

3. Međunarodno savjetovanje o slatkovodnom ribarstvu: “RIBARSTVO U OTVORENIM VODAMA“

Vukovar, 16. i 17. 04. 2009. godine

ZDRAVSTVENO STANJE RIBA RIJEKE SUTLE

Damir Valić, Irena Vardić, Damir Kapetanović, Božidar Kurtović, Marija Tomec,
Zlatica Teskeredžić i Emin Teskeredžić

Laboratorij za istraživanje i razvoj akvakulture, Zavod za istraživanje mora i
okoliša, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb, Hrvatska

UVOD

- Rijeka Sutla je granična rijeka između Hrvatske i Slovenije ukupne dužine oko 91 km. Sliv rijeke Sutle se prostire na oko 581 km². Izvire u Sloveniji, na južnim obroncima Maceljske gore na visini od 715 m, a u rijeku Savu utječe kod Savskog Marofa.
- Da bi se istražilo zdravstveno stanje riba i parametri vode, uzorkovanje je provedeno na šest lokaliteta duž rijeke Sutle.
- Za zdravlje i opstanak riba u vodi neophodne su određene vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara od kojih su najvažnije: temperatura, količina i koncentracija otopljenog kisika, količina amonijaka, nitrata, fosfata, vodikovih iona (pH), organske tvari, tvrdoća vode i mineralni sastav.
- Istraživanje bentosa rijeke Sutle obuhvatilo je faunu i floru dna, jer izravno djeluje na kvalitativni i kvantitativni sastav ribljih populacija.

- Iako planktonski oblici nisu karakteristični za tekućice, ipak mogu biti prisutni u mirnijim dijelovima rijeka gdje je strujanje vode slabo. U takvim uvjetima razvija se riječni ili potamoplankton, čiji je sastav sličan planktonu stajaćih voda.
- U cilju ispitivanja higijensko-sanitarnih uvjeta na ribolovnim vodama provedeno je i uzorkovanje vode za bakteriološku pretragu.
- Praćenje zdravstvenog stanja populacija riba koje obitavaju u određenoj ribolovnoj zoni od presudnog je značenja za opstanak tih populacija. Pritom se naglasak stavlja na uzročnike bolesti koji mogu ugroziti prirodnu ravnotežu među vrstama. U otvorenim vodama nije moguće provoditi liječenje, pa je time značaj poznavanja zdravstvenog statusa postojeće ihtiofaune, kao i zdravstvenog stanja nasadnog materijala još naglašeniji.

➤ Karta područja s ribolovnim vodama i lokalitetima na kojima je provedeno uzorkovanje

- 1. Hum na Sutli N 46° 13,339'
E 15° 43,187'
- 2. Donje Brezno N 46° 11,532'
E 15° 39,269'
- 3. Sutlanska poljana N 46° 07,830'
E 15° 37,020'
- 4. Klanjec N 46° 02,728'
E 15° 44,237'
- 5. Kraj donji N 45° 54,602'
E 15° 41,517'
- 6. Ključ Brdovečki N 45° 52,433'
E 15° 41,426'



MATERIJAL I METODE

- Na terenu su izmjereni parametri vode pomoću sonde za mjerenje temperature, kisika i pH. Također su uzeti uzorci vode za daljnju analizu u laboratoriju.
- Da bi se utvrdile osnovne biološke karakteristike istraživanih lokaliteta, obavljeno je sakupljanje i obrada uzoraka mrežnog planktona i bentosa. Za kvalitativnu i kvantitativnu obradu, uzorci planktona dobiveni su filtriranjem 20 litara vode kroz planktonsku mrežicu veličine pora 36 μm , a bentos je sabiran s određene površine karakterističnih staništa. Dobiveni uzorci mrežnog planktona i bentosa spremljeni su u boce, konzervirani s 4%-tnim formaldehidom, a mikroskopska obrada uzoraka obavljena je u laboratoriju.

- Relativna zastupljenost vrsta fitoplanktona i fitobentosa određena je po Knöppu, od 1 do 7 (1954), a saprobne vrijednosti indikatorskih vrsta po Wegelu (1983). Indeks saprobnosti na osnovi indikatorskih biljnih vrsta određen je prema Pantle-Bucku (1955), te na osnovi dobivenih vrijednosti pokazatelja i stupnja trofije, istraživani lokaliteti svrstani su u određenu vrstu kakvoće vode, prema Uredbi o klasifikaciji voda (1998).
- Kakvoća riječne vode ocjenjena je i temeljem mikrobioloških pokazatelja kakvoće vode: ukupnog broja aerobnih bakterija i ukupnog broja koliformnih bakterija, a sukladno Uredbi o klasifikaciji voda (1998). Uzorci vode uzeti su izravno u sterilne 1L boce sa površine.
- U svrhu prikupljanja podataka o postojećoj strukturi ribljeg fonda, proveden je izlov ribe upotrebom elektro-ribolovnog agregata marke Hans Grassl GmbH (5,0 kW). Ulovljena riba je odmah vagana i mjerena te zdravstveno pregledana.

- Za određivanje ukupnog broja aerobnih bakterija (cfu/mL), uzorci su serijski razrijeđeni sa Ringerovom otopinom (Pliva) pH 6,0 i inokulirani metodom širenja po podlozi (spread plate method) na Yeast extract agar medium (EN ISO 6222:1999). Nakon inkubacije na 22°C kroz 3-5 dana, bakterijske kolonije su prebrojane i rezultati su iskazani za 1 mL (cfu/mL). Broj ukupnih koliforma i *Escherichia coli* utvrđeni su s Colilert® testovima, a broj enterokoka s Enterolert® testom i Quanti/Tray 2000 (IDEXX, USA).
- S ciljem ocjene zdravstvenog stanja ihtiofaune ribolovnih voda obavljen je pregled izlovljene ribe u vidu općeg kliničkog, mikroskopskog i patoanatomskog pregleda, te su uzeti uzorci za virološku, bakteriološku i parazitološku pretragu.
- Opća klinička pretraga odnosi se na opći pregled površine tijela, škrga, peraja i usta, te su ribe pregledane na prisutnost makroskopskih patoloških promjena.
- Za mikroskopsku pretragu na prisutnost ektoparazita materijal je uziman sa škrga, peraja i kože, te pregledan u obliku nativnog preparata pod svjetlosnim mikroskopom.

- Sterilnim kirurškim škarama je uklonjena lijeva trbušna stijenka, te je obavljen makroskopski pregled unutarnjih organa na prisustvo endoparazita i eventualnih patoloških promjena na unutarnjim organima.
- U svrhu determinacije endoparazita izvršeno je određivanje sljedova nukleotida dijelova gena COI (citokrom oksidaza podjedinica I) i ITS rDNA regije, prethodno umnoženih u reakcijama PCR.
- Virološkom je pretragom analizirana prisutnost virusa zarazne hematopoetske nekroze (ZHN), zarazne nekroze gušterače (ZNG), virusne hemoragične septikemije (VHS) i proljetne viremije šarana (PVŠ) direktno u tkivnim uzorcima metodom RT-"semi-nested"-PCR. Radi nespecifičnog monitoringa virusa izvršena je inokulacija tkivnog materijala na kulture stanica EPC. Sa svih postaja uzimani su skupni uzorci organa: slezene, srca, bubrega i mozga.
- Materijal za bakteriološku pretragu sakupljen je iz škrge, jetre, slezene i bubrega. Uzorci su inokulirani na Tryptic soy agaru (BD-BBL) za izolaciju. Podloge su inkubirane kroz 24 do 48h na 22°C. Svojstva izolata su određena i identificirana upotrebom API testova (bioMérieux, France).

REZULTATI I RASPRAVA

- Rezultati fizikalno-kemijske analize vode u tablici ukazuju da je voda u odnosu na fizikalno-kemijske parametre odgovarala zahtjevima za I odnosno II kakvoću vode.

Lokalitet	Hum na Sutli	Donje Brezno	Sutlanska poljana	Klanjec	Kraj donji	Ključ Brdovečki
Parametar						
Turbiditet/FAU	10	17	13	9	15	13
Temp. Vode/°C	6,2	6,3	5,1	5,1	5,5	6,0
ORP/mV	-42,2	-42,1	-50,2	-57,1	-54,8	-57,1
pH	7,79	7,77	7,82	8,14	8,10	8,14
O ₂ (mg/L)	8,6	10,7	11,2	11,4	11,5	14,9
Rel. kol. O ₂ (%)	69,20	86,38	87,72	89,19	90,98	119,39
CO ₂ (mg/L)	2,13	1,91	2,34	2,18	1,78	2,00
KPK Mn	5,8	6,9	5,8	7,1	4,6	7,6
NH ₄ (mg/L)	0,442	0,171	0,190	0,093	0,245	0,083
NH ₃ (mg/L)	0,004	0,002	0,002	<0,001	0,002	<0,001
mg/L N (t)	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0	<1,0
P (t) (mg/L)	0,27	<0,01	0,06	0,05	0,05	<0,1
m-alkalitet	4,71	5,12	5,70	5,49	5,68	5,26
KT °dH	13,19	14,34	15,96	15,37	15,90	15,73
UT °dH	14,46	15,23	16,10	15,43	15,96	15,89

- U bentosu prevladavale su mikroskopski sitne dijatomeje (Bacillariophyceae) penatnog tipa. U zoobentosu je utvrđen rakušac *Rivulogammarus* sp., ličinke kukaca (Insecta) te predstavnik oblića (Nematoda). Prevladavale su indikatorske vrste beta-mezosaprobnog stupnja. Prema izračunatom P-B indeksu saprobnosti, vode istraživanih lokaliteta pripadale su II vrsti. Vrijednosti P-B indeksa bile su: 1,8 na lokalitetu Kraj donji, 1,9 na lokalitetu Ključ Brdovečki, 2,0 na lokalitetima Hum na Sutli, Donje Brezno i Klanjec te 2,1 na lokalitetu Sutlanska Poljana.
- Od fitoplanktonskih organizama na svim istraživanim lokalitetima prevladavala je dijatomejska flora penatnog tipa. U zooplanktonskoj zajednici prevladavali su predstavnici Rotatorija ili kolnjaka. Prevladavali su pokazatelji beta-mezosaprobnog stupnja. Izračunati P-B indeksi saprobnosti imali su vrijednosti 1,8 na lokalitetu Sutlanska Poljana, 1,9 na lokalitetima Hum na Sutli, odnosno Klanjec i 2,0 na lokalitetima Donje Brezno, Kraj donji i Ključ Brdovečki. Ove vrijednosti upućuju na pripadnost voda istraživanih lokaliteta kakvoći II vrste.

Lokalitet Vrsta	Hum na Sutli	Donje Brezno	Sutlanska poljana	Klanjec	Kraj donji	Ključ Brdovečki
Klen	66	6	6	70	28	2
Krkuša	14	16	/	2	1	/
Brkica	/	4	/	/	/	/
Čepa	/	1	/	/	/	/
Bodorka	/	1	/	3	1	/
Gavčica	/	/	5	/	1	1
Mrena	/	/	/	4	/	1
Uklija	/	/	/	4	11	/
Štuka	/	/	/	1	/	1
Sunčanica	/	/	/	1	/	/
Plotica	/	/	/	1	/	/
Grgeč	/	/	/	1	5	/
Potočna paklara	/	/	/	1	/	/
Podust	/	/	/	/	7	/
Nosara	/	/	/	/	2	/
Crvenperka	/	/	/	/	1	/
Babuška	/	/	/	/	1	/
Dvoprugasta uklija	/	/	/	/	/	13
Ukupno	80	28	11	88	58	19

- Na temelju utvrđenih vrijednosti bakterioloških parametara za istražene lokalitete, a sukladno Uredbi o klasifikaciji voda (1998), voda na lokalitetima Hum na Sutli, Donje Brezno, Sutlanska poljana i Klanjec pripadaju IV, a na lokalitetima Kraj donji i Ključ Brdovečki III vrsti vode.

Parametar					
Lokalitet	Ukupni koliformi (MPN/100 mL)	<i>E.coli</i> (MPN/100 mL)	Enterokoki (MPN/100 mL)	YEA 22°C (cfu/mL)	Vrsta vode
Hum na Sutli	5287,15	719,0	243,3	108000	IV
Donje Brezno	26208,45	3246,2	336,1	152000	IV
Sutlanska Poljana	13189,95	3011,6	312,9	320000	IV
Klanjec	2302,65	614,2	73,8	212000	IV
Kraj donji	2020,95	413,05	40,9	10500	III
Ključ Brdovečki	2678,75	382,8	40,5	19500	III

- Općom kliničkom pretragom riba nisu utvrđene patološke promjene na površini tijela riba. Kod pet od 25 pregledanih klenova na lokalitetu Hum na Sutli crijevo je bilo upaljeno i izrazito blijede boje, kao rezultat invadiranosti crijevnih nametnika iz koljena kukaša (*Acanthocephala*).
- Analizirani uzorci bili su negativni na prisustvo virusa ZHN, ZNG, VHS i PVŠ što je pokazano u reakcijama RT-PCR. Nespecifična pretraga ribljih virusa iz ovih uzoraka na stanicama EPC je također bila negativna.
- Na lokalitetu Hum na Sutli jedan klen je imao pozitivne rezultate pretrage iz uzoraka jetre (7 cfu), slezene (3 cfu) i bubrega (3 cfu). Primjenom komercijalnih API testova utvrđeno je da izolirane bakterije iz jetre, slezene i bubrega pripadaju gram negativnoj bakterijskoj vrsti *Aeromonas hydrophila/caviae*. Na lokalitetu Sutlanska Poljana jedan klen je imao pozitivne rezultate pretrage iz uzoraka jetre (12 cfu) i slezene (4 cfu). Utvrđeno je da izolirane bakterije iz jetre pripadaju gram negativnoj bakterijskoj vrsti *Pasteurella aerogenes*, a iz slezene gram negativnoj bakterijskoj vrsti *Salmonella* spp. Na ostalim lokalitetima rezultati bakteriološke pretrage su bili negativni.

- U sklopu parazitološke pretrage, na lokalitetu Hum na Sutli na škrigama jednog klena nađen je *Dactylogyrus* sp. Na lokalitetu Donje Brezno kod četiri klena na škrigama nađen je *Ichthyophthirius multifiliis*, kod jedne čepe *Dactylogyrus* sp. na škrigama i kod jedne krkuš *Diplozoon* sp. na škrigama. Na lokalitetu Klanjec na škrigama jednog klena nađen je *Dactylogyrus* sp. Na lokalitetu Kraj donji na koži dva klena nađen je *I. multifiliis*. Na lokalitetu Ključ Brdovečki kod jedne štuke na škrigama nađen je *Dactylogyrus* sp.
- Na 5 od 6 lokaliteta u pregledanim klenovima utvrđeni su crijevni nametnici iz koljena kukaša (*Acanthocephala*).

Parametar Lokalitet	Prevalencija (%)	Srednja abundancija ± SE	Srednji intenzitet ± SE	Raspon intenziteta
Hum na Sutli	80,0	11,64 ± 3,85	14,55 ± 4,30	0 - 68
Sutlanska Poljana	33,3	1,0 ± 1,0	3,0	0 - 3
Klanjec	83,9	8,33 ± 2,59	9,81 ± 3,0	0 - 59
Kraj donji	45,5	1,0 ± 0,44	2,2 ± 0,40	0 - 4
Ključ Brdovečki	50,0	1,5 ± 1,50	3,0	0 - 3



Dactylogyrus sp. na škrigama



Diplozoon sp. na škrigama



I. multifiliis na koži



Acanthocephala u crijevu

➤ Određeni sljedovi nukleotida ITS regije i dijela gena COI pronađenih kukaša su uspoređeni u programu BLAST sa sljedovima nukleotida pohranjenim u bazi podataka GenBank. Na osnovu toga pronađeni kukaši su identificirani kao pripadnici vrste *Pomphorhyncus laevis*.

<i>P. laevis</i> Sutla:	1	GCCTCGATTATAAACTGTTGTTTACTGAACTGGATTTGTGGCAATAATATAATGTTCTT	60
<i>P. laevis</i> GenBank:	131	GCCTCGATTATAAACTGTTGTTTACTGAACTGGATTTGTGGCAATAATATAATGTTCTT	190
<i>P. laevis</i> Sutla:	61	GAGCTAGCCAAGAACTATCATTTACTTGTGTGATGGTAGTTAAACCAAGAAATAAACGTCG	120
<i>P. laevis</i> GenBank:	191	GAGCTAGGCAAGAACTATCATTTACTTGTGTGATGGTAGCTAAAACAAGAAATGAACGTCG	250
<i>P. laevis</i> Sutla:	121	GTGTACAGTGAATCACTTGGCTCCCAAATCGAGGGAAGAACGTTGCCATATGTGATAAAT	180
<i>P. laevis</i> GenBank:	251	GTGTACAGTGAATCACTTGGCTCGCAAATCGAGG-AAGAACGTTGCCATATGTGATAAAT	309
<i>P. laevis</i> Sutla:	181	TTTGTGAACTGCAGGACACACGGAACAGATAGTTTTTGAACGCAAATGACAGCTGTGAGG	240
<i>P. laevis</i> GenBank:	310	TCTGTGAACTGCAGGACACACGGAACAGATAGTTTTTGAACGCAAATGACAGCTGTGAGG	369
<i>P. laevis</i> Sutla:	241	TCAAACTCATAGCTACATCCGTTTGAGGTCGATTAATATGAATATATTAACAGTGTTAGT	300
<i>P. laevis</i> GenBank:	370	TCAAACTCATAGCTACATCCGTTTGAGGTCGATTAATATGAATATATTAACAGTGTTAGT	429
<i>P. laevis</i> Sutla:	301	GATGACTACATATTAAATAACGCTGCTAACGATAAGTGCATAATGCAGGCGAGCAATTCT	360
<i>P. laevis</i> GenBank:	430	GATGACTACATATTAAATAACGCTGCTAACGATAAGTGCATAATGCAGGCGAGCAATTCT	489
<i>P. laevis</i> Sutla:	361	AATCAGTGACTATATATAGTAGAACATGCTAGCTGAAGTGCATAATCTTGAAACACTG	420
<i>P. laevis</i> GenBank:	490	AATCAGTGACTATATATAGTAGAACATGCTAGCTGAAGTGCATAATCTTGAAACACTG	549
<i>P. laevis</i> Sutla:	421	ACGATAACTCTGCGTAACTAGGTAATGATAATCATATGAGTGAAGTGTGTCGTCGTGATTGA	480
<i>P. laevis</i> GenBank:	550	ACGATAACTCTGCGTAACTAGGTAATGATAATCATATGAGTGAAGTGTGTCGTCGTGATTGA	609
<i>P. laevis</i> Sutla:	481	TCGATAT	487
<i>P. laevis</i> GenBank:	610	TCGATAT	616

ZAKLJUČCI

- Rezultati provedenih fizikalno–kemijskih pretraga uzoraka vode pokazuju da su vode ovog ribolovnog područja bogate kisikom. Vrijednosti su na svim ispitivanim lokalitetima bile iznad 8,5 mg/L. Temperatura vode nije pokazivala izražene razlike između pojedinih lokaliteta. S obzirom na vrijednosti pH, ispitivane vode odgovaraju zahtjevima za I kakvoću vode.
- U bentosu šest istraživanih lokaliteta rijeke Sutle, biljni organizmi su bili daleko više zastupljeni od životinjskih. Na osnovi izračunatog P-B indeksa saprobnosti, vode istraživanih lokaliteta rijeke Sutle pripadale su kakvoći II vrste. Bentoska bioprodukcija istraživanih lokaliteta predstavlja povoljne uvjete za naseljavanje raznolikog biljnog i životinjskog svijeta.

- Planktonska istraživanja na šest lokaliteta rijeke Sutle pokazala su, da je naseljen veliki broj populacija biljaka i manji broj životinja. U svim uzorcima prevladavale su indikatorske biljne vrste beta-mezosaprobnog stupnja. Prema P-B indeksu saprobnosti, vode istraživanih lokaliteta pripadale su kakvoći II vrste. Raznolikost vrsta, intenzitet primarne produkcije i kakvoća vode istraživanih lokaliteta, povoljno utječu na razvoj i život hidrobionata.
- Na temelju utvrđenih vrijednosti bakterioloških pokazatelja, možemo zaključiti da vode istraživanog ribolovnog područja odgovaraju III odnosno IV vrsti vode.
- U rijeci Sutli su na 6 lokaliteta ukupno ulovljene 284 ribe iz 18 rodova i 7 porodica. Najbrojnija je bila porodica Cyprinidae (95%) a najbrojnija vrsta klen (63%).
- Bakteriološki je pregledano 29 riba od čega je rezultat bio pozitivan kod dvije ribe. Identificirane su tri gram negativne bakterijske vrste: *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Pasteurella aerogenes* i *Salmonella* spp.

- Analizirani uzorci su bili negativni na prisustvo virusa ZHN, ZNG, VHS i PVŠ.
- Parazitološkom pretragom je na svim lokalitetima utvrđena slaba do osrednja prevalencija protozoa (20%) i monogenih metilja (16%) na koži i škrigama. Od endogenih parazita, na 5 od 6 lokaliteta u pregledanim klenovima utvrđeni su crijevni nametnici iz koljena kukaša. Prevalencija je bila najviša na lokalitetu Klanjec (83,9%), a najniža na lokalitetu Sutlanska Poljana (33,3%).

ZAHVALA

- Ovo istraživanje financirano je od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, Uprave ribarstva.

HVALA NA PAŽNJI

