

# KRMIVA<sup>®</sup>

## UTJECAJI TOVA TUNA NA OKOLIŠ U JADRANSKOM MORU

## ENVIRONMENTAL IMPACTS OF TUNA AQUACULTURE IN THE ADRIATIC SEA

**D. Kapetanović, Irena Vardić, D. Valić, Zlatica Teskeredžić, E. Teskeredžić**

Izvorni znanstveni članak  
Primljeno: 16. lipanj 2010.

### SAŽETAK

Razvoj akvakulture, pa tako i tova tuna, u posljednjim je desetljećima, povećao zanimanje javnosti za moguće utjecaje na okoliš. Istraživanja utjecaja uzgoja gospodarski važnih ribljih vrsta su brojna, ali ne i u pogledu procjena mikrobioloških utjecaja, a napose ne u kontekstu tova tuna.

Cilj ovog istraživanja bio je procijeniti utjecaj tova tuna (*Thunnus thynnus*) na okoliš na temelju praćenja mikrobioloških pokazatelja kakvoće morske vode na tovilištu tuna u srednjem Jadranu, te ostvarene rezultate usporediti s rezultatima istraživanja na tovilištu tuna u Mediteranu.

Kakvoća morske vode analizirana je na dva lokaliteta, pri čemu je jedan lokalitet bio na tovilištu tuna, a drugi na udaljenosti oko 500m od tovilišta i poslužio je kao tzv. kontrolna točka. Uzorkovanje je provedeno u dvije sezone (proljeće/jesen), u 2007. i 2008. godini. Tijekom ovog istraživanja, analizirani su osnovni fizikalno-kemijski (temperatura, salinitet, prozirnost) i mikrobiološki parametri (ukupan broj bakterija, *Vibrio*, ukupni koliformi, *Escherichia coli*, fekalni koliformi, enterokoki) kakvoća morske vode. Za mikrobiološku analizu uzorci morske vode serijski su razrijeđeni s PBS otopinom (Merck). Za određivanje ukupnog broja heterotrofnih bakterija, uporabljene su metodom širenja razmaza dvije podloge, Marine agar (BBL) i Trypticase soy agar (BBL) s dodatkom 1% NaCl-a (Kemika), te supstrat metoda s uporabom SimPlate testa (IDEXX), sve u duplikatu. Za određivanje broja ukupnih koliforma i *E. coli*, odnosno enterokoka uporabljene su supstrat testovi Colilert (IDEXX), odnosno Enterolert (IDEXX) u duplikatu.

Utvrđene vrijednosti broja heterotrofnih bakterija, koje ukazuju na utjecaje tovilišta u vidu eutrofikacije mora, ukupno su manje od vrijednosti utvrđenih u istraživanjima poduzetim na tovilištima tuna u Mediteranu. Broj *E. coli* i enterokoka nije značajno različit između tovilišta i kontrolne točke, ali su te vrijednosti veće u odnosu na dosadašnja istraživanja na sličnim tovilištima u Mediteranu.

Povećani broj enterokoka u uzorcima mora, i oko tovilišta, najvjerojatnija je indirektna posljedica nepravilne tehnologije hranidbe, koja privlači kolonije galebova. Ovi rezultati ukazuju da promjene kakvoće morske vode, a u svezi s tovom tuna, ovise o širem ekološkom kontekstu. Stoga, smještaj i procjenu utjecaja tova na okoliš valja razmatrati u sklopu šireg ekološkog konteksta područja.

**Ključne riječi:** *Thunnus thynnus*, heterotrofne bakterije, *Vibrio*, ukupni koliformi, fekalni koliformi, enterokoki, galebovi

Damir Kapetanović, Irena Vardić, Damir Valić, Zlatica Teskeredžić, Emin Teskeredžić, Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičkih organizama, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska.

## UVOD

Ubrzani razvoj uzgoja ribe donosi rizike od potencijalnih štetnih utjecaja na okoliš, širokog raspona od estetskih do izravnoga zagađenja (Read i Ferandes, 2003; Mautzavrakos i sur., 2007). Između potencijalnih negativnih utjecaja na okoliš prekomjerno unošenje hranjivih tvari je najozbiljnija ugroza (Kapetanović i sur., 2006 b). Glavni unos hranjivih tvari u većini uzgojnih sustava riba predstavlja riblja hrana, koja se djelomično pretvara u riblju biomasu, a djelomično otpušta u vodu kao suspendirana organska tvar ili otopljena tvar koja potječe iz izmeta, ekskreta i prekomjerne hranidbe. Ostala zagađivala su ostatci lijekova, koji se koriste za liječenje i prevenciju bolesti riba (Ervik i sur., 1997; Tovar i sur., 2000). Utjecaji uzgoja riba na okoliš istraživali su mnogi autori (Maldonado i sur., 2005; Vita i Marin, 2007; Kapetanović, 2009). Utjecaji se mogu biti umanjiti ili ukloniti prilagodbom odgovarajuće zaštite okoliša, uključujući propise, kontrolu i monitoring (Read i Ferandes, 2003). Praćenje mikrobiološke situacije u područjima koja su pod utjecajem uzgoja riba značajno je s aspekta procjene pojave bolesti u uzgajanih vrsta, te prevencije od potencijalne opasnosti po zdravlje ljudi, zbog prisutnosti patogenih mikroorganizama u okolnoj vodi (Crawford, 2003; Kapetanović i sur., 2005). Do sada su dobro istraženi utjecaji uzgoja riba na morski sediment, dok je stanje u samoj vodi manje poznato (La Rosa i sur., 2001; CIESM, 2007).

Unatoč brojnim studijama iz područja utjecaja tova tuna na okoliš (Maldonado i sur., 2005; Matijević i sur., 2008; Vidović i sur., 2009), jako je malo dostupnih informacija o utjecajima tova s obzirom na mikrobiološka svojstva morske vode (Vita i Marin, 2007; Vezzulli i sur., 2008). Istraživanjem broja heterotrofnih bakterija na tovilištu tuna u Mediteranu, utvrđeno je kako nema značajnijih razlika između lokaliteta s kavezima tuna i kontrolnih točaka. Tako su na istraživanim lokalitetima utvrđene srednje vrijednosti broja bakterija od  $2,5 \pm 1,3 \times 10^6$  CFU/mL na tovilištu, a na kontrolnoj točki  $3,0 \pm 2,1 \times 10^6$  CFU/mL. Najveći broj bakterija je utvrđen u kolovozu ( $3,9 \pm 1,8 \times 10^6$  CFU/mL), a najmanji u svibnju ( $1,7 \pm 0,5 \times 10^6$  CFU/mL) (Vezzulli i sur., 2008). Na tovilištu tuna utvrđen je mali broj indikatora fekalnog onečišćenja (Vezzulli i sur., 2008). Najveći broj indikatora fekalnog onečišćenja je utvrđen u kolovozu,

bez značajne razlike između tovilišta i kontrolne točke. Broj ukupnih koliforma na tovilištu u kolovozu je iznosio  $4,5 \pm 6,0$  CFU/100mL, a u svibnju  $0,5 \pm 0,6$  CFU/100mL, dok je njihov broj na kontrolnim točkama u kolovozu iznosio  $1,9 \pm 1,4$  CFU/100mL i u svibnju  $1,6 \pm 1,7$  CFU/100mL. Broj fekalnih koliforma na tovilištu u kolovozu iznosio je  $1,5 \pm 1,1$  CFU/100mL, na kontrolnoj točki  $2,2 \pm 2,0$  CFU/100mL, dok u svibnju fekalni koliformi nisu bili prisutni u uzorcima niti na tovilištu, niti na kontrolnoj točki. Utvrđeni broj *E. coli* na tovilištu u kolovozu je bio  $1,2 \pm 1,2$  CFU/100mL, a na kontrolnoj točki  $1,0 \pm 1,7$  CFU/100mL, dok u svibnju *E. coli* nije bila prisutna niti na jednom lokalitetu. Broj enterokoka u kolovozu na tovilištu je iznosio  $0,4 \pm 0,7$  CFU/100mL, a na kontrolnoj točki, kao i na oba lokaliteta u svibnju eneterokoki nisu bili prisutni (Vezzulli i sur., 2008). Prema dosadašnjim istraživanjima na tovilištima tuna (Vezzulli i sur., 2008), najveći broj *Vibrio* sp. je utvrđen u listopadu. U tom razdoblju broj vibrija je bio najveći na lokalitetima s kavezima ( $193 \pm 27$  CFU/100mL), a najmanje vrijednosti su bile na kontrolnim točkama ( $62 \pm 5$  CFU/100mL). Mikrobiološka analiza utvrdila je odsutnost indikatora fekalnog onečišćenja u uzorcima vode. Međutim, relativno veliki broj potencijalno patogenih bakterija (*Vibrio* sp. i *Aeromonas* sp.) utvrđen je na lokalitetima s kavezima, upućujući na usku vezu između koncentracija ovih bakterija i tova tuna (Vezzulli i sur., 2008).

Hrvatska je jedna od vodećih zemalja u tovu tuna u Mediteranu (Kapetanović i sur., 2006 a; Vita i Marin, 2007; Vezzulli i sur., 2008). Ta činjenica je potaknula ovo istraživanje, s ciljem određivanja utjecaja tova tuna u Jadranskom moru na mikrobiološka svojstva morske vode (ukupni koliformi, fekalni koliformi, *E. coli*, enterokoki i *Vibrio* sp.).

## MATERIJALI I METODE

Istraživanje je provedeno na tovilištu tuna u srednjem Jadranu, tijekom dva godišnja doba (proljeće i jesen) u dvije godine. Godišnja proizvodnja tovilišta je oko 300 T/god. Tune su hranjene s odmrznutom ribom iz Sjevernog mora (haringa, *Clupea harengus* i inćun, *Engraulis encrasicolus*), kao i svježom domaćom ribom (srdela, *Sardina pilchardus*; papalina, *Sprattus sprattus*; inćun, *Engraulis encrasicolus*).

Kakvoća morske vode analizirana je na dva lokaliteta, pri čemu je jedan lokalitet bio na tovilistu tuna, a drugi na udaljenosti oko 500m od tovilista i poslužio je kao tzv. kontrolna točka. Uzorci morske vode uzeti su s tri dubine: 0,5m ispod površine, 3m ispod površine i 0,5m od dna, s uporabom Niskinovog 5L crpca u sterilne, plastične boce (0,5L). Uzorci su u terenskim hladnjacima transportirani do laboratorija na analizu.

Sve mikrobiološke analize vode provedene su u duplikatu. Uzorci morske vode su prije analize serijski razrijeđeni uporabom sterilne otopine Phosphate Buffered Saline (PBS) (Merck) i inokulirani metodom širenja razmaza na Marine agaru (Difco-BD) (Zacccone i sur., 2002) i Tryptic soy agaru (DB-BBL) s dodatkom NaCl-a (MTSA) (Magariños i sur., 2001). Nakon inkubacije na 22°C tijekom tri do pet dana, izrasle kolonije su prebrojane i rezultati izraženi kao CFU/mL. Radi prebrojavanja što većeg broja bakterija, koje nisu uzgojive na umjetnim podlogama, za određivanje broja heterotrofnih bakterija korištena je i supstrat metoda SimPlate® (IDEXX), a rezultati su izraženi kao najvjerojatiji broj (NVB/mL).

Ukupni koliformi i *E. coli* određeni su uporabom Colilert supstrat testa (IDEXX). Enterokoki su određeni uporabom Enterolert-E supstrat testa (IDEXX). Dokazano je kako rezultati ovih metoda koreliraju s rezultatima tradicionalne metode membranske filtracije (Palmer i sur., 1993; Abbot i sur., 1998). Broj ukupnih koliforma, *E. coli* i enterokoka su utvrđeni uporabom Quantitray2000 (IDEXX), koji se sastoji od 97 bazenčića i izražava kao najvjerojatiji broj (NVB/100mL). Na temelju broja *E. coli* opreznim izračunom je određen i broj fekalnih koliforma (Surfrider Foundation, 2003) s formulom: (*E. coli* NVB) x (1.25) = Fekalni koliformi NVB.

*Vibrio* je određivan uporabom metode širenja razmaza na Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose (Difco-BD) – TCBS podloga (Moriarty, 1998) i rezultat je izražen kao CFU/mL. Za identifikaciju izoliranih bakterija upotrijebljena je metoda PCR, kojom su umnoženi dijelovi gena 16S rDNA i podjedinice B DNA giraze (*gyrB*). Ukupna DNA bakterija je izdvojena kompletno DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) prema protokolu proizvođača. U reakciji PCR korišteno je 5 µL DNA u smjesi koja je sadržala: 1x PCR pufer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP,

40 pmol početnica, 1 U Platinum Taq DNA polimeraze (Invitrogen) i sterilnu vodu – DNase, RNase none detected (Sigma) u ukupnom volumenu 50 µl. Upotrijebljene su univerzalne početnice: UL500 5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA - 3' i ULR500 5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3' za umnažanje dijela gena 16S rDNA, te GYR1 5'-CAYGCNNGGNGNAARTTYGA-3' i GYR1R 5'-CCRTCACRTCNGCRTCNGT-3' za umnažanje dijela gena *gyrB* (Avaniss-Aghajani i sur., 1996; Izumi i sur., 2007). Produkti reakcije PCR su pročišćeni i klonirani kompletno TOPO-TA cloning Kit (Invitrogen), nakon čega su određeni sljedovi nukleotida na uređaju ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (DNA Servis, Institut Ruđer Bošković, Hrvatska). Dobiveni sljedovi nukleotida su uspoređeni s postojećim u banci podataka GenBank upotrebom programa Blast (Altschul i sur., 1997).

Statistička obrada rezultata provedena je uporabom statističkih programa SigmaStat 1.0 i Statistica for Windows version 8.0.

## REZULTATI

Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara analiziranih uzoraka tijekom ovog istraživanja zadovoljavaju potrebe u uzgoju, uz očitovanje sezonskih razlika na istraživanim lokalitetima.

Analiza uzoraka morske vode s dva lokaliteta, na tovilistu tuna i na udaljenosti oko 500m od tovilista, pokazala je najveći broj heterotrofnih bakterija utvrđen supstrat metodom. Srednje vrijednosti i standardne devijacije utvrđenih mikrobioloških pokazatelja prikazane su na tablici 1.

Najveće srednje vrijednosti broja heterotrofnih bakterija utvrđene su uporabom SimPlate testa u površinskom sloju na tovilistu (41225±1358,74 NVB/mL) i na kontrolnoj točki (38602,5±22268,76 NVB/mL). Najveći broj bakterija (68050±8131,728 NVB/mL) utvrđen je u lipnju 2008. uporabom SimPlate testa u pridnenom sloju na tovilistu, kao i u listopadu 2008. istim testom u pridnenom sloju na kontrolnoj točki. Najmanji broj heterotrofnih bakterija utvrđen je uporabom MTSA podloge u površinskom sloju kontrolne točke (1450±353,5534 NVB/mL).

**Tablica 1. Rezultati (srednja vrijednost ± standardna devijacija) mikrobiološke analize morske vode (heterotrofni bakterija, *Vibrio*, ukupnih kolidforma, *E. coli* i enterokoka) za 2007.-2008.**

**Table 1. Results (mean ± standard deviation) of microbiological seawater analysis (heterotrophic bacteria, *Vibrio*, total coliforms, *E. coli* and enterococci) for 2007 and 2008**

Date	Lokaliteti uzorkovanja Sampling site	Marin (CFU/mL)	MTSA (CFU/mL)	SimPlate (NVB/mL)	<i>Vibrio</i> (CFU/mL)	Ukupni kolidformi Total coliforms (NVB/100mL)	<i>E. coli</i> (NVB/100mL)	Fekalni kolidformi Faecal coliforms (NVB/100mL)	Enterolept (NVB/100mL)
Lipanj, 2007. June 2007.	Kontrola površina Control area	5500±565,68	1450±353,55	5310±339,41	125±49,50	3385,5±3297,66	161,7±55,72	202,125±69,65	< 10,0±0
	Kontrola 3 m Control at 3m	2200±424,26	1550±353,55	2160±98,99	0	13386,6±9158,87	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
	Kontrola dno Control at sea bottom	5650±1626,34	5450±636,40	1720±622,25	5±7,07	9372,35±330,57	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
	Tovilište površina Feeding area	45000±4242,64	45500±6363,96	30500±3535,53	700±141,42	1682,5±447,60	157,95±209,30	197,4375±261,625	< 10,0±0
	Tovilište 3 m Feeding area at 3m	34000±2828,43	22300±1697,06	18000±4242,64	207,5±38,89	9884,5±4524,78	531±465,28	663,75±581,6	< 10,0±0
	Tovilište dno Feeding area at sea bottom	16650±9545,94	10350±1060,66	10000±2828,43	20±14,14	3148,7±3944,95	46,9±23,05	58,625±28,8125	< 10,0±0
	Kontrola površina Control area	29000±1414,21	12000±1414,21	44700±15273,51	5±7,07	9339,45±11298,79	1410,8±439,54	1763,5±549,425	< 10,0±0
	Kontrola 3 m Control at 3m	19500±3535,53	7000±2828,43	33900±0	10±0	7381,05±9553,08	600,8±35,64	751±44,55	< 10,0±0
	Kontrola dno Control at sea bottom	38000±1414,21	24500±2121,32	39300±2969,85	10±0	1411,6±300,66	908,7±72,55	1135,875±90,6875	< 10,0±0
	Tovilište površina Feeding area	14000±2828,43	13500±707,11	32800±15839,19	50±56,57	106,65±136,75	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
Studeni, 2007. November 2007.	Tovilište 3 m Feeding area at 3m	8500±707,11	7500±707,11	31850±13505,74	45±7,07	36,6±37,62	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
	Tovilište dno Feeding area at sea bottom	6500±707,11	5500±2121,32	34850±12940,05	15±7,07	15,05±7,28	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
	Kontrola površina Control area	23500±4949,75	5000±1414,21	45500±2121,32	279±21,21	22029,3±3063,75	706,55±94,54	883,1875±118,175	< 10,0±0
	Kontrola 3 m Control at 3m	3500±707,11	2500±2121,32	44200±3959,80	8,5±4,95	9645,25±4739,38	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
	Kontrola dno Control at sea bottom	2450±2192,03	1500±707,11	44950±8131,73	8±1,41	610,45±19,59	15,05±7,14	18,8125±8,925	< 10,0±0
	Tovilište površina Feeding area	18000±5656,85	8500±2121,32	51850±14778,53	10±0	1919,65±178,54	9,95±0,07	12,4375±0,0875	< 10,0±0
	Tovilište 3 m Feeding area at 3m	4500±2121,32	3500±707,11	48450±9970,20	10,5±0,71	17153,65±9958,96	< 10,0±0	< 12,5±0	10±0
	Tovilište dno Feeding area at sea bottom	10500±3535,53	10000±5656,85	68050±8131,73	127±19,80	10111,6±0	< 10,0±0	< 12,5±0	< 10,0±0
	Kontrola površina Control area	19000±7071,07	1500±707,11	58900±4808,33	14±5,66	7485,45±304,83	14,65±7,85	18,3125±9,8125	9,9±0
	Kontrola 3 m Control at 3m	26000±4242,64	8500±2121,32	60400±18950,46	28,5±16,26	352,55±35,14	30,75±14,92	38,4375±18,65	1214,75±1703,92
Listopad, 2008. October 2008.	Kontrola dno Control at sea bottom	41000±1414,21	5500±2121,32	68050±8131,73	200±165,46	16430,05±1271,16	15,05±7,14	18,8125±8,925	654,8±912,03
	Tovilište površina Feeding area	19500±4949,75	5000±2828,43	49750±8131,73	10,5±0,71	219,15±13,50	< 10,0±0	< 12,5±0	214,3±213,69
	Tovilište 3 m Feeding area at 3m	10000±4242,64	3000±0	46050±6576,09	3,5±4,95	329,95±68,80	9,1±0	11,375±0	57,45±67,24
	Tovilište dno Feeding area at sea bottom	20500±3535,53	9000±2828,43	42400±6505,38	20,5±0,71	872,7±53,88	14,6±7,78	18,25±9,725	61,1±72,27

Najveći broj *Vibrio* sp. utvrđen je u lipnju 2007. na tovilištu u površinskom sloju ( $700 \pm 141,42$  CFU/mL), a najmanji broj, odnosno odsutnost *Vibrio* sp. na kontrolnoj točki i dubini od 3m. Određivanje nukleotidnih sljedova gena 16S rDNA dužine 500 pb potvrdilo je da su izolirane bakterije pripadnice roda *Vibrio*, ali zbog evolucijske očuvanosti ove regije u jedinkama unutar istog roda nije bilo moguće odrediti o kojoj se vrsti radi. Analizom nukleotidnih sljedova gena gyrB (600 pb) izolirane bakterije su identificirane kao sojevi vrste *V. alginolyticus*. Postotak sličnosti između hrvatskih i izolata *V. alginolyticus* iz banke podataka GenBank na temelju sljedova nukleotida gena gyrB iznosio je od 92,8 do 100%.

Najveći broj ukupnih koliforma utvrđen je u lipnju 2008. na tovilištu na 3m dubine ( $17153,65 \pm 9958,963$  NVB/100mL) i površinskom sloju kontrolne točke ( $22029,8 \pm 3063,752$  NVB/100mL). Najmanji broj ukupnih koliforma utvrđen na tovilištu bio je u pridnenom sloju u studenom 2007. ( $15,05 \pm 7,2832$  NVB/100mL), odnosno na kontrolnoj točki i dubini od 3m u listopadu 2008. ( $352,55 \pm 35,14321$  NVB/100mL).

Vrijednosti broja *E. coli* u studenom 2007. na sve tri dubine uzorkovanja na tovilištu bile su jednake ( $<10,0 \pm 0$  NVB/100mL), a u isto vrijeme je na kontrolnoj točki u površinskom sloju utvrđen najveći broj ( $1410,8 \pm 439,5376$  NVB/100mL). Najveći broj *E. coli* na tovilištu u proljetnom razdoblju (lipanj 2007.) bio je  $531 \pm 465,2763$  NVB/100mL.

Broj fekalnih koliforma u ovom istraživanju određen je na temelju utvrđenog broja *E. coli* (Surfrider Foundation, 2003), te najveći i najmanji broj fekalnih koliforma prati prije navedene vrijednosti *E. coli*.

U tijeku prva tri uzorkovanja, analiza broja enterokoka u uzorcima morske vode provedena je s početnim razrjeđenjem 1:10 za otvorene vode (Surfrider Foundation, 2003). Međutim, u želji da se utvrde što točnije vrijednosti broja enterokoka, tijekom uzorkovanja u listopadu 2008. uzorci morske vode analizirani su bez i s razrjeđenjem, te su utvrđene konkretne vrijednosti enterokoka. Najveći broj enterokoka na kontrolnoj točki bio je na 3m dubine ( $1214,75 \pm 1703,92$  NVB/100mL), odnosno na tovilištu u površinskom sloju ( $214,3 \pm 213,69$  NVB/100mL). Vrijednosti broja enterokoka utvrđene u sva četiri uzorkovanja, a osobito u listopadu 2008. bile su veće od vrijednosti utvrđenih u sličnom istraživanju (Vezzulli i sur., 2008). Kako bi se utvrdilo porijeklo onečišćenja, koje se očitivalo povećanjem parametara fekalnog onečišćenja, određen je omjer broja fekalnih koliforma i enterokoka. Omjer broja fekalnih koliforma i enterokoka tijekom uzorkovanja u listopadu 2008. prikazan je na tablici 2. Iz utvrđenoga omjera fekalnih koliforma i enterokoka, koji je maksimalno 1,8, za pretpostaviti je da se radi o fekalnom onečišćenju animalnog porijekla od galebova, što je povezano s nepravilnom hranidbom. Svaki odnos koji je veći od četiri upućuje na ljudsko onečišćenje, dok odnos manji od dva upućuje na životinjsko onečišćenje (Ashbolt i sur., 2001).

**Tablica 2. Odnos broja fekalnih koliforma (NVB/100mL) i broja enterokoka (NVB/100mL) utvrđenih u listopadu 2008. godine**

**Table 2. Relation between number of faecal coliforms /NVB/100ml) and number of enterococci (NVB/100ml) determined in October 2008**

	<i>E. coli</i>	Fekalni koliformi Faecal coliforms (F.K.)	Enterokoki Enterococci (E)	Omjer Ratio F.K.:E
Kontrola površina - Control area	$14,65 \pm 7,85$	$18,31 \pm 9,81$	$9,9 \pm 0$	1,8
Kontrola 3 m - Control at 3m	$30,75 \pm 14,92$	$38,44 \pm 18,65$	$1214,75 \pm 1703,92$	0,03
Kontrola dno - Control at sea bottom	$15,05 \pm 7,14$	$18,81 \pm 8,93$	$654,8 \pm 912,03$	0,03
Tovilište površina - Feeding area	$9,9 \pm 0$	$12,4 \pm 0$	$214,3 \pm 213,69$	0,06
Tovilište 3 m - Feeding area at 3m	$9,1 \pm 0$	$11,38 \pm 0$	$57,45 \pm 67,24$	0,2
Tovilište dno - Feeding area at sea bottom	$14,6 \pm 7,78$	$18,25 \pm 9,73$	$61,1 \pm 72,27$	0,3

Statističkom analizom, Kruskal-Wallis testom s *post-hoc* Dunnovim testom, uspoređena su bakteriološka svojstva morske vode između tovilišta i kontrolne točke, kao i po različitim dubinama stupca morske vode (površina, 3m, dno), pri čemu su zanemarena razdoblja uzorkovanja. Utvrđeno je kako statistički značajna razlika između tovilišta i kontrolne točke postoji u broju ukupnih koliforma i *E. coli* ( $p < 0,05$ ), pri čemu su vrijednosti veće na kontrolnoj točki.

Statistički značajna razlika između tri dubine stupca morske vode, na tovilištu i kontrolnoj točki na temelju medijana vrijednosti broja heterotrofnih bakterija pri temperaturi inkubacije od 22 °C (primjenom Marine i MTSA agara, te SimPlate testa), *Vibrio* sp., ukupnih koliforma, *Escherichia coli* i enterokoka, utvrđena je samo u pogledu razlika broja *E. coli* u površinskom sloju kontrolne točke ( $p < 0,05$ ).

Kako bi se sagledale sezonske razlike između bakterioloških svojstava morske vode na tovilištu tuna, uporabljen je Mann-Whitney test za statističku analizu svih ispitivanih mikrobioloških parametara morske vode u četiri uzorkovanja tijekom dvije godine istraživanja ( $p < 0,05$ ). U 2007. godini razlika između dvije sezone je u broju heterotrofnih bakterija utvrđenih na Marine i MTSA agaru, te sa SimPlate testom na kontrolnoj točki (studen, 2007.), kao i u broju heterotrofnih bakterija utvrđenom na Marine i MTSA agaru u tovilištu (lipanj, 2007.). Statistički značajna razlika je i u broju ukupnih koliforma na kontrolnoj točki (lipanj, 2007.), a na tovilištu u broju *Vibrio* sp. (lipanj, 2007.) i *E. coli* (studen, 2007.).

Razlika između sezona u 2008. godini je u broju heterotrofnih bakterija na Marine agaru i SimPlate testu na kontrolnoj točki (listopad, 2008.), kao i u broju ukupnih koliforma (lipanj, 2008.) i enterokoka (listopad, 2008.) na tovilištu.

U obje godine uzorkovanja (2007. i 2008.) statistički značajna razlika je između sezona uzorkovanja u broju heterotrofnih bakterija utvrđenom uporabom Marine agara i SimPlate testa na kontrolnoj točki, pri čemu je veći broj utvrđen u jesen u odnosu na proljeće.

## RASPRAVA

Bakteriološka svojstva morske vode na tovilištu tuna u Jadranu, istraživana su određivanjem broja

heterotrofnih bakterija i *Vibrio* spp., kao i bakterija indikatora fekalnog zagađenja: ukupni koliformi, *E. coli* i enterokoki. Riječ je o bakteriološkim indikatorima koji se koriste za procjenu bakterioloških svojstava morske vode na uzgajalištima riba (Ampofo i Clerk, 2003; Vezzulli i sur., 2008).

U odnosu na dosadašnje rezultate istraživanja kod tuna (Vezzulli i sur., 2008), broj heterotrofnih bakterija je u ovome istraživanju bio znatno manji. Tako je najveća srednja vrijednost broja heterotrofnih bakterija na tovilištu utvrđena uporabom SimPlate testa u površinskom sloju i iznosila je  $4,1 \pm 1,1 \times 10^4$  CFU/mL, dok je na kontrolnoj točki, također u površinskom sloju, iznosila  $3,9 \pm 0,6 \times 10^4$  CFU/mL. Navedene vrijednosti ovog istraživanja su višestruko manje u odnosu na vrijednosti koje su zabilježene u istraživanjima u Mediteranu na tovilištu ( $2,5 \pm 1,3 \times 10^6$  CFU/mL), odnosno na kontrolnoj točki ( $3,0 \pm 2,1 \times 10^6$  CFU/mL). U našem istraživanju najveća vrijednost broja heterotrofnih bakterija ( $4,6 \pm 0,09 \times 10^4$  CFU/mL), kao i najmanja ( $1,2 \pm 0,82 \times 10^3$  CFU/mL) utvrđena je u studenom, dok su na Mediteranu najveće vrijednosti utvrđene u kolovozu, a najmanje u svibnju (Vezzulli i sur., 2008).

Za razliku od broja heterotrofnih bakterija, vrijednosti ostalih mjenjenih bakterioloških parametara su veće od onih koje su utvrđene na tovilištu u Mediteranu. Povećanje broja *Vibrio* spp. u vodi na tovilištu, dovodi se u vezu s tovom tuna (Vezzulli i sur., 2008), kao posljedica obogaćivanja organskom tvari (Arulampalam i sur., 1998). Međutim, u dosadašnjim studijama nije utvrđena prisutnost povećanog broja bakterijskih parametara koji upućuju na fekalno zagađenje, odnosno veći broj tih indikatora nije se dovodio u vezu s tovom tuna (Vezzulli i sur., 2008). Razlog povećanom broju ukupnih koliforma i *E. coli* na tovilištu tuna u Jadranu nije moguće sa sigurnošću dokazati na temelju do sada provedenog istraživanja, ali se iz utvrđenog omjera fekalnih koliforma i enterokoka pretpostavlja da je riječ o onečišćenju animalnog porijekla (galebovi). Poznati su utjecaji populacija galebova na fekalno onečišćenje vode (Nelson i sur., 2008).

## ZAKLJUČCI

Vrijednosti fizikalno-kemijskih parametara analiziranih uzoraka tijekom ovog istraživanja zadovo-

ljavaju potrebe u tovu tune, uz očitovanje sezonskih razlika u svim parametrima fizikalno-kemijske kakvoće vode na istraživanim lokalitetima.

Istraživanja mikrobioloških svojstava morske vode pokazala su da je statistički značajno veći broj heterotrofnih bakterija utvrđen uporabom SimPlate testa u odnosu na broj heterotrofnih bakterija utvrđen uporabom Marine i MTSA agara.

Usporedbom rezultata istraživanja specifičnih bakterijskih indikatora u moru na tovilištu tuna s literaturno dostupnim podacima, uočene su veće vrijednosti fekalnih indikatora. Takvo povećanje vrijednosti fekalnih indikatora najvjerojatnije je u svezi s tehnologijom hranidbe na tovilištu. Nekontrolirana hranidba tuna sa svježom i odmrznutom ribom privlači kolonije galebova, koji utječu na mikrobiološku kakvoću morske vode na i oko tovilišta.

## LITERATURA

- Abbott, S., Caughley, B., Scott, G. (1998): Evaluation of Enterolert® for the enumeration of enterococci in the marine environment. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32, 505-513.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped Blast and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research*, 25, 17, 3389-3402.
- Ampofo, A. J., Clerk, G. C. (2003): Diversity of bacteria in sewage treatment plant used as fish culture pond in southern Ghana. *Aquaculture Research*, 34, 667-675.
- Arulampalam, P., Yusoff, M. F., Shariff, M., Law, A. T., Srinivasu Rao, P.S. (1998): Water quality and bacterial populations in a tropical marine cage culture farm. *Aquaculture Research*, 29, 617-624.
- Ashbolt, N. J., Grabow, W. O. K., Snozzi, M. (2001): Indicators of microbial water quality in Water quality: Guidelines, Standards and Health. Edited by Lorna Fewtrell and Jamie Bartram. World Health Organization (WHO), Published by IWA Publishing, London. 290-316.
- Avaniss-Aghajani, E., Jones, K., Holtzman, A., Aronson, T., Glover, N., Boian, M., Froman, S., Brunk, C. F. (1996): Molecular technique for rapid identification of mycobacteria, *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1, 98-102.
- CIESM (2007): Impact of mariculture on coastal ecosystems. Ciesm Workshop Monographs n°32, Monaco [www.ciesm.org/online/monographs/lisboa07.pdf](http://www.ciesm.org/online/monographs/lisboa07.pdf)
- Crawford, C. M. (2003): Qualitative risk assessment of the effects of shellfish farming on the environment in Tasmania, Australia. *Ocean & Coastal Management*, 46, 47-58.
- Ervik, A., Hausen, P.-K., Aure, J., Stigebrandt, A., Johannessen, P., Jahnsen, T. (1997): Regulating the local environmental impact of intensive marine fish farming I. The concept of the MOM system (Modelling-Ongrowing fish farms-Monitoring). *Aquaculture*, 158, 85-94.
- Izumi, S., Ouchi, S., Kuge, T., Arai, H., Mito, T., Fujii, H., Aranishi, F., Shimizu, A. (2007): PCR-RFLP genotypes associated with quinolone resistance in isolates of *Flavobacterium psychrophilum*, *Journal of Fish Disease*, 30, 141-147.
- 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., Kurtović, B., Vardić, I., Valić, D., Zeskeredžić, Z., Teskeredžić, E. (2006 a): Preliminary studies on bacterial diversity of cultured tuna *Thunnus thynnus* from the Adriatic Sea. *Aquaculture Research*, 37, 1265-1266.
- Kapetanović, D., Tomec, M., Teskeredžić, E., Teskeredžić, Z. (2006 b): Utjecaj salmonidnog uzgajališta na kakvoću vode. *Krmiva*, 48, 243-250.
- Kapetanović, D. (2009): Bakterije riba i bakteriološka svojstva vode u jadranskim uzgajalištima. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet Zagreb, 136 pp.
- La Rosa, T., Mirto, S., Mazzola, A., Danovaro, R. (2001): Differential responses of benthic microbes and meiofauna to fish-farm disturbance in coastal sediments. *Environmental Pollution*, 112, 3, 427-434.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A. E., Lamas, J. (2001): Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 195, 17-21.
- 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? *Helgolander Marine Research*, 59, 121-135.
- Matijević, S., Kušpilić, G., Kljaković-Gašpić, Z., Bogner, D. (2008): Impact of fish farming on the distribution of phosphorus in sediments in the middle Adriatic area. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 535- 548.

19. Mautzavrakos, E., Kornaros, M., Lyberatos, G., Kaspiris, P. (2007): Impacts of marine fish farm in Argolikos Gulf (Greece) on the water column and sediment. *Desalination*, 210, 110-124.
20. Moriarty, D.J.W. (1998): Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 1-4, 351-358.
21. Nelson, M., Jones, S. H., Edwards, C., Ellis, J. C. (2008): Characterization of *Escherichia coli* populations from gulls, landfill trash, and wastewater using ribotyping. *Diseases of Aquatic Organisms*, 81, 53-63.
22. Palmer, C. J., Tsai, Y-L., Lang, A. L., Sangermano, L.R. (1993): Evaluation of Colilert-Marine Water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 786-790.
23. Read, P., Fernandes, T. (2003): Menagement of environmental impacts of marine aquaculture in Europe. *Aquaculture*, 226, 139-163.
24. Surfrider Fundation (2003): Blue water task force – Coastal water quality monitoring manual. Version 1.4., 42 pp.
25. Tovar, A., Morieno, C., Manuel-Vez, M. P., García-Vargas, M. (2000): Environmental impacts of intensive aquaculture in marine waters. *Water Research*, 34, 1, 334-342.
26. Vezzulli, L., Moreno, M., Marin, V., Pezzati, E., Bartoli, M., Fabiano, M. (2008): Organic waste impact of capture-based Atlantic bluefin tuna aquaculture at an exposed site in the Mediterranean Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78, 369-384.
27. Vidović, J., Čosović, V., Juračić, M., Petricoli, D. (2009): Impact of fish farming on foraminiferal community, Drvenik Veliki Island, Adriatic Sea, Croatia. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1297- 1309.
28. Vita, R., Marin, A. (2007): Environmental impact of capture-based bluefin tuna aquaculture on benthic communities in the western Mediterranean. *Aquaculture Research*, 38, 331-339.
29. Zaccone, R., Caruso, G., Cali, C. (2002): Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. *Marine Environmental Research*, 54, 1-19.

## SUMMARY

Aquaculture including tuna fattening, increased public interests in the possible impact on the environment in recent decades. Influences of cultivation of economically important fish species are numerous, but not in regard to assessment of microbial influences, particularly in the context of tuna.

The aim of this study was to assess the effects of tuna fattening (*Thunnus thynnus*) in the sense of the environmental monitoring of microbial indicators of seawater quality at tuna farm in the central Adriatic, and to compare the achieved results with the results of research on a tuna farm in the Mediterranean.

The quality of sea water was analyzed at two sites; one site was at the tuna farm, and the other at a distance of about 500m from the farm, the control point. Sampling was conducted in two seasons (spring / autumn), in 2007 and 2008. During this study, the basic physico-chemical (temperature, salinity, transparency) and microbiological parameters of seawater quality (total number of bacteria, *Vibrio*, total coliforms, *Escherichia coli*, faecal coliforms, enterococci) were analyzed. For microbiological analysis of seawater; samples were serially diluted with PBS solution (Merck). To determine the total number of heterotrophic bacteria, spread plate method was used on Marine agar (BBL) and Trypticase soy agar (BBL) supplemented with 1% NaCl-a (Kemika), as well as substrate method using SimPlate test (IDEXX), all in duplicate. To determinate total coliforms and *E. coli*, and enterococci substrate tests Colilert (IDEXX) and Enterolert (IDEXX) were used in duplicate.



Number of heterotrophic bacteria, which indicate the effects of the farm on the eutrophication, was less than the number determined in similar study in the Mediterranean. Number of *E. coli* and enterococci were not significantly different between farm and control point, but these values are higher than those from research in the Mediterranean.

Increased numbers of enterococci, on the farm and control point, were indirect consequence of improper nutrition technology, which attracted a colony of seagulls. These results suggest that changes in seawater quality in relation to tuna fattening, depend on the broader ecological context. Therefore, location and environmental impact of tuna fattening on the environment must be considered within the broader context of ecological areas.

Keywords: *Thunnus thynnus*, heterotrophic bacteria, *Vibrio*, total coliforms, faecal coliforms, enterococci, seagulls