

7. Međunarodni gospodarsko - znanstveni skup
HRVATSKO RIBARSTVO NA PRAGU EU
Riba kao funkcionalna hrana

PRAĆENJE ZDRAVSTVENOG STANJA RIBE U UZGOJU NA JADRANU

Damir Valić, Irena Vardić, Damir Kapetanović,
Zlatica Teskeredžić i Emin Teskeredžić

Institut Ruđer Bošković
Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama



7.-9.4.2011. Vukovar, Republika Hrvatska

UVOD



- 
- Akvakultura podrazumijeva proizvodnju organizama koji žive u vodi pod kontroliranim uvjetima, odnosno aktivnosti koje su potrebne za postizanje proizvodnje organizama korisnih čovjeku.
 - Zbog povećane potražnje za ribom i ribljim proizvodima posljednjih desetljeća možemo zamijetiti njezin kontinuirani porast u svjetskim razmjerima.
 - Uzgoj ribe praćen je povećanim interesom i brigom za mogući utjecaj na morski okoliš što dovodi do kontrole bolesti riba, praćenja gospodarenja te zaštite okoliša.
 - Zdravstveno stanje riba ovisi o međusobnom utjecaju riba, patogena i samog okoliša.
 - Bolest je patofiziološko/patoanatomska stanje organizma uzrokovano poremećajem fizikalnih, kemijskih i/ili bioloških parametara okoliša ili njihovih međusobnih kombinacija.

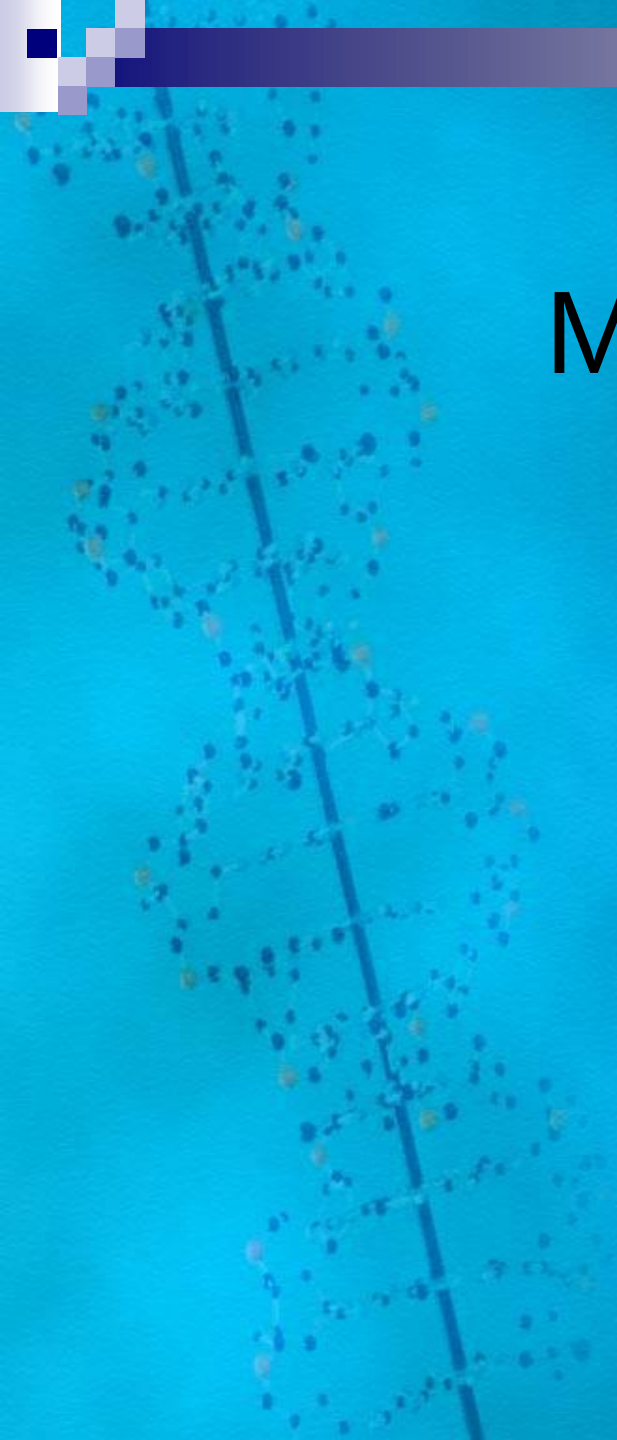


U svrhu praćenja zdravstvenog stanja ribe bilo je potrebno:

1. Analizirati fizikalno-kemijska svojstva morske vode u uzgajalištima i u njihovom okolišu;
 2. Analizirati mikrobiološka svojstva morske vode u uzgajalištima i u njihovom okolišu (broj heterotrofnih bakterija, ukupnih i fekalnih koliforma, vibrija i enterokoka);
 3. Utvrditi zdravstveno stanje ribe koje obuhvaća parazitološku, bakteriološku i virološku pretragu.
 4. Procijeniti opasnost po zdravlje uzgajivača (djelatnika) i konzumenata ribe zbog moguće prisutnosti patogena u uzgajalištima;
 5. Procijeniti utjecaj tehnologije hranidbe riba na mikrobiološku kvalitetu okoliša.
-
- Obuhvaćeno je razdoblje od pet godina s ciklusom izlazaka od dva puta godišnje, u proljeće i jesen.



MATERIJALI I METODE



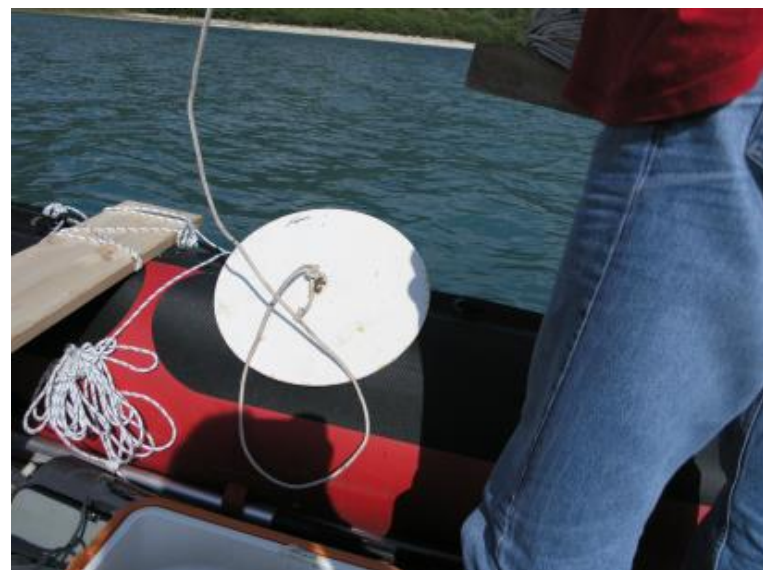
LOKALITETI

- Uzorkovanje je provedeno na tri uzgajališta lubina u području južnog (1), srednjeg (2) i sjevernog (4) Jadrana.
- Osim uzgajališta lubina istraživanjima je bilo obuhvaćeno i jedno tovilište tuna u srednjem Jadranu (3).



FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA MORA

- Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) i otopljeni kisik (mg/L) mjereni su na terenu pomoću digitalne sonde, a salinitet (‰) s uporabom salinometra.
- Rezultati vrijednosti otopljenog kisika u vodi, za lokalitete Pelješac, Ugljan i Zverinac, određeni su metodom po Winkleru.
- Prozirnost je određivana uporabom Secchi ploče.



UZORKOVANJE MORSKE VODE

- Uzorci vode za mikrobiološku pretragu uzimani su s 5 L Niskinovim crpcem, te pohranjeni u terenske hladnjake i u njima transportirani do laboratorija na analizu.
- Uzorkovanje je uključivalo uzorke vodenog stupca ispod kaveza s ribom i na udaljenosti od oko 500 m od uzgajališta (kontrolna mjesta). Uzorci morske vode za analizu su sakupljeni na tri dubine (0,5 m ispod površine, 3 m dubine i 0,5 m iznad dna).



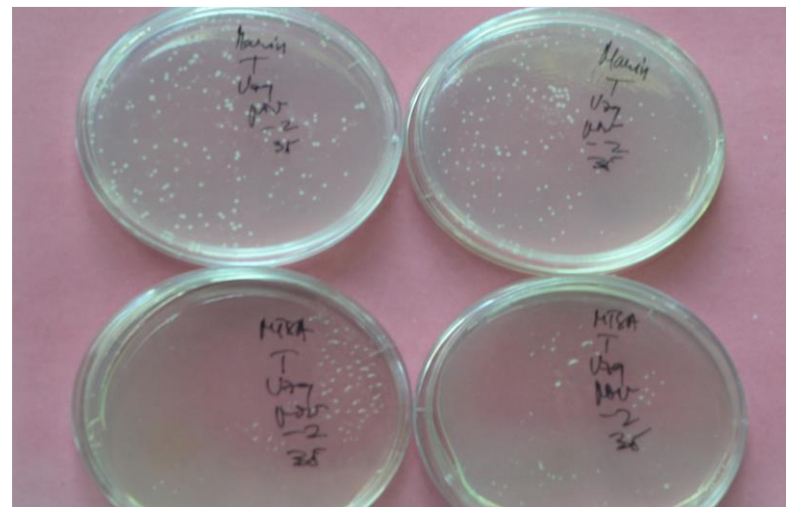
UZORKOVANJE RIBA

- Na uzgajalištima je provedena zdravstvena pretraga nasumično odabranih riba iz uzgoja (lubina i tune) kako bi se odredili paraziti, bakterije i virusi navedenih vrsta riba.



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- **Određivanje broja heterotrofnih bakterija**
- Uzorci morske vode su serijski razrijeđeni sa sterilnom PBS otopinom (Merck) i inokulirani metodom širenja razmaza na Marine (Difco-BD) agaru; Tryptic soy agaru (DB-BBL) s dodatkom NaCl-a – MTSA i uporabom SimPlate® testa (IDEXX) u duplikatu.
- Rezultati izraženi kao CFU/mL, odnosno NBB/mL.



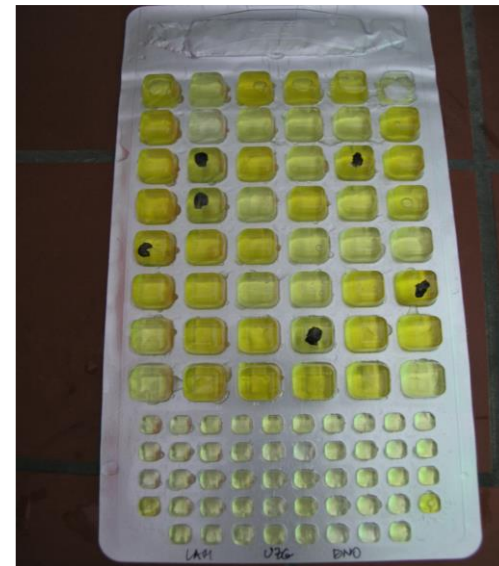
BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- **Određivanje *Vibrio* spp.**
- Vibriji su izolirani i prebrojani na selektivno-diferencijalnom mediju Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose – TCBS (Difco-BD), metodom širenja razmaza i inkubaciji na 35°C kroz 24h.
- Rezultati izraženi kao CFU/mL.
- Za identifikaciju izoliranih vibrija upotrijebljena je metoda PCR uz sekvenciranje.



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Bakteriološka analiza **ukupnih koliforma** i ***E. coli*** provedena je uporabom Colilert® testova i Quanti-Tray/2000 (IDEXX) u duplikatu.
- Nakon inkubacije na 35°C kroz 24h, žuta boja indicira prisutnost ukupnih koliforma, a fluorescencija pod UV svjetlom indicira prisutnost *E. coli*.
- Rezultati izraženi kao NBB/100mL.



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Za određivanje broja **fekalnih koliforma** (NBB) u morskoj vodi korišten je tzv. oprezni izračun (Surfrider Foundation, 2003) na temelju broja *E. coli*:
$$E. coli \text{ NBB} \times 1,25 = \text{Fekalni koliformi NBB}$$
- Najvjerojatniji broj **enterokoka** određen je uporabom Enterolert® testova i Quanti-Tray/2000 (IDEXX) u duplikatu.
- Rezultati izraženi kao NBB/100mL.



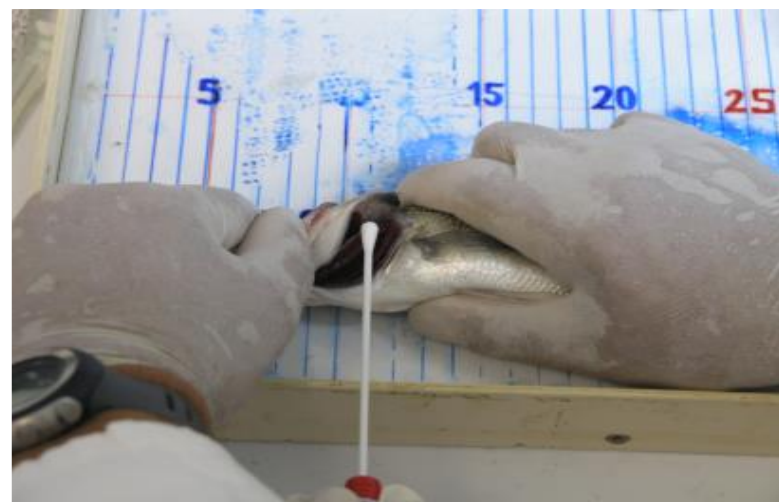
PARAZITOLOŠKA ANALIZA RIBE

- Za prisustvo ektoparazita, pregledavani su nativni preparati brisova kože, peraja i škrge, te pregledani pod svjetlosnim mikroskopom.
- Endoparaziti su određeni makroskopskim pregledom unutrašnjih organa za vrijeme razudbe, a po potrebi determinirani metodom PCR.



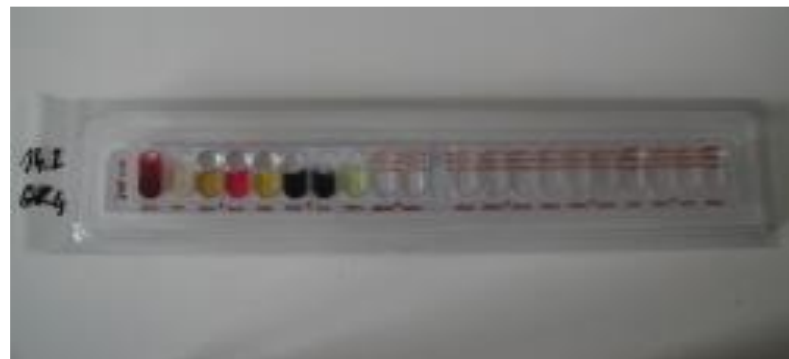
BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBE

- Za određivanje **ukupnog broja bakterija**, odnosno ***Vibrio* sp.** na koži i škrgama riba, uzet je bris kože ispod leđne peraje i sa škrge, uporabom sterilnog seta s plastičnim štapićem (Eurotubo) i sterilne PBS otopine (Merck).
- Iz serijski razrijeđenih uzoraka po jedan mL inokuliran je metodom širenja razmaza po MTSA , odnosno TCBS agaru u duplikatu.
- Rezultati izraženi kao CFU/cm².



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA ORGANA

- Materijal je uporabom sterilne eze sa škrga, iz jetre, slezene i bubrega, inokuliran na MTSA agaru.
- Podloge su inkubirane kroz 24-48h na 22°C.
- Prebrojanim izraslim kolonijama (CFU) određene su fenotipske karakteristike, bojenje po Gramu, reakcija oksidaze i katalaze.
- Svojstva izolata određena su API testovima (Bio Mérieux).
- Bakterije su identificirane APILAB Plus i Apiweb identifikacijskim softverima (Bio Mérieux, France).



VIROLOŠKA ANALIZA RIBE

- Skupni uzorci (dijelovi slezene, srca, bubrega i mozga) od pet jedinki iste vrste korišteni su za virološku pretragu.
- Virološkim pretragama riba utvrđivalo se prisustvo virusne hemoragične septikemije (VHS), zarazne hematopoetske nekroze (IHN), zarazne nekroze gušterače (IPN) i virusne encefalopatije i retinopatije (VER).
- Upotrebljavana je brza metoda RT-PCR (reverzna transkripcija - lančana reakcija polimerazom).

REZULTATI I

RASPRAVA





FIZIKALNO-KEMIJSKA ANALIZA MORA

- Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara analiziranih uzoraka tijekom ovog istraživanja zadovoljavaju potrebe u uzgoju, uz očitovanje sezonskih razlika u svim parametrima fizikalno-kemijske kvalitete vode na istraživanim lokalitetima.

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Statističkom analizom broja **heterotrofnih bakterija** pri temperaturi inkubacije 22°C na lokalitetima s uzgojem lubina, **tijekom četiri uzorkovanja (zanemarene dubine uzorkovanja)**, utvrđeno je da lokalitet Limski kanal (uzgajalište i kontrolne točke) ima značajno najveći broj heterotrofnih bakterija.
- U pogledu broja **heterotrofnih bakterija** izraslih pri temperaturi inkubacije 35°C, nije utvrđena pravilnost, odnosno, više vrijednosti su utvrđene na južnom i srednjem Jadranu u odnosu na broj heterotrofnih bakterija na sjevernom Jadranu.

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Ukoliko se promatra razlika broja heterotrofnih bakterija **po dubinama** (površina, 3 m i dno) pri temperaturi inkubacije 22°C, statističkom analizom, utvrđeno je postojanje većeg broja heterotrofnih bakterija jedino u površinskom sloju na lokalitetu Ugljan uzgajalište.
- Statističke razlike u broju heterotrofnih bakterija na tri dubine pri temperaturi inkubacije od 35°C nema između lokaliteta južnog, srednjeg i sjevernog Jadrana.
- Postojanje statističke razlike vrijednosti specifičnih bakterijskih indikatora (vibrija, ukupnih koliforma, *E. coli* i enterokoka) između **tri dubine stupca morske vode** (površina, 3 m i dno) na kontrolnim točkama i uzgajalištima tri lokaliteta s uzgojem lubina nije utvrđeno.
- Statističkom analizom vrijednosti specifičnih bakterijskih indikatora na lokalitetima s uzgojem lubina, **tijekom četiri uzorkovanja (zanemarene dubine uzorkovanja)**, utvrđeno je jedino statistički značajno najviše *E. coli* na lokalitetu Limski kanal (227,9 NBB/100mL) u lipnju 2008.

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Ako se usporede **razlike između sezone uzorkovanja (proljeće–jesen)** na svim istraživanim lokalitetima s uzgojem lubina, utvrđen je **veći broj u kasnu jesen**.
- Broj heterotrofnih bakterija u obje godine uzorkovanja je veći u studenome na lokalitetima u južnom i srednjem Jadranu, dok je na lokalitetu Limski kanal u sjevernom Jadranu za 2007. godinu broj heterotrofnih bakterija veći u lipnju.
- Glede specifičnosti broja heterotrofnih bakterija na lokalitetu Zverinac s **tovilištem tuna** nije utvrđena statistički značajna razlika broja heterotrofnih bakterija između tri dubine uzorkovanja na obje temperature inkubacije (22°C i 35°C).
- Najveća vrijednost broja heterotrofnih bakterija utvrđena je u površinskom sloju na uzgajalištu ($4,1 \pm 1,1 \times 10^4$ CFU/mL), odnosno kontrolnoj točki ($3,9 \pm 0,6 \times 10^4$ CFU/mL).

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

Bakterioloških svojstava morske vode na tri dubine; sa statistički značajnim razlikama (*) s Kruskal-Wallis testom s *post-hoc* Dunnovim testom ($p < 0,05$)

- Statističkom analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike broja heterotrofnih bakterija primjenom Marine agara (35°C) i broja *E. coli*.
- Povećanje broja *Vibrio* spp. u vodi na lokalitetu Zverinac, dovodi se u vezu s tovom tuna kao posljedica obogaćivanja s organskom tvari.

Mediji za analizu	Lokalizeti uzorkovanja	Površina	3 m	Dno
Marine agar, 22°C CFU/mL	Zverinac kontrola	13000	10500	6400
	Zverinac uzgajalište	30000	20500	17500
MTSA, 22°C CFU/mL	Zverinac kontrola	3000	5500	4500
	Zverinac uzgajalište	16500	7500	9300
SimPlate 22°C NBB/mL	Zverinac kontrola	44000	41400	41600
	Zverinac uzgajalište	42700	37650	39300
Marine agar, 35°C CFU/mL	Zverinac kontrola	3400	1550	1250
	Zverinac uzgajalište *	1950 ^a	1650 ^{ab}	885 ^b
MTSA, 35°C CFU/mL	Zverinac kontrola	1500	1500	1500
	Zverinac uzgajalište	3250	1900	860
SimPlate, 35°C NBB/mL	Zverinac kontrola	4450	2860	3970
	Zverinac uzgajalište	5000	2990	3105
<i>Vibrio</i> spp. CFU/mL	Zverinac kontrola	90,0	2,5	8,0
	Zverinac uzgajalište	10,0	8,5	20,5
Ukupni koliformi NBB/100mL	Zverinac kontrola	6493,6	3335,7	4881,5
	Zverinac uzgajalište	1579,7	8398,3	1411,6
<i>Escherichia coli</i> NBB/100mL	Zverinac kontrola *	111,2 ^a	5,5 ^b	10,0 ^b
	Zverinac uzgajalište	55,0	106,0	25,4
Enterolert NBB/100mL	Zverinac kontrola	1,0	1,0	1,0
	Zverinac uzgajalište	1,0	1,0	1,0

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Utvrđena vrijednost fekalnih koliforma u površinskom sloju mora na tovilištu tuna je veća **10x** u odnosu od one iz literature za tovilište tuna u Mediteranu.
- Iz utvrđenoga omjera fekalnih koliforma i enterokoka, koji je maksimalno 1,8 (<2,0), za pretpostaviti je da se radi o fekalnom onečišćenju animalnog porijekla od galebova, a u svezi s nepravilnom hranidbom.

Odnos broja fekalnih koliforma (NBB/100mL) i broja enterokoka (NBB/100mL) utvrđenog Enterolert i Enterolert-E testom

listopad, 2008.	<i>E. coli</i>	Fekalni koliformi (F K.)	Enterolert (E)	Enterolert-E (E-E)	Omjer F K.:E	Omjer F K.:E-E
Kontrola površina	14 65±7 85	18 31±9 81	10 0±0	10 0±0	1,8	1 8
Kontrola 3 m	30 75±14 92	38 44±18 65	8 16,4±570 21	24 19,6±1703 84	0,05	0 02
Kontrola dno	15 05±7 14	18 81±8 93	24 19 6±1703 84	1299,7±911 95	0,01	0 01
Uzajajalište površina	10 0±0	12 5±0	150 45±198 63	214 3±213 69	0,08	0 06
Uzajajalište 3 m	9,1±0	11 38±0	58 35±68 38	105±67 17	0,19	0 11
Uzajajalište dno	14 6±7 78	18 25±9 73	3 11,55±426 46	61 1±72 27	0,06	0 3

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA MORA

- Srednje vrijednosti broja **fekalnih koliforma** na uzgajalištima lubina najveće su u površinskom sloju za lokalitete Pelješac ($8,7 \times 10^2$ NBB/100mL) i Ugljan ($4,4 \times 10^3$ NBB/100mL), dok su za lokalitet Limski kanal, u pridnenom sloju ($6,1 \times 10^2$ NBB/100mL). Na lokalitetu Zverinac s tovilištem tuna, srednje vrijednosti broja fekalnih koliforma najveće su u površinskom sloju ($2,0 \times 10^2$ NBB/100mL).

Srednje vrijednosti broja fekalnih koliforma (NBB/100ml) na tri dubine istraživanih lokaliteta u Jadranskom moru

Lokalitet	Mjesto uzorkovanja	Površina	3 m	Dno
Pelješac	Kontrola	1023,3	48,5	329,0
	Uzgajalište	874,8	188,8	102,9
Ugljan	Kontrola	32,4	99,3	38,9
	Uzgajalište	4383,5	156,0	206,4
Limski kanal	Kontrola unutra	178,5	1077,8	221,0
	Kontrola van	78,3	113,4	38,0
	Uzgajalište	102,7	258,7	607,1
Zverinac	Kontrola	716,8	394,7	391,2
	Uzgajalište	197,5	229,2	38,4

BIOMETRIJSKA ANALIZA RIBA

■ Biometrijska analiza lubina

- Tijekom petogodišnjeg istraživanja pregledano je ukupno **360** lubina, na tri lokaliteta iz južnog, srednjeg i sjevernog Jadrana.
- Na temelju provedenih biometrijskih mjerenja, utvrđeno je da su pregledani lubini s lokaliteta **Ugljan** bila **najveći masom** (TM $300,63 \pm 55,00$ g, EM $283,48 \pm 47,48$ g) i **dužinom** (TL $30,65 \pm 2,29$ cm, SL $27,77 \pm 1,75$ cm).
- Lubini s lokaliteta **Limski kanal** bili su **najmanji**, (TM $179,6 \pm 46,52$ g, EM $162,76 \pm 34,52$ g. , tj. TL $25,54 \pm 2,02$ cm, SL $23,01 \pm 1,75$ cm.

■ Biometrijska analiza tuna

- Istraživanjima na tovilištu tuna u srednjem Jadranu ukupno je pregledano **10** tuna.
- Srednje vrijednosti pregledanih tuna bile su TM $11,59 \pm 5,19$ kg, EM $8,96 \pm 2,21$ kg, TL $89,1 \pm 10,48$ cm i SL $78,33 \pm 8,09$ cm.

PARAZITOLOŠKA ANALIZA RIBA

10 godišnje razdoblje

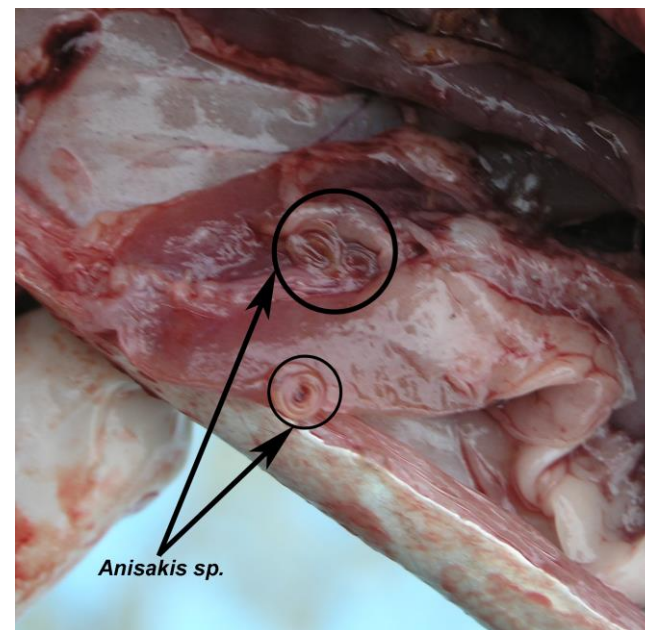
- Od ukupno pregledanih lubina, kod njih **285 (38,83%)** je utvrđena invadiranost škrga s parazitom ***Diplectanum* sp.**
- Na **tunama** je utvrđena invadiranost ekto i endoparazitima.
- U ždrijelu **12** lubina (**1,63%**) utvrđen je parazit ***Ceratothoa* oestroides**.
- Kod riba oko uzgajališta utvrđen je ***Anisakis* sp.**, kao i kod tuna dok kod lubina nije pronađen.



Diplectanum sp.



Ceratothoa oestroides



Anisakis sp.

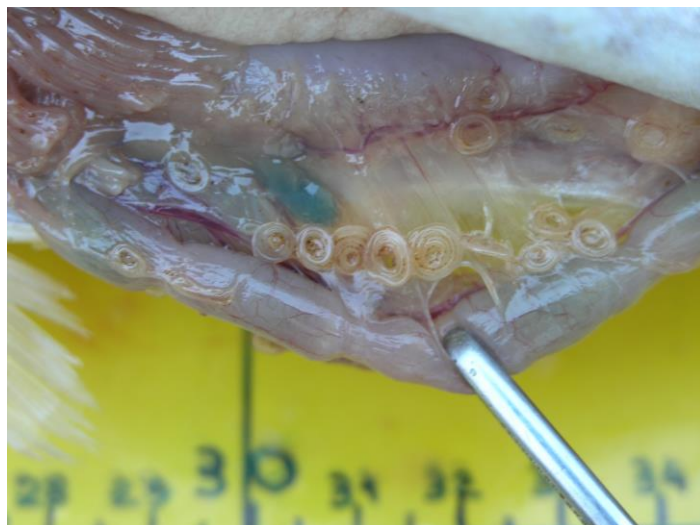
PARAZITOLOŠKA ANALIZA RIBA



Ceratothoa oestroides kod lubina



Parazitarni copepod na tuni



Anisakis sp. u trbušnoj šupljini



Diplectanum sp. na škrgama

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Temeljem rezultata analize bakterijskih svojstava vode na lokalitetima s uzgajalištima lubina i tovilištem tuna, napose procjene broja fekalnih koliforma, nije za očekivati akumulaciju patogena na ribi ili penetraciju unutar tkiva riba, izuzev na lokalitetu Ugljan.
- Bakteriološkom analizom **broja heterotrofnih bakterija i *Vibrio* sp. iz brisa s kože i škrga**, statistički **najmanji broj** heterotrofnih bakterija utvrđen je u brisovima s kože i škrga lubina sa lokaliteta **Pelješac**.
- **Najveći broj** heterotrofnih bakterija u brisu sa škrga (listopad, 2008) i kože (lipanj i listopad, 2008.) je utvrđena na lokalitetu **Limski kanal**.

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Identifikacija *Vibrio* sp.
- Određivanje nukleotidnih sljedova gena 16S rDNA dužine 500 pb potvrdilo je da su izolirane bakterije pripadnici roda *Vibrio*.
- Analizom nukleotidnih sljedova gena gyrB (600 pb) izolirane bakterije su identificirane kao sojevi vrste *V. alginolyticus*.
- Postotak sličnosti između hrvatskih i izolata *V. alginolyticus* iz banke podataka GenBank na temelju sljedova nukleotida gena gyrB je iznosio **92,8-100%**.

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
GGCATCGGTCATGATGATGATGTTGTGGTAACGAAGCTTGTCCGGTTGTACTCGTCACG
GGCATCGGTCATGATGATGATGTTGTGGTAACGAAGCTTGTCCGGTTGTACTCGTCACG
GGCATCGGTCATGATGATGATGTTGTGGTAACGAAGCTTGTCCGGTTGTACTCGTCACG
GGCATCGGTCATGATGATGATGTTGTGGTAACGAAGCTTGTCCGGTTGTACTCGTCACG
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
ACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAAGATAGCATCTT
ACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAAGATAGCATCTT
ACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAAGATAGCATCTT
ACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAAGATAGCATCTT
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
GTCGAAACGTGCTTTTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGGATTGCTTGGTT
GTCGAAACGTGCTTTTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGGATTGCTTGGTT
GTCGAAACGTGCTTTTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGGATTGCTTGGTT
GTCGAAACGTGCTTTTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGGATTGCTTGGTT
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
CTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCCACTATGTATAG
CTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCCACTATGTATAG
CTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCCACTATGTATAG
CTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCCACTATGTATAG
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
TTTACGAGAGTGCCGGATCTTTTCCCTGACAGCTGCAAGTTTACCTGGAAGACCAGCTAG
TTTACGAGAGTGCCGGATCTTTTCCCTGACAGCTGCAAGTTTACCTGGAAGACCAGCTAG
TTTACGAGAGTGCCGGATCTTTTCCCTGACAGCTGCAAGTTTACCTGGAAGACCAGCTAG
TTTACGAGAGTGCCGGATCTTTTCCCTGACAGCTGCAAGTTTACCTGGAAGACCAGCTAG
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
GTCTAGTGCACCTTTACGGCGCGTCATTTACGAGCTTTACGCGCAGCTTACGTCACG
GTCTAGTGCACCTTTACGGCGCGTCATTTACGAGCTTTACGCGCAGCTTACGTCACG
GTCTAGTGCACCTTTACGGCGCGTCATTTACGAGCTTTACGCGCAGCTTACGTCACG
GTCTAGTGCACCTTTACGGCGCGTCATTTACGAGCTTTACGCGCAGCTTACGTCACG
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

```
TGCTGCATCGATGATTTTCGAACAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTCTCAATCAGGAA
TGCTGCATCGATGATTTTCGAACAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTCTCAATCAGGAA
TGCTGCATCGATGATTTTCGAACAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTCTCAATCAGGAA
TGCTGCATCGATGATTTTCGAACAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTCTCAATCAGGAA
*****
```

Tuna/koza
Lubin/Lim/koza
Bris/Lim/koza
GenBankATCC17749

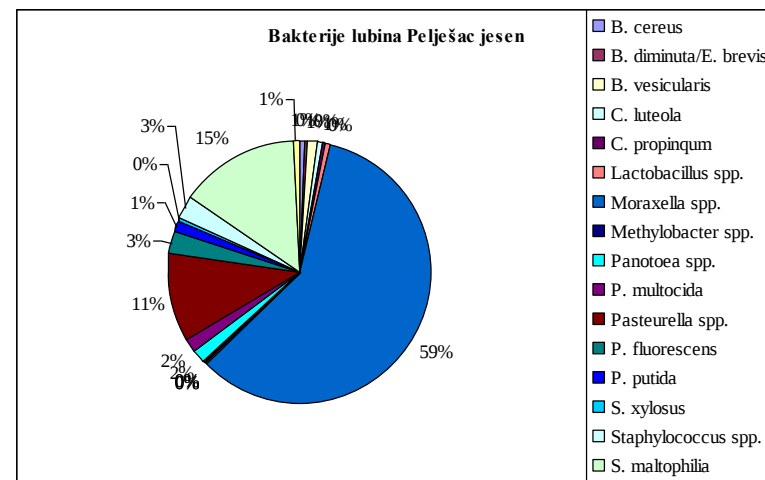
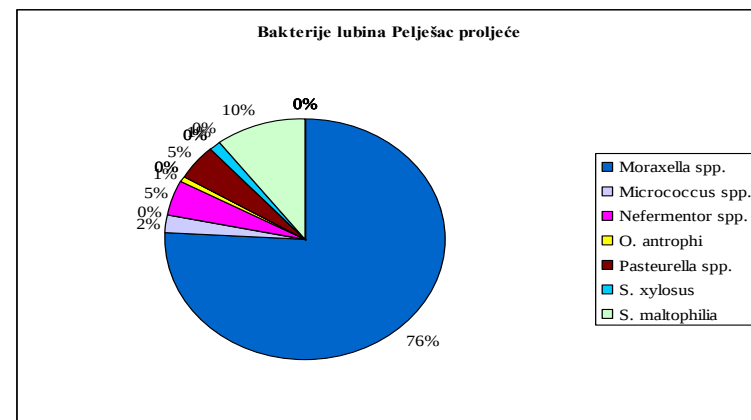
```
CTCAGACAGTTTTTACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTT
CTCAGACAGTTTTTACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTT
CTCAGACAGTTTTTACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTT
CTCAGACAGTTTTTACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTT
*****
```

Usporedba sljedova nukleotida sojeva *V. alginolyticus* izoliranih iz Hrvatske (izolati: iz kože tune i brisa kože lubina iz Limskog kanala) te soja ATCC 17749 iz GenBank-a

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

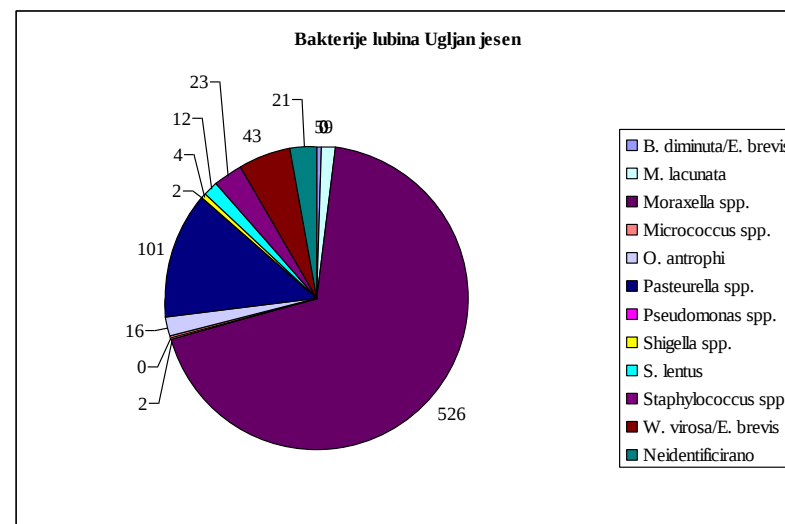
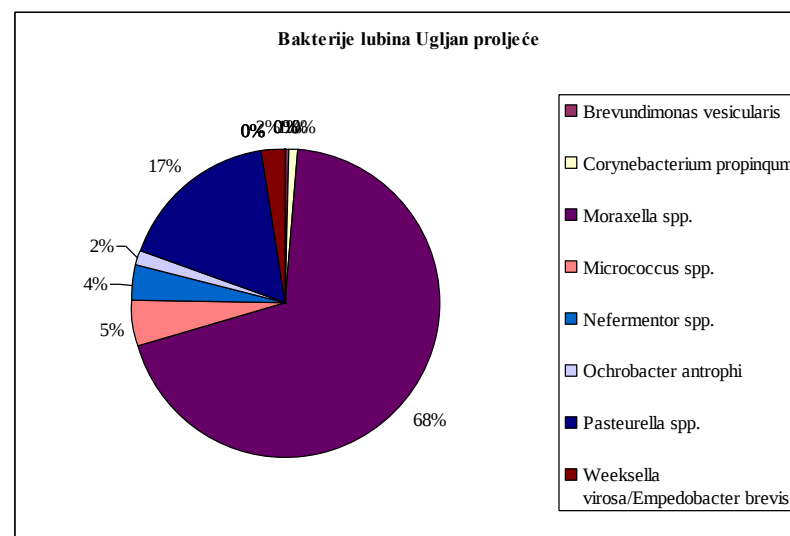
Bakterijsku populaciju lubina na lokalitetu **Pelješac** čine bakterijske vrste: *Bacillus cereus*; *Brevundimonas diminuta*/*Empedobacter brevis*; *Brevundimonas vesicularis*; *Chryseomonas luteola*; *Corynebacterium propinquum*; *Lactobacillus* spp.; *Moraxella* spp.; *Micrococcus* spp.; *Methylobacter* spp.; *Nefermentor* spp.; *Ochrobacter antrophi*; *Panotoea* spp.; *Pasteurella multocida*; *Pasteurella* spp.; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas putida*; *Staphylococcus xylosus*; *Staphylococcus* spp. i *Stenotrophomonas maltophilia*.

Gledano po sezonama proljeće i jesen postoji razlika u brojnosti zastupljenih bakterijskih vrsta, te su bakterije lubina tijekom jeseni brojnije vrstama.

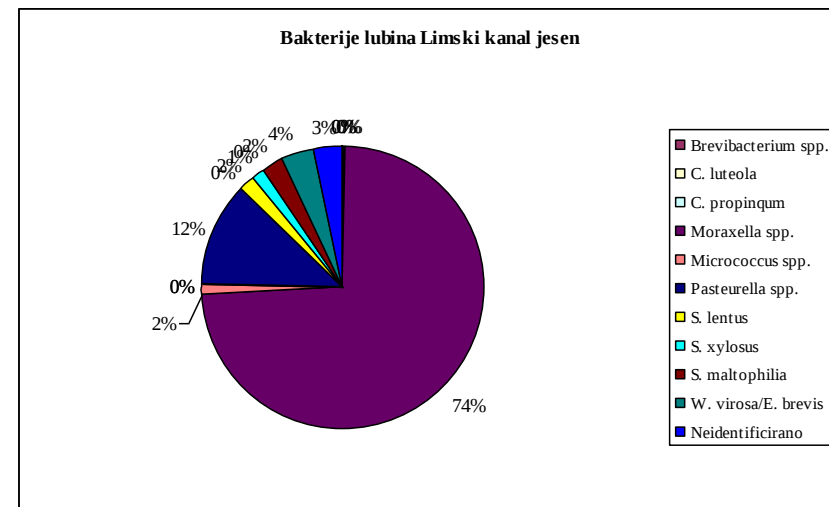


BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Bakterije lubina na lokalitetu **Ugljan** su: *Brevundimonas diminuta*/*Empedobacter brevis*; *Brevundimonas vesicularis*; *Corynebacterium propinquum*; *Moraxella lacunata*; *Moraxella* spp.; *Micrococcus* spp.; *Nefermentor* spp.; *Ochrobacter antrophi*; *Pasteurella* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Shigella* spp.; *Staphylococcus lentus*; *Staphylococcus* spp. i *Weeksella virosa*/*Empedobacter brevis*.
- Kao i na lokalitetu Pelješac i ovdje je brojnost bakterijskih vrsta u proljeće manja u odnosu na onu utvrđenu u jesenskim mjesecima.



- Na lokalitetu **Limski kanal**, u pregledanih lubina utvrđene su bakterije: *Acidobacter baumanii/calcoaceticus*; *Brevibacterium* spp.; *Chryseomonas luteola*; *Corynebacterium propinquum*; *Moraxella* spp.; *Micrococcus* spp.; *Nefermentor* spp.; *Ochrobacter anthropi*; *Pasteurella* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Staphylococcus lentus*; *Staphylococcus xylosus*; *Staphylococcus* spp.; *Stenotrophomonas maltophilia* i *Weeksellia virosa/Empedobacter brevis*.
- Iako manje izraženo u odnosu na lokalitete s uzgojem lubina južnog i srednjeg Jadrana i ovdje je brojnost bakterijskih vrsta lubina u proljeće manja nego u jesen.



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Temeljem bakterija koje su izolirane i identificirane iz **organa lubina** na sva tri lokaliteta, statistički je analizirana **razlika broja bakterija između tri lokaliteta**.
- Uspoređen je ukupni **broj izoliranih bakterija sa škrga, iz jetre, slezene i bubrega**.

Razlika ukupnog broja bakterija izoliranih iz svih organa između tri lokaliteta, statistički značajne razlike (*) s Kruskal-Wallis testom s *post-hoc* Dunnovim testom ($p < 0,05$)

Bakterijska vrsta	Pelješac	Ugljan	Limski kanal
<i>C. propinquum</i>	5	6	1
<i>Moraxella</i> sp. *	763 ^c	1122 ^b	1497 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	12	45	15
<i>Nefermentor</i> sp.	23	31	25
<i>O. antrophii</i>	4	30	20
<i>Pasteurella</i> sp.	94	206	172
<i>Staphylococcus</i> sp.	18	23	24

- Značajnost razlika je prikazana **neovisno o datumu uzorkovanja**.
- Utvrđeno je da se lubini s tri lokaliteta **razlikuju jedino po broju *Moraxella* sp. ukupno i na škragama**.

Broja bakterija izoliranih sa škrga, između lubina na tri lokaliteta, statistički značajne razlike (*) s Kruskal-Wallis testom s *post-hoc* Dunnovim testom ($p < 0,05$)

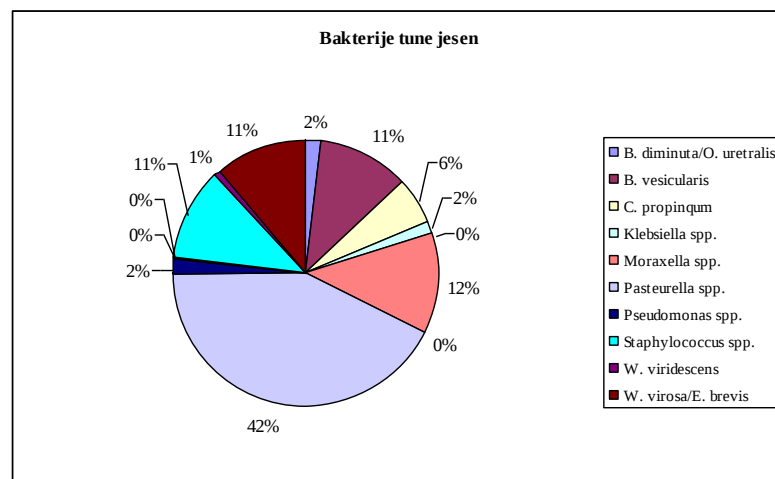
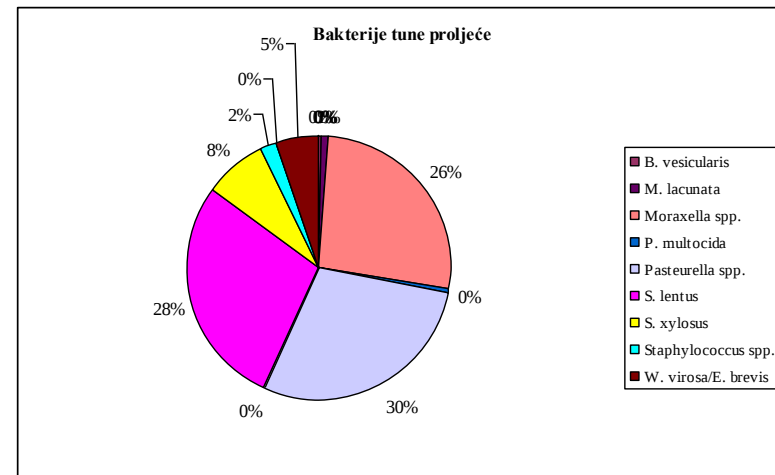
Bakterijska vrsta	Pelješac	Ugljan	Limski kanal
<i>C. propinquum</i>	5	4	1
<i>Moraxella</i> sp. *	743 ^b	1106 ^a	1414 ^a
<i>Micrococcus</i> sp.	11	39	14
<i>Nefermentor</i> sp.	13	22	15
<i>O. antrophii</i>	2	23	20
<i>Pasteurella</i> sp.	89	183	113
<i>Staphylococcus</i> sp.	17	21	17

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- **Bakterijska zajednica lubina** u Jadranu **dominatno** je sastavljena od **Gram-negativnih bakterija** (*Moraxella*, *Nefermentor*, *Ochrobacter* i *Pasteurella*), dok su manjim udjelom zastupljene Gram-pozitivne bakterijske vrste (*Corynebacterium*, *Micrococcus* i *Staphylococcus*).
- **Bakterijski patogeni**, opisani kao **uzročnici bolesti** u uzgojima **lubina** u svijetu i kod nas u ovom istraživanju **nisu utvrđeni**.
- Identificirane bakterije su utvrđene kao dio normalne mikroflore kod sardine.
- Neke od izoliranih bakterija su mogući **uzročnici bakterijskih bolesti** u riba: *Bacillus cereus*, *Klebsiella* spp., *Lactobacillus* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas putida*.
- ***Vibrio alginolyticus***, utvrđen u brisovima s kože i škrga lubina, jedna je od vrsta roda *Vibrio* izoliranih iz larvalnih stadija lubina, a isto tako je **uzročnik tipične bakterijske septicemije morskih riba**.

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Broj bakterija izoliranih iz **briso**va s kože **tune** je veći ($118 \pm 16,97$ CFU/cm²) u odnosu na broj bakterija sa škrga ($16 \pm 2,12$ CFU/cm²).
- Kao i kod lubina, u brisu s kože i škrga tune identificiran je *Vibrio alginolyticus*.
- Temeljem petogodišnjeg istraživanja bakterijska populacija tune: *Brevundimonas diminuta*/*Olighella urethralis*; *Brevundimonas vesicularis*; *Corynebacterium propinquum*; *Klebsiella* spp.; *Moraxella lacunata*; *Moraxella* spp.; *Pasteurella multocida*; *Pasteurella* spp.; *Pseudomonas* spp.; *Staphylococcus lentus*; *Staphylococcus xylosus*; *Staphylococcus* spp.; *Weissella viridescens* i *Weeksella virosa*/*Empedobacter brevis*.
- Sezonska razlika broja bakterijskih vrsta (9) u proljetnoj sezoni u odnosu na jesen (10) nije izražena kod tune.



BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Postojanje **sezonske razlike** između **bakterijskih vrsta** izoliranih u sezonama **proljeće-jesen u lubina** (Pelješac, Ugljan, Limski kanal) i **tune** (Zverinac) ispitano je uporabom Mann-Whitney testa ($p < 0,05$).
- **Statistički značajna razlika** jedino postoji na lokalitetu **Pelješac** i to u pogledu bakterijske vrste ***Stenotrophomonas maltophilia*** na **škragama**.
- **Maksimalne vrijednosti heterotrofnih bakterija iz brisa kože lubina** na lokalitetu **Pelješac, Ugljan, Limski kanal** i u **tune**, manje su od do sada **utvrđenih u srdele iz Jadrana**.
- **Bakterije kvarenja riba** uglavnom su **Gram-negativne bakterije**, a neke od njih iz rodova ***Pseudomonas*, *Moraxella* i *Vibrio***, utvrđene su u **lubina i tuna**.

BAKTERIOLOŠKA ANALIZA RIBA

- Neke od bakterija, utvrđene u jadranske srdele, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., korineformi i druge Gram-pozitivne bakterije, dio su i bakterijske zajednice uzgojenih lubina i tune.
- Od glavnih uzročnika kvarenja, *Shewanella putrefaciens* i *P. fluorescens*, u srdele iz Jadrana, u ovom istraživanju utvrđen je samo *P. fluorescens* u lubina s lokaliteta Pelješac.
- *Stenotrophomonas maltophilia*, uzročnik kvarenja ribe putem povećanja udjela kadaverina i histamina u tuna, utvrđena je u lubina s lokaliteta Pelješac i Limski kanal, dok u tune nije utvrđena.
- Histaminogene bakterije, poput roda *Klebsiella*, teško je utvrditi i izolirati te su do sada izolirane samo s kože, dok je u ovom istraživanju *Klebsiella* izolirana iz bubrega kod tune.
- Rodovi *Micrococcus* i *Staphylococcus*, s poznatom litičkom aktivnošću, dio su bakterijske populacije u lubina i tune.
- *Weisella*, poznati uzročnik kvarenja mesa, izolirana je i identificirana iz bubrega tune.



VIROLOŠKA ANALIZA RIBA

- **Rezultat virološke pretrage** na sve analizirane viruse **postupkom RT-PCR** je bio **negativan**



ZAKLJUČAK

- Prvi put u Hrvatskoj i svijetu provedeno je sustavno istraživanje zdravstveno stanje populacije lubina i tuna u uzgoju, te bakterioloških svojstava mora na uzgajalištima u Jadranu.
- Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara analiziranih uzoraka tijekom ovog istraživanja zadovoljavaju potrebe u uzgoju lubina i tune, uz očitovanje sezonskih razlika u svim parametrima fizikalno-kemijske kvalitete vode na istraživanim lokalitetima.
- Istraživanja mikrobioloških svojstava mora pokazala su da je broj heterotrofnih bakterija utvrđen tijekom istraživanja bio veći u jesenjem u odnosu na proljetni period.
- Najveći broj heterotrofnih bakterija bio je u sjevernom Jadranu-Limski kanal (turističko okružje, plovni put, geološko-hidrološke posebnosti zaljeva).
- Između lokaliteta s uzgojem lubina nema statistički značajne razlike u broju *E. coli*, *Vibrio* spp., ukupnih koliforma i enterokoka. Statističkom obradom rezultata utvrđena je pozitivna korelacija broja *Vibrio* spp. s brojem ukupnih koliforma, *E. coli* i enterokoka u moru.
- Veće vrijednosti fekalnih indikatora na tovilištu tuna, u odnosu na literaturno dostupne podatke, u svezi je s neadekvatnom hranidbom tuna sa svježom i odmrznutom ribom koja privlači kolonije galebova, a koji utječu na mikrobiološku kvalitetu vode na i oko uzgajališta.

- Utvrđeno je kako povećanje broja heterotrofnih bakterija u moru, prati povećanje broja heterotrofnih bakterija u brisovima s kože i škrga, kao i u broju izoliranih bakterija iz uzoraka organa riba.
- Sukladno najvećem broju heterotrofnih bakterija u vodi na lokalitetu Limski kanal, najveći broj heterotrofnih bakterija u brisu s kože i škrga utvrđen je u lubina na istom lokalitetu.
- Broj heterotrofnih bakterija iz brisova s kože lubina i tune je veći u odnosu na broj heterotrofnih bakterija sa škrga.
- Istraživanje bakterijske populacije u lubina, provedeno na 360 lubina iz uzgoja u Jadranu, pokazalo je raznolikost bakterijskih vrsta, pri čemu su Gram-negativne bakterije dominantno zastupljene.
- Većina Gram-negativnih bakterija (neovisno o lokalitetu uzgoja) izoliranih iz uzoraka lubina su bile *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Nefermentor* spp. i *Ochrobacter anthropi*.
- Većina izoliranih Gram-pozitivnih bakterija su bile *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. i *Corynebacterium propinquum*.
- Bakterije izolirane u tuna su: *Brevundimonas* spp., *Corynebacterium propinquum*, *Klebsiella* spp., *Moraxella* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp., *Weissella viridescens* i *Weeksella virosa*/*Empedobacter brevis*.
- Mnoge od identificiranih bakterija su ubikvitarne i uvjetno patogene u morskom ekosustavu.

- 
- Potencijalno patogeni mikroorganizmi utvrđeni u lubina i tuna su: *Bacillus cereus*, *Lactobacillus* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella* spp. i *Vibrio alginolyticus*.
 - Zabilježena je prisutnost bakterija kvarenja u lubina i tuna, iz rodova *Pseudomonas*, *Moraxella* i *Vibrio*.
 - Histaminogena vrsta iz roda *Klebsiella*, koja je prema literaturnim podacima do sada izolirana samo s kože, tijekom ovog istraživanja je izolirana iz bubrega tune.
 - Iz brisova s kože i škrge lubina i tuna izolirana je i molekularno identificirana, a sekvencioniranjem potvrđena bakterija *Vibrio alginolyticus*.
 - Izolirane bakterije su opasnost po zdravlje riba, ali i ljudi (imunodeficijentnih osoba), osobito djelatnika na uzgajalištima koji su u izravnom doticaju s ribom.
 - Nađeni paraziti kod lubina, ali i divljih riba izvan kaveza, predstavljaju potencijalnu opasnost za uzgoj u smislu prinosa, dok su drugi opasni i po zdravlje ljudi.
 - Virološkom pretragom nisu nađeni uzročnici bolesti.



Zahvaljujem
na
pažnji

Ovo istraživanje financirano je u sklopu nacionalnog programa “Jadran”