

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Kruno Bonačić

Infekcija mladi lubina *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) bakterijom *Vibrio alginolyticus* kao posljedica stresa uzrokovanog tehnološkim pogreškama i nepravilnom manipulacijom

DIPLOMSKI RAD

Mentor:

doc. dr. sc. Jurica Jug-Dujaković

Dubrovnik, 2009.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jurice Jug-Dujakovića, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

Želim se zahvaliti svom mentoru, doc. dr. sc. Jurici Jugu-Dujakoviću na ostvarivanju svih uvjeta za izradu ovog rada. Veliko hvala i na stručnim i temeljitim predavanjima, vrijednim savjetima i uvijek inovativnom pristupu obrađivanoj temi na osnovi kojih sam izgradio nova stajališta i poglede na akvakulturu tijekom studiranja.

Posebno se želim zahvaliti i mr. sc. Ani Gavrilović na nesebičnom pomaganju u obavljanju praktičnog i pismenog dijela rada. Njena predanost, profesionalnost i potpora u izradi ovog rada je bila nezamjenjiva.

Nadalje, želim se zahvaliti prof. dr. sc. Bošku Skaramuci na pružanju potpore i korisnim savjetima tijekom izrade ovog rada, te ostvarivanju uvjeta za njegov završetak.

Veliko hvala dr.sc. Eminu Teskeredžiću, voditelju Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičnih organizama Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, te njegovim suradnicima; Damiru Kapetanoviću dr. vet. med., na mikrobiološkoj analizi uzoraka i izradi antibiograma i mr. sc. Ireni Vardić na identifikaciji patogena PCR metodom. Osobito zahvaljujem, mr. sc. Ivoni Milić-Beran na pomoći oko statističke obrade podataka, te bac. Jošku Bobanoviću i svim zaposlenicima MARIBIC-a na pomoći pri rukovanju s ribom.

Na kraju moram spomenuti svoju djevojku, obitelj, kolege i prijatelje koji su sa mnom dijelili mnoge lijepe trenutke, a one teške uvijek činili malo lakšima. Njima posvećujem ovaj rad.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. STRES I POJAVA BOLESTI	2
1.1.1. <i>Uzrok stresa</i>	2
1.1.2. <i>Ponašanje ribe</i>	3
1.1.3. <i>Fiziološka reakcija na stres</i>	3
1.1.4. <i>Otpor, iscrpljenost i bolest</i>	4
1.1.5. <i>Obrana od bolesti</i>	4
1.1.6. <i>Učinak stresa na zaštitne barijere prirođenog imuniteta</i>	6
1.1.7. <i>Učinak stresa na stečenu imunost</i>	7
1.1.8. <i>Otpornost na bolest</i>	7
1.1.9. <i>Tijek bolesti</i>	7
1.2. PREVENCIJA STRESA	8
1.3. PREVENCIJA BOLESTI	10
1.4. BOLESTI LUBINA.....	11
1.4.1. <i>Zarazne i nametničke bolesti</i>	11
1.4.2. <i>Bolesti nezarazne etiologije</i>	13
1.4.3. <i>Zarazne i nametničke bolesti lubina na hrvatskim uzgajalištima</i>	14
1.4.4. <i>Vibrioza</i>	15
2. MATERIJALI I METODE	18
2.1. PRIHVAT BOLESNE MLAĐI I POSTAVLJANJE POKUSA	18
2.2. SLANJE UZORAKA NA MIKROBIOLOŠKU PRETRAGU	18
2.3. IDENTIFIKACIJA UZROČNIKA MIKROBIOLOŠKIM METODAMA	19
2.4. ANTIBIOGRAM.....	19
2.5. IDENTIFIKACIJA PATOGENA PCR METODOM.....	20
2.6. PRAĆENJE PREŽIVLJAVANJA MLAĐI TIJEKOM TERAPIJE	21
3. REZULTATI	22
3.1. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA	22
3.2. ANTIBIOGRAM.....	23
3.3. IDENTIFIKACIJA PATOGENA PCR METODOM.....	23
3.4. REZULTATI PREŽIVLJAVANJA MLAĐI TIJEKOM TERAPIJE	25
4. RASPRAVA	28
4.1. STRES KAO PREDUVJET ZA NASTANAK INFEKCIJE	28
4.2. AMBIJENTALNI UVJETI ZA RAZVOJ BOLESTI.....	30
4.3. KLINIČKI SIMPTOMI BOLESTI.....	30
4.4. IDENTIFIKACIJA UZROČNIKA I ANTIBIOGRAM.....	31
4.5. TERAPIJA I TIJEK BOLESTI	32
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA	36

Sažetak

Infekcija mlađi lubina bakterijom *Vibrio alginolyticus* kao posljedica stresa uzrokovanog tehnološkim pogreškama i nepravilnom manipulacijom

Mlađ lubina *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) u hrvatskim mrjestilištima, nakon stresa uzrokovanog transportom i manipulacijom, često obolijeva od vibrioze nedovoljno istražene etiologije. Infekcije su do sada uglavnom pripisivane bakterijama iz roda *Vibrio* i liječene bez pravilno određene terapije (antibiograma) s formaldehidom i trimetosulom. U ovom istraživanju su znakovi pojave bolesti uočeni nakon transporta ribe iz mrjestilišta u uzgojne bazene s optimalnom kvalitetom morske vode temperature od 18 – 20 °C. Neposredno nakon pojave simptoma bolesti (u svibnju 2009.) uzročnik je izoliran iz oboljele mlađi lubina mase 1 – 2 g i potom je obavljena PCR identifikacija i napravljen antibiogram. Uzročnik infekcije je identificiran kao bakterija *Vibrio alginolyticus* koji se sve češće opisuje kao uzročnik oboljenja lubina i komarče na uzgajalištima u Sredozemlju, dok u hrvatskim uzgajalištima i mrjestilištima do sada nije bio zabilježen. Od niza testiranih antibiotika, patogen je pokazao najveću osjetljivost na flumekvin (AR₃₀), a nešto manju prema nedopuštenom kloramfenikolu (C₃₀) i oksitetraciklinu (T₃₀). Mlađ je uspješno liječena flumekvinom u dozi od 3 g aktivne supstance / 100 kg ribe, te kroz period od 10 dana pokazala smrtnost od 29,4%, dok je uzorak liječen formaldehidom i trimetosulom pokazao smrtnost od 62,3%. Ovim je radom dokazana mogućnost uspješne identifikacije ove vrste bakterije i određen je uspješan tretman flumekvinom, te bi u budućim slučajevima pojave sličnih simptoma u uzgoju trebalo primijeniti opisani postupak.

Ključne riječi: mlađ lubina / stres / vibrioza / *Vibrio alginolyticus* / tretman antibioticima

Infection of European sea bass juveniles with *Vibrio alginolyticus* as a result of stress caused by faults in technology and improper handling

Outbreaks of a vibriosis with an insufficiently identified etiology are occurring in sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) hatcheries along the coast of Croatia as a result of stress caused by transport and manipulation of juvenile fish. Infections have been attributed to species from the genus *Vibrio* and treated, without determining the proper therapy (antibiogram), with a combination of formaldehyde and trimethosul. In this study, symptoms of vibriosis were recorded after transporting juvenile fish from a hatchery to culture tanks with optimal seawater quality and a temperature of 18 – 20 °C. At the first sign of disease (in May 2009), the pathogen was isolated from infected sea bass juveniles weighting 1 – 2 g, identified using PCR and tested for sensitivity to antibiotics. The infective agent was identified as *Vibrio alginolyticus*, frequently described as the cause of disease outbreaks in sea bass and sea bream farms across the Mediterranean, while not determined as a cause of disease in Croatian aquaculture facilities so far. Antibiotic sensitivity tests of the bacteria indicated that the isolate was highly sensitive to flumequine (AR30) and somewhat less sensitive to the not permitted chloramphenicol (C30) and oxytetracycline (T30). The fish was successfully treated with a flumequine dose of 3 g of active substance / 100 kg of fish over a 10 day period. Fish treated with flumequine exhibited a total mortality of 29,4%, while fish treated with a combination of formaldehyde and trimethosul had a total mortality of 62,3%. This study confirms the possibility of successful identification of this species of bacteria and provides an efficient antibiotic treatment. In future cases of the occurrence of similar symptoms in aquaculture farms, it would be advisable to apply the described procedure.

Keywords: sea bass juveniles / stress / vibriosis / *Vibrio alginolyticus* / antibiotic treatment

1. Uvod

Uzgoj bijele morske ribe u Republici Hrvatskoj se prvenstveno zasniva na uzgoju lubina *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) i komarče *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758) (Katavić, 2004). Prema podacima Državnog zavoda za statistiku (DZS, 2009) u 2008 akvakulturna proizvodnja bijele ribe u Hrvatskoj iznosila je 4.500 tona, od toga 2.700 tona lubina i 1.800 tona komarče (tablica 1.). Proizvodnja mlađi provodi se u jednom većem i tri manja mrjestilišta i danas se ukupno proizvede oko 10.000.000 komada mlađi lubina i komarče godišnje (Jug-Dujaković, 2008).

Tablica 1. Akvakulturna proizvodnja lubina i komarče u Hrvatskoj od 1999. do 2008. (DZS, 2009).

Godina	Komarča	Lubin	Ukupno
1999	450	1300	1750
2000	800	1300	2100
2001	800	1700	2500
2002	700	1800	2500
2003	850	1573	2423
2004	700	2300	3000
2005	1000	2000	3000
2006	1050	2400	3450
2007	1150	2800	3950
2008	1800	2700	4500

Od samog početka uzgoja morskih riba, osnovni uzrok ekonomskog gubitka u svim svjetskim mrjestilištima i uzgajalištima predstavljaju oboljenja uzgojnih organizama, i to posebno ličinki i mlađi (Kubota i Takakuwa, 1963; Anderson i Conroy, 1970). U ovom smo radu obradili pojavu i razvitak bakterijske bolesti uslijed stresa uzrokovanog propustima u organizaciji, te tehnološkim i sanitarnim rješenjima u uzgojnim sustavima. Potaknuti vrlo čestom pojavom masovnog bakterijskog oboljenja ličinki i mlađi lubina u hrvatskim uzgajalištima, odlučili smo provesti etiološko istraživanje u svrhu otkrivanja točnog uzročnika pojave ove česte bolesti i odgovarajućeg tretmana liječenja.

1.1. Stres i pojava bolesti

1.1.1. Uzrok stresa

Ribe su često izložene stresu u umjetnom uzgoju (uzgajalište, laboratorij), ali i u prirodnom okruženju. Stres je stanje u kojem organizam ne može održavati normalnu unutrašnju ravnotežu, odnosno homeostazu, zbog utjecaja različitih čimbenika. Do njega dolazi kada se ribu stavi u uvjete koji su izvan njenih normalnih granica tolerancije. Postoji niz uzročnika stresa koji se nazivaju stresori, a dijele se na kemijske, biološke, fizikalne i proceduralne (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

Kemijski stresori su:

1. Neodgovarajući sastav i nagle promjene svojstava vode (neprikladan pH, slanost itd.) ,
2. Zagađenost vode otrovnim tvarima (namjerna – tretmani kemoterapeuticima, nenamjerna – pesticidi, izlivanje otpadnih voda koje sadrže organske i anorganske polutante, i dr.),
3. Neodgovarajući ili naglo promijenjen sastav prehrane (vrsta i postotak bjelančevina, aminokiselina i dr.),
4. Visoke koncentracije metaboličkih izlučevina (amonijaka, nitrita, i dr.) (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

Biološki stresori su:

1. Velika gustoća populacije,
2. Inter i intraspecifični socijalni odnosi (agresija, teritorijalnost, prostorne potrebe za plivanje, međusobno netrpeljive vrste, strah od grabežljivaca),
3. Promjene uslijed zaraznih i/ili nametničkih bolesti (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

Fizikalni stresori su:

1. Promjena temperature (čimbenik koji najviše utječe na imuni sustav riba),
2. Osvjetljenje (duljina trajanja i intenzitet) ili boje koje nadražuju,
3. Zvukovi,
4. Otopljeni plinovi (nedostatak kisika, prezasićenost kisikom ili drugim plinovima),
5. Udar električne struje i dr. (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

Proceduralni stresori, ujedno i najčešći uzrok oboljenja riba u uzgajalištima i mrjestilištima, su:

1. Manipulacija tijekom uzgoja (selekcija, premještanje ribe u drugi kavez ili bazen, izlov i dr.),
2. Manipulacija tijekom prijevoza,
3. Tretmani kod bolesti (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

1.1.2. Ponašanje ribe

Znakovi stresnog stanje riba se vidljivo očituju u promjeni njenog ponašanja. U prirodnom okruženju, to se odnosi na aktivnosti hranjenja, izbjegavanja predatora, lov plijena, migracije i odabira staništa, koje su kritične za preživljavanje jedinki, pa tako i populacije (Little, 2002).

Promjene u ponašanju mogu trajati od par minuta do par tjedana prije nego se vrate u početno stanje, a ovise o snazi i dužini trajanja stresora (Schreck i sur., 1997).

Kao u prirodi, svaka promjena životnih uvjeta unutar bazena, također se odražava na ponašanje riba. Iskusni zaposlenici mogu redovitim pregledima otkriti sve nepravilnosti u uzgojnoj sredini. Prema Moretti i sur. (1999) znakovi normalnog ponašanja zdravih riba su:

- potpuna kontrola plivanja
- uspješno hranjenje
- brza reakcija na iznenadne podražaje (npr. na zamah rukom poviše bazena)
- pravilna obojenost (srebrno siva umjesto crna)
- okupljanje ispod hranilica
- zauzimanje čitavog volumen bazena
- izostanak okupljanja oko dovoda svježje morske vode ili izvora zraka, odnosno kisika (javlja se kod manjka kisika u bazenu)

1.1.3. Fiziološka reakcija na stres

Pri odgovoru na stresore glavnu ulogu imaju osovine mozak – simpatički živčani sustav – kromafinske stanice, te mozak - hipofiza – interrenalne stanice (Wendelar Bonga, 1997). Brzo izlučivanje katekolaminskih hormona iz kromafinskih stanica u bubregu uzrokuje trenutnu pripravnost za visoki stupanj aktivnosti i bijeg, a kortikosteroidi iz interrenalnih stanica u bubregu upravljaju sporijim promjenama. (Wendelar Bonga, 1997; Fijan, 2006). Dolazi do poremećaja osmoregulacije zbog

promjene u metabolizmu minerala. U tom slučaju slatkovodne ribe apsorbiraju veće količine vode iz okoliša, a morske ribe gube vodu iz tijela. Zbog ovog poremećaja ribe trebaju usmjeriti dodatnu energiju u osmoregulaciju. Ujedno dolazi do ubrzanog disanja i povećanja krvnog tlaka, te se rezervni eritrociti otpuštaju u krvotok. Upalna reakcija se ublažava i potiskuje hormonima nadbubrežne žlijezde (Francis-Floyd, 1990; Wendelar Bonga, 1997; Fijan 2006).

1.1.4. Otpor, iscrpljenost i bolest

Ako je riba pod utjecajem stresora može se tek kratko vrijeme ponašati i izgledati normalno, no ubrzano troši svoje energetske zalihe. To je tzv. faza otpora. Kada se energetske zalihe iscrpe, a prilagodba na nove uvjete nije uspjela jer su stresori bili previše snažni ili je organizam predugo bio njima podvrgnut, dolazi do iscrpljenosti organizma i podložnosti bolesti (Francis-Floyd, 1990).

Bolest je stanje poremećenosti životnih procesa i nastaje kad štetni čimbenici oštete i aktiviraju, nadvladaju ili onesposobe obrambeni sustav jedinke (Fijan, 2006).

1.1.5. Obrana od bolesti

Infektivni organizmi koji uzrokuju bolesti su najčešće prisutni u svim površinskim vodama (Conte, 1992). Kada su ribe pod stresom, njihova sposobnost da se obrane od napada patogena je oslabljena, pa se stres i njegovi uzroci smatraju glavnim čimbenikom koji pridonosi pojavi bolesti riba u uzgoju (Iwama i sur., 1997). Uzročnici bolesti ulaze u organizam kroz oštećene vanjske površine – kožu, škrge, sluznice osjetnih organa, probavni sustav i tako dalje. Oni koji žive ili se umnažaju u unutrašnjim organima ribe moraju nakon prihvaćanja prodrijeti kroz neku od površina i svladati taj dio obrane organizma (Fijan, 2006).

Riblja sluz je fizička barijera koja sprječava ulazak patogena iz okoliša u ribu. Također je i kemijska barijera jer sadrži enzime (lizozime) i antitijela (imunoglobuline) koji mogu inaktivirati invazivne organizme. Sluz omogućuje ribi lakše kretanje kroz vodeni medij, te je važna i za osmoregulaciju (Francis-Floyd, 1990; Ellis, 2001; Fijan, 2006).

Ljuske i koža također djeluju kao fizička barijera koja ribu štiti od ozljeda. Kada dođe do njihova oštećenja, otvorena su vrata svim patogenim organizmima u okolišu da započnu infekciju (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

Uravnoteženost sastava i količine prirodne bakterijske mikroflore kože, škruga i probavnog sustava je važna za održavanje normalnog stanja tih površina. Mikroflora djeluje antagonistički na bakterijske uzročnike bolesti, a njena neuravnoteženost može biti štetna. Poremećaj mikroflore u probavnom sustavu može biti izazvan primjenom antibiotika i sličnih lijekova u hrani, te greškama u hranidbi, dok poremećaj flore kože i škruga najčešće nastaje pri neprikladnom sastavu i zagađenosti vode (Shephard, 1994; Ellis, 2001; Fijan, 2006).

Sami ulazak uzročnika bolesti u organizam ne znači nužno i njezinu pojavu. Pojava bolesti ovisi o snazi obrambenog sustava ribe. Obrambeni sustav ili imunitet se obično dijeli na prirođeni i stečeni. Ipak, novija istraživanja imunoloških sustava riba i viših kralježnjaka pokazuju sve veću povezanost i isprepletenost ova dva sustava. Prirođeni imunološki odgovor uglavnom se javlja prije stečenog, aktivira stečeni i određuje njegov način ispoljavanja, te pripomaže u održavanju homeostaze (Fearon i Locksley, 1996; Fearon, 1997).

Iako ima ograničen mehanizam prepoznavanja patogena, učinkovitost prirođenog imuniteta u borbi protiv patogena je dojmjljiva. On je od osobite važnosti za borbu protiv infekcija kod riba. Razlog tome je intristična neučinkovitost stečenog imuniteta zbog evolutivnog položaja riba, te njihove poikilotermne prirode. Ovo rezultira ograničenom raznolikošću antitijela, sazrijevanju afiniteta i pamćenja, te sporom proliferacijom limfocita. Stoga je stečeni imuni sustav kod riba spor (do 12 tjedana) u odnosu na trenutačni i relativno temperaturno neovisni urođeni imunitet (Alexander i Ingram, 1992; Ellis, 2001; Du Pasquier, 1982). Komponente prirođenog imuniteta se najčešće dijele na fizičke barijere, te stanične i humoralne čimbenike (Magnadóttir, 2006).

Upala je nespecifični, odnosno prirođeni stanični odgovor upalnih stanica na uzročnika bolesti. To može biti bakterija, virus, nametnik, gljivica ili toksin. Upalu karakteriziraju bol, otekline, crvenilo, užarenost i gubitak funkcije (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006). To je zaštitni odgovor tijela kojim pokušava: ograditi i uništiti invazivne organizme sa svrhom usporavanja širenja štete od fizičkih i bioloških uzroka, uništiti ili ukloniti uzrok oštećenja, te nadomjestiti propale stanice i dovesti do ozdravljenja (Fijan, 2006). U prirođeni stanični imunitet se ubrajaju fagocitne stanice (neutrofili i makrofagi), nespecifične citotoksične stanice (Evans i sur., 2001; Neumann i sur., 2001), te epitelne i dentritičke stanice (Press i sur., 1994; Dalmo i sur., 1996; Ganassin i Bols, 1996).

Humoralni odgovor se odnosi na otopljene makromolekule u krvi, limfi i međustaničnoj tekućini koje reagiraju s infektivnim česticama ili organizmima i čine ih pogodnim za fagocitozu (Fijan, 2006).

Antitijela (specifični, stečeni stanični odgovor) su molekule koje su posebno sintetizirane da se bore protiv određenog invazivnog proteina ili organizama. Do njihove sinteze dolazi kada riba prvi put dođe u dodir s invazivnim organizmom, te štite ribu od budućih infekcija od strane istog patogena. Izlaganje ribe subletalnim koncentracijama patogena je od iznimne važnosti za razvijanje njenog imunološkog sustava. Riba uzgojena u sterilnom okolišu će imati jako slabu zaštitu od bolesti. Također, mlade jedinke mogu biti podložnije bolestima od starijih jer još nemaju dovoljno razvijen imunološki sustav (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

1.1.6. Učinak stresa na zaštitne barijere prirodnog imuniteta

Svaki stres uzrokuje promjenu kemijskog sastava sluzi koja obavija ribu i tako smanjuje njenu učinkovitost protiv invazivnih organizama. Stres poremeti normalan omjer elektrolita (Na^+ , K i Cl) što rezultira većom apsorpcijom vode kod slatkovodnih riba, te dehidracijom kod morskih. Raste potreba za osmoregulacijskom aktivnošću sluzi (Francis-Floyd, 1990).

Stres uzrokovan nestručnom manipulacijom potpomognut je fizičkim odstranjivanjem sluzi s ribe. Ovim je degradirana kemijska zaštita i osmoregulacijska funkcija sluzi (u trenu kada je najviše potrebna). Također je smanjena podmazanost površine tijela ribe što dovodi do većeg trenja i otežanog kretanja kroz vodeni medij i rezultira potrošnjom dodatne energije (u trenu kada se energetske zalihe metaboliziraju). Na kraju, odstranjena je fizička barijera koja sprječava ulazak invazivnih organizama. Do poremećaja lučenja sluzi dolazi i pri raznim kemijskim tretmanima, kao na primjer kod primjene lijekova (Francis-Floyd, 1990).

Ljuske i koža riba se najčešće oštećuju pri nepravilnoj manipulaciji. Svaka otpala ljuska i napuknuće kože omogućuje invazivnim organizmima lakši ulazak u tijelo. Oštećenja mogu uzrokovati i druge ribe, ali i razni nametnici (Francis-Floyd, 1990).

Ribe s mnogo nametnika često uginu od sekundarnih bakterijskih infekcija; prisutnost nametnika, posljedična mehanička oštećenja i stanje stresa olakšavaju

bakterijama iz okolnog medija da napadnu ribu i uzrokuju letalnu bolest (Francis-Floyd, 1990).

1.1.7. Učinak stresa na stečenu imunost

Brojni ambijentalni čimbenici utječu na stečenu imunost. Tako primjerice, temperaturni stres pri naglom padu temperature ili koncentracije kisika u moru drastično smanjuje sposobnost otpuštanja antitijela. Ovo uzrokuje kašnjenje imunološkog odgovora, što često daje invazivnim organizmima priliku da se razmnože do te mjere da preplave ribu i uzrokuju bolest (Francis-Floyd, 1990).

Kratkoročno držanje riba u velikoj gustoći unutar uzgojnog sustava će već uzrokovati smanjenje fagocitne aktivnosti leukocita, te stvoriti stanje imunodepresije (Ortuño i sur., 2001).

Stres koji traje kroz duži period vremena, također znatno smanjuje učinkovitost specifičnog imunološkog odgovora, čime je, opet, povećana mogućnost invazivnog organizma da uzrokuje bolest (Francis-Floyd, 1990).

1.1.8. Otpornost na bolest

Kada dođe do pojave bolesti unutar neke populacije, ne obolijevaju i ugibaju odmah sve ribe. Mnogo je čimbenika koji utječu na imuni odgovor pojedinih jedinki na potencijalne patogene. Patogen (virus, bakterija ili nametnik) mora biti sposoban uzrokovati bolest, domaćin (riba) mora biti u osjetljivom stanju i određeni okolišni čimbenici moraju biti prikladni da bi došlo do pojave bolesti (Francis-Floyd, 1990).

1.1.9. Tijek bolesti

Tijekom bolesti odvijaju se dva procesa: s jedne strane štetni čimbenik oštećuje organizam ili neki njegov dio, a s druge strane obrambeni sustav i obnavljanje tkiva nastoje neutralizirati štetni čimbenik i oštećenja. Kada obrambeni sustav nadvlada uzrok bolesti, riba će ozdraviti. Ako obrana posve oslabi, oporavak postaje nemoguć i uginuće je neminovno (Fijan, 2006).

1.2. Prevencija stresa

Iako je nemoguće izbjeći stres pri rukovanju ribom, potrebno ga je svesti na minimum. U tu svrhu su uvedene određene smjernice kako bi se pomoglo uzgajivačima da što više ublaže čimbenike stresa kojima su izloženi uzgajani organizmi. Konkretno, za prijenos ribe iz ličinačkih bazena u bazene za mlađ navode se slijedeće mjere koje se mogu primijeniti i kod svakog drugog rukovanja ribom (Moretti i sur., 1999):

- dan prije pripremiti svu opremu, dobro je očistiti i dezinficirati
- svaki zaposlenik mora biti dobro uvježban i točno znati svoje obveze kako bi se postupak obavio što brže i sa što manje oštećenja organizama
- ako je moguće, obaviti prijenos rano u jutro (kada je temperatura niža, posebno u ljetnim mjesecima)
- 3 do 4 dana prije, ribe bi trebale primiti povećanu dozu vitamina C (do 10.000 mg/kg hrane) u svojoj prehrani
- ne hraniti ribu 24 sata prije prijenosa
- temeljito očistiti dno bazena prije prikupljanja ribe kako se ne bi zagadio prijenosni medij
- treba imati zalihu čistog kisika u blizini u slučaju nužde
- treba pokušati ne dodirivati ribu, te ne dopustiti da iskače ili se zadržava izvan vode
- nikad se ne smije staviti prevelika koncentracija riba u jedan spremnik
- ne dopustiti da prljava voda uđe u bazene za mlađ, te da posude u kojima se prenose dodirnu pod prije uranjanja
- što više skratiti period u kojem su ribe bez aeracije i izmjene vode
- kada dođu u novu sredinu, potrebno je nahraniti ribu što je prije moguće, kako bi se izbjegao kanibalizam
- odmah nakon prijenosa hraniti s mnogo žive hrane (metanauplijima artemije) kako bi se brzo oporavile (Moretti i sur., 1999).

Selektiranje se obavezno treba provoditi jer čak i ribe iz istog mrijesta pokazuju različite stope rasta, što rezultira da se u jednom bazenu istodobno nalaze ribe koje su duplo veće od drugih. Agresivno ponašanje većih riba, te neprirodne grupacije unutar bazena ubrzo dovode do kanibalizma (Moretti i sur., 1999). Kod vrste *Lates calcarifer* (Bloch, 1790) zabilježeno je da žrtve kanibalizma mogu biti 61 -

67% veličine napadača (Parazo i sur., 1990). Preporuča se da varijacija u veličini mlađi unutar jednog bazena bude manje od 10% (Moretti i sur., 1999).

Ako se ne kontrolira, kanibalizam može postati bitan uzročnik stresa i smrtnosti. Uz socijalni stres, napadnute jedinke zadobivaju i mehanička oštećenja što otvara put patogenim organizmima da započnu sekundarne infekcije. Najbolje rješenje je redovito selektiranje ribe i odvajanje u homogene veličinske kategorije. Selektiranje se postiže prolaskom ribe kroz niz sortirki različite veličine. To su najčešće plastične posude koje umjesto dna imaju rešetke od nehrđajućeg čelika. Udaljenost između šipki je kalibrirana prema veličini ribe koja može proći (Moretti i sur., 1999).

Ispravan proces selektiranja je slijedeći:

- prikupiti svu ribu iz bazena i držati je u plutajućem kavezu (PVC okvir i mreža malog oka)
- postaviti još 2 plutajuća kaveza u bazen, te u njih staviti 2 sortirke jednu u drugoj (sortirka s većim otvorima je na vrhu, a s manjim na dnu)
- skupiti mrežicom prikupljenu ribu i polako je ulijevati u naslagane sortirke
- lagano pomicati sortirke da ribe lakše prođu kroz rešetke
- ribe iz gornje sortirke prebaciti u jedan plutajući kavez ili ravno u predviđeni bazen
- ponoviti s drugom sortirkom
- najmanje ribe prođu obje sortirke i tada se nalaze u plutajućem kavezu, te ih se prebacuje u predviđeni bazen
- ponoviti proceduru dok sve ribe nisu sortirane
- pri rukovanju ribom, držati se mjera opreza prethodno navedenih za njihov prijenos (Moretti i sur., 1999).

Kada riba dosegne veličinu od 2 do 5 g, izlovljava se iz bazena za mlađ i prebacuje u kaveze u moru ili bazene za predrast. Prijenos riba unutar farme gdje se nalazi i mrjestilište je jako kratko i ne zahtijeva posebnu opremu. Ribe se obično stavljaju u cilindrične spremnike koji se prevoze traktorom ili malim kamionom do odredišta. Voda se obogaćuje kisikom kao mjera sigurnosti (Moretti i sur., 1999).

Ako je uzgajalište jako udaljeno od mrjestilišta, prijenos je znatno zakompliciran. Prijevoz ribe na udaljene lokacije je višedijelna procedura koju treba detaljno osmisлити kako bi se minimalizirao stres (Piper i sur., 1982).

Najčešći način transporta ribe je u spremnicima s izolacijom koji su ugrađeni ili samo postavljeni na kamione. Ovi spremnici mogu biti spojeni na uređaje za aeraciju ili oksigenaciju, hlađenje, te automatski monitoring otopljenog kisika i temperature.

Još jedan način da se mlađ prevozi je u plastičnim vrećama koje su 1/3 ispunjene morskom vodom, a 2/3 čistim kisikom. Vreće se stavljaju u kutije izolirane polistirenom kako bi se temperatura održala niskom tijekom prijevoza. Ovo funkcionira, ali nije praktično kada su u pitanju velike količine mlađi jer je ovaj način pakiranja poprilično skup i dugog trajanja. Najčešće se koristi za zračni prijevoz vrijednog i malog biološkog materijala, kao što su post-ličinke kozica, tropske ribice ili riblja ikra (Moretti i sur., 1999).

Kako bi se spriječio dodatan stres, potrebno je držati se mjera opreza koje su navedene za prijenos mlađi iz ličinačkih bazena u bazene za mlađ. Zahtjeva se veoma strogo pridržavanje ovih mjera zbog dugog vremena prijevoza - od nekoliko sati do nekoliko dana (Moretti i sur., 1999).

1.3. Prevencija bolesti

Uzgojni sustavi bi se trebali pridržavati smjernica za prevenciju bolesti, koje uključuju: pravilno održavanje kvalitete vode, odgovarajuću prehranu, karantenu novih uzgojnih organizama, te ispravne sanitarne procedure (Francis-Floyd, 2001).

U kopnenim sustavima, povećano opterećenje organskim tvarima, uzrokovano visokom stopom hranjenja i gustim nasadima organizama, omogućava bujanje bakterija, gljivica i nametnika. Kako bi se ovo svelo na minimum, potrebno je izmjenu vode prilagoditi gustoći nasada i stopi hranjenja. Nadalje, uzgojni sustav mora biti dizajniran kako bi se izbjeglo da jedna uzgojna jedinica prima vodu puštenu iz druge. Također, potrebno je redovito uklanjati partikularnu tvar (izmet, nepojedenu hranu, itd.). Uginula riba je često prijenosnik zaraznih bolesti i onečišćuje vodu dok se raspada, pa ju je potrebno što prije ukloniti (Francis-Floyd, 2001).

Sanitarne procedure uključuju dezinfekciju opreme za više uzgojnih jedinica, čistoću i prevenciju prijenosa bolesti putem opreme, osoblja ili vode. Jako je važno da se sva oprema za čišćenje bazena kemijski dezinficira nakon svake upotrebe i između različitih uzgojnih jedinica. Dezinfekcijske barijere, te mjesta gdje zaposlenici mogu oprati ruke dezinfekcijskim sapunom je potrebno postaviti na ulazu u zgradu, te između prostorija. Jednostavan način dezinfekcije opreme za čišćenje je da se poslije

korištenja odlažu ili uranjaju u posude s dezinficijensom. Preporuča se opremu uranjati u otopinu klora koncentracije od 200 mg/l u trajanju od 30 do 60 minuta ili koncentracije od 100 mg/l u trajanju od nekoliko sati. Klor se nakon toga može neutralizirati dodavanjem natrijevog tiosulfata; 15 g natrijevog tiosulfata će neutralizirati klor u 10 litara otopine od 200 mg/l (Francis-Floyd, 2001). Uzgojni medij se može dezinficirati s klorom ili jodom, ali zbog mogućih negativnih sekundarnih učinaka (Pilkington, 1995), te otežane kontinuirane dezinfekcije, danas se najviše koriste dezinfekcijski tretmani ozonom ili UV zračenjem, naročito za recirkulacijske sustave (Losordo i sur., 1999).

Mnogi autori su opisali živu hranu kao bitan vektor unosa bakterija u uzgojni sustav (May, 1973; Sera i Kumata, 1972; Campbell i Buswell, 1983; Muroga i sur., 1987) i to posebno putem artemije (Chair i sur., 1994; Grisez i sur., 1996), dok drugi opisuju algalne kulture kao pogodno mjesto za razvoj patogenih bakterija, naročito kod uzgoja kozica i školjkaša za čije se potrebe dodaju probiotici (Simon, 1978; Rico-Mora i sur., 1998).

Uspostava prostora za karantenu unutar akvakulturnog postrojenja smanjuje rizik unosa zaraženih organizama u sustav (Stickney, 1994). Osim fizičke izoliranosti od uzgajanih organizama, za pristigle organizme se može koristiti zasebna oprema, osoblje, opskrba vodom i hrana (Lee Delabbio, 2003).

U novije vrijeme cijepljenje je jedna od osnovnih mjera za sprječavanje nekih bakterijskih i virusnih bolesti (Ellis, 1988; Plumb, 1994; Mitchell, 1995). Korištenje cjepiva ne sprječava ulaz patogena, već samo povećava minimalnu infektivnu dozu. Cjepiva su oblik profilaktičkih mjera jer postaju beskorisna nakon pojave infekcije u populaciji (Hastings, 1988).

Danas se koriste i imunomodulatori, odnosno tvari koje mijenjaju stanje imunskog sustava, tj. pojačavaju ili oslabljuju specifičan, nespecifičan ili oba imuna odgovora (Fijan, 2006).

1.4. Bolesti lubina

1.4.1. Zarazne i nametničke bolesti

U tablici 2. su prikazane najznačajnije zarazne i nametničke bolesti lubina, opisani osnovni klinički simptomi, te mjere tretiranja i profilakse.

Tablica 2. Najznačajnije zarazne i nametničke bolesti lubina u uzgoju (www.FAO.org, Cultured Aquatic Species Information Program).

BOLEST	UZROČNIK	TIP	ZNAKOVI	MJERE
Virusna encefaloretinopatija	Nodavirus	Virus	Nervni simptomi	Dobra profilaksa; održavanje optimalnih uvjeta
Vibrioza	<i>Listonella anguillarum</i> ; <i>Vibrio ordalii</i> ; <i>Vibrio</i> spp	Bakterija	Anoreksija; tamnjenje kože; čirevi na koži; napuhivanje trbuha; povećanje slezene; petehijalna krvarenja na crijevima; nekrotični enteritis	Cijepljenje mlađi; tretman antibioticima
Fotobakterioza ili pseudotuberkuloza	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>pasteurella</i>	Bakterija	Anoreksija; tamnjenje; povećanje slezene; milijarne lezije slezene ili granulomatoza slezene (kronični oblik)	Tretman antibioticima
Miksobakterioza	<i>Flexibacter maritimus</i>	Bakterija	Čirevi na koži; nekroza; nagrizanje peraja	Tretman antibioticima
Mikobakterioza	<i>Mycobacterium marinum</i>	Bakterija	Mršavljenje; slab rast; hipertrofični bubrezi i slezena s granulomima	Dobra profilaksa
Epiteliocistis	Slično rodu <i>Chlamydia</i>	Bakterija	Milijarne kvržice na koži ili škrgama	Dobra profilaksa
Amilodiniaza	<i>Amyloodinium ocellatum</i>	Dinoflagelat	Tamnjenje kože; dojam da je koža prašnjava (baršunasta bolest)	Tretman slatkom vodom
Kriptokarioniaza	<i>Cryptocaryon irritans</i>	Cilijat	Lezije kože; bijele točke ili bijele mrlje s više žarišta	Tretman slatkom vodom
Skuticilijatoza; druge cilijatoze	<i>Philasterides dicentrarchi</i> ; <i>Uronema</i> sp.; <i>Tetrahytnema</i> sp.	Cilijat	Lezije škrge i kože; depigmentacija; ulceracije; krvarenja na koži	Tretman slatkom vodom
Miksosporidioza	<i>Shaerospora dicentrarchi</i> ; <i>S. testicularis</i> ; <i>Ceratomyxa labraci</i>	Miksosporidij	Smanjena proizvodnja; smanjena stopa rasta; niski mortalitet	Nema tretmana
Mikrosporidioza	<i>Glugea</i> sp.	Mikrosporidij	Smanjena proizvodnja; niski mortalitet	Nema tretmana
Škržne nametničke infekcije	<i>Diplectanum aequans</i> ; <i>D. laubieri</i>	Jednorodni metilij	Zamućenost kože; žarišno crvenilo s viškom proizvodnje sluzi; epitelna hiperplazija; krvarenja škrge	Dobra profilaksa; održavanje optimalnih uvjeta

Infekcija anisakisom	<i>Anisakis</i> spp.	Oblič	Ličinke u trbušnoj šupljini	Dobra profilaksa
Izopodiza	<i>Ceratothoa oestroides</i> ; <i>Nerocilla orbigny</i> ; <i>Anilocra physoides</i>	Izopodni rak	Usporeni rast; nekroza škržnog i kožnog tkiva; odrasle jedinke i ličinke na ribama	Dobra profilaksa

1.4.2. Bolesti nezarazne etiologije

Pored bolesti zarazne etiologije još su češće tzv. «bolesti nezarazne etiologije». Vrlo često ova skupina bolesti predstavlja primarni poremećaj, na koji se zarazne bolesti nadovezuju u obliku sekundarnih infekcija. U njih ubrajamo bolesti prouzročene fizikalnim, kemijsko-toksičnim, biološko-toksičnim, prehrambenim i genetskim čimbenicima. U akvakulturi su najčešće uzrokovane greškama u tehnologiji koje oslabljuju kondiciju, konstituciju, uzrokuju stres ili omogućuju ulazak i umnažanje uzročnika zarazne bolesti. Potrebno je provoditi pravilnu ishranu uzgajanih organizama, održavati optimalne uvjete sredine, paziti na gustoću nasada i općenito pravilno rukovati s ribama (Fijan, 2006).

Najčešće fizičko-kemijske promjene u vodenom okolišu koje se smatraju štetnim za ribe u uzgojnim instalacijama su: nagle promjena temperature, pH i koncentracije otopljenog kisika, povećane koncentracije amonijaka, nitrita, vodikovog sulfida i ugljik-dioksida, te supersaturacija drugim otopljenim plinovima (Alabaster i Lloyd, 1980; Svobodová i sur., 1993).

Prema Moretti i sur. (1999) optimalni uvjeti za uzgoj mlađi lubina su slijedeći:

- Temperatura vode 18 °C - 22 °C
- Slanost 20 - 25 psu
- Ukupni amonijakalni dušik ≤ 1 ppm
- Otopljeni kisik blizu ili preko 100% zasićenja
- Fotoperiod 14 h svjetla : 10 h mraka
- Intenzitet osvjetljenja 1000 luxa
- Postepeno povećanje izmjene vode do razine izmjene cijelog volumena svako 2 sata

Sastojci i količina hrane znatno utječu na fiziološko stanje riba i jačinu njihovog imuniteta. Bolest mogu uzrokovati nepravilan režim hranjenja, nedostatak i neuravnoteženost hranjivih tvari u prehrani, te štetne tvari u hrani (Fijan, 2006).

Režim hranjenja ima utjecaj na učinkovitost rasta i iskorištavanje hrane (Tsevis i sur., 1992; Azzaydi i sur., 2000). Također je važno poznavati optimalni režim hranjenja pri odgovarajućim ambijentalnim uvjetima (posebno temperaturi) kako se ne bi pogoršala kvaliteta uzgojne sredine akumulacijom i razgradnjom nepojedene hrane u sustavu (Kalogeropoulos i sur., 1992; Russell i sur., 1996; Alexis i sur., 1999; Ng i sur., 2000; Mihelakakis i sur., 2002; Webster i sur., 2002; Eroldoğan, 2004).

Nepovoljni okolišni uvjeti i ishrana u ličinačkom razdoblju mogu rezultirati zaostajanjem u razvoju jedinki, slabijom iskoristivošću hrane, nastankom tjelesnih nepravilnosti, te smanjenim preživljavanjem. Neke od nepravilnosti u razvoju koje ujedno smanjuju otpornost organizma i tako pogoduju prodoru patogena u ribu su: usporeno okoštavanje u odnosu na ubrzani rast ličinki uslijed neadekvatne ishrane (Gavrilović i sur., 2009), smanjena kalcifikacija kostiju (Koumoundouros i sur., 2002), povećano opterećenje zbog mišićne aktivnosti koje rezultira poremećajem kalcifikacije osovinskog kostura (Kranenbarg i sur., 2005), pojačana mišićna aktivnost i posljedično zaostajanje u rastu uzrokovano neaktiviranim ribljim mjehurom (Strujić, 2007).

1.4.3. Zarazne i nametničke bolesti lubina na hrvatskim uzgajalištima

Na osnovi sistematskog kliničkog, parazitološkog, patoanatomskog, histopatološkog i bakteriološkog monitoringa uzgajanih riba na hrvatskoj obali Jadrana, Oraić i Zrnčić (1998) su utvrdili specifične virusne, bakterijske i nametničke patogene koji su često imali uspostavljene populacije u uzgojnoj sredini. Kod lubina su najizraženija bila bakterijska oboljenja, i to najviše vrste *Listonella anguillarum*, *Pasteurella piscicida* i *Myxobacteria* spp. (Oraić i Zrnčić, 1998).

Parazitološki pregledi lubina su otkrili vrste *Trichodina* sp. i *Diplectanum* sp. iz skupine protozoa, te vrste *Caligus* sp. i *Lernanthropus* sp. iz potkoljena Crustacea (Oraić i Zrnčić, 1998).

Mladineo (2006) je prva identificirala nametnička oboljenja u kaveznom uzgoju morske ribe na Jadranu. Kod lubina je utvrdila slijedeće vrste: *Amyloodinium ocellatum*, *Cryptocaryon irritans*, *Ceratomyxa sparusaurati*, *Sphaerospora dicentrarchi*, *Polysporoplasma sparis* i *Diplectanum aequans*.

Ekonomski utjecaj virusnih i nametničkih bolesti u hrvatskoj akvakulturi je mali ili još nepotpuno identificiran, no bakterijska oboljenja često uzrokuju veliku smrtnost i ekonomske gubitke, posebno u mrjestilištima i rastilištima.

1.4.4. Vibrioza

Većina vibrija su sekundarni patogeni koji često uzrokuju bolest kada su ribe pod stresom, što rezultira velikim mortalitetom. Zato je vibrioza postala bolest koja uzrokuje najveće ekonomske gubitke u morskom uzgoju ribe (Arulampalam i sur., 1998). Posljednjih godina česta oboljenja ličinki i mlađi lubina s visokim mortalitetima na hrvatskim uzgajalištima i mrjestilištima pripisana su vibriozni nedovoljno razjašnjene etiologije. Naime, smatra se da se ova bakterijska infekcija javlja sekundarno, nakon primarnih nametničkih infekcija na škrgama. Uzgajivači liječenje najčešće provode kombinacijom formaldehida i trimetosula, no bez većeg učinka (Bonačić i Bjelovučić, usmeno priopćenje).

Vibriozu uzrokuju gram-negativne, pokretne bakterije koje su ranije bile svrstane u rod *Vibrio* (neki od tih uzročnika prebačeni su u druge rodove kao što je *Listonella*) (Fijan, 2006). U rod se ubraja više od 60 vrsta, uglavnom morskog porijekla. Iako se radi o brojnoj skupini, za sada je utvrđeno da mali broj vrsta uzrokuje infekcije kod riba. Taksonomija se stalno nadopunjava zbog otkrića novih vrsta (Igbinosa i Okoh, 2008). One su tipičan predstavnik morskih bakterija i rasprostranjene su širom svijeta u moru i sedimentu. To su oksidaza pozitivni i fakultativno anaerobni savijeni štapići. Vezani su uz površinu mnogih morskih životinja i biljaka, kao i otopljene organske tvari. Imaju glavnu ulogu u inicijalnoj kolonizaciji kao simbionti, ali i kao patogeni (Munn, 2004).

Rast vibrija stimuliraju vode bogate hranjivim tvarima, a poznato je kako bogatstvo hranjivim tvarima služi kao jedan od najvažnijih čimbenika koji određuju distribuciju bakterija (Arulampalam i sur., 1998). Većina vrsta je mezofilna, te zahtijeva NaCl (2 - 3%) za rast (Huss i sur., 2003). Dakle, pojava i proliferacija populacija vibrija je vezana za morsku ili boćatu sredinu i sezonskog je karaktera, odnosno ovisi o temperaturi i hranjivim tvarima.

Prema istraživanju koje su proveli Jakšić i sur. (2002) udio pojedinih vrsta iz roda *Vibrio* u uzorcima jadranskih riba, rakova i školjkaša sakupljenih na tržnici bio je slijedeći: *Vibrio parahaemolyticus* 47,83%, *Vibrio vulnificus* 34,78% i *Vibrio*

alginolyticus 3,42%. U Španjolskoj je od 1990. do 1996. značajno porastao postotak izolacije vrste *V. alginolyticus* iz oboljelih komarči i iznosi 13,5% od ukupno 10 identificiranih *Vibrio* vrsta (Balebona i sur., 1998b). U razdoblju od 1996. do 2000., Zorilla i sur. (2003) su nastavili istraživanje, te su zabilježili ponovni porast postotka izolacije vrste *V. alginolyticus* iz oboljelih komarči koji je iznosio 21,35% od svih *Vibrio* vrsta. Ovim udjelom je *V. alginolyticus* postao najčešće izolirana bakterija od svih zabilježenih vrsta u ovom istraživanju.

Vrsta *V. parahaemolyticus* je kao uzročnik humanih gastroenteritisa prvi put izolirana u Japanu (Fujino i sur., 1951). Ova vrsta primarno izaziva bolesti kod ljudi i smatra se da uzrokuje barem četvrtinu svih bolesti uzrokovanih hranom (Feldhusen, 2000). Vrsta *V. vulnificus*, također može izazvati pojavu rana, infekcije tkiva i primarne septikemije kod ljudi s već postojećim bolestima jetre ili ugroženim imunim sustavom. Infekcije su najčešće uzrokovane inficiranjem rana za vrijeme boravka u slanom vodenom okolišu (Jakšić i sur., 2002). *V. alginolyticus*, ali i *V. vulnificus* su poznati po toplovodnim vibriozama koje uzrokuju kod riba (Fijan, 2006).

1.4.4.1. Listoneloza

U ovoj skupini, najopasnija i u cijelom svijetu prisutna bolest riba u marikulturi je listoneloza koju uzrokuje bakterija *Listonella anguillarum* (donedavno *Vibrio anguillarum*). Listoneloza nanosi značajne štete u uzgoju lubina. Iako može biti u bilo koje doba godine nakon stresa (prijevoz, nevrijeme, prekomjerna hranidba, obrasli kavezi, itd.), najčešća je početkom proljeća i pri završetku jeseni, kad su oscilacije temperature mora češće i veće. Pri akutnom septikemijskom tijeku u većih lubina prevladava zacrvenjenost kože i krvarenja na glavi, truhu i oko peraja. Anus je često ispupčen i crven. Škrge i jetra su blijedi, slezena povećana, crijevo katralno upaljeno, a peritoneum posut krvarenjima. Riblji mjehur je proširen pa oboljela riba bezvoljno pliva uz površinu, a lešine plutaju. U oboljelih mladunaca znaci septikemije su obično manje ili slabo izraženi. Smrtnost može doseći i 25 - 35%, naročito u mladunaca (Fijan, 2006).

1.4.4.2. Toplovodne vibrioze

Toplovodne vibrioze javljaju se u nekoliko vrsta riba prouzročene bakterijama *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. splendidus*, *V. fulnisi*, te *Photobacterium*

damselae. Znaci i ostale karakteristike tih bolesti veoma su slični onima kod listoneloze. Mogu prouzročiti značajnu smrtnost. Imunoprofilaksa kod mlađih i starijih jedinki je djelomično uspješna (Fijan, 2006).

2. Materijali i metode

2.1. Prihvat bolesne mlađi i postavljanje pokusa

Riba mase 1 - 2 g je iz mrjestilišta udaljenog 200 km dopremljena krajem svibnja u plastičnim transportnim bazenima u Tehnološki i poslovno – inovacijski centar za marikulturu MARIBIC na daljnji uzgoj u mikrobiološki ispravnoj bušotinskoj vodi konstantne temperature 18 °C – 20 °C i slanosti 30 psu. Tijekom prijevoza koncentracija otopljenog kisika je održavana na optimalnoj razini od 80% do 120% zasićenosti. Dan nakon nasađivanja mlađi u uzgojne bazene, utvrđeni su znaci bolesti koji su se manifestirali promjenom ponašanja i pojavom krvarenja u području glave i repa. Po pojavi prvih simptoma bolesti kontaktiran je tehnolog u mrjestilištu iz kojeg je riba dopremljena. Prema njegovim navodima radilo se o akutnoj vibriozu, koja se javlja gotovo svake godine tijekom proizvodnje mlađi i manifestira prvenstveno na škrgama nakon primarne nametničke infekcije, te predstavlja značajan problem u većini hrvatskih mrjestilišta. Prema rezultatima do sada provedenih analiza u Hrvatskoj i Italiji mlađ je tretirana formaldehidom i trimetosulom. Kako se radi o maloj veličini jedinki, rečeno je da dalja izolacija uzročnika nije moguća, a navedeni tretmani nisu dostatni za iskorjenjivanje bolesti. Naime, bolest se javlja kontinuirano u većini hrvatskih mrjestilišta, pri čemu su mortaliteti izraženi nakon transporta, selekcije i drugih sličnih stresnih situacija (Bonačić i Bjelovučić, usmeno priopćenje).

Odlučili smo dva uzgojna bazena tretirati na opisani način (formaldehidom i trimetosulom), a uzročnika identificirati, te ukoliko se radi o bakteriji napraviti antibiogram kako bi se utvrdio djelotvoran lijek kojim bi se tretirala mlađ u ostalim uzgojnim bazenima. Pri tome, parazitološkom pretragom kože i škrga nije utvrđena nametnička infestacija, te su uzorci poslani na mikrobiološku i PCR dijagnostiku u laboratorij Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta „Ruđer Bošković“.

2.2. Slanje uzoraka na mikrobiološku pretragu

Bolesna mlađ je mrežicom izdvojena iz populacije i pakirana u PVC vreće volumena 50 litara. Vreće su ispunjene 1/3 filtriranom morskom vodom iz uzgojnog sustava. Ostatak volumena je nadopunjen kisikom, te je vrh vreće čvrsto zavezan kako ne bi propustio plin. Vreće su tada položene u termoizolirajuće kutije koje su

ispunjene ledom i termoizolirajućim materijalom za pakiranje. Tako zapakirani uzorci poslani su autobusom na mikrobiološku pretragu. Vrijeme transporta je bilo oko 8 sati.

2.3. Identifikacija uzročnika mikrobiološkim metodama

Inicijalni bakterijski izolati su dobiveni iz homogeniziranog tkiva skupnih uzoraka mlađi. Kako bi se dobilo razrjeđenje 1:10, aseptično izvagano tkivo mlađi je homogenizirano u sterilnim plastičnim vrećicama koristeći primjereni volumen fosfatnog pufera (Phosphate Buffered Saline, Merck). Dobivena suspenzija je serijski razrijeđena upotrebom fosfatnog pufera. Na petrijeve posude s TCBS agarom (Tiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose, BD) inokulirano je po 1 ml serijski razrijeđenog uzorka. Petrijeve posude su inkubirane na $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 24 sata. Dobivene karakteristične kolonije su presađene na podloge s TCBS agarom za identifikaciju (Whitman, 2004).

2.4. Antibiogram

Antibiogram je rađen disk difuzijskom metodom prema Nagliču i sur. (1992), uz upotrebu Mueller-Hinton II agara (BBL). Diskovi s antibioticima su čuvani na temperaturi ispod $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, te pušteni da se zagriju do sobne temperature prije upotrebe. Kako bi se standardizirala gustoća inokulata (0,5 MacFarland standard), korišten je Vitek Systems ATB 1550 (bio Mérieux).

Odabrane su kolonije za inokulaciju na Mueller-Hinton II agaru. Sterilnom bakteriološkom ušicom se dodirnuo vršni dio kolonije, te je prebačen u odgovarajuće ampulice koje su sadržavale 5 ml suspenzionog medija (bio Mérieux). Inokulat, gustoće od 0,5 po McFarland standardu, je upotrebom sterilne plastične pipete nanesen na suhu površinu Mueller-Hinton II agara. Nakon pet minuta, otpipetiran je suvišak bakterijskog inokuluma te su podloge ostavljene par minuta kako bi se osušio višak vlage. Nakon toga su postavljeni diskovi s antimikrobnim tvarima u razmacima većim od 24 mm između njihovih središta.

Petrijeve posude s Mueller-Hinton II agarom su okrenute i stavljene u inkubator na $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon 24 - 48 sati aerobne inkubacije svaka je petrijeva posuda pregledana i ravnalom su izmjereni promjeri zona inhibicije bakterijskog rasta.

Testirana je osjetljivost izoliranih bakterija upotrebom diskova proizvođača BD-BBL: ampicilin (AM₁₀), kloramfenikol (C₃₀), eritromicin (E₁₅), nitrofurantion (F/M₃₀₀), norfloksacin (NOR₁₀), novobiocin (NB₅), oksitetraciklin (T₃₀), penicilin (P₁₀), piperacilin (PIP₁₀₀), sulfametoksazol + trimetoprim (SXT), flumekvin (AR₃₀), tetraciklin (TE₃₀) i trimetoprim (TMP₅).

2.5. Identifikacija patogena PCR metodom

Za identifikaciju izoliranih bakterija upotrijebljena je metoda lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR), kojom su umnoženi dijelovi gena 16S rDNA i podjedinice B DNA giraze (*gyrB*). Ukupna DNA bakterija je izdvojena kompletom DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) prema protokolu proizvođača. U reakciji PCR korišteno je 5 µl DNA u smjesi koja je sadržala: 1 × PCR pufer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 40 pmol početnica, 1 U Platinum Taq DNA polimerazu (Invitrogen) i sterilnu vodu u ukupnom volumenu 50 µl. Upotrijebljene su univerzalne početnice: UL500 5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3' i ULR500 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3' za umnožavanje dijela gena 16S rDNA, te GYR1 5'-CAYGCNNGGNGGNAARTTYGA-3' i GYR1R 5'-CCRTCACRTCCNGCRTCNGT-3' za umnožavanje dijela gena *gyrB* (Avaniss-Aghajani i sur., 1996; Izumi i sur., 2007). Reakcija se sastojala od početnog ciklusa od 5 minuta pri 94 °C, dalje se provodila u 35 ciklusa pri sljedećim uvjetima: 30 sekunda pri 94 °C, 45 sekunda pri 56 °C, 1 minuta pri 72 °C, te je uslijedio završni ciklus od 10 minuta pri 72 °C. Elektroforezom u 1,7% gelu agaroze provjereni su produkti reakcije PCR. Oni su zatim pročišćeni i klonirani, te je plazmid s integriranim PCR produktom upotrijebljen za transformaciju kompetitivnih stanica kompletom TOPO-TA cloning Kit (Invitrogen). Izdvajanje i pročišćavanje plazmidne DNA izvršeno je kompletom PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen), nakon čega je izvršeno određivanje sljedova nukleotida na uređaju ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (DNA Servis, Institut Ruđer Bošković, Hrvatska). Dobiveni sljedovi nukleotida su uspoređeni s postojećim sljedovima u banci podataka GenBank upotrebom programa Blast (Altschul i sur., 1997), te međusobno sravnjeni u programu ClustalX (Thompson i sur., 1997).

2.6. Praćenje preživljavanja mlađi tijekom terapije

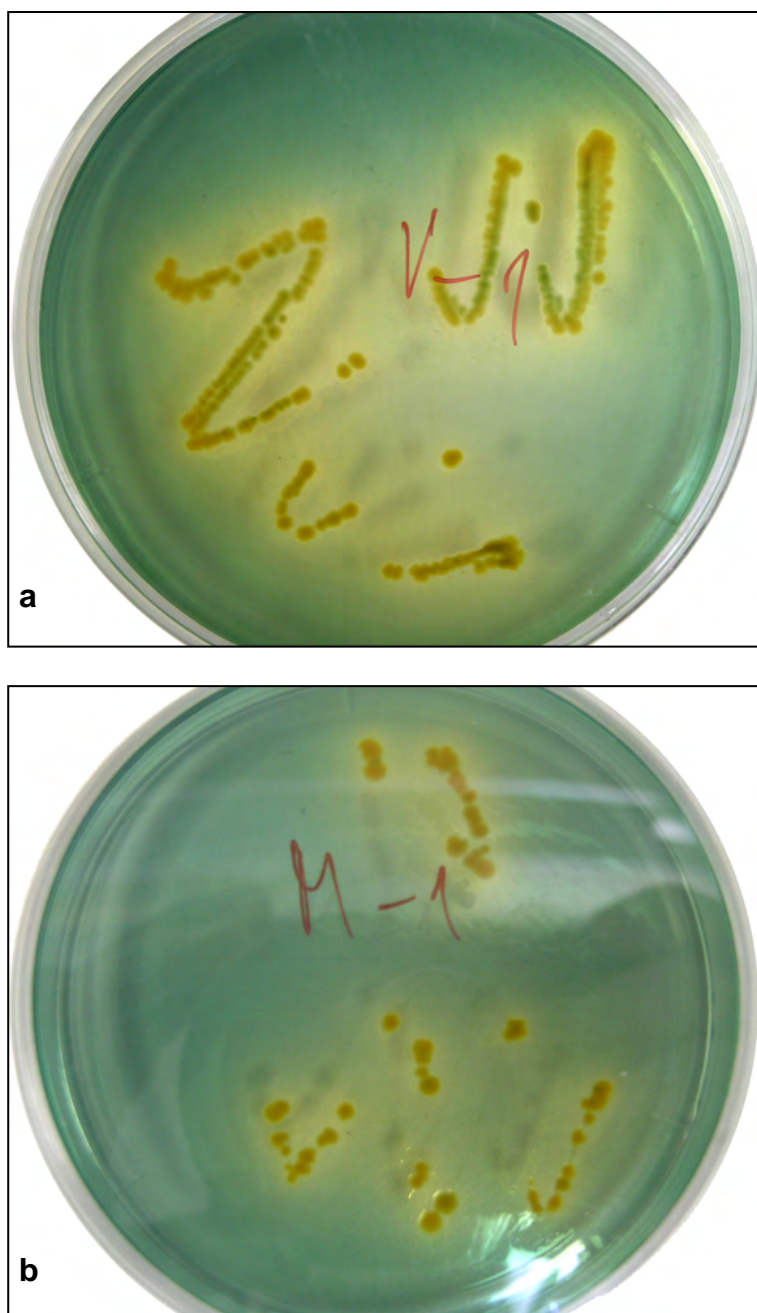
Dva standardna uzgojna bazena koja su sadržavala 25.000 jedinki mlađi lubina tretirana su formaldehidom i trimetosulom, a ostali bazeni (ukupno četiri od kojih su dva uključena u pokus) s istim brojem jedinki tretirani su antibiotikom utvrđenim antibiogramom. Uspješnost terapije je u oba slučaja praćena svakodnevnim brojanjem uginulih riba.

Za testiranje razlika između aritmetičkih sredina i varijance skupina unutar istog tretmana korišteni su Student t-test i ANOVA, dok je usporedba aritmetičkih sredina između različitih tretmana obavljena Student t-testom. Statistička obrada podataka obavljena je u programu SPSS.

3. Rezultati

3.1. Mikrobiološka analiza

Bakteriološkom pretragom homogenata tkiva mlađi nakon inkubacije TCBS podloga na 35 °C kroz 24 sata izolirane su tipične žute kolonije *Vibrio* spp. (slika 1.). Presađene kolonije upotrijebljene su za PCR analizu.



Slika 1. Žute kolonije dobivene iz izolata *Vibrio* spp. (fotografirao: Damir Kapetanović, dr. vet. med).

3.2. Antibiogram

Rezultati antibiograma prikazani su u tablici 3. Najveća osjetljivost izolata *Vibrio* sp. utvrđena je prema flumekvinu, a nešto manja prema kloramfenikolu i oksitetraciklinu (Kapetanović, usmeno priopćenje). Ostali antibakterijski lijekovi pokazali su znatno manju učinkovitost. S obzirom na navedeni rezultat, za terapiju je izabran flumekvin u dozi od 3 g aktivne supstance / 100 kg ribe u trajanju od 8 dana.

Tablica 3. Rezultati antibiograma (Stupanj osjetljivosti: S – osjetljiv, I – srednje osjetljiv, R – neosjetljiv).

ANTIMIKROBNA TVAR	OZNAKA	STUPANJ OSJETLJIVOSTI
Ampicilin	AM10	R
Kloramfenikol	C30	S
Eritromicin	E15	I
Flumekvin	AR30	S
Nitrofurantion	F/M300	I
Norfloxacin	NOR10	I
Novobiocin	NB5	I
Oksitetraciklin	T30	S
Penicilin	P10	R
Piperacilin	PIP100	R
Sulfametoksazol + trimetoprim	SXT	R
Tetraciklin	TE30	I
Trimetoprim	TMP5	R

3.3. Identifikacija patogena PCR metodom

Određivanje nukleotidnih sljedova gena 16S rDNA dužine 500 pb potvrdilo je da su izolirane bakterije pripadnici roda *Vibrio*, ali zbog velike očuvanosti ove regije u jedinkama bakterija unutar istog roda nije bilo moguće odrediti o kojoj se vrsti radi. Analizom nukleotidnih sljedova gena *gyrB* dužine 1200 pb (Slika 3.) izolirane bakterije su identificirane kao sojevi vrste *V. alginolyticus*.

```

2 TACTCGTCACGACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAA
3 TACTCGTCACGACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAA
1 TACTCGTCACGACCGATACCACAACCTAGTGCAGTGTGCTACTTCTTGAGAA
*****

2 GATAGCATCTTGTGCGAACGTGCTTTCTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGG
3 GATAGCATCTTGTGCGAACGTGCTTTCTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGG
1 GATAGCATCTTGTGCGAACGTGCTTTCTCTACGTTAAGAATCTTACCTTTTAGCGGTAGG
*****

2 ATTGCTTGGTTCTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCC
3 ATTGCTTGGTTCTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCC
1 ATCGCTTGGTTCTTACGGTTACGGCCTTGTGTTGCGGAGCCGCTGCCGAATCACCTCC
** *****

2 ACTATGTATAGTTCAGAGAGTGCAGGATCTTTTCTGACAGTCTGCAAGTTTACCTGGA
3 ACTATGTATAGTTCAGAGAGTGCAGGATCTTTTCTGACAGTCTGCAAGTTTACCTGGA
1 ACTATGTATAGTTCAGAGAGTGCAGGATCTTTTCTGACAGTCTGCAAGTTTACCTGGA
*****

2 AGACCAGCTAGGTCTAGTGCACCTTTACGGCGCTCATTTCACGAGCTTTACGCGCAGCT
3 AGACCAGCTAGGTCTAGTGCACCTTTACGGCGCTCATTTCACGAGCTTTACGCGCAGCT
1 AGGCCAGCTAGGTCTAGTGCACCTTTACGGCGCTCATTTCACGAGCTTTACGCGCAGCT
** *****

2 TCACGTGCACGTGCTGCATCGATGATTTTGAACAAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTTC
3 TCACGTGCACGTGCTGCATCGATGATTTTGAACAAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTTC
1 TCACGTGCACGTGCTGCATCGATGATTTTGAACAAACCATCTTCGCTTCTGTCGGGTTTC
*****

2 TCAATCAGGAAGTTCAGACAGTTCACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTTCA
3 TCAATCAGGAAGTTCAGACAGTTCACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTTCA
1 TCAATCAGGAAGTTCAGACAGTTCACCCATTGCAGACTCAACAGCTGATTTCACTTCA
*****

2 GAAGAACTAGTTTGTCTTTGTTGGCTTGAGAATTTAGGATCAGGCACCTTCACCGAA
3 GAAGAACTAGTTTGTCTTTGTTGGCTTGAGAATTTAGGATCAGGCACCTTCACCGAA
1 GAAGAACTAGTTTGTCTTTGTTGGCTTGAGAATTTAGGATCAGGCACCTTCACCGAA
*****

2 ACAACCGCAGTTAGACCTTCACGCGCATCGTCGCCTGAAGTCGCTGTTTCGCTTCTTC
3 ACAACCGCAGTTAGACCTTCACGCGCATCGTCGCCTGAAGTCGCTGTTTCGCTTCTTC
1 ACAACCGCAGTTAGACCTTCACGCGCATCGTCGCCTGAAGTCGCTGTTTCGCTTCTTC
*****

2 GAGAAACCTTCTTATCCATAAAGCTGTTCAATGTACGTGTAGCGCAGCAGGAAACCA
3 GAGAAACCTTCTTATCCATAAAGCTGTTCAATGTACGTGTAGCGCAGCAGGAAACCA
1 GAGAAACCTTCTTATCCATAAAGCTGTTCAATGTACGTGTAGCGCAGCAGGAAACCA
*****

2 GCAAGGTGAGTACCACCATCAGCTGTGGGATATTGTTGGTAAAGCAGAAGATGTTCTCT
3 GCAAGGTGAGTACCACCATCAGCTGTGGGATATTGTTGGTAAAGCAGAAGATGTTCTCT
1 GCAAGGTGAGTACCACCATCAGCTGTGGGATATTGTTGGTAAAGCAGAAGATGTTCTCT
*****

2 TGAAACCATCGTTCATTGCATCGCCACTTCAACTGAAATGCCGCTTCACGCTCAGAG
3 TGAAACCATCGTTCATTGCATCGCCACTTCAACTGAAATGCCGCTTCACGCTCAGAG
1 TGAAACCATCGTTCATTGCATCGCCACTTCAACTGAAATGCCGCTTCACGCTCAGAG
*****

2 TTAAAGTGAAGATTTTTCGATGATTGGCGTTTGTGGTGTGTTAGGTGATCAGCAAC
3 TTAAAGTGAAGATTTTTCGATGATTGGCGTTTGTGGTGTGTTAGGTGATCAGCAAC
1 TTAAAGTGAAGATTTTTCGATGATTGGCGTTTGTGGTGTGTTAGGTGATCAGCAAC
*****

2 GCTTGAATACCACCTTCATACATGAAGTGATCATGTTTGTCCGCTTCACGTTTCAAC
3 GCTTGAATACCACCTTCATACATGAAGTGATCATGTTTGTCCGCTTCACGTTTCAAC
1 GCTTGAATACCACCTTCATACATGAAGTGATCATGTTTGTCCGCTTCACGTTTCAAC
*****

2 AATTTGATCGACACACCAGAGTTCAGGAATGACAGTTCACGAGGCGTTTCGCCAGAATG
3 AATTTGATCGACACACCAGAGTTCAGGAATGACAGTTCACGAGGCGTTTCGCCAGAATG
1 AATTTGATCGACACACCAGAGTTCAGGAATGACAGTTCACGAGGCGTTTCGCCAGAATG
*****

2 TCATAGTGAAGTCAAGTGTAGAGAAGCTTTCGGCACTTGGCCAGAAACGAATTTGTGTA
3 TCATAGTGAAGTCAAGTGTAGAGAAGCTTTCGGCACTTGGCCAGAAACGAATTTGTGTA
1 TCATAGTGAAGTCAAGTGTAGAGAAGCTTTCGGCACTTGGCCAGAAACGAATTTGTGTA
*****

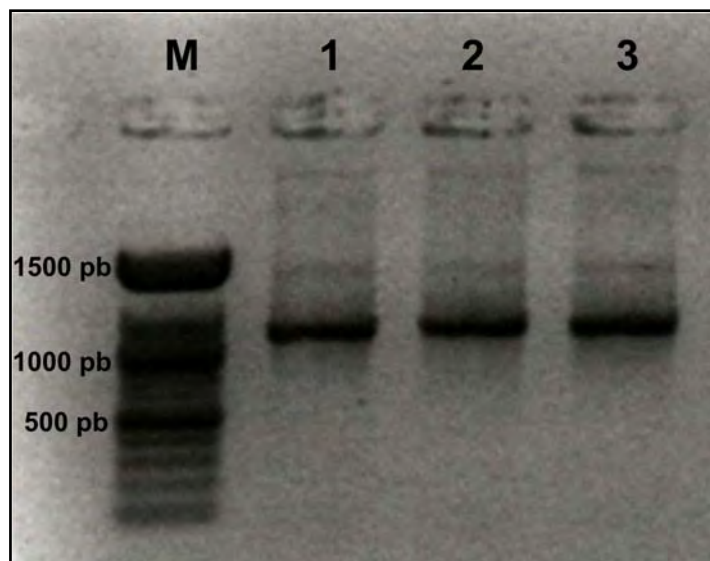
2 CCGGTTTTATCCGATACCCACAACGGCTAGTGGCGCTTGGGCTCACCATGGCGGTAG
3 CCGGTTTTATCCGATACCCACAACGGCTAGTGGCGCTTGGGCTCACCATGGCGGTAG
1 CCGGTTTTATCCGATACCCACAACGGCTAGTGGCGCTTGGGCTCACCATGGCGGTAG
*****

2 GTTTCGATGGATATGGCCACCACGATGAATCGTTAGCTCAACTTCTCTGATAGTGGC
3 GTTTCGATGGATATGGCCACCACGATGAATCGTTAGCTCAACTTCTCTGATAGTGGC
1 GTTTCGATGGATATGGCCACCACGATGAATCGTTAGCTCAACTTCTCTGATAGTGGC
*****

```

Slika 2. Primjer usporedbe sljedova nukleotida gyrB gena u regiji dužine 1080 pb u uzorcima.

Postotak sličnosti između hrvatskih i izolata *V. alginolyticus* iz banke podataka GenBank na temelju sljedova nukleotida gena *gyrB* je iznosio od 96,2% do 99,3%. Na Slici 2. prikazana je usporedba sljedova nukleotida gena *gyrB* između sojeva *V. alginolyticus* izoliranih iz lubina. Razlike u sljedovima nukleotida umnoženog dijela *gyrB* gena iz tri uzorka se kretala od 0,6 – 0,9%.



Slika 3. Elektroforeza u gelu agaroze umnoženih odsječaka gena *gyrB* (dužine oko 1200 pb) iz uzoraka.

3.4. Rezultati preživljavanja mladi tijekom terapije

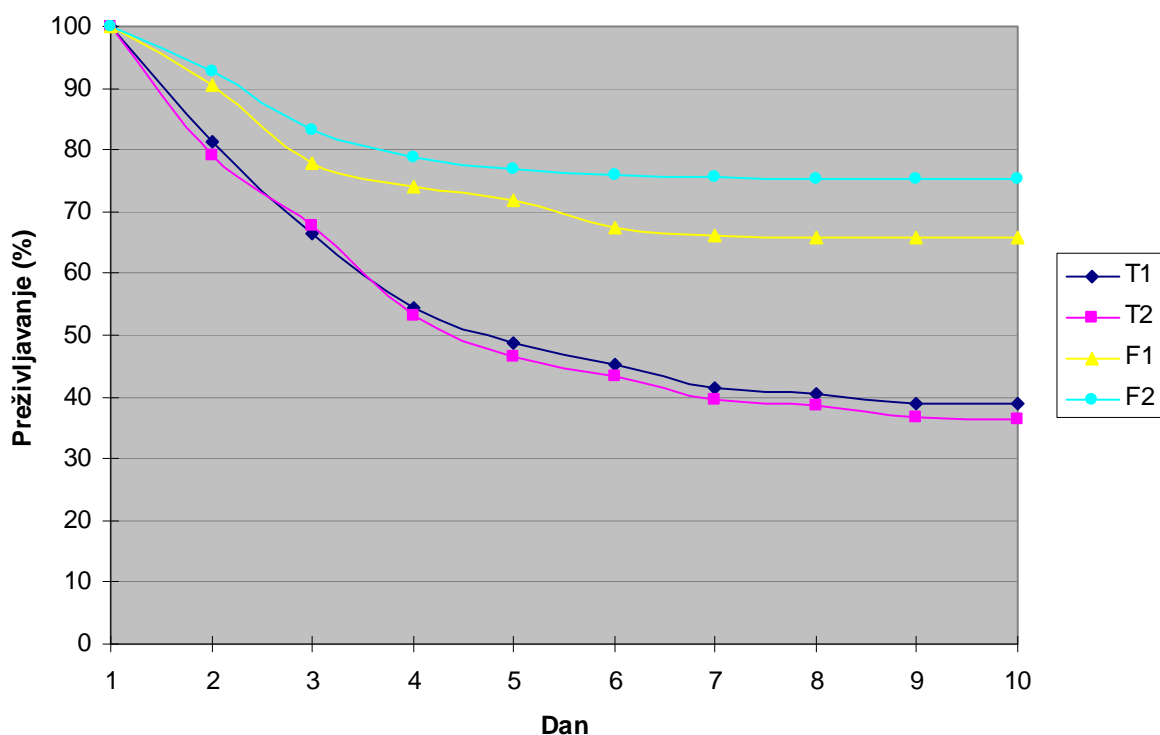
Od početnih 25.000 jedinki mladi po bazenu, nakon perioda od 10 dana u bazenima tretiranim kombinacijom formaldehida i trimetosula uginulo je 61,1% i 63,4% (prosjek 62,3%) jedinki, dok je u bazenima tretiranim flumekvinom uginulo 34,2% i 24,6% (prosjek 29,4%) jedinki (tablica 4.). Na slici 4. je prikazan postotak preživljavanja jedinki tijekom pokusa iz čega su jasno vidljivi bolji rezultati u obje skupine tretirane flumekvinom.

Analiza varijance (ANOVA) uzoraka između bazena tretiranih istim lijekom je za obje terapijske skupine pokazala da ne postoje statistički značajne razlike unutar istog tretmana ($p < 0,001$, $F = 0,889147$ za bazene tretirane kombinacijom formaldehida i trimetosula, $F = 1,66261$ za bazene tretirane flumekvinom). Ujedno je i Student t-test usporedbe prosječne smrtnosti (aritmetičkih sredina) unutar skupina istog tretmana pokazao nepostojanje značajne razlike ($p < 0,001$, $t = 0,07952$ za

bazene tretirane kombinacijom formaldehida i trimetosula, $t = 0,559402$ za bazene tretirane flumekvinom).

Tablica 4. Broj uginulih jedinki po danu pokusa (T1 i T2 su bazeni tretirani kombinacijom formaldehida i trimetosula, F1 i F2 su bazeni tretirani flumekvinom).

Dan	T1	T2	F1	F2
1	0	0	0	0
2	4632	5230	2346	1850
3	3746	2862	3192	2308
4	3015	3646	920	1114
5	1452	1628	585	489
6	846	758	1108	238
7	958	1004	351	121
8	223	236	48	46
9	368	462	0	0
10	40	38	3	0
Ukupno	15280	15864	8553	6166



Slika 4. Preživljavanje (%) mlađi lubina tijekom pokusa (T1 i T2 su bazeni tretirani kombinacijom formaldehida i trimetosula, F1 i F2 su bazeni tretirani flumekvinom).

Usporedba aritmetičkih sredina smrtnosti između različitih terapijskih skupina pokazala je postojanje značajnih razlika između tretmana ($p < 0,05$, $t = -1,988105$). Iz

navedenog je vidljivo da je *V. alginolyticus* statistički značajno osjetljiviji na flumekvin u odnosu na kombinaciju formaldehida i trimetosula.

4. Rasprava

V. alginolyticus se sve češće opisuje kao uzročnik oboljenja na uzgajalištima lubina i komarče u Sredozemlju. U Hrvatskoj su Jakšić i sur. (2002) utvrdili njegovu prisutnost na ribi iz konzuma, dok u uzgoju ovaj uzročnik do sada nije opisan. U hrvatskim mrjestilištima se posljednjih godina u jesen i proljeće sve češće javlja vibrioza nedovoljno razjašnjene etiologije, što bi se s obzirom na rezultate ovog istraživanja moglo pripisati bakteriji *V. alginolyticus*. Tome idu u prilog istraživanja Balebona i sur. (1998b), te Zorilla i sur. (2003) koji navode da udio uzročnika *V. alginolyticus* u populacijama morskih sekundarnih bakterijskih patogena postojano raste, te iako je donedavno bio najčešće utvrđivan kao uzročnik oboljenja kozica (Selvin i Lipton, 2003; Cheng i sur., 2004), već postaje dominantan uzročnik bolesti na mnogim uzgajalištima morske ribe diljem svijeta (Li i sur., 1999; Zorilla i sur., 2003). U skladu s prethodno navedenim, Toranzo i sur. (1994) smatraju da su oboljenja uzrokovana bakterijama drastično porasla uslijed povećanja ličinačke proizvodnje ribe.

4.1. Stres kao preduvjet za nastanak infekcije

U našem je istraživanju nastanku bolesti prethodio stres uslijed transporta i manipulacije. Brojna su istraživanja pokazala da oštećenja tkiva ili smanjenje imuniteta uzrokovani stresom pogoduju nastanku bolesti. To pokazuje i pokus uranjanja u kupku bogatu bakterijom *V. alginolyticus* koji su proveli Balebona i sur. (1998) i pri tome pokazali da je uzročnik patogen za komarču samo kada joj je sloj sluzi odstranjen i koža oštećena. Nadalje, Arulampalam i sur. (1998) su pokazali da se infekcija uzročnikom *V. alginolyticus* javlja sekundarno, odnosno kada je imunitet ribe već oslabljen.

Barton i Iwama (1991) navode da je proceduralni stres najčešći uzrok oboljenja u mnogim mrjestilištima i uzgajalištima. Autori ističu da se treba pridržavati općih smjernica pri rukovanju s ribom, pri čemu su najkritičnije točke u uzgojnom ciklusu: prijenos riba iz ličinačkih bazena u bazene za mlađ, selektiranje i prijevoz mlađi.

Ključ prevencije stresa je pravilna organizacija mrjestilišta ili uzgajališta (Francis-Floyd, 1990). Često preispitivanje i ponovne procjene organizacijskih

protokola jednog sustava pomažu pri obrani od stresa i neophodna su za riblje zdravlje (Conte, 2004). Postignut je znatan napredak kada je riječ o razumijevanju odnosa između specifičnih stresora (ili kombinacija stresora) i specifičnih pojava bolesti (Wedemeyer i sur., 1976; Wedemeyer i McLeay, 1981; Wedemeyer, 1996; Wedemeyer, 1997).

Pravilni organizacijski protokoli se odnose na:

1. održavanje optimalne kvalitete vode,
2. pravilnu prehranu,
3. provođenje pravilnih sanitarnih mjera i
4. pravilno rukovanje ribama (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

Pod održavanjem optimalne kvalitete vode podrazumijeva se sprječavanje akumulacije organskog otpada i otopljenih dušičnih spojeva, održavanje temperature i pH unutar odgovarajućih vrijednosti za uzgajanu vrstu i održavanje koncentracije otopljenog kisika iznad 5 mg/l. Slaba kvaliteta vode je čest i važan stresor kod uzgoja ribe, te prethodi pojavi mnogih bolesti (Alabaster i Lloyd, 1980; Francis-Floyd, 1990; Svobodova i sur., 1993; Fijan, 2006).

Pravilna prehrana je ona koja zadovoljava nutritivne potrebe određene vrste ribe (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006). Važan je omjer vitamina, minerala, ugljikohidrata, lipida i proteina (Colin i sur., 1993), pri čemu posebnu pažnju treba posvetiti kvalitativnim svojstvima aminokiselina, vitamina i visoko nezasićenih masnih kiselina (Cahu i Infante, 2001).

Pravilne sanitarne mjere podrazumijevaju odstranjivanje otpada iz ribljih bazena, dezinfekciju posuda, mreža i svih drugih alata koji se koriste za više uzgojnih jedinica. Organski otpad koji se nakuplja na dnu bazena ili posuda je savršen medij za razmnožavanje gljivica, bakterija i protozoa. Brzo odstranjivanje ovakvih tvari će smanjiti količinu patogena kojima se riba izlaže. Dezinfekcijom posuda i opreme koje se koriste u više uzgojnih jedinica sprječava se prijenos bolesti s jedne populacije riba na drugu (Francis-Floyd, 1990; Fijan, 2006).

U našem se slučaju vodilo računa o održavanju optimalne kvalitete vode, pravilnoj prehrani i provođenju pravilnih sanitarnih mjera, no za pretpostaviti je da su transport i manipulacija ribom pri istovaru bili ključni preduvjet za pojavu bolesti.

Pretpostavci da se veliki dio vibrioza nerazjašnjene etiologije može pripisati uzročniku *V. alginolyticus* idu u prilog i zabilješke tehnologa u hrvatskim mrijestilištima o mortalitetima nakon transporta, selekcije i sličnih stresnih situacija

kojima su prethodili slični simptomi bolesti (Bonačić i Bjelovučić, usmeno priopćenje). Iako je nemoguće izbjeći stres pri rukovanju ribom, potrebno ga je svesti na minimum. U tu svrhu su uvedene određene smjernice kako bi se pomoglo uzgajivačima da što više ublaže čimbenike stresa kojim izlažu uzgajane organizme (Moretti i sur., 1999).

4.2. Ambijentalni uvjeti za razvoj bolesti

U ovom je istraživanju mlađ obolila krajem svibnja, što odgovara sezonalnom karakteru proliferacije vrsta iz roda *Vibrio* (Huss i sur., 2004). Molitoris i sur. (1985) su u Indoneziji pratili distribuciju bakterija *V. alginolyticus* i *V. parahaemolyticus* kod različitih skupina morskih organizama (ribe, lignje, kozice) i u vodi. Od veljače do ožujka 1972. nije zabilježen niti jedan slučaj pojave *V. alginolyticus* u uzorcima morske vode, dok je od rujna do prosinca iste godine, bakterija zabilježena u svim uzorcima. Temperature mora tijekom godine su iznosile od 29 °C do 32 °C.

Temperatura u našem uzgojnom sustavu je bila 18 °C do 20 °C, što je usporedivo s temperaturom od 21,5 °C do 23 °C na Turskom uzgajalištu gdje je *V. alginolyticus* izoliran iz oboljele mlađi mase 0,5 - 1,0 g (Korun, 2007). Ben Kahlanakbi i sur. (2006) su izolirali ovog uzročnika iz nešto većih oboljelih jedinki (20 - 125 g) komarče i lubina, također iz uzgojne sredine temperature od 16 °C do 22 °C, a u daljnjim istraživanjima su ga inkubirali pri temperaturi od 22 °C do 25 °C (Ben Kahlanakbi i sur., 2007). Balebona i sur. (1998) su ispitivanje virulencije *V. alginolyticus* na komarči 5 - 10 g provodili u uvjetima uzgojne temperature od 22 °C. *L. anguillarum* je izoliran u francuskim mrjestilištima iz oboljele mlađi lubina mase 0,2 - 0,5 g koje su uzgajane na temperaturi od 20 °C (Breuil i Haffner, 1989). *V. alginolyticus* izoliran je iz oboljelih kozica *Penaeus monodon* (Fabricius, 1798) u Indiji koje su za potrebe istraživanja držane na 30 ± 2 °C (Selvin i Lipton, 2003).

4.3. Klinički simptomi bolesti

Vanjski znakovi bolesti zaražene mlađi lubina su se manifestirali promjenom ponašanja i pojavom krvarenja u području glave i repa, a kod manjeg broja jedinki utvrđeno je i blago oticanje trbuha. Korun (2007) je na mlađi lubina oboljeloj od *V. alginolyticus* iz Turskih uzgajališta zabilježio pojavu čireva na dorzalnom dijelu tijela,

krvarenja na operkulumu, bjelkastu obojenost trbuha, a nekim je jedinkama virio dio crijeva iz anusa. Balebona i sur. (1998) su na oboljelim komarčama s uzgajališta u Španjolskoj uočili pojavu čireva na koži, vanjska krvarenja, egzoftalmiju, očna krvarenja, tamnu pigmentaciju i oticanje trbuha. Ben Kahla-Nakbi i sur. (2006) su zabilježili vanjska krvarenja, čireve i tamnu pigmentaciju na nešto starijoj oboljeloj mlađi lubina i komarče. Li i sur. (1999) su izolirali bakterije iz roda *Vibrio* s jedinki *Sparus sarba* (Forsskål, 1775) koje su pokazivale upale, krvarenja, gnjiljenje peraja i prekrivenost čirevima. Za pretpostaviti je da na kliničke simptome bolesti utječe soj uzročnika, njegova brojnost u uzgojnom mediju i početak primjene terapije.

4.4. Identifikacija uzročnika i antibiogram

U mikrobiološkoj analizi, izolati su nakon inkubacije stvorili žute kolonije na TCBS agaru što je sukladno rezultatima koje je utvrdio Korun (2007).

Antibiogram je proveden disk difuzijskom metodom prema Naglič i sur. (1992) na Mueller-Hinton II agaru. Od niza antibiotika, protiv inokuliranog patogena, najučinkovitijim se pokazao flumekvin. Zabilježena je i nešto manja osjetljivost patogena na nedopušteni kloramfenikol i oksitetraciklin. Izolirane kolonije su pokazale otpornost prema ampicilinu, eritromicinu, nitrofurantionu, norfloksacinu, novobiocinu, penicilinu, piperacilinu, sulfametoksazolu + trimetoprimu, tetraciklinu i trimetoprimu. Antibiogrami kod drugih istraživanja su pokazali otpornost na ampicilin i trimetoprim, a osjetljivost na flumekvin i oksoličnu kiselinu za *V. alginolyticus* izoliran iz mlađi lubina (Korun, 2007), te osjetljivost na kloramfenikol, ciprofloksacin, nalidiksičnu kiselinu i streptomycin za *V. alginolyticus* izoliran iz kozica *Penaeus monodon* u Indiji (Selvin i Lipton, 2003). U navedenim istraživanjima nisu utvrđivani sojevi, što može biti uzrok blagog nepodudaranja osjetljivosti uzročnika na antibiotike.

U istraživanju koje su proveli Ben Kahla-Nakbi i sur. (2006), na temelju ponavljajućih inter-genskih konsenzus sljedova nukleotida enterobakterija, otkriveno je 19 različitih genotipova *V. alginolyticus* izoliranih s oboljele mlađi lubina i komarče. Većina izolata je bila otporna na bar dva antimikrobna lijeka. Svi izolirani sojevi su bili otporni na ampicilin, 91,17% ih je bilo otporno na nitrofurantion i 35,29% na tetraciklin.

Li i sur. (1999) su izolirali 51 soj bakterija roda *Vibrio* iz oboljelih jedinki vrste *Sparus sarba* na uzgajalištima u Hong Kongu. Sojevi su bili raspoređeni u 7 vrsta, od

kojih je najzastupljenija bila *V. alginolyticus* (47% izolata). Svi su sojevi testirani na 16 antibiotika, te pokazali osjetljivost na streptomycin, nalidiksičnu kiselinu, rifampicin i ceftriakson, dok su skoro svi bili osjetljivi na kloramfenikol (98%), sulfametoksazol (98%) i ceftazidim (96%). 30 je sojeva bilo otporno na ampicilin. 54,9% ih je bilo otporno na amikacin, 58,8% na kantamicin, 76,5% na trimetoprim i 66,7% na cefuroksin.

Pri identifikaciji patogena PCR metodom, potrebno je bilo analizirati nukleotidne sljedove gena *gyrB* dužine 1200 pb kako bi se uspjela odrediti vrsta. Zbog ograničenog vremena, u ovom istraživanju nisu identificirani sojevi uzročnika, te je navedeno ostavljeno za buduće analize. PCR metodu zasnovanu na *gyrB* slijedu gena koristili su Kumar i sur. (2006) za identifikaciju laboratorijskih izolata *V. vulnificus* pri čemu nije bilo unakrsnih reakcija s drugim vrstama unutar ili izvan roda *Vibrio*. Ova jednostavna i specifična metoda se pokazala praktičnim i učinkovitim za ovakve potrebe.

4.5. Terapija i tijek bolesti

Veterinarski lijekovi za ribe i ljekoviti dodatci moraju prije stavljanja u promet biti odobreni u skladu s propisima. Neke tvari koje pri preporučenom načinu upotrebe nisu škodljive za ribu, okoliš ni potrošače ne moraju biti odobrene (npr. kuhinjska sol, octena kiselina itd.) (Fijan, 2006).

U novije vrijeme je osnovno pravilo za upotrebu lijekova primijeniti ih neposredno nakon pojave bolesti (Fijan, 2006), s tim da je potrebno voditi računa o postavljanju rane dijagnoze i što bržem određivanju pravilnog tretmana liječenja (za bakterijske bolesti određivanje antibiograma) riba koje pokazuju simptome. Prije desetak godina, za razliku od navedenog, određeni tretmani ribe kemoterapeuticima redovito su se provodili profilaktički u svakom uzgojnom ciklusu: tretman matičnog jata protiv bakterioza i nametnika, dezinfekcija oplođenih jaja i prevencija bolesti uzrokovanim stresom poslije rukovanja. Budući da je zadnji slučaj od posebnog značaja, preventivni tretmani kemoterapeuticima su se provodili pri prebacivanju riba iz ličinačkih u bazene za mlađ, pri prebacivanju iz bazena za mlađ u bazene za predrast i prije selektiranja. Bili su preporučeni, kemoterapeutici kao što su nitrofurazon, furazolidon i furaltadon (Moretti i sur., 1999), no oni se danas nalaze na popisu farmakološki-djelatnih zabranjenih tvari, zajedno s kloramfenikolom,

kloroformom, klorpromazinom, kolhicinom, dapsonom, dimetridazolom, metronidazolom, i ronidazolom (Narodne novine 75/08, 25/09).

Vodeći se suvremenim smjernicama, u ovom smo istraživanju posebnu pažnju posvetili brzini određivanja uzročnika i najpogodnijeg kemoterapeutika. Kako bi se usporedila djelotvornost terapije koja je do sada najčešće korištena u Hrvatskoj za opisane kliničke simptome (kombinacija formaldehida i trimetosula) i antibiogramom utvrđenog najdjelotvornijeg kemoterapeutika (flumekvina), dva bazena su tretirana s kombinacijom formaldehida i trimetosula, a ostali flumekvinom.

Prosječna ukupna smrtnost riba u bazenima liječenih kombinacijom formaldehida i trimetosula je bila 62,3%, a onih liječenih flumekvinom 29,4% kroz period od 10 dana. Li i sur. (1999) su intraperitonealno injektirali jedinke *Sparus sarba* nizom sojeva iz roda *Vibrio*. Riba injektirane sojevima vrste *V. alginolyticus* su pokazale najveću stopu smrtnosti, pri čemu je najvirulentniji soj uzrokovao smrtnost od 60%. Iako se ne radi o istoj vrsti ribe, očigledno je da se radi o virulentnijem uzročniku na koji kombinacija formaldehida i trimetosula nema značajniji učinak.

Drugi dan nakon početka liječenja, smrtnost riba kod tretmana flumekvinom bila je duplo manja od skupine tretirane kombinacijom formaldehida i trimetosula, nakon čega je uslijedio nagli pad smrtnosti sve dok nije dosegnuta vrijednost od 0% u 9. danu. Postotak dnevne smrtnosti uzorka tretiranog kombinacijom formaldehida i trimetosula je tijekom čitavog trajanja pokusa bio oko 2 puta veći u usporedbi s uzorkom tretiranim flumekvinom. Statistički značajna terapijska efikasnost flumekvina u usporedbi s kombinacijom formaldehida i trimetosula dokazana je Student t-testom.

Pored virulencije uzročnika, pojava bolesti i jačina kliničkih simptoma ovisna je i o količini bakterija u vodi. Srednja 50%-tna letalna doza predstavlja broj bakterija potrebnih da ubiju 50% inokuliranih riba, a izražava se u CFU (colony forming unit) po jedinki ili masi jedinke (Reed i Muench, 1938). Ben Kahla-Nakbi i sur. (2006) su testirali virulenciju sedam sojeva roda *Vibrio* izoliranih iz oboljelih komarča i lubina intraperitonealnim injektiranjem, te pokazali patogenost za lubina i komarču. Srednje 50%-tne letalne doze su bile od $5,01 \times 10^4$ do $6,20 \times 10^7$ CFU/jedinki. Ben Abdallah i sur. (2009) bilježe 50%-tnu letalnu dozu od $1,03 \times 10^5$ do $1,0 \times 10^6$ CFU/jedinki za lubina i komarču za 2 soja *V. alginolyticus*. Kod kozice *Penaeus monodon*, *V. alginolyticus* je najviše uzrokovao sekundarne infekcije, nakon oboljenja od «white spot» bolesti. 50%-tne letalne doze su bile 5×10^6 CFU/jedinki (Selvin i Lipton, 2003). Balebona i sur. (1998) su intraperitonealno injektirali mlađ komarče iz uzgoja

bakterijom *V. alginolyticus*. 50%-tne letalne doze patogena su varirale od $5,4 \times 10^4$ do $1,0 \times 10^6$ CFU/g tjelesne mase. S obzirom na navedeno, možemo pretpostaviti da se u našem slučaju radi o visokoj virulentnosti ili velikoj brojnosti ovog patogena u morskoj vodi.

Iako primjena rezultata ovog istraživanja može doprinijeti smanjivanju ekonomskih gubitaka u hrvatskim mrjestilištima, u narednim istraživanjima bi bilo preporučljivo ispitati soj uzročnika, kao i moguću prevenciju bolesti uzrokovane bakterijom *V. alginolyticus* primjenom imunomodulatora.

Primjena imunomodulatora ispitivana je na kozicama *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) pri čemu je nakon injektiranja natrijevog alginata u koncentraciji od 10 µg/g ili više utvrđena povećana učinkovitost imunološke reakcije na infekciju vrstom *V. alginolyticus* i značajno veća stopa preživljavanja od zaražene netretirane kontrolne grupe (Cheng i sur., 2004). Sličan pokus je proveden na kirnjama *Epinephelus coioides* i *Epinephelus fuscoguttatus* s pozitivnim rezultatima. Kirnja *Epinephelus coioides*, intraperitonealno injektirana s 20 mg natrijeva alginata po kg ribe, te s 30 mg i-karagenana (koloidni pripravak iz crvenih algi) po kg ribe, pokazala je povećanu učinkovitost nespecifičnog imuniteta protiv infekcije vrstom *V. alginolyticus* (Cheng i sur., 2007). Kirnji *Epinephelus fuscoguttatus* su u prehranu dodavani natrijev alginat ili k-karagenan, što se pokazalo dovoljno za borbu protiv infekcije od vrste *V. alginolyticus* već u koncentracijama od 10g/kg i 5 g/kg (Cheng i sur., 2008).

5. Zaključak

Kao i većina vrsta iz roda *Vibrio*, *V. alginolyticus* je najčešće sekundarni patogen i njegovoj proliferaciji u uzgojnim sustavima najviše pogoduje stres uzrokovan tehnološkim pogreškama i nepravilnom manipulacijom organizama u uzgoju.

Nakon provedene mikrobiološke analize i antibiograma, kao uzročnik bakterijske infekcije mlađi lubina, nakon stresa uzrokovanog transportom i manipulacijom, identificirana je vrsta *V. alginolyticus*. Kao odgovarajući antibiotik za njegovo liječenje izabran je flumekvin (AR₃₀).

Infekcije sa sličnim simptomima koje prate proizvodnju lubina u hrvatskim mrjestilištima do sada su uglavnom pripisivane bakteriozi uzrokovanj neidentificiranom vrstom roda *Vibrio* i liječene bez pravilno određene terapije (antibiograma). Za pretpostaviti je da su mnoge od njih bile, kao i u našem slučaju, uzrokovane vrstom *V. alginolyticus* čija je prisutnost utvrđena u Jadranu, no ova bakterija nije prepoznata kao uzročnik bakterijskih infekcija u mrjestilištima i uzgajalištima.

Ovim je radom dokazana mogućnost uspješne identifikacije ove vrste i određen je uspješan tretman flumekvinom, te bi u budućim slučajevima pojave sličnih simptoma u uzgoju trebalo primijeniti opisani postupak.

Ispravnom terapijom bolesti bi se značajno smanjili ekonomski gubitci, te bi se spriječilo stjecanje rezistencije bakterija na kemoterapeutike, a ujedno i doprinijelo boljoj kondiciji i kvaliteti mlađi za daljnji uzgoj.

6. Literatura

- Alabaster, J. S., Lloyd, R., 1980. Water quality criteria for freshwater fish. European Inland Fisheries Advisory Commission Report (FAO). Butterworth. London-Boston, str. 297.
- Alexander J. B., Ingram G. A., 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annu Rev Fish Dis.* 2: 249-279.
- Alexis, M. N., Nengas, I., Fountoulaki, E., Papoutsi, E., Andriopolou, A., Koutsodimou, M., Gaubaudan, J., 1999. Tissue ascorbic acid levels in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) fingerlings fed diet containing different forms of ascorbic acid. *Aquaculture* 179: 447– 456.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J., 1997. Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.
- Anderson, J. I. W., Conroy, D. A., 1970. *Vibrio* diseases in marine fishes. Symposium on Diseases of Fish and Shellfish 53: 266–272.
- Arulampalam, P., Yusoff, M. F., Shariff, M., Law, A. T., Srinivasu Rao, P. S., 1998. Water quality and bacterial populations in a tropical marine cage culture farm. *Aquaculture Research* 29: 617-624.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Holtzman, A., Aronson, T., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Brunk, C. F., 1996. Molecular technique for rapid identification of mycobacteria, *Journal of Clinical Microbiology* 34(1): 98-102.
- Azzaydi, M., Martines, F. J., Zamora, S., Sánchez-Vázquez, F. J., Madrid, J. A., 2000. The influence of nocturnal vs. diurnal feeding condition under winter condition on growth and feed conversion of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 182: 329– 338.
- Balebona, M. C., Andreu, M. J., Bordas, M. A., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A., Borrego, J. J., 1998. Pathogenicity of *V. alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64(11): 4269-4275.
- Balebona, M. C., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A., Borrego, J. J., 1998b. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) in Southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture* 166: 19–35.

- Barton, B. A., Iwama, I. W., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *A. Rev. Fish Dis.* 1: 3–26.
- Ben Abdallah, F., Chaieb, K., Kallel, H., Bakhrouf, A., 2009. RT-PCR assays for in vivo expression of *V. alginolyticus* virulence genes in cultured *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Annals of Microbiology* 59(1): 63-67.
- Ben Kahla-Nakbi, A., Chaieb, K., Besbes, A., Zmantar, T., Bakhrouf, A., 2006. Virulence and enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR of *V. alginolyticus* strains isolated from Tunisian cultured gilthead sea bream and sea bass outbreaks. *Veterinary Microbiology* 117: 321-327.
- Ben Kahla-Nakbi, A., Besbes, A., Chaieb, K., Rouabhia, M., Bakhrouf, A., 2007. Survival of *V. alginolyticus* in seawater and retention of virulence of its starved cells. *Marine Environmental Research* 64: 469-478.
- Breuil, G., Haffner, P., 1989. A field report on vibrio disease of Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the South of France. *Advances in Tropical Aquaculture. Aquacop Ifremer, Actes de Colloque* 9: 161-169.
- Cahu, C., Infante, J. Z., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161-180.
- Campbell, A. C., Buswell, J. A., 1983. The intestinal microflora of farmed Dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *J. Appl. Bacteriol.* 35: 215– 223.
- Chair, M., Dehasque, M., Van Pouke, S., Nelis, H., Sogerloos, P., De Leenheer, A.P., 1994. An oral challenge for turbot larvae with *Vibrio anguillarum*. *Aquac. Int.* 2: 270– 272.
- Cheng, W., Liu, C.-H., Yeh, S.-T., Chen, J.-C., 2004. The immune stimulatory effect of sodium alginate on the white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 17: 41-51.
- Cheng, A.-C., Tu, C.-W., Chen, Y.-Y., Nan, F.-H., Chen, J.-C., 2007. The immunostimulatory effect of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish and Shellfish Immunology* 22: 197-205.
- Cheng, A.-C., Chen, Y.-Y., Chen, J.-C., 2008. Dietary administration of sodium alginate and k-carrageenan enhances the innate immune response of brown-

- marbled grouper *Epinephelus fuscoguttatus* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 121: 206-215.
- Colin, B., Cowey, B., Young Cho, C., 1993. Nutritional requirements of fish. *Proceedings of the Nutrition Society* 52: 417-426.
- Conte, F. S., 1992. Evaluation of a freshwater site for aquaculture potential. Publication WRAC no. 92-101. Western Regional Aquaculture centre. SAD, str. 35.
- Conte, F. S., 2004. Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science* 86(3-4): 205–223.
- Dalmo, R. A., Ingebrigsten, K., Sveinbjornsson, B i Seljelid, R., 1996. Accumulation of Immunomodulatory laminaran (beta (1,3)-D-glucan) in the heart, spleen and kidney of Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J Fish Dis.* 19: 129-136.
- Du Pasquier L., 1982. Antibody diversity in lower vertebrates - why is it so restricted? *Nature* 296: 311-313.
- Državni zavod za statistiku (DZS), 2009. Statistički godišnjak.
- Ellis, A. E., 1988. Fish vaccination. Academic Press. San Diego, California.
- Ellis A. E., 2001. Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol.* 25(8-9): 827 -839.
- Eroldoğan, O. T., Kumlu, M., Aktaş, M., 2004. Optimum feeding rates for European sea bass *Dicentrarchus labrax* L. reared in seawater and freshwater. *Aquaculture* 231: 501-515.
- Evans, D. L., Leary, J. H., Jaso-Friedmann, L., 2001. Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: regulation by programmed cell death. *Dev Comp Immunol.* 25: 791-805.
- Fearon D. T., 1997. Seeking wisdom in innate immunity. *Nature* 388: 323-324.
- Fearon D. T., Locksley R. M., 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272: 50-54.
- Feldhusen, F., 2000. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* 2(13): 1651–1660.
- Fijan, N., 2006. Zaštita zdravlja riba. Gradska i sveučilišna knjižnica Osijek. Osijek: Poljoprivredni fakultet, str. 392.
- Francis-Floyd, R., 1990. Stress – Its Role in Fish Disease. CIR919, Fisheries and Aquatic Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

- Francis-Floyd, R., 2001. Sanitation Practises for Aquaculture Facilities. VM87, Veterinary Medicine-Administration Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Fujino, T., Okuno, Y., Nakada, D., Aoyama, A., Fukai, K., Mukai, T., i Ueho, T., 1951. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning. Journal of the Japan Association of Infection and Diseases 35: 11–12.
- Ganassin, R. C., Bols, N. C., 1996. Development of long-term rainbow trout spleen cultures that are haemopoietic and produce dendritic cells. Fish Shellfish Immunol. 6: 17-34.
- Gavrilović, A., Jug-Dujaković, J., Kužir, S., Gjurčević, E., Stanin, D., Kozarić, Z., 2009. Utjecaj kvalitativno različitih hranidbenih režima na razvoj ličinki lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Zbornik radova 44. hrvatskog i 4. međunarodnog simpozija agronoma, str. 683-686.
- Grisez, L., Chair, M., Sogerloos, P., Ollevier, F., 1996. Mode of infection and spread of *Vibrio anguillarum* in turbot *Scophthalmus maximus* larvae after oral challenge through live feed. Dis. Aquat. Org. 26: 181– 187.
- Hastings, T. S., 1988. Furunculosis vaccines. Academic press. London.
- Huss H. H., Ababouch, L., Gram, L., 2003. Assessment and Management of Seafood Safety and Quality. FAO fisheries technical paper 444. Rome.
- Igbinsosa E. O., Okoh A.I., 2008. Emerging *Vibrio* species: an unending threat to public health in developing countries. Research in Microbiology 159: 495-506.
- Iwama, G. K., Pickering, A. D., Sumpter, J. P., Schreck, C. B., 1997. Fish Stress and Health in Aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series, vol. 62. Cambridge University Press. Velika Britanija, str. 288.
- Izumi, S., Ouchi, S., Kuge, T., Arai, H., Mito, T., Fujii, H., Aranishi, F., Shimizu, A. 2007. PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. Journal of Fish Disease 30: 141-147.
- Jakšić S., Uhitil S., Petrak T., Bažulić D., Gumhalter Karolyi L., 2002. Occurrence of *Vibrio* spp. in sea fish, shrimps and bivalve molluscs harvested from Adriatic sea. Food Control 13: 491-493.
- Jug-Dujaković, J., 2008. Marine fish production. In Croatian fisheries and aquaculture sector study. National fisheries strategy & com project. Agrotech.

- Kalogeropoulos, N., Alexis, M. N., Henderson, R. J., 1992. Effects of dietary soybean and cod-liver oil levels on growth and body composition of gilthead bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 104: 293–308.
- Katavić, I., 2004. Strateške smjernice za razvitak hrvatske marikulture. Izlaganje sa znanstvenog skupa. *Naše more* 51: 1-2.
- Korun, J., 2007. Biochemical Properties and Antibiotic Sensitivities of *V. alginolyticus* Isolated from European Sea Bass Larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.) in Turkey. *Rapp. Comm. int. Mer Medit. Akdeniz University Faculty of Fisheries*, str. 38.
- Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P., Kentouri M., 2002. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture* 209: 49-58.
- Kranenborg, S., Waarsing, J. H., Muller, M., Weinans, H., Van Leeuwen J. L., 2005. Lordotic vertebrae in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) are adapted to increased loads. *J. Biomech.* 38: 1239-1246.
- Kubota, S. S., Takakuwa, M., 1963. Studies on the diseases of marine cultured fishes: I. General description and preliminary discussion of fish diseases in Mie Prefecture. *J. Fac. Fish Prefect. Univ. Mie* 6: 107–124.
- Kumar, H. S., Parvathi, A., Karunasagar, I., Karunasagar, I., 2006. A gyrB-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology* 111: 216–220.
- Lee Delabbio, J., 2003. Biosecurity in the Recirculation Sector of Finfish Aquaculture in the United States and Canada. Dissertation submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and state University, str. 138.
- Li, J., Yie, J., Foo, R. W. T., Ling, J. M. L., Xu, H., Woo, N., Y. S., 1999. Antibiotic Resistance and Plasmid Profiles of *Vibrio* Isolates from Cultured Silver Sea Bream, *Sparus sarba*. *Marine Pollution Bulletin* 39(1-12): 245-249.
- Little, E. E., 2002. Behavioral measures of environmental stressors in fish, *Biological Indicators of Stress in Fish*, 2nd edition. American Fisheries Society. Bethesda, str. 431.
- Losordo, T. M., Masser, M. P., Rakocy, J. E., 1999. Recirculating Aquaculture Tank Production Systems, A Review of Component Options. SRAC Publication No. 453.

- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20: 137-151.
- May, R. C., 1973. Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. *The Early Life History of Fish*. Springer-Verlag. Berlin, str. 3 –19.
- Mihelakakis, A., Tsoikas, C., Yoshimatsu, T., 2002. Optimization of feeding rate of hatchery-produced juvenile gilthead sea bream *Sparus aurata*. *J. World Aquac. Soc.* 33: 169–175.
- Mitchell, H. 1995. Choosing a furunculosis vaccine: points to consider. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada* 95(3): 30-37.
- Mladineo, I., 2006. Parasites of Adriatic cage reared fish. *Acta adriatica* 47(1): 23-28.
- Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Cittolin, G., Guidastrì, R., 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream, Vol. 1. FAO, Rome. Italy, str. 194.
- Molitoris, E., Joseph, S. W., Krichevsky, M. I., Sindhuhardja, W., Colwell, R. R., 1985. Characterization and Distribution of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* Isolated in Indonesia. *Applied and Environmental Microbiology* 50(6): 1388-1394.
- Muroga, K., Higashi, M., Keetoku, H., 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65: 79–88.
- Munn, C. B., 2004. *Marine microbiology: ecology and applications*. Bios Scientific Publishers, str. 282.
- Naglić, T., Hajsig, D., Madić, J., Pinter, Lj., 1992. *Praktikum opće mikrobiologije i imunologije*. Školska knjiga. Zagreb, str. 83.
- Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev Comp Immunol.* 25: 807-825.
- Ng, W. K., Lu, K. S., Hashim, R., Ali, A., 2000. Effects of feeding rate on growth, feed utilization and body composition of a tropical bagrid catfish. *Aquac. Int.* 8: 19–29.
- Oraić, D., Zrnčić, S., 1998. The Most Prevalent Diseases in Cultivated Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) and Sea Bream (*Sparus aurata*) in Fish Farms Along the Croatian Coast. *Proceedings of the Third International Symposium on Aquatic Animal Health*, Baltimore, Maryland, SAD: ARC Press, 1998, str. 208.

- Ortuño, J., Esteban, M. A., Meseguer, J., 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish and Shellfish Immunology* 11(2): 187-197.
- Parazo, M. M., Garcia, L. M. B., Ayson, F. G., Fermin, A. C., Almendras, J. M. E., 1990. Sea bass hatchery operations. *Aquaculture Extension Manual* no. 18. Southeast Asian Fisheries Development Center, Aquaculture Dept. Tigbauan (Philippines), str. 38.
- Pilkington, N. H. 1995. Disinfection: an Overview. *Modern Techniques in Water and Wastewater Treatment*, CSIRO Publishing. East Melbourne, str. 75-79.
- Piper, R. G., McElwain, I. B., Orme, L. E., McCraren, J. P., Fowler, L. G., Leonard, J. R., 1982. *Fish Hatchery Management*. American Fisheries Society, Bethesda, MD. SAD, str. 517.
- Plumb, J. A., 1994. Health maintenance of cultured fishes: Principal microbial diseases. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, str. 254.
- Press, Mc L., Dannevig, B. H., Landsverk, T., 1994. Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 4: 79-93.
- Reed, L. J., Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 27: 493–497.
- Rico-Mora, R., Voltolina, D., Villaescusa-Celaya, J. A., 1998. Biological control of *V. alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. *Aquaculture engineering* 19: 1-6.
- Russell, N. R., Fish, J. D., Wootton, R. J., 1996. Feeding and growth of juvenile sea bass: the effect of ration and temperature on growth rate and efficiency. *J. Fish Biol.* 49: 206– 220.
- Schreck, C. B., Olla, B. L., i Davis. M. W., 1997. Behavioral responses to stress, *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press. Cambridge, str. 119.
- Selvin, J., Lipton, A. P., 2003. *V. alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* 57: 147-150.
- Sera, H., Kumata, M., 1972. Bacterial flora in the digestive tract of marine fish. Bacterial flora of fish, red seabream snapper and crimson sea bream, fed three kind of diets. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38: 50– 55.

- Shephard, K. L., 1994. Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4: 401-429.
- Simon, C. M., 1978. The culture of the diatom *Chaetoceros gracilis* and its use as a food for penaeid protozoal larvae. *Aquaculture* 14(2): 105–113.
- Stickney, R. 1994. *Principles of aquaculture*. John Wiley & Sons. New York.
- Strujić, J., 2007. Deformacije kralježnice kod komarče (*Sparus aurata* L.) i lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Diplomski rad, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, str. 27.
- Svobodová, Z., Lloyd, R., Máchová, J., Vykusová, B., 1993. Water quality and fish health. EIFAC Technical Paper. No. 54. FAO. Rome, str. 59.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Toranzo, A. E., Barja, J. L., Devesa, S., 1994. An overview of the main infectious problems in cultured turbot: present status and future necessities. *Eur. Aquac. Soc., Spec. Publ.* 22: 106–126.
- Tsevis, N., Klaoudatos, S., Conides, A., 1992. Food conversion budget in sea bass *Dicentrarchus labrax*, fingerlings under two different feeding frequency patterns. *Aquaculture* 101: 293–304.
- Webster, C. D., Thompson, K. R., Muzinic, L., 2002. Feeding fish and how feeding frequency affects sunshine bass. *World Aquac.* 33: 20–24.
- Wedemeyer, G. A., Meyer, F. B., Smith, L., 1976. *Environmental Stress and Fish Diseases*. TFH Publications, Neptune. New Jersey, str. 192.
- Wedemeyer, G. A., 1996. *Physiology of Fish in Intensive Culture Systems*. Chapman & Hall, ITP. New York, str. 232.
- Wedemeyer, G. A., 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture. *Fish Stress and Health in Aquaculture. Soc. Exp. Biol. Semin. Ser.* 62. Cambridge University Press, UK. 35–71.
- Wedemeyer, G. A., McLeay, D. J., 1981. *Stress in Fish*. Academic Press. London, str. 247–273.
- Wendelaar Bonga S. E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Review* 77: 592-625.

- Whitman, A. K., 2004. Finfish and shellfish bacteriology manual: Techniques and procedures. A Blackwell Publishing company. Iowa State Press, str. 258.
- Zorilla, I., Chabrillón, M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M. C., Moriñigo, M. A., 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. Aquaculture 218: 11-20.