Bakterije roda Vibrio iz lubina (Dicentrarchus labrax Linnaeus, 1758) uzgojenih u istočnom Jadranu

Veić, Tina

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:740993

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Tina Veić

BAKTERIJE RODA *VIBRIO* IZ LUBINA (*DICENTRARCHUS LABRAX*, LINNAEUS, 1758) UZGOJENIH U ISTOČNOM JADRANU

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Ovaj rad, izrađen na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Davora Zanelle i u Laboratoriju za patologiju riba Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu pod vodstvom dr. sc. Snježane Zrnčić, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja Magistra ekologije i zaštite prirode.

Veliko hvala mojoj mentorici Snježani Zrnčić koja me primila u laboratorij za patologiju riba i strpljivo mi pokazala sve što je bilo potrebno da uspješno odradim i napišem ovaj diplomski rad.

Također hvala i mom drugom mentoru Davoru Zanelli koji mi je omogućio izradu diplomskog rada na Veterinarskom institutu te na vremenu i trudu koji je posvetio da mi pomogne u pisanju diplomskog rada.

Zahvaljujem se i dr.sc. Draženu Oraiću na ustupljenim materijalima za pisanje diplomskog rada, također i dr.sc. Ivoni Mladineo koja mi je ustupila podatke za molekularnu identifikaciju bakterija *Vibrio harveyi.*

Svim mojim prijateljima jedno veliko hvala jer su uvijek bili tu.

Naposlijetku hvala mojoj obitelji na podršci i razumijevanju koje su mi pružili sve ove godine školovanja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

BAKTERIJE RODA *VIBRIO* IZ LUBINA (*DICENTRARCHUS LABRAX*, LINNAEUS, 1758) UZGOJENIH U ISTOČNOM JADRANU

Tina Veić

Rooseveltov trg 6, 1000 Zagreb, Hrvatska

Zbog pravovremenog otkrivanja vibrioza uzgajanog lubina provedeno je istraživanje sa ciljem određivanja najvažnijih uzgojnih, morfoloških i biokemijskih karakteristika bakterija vrsta *Vibrio anguillarum* i *Vibrio harveyi*. Pri izradi diplomskog rada korištene su standardne bakteriološke metode, a za povrđivanje pripadnosti izolirane DNA bakterijama *V. anguillarum* i *V. harveyi* provedena je i molekularna identifikacija bakterija lančanom reakcijom polimeraze. Iz oboljelih riba izdvojeno je 6 sojeva *V. anguillarum* i 6 sojeva *V. harveyi*, te su njihove morfološke i biokemijske karakteristike međusobno uspoređene. Testirana je osjetljivost bakterija na pojedina antibakterijska svojstva sa ciljem liječenja i iskorjenjivanja vibrioze uzgajanog lubina. Dobiveni rezultati pokazuju da se vibrioza najčešće javlja u akutnom do subakutnom tijeku koji je karakteriziran krvarenjima oko usta, po osnovama peraja i perianalnoj regiji. Utvrđivanjem biokemijskih svojstava uočeno je da bakterijski sojevi *V. harveyi* za razliku od *V. anguillarum* nemaju sposobnost iskorištavanja β galaktozidaze, razgradnje aminokiseline triptofan u indol, također nemaju sposobnost razgradnje želatine, te ne proizvode nitrate i acetoin. Dokazano je da su svi ispitivani sojevi osjetljivi do umjereno osjetljivi na niske koncentracije flumekvina, oksitetraciklina, oksolinske kiseline i trimetoprim-sulfametoksazola. Ovo istraživanje je pružilo osnovu za bržu dijagnostiku vibrioza i postavilo smjernice za uspješno i pravovremeno liječenje.

(38 stranica, 5 slika, 11 tablica, 53 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: lubin, vibrioza

Voditelj:dr. sc. Davor Zanella, izv. prof.

Suvoditelj:dr. sc. Snježana Zrnčić

Ocijenjitelji:

Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

CHARACTERIAZTION OF *VIBRIO* SPECIES ISOLATED FROM EUROPEAN SEA BASS (*DICENTRARHUS LABRAX*, LINNAEUS, 1758) FARMED ON THE EASTERN ADRIATIC SEA

Tina Veić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The aim of this study was to identify the most important growing, morphological and biochemical characteristics of two bacteria from the genus *Vibrio*; *Vibrio anguillarum* and *Vibrio harveyi* for early detection of vibriosis in farmed sea bass. During the studies carried out for this thesis we used standard bacteriological methods, but in order to confirm that isolated DNA belonged to bacteria *V. anguillarum* and *V. harveyi* we also performed a molecular identification using the polymerase chain reaction. From sick fish we isolated 6 strains of *V. anguillarum* and 6 strains of *V. harveyi*, and we compared their morphological and biochemical characteristics. To create the basis for successful treatment and prevention of vibriosis in farmed sea bass, we tested a sensitivity of each isolated bacteria to a certain antibacterial substance. Results showed that most often the disease appears in its acute or subacute course, characterised by hemorrhages around the mouth, on the fins basis and perianal region. Comparing biochemical properties of isolated bacterial strains of *V. harveyi* to *V.anguillarum* we concluded that the first ones do not have abillity to utilize β galactosidase, to decompose tryptophan into indole, have no mechanism of degradation of gelatine and do not produce nitrates and acetoin. It is proved that all the strains are sensitive or moderately sensitive to low concentrations of flumequine, oxytetracycline, oxolinic acid and trimethoprim-sulfamethoxazole. This study provided basis for faster diagnosis and successful treatment of vibriosis.

(38 pages, 5 figures, 11 tables, 53 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: sea bass, vibriosis

Main supervisor: dr. sc. Davor Zanella, Assistant Professor

Assistant supervisor: dr.sc. Snježana Zrnčić

Reviewers:

Thesis accepted:

SADRŽAJ:

1. UVOD.....1

1.1. Kavezni uzgoj lubina..... 2

1.2. Bolesti riba uzrokovane bakterijama roda *Vibrio*..... 4

1.3.Vibrioza uzgajanog lubina 6

1.3.1. Uvjeti okoliša 6

1.3.2.Mikrobiološke osobitosti bakterija roda *Vibrio*..... 7

1.3.3.Izdvajanje, uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva bakterije *Vibrio anguillarum* 7

1.3.4. Izdvajanje, uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva bakterije *Vibrio harveyi* 8

1.3.5. Dijagnostika bakterija roda Vibrio (*V. anguillarum i V. harveyi*) molekularnim metodama.....8

1.4. Suzbijanje i liječenje vibrioze 9

1.5. Cilj istraživanja 11

2. MATERIJALI I METODE 12

2.1. Vanjski pregled lubina.....12

2.2. Uzimanje materijala za bakteriološke pretrage.....12

2.3. Hranjive podloge.....12

2.4. Identifikacija izdvojenih sojeva.....13

2.4.1. Morfološke karakteristike kolonija.....13

2.4.2. Biokemijska identifikacija izdvojenih sojeva.....13

2.4.3. Molekularna identifikacija izdvojenih bakterijskih sojeva *V. anguillarum*.....16

2.4.4. Molekularna identifikacija izdvojenih bakterijskih sojeva *V. harveyi*.....16

3. REZULTATI.....18

3.1. Vanjski izgled oboljelih riba.....18

3.2. Rezultati bakterioloških istraživanja.....18

3.2.1. Uzgojna svojstva izdvojenih *Vibrio* vrsta.....18

3.2.2. Prikaz morfoloških i biokemijskih svojstava izdvojenih bakterijskih sojeva *V. anguillaru*m.....19

3.2.3. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *V.anguillarum* na antibakterijska sredstva disk difuzijskom metodom.....22

3.2.4. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *V.anguillarum* na antibakterijska sredstva određena metodom minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC).....22

3.2.5. Prikaz morfoloških i biokemijskih svojstava izdvojenih bakterijskih sojeva *V. harveyi*.....23

3.2.6. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *V.harveyi* na antibakterijska sredstva disk difuzijskom metodom……....…….....26

3.2.7. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *V.harveyi* na antibakterijska sredstva određena metodom minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC).....26

3.2.8. Rezultati molekularne identifikacije izdvojenih bakterijskih sojeva *V.anguillarum*.....27

3.2.9. Rezultati molekularne identifikacije izdvojenih bakterijskih sojeva *V.harveyi*.....28

4.RASPRAVA.....29

5. ZAKLJUČAK.....32

6. LITERATURA.....33

1. UVOD

Uzgoj morskih organizama na istočnoj obali Jadrana ima dugu tradiciju. Prvi zapisi o marikulturi datiraju još iz 19. stoljeća. Početci marikulture u Hrvatskoj se mogu prepoznati u posebno dizajniranim ribljim bazenima koji su se nalazili u dvorištima kuća plemićkih obitelji. Lorini (1903) piše o 116 bazena na istočnoj obali Jadrana, govoreći o njihovom lošem stanju i potrebi za većim brojem takvih bazena. Procvat marikulture u Hrvatskoj dogodio se 70-ih godina prošlog stoljeća, zahvaljujući istraživanjima pojedinih laboratorija i instituta u području marikulture. Morović (1972) je objavio rad o biologiji lubina (*Dicentrarchus labrax,* Linnaeus, 1758) te naglasio mogućnost njegovog uzgoja. Teskeredžić i Fijan (1977) su izvijestili da je prvi kavez s ribom u Jadranu postavljen 1974. godine na otoku Cresu. Nedugo nakon postavljanja prvog kaveza u more započela je gradnja mrijestilišta za lubina i komarču u Ninu, čime je započet komercijalni uzgoj lubina i komarče. Istodobno se slično uzgajalište osnovalo u Istri. Do kraja stoljeća, uz ova dva pionira uzgoja u marikulturi, osnovano je više manjih obiteljskih uzgajališta s proizvodnjom od oko 50-tak tona (Zrnčić 1999).

Prema podacima dostupnim u Nacionalnom strateškom planu razvoja akvakulture 2014-2020. marikultura u Hrvatskoj se temelji na uzgoju bijele ribe, plave ribe (tuna) i školjkaša. U 2014. godini ukupna proizvodnja u marikulturi dosegla je 9 960 tona, od čega je uzgojeno 3 215 t lubina (*Dicentrarhus labrax*), 3 655 t komarče (*Sparus aurata*), 60 t hame (*Argyrosomus regius*), 7 t zubaca (*Dentex dentex*), 13 t pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) u moru, 714 t dagnje (*Mytilus galoprovincialis*), 32 t kamenica (*Ostrea edulis*), te 2 224 t atlantske plavoperajne tune (*Tunnus thynnus*) (Ministarstvo poljoprivrede 2014).

Kao i u drugim animalnim proizvodnjama, daljnji uspješni razvitak marikulture ugrožavaju bolesti koje su posljedica intenzifikacije tehnoloških procesa. Intenzivni uzgoj u cjelini povećava broj primljivih domadara, tako da je rizik potencijalno brzog širenja bolesti izuzetno visok (Katavić 2006). Bolesti u marikulturi, uz povećani broj uginulih jedniki u uzgoju, uzrokuju smanjeni prirast i iskorištavanje hrane, a samim time utječu na ekonomske učinke proizvodnog procesa.

U mediteranskoj regiji su bakterijske bolesti, a posebice vibrioze, uzrokovane vrstama roda *Vibrio* najčešći limitirajući čimbenik u uzgoju. U Hrvatskoj gubitci uzokovani vrstama

Vibrio anguillarum serotip O1 i *Vibrio harveyi* dosežu od 20 do 50%. Kako bi se pravovremeno spriječile ekonomske štete izazvane pojavom bolesti važno je poznavati uvjete u kojima se bolesti javljaju, promjene koje uzrokuje u oboljelom organizmu i svojstva uzročnika bolesti. Poznavanje navedenih činjenica postavlja osnovu za brzu i sigurnu dijagnostiku, mjere suzbijanja i spriječavanja pojave bolesti.

1.1. Kavezni uzgoj lubina

Duljina istočne obale Jadranskog mora iznosi preko 6 000 km zajedno s otocima, otočićima i grebenima. Zbog svojih geomorfoloških osobina obiluje zaljevima, uvalama i kanalima zaštićenim otočnim nizovima od snažnih naleta valova i vjetrova i estuarijima kao vrlo produktivnim sredinama, što pruža realne mogućnosti za uzgoj različitih vrsta morskih organizama (Katavić 1988). Da bi zadovoljili zahtjevima za kavezni uzgoj ribe pogodni lokaliteti moraju imati preko 15 metara dubine, aktivnu izmjenu vodenih masa, zasićenost kisikom i temperaturu koja se zimi ne spušta ispod 8 do 10 ^{o}C. Osim toga, važno je da u blizini ne bude izvora zagađenja (Zrnčić 1999).

Lubin (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758), gastronomski izrazito cijenjena riba, se prva počela uzgajati upravo na istočnoj obali Jadrana. Prva tvrtka koja je započela s umjetnim uzgojem mlađi lubina u Hrvatskoj, ali i na Mediteranu, bio je Cenmar. 1984. godine, nakon završetka gradnje mrijestilišta u Ninu, proizvedena je prva mlađ lubina u Hrvatskoj. Danas, uz industrijsku i modernu proizvodnju u Cromarisu, sljedniku Cenmara, postoji još nekoliko malih mrijestilišta za mlađ lubina, a konzumna riba se uzgaja na tridesetak uzgajališta bijele ribe različitih kapaciteta; od 50-tak do nekoliko tisuća tona (Ministarstvo poljoprivrede 2015).

Marikultura, kao kontrolirani uzgoj morskih organizama, podrazumijeva nadzor cjelovitog biološkog ciklusa određene vrste. Prema Kataviću (1995), biološki ciklus lubina obuhvaća (1) održavanje matičnog jata i inducirani mrijest, (2) inkubaciju ikre, (3) uzgoj ličinačkih stadija i proizvodnju mlađi sposobne za nasađivanje u kaveze, te (4) kavezni uzgoj koji se odvija kao „predrast“ tijekom prve godine i „komercijalna proizvodnja“ tijekom druge i treće godine uzgoja. U Hrvatskoj se za uzgoj lubina koriste uzobalni kavezi promjera od 15 do 30 metara i dubine do 15 metara (Katavić 2006).

Prije kontroliranog uzgoja lubina mora se formirati matično jato ulovom matica izvan sezone mrijesta. Optimalna starost ženki lubina je između 5 i 8 godina, dok je za mužjaka optimalna starost od 2 do 4 godine (FAO 2016). Nakon njihove aklimatizacije moguće je potpomoći (inducirati) gametogenezu u potpuno kontroliranim uvjetima i dobivati zrele rasplodne stanice tijekom cijele godine. Gametogeneza, odnosno zrenje muških i ženskih spolnih stanica, jednako tako ovulacija i sam mrijest regulirani su preciznim hormonalnim mehanizmima (Katavić 2006). Kada se ženke izmrijeste, ikra pluta po površini te se sakuplja sifoniranjem i potom stavlja na inkubaciju u bazene pri temperaturi od 16°C (Zrnčić 1999). Nakon 4 do 7 dana dolazi do valjenja ličinki. Ličinke lubina u svom ranom poslije-natalnom razvitku prolaze kroz nekoliko razvojnih faza, od kojih je svaka vrsta obilježena drugačijim karakteristikama rasta, preferencijama u hranidbi, kao i posve drugačijim ponašanjem (Katavić 2006). U dobi od oko 26 dana, kada su ličinke lubina duge oko 1 cm započinje navikavanje na inertnu hranu, a u starosti od 50 do 90 dana ribice se selekcioniraju i premještaju u veće bazene. U potonjima se uzgajaju do veličine od oko 1 do 2 grama, a potom se premještaju na uzgoj i tov u kavezima (Zrnčić 1999). Preporuka je nasaditi mlađ lubina u razdoblju travnja i svibnja, budući da je temperatura mora povoljnija, a i prirast izrazito ovisi o temperaturi mora kroz ljetno razdoblje (Treer i sur. 1995).

Trajanje uzgojnog ciklusa najviše ovisi o kvaliteti mlađi, uzgojnom lokalitetu, pravilnoj hranidbi, te o dužini trajanja uzgojne sezone (Treer i sur. 1995). U Hrvatskoj uzgojni ciklus lubina traje od 18 do 24 mjeseca. Lubin kao karnivorna vrsta zahtijeva hranu s visokim udjelom proteina. U komercijalnom uzgoju hrani se ekstrudiranom hranom prilagođenom njegovim nutritivnim potrebama (Bavčević i Lovrinov 2006).

Tijekom uzgoja lubina do komercijalne veličine treba posvetiti pozornost uzgojnoj gustoći, prirastu i zdravstvenom stanju (Treer i sur. 1995). Uzgojna gustoća na početku iznosi od 0,1 do 0,4 kg/m^3, te je u prvoj godini mlađ izuzetno osjetljiva na uzgojne promjene i češće obolijeva. Prema Kataviću (2006) stopa preživljavanja od mlađi do konzumne ribe je 80 do 85% , a gustoća nasada od 10 do 20 kg/m^3.

Osim ribe, treba kontrolirati kaveze i mreže u kojima je riba smještena. Čistoća mreže je osnovni uvjet dobre cirkulacije morske vode, a time i kvalitete životnih uvjeta ribe. Na dnu kaveza se obično zadržavaju ostaci hrane te uginula riba, stoga je nužno i to pregledavati.

Ovisno o obraštaju, mreže je potrebno mijenjati svaka dva tjedna, a uginulu ribu treba vaditi i neškodljivo uklanjati svakodnevno (Zrnčić 1999).

1.2. Bolesti riba uzrokovane bakterijama roda *Vibrio*

Bolesti i poremećaji u različitim fazama životnog ciklusa morskih riba znatno utječu na rast i preživljavanje, a time i na ekonomske učinke proizvodnog programa (Katavić 2006). Bolesti uzrokovane bakterijama iz roda *Vibrio* nazivaju se vibriozama i predstavljaju jednu od najčešćih bolesti morskih riba.

Vibrioza, prvotno poznata pod nazivom «crvena kuga» je prvi put opisana kod jegulje, a uzročnika je opisao Canestrini 1893. godine (cit po: Hofer 1904) i nazvao ga je *Bacillus anguillarum*. Nedugo nakon istraživanja ove bolesti u jegulja u Baltičkom moru, Bergman je 1909. godine uzročnika preimenovao u *Vibrio anguillarum*. Osim jegulje za bolest su primljive pastrva, losos, bakalar, haringa, lubin, gof, cipal te plosnatice (list, plat, iverak) (Strunjak- Perović i sur. 1997). Vibrioza se javlja u gotovo svim zemljama svijeta.

Tijek vibrioze može biti perakutan, akutan i subakutan do kroničan (Le Breton 1996). Kod perakutnog oblika znakovi bolesti nisu izraženi, ali često se javljaju iznenadni i vrlo visoki mortaliteti. Najčešći je akutni do subakutni tijek bolesti kod kojeg gubitci u kaveznom uzgoju dosežu i do 40% od oboljele populacije. Ovaj oblik bolesti javlja se u proljeće ili jesen kada temperatura mora raste odnosno pada između 15 i 20 ^{o}C. Oboljela riba je tamno pigmentirana, ne uzima hranu i pliva odvojeno od plova. Klinička je slika karakterizirana krvarenjima oko usta, egzoftalmijom, krvarenjima po osnovama peraja i perianalnoj regiji.

Kronični se oblik obično javlja zimi, pri niskim temperaturama mora i karakterizira se nekrotičnim lezijama u abdominalnoj muskulaturi, tamnom pigmentacijom, a ponekad i egzoftalmijom (Oraić i sur. 1996).

Do sada je opisano 63 vrste roda *Vibrio* i zahvaljujući napretku molekularne biologije iz godine u godinu se otkrivaju nove vrste (Thompson i sur. 2004). Osim *V. anguillarum* opisani su i drugi uzročnici bolesti iz roda *Vibrio* kao što su *V. ordalii*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. salmonicida*, *V. cholerae*, *V. vulnificus*, *V. damsela*, *V. carcahriae*. Prema

dosadašnjim istraživanjima smatra se da su *V.anguillarum, V. ordalii, V. salmonicida, V.harveyi* te *V. vulnificus* patogeni koji uzrokuju najveće gubitke u akvakulturi diljem svijeta (Toranzo i sur. 2005; Sandlund i sur. 2010; Sitjà- Bobadilla i sur. 2014).

Vibrio ordalii, dugo vremena smatran biotipom II *V. anguillarum*, uglavnom se javlja u Sjevernoj Americi, Japanu i Australiji, te uzrokuje vibrioze kod salmonidnih vrsta (Austin i Austin 2012). Bolest uzrokovana *V. ordali* može se opisati kao hemoragična septikemija, ali postoje neke razlike u patologiji bolesti u odnosu na hemoragičnu septikemiju uzrokovanu *V.anguillarum*. Kod pacifičkog lososa, formiraju se mikrokolonije u skeletnoj i mišićnoj muskulaturi, škržnom tkivu, te prednjim i stražnjim dijelovima probavnog sustava (Ransom i sur. 1984).

Hemoragična septikemija japanske jegulje (*Anguilla anguilla*) je opisana u razdoblju od 1975. do 1977. godine, kada su zabilježene epidemije ove bolesti na nekoliko lokaliteta. Karakterizirana je krvarenjima po koži, posebice repu, perajama i dorzalnoj regiji. U uznapredovalom stadiju bolesti uočljive su promjene u probavnom sustavu, škrgama, srcu, jetri i bubregu (Miyazaki i sur. 1977). Tison i suradnici (1982) reklasificirali su bakterijsku vrstu kao *Vibrio vulnificus*. Tijekom 2005. godine, *V. vulnificus* je uzrokovao visoki mortalitet kod uzgajane strijele modrulje (*Trachinotus ovatus*) u Kini (Li i sur. 2006). *V. vulnificus* biotip 2, izdvojen je iz jegulja uzgajanih u Španjolskoj i Danskoj. Prema istraživanju Fouz i sur. (2006) smatra se da ova bakterija kod jegulja uzrokuje izrazito jaka krvarenja i nekrozu tkiva.

Sljedeći predstavnik roda *Vibrio* uzročnik bolesti riba je *Vibrio harveyi.* Jedna je od najčešće izoliranih *Vibrio* vrsta (Pujalte i sur. 2003) i uzrokuje ogromne ekonomske gubitke u marikulturi. Kod oboljelih riba uočavaju se ulcerozne promjene na koži i lezije u jetri dok su Liu i sur. (2003) kod oboljele crvene hame (*Sciaenops ocellatus*) zabilježili gastroenteritis i natečeno crijevo ispunjeno žutom tekućinom.

„Hitra disease“ ili hladnovodna vibrioza javlja se u zimskim mjesecima, kada temperatura mora ne prelazi 10°C kod salmonidnih vrsta riba. Uzročnik bolesti je *Vibrio salmonicida*, a prvi put je opisana u uzgojima atlantskog lososa (*Salmo salar*) i kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) u Norveškoj sedamdesetih godina (Egidius i sur. 1981).

Karakterizirana je hemoragičnom septikemijom, ribe nekoordinirano plivaju i ne uzimaju hranu. Istraživanja su pokazala da oboljela riba izlučuje uzročnika fecesom koji je prisutan u sedimentu dna nekoliko mjeseci nakon epizootije hladnovodne vibrioze (Enger i sur. 1989).

U marikulturi Hrvatske najveće ekonomske gubitke uzrokuju *V. angullarum* i *V. harveyi*. *V. anguillarum* serotip O1 je najčešći uzročnik vibrioze uzgajanog lubina u Hrvatskoj, ali i u ostalim mediteranskim zemljama (Zrnčić i sur. 2013). Posljednih nekoliko godina, sve veće zdravstvene probleme izaziva i *V. harveyi*, koji je do sada smatran patogenom ličinki nekih vrsta rakova, ali ga sve češće nalazimo i kod ostalih morskih organizama. Stoga je u ovom radu naglasak upravo na ove dvije vrste bakterija iz roda *Vibrio*.

1.3. Vibrioze kod uzgajanog lubina

1.3.1. Uvjeti okoliša

Kod riba uzgajanih u optimalnim uvjetima rijetko se javljaju bolesti uzrokovane mikroorganizmima. Međutim, kada su ribe izložene nepovoljnjim meteorološkim uvjetima, stresu uzrokovanom manipulacijom zbog tehnološkog procesa uzgoja, dolazi do pojave bolesti. Važni faktori koji potiču nastanak vibrioza su: kemijski stres (kvaliteta morske vode, onečišćenje, prehrana), biološki stres (gustoća nasada, prisutnost drugih mikro i makro organizama) te fizički stres (temperatura) (Frans i sur. 2011).

Vibrioze se najčešće javljaju u područjima s mekim dnom, slabom izmjenom vode i s visokim organskim opterećenjem akvatorija (Hjeltnes i Roberts 1993). Pojave bolesti su česte nakon pada otopljene koncentracije kisika u vodenom stupcu, te stresa zbog gustog nasada i loših higijenskih uvjeta (Zrnčić 1999). Na hrvatskim uzgajalištima lubina pojava bolesti je uobičajena u proljeće kada temperatura mora naglo raste te u jesen pri naglom padu temperature. Istražujući okolišne uvjete koji prethode vibriozama posljednjih dvadeset godina, zaključeno je da je došlo do promjena. Do 2004. godine akutni oblik vibrioze bi se javljao samo tijekom naglog povećanja temperaturi mora sa 17 °C na 19 °C u proljeće, odnosno prilikom naglog pada temperature u jesen. Posljednih nekoliko godina akutni oblik bolesti se pojavljuje i ljeti uslijed nagle promjene vremena kao što je jaka bura koja u kratkom vremenu snizi tempreaturu mora, dok zimi dolazi do pojave kroničnog oblika bolesti uzrokovanog

miješanom infekcijom bakterijama *V.anguillarum* i *Tenacibaculum maritimum* (Haenen i sur. 2014).

Vibrio harveyi se javlja ljeti pri temperaturama višim od 20 ^{o}C, a karakteriziran je krvarenjima po glavi, osnovama peraja i plitkim lezijama kože. U kroničnom tijeku bolesti uočava se nervni sindrom manifestiran nekoordiniranim plivanjem (Čolak i Zrnčić 2016).

1.3.2. Mikrobiološke osobitosti bakterija roda *Vibrio*

Bakterije roda *Vibrio* su Gram-negativni ravni ili blago zakrivljeni štapići, debljine od 0,3 do 1,0 μm i duljine od 1,0 do 3,5 μm. Ne tvore spore, pokreću se polarnom flagelom ili su nepokretni. Većina vrsta roda *Vibrio* dobro raste na podlogama s morskom vodom jer ioni natrija stimuliraju njihov rast.

Sve bakterije unutar ovog roda su fakultativni anaerobi, kemoorganotrofni i većina ih je oksidaza pozitivnih. Fermentiraju ugljikohidrate uz tvorbu kiselina, ali ne i plina. Ove bakterije rastu na neselektivnim podlogama, te su im kolonije glatke, konveksne i sivkasto-bijeličaste.

Pojedine vrste roda *Vibrio* mogu se diferencirati na temelju određivanja biokemijskih svojstava kao što su bujanje na kompleksnoj čvrstoj podlozi, tvorba enzima arginin dihidrolaze, sposobnost redukcije nitrata u nitrite, Voges Proskauer reakcija (tvorba acetoina), rast pri 40°C, korištenje saharoze, L-arabinoze i D-sorbita (Zrnčić 1999).

1.3.3 Izdvajanje, uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva bakterije *Vibrio anguillarum*

Materijal za bakteriološku pretragu se uzorkuje iz bubrega i tkiva s difuznim lezijama moribundnih riba. U slučajevima postojanja septikemije materijal se uzorkuje i iz jetre, slezene, srca i krvi (Zrnčić 1999).

Za primarno izdvajanje bakterije *Vibrio anguillarum* najčešće se koriste neselektivne hranjive podloge kao što su triptozni soja agar (engl. Trypticase soy agar-TSA), Marine agar (MA) s relativno malim sadržajem hranjivih tvari ali s dvostrukim količinama glavnih mineralnih komponenti morske vode. Za identifikaciju *Vibrio* vrsta također se koristi i tiosulfat-citrat žučne soli-saharoza agar (engl. Thiosulphate citrate bile salt sucrose-TCBS). TCBS (Kobayashi i sur.) je razvijen 1963. godine i pokazao se vrlo korisnim za selektivno

izdvajanje uzročnika bolesti, no također inhibira rast nekih vibrija, kao što je *V.ordalii*. Vrste koje fermentiraju saharozu rastu na ovoj podlozi kao žute kolonije za razliku od onih koje ne fermentiraju te su zelene boje (Zrnčić 1999).

Kolonije svježih kultura bakterija *V. anguillarum* su žućkaste boje, okrugle ili blago konveksne, pravilne, blago svjetlucave. Ove bakterije tvore arginin dihidrolazu, katalazu, β-galaktozidazu, indol i oksidazu, ali ne i H_2S, lizin dekarboksilazu, ornitin dekarboksilazu, fenilalanin i ureazu. Kao i većina ostalih vibrija, pokazuje osjetljivost na vibriostat O/129, stvara acetoin (pozitivna Voges Proskauer reakcija) ali ne i metilensko crvenilo. Nadalje, razgrađuje želatinu, DNA, lipide, škrob ali ne i eskulin. Reducira nitrite. Raste na temperaturi od 15 do 37^{o}C, i pri salinitetu od 0,3 do 3,0%. Pri salinitetu 0 i 7% ne raste. Koristi citrate, malonat i tartarat. Osim toga, stvara kiseline od arabinoze, celobioze, galaktoze, glicerola, maltoze, manitola, sorbitola, saharoze i trehaloze, ali ne i iz adonitola, dulcitola, eritritola, inozitola, laktoze, melobioze, rafinoze, ramnoze, salicina ili ksiloze (Austin i Austin 2012).

1.3.4. Izdvajanje, uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva bakterije *Vibrio harveyi*

Za primarno izdvajanje bakterije *Vibrio harveyi* uzimaju se uzorci bubrega i jetre te se inokuliraju na TSA podlogu obogaćenu s 1,5 % NaCl. Uglavnom za rast ovih bakterija koristi se TSA podloga, MacConkey agar, TCSB i citofaga agar, uz inkubaciju pri temperaturi od 25-35°C tijekom 24-48 sati (Grimes i sur. 1984).

Bakterijska kultura uključuje pleomorfne, Gram-negativne štapiće, koji se pokreću pomoću polarnog i/ili lateralnog biča. Proizvodi katalazu, indol, lizin i ornitin dekarboksilazu i oksidazu, ali ne i arginin dihidrolazu. Za razliku od *V.anguillarum,* Voges Proskauer reakcija je kod *V. harveyi* negativna, odnosno ne proizvode acetoin. Reducira nitrate. Razgrađuje alginat, krv, DNA, želatinu i lecitin, ali ne i eskulin, kazein, celulozu, pektin i škrob. Ove bakterije rastu pri 3-8%, ali ne i na 0 i 10%, te pri temperaturi od 11-40°C. Pokazuje osjetljivost na vibriostat O129 od 150µg, ali ne i od 10µg (Austin i Austin 2012).

1.3.5. Dijagnostika bakterija roda Vibrio (*V. anguillarum* i *V. harveyi*) molekularnim metodama

Zbog dugotrajne i ponekad netočne identifikacije *Vibrio* vrsta pomoću standardnih morfoloških i biokemijskih metoda, u identifikaciji se sve više koriste molekularne metode. One su puno jednostavnije i daju rezultate u kraćem roku.

Znanje o biokemijskim i molekularnim aspektima *V.anguillarum* je limitirano, uspoređujući sa znanjem o *Vibrio* vrstama patogenim za ljude, kao što su *V. cholerae*, *V. parahemolyticus* i *V. vulnificus*. Primjerice, za vrste *V. cholerae* i *V. parahemolyticus*, u potpunosti je poznat njihov genom. Na temelju tih saznanja zaključeno je, da iako ove dvije vrste uzrokuju slične bolesti, koriste različite mehanizame za izazivanje infekcija u svojih domaćina (Makino i sur. 2003).

Za identifikaciju *V. anguillarum* koriste se različite molekularne metode koje uključuju analizu plazmida, DNA hibridizaciju te lančanu reakciju polimeraze (engl., polymerase chain reaction, PCR). Do sada je, pomoću lančane reakcije polimeraze, određena filogenetska veza između *V. anguillarum* i ostalih vibrija. Razvijeni su brojni protokoli lančane reakcije polimerazom u kojima se koriste početnice specifične za umnažanje odsječaka gena 16S rRNA, *rpoN* gena i *amiB* gena, međutim njima se ne mogu razlikovati potencijalno patogeni od nepatogenih sojeva, jer su ovi geni „housekeeping geni“ (neophodni za odvijanje normalnih staničnih funkcija) kod svih izolata *V. anguillarum* (Xiao i sur. 2009).

Za identifikaciju *V. harveyi* poznato je nekoliko molekularnih metoda koje uključuju analizu cijelog genoma te metode koje ciljano umnažaju jedan ili više gena. Do sada su razvijene metode koje koriste specifične početnice za umnažanje odsječaka gena 16S rRNA, *gyrB* gena, *taxR* gena, *vvh* gena i *luxN* gena (Cano-Gomez i sur. 2009).

Međutim, dizajniranje molekularnih tehnika za specifičnu identifikaciju različitih *Vibrio* vrsta je izuzetno teško i problematično jer se svakim danom otkriva njihov novi način virulencije te stoga ne postoji jedinstvena metoda za utvrđivanje *Vibrio* vrsta.

1.4. Suzbijanje i liječenje vibrioze

Ukoliko optimalni uvjeti za rast i preživljavanje ribama budu iz bilo kojeg razloga narušeni može doći do pojave infekcija. Tada je jedina mogućnost suzbijanja infekcija upotreba antimikrobnih sredstava.

Antimikrobna sredstva u marikulturi se primjenjuju kupkom ili u hrani. Primjena antimikrobnih sredstava kupkom omogućava i zdravim i bolesnim ribama da uzmu jednake doze lijeka. Međutim, ovaj način liječenja limitiran je veličinom bazena i moguć je samo u fazama ili oblicima uzgoja koji se odvijaju u bazenima. Iznimno je moguće kupku provoditi u

specijalno dizajniranim ceradama koje se navuku oko kaveza ali je to skup i tehnički kompliciran postupak.

Najpraktičnije i široko primjenjivo je liječenje riba u uzgoju putem hrane. Oboljela riba u većini slučajeva ne uzima hranu, stoga ljekovitu hranu uzima samo zdrava riba. Zato je antimikrobna terapija učinkovita u suzbijanju širenja bolesti na zdrave jedinke u uzgojnoj jedinici.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da postoje brojni lijekovi koji suzbijaju vibrioze. Brojni autori navode kloramfenikol, furanace, nitrofurazon, oksoliničnu kiselinu, flumekvin, oksitetraciklin i potencirane sulfonamide uspješnim u liječenju vibrioze. Tako se na primjer u Norveškoj za suzbijanje vibrioza kod mlađi bakalara koriste oksolinična kiselina i florfenikol (Frans i sur. 2011).

Široka primjena antibiotika trebala bi se svesti na minimum, jer prema istraživanjima Alderman i Hastings (1998) antibiotici kontaminiraju okoliš i ribu koju ljudi konzumiraju. Pogrešna primjena antibiotika može dovesti i do rezistencije bakterija. Colquhoun i sur. (2007) zapazili su rezistenciju bakterije *V. anguillarum* na oksoliničnu kiselinu.

Osim uporabe antimikrobnih sredstava u liječenju za sprječavanje nastanka vibrioza koriste se i cjepiva. Idealno cjepivo u akvakulturi treba učinkovito sprječavati smrtnost riba, imati prihvatljivu cijenu te omogućiti dugotrajnu imunost (Leong i sur. 1997). Cijepljenjem lubina pripravkom protiv vibrioze koji sadrži inkativirane uzročnike postiže se dobra zaštita od bolesti, te je prihvaćeno kao jedna od mjera biosigurnosti na mnogim mediteranskim uzgajalištima (Graveningen i sur. 1998). Cjepivo se ribama može dati na tri načina: uranjanjem bolesne ribe u kupku koja sadrži cjepivo, injektiranjem cjepiva u ribu ili unošenjem cjepiva hranom (Katavić 2006). Vrlo učinkovita zaštita od vibrioze temelji se na programu koji započinje cijepljenjem mlađi lubina mase 1 - 2 grama u mrijestilištu uranjanjem. Takav tretman rezultira dobrom zaštitom u trajanju od 2 do 4 mjeseca (Wardle 1996.) sa stupnjem zaštite 60-80%. Da bi se stupanj i vrijeme trajanja zaštite poboljšali, primjenjuje se docjepljivanje lubina u kavezima (Toranzo i sur. 2009.). Docjepljivanje se može provoditi uranjanjem, parenteralnom (i/p) aplikacijom cjepiva te primjenom cjepiva u hrani (Le Breton 2009.), ovisno o uvjetima uzgoja, veličini ribe i mogućnostima primjene. Stoga, kako bi se zadržao održivi razvoj marikulture, istražuje se nekoliko alternativnih pristupa u suzbijanju vibrioze.

1.5. Cilj istraživanja

Razvojem tehnologije i industrije, morski ekosustavi su sve više eksploatirani. Količina slobodno živuće ribe se smanjuje, ali zbog toga proizvodnja u marikulturi raste. Zbog sve veće intenzifikacije uzgojnih sustava, dolazi do smanjenja kvalitete okolišnih uvjeta, a samim time i do povećanja mogućnosti nastajanja bolesti. Nastankom bolesti u uzgajalištima marikulture, smanjuje se rast i preživljavanje uzgajanih vrsta, te dolazi do ekonomskih gubitaka. U Republici Hrvatskoj se marikultura temelji na nekoliko velikih industrijskih farmi i više manjih obiteljskih farmi s godišnjom proizvodnjom oko 100 tona kojima pojava bolesti ugrožava egzistenciju.

Najčešće bolesti koje se javljaju su uzrokovane bakterijama iz roda *Vibrio.* Stoga je cilj ovog diplomskog rada karakterizacija različitih sojeva *Vibrio* bakterija izoliranih iz oboljelih uzgajanih lubina kako bi se u budućnosti što lakše i brže dijagnosticirale vibrioze, te kako bi se odredio monitoring te programi kontrole i prevencije ove bolesti.

2.MATERIJALI I METODE

2.1. Vanjski pregled lubina

Promjene u vanjskom izgledu riba utvrđivane su prostim okom. Pregledani su tjelesni otvori, škrge i peraje. Pretragom kože obuhvaćene su eventualne promjene boje, otečenja, lezije ili krvarenja. Zatim je odstranjen operkulum i promotren izgled i boja škrga, te eventualna nazočnost makroskopski vidljivih ektoparazita. Pripremljeni su nativni preparati škržnih listića standardnom tehnikom, te su pregledani mikroskopski na malom povećanju.

2.2. Uzimanje materijala za bakteriološke pretrage

Za bakteriološku pretragu uzimani su uzorci srca, slezene i bubrega lubina. Nakon otvaranja trbušne šupljine lubina, užarenim skalpelom opaljena je površina srca, slezene i bubrega. Materijal je uzet sterilnom bakteriološkom ušicom ispod opaljenog područja. Nakon toga pažljivo su odmaknuti organi u trbuhu i riblji mjehur te na isti način uzeti uzorci bubrega. Prikupljeni materijali srca, slezene i bubrega nacjepljeni su na čvrste hranjive podloge. Zatim su hranjive podloge stavljene na 24 satnu inkubaciju na 22°C.

2.3. Hranjive podloge

Za izdvajanje sojeva bakterija *V. anguillarum* i *V. harveyi* korištene su hranjive podloge MA (Marine agar) (Difco,USA) i TSA (Trypticase Soy agar) uz dodatak 1,5% NaCl (Difco,USA). Nakon nacjepljivanja, hranjive podloge su inkubirane tijekom 24 sata pri temperaturi od 22°C. Kolonije porasle na neslektivnim podlogama (MA i TSA uz dodatak NaCl) su precijepiljene na selektivnu hranjivu podlogu TCBS.

Izdvojene bakterijske kolonije koje su po svojim osobinama odgovarale opisanim kolonijama vrstama *V. anguillarum* i *V. harveyi* (Austin i Austin, 2012) čuvane su u hladnjaku i precijepljenei na kose MA.

2.4. Identifikacija izdvojenih sojeva

Izdvojeni sojevi bakterija identificirani su temeljem morfoloških karakteristika bakterijskih kolonija, tinktorijelnih i biokemijskih osobitosti te lančanom reakcijom polimeraze.

2.4.1. Morfološke karakteristike kolonija

Nakon inkubacije materijala na hranjivim podlogama identificiraju se izrasle bakterijske kolonije. Prvi korak u identifikaciji jest određivanje čiste bakterijske kulture. Nakon utvrđivanja čistih bakterijskih kultura, na obrnutom mikroskopu pregledali smo pojedinačne kolonije i utvdili njihovu morfologiju.

Iz čiste kulture napravljen je razmaz tako što je na čistu predmeticu staviljena kap fiziološke otopine i u tu kap bakteriološkom uškom je dodana mala količina bakterijskih stanica iz kolonije, te je razmazano kružnim pokretima i osušeno. Nakon fiksacije bakterija toplinom, obojene su bojenjem prema Gramu kojim se bakterije diferenciraju na Gram-pozitivne i Gram-negativne (Habrun 2014).

Pokretljivost bakterija određena je pomoću API M Medium (BioMerieux, Francuska) ampule. Prije inokulacije ampula bakterijskim kolonijama, morali smo ih zagrijati u vodenoj kupelji prema uputama proizvođača. Nakon zagrijavanja i pretvaranja medija u polutekuće stanje, ampule su ohlađene na sobnu temperaturu i inokulirane bakterijskim kolonijama. Inkubacija je trajala 24 sata na 37 °C. Nakon 24 sata rezultati su očitani prema uputama proizvođača.

2.4.2. Biokemijska identifikacija izdvojenih sojeva

Tvorba enzima katalaze dokazana je uočavanjem stvaranja mjehurića na predmetnom stakalcu nakon što je u 3%-tnu otopinu vodikovog peroksida dodana bakterijska koloniju (Habrun 2014).

Tvorba enzima citokrom oksidaze dokazana je tako što se filtar papir namoči N,N-dimetil-fenilen-diamonij kloridom i ezom se prenesu kolonije s agara i utrljaju na filtar papir. Nakon 20-60 sekundi promjena boje filtarskog papira usporedi se sa standardom i odredi tvori li bakterijska kultura citokrom oksidazu.

Bakterije roda *Vibrio* diferencirane su od ostalih bakterija testom osjetljivosti na vibriostat O/129 koristeći diskove impregnirane sa 150 μg i 10 μg 2,4-diamino-6,7-diisopropylpterydina i s 5 μg novobiocina koje smo stavili na MH agar obogaćen sa 1,5% NaCl te nasadili svježom bakterijskom kulturom.

Oblik hemolize određen je tako što su svježe bakterijske kolonije nacijepljene na krvni agar sa dodatkom 1,5% NaCl te inkubirane na 24 sata pri temperaturi od 22 °C.

Kako bi odredili ima li bakterijska kultura oksidacijski ili fermentacijski metabolizam ugljikohidrata proveden je O-F postupak (oksidacijsko-fermentacijski postupak). Korištena je polučvrsta podloga koja sadrži glukozu i bromtimol plavo kao pH indikator. Za svaku ispitivanu kulturu uzete su dvije epruvete s podlogom i nacijepljenei su. Potom je jedna epruveta zatvorena sterilnim parafinskim uljem, te su obje epruvete inkubirane pri 30 °C.

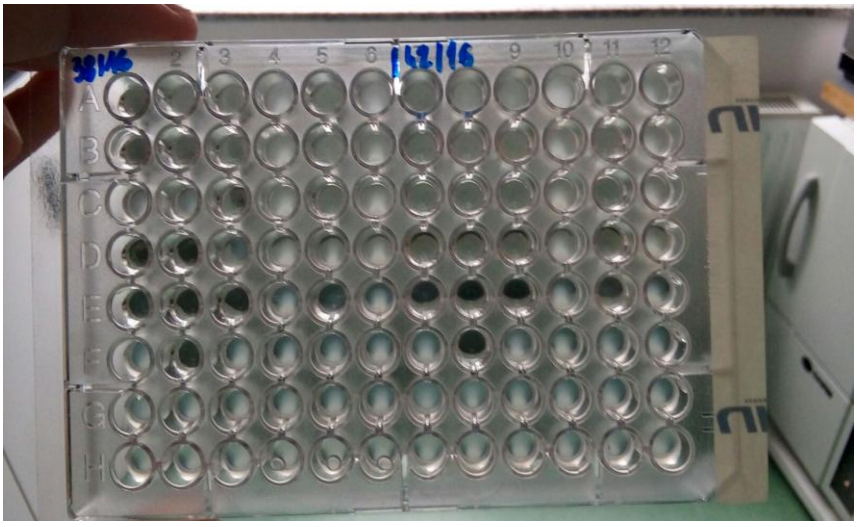
Toleranciju prema soli određivali smo u peptonskoj vodi s dodatkom soli od 0,5%, 3%, 6% te 10%.

Budući da je zbog određivanja bakterijske vrste bilo potrebno odrediti više biokemijskih svojstava, umjesto pojedinačnog određivanja biokemijskih svojstava, korišteni su gotovi biokemijski nizovi za identifikaciju bakterija. Pri izradi ovog diplomskog rada koristila sam API20E (BioMerieux S.A., Marcy-l'Etoile, Francuska) panel koji se sastoji od 20 mikro- cjevčica ispunjenih dehidriranim supstratima. Ovim testom obuhvaćena je sposobnost bakterija da iskorištavaju β-galaktozidazu (ONPG), arginin, lizin, ornitin, citrat, tvore sumporovodik, indol, Voges Proskauerov pokus, hidrolizaju ureu, razgrađuju želatinu, šećere glukozu, manozu, inozit, sorbit, ramnozu, saharozu i melobizu te amigdalin i arabinozu. Svaka jažicu ovog testa inokulirana je bakterijskom suspenzijom koju smo dobili tako što smo u 3 ml fiziološke otopine suspendirali bakterijske kolonije. Testovi su popunjenii prema uputama proizvođača te inkubirani na 24 do 48 sati pri temperaturi od 37 °C. Fermentacija šećera, u testovima za ugljikohidrate, omogućena je zatvaranjem jažica sterilnim mineralnim uljem. Reakcije su očitane pomoću originalnih reagenasa.

Osjetljivost izoliranih bakterijskih vrsta prema antibioticima određeni su difuzijskim postupkom i dilucijskim postupkom. Difuzijski test, poznat pod nazivom antibiogram je kvantitativna metoda i rezultat se tumači kao osjetljiv, umjerno osjetljiv i neosjetljiv. Dilucijski postupak obično se izvodi kao mikrodilucijski test kojim se određuju minimalne inhbicijske koncentracije (MIC), a dobivena vrijednost se izražava u mgL^{-1}.

Difuzijski postupak prema Kirby i Baueru (1966) proveden je na Mullller-Hintonovom agaru uz dodatak 1,5% NaCl. Upotrijebljeni su slijedeći dijagnostički diskovi različitih proizvođača s različitom koncentracijom djelatne tvari: ampicilin 25 µg (Oxoid), trimetoprim/sulfadiazin 25 µg (Becton Dickinson), kloramfenikol 30 µg (Becton Dickinson), oksitetraciklin 30 µg (Becton Dickinson), enrofloksacin 5 µg (Becton Dickinson), flumekvin 30 µg (Becton Dickinson), nalidiksična kiselina 30 µg (Becton Dickinson), gentamicin 10 µg (Oxoid) te neomicin 30 µg (Oxoid). Osjetljivost ispitivanih sojeva na pojedina antibakterijska sredstva ocjenjeni su mjerenjem zone inhibicije i procjenom osjetljivosti prema uputama proizvođača.

Minimalne inhibitorne koncentracije pojedinih antibakterijskih tvari na vlastite izolate *V. anguillarum* i *V. harveyi* određene su pomoću VetMIC Aquatic (SVA, Švedska). Pripremljena je CAMHB (kation prilagođeni Muller-Hinton bujon) prema uputama proizvođača, a zatim je bakterijska suspenzija, dobivena tako što su u 2 ml fiziološke otopine dodali 24 satne kulture bakterijskih izolata, dodali u CAMHB. Tako pripremljena otopina je inokulirana u svaku jažicu VetMIC panela te inkubirana na 48 sati pri temperaturi od 22 °C. Vrijednosti MIC-a različitih antibiotika određivane su u mgL^{-1}. Kao standarde koristili smo slijedeće antibiotike: ampicilin, eritromicin, florfenikol, oksitetraciklin, oksolinska kiselina, trimetoprim-sulfametoksazol.



Slika 1. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija pomoću VetMIC Aquatic panela

2.4.3 Molekularna identifikacija izdvojenih bakterijskih sojeva *V. anguillarum*

Kako bi potvrdili da izdvojena DNA pripada bakteriji *V. anguillarum* korištena je molekularna metoda, lančana reakcija polimeraze (engl., polymerase chain reaction, PCR) kojom se umnaža dio amiB genskog slijeda (Gyeong- Eun i sur. 2007). Prije same reakcije izdvojena je DNA tako što je ušica bakterijske kulture razmućena u 100 µl destilirane vode (AccuGene Molecular Biology Water, Lonza, Švicarska), kuhana je 20 minuta na 95 °C te centrifugirana 1 minutu na 14 000 g. Supernatan je korišten kao DNA kalup u lančanoj reakciji polimeraze.

Reakcijska smjesa ukupnog volumena 20 µl sadržavala je 10 µl mješavine HotStarTaq Master Mix (Oiagen, Njemačka), 7 µl vode (Rnase-free Water, Oiagen, Njemačka), 0.5 µl početnice van-ami8 (5'-ACAT CATCCATTTGTTAC-3'), 0.5 µl početnice van-ami417 (5'-CCTTATCACTATCCAAATTG-3') te 2 µl DNA. Konačna koncentracija svake početnice (MetaBion International, Njemačka) u reakcijskoj smjesi bila je 0,4 µM.

Umnažanje je provedeno pomoću uređaja ProFlex (Applied Biosystems, SAD) s početnom denaturacijom na 95 ºC 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije pri 95 ºC 30 sekundi, vezanje početnica pri temperaturi od 54 ºC na 30 sekundi i produljivanje lanaca na 72 ºC 30 sekundi. Nakon toga je uslijedio završni korak produljivanja lanaca na 72 ºC 10 minuta te održavanje temperature na 4 ºC neograničeno. Veličina produkta umnažanja 429 parova baza (engl. base pair, bp) utvrđena je pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, Njemačka) s računalnim programom QIAxcel BioCalculator. Korišteni su aligment marker 15 bp - 3 kb te size marker 100 bp - 2.5 kb.

2.4.4. Molekularna identifikacija izdvojenih bakterijskih sojeva *V. harveyi*

Iz bakterijskih kolonija identificiranih kao *V. harveyi* izdvojena je DNA primjenom kita za izolaciju DNA iz tkiva i krvi (Qiagen, USA) te je korišten kao kalup u lančanoj reakciji polimeraze gdje je umnažen 16s rRNA genski slijed primjenom početnica 27f (AGAGTTTTGATCCTGGCTCAG) i 1492r (GGTTACCTTGTTACGACTT) metodom prema Wilson i sur. (1990). Umnažanje je provedeno pomoću uređaja ProFlex (Applied Biosystems, SAD) s početnom denaturacijom na 94 ºC 15 minuta, nakon koje je uslijedilo 35 ciklusa denaturacije pri 94 ºC 70 sekundi, vezanje početnica pri temperaturi od 35 ºC na 2,5 minute i produljivanje lanaca na 72 ºC 30 sekundi. Nakon toga je uslijedio završni korak produljivanja lanaca na 75 ºC 4 minute te održavanje temperature na 4 ºC neograničeno.

Veličina produkta umnažanja 100 parova baza (engl. base pair, bp) utvrđena je pomoću uređaja za kapilarnu elektroforezu QIAxcel (Qiagen, Njemačka) s računalnim programom QIAxcel BioCalculator. PCR produkti su poslani u Macrogen, Amsterdam (Nizozemska) radi komercijanog sekvenciranja. Dobivene sekvence su analizirane korištenjem BLAST alata za traganjem identiteta u GenBank i RBD (Ribosomal Data Base Project II). Dobivene sekvence su taksonomski identificirane temeljem sličnosti veće od 99%.

3.REZULTATI

3.1. Vanjski izgled oboljelih jedinki

U nekoliko pregledanih primjeraka uočen je gubitak ljusaka po cijelom tijelu, krvarenja po koži glave, škržnog poklopca te po osnovama prsnih i trbušnih peraja. Škrge su bile blijedocrvene. Mikroskopski su uočena krvarenja i hiperplazija epitelnih stanica škržnih listića (Slika 2).



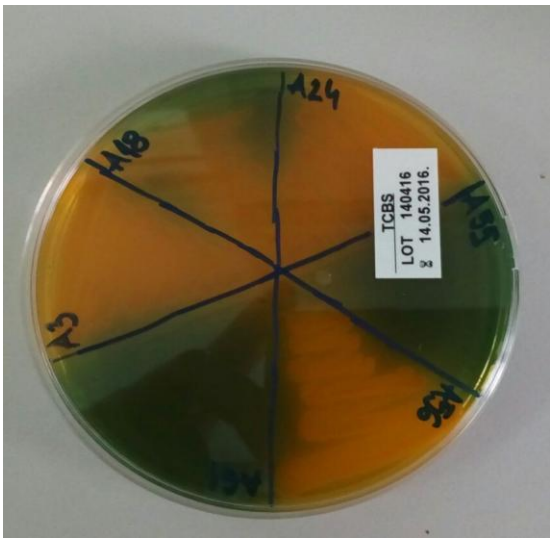
Slika 2. Krvarenja po glavi, škržnom poklopcu i osnovama peraja u akutnog do subakutnom tijeka vibrioze

3.2. Rezultati bakterioloških istraživanja

3.2.1. Uzgojna svojstva izdvojenih *Vibrio* vrsta

Izdvojeno je ukupno 6 sojeva *Vibrio anguillarum*, označenih redom: 8/13,26/14, 75/14, 125/14, 38/16 te 42/16; te 6 sojeva *Vibrio harveyi* označenih kao: A2, A27, A32, A33, A39, te A40.

Svi izdvojeni sojevi rasli su na TCBS podlozi kao žute kolonije zbog fermentacije glukoze (Slika 3).



Slika 3. Bakterijske kolonije na TCBS podlozi

3.2.2. Prikaz morfoloških i biokemijskih svojstava izdvojenih bakterijskih sojeva *Vibiro anguillarum*

Sve su se izdvojene bakterije bojile Gram negativno te su bile pokretne. Svi izdvojeni sojevi su rasli na 0,5 do 6% NaCl, dok nijedan soj *V.anguillarum* nije rastao na 10% NaCl (Tablica 1).

Tablica 1. Fiziološka svojstva izdvojenih sojeva *Vibrio anguillarum*

Soj *V.anguillarum*	**8/13**	**26/14**	**75/14**	**125/14**	**38/16**	**42/16**
Bojenje po Gramu	-	-	-	-	-	-
Pokretljivost	+	+	+	+	+	+
Rast na:						
0,5% NaCl	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-

Ukupno je istraženo 27 biokemijskih svojstava izdvojenih sojeva, od čega je 20 svojstava određeno pomoću API 20 E sistema (Slika 4).



Slika 4. API 20 E sistem

S obzirom na biokemijska svojstva jedino soj 26/14 posjeduje β- hemolizu, dok ostali sojevi posjeduju γ- hemolizu, vibriostat O/129 i novobiocin inhibiraju njihov rast. Nadalje, svi sojevi posjeduju enzime oksidazu, katalazu i β galaktozidazu, ali ne i lizin dekarboksilazu i ornitin dekarboksilazu, te svi imaju fermentacijski metabolizam ugljikohidrata. Od ukupno 6 izdvojenih sojeva *V. anguillarum*, 4 soja (8/13, 26/14, 75/14, 125/14), imaju enzim arginin dehidroksilazu, dok sojevi 38/16 te 42/16 ne posjeduju ovaj enzim. Jedino soj 8/13 pri fermentaciji glukoze tvori acetoin u Voges Proskauer reakciji (Tablica 2).

Tablica 2. Biokemijska svojstva izdvojenih sojeva *Vibrio anguillarum* (S- osjetljivo, I- umjereno osjetljivo, R- neosjetljivo)

Soj *V.anguillarum*	**8/13**	**26/14**	**75/14**	**125/14**	**38/16**	**42/16**
Oksidaza	+	+	+	+	+	+
Katalaza	+	+	+	+	+	+
O/129 (150 µg)	20 S	16 S	20 S	18 S	21 S	18 S
O/129 (10 µg)	11 S	7 I	12 S	18 S	11 S	12 S
Novobiocin	14 I	14 I	15 I	14 I	16 S	16 S
β –hemoliza	Γ	β	γ	γ	Γ	γ
OF glukoza	F	F	F	F	F	F

Niti jedan ispitivani soj nije sposoban iskoristiti citrat te nemaju sposobnost da iz aminokiseline oslobađaju sumporovodik. Pojedini sojevi djelomično su sposobni razgraditi aminokiselinu triptofan u indol, dok svi sojevi imaju sposobnost produkcije nitrata.

S obzirom na enzimatsku aktivnost svi sojevi posjeduju želatinazu, dok enzime ureazu i triptofan deaminazu posjeduje samo nekoliko sojeva. Svi izdvojeni bakterijski sojevi fermentiraju saharozu i sorbit, a glukozu fermentiraju svi sojevi osim soja 8/13.

Tablica 3. Biokemijska svojstva izdvojenih sojeva *Vibrio anguillarum* određena API 20E sistemom

Soj *V.anguillarum*	**8/13**	**26/14**	**75/14**	**125/14**	**38/16**	**42/16**
ONPG	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-
URE	+	-	-	-	-	-
TDA	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
IND	-	+/-	+/-	+/-	-	-
VP	+	-	-	-	-	-
GEL	+	+	+	+	+	+
GLU	-	+	+	+	+	+
MAN	+/-	+	+	+	-	-
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	+	+	+	+	+	+
RHA	-	-	-	-	-	-
SUC	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	-	-
ARA	-	+	+	-	-	-
NO_2	+	+	+	+	+	+

3.2.3. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *V.anguillarum* na antibakterijska sredstva disk difuzijskom metodom

Metodom difuzijskog postupka utvrđeno je da su svi sojevi osjetljivi do umjereno osjetljivi prema trimetoprim-sulfametoksazol,flumekvinu i florfenikolu. Soj 38/16 je jedini osjetljiv na ampicilin, dok su ostali izdvojeni sojevi potpuno neosjetljivi. Sojevi 26/14,75/14 te 125/14 pokazuju osjetljivost odnosno umjerenu osjetljivot prema oksitetraciklinu, dok je soj 8/13 poptuno neosjetljiv prema ovom antibakterijskom sredstvu (Tablica 4).

Tablica 4. Djelovanje antibakterijskih tvari prema izdvojenim sojevima *Vibrio anguillarum* (S- osjeljivo, I- umjereno osjetljivo, R- neosjetljivo)

Soj *V.anguillarum*	**8/13**	**26/14**	**75/14**	**125/14**	**38/16**	**42/16**
Ampicilin 25µg	6 R	9 R	8 R	11 R	19 I	12 R
Trim/Sulfa 25µg	17 I	19 S	24 S	21 S	20 S	22 S
Florfenikol 30µg	11 S	17 I	28 S	24 S	21 S	23 S
Oksitetraciklin 30µg	14 R	24 S	25 S	22 S	25 S	23 S
Flumequine 30 µg	21 S	23 S	22 S	21 S	25 S	22 S

3.2.4. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *V. anguillarum* na antibakterijska sredstva određena metodom minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC)

Svi ispitivani sojevi inhibirani su niskim koncentracijama florfenikola, oksitetraciklina, oksolinske kiseline te trimetoprim-sulfametoksazol, a rezistentni su na ampicilin i eritromicin (Tablica 5). Prema dobivenim rezultatima bakterije su osjetljive na antimikrobne tvari koje inhibiraju njihov rast pri niskim koncentracijama.

Tablica 5. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) antimikrobnih tvari na izdvojene sojeve *Vibrio anguillarum* (S- osjetljivo, I- umjereno osjetljivo, R- neosjetljivo)

	A N T I B I O T I K					
Soj *V.anguillarum*	Ampicilin mg/L	Erythromycin mg/L	Florfenicol mg/L	Oxytetracycline mg/L	Oxolinic acid mg/L	Trimethoprim-Sulfamethoxazole mg/L
8/13	R	R	0,5 S	0,25 S	0,06 S	0,12/2,4 S
26/14	R	R	0,5 S	0,5 S	0,5 S	0,12/2,4 S
75/14	R	R	0,5 S	0,25 S	0,12 S	0,12/2,4 S
125/14	R	R	2 S	0,5 S	0,12 S	0,12/2,4 S
38/16	R	R	2 S	0,25 S	0,06 S	0,12/2,4 S
42/16	R	R	1 S	0,25 S	0,06 S	0,12/2,4 S
Postotak osjetljivih sojeva *V. anguillarum*	0%	0%	100%	100%	100%	100%

3.2.5. Prikaz morfoloških i biokemijskih svojstava izdvojenih bakterijskih sojeva *Vibrio harveyi*

Izdvojeni bakterijski sojevi *Vibrio harveyi* bojili su Gram negativno te su bili pokretni. Svi izdvojeni sojevi rasli su uz dodatak od 0,5 do 3% NaCl, uz dodatak od 6% NaCl su rasli svi sojevi osim soja A40, a pri dodatku od 10% NaCl peptonskoj vodi nije rastao niti jedan izdvojeni soj (Tablica 6).

Tablica 6. Fiziološka svojstva izdvojenih sojeva *Vibrio harveyi*

Soj *V.harveyi*	**A2**	**A27**	**A32**	**A33**	**A39**	**A40**
Bojenje po Gramu	-	-	-	-	-	-
Pokretljivost	+	+	+	+	+	+
Rast na:						

0,5% NaCl	+	+	+	+	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-

Kod izdvojenih sojeva *V.harveyi* ukupno smo odredili 27 biokemijskih svojstava, od čega je 20 svojstava određeno pomoću API20E sistema.

Svi sojevi posjeduju enzime oksidazu i katalazu, ali ne i β-galaktozidazu, arginin dehidroksilazu te ornitin dekarboksilazu. Sojevi A2 i A27 posjeduju i enzim lizin dekarboksilazu. Svi sojevi imaju fermentacijski metabolizam ugljikohidrata kao i izdvojeni *V.anguillarum* sojevi, te posjeduju β hemolizu. Izdvojeni sojevi su osjetljivi na vibriostat O/129 (150 mg), dok su na O/129 (10 mg) i novobiocin uglavnom rezistentni. Nijedan soj pri fermentaciji glukoze ne tvori acetion u Voges Proskauer reakciji (Tablica 7).

Tablica 7. Biokemijska svojstva izdvojenih sojeva *Vibrio harveyi* (S-osjetljivo, I- umjereno osjetljivo, R- neosjetljivo)

Soj *V.harveyi*	**A2**	**A27**	**A32**	**A33**	**A39**	**A40**
Oksidaza	+	+	+	+	+	+
Katalaza	+	+	+	+	+	+
O/129 (150 µg)	16 S	18 S	20 S	12 S	14 S	16 S
O/129 (10 µg)	6 I	4 I	1 R	1 R	1 R	1 R
Novobiocin	9 R	6 R	5 R	4 R	5 R	6 R
β –hemoliza	β	β	β	β	β	β
OF glukoza	F	F	F	F	F	F
VP reakcija	-	-	-	-	-	-
Arginin dehidroksilaza	-	-	-	-	-	-
Lizin dekarboksilaza	+	+	-	-	-	-
Ornitin dekarboksilaza	-	-	-	-	-	-

Sojevi A2 i A27 sposobni su iskoristiti citrat, a nijedan soj ne oslobađa sumporovodik iz aminokiseline.

S obzirom na enzimatsku aktivnost nijedan soj ne posjeduje enzime ureazu i želatinazu, ali posjeduju enzim triptofan deaminazu. Svi izdvojeni bakterijski sojevi fermentiraju glukozu, saharozu i amigdalin, a manozu jedino ne fermentira soj A39.

Tablica 8. Biokemijska svojstva izdvojenih sojeva *Vibrio harveyi* određena API 20E sistemom

Soj *V.harveyi*	**A2**	**A27**	**A32**	**A33**	**A39**	**A40**
ONPG	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-
CIT	+	+	-	-	-	-
H_2S	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-
TDA	+	+	+	+	+	+
IND	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	-	+
INO	-	-	-	-	-	-
SOR	-	+	+	+	-	+
RHA	-	-	-	-	-	-
SUC	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-
AMY	+	+	+	+	+	+
ARA	-	-	-	-	-	-
NO_2	-	-	-	-	-	-

3.2.6. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *Vibrio harveyi* na antibakterijska sredstva disk difuzijskom metodom

Osjetljivost bakterijskih sojeva na antibakterijska sredstva određena su metodom difuzijskog postupka te je utvrđeno da su svi sojevi rezistentni na gentamicin i neomicin. Osjetljivi su na trimetoprim-sulfametoksazol i flumekvin, te umjereno osjetljivi prema nalidiksičnoj kiselini. Sojevi A2, A27, A32, A33 su osjetljivi odnosno umjereno osjetljivi prema oksitetraciklinu, a sojevi A39 i A40 su potpuno rezistentni prema ovom antibakterijskom sredstvu (Tablica 9).

Tablica 9. Djelovanje antibakterijskih tvari prema izdvojenim sojevima *Vibrio harveyi* (S- osjetljivo, I- umjereno osjetljivo, R- neosjetljivo)

Soj *V.harveyi*	**A2**	**A27**	**A32**	**A33**	**A39**	**A40**
Trim/Sulfa 25µg	18 S	18 S	11 I	19 S	18 S	16 S
Oksitetraciklin 30µg	25 S	18 I	16 I	16 I	14 R	14 R
Florfenicol	16 I	20 S	22 S	24 S	21 S	14 I
Flumekvin 30µg	21 S	20 S	19 S	19 S	19 S	18 I
Nalidiksična kiselina 30µg	18 I	17 I	14 I	14 I	17 I	17 I
Gentamicin 10µg	12 R	11 R	9 R	11 R	10 R	10 R
Neomicin 30µg	12 R	12 R	10 R	11 R	9 R	10 R

3.2.7. Osjetljivost izdvojenih bakterijskih sojeva *Vibrio harveyi* na antibakterijska sredstva metodom određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC)

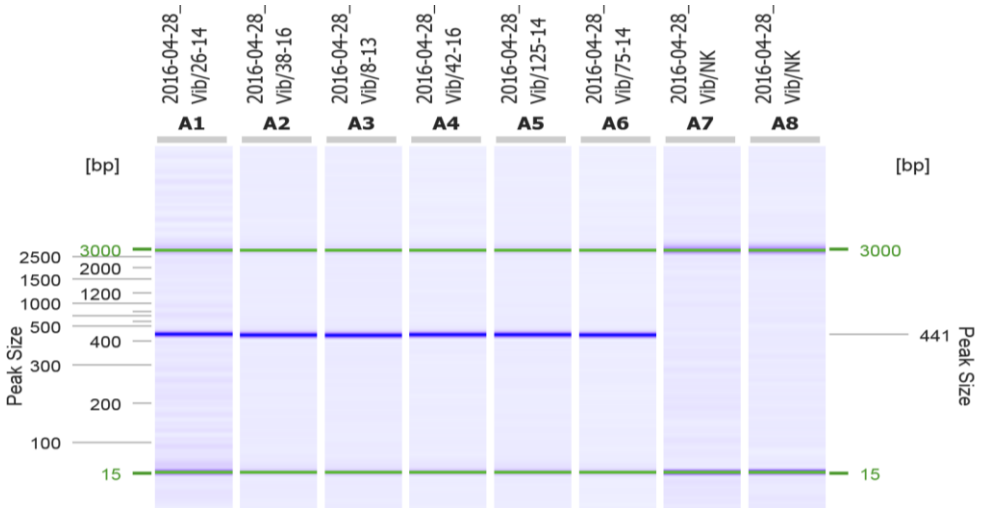
Svi ispitivani sojevi inhibirani su niskim koncentracijama florfenikola, oksitetraciklina te trimetoprim-sulfametoksazol, umjereno su osjetljivi na oksoliničnu kiselinu, a rezistentni su na ampicilin i eritromicin (Tablica 10).

Tablica 10. Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) antimikrobnih tvari na izdvojene sojeve *Vibrio harveyi* (S- osjetljivo, I- umjereno osjetljivo, R- neosjetljivo)

	A N T I B I O T I K					
Soj *V.havreyi*	Ampicilin mg/L	Erythromycin mg/L	Florfenicol mg/L	Oxytetracycline mg/L	Oxolinic acid mg/L	Trimethoprim-Sulfamethoxazole mg/L
A2	R	R	2 S	0,25 S	0,5 I	0,25/4,8 S
A27	R	R	1 S	0,5 S	0,5 I	0,25/4,8 S
A32	R	R	1 S	0,25 S	0,5 I	0,25/4,8 S
A33	R	R	1 S	0,5 S	0,5 I	0,5/9,5 S
A39	R	R	1 S	0,5 S	0,5 I	0,25/4,8 S
A40	R	R	2 S	0,5 S	0,25 I	0,25/4,8 S
Postotak osjetljivih sojeva *V. harveyi*	0%	0%	100%	100%	0%	100%

3.2.8. Rezultati molekularne identifikacije izdvojenih bakterijskih sojeva *Vibrio anguillarum*

Lančanom rekacijom polimerazom (engl. Polymerase chain reaction, PCR) kojom se umnaža dio amiB genskog slijeda dokazano je da izdvojena molekula DNA pripada bakteriji *Vibrio anguillarum*. Tijekom postupka korištene su specifične početnice, van-ami8 i van-ami417, što je rezultiralo produktom predviđene duljine od 429 parova baza (Slika 5).



Slika 5. Kapilarna elektroforeza

3.2.9. Rezultati molekularne identifikacije izdvojenih bakterijskih sojeva *Vibrio harveyi*

Slijed baza 16s rRNA dobiven sekvenciranjem pročišćenih produkata lančane reakcije polimerazom je analiziran i uspoređen sa slijedovima pohranjenim u Gene Bank bazi, jednako kao i onim u RBD (Ribosomal Data Base Project II). Vlastiti izolati su pokazali sukladnost veću od 99% sa slijedovim pohranjenim za *V. harveyi* (Tablica 11).

Tablica 11. Rezultati analize dobivenih slijedova baza (16s rRNA) usporedbom sa slijedovima pohranjenim u Gene Bank i RDP

UZORAK	BIOKEMIJA	BLAST	RDP
A2	*Vibrio harveyi*	***V. harveyi***/*V. rotiferianus*/*V. owensii*	***V. harveyi***
A27	*Vibrio harveyi*	***V. harveyi***	***V. harveyi***
A32	*Vibrio harveyi*	***V. harveyi***	***V. harveyi***
A33	*Vibrio harveyi*	***V. harveyi***	***V. harveyi***
A39	*Vibrio harveyi*	***V. harveyi***	***V. harveyi***
A40	*Vibrio harveyi*	***V. harveyi***	***V. harveyi***

4. RASPRAVA

Vibrioza uzrokovana bakterijama roda *Vibrio* u Hrvatskoj je prvi puta opisana osamdesetih godina prošlog stoljeća kao bolest pastrva u ribogojilištu u Trogiru (Pavić i sur. 1988). Naime, u to je vrijeme bila uobičajena hranidba pastrva mljevenom srdelom, a uzgajalište u Trogiru je imalo dotok morske vode. Međutim, danas vibrioza predstavlja limitirajući faktor u kaveznom uzgoju lubina ne samo u Hrvatskoj već u cijeloj mediteranskoj regiji (Haenen i sur. 2014).

Poznato je da su bakterije roda *Vibrio* najčešći uzročnici bolesti riba, stoga istraživanjem epizootioloških uvjeta u kojima se javlja bolest te istraživanjem svojstava uzročnika i njegove osjetljivosti prema antibakterijskim sredstvima dobivamo osnov za suzbijanje i sprječavanje pojave ove bolesti.

Tijekom našeg istraživanja ispitane su uzgojne, morfološke i biokemijske karakteristike nekoliko sojeva *V. anguillarum* i *V. harveyi*. Također je ispitana i osjetljivost prema antibakterijskim sredstvima izdvojenih sojeva.

Prilikom pregledavanja bolesnih jedinki prepoznat je akutni oblik bolesti, karakteriziran slabijim krvarenjima po koži škržnog poklopca, osnovama peraja, škržnom epitelu i jetri, te subakutni s izraženijim opisanim promjenama.

Uzgojna, morfološka i biokemijska svojstva izdvojenih sojeva sukladna su s poznatim svojstvima sojeva koje opisuju Austin i Austin (2012). Ispitivani sojevi rasli su na selektivnoj podlozi TCBS (Kobayashi 1963) kao žute kolonije zbog fermentacije saharoze. S obzirom da i neke druge vrste roda *Vibrio* fermentiraju saharozu i rastu na TCBS-u kao žute kolonije, izdvojeni sojevi su podvrgnuti daljnim biokemijskim analizama.

Austin i Austin (2012) opisuju nekoliko različitih biotipova *Vibrio anguillarum*. Postoji tip A nazvan *V. anguillarum forma typica,* a karakterizira ga produkcija indola i kiseline iz manitola i saharoze, tip B nazvan *V.anguillarum forma anguillicida* koji ne producira indol i kiselinu iz manitola i saharoze, te tip C koji nazvan *V.anguillarum forma ophtalmica* kojeg karakterizira produkcija kiseline iz manitola i saharoze, ali nema produkcije indola. Nešto kasnije su opisani tipovi D i E koje karakterizira produkcija indola, ali ne i

kiseline iz manitola. U mojem istraživanju pokazalo se da od 6 izdvojenih sojeva *V. anguillarum*, tri istraživana soja (26/14, 75/14, 125/14) se mogu svrstati u tip A, soj 8/13 se može svrstati u tip C, dok preostala dva soja (38/16 i 42/16) ne mogu se svrstati u nijedan opisani biotip.

Proučavajući tipove hemolize kod bakterija *V. anguillarum* i *V. harveyi*, zaključeno je da kod izoliranih sojeva *V.anguillarum* prevladava γ hemoliza za razliku od literaturnih podataka (Austin i Austin 2012), dok svi izolirani sojevi *V. harveyi* pokazuju β hemolizu što je u skladu s literaturnim podacima (Rattanama i sur. 2012). Istraživanjem tolerancije prema soli utvrđeno je da izdvojeni sojevi *V. anguillarum* rastu od 0,5 % do 6% NaCl, dok pri 10 % NaCl ne rastu, što je vrlo slično podacima koje daju Austin i Austin (2012), međutim oni su utvrdili da bakterije ne rastu pri 7% NaCl. Podaci tolerancije dobiveni za *V. harveyi* podudaraju se sa navodima istih autora.

U postupku identifikacije API 20 E sistemom utvrđeno je da izolirani bakterijski sojevi *V. harveyi* za razliku od *V. anguillarum* nemaju sposobnost iskorištavanja β galaktozidaze, razgradnje aminokiseline triptofan u indol te nemaju sposobnost produkcije nitrata. Oba soja fermentiraju glukozu i saharozu, dok ne fermentiraju melbiozu. Ono što razlikuje sojeve *V. harveyi* od *V. anguillarum* kada je riječ o fermentaciji šećera je to, da sojevi *V. harveyi* fermeniraju i amigdalin.

Proučavajući osobitosti izdvojenih bakterija *V. anguillarum* i *V. harveyi* provjerena je njihova osjetljivost prema antibakterijskim sredstvima metodom difuzijskog postupka i metodom minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i međusobno uspoređena. Obje skupine sojeva pokazali su se u pokusu metodom difuzijskog postupka osjetljivim prema trimetoprim- sulfametoksazolu, 50 % izoliranih *V.anguillarum* je bilo osjetljivo do umjereno osjetljivo prema oksitetracilklinu, dok je taj postotak kod *V. harveyi* bio nešto viši. Literaturni podaci (Zrnčić 1999) podudaraju se s dobivenim rezultatima za minimalne inhibitorne koncentracije. Sojevi *V. anguillarum* i *V. harveyi* inhibirani su niskim koncentracijama florfenikola, oksitetraciklina, oksolinične kiseline te trimetoprim-sulfametoksazolom, a rezistentni su na ampicilin i eritromicin. MIC-ovi za pojedine sojeve su varirali pa je tako niža koncentracija florfenikola inhibirala rast sojeva *V. anguillarum*,

dok je za inhibiciju sojeva *V. harveyi* bila potrebna dvostruka koncentracija. Najniža MIC oksitetraciklina bila je ona koja je inhibirala rast sojeva 8/13 te 75/14, a slični rezultati su dobiveni i za oksoliničnu kiselinu. Uspoređujući koncentracije antibiotika koje su potrebne za inhibiciju rasta bakterija između *V. anguillarum* i *V. harveyi*, možemo reći da su za *V. harveyi* potrebne u većini slučajeva dvostruke koncentracije antibiotika.

S obzirom da vibrioza i dalje predstavlja endemsku bolest, potrebno je antibakterijsko liječenje kako bi se kontrolirali gubitci u proizvodnji. Iz ovog istraživanja je dokazano da oba izolirana soja *Vibrio* bakterija mogu biti inhibirana odgovarajućim antibakterijskim sredstvima. Međutim, kako bi se izbjegle učestale primjene antimikrobnih lijekova potrebno je u ciklus uzgoja uvesti pravovremenu vakcinaciju riba protiv bakterijskih uzročnika. Posljednjih dvadesetak godina brojni su primjeri opravdanosti vakcinacije ribe u svjetlu održivog rasta, razvoja i isplativosti akvakulture (Thorarinsson i Powell 2006.). Kod riba zaštićenih vakcinom tijekom cijelog uzgojnog ciklusa će gubitci od bakterijskih bolesti i potreba liječenja biti svedeni na minimum. Vakcinacija će imati povoljan ekonomski učinak na profitabilnost uzgoja. Dobro poznavanje svojstava opisanih bakterija i njihova određena taksonomska pripadnost omogućavaju razvoj antibakterijskih vakcina.

5. ZAKLJUČAK

Bakterije roda *Vibrio* najčešći su uzročnici bolesti riba. Vibrioza je bolest koja se javlja u svim zemljama svijeta. U Republici Hrvatskoj najčešći uzročnici vibrioza su bakterije *Vibrio anguillarum* i *Vibrio harveyi*. Ovi patogeni uzrokuju od 20 do 50% gubitaka u marikulturi.

Do 2004. godine se smatralo da se bolest obično javlja u proljeće i jesen, kada temperatura mora naglo poraste odnosno smanji se, no zamijećeno je da se bolest pojavila u ljeto uslijed nagle promjene vremena kao što je jaka bura koja je u vrlo kratkom vremenskom razdoblju snižava temperaturu mora. Iz ovog istraživanja dokazano je da je najčešći akutni do subakutni tijek bolesti koji je karakteriziran krvarenjima oko usta, po osnovama peraja i perianalnoj regiji. Izolirani bakterijski sojevi su potvrđeni kao *V. anguillarum* i *V. harveyi* uz pomoć brojnih morfoloških, biokemijskih i molekularnih analiza.

Izolirani sojevi *V. anguillarum* i *V. harveyi* razlikuju se u nekoliko biokemijskih obilježja. Bakterijski sojevi *V. harveyi* za razliku od *V. anguillarum* nemaju sposobnost iskorištavanja β galaktozidaze, razgradnje aminokiseline triptofan u indol, također nemaju sposobnost razgradnje želatine, te ne proizvode nitrate i acetion.

Svi ispitivani sojevi bili su podjednako osjetljivi prema antibakterijskim sredstvima i metodom difuzijskog postupka i u pokusu određivanja minimalnih inhibitornih koncentracija. Dokazano je da su svi sojevi osjetljivi do umjereno osjetljivi na niske koncentracijama flumekvina, oksitetracilina, oksolinske kiseline i trimetoprim- sulfametoksazola, stoga je važno da se pravovremeno liječenje vibrioze temelji na ovim antibioticima.

6. LITERATURA

Alderman D.J., Hastings T.S. (1998): Antibiotic use in aquaculture:development of resistance- potential for consumer health risks. International Journal of Food Science and Technology **33**: 139-155.

Austin B., Austin D.A. (2012): Bacterial Fish Pathogens. Diseases of Farmed and Wild Fish. Springer-Praxis Publishing, Ltd., United Kingdom

Bavčević L., Lovrinov M. (2006): Hrana za kavezni uzgoj lubina i komarče- razvoj i perspektive. Izlaganje sa znanstvenog skupa. Ribarstvo **64**: 103-112.

Cano-Gomez A., Bourne D.G., Hall M.R., Owens L., Hϕj L. (2009): Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: Current methods and future prospects. Aquaculture **287**:1-10.

Colquhoun D.J., Aarflot L., Melvold C.F. (2007): gyrA and parC mutations and associated quinolone resistance in *Vibrio anguillarum* serotype O2b strains isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) in Norway. Antimicrobial Agents and Chemotherapy **51**: 2 597-2 599.

Čolak S., Zrnčić S. (2016): Health situation in Croatian mariculture. Workshop „Preventive measures in mariculture: experiences and perspectives“, Split

Egidius E., Anderson K., Clausen E., Raa J. (1981): Cold water vibriosis or „Hitra disease“ in Norwegian salmonid farming. Jornal of Fish Diseases **4**: 353-354.

Enger O., Husevag B., Goksoyr J. (1989): Presence of the Fish Pathogen *Vibrio salmonicida* in Fish Farm Sediments. Applied and Environmental Microbiology **11**: 1815-1818.

FAO. (2016): Cultured Aquatic Species Information Programme, *Dicentrarhus labrax* (Linnaeus, 1758). Dostupno sa: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Dicentrarchus_labrax/en, pristupljeno: svibanj, 2016.

Fouz B., Larsen J.L., Amaro C. (2006): *Vibrio vulnificus* serovar A: An emerging pathogen in European anguilliculture. Journal of Fish Diseases **29**: 285-291.

Frans I., Michiels C.W., Bossier P., Willems K.A., Lievens B., Reiders H. (2011): *Vibrio anguillarum* as fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. Journal of Fish Diseases **34**:643-661.

Graveningen K., Thorarinsson R., Johansen L.H., Nissen B., Rikardsen K.L.S., Greger E. (1998): Bivalent vaccines for sea bass (*Dicentrarhus labrax*) against vibriosis and pasteurellosis. Journal of Applied Ichtyology **14**:159-162.

Grimes D.J., Stemmler J., Hada H., May E.B., Maneval D., Hetrick F.M., Jones R.T., Stoskopf M., Colwell R.R. (1984): Vibrio species associated with mortality of sharks held in captivity. Microbial Ecology **10**: 271-282.

Gyeong-Eun H., Dong-Gyun K., Ju-Yoon B., Sun-Hee A., Sunghul C.B., In-Soo K. (2007): Species-specific PCR detection of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*, using amiB gene, which encodes N-acetymuramoyl-L-alanine amidase. FEMS Microbiol Lett **269**: 201-206.

Habrun B. (2014): Klinička veterinarska bakteriologija. Medicinska naklada, Zagreb

Haenen O.L.M., Fouz B., Amaro C., Isern M.M., Mikkelsen H., Zrnčić S., Travers M.A., Renault T., Wardle R., Hellstörm A., Dalsgaard I. (2014): Vibriosis in aquaculture. Bulletin-European Association of Fish Pathologists **34**: 138-148.

Hjeltnes B., Roberts R.J. (1993): Vibriosis. U: Inglis V., Roberts R.J., Bromage N.R. (ur.) Bacterial Diseases of Fish. Oxford, Blackwell Scinetific Publications, str. 109-121.

Hofer B. (1904): Handbuch Der Fischkrankheiten. E. Schweizerbarttsche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

Katavić I. (1988): Za jedan bolji pristup programima marikulture duž istočne obale Jadrana. Morsko ribarstvo **3**: 76-82.

Katavić I. (1995): Pregled stanja i perspektive daljnjeg razvitka marikulture u zemljama Sredozemlja. Plenarno predavanje na temu Marikultura i okoliš. Znanstveni skup „Hrvatsko morsko ribarstvo na pragu XXI stoljeća“. Split, 16-18.10.1995.

Katavić I. (2006): Marikultura. U:Bogut I.(ur) Ribogojstvo. Osijek, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, str: 349-506.

Kobayashi T., Enomoto S., Sakazaki R., Kuwahara S. (1963): A new selective medium for pathogenic vibrios TCBS Agar (modified Nakanishi's Agar). Japanese Journal of Bacteriology **18**: 387-391.

Le Breton A. (1996): An overview of the main infectious problems in cultured seabass *Dicentrarhus labrax* and seabream *Sparus aurata*: solutions? International Workshop on „Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects“, Verona

Le Breton A. (2009): Vaccines in Mediterranean aquaculture: practice and needs. U: Rodgers C., Basurco B. (ur.) The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture. Options Mediterraneennes: Serie A. Seminaires Mediterraneennes, str. 86.

Leong J.C., Anderson E., Bootland L.M., Chiou P.W., Johnson M.,Kim C., Mourich D., Trobridge G. (1997): Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. Developments in Biological Standardization **90**:267–277.

Li G., Zhao D., Huang L., Sun J., Gao D., Wang H., Tan Y., Liang L. (2006). Identification and phylogenetic analysis of *Vibrio vulnificus* isolated from diseased *Trachinotus ovatus* in cage mariculture. Aquaculture **261**:17-25.

Liu P.C., Chuang W.H., Lee K.K. (2003): Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*). Journal of Applied Ichtyology **14**: 75-79.

Lorini P. (1903): Ribanje i ribarske sprave pri istočnim obalama Jadranskog mora. Beč 1903. Naklada školska knjiga, 266 str.

Makino K., Oshima K., Kurokawa K., Yokoyama K., Uda T., Tagomori K., Iijima Y., Najima M., Nakano M., Yamashita A., Kubota Y., Kimura S., Yasunaga T., Honda T., Shinagawa H., Hattori M., and Iida T. (2003): Genome sequence of *Vibrio*

parahaemolyticus: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*. The Lancet **361**: 743-749.

Ministarstvo poljoprivrede.(2014): Nacionalni strateški plan razvoja akvakulture 2014-2020. Dostupno sa: http://mps.hr/ribarstvo/default.aspx?id=467, pristupljeno: svibanj, 2016.

Ministarstvo poljoprivrede. (2015): Popis uzgajivača. Dostupno sa: http://www.mps.hr/ribarstvo/default.aspx?id=415, pristupljeno: svibanj,2016.

Miyazaki T., Kubota S.S. (1977): Histopathological study of vibriosis of the salmonids. Fish Pathology **12**: 93-98

Morović D. (1972): Prilog poznavanju biologije lubina. Morsko ribarstvo **24**: 51-54.

Oraić D., Zrnčić S., Šoštarić B. (1996): *Vibrio anguillarum* ulcerative dermatitis in cage cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*). The seventh Ljudevit Jurak International Symposium on Comparative Pathology. Zagreb

Pavić S., Katić P., Živković J., Fijan N. (1988): Vibrioza pastrva u trogirskom uzgajalištu: neke biokemijske karakteristike uzročnika. Veterinarski glasnik **42**: 35-39.

Pujalte M.J., Sitjá- Bobadilla A., Macián M.C., Belloch C., Álvarez-Pellitero P., Pérez-Sánchez J., Uruburu F., Garay E. (2003): Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and European sea bass. Systematic and Applied Microbiology **26**: 284-292.

Ransom D.P., Lannan C.N., Rohovec J.S., Fryer J.L. (1984): Comparison of histopathology caused by *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii* in three species of Pacific salmon. Journal of Fish Diseases **7:**107-115

Rattanama P., Thompson J.R., Kongkerd N., Sirinitiwarawong K., Vuddhakul V. (2012): Sigma E Regulators Control Hemolytic Activity and Virulence in a Shrimp Pathogenic *Vibrio harveyi*. doi:info:doi/10.1371/annotation/de7188a8-1565-41fa-bc0c-418ea1bf8f44

Sandlund N., Rodseth O.M., Knappskong D.H., Fiksdal I.U., Berg O. (2010): Comparative susceptibility of turbot, halibut, and cod yolk-sac larvae to challenge with Vibrio spp. Diseases of Aquatic Organisms **89**: 29-37.

Sitjà- Bobadilla A., Zarza C., Fouz B. (2014): Pathology. U: Sánchez- Vázquez F.J., Muñoz-Cueto J.A. (ur) Biology of European Sea bass.Boca Raton, CRC Press, str: 287-341.

Strunjak- Perović I., Hacmanjek M., Čož-Rakovec R., Teskeredžić E., Teskeredžić Z., Topić-Popović N. (1997): Bakterijske bolesti morskih riba. Ribarstvo **55**: 147-160.

Teskeredžić E., Fijan N. (1977): Uzgoj morskih riba u kavezima. Morsko ribarstvo **2**: 46.

Thompson L.F., Iida T., Swings J. (2004): Biodiversity of Vibrios. Microbiology and Molecular Biology Reviews **63**: 403-431.

Thorarinsson R., Powell D.B. (2006): Effects of disease risk, vaccine efficacy, and market price on the economics of fish vaccination. Aquaculture **259**, 42-49.

Tison D.L., Nishibuchi M., Greenwood J.D., Seidler R.J. (1982): *Vibrio vulnificus* biogroup 2: a new biogroup pathogenic for eels. Applied an Environmental Microbiology **44**:640-646.

Toranzo A.E., Margarinos B., Romalde J.L. (2005): A review of the main bacterial diseases in mariculture systems. Aquaculture **246**: 37-61.

Toranzo A.E., Romalde J.L., Margarinos B., Barja J.L. (2009): Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. Options Méditerranéennes, A. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture **86**: 155-176.

Treer T., Safner R., Aničić I., Lovrinov M. (1995): Ribarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb, str: 168-171; 359-378.

Wardle R. (1996): Vaccination strategies for the prevention and control of diseases of farmed sea bass, bream and turbot. International Workshop on "Fish Health Management in Sea Bass and Sea Bream Farming". Malta

Wilson K.H., Blitchington R.B., Greene R.C. (1990): Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiolgy **28:** 1942-1946.

Xiao P., Mo Z.L., Mao Y.X., Wang C.L., Zou Y.X., Li J. (2009): Detection of *Vibrio anguillarum* by PCR amplification of *empA* gene. Journal of Fish Diseases **32**: 293-296.

Zrnčić S. (1999): Patomorfološka, epizootiološka i bakteriološka istraživanja vibrioze lubina (*Dicentrarchus labrax,* L.) iz uzgoja u hrvatskom priobalju. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu

Zrnčić S., Oraić D., Pleadin J., Mihaljević Ž., Cvitić I. (2013): Učinkovitost docjepljivanja lubina (*Dicentrarhus labrax,* L.) u uzgojnim uvjetima. Veterinarska stanica **44**: 141-147.

OSOBNE INFORMACIJE

Veić Tina

Šibenska 51, 21000 Split (Hrvatska)

+385 98 200 114

veic.tina@gmail.com

RADNO ISKUSTVO

01/03/2016–06/2016 — **Volonter**

Hrvatski veterinarski institut, Laboratorij za patologiju riba, Zagreb (Hrvatska)

-sudjelovanje u laboratorijskoj obradi uzoraka vezanih za morsku bakteriologiju

-samostalno izvođenje potrebnih biokemijskih i molekularnih testova za karakterizaciju bakterijskih sojeva

2013–2014 — **Volonter**

Oceanus, Split (Hrvatska)

- sudjelovanje u izradi projekta "Volim more" te vođenje radionica na tu temu

OBRAZOVANJE I OSPOSOBLJAVANJE

01/10/2014–danas — **Kandidat za stjecanje zvanja Magistrica ekologije i zaštite prirode**

Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Diplomski studij Ekologija i zaštita prirode, Zagreb (Hrvatska)

- kolegiji vezani za bioraznolikost i ugrožene vrste, ekotoksikologiju, zaštitu okoliša, mikrobiologiju, biologiju i ekologiju mora, uporabu GIS-a u biologiji, laboratorijske vježe

01/10/2011–01/10/2014 — **univ. bacc. biol. oecol. mar**

Sveučilišni odjel za studije mora, Preddiplomski studij Biologija i ekologija mora, Split (Hrvatska)

- stečena titula sveučilišne prvostupnice biologije i ekologije mora

-kolegiji vezani za biologiju, kemiju i fiziku; stručni predmeti iz biologije i ekologije mora; laboratorijske vježbe

OSOBNE VJEŠTINE

Materinski jezik: Hrvatski

Ostali jezici

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
engleski	C2	C2	C1	C1	C1
talijanski	A2	B1	B1	B1	B1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

-dobre komunikacijske vještine stečene tokom vođenja radionica

-sposobnost rada u timu

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

-članica sam BIUS-a, udruge studenata biologije
- članica sam Oceanus-a, studentske organizacije studenata Sveučilišnog odjela za studije mora
-organizator radionica za djecu u osnovnoj školi na temu "Volim more"

Digitalna kompetencija

SAMOPROCJENA				
Obrada informacija	Komunikacija	Stvaranje sadržaja	Sigurnost	Rješavanje problema
Iskusni korisnik	Iskusni korisnik	Samostalni korisnik	Samostalni korisnik	Temeljni korisnik

Informacijsko-komunikacijske tehnologije - tablica za samoprocjenu

-odlično znanje iz Microsoft office programskog paketa, GIS-a te online baza podataka koje sam stekla tokom svog obrazovanja

Vozačka dozvola

B