

## Streszczenie

Bakterie z grupy *Shewanella putrefaciens*, do niedawna uważane za halofilne, dzięki zdolnościom adaptacyjnym stały się przyczyną zaburzeń zdrowotnych ryb słodkowodnych. W ostatnich latach stwierdzano liczne przypadki chorobowe jednoznacznie wskazujące, że *Shewanella* stanowią zagrożenie dla zdrowia różnych gatunków tych zwierząt. Dotychczasowe badania izolatów pozyskanych od ryb dotyczyły głównie analizy cech biochemicznych bakterii, natomiast nie prowadzono badań serologicznych oraz identyfikacji czynników warunkujących ich chorobotwórczość dla ryb. Fragmentaryczne są również badania genotypowe tych drobnoustrojów. Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było uzyskanie brakujących odpowiedzi na te zagadnienia.

W dysertacji zaprezentowano szczegółową charakterystykę fenotypową i genotypową izolatów z grupy *S. putrefaciens* oraz określono zależności pomiędzy niektórymi właściwościami tych bakterii, a ich patogennością dla karpia i pstrąga. Badania objęły izolaty pochodzące również od innych gatunków ryb hodowlanych, dziko żyjących oraz ozdobnych. Pierwszy etap obejmował analizy fenotypowe w celu określenia właściwości enzymatycznych, serologicznych i wrażliwości na środki przeciwbakteryjne. W drugim etapie skupiono się na analizie genotypowej bakterii w celu ich identyfikacji i różnicowania oraz ocenie zgodności cech genotypowych z fenotypowymi w kontekście chorobotwórczości. Wnioski z tych badań zweryfikowano w ostatnim etapie prac polegającym na eksperymentalnym zakażeniu ryb.

Bakterie wstępnie zidentyfikowane jako *S. putrefaciens* wykazywały różną aktywność biochemiczną w odniesieniu do nielicznych substratów. Zaobserwowano zróżnicowaną wrażliwość na środki przeciwbakteryjne, jednak brak kryteriów interpretacji antybiogramów uniemożliwia aktualnie ocenę *in vitro* skuteczności potencjalnego leczenia szewanellozy.

Niektóre cechy fenotypowe, takie jak aktywność enzymatyczna izolatów, wykazały związek z klinicznymi objawami obserwowanymi u zakażonych ryb. Aktywność hemolityczna może w niższych temperaturach odgrywać istotną rolę w patogenności tych mikroorganizmów. Znalazło to potwierdzenie w prezentowanych badaniach i obserwacjach klinicznych dotyczących występowania u ryb zakażeń *S. putrefaciens* przy temperaturze wody wynoszącej około 10°C.

Ważnym aspektem badań było opracowanie autorskiej metody serotypowania bakterii z grupy *S. putrefaciens* i jej zastosowanie do różnicowania izolatów, również w kontekście patogenności. Pomimo zakwalifikowania większości badanych bakterii do wyznaczonych wariantów serologicznych, liczna grupa izolatów niezidentyfikowanych potwierdziła dużą różnorodność *Shewanella*.

Analiza filogenetyczna fragmentu genu 16S rRNA wykazała duże zróżnicowanie genetyczne izolatów, które zostały zakwalifikowane do trzech gatunków: *S. putrefaciens*, *S. xiamenensis* oraz *S. oneidensis*. Jednocześnie, trudności w klasyfikacji kilku izolatów potwierdzają różnorodność w obrębie badanej grupy drobnoustrojów. Mogą również świadczyć o obecności nieopisanych dotąd gatunków rodzaju *Shewanella*.

Zróżnicowanie genotypów wyznaczonych metodą ERIC-PCR zaobserwowano zarówno pomiędzy gatunkami, jak również w obrębie *S. putrefaciens*, *S. xiamenensis* oraz *S. oneidensis*. Metoda charakteryzowała się uniwersalnością i wysoką siłą różnicującą. Większe zróżnicowanie występowało u *S. putrefaciens* i *S. oneidensis* w porównaniu do *S. xiamenensis*. Obserwowano pewne zależności pomiędzy genotypem izolatu, a objawami chorobowymi wywoływanymi u ryb. Badania genomowego DNA bakterii z grupy *S. putrefaciens* metodą PFGE wykazały zróżnicowanie profili genotypowych, jednak niepoliczalne fragmenty restrykcyjne genomowego DNA wykluczyły możliwość zastosowania metody w badaniach epidemiologicznych. W dochodzeniu źródeł i dróg szerzenia się zarazka z powodzeniem może być natomiast użyta technika ERIC-PCR.

Zakażenia eksperymentalne potwierdziły patogenność bakterii z grupy *S. putrefaciens*, jednak w zależności od gatunku ryb obserwowano różne objawy chorobowe oraz różną śmiertelność. U zakażonych karpia dominowały zmiany skórne, natomiast u zakażonych pstrągów notowano mniej nasilone objawy niespecyficzne, jak np. wytrzeszcz gałek ocznych. Zarówno u karpia jak i pstrągów brak lub niewielkie nasilenie zmian chorobowych obserwowano głównie po zakażeniu *S. oneidensis* oraz *S. xiamenensis*. Największą, sięgającą 100% śmiertelność odnotowano u pstrągów tęczowych zakażonych jednym z izolatów *S. putrefaciens*.

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki konieczna jest kontynuacja badań ukierunkowanych na kompleksową charakterystykę gatunków wyodrębnionych z grupy *S. putrefaciens*, szczególnie w odniesieniu do mechanizmów oraz genetycznych podstaw ich chorobotwórczości dla ryb.

## Summary

*Shewanella putrefaciens* group, until recently considered as a halophilic bacteria, due to their adaptive abilities, became the causative agent of disease in freshwater fish. Numerous health disorders reported in recent years clearly indicate that *Shewanella* pose threat to different species of these animals. Up to date studies of isolates collected from fish were focused mainly on their biochemical properties, however serological examination and determination of their pathogenicity factors for fish were not performed. Genotypic studies of these microorganisms are also scarce. The aim of current doctoral thesis was to gain the missing answers for these issues.

The dissertation presents comprehensive phenotypic and genotypic characterization of *S. putrefaciens* group isolates as well as determination of the relationship between some properties of these bacteria and their pathogenicity for carp and rainbow trout. The study included also isolates collected from other species of farmed, wild, and ornamental fish. The first stage included phenotypic examinations of enzymatic and serological properties as well as susceptibility to antibacterial agents. The second stage was focused on genotypic analysis of bacteria for their identification and differentiation as well as assessment of correlations between genotypic and phenotypic properties and the context of pathogenicity. The conclusions of these studies were verified in the last stage of work involving experimental infection of fish.

Bacteria preliminary identified as *S. putrefaciens* showed different biochemical activity for a few substrates. Various susceptibility to antimicrobial agents was also observed, however unavailability of antibiogram interpretation criteria makes impossible *in vitro* evaluation of effectiveness of potential treatment of shewanellosis.

Some phenotypic properties of the isolates, such as the enzymatic activity, were found related with clinical signs in infected fish. Haemolytic activity at lower temperatures may play an important role in the pathogenicity of these microorganisms. It was confirmed in the presented studies and clinical observations of health disorders in fish infected with *S. putrefaciens* at water temperature of approximately 10°C.

An important aspect of the study was the development of the author's serotyping method for bacteria belonging to *S. putrefaciens* group and its application for the differentiation of isolates, also in the context of pathogenicity. Despite the majority of tested bacteria being classified to the defined serological variants,

numerous group of serologically unidentified isolates confirmed huge diversity of *Shewanella*.

Phylogenetic analysis of the partial 16S rRNA gene showed a large genetic variety of the isolates, which were classified into three species: *S. putrefaciens*, *S. xiamenensis*, and *S. oneidensis*. Simultaneously, difficulties in the classification of some isolates confirmed the diversity in the tested group of microorganisms. They may also indicate on the presence of not yet described species within the genus *Shewanella*.

The diversity of genotypes determined by the ERIC-PCR method was observed both between species as well as within *S. putrefaciens*, *S. xiamenensis* and *S. oneidensis*. The method was universal and showed high discriminatory power. Greater variation occurred among *S. putrefaciens* and *S. oneidensis* compared to *S. xiamenensis*. Some correlations between genotype and clinical symptoms developed in fish were observed. PFGE studies of the genomic DNA of *S. putrefaciens* group showed the diversity of genotypic profiles, however the uncountable restriction fragments of genomic DNA ruled out the possibility of application of the method for epidemic typing. Hence, ERIC-PCR might be successfully used to investigate sources and routes of the pathogen spread.

Experimental fish infections confirmed the pathogenicity of *S. putrefaciens* group, however the clinical signs and mortality rate in diseased fish depended on fish species. Skin lesions predominated in infected carp, while infected trout showed less intense non-specific symptoms such as exophthalmia. Both in carp and trout low intensive or no health disorders were observed following *S. oneidensis* and *S. xiamenensis* infections. The highest mortality rate reaching up to 100% was noted in rainbow trout infected with one of *S. putrefaciens* isolates.

Considering the obtained results, there is a need for future investigations focused on comprehensive characterization of species distinguished within *Shewanella* group, precisely targeting mechanisms and genetic background of pathogenicity for fish.