

Dinamika i raznolikost bakterijske zajednice *Vibrio* u akvakulturi školjkaša s naglaskom na antibiotsku rezistenciju

Orlić K.¹, Kazazić S.¹, Kapetanović D.¹, Vardić-Smrzlić I.¹, Kolda A.¹, Bolotin J.², Kožul V.², Buha T.³, Nerlović V.⁴, Bobanović-Čolić S.², Perić L.¹

¹Institut Ruđer Bošković, Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb, Hrvatska, korlic@irb.hr

²Institut za more i priobalje, Sveučilište u Dubrovniku, Hrvatska

³Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, Porto, Portugal; Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska

⁴Sveučilišni odjel za studija mora, Sveučilište u Splitu, Hrvatska



29. - 31. 3. 2023.
Hotel Lav, Vukovar

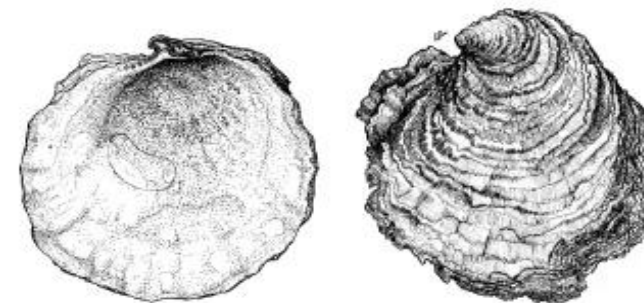
14. Međunarodna
konferencija o akvakulturi

Akvakultura školjkaša u Hrvatskoj

- Uzgoj školjkaša se odvija u prirodnoj sredini
- Utjecaj okolišnih čimbenika
- Filtracija – akumulacija različitih čestica i mikroorganizama



Mytilus galloprovincialis (Lamarck, 1819)
mediteranska dagnja



Ostrea edulis (Linneaus, 1758)
europska plosnata kamenica

Vibrio bakterije

- Sveprisutne u vodenim okolišima
- Poznati uzročnici bolesti kod ljudi i životinja - vibrioza
- Poznato oko 100 vrsta
- Grupiraju su u **filogrupe** ovisno o genetičkoj sličnosti (npr. *Harveyi*, *Splendidus*, *Orientalis*)

- Patogeni školjkaša:

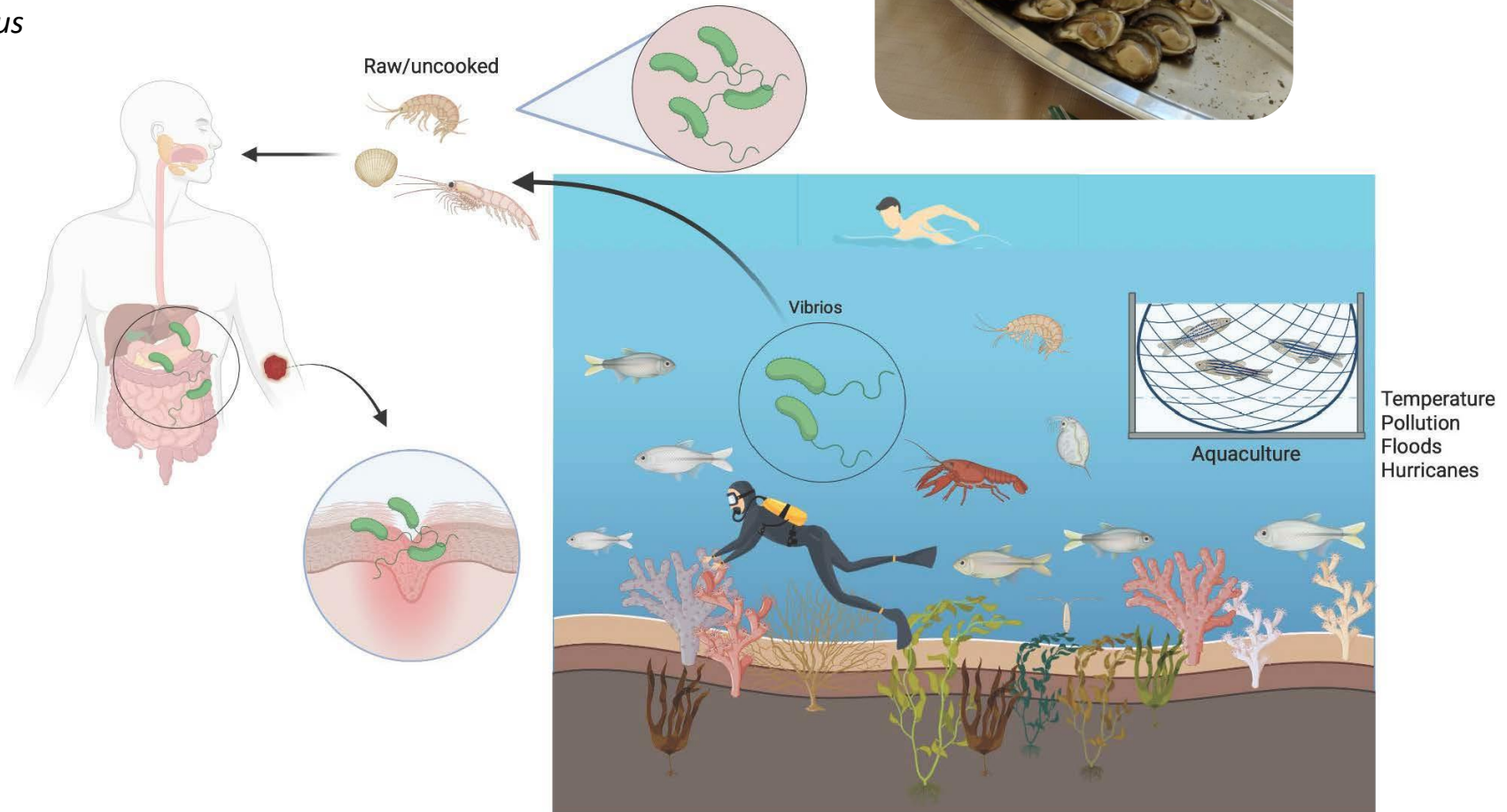
- *V. alginolyticus*
- *V. splendidus*
- *V. tasmaniensis*
- *V. neptunis*
- *V. ostreicida*
- *V. tubiashii*
- *V. aestuarianus*
- *V. pectenecida*

Uzročnici vibrioza
i masovnih mortaliteta školjkaša



- “Big four” – ljudski patogeni:

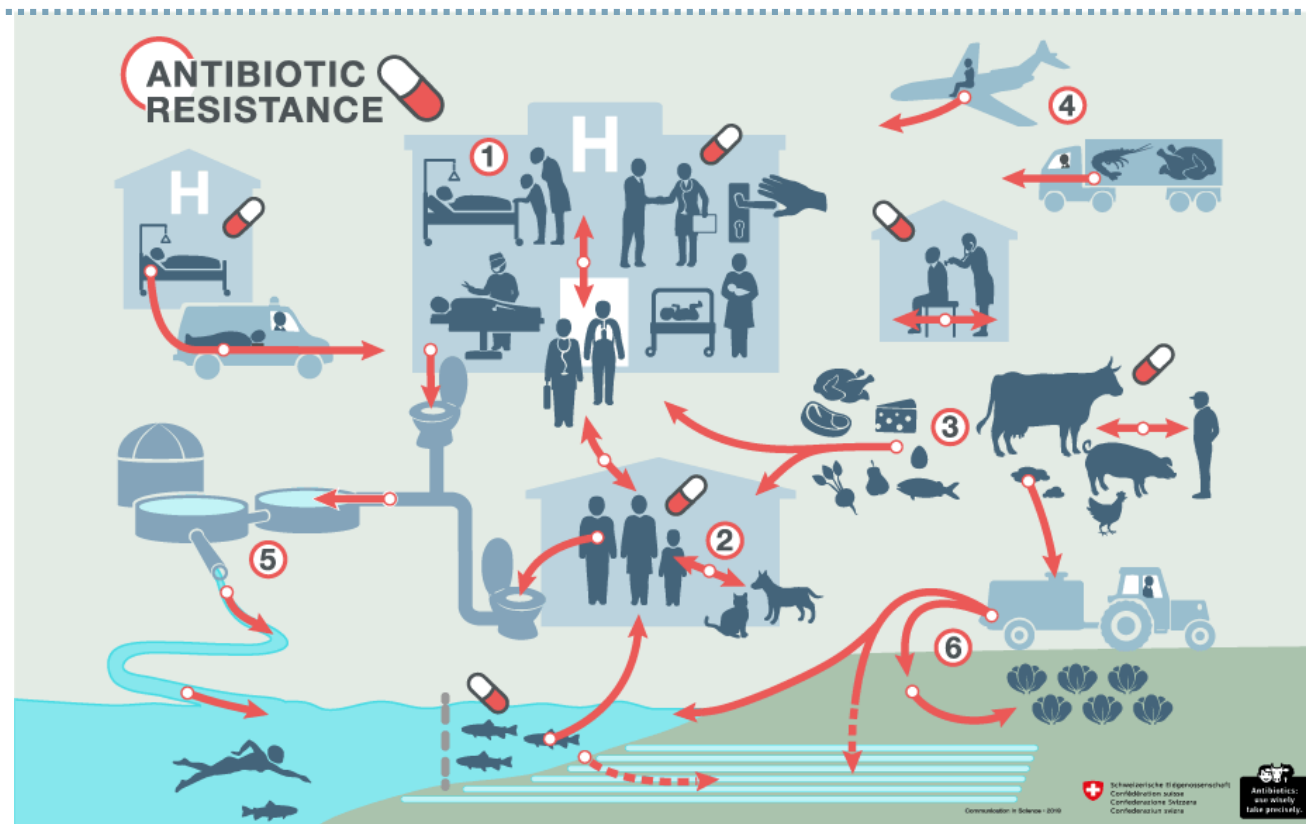
1. *V. alginolyticus*
2. *V. parahaemolyticus*
3. *V. cholerae*
4. *V. vulnificus*



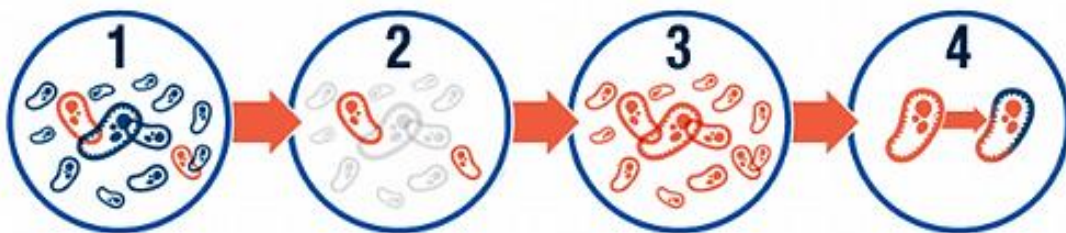
Antibiotska rezistencija

Antibiotska rezistencija - otpornost bakterija na antibiotike

- predstavlja ozbiljnu prijetnju javnom zdravlju i preuzima sve veću važnost u svijetu



Kako nastaje antibiotska rezistencija?

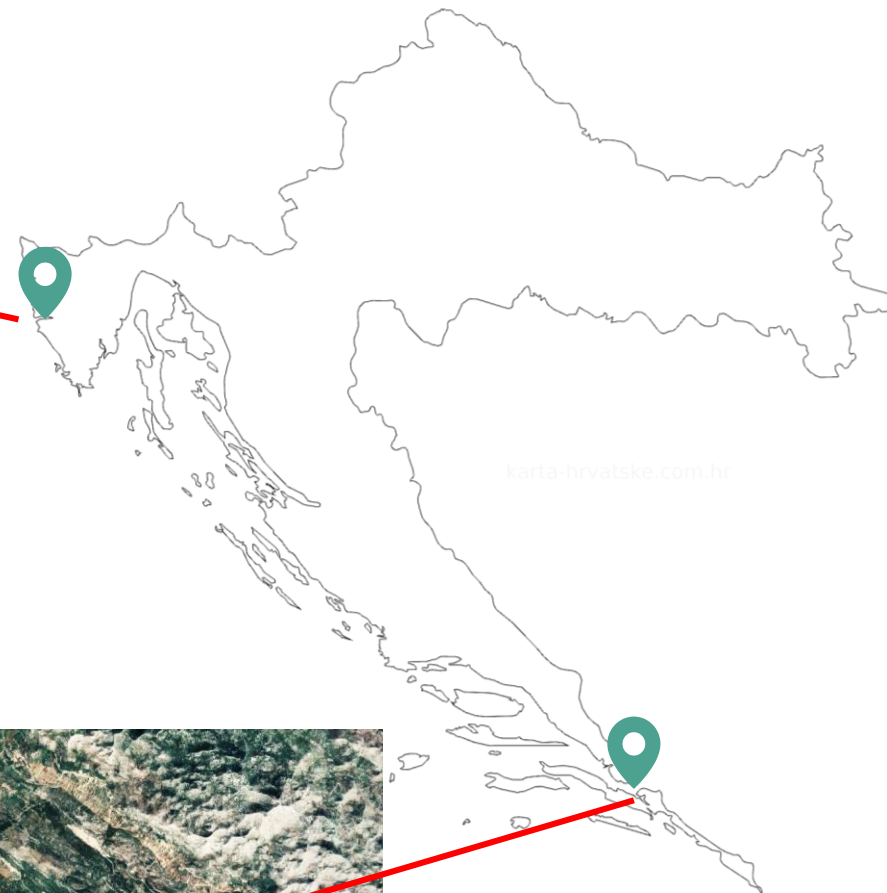
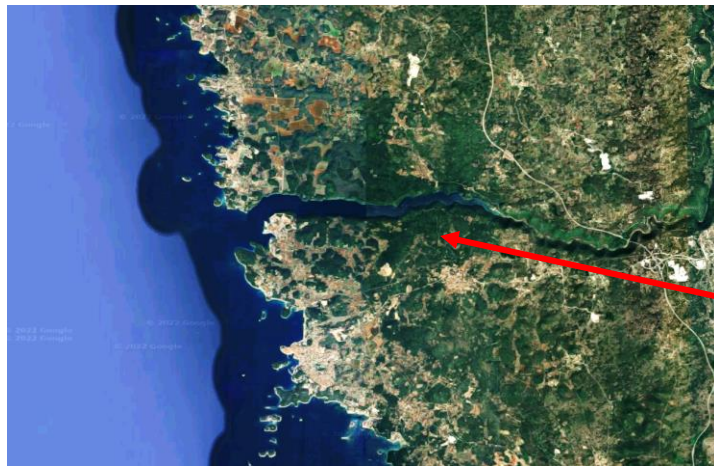


1
Veliki broj bakterija.
Nekoliko njih su rezistentne
na antibiotike.

2
Antibiotici ubijaju bakterije
uzročnike bolesti jednako
kao i dobre bakterije koje
štite organizam od infekcija.

3
Rezistentne bakterije sada
preferiraju da rastu i
preuzmu ih.

4
Bakterija može prenijeti
njenu rezistenciju na druge
bakterije, prozrokujući više
problema.



Limski zaljev

Malostonski zaljev



- Zaštićeni morski rezervati

Ciljevi istraživanja

1

Odrediti fizikalno-kemijske i mikrobiološke parametre morske vode

2

Odrediti ukupan broj bakterija i ukupan broj *Vibrio* bakterija

3

Analizirati uzgojenu mikrobnu zajednicu roda *Vibrio*

4

Odrediti koji okolišni čimbenici imaju najveći utjecaj na *Vibrio* zajednicu

5

Odrediti antibiotsku rezistenciju za bakterije roda *Vibrio*



MORSKA VODA

SEDIMENT

TKIVO ŠKOLJKAŠA

**Selektivne i
ne-selektivne podloge**
(Marine agar i TCBS)

FIZIKALNO-KEMIJSKI PARAMETRI (temperatura, salinitet, zasićenost
kisikom, nitriti, nitrati, fosfor, dušik, dubina, klorofil a...)

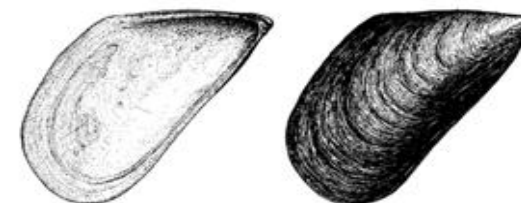
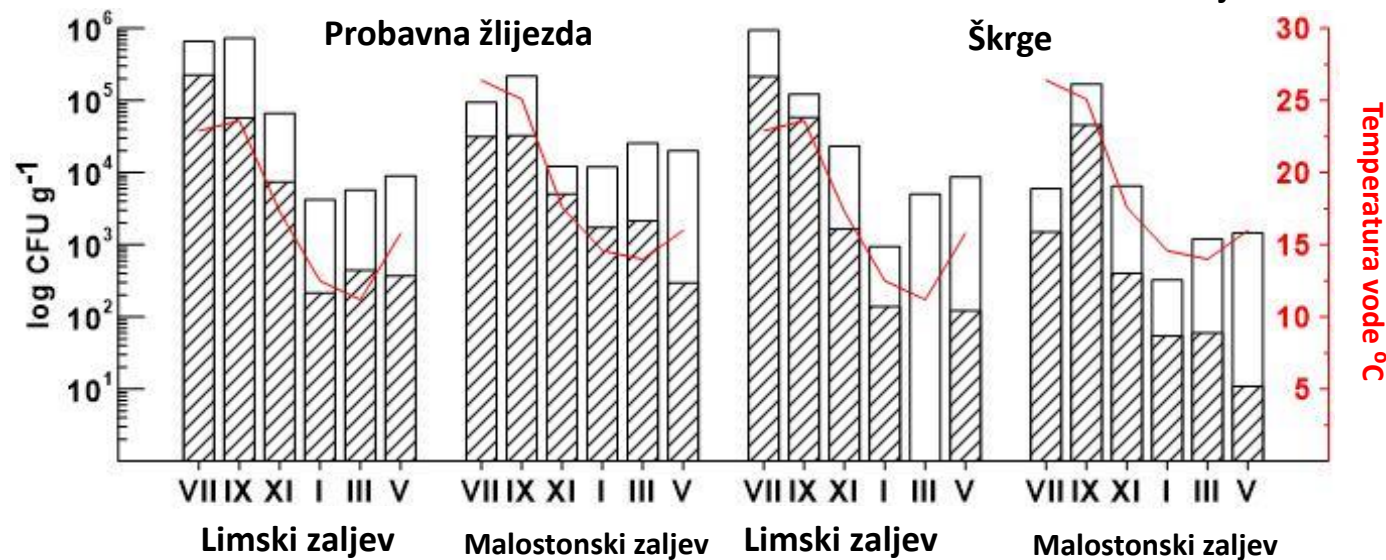
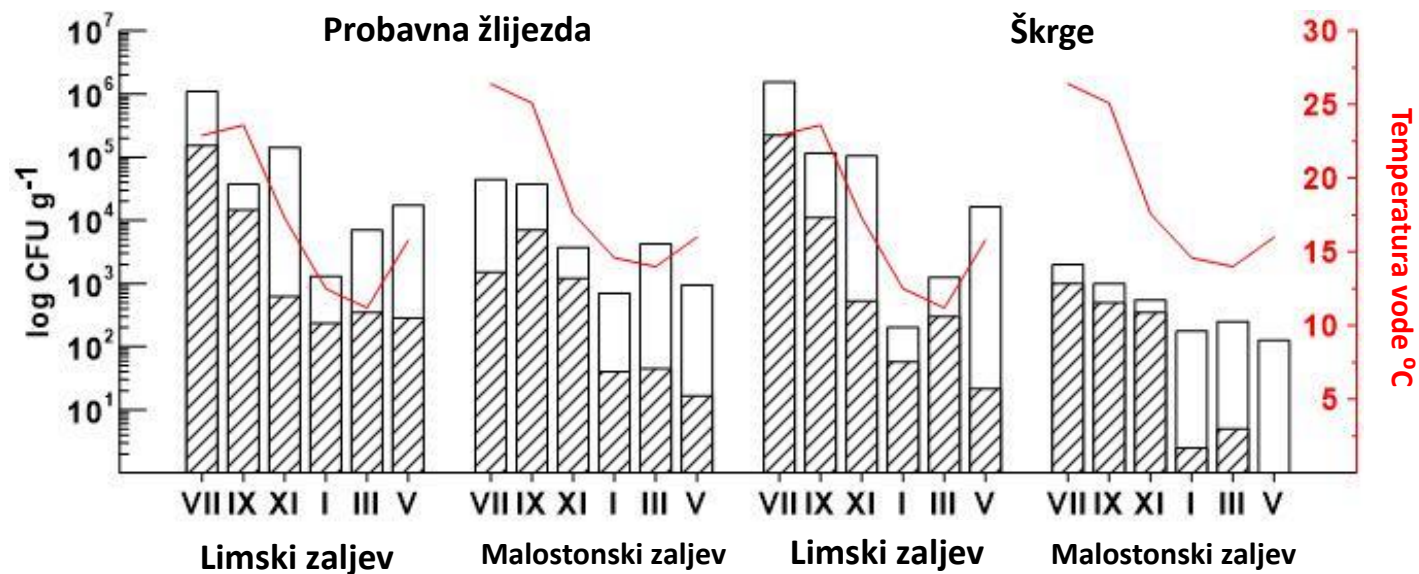
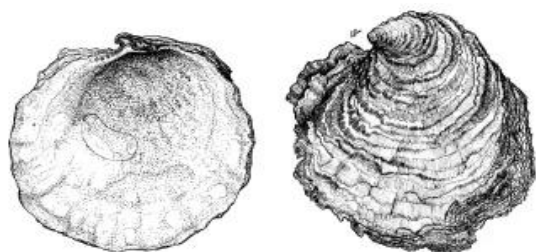
MIKROBIOLOŠKI PARAMETRI (*E. coli*, ukupni koliformi, enterokoki)

Fizikalno-kemijski i mikrobiološki parametri morske vode i sedimenta

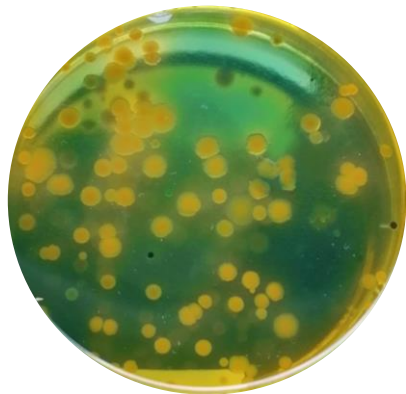
Parametri morske vode	Limski zaljev Min - Max	Malostonski zaljev Min - Max
temperatura (°C)	11.2 - 23.6	14 - 26.4
salinitet (‰)	33.1 - 37.2	31.4 - 35.9
O ₂ (%)	90.7 - 111.1	88.1 - 101.7
pH	8.16 - 8.27	8.19 - 8.3
NO ₂ -N (mgN/L)	0.0005 - 0.0009	0.005 - 0.015
NO ₃ - (mg/L)	0.06 - 0.13	0.1 - 0.91
NO ₃ -N (mgN/L)	0.01 - 0.03	0.005 - 0.02
N (mg/L)	0.09 - 0.24	0.09 - 0.01
P (mg/L)	0.001 - 0.026	0.002 - 0.027
SiO ₃ (mg/L)	0.064 - 0.513	0.095 - 0.549
chl <i>a</i> (µg/L)	1.14 - 3.42	0.811 - 3.16
POM (mg/L)	1.9 - 4.1	2.1 - 3.3
Secchi dubina (m)	6 - 11	5 - 7

	Limski zaljev (Min - Max)		Malostonski zaljev (Min - Max)	
	morska voda	sediment	morska voda	sediment
Ukupni koliformi (MPN/100 mL)	<10 - 250	<10 - 6910	<10 - 84	<10 - 840
Enterococci (MPN/100 mL)	<10 - 52	10 - 391	<10	<10
<i>E. coli</i> (MPN/100 mL)	<10	<10 - 90	<10	<10 - 132

Ukupan broj bakterija (THB) i ukupan broj *Vibrio* bakterija (TVC)



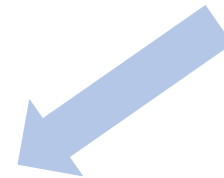
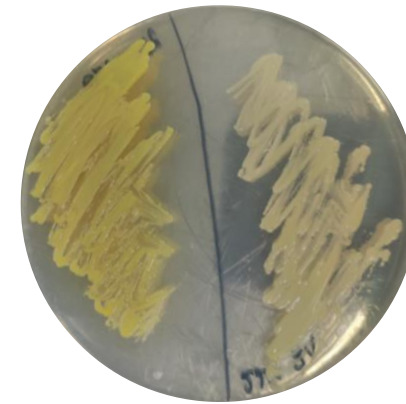
- Ukupan broj bakterija (CFU/mL ili g)
- Ukupan broj *Vibrio* bakterija (CFU/mL ili g)



Mješovita
bakterijska
kultura na TCBS
ploči



Čista kultura



MALDI-TOF
masena spektrometrija
- Određivanje roda i filogrupe



Metoda difuzije na disku



- interpretacija: CLSI M45

Sample ID	Target Pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)
3LK 3	D2	Vibrio gigantis	<u>1.73</u> (+)
3LK 5	D3	Vibrio mediterranei	<u>1.78</u> (+)
3LK 15	D8	Vibrio harveyi	<u>2.29</u> (+++)
3LK 18	D10	Vibrio harveyi	<u>2.13</u> (+++)
3LK 20	D11	Vibrio harveyi	<u>2.23</u> (+++)
3LK 26	E1	Vibrio chagasii	<u>1.89</u> (+)
3LK 28	E2	Vibrio tasmaniensis	<u>1.56</u> (-)

Uzgojena mikrobnajednica

Filogrupe:

 *Harveyi*

 *Splendidus*

 *Mediterranei*

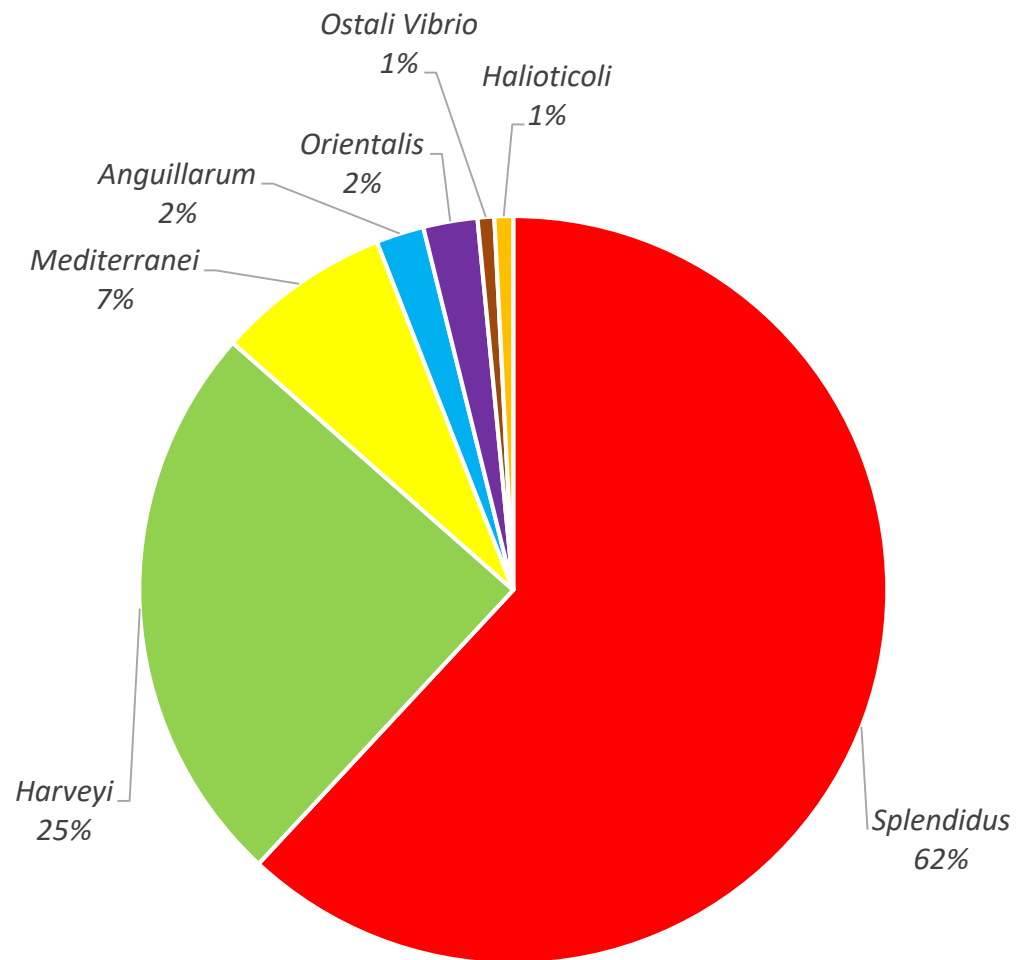
 *Anguillarum*

 *Orientalis*

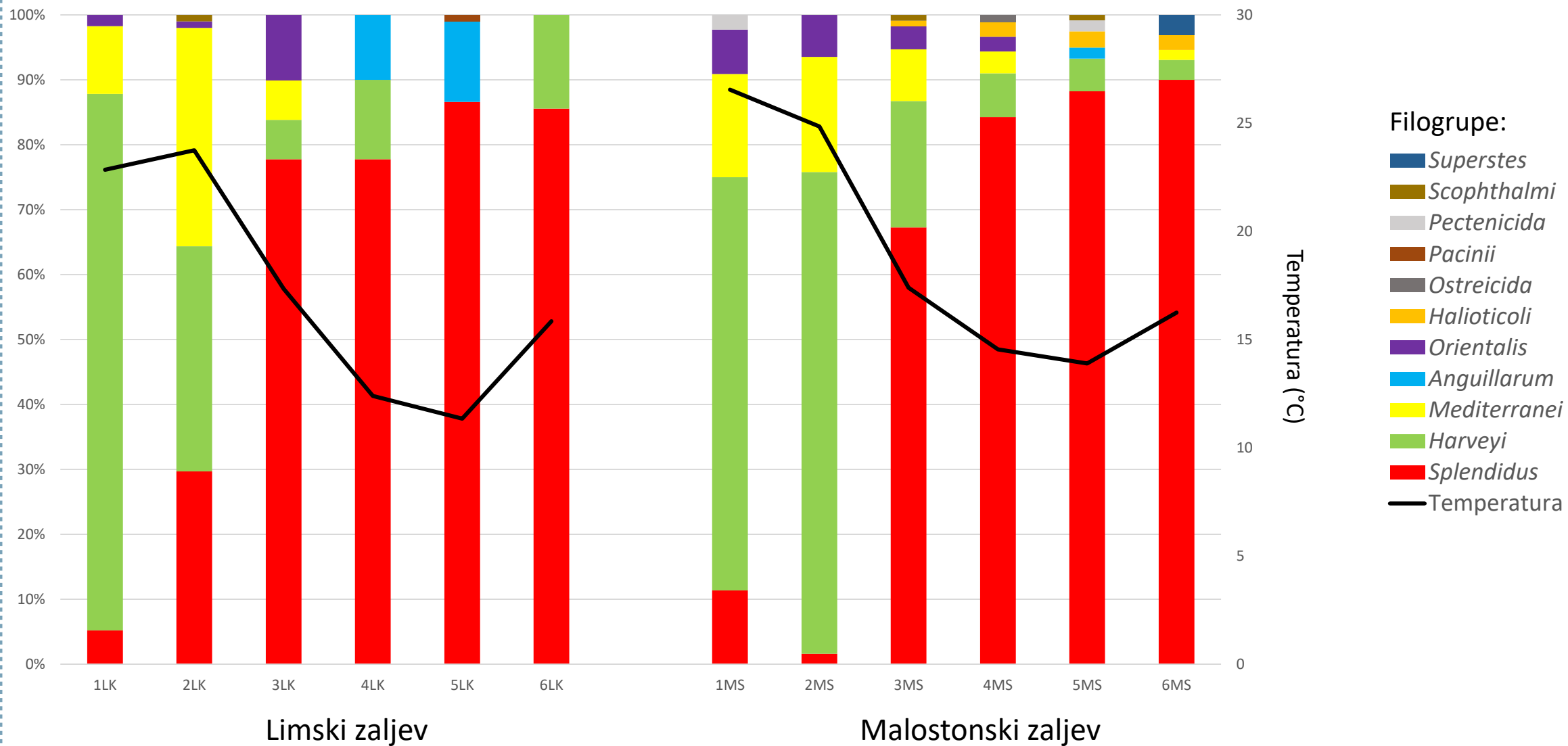
 *Halioticoli*

 *Ostali Vibrio*

n=1156

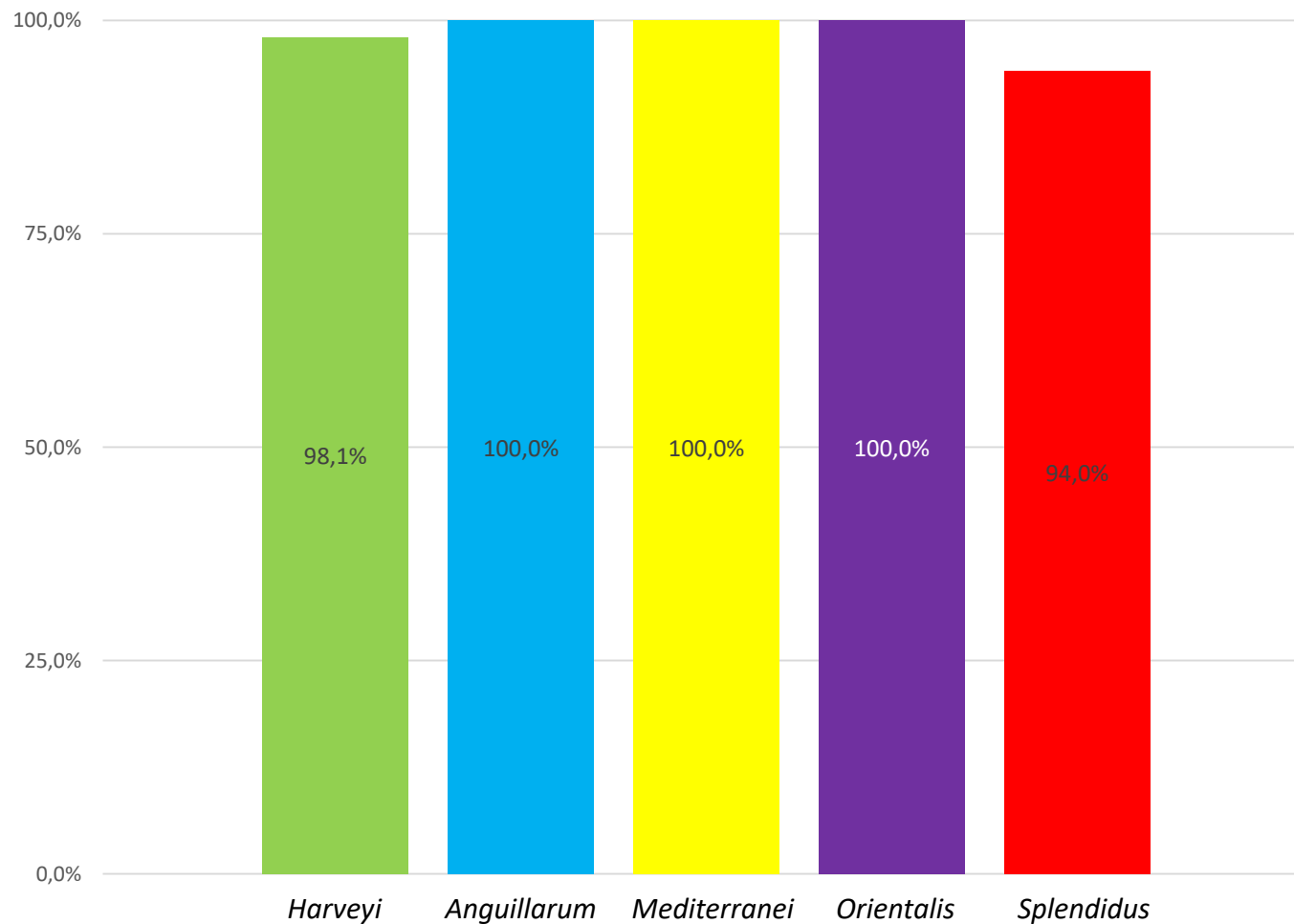


Utjecaj temperature na *Vibrio* zajednicu



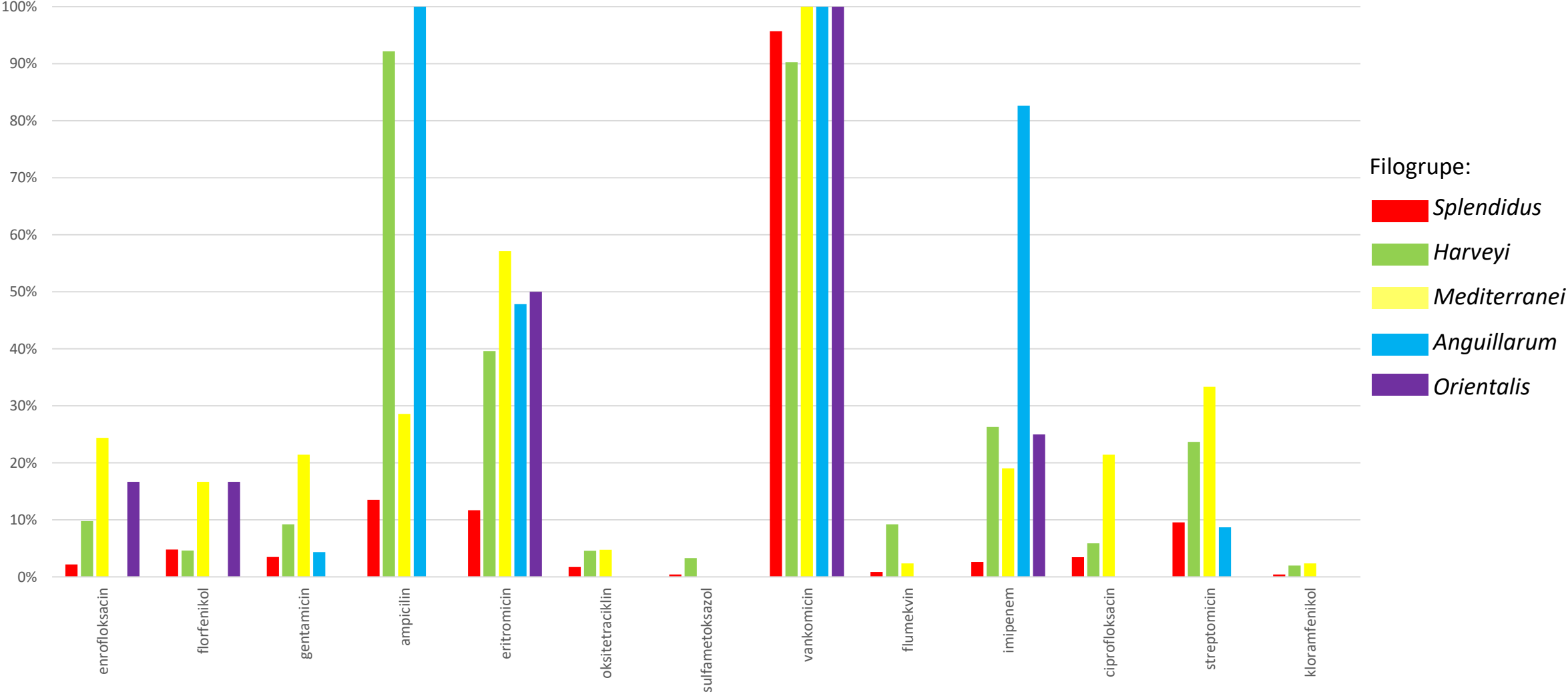
Antibiotska rezistencija bakterija roda *Vibrio*

Udio bakterija koje su rezistentne na jedan ili više antibiotika



ENR5	enrofloksacin
FFC30	florfenikol
GM10	gentamicin
AM10	ampicilin
E15	eritromicin
T30	oksitetraciklin
SXT	sulfametoksazol
VA30	vankomicin
UB30	flumekvin
IPM10	imipenem
CIP5	ciprofloksacin
S10	streptomicin
C30	kloramfenikol

Antibiotska rezistencija bakterija roda *Vibrio*



Zaključci



temperatura najdominantniji okolišni parametar koji je utjecao na brojnost i raznolikost *Vibrio* vrsta



Prvi višoj temperaturi dominiraju bakterije iz filogrupe *Harveyi* dok na nižim temperaturama *Splendidus*



Više od **98%** izoliranih *Vibrio* bakterija su rezistentne na jedan ili više antibiotika



Antibiotik na kojega je bilo rezistentno najviše bakterija je bio **vankomicin** (VA)

Hvala na pažnji!



Osjetljivost komercijalno važnih školjkaša u akvakulturi istočnog dijela Jadrana na promjene okolišnih uvjeta (Best Adria) - IP-2019-04-1956

