

ACTA ADRIATICA

INSTITUT ZA OCEANOGRFIJU I RIBARSTVO - SPLIT
SFR JUGOSLAVIJA

Vol. XIV, No. 3

IZUČAVANJE VOLUMENA BAKTERIJSKIH STANICA NA PODRUČJU SREDNJEG JADRANA

CALCULATING THE VOLUME OF THE BACTERIAL
CELLS IN THE REGION OF MIDDLE ADRIATIC

OLIVERA RISTIĆ I SLAVKO ŠOBOT

SPLIT 1972.

IZUČAVANJE VOLUMENA BAKTERIJSKIH STANICA NA PODRUČJU SREDNJEG JADRANA

CALCULATING THE VOLUME OF THE BACTERIAL CELLS IN THE REGION OF MIDDLE ADRIATIC

Olivera Ristić i Slavko Šobot

*Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split
Poljoprivredni fakultet, Novi Sad*

U V O D

Bakterije su u morskoj vodi daleko masovnije naseljene od drugih mikrobnih predstavnika (plijesni, kvasaca, aktinomiceta itd.), pa se zbog toga, vjerojatno, njihovu proučavanju u morskim ekosistemima i posvećuje veća pažnja. Svojom djelatnošću u procesu destrukcije organske materije, bakterije su od posebnog značaja za kruženje materije, a osim toga njihova uloga u trofičkom lancu privlači znatnu pažnju, jer predstavljaju izvor hrane za zooplanktonske i zoobentonske organizme.

Da bismo saznali količinu bakterijskog naselja u moru, njegovu rasprostranjenost, dinamiku kolebanja populacije, produkciju ili brzinu razmnožavanja, služimo se kvantitativnim prikazivanjima dobivenih rezultata, bilo u vidu broja kolonija, brojnosti bakterijskih stanica ili prikazujući vrijednosti kao bakterijsku biomasu. Prikazivanje rezultata u težinskim jedinicama je prikladnije i svrsishodnije s obzirom na ostale komponente živog svijeta u moru i na mogućnost komparacije s njima, bilo da se radi o zooplanktonu, fitoplanktonu ili mikrobentosu.

Za izračunavanje bakterijske biomase, tj. za prijelaz od njihova broja na težinu, potrebno je izvršiti mjerenja veličine bakterijskih stanica. Na osnovu dobivenih vrijednosti za pojedine morfološke grupe, po formulama za prosta geometrijska tijela, izračunava se volumen bakterijskog tijela. Iz podataka o ukupnom broju bakterijskih stanica u 1 ml vode, znajući prosječne volumene bakterija, može se izračunati biomasa u određenom volumenu vode. Za specifičnu težinu većina autora uzima vrijednost 1,0 (Ivanov 1955, Cviić 1963, Kuznjecov i Romanenko 1963, Rodina 1965, Zobel 1963), a Jørgenson (1966) smatra da taj faktor treba da bude 1,1.

Kako je mjerenje veličina bakterijskih stanica i proučavanje volumena po morfološkim grupama dugotrajan i težak posao, vrlo se često u mikrobiološkoj literaturi bakterijska biomasa izražava brojčanim, a ne težinskim vrijednostima ili, kako navode Kuznjecov i Romanenko (1963), razni autori uzimaju različite koeficijente. Zbog toga je potrebno vršiti opetovana mjerenja na ispitivanim područjima, radi dobivanja što točnijih podataka.

Ako se bakterijska biomasa prikazuje u vlažnoj težini, potrebno je mjeriti žive stanice. Rodina (1965) navodi da je vršila mjerenja živih stanica, međutim Osnickaja (1954) iznosi da je mjerila stanice na membranskim filtrima, tj. na fiksiranom materijalu. Većina ostalih autora ne daje ove podatke, pa je neizvjesno u kakvom su stanju kod njih mjerene veličine stanica.

Cviić (1963) iznosi da je izvršio mjerenja na stanicama kultiviranih bakterija. Nameće se pitanje mijenja li se u laboratorijskim uslovima veličina stanica pojedinih vrsta. Pored toga treba imati na umu da se samo mali postotak od zastupljenih bakterija u morskoj sredini može dobiti metodama kultiviranja.

Svi su ovi momenti bili razlog da, radi određivanja bakterijske biomase u srednjem Jadranu, prethodno izvršimo mjerenja bakterijskih stanica i izračunamo njihove volumene.

MATERIJALI I METODIKA

Uzorci morske vode su uzimani u toku ljetnog perioda sa 4 postaje: Stoničica, Kaštelanski zaljev, a na profilu Ancona—Dugi otok sa dvije postaje (pučinska i obalna). Sve su probe uzimane za stupac vode od površine do dna (vidi sliku 1.)

Budući da smo htjeli saznati hoće li biti odstupanja u veličinama bakterijskih stanica iz morske vode i kultiviranih bakterija iz iste sredine te hoće li biti značajnih razlika u volumenu nativnih i fiksiranih stanica, izvršili smo mjerenja u svim ovim kombinacijama i izračunali njihov volumen. Osim toga volumene kokoidalnih i dominantnih štapićastih oblika izračunali smo iz aritmetičkih sredina dijametara, odnosno dužine i širine stanica, a paralelno i iz srednjih veličina kubova, odnosno kvadrata ovih parametara.

Karta 1. Raspored postaja

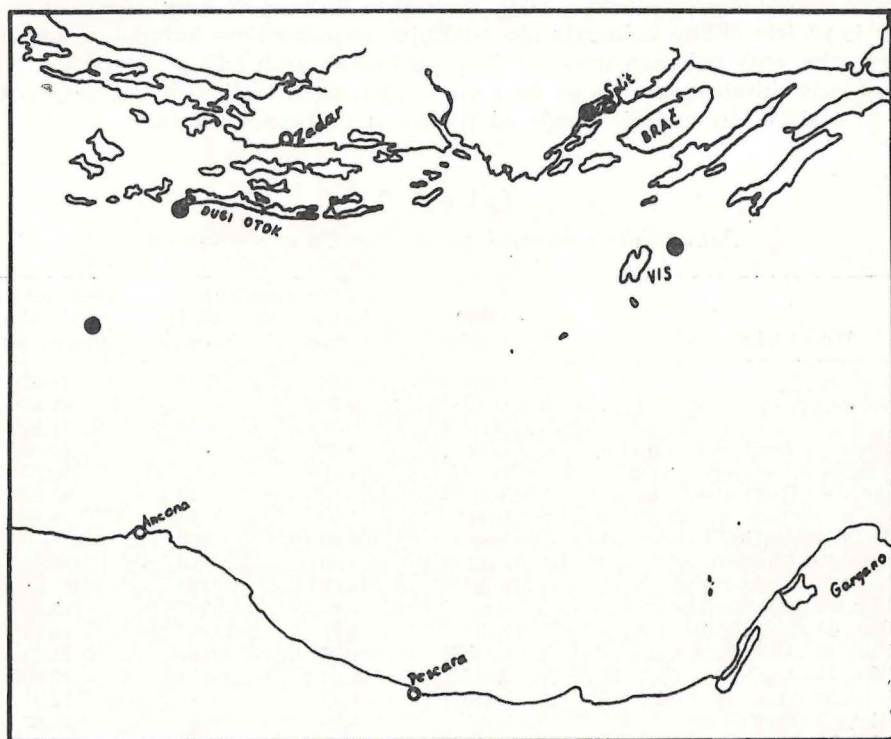
Za mjerenje dimenzija fiksiranih bakterija iz morske vode koristili smo se membranskim filterima No 2 (firme Sartorius — Göthingen). Filtri su prethodno sterilizirani kuhanjem u destiliranoj vodi, a zatim je pod sterilnim uvjetima profiltrirano za svaki uzorak po 50 ml morske vode. Po završenoj filtraciji filtri su fiksirani u pari formalina i sušeni aseptički na zraku. Osušeni filtri su bojani 5% eritrozinom 3 sata, odbojavani, sušeni na zraku, prosvjetljivani i mikroskopirani.

Iste filtre smo upotrebljavali i za dobivanje nativnih stanica iz morske vode, pri čemu je filtrirana 1 lit. morske vode, zbog dobivanja veće koncen-

tracije bakterijskih stanica. Filtracija je zaustavljena u momentu kada je u lijevku ostalo 1—0,5 ml vode iz koje je uziman materijal za pravljenje preparata.

Kod mjerenja stanica iz kultura načinjena je suspenzija stanica u sterilnoj fiziološkoj otopini, a onda je postupak bio isti kao što je navedeno.

Bakterijske kulture su izabrane s istih područja, a obrađeno je ukupno 10 različitih izolata (po 5 iz svake morfološke grupe). Ukupno je izmjereno 3800 stanica. Volumen bakterijskih stanica kokoidalnog oblika izračunavan je po formuli kugle, a volumen štapićastih po formuli valjka. Kao što smo napomenuli, za svaki smo uzorak proračunavanje volumena vršili na dva načina. Bilo da se dobivene vrijednosti dimenzija po aritmetičkim sredinama uvrste u odgovarajuće formule ili su iskorišćene srednje vrijednosti kubova odnosno kvadrata dijametra, jer ima mišljenja (Rodina, 1965) da aritmetičke sredine dijametra koka, odnosno širine štapića, daju umanjene vrijednosti volumena. Rezultate mjerenja smo svodili na varijacione nizove. Za izračunavanje prosjeka po intervalnim podacima iskorišteni su prosjeci intervala.



Sl. 1. Područje istraživanja

REZULTATI I DISKUSIJA

Podaci o volumenu bakterijskih stanica iz morske vode različiti su. Osnickaja (1954) je za Kaspijsko more dobila vrijednost od $0,3 \mu^3$, Cviić (1963) za bakterije Jadranskog mora nalazi da je volumen jedne bakterijske stanice u prosjeku $0,25 \mu^3$, a ZoBell (1963) navodi da se volumen za većinu morskih bakterija kreće od $0,1$ do $1,0 \mu^3$.

Iz navedenih podataka je vidljivo da se pri mjerenju bakterijskih stanica dobivaju različiti rezultati, što je sasvim razumljivo kad se radi o različitim ekološko-geografskim uvjetima ispitivanih područja.

Prema dobivenim rezultatima kod nas, zapaža se da su prosječne vrijednosti volumena u većini slučajeva veće, ako su mjerene stanice kultiviranih bakterija. Tako je prosječan volumen štapićastih bakterija iz morske vode (po aritmetičkim sredinama dimenzija) iznosio $0,74 \mu^3$, dok je kod kultiviranih bakterija iznosio $0,82 \mu^3$. Volumeni štapićastih bakterija (po srednjim vrijednostima kvadrata širine) bili su pojednaki i iz morske vode i kultiviranih bakterija ($0,96$, odnosno $0,94 \mu^3$). Volumen kokoidalnih bakterija (po aritmetičkim sredinama) iz morske vode je iznosio $0,42 \mu^3$, a kultiviranih $0,79 \mu^3$, dok je za iste oblike bakterija (po srednjim vrijednostima kubova dijametara) iz morske vode volumen iznosio $0,75 \mu^3$, a kultiviranih $0,95 \mu^3$. Povećani volumeni kultiviranih bakterija su dobiveni i mjerenjem fiksiranih bakterija, samo su te razlike bile znatno manje od razlika u nativnom stanju.

Tabela 1.

Bakterijski volumeni po aritmetičkim sredinama

Postaje	Oblik stanica	Volumen (μ^3)		Post. omj. vol. fiksir. stanica prema nativ.
		Nativ. stanica	Fiksir. stanica	
Stončica	štapići	0,54	0,16	29,62
	koki	0,26	0,12	46,15
Ancona — Dugi otok (pučina)	štapići	0,57	0,18	31,57
	koki	0,42	0,13	30,95
Ancona — Dugi otok (obalna)	štapići	1,00	0,20	20,00
	koki	0,62	0,16	25,80
Kaštelanski zaljev	štapići	0,87	0,13	14,94
	koki	0,38	0,08	21,05
Soj br. 4 (Stončica)	koki	0,99	0,19	19,19
Soj br. 38 (Stončica)	koki	0,64	0,33	51,56
Soj br. 40 (Stončica)	štapići	0,65	0,17	26,15
Soj br. 47 (Stončica)	koki	0,99	0,14	14,14
Soj br. 73 (Anc.-D. o. puč.)	štapići	0,99	0,41	41,41
Soj br. 71 (Anc.-D. o. ob.)	štapići	0,61	0,11	18,03
Soj. br. 78 (Anc.-D. o. ob.)	štapići	0,91	0,13	14,28
Soj br. 9 (Kaštel. z.)	koki	0,69	0,22	31,88
Soj br. 23 (Kaštel. z.)	štapići	0,96	0,14	14,58
Soj br. 56 (Kaštel. z.)	koki	0,68	0,06	8,82

Tabela 2.

Bakterijski volumeni po srednjoj veličini kubova i kvadrata

	Oblik	Volumen (mik ³)		Post. omj. vol. fiksir. stanica
		Nativ.	Fiksir.	
Postaje	stanica	stanica	stanica	prema nativ.
Stončica	štapići	0,78	0,23	29,48
	koki	0,65	0,24	36,92
Ancona — Dugi otok (pučina)	štapići	0,71	0,27	38,02
	koki	0,64	0,23	35,93
Ancona — Dugi otok (obalna)	štapići	1,25	0,27	21,60
	koki	0,86	0,27	31,39
Kaštelanski zaljev	štapići	1,12	0,24	21,42
	koki	0,87	0,18	20,68
Soj. br. 4 (Stončica)	koki	1,19	0,28	32,52
Soj. br. 38 (Stončica)	koki	0,88	0,42	47,72
Soj. br. 40 (Stončica)	štapići	0,80	0,20	25,00
Soj. br. 47 (Stončica)	koki	1,12	0,19	16,96
Soj. br. 71 (Anc.-D. o. ob.)	štapići	0,74	0,16	21,62
Soj. br. 73 (Anc.-D. o. puč.)	štapići	1,10	0,52	47,27
Soj. br. 78 (Anc.-D. o. ob.)	štapići	0,96	0,22	22,91
Soj. br. 9 (Kaštel. z.)	koki	0,81	0,32	39,50
Soj. br. 23 (Kaštel. z.)	štapići	1,12	0,15	13,39
Soj. br. 56 (Kaštel. z.)	koki	0,79	0,13	16,45

Tabela 3.

Bakterijski volumeni nativnih stanica

Postaje	Oblik stanica	Volumen (mik ³)		Postot. omj. vol. po aritm. sred. i sred. velič. kvadr. i kub.
		Po arit. sredinama	Po sred. vel. kvad. i kubova	
Stončica	štapići	0,54	0,78	69,23
	koki	0,26	0,65	40,00
Ancona — Dugi otok (pučina)	štapići	0,57	0,71	80,28
	koki	0,42	0,64	65,62
Ancona — Dugi otok (obalna)	štapići	1,00	1,25	80,00
	koki	0,62	0,86	72,09
Kaštelanski zaljev	štapići	0,87	1,12	77,67
	koki	0,38	0,87	43,67
Soj. br. 4 (Stončica)	koki	0,99	1,19	83,19
Soj. br. 38 (Stončica)	koki	0,64	0,88	72,72
Soj. br. 40 (Stončica)	štapići	0,65	0,80	81,25
Soj. br. 47 (Stončica)	koki	0,99	1,12	88,39
Soj. br. 71 (Anc.-D. o. ob.)	štapići	0,61	0,74	82,43
Soj. br. 73 (Anc.-D. o. puč.)	štapići	0,99	1,10	90,00
Soj. br. 78 (Anc.-D. o. ob.)	štapići	0,91	0,96	94,79
Soj. br. 9 (Kaštel. z.)	koki	0,69	0,81	85,18
Soj. br. 23 (Kaštel. z.)	štapići	0,96	1,12	85,71
Soj. br. 56 (Kaštel. z.)	koki	0,68	0,79	86,07

Iz tabela 1. i 2. može se vidjeti da su volumeni fiksiranih stanica u svim slučajevima manji od volumena nativnih. Volumeni fiksiranih bakterija iznosili su 8,8—51,1% (tabela br. 1) ili 13,39—47,72% (tabela br. 2) od volumena nativnih bakterijskih stanica. Smanjivanje volumena fiksiranog materijala je sasvim prirodna posljedica sušenja bakterijskih stanica. Međutim, ovdje je interesantno napomenuti da Lebedejeva i Kozlova (1969) nalaze da se i poslije fiksiranja formalinom vlažna težina nekih vrsta rodova *Daphnia*, *Ceriodaphnia* i *Euricerus* mijenja i povećava za 30—40%. Zbog odsustva zakonitosti u primjeni težine ovih kladocera pri fiksiranju formalinom, autori smatraju da je nužno mjeriti žive organizme.

Budući da se za izračunavanje biomase u vlažnoj težini kod bakterija mogu mjeriti žive stanice, to je, po našem mišljenju, za dobivanje egzaktnih podataka potrebno mjeriti samo nativne stanice, jer fiksiran materijal ne prikazuje ni vlažnu, ni suhu težinu.

Volumen bakterijskih stanica dobiven po aritmetičkim sredinama, bio je u svim slučajevima manji od volumena izračunatog po vrijednostima srednjih veličina kubova i kvadrata. Na tabeli br. 3. izražen je procentni odnos tih volumena.

Analizirajući podatke staničnih volumena bakterija iz morske vode s pučinskog i obalnog područja srednjeg Jadrana uočava se da su u obalnoj zoni stanice većih volumena ($0,86$ — $0,87 \mu^3$ za kokoidalne oblike i $1,12$ — $1,25 \mu^3$ za štapičaste bakterije) od onih koje su zastupljene u pučinskoj zoni (koki $0,64$ — $0,65 \mu^3$, a štapići $0,71$ — $0,78 \mu^3$). Budući da se sinteza staničnog sadržaja vrši na račun autohtonog i alohtonog materijala, na ove razlike utječe veća količina alohtonog materijala u obalnoj zoni.

ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je za dobivanje točnijih podataka u proračunavanju bakterijske biomase potrebno vršiti mjerenja nativnih stanica. Vrijednosti volumena treba posebno izražavati kao prosječne volumene kokoidalnih odnosno štapičastih stanica, a ne kao prosječne vrijednosti bakterijskih stanica. U našem slučaju prosječan volumen koka iz morske vode iznosio je $0,75 \mu^3$, a štapića $0,96 \mu^3$. Uz to je i njihova brojčana zastupljenost različita, pa je bez sumnje pogrešno zanemarivati ove parametre.

Izračunavanje izmjerenih dimenzija (dijametra i širine) za dobivanje srednjih vrijednosti svih izmjerenih stanica treba vršiti statističkim metodama, jer aritmetičke sredine daju umanjene vrijednosti.

Sudeći po dobivenim rezultatima drugih autora, uvjetno uzimanje koeficijenta smanjuje točnost dobivenih podataka, jer je veličina bakterijskih stanica promjenljiva i različita za različita područja.

KRATAK SADRŽAJ

U radu su izneseni rezultati izračunavanja volumena bakterijskih stanica u vodama srednjeg Jadrana. Izračunavani su volumeni stanica u nativnom i fiksiranom stanju direktno iz morske vode i nakon kultiviranja. Za kokoidalne oblike upotrijebljena je formula za kuglu, a za štapičaste oblike formula za valjak. Prosječni volumeni su izračunavani uvrštavanjem dobivenih vrijednosti po aritmetičkim sredinama i po srednjim vrijednostima kubova odnosno kvadrata dijametra.

Prosječni volumeni bakterijskih stanica su veći od kultiviranih sojeva (iste morfološke grupe) u odnosu na stanice dobivene direktno iz morske vode (tabele 1. i 2). Veći su volumeni dobiveni izračunavanjem po vrijednostima srednjih veličina kubova odnosno kvadrata dijametra od onih dobivenih po aritmetičkim sredinama (tabela 3).

Zbog priličnog variranja prosječnih volumena fiksiranih stanica nije moguća upotreba nekog faktora za pretvaranje »suhog« volumena u mokri.

U ispitivanom području prosječni volumen za kokoidalne oblike iznosi $0,75 \mu^3$, a za štapičaste $0,96 \mu^3$. Pri izračunavanju bakterijske biomase stoga treba obratiti pažnju brojčanoj zastupljenosti po morfološkim grupama. Iz dobivenih rezultata je vidljivo da nije pogodna upotreba neke uvjetne vrijednosti za volumen bakterijske stanice.

CALCULATING THE VOLUME OF THE BACTERIAL CELLS IN THE
REGION OF MIDDLE ADRIATIC

by

Olivera Ristić and Slavko Šobot

Institute of Oceanography and Fisheries, Split
Faculty of Agriculture, Novi Sad

SUMMARY

This work contains the results of the calculation of the volume of the bacterial cell in the waters of the Middle Adriatic. The cell volumes in the native and fixed conditions have been calculated directly from the sea water and after the cultivation. For coccus form ball formula has been applied, and roller formula has been applied for rod forms.

The average volumes are worked out by inserting the obtained values according to arithmetic averages and against the average values of cubes respectively square diameter.

The average volumes of bacterial cells are higher with the cultivate strains (the same morphological group) in the relation to the cells obtained directly from the sea water (table 1 and 2). The larger volumes are obtained by working out in accordance

with the values of average sizes of cubics respectively of the square diameter from those obtained by arithmetic averages (table 3).

Owing to the considerable oscillation of the average volume of fixed cells it is not possible to use a certain factor for converting »dry« volume into wet one.

In the examined region the average volume for cocci forms amounts to $0,75 \mu^3$, and for rod forms $0,96 \mu^3$. During the calculation of bacterial biomass therefore the attention has to be paid to the numeral participation per morphological groups.

It can be seen from the obtained results that it is not suitable to use some of the condition values for the volume of bacterial cells.

LITERATURA

- Cviić, V. (1963). Rasprostranjenost bakterija i bakterijske biomase u Južnom Jadranu. *Acta Adriatica* (Split), 10,7:1—15.
- Ivanov, M. I. (1955). Metod opredelenija produkcii bakteriialnoj biomasi. *Mikrobiologija* (Moskva), 24,1:79—89.
- Jørgenson, C. B. (1966). *Biology of Suspension Freeding*. Division: Zoology, vol. 27, Pergamon Press Ltd. (Oxford).
- Kožova, O. M. (1964). Bakterioplankton irkutskovo vodohranilišća v pjervie posle zapolnenija godi. *Trudi limnol. inst.* 11,33:115—133.
- Kuznjecov, S. I. i Romanenko, W. I. (1963). *Mikrobiologičeskoe izučenje vnutrenih vodojem*. Izd. A. N. SSSR. Moskva — Lenjingrad.
- Kuznjecov, S. I. i Romanenko, W. I. (1966). *Produktion der Biomasse heterotropher Bakterien und die Geschwindigkeit ihrer Vermehrung im Ribinsk-Stausee*. *Verh. int. Ver. Limnol.*, 16, 3: 1493—1500.
- Lebedejeva, L. I. i Kozlova, E. I. (1969). Razmernovesovaja karakteristika živih i fiksirovanih formalinom presnovodnih Cladocera. *Gidrobiol. žur. A. N. USSR.*, 5, 2: 73—80.
- Novožilova, M. I. (1955). Dinamika čislenosti i biomasi bakterij v vodnoj tolšće ribinskovo vodohranilišća. *Mikrobiologija* (Moskva), 24, 6: 710—717.
- Osnickaja, L. K. (1954). Čislenost i biomasa bakterii v vodnoj tolšće Kaspiskovo morja. *Mikrobiologija* (Moskva), 23, 5: 517—579.
- Rodina, A. G. (1950). *Mikrobiologičeskie isledovanija vodojemov*. Izd. A. N. SSSR, Moskva — Lenjingrad.
- Rodina, A. G. (1965). *Metodi vodnoj mikrobiologii*. Izd. »Nauka«, Moskva — Lenjingrad.
- Romanenko, W. I. (1964). Geterotrofnaja asimilacija CO_2 bakteriialnoj flori vodi. *Mikrobiologija* (Moskva), 33, 4: 679—683.
- Romanenko, W. I. (1969). *Produkcija bakterii i fitoplanktona v presnih vodojemah*. *Gidrobiol. žurnal A. N. USSR*, 5, 2: 56—58.
- Sorokin, J. (1959). Biomasa bakterii i hemičeskij sostav gruntov ribinskovo vodohranilišća. *Bilt. inst. biol. vodohran.*, 4: 1—6.
- ZoBell, C. E. (1959). *Introduction to marine microbiology*. New Zealand Oceanogr. Inst. Mem., 3: 7—23.
- ZoBell, C. E. (1963). Domain of the marine microbiologist. In C. H. Oppenheimer, (ed.), *Symposium on Marine Microbiology*, Charles C. Thomas, Springfield, Ill., USA, 3—24.
- ZoBell, C. E. (1964). Geochemical aspects of the microbial modification of carbon compounds. *Scripp. inst. of oceanog.*, 34, 2: 1653—1670.