necesară efectuarea examenului bacteriologic al peștilor, cel puțin al acelorora cu prospețime dubioasă.

7. Considerăm necesară continuarea prezentelor cercetări, care să cuprindă mai multe specii de pești, cu particularități biologice diferite, recoltați din medii acvatice diferite. Este de asemenea necesară extinderea cercetărilor pe o perioadă mai mare de la pescuire (72 ore) și în condiții diferite de păstrare a peștelui, urmărind ca obiectiv principal încărcătura microbiană în raport cu gradul de prospețime al peștelui, extinzînd investigațiile și la nivelul musculaturii și al intestinului.

BIBLIOGRAFIE

1. APRILESCU M. — Flora bacteriană bucală și branhială la peștii de apă dulce (lucrare de diplomă 1970).
2. BOGATU D. — Cours de ichtiopatologie, 1960, Inst. Palitch. Galați.
3. CRASOVSCHI-TUDOR RODICA MIRELA — Sinteza hemolizinelor în diferite condiții de cultivare la *Bacillus cereus* (lucrare de diplomă 1970).
4. DINULESCU GH. și RĂDULESCU I. — Icthiopatologie și igienă piscicolă, Ed. Stat, Buc., 1952.
5. IENIȘTEA C. — Microbiologie alimentară, Ed. Med., Buc., 1958, pg. 256—274.
6. NESTORESCU N. și POPOVICI MARCELA — Toxiinfecții alimentare; Ed. Med., Buc., 1959, pg. 232—233.
7. STAMATIN N. — Microbiologie și imunologie veterinară; Ed. D.P., 1965.

Résumé

Les deux auteurs déterminent la flore microbienne buccale et branchiale des 200 exemplaires de poissons appartenant aux espèces: carpe, silure, sandre et brochet.

Ils ont constaté que tous les poissons examinés sans tenir compte de l'espèce ou du degré de l'état de fraîcheur, étaient porteurs de germes dans la cavité, buccale aussi bien que sur les branchies.

De plus, on n'a pas constaté des différences essentielles entre la flore bactérienne isolée appartenant à ces deux régions distinctes et, pour la plupart des cas, cette flore a été commune aux espèces examinées.

Dans l'ordre décroissant de leur fréquence, chez les poissons examinés, on a isolé des germes du groupe coli, suivis par les coques, staphylocoques, proteus, bacilles aérobies qui sont sporulés, pseudomonas, sarcina, *b. cereus* et *b. corynebacterium*.

Le nombre des poissons contaminés, aussi bien que la variété et la fréquence de la flore bactérienne isolée augmentent proportionnellement à l'intervalle écoulé depuis le moment de la pêche, la quantité microbienne étant plus élevée chez les poissons récoltés des lacs et des étangs que chez les poissons du Danube, et cette quantité s'accroît encore par la pollution des eaux, immédiatement après les pluies.

Les auteurs font des remarques sur la possibilité de l'apparition chez l'homme des toxiinfections produites par la consommation du poisson contaminé par *b. proteus* et *b. cereus*, germes trouvés par les auteurs chez certains poissons examinés.