

4. Međunarodni znanstveno – stručni skup o ribarstvu:
“HRVATSKO RIBARSTVO KAKO I KUĐA DALJE“

Ribarstvo i zaštita zdravlja riba

Vukovar, 14. i 15. 04. 2010. godine

KVALITETA VODE I ZDRAVSTVENO STANJE RIBA RIJEKE SUTLE

Damir Valić*, Irena Vardić*, Damir Kapetanović*, Božidar Kurtović*, Marija Tomec*,
Zlatica Teskeredžić*, Biserka Raspor#, Zrinka Dragun#, Željka Strižak# i Emin Teskeredžić*

*Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Zavod za istraživanje mora i
okoliša, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

#Laboratorij za biološke učinke metala, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer
Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

UVOD

- Tijekom posljednjih desetljeća slatkovodni ribolov u Hrvatskoj se razvija gotovo isključivo kao športski ribolov, dok gospodarski praktički nestaje.
- Za izradu kvalitetnog programa praćenja stanja slatkovodnog ribarstva, kako bi se omogućilo ribolovnim društvima i drugim zainteresiranim subjektima gospodarenje ovim prirodnim resursima, važno je istražiti medij u kojem ribe obitavaju.
- Praćenjem što većeg broja parametara (fizikalno-kemijskih, bioloških, mikrobioloških, teških metala) u vodi određuje se njena kvaliteta, a utvrđivanje brojnosti i raznovrsnosti ihtiopopulacija koje u njoj obitavaju te njihovog zdravstvenog statusa, pruža općenitu sliku stanja tog vodenog sustava, kao i pretpostavku njegovog budućeg razvoja.

- Rijeka Sutla izvire u Sloveniji i je granična rijeka između Hrvatske i Slovenije ukupne dužine oko 91 km, od toga u Hrvatskoj 89 km. U rijeku Savu utječe kod Savskog Marofa.
- Kao nastavak istraživanja iz 2008. godine, u rujnu i listopadu 2009. na osam lokaliteta duž rijeke Sutle istražilo se zdravstveno stanje riba i parametri vode.
- Praćenje zdravstvenog stanja populacija riba koje obitavaju u određenoj ribolovnoj zoni od presudnog je značenja za opstanak tih populacija. Pritom se naglasak stavlja na uzročnike bolesti koji mogu ugroziti prirodnu ravnotežu među vrstama. U otvorenim vodama nije moguće provoditi liječenje, pa je time značaj poznavanja zdravstvenog statusa postojeće ihtiofaune, kao i zdravstvenog stanja nasadnog materijala još naglašeniji.

➤ Karta područja s ribolovnim vodama i lokalitetima na kojima je provedeno uzorkovanje

- | | | | |
|----|--|---------------|---------------|
| 1. | Hum na Sutli | N 46° 13,339' | E 15° 43,187' |
| 2. | Donje Brezno | N 46° 11,532' | E 15° 39,269' |
| 3. | Kumrovec -Ulamin kut | N 46° 04,377' | E 15° 40,562' |
| 4. | Klanjec | N 46° 02,728' | E 15° 44,237' |
| 5. | Ključ Brdovečki | N 45° 52,433' | E 15° 41,426' |
| 6. | Drenje Brdovečko | N 45° 52,133' | E 15° 41,768' |
| 7. | Hum na Sutli- staklana Straža | | |
| 8. | Hum na Sutli – Rogatec (granični prijelaz) | | |





Lokalitet Hum na Sutli



Lokalitet Donje Brezno



Lokalitet Kumrovec - Ulamin Kut



Lokalitet Klanjec



Lokalitet Ključ Brdovečki



Lokalitet Drenje Brdovečko

MATERIJAL I METODE

- Na terenu su izmjereni parametri vode pomoću sonde za mjerenje temperature, kisika i pH. Uzeti su i uzorci vode za daljnju analizu u laboratoriju.
- Za određivanje koncentracija otopljenih metala u riječnoj vodi uzorci su profiltrirani kroz celulozni nitratni filter s porama 0,45 μm , zakiseljeni s dušičnom kiselinom te pohranjeni na 4°C. Metali u tragovima mjereni su izravno, dok su koncentracije makro elemenata (Na, K, Ca i Mg) mjerene u 10x razrijeđenim uzorcima, metodom masene spektrometrije visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom.
- Uzorci planktona dobiveni su filtriranjem 20 litara vode kroz planktonsku mrežicu veličine pora 36 μm , a bentos je sabiran s određene površine karakterističnih staništa. Uzorci su spremljeni u boce s 4%-tnim formaldehidom i obrađeni u laboratoriju.

- Izračunata je apsolutna učestalost fitoplanktonskih vrsta (broj stanica/L). Relativna zastupljenost vrsta fitoplanktona i fitobentosa određena je po Knöppu, a saprobne vrijednosti indikatorskih vrsta po Wegelu. Indeks saprobnosti određen je prema Pantle-Bucku, te na osnovi dobivenih vrijednosti pokazatelja i stupnja trofije, lokaliteti su svrstani u određenu vrstu kakvoće.
- Kakvoća riječne vode ocjenjena je i temeljem mikrobioloških pokazatelja: ukupnog broja aerobnih bakterija i ukupnog broja koliformnih bakterija, sukladno Uredbi o klasifikaciji voda (1998), koja je zamijenjena sa novim uredbama iz 2008. godine po kojima se isti više ne određuju.
- Broj ukupnih koliforma i *Escherichia coli* utvrđeni su s Colilert® testovima, a broj enterokoka s Enterolert® testom i Quanti/Tray 2000 (IDEXX, USA).

- Izlov ribe proveden je upotrebom elektro-ribolovnog agregata. Ulovljena riba je odmah vagana i mjerena te zdravstveno pregledana.
- S ciljem ocjene zdravstvenog stanja obavljen je pregled ribe u vidu općeg kliničkog, mikroskopskog i patoanatomskog pregleda, te su uzeti uzorci za virološku, bakteriološku i parazitološku pretragu.
- Za mikroskopsku pretragu na prisutnost ektoparazita materijal je uziman sa škrge, peraja i kože, te pregledan u obliku nativnog preparata pod svjetlosnim mikroskopom.
- Obavljen je makroskopski pregled unutarnjih organa na prisustvo endoparazita i patoloških promjena.
- U svrhu determinacije endoparazita izvršeno je određivanje sljedova nukleotida dijelova gena COI i ITS rDNA regije, umnoženih u reakcijama PCR.

- Virološkom pretragom analizirana je prisutnost virusa proljetne viremije šarana (PVŠ), zarazne nekroze gušterače (ZNG), zarazne hematopoetske nekroze (ZHN) i virusne hemoragične septikemije (VHS) direktno u tkivnim uzorcima (slezena, srce, bubreg i mozak) metodom RT-"semi-nested"-PCR. Izvršena je i inokulacija tkivnog materijala na kulture stanica EPC.
- Materijal za bakteriološku pretragu sakupljen je iz škrge, jetre, slezene i bubrega. Uzorci su inokulirani na TSA agaru. Podloge su inkubirane kroz 24 do 48h na 22°C.
- Nakon utvrđivanja kukaša *P. laevis* u crijevima klenova određena je i crijevna bakterijska flora. Bakterije su izolirane na TSA podlogama i determinirane određivanjem slijeda nukleotida gena 16S rRNA.

REZULTATI I RASPRAVA

- Rezultati fizikalno-kemijske analize vode u rujnu i listopadu 2009. godine na rijeci Sutli.

	14-16.9.2009	9.10.2009	14.10.2009.	21.10.2009	Svi izlasci
Zamućenost/FAU	0-11	0-9	4-13	0-11	0-13
Temp. °C	16,6-18,2	16,4-17,8	13,3-14,3	7,2,-13,5	7,2-18,2
*Salinitet ‰	-	0,25-0,62	0,23-0,46	0,25-0,56	0,23-0,62
*TDS mg/L	-	287-634	246-465	250-565	226-634
Cond. µS/cm	550-1003	532-1150	463-823,5	470,5-1083	463-1150
pH	7,75-8,23	7,70-8,31	7,85-8,28	7,80-8,23	7,70-8,31
O ₂ mg/L	4,59-9,01	2,39-11,40	6,36-10,55	6,19-11,60	2,39-11,60
O ₂ %	51,2-94,1	30,5-121,1	43,3-97,2	54,4-100,9	30,5-121,1
mg/L CO ₂	0,9-2,4	1,1-2,2	1,3-2,7	1,2-2,6	1,1-2,7
KPK/ Mn	0,9-2,7	2,1-6,80	2,8-5,12	3,05-6,11	0,9-6,80
mg/L NH ₄	0,020-0,097	0,035-0,113	0,020-0,105	0,028-0,120	0,020-0,120
mg/L NH ₃	<0,001-0,003	0,001-0,002	<0,001-0,001	<0,001-0,001	<0,001-0,003
NO ₂ mg/L	<0,001-0,087	0,001-0,092	<0,001-0,104	<0,001-0,026	<0,001-0,104
NO ₃ mg/L	<0,01-0,02	<0,01-0,12	0,01-0,06	0,01-0,09	<0,01-0,12
N (t) mg/L	<0,1-0,2	0,1-3,2	0,1-2,5	0,1-1,0	0,1-3,2
*S ²⁻ mg/L	-	0,01-0,03	0,1-0,7	0,01-0,04	0,01-0,07
P (t) mg/L	0,09-0,34	0,09-0,41	0,21-0,48	0,09-0,37	0,09-0,48
m- alkalitet	3,02-4,02	3,01-4,17	2,28-4,0	3,26-4,27	2,28-4,59
KT°dH	8,57-11,26	8,43-11,68	6,38-11,03	3,13-12,85	6,38-12,85
UT°dH	11,75-14,77	11,33-16,05	11,09-13,78	13,22-15,68	11,33-16,05

- Najviše i najniže koncentracije otopljenih metala izmjerene u rijeci Sutli uspoređene su s onima u rijeci Savi u kojoj koncentracije metala nisu značajno više od prirodnih.
- Koncentracije otopljenih metala na Humu na Sutli bile su usporedive ili niže od koncentracija izmjerenih u rijeci Savi, te se stoga ovaj lokalitet može smatrati nezagađen metalima. Jedina iznimka su nešto povišene koncentracije Li, Fe, Sr i As (dvostruko u odnosu na rijeku Savu).
- Koncentracije većine metala izmjerene na Donjem Breznom znatno su više u odnosu na rijeku Savu, posebice natrija (8x) i kalija (4x) od makro elemenata, te od metala u tragovima, koncentracije litija (30x), molibdena (15x), kadmija (8x), talija (5x), olova (20x), mangana (6x), željeza (4x), kobalta (5x), nikla (3x), stroncija (3x), barija (2x) i arsena (9x).

- Od mjerenih metala u otopljenoj frakciji, samo za tri postoje propisane granične vrijednosti za riječnu vodu: Cd, Pb i Ni, dok je za Cu preuzet prijedlog iz neobjavljenih izvješća Ujedinjenog Kraljevstva. Usporedbom s dozvoljenim PGK za navedena četiri metala, prosječne izmjerene vrijednosti na svim lokalitetima niže su od propisanih. Jedino kod kadmija, koncentracije zabilježene u nekim uzorkovanjima na lokalitetima Hum na Sutli-Rogatec i Donje Brezno prelaze PGK, ali su još uvijek znatno niže od MDK za pojedinačna mjerenja otopljenog kadmija u riječnoj vodi, koja prema ODV (2000/60/EC) i Uredbi o opasnim tvarima u vodama (NN 137/08b) iznosi $0,900 \mu\text{g L}^{-1}$.
- Prvi sustavni podaci o koncentracijama većeg broja otopljenih metala i metaloida u rijeci Sutli.

- U bentosu biljni organizmi su daleko više zastupljeni od životinjskih vrsta. Prevladavale su brojne mikrofitske dijatomeje penatnog tipa. U zoobentosu su utvrđeni predstavnici kolnjaka i oblića te ličinke kukaca.
- Na osnovi kvalitativnih analiza mrežnog planktona, utvrđena je dominantnost fitoplanktona u odnosu na zooplankton. U fitoplanktonu su utvrđene mnoge bentoske vrste, a prevladavala je dijatomejska flora penatnog tipa.
- U zooplanktonu prevladavali su predstavnici kolnjaka. Ovu skupinu mnogi autori smatraju jednom od dominantnih slatkovodnih zooplanktonskih skupina.
- Kakvoća vode je na svim istraživanim lokalitetima bila beta-mezosaprobnog tipa. Na osnovi izračunatog P-B indeksa saprobnosti, vode istraživanih lokaliteta rijeke Sutle pripadale su kakvoći II vrste.

Lokalitet Vrsta	Hum na Sutli	Donje Brezno	Klanjec	Kumrovec Ulamin kut	Ključ Brdovečki	Drenje Brdovečko
Klen	41	34	20	20	42	41
Krkuša	3	16	/	/	2	1
Brkica	/	2	/	/	/	/
Mali vretenac	/	/	1	/	/	/
Bodorka	/	3	/	/	/	/
Som	/	/	2	/	/	/
Mrena	/	/	9	14	3	5
Potočna mrena	1	/	/	7	18	7
Štuka	/	/	/	1	/	/
Manjić	/	/	/	1	/	/
Vijun	/	/	/	1	/	2
Grgeč	/	/	1	/	/	/
Uklja	/	/	11	11	1	8
Podust	/	/	5	2	/	/
Nosara	/	/	1	1	/	1
Crvenperka	/	1	/	/	/	/
Dvoprugasta uklja	3	/	/	/	18	/
Ukupno	48	56	50	58	84	65

➤ Rezultati mikrobiološke analize vode rijeke Sutle na istraživanim lokalitetima.

Datum	Parametar	Hum na Sutli	Straža- tvornica (Hum)	Hum-granični prijelaz	Donje Brezno	Kumrovec	Klanjec	Ključ Brdovečki	Drenje Brdovečko
14.09.	U. koliformi (MPN/100 ml)	7813,5	NA	NA	15739	3074,5	5630,5	2078	2305
	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	2041,5	NA	NA	4258	46,6	467	411	469
	Enterokoki (MPN/100 ml)	41,25	NA	NA	100,6	25,4	15,1	83,95	20,25
	HPC 35°C (cfu/ml)	1450	NA	NA	7750	2000	2000	950	850
	HPC 22°C (cfu/ml)	20000	NA	NA	24000	5500	4650	8500	7000
	Vrsta vode	III			IV	III	III	III	III
9.10.	U. koliformi (MPN/100 ml)	2548	30759	14424,5	2259,5	630,5	1664	741,5	1996,5
	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	254	5758,5	5079	623,5	99,5	100	150,5	202
	Enterokoki (MPN/100 ml)	57,7	5962,85	2525,1	110,55	102,9	25,3	68,65	63,65
	HPC 35°C (cfu/ml)	300	1200	33000	750	200	200	100	200
	HPC 22°C (cfu/ml)	1500	4500	149000	1050	23000	100	3500	2000
	Vrsta vode	III	IV	IV	III	III	III	III	III
14.10.	U. koliformi (MPN/100 ml)	4838,5	57943	55079	92607,5	2767,5	2689,5	16404,5	13891
	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	1096	8749,5	5843,5	16242	304	810,5	1579,5	1097
	Enterokoki (MPN/100 ml)	868,3	1454,05	760,15	1520,5	252,5	166,65	1835,3	1723,3
	HPC 35°C (cfu/ml)	350	1750	27600	4700	450	600	31400	500
	HPC 22°C (cfu/ml)	7500	6500	94000	26000	2500	1500	29500	16000
	Vrsta vode	III	IV	IV	IV	III	III	IV	IV
21.10.	U. koliformi (MPN/100 ml)	2281	35534	62688	63080	1780,5	11126,5	688,5	254
	<i>E. coli</i> (MPN/100 ml)	520,5	4696,5	2594,5	3790,5	965	570,5	<100	100
	Enterokoki (MPN/100 ml)	183,25	1356,6	1248,35	953,65	115,85	80,5	15,1	25,45
	HPC 35°C (cfu/ml)	400	550	19500	900	350	200	350	100
	HPC 22°C (cfu/ml)	550	3000	57500	3500	1000	1500	550	1500
	Vrsta vode	III	IV	IV	IV	IV	IV	III	II

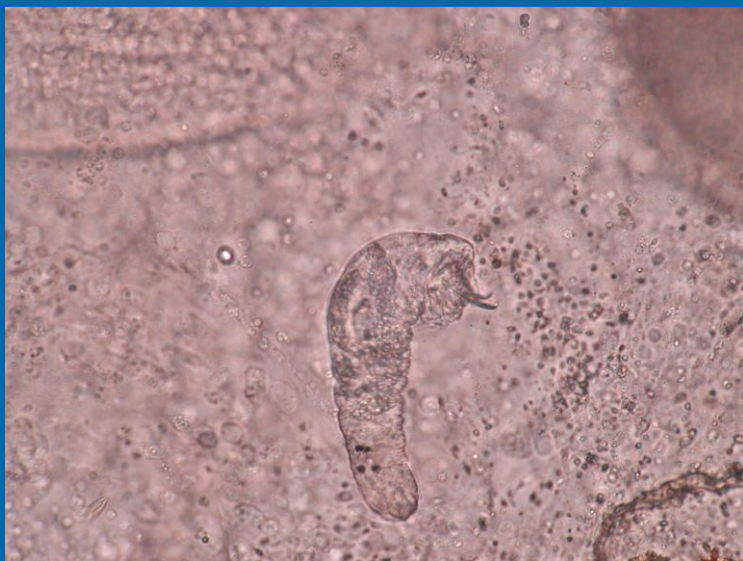
- Općom kliničkom pretragom riba nisu utvrđene patološke promjene na površini tijela riba.
- Analizirani uzorci bili su negativni na prisustvo virusa ZHN, ZNG, VHS i PVŠ.
- Bakteriološki je pregledano 26 riba. Ukupno je izolirano 563 CFU od čega sa škrge 361 CFU, iz jetre 92 CFU iz slezene 74 CFU i iz bubrega 36 CFU.
- Broj bakterija (CFU/mL) u crijevu se kretao u rasponu od 1×10^3 CFU/mL (Hum na Sutli) do $1,7 \times 10^5$ CFU/mL (Drenje Brdovečko). Broj bakterija u crijevima klenova zaraženih kukašem *P. laevis* nije bio veći u odnosu na broj bakterija u crijevima nezaraženih klenova. Također brojnost bakterija u crijevima nije bila u korelaciji s intenzitetom parazita.

- Od 20 različitih vrsta izoliranih bakterija iz crijeva klenova, 70% su pripadale razredu Gammaproteobacteria, njih 10% razredu Actinobacteria, 10% razredu Bacilli, te po 5% razredu Betaproteobacteria i razredu Flavobacteria. Identificirane su sljedeće vrste Gram-pozitivnih bakterija: *Exiguobacterium* sp., *Staphylococcus aureus*, *Brachyobacterium paraconglomeratum* te *Microbacterium* sp.
- Od Gram-negativnih bakterija treba istaknuti nalaz vrste *Aeromonas salmonicida* koja kod riba izaziva bolest furunkulozu. Također, riba koja je bila zaražena bakterijom *A. salmonicida* nije imala crijevne nametnike, čime se ovaj patogen nije mogao dovesti u vezu s upalnim procesima stijenke crijeva uslijed invazije nametnikom.

- U sklopu parazitološke pretrage, ukupno je pronađeno 66 jedinki s barem jednim oblikom parazita.
- Od ektoparazita najčešće je pronađen *Dactylogyrus* sp. Od ostalih nametnika pronađena je *Trichodina* sp., *Ichthyophthirius multifiliis*, ličinke kukaca i metilji.
- Od 95 pregledanih riba sa 6 lokaliteta, njih 53, tj. 55,8% bile su zaražene crijevnim kukašima. Molekularnom analizom (ITS regija i gen COI) je ustanovljeno da se radi o vrsti *Pomphorhynchus laevis*. Crijevni nametnici pronađeni su samo kod klena.

Osnovni kvantitativni parametri invazije crijevnih nametnika iz koljena kukaša (*Acanthocephala*) u klenovima

Parametar	Učestalost (%)	Srednja gustoća $\pm$ SE	Srednji intenzitet $\pm$ SE	Raspon intenziteta
Lokalitet				
Hum na Sutli	66,7	$9,67 \pm 5,47$	$14,5 \pm 6,08$	0 - 63
Donje Brezno	20	$0,27 \pm 1,16$	$1,33 \pm 0,50$	0 - 2
Kumrovec– Ulašin kut	53,3	$6,13 \pm 3,76$	$11,5 \pm 3,0$	0 - 36
Ključ Brdovečki	87,5	$2,0 \pm 1,13$	$2,29 \pm 1,01$	0 - 6
Drenje Brdovečko	60	$6,68 \pm 8,32$	$10,58 \pm 8,19$	0 - 95



Dactylogyrus sp. na škrgama



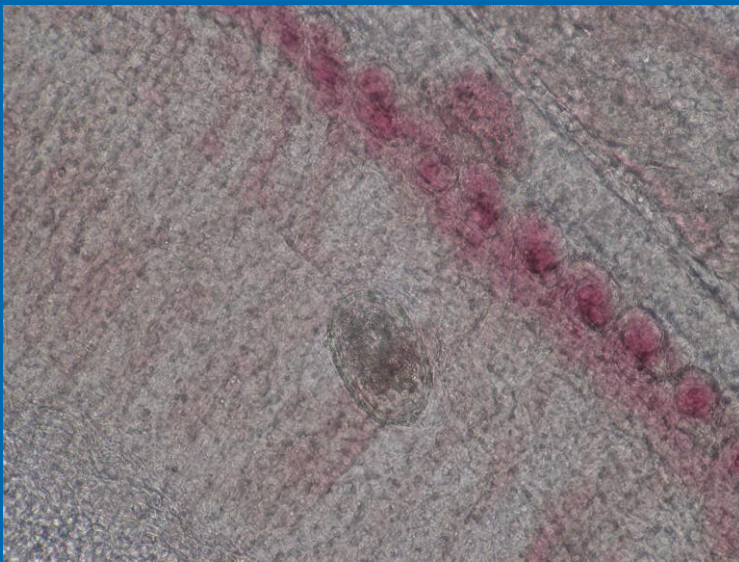
I. multifiliis na škrgama



Ličinka kukca na škrgama



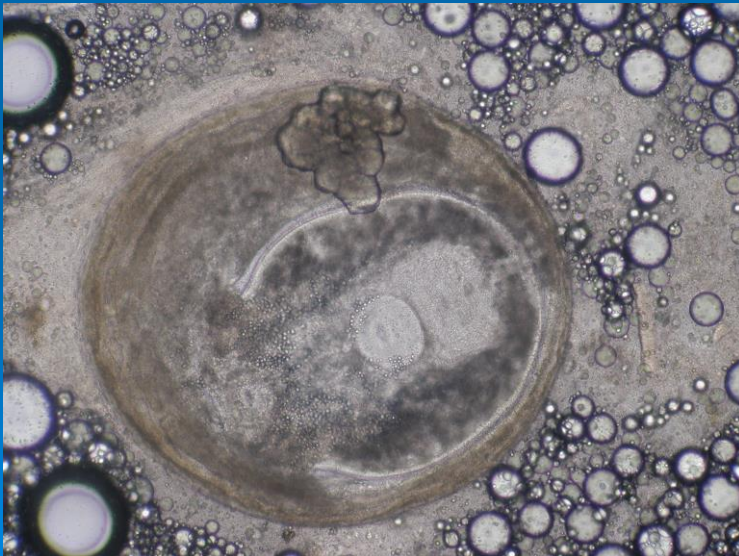
Metilj na škrgama



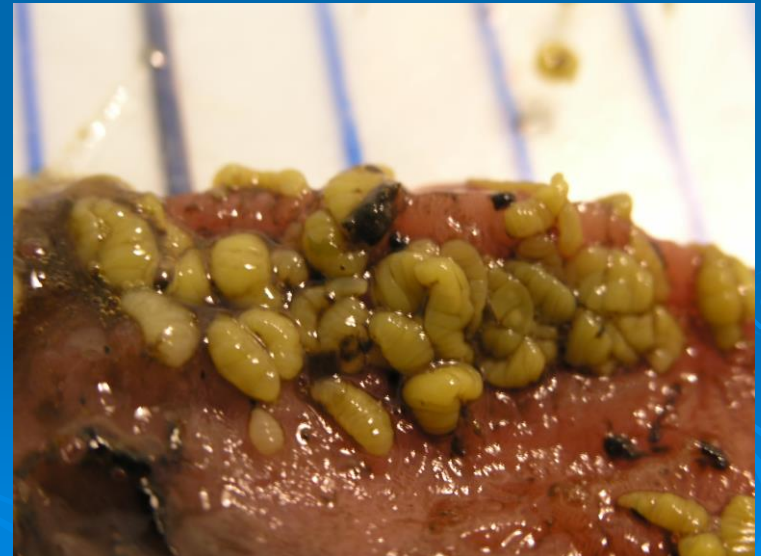
Jaje nematoda na škrgama



Trichodina sp. na škrgama



Metacerkarija digenog metilja na koži



Acanthocephala u crijevu

ZAKLJUČCI

- Rezultati provedenih fizikalno–kemijskih analiza uzoraka vode tijekom četiri uzorkovanja pokazuju da su vode na lokalitetima 1, 2, 7 i 8 siromašne kisikom. Temperatura vode bila je u skladu s godišnjom dobi osim na lokalitetu 7 gdje je uvijek bila znatno viša i kretala se od 13,5–20,8°C. Prema rezultatima ostalih fizikalno-kemijskih parametara, rijeka Sutla se može svrstati u IV vrstu voda.
- Iako su koncentracije otopljenih metala, koji su svrstani u prioritetne opasne tvari (Cd, Pb i Ni), u vodi rijeke Sutle niže od zakonski propisanih graničnih koncentracija, značajna povišenja koncentracija većeg broja otopljenih metala zabilježena na pojedinim postajama ukazuju na potrebu sustavnog praćenja koncentracija otopljenih metala u ovoj rijeci, definiranja izvora zagađenja i sprječavanja daljnjeg pogoršanja kakvoće riječne vode.

- Osim koncentracija otopljenih metala u vodi, u tijeku su i mjerenje koncentracija odabranih metala u citosolu dva tkiva klenova ulovljenih u rijeci Sutli u rujnu 2009. godine. Citosolske koncentracije metala u škragama (izravni dodir s okolišem, mjesto unosa) i jetri (glavni metabolički i detoksikacijski organ), uvode se kao pokazatelji izloženosti klenova metalima.
- Veliki broj utvrđenih indikatorskih vrsta pripadao je beta-mezosaprobnom stupnju. Na osnovi izračunatog P-B indeksa saprobnosti, vode istraživanih lokaliteta rijeke Sutle pripadale su kakvoći II vrste.
- Na temelju utvrđenih vrijednosti mikrobioloških pokazatelja u vodi, možemo zaključiti da vode istraživanog ribolovnog područja odgovaraju III odnosno IV vrsti, pri čemu je najveće bakteriološko opterećenje vodotoka na lokalitetima 7 i 8 (staklana Straža i granični prijelaz).

- U rijeci Sutli je na 6 lokaliteta ukupno ulovljena 361 riba, iz 16 rodova i 6 porodica. Najbrojnija je bila porodica Cyprinidae, a najbrojnija vrsta klen (54,8%).
- Parazitološkom pretragom u pregledanim klenovima sa svih postaja utvrđeni su crijevni nametnici kukaši vrste *Pomphorynchus leavis*. Najveća učestalost kukaša zabilježena je na postajama: Ključ Brdovečki, Hum na Sutli te Drenje Brdovečko.
- Probavni trakt ima ključnu ulogu u ishrani i zdravlju riba te je stoga i određivanje bakterijske mikroflore crijeva značajno za ocjenu zdravstvenog stanja divlje populacije riba. Pregledani klenovi imali su približno jednak broj bakterija u crijevnim uzorcima s analiziranih lokaliteta, bez obzira na prisutnost crijevnih nametnika kukaša.
- Nalaz uzročnika bolesti furunkuloze, bakterije *A. salmonicida*, ukazuje da divlje populacije klenova mogu biti rezervoari patogenih mikroorganizama, te da je probavni trakt jedan od putova širenja ove bakterije u ribljem organizmu.

- Kontinuirani monitoring određene vode temelj je njezinog pravilnog gospodarenja, zaštite riba i drugih organizama vezanih za vodu, te očuvanje bioraznolikosti i cijelog krajobraza što treba biti od posebnog interesa za Republiku Hrvatsku.
- Na ovaj način može se kvalitetno štititi voda od zagađenja i usporedo razvijati športsko ribolovni turizam.
- Rezultati istraživanja na više lokaliteta uzduž rijeke Sutle u 2009. godini, zajedno s onima iz 2008., prikazuju sve prednosti ovakvog interdisciplinarnog pristupa.
- Kontinuitet istraživanja treba nastaviti zbog interesa športsko ribolovnih društava i udruga, zdravlja ljudi i životinja, kao i zbog očuvanja ekoloških osobitosti jednog od najvećih prirodnih bogatstava.

ZAHVALA

- Ovo istraživanje financirano je od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Uprave ribarstva.

HVALA NA PAŽNJI

