

BAKTERIJSKA FLORA LIČINKI I MLAĐA KALIFORNIJSKE PASTRVE (*Oncorhynchus mykiss*)

D. Kapetanović, E. Teskeredžić

Sažetak

U dostupnoj literaturi nema podataka o strukturi bakterijske flore kod ličinki i mlada kalifornijske pastrve u prvim danima života. Zadatak je našeg rada bio pratiti bakterijsku floru od 3. do 8. tjedna života. Tijekom 35 dana pokusa utvrđivana je bakterijska flora kalifornijske pastrve uz praćenje fizikalno-kemijskih parametara kvalitete vode i njezina utjecaja na zdravlje.

Uzorci za bakteriološku pretragu uzimani su sa škrge, srca i područja bubrega i inokulirani na podloge. Bakterijske su kolonije pregledane makroskopski, razmazi su obojeni po Gramu, a zatim su načinjeni biokemijski testovi. Pri identifikaciji primjenjivan je APILAB Plus program (bio Mérieux, France). Bakterijska flora ličinki i mlada kalifornijske pastrve mijenjala se je sa starošću. Fizikalno-kemijske karakteristike vode kretale su se unutar optimalnih vrijednosti. Od inokuliranog materijala najviše je izraslo bakterijskih kolonija s izolata škrge (64,4 %), zatim iz srca (21,8 %) i iz područja bubrega (13,8 %). Bakterijsku floru ličinki u inkubatoru većim su dijelom tvorile gram-pozitivne bakterije (64,7 %), i to vrste: *Renibacterium salmoninarum* (23,5 %), *Lactobacillus spp.* (11,8 %), *Staphylococcus spp.* (17,6 %) i *Corynebacterium aquatile* (11,8 %). Premještanje ličinki iz inkubatora u bazene reduciralo je bakterijsku floru (–66,7 %) nakon 45 minuta boravka u bazenu. Gram-negativne bakterijske vrste koje su u ličinki u inkubatoru bile zastupljene u niskom postotku (35,3 %), premještanjem ličinki u bazene postale su dominantne i činile su više od 95 % bakterijske flore ličinki,



Damir Kapetanović, dr. vet. med., dr. sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik, Institut Ruder Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska, e-mail: etesker@rudjer.irb.hr

odnosno mlada kalifornijske pastrve. *Flavobacterium*, *Acinetobacter* i *Yersinia* bili su pretežiti gram–negativni rodovi u ličinki u inkubatoru, dok su *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* i *Pasteurella* glavni izolati iz ličinki, odnosno mlada u bazenima do kraja pokusa.

Bakterijska flora ličinki u inkubatoru većinom se sastoji od gram–pozitivne flore, a u ličinaka i mlada kalifornijske pastrve u bazenima od gram–negativne bakterijske flore.

Ključne riječi: ličinke — mlad, kalifornijska pastrva, bakterijska flora, unutarnji organi.

UVOD

Današnji trend zdrave prehrane ljudi stavlja težište na uzgoj zdrave i prirodne hrane koja bi u što većoj mjeri zadovoljila čovjekove potrebe za hranjivim tvarima, a bez suvišne intervencije kemikalijama u proizvodnji.

U tom se kontekstu nalazi i akvakulturna proizvodnja, koja slijedi ideju razvijanja metode uzgoja bliske prirodi.

Kontroliranim uzgojem skraćuje se proizvodni lanac, te se ostvaruju mnoge mogućnosti uzgoja (Teskeredžić, 1983). Glavna salmonidna vrsta u slatkovodnoj akvakulturi jest kalifornijska pastrva (Larsen i Pedersen, 1997). Kontrolirani intenzivni ugoj ribe zasniva se na velikoj aglomeraciji riba smještenih na malom prostoru, što je preduvjet i uzrok znatnijoj pojavi uvjetnih bolesti riba bakterijske etiologije, a u vezi s pogoršanim prilikama smještaja i držanja, odnosno s većim stresom.

U menadžmentu bolesti naglasak bi trebao biti na prevenciji, za koju je vjerojatnije da bude povoljnija nego liječenje (Versehure i sur., 2000). Ovo može voditi manjoj upotrebi kemikalija (antibiotika, dezinficijensa i pesticida), koji najčešće djeluju na simptome, a ne na uzrok problema pojave bolesti (Planas i Cunha, 1999). Konvencionalni pristup, kakav je upotreba dezinficijensa i antimikrobnih lijekova, imaju ograničen uspjeh u prevenciji ili u liječenju bolesti (Subasinghe, 1997). Usto, postoji rastuća zabrinutost oko upotrebe, a napose zloupotrebe antimikrobnih lijekova ne samo u humanoj medicini i poljoprivredi nego i u akvakulturi. Zato u akvakulturi postoji hitna potreba za razvojem strategije mikrobiološke kontrole (Versehure i sur., 2000).

U vodenom okolišu domaćin i mikroorganizmi dijele ekosustav. U nekom smislu mikroorganizmi u vodi imaju izbor življenja u zajednici s potencijalnim domaćinom (intestinalni trakt, škrge ili koža) ili ne (Harris, 1993). Životinje koje žive u vodi u uzgoju su okružene okolišem koji podržava njihove patogene, neovisno o potencijalnom domaćinu i tako patogeni mogu dosegnuti visoku gustoću oko životinje (Moriarty, 1998).

Stres oslabljuje prvu crtu obrane od infekcije i tako utire put djelovanju bakterija. U tom se kontekstu nalaze i supkliničke infekcije, koje često ostaju

neotkrivene i zanemarene, a očituju se smanjenjem proizvodnog potencijala, u obliku slabijega prirasta i lošije iskorištenosti hrane.

Gospodarske štete nastaju uglavnom zbog nekih od razloga kao što je smanjeni prirast, troškovi liječenja i ugibanje. Suzbijanje gospodarskih šteta provodi se preventivnim mjerama, što je jeftinije od liječenja klinički oboljelih životinja. Osim toga, masovna uporaba antimikrobnih lijekova za kontrolu bolesti i poticanje rasta u životinja uvećava selektivni pritisak na mikrobiološki svijet i potpomaže prirodnu sposobnost bakterijske rezistencije (World Health Organization, 2002). Supterapijska uporaba antibiotika i jasno povećanje slučajeva rezistencije na antibiotike bakterija različitih područja animalne proizvodnje i njihove moguće implikacije za javno zdravstvo vodi k intenzivnijem nadzoru bakterijske rezistencije (Levy, 1998; Schmidt i sur., 2000; Tollefson i sur., 1999). Utjecaj antimikrobnih supstancija na okoliš teško je ocijeniti zbog kompleksnosti vodenog okoliša, dok primjer rezistencije bakterijskih uzročnika u riba često reflektira intenzivnu uporabu antimikrobnih supstancija (Brun i sur., 2000; Toranzo i sur., 1984) koje dalje mogu biti opasne za ljudsko zdravlje.

U velikoj aglomeraciji riba, u nadzoru i brizi oko njihova zdravlja, najkorisnija preventivna, ali i ekonomska mjera, jest sprečavanje bolesti. To je, među ostalim, najlakše ostvariti sustavnim praćenjem fizikalno-kemijskih parametara vode, i u smislu očuvanja zdravlja riba, i s obzirom na poticanje proizvodnosti ribe. Limitirajući čimbenici koji utječu na razvoj mikroflore u akvakulturnim sustavima uključuju: temperaturu, količinu kisika te kvalitetu i kvantitetu hranidbe. Ovi kombinirani okolišni čimbenici kreiraju stanište u kojemu su mikroorganizmi sposobni za razmnožavanje (Versehure i sur., 2000).

S obzirom na to da primarna mikroflora ranoga stadija riblje ličinke ovisi djelomično o vodi u kojoj su one uzgojene (Cahill, 1990; Ringo i Birckbeck, 1999), prisutnost bakterija u okolišnoj vodi krajnje je značajna za razvoj bakterijske flore i na unutrašnjoj i na vanjskoj površini ikre i ličinalnih organizama (Versehure i sur., 2000).

Tri najznačajnija riblja patogena u europskoj slatkovodnoj akvakulturi jesu *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* i *Aeromonas salmonicida*. Oni tvore skupinu ubikvitarnih bakterija vodene sredine, a povezani su s crijevnom bolešću crvenih usta, sindromom mlada kalifornijske pastrve i furunkulozom (Schmidt i sur., 2000; Larsen i Pedersen, 1997).

F. psychrophilum uzročnik je sindroma mlada kalifornijske pastrve i bakterijske bolesti hladne vode, septikemijske infekcije koja može uzrokovati znatan rani gubitak na ribogojilištima za uzgoj salmonida. To se osobito odnosi na kalifornijsku pastrvu (*Oncorhynchus mykiss*) u Europi (Crump i sur., 2001), i to napose kod mladih kalifornijskih pastrva na uzgajalištima tijekom zime i proljeća (Secades i sur., 2001). Infekcija mlada kalifornijske pastrve s *F. psychrophilum* opsežno zahvaća monocitno-makrofagni sustav, a istodobno je lokalizacija bakterija u kožnim čirevima i retinalnim upalnim točkama tipična za kronični stadij bolesti (Evensen i Lorenzen, 1996).

R. salmoninarum uzrokuje bakterijsku bubrežnu bolest, koja može biti prenesena s jedne na drugu ribu ili vertikalno preko oplodene ikre, te tako prenesena s jedne na drugu generaciju (Roberts i Shepherd, 1997).

Najveći se gubitci događaju u nerazvijenih salmonida koji nisu imunokompetentni (Johnson i sur., 1982). Inficirane ribe mogu katkad biti uspješno liječene s antibioticima, ali ovakvo liječenje ne omogućuju visoki troškovi, kratko vrijeme primjene i potencijalno škodljiv učinak na ljudsko zdravlje i okoliš (Crump i sur., 2001).

Svrha našeg rada bila je pratiti bakterijsku floru u ličinkama i mlada pastrve kroz razdoblje od premještanja iz inkubatora u bazene do dobi od pet tjedana.

Cilj je rada bio utvrditi kako pojava određenih bakterija utječe na zdravlje i preživljenje ličinki i mlada. Zadaci su bili pratiti kakvoću vode, biometriju ličinki i mlada, te njihovu bakterijsku floru.

MATERIJAL I METODE

Životinje za pokus

Praćena je pojava bakterijske flore na ličinkama i mladu kalifornijske pastrve. Ikra kalifornijske pastrve u količini od 300 000 komada dopremljena iz SAD-a u siječnju 2003. uložena je u 6 inkubatora s po 5 ležnica, ali je ikra stavljena u 4 ležnice jer najgornja služi za taloženje vode. Ležnice su bile dimenzija 61 x 47 cm. U veljači izležene ličinke kalifornijske pastrve prebačene su iz ležnica u četiri ribnjačka bazena. U četiri bazena dimenzija 270 cm x 290 cm s protočnom vodom smješteno je po 75 000 ličinki, ukupno 300 000 ličinki. Uzorci za bakteriološku pretragu uzimani su dvaput na tjedan (utorak i petak) do ožujka 2003.

Uzorci

Dva bazena (I. i IV.), od ukupno četiri bazena s ličinkama kalifornijske pastrve, odabrana su za uzorkovanje. Po deset ličinaka iz svakog bazena nasumično je odabrano za bakterijsku pretragu škrga, srca i utrobe. Prije prebacivanja ličinaka iz ležnice u bazene uzet je prvi uzorak od deset ličinki za bakteriološku pretragu, a poslije prebacivanja u bazene, nakon sat vremena uzet je drugi uzorak od deset ličinaka iz I. bazena. U daljnjem tijeku pokusa kroz 6 tjedana, svakog tjedna, po dva puta (utorak i petak) uzeto je po deset ličinki iz I. i IV. bazena za pretragu. Ličinke i mlad kalifornijske pastrve za pretragu odabirane su nasumično po bazenima. Živi su uzorci odmah prevezeni u laboratorij LIRA-e Instituta »Ruder Bošković«, pregledani i obrađeni unutar 30 minuta od uzorkovanja.

Biometrijska obrada uzoraka

Biometrijska su mjerenja obavljena neposredno prije bakteriološkoga pregleda uzoraka. Mjerena je ukupna dužina ličinki, tj. mlada od vrha glave do vrha

repne peraje i izražena u centimetrima. Masa ribe određivana je vaganjem ličinki, tj. mlada na digitalnoj vagi Tecator (6110 Balance), mjerne skale od 0 do 110 g i preciznošću od 0,1 mg, a izražena u gramima. Iz mase uzoraka (w) izražene u gramima i dužine uzoraka (l) izražene u centimetrima, izračunan je faktor kondicije (CF) prema izrazu:

$$CF = \frac{w}{l^3} \times 100.$$

Fizikalno–kemijska analiza vode

Ovim istraživanjima, usporedo sa zdravstvenim pregledom i bakteriološkom pretragom, željela se utvrditi djelotvornost sustavnog praćenja okolišnih uvjeta u smislu očuvanja zdravlja ribe, na mjestu ulaska vode u ribnjak i bazenima za pokus (bazen I i IV). Na ribnjaku su provedena mjerenja osnovnih fizikalno–kemijskih parametara vode: temperature, pH i količine kisika, a u laboratoriju je obavljena kemijska analiza vode 11. dana pokusa, i to na: količinu otopljenoga ugljikova dioksida, količinu otopljene organske tvari, koncentraciju amonijeva iona, koncentraciju amonijaka, m–alkalitet i tvrdoću vode. Upotrijebljene su standardne metode za uzorkovanje vode i mjerenje odabranih parametara (R a n d, 1975).

Bakteriološka analiza

Uzorci za bakteriološku pretragu uzimani su sa škrge, srca i s područja bubrega. Užarenom bakteriološkom ušicom spaljena je površina organa (kože), a zatim je uzet uzorak iz unutrašnjosti organa.

Za primarnu izolaciju rabljena je neselektivna podloga Tryptic soy agar (TSA — BBL). Nakon nacjepljivanja na TSA podloge materijal je stavljen u termostat na 22°C na inkubaciju, u trajanju 24 do 48 sati.

Izolacija i identifikacija

Nakon primarne inkubacije od 24 do 48 sati, izrasle su bakterijske kolonije na temelju morfoloških karakteristika i pigmentacije, selekcionirane, izolirane i precijepljene na nove TSA podloge za purifikaciju.

Purificirane bakterijske kolonije pregledane su makroskopski (tvorba pigmenta, njihova difuzija u podlogu, zatim veličina, oblik, presjek, rubovi, prozirnost i miris bakterijskih kolonija), razmazi su bojeni po Gramu, a zatim su načinjeni biokemijski testovi. Prigodom identifikacije primjenjivani su API 20E i API 20 NE testovi.

REZULTATI

Osnovni biometrijski podaci uzorkovanih riba prikazani su u Tablicama 1 i 2.

Prosječna dužina (l) i prosječna masa (w) ličinki kalifornijske pastrve prvoga dana pokusa prikazani su Tablici 1. Uzorak I čine nasumično odabrane

ličinke iz inkubatora, a uzorak II obuhvaća ličinke koje su nakon jednoga sata od prebacivanja iz inkubatora u bazene nasumično uzorkovane iz bazena I.

Kretanje osnovnih biometrijskih vrijednosti ličinki i mlada kalifornijske pastrve iz bazena I i IV tijekom pet tjedana pokusa prikazani su u Tablici 2.

Tablica 1. Prosječne vrijednosti osnovnih biometrijskih podataka i faktora kondicije uzorkovanih ličinki na početku pokusa (n = 10).

Table 1. Average values of the basic biometric data and condition factors of sampling larvae at the start of experiment (n = 10).

	Prosječna dužina / average length (l / cm)		Prosječna masa / average weight (w / g)		Faktor kondicije / condition factor (CF)	
	Uzorak / sample I	Uzorak / sample II	Uzorak / sample I	Uzorak / sample II	Uzorak / sample I	Uzorak / sample II
1. dan / day	2,45	2,40	0,134	0,132	0,91	0,96

Tablica 2. Prosječne vrijednosti osnovnih biometrijskih podataka uzorkovanih ličinki i mlada, te faktora kondicije tijekom istraživanja (n = 10).

Table 2. Average values of the basic biometric data of sampling larvae and fry, and condition factors during experiment (n = 10).

Dan / day	Prosječna dužina / average length (l / cm)		Prosječna masa / average weight (w / g)		Faktor kondicije / condition factor (CF)	
	Bazen / pool I	Bazen / pool IV	Bazen / pool I	Bazen / pool IV	Bazen / pool I	Bazen / pool II
4.	2,42	2,36	0,146	0,128	1,03	0,97
8.	2,53	2,53	0,121	0,112	0,75	0,69
11.	2,52	2,58	0,145	0,150	0,91	0,87
15.	2,66	2,57	0,147	0,167	0,78	0,98
18.	2,69	2,75	0,173	0,173	0,89	0,83
22.	2,80	2,65	0,200	0,176	0,91	0,94
25.	2,76	2,78	0,180	0,190	0,86	0,88
29.	2,99	3,08	0,300	0,296	1,12	1,01
32.	3,17	3,16	0,300	0,340	0,94	1,08
35.	3,17	3,24	0,310	0,378	0,97	1,11

Fizikalno–kemijska analiza vode

Rezultati fizikalno–kemijskih karakteristika vode u vrijeme uzorkovanja prezentirani su u Tablicama 3. i 4.

Tablica 3. Fizikalno–kemijske karakteristike vode: temperatura (C), pH, O₂ (mg/L) i relativna O₂ (%).Table 3. Physicochemical characteristics of water: temperature (C), pH, O₂ (mg/L) and relative O₂ (%).

Dan / day	Temperatura / temperature (C)			pH			O ₂ (mg/L)			Rel. O ₂ (%)		
	Ulaz / entrance	Bazen / pool I	Bazen / pool IV	Ulaz / entrance	Bazen / pool I	Bazen / pool IV	Ulaz / entrance	Bazen / pool I	Bazen / pool IV	Ulaz / entrance	Bazen / pool I	Bazen / pool IV
4.	7,6	7,3	7,8	7,51	7,54	7,54	12,4	11,0	9,7	103,42	91,06	81,3
8.	7,5	7,4	7,4	7,56	7,56	7,57	12,6	11,6	11,5	104,8	96,27	95,44
11.	7,3	7,4	7,5	7,5	7,58	7,59	12,6	12,0	11,8	104,3	99,59	98,17
15.	7,5	7,5	7,5	7,26	7,28	7,27	12,7	11,9	12,2	105,66	99,0	101,5
18.	7,3	7,6	7,6	7,26	7,29	7,28	12,9	12,0	12,4	106,79	100,08	103,42
22.	8,0	8,5	8,3	7,20	7,23	7,22	12,3	11,6	12,4	103,6	98,89	105,2
25.	8,0	8,0	8,0	7,24	7,31	7,30	12,6	12,0	12,5	106,15	101,1	105,3
29.	8,5	8,7	8,7	7,26	7,25	7,29	12,6	12,2	12,5	107,42	104,5	107,07
32.	8,7	8,7	8,7	7,25	7,28	7,26	12,4	12,0	12,1	106,22	102,79	103,65
35.	8,3	8,5	8,5	7,34	7,34	7,38	12,5	12,2	12,7	106,06	104,0	108,27

Tablica 4. Fizikalno–kemijska analiza vode.

Table 4. Physico–chemical analysis of water.

Uzorak / sample	Temp. vode / water temp. (C)	pH	O ₂ (mg/L)	Rel. O ₂ (%)	CO ₂ (mg/L)	KMnO ₄ (mg/L)	NH ₄ (mg/L)	NH ₃ (mg/L)	m–alkalitet / m–alkalinity	KT dH
Ulaz / entrance	7,3	7,50	12,6	104,30	12,2	8,53	<0,10	<0,001	4,12	11,54
Bazen / pool I	7,4	7,58	12,0	99,59	11,6	9,10	<0,10	<0,001	4,04	11,31
Bazen / pool IV	7,5	7,59	11,8	97,93	8,8	9,35	<0,10	<0,001	4,09	11,45

*Bakterijska flora**Bakterijska flora ličinaka prvog dana pokusa*

Od ukupno pregledanih 20 uzoraka ličinki (n=20) uzorkovanih nultog dana pokusa, iz uzorka 1 uzetog iz inkubatora (n=10) i iz uzorka 2 uzetog iz bazena I nakon 45 minuta od premještanja ličinki iz inkubatora u bazene, izolirano je ukupno 17 bakterijskih kolonija.

Od ukupnoga broja izoliranih bakterija (17) u uzorku 1 izolirano je 12 bakterija, od čega sa škrga 9, sa srca 2 i iz utrobe 1. Istodobno, od ukupnoga broja bakterija (17) iz uzorka 2 izolirano je 5, od čega sa škrga 2, sa srca 1 i s područja bubrega 2. Rezultati bakteriološke pretrage prvog dana pokusa prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Bakterijska flora ličinaka prvog dana pokusa.

Table 5. Bacterial flora of larvae at the first day of experiment.

		<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Lactobacillus spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Renibacterium salmo.</i>	<i>Yersinia spp.</i>	<i>Corynebacterium aqua.</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Flavobacterium psych.</i>	Ukupno / total
Uzorak / sample 1	škрге / gill		2	1	2	1	1	1	1	9
	srce / heart				1		1			2
	utroba / viscera			1						1
Uzorak / sample 2	škрге / gill								2	2
	srce / heart				1					1
	utroba / viscera	1		1						2
Ukupno / total		1	2	3	4	1	2	1	3	17
%	100	5,9	11,8	17,6	23,5	5,9	11,8	5,9	17,6	

Bakterijska flora ličinki i mlada kalifornijske pastrve

Tijekom deset uzorkovanja ličinki i mlada kalifornijske pastrve iz bazena I i IV za bakteriološku pretragu pregledano je ukupno po 100 uzoraka (n=100) iz svakog od bazena.

Iz bazena I tijekom deset bakterioloških pretraga ukupno su izolirane 123 bakterije, pri čemu većina, sa škrga 79 (64,23 %) izolata potječe, iz srca 23 (18,70 %) i s područja bubrega 21 (17,07 %) izolat. Rezultati izolacije i identifikacije bakterijske flore ličinki i mlada kalifornijske pastrve iz bazena I prezentirani su u Tablici 6.

Istodobno je bakteriološkom pretragom na uzorcima iz IV. bazena izolirano 116 bakterija, od čega i ovdje većina od 75 (64,66 %) izolata potječe sa škrge, dok je 29 (25,00%) izolata iz srca i 12 (10,34 %) iz područja bubrega ličinki, odnosno mlada. Rezultati bakteriološke pretrage uzoraka iz bazena IV prezentirani su u Tablici 7.

Tablica 6. Bakterijska flora ličinki i mlada kalifornijske pastrve iz bazena I tijekom pokusa.

Table 6. Bacterial flora of rainbow trout larvae and fry in the pool I during the experiment.

Dan / day	Bazen / pool I											Ukupno / total				
	<i>Enterobacter brevis</i>	<i>Pseudomonas fluor.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Non-fermenter spp.</i>	<i>Breun vesic. / Past. spp.</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Flavobacterium psych.</i>	<i>Pseudomonas alcaligen.</i>	<i>Moraxella spp.</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Pseudomonas putida</i>		<i>Pasteurella pneu. / hem.</i>	<i>Myroides</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Citrobacter freundii</i>
4.	škrge / gill					3		1	2	1						7
	srce / heart					1		1	2	1						5
	bubreg / kidney								2							2
8.	škrge / gill															
	srce / heart															
	bubreg / kidney		2													2
11.	škrge / gill				5	1	1				1					8
	srce / heart				2											2
	bubreg / kidney				2											2
15.	škrge / gill		3			5	4									12
	srce / heart		1			2					1					4
	bubreg / kidney															
18.	škrge / gill		3		2				1				1			7
	srce / heart															
	bubreg / kidney		2			1						1				4
22.	škrge / gill		2			5	1				1	1				10
	srce / heart		1		1	1					2					5
	bubreg / kidney				2						1	1				4
25.	škrge / gill	1	3	2	5	1										12
	srce / heart			1	1											2
	bubreg / kidney				6	1										7

29.	škrge / gill		1				5								1		7	
	srce / heart						1								1		2	
	bubreg / kidney																	
32.	škrge / gill		1				3		2								6	
	srce / heart		2														2	
	bubreg / kidney																	
35.	škrge / gill											6p				4	10	
	srce / heart														1		1	
	bubreg / kidney																	
Ukupno / total	škrge / gill	1	13	2	12	2	22	5	3	3	1	1	1/6	2	1	4	79	64,23%
	srce / heart		4	1	4		5		1	2	1		3		1	1	23	18,70%
	bubreg / kidney		4		10	1	1			2			2	1			21	17,07%
	Ukupno / total	1	21	3	26	3	28	5	4	7	2	1	12	3	2	5	123	
	%	0,81	17,07	2,44	21,14	2,44	22,76	4,07	3,25	5,69	1,63	0,81	9,76	2,44	1,63	4,07		100

Tablica 7. Bakterijska flora ličinki i mlada kalifornijske pastrve iz bazena IV tijekom pokusa.

Table 7. Bacterial flora of rainbow trout larvae and fry in the pool IV during the experiment.

Dan / day	Bazen / pool IV	<i>Pseudomonas fluor.</i>	<i>Flavobacterium oryzi.</i>	<i>Non-fermenter spp.</i>	<i>Brevun vesic. / Post. spp.</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Staphilococcus spp.</i>	<i>Renibacterium salmo.</i>	<i>Flavobacterium psych.</i>	<i>Pseudomonas alcaligen.</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Pasteurella pneu. / hem.</i>	<i>Shevanelia putrefaciens</i>	Ukupno / total
4.	škrge / gill					3				1				4
	srce / heart					2					2			4
	bubreg / kidney						1							1
8.	škrge / gill			1				1						2
	srce / heart		1				1	1						3
	bubreg / kidney	1				1								2
11.	škrge / gill			1	1							1		3
	srce / heart													
	bubreg / kidney			1							1			2

15.	škrge / gill	2				8								10	
	srce / heart	1				3									
	bubreg / kidney													4	
18.	škrge / gill	3		4		3								10	
	srce / heart			1		3								4	
	bubreg / kidney					1								1	
22.	škrge / gill	2		1		5								8	
	srce / heart	1				1								2	
	bubreg / kidney					1								1	
25.	škrge / gill	5	3	1	2									11	
	srce / heart	3		1	1									5	
	bubreg / kidney	4												4	
29.	škrge / gill	6				3								9	
	srce / heart	1				2								3	
	bubreg / kidney														
32.	škrge / gill	5				3			2					10	
	srce / heart					1								1	
	bubreg / kidney	1												1	
35.	škrge / gill		3								1	4		8	
	srce / heart											3		3	
	bubreg / kidney														
Ukupno / total	škrge / gill	23	6	8	3	25		1	2	1		2	4	75	64,66
	srce / heart	6	1	2	1	12	1	1			2		3	29	25,00
	bubreg / kidney	5/1		1		3	1				1			12	10,34
Ukupno / total	35	7	11	4	40	2	2	2	1	3	2	7	116		
%	30,2	6,0	9,5	3,5	34,5	1,7	1,7	1,7	0,9	2,6	1,7	6,0		100	

RASPRAVA

U dostupnoj literaturi i objavljenim radovima nisu nađeni podaci o strukturi bakterijske flore u ličnika kalifornijske pastrve u inkubatoru i u ličnika i mlada u prvim tjednima života nakon prebacivanja iz inkubatora u bazene.

Tijekom pokusa u objema pokusnim skupinama uzeti su uzorci za pretragu sa škrge, srca i s područja bubrega. Većina bakterijskih izolata u ovoj

studiji potječe sa škruga, što je posljedica izravnog utjecaja mikroflora vode na organizme u njoj, što je sukladno dosadašnjim spoznajama (Harris, 1993; Moriarty, 1998).

Naši su rezultati pokazali razlike u ukupnom broju bakterija izoliranih iz pojedinih ličinka unutar uzorka, kao i razlike između dvaju uzoraka (uzorak 1 i 2). Uočljivo je da većina izolata nultoga dana pokusa potječe iz uzorka uzetog u inkubatoru u odnosu prema uzorku nakon 45 minuta od prebacivanja iz inkubatora u bazene. Bakterijsku floru utvrđenu u ličinka iz inkubatora (Tablica 8) većim dijelom čine gram-pozitivne bakterije (64,7 %), i to vrste: *Renibacterium salmoninarum* (23,5 %), *Lactobacillus* spp. (11,8 %), *Staphylococcus* spp. (17,6 %) i *Corynebacterium aquatile* (11,8 %). Ostatak (35,3 %) bakterijske zajednice su predstavnici su gram-negativnih bakterijskih vrsta: *Acinetobacter* spp. (5,9 %), *Aeromonas hydrophila* (5,9 %), *Flavobacterium psychrophilum* (17,6 %) i *Yersinia* spp. (5,9 %). Rezultati upućuju na to da je riječ o bakterijskoj flori koja se formirala u ličinka u inkubatoru od primarne mikroflora s unutrašnje i vanjske površine ikre, što je sukladno navodima Verseh uera i suradnika (2000). Premještanje ličinki iz inkubatora u bazene rezultiralo je u reduciranju bakterijske flore (–66,7 %) ličinki kalifornijske

Tablica 8. Struktura bakterijske flore prvog dana pokusa.

Table 8. Structure of bacterial flora at the first day of the experiment.

	Gram-negative bacteria				Gram-positive bacteria				
Ukupno / total	6				11				17
%	35,3				64,7				100
	<i>Acinetobacter</i> spp.	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Yersinia</i> spp.	<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	<i>Corynebacterium aquatile</i>	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Renibacterium salmoninarum</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	
Ukupno / total	1	1	1	3	2	2	4	3	17
%	5,9	5,9	5,9	17,6	11,8	11,8	23,5	17,6	100

Tablica 9. Struktura bakterijske flore tijekom pokusa.
Table 9. Structure of bacterial flora during the experiment.

	Gram-negative bacteria													Gram-positive bacteria			
Ukupno/ total	232													7			239
%	97,07													2,93			100
	<i>Aeromonas spp.</i>	<i>Brevun. spp. / Past. Spp.</i>	<i>Burkholderia spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>Empedobacter spp.</i>	<i>Flavobacterium spp.</i>	<i>Moraxella spp.</i>	<i>Myroides spp.</i>	<i>Non-fermentro spp.</i>	<i>Pasteurella spp.</i>	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Vibrio spp.</i>	<i>Shewanella spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>Renibacterium spp.</i>	<i>Staphilococcus spp.,</i>	
Škrge / gill	47	5	1	4	1	13	3	2	20	9	41	1	4	2	1		154
%	30,52	3,25	0,65	2,60	0,65	8,44	1,95	1,30	12,99	5,84	26,62	0,65	2,60	1,30	0,65		64,43
Srce / heart	17	1	1	1		1	2		6	3	11	3	3	1	1	1	52
%	32,69	1,92	1,92	1,92		1,92	3,85		11,54	5,77	21,15	5,77	5,77	1,92	1,92	1,92	21,76
Bubreg / kidney	4	1					2	1	11	2	10	1				1	33
%	12,12	3,03					6,06	3,03	33,33	6,06	30,30	3,03				3,03	13,81
Ukupno / total	68	7	2	5	1	14	7	3	37	14	62	5	7	3	2	2	239
%	28,45	2,93	0,84	2,09	0,42	5,86	2,93	1,25	15,48	5,86	25,94	2,09	2,93	1,25	0,84	0,84	100

pastrve nakon 45 minuta boravka u bazenu, a osobito bakterijske flore na škragama (–77,78 %).

Kako je vidljivo iz Tablice 6, rezultati pokazuju visoku frekvenciju gram–negativnih bakterija iz rodova: *Aeromonas* (22,76 %), *Nefermentora* (21,14 %), *Pseudomonas* (17,07 %), *Pasteurella* (9,76 %), *Moraxella* (5,69 %) i *Flavibacterium* (4,07 %), dok je jedini predstavnik skupine gram–pozitivnih bakterija iz roda *Bacillus* (2,44 %).

Rezultatima prikazanim u Tablici 7. utvrđeno je da glavninu bakterijske flore ličinki i mlada kalifornijske pastrve u IV. bazenu tvore gram–negativne bakterije, i to većinom one iz rodova: *Aeromonas* (34,48 %), *Pseudomonas* (30,17 %), *Nefermentora* (9,48 %), *Flavobacterium* (7,75 %), *Shewanella* (6,03 %), dok su od gram–pozitivnih bakterija utvrđeni rodovi *Renibacterium* (1,72 %) i *Staphilococcus* (1,72 %). Ovdje se očitovao utjecaj vode na formiranje bakterijske flore, jer se smještajem jedinki u bazene smanjila koncentracija mikroorganizama u prostoru.

Voda sa svojim limitirajućim čimbenicima (Versehuere i sur., 2000) utjecala je na formiranje staništa ličinki u bazenima, a samim time i na kreiranje bakterijske flore tih ličinaka, odnosno mlada kalifornijske pastrve. Budući da je voda svojom kvalitetom i izikalno–kemijskim parametrima pružala optimalne uvjete za rast i razvoj ličinki, nije došlo do razvoja bolesti i izrazitog bujanja patogenih bakterijskih vrsta za ličinke, odnosno mlad kalifornijske pastrve.

Bakterijsku floru škrva ličinki i mlada kalifornijske pastrve u bazenima, u objema pokusnim skupinama (Tablica 9), glavninom čine pripadnici rodova: *Pseudomonas* (26,62 %), *Aeromonas* (30,52 %), *Nefermentor* (12,99 %) i *Flavobacterium* (8,44 %). Na temelju navedenog u Tablici 9, vidljivo je da glavninu mikroflore škrva ličinki i mlada kalifornijske pastrve u bazenima čine gram–negativne bakterije, što je vjerojatno rezultat njihove visoke koncentracije u vodi. Iste bakterijske vrste prevladavaju i među izolatima koji su dobiveni iz srca i područja bubrega tih ličinaka. Gram–pozitivna frakcija bakterijskih vrsta bila je mala u jedinaka obaju bazena (2,93 %), što je vjerojatno posljedica njihove male koncentracije u vodi, a izolirani su: *Bacillus* spp., *R. salmoninarum* i *Staphilococcus* spp.

Dobiveni rezultati glede najznačajnijih ribljih patogena iz rodova: *Flavobacterium*, *Aeromonas* i *Yersinia* u skladu su s rezultatima što su ih objavili Schmidt i suradnici (2000), Larsen i Pedersen (1997), Crump i suradnici (2001) i Secades i suradnici (2001). Kretanje koncentracije *R. salmoninarum*, tj. njezina izolacija samo u prva dva tjedna pokusa potvrđuju njezin vertikalni prijenos preko ikre, a to se slaže s prijašnjim izvještajima Robertsa i Shepherd (1997).

Izostanak masovnih uginuća i abnormalnosti u ličinki i mlada kalifornijske pastrve tijekom ovoga pokusa vjerojatna su posljedica optimalne kvalitete koja

ni u jednom trenutku nije djelovala kao stresor na jedinke, a, s druge strane, nije pogodovala bujanju bakterijskih patogena.

ZAKLJUČAK

Ova studija bakterijske flore ličinki i mlada kalifornijske pastrve utvrdila je znatne razlike u frekvenciji bakterijskih vrsta izoliranih kod ličinki u inkubatoru i poslije u ličinki, odnosno mladi u bazenima.

Većina bakterijskih izolata iz ličinaka u inkubatoru pripadala je gram-pozitivnoj bakterijskoj flori, koja je premještanjem ličinki u bazene reducirana i na niskoj se razini održala do kraja pokusa. Sa druge strane, gram-negativne bakterijske vrste koje su u ličinki u inkubatoru bile zastupljene u niskom postotku, premještanjem u bazene postale su dominirajuća bakterijska flora ličinaka, odnosno mlada.

Većina identificiranih mikroorganizama izolirana je sa škrge. Riječ je o pripadnicima ubikvitarne vodne mikroflore. Dakle, potvrđen je utjecaj vode, kao životne sredine na mikrofloru jedinaka u njoj.

Budući da je kvaliteta vode bila optimalna, zdravstveno stanje ličinki i mlada kalifornijske pastrve bilo je zadovoljavajuće, pa nije došlo do bujanja bakterijskih patogena i razvoja bolesti uzrokovane bilo kojim od identificiranih bakterija.

Rezultati ostvareni ovim pokusom osnovica su za daljnja istraživanja bakterijske flore mlada kalifornijske pastrve i njezine osjetljivosti na antimikrobna sredstva.

Nužna je kontinuirana kontrola kretanja bakterijske flore u populaciji ličinki, odnosno mlada kalifornijske pastrve radi pravodobne intervencije odgovarajućim sredstvima.

Summary

BACTERIAL FLORA OF RAINBOW TROUT LARVAE AND FRY (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)

D. Kapetanović, E. Teskeredžić

There are no information in available literature about the structure of bacterial flora in rainbow trout larvae and fry in the first days of their lives. The objective of our work has been to follow bacteroflora between the third

Damir Kapetanović, dr. vet. med., dr. sc. Emin Teskeredžić, senior scientist, Ruder Bošković Institute, Center for marine and environmental research, Laboratory for aquaculture, Bijenička 54, 10000 Zagreb, Croatia, e-mail: etesker@rudjer.irb.hr

and the eighth week of their lives. During 35 days of experiment bacteroflora of rainbow trout has been examined, along with following physico-chemical characteristics of water quality as well as its influence on health.

Samples for bacteriological examination were taken from gill, heart and kidney areas and inoculated on the plates. Bacterial colonies were examined macroscopically, slides with Gram staining, and afterwards biochemical tests were performed. For identification, APILAB Plus programme (bio Mérieux, France) was used. Bacterial population of rainbow trout larvae and fry changed in dependence with their age. Physico-chemical characteristics of water ranged within optimal values. Most of bacterial colonies originated from gill isolates (64,4 %), than from heart (21,8 %) and kidney areas (13,8 %). The bacterial flora of larvae in incubator was composed mostly of Gram-positive bacteria (75,1 %), genera: *Renibacterium* (25 %), *Lactobacillus* (16,7 %), *Staphylococcus* (16,7 %) and *Corynebacterium* (16,7 %). The transfer of larvae from incubator into the pools resulted in reducing bacterial flora (–66,7 %) after 45 minute stay in the pool. Gram-negative bacteria, which have been represented in larvae in incubator with low percent (24, 9 %), after the transfer of larvae to the pools became dominant and represented more than 95 % of rainbow trout larvae and fry bacterial flora. *Flavobacterium*, *Acinetobacter* and *Yersinia* were the predominant Gram-negative genera in larvae in incubator, whereas *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* and *Pasteurella* were the main isolates from rainbow trout larvae and fry until the end of experiment.

Bacterial flora of larvae in incubator mostly consists of Gram-positive bacteria, whereas in rainbow trout larvae and fry in pools Gram-negative bacterial flora prevail.

Key words: larva — fry, rainbow trout, bacterial flora, internal organs.

LITERATURA

- Bruun, M. S., Schmidt, A. S., Hadsen, L., Dalsgaard, I. (2000):* Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*, 187, 201–212.
- Cahill, M. M. (1990):* Bacterial flora of fishes. *Microbial ecology*, 19, 21–41.
- Crump, E. M., Perry, B. M., Clouthier, S. C., Kay, W. W. (2001):* Antigenic characterization of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology*, 67, (2), 750–759.
- Evensen, ., Lorenzen, E. (1996):* An immunohistochemical study of *Flexibacter psychrophilus* infection in experimentally and naturally infected rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Diseases of aquatic organisms*, 25, 53–61.
- Harris, J. M. (1993):* The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. *Microb. Ecol.*, 25, 195–231.

- Johnson, K. A., Flynn, J. K., Amend, D. F. (1982):* Duration of immunity in salmonids vaccinated by direct immersion with *Yersinia ruckeri* and *Vibrio anguillarum* bacterins. *Journal of fish diseases*, 5, 207–213.
- Larsen, J. L., Pedersen, K. (1997):* Vaccination strategies in freshwater salmonid aquaculture. *Dev. Biol. Stand.*, 90, 391–400.
- Levy, S. B. (1998):* Multidrug resistance: a sign of the times. *New Eng. J. Med.*, 338, 1376–1378.
- Moriarty, D. (1998):* Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351–358.
- Planas, M., Cunha, I. (1999):* Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177, 171–190.
- Rand, M. C. (1975):* Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 14 th Edition, American Public Health Association, Washington,
- Ringo, E., Birkbeck, T. H. (1999):* Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquacult. Res.*, 30, 73–93.
- Roberts, R. J., Shepherd, C. J. (1997):* Handbook of Trout and Salmon Diseases. Third Ed. Fishing News Books, Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J. L. (2000):* Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and environmental microbiology*, 66, (11), 4908–4915.
- Secades, P., Alvarez, B., Guijarro, J. A. (2001):* Purification and characterization of a psychrophilic calcium-induced growth-phase-dependent metalloprotease from the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Applied and environmental microbiology*, 67, (6), 2436–2444.
- Subasinghe, R. (1997):* Fish health and quarantine, p. 45–49. *In* Review of the State of the World Aquaculture. FAO Fisheries circular no. 886. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Teskeredžić, E. (1983):* Uzgoj kalifornijske pastrve (*Salmo Gairdneri* Rich. 1836) u plutajućim kavezima u mješanoj vodi. *Znanstvena edicija Fakulteta poljoprivrednih znanosti Sveučilišta u Zagrebu, Poljoprivredna znanstvena smotra*, 63, 605–618.
- Tollefson, L., Fedorka-Cray, P. J., Augulo, F. J. (1999):* Public health aspects of antibiotic resistance monitoring in the USA. *Acta Vet. Scand.*, 92, 67–75.
- Toranzo, A. E., Combarro, P., Lemos, M. L., Barja, J. L. (1984):* Plasmid coding for transferable drug resistance in bacteria isolated from cultured rainbow trout. *Applied and environmental microbiology*, 48, 872–877.
- Verseuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000):* Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64, (4), 655–671.
- World health organization (2002):* Antimicrobial resistance. Fact sheet 194.

Primljeno: 27. 8. 2003.

Prihvaćeno: 26. 9. 2003.

