

****Ovo istraživanje je financirano sredstvima Bjelovarsko-Bilogorske županije. Autori se zahvaljuju Udruzi proizvođača tovne junadi Baby Beef iz Gudovca, Poljoprivrednoj zadruzi Ivanec iz Ivanca, te Mesnoj industriji IMI iz Ivanca na suradnji u pripremi i provedbi istraživanja.**

REFERENCES

Florek, M., Litwińczuk Z. (2002): The quality of meat from the carcasses of young bulls and heifers classified according to the EUROP system. *Animal Science Papers and Reports*. Vol. 20. Supplement 1, 169-178.

Kallweit, E., Henning, M. (1998): Carcass evaluation systems in the EU. *Research Rept Biotechnical Fac., University of Ljubljana, Agricultural Issue*. Supplement 30, 135-140. 6th International Symposium Animal Science Days, Portorož, Slovenia, Sept. 16-18, 1998.

Kolega, A., Kovačić, D., Radman, M., Markovina, J. (2003): Export marketing of the Croatian baby beef. *Agriculturae Conspetus Scientificus*, Vol. 68, No. 3, 179-184.

Pankretić, B. (1998): Upliv vanjsko-trgovinskih mjera agrarne politike na govedarsku proizvodnju u Hrvatskoj. *Magistarski rad*,

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Pravilnik o kakvoći goveđih trupova i polovica na liniji klanja. (2004). *Narodne novine* 20/04.

Pravilnik o uvjetima i načinu prijevoza životinja. (2005). *Narodne novine* 116/05.

SAS, 1999. *OnlineDoc® Software Release 8*. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Scheper, J., Scholz, W. (1985): DLG-Schnittführung für die Zerlegung der Schlachtkörper von Rind, Kalb, Schwein und Schaf. *Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft e. V. (DLG)*, Frankfurt am Main.

Wajda, S., Daszkiewicz, T. (2002): Slaughter value and meat quality in heifers of different EUROP adiposity classes. *Animal Science Papers and Reports*, Vol. 20. Supplement 1, 235-242.

Žgur, S., Drobnič, M. (1998): A note on quality of cattle slaughtered in Slovenia. *Research Rept. Biotechnical Fac., University of Ljubljana, Agricultural Issue*. Supplement 30, 141-146. 6th International Symposium Animal Science Days, Portorož, Slovenia, Sept. 16-18, 1998.

Received / Prispjelo: 7.11.2006.

Accepted / Prihvaćeno: 16.11.2006. ■

BIOLUMINISCENTNE BAKTERIJE NA OSLIĆU (*MERLUCCIOUS MERLUCCIOUS*)

Čanković¹, M.

SAŽETAK

Bioluminiscencija je zanimljiva pojava proizvodnje svjetla, koju posjeduju različite skupine organizama, kao što su bakterije, gljivice i životinje. Bakterije su najbrojniji bioluminiscentni organizmi, a zanimljivo je da ih većina obitava u moru.

Cilj ovog rada bila je izolacija i određivanje bioluminiscentnih bakterijskih vrsta koje u morskom okolišu žive na ribi. Izolacija bioluminiscentnih bakterija je obavljena s površine kože svježe ulovljenog oslića (*Merluccius merluccius*) 24 sata po ulovu, pohranjenom u hladnjaku na temperaturu od 4°C. Izolirane kolonije luminiscentnih bakterija proizvodile su na hranjivoj podlozi intenzivno zelenkasto – plavo svjetlo. Rezultati dobiveni ispitivanjem njihovih morfoloških i biokemijskih osobina uputili su na zaključak da bakterije izolirane s površine kože oslića pri-

padaju rodu *Vibrio*, vrsti *Vibrio fischeri*, koja u određenim uvjetima može uzrokovati bolest kod nekih beskralješnjaka, odnosno kvarenje ribe po ulovu.

Gljučne riječi: bioluminiscentne bakterije, izolacija, određivanje, *Merluccius merluccius*, *Vibrio fischeri*

UVOD

Pojam bioluminiscencije odnosi se na emitiranje svjetlosti od strane živih organizama, koje je rezultat oksidacije organskog spoja luciferina uz pomoć enzima luciferaze. Taj proces je široko rasprostranjen i bilježi se već preko 2500 godina. Najranija su zabilježena istraživanja starih Kineza koji su svoja dostignuća preko Grka proširili i na Zapadne civilizacije, uključujući i poznatog prirodoslovca i filozofa

¹ Milan Čanković, dipl. ing., Kralja Tomislava 21, 22 000 Šibenik; E-mail: chunky@net.hr

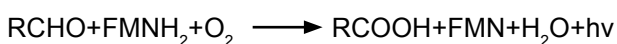
Aristotela u IV. stoljeću prije Krista (Meighen, 1992). Kroz naredna stoljeća mnogi su se znanstvenici bavili ovom pojavom, među njima i Heller koji je 1853. godine izdvojio jedan organizam i nazvao ga *Sarcina lutea*, smatravši ga uzrokom svijetljenja mesa. Beijerinck (1889) navodi da je Pflüger 1885. godine izolirao bakterije koje svijetle s ribe, a Cohn ih je 1888. godine nazvao *Micrococcus phosphoreus*.

Detaljnije istraživanje luminiscentnih bakterija započelo je otkrićem *Bacterium phosphorescens* u zapadnom dijelu Indije, nakon čega je opisano tridesetak vrsta fotobakterija izoliranih iz Trščanskog zaljeva. Do spoznaje da je bioluminiscencija uglavnom prevladavajuće svojstvo morskih organizama došao je Harvey (1940).

Od XIX. stoljeća do danas identificirane su strukture supstrata i enzima luciferaze iz nekoliko različitih luminiscentnih organizama (Czyż i Węgrzyn, 2002, Jabłoński i DeLuca, 1978).

Bioluminiscencija nije jedini proces koji rezultira emisijom svjetlosti u živim organizmima. Fotoluminiscentni procesi fluorescencije i fosforescencije se također pojavljuju u živim stanicama. Treba napomenuti da se u reakciji bioluminiscencije, općenito smatra da pobuđena molekula ima samo jedan energetski nivo koji uzrokuje odgovarajuću spektralnu liniju i, s obzirom na to, tako emitirani spektar može biti izjednačen s onim kod fluorescentnih vrsta (Meighen, 1992).

Reakcija bakterijske luminiscencije katalizirana je enzimom luciferazom, koja se sastoji od dvije podjedinice, α i β . Supstrati luciferaze su dugolančani aldehid i FMNH₂ (reducirani flavin mononukleotid). U reakciji se FMNH₂ pomoću luciferaze i uz prisustvo dugolančanog aldehida (tetradekanala) oksidira u FMN (flavin mononukleotid), a kao nusprodukt ove reakcije nastaje kvant svjetlosti (Czyż i Węgrzyn, 2002). Reakcija se može prikazati na sljedeći način:



Reakcija bioluminiscencije *in vitro* rezultira emisijom plavo-zelenog svjetla s maksimalnim intenzitetom na 490 nm. Izvor energije potrebne za emitiranje ove svjetlosti je reakcija oksidacije luciferina kao i FMNH₂. Postoje razlike između lumini-

scijskog spektra promatranog *in vitro* i onog *in vivo*. Ove razlike nastaju zbog proteina pronađenih kod nekih bakterija koji se ponašaju kao detektori, što rezultira emitiranjem svjetlosti na drugoj valnoj duljini. Tako je svjetlo bakterije *Vibrio fischeri* plavije s maksimumom na 475 nm jer fluorescentno plavi protein preuzima energiju iz reakcije i emitira svjetlo na svojoj karakterističnoj valnoj duljini. Soj *V. fischeri* (Y-1) ima fluorescentno žuti protein (YFP) i emitira žuto svjetlo s maksimumom na 540 nm. Kako veze između YFP i reakcijskog sustava slabe (npr. povišenjem temperature), reducira se žuta komponenta luminiscencije. Naime, do 18°C svjetlost je žuta, a pri višim temperaturama je plava (Herring, 2002). Za emitiranje svjetla bakterije mogu koristiti i do 20 % ukupne stanične energije (Czyż i Węgrzyn, 2002).

Luminiscentne bakterije su najrasprostranjeniji luminiscentni organizmi, a većina ih obitava u morskom okolišu kao slobodno živuće jedinke ili su povezane s nekim drugim organizmima (Nealson, 1994). Ove bakterije su također pronađene i u slatkoj vodi i na kopnu. Žive kao saprofiti na uginuloj ribi ili mesu, kao paraziti u rakovima i insektima, kao simbiotički u svjetlećim organima riba i liganja ili kao komensali u crijevima riba i crvi, te kao samostalne jedinke u moru (Meighen, 1992). One su, međutim, nedovoljno istražene, a literatura oskudijeva podacima o ovoj interesantnoj skupini organizama. Stoga je svrha ovog rada bila pobliže upoznavanje s fiziološkim i morfološkim karakteristikama ovih bakterija.

Većina morskih luminiscentnih bakterija može biti izolirana direktno iz morske vode, ali isto tako i iz probavnog trakta morskih riba, te s površine kože uginule ribe gdje žive kao saprofiti. S obzirom na to, mnoge luminiscentne vrste su izolirane s kože riba na kojima su rasle kao saprofiti, što objašnjava luminiscenciju ribe u stadiju truljenja koju je prije tri stoljeća promatrao Robert Boyle (Meighen, 1992).

MATERIJAL I METODE

Oslić (*Merluccius merluccius*) je ulovljen u području Blitvenice, pridnom povlačnom mrežom – kočom, na 180 m dubine u lipnju 2005.

Ulovljena riba ne smije doći u doticaj sa slatkom vodom ili ledom kako se bakterije ne bi isprale s nje-

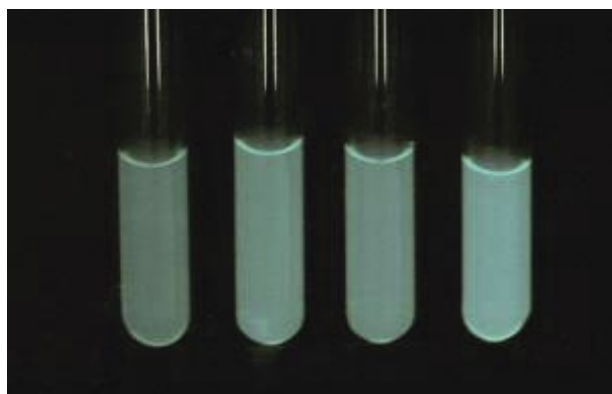
ne kože ili uginule zbog smrzavanja. Svježe ulovljeni oslić stavljen je u plastičnu posudu do polovice urođen u morsku vodu, u hladnjak na temperaturu od oko 4°C. Nakon 24 sata gotovo cijela riba je svijetlila u mraku, s tim da je područje glave, operkuluma, repa, te područje na granici morske vode i zraka, bilo nešto gušće prekriveno kolonijama luminiscentnih bakterija.

Bakteriološkom ezom uzorci bakterija inokulirani su na prethodno pripremljene hranjive podloge (luminiscentnu i Boss hranjivu podlogu). Površina ribe blago je sastrugana na dijelu gdje su bakterije najjače svijetlile.

Daljnijim precjepljivanjima dobivena je čista kultura luminiscentnih bakterija. Nakon 24 sata inkubacije

▼ **Slika 1.** Bilomuniscentne bakterije u luminiscentnom i Boss bujonu

▼ **Picture 1.** Bioluminescent bacteria in luminiscent and Boss bujon



▼ **Slika 2.** Bioluminiscentne bakterije uzgojene na Boss i luminiscentnim podlogama

▼ **Picture 2.** Bioluminescent bacteria grown on luminiscent and Boss medium



pri sobnoj temperaturi, na hranjivim podlogama su izrasle kolonije koje su emitirale intenzivno zelenkasto-plavo svjetlo (Slika 1). Bakterije su s čvrste hranjive podloge prenijete u hranjivi bujon kako bi se namnožile (pripremljen je luminiscentni i Boss bujon). Luminiscentne bakterije izrasle u hranjivom bujonu prikazane su na slici 2.

Na uzgojenim uzorcima mikroskopiranjem su utvrđene morfološke karakteristike ovih bakterija, obojane su po Gramu, ispitana je izvanstanična i unutarstanična enzimatska aktivnost, rast bez NaCl, te sposobnost rasta na različitim temperaturama. Za utvrđivanje morfoloških karakteristika preparati su prethodno obojeni DAPI i cyber fluorescentnim bojama. Rast bez NaCl ispitan je na Boss podlozi u koju nismo dodali NaCl. Kod ispitivanja izvanstanične enzimatske aktivnosti utvrđivana je sposobnost luminiscentnih bakterija da razgrade želatinu, lipide i škrob, a pri ispitivanju unutarstanične enzimatske aktivnosti testirane su IMVIC reakcije, fermentacija glukoze i laktoze, proizvodnja H₂S, razgradnja uree do amonijaka i reakcije denitrifikacije. Sve inokulirane podloge (osim kod ispitivanja rasta na različitim temp.) inkubirane su pri sobnoj temperaturi, a rezultati su očitani nakon sedam dana. Sposobnost rasta ispitana je i pri temperaturama od 5°C, 25°C, 36,5°C i 44,5°C.

REZULTATI I RASPRAVA

Mikroskopirajući nativni preparat i preparate bojana fluorescentnim bojama DAPI i cyber green, uočeno je da izolirane bakterije imaju oblik zakrivljenih štapića i izraženu pokretljivost (Slika 3 i 4). Prilikom bojenja po Gramu stanice su se obojile crveno, svrstavajući ih u skupinu Gram – negativnih bakterija (Slika 5).

Prilikom ispitivanja izvanstanične enzimatske aktivnosti utvrđeno je da ove bakterije hidroliziraju želatinu odnosno proteine i lipide, a nemaju amilaze pomoću kojih bi hidrolizirali škrob (Tablica 1).

Ispitivanjem unutarstanične enzimatske aktivnosti dokazano je da izolirane bakterije prilikom fermentacije glukoze zakiseljavaju podlogu, a nemaju sposobnost fermentacije laktoze i ne proizvode plin. Utvrđeno je da ove bakterije nemaju sposobnost iskorištavanja citrata kao izvora ugljika i ne razgrađuju ureu do amonijaka. Reakcije denitrifikacije

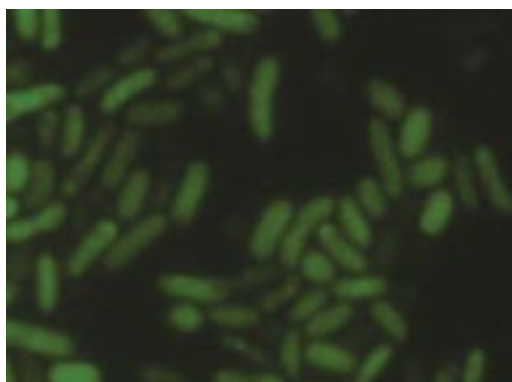
▼ **Slika 3.** Bioluminiscentne bakterije obojene DAPI fluorescentnom bojom

▼ **Picture 3.** Bioluminescent bacteria coloured with DAPI florescent colour



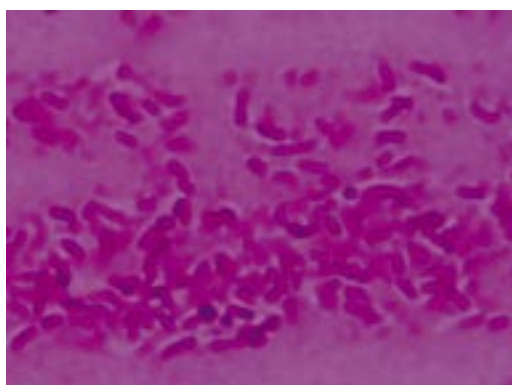
▼ **Slika 4.** Bioluminiscentne bakterije obojene cyber green bojom

▼ **Picture 4.** Bioluminescent bacteria coloured with cyber green colour



▼ **Slika 5.** Gram negativno bojane luminiscentne bakterijske stanice

▼ **Picture 5.** Picture 5: Gram negativley coloured luminescent bacteria



▼ **Tablica 1.** Rezultati izvanstanične enzimatske aktivnosti bioluminiscentnih bakterija

▼ **Table 1.** Results of extracellular enzymatic activity of bioluminescent bacteria

HIDROLIZA / HYDROLYSIS OF	REAKCIJA / REACTION
želatine / gelatine	+
škroba /starch	-
lipida / lipids	+

Legenda: + = pozitivna reakcija ; - = negativna reakcija
Legend: + = positive reaction ; - = negative reaction

▼ **Tablica 2.** Pregled rezultata ispitivanih unutarstaničnih enzimatskih aktivnosti luminiscentnih bakterija

▼ **Table 2.** Results overview of investigated intracellular enzymatic activities of luminiscent bacteria

TEST/ TEST	REAKCIJA / REACTION
fermentacija glukoze / glucose fermentation	+
fermentacija laktoze / lactose fermentation	-
proizvodnja H ₂ S / H ₂ S production	-
stvaranje indola / indole formation	-
MC reakcija / MC reaction	-
VP reakcija / VP reaction	-
iskorištavanje citrata / citrate utilization	-
razgradnja uree / urea splitting	-
reakcije denitrifikacije / denitrification reactions	-

Legenda: + = pozitivna reakcija ; - = negativna reakcija
Legend: + = positive reaction ; - = negative reaction

također su bile negativne (Tablica 2).

Nakon inkubacije od 48 sati pri sobnoj temperaturi na Boss podlozi bez NaCl nije došlo do rasta bakterija, čime je eliminirana vrsta *Vibrio cholerae*.

Važno je napomenuti da pokušaj izolacije s oslića koji je odstajao 72 sata u istim uvjetima nije bio uspješan jer je

luminiscencija bila znatno smanjenog intenziteta.

Ispitivanje rasta izoliranih bakterija pri inkubaciji na temperaturama od 5°C, 25°C, 36.5°C i 44.5°C je pokazalo očekivane rezultate. Do rasta je došlo jedino na podlozi inkubiranoj na 25°C, budući da je ta temperatura najbliža temperaturi morske vode u kojoj obitava oslić (*M. merluccius*) s kojeg smo izolirali ispitivane bakterije (Tablica 3).

▼ **Tablica 3.** Rezultati rasta ispitivanih bakterija na različitim temperaturama

▼ **Table 3.** Results of growth of investigated bacteria on different temperatures

TEMPERATURA / TEMPERATURE [° C]	RAST / GROWTH
5	-
25	+
36,5	-
44,5	-

Legenda: + = ima rasta; - = nema rasta

Legend: + = there is growth; - = there is no growth

Sva ispitivanja morfoloških osobina, rezultati bojenja po Gramu, te rezultati ispitivanih biokemijskih reakcija upućuju na to da se radi o bakteriji *Vibrio fischeri*. To su bakterije isključivo iz morskog ekosustava, heterotrofne su i pokreću se pomoću flagela. Uglavnom se nalaze u simbiozi s različitim ribama i glavonošcima, dok slobodno žive jedinke žive kao saprofiti razlažući organsku tvar. Takve jedinke mogu dovesti do pojave luminiscentne vibrioze, bolesti koja pogađa beskralješnjake koji se uzgajaju u akvakulturi (npr. jastog, hlap, kozica) (Madigan i Martinko, 2005). Na ribi se ove bakterije razvijaju nakon uginuća, odnosno ako nakon ulova riba nije "šokirana" ledom. Njihovim razvojem započinje razgradnja, odnosno sam proces kvarenja ribe.

SUMMARY

BIOLUMINESCENT BACTERIA IN HAKE (*MERLUCCIOUS MERLUCCIOUS*)

Bioluminescence is an interesting phenomenon of production of light, wich occurs in various life forms like

bacteria, fungi and animals.

*Bacteria are the most numerous bioluminescent organisms. It is interesting that the majority of these organisms live in marine environments. This thesis deals with the isolation and determination of the bioluminescent bacteria from hake (*Merluccius merluccius*).*

*The freshly caught hake (*Merluccius merluccius*) was held in the refrigerator on 4°C for 24 hours. After that period the isolation was done.*

*The bioluminescent bacteria colonies were producing intensive greenish – blue light. The results obtained by the research of the morphological and biochemical features showed that the light producing bacteria is *Vibrio fischeri*, which in certain conditions could cause disease in some invertebrates, i.e. deterioration of the caught fish.*

Key words: *bioluminescent bacteria, isolation, determination, *Merluccius merluccius*, *Vibrio fischeri**

LITERATURA

Beijerinck, M.W. (1889): Le Photobacterium luminosum, Bactérie lumineuse de la Mer du Nord. Archives Néerlandaises des Sciences Exactes et Naturelles, 23: 415-427.

Czyż, A., Węgrzyn, G. (2002): Invited paper. How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology. Institute of Oceanology PAS. 291 – 305.

Duraković, S., Duraković, L. (1998a): Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju. Durieux d.o.o., Zagreb, 1998.

Duraković, S., Duraković, L. (1998b): Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju. Durieux d.o.o., Zagreb, 1998.

Harvey, E.N. (1940): Living Light. Princeton University Press. 328 pp.

Herring, P. (2002): Marine microlights. The luminous marine bacteria. Microbiology today. vol. 29: 174 – 176.

Jabłoński, E., DeLuca, M. (1978): Studies of control of luminescence in *Beneckea harveyi*: properties of the NADH and NADPH:FMN oxidoreductases. Biochemistry. 672 – 678.

Madigan, M. J. Martinko (2005). Brock Biology of Microorganisms, 11th ed., Prentice Hall

Meighen, E. A. (1992): Bioluminescence, Bacterial. Encyclopedia of microbiology vol. 1: 309 – 319.

Nealson, K. H. (1994): Bacterial bioluminescence. Three decades of enlightenment. Naval Res Rev vol. 45: 191 – 216.

Porter, K., Y.S. Feig (1980): The use of DAPI for identifying and counting microfluore. Limnology and Oceanography vol. 25: 943 – 948.

Ripabelli, G., G. M.Grasso, M. L. Sammarco, I. Luzzi (1997): Procedure di isolamento e caratterizzazione di *Vibrio* spp. di importanza clinica. Istituto superiore di sanità. 29 – 38, 265 – 274.

Received / Prispjelo: 21.8.2006.

Accepted / Prihvaćeno: 28.10.2006. ■