

ODREĐIVANJE BROJA HETEROTROFNIH BAKTERIJA U JADRANSKIM UZGAJALIŠTIMA PRIMJENOM RAZLIČITIH METODA

D. Kapetanović*¹, Z. Dragun², D. Valić¹, I. Vardić Smrzlić¹,
Z. Teskeredžić¹, E. Teskeredžić¹

Sažetak

Akvakultura je jedna od grana proizvodnje hrane, s izuzetnim razvojem. Povećana primjena hrane u akvakulturi, uz moguće organsko onečišćenje generalno vodi k narušavanju kvalitete vode. Problemi narušene kvalitete vode vezani su uz fizikalne i kemijske čimbenike, kao i narušavanje mikrobiološke kvalitete vode. Heterotrofne bakterije imaju značajnu ulogu u procesu razgradnje organske tvari u vodenom okolišu i pokazatelj su procesa eutrofikacije.

U ovom su radu prikazana naša iskustva i spoznaje o bakteriološkim svojstvima morske vode u uzgajalištima lubina (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) uzduž istočne obale Jadranskog mora, s ciljem određivanja broja heterotrofnih bakterija u morskoj vodi primjenom dvije metode i dvije temperature inkubacije. Primijenjene su dvije metode za prebrojavanje heterotrofnih bakterija u morskoj vodi: supstrat SimPlate® test i metoda širenja uzorka po podlozi s uporabom uobičajenih umjetnih hranjivih podloga (Marine agara i Tryptic Soy agara s dodatkom NaCl), kao i dvije temperature inkubacije (22 °C i 35 °C).

Rezultati analize bakterioloških svojstava morske vode u jadranskim uzgajalištima upućuju da je određivanje broja heterotrofnih bakterija u morskoj vodi ovisno o primijenjenoj temperaturi i mediju za brojanje. Pri tome je temperatura inkubacije od 22 °C pogodnija za rast heterotrofnih bakterija iz morske vode, a SimPlate test daje veće vrijednosti broja heterotrofnih bakterija. Rast vrijednosti broja heterotrofnih bakterija tijekom istraživanja upućuju na moguće narušavanje mikrobiološke kvalitete morske vode u jadranskim uzgajalištima te na potrebu redovitog monitoringa kvalitete morske vode.

Ključne riječi: heterotrofne bakterije, lubin, SimPlate, marine agar, tryptic soy agar

1 dr. sc. Damir Kapetanović* (corresponding author, e-mail: kada@irb.hr), znanstveni suradnik; dr. sc. Damir Valić, viši asistent; dr. sc. Irena Vardić Smrzlić, viši asistent; dr. sc. Zlatica Teskeredžić, znanstveni savjetnik; dr. sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska;

2 dr. sc. Zrinka Dragun, znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za biološke učinke metala, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

UVOD

Akvakultura je jedna od grana proizvodnje hrane, koja bilježi izuzetan razvoj i napredak. Istovremeno, povećana primjena hrane i drugih organskih hranjivih tvari, uz moguće organsko onečišćenje generalno vodi k narušavanju kvalitete vode. Problemi narušene kvalitete vode vezani su uz fizikalne i kemijske čimbenike, kao i narušavanje mikrobiološke kvalitete vode (Kapetanović i sur., 2005).

Heterotrofne bakterije imaju značajnu ulogu u procesu razgradnje organske tvari u vodenom okolišu i pokazatelj su procesa eutrofikacije (Kapetanović i sur., 2009). Heterotrofne bakterije su dobri indikatori obogaćenja organskom tvari i postoji pozitivna korelacija broja heterotrofnih bakterija s veličinom/gustoćom ribe te količinom organske tvari (Kapetanović i sur., 2011). Osim toga, jedan od pokazatelja razine onečišćenja vode na uzgajalištima riba je i određivanje broja heterotrofnih bakterija na 22 °C i 37 °C (Golaš i sur., 2004).

Poznata je, kako je mali broj bakterija (oko 1%) uzgojiv na umjetnim hranjivim podlogama (Amann i sur., 1995). Različite metode te različite hranjive podloge su rabljene za određivanje broja heterotrofnih bakterija (eng. heterotrophic plate count, HPC) u moru. Uvjeti provedbe metode širenja uzorka po podlozi su manje stresni za rast bakterija u odnosu na druge standardne metode (metoda razlijevanja po podlozi, membranske filtracije), pri čemu je broj bakterija određen uporabom ove metode veći u odnosu na druge (Reasoner, 2004). Broj kolonija izraslih na Marine agaru je veći nego broj izraslih kolonija na Trypticase Soy agaru (Buckley i sur., 1976).

SimPlate® je supstrat metoda, koja koristi višestruku enzimsku tehnologiju za izravno određivanje HPC u vodi, bez izolacije bakterija na umjetnim hranjivim podlogama. Supstrat metoda smatra se jednako vrijednom standardnim metodama za određivanje HPC u slatkovodnim uzorcima (Jackson i sur., 2000).

Nekoliko radova izvještava o broju heterotrofnih bakterija u Jadranskom moru (Krstulović i Šolić, 1990, La Rosa i sur., 2001, Zaccone i sur., 2002, Stabili i Cavallo, 2004, Šantić i sur., 2007), međutim, nema podataka o njihovom broju u jadranskim uzgajalištima riba.

Cilj ovog rada je odrediti optimalne uvjete za monitoring broja heterotrofnih bakterija u morskoj vodi, s usporedbom rezultata ostvarenih na dvije temperature inkubacije, kao i usporedbom rezultata ostvarenih uporabom supstrat SimPlate® testa s uporabom uobičajenih umjetnih hranjivih podloga pri uporabi metode širenja uzorka po podlozi (Marine agara i Tryptic Soy agara s dodatkom NaCl).

Glavni cilj rada je, prvi put, procijeniti broj heterotrofnih bakterija u morskoj vodi na tri uzgajališta lubina (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) uzduž istočne obale Jadranskog mora.

MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na tri jadranska uzgajališta (Slika 1): u sjevernom (1. Limski kanal), srednjem (2. Ugljan) i južnom Jadranu (3. Pelješac). Ukupno je uzorkovano 72 uzorka morske vode u dvije sezone (proljeće i jesen) tijekom 2007. i 2008. godine.



Slika 1. Karta lokaliteta uzorkovanja: 1 - Limski kanal; 2 - Ugljan; 3 - Pelješac
Fig. 1. The map of the sampling sites: 1 - Lim channel; 2 - Ugljan; 3 - Pelješac

Uzroci morske vode

Uzorci morske vode uzeti su s uzgajališta i kontrolne točke, na oko 500 m od uzgajališta. Uzorci su uzorkovani uporabom Niskinovog crpca s tri dubine: 0,5 m i 3 m ispod površine mora te 0,5 m iznad dna u sterilne plastične boce od 0,5 L.

Analiza morske vode

Prije analize uzorci morske vode su serijski razrijeđeni uporabom sterilne Phosphate Buffered Saline (PBS) otopine (Merck). Serijski razrijeđeni uzorci su inokulirani metodom širenja uzorka po podlozi na Marine agaru (Difco-BD) i Tryptic Soy agaru (DB-BBL) s dodanim NaCl - MTSA, kao i uporabom supstrat metode na SimPlate® testu (IDEXX). SimPlate reagens sadrži jedinstveni enzimski supstrat, pri čemu je svaki od enzima iz supstrata namijenjen različitom bakterijskom enzimu. Najuobičajeniji enzimi bakterija iz vode su obuhvaćeni ovim enzimskim supstratom. Primjenom ovog testa zaobiđena je izolacija bakterijskih kolonija na podlozi u svrhu njihova prebrojavanja.

Nakon inkubacije na 35 °C tijekom 24 h (Atiribom i sur., 2013) i na 22 °C tijekom tri do pet dana izrasle kolonije su prebrojane i izražene kao broj izraslih bakterijskih kolonija u mL (eng. colony forming unit, CFU), odnosno kod SimPlate testa kao najvjerojatniji broj bakterija u mL (eng. most probable number, MPN).

Statistička analiza

Statistička analiza provedena je uporabom Sigma Stat statističkog paketa, Version 1.0., s prethodno logaritmiranim vrijednostima broja heterotrofnih bakterija. Usporedba broja heterotrofnih bakterija na dvije temperature inkubacije, kao i usporedba između uzgajališta i kontrolnih točaka načinjena je uporabom Mann-Whitney Rank Sum Testa. Usporedba broja heterotrofnih bakterija dobivenog trima procedurama brojanja, kao i usporedba tri uzgajališta i četiri perioda uzorkovanja načinjena je uporabom Kruskal-Wallis One Way Analize s post-hoc Dunnovim testom.

REZULTATI I RASPRAVA

Utjecaj temperature inkubacije na rast bakterija

Broj heterotrofnih bakterija - HPC (median) određen uporabom SimPlate testa na 22 °C je oko 15 puta veći ($p < 0,001$) nego na 35 °C (Tablica 1). Statistički značajno veći HPC na 22 °C također je utvrđen uporabom metode razlijevanja po podlozi i to 5 puta više na Marine agaru i 17 puta više na MTSA agaru (Tablica 1). Bakterije izrasle na temperaturi inkubacije od 22 °C predstavljaju autohtonu bakterijsku zajednicu vodenog ekosustava te je ta temperatura najbliža uvjetima u vodenom ekosustavu i pogoduje njihovom rastu na umjetnim podlogama više nego temperatura inkubacije od 35 °C. Brojne studije su pokazale jednak spektar heterotrofnih bakterija koje su izolirane iz vode na temperaturi inkubacije od 22 °C, a uključuje bakterije: *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Comamonas* spp., *Enterobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Klebsiella* spp., *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., *Sphingomonas* spp., *Stenotrophomonas* spp., atipični *Mycobacterium* spp., *Bacillus* spp. i *Nocardia* (Exner i sur., 2003).

Usporedba HPC određenog uporabom SimPlate testa i metode širenja uzorka po podlozi

HPC (median) određen uporabom SimPlate testa je 3-4 puta veći ($p < 0,001$) od broja određenog metodom širenja po podlozi na Marine agaru i MTSA agaru (Tablica 1). Takva razlika između ove dvije metode je vjerojatno posljedica slabog rasta bakterija na umjetnim hranjivim podlogama (Amann i sur., 1995), što čini SimPlate test osjetljivijim za određivanje HPC.

Tablica 1. HPC vrijednosti (median) određene nakon inkubacije na temperaturi 22 °C i 35 °C uporabom SimPlate testa, Marine Agara i MTSA Agara

Table 1. HPC values (median) determined after incubation at two temperatures (22 °C and 35 °C) using SimPlate test, Marine Agar and MTSA Agar

Test	n	22 °C	35 °C	*p
SimPlate® (MPN/mL)	78	47.0×10 ³	3.27×10 ³	<0.001
Marine Agar (CFU/mL)	78	14.6×10 ³	2.95×10 ³	<0.001
MTSA Agar (CFU/mL)	78	12.0×10 ³	0.70×10 ³	<0.001

*p – statistički značajna razlika, Mann-Whitney Rank Sum test

*p – statistically significant difference, Mann-Whitney Rank Sum test

Određivanje HPC na jadranskim uzgajalištima

Određivanje HPC je temeljeno na srednjoj vrijednosti HPC za stupac morske vode, mjereno za svaku lokaciju, a određeno uporabom SimPlate testa na temperaturi inkubacije 22 °C. Za svako uzgajalište, usporedba je načinjena između vrijednosti HPC određenih u morskoj vodi na samom uzgajalištu i kontrolnoj točki (Slika 2). Kako povećanje HPC nije utvrđeno na uzgajalištima lubina, čini se da nije došlo do organskog onečišćenja morske vode.

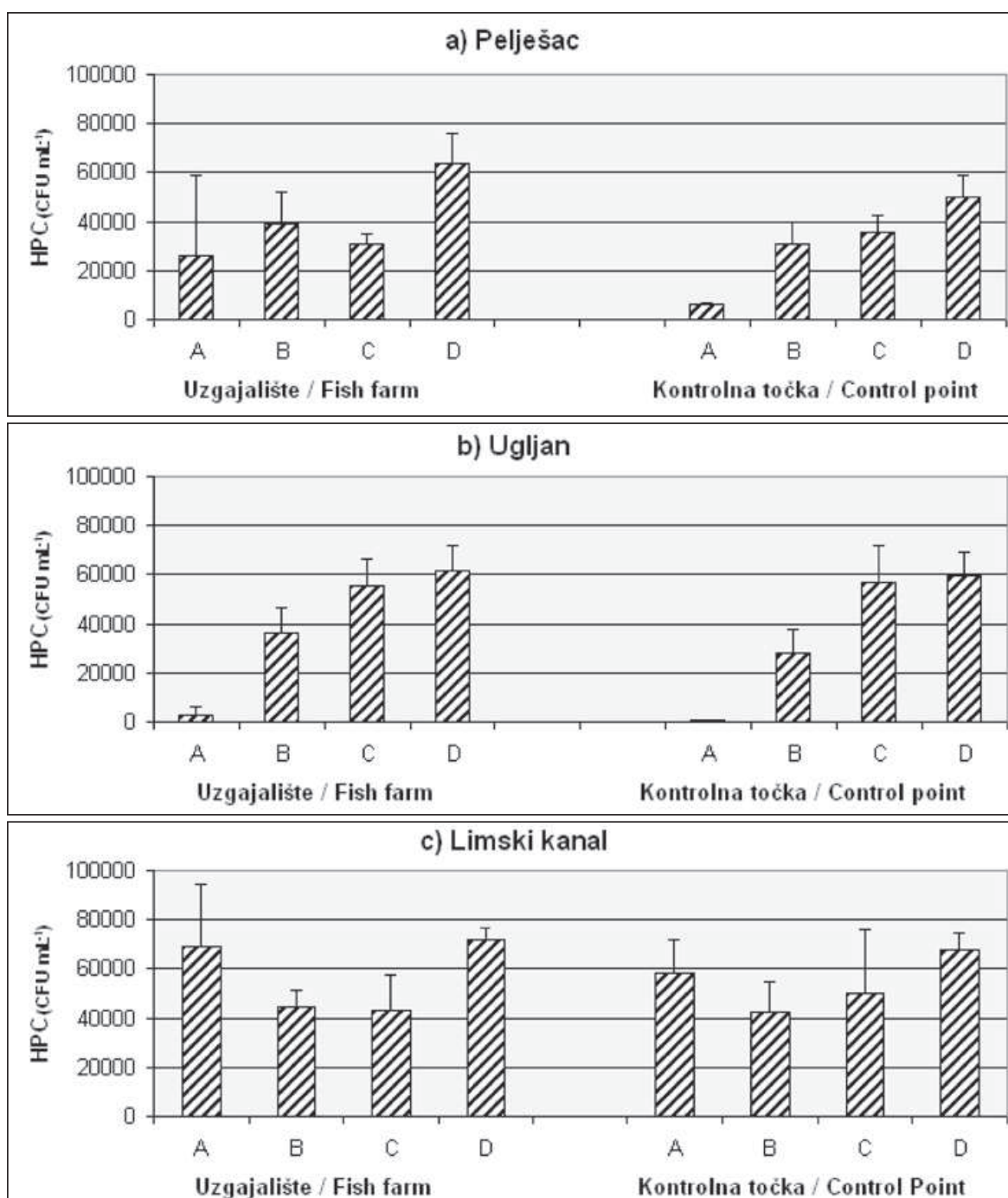
Uzgajalište lubina na lokaciji Limski kanal ($55,5 \times 10^3$ MPN mL⁻¹) ima veći HPC u odnosu na uzgajalište kod otoka Ugljan ($45,5 \times 10^3$ MPN mL⁻¹) i poluotoka Pelješac ($37,2 \times 10^3$ MPN mL⁻¹), pri čemu je razlika između uzgajališta Limski kanal i Pelješac statistički značajna ($p < 0,05$). Utvrđena razlika vjerojatno je posljedica specifičnog geografskog položaja uzgajališta Limski kanal, koje je ujedno i plovni put što vjerojatno utječe na vrijednost HPC.

Sezonske oscilacije vrijednosti HPC uočljive su na uzgajalištima u srednjem i južnom Jadranu, pri čemu je u prosincu 2008. god, broj heterotrofnih bakterija na uzgajalištu i kontrolnoj točki veći u odnosu na prethodna tri uzorkovanja (Slika 2a-b), ukazujući na obogaćenje organskom tvari.

Radi sagledavanja rezultata HPC na uzgajalištima lubina u širem kontekstu rezultati su uspoređeni s rezultatima istraživanja HPC u Jadranu, koja nisu bila vezana na uzgajališta riba (Šantić i sur., 2007). Iako su vrijednosti određene SimPlate supstrat testom veće od onih dobivenih uporabom metode širenja po podlozi, naši rezultati u rasponu od $0,23 \times 10^3$ MPN mL⁻¹ (Ugljan) do $104,0 \times 10^3$ MPN mL⁻¹ (Limski kanal) su unutar vrijednosti ($50,0 \times 10^3$ - $3,92 \times 10^6$ CFU mL⁻¹), dobivenih od Šantić i sur. (2007) uporabom metode širenja po podlozi.

Usporedbom naših rezultata HPC s rezultatima za talijanski dio Jadrana, od Brindisija do S. M. di Leuca, pod različitim antropogenim utjecajima (Stabili i Cavallo, 2004), koji su određeni metodom tekuće citometrije ($43,0 \times 10^3$ - $67,0 \times 10^3$ CFU mL⁻¹), utvrđeno je da su naši rezultati unutar prezentiranih vrijednosti.

Usporedbom dobivenih rezultata s rezultatima iz Mediterana (Maldonado i sur., 2005), vezanih za uzgajališta riba uz Španjolsku obalu, uočeno je da su maksimalne vrijednosti HPC u morskoj vodi uzgajališta lubina u Limskom kanalu ($104,0 \times 10^3$ MPN mL⁻¹) manje od minimalnih vrijednosti HPC na uzgajalištima lubina u Mediteranu ($200,0 \times 10^3$ CFU mL⁻¹).



Slika 2. Broj heterotrofnih bakterija (HPC) u morskoj vodi (srednja vrijednost i standardna devijacija) na tri uzgajališta lubina (uzgajalište i kontrolna točka) u Jadranskom moru određen uporabom SimPlate testa na temperaturi inkubacije od 22°C: a) Pelješac; b) Ugljan; c) Limski kanal. A - lipanj 2007.; B - studeni 2007.; C - lipanj 2008.; D - prosinac 2008.

Fig. 2. Number of heterotrophic bacteria (HPC) in marine water (Median and standard deviation) at three European sea bass farms (fish farm and control point) in the Adriatic Sea determined using SimPlate test at incubation temperature of 22°C: a) Pelješac; b) Ugljan; c) Limski kanal. A - June 2007; B - November 2007; C - June 2008; D - December 2008

ZAKLJUČAK

Rezultati analize bakterioloških svojstava morske vode u jadranskim uzgajalištima s aspekta određivanja broja heterotrofnih bakterija upućuju na zaključak da je određivanje broja heterotrofnih bakterija u morskoj vodi ovisi o primijenjenoj temperaturi i mediju za brojanje.

Temperatura inkubacije od 22 °C je pogodnija za rast heterotrofnih bakterija, pri čemu SimPlate test daje veće vrijednosti nego standardna metoda širenja po podlozi na umjetnim hranjivim podlogama. Kako povećanje HPC nije utvrđeno na uzgajalištima lubina u odnosu na kontrolne točke, čini se da nije došlo do organskog onečišćenja morske vode.

Uočene promjene vrijednosti HPC između uzorkovanja, pokazatelj je mogućeg narušavanja kvalitete morske vode, što ukazuje na potrebu sezonskog (po godišnjim dobima) monitoringa mikrobiološke kvalitete morske vode na uzgajalištima lubina i okolnog akvatorija u Jadranu.

ZAHVALA

Ovo istraživanje provedeno je u sklopu nacionalnog monitoring programa "Jadran".

Summary

BACTERIOLOGICAL PROPERTIES OF MARINE WATER IN ADRIATIC FISH FARMS: ENUMERATION OF HETEROTROPHIC BACTERIA

D. Kapetanović*¹, Z. Dragun², D. Valić¹, I. Vardić Smrzlić¹,
Z. Teskeredžić¹, E. Teskeredžić¹

Aquaculture is currently one of the fastest growing food production sectors in the world. Increase in nutrients and organic wastes lead to general deterioration of water quality. The problem of water quality is associated with both physical and chemical factors, as well as microbiological water quality. Heterotrophic bacteria play an important role in the process of decomposition of organic matter in water environment and indicate eutrophication process.

Here we present our experience and knowledge on bacterial properties of marine

1 dr. sc. Damir Kapetanović* (corresponding author, e-mail: kada@irb.hr), znanstveni suradnik; dr. sc. Damir Valić, viši asistent; dr. sc. Irena Vardić Smrzlić, viši asistent; dr. sc. Zlatica Teskeredžić, znanstveni savjetnik; dr. sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik, Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska;

2 dr. sc. Zrinka Dragun, znanstveni suradnik, Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Laboratorij za biološke učinke metala, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska

water in the Adriatic fish farms with European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758), with an emphasis on enumeration of heterotrophic bacteria in marine water.

We applied two temperatures of incubation, as well as two methods for enumeration of heterotrophic bacteria: substrate SimPlate® test and spread plate method on conventional artificial media (Marine agar and Tryptic Soy agar with added NaCl).

The results of analysis of bacteriological properties of marine water in the Adriatic fish farms showed that enumeration of heterotrophic bacteria in marine water depends on the applied incubation temperature and media for enumeration. At the same time, the incubation temperature of 22°C favours more intense growth of marine heterotrophic bacteria, whereas a SimPlate test gives higher values of heterotrophic bacteria. Volatile values of heterotrophic bacteria during this research indicate a possible deterioration of microbiological water quality in the Adriatic fish farms and a need for regular monitoring of marine water quality.

Key words: heterotrophic bacteria, European sea bass, SimPlate, marine agar, tryptic soy agar

LITERATURA

- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 59, 143-169.
- Atiribom, R.Y., Ovie, S.I., Mbagwu, I.G., Kolndadacha, O.D. (2013): Classification of the Pelagic and Benthic Compartments of Kainji Lake Ecosystem Using Types and Loads of the Bacterial Flora. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 8, 223-227.
- Buckley, E.N., Jonas, R.B., Pfaender, F.K. (1976): Characterization of microbial isolates from an estuarine ecosystem: Relationship of hydrocarbon utilization to ambient hydrocarbon concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 32, 232-237.
- Golaš, I., Zmysłowska, I., Harnisz, M. (2004): The microbiological state of fish feed, water, and *Silurus glanis* L. skin of fry during intensive rearing. *Bulletin of the Sea Fisheries Institute*, 161, (1), 3-14.
- Jackson, W.R., Osborne, K., Barnes, G., Jolliff, C., Zamani, D., Roll, B., Stillinos, A., Herzog, D., Cannon, S., Loveland, S. (2000): Multiregional evaluation of the SimPlate heterotrophic plate count method compared to the standard plate count agar pour plate method in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 453-454.
- Kapetanović, D., Kurtović, B., Teskeredžić, Z., Teskeredžić, E. (2005): Incidence of *E. coli* in aquaculture areas of the Adriatic Sea. *Medycyna Weterynaryjna*, 61, 12, 1366-1367.
- Kapetanović, D., Dragun, Z., Valić, D., Teskeredžić, Z., Teskeredžić, E., (2009): Enumeration of heterotrophs in river water with spread plate method: comparison of Yeast extract agar and R2A agar. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18, 7b, 1276-1280.

- Kapetanović, D., Valić, D., Vardić Smrzlić, I., Teskeredžić, Z., Teskeredžić, E., (2011): Usporedba i značaj mikrobioloških pokazatelja vode u akvakulturi. *Hrvatske vode: časopis za vodno gospodarstvo*, 19, 76, 151-156.
- Krstulović, N., Šolić, M. (1990): Long-term study of heterotrophic bacteria as indicators of eutrophication of the open middle Adriatic Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 30, 611-617.
- La Rosa, T., Mirto, S., Marino, A., Alonzo, V., Maugeri, T.L., Mazzola, A. (2001): Heterotrophic bacteria community and pollution indicators of mussel – farm impact in the Gulf of Gaeta (Tyrrhenian Sea). *Marine Environmental Research*, 52, 301-321.
- Maldonado, M., Carmona, M.C., Escheverría, Y., Riesgo, A. (2005): The environmental impact of Mediterranean cage fish farms at semi exposed locations: does it need a re-assessment? *Helgoland Marine Research*, 59, 121-135.
- Reasoner, D.J. (2004): Heterotrophic plate count methodology in the United States. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 307-315.
- Stabili, L., Cavallo, R.A. (2004): Biodiversity of culturable heterotrophic bacteria in the Southern Adriatic Sea Italian coast waters. *Scientia Marina*, 68, 31-41.
- Šantić, D., Krstulović, N., Šolić, M. (2007): Comparison of flow cytometric and epifluorescent counting methods for marine heterotrophic bacteria. *Acta Adriatica*, 48, 107-114.
- Zaccone, R., Caruso, G., Calì, C. (2002): Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. *Marine Environmental Research*, 54, 1-19.

Primljeno/Received: 2. 11. 2012.

Prihvaćeno/Accepted: 7. 12. 2012.