

Prisutnost bakterija otpornih na antibiotike kao dijela mikroflore uzgojenog lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Ramljak, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:709931>

Rights / Prava: [In copyright](#)/Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ana Ramljak

**Prisutnost bakterija otpornih na antibiotike kao dijela mikroflore
uzgojenog lubina (*Dicentrarchus labrax*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Damira Kapetanovića, uz suvoditelja dr. sc. Tomislava Ivankovića, doc. s Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Najprije se želim zahvaliti svom mentoru, dr. sc. Damiru Kapetanoviću s Instituta Ruđer Bošković, na iznimnom trudu, pomoći, motiviranosti i strpljenju tijekom izrade ovog diplomskog rada, kao i na pruženoj prilici i povjerenju.

Zahvaljujem se i suvoditelju dr. sc. Tomislavu Ivankoviću s Biološkog odsjeka PMF-a na susretljivosti i pomoći. Hvala što ste me kroz svoj rad, još na prvoj godini studija, zainteresirali za mikrobiologiju.

Želim se zahvaliti i svim djelatnicima Laboratorija za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama koji su uvijek bili spremni pomoći, a posebice dr. sc. Ireni Vardić Smrzlić, doktorandici Anamariji Koldi, mag. oecol. te stručnom suradniku Franu Barcu, dr. med. vet.

Veliko hvala i dr. sc. Ines Sviličić Petrić iz Laboratorija za okolišnu mikrobiologiju i biotehnologiju na pruženoj prilici za odrađivanje prakse na Institutu, motivaciji, pomoći i savjetima oko diplomskog rada te na upoznavanju s mentorom.

I na kraju, hvala mojim roditeljima i sestri na podršci i ohrabrivanju svih ovih godina.

Ovaj rad je u potpunosti financiran od strane Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta IP-2018-01-3150: Prilagodba uzgoja bijele ribe klimatskim promjenama – AqADAPT.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

PRISUTNOST BAKTERIJA OTPORNIH NA ANTIBIOTIKE KAO DIJELA MIKROFLORE UZGOJENOG LUBINA (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Ana Ramljak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Važnost akvakulture u proizvodnji hrane sve je veća, a među vrstama ribe koje se najviše uzgajaju u Jadranskom moru je lubin (*Dicentrarchus labrax*). Za liječenje oboljelih riba u uzgajalištima koriste se antibiotici koji doprinose otpornosti bakterija iz okoliša na antibiotike. Cilj rada bio je usporediti sastav mikrobnih zajednica u uzgajalištima sa i bez primjene antibiotika. Istaknuta je mikrobnja zajednica kože lubina zbog važnosti za obranu organizma od patogena. Uzorkovanje je provedeno tijekom ljeta na uzgajalištima kod otoka Cresa i otoka Vrgade. Obavljena je fizikalno-kemijska analiza morske vode te mikrobiološka analiza kože, morske vode i sedimenta. Ispitana je otpornost bakterija na antibiotike i provedena je izolacija bakterijske DNA. Bakterije su identificirane određivanjem slijedova nukleotida gena 16S rRNA umnoženih u lančanoj reakciji polimerazom (PCR). U uzorcima morske vode, sedimenta i brisevima kože identificirano je 55 bakterijskih vrsta, većinom specifičnih za svaki tip uzorka. Uspoređujući uzgajališta, jedini zajednički rodovi u brisevima kože bili su *Pseudomonas* i *Vibrio*, dok za otpornost bakterijskih izolata s kože nije utvrđena statistički značajna razlika ($p < 0,05$). *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum* i *V. harveyi* patogene su bakterije identificirane u brisevima kože s utvrđenom otpornošću na određene antibiotike. Rezultati ukazuju na potencijalan problem u uzgajalištima u slučaju pojave bolesti.

(50 stranica, 20 slika, 11 tablica, 39 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: akvakultura, lubin, otpornost na antibiotike

Voditelj: dr. sc. Damir Kapetanović

Suvoditelj: dr. sc. Tomislav Ivanković, doc.

Ocjenitelji:

dr. sc. Jasna Hrenović, prof.

dr. sc. Sandra Radić Brkanjac, izv. prof.

dr. sc. Ivan Čanjevac, doc.

dr. sc. Kristina Pikelj, doc.

Zamjena: dr. sc. Neven Bočić, izv. prof.

Rad prihvaćen: 03. rujna 2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

PRESENCE OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA AS PART OF THE MICROFLORA OF FARMED EUROPEAN SEABASS (*DICENTRARCHUS LABRAX*)

Ana Ramljak
Rooseveltovo trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The importance of aquaculture is continually increasing in the food-producing sector, and one of the most farmed fish in Adriatic Sea is European seabass (*Dicentrarchus labrax*). Antibiotics are used for treatment of diseased fish in aquaculture, thus contributing to the spread of antibiotic resistance among environmental bacteria. The aim of this paper is to compare microbial communities between two fish farms, one which uses antibiotics for treatment and the other one which holds antibiotic-free certificate. Skin microbiome is highlighted due to the role of skin in defense against pathogens. Samples were collected during summer from two fish farms, near island Cres and near island Vrgada. Physico-chemical analysis of seawater was performed, as well as microbiological analysis of skin swabs, seawater and sediment. The antibiotic susceptibility test and bacterial DNA extraction were also performed. Bacteria identification was performed with determining the nucleic acid sequence of 16S rRNA gene amplified in polymerase chain reaction (PCR). There were 55 bacteria species identified in skin swabs, seawater and sediment samples. Species were mostly specific to each sample type. Only two bacterial genera, *Pseudomonas* and *Vibrio*, were identified in skin swabs samples from both fish farms. There was no statistically significant difference ($p < 0,05$) in antibiotic resistance of bacterial isolates from skin swabs between two fish farms. Pathogenic bacteria identified in skin swabs were *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum* and *V. harveyi*, and showed resistance to certain antibiotics. The results indicate a potential problem for fish health management in case of disease outbreak.

(50 pages, 20 figures, 11 tables, 39 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: aquaculture, European seabass, antibiotic resistance

Supervisor: Dr. Damir Kapetanović

Cosupervisor: Dr. Tomislav Ivanković, Asst. Prof.

Reviewers:

Dr. Jasna Hrenović, Prof.

Dr. Sandra Radić Brkanjac, Assoc. Prof.

Dr. Ivan Čanjevac, Asst. Prof.

Dr. Kristina Pikelj, Asst. Prof.

Substitute: Dr. Neven Bočić, Assoc. Prof.

Thesis accepted: 3th of September 2020

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Akvakultura i primjena antibiotika..... | 1 |
| 1.2. Uzgoj lubina u Hrvatskoj | 3 |
| 1.3. Prethodna istraživanja | 4 |
| 1.3.1. Uloga kože riba u imunološkom sustavu riba..... | 4 |
| 1.3.2. Mikroflora kože..... | 5 |
| 1.4. Cilj istraživanja | 6 |
| 2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA | 7 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 10 |
| 3.1. Indikatorski organizam – lubin (<i>Dicentrarchus labrax</i>)..... | 10 |
| 3.2. Uzorkovanje kože riba, morske vode i sedimenta | 11 |
| 3.3. Fizikalno-kemijska analiza morske vode | 12 |
| 3.4. Mikrobiološka analiza kože, morske vode i sedimenta | 12 |
| 3.5. Izolacija bakterija..... | 14 |
| 3.6. Određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike | 15 |
| 3.7. Izolacija DNA..... | 16 |
| 3.8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)..... | 17 |
| 3.9. Elektroforeza..... | 18 |
| 3.10. Sekvenciranje DNA | 18 |
| 3.11. Statistička analiza..... | 19 |
| 4. REZULTATI | 20 |
| 4.1. Rezultati fizikalno-kemijske analize morske vode | 20 |
| 4.2. Rezultati mikrobiološke analize iz briseva kože, morske vode i sedimenta | 21 |
| 4.3. Rezultati zdravstvenog pregleda lubina..... | 24 |
| 4.4. Rezultati molekularne identifikacije..... | 25 |
| 4.4.1. Uzgajalište u akvatoriju otoka Cresa | 25 |
| 4.4.1.1. Uzorci iz briseva kože lubina kod otoka Cresa..... | 27 |
| 4.4.1.2. Uzorci morske vode kod otoka Cresa | 27 |
| 4.4.1.3. Uzorci sedimenta kod otoka Cresa | 28 |
| 4.4.2. Uzgajalište u akvatoriju otoka Vrgade | 29 |
| 4.4.2.1. Uzorci iz briseva kože lubina kod otoka Vrgade | 31 |
| 4.4.2.2. Uzorci morske vode kod otoka Vrgade | 31 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2.3. Uzorci sedimenta kod otoka Vrgade..... | 32 |
| 4.4.3. Rezultati iz oba uzgajališta..... | 33 |
| 4.5. Otpornost bakterijskih izolata na antibiotike..... | 35 |
| 4.5.1. Bakterijski izolati iz brisa kože lubina | 35 |
| 4.5.2. Bakterijski izolati iz uzoraka morske vode..... | 37 |
| 4.5.3. Bakterijski izolati iz uzoraka sedimenta | 39 |
| 5. RASPRAVA | 41 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 44 |
| 7. LITERATURA | 45 |
| 8. ŽIVOTOPIS..... | 50 |

POPIS KRATICA

| | |
|--------|--|
| BLAST | eng. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| CFU | eng. <i>Colony-forming unit</i> |
| EU | Europska unija |
| FAO UN | eng. <i>Food and Agriculture Organisation of the United Nations</i> , Organizacije za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda |
| HPC | eng. <i>Heterotrophic Plate Count</i> |
| IUCN | eng. <i>International Union for Conservation of Nature</i> , Međunarodni savez za očuvanje prirode |
| MPN | eng. <i>Most Probable Number</i> |
| MTSA | Tryptic soy agar (BD BBL™) s dodatkom 1 % NaCl-a |
| ORP | Oksidacijsko-redukcijski potencijal |
| PBS | Sterilna fiziološka otopina puferirana fosfatnim puferom, eng. <i>Phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | Lančana reakcija polimerazom, eng. <i>Polymerase chain reaction</i> |
| TAE | Tris-acetat EDTA pufer |
| TCBS | eng. <i>Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose</i> |
| TDS | Ukupno otopljene tvari, eng. <i>Total dissolved solids</i> |
| WHO | eng. <i>World Health Organization</i> , Svjetska zdravstvena organizacija |

1. UVOD

1.1. Akvakultura i primjena antibiotika

Organizacija za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih naroda (FAO UN) definira akvakulturu kao uzgoj akvatičkih organizama koji uključuje uzgoj ribe, mekušaca, rakova i makrofita te podrazumijeva ljudske intervencije kojim se povećava proizvodnja (skladištenje ribe, hranjenje, pružanje zaštite od predatora) (FAO, URL 1). S obzirom na povećanje broja stanovnika i sve veće potrebe za hranom, akvakultura predstavlja značajnu gospodarsku djelatnost koja omogućuje zadovoljenje tih potreba, ali i otvaranje radnih mjesta. Danas, akvakultura je jedno od najbrže rastućih područja proizvodnje hrane (FAO, URL 1). Također, akvakultura predstavlja alternativu izlovu riba kojim su brojne ekonomski značajne divlje vrste riba ugrožene (Esteban 2012). UN je 2015. godine usvojio Agendu za održivi razvoj do 2030. godine te je u sklopu jednog od globalnih ciljeva održivog razvoja istaknuo značaj akvakulture za prehranu i sigurnost hrane. Uzimajući u obzir izazove koje donose klimatske promjene, značaj akvakulture će zasigurno nadalje rasti (Santos i Ramos 2018). To potvrđuje i nacrt "Više od ribnjaka" – Vizije i plan provedbe strategije transformacije sektora akvakulture u Hrvatskoj 2020.-2030., koje je Ministarstvo poljoprivrede RH izdalo u lipnju 2020. godine (URL 2) u kojem se kao jedan od strateških ciljeva navodi povećanje proizvodnosti i otpornosti proizvodnje u akvakulturi na klimatske promjene. Između ostalog, taj cilj uključuje razvoj održive akvakulture, kontrolu onečišćenja, bolje upravljanje staništima i predatorskim vrstama, korištenje obnovljivih izvora energije, ali i učinkovitiju prevenciju i kontrolu bolesti.

Zbog oslabljenog imunološkog sustava uzrokovanog različitim stresnim čimbenicima tijekom rasta i razvoja ribe u uzgajalištu, ali i sanitarnih nedostataka u uzgajalištima, prevelike gustoće riba ili neučinkovitog odvajanja zaraženih od nezaraženih riba, zabilježena je sve češća pojava i brži prijenos bakterijskih infekcija među ribama. Zbog toga je profilaktička upotreba antibiotika u akvakulturi postala uobičajena praksa (Cabello 2006). Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) definira antibiotike kao lijekove koji se koriste za prevenciju i liječenje bakterijskih infekcija (WHO, URL 3). U akvakulturnoj proizvodnji antibiotici se najčešće primjenjuju kroz hranu te nepojedenom hranom i fecesom dolaze u okoliš gdje morskim strujama mogu biti preneseni na velike udaljenosti. Na taj način mogu dospjeti u probavni sustav različitih morskih organizama, a njihovom konzumacijom i u probavni sustav ljudi. Time se mijenja mikroflora probavnog sustava, potiču bakterijske infekcije i razvoj otpornosti bakterija na antibiotike (Cabello 2006). Otpornost bakterija na antibiotike podrazumijeva promjenu odgovora bakterija na primjenu antibiotika, a infekcije koje takve bakterije uzrokuju se teže liječe (WHO, URL 3). Otpornost na antibiotike se razvija mutacijom kromosoma ili prijenosom plazmida s genima za otpornost između

bakterija (Martínez Cruz i sur. 2012). Sve češće se bilježe slučajevi pojave otpornosti bakterija iz okoliša na antibiotike, a horizontalnim prijenosom gena za otpornost može doći do razvoja otpornosti na antibiotike kod bakterija patogenih za životinje i ljude. S obzirom na to, dovodi se u pitanje učinkovitost masovne primjene antibiotika u uzgajalištima, ali i u drugim područjima proizvodnje hrane (Cabello 2006). Jedno od načela održive akvakulture je smanjenje upotrebe lijekova upravo zbog spomenute problematike (URL 4), što se navodi i kao mjera provedbe strateških ciljeva u svrhu razvoja akvakulture u nacrtu "Više od ribnjaka" Ministarstva poljoprivrede (URL 2).

Uz omogućavanje boljih sanitarnih uvjeta u uzgajalištima, jedan od načina prevencije bolesti je cijepljenje riba, no zbog sporog razvoja cjepiva te manjka istraživanja štetnosti antibiotika za okoliš i ljude, antibiotici se i dalje uvelike koriste (URL 4). Cijepljenje riba se 70-ih godina prošlog stoljeća pokazalo učinkovitim protiv jedne od najčešćih bolesti riba, vibrioze, čiji su uzročnik bakterije roda *Vibrio* (Sommerset i sur. 2005). S obzirom na nepotpuno razumijevanje imunološkog sustava riba, kao i specifičnosti cjepiva samo za određene patogene i vrste riba, danas su cjepiva dostupna za 17 vrsta riba koja su učinkovita protiv 22 bakterijske bolesti i 4 virusne bolesti. Za nametičke bolesti do danas nije razvijeno nijedno cjepivo. Iako je napredak u razvoju cjepiva omogućen razvojem biotehnologije i rekombinantnih cjepiva, daljnja istraživanja su potrebna za razvoj novih učinkovitih cjepiva koja će omogućiti dugotrajnu zaštitu (Dadar i sur. 2016). Uz cjepiva, održiva metoda prevencije bolesti riba je upotreba probiotika. Probiotici sadržavaju mikroorganizme s povoljnim učincima za organizam te reguliraju ravnotežu mikroflore. Probiotički mikroorganizmi djeluju antimikrobno na patogene tako da im onemogućavaju adheziju na crijeva, izlučuju antimikrobne tvari te su u kompeticiji za hranjive tvari potrebne patogenima za preživljavanje. Istraživanja su pokazala da ribe lakše probavljaju hranu kada se koriste probiotici kao dodatak hrani. Također, neka istraživanja su pokazala da probiotici povećavaju toleranciju na stres te pozitivno utječu na reprodukciju nekih vrsta riba (Martínez Cruz i sur. 2012). Unatoč pozitivnim učincima, samo je nekoliko probiotika u komercijalnoj upotrebi u Europi. Kao neki od razloga tome navode se osjetljivost probiotika na okolišne uvjete, stroge zakonske regulative, visoka cijena proizvodnje i dr. (De Bruijn i sur. 2018).

1.2. Uzgoj lubina u Hrvatskoj

Lubin ili brancin (*Dicentrarchus labrax* Linnaeus, 1758) je, uz oradu, vrsta ribe koja se najviše uzgaja u Hrvatskoj, a pri vrhu je i na popisu vrsta riba koje se najviše uzgajaju u Europskoj uniji (EU) (Ministarstvo poljoprivrede, URL 5, Eurostat, URL 6). Na globalnoj razini, EU je najveći proizvođač lubina s 80 % udjela u ukupnoj svjetskoj proizvodnji lubina, a slijedi ju Egipat (Europska komisija 2012, URL 7). U razdoblju od 2002. do 2011. godine proizvodnja lubina činila je 10 % ukupne globalne proizvodnje u akvakulturi (Larsen i sur. 2013). U 2019. godini u Hrvatskoj je uzgojeno više od 19 000 t ribe i školjkaša, od čega više od 6000 t lubina te je u usporedbi s prethodnim godinama zabilježen rast. S druge strane, uspoređujući podatke s, primjerice Grčkom koja je glavni proizvođač lubina u EU, ukupna masa uzgojenog lubina u 2019. godini je gotovo 8 puta manja (> 47 000 tona) što ukazuje na mogućnosti napretka marikulture u Hrvatskoj (Eurostat, URL 6).

Još 1979. godine tvrtka Cenmar iz Zadra je prva u svijetu pokrenula uzgoj lubina i orade u kavezima u moru. Osamdesetih godina prošlog stoljeća uspješno je poslovalo i razvijalo se nekoliko manjih tvrtki za uzgoj bijele ribe u Hrvatskoj, no s problemima koje je donio rat, razvoj akvakulture počeo je zaostajati za Grčkom, Turskom i Španjolskom. Uz rat, glavni problemi su bili prilagodba na visoke standarde zaštite okoliša, nedostatak kapitala, problemi s koncesijama na pomorskom dobru te prostorni planovi s nedefiniranim kriterijima za određivanje područja namijenjenih za uzgoj riba (Nadilo 2014). Ulaskom u EU 2013. godine, hrvatskoj akvakulturi su otvorene mogućnosti daljnjeg napretka u smjeru održive akvakulture koju EU potiče, a napredak pokazuju i podaci o dvostruko većem uzgoju lubina u razdoblju od 2014. (3215 t) do 2018. godine (6220 t) (Ministarstvo poljoprivrede, URL 8).

Trenutno su u Hrvatskoj registrirane dvije tvrtke za uzgoj riba i školjkaša (polikultura), a 22 tvrtke za uzgoj bijele ribe te se lubin i orada uzgajaju u svim priobalnim županijama. Među njima najveći udio u proizvodnji bijele ribe zauzima Zadarska županija (Ministarstvo poljoprivrede, URL 9).

1.3. Prethodna istraživanja

1.3.1. Uloga kože riba u imunološkom sustavu riba

Učestale bolesti riba i onečišćenje okoliša su problemi koji mogu dovesti do ekonomskih gubitaka te nekvalitetne i neisplative proizvodnje u akvakulturi (Esteban 2012). Primjerice, bakterija *Photobacterium damsela* uzročnik je fotobakterioze sa smrtnošću između 60 % i 80 % kod lubina (*Dicentrarchus labrax*). S obzirom na sve veći značaj akvakulture, za učinkovito liječenje i prevenciju bolesti, razvoj cjepiva te pronalaženje alternativnih načina liječenja zbog pojave otpornosti bakterija na antibiotike, potrebna su dodatna istraživanja imunološkog sustava riba (Esteban 2012).

Limfni organi riba kao dio imunološkog sustava, dijele se na primarne i sekundarne. Primarnim limfnim organima pripadaju timus i prednji bubreg (ekvivalent koštane srži sisavaca), dok sekundarnim limfnim organima pripadaju slezena i limfno tkivo pridruženo sluznicama (eng. *Mucosa-Associated Lymphoid Tissue*, MALT). Prave koštunjače (Teleostei) su nadred unutar razreda zrakoperke (Actinopterygii), nadrazreda čeljustousti (Gnathostomata), potkoljena kralješnjaci (Vertebrata) i koljena svitkovci (Chordata). Kod pravih koštunjača MALT se dijeli na limfno tkivo pridruženo koži (eng. *Skin-Associated Lymphoid Tissue*, SALT), limfno tkivo pridruženo sluznici škrga (eng. *Gill-Associated Lymphoid Tissue*, GIALT), limfno tkivo pridruženo sluznici probavnog trakta (eng. *Gut-Associated Lymphoid Tissue*, GALT) i limfno tkivo pridruženo sluznici nazofarinksa (ždrijela) (eng. *Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue*, NALT) (Kelly i Salinas 2017). MALT predstavlja prvu liniju obrane organizma protiv patogena jer upravo na sluznici (mukozi) patogen dolazi u dodir s organizmom, a imunološkim odgovorom sluznice određuje se daljnji tijek infekcije. MALT sadrži više vrsta leukocita: limfociti T, limfociti B, plazma stanice, makrofagi, granulociti. Koža i škrge riba su, prema istraživanjima, glavna mjesta ulaska patogena i infekcije. Koža pravih koštunjača izlučuje sluz koja prekriva epidermu i po tome se uvelike razlikuje od kože sisavaca i ostalih kralješnjaka kod kojih je rožnati sloj (lat. *stratum corneum*) na površini epiderme. Budući da su ribe uvijek u dodiru s vodenim okolišem bogatim patogenim organizmima, kožne bolesti su uobičajene te je koža značajna za primarnu obranu. Površinski sloj na koži čini sluz s bakterijama koje tvore mikrofloru. U sastavu kože su epiderma s vršastim stanicama koje proizvode sluz i derma u kojoj nastaju ljuske (Esteban 2012).

Viskoelastičnost kožne sluzi blokira različite bakterije, a pri kontaktu s patogenom, ribe izlučuju više sluzi i mijenjaju njen sastav te nije poznato mijenja li se pri tom sastav mikroflora kože (Reverter i sur. 2018). Virus ili bakterije budu zarobljeni u kožnoj sluzi te vodenom strujom odneseni s kože. Sluz kože najvećim dijelom čine adhezivni glikoproteini mucini koji tvore matriks kožne sluzi u kojem se nalaze

brojne komponente imunološkog sustava od kojih su samo neke skupine detaljno istražene (enzimi, proteini, antimikrobni peptidi, proteaze, imunoglobulini) (Esteban 2012). Sastav sluzi kože riba varira ovisno o vrsti ribe, spolu, razvojnem stadiju i vanjskim čimbenicima poput temperature vode i pH. Također, različiti stresni čimbenici utječu na lučenje sluzi i njen sastav (razina proteina i drugih molekula) čime riba može postati podložnija infekcijama. Uz imunološku ulogu, sluz ima značaj u osmoregulaciji, zaštiti od ogrebotina, zaštiti od toksičnih tvari iz okoliša i teških metala, hranjenju potomaka, kemijskoj komunikaciji (Reverter i sur. 2018).

1.3.2. Mikroflora kože

Mikroflora podrazumijeva mikroorganizme koji su prisutni na sluznicama i koži ribe (Rosado i sur. 2019b). S obzirom na uvjete uzgoja u akvakulturi (velika gustoća i niske koncentracije kisika), često se javljaju poremećaji u ravnoteži mikroflora riba (disbioza) (Rosado i sur. 2019a). Iako su patogeni mikroorganizmi sastavni dio mikroflora riba, ne uzrokuju bolesti osim ako ne dođe do poremećaja u ravnoteži mikroflora. Na poremećaje u ravnoteži mikroflora riba, u uvjetima uzgoja, utječu i promjene fizičkih i kemijskih uvjeta u vodi, promjene temperature, sezonske promjene, klimatske promjene i upotreba antibiotika (De Bruijn i sur. 2018). Budući da je koža, uz škrge, organ koji sudjeluje u primarnoj obrani organizma od patogena, bitno je istražiti njenu mikrofloru te kako poremećaji mikroflora dovode do razvoja bolesti. Većina istraživanja mikroflora riba su fokusirana na crijevnu mikrofloru i učinke probiotika na ravnotežu mikroflora (Larsen i sur. 2013). Mikroflora kože kod zdravih jedinki se uglavnom sastoji od mikroorganizama koji djeluju antimikrobno. Kod jedinki pod utjecajem stresa, mikrofloru kože većinom čine patogeni mikroorganizmi (Rosado i sur. 2019a). Na sastav mikroflora, prema istraživanjima, utječu lokacija staništa ribe, fiziologija te povijest bolesti jedinke. Neka istraživanja su pokazala da je sastav mikroflora ličinki riba uglavnom sličan mikrobnim zajednicama koje se nalaze vodenom okolišu, dok je kod odraslih jedinki sastav mikroflora stabilan. Također, utvrđeno je da se raznolikost mikrobnih zajednica smanjuje sa starošću (Rosado i sur. 2019a). Mehanizmi kojima mikroorganizmi u mikroflori djeluju na patogene uključuju kompeticiju za esencijalne hranjive tvari, izuzeće iz niše i antibiozu (sprječavanje rasta patogenih bakterija proizvodnjom antimikrobnih komponenti) (De Bruijn i sur. 2018).

Mikroflora sluznice kože sadrži više aerobnih nego anaerobnih bakterija, a prema istraživanjima na koži je prisutno između 10^2 i 10^4 bakterija po cm^2 (De Bruijn i sur. 2018). Istraživanja mikroflora kože lubina (*Dicentrarchus labrax*) i drugih vrsta pokazala su da je mikroflora kože specifična za pojedinu vrstu ribe. Općenito, kod pravih koštunjača bakterije iz koljena Proteobacteria su najčešće zabilježene (Rosado i sur. 2019a). Kod lubina, među najčešćima su bakterije koljena Proteobacteria, Bacteroidetes i Verrucomicrobia (Rosado i sur. 2019b). Bitno je napomenuti da zaključci o sastavu mikroflora nisu

univerzalni jer postoje brojne razlike među rezultatima istraživanja mikroflore. Mogući uzrok tome su razlike u korištenoj metodologiji prilikom istraživanja, primjerice kod uzorkovanja kože (Rosado i sur. 2019a). Kao i bakterijske infekcije, primjena antibiotika također može utjecati na poremećaj sastava mikroflore kože te na smanjenje raznolikosti mikroflore kože čime je imunološki sustav jedinke oslabljen. Zbog smanjenja raznolikosti mikroflore, veća je podložnost novim infekcijama, a zabilježeno je i smanjenje rasta te veći mortalitet (Rosado i sur. 2019b).

1.4. Cilj istraživanja

U ovom radu ciljevi istraživanja bili su:

1. Analizirati mikrobnu zajednicu na koži lubina u uzgoju.
Izolirati i opisati patogene bakterije i utvrditi njihovu otpornost na antibiotike.
2. Usporediti mikrobnu zajednicu lubina iz uzgajališta s tehnologijom sa i bez upotrebe antibiotika.
Usporediti rezultate dobivene s uzgajališta u sjevernom Jadranu, koje se odlikuje tehnologijom uzgoja bez primjene antibiotika (ANTIBIOTIC FREE certifikat), s mikrobnom zajednicom lubina koji se uzgajaju u srednjem Jadranu s primjenom antibiotika za liječenje u uzgoju. Diplomski rad će pridonijeti znanju o složenosti i dinamičkoj interakciji trokuta: bakterije – riba – okoliš.

2. PODRUČJE ISTRAŽIVANJA

Područje istraživanja je Jadransko more, točnije sjeverni i srednji Jadran.

Jadransko more čini 4,6 % ukupne površine Sredozemnog mora i nalazi se na njegovom sjeverozapadnom dijelu (Viličić 2014). Dijeli se na tri dijela: sjeverni Jadran koji je najplići i pod utjecajem rijeke Po, srednji i južni Jadran koji je preko Otrantskih vrata povezan s Jonskim morem (Lipizer i sur. 2014). Veći dio Jadranskog mora se prostire na dubinama do 200 m. Granica između sjevernog i srednjeg Jadrana je Jabučka (Srednjojadranska) kotlina, dok je granica između srednjeg i južnog Jadrana u području Palagruškog praga (Viličić 2014). Za cirkulaciju u Jadranskom moru važne su Istočnojadranska struja koja donosi topliju i slaniju vodu iz istočnog Sredozemlja i Jonskog mora te Zapadnojadranska struja i Zapadnojadranska pridnena struja. Zapadnojadranska struja se pruža uz talijansku obalu, a bogata je hranjivim tvarima te uzrokuje cvjetanje fitoplanktona. Nastaje pod utjecajem rijeke Po, vjetrova i rotacije Zemlje. Istraživanja su pokazala kako se od 1970. godine smanjuje dotok hranjivih tvari rijekom Po u sjeverni Jadran, a u razdoblju od 1970-ih do 1990-ih bilježi se porast eutrofikacije u srednjem i južnom Jadranu (Viličić 2014).

Jadransko more bogato je endemnim vrstama, a 49 % svih opisanih vrsta koje nastanjuju Mediteran nalaze se u Jadranskom moru. Uz klimatske poremećaje, glavni negativni učinci na Jadransko more su pridnena ribolov kočom, hipoksija i onečišćenje uzrokovano ljudskom aktivnošću na kopnu (Cerrano i sur. 2015).

Za ovo istraživanje uzorci morske vode, ribe i sedimenta uzeti su iz dva uzgajališta u sjevernom i srednjem Jadranu tijekom ljeta (Slika 1).

Uzgajalište tvrtke Orada Adriatic d.o.o. nalazi se u sjevernom Jadranu, te je uzorkovanje obavljeno u uzgajalištu na sjeverozapadnoj obali otoka Cresa, u uvali Veli Bok (Slika 2). Uzgajalište se najvećim dijelom nalazi izvan zaštićenog obalnog područja (ZOP). Godišnji kapacitet proizvodnje uzgajališta je 990 tona bijele ribe (Ministarstvo zaštite okoliša i prirode 2015, URL 10). U listopadu 2019. godine dodijeljen mu je ANTIBIOTIC FREE certifikat od strane neovisnog revizora DNV GL Business Assurance Italia. Tvrtka posjeduje uzgajališta na otoku Krku i na otoku Cresu, a u svojim kavezima održavaju visoku kvalitetu okoliša i sanitarnih uvjeta (mala gustoća riba u kavezima, visoka kvaliteta prehrane) (URL 11).

U srednjem Jadranu uzorci su uzeti iz uzgajališta tvrtke Kornat Ittica, a nalazi se u akvatoriju Vrgadskog kanala, jugoistočno od otoka Vrgade (Slika 3). Nalazi se izvan zaštićenog obalnog područja (ZOP) (Forvm d.o.o., URL 12). Godišnji kapacitet proizvodnje uzgajališta je 2145 tona ribe i 220 tona školjkaša (Ministarstvo zaštite okoliša i prirode 2016, URL 13). Uzgajalište upotrebljava antibiotike za

liječenje oboljelih riba u uzgoju, dakle ne posjeduje ANTIBIOTIC FREE certifikat.



Slika 1 Karta uzorkovanja lubina na uzgajalištu s ANTIBIOTIC FREE certifikatom (1) i uzgajalištu s upotrebom antibiotika za liječenje oboljelih lubina u uzgoju (2).



Slika 2 Uzgajalište u akvatoriju otoka Cresa.



Slika 3 Uzgajalište u akvatoriju otoka Vrgade,

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Indikatorski organizam – lubin (*Dicentrarchus labrax*)

Lubin ili brancin (*Dicentrarchus labrax*) je morska vrsta ribe koja pripada razredu Actinopterygii (zrakoperke), redu Perciformes (grgečke) i porodici Moronidae (lubini) (Slika 4). Rasprostranjen je u cijelom Sredozemnom moru, Crnom moru te u istočnom Atlantskom oceanu, od Norveške sve do Senegala. Rasprostranjen je čitavom dužinom Jadranskog mora, no najviše ga ima u sjevernom dijelu. Ne nalazi se na IUCN Crvenom popisu ugroženih vrsta, no ugrožen je pretjeranim izlovljavanjem, urbanizacijom i industrijalizacijom obale te onečišćenjem priobalnog mora (Jardas i sur. 2008). Zaštićen je Naredbom o zaštiti riba i drugih morskih organizama (Narodne novine br. 63/10) te se ne smiju loviti jedinke manje od 23 cm (Jardas i sur. 2008).

Lubin ima blago ispupčenu donju čeljust te izduženo, vretenasto, bočno spljošteno tijelo, a naraste do dužine 1 m i mase oko 14 kg. Obično je olovnosivkaste boje sa svjetlijim bokovima i bijelim trbuhom, a mladi mogu imati crne mrlje raspršene po tijelu. Mladi lubini formiraju skupine, dok odrasle jedinke žive samačkim životom ili u paru. Karnivorna je vrsta, hrani se ribom, rakovima i glavonošcima (Jardas i sur 2008). Nastanjuje priobalne vode do 100 metara dubine, a ljeti migrira u priobalne rijeke, lagune i estuarije. Zimi se zadržava na većim dubinama. U Sredozemnom moru spolno sazrijeva između dvije i četiri godine, a u Atlantskom oceanu između četiri i sedam godina života. U uzgajalištima je vrijeme spolnog sazrijevanja ranije nego u prirodnim staništima (FAO, URL 14). Mrijesti se u razdoblju između studenoga i ožujka (Jardas i sur 2008).



Slika 4 Lubin (*Dicentrarchus labrax*) iz uzgajališta u akvatoriju otoka Vrgade.

3.2. Uzorkovanje kože riba, morske vode i sedimenta

S deset jedinki lubina (*Dicentrarchus labrax*), izlovljenih za komercijalne potrebe (konzumna riba) na svakom uzgajalištu, uzeti su brisevi kože za izolaciju i identifikaciju bakterija. Brisevi su uzeti tijekom ljeta pomoću sterilnih štapića s pamučnim vrhom dugim 1 cm (Deltalab), s površine 1 cm² ispod ledne peraje lubina (Slika 5). Uzorci su zatim serijski razrijeđeni u 10 mL sterilne fiziološke otopine puferirane fosfatnim puferom (PBS, Merck) (Kapetanović i sur. 2013). Tijekom uzorkovanja obavljen je zdravstveni pregled izlovljenih jedinki te su prikupljeni biometrijski podaci tj. ukupna dužina i ukupna masa.

Po jedan uzorak sedimenta (10 g površinskog sloja sedimenta) iz svakog uzgajališta prikupljen je upotrebom Ekmanovog grabila. Pomoću Niskinovog crpca u sterilne boce volumena 0,5 L iz stupca morske vode (0,5 m ispod površine, 6 m dubine, 12 m dubine i 0,5 m iznad dna) prikupljeni su uzorci morske vode sa svakog uzgajališta. Uzorci su serijski razrijeđeni u 10 mL sterilne PBS otopine (Merck).



Slika 5 Uzimanje brisa kože lubina (*Dicentrarchus labrax*).

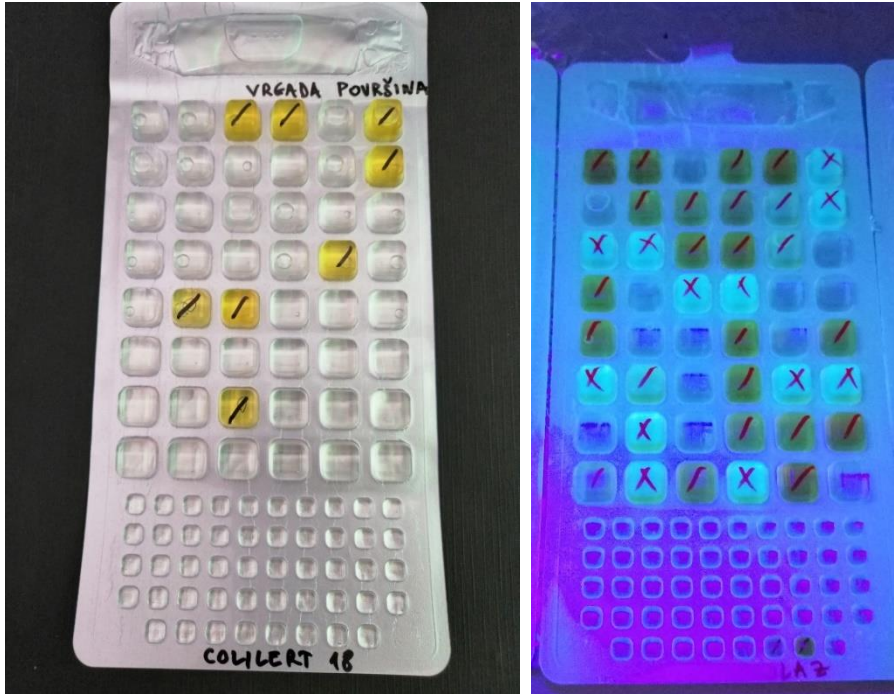
3.3. Fizikalno-kemijska analiza morske vode

Na oba uzgajališta provedena su mjerenja fizikalno-kemijskih parametara morske vode. Mjerenja pH i ORP (oksidacijsko-redukcijski potencijal) provedena su elektrometrijski, upotrebom prijenosne digitalne multi-parametarske sonde SevenGo pro/Ion (Mettler Toledo) preciznosti 0,001 mg/L. Nadalje, količina otopljenog kisika (mg/L O₂), zasićenje vode kisikom (% O₂) i temperatura (°C) izmjereni su prijenosnom digitalnom O₂/temp. sondom SevenGo pro/ SG9 OptiOx (Mettler Toledo) preciznosti 0,01 mg/L. Konduktivitet i ukupno otopljene tvari (eng. *Total Dissolved Solids*, TDS) izmjereni su upotrebom sonde SevenGo pro/ conductivity (Mettler Toledo) preciznosti 0,1 mg/L.

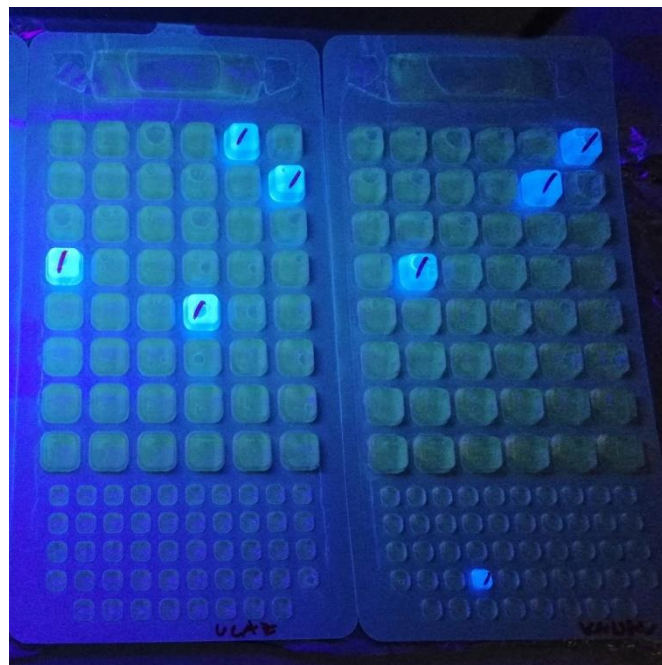
3.4. Mikrobiološka analiza kože, morske vode i sedimenta

Mikrobiološkom analizom kože, morske vode i sedimenta iz oba uzgajališta utvrđen je ukupan broj heterotrofnih bakterija (eng. *Heterotrophic Plate Count*, HPC) metodom širenja po podlozi na Difco™ Marine Agar 2216 (BD) podlozi koje su inkubirane na 22 °C kroz 3-5 dana. Za izolaciju bakterija roda *Vibrio* iz briseva kože riba te iz sedimenta i morske vode primijenjena je metoda širenja po podlozi, a korištena je selektivna podloga Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) (Difco™, BD). Podloge su inkubirane na 22 °C tijekom 24 sata. Rezultati su prikazani kao broj izraslih kolonija (eng. *Colony-forming unit*, CFU) u 1 mL sedimenta i vode, odnosno na 1 cm² kože (Kapetanović i sur. 2013).

Ukupni koliformi i *Escherichia coli* određeni su upotrebom supstrat tehnologije Colilert-18™ i Quanti-Tray/2000 prema uputama proizvođača (IDEXX). Nakon inkubacije 24 sata na 35 °C, pojava žute boje komorica ukazuje na prisutnost ukupnih koliforma, a fluorescencija pod UV svjetlom ukazuje na prisutnost *E. coli* (Slika 6). Enterokoki su određeni upotrebom Enterolert-E™ i Quanti-Tray/2000 prema uputama proizvođača (IDEXX). Nakon inkubacije 24 sata na 41 °C, pojava fluorescencije ukazuje na prisutnost enterokoka (Slika 7) (Kapetanović i sur. 2013). Quanti-Tray/2000 daje najvjerojatniji broj bakterija (eng. *Most Probable Number*, MPN) u uzorku od 100 mL koristeći reagense proizvođača (IDEXX).



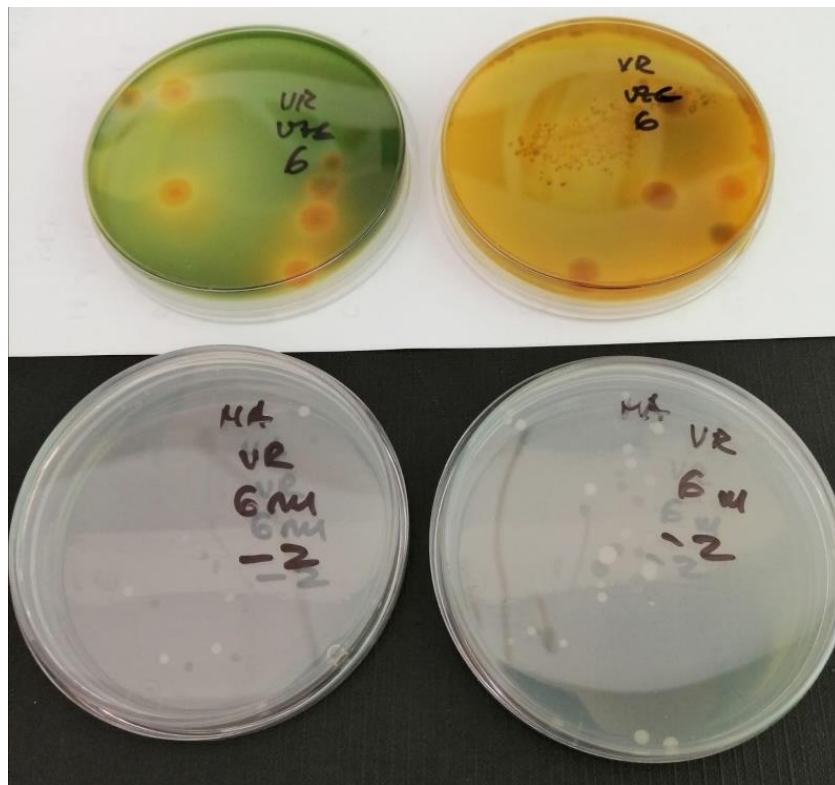
Slika 6 Tehnologija Colilert-18™ za određivanje ukupnih koliforma i *E. coli*.
Prisutnost ukupnih koliforma (lijevo) te prisutnost *E. coli* (desno).



Slika 7 Tehnologija Enterolert-E™ za određivanje enterokoka.
Pojava fluorescencije ukazuje na prisutnost enterokoka.

3.5. Izolacija bakterija

Brisevi kože te uzorci morske vode i sedimenta serijski su razrijeđeni sa sterilnom PBS otopinom (Merck). Metodom širenja po podlozi 1 mL svakog uzorka je inokuliran na neselektivnoj podlozi Difco™ Marine Agar 2216 (BD) (Slika 8, dolje) tijekom 24 sata na 22 °C te na selektivnoj podlozi Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) (Difco™, BD) (Slika 8, gore). Bakterijske kolonije su slučajno odabrane i sterilnom ušicom (ezom) prenesene na podlogu Tryptic soy agar (BD BBL™) s dodatkom 1 % NaCl-a (MTSA) kako bi se uzgojile čiste bakterijske kolonije (Kapetanović i sur. 2019).

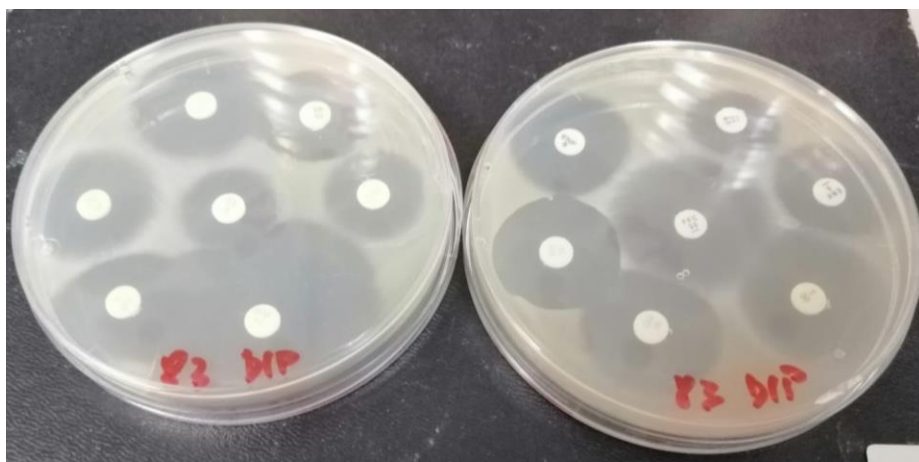


Slika 8 Selektivna podloga Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (TCBS) (Difco™, BD) za izolaciju bakterija roda *Vibrio* (gore). Neselektivna podloga Difco™ Marine Agar 2216 (BD) (dolje).

3.6. Određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike

Upotrebom Kirby-Bauer disk difuzijske metode na podlozi Difco™ Mueller Hinton II agar (BD) određena je osjetljivost izoliranih bakterijskih sojeva na antibiotike (Slika 9). Za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike korišteni su antibiotici koji su najčešće bili upotrebljavani, osobito u akvakulturi. Antimikrobni diskovi korišteni za ispitivanje su (sadržaj antimikrobne tvari prikazan je u mikrogramima u zagradi): ampicilin (10), streptomycin (10), gentamicin (10), kloramfenikol (30), ciprofloksacin (5), eritromicin (15), imipenem (10), oksitetraciklin (30), sulfametoksazol/trimetoprim (23.75/1.25), vankomicin (30) proizvođača BBL™ Sensi-Disc™, kao i enrofloksacin (5), florfenikol (30) i flumekvin (30) proizvođača Thermo Scientific™ Oxoid™. Inokulum je pripremljen u 5 mL sterilne otopine 0,85 % Suspension medium (BioMérieux). Na uređaju Vitek Systems ATB 1550 (BioMérieux) turbiditet za svaki inokulum namješten je na 0,5 prema McFarland vrijednosnoj skali (Kapetanović i sur. 2019).

Nakon 24 sata inkubacije na 22 °C ravnalom je izmjeren promjer zone inhibicije te su vrijednosti interpretirane kao osjetljiv, srednje osjetljiv ili rezistentan prema uputama proizvođača (Kapetanović i sur. 2019).



Slika 9 Kirby-Bauer disk difuzijska metoda na podlozi Difco™ Mueller Hinton II agar (BD) za određivanje osjetljivosti bakterija na antibiotike.

3.7. Izolacija DNA

Za izolaciju DNA bakterija korišten je komercijalni set reagensa proizvođača Sigma GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit. Postupak izolacije DNA izveden je prema uputama proizvođača.

U mikroepruvete dodano je 180 µL otopine *Lysis T*. Sterilnom ušicom (ezom) bakterijske kolonije uzgojene na podlogama prenesene su u mikroepruvetu. Zatim je dodano 20 µL otopine proteinaze K te je uzorak promiješan na tresilici (Vortex). Uzorak je inkubiran uz povremeno miješanje na 55 °C tijekom 2 do 4 sata na uređaju Thermomixer 5350 (Eppendorf). Nakon toga, uzorak je nakratko promiješan na tresilici.

U sljedećem koraku dodano je 200 µL otopine *Lysis C* te je uzorak promiješan na tresilici 15 sekundi za uspješnu lizu stanica. Uzorak je inkubiran na 70 °C tijekom 10 minuta.

Nakon inkubacije uzorka dodano je 200 µL etanola te je uzorak promiješan na tresilici 5 do 10 sekundi kako bi se homogenizirao. Time je uzorak pripremljen za vezanje DNA na kolonicu (eng. *Miniprep Binding Column*). Kolonica je prethodno uklopljena u mikroepruvetu (eng. *Collection Tube*). Zatim je dodano 500 µL otopine *Column Preparation* i centrifugirano 1 minutu na 12 000 x g.

Uzorak je prebačen mikropipetom u pripremljenu kolonicu te centrifugiran 1 minutu na ≥ 6500 x g. Nakon toga je kolonica prebačena u novu mikroepruvetu, isprana s 500 µL otopine *Wash Solution* i centrifugirana 1 minutu na ≥ 6500 x g. Zatim je kolonica drugi put isprana s 500 µL otopine *Wash Solution* te centrifugirana 3 minute na maksimalnoj brzini (12 000 do 16 000 x g) kako bi se kolonica osušila. Za uspješno sušenje, uzorak je centrifugiran dodatno jednu minutu na maksimalnoj brzini. Kolonica je prebačena u novu mikroepruvetu te je dodano 200 µL otopine *Elution*. Uzorak je inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi prije centrifugiranja 1 minutu na ≥ 6500 x g.

Dobiveni eluat sadržavao je pročišćenu genomsku DNA i pohranjen je na -20 °C.

3.8. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Lančana reakcija polimerazom (PCR, eng. *Polymerase Chain Reaction*) je često korištena metoda u molekularnoj biologiji kojom se umnaža određeni odsječak molekule DNA. Ovom metodom dobije se nekoliko milijuna kopija određene sekvence molekule DNA u vremenskom periodu od nekoliko sati (Verma i sur. 2014).

Lančana reakcija polimerazom sastoji se od tri koraka ponovljena u 25 do 35 ciklusa. Na početku procesa se odvija inicijalni korak zagrijavanja na 94-96 °C tijekom dvije do osam minuta, pri čemu se aktivira DNA polimeraza. Prvi korak kojim započinju ciklusi je denaturacija u kojem dolazi do razdvajanja lanaca molekule DNA kidanjem vodikovih veza između komplementarnih dušičnih baza pri čemu nastaju dvije jednolančane molekule DNA. Drugi korak je prijanjanje početnica za jednolančane DNA. Treći korak je produženje lanca pri čemu DNA polimeraza sintetizira novi DNA lanac komplementaran starom DNA lancu. Odvija se pri temperaturi optimalnoj za DNA polimerazu (Verma i sur. 2014).

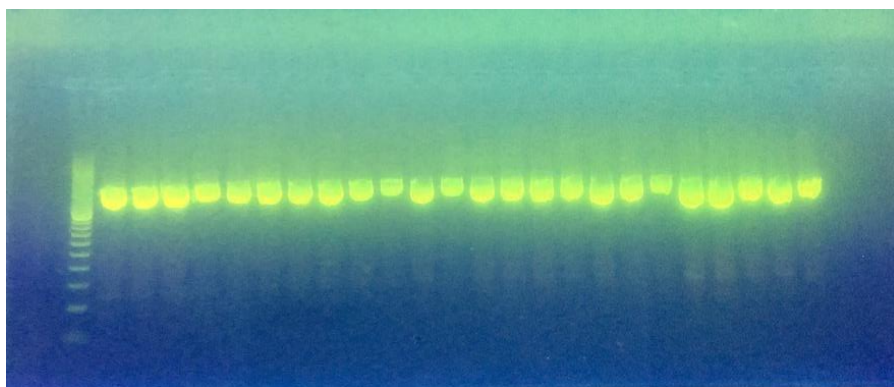
Prije same reakcije, pripremljena je reakcijska smjesa volumena 50 µL koja se sastojala od 21 µL sterilne H₂O, 25 µL EmeraldAmp® GT PCR Master Mix (Takara), 1 µL početnice 27F, 1 µL početnice 1492R te 2 µL molekule DNA. U ovom istraživanju tijekom 35 ciklusa umnožen je odsječak gena 16S rRNA veličine 1450 pb prema Wilson i sur. (1990). Korišten je PCR uređaj Eppendorf® Mastercycler Personal. Uvjeti reakcije prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1 Uvjeti reakcije lančane reakcije polimerazom (PCR).

| | Temperatura (°C) | Vrijeme |
|--------------------------|------------------|---------|
| 1. Aktivacija polimeraze | 94 °C | 3 min |
| 2. Denaturacija | 94 °C | 30 s |
| 3. Prijanjanje početnica | 58 °C | 30 s |
| 4. Produženje lanca | 72 °C | 30 s |
| 5. Završno produženje | 72 °C | 10 min |

3.9. Elektroforeza

Elektroforeza na agaroznom gelu koristi se za razdvajanje i vizualizaciju DNA fragmenata (Yun Lee i sur. 2012). U ovom istraživanju pripremljen je 1,5%-tni agarozni gel dodatkom 0,85 g agaroze (Sigma) u 55 mL TAE pufera (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA). Nakon zagrijavanja i potpunog otapanja agaroze, za vizualizaciju pod UV svjetlom dodano je 4 μ L fluorescirajuće boje GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza). Tako pripremljeni gel izliven je u plastičnu kadu za elektroforezu (BioRad). Nakon što se gel skrutnuo, po 2 μ L svakog uzorka tj. PCR produkta nanoseno je u jažice. Također, u jednu jažicu je nanoseno i 4 μ L biljega DNA (Takara) s fragmentima na svakih 100 pb (parova baza, eng. *Base Pair*, bp). Biljeg DNA služi za određivanje veličine fragmenta DNA našeg uzorka. Pod naponom (100 V) negativno nabijena molekula DNA kreće se prema pozitivnom električnom polu (Yun Lee i sur. 2012). Koristeći UV transiluminator (BioRad) promotreni su rezultati nakon 30 do 40 min (Slika 10).



Slika 10 Rezultati elektroforeze na agaroznom gelu.

3.10. Sekvenciranje DNA

Sekvenciranje predstavlja određivanje sljedova nukleotida DNA molekule. Sekvenciranje DNA obavljeno je u tvrtci Macrogen (Nizozemska) gdje su poslani PCR produkti uzoraka. Dobivene sekvence uređene su dijelom manualno, a dijelom u programu BioEdit version 7.2.5. (Hall 1999). Kako bi se sekvence taksonomski odredile, uspoređene su sa sekvencama u banci gena (GenBank, NCBI) pomoću algoritma BLAST (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*).

3.11. Statistička analiza

Pomoću programa SigmaPlot Version 14.0 (Systat Software Inc.) obavljena je statistička analiza broja heterotrofnih bakterija i broja bakterija roda *Vibrio* iz brisa s kože lubina i uzoraka morske vode između uzgajališta kod otoka Cresa i otoka Vrgade. Također je obavljena statistička analiza broja bakterijskih izolata otpornih na antibiotike između uzgajališta u svakom tipu uzorka (koža, morska voda, sediment). Za statističku analizu korišten je Mann-Whitney test, a zabilježene razlike bile su statistički značajne pri $p < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati fizikalno-kemijske analize morske vode

U Tablici 2 prikazani su rezultati mjerenja fizikalno-kemijskih parametara morske vode iz uzgajališta u akvatoriju otoka Cresa te otoka Vrgade. Mjerenja su obavljena na četiri dubine u svakom uzgajalištu tijekom ljeta te vrijednosti parametara zadovoljavaju potrebe u uzgoju (Zweig i sur. 1999). Konduktivitet je imao vrijednosti od 46,8 do 51,5 $\mu\text{S/cm}$ u uzgajalištu u akvatoriju otoka Cresa, dok je u uzgajalištu kod otoka Vrgade imao vrijednosti 56,0 do 56,3 $\mu\text{S/cm}$. U uzgajalištu u akvatoriju otoka Cresa ukupno otopljene tvari (eng. *Total Dissolved Solids*, TDS) iznosile su 37,3 mg/L, dok je ORP (oksidacijsko-redukcijski potencijal) iznosio između 105,1 i 107,5 mV. U uzgajalištu u akvatoriju otoka Vrgade ukupno otopljene tvari iznosile su između 28,0 i 28,1 mg/L, dok je ORP iznosio između -65,6 i -56,0 mV. Vrijednosti količine otopljenog kisika (O_2 , mg/L) i zasićenja kisikom (% O_2) uglavnom su opadale s većom dubinom.

Tablica 2 Fizikalno-kemijska analiza morske vode s uzgajališta u akvatoriju otoka Cresa i otoka Vrgade.

| Dubina (m) | Secchi (m) | Salinitet (ppt) | Konduktivitet ($\mu\text{S/cm}$) | TDS (mg/L) | Temp. ($^{\circ}\text{C}$) | ORP (mV) | pH | O_2 (mg/L) | O_2 (%) |
|---------------|---------------|--------------------|---------------------------------------|---------------|---------------------------------|-------------|------|------------------------|---------------------|
| Cres | | | | | | | | | |
| 0,5 m | 28 m | 38,25 | 51,5 | 37,3 | 19,7 | 105,5 | 9 | 7,01 | 96,4 |
| 6 m | 28 m | 38,26 | 51,5 | 37,3 | 19,7 | 105,3 | 9 | 6,94 | 95,4 |
| 12 m | 28 m | 38,27 | 51,5 | 37,3 | 19,7 | 105,1 | 9 | 6,93 | 95,3 |
| 0,5 m od dna | 28 m | 38,43 | 46,8 | 37,5 | 15,1 | 107,8 | 9 | 6,62 | 83,7 |
| Vrgada | | | | | | | | | |
| 0,3 m | 20 m | 37,3 | 56,2 | 28,1 | 23,5 | -64,4 | 8,12 | 8,48 | 99,2 |
| 6 m | 20 m | 37,1 | 56,0 | 28,0 | 23,0 | -65,3 | 8,13 | 8,07 | 93,4 |
| 12 m | 20 m | 37,2 | 56,3 | 28,0 | 22,5 | -56,0 | 8,13 | 8,35 | 95,5 |
| 0,5 m od dna | 20 m | 37,2 | 56,2 | 28,1 | 20,1 | -65,6 | 8,16 | 8,02 | 87,6 |

4.2. Rezultati mikrobiološke analize iz briseva kože, morske vode i sedimenta

Rezultati mikrobiološke analize morske vode i sedimenta iz dva uzgajališta prikazani su u Tablici 3 i Tablici 4.

U morskoj vodi, najveći broj ukupnih koliforma utvrđen je u uzorku iz uzgajališta s 12 m dubine kod otoka Cresa, dok je istovremeno najmanji broj ukupnih koliforma zabilježen u uzorku s dna istog uzgajališta. Najveći broj *E. coli*, kao i najveći broj enterokoka, zabilježen je u uzorku s površine morske vode iz uzgajališta kod otoka Vrgade. Uzorak morske vode s dubine 12 m iz uzgajališta kod otoka Vrgade pokazao je najveći broj heterotrofnih bakterija (*Heterotrophic Plate Count*, HPC). Uzorak s površine morske vode iz uzgajališta kod otoka Cresa pokazao je najmanji broj heterotrofnih bakterija. Razlike u ukupnom broju heterotrofnih bakterija u morskoj vodi između uzgajališta nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$). Broj bakterija roda *Vibrio* bio je veći u svim uzorcima morske vode iz uzgajališta u akvatoriju otoka Vrgade, a utvrđene razlike su bile statistički značajno veće u odnosu na uzgajalište kod otoka Cresa ($p < 0,05$). Prema Uredbi o kakvoći voda za kupanje (Narodne novine br. 51/14), uzorkovana morska voda je izvrsne kakvoće.

Ispitani parametri u uzorcima sedimenta imali su veće vrijednosti u uzorku iz uzgajališta kod otoka Vrgade, osim broja *E. coli* koji je imao jednaku vrijednost u sedimentu iz oba uzgajališta.

Tablica 3 Mikrobiološka analiza morske vode i sedimenta, uzgajalište u akvatoriju otoka Cres.

| Tip uzorka | Ukupni koliformi (MPN/100 mL) | <i>E. coli</i> (MPN/100 mL) | Enterokoki (MPN/100 mL) | HPC (CFU/mL) | <i>Vibrio</i> (CFU/mL) |
|--------------------|---|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Morska voda | | | | | |
| površina | 487,0 | < 10,0 | < 10,0 | 90 | 10 |
| 6 m | 588,0 | < 10,0 | < 10,0 | 545 | 17 |
| 12 m | 1034,0 | < 10,0 | < 10,0 | 295 | 17 |
| dno | 10,0 | < 10,0 | < 10,0 | 185 | 12 |
| Sediment | < 10,0 | < 10,0 | < 10,0 | 60 | 3 |

Tablica 4 Mikrobiološka analiza morske vode i sedimenta, uzgajalište u akvatoriju otoka Vrgade.

| Tip uzorka | Ukupni koliformi (MPN/100 mL) | <i>E. coli</i> (MPN/100 mL) | Enterokoki (MPN/100 mL) | HPC (CFU/mL) | <i>Vibrio</i> (CFU/mL) |
|--------------------|---|---------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|----------------------------------|
| Morska voda | | | | | |
| površina | 88,0 | 25,5 | 10,0 | 220 | 22 |
| 6 m | 81,5 | 10,0 | < 10,0 | 260 | 23 |
| 12 m | 20,0 | 10,0 | < 10,0 | 780 | 45 |
| dno | 20,5 | < 10,0 | < 10,0 | 660 | 130 |
| Sediment | 15,0 | < 10,0 | 46,5 | 120 | 88 |

Rezultati mikrobiološke analize iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod Cresa i kod Vrgade prikazani su u Tablici 5. Razlike u ukupnom broju heterotrofnih bakterija (*Heterotrophic Plate Count*, HPC) iz brisa kože lubina između uzgajališta bile su statistički značajno veće u uzgajalištu kod otoka Cresa ($p < 0,05$). Broj bakterija roda *Vibrio* između uzgajališta također je bio statistički značajno veći kod otoka Cresa ($p < 0,05$).

Tablica 5 Mikrobiološka analiza brisa kože lubina iz uzgajališta kod Cresa i kod Vrgade.

| Redni broj uzorka ribe | Cres | | Vrgada | |
|---------------------------|---------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| | <i>Vibrio</i> (CFU/mL) | HPC (CFU/mL) | <i>Vibrio</i> (CFU/mL) | HPC (CFU/mL) |
| 1. | 112 | 42 | neg | 10 |
| 2. | 80 | 65 | neg | 30 |
| 3. | neg | 80 | neg | 30 |
| 4. | 18 | 72 | neg | neg |
| 5. | 40 | 48 | 10 | 52 |
| 6. | 25 | 56 | 20 | 50 |
| 7. | neg | 70 | 10 | 40 |
| 8. | 20 | 60 | 10 | 44 |
| 9. | 50 | 120 | neg | 38 |
| 10. | 36 | 78 | neg | 68 |

4.3. Rezultati zdravstvenog pregleda lubina

Zdravstvenim pregledom lubina iz uzgajališta u akvatoriju otoka Cresa te otoka Vrgade nisu utvrđeni klinički znaci bolesti. Izmjereni biometrijski pokazatelji uzoraka lubina te prosjek i standardna devijacija prikazani su u Tablici 6. U uzgajalištu kod otoka Cresa, ukupna dužina uzoraka lubina iznosila je između 28,5 cm i 34,8 cm, a ukupna masa između 281,5 g i 487,7 g. U uzgajalištu kod otoka Vrgade, ukupna dužina uzoraka lubina iznosila je između 30,9 cm i 43,2 cm, a ukupna masa između 254,2 g i 686,5 g.

Tablica 6 Biometrijski pokazatelji uzoraka lubina iz uzgajališta kod Cresa i kod Vrgade.

| Redni broj uzorka ribe | Cres | | Vrgada | |
|------------------------|--------------------|-----------------|--------------------|-----------------|
| | Ukupna dužina (cm) | Ukupna masa (g) | Ukupna dužina (cm) | Ukupna masa (g) |
| 1. | 32,2 | 388,3 | 36,2 | 442,8 |
| 2. | 33,1 | 431,2 | 30,9 | 254,2 |
| 3. | 33,5 | 448,8 | 43,2 | 686,5 |
| 4. | 33,1 | 418,1 | 41,3 | 674,1 |
| 5. | 34,8 | 487,7 | 35,7 | 380,5 |
| 6. | 33,1 | 384,3 | 34,9 | 345,5 |
| 7. | 28,5 | 313,7 | 34,9 | 288,4 |
| 8. | 33,1 | 443,5 | 34,1 | 286,2 |
| 9. | 30,2 | 281,5 | 39,1 | 555,0 |
| 10. | 30,8 | 346,4 | 38,4 | 418,1 |
| prosjek | 32,24 | 394,35 | 36,87 | 433,13 |
| standardna devijacija | 1,86559493 | 64,71569018 | 3,649977169 | 157,2099378 |

4.4. Rezultati molekularne identifikacije

4.4.1. Uzgajalište u akvatoriju otoka Cresa

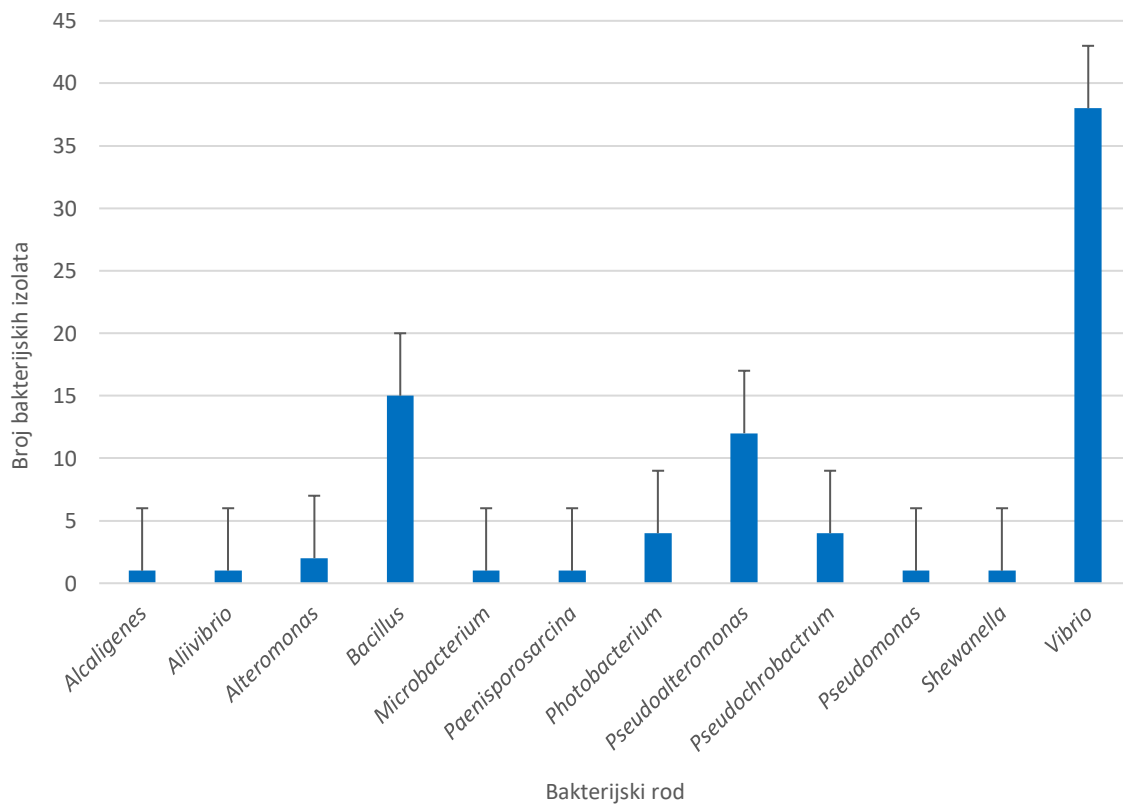
Sekvence gena 16S rRNA iz 81 bakterijskog izolata iz uzgajališta kod otoka Cresa uspoređene su sa sekvencama u banci gena (GenBank, NCBI) te su dobiveni rezultati s postotkom identičnosti > 96 %. Na temelju usporedbe sekvenci, dobivene su 33 vrste bakterija prikazane u Tablici 7. Od ukupnog broja bakterijskih izolata, 28 ih je bilo iz brisa kože lubina, 32 iz morske vode te 21 iz sedimenta. Od svih vrsta bakterija u koži, morskoj vodi i sedimentu, samo tri vrste se pojavljuju u više od jednog tipa uzorka.

Tablica 7 Rezultati molekularne identifikacije bakterijskih izolata iz uzgajališta kod otoka Cresa.

| Vrsta bakterije | Koža (n=28) | | Morska voda (n=32) | | Sediment (n=21) | |
|--|-------------|------|--------------------|------|-----------------|------|
| | No. | % | No. | % | No. | % |
| <i>Alcaligenes faecalis</i> | 1 | 3,6 | | | | |
| <i>Aliivibrio finisterrensis</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Alteromonas macleodii</i> | | | 2 | 6,3 | | |
| <i>Bacillus aquimaris</i> | | | | | 7 | 33,3 |
| <i>Bacillus horikoshii</i> | | | | | 1 | 4,8 |
| <i>Bacillus hwajinpoensis</i> | 2 | 7,1 | | | 3 | 14,3 |
| <i>Bacillus idriensis</i> | | | | | 1 | 4,8 |
| <i>Bacillus tianshenii</i> | | | | | 1 | 4,8 |
| <i>Microbacterium oxydans</i> | 1 | 3,6 | | | | |
| <i>Paenisporosarcina quisquiliarum</i> | | | | | 1 | 4,8 |
| <i>Photobacterium aphoticum</i> | | | | | 4 | 19,0 |
| <i>Pseudoalteromonas arabiensis</i> | 3 | 10,7 | | | | |
| <i>Pseudoalteromonas hodoensis</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Pseudoalteromonas phenolica</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i> | | | 3 | 9,4 | | |
| <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> | | | 3 | 9,4 | | |
| <i>Pseudoalteromonas undina</i> | 1 | 3,6 | | | | |
| <i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> | 4 | 14,3 | | | | |
| <i>Pseudomonas zhaodongensis</i> | 1 | 3,6 | | | | |
| <i>Shewanella marinintestina</i> | | | | | 1 | 4,8 |
| <i>Vibrio alginolyticus</i> | 5 | 17,9 | 2 | 6,3 | | |
| <i>Vibrio chagasii</i> | | | 6 | 18,8 | | |
| <i>Vibrio crassostreae</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Vibrio cyclitrophicus</i> | 4 | 14,3 | | | | |
| <i>Vibrio europaeus</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Vibrio fortis</i> | | | 2 | 6,3 | | |
| <i>Vibrio gigantis</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Vibrio harveyi</i> | 4 | 14,3 | 1 | 3,1 | | |
| <i>Vibrio hyugaensis</i> | | | 1 | 3,1 | | |
| <i>Vibrio kanaloae</i> | | | 3 | 9,4 | | |
| <i>Vibrio neocaledonicus</i> | 2 | 7,1 | | | | |
| <i>Vibrio toranzoniae</i> | | | | | 2 | 9,5 |
| <i>Vibrio tubiashii</i> | | | 3 | 9,4 | | |

Bacillus hwajinpoensis izoliran je iz brisa kože (2 bakterijska izolata) i sedimenta (3 bakterijska izolata). *Vibrio alginolyticus* izoliran je iz brisa kože lubina (5 bakterijska izolata) te iz morske vode (2 bakterijska izolata). *Vibrio harveyi* izoliran je iz brisa kože lubina (4 bakterijska izolata) te iz morske vode (1 bakterijska izolata). Najveću raznolikost bakterijskih vrsta imali su uzorci morske vode (16 vrsta). U uzorcima iz briseva kože lubina identificirano je 11 bakterijskih vrsta, dok je u uzorcima sedimenta identificirano 9 vrsta (Tablica 7).

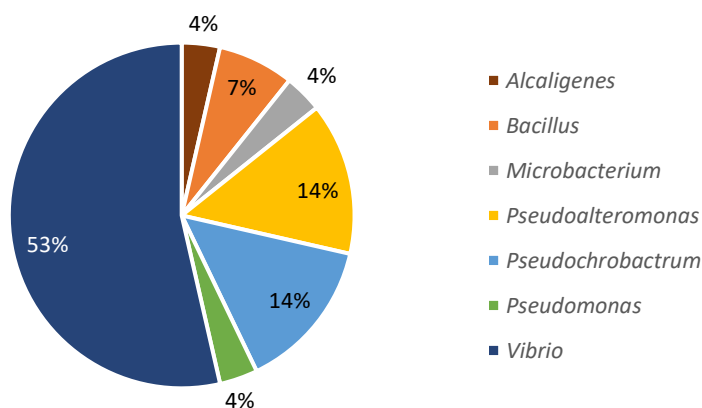
Na Slici 11. prikazani su bakterijski rodovi zastupljeni u svim uzorcima iz uzgajališta u akvatoriju otoka Cresa. Najzastupljeniji rodovi u uzorcima iz uzgajališta su rod *Vibrio* (47 %), rod *Bacillus* (19 %) te rod *Pseudoalteromonas* (15 %). Najveća raznolikost bakterijskih rodova zabilježena je u uzorcima iz briseva kože (sedam rodova). U uzorcima sedimenta zabilježeno je pet bakterijskih rodova, dok su u uzorcima morske vode zabilježena četiri bakterijska roda.



Slika 11 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima iz uzgajališta kod otoka Cresa.

4.4.1.1. Uzorci iz briseva kože lubina kod otoka Cresa

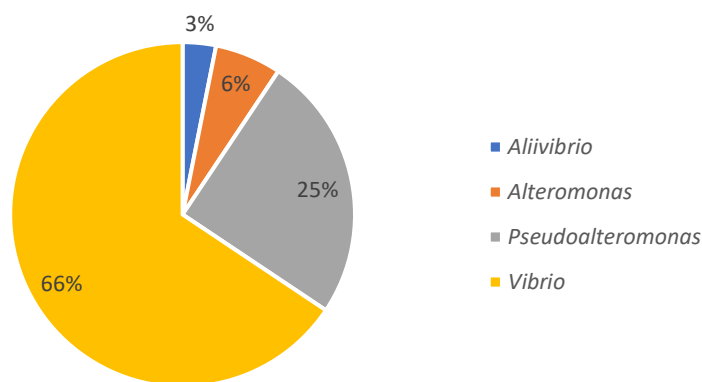
Ukupan broj bakterijskih izolata iz brisa kože lubina iz uzgajališta kod otoka Cresa bio je 28, a identificirano je sedam bakterijskih rodova. Na Slici 12. prikazana je zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima iz briseva kože lubina. Najzastupljenije bakterije bile su bakterije roda *Vibrio* (53 %) te roda *Pseudoalteromonas* (14 %) i *Pseudochrobactrum* (14 %). U najvećem broju bakterijskih izolata zabilježen je *Vibrio alginolyticus* (17,9 %) te *Pseudochrobactrum sacchaloryticum* (14,3 %), *Vibrio cyclitrophicus* (14,3 %) i *Vibrio harveyi* (14,3 %) (Tablica 7).



Slika 12 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod otoka Cresa.

4.4.1.2. Uzorci morske vode kod otoka Cresa

U ukupnom broju uzoraka morske vode iz uzgajališta kod otoka Cresa (32 bakterijska izolata) identificirana su četiri bakterijska roda prikazana na Slici 13. Najdominantniji bakterijski rod bio je rod *Vibrio* (64 %), zatim rod *Pseudoalteromonas* (24 %).

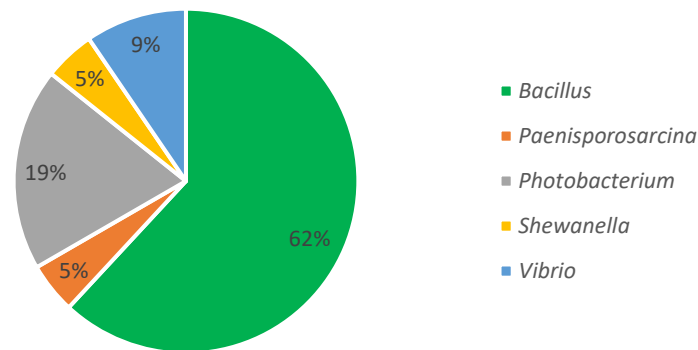


Slika 13 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima morske vode iz uzgajališta kod otoka Cresa.

Od bakterijskih vrsta ističu se *Vibrio chagasii* (18,8 %), *Pseudoalteromonas shioyasakiensis* (9,4 %), *Pseudoalteromonas tetraodonis* (9,4 %), *Vibrio kanaloe* (9,4 %) te *Vibrio tubiashii* (9,4 %) (Tablica 7).

4.4.1.3. Uzorci sedimenta kod otoka Cresa

Iz sedimenta iz uzgajališta kod otoka Cresa dobiven je 21 bakterijski izolat iz pet bakterijskih rodova među kojima je dominirao rod *Bacillus* (62 %) (Slika 14). Drugi najzastupljeniji rod bio je *Photobacterium* (19 %). Među bakterijskim vrstama najzastupljeniji je bio *Bacillus aquimaris* (33,3 %), *Photobacterium aphoticum* (19,0 %) te *Bacillus hwajinpoensis* (14,3 %) (Tablica 7).



Slika 14 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima sedimenta iz uzgajališta kod otoka Cresa.

4.4.2. Uzgajalište u akvatoriju otoka Vrgade

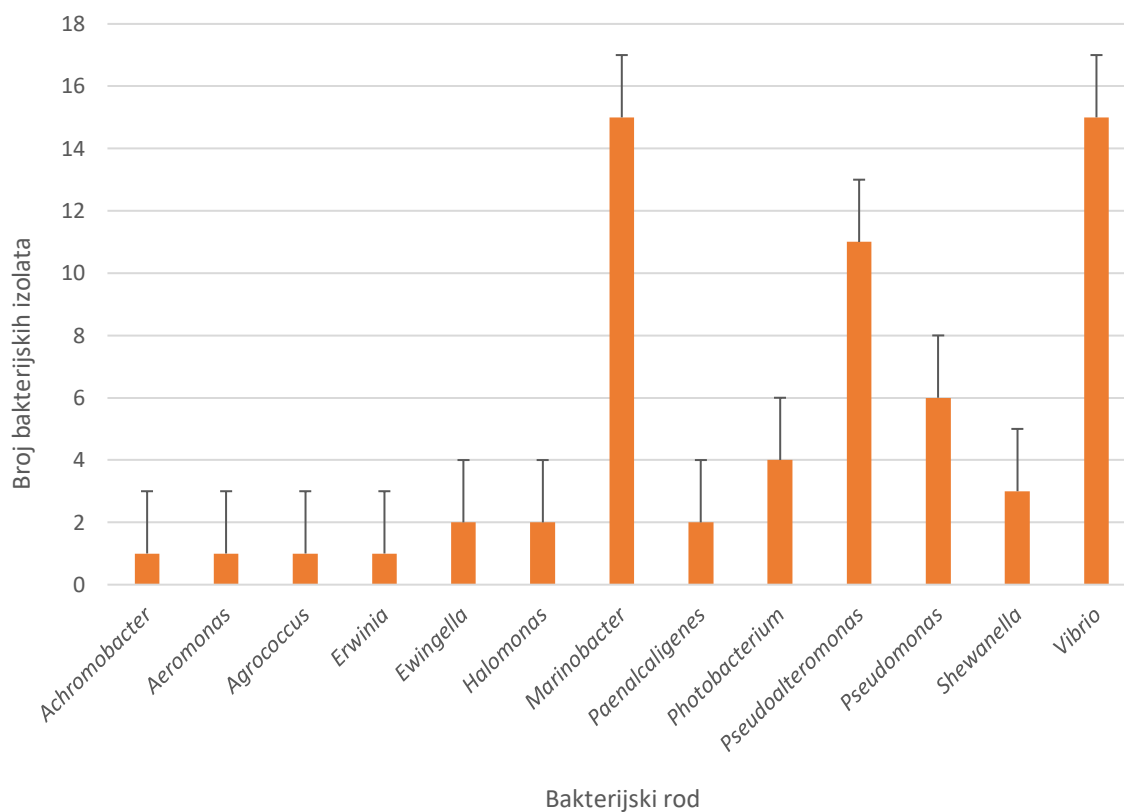
Usporedbom sekvenci gena 16S rRNA iz 64 bakterijska izolata iz uzgajališta u akvatoriju otoka Vrgade sa sekvencama u banci gena (GeneBank, NCBI) identificirane su 22 bakterijske vrste. Rezultati su dobiveni s postotkom identičnosti > 96 % između sekvenci te su prikazani u Tablici 8. Ukupan broj bakterijskih izolata iz brisa kože lubina bio je 20, iz morske vode 22 te iz sedimenta 22. *Vibrio toranzoniae* je identificiran u uzorcima iz briseva kože lubina (3 bakterijska izolata) te u uzorcima sedimenta (6 bakterijskih izolata). *Marinobacter litoralis* identificiran je u uzorcima morske vode (13 bakterijskih izolata) te u uzorcima sedimenta (2 bakterijska izolata). Nadalje, u uzorcima morske vode i sedimenta identificirani su *Pseudoalteromonas tetraodonis* (2 i 4 bakterijska izolata) te *Pseudoalteromonas undina* (4 i 1 bakterijski izolat). Ostale bakterijske vrste zabilježene su samo u jednom tipu uzorka.

Tablica 8 Rezultati molekularne identifikacije bakterijskih izolata iz uzgajališta kod otoka Vrgade.

| Tip uzorka | Koža (n=20) | | Morska voda (n=22) | | Sediment (n=22) | |
|--------------------------------------|----------------|----|-----------------------|------|--------------------|------|
| | No. | % | No. | % | No. | % |
| <i>Achromobacter spanius</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Aeromonas molluscorum</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Agrococcus sp.</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Erwinia billingiae</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Ewingella americana</i> | 2 | 10 | | | | |
| <i>Halomonas aquamarina</i> | | | 1 | 4,5 | | |
| <i>Halomonas boliviensis</i> | | | | | 1 | 4,5 |
| <i>Marinobacter litoralis</i> | | | 13 | 59,1 | 2 | 9,1 |
| <i>Paenalcaligenes suwonensis</i> | | | | | 2 | 9,1 |
| <i>Photobacterium lutimaris</i> | | | | | 4 | 18,2 |
| <i>Pseudoalteromonas tetraodonis</i> | | | 2 | 9,1 | 4 | 18,2 |
| <i>Pseudoalteromonas undina</i> | | | 4 | 18,2 | 1 | 4,5 |
| <i>Pseudomonas azotoformans</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Pseudomonas gessardii</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Pseudomonas kribbensis</i> | | | 1 | 4,5 | | |
| <i>Pseudomonas poae</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Pseudomonas sp. DSM 28142</i> | 1 | 5 | | | | |
| <i>Pseudomonas zhaodongensis</i> | | | 1 | 4,5 | | |
| <i>Shewanella arctica</i> | 3 | 15 | | | | |
| <i>Vibrio anguillarum</i> | 4 | 20 | | | | |
| <i>Vibrio kanaloae</i> | | | | | 2 | 9,1 |
| <i>Vibrio toranzoniae</i> | 3 | 15 | | | 6 | 27,3 |

U uzorcima iz briseva kože lubina zabilježena je najveća raznolikost bakterijskih vrsta (12 vrsta), dok je u uzorcima morske vode zabilježena najmanja raznolikost bakterijskih vrsta (6 vrsta). U uzorcima sedimenta identificirano je 8 bakterijskih vrsta (Tablica 8).

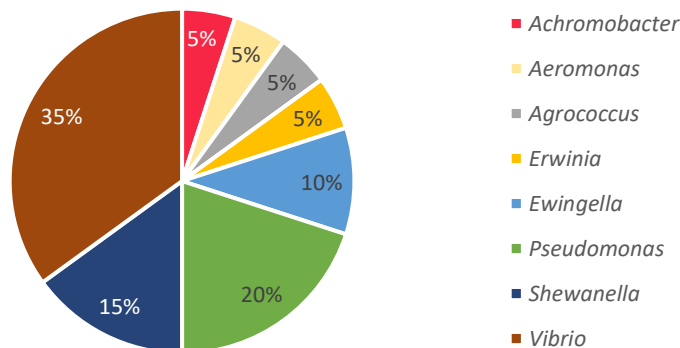
Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima iz uzgajališta kod otoka Vrgade prikazana je na Slici 15. Može se uočiti da su najdominantniji bakterijski rodovi bili *Marinobacter* (23 %), *Vibrio* (23 %) te *Pseudoalteromonas* (17 %). Uzorci iz brisa kože lubina imali su najveću raznolikost bakterijskih rodova (osam rodova). U uzorku sedimenta identificirano je šest bakterijskih rodova, dok je u uzorcima morske vode identificirano njih četiri.



Slika 15 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima iz uzgajališta kod otoka Vrgade.

4.4.2.1. Uzorci iz briseva kože lubina kod otoka Vrgade

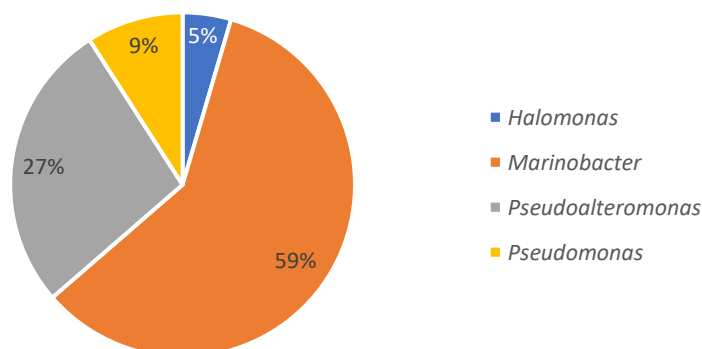
Među 20 bakterijskih izolata iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod otoka Vrgade, identificirano je osam bakterijskih rodova čija je zastupljenost prikazana na Slici 16. Najdominantniji bakterijski rodovi bili su *Vibrio* (35 %) te *Pseudomonas* (20 %). Od bakterijskih vrsta u bakterijskim izolatima iz briseva kože lubina ističu se *Vibrio anguillarum* (20 %), *Shewanella arctica* (15 %) i *Vibrio toranzoniae* (15 %) (Tablica 8).



Slika 16 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod otoka Vrgade.

4.4.2.2. Uzorci morske vode kod otoka Vrgade

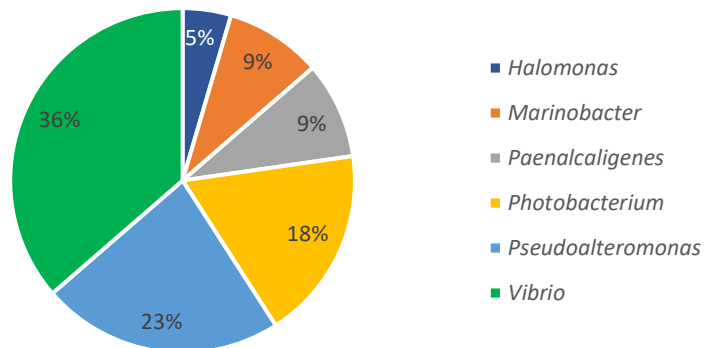
U uzorcima morske vode iz uzgajališta kod otoka Vrgade (22 bakterijska izolata), identificirana su četiri bakterijska roda od kojih su najzastupljeniji bili rod *Marinobacter* (59 %) te rod *Pseudoalteromonas* (27 %). Rezultati zastupljenosti bakterijskih rodova u uzorcima morske vode prikazani su na Slici 17. Od identificiranih bakterijskih vrsta najzastupljenija je *Marinobacter litoralis* (59,1 %) (Tablica 8).



Slika 17 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima morske vode iz uzgajališta kod otoka Vrgade.

4.4.2.3. Uzorci sedimenta kod otoka Vrgade

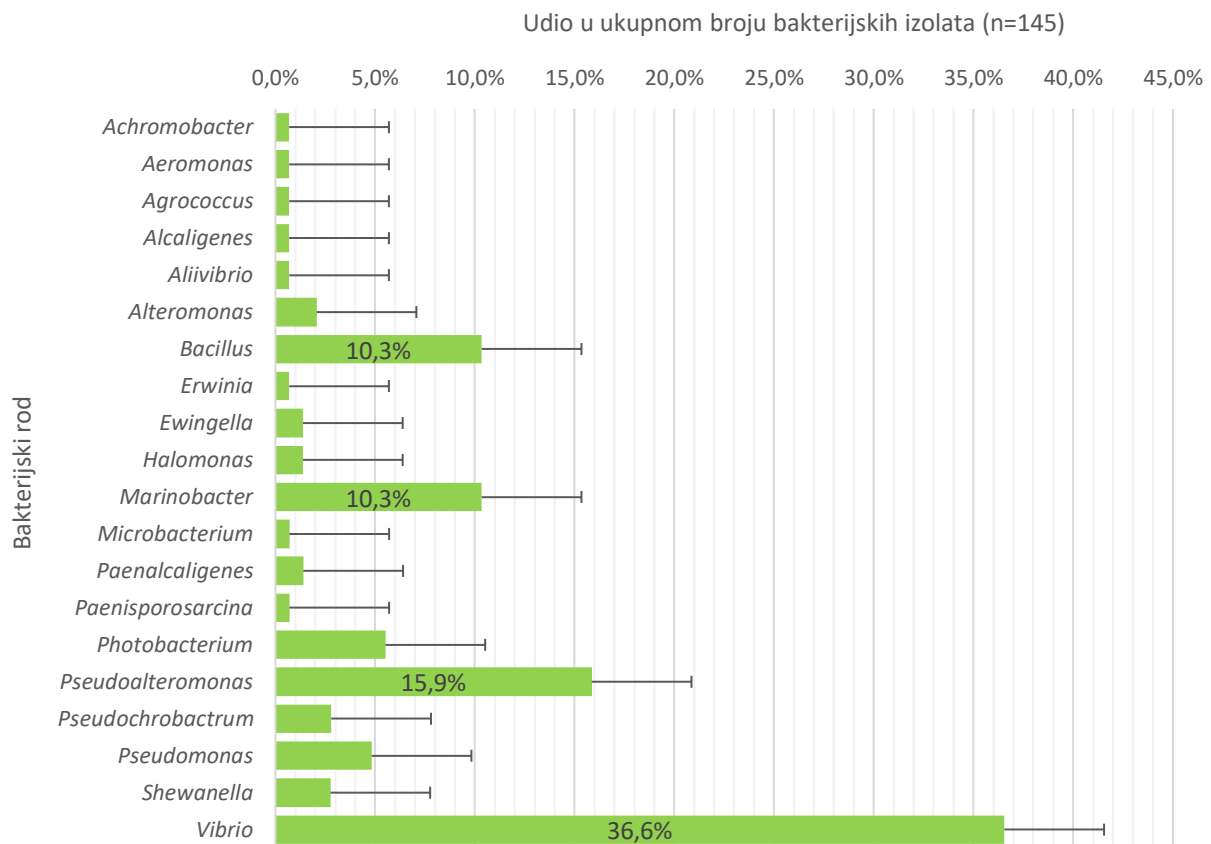
Identificirani bakterijski rodovi u 22 bakterijska izolata iz sedimenta iz uzgajališta kod otoka Vrgade te njihova zastupljenost prikazani su na Slici 18. Među šest bakterijskih rodova najzastupljeniji bili su *Vibrio* (36 %), *Pseudoalteromonas* (23 %) te *Photobacterium* (18 %). Najdominantnije bakterijske vrste bile su *Vibrio toranzoniae* (27,3 %), *Photobacterium lutimaris* (18,2 %) te *Pseudoalteromonas tetraodonis* (18,2 %) (Tablica 8).



Slika 18 Zastupljenost bakterijskih rodova u uzorcima sedimenta iz uzgajališta kod otoka Vrgade.

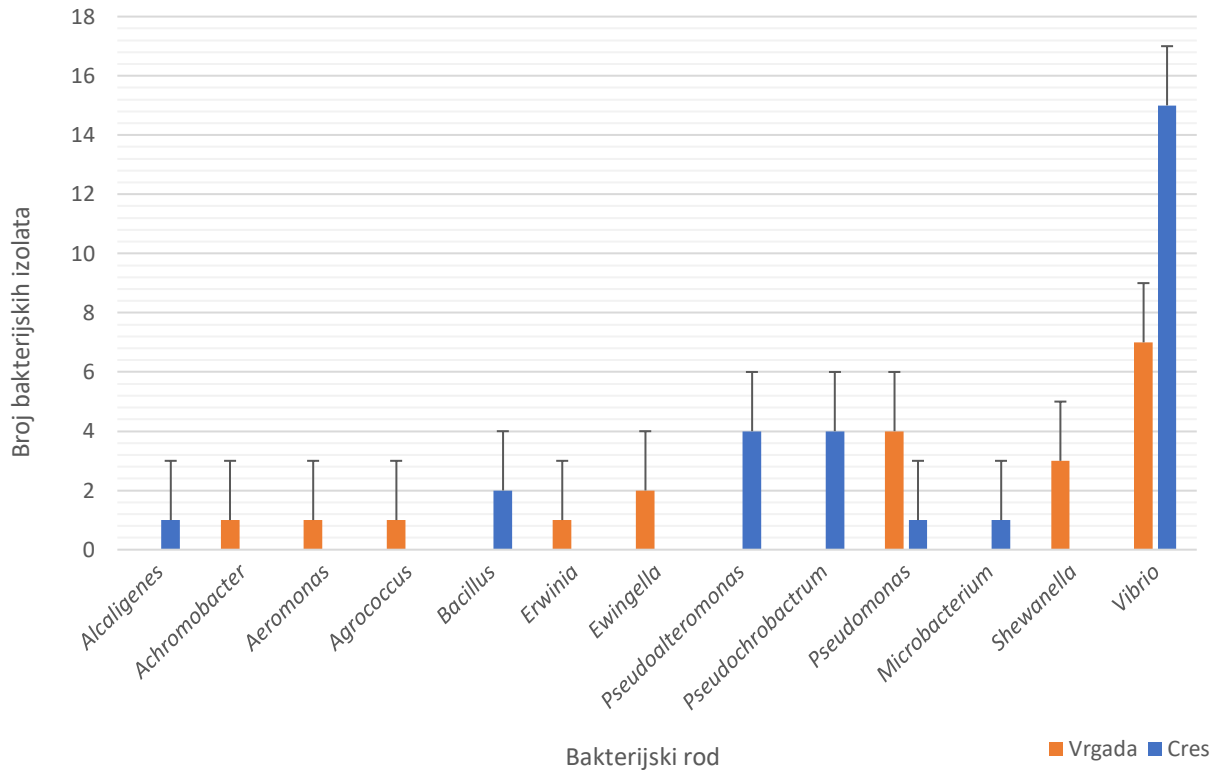
4.4.3. Rezultati iz oba uzgajališta

Ukupni broj bakterijskih izolata iz uzoraka iz uzgajališta kod otoka Cres i kod otoka Vrgade bio je 145, a identificirano je ukupno 20 bakterijskih rodova. Od ukupnog broja bakterijskih izolata, 88% identificiranih bakterija bile su Gram-negativne, dok su 12% bile Gram-pozitivne bakterije. Udio u postotcima pojedinih bakterijskih rodova u ukupnom broju izolata prikazan je na Slici 19. Može se uočiti da su najzastupljeniji bakterijski rodovi bili rod *Vibrio* (36,6 %), rod *Pseudoalteromonas* (15,9 %), rod *Bacillus* (10,3 %) te rod *Marinobacter* (10,3 %).



Slika 19 Udio bakterijskih rodova (u postotcima) u ukupnom broju bakterijskih izolata (n=145) iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade.

Iz oba uzgajališta, u 48 bakterijskih izolata iz briseva kože lubina identificirano je 13 bakterijskih rodova. Na Slici 20. prikazan je udio bakterijskih rodova u uzorcima iz briseva kože lubina iz dva uzgajališta. Može se uočiti kako su samo rod *Pseudomonas* i rod *Vibrio* identificirani u uzorcima iz oba uzgajališta. Rod *Pseudomonas* identificiran je u ukupno pet uzoraka (10 %), dok je rod *Vibrio* identificiran u 22 uzorka (46 %).



Slika 20 Udio bakterijskih rodova u ukupnom broju bakterijskih izolata iz briseva kože lubina (n=48) iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade.

4.5. Otpornost bakterijskih izolata na antibiotike

4.5.1. Bakterijski izolati iz brisa kože lubina

Na ukupno 48 bakterijskih izolata iz brisa kože lubina iz uzgajališta u akvatoriju otoka Cresa (28 izolata) te u akvatoriju otoka Vrgade (20 izolata) testirana je otpornost na 13 antibiotika. Broj izolata otpornih na pojedine antibiotike, kao i udio u postotcima navedeni su u Tablici 9.

Najveći broj bakterijskih izolata iz uzgajališta kod Cresa pokazalo je otpornost na vankomicin (85,7 %), ampicilin (57,1 %), enrofloksacin (39,3 %), eritromicin (39,3 %) te streptomycin (39,3 %). Bakterijski izolati bili su u najvećem broju osjetljivi na imipenem (82,1 %), gentamicin (78,6 %) te florfenikol (71,4 %). *Vibrio alginolyticus* identificiran je u najvećem broju uzoraka. Svi izolati identificirani kao *Vibrio alginolyticus* bili su otporni na vankomicin te ampicilin. Otpornost izolata na ostale antibiotike bila je neujednačena.

Najviše bakterijskih izolata iz uzgajališta kod Vrgade bilo je otporno na ampicilin (100,0 %), vankomicin (100,0 %), eritromicin (75,0 %), florfenikol (65,0 %) te imipenem (65,0 %). Najveći broj bakterijskih izolata bilo je osjetljivo na gentamicin (60,0 %) i flumekvin (45,0 %). Na ciprofloksacin 50,0 % izolata bilo je srednje osjetljivo. Najdominantnija bakterijska vrsta u uzorcima bio je *Vibrio anguillarum* te su svi bakterijski izolati bili otporni na enrofloksacin, ampicilin, eritromicin, vankomicin i streptomycin. Na ostale antibiotike nije zabilježena ujednačena otpornost između izolata.

Promatrajući sve podatke, najviše bakterijskih izolata iz oba uzgajališta pokazalo je otpornost na vankomicin (Cres 85,7 %, Vrgada 100,0 %) te ampicilin (Cres 57,1 %, Vrgada 100,0 %). Najveći broj izolata bio je osjetljiv na gentamicin (Cres 78,6 %, Vrgada 60,0 %) te na flumekvin (Cres 64,3 %, Vrgada 45,0 %).

Između dva uzgajališta nisu zabilježene statistički značajne razlike u broju bakterijskih izolata otpornih na antibiotike ($p > 0,05$).

Tablica 9 Otpornost na antibiotike bakterijskih izolata iz brisa kože lubina iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade.

(n – broj bakterijskih izolata)

| Antibiotik | Cres (n=28) | | | | Vrgada (n=20) | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|------|-----------------------|------|---------------|------|---------------|------|-----------------------|------|--------------|-------|
| | Osjetljiv (S) | | Srednje osjetljiv (I) | | Otporan (R) | | Osjetljiv (S) | | Srednje osjetljiv (I) | | Otporan (R) | |
| | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % |
| Enrofloksacin | 12 | 42,9 | 5 | 17,9 | 11 | 39,3 | 4 | 20,0 | 6 | 30,0 | 10 | 50,0 |
| Florfenikol | 20 | 71,4 | | | 8 | 28,6 | 7 | 35,0 | | | 13 | 65,0 |
| Gentamicin | 22 | 78,6 | 2 | 7,1 | 4 | 14,3 | 12 | 60,0 | 4 | 20,0 | 4 | 20,0 |
| Ampicilin | 10 | 35,7 | 2 | 7,1 | 16 | 57,1 | | | | | 20 | 100,0 |
| Eritromicin | 5 | 17,9 | 12 | 42,9 | 11 | 39,3 | | | 5 | 25,0 | 15 | 75,0 |
| Oksitetraciklin | 7 | 25,0 | 12 | 42,9 | 9 | 32,1 | | | 13 | 65,0 | 7 | 35,0 |
| Sulfametoksazol/ trimetoprim | 17 | 60,7 | 5 | 17,9 | 6 | 21,4 | 6 | 30,0 | 3 | 15,0 | 11 | 55,0 |
| Vankomicin | 3 | 10,7 | 1 | 3,6 | 24 | 85,7 | | | | | 20 | 100,0 |
| Flumekvin | 18 | 64,3 | 4 | 14,3 | 6 | 21,4 | 9 | 45,0 | 3 | 15,0 | 8 | 40,0 |
| Imipenem | 23 | 82,1 | | | 5 | 17,9 | 5 | 25,0 | 2 | 10,0 | 13 | 65,0 |
| Ciprofloksacin | 13 | 46,4 | 6 | 21,4 | 9 | 32,1 | 4 | 20,0 | 10 | 50,0 | 6 | 30,0 |
| Streptomicin | 10 | 35,7 | 7 | 25,0 | 11 | 39,3 | 3 | 15,0 | 6 | 30,0 | 11 | 55,0 |
| Kloramfenikol | 16 | 57,1 | 8 | 28,6 | 4 | 14,3 | 7 | 35,0 | 5 | 25,0 | 8 | 40,0 |

4.5.2. Bakterijski izolati iz uzoraka morske vode

Broj bakterijskih izolata iz uzoraka morske vode otpornih na antibiotike te udio u postotcima prikazani su u Tablici 10. Ukupan broj testiranih bakterijskih izolata iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade bio je 54 (32 iz uzgajališta kod Cresa, 22 iz uzgajališta kod Vrgade).

84,4 % bakterijskih izolata iz morske vode iz uzgajališta kod Cresa bilo je osjetljivo na vankomicin, a 50,0 % na ampicilin. Najveći broj bakterijskih izolata bio je osjetljiv na kloramfenikol (90,6 %), imipenem (87,5 %) te sulfametoksazol/ trimetoprim (87,5 %). Na eritromicin 50,0 % bakterijskih izolata bilo je srednje osjetljivo. Najdominantnija bakterijska vrsta u uzorcima morske vode bio je *Vibrio chagasii* te su svi bakterijski izolati pokazali otpornost na vankomicin.

Što se tiče bakterijskih izolata iz uzoraka morske vode iz uzgajališta kod Vrgade, najviše ih je pokazalo otpornost na vankomicin (90,9 %). Na ostalih 12 korištenih antibiotika svi bakterijski izolati bili su većinom osjetljivi ili srednje osjetljivi. U 22 uzorka morske vode, najzastupljenija bakterijska vrsta bio je *Marinobacter litoralis* te su svi bakterijski izolati bili otporni na vankomicin, dok za ostale antibiotike otpornost nije bila konzistentna.

Razlike u broju otpornih bakterijskih izolata između dva uzgajališta nisu bile statistički značajne ($p > 0,05$).

Tablica 10 Otpornost na antibiotike bakterijskih izolata iz morske vode iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade.

(n – broj bakterijskih izolata)

| Antibiotik | Cres (n=32) | | | | Vrgada (n=22) | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|------|-----------------------|------|---------------|------|---------------|------|-----------------------|------|--------------|------|
| | Osjetljiv (S) | | Srednje osjetljiv (I) | | Otporan (R) | | Osjetljiv (S) | | Srednje osjetljiv (I) | | Otporan (R) | |
| | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % |
| Enrofloksacin | 13 | 40,6 | 9 | 28,1 | 10 | 31,3 | 12 | 54,5 | 7 | 31,8 | 3 | 13,6 |
| Florfenikol | 26 | 81,3 | 3 | 9,4 | 3 | 9,4 | 18 | 81,8 | 1 | 4,5 | 3 | 13,6 |
| Gentamicin | 22 | 68,8 | 4 | 12,5 | 6 | 18,8 | 19 | 86,4 | 2 | 9,1 | 1 | 4,5 |
| Ampicilin | 10 | 31,3 | 6 | 18,8 | 16 | 50,0 | 18 | 81,8 | 1 | 4,5 | 3 | 13,6 |
| Eritromicin | 4 | 12,5 | 16 | 50,0 | 12 | 37,5 | 4 | 18,2 | 15 | 68,2 | 3 | 13,6 |
| Oksitetraciklin | 25 | 78,1 | 6 | 18,8 | 1 | 3,1 | | | 19 | 86,4 | 3 | 13,6 |
| Sulfametoksazol/ trimetoprim | 28 | 87,5 | 1 | 3,1 | 3 | 9,4 | 11 | 50,0 | 5 | 22,7 | 6 | 27,3 |
| Vankomicin | 2 | 6,3 | 3 | 9,4 | 27 | 84,4 | | | 2 | 9,1 | 20 | 90,9 |
| Flumekvin | 26 | 81,3 | 2 | 6,3 | 4 | 12,5 | 18 | 81,8 | | | 4 | 18,2 |
| Imipenem | 28 | 87,5 | 2 | 6,3 | 2 | 6,3 | 19 | 86,4 | 2 | 9,1 | 1 | 4,5 |
| Ciprofloksacin | 16 | 50,0 | 10 | 31,3 | 6 | 18,8 | 12 | 54,5 | 6 | 27,3 | 4 | 18,2 |
| Streptomicin | 8 | 25,0 | 10 | 31,3 | 13 | 40,6 | 9 | 40,9 | 10 | 45,5 | 3 | 13,6 |
| Kloramfenikol | 29 | 90,6 | 2 | 6,3 | 1 | 3,1 | 17 | 77,3 | 3 | 13,6 | 2 | 9,1 |

4.5.3. Bakterijski izolati iz uzoraka sedimenta

Ukupno 43 bakterijska izolata iz sedimenta (21 iz uzgajališta kod Cresa, 22 iz uzgajališta kod Vrgade) testirana su na otpornost na antibiotike. Rezultati broja otpornih bakterijskih izolata i udio u postotcima navedeni su u Tablici 12.

Najviše bakterijskih izolata iz uzorka sedimenta iz uzgajališta kod otoka Cresa pokazalo je otpornost na enrofloksacin (61,9 %) te flumekvin (52,9 %). S druge strane, 66,7 % bakterijskih izolata bilo je osjetljivo na gentamicin i imipenem, dok je 61,9 % bilo osjetljivo na ampicilin. Na oksitetraciklin i florfenikol 57,1 % izolata bilo je srednje osjetljivo. Među identificiranim bakterijskim vrstama najčešći je bio *Bacillus aquimaris* te je najviše bakterijskih izolata (šest od sedam bakterijskih izolata) bilo otporno na enrofloksacin. Za druge antibiotike otpornost bakterijskih izolata nije bila konzistentna.

86,4 % bakterijskih izolata iz uzorka sedimenta iz uzgajališta u akvatoriju otoka Vrgade pokazalo je otpornost na vankomicin. Najveći broj bakterijskih izolata bio je osjetljiv na gentamicin (100,0 %), imipenem (100,0 %), kloramfenikol (86,4 %), sulfametoksazol/ trimetoprim (86,4 %). Na eritromicin 59,1 % bakterijskih izolata bilo je srednje osjetljivo. Od bakterijskih vrsta *Vibrio toranzoniae* bio je identificiran u najvećem broju uzoraka te je pet od šest bakterijskih izolata bilo otporno na vankomicin. Podaci o otpornosti na ostale antibiotike nisu bili ujednačeni između izolata.

Razlike u broju bakterijskih izolata otpornih na antibiotike između dva uzgajališta bile su statistički značajno veće na uzgajalištu kod otoka Cresa ($p < 0,05$).

Tablica 11 Otpornost na antibiotike bakterijskih izolata iz sedimenta iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade.

(n – broj bakterijskih izolata)

| Antibiotik | Cres (n=21) | | | | Vrgada (n=22) | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------|------|-----------------------|------|---------------|------|---------------|-------|-----------------------|------|--------------|------|
| | Osjetljiv (S) | | Srednje osjetljiv (I) | | Otporan (R) | | Osjetljiv (S) | | Srednje osjetljiv (I) | | Otporan (R) | |
| | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % | Broj izolata | % |
| Enrofloksacin | 6 | 28,6 | 2 | 9,5 | 13 | 61,9 | 12 | 54,5 | 8 | 36,4 | 2 | 9,1 |
| Florfenikol | | | 12 | 57,1 | 9 | 42,9 | 18 | 81,8 | 1 | 4,5 | 3 | 13,6 |
| Gentamicin | 14 | 66,7 | 3 | 14,3 | 4 | 19,0 | 22 | 100,0 | | | | |
| Ampicilin | 13 | 61,9 | 2 | 9,5 | 6 | 28,6 | 14 | 63,6 | 1 | 4,5 | 7 | 31,8 |
| Eritromicin | 3 | 14,3 | 9 | 42,9 | 9 | 42,9 | 3 | 13,6 | 13 | 59,1 | 6 | 27,3 |
| Oksitetraciklin | 3 | 14,3 | 12 | 57,1 | 6 | 28,6 | 15 | 68,2 | 5 | 22,7 | 2 | 9,1 |
| Sulfametoksazol/ trimetoprim | 11 | 52,4 | 7 | 33,3 | 3 | 14,3 | 19 | 86,4 | 1 | 4,5 | 2 | 9,1 |
| Vankomicin | 7 | 33,3 | 5 | 23,8 | 9 | 42,9 | 2 | 9,1 | 1 | 4,5 | 19 | 86,4 |
| Flumekvin | 8 | 38,1 | 2 | 9,5 | 11 | 52,4 | 18 | 81,8 | | | 4 | 18,2 |
| Imipenem | 14 | 66,7 | 1 | 4,8 | 6 | 28,6 | 22 | 100,0 | | | 2 | 9,1 |
| Ciprofloksacin | 6 | 28,6 | 5 | 23,8 | 10 | 47,6 | 16 | 72,7 | 2 | 9,1 | 4 | 18,2 |
| Streptomicin | 6 | 28,6 | 9 | 42,9 | 6 | 28,6 | 11 | 50,0 | 9 | 40,9 | 2 | 9,1 |
| Kloramfenikol | 9 | 42,9 | 9 | 42,9 | 3 | 14,3 | 19 | 86,4 | 2 | 9,1 | 1 | 4,5 |

5. RASPRAVA

Kvaliteta morske vode u uzgajalištima uvelike utječe na uspješnu proizvodnju ribe. Stres uzrokovan poremećajima kvalitete morske vode negativno utječe na rast i razvoj ribe (Philipose i sur. 2012). Fizikalno-kemijski parametri morske vode izmjereni na uzgajalištu kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade bili su u skladu s dosadašnjim istraživanjima u jadranskim uzgajalištima lubina (Kapetanović i sur. 2013, Kapetanović i sur. 2017, Matijević i sur. 2009). Konduktivitet ukazuje na sadržaj iona u vodi, dok ukupno otopljene tvari (TDS) predstavljaju sve krute tvari otopljene u vodi. Ta dva parametra su u pozitivnoj korelaciji te su se vrijednosti razlikovale između uzgajališta (Mustapha 2017). Vrijednost oksidacijsko-redukcijskog potencijala u morskoj vodi varira ovisno o pH, temperaturi, salinitetu i otopljenom kisiku. Iako je utjecaj ORP-a na zdravlje i razvoj ribe slabo istražen, u istraživanju Li i sur. (2014) je pokazano da visoke vrijednosti ORP-a (iznad 320 mV) utječu na smanjenje apetita i smrtnost lubina.

Mikrobiološkom analizom iz briseva kože lubina i uzoraka morske vode zabilježen je veći ukupni broj heterotrofnih bakterija kod uzoraka morske vode. Budući da je uzorkovanje obavljeno tijekom ljeta, mogući razlog tome je visoka temperatura morske vode koja stimulira rast bakterija (Kapetanović i sur. 2017). S druge strane, broj bakterija roda *Vibrio* bio je statistički značajno veći u uzorcima morske vode iz uzgajališta kod Vrgade ($p < 0,05$) nego kod otoka Cresa što se može objasniti utjecajem veće temperature kod otoka Vrgade koja potiče rast bakterija. Međutim, u uzorcima iz briseva kože lubina statistički značajno veći broj bakterija roda *Vibrio* ($p < 0,05$) zabilježen je u uzorcima iz uzgajališta kod Cresa što je u skladu s činjenicama koje iznosi Rosado i sur. (2019a) da se sastav mikroflore kože razlikuje od sastava mikrobnih zajednica morske vode.

S obzirom na tehnologiju uzgoja s i bez primjene antibiotika, analizirajući sastav mikrobnih zajednica u oba uzgajališta, može se primijetiti sličan broj bakterijskih rodova u svakom tipu uzorka (koža, morska voda, sediment). U uzorcima morske vode iz oba uzgajališta utvrđena je bakterijska zajednica iz po četiri roda. Međutim, uspoređujući identificirane rodove zastupljenost bakterijskih rodova se razlikuje. Također, i broj bakterijskih vrsta se razlikuje te je u uzorcima morske vode iz uzgajališta kod Cresa identificirano 16 bakterijskih vrsta, dok je u uzorcima iz uzgajališta kod Vrgade identificirano 6 bakterijskih vrsta. Na raznolikost bakterijskih vrsta uvelike utječe kvaliteta morske vode u uzgajalištu (Onianwah i sur. 2018). Iako je prema fizikalno-kemijskim te mikrobiološkim parametrima morska voda izvorsne kakvoće u oba uzgajališta, primjena antibiotika u uzgajalištu kod otoka Vrgade je potencijalno utjecala na kvalitetu morske vode, a time i na raznolikost bakterijskih vrsta. Rosado i sur. (2019b) iznose kako primjena antibiotika u uzgajalištima može utjecati na promjenu sastava bakterijskih vrsta u mikroflori kože čime se smanjuje

raznolikost bakterija te ribe postaju manje otporne na bakterijske infekcije. Unatoč tome, u ovom radu je identificirano 12 bakterijskih vrsta iz uzoraka briseva kože lubina u uzgajalištu kod otoka Vrgade gdje se primjenjuju antibiotici. U uzgajalištu bez primjene antibiotika kod otoka Cresa je pak identificirano 11 bakterijskih vrsta iz uzoraka briseva kože lubina. Međutim, u oba uzgajališta, u uzorcima iz briseva kože identificirana su dva zajednička roda, *Pseudomonas* i *Vibrio*.

Koža je, kao što je spomenuto u uvodnom dijelu, jedno od glavnih mjesta ulaska patogena i infekcija, dok sluz kože riba ima značajnu imunološku ulogu i antibakterijsko djelovanje (Esteban 2012). Zbog toga je jedan od ciljeva ovog rada bio identificirati bakterijske vrste iz briseva kože lubina s posebnim naglaskom na patogene bakterije. Analizirajući bakterijske vrste identificirane u uzorcima iz briseva kože lubina, mogu se uočiti neke potencijalno patogene bakterije, iako uzorkovane ribe nisu pokazivale kliničke znakove bolesti. To potvrđuje činjenicu da mikroflora kože riba sadržava patogene bakterije koje ne uzrokuju bolesti ako ne dođe do poremećaja u ravnoteži mikroflore (De Bruijn i sur. 2018).

Pseudoalteromonas undina izoliran je iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod Cresa. *P. undina* uobičajeno je rasprostranjen u morskoj vodi, posebice u uzgajalištima bogatima organskom tvari, no nije zabilježen kao patogena bakterija osim u jednom istraživanju iz 2007. gdje je uzrokovao smrt kod svih uzorkovanih lubina (Pujalte i sur. 2007). Također, iz uzgajališta kod Cresa izolirani su patogeni *Vibrio alginolyticus* i *Vibrio harveyi*. *V. alginolyticus* poznat je kao uzročnik vibrioze, opasne bolesti za ribe (Kapetanović i sur. 2013), no u nedavnim istraživanjima pokazano je kako *V. harveyi* također predstavlja potencijalnu opasnost za gubitke u uzgoju lubina u Mediteranu (Vendramin i sur. 2016).

Uzorci iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod otoka Vrgade također su sadržavali neke patogene bakterije. *Vibrio anguillarum* jedan je od uzročnika vibrioze istraživan u Jadranskom moru (Kapetanović i sur. 2019), dok je *Vibrio toranzoniae* za sad identificiran kao patogen samo kod bolesnih morskih jegulja (*Genypterus chilensis*) u Čileu (Lasa i sur. 2015). Također, izoliran je *Pseudomonas gessardii* koji je u nedavnom istraživanju utvrđen kao patogen za ličinku škampa, točnije kao oportunistički patogen, dok je *Vibrio alginolyticus* utvrđen kao primarni patogen (Hamza i sur. 2018).

S obzirom na do sad utvrđenu patogenost bakterija *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum* i *Vibrio harveyi*, bitno je naglasiti njihovu otpornost na antibiotike iako je kod pojedinih izolata bila neujednačena. *V. alginolyticus* u uzorcima iz briseva kože lubina iz uzgajališta kod otoka Cresa pokazao je otpornost na antibiotike streptomycin i ampicilin. U prethodnim istraživanjima *V. alginolyticus* izoliran iz briseva kože lubina iz tri uzgajališta na Jadranu (Limski kanal, otok Ugljan i poluotok Pelješac) pokazao je otpornost na pet od 13 testiranih antibiotika (ampicilin, penicilin, piperacilin, sulfametoksazol/ trimetoprim i trimetoprim) što ukazuje na manju otpornost izoliranog *V. alginolyticus* u ovom istraživanju (Kapetanović i sur. 2013). S druge strane, istraživanja obavljena u Indiji na uzgojenoj tigrastoj kozici (*Penaes monodon*)

pokazala su jaku osjetljivost *V. alginolyticusa* na streptomycin što je u suprotnosti s dobivenim rezultatima ovog istraživanja (Selvin i Lipton 2003). Također, svi izolati *V. alginolyticusa* u ovom istraživanju pokazali su osjetljivost ili srednju osjetljivost na sulfametoksazol/ trimetoprim koji je često korišten za liječenje vibrioze što je u skladu s istraživanjima Zorrilla i sur. gdje su istraživanja provedena na bolesnim jedinkama orade (*Sparus aurata*) iz uzgoja u Španjolskoj (2003).

Za izolate bakterije *V. harveyi* iz uzgajališta kod Cresa utvrđena je otpornost na ampicilin, eritromicin i vankomicin. Rezultati prethodnog istraživanja u kojem je *V. harveyi* izoliran iz morske vode u Južnoj Koreji utvrdili su otpornost na ampicilin i vankomicin, dok je na eritromicin izolirani *V. harveyi* pokazao osjetljivost (Kang i sur. 2014).

Vibrio anguillarum izoliran je iz uzgajališta kod otoka Vrgade te je utvrđena otpornost na antibiotike ampicilin, enrofloksacin, eritromicin, streptomycin i vankomicin. Otpornost *V. anguillarum* u istraživanju uzoraka iz različitih briseva iz uzgojene kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), utvrđena je za kloksacilin, ampicilin, sulfametoksazol/ trimetoprim i eritromicin (Parin i sur. 2019). S obzirom na različitu organizam u istraživanju, kao i lokaciju (Turska) odstupanja u rezultatima su uobičajena.

U nedavnom istraživanju, *V. anguillarum* izoliran je iz brisa kože i škrge lubina (Mali Ston) te su rezultati pokazali otpornost izolata na gentamicin, eritromicin i streptomycin što ne odgovara u potpunosti rezultatima ovog istraživanja (Kapetanović i sur. 2019). Dakle, veća otpornost *V. anguillarum* utvrđena je u ovom istraživanju što ukazuje na mogući razvoj otpornosti bakterija na pojedine antibiotike na koje u prošlim istraživanjima nije utvrđena otpornost.

Bitno je uočiti da je patogen *V. anguillarum* prema ovom istraživanju, razvio otpornost na veći broj antibiotika u uzgajalištu gdje se primjenjuju antibiotici u uzgoju (kod otoka Vrgade) nego patogene bakterije roda *Vibrio* zabilježene u uzorcima iz uzgajališta gdje nema upotrebe antibiotika (kod otoka Cresa).

Budući da su spomenute patogene bakterije identificirane u većem broju uzoraka iz briseva kože lubina iz svakog uzgajališta te da je utvrđen razvoj otpornosti na pojedine antibiotike, predstavljaju određenu opasnost od izbivanja bolesti i gubitaka u uzgajalištima kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade.

6. ZAKLJUČAK

- Na temelju fizikalno-kemijske analize morske vode iz uzgajališta kod otoka Cresa i kod otoka Vrgade utvrđeno je da vrijednosti parametara zadovoljavaju potrebe u uzgoju.
- Mikrobiološkom analizom utvrđeno je da je morska voda iz oba uzgajališta izvršne kakvoće prema Uredbi o kakvoći vode za kupanje (Narodne novine br. 51/14). Također, u uzorcima iz briseva kože lubina utvrđen je statistički značajno veći broj ukupnih heterotrofnih bakterija i bakterija roda *Vibrio* ($p < 0,05$) u uzorcima iz uzgajališta kod otoka Cresa koje ne koriste antibiotike.
- Molekularnom identifikacijom bakterijskih izolata iz uzoraka morske vode iz svakog uzgajališta utvrđeno je 16 bakterijskih vrsta u uzorcima iz uzgajališta kod Cresa koje ne primjenjuje antibiotike, dok je iz uzgajališta s primjenom antibiotika kod Vrgade utvrđeno 6 bakterijskih vrsta. Mogući uzrok manje raznolikosti bakterijskih vrsta je primjena antibiotika koja može utjecati na promjenu sastava bakterijskih vrsta u mikrobnj zajednici.
- U bakterijskim izolatima iz briseva kože lubina iz oba uzgajališta, utvrđene su različite mikrobne zajednice u odnosu na mikrobne zajednice iz uzoraka morske vode iz odgovarajućih uzgajališta što potvrđuje spoznaju o različitosti mikrobnih zajednica kože riba i vodenog okoliša koja ih okružuje. Analizom sastava mikrobnih zajednica kože lubina u uzgoju s i bez primjene antibiotika utvrđena su samo dva zajednička roda: *Pseudomonas* i *Vibrio*.
- Uzorkovane ribe nisu pokazivale kliničke znakove bolesti u ovom istraživanju, no u mikrobnim zajednicama kože uzorkovanih jedinki lubina identificirane su potencijalno patogene bakterije od kojih su najznačajnije *Vibrio alginolyticus* i *Vibrio harveyi* (izolati iz uzgajališta kod Cresa) te *Vibrio anguillarum* (izolati iz uzgajališta kod Vrgade). Navedene bakterijske vrste uzročnici su česte bolesti kod riba – vibrioze.
- Navedene potencijalno patogene vrste bakterija, identificirane u izolatima iz uzgajališta kod Cresa, jedine su zajedničke vrste mikrobnj zajednici kože i morske vode, što upućuje na moguću rezervoar ovih patogena u morskoj vodi.
- *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* i *V. harveyi* razvili su otpornost na određene antibiotike inače korištene u akvakulturi što potencijalno može biti problem za spomenuta uzgajališta ako dođe do poremećaja i izbijanja bolesti. Također, postoji mogućnost daljnjeg razvoja otpornosti na antibiotike i horizontalnog prijenosa gena za otpornost između bakterija, posebice u uzgajalištu kod Vrgade gdje se antibiotici primjenjuju.
- Unatoč pokazanoj otpornosti pojedinih bakterija na neke antibiotike, njihova primjena značajna je za liječenje bolesti i smanjivanje gubitaka u akvakulturi. Testiranje otpornosti bakterije, koja je uzročnik bolesti, na antibiotike omogućuje primjenu najučinkovitijeg antibiotika s najmanjom otpornošću u slučaju pojave bolesti.
- Međutim, što se više antibiotika koristi, to je vjerojatnije da će bakterije razviti otpornost na njih, što u konačnici znači da se moraju koristiti samo kad je to apsolutno potrebno. Najučinkovitije sredstvo za sprječavanje razvoja otpornosti bakterija na antibiotike je smanjiti potrebu za upotrebom antibiotika u akvakulturi.

7. LITERATURA

Cabello F. C. 2006. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology* **8**, 1137-1144.

Cerrano, C., Bakran-Petricioli, Tatjana, Bastari, A., Frascchetti, S., Huete-Stauffer, C., Ferretti, F., Micheli, F., Ponti, M., Pusceddu A., Valisano L. 2015. Adriatic Sea: Description of the ecology and identification of the areas that may deserve to be protected. United Nations Environment Programme/Mediterranean Action Plan (UNEP/MAP) - Regional Activity Centre for Specially Protected Areas (RAC/SPA), Tunis, urednici: Cebrian, D., Requena, S. Izvješće.

Dadar M., Dhama K., Vakharia V. N., Hoseinifar S. H., Karthik K., Tiwari R., Khandia R., Munjal A., Salgado-Miranda C., Joshi S. K. 2016. Advances in Aquaculture Vaccines Against Fish Pathogens: Global Status and Current Trends. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture* **25**, 184-217.

De Bruijn I., Liu Y., Wiegertjes G. F., Raaijmakers J. M. 2018. Exploring fish microbial communities to mitigate emerging diseases in aquaculture. *FEMS Microbiology Ecology* **94**, 1-12.

Esteban M. A. 2012. An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology* **2012**, 1-29.

Hall T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* **41**, 95-98.

Hamza F., Kumar A. R., Zinjarde S. 2018. Efficacy of cell free supernatant from *Bacillus licheniformis* in protecting *Artemia salina* against *Vibrio alginolyticus* and *Pseudomonas gessardii*. *Microbial Pathogenesis* **116**, 335-344.

Jardas I., Pallaoro A., Vrgoč N., Jukić-Peladić S., Dadić V. (2008): Crvena knjiga morskih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture i Državni zavod za zaštitu prirode RH, Zagreb.

Kang C. H., Kim Y. G., Oh S. J., Mok J. S., Cho M. H., So J. S. 2014. Antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* isolated from seawater in Korea. *Marine Pollution Bulletin* **86**, 261-265.

Kapetanović D., Gavrilović A., Jug-Dujaković J., Vardić Smrzlić I., Kazazić S., Bojanić-Rašović M., Kolda A., Pešić A., Perić L., Žunić J., Mandić M., Joksimović A., Vukić Lušić D., Đurović M. 2019. Assessment of microbial sea water quality and health status of farmed European seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Eastern Adriatic Sea (Montenegro and Croatia). *Studia Marina* **32**, 52-64.

Kapetanović D., Vardić Smrzlić I., Valić D., Teskeredžić Z., Teskeredžić E. 2017. Culturable microbiota associated with farmed Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Aquatic Living Resources **30**, 1-8.

Kapetanović D., Vardić Smrzlić I., Valić D., Teskeredžić E. 2013. Occurrence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Vibrio alginolyticus* in the Eastern Adriatic Sea. Marine Pollution Bulletin **75**, 46-52.

Kelly C., Salinas I. 2017. Under Pressure: interactions between Commensal Microbiota and the Teleost immune System. Frontiers in Immunology **7**, 1-9.

Larsen A, Tao Z., Bullard S. A., Arias C. R. 2013. Diversity of the skin microbiota of fishes: evidence for host species specificity. FEMS Microbiology Ecology **85**, 483-494.

Lasa A., Avendaño-Herrera R., Estrada J. M., Romalde J. L. 2015. Isolation and identification of *Vibrio toranzoniae* associated with diseased red conger eel (*Genypterus chilensis*) farmed in Chile. Veterinary Microbiology **179**, 327–331.

Li X., Blancheton J.-P., Liu Y., Triplet S., Michaud L. 2014. Effect of oxidation–reduction potential on performance of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in recirculating aquaculture systems. Aquaculture International **22**, 1263-1282.

Lipizer M., Partescano E., Rabitti A, Giorgetti A., Crise A. 2014. Qualified temperature, salinity and dissolved oxygen climatologies in a changing Adriatic Sea. Ocean Science **10**, 771-797.

Martínez Cruz P., Ibáñez A. L., Monroy Herмосillo O. A., Ramírez Saad H. C. 2012. Use of Probiotics in Aquaculture. ISRN Microbiology **2012**, 1-13.

Matijević S., Kušpilić G., Morović M., Grbec B., Bogner D., Skejić S., Veža J. 2009. Physical and chemical properties of the water column and sediments at sea bass/sea bream farm in the middle Adriatic (Maslinova Bay). Acta Adriatica **50**, 59-76.

Mustapha M. K. 2017. Comparative Assessment of the Water Quality of Four Types of Aquaculture Ponds under Different Culture Systems. Advanced research in life sciences **1**, 104-110.

Nadilo B. 2014. Novo mrijestilište za uzgoj ribe u Ninu. Prvi započeli – sada nastoje biti i najkvalitetniji. Građevinar **66**, 1141-1153.

Narodne novine, broj 63/10. Naredba o zaštiti riba i drugih morskih organizama. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.

- Narodne novine, broj 51/14. Uredba o kakvoći voda za kupanje. Vlada Republike Hrvatske.
- Onianwah I. F., Stanley H. O., Oyakhire M. 2018. Microorganisms in Aquaculture Development. *Global Advanced Research Journal of Microbiology* **7**, 127-131.
- Parin U., Erbas G., Savasan S., Yuksel H. T., Gurpinar S., Kirkan S. 2019. Antimicrobial resistance of *Vibrio (Listonella) anguillarum* isolated from rainbow trouts (*Oncorhynchus mykiss*). *Indian Journal of Animal Research* **53**, 1522-1525.
- Pujalte M. J., Sitjà-Bobadilla A., Macián M.C., Álvarez-Pellitero P., Garay E. 2007. Occurrence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterisation of *P. undina* strain U58. *Aquaculture* **271**, 47-53.
- Reverter M., Tapissier-Bontemps N., Lecchini D., Banaigs B., Sasal P. 2018. Biological and Ecological Roles of External Fish Mucus: A Review. *Fishes* **3**, 1-19.
- Rosado D., Pérez-Losada M., Severino R., Cable J., Xavier R. 2019. Characterization of the skin and gill microbiomes of the farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*) and seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* **500**, 57-64.
- Rosado D., Xavier R., Severino R., Tavares F., Cable J., Pérez-Losada M. 2019. Effects of disease, antibiotic treatment and recovery trajectory on the microbiome of farmed seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Scientific Reports* **9**, 1-11.
- Santos L., Ramos F. 2018. Antimicrobial resistance in aquaculture: current knowledge and alternatives to tackle the problem. *International Journal of Antimicrobial Agents* **52**, 135-143.
- Selvin J., Lipton A. P. 2003. *Vibrio alginolyticus* associated with white spot disease of *Penaeus monodon*. *Diseases of Aquatic Organisms* **57**, 147-150.
- Sommerset I., Krossøy B., Biering E., Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Rev. Vaccines* **4**, 89–101.
- Vendramin N., Zrncic S., Padrós F., Oraic D., Le Breton A., Zarza C., Olesen N. J. 2016. Fish health in Mediterranean Aquaculture, past mistakes and future challenges. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* **36**, 38-45.
- Verma K., Dalal J., Sharma S. 2014. Scientific concepts of polymerase chain reaction (PCR). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **5**, 3086-3095.

Viličić D. 2014. Specifična oceanološka svojstva hrvatskog dijela Jadrana. *Hrvatske vode* **22**, 297-314.

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

Yun Lee P., Costumbrado J., Hsu C. Y., Hoon Kim Y. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* **62**, 1-5.

Zorrilla 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.

Zweig R. D., Morton J. D., Stewart M. M. (1999): *Source Water Quality for Aquaculture: A Guide for Assessment*. The World Bank, Washington, D. C.

Internetski izvori:

URL 1: <http://www.fao.org/aquaculture/en/> (pristupljeno 17.7.2020.)

URL 2:

https://poljoprivreda.gov.hr/UserDocsImages//dokumenti/novosti//Nacrt_strategije_razvoja_akva_kulture_2020_2030.pdf (pristupljeno 17.7.2020.)

URL 3: <https://www.who.int/> (pristupljeno 17.7.2020.)

URL 4:

https://ec.europa.eu/environment/integration/research/newsalert/pdf/sustainable_aquaculture_FB11_en.pdf (pristupljeno 18.7.2020.)

URL 5: <https://ribarstvo.mps.hr/default.aspx?id=79> (pristupljeno 18.7.2020.)

URL 6: <https://ec.europa.eu/eurostat> (pristupljeno 21.7.2020.)

URL 7: https://ec.europa.eu/fisheries/sites/fisheries/files/docs/body/seabass_en.pdf (pristupljeno 21.7.2020.)

URL 8: <https://podaci.ribarstvo.hr/2019/07/17/izvjestaj-o-proizvodnji-u-akvakulturi/> (pristupljeno 22.7.2020.)

URL 9: https://poljoprivreda2020.hr/wp-content/uploads/2019/04/Morska_akvakultura_veljaca_2019.pdf (pristupljeno 22.7.2020.)

URL 10: https://mzoe.gov.hr/UserDocsImages//ARHIVA%20DOKUMENATA/ARHIVA%20---%20OPUO/2015/30042015_-_rjesenje_ministarstva_od_29_travnja_2015_godine.pdf (pristupljeno 11.9.2020.)

URL 11: <https://www.royal-adriatic.com/novosti/orada-adriatic-je-dobila-antibiotic-free-certifikat-za-sva-svoja-uzgajalista> (pristupljeno 23.7.2020.)

URL 12: <https://zadarska-zupanija.hr/kolegij2015/36/13.1.pdf> (pristupljeno 11.9.2020.)

URL 13: <https://mmpi.gov.hr/UserDocsImages/arhiva/Prilog2-I-IzmjeneIDopuneLokacijskeDozvole.pdf> (pristupljeno 11.9.2020.)

URL 14: <http://www.fao.org/fishery/affris/species-profiles/european-seabass/european-seabass-home/en/> (pristupljeno 23.7.2020.)

Izvori slika:

Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 01. ožujka 1997. godine u gradu Luzernu u Švicarskoj. Nakon 10 mjeseci života u Švicarskoj, s roditeljima sam se doselila u malo turističko mjesto Živogošće Blato na Makarskoj rivijeri. 2011. godine sam upisala smjer opća gimnazija u srednjoj školi fra Andrije Kačića Miošića u Makarskoj. Nakon toga, 2015. godine selim se u Zagreb gdje započinjem studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu.

Kroz studij sam zavoľjela područje mikrobiologije te sam pod naslovom "Bioremedijacija pesticida" napisala završni rad čime sam završila preddiplomski studij.

Tijekom diplomskog studija odradila sam stručnu praksu u laboratoriju u Zagrebačkim otpadnim vodama te na Institutu Ruđer Bošković. 2020. godine dobila sam Dekanovu nagradu za izniman uspjeh na studiju. Aktivna sam članica Udruge studenata biologije (BIUS) te sam, zajedno s kolegicama, 2018. godine osnovala sekciju za održivi razvoj unutar BIUS-a kroz koju smo ostvarile brojne suradnje s drugim fakultetima i udrugama. Uz to, volontirala sam na manifestacijama popularizacije znanosti, Noć biologije i Znanstveni piknik.