Karakterizacija probiotičke bakterije Lactobacillus plantarum O1 za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture

Čanak, Iva

Doctoral thesis / Disertacija

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:119103

Rights / Prava: Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Iva Čanak

KARAKTERIZACIJA PROBIOTIČKE BAKTERIJE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* O1 ZA BIOLOŠKO KONZERVIRANJE PROIZVODA AKVAKULTURE

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Prof.dr.sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Iva Čanak

CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC BACTERIUM *LACTOBACILLUS PLANTARUM* O1 FOR BIOLOGICAL CONSERVATION OF AQUACULTURE PRODUCTS

DOCTORAL DISERTATION

Supervisor:

Jadranka Frece, PhD, Professor

Zagreb, 2020.

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Prof.dr.sc. Jadranka Frece rođena je u Zagrebu, 27. ožujka 1974. godine. Diplomirala je 1997. godine na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Dobila je nagradu Rektora za najbolje studentske radove u akademskoj godini 1995/96. Godine 2003. stekla je akademski stupanj magistra biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija. Akademski stupanj doktora biotehničkih znanosti, znanstveno polje biotehnologija, stekla je 2007. godine obranivši disertaciju na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 17. prosinca 1998. godine do 15. lipnja. 2008. bila je zaposlena u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je postala mlađa asistentica (1998.-2002.), asistentica (2002.-2006.) te viša asistentica (2006.-2007.). Zvanje docenta postigla je 2008. godine. Habilitacijsko predavanje održala je na temu: "Molekularno-mikrobiološke metode u određivanju patogena u hrani". Kao docent prelazi u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Zavoda za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na predmete "Mikrobiologija" i "Mikrobiologija namirnica", te "Bakteriologija", "Mikologija", "Mikrobiologija hrane" i "Mikrobni indikatori u kontroli kvalitete hrane". Zvanje izvanredne profesorice stječe u siječnju 2012. godine, a redovite profesorice u travnju, 2016. Usavršavala se na Biotehniškoj fakulteti Univerza v Ljubljani (1999.), "Methodological courses in biology and medicine "DNA i RNA", Institut "Ruđer Bošković", u Zagrebu, od 12.-16. svibnja 2003. te na Karl-Franzens-University, Graz (2008.). 2017. je završila seminar *Aktivno učenje i kritičko mišljenje u visokoškolskoj nastavi*. Koautorica je četiri sveučilišna udžbenika, jedne znanstvene knjige te sedam poglavlja u znanstvenim knjigama, a pod njenim mentorstvom izrađena su 22 diplomska i 17 završnih radova te obranjena tri doktorska rada, jedan magistarski rad i dva magistarska specijalistička rada. Prof. dr. sc. Jadranka Frece je bila članica znanstvenog i organizacijskog odbora mnogih znanstvenih međunarodnih kongresa, članica Savjeta za Ruralni razvoj, Ministarstva poljoprivrede (2013.) za izradu nacrta Programa ruralnog razvoja RH 2014.-2020, članica Povjerenstva za izradu Pravilnika o pomoći EU Komisiji i suradnji između EU Komisije i RH kroz znanstvena ispitivanja u području hrane (2013.), zamjenica predsjednice Vijeća biotehničkog područja (2017.-2018.), te članica PANELA 2 Biotehničkih znanosti za vrednovanje projektnih prijedloga prijavljenih na natječaje Zaklade „Istraživački projekti" i „Uspostavni istraživački projekti" (rok: rujan 2014.). Članica je Povjerenstva za poslijediplomske specijalističke programe Sveučilišta u Zagrebu (2014.-), zamjenica člana Senata Sveučilišta u Zagrebu (2015.-2019.), članica Znanstvenog odbora EBTNA u Hrvatskoj

(2014.-), članica je savjeta gradonačelnika grada Knina od 2017., članica Povjerenstva za utvrđivanje kriterija i potvrdu izbora u zvanja Vijeća biotehničkog područja (2017.-2021.), članica uprave hrvatskog klastera konkurentnosti prehrambeno-prerađivačkog sektora (2018.-) te članica Tematskog inovacijskog vijeća za hranu i bioekonomiju (2018.-). Glavna je urednica časopisa Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition (2016.-). Znanstvena istraživanja vezana su uz područje opće i primjenjene mikrobiologije, mikrobnog kvarenja hrane i antimikrobne aktivnosti prirodnih biokonzervansa u zaštiti hrane. Recentna znanstvena istraživanja obuhvaćaju identifikaciju i karakterizaciju probiotičkih i autohtonih funkcionalnih starter kultura i njihovu proizvodnju za fermentirane proizvode. Rezultati istraživanja zaštićeni su u 3 nacionalna patenta. Objavila je ukupno 87 znanstvena rada od kojih su 44 znanstvena rada klasificirana u a1 skupini, 32 rada je klasificirano u a2 skupini, te 11 radova s kongresa i skupova iz kategorije a3 radova te desetak stručnih radova. Objavljeni znanstveni radovi citirani su ukupno 1102 puta (izvor: ISI Web of Science), ukupan broj citata u Scopusu: 1060, prema Google Scholaru ukupna citiranost: 2255 puta, a omjer citata po radu: 23,3 te h-index:13 (WoS i Scopus) odnosno h-indeks: 18 (Google Scholar). Za postignute rezultate dobila je dvije potpore Biotehničke zaklade Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta (1999. i 2004.), te kao koautor i *Prvu nagradu Saveza inovatora Poljske i autora tehničkih unapređenja* za izložene rezultate „Proizvodnja i primjena probiotičkih starter kultura“ dodijeljene na 5. međunarodnoj izložbi inovacija, novih ideja, proizvoda i tehnologija ARCA 2007. Zagreb, Zagrebački velesajam, 11.-18. rujna 2007. Dobitnica je Državne nagrade za znanost za 2014. godinu za primjenu rezultata znanstveno-istraživačkog rada. Prof. dr. sc. Jadranka Frece bila je prodekanica za znanstveno-istraživački rad Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu od 2011.-2015. godine. Ponovno je 2015. godine izabrana za Prodekanicu za znanost PBF-a. Od 2019. godine obnaša dužnost dekanice PBF-a. Članica je Hrvatskog društva za biotehnologiju, Hrvatskog društva prehrambenih tehnologa, biotehnologa i nutricionista, Hrvatskog mikrobiološkog društva u Zagrebu te član suradnik u Odjelu za bioprocesno inženjerstvo Akademije tehničkih znanosti Hrvatske (HATZ).

Zahvala

Iskreno i od srca zahvaljujem dragoj mentorici prof.dr.sc. Jadranki Frece za stalno poticanje i motivaciju u svim fazama rada. Hvala joj na prenesenom znanju, nesebičnoj pomoći i potpori, i uloženom trudu tijekom izrade mog doktorskog rada.

Iskreno zahvaljujem prof.dr.sc. Kseniji Markov na savjetima, prenesenom znanju, motivaciji, brizi i toploj riječi uvijek kad je trebalo.

Veliko hvala izv.prof.dr.sc. Jurici Jug-Dujakoviću i izv.prof.dr.sc. Ani Gavrilović što mi je omogućila da dio doktorskog rada izradim u sklopu projekta pod njenim vodstvom naslova „Primjena bioloških metoda konzerviranja proizvoda akvakulture - ekološki način povećanja sigurnosti i održivosti“, financiranom od strane Hrvatske agencije za malo gospodarstvo, inovacije i investicije (HAMAG-BICRO).

Zahvaljujem i ostalim članovima i konzultantima projektnog tima Sveučilišta u Dubrovniku (prof. dr. sc. Stjepanu Orhanoviću, Ani Ljubičić, mag. ing. maricult., doc. dr. sc. Marini Brailo) na pripremi i dostavi uzoraka koje sam koristila u eksperimentalnom dijelu rada.

Od sveg srca hvala dragim kolegama Željku Jakopoviću i Deniju Kostelcu, na prijateljstvu, potpori, strpljenju i razumijevanju svih ovih godina.

Veliko hvala Ines Kuk i Vesni Jurišević na savjetima, pomoći i podršci.

Od sveg srca hvala mojoj majci Rajki, na moralnoj podršci, strpljenju i bezuvjetnoj potpori kad je bilo najteže.

Mojim prijateljima koji su brinuli, veselili se sa mnom, bodrili i vjerovali u mene cijelo ovo vrijeme. Hvala vam!

„Vjerujem da ono što postajemo ovisi o tome što nas nauče naši očevi u neobičnim svakodnevnim trenucima. Formiraju nas sitni komadići njihove mudrosti „

Umberto Eco

Tata, tebi!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu **Doktorski rad**
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Poslijediplomski sveučilišni studij

KARAKTERIZACIJA PROBIOTIČKE BAKTERIJE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* O1 ZA BIOLOŠKO KONZERVIRANJE PROIZVODA AKVAKULTURE

Iva Čanak, mag.ing.bioproc.

Kratki sažetak

Cilj ovog rada, uz polazno ljetno i zimsko utvrđivanje prisutnosti mikroorganizama odgovornih za zdravstvenu ispravnost ribe i školjkaša, bio je iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša, izolirati, identificirati i karakterizirati prisutne bakterije mliječne kiseline (BMK) te odabrati onu s najvećim konzervirajućim potencijalom. Izolat autohtone mikroflore pripremljen je od komercijalno najzastupljenijih vrsta u hrvatskoj marikulturi-lubina (*Dicentrarchus labrax*), orade (*Sparus aurata*), dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*). Utvrđena je prisutnost pet sojeva BMK: *Lactobacillus plantarum* O1, *L. plantarum* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *L. plantarum* K4 i *L. plantarum* D1. Potom je obavljena karakterizacija svake pojedinačne izolirane BMK kulture sukladno selekcijskim kriterijima za odabir BMK za primjenu u akvakulturi. Rezultati ovog rada upućuju na veliki potencijal primjene BMK morskog porijekla u akvakulturi-kao probiotika s ciljem preveniranja i smanjivanja bolesti morskih životinja ili kao bioloških konzervansa s ciljem dobivanja novih vrsta ekološki održivih proizvoda prirodno produljenog roka trajnosti.

Broj stranica:107
Broj slika: 16
Broj tablica: 23
Broj literaturnih navoda: 212
Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: akvakultura, *Lactobacillus plantarum*, mikrobiota, probiotici

Datum obrane: 4.12.2020.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Ksenija Markov
2. prof.dr.sc. Jasna Beganović
3. dr.sc. Ana Gavrilović, izv.prof.
4. prof.dr.sc. Anita Slavica (zamjenski član)

Rad je pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb i u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb **PhD thesis**
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Postgraduate University Study

CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC BACTERIUM *LACTOBACILLUS PLANTARUM* O1 FOR BIOLOGICAL CONSERVATION OF AQUACULTURE PRODUCTS

Iva Čanak, M. Bioproc.Eng.

Short abstract

The aim of this study, in addition to the initial summer and winter determination of the presence of microorganisms responsible for the health of fish and shellfish, was to isolate, identify and characterize the lactic acid bacteria (LAB) present in isolates of the autochthonous microflora of the digestive system, skin mucus and gills of fish and shellfish, and choose the one with the greatest preservative potential.The isolate of autochthonous microflora was prepared from the most commercially represented species in Croatian mariculture - sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*), mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*). The presence of five LAB strains was determined: *Lactobacillus plantarum* O1, *L. plantarum* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *L. plantarum* K4 and *L. plantarum* D1. The characterization of each individual isolated pure LAB culture was then performed according to the selection criteria for the selection of LAB for use in aquaculture. The results of this work point the great potential of marine origin LAB in aquaculture - as a probiotic to prevent and reduce diseases of marine animals or as biological preservatives to obtain new types of environmentally sustainable products with naturally extended shelf life.

Number of pages:107
Numer of figures:16
Number of tables: 23
Number of references:212
Original in: Croatian

Keywords: aquaculture, *Lactobacillus plantarum*, microbiota, probiotics

Date of thesis defence: 4.12.2020.

Reviewers:

1. PhD. Ksenija Markov, Full professor
2. PhD. Jasna Beganović, Full professor
3. PhD. Ana Gavrilović, Associate professor
4. PhD. Anita Slavica, Full professor (substitute)

Thesis is deposited in Library of Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Tema doktorskog rada pod naslovom „Karakterizacija probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* O1 za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture“ prihvaćena je na sjednici Fakultetskog Vijeća Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu održanoj 24. travnja 2019. godine, a Senat Sveučilišta u Zagrebu donio je odluku o pokretanju postupka stjecanja doktorata znanosti na sjednici održanoj 28. travnja 2020.

Sažetak

Kao alternativa kemoterapeuticima i cijepljenju, a s ciljem kontrole bolesti, u akvakulturi se u posljednje vrijeme sve više primjenjuju probiotici. Korištenjem bakterija mliječne kiseline (BMK) izoliranih iz morskog okoliša osigurava se njihova bolja prilagodba i veća učinkovitost. Kao učinkoviti probiotici, BMK moraju zadovoljavati nekoliko osnovnih kriterija kako bi preživjele u uvjetima staništa u kojem se primjenjuju i kako bi mogle manifestirati karakteristike poželjne prilikom uzgoja morskih organizma. Nadalje, svakodnevna pojava novih akvatičkih vrsta i zahtjevi potrošača za zdravom, prirodnom i sigurnom hranom bez primjene kemijskih konzervansa, stavili su naglasak na alternativne metode. Ovakve strategije uključuju korištenje prirodnih bakterijskih bioloških konzervansa koji su sigurni za konzumaciju jer predstavljaju dio prirodne, korisne mikroflore u ljudskoj ishrani. Stoga je cilj ovog rada, uz polazno ljetno i zimsko utvrđivanje prisutnosti mikroorganizama odgovornih za zdravstvenu ispravnost ribe i školjkaša, iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša, izolirati, identificirati i karakterizirati prisutne BMK te odabrati onu s najvećim konzervirajućim potencijalom. U izolatu autohtone mikroflore pripremljenom od komercijalno najzastupljenijih vrsta u hrvatskoj marikulturi-lubina (*Dicentrarchus labrax*), orade (*Sparus aurata*), dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*), utvrđena je prisutnost pet bakterijskih izolata: *Lactobacillus plantarum* O1, *L. plantarum* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *L. plantarum* K4 i *L. plantarum* D1. Sljedeći korak istraživanja bio je pojedinačna karakterizacija izolata čistih BMK kultura sukladno selekcijskim kriterijima za odabir BMK za primjenu u akvakulturi. Kako bi se uspješno koristili kod morskih proizvoda, izolati moraju zadovoljavati sljedeće uvjete: *in situ* preživljavanje u gastrointestinalnom traktu i u morskoj vodi, imati antimikrobnu aktivnost prema najčešćim morskim patogenim mikroorganizmima i dobro adherirati na površinu organizma. Osim navedenih karakteristika mikrorganizmi ne smiju imati sposobnost proizvodnje biogenih amina kao niti hemolitičku aktivnost. Osim navedenih kriterija, sojevi korišteni prilikom biološkog konzerviranja morskih proizvoda također moraju biti otporni na stresne ambijentalne uvjete poput visokih temperatura i niskih pH vrijednosti. Svi bakterijski izolati su uspješno zadovoljili sve kriterije, ali se tijekom testiranja najboljim sojem pokazao *L. plantarum* O1. Na osnovu svega navedenog, može se zaključiti kako BMK morskog porijekla imaju veliki potencijal primjene u akvakulturi, bilo da je riječ o zaštitnoj ulozi kao probiotici ili kao biokonzervansi s ciljem dobivanja inovativnih, zdravih proizvoda prirodno produljenog roka trajnosti.

Abstract

As an alternative to chemotherapeutics and vaccination, and with the aim of controlling the disease, probiotics have been increasingly used in aquaculture lately. The use of lactic acid bacteria (LAB) isolated from the marine environment ensures their better adaptation and greater efficiency. As effective probiotics, LAB must meet several basic criteria in order to survive in the habitat conditions in which they are applied and to be able to manifest the characteristics desirable in the cultivation of marine organisms. Furthermore, the daily emergence of new aquatic species and consumer demands for healthy, natural and safe food without use of chemical preservatives have placed emphasis on alternative methods. Such strategies include use of natural bacterial biological preservatives that are safe to consume because they are part of the natural, beneficial microflora in the human diet. Therefore, the aim of this work, in addition to the initial summer and winter determination of the presence of microorganisms responsible for the health of fish and shellfish, was to isolate, identify and characterize present LAB from isolates of autochthonous microflora of the digestive system and mucus skin and gills of fish and shellfish, and choose one with best preservative potential. In isolates of autochthonous microflora prepared from the most commercially represented species in Croatian mariculture - sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*), mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*), the presence of five bacterial isolates was found: *Lactobacillus plantarum* O1, *L. plantarum* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *L. plantarum* K4 and *L. plantarum* D1. The next step of the research was the individual characterization of isolates of pure LAB cultures according to the selection criteria for the selection of LAB for application in aquaculture. To be used successfully in marine products, isolates must meet the following conditions: *in situ* survival in gastrointestinal tract and in seawater, antimicrobial activity against the most common marine pathogenic microorganisms and good adherence to the surface of the organism. In addition to the above characteristics, microorganisms must not have the ability to produce biogenic amines or hemolytic activity. In addition to the above criteria, strains used in the biological preservation of marine products must also be resistant to stressful environmental conditions such as high temperatures and low pH values. All bacterial isolates successfully met all the criteria, but *L. plantarum* O1 proved to be the best strain during testing. Based on all the above, it can be concluded that marine origin LAB have great potential for application in aquaculture, whether with protective role as probiotics or as biopreservatives in order to obtain innovative, healthy products with naturally extended shelf life.

Sadržaj

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 3
2.1. Biokonzerviranje 3
2.1.1. Dosadašnja istraživanja u području biokonzerviranja proizvoda akvakulture 5
2.2. Fermentirani proizvodi akvakulture 7
2.2. Mikrobna populacija svježe ribe i školjkaša 9
2.3. Bakterije mliječne kiseline 10
2.3.1. Sistematika bakterija mliječne kiseline 10
2.3.2. Antimikrobne tvari bakterija mliječne kiseline 12
2.3.2.1. Organske kiseline 12
2.3.2.2. Bakteriocini 12
2.3.2.3. Ostali antimikrobni spojevi 12
2.3.2. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz morskih proizvoda 13
2.4. Patogene bakterije u morskim proizvodima 15
2.5. Bakterije mliječne kiseline kao probiotici u kontroli bolesti 17
2.5.1. Promotori rasta 18
2.5.2. Probava hranjivih tvari 19
2.5.3. Kvaliteta morske vode 19
2.5.4. Tolerancija na stres 19
3. MATERIJALI I METODE 21
3.1. Materijali 21
3.1.1. Uzorci 21
3.1.2. Mikroorganizmi 22
3.1.3. Hranjive podloge 22
3.1.4. Uređaji 25
3.1.5. Pribor 26
3.1.6. Kemikalije 26
3.2. Metode rada 28
3.2.1. Izolacija i identifikacija mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane 28
3.2.1.1. Mikrobiološke metode 28
3.2.1.2.Fenotipske metode 28
API 20E 28
API Listeria 28

3.2.2. Izolacija i identifikacija BMK iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša 30
3.2.2.1. Fenotipske metode 30
API 50 CHL 30
API STREP 31
3.2.2.1.1. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) 31
3.2.2.1.2. Izolacija površinskih proteina s bakterijskih stanica 31
3.2.2.1.3. Izolacija ukupnih staničnih proteina 32
3.2.2.2. Genetičke metode 32
3.2.2.2.1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata 32
3.2.2.3. Proteomičke metode 32
3.2.2.3.1. MALDI TOF/TOF 32
3.2.2.3.2. LC-MS ESI (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Electrospray Ionisation)-tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem 34
3.2.3. Karakterizacija izolata bakterija mliječne kiseline 36
3.2.3.1. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline pri različitim temperaturama 36
3.2.3.2. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline pri različitim pH vrijednostima 36
3.2.3.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom 36
3.2.3.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti bakterijskih izolata 36
3.2.3.4.1. Priprava bakterija mliječne kiseline za ispitivanje antimikrobne aktivnosti 37
3.2.3.4.2. Turbidimetrijska metoda 37
3.2.3.5. Ispitivanje prisutnosti bakteriocina 37
3.2.3.5.1. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK) za određivanje prisutnosti bakteriocina 37
3.2.3.5.2. Oligonukleotidi 37
3.2.3.5.3. Detekcija gena za sintezu bakteriocina lančanom reakcijom polimeraze . 38
3.2.3.5.4. Elektroforeza u gelu agaroze 39
3.2.3.5.5. LC-MS ESI (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Electrospray Ionisation)-tekućinska kromatografija spregnuta spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem 39
3.2.3.6. Ispitivanje osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama 39
3.2.3.7. Određivanje biogenih amina pomoću selektivnih podloga 39
3.2.3.8. Hemolitička aktivnost 40

3.2.3.9. Preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije 40
3.2.3.10. Preživljavanje bakterijskih izolata u *in situ* uvjetima 40
3.2.3.10.1. Preživljavanje bakterijskih izolata u žučnim solima ribe 40
3.2.3.10.2. Preživljavanje bakterijskih izolata u želučanom soku ribe 40
3.2.3.10.3. Preživljavanje bakterijskih izolata u morskoj vodi 41
3.2.3.10.4. Test adhezije bakterijskih izolata na sluz svježe ribe 41
3.2.4. Statistička obrada podataka 42
4. REZULTATI 43
4.1. Izolacija te fenotipska i genotipska identifikacija mikrobne populacije 43
4.2. Karakterizacija bakterijskih izolata 51
4.2.1. Antimikrobna aktivnost izoliranih bakterijskih izolata 52
4.2.2. Procjena sigurnosti bakterijskih izolata 62
4.2.4. Preživljavanje bakterijskih izolata tijekom liofilizacije 63
4.2.3. *In situ* karakterizacija bakterijskih izolata 64
4.2.4. Dodatna karakterizacija bakterijskog izolata *L. plantarum* O1 68
5. RASPRAVA 70
5.1. Izolacija i identifikacija mikrobne populacije izabranih proizvoda akvakulture 70
5.2. Karakterizacija bakterijskih izolata kao potencijalnih probiotičkih sojeva za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture 76
6. ZAKLJUČCI 86
7. LITERATURA 87

1. UVOD

Rast interesa potrošača za zdravom hranom i paralelna pažnja posvećena pitanjima kakvoće hrane doprinjela je povećanoj potrošnji ribe i ribljih proizvoda. Ova kategorija proizvoda smatra se visoko hranjivom i često preporučljivom od strane nutricionista. Međutim, poznato je da su riba i morski proizvodi osjetljivi na kvarenje uslijed mikrobiološke i biokemijske razgradnje (Dalgaard i sur., 2006; Mejlholm i sur., 2008). U skladu s tim, razvoj učinkovitih tretmana prerade za produljenje roka trajanja svježih ribljih proizvoda postao je nužan. Povrh toga, potrošači sve više traže visokokvalitetne, ali minimalno prerađene morske plodove (Campos i sur., 2012). U tom kontekstu, niže razine soli, masti, kiselina i šećera i/ili potpuno ili djelomično uklanjanje kemijskih aditiva postali su presudni. Posljednjih godina tradicionalni postupci poput soljenja, dimljenja i konzerviranja koji se primjenjuju na proizvodima akvakulture smanjili su se u korist takozvanih blagih tehnologija koje uključuju primjenu nižih koncentracija soli, niže temperature grijanja i pakiranja pod vakuumom ili pod modificiranom atmosferom (Dalgaardi sur., 2006). Međutim, nedostatak ovih tehnologija je oslabljena higijena i sigurnost koja može dovesti do porasta broja bolesti povezanih s hranom (Cortesi i sur., 2009). Stoga je u posljednje vrijeme sve veći naglasak na novim tehnologijama za povećanje sigurnosti hrane i produljenje roka trajanja. Do sada su se pristupi za smanjenje rizika od izbijanja trovanja hranom oslanjali na dodavanje učinkovitih kemijskih konzervansa ili na primjenu fizikalnih tretmana poput grijanja, hlađenja, primjene visokog hidrostatskog tlaka, ionizirajućeg zračenja, ozona, ultrazvučne tehnologije itd. Unatoč nekim mogućim prednostima, takvi tretmani imaju nekoliko nedostataka i ograničenja kada se primjenjuju na morskim proizvodima. Međutim potrebno je istaknuti toksičnost nekih najčešće korištenih kemijskih konzervansa poput nitrita (Cleveland i sur., 2001) i promjene senzorskih i hranjivih svojstava plodova mora. Zbog osjetljive prirode proizvoda akvakulture, fizikalni tretmani mogu prouzrokovati znatne gubitke u kvaliteti poput oštećenja uslijed smrzavanja ili obezbojenja u slučaju visokog hidrostatskog tlaka i ionizirajućeg zračenja) (Zhou i sur., 2010).

Među alternativnim strategijama očuvanja hrane posebna se pozornost posvetila tehnikama biološkog očuvanja, koje produžuju rok trajanja i poboljšavaju higijensku kvalitetu, minimizirajući pritom negativan utjecaj na nutritivna i senzorna svojstva. Biokonzerviranje se odnosi na upotrebu prirodne ili kontrolirane mikroflore i/ili njezinih antimikrobnih metabolita (Nilsson i sur., 2005; Garcia i sur., 2010). Bakterije mliječne kiseline (BMK) su zanimljivi kandidati koji se mogu koristiti za ovaj pristup. Često su prisutne u prehrambenim proizvodima i kompetitivnom inhibicijom mogu konkurirati patogenim mikroorganizmima, stvarajući širok spektar antimikrobnih metabolita poput organskih kiselina, diacetila, acetoina, vodikovog

peroksida, antifungalnih peptida i bakteriocina. Osim što je potrebno spriječiti kvarenje proizvoda akvakulture kao prehrambenih proizvoda, potrebno je pronaći i adekvatni način njihove zaštite prilikom uzgoja. Novije strategije uključuju odabir BMK prirodno prisutnih u morskim proizvodima, kako bi se osigurao njihov dobar rast u morskoj matrici. U svrhu zaštite proizvoda akvakulture tijekom njihova uzgoja, kao rješenje se nameće primjena probiotičkih bakterija izoliranih iz gastrointestinalnog trakta morskih organizama. Takvi sojevi su se već pokazali uspješnijima od onih izoliranih iz drugih kralježnjaka jer su prilagođeni uvjetima njihove primjene kao probiotičkih pripravaka (Fjellheim i sur., 2010).

Stoga je cilj ovog rada, uz polazno ljetno i zimsko utvrđivanje prisutnosti mikroorganizama odgovornih za zdravstvenu ispravnost ribe i školjkaša, bio iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša, izolirati, identificirati i karakterizirati prisutne BMK te odabrati onu s najvećim konzervirajućim potencijalom za primjenu u akvakulturi i konzerviranju proizvoda akvakulture.

2. OPĆI DIO

2.1. Biokonzerviranje

Mikrobna sigurnost i stabilnost hrane temelje se na primjeni različitih tehnologija i konzervansa. Većina tehnologija za dekontaminaciju poput onih najstarijih kao što je kuhanje i novijih blažih tehnologija poput visokog tlaka, ozona i ultrazvuka nisu u potpunosti učinkovite ili kompatibilne s nježnom teksturom i okusom morskih plodova. Kemijski konzervansi također nisu prihvatljivi obzirom na sve veće zahtjeve potrošača za prirodnim proizvodima. Alternativno rješenje koje dobiva sve više pažnje jest biokonzerviranje (Dortu i Thonart, 2009). Ova tehnologija se sastoji od inokulacije hrane mikroorganizmima i/ili njihovim metabolitima odabranim radi njihovih antibakterijskih svojstava. Bakterije mliječne kiseline (BMK) općenito su dobri kandidati jer neke od njih imaju sposobnost inhibiranja rasta mikroorganizama, prirodno su prisutne u mnogim prehrambenim proizvodima i ljudi ih godinama konzumiraju bez ikakvog sigurnosnog rizika. BMK imaju složene nutritivne potrebe i da bi se postigla njihova dobra implementacija, uglavnom se za biokonzerviranje koriste bakterije izolirane iz hrane kojoj se produljuje trajnost (Pilet i Leroi, 2011). Za razliku od mesa ili mliječnih proizvoda, proizvodi od morskih plodova uglavnom nisu fermentirani. Stoga je dodavanje bakterijskih kultura, čak i sa zaštitnim učincima, još uvijek novitet i nije još sasvim prihvaćeno od strane proizvođača, čiji je glavni cilj izbjegavanje bakterijske kontaminacije primjenom dobre higijenske prakse. Međutim, kod blago konzerviranih ribljih proizvoda, upotreba zaštitne kulture smatra se alternativom korištenju aditiva u hrani te polako dobiva interes riblje industrije (Pilet i Leroy, 2011). Kako bi postala održiva tehnologija biokonzerviranja mora se kombinirati s hlađenjem na +4 °C ili s tehnikama vakuumiranja. Nadalje, odabir potencijalnih zaštitnih bakterija u morskim proizvodima još uvijek je izazov, budući da se iste moraju prilagoditi matrici morskih plodova koja je siromašna šećerom, a njihova metabolička aktivnost ne bi smjela promijeniti početne karakteristike proizvoda, odnosno ne uzrokovati zakiseljavanje i kvarenje (El Bassi i sur., 2009). Također je važna sposobnost kulture u stvaranju dovoljno aktivnih antagonističkih metabolita protiv širokog spektra relevantnih patogena koje se prenose hranom. Uz to, sposobnost preživljavanja nepovoljnih uvjeta tijekom tehnoloških tretmana i održavanje inhibicijskih aktivnosti tijekom skladištenja od velikog su značaja (Ghanbari i sur., 2013).

Trenutno postoje tri glavna izazova koja ozbiljno ograničavaju primjenu biokonzerviranja morskih plodova: pitanja vezana za sigurnost mikroba, regulatorni aspekti i formulacija mikroorganizma. Općenito, postoje strogi regulatorni zahtjevi za upotrebu antimikrobnih kultura i supstancija koje se javljaju u prirodi, poput bakteriocina, u očuvanju hrane. Kao jedan

od ključnih regulatornih aspekata, kod odabira zaštitnih kultura za biološku zaštitu brzo kvarljivih proizvoda mora se uzeti u obzir njihov utjecaj na prehrambene i osjetilne značajke. Vjerojatno je to jedan od glavnih razloga zbog kojih su, unatoč većem broju istraživanja iz drugih prehrambenih sektora, informacije o primjeni BMK ili bakteriocina u morskoj hrani ograničene. U slučaju zaštitnih kultura, treba razmotriti sigurnosne aspekte (npr. proizvodnju histamina) bioprotektivnih kultura. Izravnom primjenom bakteriocina u morskoj hrani, isto tako, moraju se ispuniti regulatorni aspekti. Bakteriocini ne bi trebali imati štetne učinke na osjetilna svojstva hrane, moraju biti stabilni tijekom skladištenja, a aktivnost mora biti jednolika tijekom cijelog roka trajanja hrane. Američka agencije za hranu i lijekove (FDA) odobrila je 1988. godine nizin za upotrebu u pasteriziranim sirnim namazima, i to je trenutno jedini pročišćeni bakteriocin odobren za upotrebu u hrani u SAD-u, koji se koristi i za očuvanje trajnosti morskih proizvoda u obliku obložnih ili impregniranih filmova (Jones, i sur., 2005). Iako su postignuti značajni rezultati u kontroli rasta *L. monocytogenes* korištenjem zaštitnih kultura BMK ili/i njihovih bakteriocina u morskim plodovima, do danas ti potencijalni bioprotektivni bakterijski pripravci nisu uključeni u popis mikroorganizama za koje je ocijenjeno da su prikladni za QPS (engl. **q**ualified **p**resumption of **s**afety) status. Potrebna su opsežna istraživanja o antagonističkim učincima, precizni taksonomski podaci i snažni dokazi u pogledu sigurnosti za dobivanje ovog statusa.

Posljednjih godina tradicionalni postupci poput soljenja, dimljenja i konzerviranja morskih plodova smanjili su se u korist takozvanih blažih tehnologija koje uključuju primjenu nižih koncentracija soli, nižih temperatura zagrijanja i pakiranja pod vakuumom (VP) ili u modificiranoj atmosferi (MAP). Međutim, nedostatak ovih tehnologija su oslabljeni sigurnosni aspekti uslijed kojih može doći do povećanja bolesti povezanih s hranom (Ghanbari i sur., 2013). Stoga je biokonzerviranje moćan i prirodan alat za produljenje roka trajanja i za povećanje sigurnosti hrane primjenom mikroorganizama i njihovih metabolita, koji se prirodno javljaju u određenim namirnicama.

2.1.1. Dosadašnja istraživanja u području biokonzerviranja proizvoda akvakulture

U gotovim morskim proizvodima, kuhanje, konzervansi i uvjeti skladištenja inhibiraju gram-negativne bakterije, što rezultira dužim trajanjem. Takvi uvjeti pogoduju rastu psihrootrofnih patogena poput bakterija iz roda *Listeria*, omogućujući im da narastu do opasnih koncentracija (Francis i O'Beirne 1998). *L. monocytogenes* je u stanju preživjeti i rasti ispod 0 °C i do 45 °C. Ova sposobnost rasta na temperaturama skladištenja znači da je ova bakterija glavna opasnost u ovoj vrsti proizvoda. Neke zemlje imaju propisanu "nultu toleranciju" za bakterije roda *Listeria*, tj. u 25 g ispitivane namirnice ova bakterija ne smije biti prisutna. BMK mogu rasti pod istim uvjetima skladištenja kao i *Listeria* spp. Stoga su se mnoga istraživanja usredotočila na izolaciju ovih gram-pozitivnih bakterija i njihovih metabolita (bakteriocina) s ciljem dobivanja konkurentne flore protiv patogenih organizama ili antimikrobnih spojeva (Pilet i Leroi, 2011). Većina dosadašnjih istraživanja je usredotočena na primjenu bakteriocinogenih sojeva BMK različitog porijekla u inhibiciji *L. monocytogenes* dok je manji naglasak na primjeni autohtonih morskih izolata BMK u produljenju roka trajnosti proizvoda akvakulture. Sigurnost za potrošače jedan je od značajnih aspekata, a posebno za neke morske proizvode koji se ne kuhaju prije konzumacije. Kim i Hearnsberger (1994) su tretiranjem fileta soma s 0.5 % natrijevog acetata i 0.25 % kalijevog sorbata uz dodatak 2.50 % kulture BMK postigli potpunu inhibiranost gram-negativnih bakterija uz poboljšanje mirisa i izgleda soma tijekom 13 dana čuvanja. Einarsson i Lauzon (1995) su tretirali škampe različitim bakteriocinima iz BMK i zabilježili produženje roka trajanja, osim kod dodatka karnocina UI49.

Kışla i Ünlütürk (2004) proučavali su mikrobiološku ispravnost pastrve tretirane s vodenom otopinom *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCFB 497, nizina i mliječne kiseline. Autori su zapazili da uranjanje fileta pastrve u mliječnu kulturu nije produljilo rok trajanja zbog niske razine inokuluma i vrste korištene mliječne kulture. Elotmani i Assobhei (2004) pratili su inhibiciju mikrobne flore sardine primjenom nisina i laktoperoksidaznog sustava (LP), i zabilježili učinkovitost kombinacije nisin-LP u inhibiciji mikroflore kvarenja ribe. U drugom istraživanju soj *L. sakei* Lb706 koji proizvodi sakacin A, inhibirao je rast *L. monocytogenes* u prva tri dana skladištenja fileta pastrve na 10 °C, nakon čega se broj ove bakterije povećao na 10^7 CFU/g (Hisar i sur., 2005). Altieri i sur. (2005) su dodatkom *Bifidobacterium bifidum* uspješno inhibirali *Pseudomonas* spp. i *P. phosphoreum* u svježim filetima iverka (*Platichthys flesus*) skladištenog na niskim temperaturama u modificiranoj atmosferi.

Primjena dviju zaštitnih kultura *Lactobacillus sakei* CECT 4808 i *L. curvatus* CECT 904T na vakuum pakiranu kalifornijsku pastrvu (*Oncorhynchus mykiss*) rezultirala je produljenjem roka

trajnosti za pet dana, značajno poboljšavši broj svih mikroorganizama pokazatelja kvarljivosti (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., kvasci i plijesni i H_2S-bakterije), ispitivanih kemijskih parametara i smanjenje neugodnih mirisa (Katikou i sur., 2007). Anti-listerijska aktivnost tri BMK soja korištenih pojedinačno ili kao kokultura testirana je na hladno dimljenom lososu, umjetno kontaminiranom s *L. innocua* i pohranjenom u vakuumu na 4 °C. Autori su zaključili da je najdjelotvornija kombinacija bila *L. casei* T3 i *L. plantarum* PE2 (Vescovo i sur., 2006). U radu autora Shirazinejad i sur. (2010) 2,0 % mliječna kiselina u kombinaciji s nizinom pokazala je najveće smanjenje populacije *Pseudomonas* spp. i H_2S-bakterija tijekom hladnog skladištenja kozica.

Inokulacija fileta tilapije (*Oreochromis niloticus*) s *Lactobacillus casei* DSM 120011 i *Lactobacillus acidophilus* 1M u koncentraciji od 2 % smanjila je vrijednosti ukupno hlapljive baze dušika (TVB-N), trimetilamina (TMA-N) i tiobarbituratne kiseline (TBA) i poboljšala biokemijske kriterije svježine, mikrobnu kvalitetu i sigurnost zamrznutih fileta ribe tijekom skladištenja od 45 i 90 dana (Ibrahim i Salha, 2009).

Budu-Amoako i sur. (1999) testirali su nizin u kombinaciji s toplinom kao anti-listerijski tretman u hladno pakiranom jastogu, uspješno smanjujući koncentraciju inokulirane *L. monocytogenes*. Istu su bakteriju u hladno dimljenom lososu uspješno inhibirali i Yamazaki i sur. (2003) dodatkom bakteriocinogenog soja *C. maltaromaticum* CS526 izoliranog iz surimija.

Sudalayandi (2011) uspješno je sačuvao svježinu indijske skuše (*Rastrelliger kanagurta*) suzbijanjem rasta bakterija koje uzrokuju kvarenje i sintezu amina tijekom dva dana na 37 °C inokulacijom različitih sojeva BMK: *Pediococcus acidilactici*, *P. pentosaceous*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *L. acidophilus* i *L. helveticus*. Anacarso i sur. (2014) su uočili da su pri temperaturama hlađenja zaštitna kultura *L. pentosus* 39 i njezin bakteriocin značajno smanjili broj *A. hydrophila* i *L. monocytogenes*, dok su Hwanhlem i sur. (2015) uspješno proveli biokonzerviranje kuhanih, oguljenih i ioniziranih tropskih bijelih kozica (*Penaeus vannamei*) primjenom *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L, izoliranog iz šume mangrova.

BMK zaštitne kulture nisu primijenjene u raznolikom broju morskih proizvoda, a najviše se koriste za biooočuvanje hladno dimljenog lososa. Učinkovitost bakteriocina u kontroli rasta *L. monocytogenes* kod hladno dimljenog lososa u vakuumu, potvrdilo je nekoliko istraživača. Utvrđeno je da je sakacin P vrlo moćan protiv *L. monocytogenes* i jedan je od najviše proučenih bakteriocina (Blom i sur., 1997; Eijsink i sur., 1998; Gänzle i sur.,1999; Aasen i sur., 2000;

Katla i sur., 2001). Nadalje, mnogi uspješni rezultati dobiveni su u laboratoriju ali njihova primjena u morskoj industriji i dalje je ograničena (Pilet i Leroi, 2011).

Iz navedenih istraživanja vidljivo je da upotreba bakteriocina i bakteriocinogenih sojeva BMK kao biokonzervansa može povećati sigurnost i produžiti vijek skladištenja morskih proizvoda. Međutim, zabilježeno je da neki sojevi BMK utječu na proizvodnju biogenih amina, amonijaka i / ili trimetilamin oksida (TMA-O) u morskim proizvodima (Leroi, 2010; Küley i sur. 2013). Stoga je odabir odgovarajućeg soja BMK koji će se koristiti kao bioprotektivna kultura jedan od najvažnijih parametara koji se trebaju uzeti u obzir prilikom primjene BMK u proizvodima akvakulture.

2.2. Fermentirani proizvodi akvakulture

Za razliku od mliječnih, mesnih, i biljnih proizvoda, BMK se ne koriste često za fermentiranje morskih proizvoda. Postoje neki tradicionalni fermentirani proizvodi, poput soljenih inćuna i ribljih umaka vrlo popularnih u azijskim zemljama. Nedavno se u Japanu proizvodnja ribljeg umaka drastično povećala jer ribarska industrija pokušava u potpunosti smanjiti otpad iskorištavajući sav riblji materijal. Halofilne BMK, uglavnom *Staphylococcus* spp. i *Tetragenococcus* spp. izolirane su kao dominantne bakterije tijekom fermentacije (Taira i sur., 2007), ali njihova je stvarna uloga i dalje upitna. Veliki dio razgradnje je uglavnom posljedica prisutnosti endogenih enzima u ribi. Međutim, jasno je da određeni halotolerantni sojevi poput *Tetragenococcus halophilus* i *T. muriaticus* doprinose snižavanju pH vrijednosti i smanjuju rizik od truljenja fermentirajućeg ribljeg umaka, posebno kada se dodaje dodatni izvor ugljikohidrata, poput sojinog umaka (Uchida i sur., 2005).

Tradicionalni, blago slani fermentirani riblji proizvodi rasprostranjeni su u jugoistočnoj Aziji. Obično se prave od slatkovodnih vrsta ribe, soli (2–7 %), izvora ugljikohidrata (riža, proso, šećer ili voće) i začina (češnjak, đumbir, čili, papar). Smjesa se čvrsto pakira u lišće banane ili plastične vrećice i ostavlja da fermentira dva do pet dana na 30 °C prije nego što se konzumira kao glavno jelo ili užina. U tim vrstama proizvoda Paludan-Müller i sur. (1999) su izolirali BMK pri čemu je dominantni soj bio *L. lactis* subsp. *lactis*. Bilo je i pokušaja razvoja novih fermentiranih morskih proizvoda, poput zaslađenih fileta lososa, inokuliranih različitim komercijalnim starterima laktobacila (Morzel i sur., 1997). Međutim, istraživanja su ostala u laboratorijskoj fazi.

Riba je izvor visokokvalitetnih bjelančevina, esencijalnih minerala, vitamina i polinezasićenih masnih kiselina. Stoga se novija istraživanja bave razvojem novih proizvoda koji idealno trebaju zadržati sva hranjiva svojstva ribe, ali ne i njihov tipičan miris. Glatman i sur. (2000) i Gelman i sur. (2001) inokulirali su žutoperajnu tunu s visokom razinom *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* i *L. mesenteroides* i dokazali su da soj *L. mesenteroides* može uspješno fermentirati meso tune, uz razvoj novih mirisa i teksture te smanjenje razine histamina. Najbolji rezultati dobiveni su nakon pet tjedana fermentacije pri 8 °C.

Riblja silaža istraživala se od pedesetih godina prošlog stoljeća i trebala je pružiti komercijalnu alternativu nekim nusproizvodima riblje industrije. Različiti sojevi *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *Pediococcus halophilus* i *P. acidilactici* testirani su s određenim uspjehom zbog njihove sposobnosti bržeg snižavanja pH vrijednosti ribljeg mesa. Međutim, niska razina šećera u matrici zahtijeva dodavanje ugljikohidrata, poput škroba, slada ili melase. Unatoč tome, u anaerobnim uvjetima koji pogoduju fermentaciji BMK, rizik od onečišćenja bakterijama *Bacillus* i *Clostridium* se ne može izbjeći. Promjene u kulinarskim navikama potaknule su prehrambenu industriji na proizvodnju različite vrste hrane od kojih su mnoge već spremne za jelo poput blago konzerviranih ribljih proizvoda (LPFP) uključujući i marinirane riblje proizvode (Gavrilović i sur., 2016). Mariniranje je jedan od najstarijih načina očuvanja ribe u Europi. Tijekom procesa zrenja pravilan prodor soli, kiselina i drugih sastojaka poboljšava teksturu i osjetilnu kvalitetu mariniranih proizvoda. Budući da mariniranje nije toplinski proces, sigurnost i trajnost ovako tretiranih plodova mora ovisi o tipu i koncentraciji organske kiseline, koncentraciji NaCl i finalnoj pH vrijednosti. Inhibitorni učinak tih tvari na bakterije i aktivnost enzima povećava se s koncentracijom (Andrighetto i sur., 2009). Pored tog učinka, također je potrebno promijeniti teksturu i strukturna svojstva sirovine, što rezultira proizvodom posebnog okusa i produženog roka valjanosti. S obzirom na veliku potražnju za ovom hranom, poraslo je i zanimanje industrije za BMK kao prirodnim konzervansima (Leroi, 2010). Poznato je da BMK proizvode antimikrobne tvari uključujući bakteriocine koji mogu inhibirati rast nekoliko patogenih bakterija rodova *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria* i *Staphylococcus* (Noonpakdee i sur., 2009).

Stoga su istraživanja ovakvih fermentiranih proizvoda usmjerena na potragu za psihtrotrofnim sojevima pogodnim za brzu fermentaciju ribe i inhibiciju patogenih mikroorganizama. Mnogi od mikroorganizama koji su prirodno prisutni u fermentiranim morskim proizvodima mogu se koristiti kao starteri u tradicionalnim ili komercijalnim proizvodima. Ti mikroorganizmi poboljšavaju prihvatljivost proizvoda ispunjavajući određene zahtjeve, poput odsutnosti

proizvodnje biogenih amina. Od ostalih poželjnih svojstava, moraju biti osjetljivi na antibiotike i / ili imati antimikrobnu aktivnost protiv nekih ciljnih patogenih mikroorganizama (Frece i sur., 2019, u postupku objave). Raznolikost i raznovrsnost tradicionalnih i komercijalnih ribljih fermentiranih proizvoda uzrokuje i raznolikost mikroorganizama povezanih s tim proizvodima. Mnogi od njih pripadaju skupini BMK, vrlo često rodu *Lactobacillus*, sa širokom metaboličkom aktivnošću i sposobnošću kolonizacije nekoliko staništa. Novije strategije uključuju odabir BMK prirodno prisutnih u morskim proizvodima, kako bi se osigurao njihov dobar rast u morskoj matrici pohranjenoj na niskim temperaturama.

2.2. Mikrobna populacija svježe ribe i školjkaša

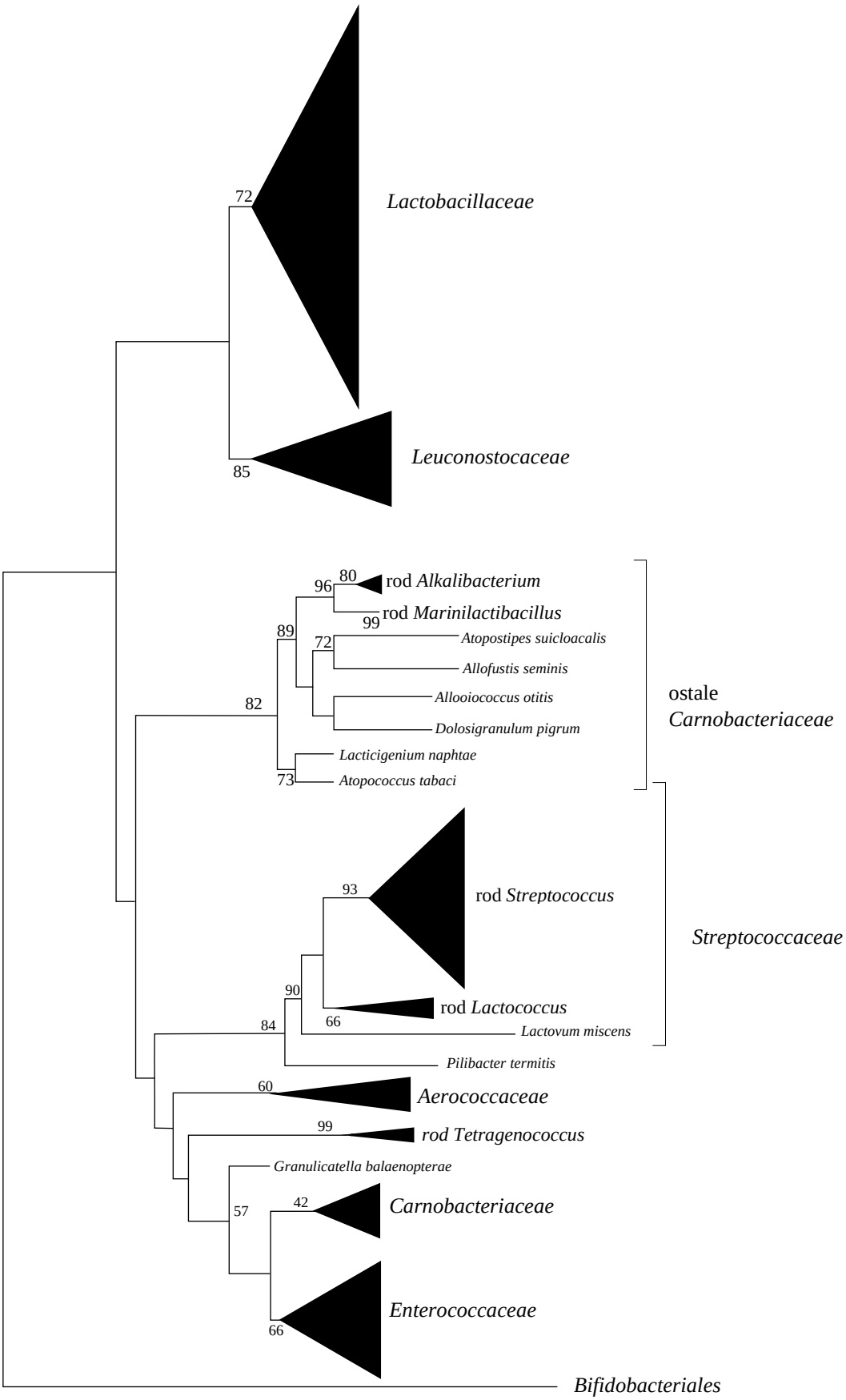
Mikrobiota morske ribe iz umjerenih voda obično se sastoji od gram-negativnih psirotrofnih bakterija čiji je rast moguć pri 0 °C i optimalan oko 25 °C. Većina pripada proteobakterijama: *Pseudomonas, Shewanella, Acinetobacter, Aeromonas, Vibrio, Moraxella, Psychrobacter, Photobacterium* itd., te u manjoj mjeri CFB skupini (*Cytophagae Flavobacter* i *Bacteroides*). Gram-pozitivne bakterije, kao što su *Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus, Lactobacillus* i *Clostridium*, također mogu biti prisutne u različitim omjerima (Huber i sur., 2004; Wilson i sur., 2008). Isti bakterijski rodovi mogu se naći u tropskim morskim ribama, pri čemu su rodovi *Enterobacteriaceae* i *Vibrionacea* često dominantni (Liston, 1980). Autohtona mikrobiota gastrointestinalnog trakta proučenija je od one na koži ili sluzi zbog njene važnosti u probavi, prehrani i bolestima u akvakulturi (Spanggaard i sur., 2000). Iako je ovo okruženje djelomično anaerobno, veliki broj istraživača je uočio prevladavanje aerobnih bakterija prisutnih u okolnoj vodi. To bi mogla biti posljedica tehnika prikupljanja, koje nisu uvijek prikladne za striktne anaerobe **(**Burr i sur., 2005). Ipak, Huber i sur. (2004) su molekularnim metodama dokazali kako je aerobna mikrobiota kalifornijske pastrve predstavljala 50 do 90 % ukupne mikrobiote. Općenito, gram-negativne bakterije (*Vibrio, Acinetobacter* i *Enterobacteriaceae*) dominiraju mikrobiotom svježe ribe (Ringø i Birkbeck, 1999). To su fermentativne bakterije koje se brzo razvijaju u gastrointestinalnom traktu zbog niskog pH, nedostatka kisika i obilja hranjivih sastojaka. Mikroflora mekušaca slična je onoj ribe, pri čemu je *Vibrio* spp. brojniji i često dominira mikroflorom školjkaša. Kako je uzgoj školjkaša obično povezan s obalnim područjem, njihova mikroflora može odražavati kopnene utjecaje, te se može zabilježiti i prisutnost rodova *Enterobacteriaceae* i *Streptococcacae* (ICMSF, 2005).

2.3. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporogene bakterije koje rastu u obliku koka, kokobacila ili bacila s DNK baznim sastavom manjim od 55 mol% G + C. Uglavnom su anaerobi i nemaju enzim katalazu (Makarova i sur. 2006; Slover i Danziger 2008). Fermentiraju glukozu prvenstveno do mliječne kiseline ili mliječne kiseline, CO_2 i etanola. Sve BMK rastu anaerobno, ali za razliku od većine anaeroba, mogu rasti u prisutnosti O_2 kao "aerotolerantni anaerobi". Iako im nedostaje katalaza, posjeduju superoksid dismutazu i imaju alternativna sredstva za detoksikaciju peroksidnih radikala, uglavnom putem enzima peroksidaze (Hwanhlem i Aran, 2015). BMK se prirodno pojavljuju u velikom broju sirovina poput mlijeka, mesa i brašna koje se koriste u proizvodnji hrane. BMK se koriste kao starter kulture u prehrambenoj industriji za proizvodnju fermentirane hrane, uključujući mliječne proizvode (jogurt, sir), meso (kobasice), ribu, žitarice (kruh i pića poput piva), voće (malolaktična fermentacija u proizvodnji vina) i povrće (kiseli kupus, kimchi) (Manivasagan i sur., 2014). Zaštita hrane od kvarenja i patogenih mikroorganizama posljedica je proizvodnje organskih kiselina, vodikovog peroksida, diacetila, antifungalnih spojeva i / ili bakteriocina. (Hwanhlem i Aran, 2015). Osim njihove primjene kao biokonzervansa važan je i njihov doprinos teksturi i organoleptičkim svojstvima proizvoda (Šušković, 2019; Frece i sur., 2010a,c).

2.3.1. Sistematika bakterija mliječne kiseline

Općenito je poznato da je sposobnost sinteze mliječne kiseline iz ugljikohidrata karakteristika koju dijele skupine gram pozitivnih bakterija i nema filogenetsko značenje. S druge strane, filogenetska stabla čine okosnicu suvremene bakterijske sistematike, pa su, taksonomski gledano, bakterije koje stvaraju mliječnu kiselinu raspoređene u šest obitelji: *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* (Slika 1). Tijekom posljednjih nekoliko godina, kontinuirani opis novih vrsta značajno je izmijenio filogenetsku strukturu, a posebno obitelji *Carnobacteriaceae* i *Enterococcaceae* (Felis i sur., 2015).



Slika 1. Filogenetsko stablo bakterija mliječne kiseline zasnovano na 16S rRNA sekvenciranju (Felis i sur., 2015)

2.3.2. Antimikrobne tvari bakterija mliječne kiseline

2.3.2.1. Organske kiseline

Važna uloga BMK je i brza proizvodnja organskih kiselina koje inhibiraju rast neželjene mikroflore i povećavaju sigurnost proizvoda i rok trajanja. Vrste i količine organskih kiselina dobivenih tijekom procesa fermentacije ovise o prisutnim BMK sojevima, sastavu kulture i uvjetima rasta (Ghambari i sur., 2013). L (+) mliječna kiselina ima jače inhibitorno djelovanje u odnosu na svoj D (-) stereoizomer (Ouwehand i Vesterlund, 2004). Antimikrobni učinak organskih kiselina posljedica je smanjenja pH i djelovanja nedisociranih molekula kiseline (Podolak i sur., 1996). BMK proizvodnjom kiselina snižavaju pH vrijednost na razinu pri kojoj inhibiraju rast bakterija uzročnika putrefakcije (*Clostridium*, *Pseudomonas*), patogenih (*Salmonella*, *Listeria* spp.) i toksikogenih bakterija (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*) (Gálvez i sur, 2007). Nadalje, nedisocirana kiselina, zbog svoje topljivosti u masnoćama, difundira u bakterijsku stanicu, smanjujući na taj način unutarstanični pH i usporavajući metaboličke aktivnosti.

2.3.2.2. Bakteriocini

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani peptidi koji posjeduju antimikrobno djelovanje prema sojevima iste i/ili različite vrste (Campos i sur., 2012). Procijenjeno je da između 30 % i 99 % svih bakterija i arheja proizvodi bakteriocine, a najbrojnija su istraživanja o BMK kao producentima zbog njihove potencijalne primjene u prehrambenim proizvodima (Collins i sur., 2010). Primijećeno je da je aktivnost bakteriocina često usmjerena prema bakterijama koje su vrstom bliske soju koji proizvodi bakteriocin ili prema bakterijama koje se nalaze u sličnom okruženju (Drider i sur., 2006). Također je uočeno da neki bakteriocini igraju ulogu u signalizaciji stanica. Klasificiraju se prema vrsti producenta, molekulskoj masi, slijedu aminokiselina i organizaciji genskog klastera (Nes i sur., 2007). Bakteriocini koje proizvode BMK razvrstani su u tri glavne skupine: bakteriocini koji sadrže lationin ili lantibiotici, mali termostabilni peptidi i veliki termolabilni peptidi (Drider i sur., 2006).

2.3.2.3. Ostali antimikrobni spojevi

Vodikov peroksid (H_2O_2) nastaje iz laktata u prisutnosti kisika kao rezultat djelovanja flavoprotein oksidaze ili NADH peroksidaze (Ammor i Mayo, 2007). Antimikrobni učinak H_2O_2 proizlazi iz oksidacije sulfhidrilnih skupina što uzrokuje denaturaciju određenog broja enzima i peroksidaciju lipidnih membrana, čime se povećava propusnost membrane (Holzapfel

i sur., 1995). Većina nepoželjnih bakterija poput *Pseudomonas* spp. i *S. aureus* je osjetljiva na H_2O_2.

Ugljični dioksid (CO_2) uglavnom proizvode heterofermentativne BMK. CO_2 igra ulogu u stvaranju anaerobnog okruženja koje inhibira dekarboksilaciju, a nakupljanje CO_2 u membranskom lipidnom dvosloju može uzrokovati disfunkciju propusnosti (Holzapfel i sur., 1995). CO_2 može učinkovito inhibirati rast mnogih mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje hrane, posebno gram-negativnih psirotrofnih bakterija (Devlieghere i Debevre, 2000).

Diacetil, aromatsku komponentu, proizvode vrste svih rodova BMK citratnom fermentacijom. Proizvode ga heterofermentativne BMK kao nusproizvod zajedno s laktatom kao glavnim produktom (Holzapfel i sur., 1995). Diacetil je proizvod visoke vrijednosti i široko se koristi u mliječnoj industriji kao poželjan spoj okusa. Diacetil također ima antimikrobna svojstva. Otkriveno je da je učinkovitiji protiv gram-negativnih bakterija, kvasaca i plijesni nego protiv gram-pozitivnih bakterija. Smatra se da diacetil reagira s proteinom koji vezuje arginin kod gram-negativnih bakterija i time ometa upotrebu ove aminokiseline (Lanciotti i sur., 2003).

2.3.2. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz morskih proizvoda

Iako se u prošlosti pretpostavljalo da BMK nisu prisutne u svježoj ribi zbog visokog post-mortem pH, niskog postotka šećera i visokog sadržaja dušičnih molekula, danas je opće prihvaćeno da su BMK prirodno prisutne u crijevnoj mikrobioti riba i školjkaša od prvih dana nadalje (Yang i sur., 2007; Ringø, 2008). Laktobacili, osobito *Lactobacillus plantarum*, izolirani su iz atlantskog lososa, kolje, jezerske zlatovčice i bakalara. Karnobakterije, uključujući *Carnobacterium maltaromaticum, C. divergens*, *C. gallinarum* i *C. inhibens*, izolirane su iz svih ovih vrsta uključujući i šarana (Huber i sur., 2004). Karnobakterije se čak navode kao dominantni rod u gastrointestinalnom traktu mladog atlantskog lososa (Ringø i sur. 1997.) i bakalara (Seppola i sur., 2006).

Ostali autori zabilježili su prisutnost *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus piscium*, *Vagococcus salmoninarum*, *Lactobacillus fuchuensis*, *Streptococcus* spp., *Weissella* spp. i *Aerococcus* spp. u proizvodima akvakulture (Liu i sur. 2009; Matamoros i sur. 2009a, Ghanbari i sur. 2013). Neke vrste roda *Lactobacillus* izolirane iz kamenica pokazale su učinkovitu inhibiciju rasta *Vibrio alginolyticus* i *V. proteolyticus* (Lee i sur., 2010). Što se tiče mikrobiote školjkaša, opće je prihvaćeno da su *Firmicutes* dominantno koljeno gastrointestinalnog trakta (Ringø i sur., 2019). Dominantni rodovi kod školjkaša su *Weissella*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*, uključujući vrste *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, L. *sporogenes*, *L.*

casei, L. brevis, L. helveticus i *P. acidilactici*. Iako je rod *Bifidobacterium* obično prisutan u probavnom sustavu sisavaca i toplokrvnih životinja, rijetko je prisutan kod morskih životinja (Merrifield i sur., 2014).

Pojavnost BMK također je zabilježena u mnogim vrstama morskih proizvoda spremnih za jelo, poput škampi u salamuri, hladno dimljene ribe, fermentirane ribe, marinirane ili sušene ribe, kao i morske salate. Dalgaard i sur. (2003) su izolirali BMK iz kuhanih i salamurenih kozica pohranjenih u modificiranoj atmosferi između 0 °C i 25 °C te identificirali sojeve *Enterococcus faecalis*, *Carnobacterium divergens* i *Lactobacillus curvatus*. Nadalje, enterokoki s antitilisterijskom aktivnošću izolirani su s kože romba (*Scophthalmus maximus*) iz uzgoja (Campos i sur. 2006) i iz hladno dimljenog lososa (Tomé i sur. 2006). U mariniranoj ili dimljenoj ribi raznolikost BMK je u potpunosti drugačija u odnosu na svježu ribu budući da više dominiraju laktobacili i pediokoki (Ghanbari i sur., 2013). Chahad i sur. (2012) identificirali su i okarakterizirali 84 BMK soja iz lubina (*Dicentrarchus labrax*) i orade (*Sparus aurata*) i potvrdili njihovu uspješnost inhibicije prema najrelevantnijim patogenim bakterijama koje mogu biti prisutne u komercijalnim proizvodima.

Stanište i mikrookolišni uvjeti kao što su salinitet i stres utječu na vrste prisutne u mikrobioti riba i školjkaša čemu u prilog ide i istraživanje Ringø i Storm (1994) koji su dokazali da je broj bakterija iz roda *Lactobacillus* manji kod lososa uzgojenom u slanoj vodi u odnosu na onog uzgojenog u kopnenim vodama. Karakteristika sojeva BMK da proizvode antimikrobne agense čini ih izuzetno kompetentnima prema drugim pripadnicima mikrobiote te zahvaljujući tom svojstvu, BMK izolirane iz proizvoda akvakulture pronalaze potencijalnu primjenu kod tehnika biokonzerviranja hrane te kao probiotički pripravci. U tablici 1 prikazani su neki od bakteriocinogenih BMK morskog porijekla.

Tablica 1. Bakteriocinogeni sojevi BMK morskog porijekla (Bindiya i Bhat, 2016)

Bakteriocin	**Soj producent**	**Izvor izolacije**
BLIS	*Lactobacillus pentosus* 39	fileti lososa
Karnocin U149	*Carnobacterium* sp.	svježa riba
Divergicin M35	*Carnobacterium divergens* M35	smrznute dimljene dagnje
Divercin V41	*Carnobacterium divergens* V41	riblja utroba
Karnobakteriocin B2	*Carnobacterium pisciocola* A9b	hladno dimljeni losos
Piscikocin CS526	*Carnobacterium pisciocola* CS526	smrznuti surimi
BLIS	*Enterococcus faecium* CHG 2-1	školjke brbavice
BLIS	*Lactobacillus lactis*	sediment

*****BLIS-engl. bacteriocin like inhibitory supstance

2.4. Patogene bakterije u morskim proizvodima

Ribe i školjkaši su za razliku od sisavaca hladnokrvne životinje i na sve njihove fiziološke procese, uključujući i sposobnost uspostavljanja imunološkog odgovora na patogene mikroorganizme, uvelike utječe temperatura vode. Slično tome, na patogene prisutne na morskim proizvodima također utječe temperatura vode, što znači da su bolesti morskih životinja i epidemije često sezonske, pri čemu se neke pojavljuju u hladnijim zimskim mjesecima, a druge pretežno tijekom toplog ljetnog perioda (Anonymous 1). Patogene bakterije obično se u morskim proizvodima nalaze u niskim koncentracijama. Kontaminacija morske vode i sedimenta nastaje zbog onečišćenja patogenima humanog ili animalnog porijekla poput bakterija roda *Salmonella, Campylobacter* ili *Escherichia* (Yin i sur., 2007). Onečišćenja okoliša mogu rezultirati plodovima mora nesigurnim za zdravlje. Unakrsna kontaminacija morskih plodova i njihovih proizvoda može se dogoditi tijekom izlova, rukovanja, pripreme, prerade, transporta i skladištenja. Pored toga, može doći do međusobne kontaminacije između navedenih operacija (Lee i sur., 2008). Patogeni mikroorganizmi su podjeljeni na one manjeg

ili većeg utjecaja na sigurnost hrane. Velike probleme u morskoj hrani uzrokuju bakterije roda *Vibrio* i *Salmonella*, dok manju zabrinutost izazivaju *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* i mikrobni toksini poput stafilokoknog enterotoksina C (SEC) i stafilokoknog enterotoksina A (SEA) (Elbashir i sur., 2018). Huss (2004) je patogene bakterije koje se prenose proizvodima akvakulture podijelio u tri skupine koje uključuju autohtone (*Vibrio* sp., *Aeromonas* sp.) i alohtone bakterije kao posljedica fekalne kontaminacije (*Salmonella* sp., *E. coli, Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*) ili bakterijske kontaminacije tijekom obrade i skladištenja (*L. monocytogenes, Clostridium perfringens, Bacillus cereus*).

Autohtone bakterije koje su prirodno prisutne u morskom okolišu uključuju *Vibrio vulnificus, V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* i *Aeromonas hydrophila*. Prisutnost autohtonih bakterija obično ne izaziva zabrinutost jer su prisutne u malim koncentracijama bakterijskih stanica da bi izazvale bolesti. Štoviše, odgovarajućim kuhanjem se uklanjaju bakterije i/ili njihovi toksini. Stoga se opasnost odnosi na proizvode u kojima je rast tih bakterija moguć tijekom skladištenja, a jedu se sirovi ili nedovoljno kuhani (Pilet i Leroi, 2011). To može biti slučaj s *Vibriom* u sirovoj ribi ili u pripremi tropskih škampa. *Vibrio* su mezofilne bakterije koje se nalaze u tropskim ili u umjerenim vodama. Njihov rast je vrlo brz ako se proizvodi čuvaju nekoliko sati na sobnoj temperaturi. Svježi školjkaši, zaštićeni ljušturom, su uglavnom manje sklone unakrsnoj kontaminaciji od ostalih morskih plodova. Međutim, ako je nekoliko šarži školjkaša iz različitih područja uronjeno u isti spremnik s morskom vodom radi mokrog skladištenja ili depuracije, može doći do unakrsne kontaminacije (Lee i sur., 2008).

Alohtone bakterije nastale uslijed kontaminacije tijekom prerade ribe su iste kao i one koje se mogu naći u drugim prehrambenim proizvodima, tj. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* ili enterohemoragična *Escherichia coli*. Drugi izvor kontaminacije je fekalno zagađenje morskog okoliša. Može nastati onečišćenjem iz kanalizacije, čamaca i brodova. Neke bakterije se mogu pojaviti i uslijed onečišćenja morskog okoliša životinjskim fekalijama. *Salmonella* Typhi i *Vibrio cholerae* uglavnom su povezane s onečišćenjem ljudskim fekalijama, dok se netipične vrste rodova *Salmonella* i *Campylobacter* mogu pojaviti iz bilo kojeg izvora (Lee i sur., 2008). *L. monocytogenes* predstavlja problem u slabo konzerviranim ribljim proizvodima (LPFP-engl. lightly preserved fish products), poput hladno dimljene, lagano marinirane ribe ili nedovoljno kuhane morske hrane koja se čuva pod vakuumom ili u modificiranoj atmosferi. Tijekom produženog roka trajanja tih proizvoda, *L. monocytogenes* se još uvijek može razviti i dostići neprihvatljivu koncentraciju (Pilet i Leroi, 2011). Nedovoljno zasoljena morska hrana koja se

čuva u anaerobnom stanju ili tradicionalna fermentirana riba također može biti pogodan supstrat za rast C. *botulinum* i proizvodnju botulinskog toksina (FAO, 2012).

2.5. Bakterije mliječne kiseline kao probiotici u kontroli bolesti

Specifični bakterijski patogeni mogu biti važan uzrok smrtnosti u riba, jer intenzivna praksa uzgoja često rezultira i padom prirodnog imuniteta domaćina. Istraživački laboratoriji i komercijalna mrijestilišta pokušali su prevladati ovaj problem dezinfekcijom vode i hrane, poticanjem otpornosti domaćina profilaktičkom ili terapijskom primjenom antibiotika. Međutim, neselektivna uporaba antibiotika u kontroli bolesti u mnogim dijelovima riblje industrije dovela je do otpornosti patogena na antibiotike, svojstva koja se lako može prenijeti na druge bakterije (Diep i Nes, 2002). Alternativni pristup kojim se mogu smanjiti oportunističke infekcije ribljim patogenima je manipulacija crijevne mikroflore dodavanjem antagonističkih bakterija u prehranu kako bi se povećao udio korisnih bakterija u mikroflori crijeva (Ringø i sur., 2005). Prednost ove metode je što se može primijeniti u ranim fazama razvoja, kad je cijepljenje nepraktično i nema smisla radi nerazvijenog imunološkog sustava. U tom je pogledu postojanost antimikrobne aktivnosti vrlo važna osobina probiotičkog soja BMK. U nedavnoj studiji Bogut i sur. (2000) su procijenili učinak *E. faecium* na crijevnu mikrobiotu soma (*Silurus glanis*). Ribe su bile izložene soju *E. faecium* uključivanjem ove bakterije u prehranu. Nakon približno 2 mjeseca hranjenja uočene su neke zanimljive razlike u crijevnoj mikrobioti. Primjena *E. faecium* smanjila je razinu populacije *S. aureus, E. coli* i drugih bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae*, uz potpunu eliminaciju *Clostridium* spp.

Jedno od prvih istraživanja komercijalnih pripravaka probiotika u ribljoj industriji bilo je usmjereno na primjenu Biostarta, preparata koji sadrži različite vrste roda *Bacillus*. Moriarty je 1998. zaključio da je upotreba komercijalnih probiotičkih sojeva *Bacillus* spp. povećala kvalitetu i održivost škampa uzgajanih u ribnjaku. Dodavanjem probiotičkog pripravka Biogen kao dopune u hranjenju tilapije dobiveno je značajno povećanje produktivnosti (El-Haroun i sur., 2006). Humani probiotik, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC korišten je u ishrani pastrve tijekom 51 dana s ciljem smanjenja smrtnosti bakterije *Aeromonas salmonicida*, uzročnika furunikuloze. Smrtnost pastrve smanjena je s 52,6 na 18,9% (Nikoskelainen i sur., 2001). Abasali i Mohamad (2010) su u svom istraživanju zabilježili povećanje gonadosomatskog indeksa i stvaranje mlađi kod ženki reproduktivne dobi, koristeći preparat Primalac, miješanu kulturu *L. acidophilus, L. casei, E. faecium* i *B. thermophilum*. Istraživanje koje je napravljeno s bijelim kozicama pokazalo je da je korištenje miješanih kulture probiotika

povećalo preživljavanje, razgradnju hrane, i proizvodnju kozica iz uzgoja (Wang i sur., 2005). Taoka i sur. (2006) su primjenom komercijalnih preparata Alchem Poseidon, Alchem Korea CO i Wonju Korea CO, koji sadrže miješane kulture bakterija (*Bacillus subtilis, L. acidophilus* i *Clostridium butyricum*) i kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), poboljšali nespecifične imunološke parametre i otpornost tilapije prema patogenoj bakteriji *Edwardsiella turda*.

Neki komercijalni proizvodi akvakulture uključili su i prebiotike u svoju formulaciju poput manana, glukana i ekstrakta juke koji dodatno povećavaju korisne učinke ovih proizvoda (El-Dakar i sur., 2007). Trenutno su komercijalni pripravci probiotika dostupni u obliku tekućine ili praha. U novije vrijeme razvijeni su sustavi za imobilizaciju probiotika, osobito pomoću mikrokapsulacije. Mikrobne stanice visoke gustoće inkapsuliraju se u koloidni matriks koristeći alginat, kitozan, karboksimetilcelulozu ili pektin za fizičku i kemijsku zaštitu. Trenutno liofilizirani komercijalni pripravci imaju prednosti radi lakšeg skladištenja i transporta. Međutim, uvjeti za rekonstituciju ovih pripravaka poput temperature, stupnja hidratacije i osmolarnosti otopine od vitalnog su značaja za osiguravanje održivosti bakterija (Muller i sur., 2009). Prednosti korištenja probiotika u akvakulturi i njihova djelotvornost navedeni su daljnjem tekstu.

2.5.1. Promotori rasta

Probiotici se koriste u akvakulturi za povećanje rasta kultiviranih vrsta. Još uvijek nije u potpunsti razjašnjeno da li takvi proizvodi povećavaju apetit ili poboljšavaju probavljivost (Martínez-Cruz i sur., 2012). Ishrana nilske tilapije dopunjena probiotičkim sojem *Streptococcus*, znatno je povećala sadržaj proteina i lipida kao i težinu ribe (Lara-Flores i sur., 2003). Poboljšanje rasta i preživljavanja akvarijskih riba uključujući šverta (*Xiphophorus helleri*) i gupija (*Poecilia reticulate*), postignuto je ishranom nadopunjenom s *B. subtilis* i *Streptomyces* (Ghosh i sur., 2008; Dharmaraj i Dhevendaran, 2010). Probiotici su također uspješno testirani i na školjkašima. Stopa rasta malih (20 mm) i velikih (67 mm) Petrovih uha je poboljšana za 8 % odnosno 34 % tijekom osam mjeseci. Nadalje, ishrana Petrovih uha nadopunjena s probioticima je pokazala preživljavanje od 62 % kod školjkaša zaraženih s patogenom bakterijom *Vibrio anguillarum* u usporedbi s 25 % kod neliječenih školjkaša (Macey i Coyne, 2005).

2.5.2. Probava hranjivih tvari

Balcázar i sur. (2006) navode da probiotici blagotvorno utječu na probavne procese morskih životinja jer probiotički sojevi sintetiziraju izvanstanične enzime poput proteaza, amilaza, i lipaza, kao i faktore rasta, poput vitamina, masnih kiselina i aminokiselina. Stoga se nutrijenti učinkovitije apsorbiraju kada se hrana nadopunjuje probioticima (El-Haroun i sur., 2006). Hidalgo i sur. (2006) su u svom istraživanju potvrdili da prehrana zubaca (*Dentex dentex*) nadopunjena sojem *B. cereus*, utječe na povećavanje rasta ribe zbog učinkovitijeg iskorištavanja hrane. Kod larvi lubina hranjenih dodatkom *S. cerevisiae* X2180 uočeno je povećanje rasta i proizvodnje antioksidativnih enzima (katalaza, superoksid dismutaza, glutation peroksidaza (Tovar-Ramírez i sur., 2010). Kod bijele kozice i indijskog bijelog škampa (*Fenneropenaeus indicus*), dodatak probiotika povećao je prividnu probavljivost suhe tvari, bjelančevina i fosfora (Lin i sur., 2004). Ghosh i sur. (2008) su uključivanjem *B. subtilis* u ishranu gupija i šverta zabilježili povećanje duljine i težine ovih akvarijskih riba, kao i specifičnu aktivnost proteaza i amilaza u probavnom traktu.

2.5.3. Kvaliteta morske vode

Održavanjem visoke razine probiotika u ribnjacima, uzgajivači ribe mogu smanjiti nakupljanje otopljenog organskog ugljika tijekom sezone rasta. Probiotici također mogu uravnotežiti proizvodnju fitoplanktona (Balcázar i sur., 2006). Lalloo i sur. (2007) su izolirali nekoliko *Bacillus* vrsta iz šarana (*Cyprinus carpio*) i proveli ispitivanje kvalitete vode prilikom uzgoja akvarijskih riba te ispitali utjecaj na rast *A. hydrophila* uz dodatak devet sojeva. Tri *Bacillus* izolata pokazala su visoku sposobnost inhibicije patogena uz smanjenje koncentracije amonijaka, nitrata, i fosfata. Wang i sur. (2005) su dokazali da je komercijalni preparat sastavljen od *Bacillus* sp., *S. cerevisiae*, *Nitrosomonas* sp. i *Nitrobacter* sp. imao sposobnost povećanja korisne mikrobiote bijele kozice, uz smanjenje koncentracije anorganskog dušika i fosfata.

2.5.4. Tolerancija na stres

Jedno od prvih istraživanju na ovu tematiku bavilo se ispitivanjem dodatka *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* u prehranu europskog brancina u vremenskom intervalu od 25 do 59 dana. Razine kortizola zabilježene kod ribe hranjenje dodatkom probiotika bile su znatno niže od kontrolne skupine (Carnevali i sur., 2006). Još jedan način procjene stresa kod riba uključuje podvrgavanje istih toplinskom šoku, kao u slučaju iverka (*Paralichthys olivaceus*) uzgajanog u recirkulacijskom sustavu (Taoka i sur., 2006). Skupina tretirana probioticima (*S.*

cerevisiae, L. acidophilus, C. butyricum, B. subtilis) pokazala je veću toleranciju na testu stresa od kontrolne skupine. Razine laktata i glukoze u plazmi smatraju se odgovarajućim pokazateljima stresa jer se njihova koncentracija povećava kao sekundarna reakcija tijekom razdoblja stresa radi pokrivanja velike količine energije koju zahtjevaju ovakve situacije. Varela i sur. (2010) su proveli istraživanje na oradi i ustanovili da su rezerve glikogena i triglicerida u jetri kontrolne skupine značajno smanjene u odnosu na koncentracije dobivene kad je ishrana ribe bila nadopunjena probiotikom *Alteromonas* sp. Pdp 11.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Za mikrobiološku analizu zdravstvene ispravnosti u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u ljetnom i zimskom razdoblju 2015. godine dostavljeni su uzorci lubina (*Dicentrarchus labrax*) i orade (*Sparus aurata*), svaki put po 5 komada svake vrste (prosječne mase približno po 400 g) iz ribogojilišta "Riba Mljet" na otoku Mljetu. Istovremeno, i s istom svrhom, su dostavljani i uzorci kamenica (*Ostrea edulis*) i dagnji (*Mytilus galloprovincialis*), 5 komada svake vrste, izlovljeni na uzgajalištu "Školjkarstva mušula", smještenog u uvali Bistrina, u zaljevu Mali Ston.

Za izolaciju, identifikaciju i karakterizaciju izolata bakterija mliječne kiseline (BMK), izolati autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša priređeni su sukladno razvijenom protokolu u laboratorijima istraživačkog centra Sveučilišta u Dubrovniku i dostavljeni neposredno nakon izrade u terenskom hladnjaku u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica. Izolirani bakterijski izolati su nakon identifikacije karakterizirani sukladno selekcijskim kriterijima za odabir BMK za primjenu u akvakulturi i konzerviranju proizvoda akvakulture, pri čemu su obavljene slijedeće analize: preživljavanje u određenom rasponu temperature i pH, ispitivanje antimikrobne aktivnosti, ispitivanje osjetljivosti na antibiotike, sposobnost proizvodnje biogenih amina a ispitan je i utjecaj liofilizacije na preživljavanje.

Uzorci sadržaj žučnog mjehura, želuca i sluzi lubina izlovljenih nakon perioda gladovanja od 72 sata u uzgajalištu tvrtke Cromaris, smještenom u blizini uvale Lamjana na otoku Ugljanu, korišteni su za analizu preživljavanja izolata BMK u žučnim solima ribe i želučanom soku *in situ*, te za provođenje *in vitro* testa adhezije izolata BMK na sluz svježe ribe. Uzorci su prikupljeni odmah po izlovu te pohranjeni na -20 °C do korištenja.

Za analizu preživljavanja izolata BMK u morskoj vodi *in situ*, uzorak morske vode prikupljen je na otoku Silbi u zadarskom arhipelagu.

3.1.2. Mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu identificirani su u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Standardni sojevi patogenih mikroorganizama korišteni za određivanje antimikrobne aktivnosti dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

3.1.3. Hranjive podloge

a) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline

- MRS agar (De Man, Rogosa i Sharpe) sastava: pepton 10,0 g/l; goveđi ekstrakt 10,0 g/l; ekstrakt kvasca 5,0 g/l; glukoza 20,0 g/l; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/l; natrijev acetat 5,0 g/l; amonijev citrat 2,0 g/l; magnezijev sulfat 0,2 g/l; manganov sulfat 0,05 g/l; agar 15,0 g/l; Tween 80 1,0 g/l; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- MRS bujon- istog sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.
- M17 agar sastava: pepton iz kazeina 2,5g/l; pepton 2,5 g/l; sojin pepton 2,5 g/l; kvaščev ekstrakt 5 g/l; goveđi ekstrakt 5 g/l; natrijev glicerofosfat 19 g/l; magnezijev sulfat 0,25 g/l; askorbinska kiselina 0,5 g/l; laktoza 5 g/l; agar 13 g/l. pH vrijednost podloge je 7.1; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- M17 bujon- istog sastava kao M17 agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/15 min. Sadržaj je dobro promućkan i razliven po 10 mL u epruvete s čepom.

b) Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj test mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) sastava: pepton 15,0 g/l; mesni ekstrakt 3,0 g/l; Na Cl 5,0 g/l; K_3PO_4 0,3 g/l; agar 18,0 g/l; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.
- HB (hranjivi bujon) - istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

c) Podloga za *Listeria monocytogenes*

- Fraser bujon sastava: proteoza pepton 5,0 g/l; tripton 5,0 g/l; goveđi ekstrakt 5,0 g/l; ekstrakt kvasca 5,0 g/l; natrij-klorid 20,0 g/l; dinatrij-hidrogenfosfat anhidrid 9,5 g/l; kalij-dihidrogenfosfat 1,35 g/l; eskulin 1,0 g/l; litij-klorid 3,0 g/l; akriflavin HCl 0,025 g/l; nalidiksična kiselina 0,02 g/l. pH podloge je 7,32. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan suplement (željezo amonijev citrat) prethodno sterilno rekonstituiran u 5 ml sterilne destilirane vode, sadržaj je dobro promješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.
- PALCAM agar sastava: pepto-kompleks 10,0 g/l; triptoza 10,0 g/l; pepton 3,0 g/l; ekstrakt kvasca 3,0 g/l; kukuruzni škrob 1,0 g/l; natrij-klorid 5,0 g/l; glukoza 0,5 g/l; manitol 10,0 g/l; eskulin 0,8 g/l; željezo amonijev citrat 0,5 g/l; litij-klorid 15,0 g/l; fenolno crvenilo 0,08 g/l; agar 12,0 g/l; polimiksin B 10,0 mg/l; ceftazidim 20,0 mg/l; akriflavin HCl 5,0 mg/l. pH podloge je 7,2. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan suplement (Listeria PALCAM Antimikrobni) prethodno sterilno rekonstituiran u 5 ml sterilne destilirane vode, sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

d) Podloga za *Vibrio* sp.

- TCBS (Thiosulfate Citrate Bile **s**alt Sucrose) Kobayashi agar sastava: pepton 10,0 g/l; kvaščev ekstrakt 6 g/l; natrij tiosulfat 10 g/l; natrij citrat 10 g/l; natrij klorid 10 g/l; goveđa žuč 8 g/l; saharoza 20 g/l; željezo citrat 1 g/l; timol plavo 0,04 g/l, bromtimol plavo 0,04 g/l; agar 16 g/l. pH podloge je 8,6. Sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

e) Podloga za *Salmonella* sp.

- RVS (Rappaport-Vassiliadis Soya) bujon sastava: sojin pepton 4,5 g/l; natrijev klorid 7,2 g/l; kalijev dihidrogenfosfat 1,26 g/l; di-kalij hidrogen fosfat 0,18 g/l; magnezijev klorid 13,4 g/l; malahitno zelenilo oksalat 0,036 g/l. pH vrijednost podloge je 5,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.
- XLD (Xylose Lysine Deoxycholate) agar sastava: ksiloza 3,75 g/l; L-lizin 5 g/l; lakotoza 7,5 g/l; saharoza 7,5 g/l; natrijev klorid 5 g/l; kvaščev ekstrakt 3 g/l; natrijev deoksikolat 1 g/l; natrijev tiosulfat 6,8 g/l; amonij željezo (III) citrat 0,8 g/l; fenol crveno 0,08 g/l; agar 14,5 g/l. pH vrijednost podloge je 4,7; podloga se sterilizira na plameniku

do vrenja uz povremeno miješanje. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

f) Podloga za *Pseudomonas aeruginosa*

- Cetrimid agar sastava: pepton iz želatine 20 g/l; magnezijev klorid 1,4 g/l; kalijev sulfat 10 g/l; cetrimid 0,3 g/l; agar 14 g/l; pH vrijednost podloge je 7,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

g) Podloga za *Escherichia coli*

- RAPID'E. coli 2 agar sastava: pepton 10 g/l, natrijev klorid 5 g/l, kvaščev ekstrakt 3 g/l, selektivni kromogeni mix 6 g/l, agar 13 g/l. pH vrijednost podloge je 7,2 ± 0,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodan suplement (2ml na 200ml podloge), sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

h) Podloga za *Enterobacteriaceae*

- VRBG (Violet Red Bile Glucose) agar sastava: pepton 7 g/l; kvaščev ekstrakt 3 g/l; natrijev klorid 5 g/l; žučne soli 1,5 g/l; glukoza 10 g/l; neutralno crveno 0,03 g/l; kristal violet 0,002 g/l; agar 15 g/l. pH vrijednost podloge je 7,4 ± 0,4; podloga se sterilizira na plameniku do vrenja uz povremeno miješanje. Sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

i) Podloga za koliformne bakterije

- BGLB (Brilliant Green Lactose Bile) bujon sastava: žučne soli 20 g/l; laktoza 10 g/l; pepton 10 g/l; briljant zeleno 0,0133 g/l. pH vrijednost podloge je 7,2 ± 0,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promješan i razliven u razliven po 5 ml u epruvete s čepom i Durhamovom epruvetom.

j) Podloga za sulfito-reducirajuće klostridije

- sulfitni agar sastava: kazein hidrolizat 10 g/l; natrijev sulfit 0,5 g/l; željezov citrat 0,5 g/l; agar 15 g/l; pH vrijednost podloge je 7,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

k) Podloga za određivanje hemolitičke aktivnosti

- Columbia krvni agar sastava: pepto-kompleks 10 g/l; triptoza 10 g/l; pepton 3 g/l; kukuruzni škrob 1 g/l; natrijev klorid 5 g/l; agar 12 g/l. Sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min. pH vrijednost podloge je 7,3. Nakon hlađenja, u pripremljenu podlogu sterilno je dodana 5 % defibrirana ovčja krv, sadržaj je dobro promješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

3.1.4. Uređaji

- centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- centrifuga, Centric 150 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- inkubator, MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- tehnička vaga, Extend (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- analitička vaga, Entris (Sartorius, Göttingen, Njemačka)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- hladnjak sa zamrzivačem, CUef 3311 (Liebherr, Kirchdorf, Njemačka)
- spektrofotometar, Helios β UV-Vis (Unicam, Cambridge, UK)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)
- denzimat (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska)
- magnetska miješalica, Lab Stir (Gilson, Middleton, WI, SAD)
- DNA-termoblok, Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- horizontalna elektroforeza, MSMIDI (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, UK)
- vertikalna elektroforeza (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, UK)
- transiluminator, MacroVue UVis-20 (Hoefer, Inc., Holliston, MA, SAD)
- MALDI TOF/TOF 4800 Plus analyzer (Applied Biosystems, CA, SAD)
- LC-MS ESI (Waters, Milford, MA, SAD)

3.1.5. Pribor

- automatske pipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- plastična posuda za odlaganje otpadnog materijala
- mikrotitarske pločice
- štapići po Drigalskom
- Erlenmeyerove tikvice
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikrobiološka ušica
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- laboratorijske čaše
- laboratorijski stalci
- kivete (50 ml)
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- Eppendorf tubice (2ml)
- filteri za šprice „Minisart“, PTFE, 0.22 μm (Sartorius, Göttingen, Njemačka)

3.1.6. Kemikalije

Sve korištene kemikalije bile su visoke analitičke (p.a.) čistoće.

- natrijev klorid (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- limunska kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1% otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- standardna puferska otopina pH 4 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- standardna puferska otopina pH 7 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- glicerol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- dinatrijev hidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalijev dihidrogenfosfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- natrijev acetat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- octena kiselina (J.T. Baker, Phillipsburg, NY, SAD)
- natrijev hidroksid (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- etanol, 96% (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

- NucleoSpin® Microbal DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)
- HotStarTaq Plus master Mix (Qiagen, Hilden, Njemačka)
- Midori Green Advance DNK boja (Nippon Genetics, Dueren, Njemačka)
- agaroza (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- TAE-pufer (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- BenchTop 100 pb DNK standardi (Promega, Madison, WI, USA)
- standardi za proteinsku elektroforezu, 2-212 kDa (BioLabs, Engleska)
- amonijev persulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- N,N´-metilenbisakrilamid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- akrilamid (Fluka, Buchs, Švicarska)
- β-merkaptoetanol (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- natrijev dodecilsulfat (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)
- N, N, N´, N´-tetrametil etilendiamin (Serva, Heidelberg, Njemačka)
- glicin (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka)

3.2. Metode rada

3.2.1. Izolacija i identifikacija mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane

Izolacija i identifikacija bakterija koje uzrokuju zdravstvenu neispravnost hrane iz uzoraka ribe i školjkaša provedena je primjenom klasičnih mikrobioloških i fenotipskih metoda (tablica 2).

3.2.1.1. Mikrobiološke metode

Mikrobiološke metode izolacije mikroorganizama obuhvaćale su homogenizaciju, pripremu serije decimalnih razrijeđenja i nacjepljavnje na selektivne podloge. 10 g svakog uzorka sterilno je preneseno u tikvicu s 90 ml fiziološke otopine. Nakon homogenizacije napravljena je serija od 6 razrjeđenja te je 0,1 ml svakog razrjeđenja nacijepljeno na selektivne podloge. Zatim su uzorci inkubirani 48 sati pri 37 °C. Pokus je proveden u tri paralele, u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Nakon 48 sati, pomoću mikrobiološke ušice porasle kolonije su precijepljene na svježe selektivne podloge i opet inkubirane 48 sati pri 37 °C. Nakon toga su izolati precijepljeni u 10 ml sterilne tekuće i na kose podloge i inkubirani 48 sati pri 37 °C.

3.2.1.2.Fenotipske metode

API 20E

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na VRBG agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 sata pri 37 °C. Nekoliko identičnih kolonija s VRBG agara je pomoću mikrobiološke ušice dodano u kivetu koja sadrži API 20E medij. Tako pripremljenom suspenzijom napunjene su epruvetice API 20E stripa koji je zatim inkubiran 18 sati pri 36 °C, nakon čega su očitani rezultati. Biokemijski profil se identificirao pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka (V 4.1).

API Listeria

API Listeria sistem se sastoji od sljedećih 10 testova: diferencijacije između *L. innocua* i *L. monocytogenes*, temeljenog na prisutnosti ili odsutnosti arilamidaze (DIM test), hidrolize eskulina, prisutnosti α-manozidaze, te proizvodnje kiseline od D-arabitola, D-ksiloze, L-ramnoze, α-metil-D-glukozida, D-riboze, glukoza-1-fosfata i D-tagatoze. Nekoliko kolonija uzeto je ušicom s PALCAM agara i suspendirano u 2 ml sterilne destilirane vode do 0.5 McF. Bakterijska suspenzija je nakapana u 10 epruvetica (100 ml za DIM test i 50 ml za druge

parove). Nakon toga se strip inkubirao pri 37 °C tijekom 18 do 24 sata. Nakon inkubacije, jedna kap ZYM B (dobivena od proizvođača) dodana je na DIM test te se pustilo da reagira tijekom 3 min; te su nakon toga očitane sve reakcije. Reakcije su određene prema promjenama boje sukladno uputama proizvođača.

Tablica 2. Klasične mikrobiološke i biokemijske metode za izolaciju i identifikaciju mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane

Mikroorganizmi	**Metoda**	**Hranjivi medij**	**Uvjeti uzgoja (aerobno i anaerobno)**	**API test**
Aerobne mezofilne bakterije	HRN EN ISO 4833-2:2013	Hranjivi agar (Biolife)	37 °C 24-48 h	-
Enterobacteriaceae	HRN ISO 21528-2:2017	VRBG (Biolife)	37 °C 24-48 h	API 20E
Escherichia coli	ISO 16649-2:2001	RAPID *E. coli* (Biolife)	37 °C 24-48 h	API 20E
Listeria monocytogenes	ISO 11290-1:2017	Fraser, Palcam (Biolife)	37 °C 48–72 h	API *Listeria*
Sulfitoreducirajući klostridiji	HRN EN ISO 26461-2:2008	Sulfitni agar, (Biolife)	37 °C 24-48 h	-
Psudomonas aeruginosa	NF EN ISO 6887, 2004	Cetrimid agar (Biolife)	37 °C 48–72 h	API 20E
Salmonella sp.	ISO 6579-1:2017	RVS bujon, XLD (Biolife)	37 ° C 24 - 48 h	API 20E
Vibrio sp.	ISO 21872-1:2017	TCBS agar (Biolife)	37 °C 48–72 h 24-48 h	API 20E

3.2.2. Izolacija i identifikacija BMK iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša

Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline provedena je klasičnim mikrobiološkim (poglavlje 3.2.1.1.) i fenotipskim metodama (tablica 3). Osim fenotipskih metoda, izolati BMK su dodatno potvrđeni spektrometrijom masa MALDI TOF/TOF, dok je soj s najboljim karakteristikama *L. plantarum* O1 dokazan na razini gena primjenom AFLP genetičke metode te proteomikom primjenom kromatografije spregnute sa spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (LC-MS ESI).

Tablica 3. Klasične mikrobiološke i biokemijske metode za izolaciju i identifikaciju bakterija mliječne kiseline

Mikroorganizmi	**Metoda**	**Hranjivi medij**	**Uvjeti uzgoja (aerobno i anaerobno)**	**API test**
Bakterije mliječne kiseline	ISO 13721:1995	MRS agar M17 agar (Biolife)	30 °C	API 50 CHL API STAPH

3.2.2.1. Fenotipske metode

API 50 CHL

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na MRS agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 sata pri 37 °C. Pomoću mikrobiološke ušice se u kivetu koja sadrži API 50 CHL medij, dodalo nekoliko identičnih kolonija s MRS agara. Gustoća inokuluma mjerena je u denzimatu, a mora biti 2 McF. Pripremljena suspenzija se nakapala u epruvetice API 50 CH V5.1 stripa koji sadrži 49 različitih ugljikohidrata. U sve epruvetice nakapalo se i mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti, te je provodena inkubacija pri 37 °C kroz 48 sati, nakon čega su očitani rezultati. Pozitivni testovi su on, kod kojih je došlo do promjene boje u žuto, uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora. Biokemijski profil je identificiran pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka (V 5.1). Razina pouzdanosti izražena je kao izvrsna (≥ 99.9%), veoma dobra (≥ 99.0%), dobra (≥ 90.0%), prihvatljiva (≥ 80%) ili neprihvatljiva identifikacija (< 80%).

API STREP

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na M17 agaru u obliku kolonija anaerobno kroz 24 sata pri 37 °C. Nekoliko identičnih kolonija s M17 agara se pomoću mikrobiološke ušice dodalo u kivetu koja sadrži API STREP medij. Gustoća inokuluma mjerena je u dezimatu i mora iznositi 4 McF. Tako pripremljenom suspenzijom napunjene su epruvetice API STREP stripa koji sadrži 20 različitih ugljikohidrata. Mineralno ulje nakapano je u epruvetice u kojima se provode testovi koji zahtijevaju anaerobne uvijete. API STREP strip je inkubiran 48 sati pri 37 °C nakon čega su očitani rezultati. Biokemijski profil je identificiran pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka (V 7.0).

3.2.2.1.1. Elektroforeza na SDS-poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE)

Uzorci ukupnih i površinskih proteina izolata BMK su pripremljeni tako da je volumenima od 15 µl SDS ekstrakata proteina dodano 5µl pufera za uzorke za elektroforezu po Laemmli-u (50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2 mM EDTA III; 2 % SDS; 10 % glicerol; 0,001 % bromfenol plavo i 5 % -merkaptoetanol). Uzorci su prokuhani 2-3 min te nanešeni na 10% poliakrilamidne ploče za elektroforezu. Poliakrilamidne ploče za elektroforezu sastoje se od gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje. Sastav gela za sabijanje je: 4,5 % akrilamida, 0,12 % N, N' - metilenbisakrilamida, 0,1 % SDS-a, 0,075 % N, N, N', N'- tetrametiletilendiamina (TEMED) i 7.5 % amonijevog persulfata (APS) u 0,5 M Tris-HCl puferu pH 6,8. Sastav 10 % gela za razdvajanje je: 10 % akrilamida, 0,3 % N, N' - metilenbisakrilamida, 0,1 % SDS-a, 0,05 % TEMED i 5 % APS u 1,5 M Tris-HCl puferu pH 8,8. Elektroforeza je provedena u puferu za elektroforezu (25mM TRIS-glicin) a zaustavljena je kada je boja dosegnula rub ploče. Bojanje gela na proteine provedeno je u 0,1 %-tnoj Coomassie Brilliant Blue G-250 s 50 % etanola i 7 % octene kiseline kroz najmanje 3 sata. Nakon bojenja, gel je inkubiran u 7 %-tnoj octenoj kiselini do obezbojenja pozadine.

3.2.2.1.2. Izolacija površinskih proteina s bakterijskih stanica

Prekonoćne bakterijske kulture, koncentrirane centrifugiranjem pri 10 000 rpm tijekom 5 min i dva puta isprane sterilnom destiliranom vodom, resuspendirane su u 50 µl 1%-tne otopine SDS-a. Tako resuspendirane stanice, prokuhane su 10 min. te ponovno centrifugirane pri 9 000 rpm kroz 5 min, a supernatant je podvrgnut SDS-poliakrilamidnoj gel-elektroforezi (SDS-PAGE).

3.2.2.1.3. Izolacija ukupnih staničnih proteina

Prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su pri 9 000 rpm tijekom 15 min. Stanice su isprane sterilnom otopinom natrijeva klorida (0,9 %), ponovno centrifugirane i resuspendirane u 100 µl sterilne otopine natrijeva klorida kojoj je dodan 1 g staklenih kuglica (r = 2 mm). Suspenzija je izmiješana na vibromješaču kroz 4 min (30 s miješanja – 30 s hlađenja u ledu), a zatim tretirana s 1 ml 10 % otopine SDS-a. Uzorci su prokuhani 10 min, ohlađeni u ledu (3-4 min) i centrifugirani pri 9 000 rpm tijekom 15 min. Nakon što je određena koncentracija proteina u supernatantu, provedena je SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE).

3.2.2.2. Genetičke metode

3.2.2.2.1. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Polimorfizam dužine umnoženih fragmenata

Izolacija i umnažanje DNK iz *L. plantarum* O1 provedeno je AFLP metodom u BCCM/LMG identifikacijskom servisu (Gent, Belgija).

3.2.2.3. Proteomičke metode

3.2.2.3.1. MALDI TOF/TOF

Analiza izolata BMK je provedena na spektrometru masa MALDI TOF/TOF 4800 Plus analyzer u Centru za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

Priprema lizata stanica i izolacija proteina

Bakterijske stanice su se odvojile od tekuće hranjive podloge centrifugiranjem 20 min pri 2000 rpm. Na talog stanica se dodao 25 mM natrijev hidrogen karbonatni pufer koji u sebi sadrži 0,1 % Triton X-100 te je uslijedio korak lize stanica staklenim kuglicama. Nakon lize stanica uslijedio je korak inkubacije uzoraka 1 min pri 95 °C kako bi se inaktivirale endoproteaze. Zatim je uzorak stavljen na centrifugiranje 20 min na 7000 rpm pri 4 °C kako bi odvojio stanični lizat od netopivih staničnih dijelova. Nakon centrifugiranja izdvojen je supernatant i izmjerena mu je koncentracija proteina po metodi Bradford.

Na 100 µl otopine proteina dodan je volumen tripsina (1 mg/ml) tako da konačni maseni omjer tripsina i proteina u uzorku bude 1:50. Digestija proteina odvijala se preko noći pri 37 °C.

Derivatizacija uzoraka

Nakon digestije uzorci su posušeni u vakuum centrifugi pri 40 °C te je nakon sušenja uslijedio korak obilježavanja N-kraja peptida s 5-formil-1,3-benzenedisulfoničnom kiselinom dinatrijevom soli hidrat 4-sulfofenil-izotiocijanta (CAF-/CAF+ reagensom). Na posušene uzorke je dodano 30 µl otopine CAF-/CAF+ reagensa* te su peptidi resuspendirani u reagensu. Tako pripremljena smjesa je podvrgnuta mikrovalovima jakosti od 180 W u mikrovalnoj pećnici tijekom 8 minuta. Nakon derivatizacije peptidi su pročišćeni na koloni i posušeni u vakuum centrifugi pri 40 °C.

*CAF-/CAF+ reagens je zaštićen patentom PCT/HR2011/000019

Separacija peptida kapilarnom tekućinskom kromatografijom

Na posušene uzorke je dodano 25 µl 0,1 %-tne mravlje kiseline, peptidi su resuspendirani u otopini i preneseni u mikroviale. Za separaciju peptida korišten je CapLC sustav s UV/VIS detektorom koji je povezan s Tempo^{TM} LC MALDI sustavom za frakcioniranje direktno na MALDI pločicu. Separacija peptida provodila se na koloni Inertsil WP300-C8 pri 40 °C, protoku od 2 µl min^{-1} i volumenu injektiranja od 5 µl. Mobilne faze koje su korištene su mobilna faza A koja se sastojala od 2 % acetonitrila/ 0,1 %- tne mravlje kiseline i mobilna faza B koja se sastojala 98 % acetonitrila/ 0,1 %-tne mravlje kiseline. Korištena je metoda u trajanju od 55 min s gradijentalnom elucijom u trajanju od 30 min pri čemu faza B raste od 5 % do 80 % te se zatim uvjeti na koloni vraćaju na početno stanje. Eluirani peptidi su detektirni pri UV absorbaniciji od 280 nm. Frakcioniranje i miješanje eluiranih peptida s matricom (α-cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 3 mg/ml u 50 %-tnoj vodenoj otopini acetonitrila) provodilo se korištenjem automatskog Tempo^{TM} LC MALDI sustava pri protoku od 2 µl min^{-1}. Parametri analize prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Parametri analize MALDI TOF/TOF

Tip analize	**MS-**	**MS/MS-**	**MS/MS+**
Detekcija iona	Negativna	Negativna	Pozitivna
Zrcalo	Reflektron	Reflektron	Reflektron
Broj snimaka/spektru	1000	2000	2000
Raspon masa/Da	1000-4000	9-3833	9-3833
Vrijeme odziva/ns	200	200	200

Identifikacija proteina

Za identifikaciju derivatiziranih peptida je korišten ProteinReader pretraživač koji omogućava *de novo* sekvenciranje peptidnih sekvenci iz MS/MS^- i MS/MS^+ spektara. Koristeći BLASTp alat za sravnavanje sekvenci pretražena je nrNCBI baza podataka. Pretraživač ProteinReader je razvijen na Institutu „Ruđer Bošković".

3.2.2.3.2. LC-MS ESI (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Electrospray Ionisation)-tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem

S ciljem dodatne potvrde identifikacije izolata, priprema stanica *L. plantarum* O1 i digestija napravljena je sljedeći upute iz poglavlja 3.2.2.3.1. Nakon digestije, uzorak je osušen u koncentratoru (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) i otopljen u 10 µl 0,1 %-tne mravlje kiseline. Uzorak je analiziran na spektrometru masa visoke rezolucije ESI-Q-TOF Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA, SAD) koji je bio vezan s tekućinskim kromatografom nanoACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA, SAD). Instrumentalni parametri podešeni su korištenjem software-a MassLynx verzije 4.1. SCN902 (Waters, Milford, MA, SAD). Peptidi su radvojeni na analitičkoj koloni nanoAcquity UPLC 1,7 µm BEH130 C_{18}, 100 µm × 100 mm (Waters, Milford, MA, SAD) uz korištenje pretkolone UPLC 2G-V/M Trap 5 µm Symmetry C_{18}, 180 µm × 20 mm (Waters, Milford, MA, SAD). Injektirano je 1 µl uzorka. Uvjeti 65-minutnog gradijentnog ispiranja primijenjenog za optimalno razdvajanje triptičkih peptida kromatografijom obrnutih faza opisani su u tablici 5. Pokretna faza A bila je vodena otopina mravlje kiseline (0,1 %; φ), a pokretna faza B vodena otopina 0,1 % mravlje kiseline i 95 % acetonitrila (φ). Protok je iznosio 1 µl min^{-1}, a temperatura kolone bila je 40 °C.

Tablica 5. Uvjeti gradijenta za razdvajanje triptičkih peptida

vrijeme (min)	% A	% B
početno	99,0	1,0
0,10	99,0	1,0
25,0	60,0	40,0
40,0	40,0	60,0
50,0	1,0	99,0
55,0	99,0	1,0
65,0	99,0	1,0

Peptidni uzorci prikupljani su pri niskoj i visokoj energiji MS^E pristupom. U uvjetima niske energije, podaci su prikupljani kod konstantne kolizijske energije od 4 eV, dok je u uvjetima visoke energije kolizijska energija linearno podizana od 20 do 45 eV. Podaci su prikupljani svake sekunde u području masa 50 – 3000 Da. Tijekom analize uzoraka korišten je stalni protok leucin-enkefalina (1 ng μl^{-1}, protok 0,4 µl min^{-1}, $[M+H]^+$ = 556,2771 Da) s ciljem korigiranja točnosti masa. Pretragom je dobiveno 51.415 MS2 spektara u proteinskoj bazi podataka GenBank "nr". Najboljih 407 MS2 spektara je korišteno za identifikaciju soja.

3.2.3. Karakterizacija izolata bakterija mliječne kiseline

Priprema suspenzije bakterijskih stanica

Za karakterizaciju izolata BMK, prekonoćne bakterijske kulture centrifugirane su pri 10 000 rpm. Stanice su isprane sterilnom otopinom natrijevog klorida (0,5 %), ponovno centrifugirane i resuspendirane u sterilnoj otopini natrijevog klorida (0,5 %). S pripljenom suspenzijom obavljene su analize preživljavanja u različitim rasponima tempereature i pH te ispitivanje antimikrobne aktivnosti.

Za *in situ* pokuse preživljavanja u morskoj vodi i gastrointestinalnom traktu ribe te adhezije na sluz ribe, nakon prekonoćnog uzgoja, dobiveni talog stanica je ispran s 1 ml puferirane otopine fosfatnih soli (Phosphate Buffer Saline-PBS; pH 7,2), ponovno centrifugiran i resuspendiran u 200 µl iste otopine.

3.2.3.1. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline pri različitim temperaturama

Izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline nacijepljeni su u MRS bujon i uzgojeni pri različitim temperaturama (4 °C, 13 °C, 28 °C, 37 °C, 45 °C, 60 °C) tijekom 24 h. Broj poraslih kolonija određen je indirektnom metodom.

3.2.3.2. Preživljavanje bakterija mliječne kiseline pri različitim pH vrijednostima

Suspenzija stanica pripremljena je kao što je opisano u poglavlju 3.2.3. iznad i inokulirana u MRS bujon kojem je prethodno podešena pH vrijednost (2, 4, 6) te su uzorci inkubirani preko noći na 37 °C. Broj poraslih kolonija određen je indirektnom metodom.

3.2.3.3. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzoraka koji su sadržavali bakterijske stanice pripravljena su decimalna razrjeđenja u sterilnoj vodi i nacijepljena na Petrijeve zdjelice s MRS agarom. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C, izbrojane su porasle kolonije i proračunat broj živih stanica po mililitru uzorka.

3.2.3.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti bakterijskih izolata

Antimikrobna aktivnost izolata bakterija mliječne kiseline ispitana je turbidimetrijskom metodom na test mikroorganizmima: *Escherichia coli* 3014, *Staphylococcus aureus* 3048, *Proteus mirabilis* 3008, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Listeria monocytogenes* ATCC 23074, *Vibrio* sp. i *Aeromonas hydrophila* JCM 1027.

3.2.3.4.1. Priprava bakterija mliječne kiseline za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Kulture bakterija mliječne kiseline uzgojene su preko noći u MRS bujonu i centrifugirane 15 minuta pri 6 000 rpm. Dobiveni supernatant se koristio za ispitivanje antibakterijske aktivnosti.

3.2.3.4.2. Turbidimetrijska metoda

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240 µl supernatanata određenog bakterijskog izolata i 10 µl test mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivom bujonu. Supernatant BMK je prethodno neutraliziran s 1M NaOH kako bi se izbjegnuo inhibitorni učinak mliječne kiseline. Antibakterijsko djelovanje supernatanata bakterijskih izolata na test mikroorganizme, tijekom 72 sata uzgoja (2, 4, 6, 24, 48 i 72 h) pri 37 °C, određivano je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Austrija). Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen hranjivi bujon s test mikroorganizmom bez dodanog supernatanata bakterijskog izolata) i uzoraka s dodanim supernatantom bakterijskog izolata mjera je inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepe probe su bili uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama (Frece i sur., 2010a). Stupanj inhibicije određen je prema izrazu: Stupanj inhibicije (%) = $(1- A_1/A_o)\times100$ (Frece i sur., 2009).

3.2.3.5. Ispitivanje prisutnosti bakteriocina

3.2.3.5.1. Izolacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK) za određivanje prisutnosti bakteriocina

Ukupna genomska DNK *L. plantarum* O1 izolirana je iz bakterijske kulture s NucleoSpin, Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka), slijedeći preporuke proizvođača.

3.2.3.5.2. Oligonukleotidi

Za potrebe određivanja prisutnosti bakteriocina sintetizirano je osam različitih oligonukleotida koji su prikazani u tablici 6. Korišteni su kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze (PCR). Proizvođač navedenih oligonukleotida je "Metabion" (Njemačka).

Tablica 6. Početnice korištene za lančanu reakciju polimeraze (PCR) za amplifikaciju gena koji su odgovorni za biosintezu plantaricina

Početnice	Sekvenca	Temperatura sparivanja/°C
PlnA-for	5'-ATGAAAATTCAAATTAAAGGTATGAAGC-3'	53
PlnA-rev	5'-TTACCATCCCCATTTTTTAAACAGTTTC-3'	
PlnEF-for	5'-GGCATAGTTAAAATTCCCCCC-3'	53,2
PlnEF-rev	5'-CAGGTTGCCGCAAAAAAA G-3'	
PlnNC8-for	5'-GGTCTGCGTATAAGCATCGC-3'	60
PlnNC8-rev	5'-AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC-3'	
PlnW-for	5'-TCACACGAAATATTCCA-3'	55
PlnW-rev	5'-GGCAAGCGTAAGAAATAAATGAG-3'	

3.2.3.5.3. Detekcija gena za sintezu bakteriocina lančanom reakcijom polimeraze

Za sintezu željenog fragmenta DNK bile su potrebne dvije oligonukleotidne početnice komplementarne 3'-krajevima, DNK koja se umnožava (DNK-kalup), deoksiribonukleozid-trifosfati (ATP; CTP; GTP i TTP; sva četiri u jednakim koncentracijama) i termorezistentna DNK polimeraza s odgovarajućim puferom. Kao DNK-kalup korištena je cjelokupna DNK *L. plantarum* O1 izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.3.5.1. Reakcijska smjesa volumena 25 µl bila je slijedećeg sastava: 12,5 µl HotStarTaq Plus master Mix Kit, 1 µl P1 (for), 1 µl P2 (rev), 2,5 µl Midori Green Advance DNK boje, 1 µl DNK i 7 µl sterilne H_2O. Amplifikacija DNK PCR metodom provedena je u DNK-termobloku, Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Postupak je bio sljedeći: denaturacija na 95 °C tijekom 5 min, nakon čega je slijedilo 30 ciklusa denaturacije na 94 °C tijekom 30 s, komplementarno sparivanje početnica na specifičnoj temperaturi tijekom 1 min te polimerizacija 1 min na 72 °C. Dobiveni uzorci fragmenta analizirani su elektroforezom u gelu agaroze (poglavlje 3.2.3.5.4).

3.2.3.5.4. Elektroforeza u gelu agaroze

Elektroforeza DNK *L. plantarum* O1 provedena je u 1 % agaroznom gelu pripremljenom s TAE-puferom (40 mmol/L TRIS-HAc pH 8,0; 1 mmol/l EDTA). Elektroforeza je provedena pri naponu 5 V/cm gela, a po njenom završetku gel je uronjen u otopinu etidij-bromida na 15 minuta, nakon čega su vrpce DNK vizualizirane pomoću UV svjetla na transiluminatoru (Hoefer, Macrovue UVis-20).

3.2.3.5.5. LC-MS ESI (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Electrospray Ionisation)-tekućinska kromatografija spregnuta spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem

Potvrda prisutnosti bakteriocina kod *L. plantarum* O1 napravljena je pomoću LC-MS/ ESI kako je opisano u poglavlju 3.2.2.3.2. Peptidi su identificirani vezanim sustavom nano-tekućinske kromatografije i spektrometrije masa te pretragom ne-redunantne baze podataka proteinskih sekvenci američkog Nacionalnog Centra za biotehnološke informacije (NCBI).

3.2.3.6. Ispitivanje osjetljivosti bakterijskih izolata na antibiotike metodom difuzije na krutim hranjivim podlogama

Prekonoćna bakterijska kultura (100 µl), čija se osjetljivost ispituje, nacijepljena je u epruvetu koja sadrži 12 ml MRS agar hranjive podloge koja je prethodno otopljena i ohlađena na 50 °C. Inokulirana podloga izlivena je u Petrijeve zdjelice. Kada se hranjiva podloga skrutnula, sterilnom pincetom nanešeni su filter diskovi s antibioticima. Ispitana je antibiotička rezistencija izolata na 12 različitih antibiotika: kanamicin, meticilin, neomicin, eritromicin, tobramicin, ampicilin, streptomicin, gentamicin, kloramfenikol, rifampicin, vankomicin i tetraciklin. Petrijeve ploče su inkubirane pri 37 °C preko noći, nakon čega je slijedilo mjerenje promjera zona inhibicije, uključujući i promjer diska.

3.2.3.7. Određivanje biogenih amina pomoću selektivnih podloga

Kako bi se provjerilo da li bakterijski izolati proizvode histidin dekarboksilazu odnosno tirozin dekarboksilazu, sojevi su prethodno uzgojeni na MRS agaru a zatim inokulirani na DA-H i DA-T ploče s histidinom tj. tirozinom. Mediji su napravljeni prema Joosten i Northolt (1989). Inkubacija je provedena anaerobno na 37 °C tijekom 5 dana. Pozitivan rezultat su ljubičaste tj. prozirne zone oko poraslih kolonija.

3.2.3.8. Hemolitička aktivnost

Bakterijski izolati nacijepljeni su na ploče s krvnim agarom i inkubirani na 30 °C tijekom 24-48 h. Prozirne zone oko poraslih kolonija znak su da je došlo do hemolize krvi.

3.2.3.9. Preživljavanje probiotičkih sojeva tijekom liofilizacije

Bakterijske kulture uzgojene na MRS hranjivoj podlozi su centifugirane (4000 rpm/ 10 min), isprane sterilnom destiliranom vodom i resuspendirane u obranom mlijeku (10 %). Tako priređene suspenzije stanica zamrznute su na -20 °C preko noći, a zatim su liofilizirane u liofilizatoru (model Alpha 1–2 LD Plus; Christ, Osterode am Harz, Njemačka) tijekom noći. Preživljavanje stanica nakon procesa liofilizacije određeno je indirektnom metodom (poglavlje 3.2.3.3.).

3.2.3.10. Preživljavanje bakterijskih izolata u *in situ* uvjetima

3.2.3.10.1. Preživljavanje bakterijskih izolata u žučnim solima ribe

Za dobivanje žuči, zdravi lubini žrtvovani su 72 h nakon posljednjeg hranjenja. Lateralnim rezom je otkrivena peritonealna šupljina i žučni mjehur se vizualno identificirao. Žuč je aseptički prikupljena punkcijom mjehura. Bakterijska suspenzija je pripremljena kako je opisano u poglavlju 3.2.3. Jedan mililitar bakterijske suspenzije (10^7 CFU/ml) inokuliran je u 10 ml sterilnog PBS pH 7,2 (kontrola) ili u sterilni PBS (pH 7,2) koji sadrži 10 % (v/v) riblje žuči (Nikoskelainen et al., 2001). Jedan mililitar svake suspenzije je uzet odmah (0 h) i nakon 1,5 h na 18 °C. Broj živih bakterija određen je indirektnom metodom (poglavlje 3.2.3.3.).

3.2.3.10.2. Preživljavanje bakterijskih izolata u želučanom soku ribe

Priređena suspenzija bakterijskih stanica inokulirana je (10^7 CFU/ml) u želučani sadržaj dobiven punkcijom želuca lubina ili u fiziološku otopinu pH 6 (kontrola). Nakon inkubacije na 18 °C tijekom 1,5 h, broj poraslih kolonija određen je indirektnom metodom (poglavlje 3.2.3.3.).

3.2.3.10.3. Preživljavanje bakterijskih izolata u morskoj vodi

Bakterijske kulture uzgojene su u MRS bujonu tijekom 16 h te su centrifugirane 5 min na 6 000 rpm pri 4 °C. Talog stanica ispran je dva puta u sterilnom PBS puferu (pH 7,2) i resuspendiran u manjem volumenu istog pufera (200 µl). BMK izolati su inokulirani (10^7 CFU/ml) u filtriranu (0,22 µm) i autoklaviranu (121 °C, 15 min) morsku vodu (100 ml) i inkubirani na 18 °C tijekom 7 dana. Alikvoti (1 ml) su uzimani nakon 0 h, 2 h, 6 h, 24 h, 48h i 7. dan te je broj poraslih kolonija određen indirektnom metodom (poglavlje 3.2.3.3.).

3.2.3.10.4. Test adhezije bakterijskih izolata na sluz svježe ribe

Uzorci sluzi su dobiveni iz četiri jedinke lubina prosješne tjelesne mase 400 g, neposredno nakon žrtvovanja prema postupku Cohen i Laux (1995). Sluz je dobivena blagim struganjem površine ribe gumenom četkicom i stavljena u malu količinu fosfatnog pufera pH 7,2. Sluz s kože je sakupljena s cijelog tijela ribe, a uzorci sluzi pohranjeni su u alikvotima od 1 ml na -20 °C do upotrebe.

Sposobnost bakterijskih izolata da adheriraju na površinsku sluz procijenjena je primjenom mikrotitarske pločice s 96 jažica koja je prethodno presvučena s ribljom sluzi. Pločica je presvučena sa 150 µl uzorka sluzi i inkubirana preko noći na 4 °C. Nakon toga jažice su isprane s PBS-om radi uklanjanja nevezane sluzi. Svakoj jažici dodano je 100 µl svježeg BMK izolata (~ 1.0×10^8 CFU/ml). Nakon 1 h, ispiranjem s PBS-om uklonjene su nevezane bakterije a pričvršćene bakterije su fiksirane tijekom 20 min na 60 °C i obojane kristal violetom tijekom 45 min. Jažice su potom isprane s PBS puferom kako bi se uklonio višak boje. Boja koja je ostala vezana na bakterijskim stanicama otpuštena je ispiranjem sa 100 µl 20 mM acetatnog pufera, pH 4,3. Ukupno bakterijsko vezanje određeno je pomoću optičke gustoće (OD) na valnoj duljini od 600 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (model Sunrise, Tecan, Grödig, Austrija) a postotak bakterijskih stanica vezanih na sluz izračunat je dolje navedenom formulom (Geraylou et al., 2014).

$$AC(\%) = \frac{(A1 - A_{Ctrl})}{A_0} \times 100 \qquad (1)$$

gdje je:

AC: kapacitet adhezije (%)

A_{Ctrl}: absorbancija kontrolnog uzorka (obojana sluz)

A_0: vrijednost absorbancije korištenog BMK soja (10^8 CFU/ml)

A1: vrijednost absorbancije BMK soja vezanog na sluz

3.2.4. Statistička obrada podataka

Svi pokusi provedeni su u triplikatu. Za statističku obradu podataka korišten je program STATISTICA v.7.1. za Windows 10 (Stat-Soft, Tulsa, OK, SAD). Prije statističke obrade rezultati dobiveni u istraživanjima su pripremljeni i uređeni u programu Microsoft Office Excel 2013.

4. REZULTATI

4.1. Izolacija te fenotipska i genotipska identifikacija mikrobne populacije

Tijekom ljetnog i zimskog perioda prikupljeni su uzorci svježe orade, lubina, kamenica i dagnji iz kojih je potom klasičnim mikrobiološkim metodama izolirana trenutno prisutna mikrobna populacija (tablice 7-14). U uzorcima u kojima je zabilježena prisutnost bakterija mliječne kiseline identificirano je šest autohtonih izolata. Biokemijskim API testovima dobiveni su fermentacijski profili izoliranih bakterijskih izolata s vrlo visokom razinom identifikacije (identifikacija vrste s ID u rangu od 98 do 99,9 %) (tablice 15, 16).

Fenotipska identifikacija ispitivanih izolata provedena je i analizom površinskih i ukupnih proteina natrij dodecil sulfat poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE) (slike 2-3) koja je dodatno potvrđena spektrometrijom masa MALDI-TOF/MS.

Tablica 7. Mikrobiološka analiza uzoraka lubina tijekom zimskog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enterobacteriaceae	$8,7 \pm 0,67 \times 10^1$	$7,5 \pm 0,70 \times 10^1$	$9,2 \pm 0,63 \times 10^1$	$8,8 \pm 0,6 \times 10^1$	$6,9 \pm 0,67 \times 10^1$
Sulfitoreducirajući klostridiji	n.d.	$1,2 \pm 0,50 \times 10^1$	n.d.	n.d.	n.d.
Vibrio sp.	$2,7 \pm 0,70 \times 10^1$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Aerobne mezofilne bakterije	$2,7 \pm 0,84 \times 10^3$	$4,2 \pm 0,8 \times 10^2$	$1,5 \pm 0,65 \times 10^3$	$2,2 \pm 0,74 \times 10^3$	$3,8 \pm 0,68 \times 10^3$
P. aeruginosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bakterije mliječne kiseline	n.d.	$9,0 \pm 0,65 \times 10^2$	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije dokazano

Tablica 8. Mikrobiološka analiza uzoraka lubina tijekom ljetnog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	n.d.	$4,2 \pm 0,57 \times 10^2$	n.d.	$2,6 \pm 0,6 \times 10^3$
Enterobacteriaceae	$6,9 \pm 0,63 \times 10^3$	$4,7 \pm 0,59 \times 10^4$	$3,7 \pm 0,61 \times 10^4$	$1,3 \pm 0,7 \times 10^5$	$5,8 \pm 0,82 \times 10^5$
Sulfitoreducirajući klostridiji	n.d.	n.d.	$2,5 \pm 0,65 \times 10^5$	$4,5 \pm 0,73 \times 10^5$	n.d.
Vibrio sp.	$4,3 \pm 0,73 \times 10^3$	$2,7 \pm 0,70 \times 10^2$	$5,6 \pm 0,55 \times 10^4$	n.d.	$7,7 \pm 0,58 \times 10^2$
Aerobne mezofilne bakterije	$2,3 \pm 0,82 \times 10^5$	$2,9 \pm 0,74 \times 10^5$	$1,8 \pm 0,6 \times 10^6$	$7,3 \pm 0,72 \times 10^4$	$8,1 \pm 0,56 \times 10^5$
P. aeruginosa	n.d.	$7,3 \pm 0,65 \times 10^3$	$5,3 \pm 0,57 \times 10^4$	n.d.	n.d.
Bakterije mliječne kiseline	$4,6 \pm 0,63 \times 10^5$	$9,0 \pm 0,65 \times 10^2$	$6,3 \pm 0,61 \times 10^4$	n.d.	$3,2 \pm 0,59 \times 10^5$

n.d.-nije dokazano

Tablica 9. Mikrobiološka analiza uzoraka orade tijekom zimskog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Enterobacteriaceae	$3,5 \pm 0,7 \times 10^1$	$5,6 \pm 0,73 \times 10^1$	$9,3 \pm 0,66 \times 10^1$	$7,2 \pm 0,57 \times 10^1$	$8,3 \pm 0,65 \times 10^1$
Sulfitoreducirajući klostridiji	n.d.	n.d.	n.d.	$4,2 \pm 0,63 \times 10^1$	n.d.
Vibrio sp.	n.d.	n.d.	$1,8 \pm 0,75 \times 10^1$	n.d.	n.d.
Aerobne mezofilne bakterije	$3,2 \pm 0,65 \times 10^1$	$4,7 \pm 0,76 \times 10^3$	$6,3 \pm 0,66 \times 10^2$	$3,6 \pm 0,73 \times 10^1$	$2,5 \pm 0,64 \times 10^3$
P. aeruginosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Bakterije mliječne kiseline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije dokazano

Tablica 10. Mikrobiološka analiza uzoraka orade tijekom ljetnog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	$5,7 \pm 0,5 \times 10^2$	n.d.	n.d.	$8,1 \pm 0,63 \times 10^2$
Enterobacteriaceae	$1,6 \pm 0,6 \times 10^3$	$3,3 \pm 0,59 \times 10^5$	$4,7 \pm 0,61 \times 10^5$	$5,9 \pm 0,7 \times 10^4$	$7,1 \pm 0,74 \times 10^6$
Sulfitoreducirajući klostridiji	n.d.	$6,8 \pm 0,6 \times 10^4$	n.d.	n.d	n.d.
Vibrio sp.	$2,6 \pm 0,7 \times 10^2$	n.d.	$4,9 \pm 0,58 \times 10^4$	n.d.	$6,4 \pm 0,6 \times 10^3$
Aerobne mezofilne bakterije	$4,6 \pm 0,75 \times 10^4$	$5,3 \pm 0,69 \times 10^5$	$2,8 \pm 0,66 \times 10^5$	$4,7 \pm 0,7 \times 10^6$	$7,3 \pm 0,54 \times 10^5$
P. aeruginosa	n.d.	$3,6 \pm 0,63 \times 10^3$	n.d.	$5,8 \pm 0,59 \times 10^3$	n.d.
Bakterije mliječne kiseline	$9,3 \pm 0,61 \times 10^6$	n.d.	$5,8 \pm 0,59 \times 10^4$	n.d.	$7,2 \pm 0,6 \times 10^4$

n.d.-nije dokazano

Tablica 11. Mikrobiološka analiza uzoraka dagnji tijekom zimskog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E. coli *(/100 g mesa)*	n.d.	$2,5 \pm 0,63 \times 10^2$	$1,9 \pm 0,55 \times 10^2$	n.d.	n.d.
Sulfitoreducirajući klostridiji	n.d.	$1,6 \pm 0,70 \times 10^2$	$2,3 \pm 0,66 \times 10^2$	n.d.	n.d.
Vibrio sp.	n.d.	$4,2 \pm 0,47 \times 10^1$	$3,6 \pm 0,6 \times 10^1$	n.d.	n.d.
Aerobne mezofilne bakterije	$2,6 \pm 0,80 \times 10^3$	$3 \pm 0,88 \times 10^2$	$2,7 \pm 0,75 \times 10^3$	$3,3 \pm 0,69 \times 10^3$	$3,1 \pm 0,83 \times 10^3$
P. aeruginosa	$3,6 \pm 0,69 \times 10^2$	$4,4 \pm 0,80 \times 10^2$	$2,4 \pm 0,78 \times 10^3$	$4,8 \pm 0,73 \times 10^2$	$4,1 \pm 0,66 \times 10^3$
Bakterije mliječne kiseline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije dokazano

Tablica 12. Mikrobiološka analiza uzoraka dagnji tijekom ljetnog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	n.d.	$2,7 \pm 0,45 \times 10^2$	n.d.	$5,5 \pm 0,39 \times 10^3$
E. coli *(/100 g mesa)*	$2,7 \pm 0,58 \times 10^2$	$1,8 \pm 0,62 \times 10^2$	$1,9 \pm 0,55 \times 10^2$	n.d.	$7,3 \pm 0,63 \times 10^4$
Sulfitoreducirajući klostridiji	$4,7 \pm 0,74 \times 10^3$	$1,6 \pm 0,70 \times 10^2$	$2,3 \pm 0,66 \times 10^2$	$1,2 \pm 0,45 \times 10^1$	n.d.
Vibrio sp.	$4,6 \pm 0,43 \times 10^3$	$3,9 \pm 0,27 \times 10^5$	$7,2 \pm 0,43 \times 10^2$	$1,8 \pm 0,36 \times 10^4$	$4,6 \pm 0,43 \times 10^3$
Aerobne mezofilne bakterije	$3,4 \pm 0,80 \times 10^5$	$2,9 \pm 0,84 \times 10^4$	$6,3 \pm 0,76 \times 10^4$	$4,8 \pm 0,72 \times 10^6$	$3,6 \pm 0,83 \times 10^5$
P. aeruginosa	$2,5 \pm 0,66 \times 10^2$	$3,5 \pm 0,77 \times 10^3$	$6,3 \pm 0,59 \times 10^3$	$5,6 \pm 0,69 \times 10^5$	$3,9 \pm 0,67 \times 10^5$
Bakterije mliječne kiseline	n.d.	n.d.	$4,5 \pm 0,72 \times 10^4$	n.d.	n.d.

n.d.-nije dokazano

Tablica 13. Mikrobiološka analiza uzoraka kamenica tijekom zimskog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
E. coli *(/100 g mesa)*	$2,1 \pm 0,71 \times 10^2$	n.d.	n.d.	n.d.	$3,5 \pm 0,63 \times 10^2$
Sulfitoreducirajući klostridiji	$2,3 \pm 0,70 \times 10^2$	n.d.	$4,1 \pm 0,59 \times 10^3$	n.d.	n.d.
Vibrio sp.	$1,9 \pm 0,67 \times 10^2$	n.d.	n.d.	$2,3 \pm 0,55 \times 10^2$	n.d.
Aerobne mezofilne bakterije	$3,5 \pm 0,86 \times 10^3$	$2,9 \pm 0,9 \times 10^3$	$3,1 \pm 0,83 \times 10^3$	$3,8 \pm 0,79 \times 10^2$	$3,5 \pm 0,88 \times 10^3$
P. aeruginosa	$2,6 \pm 0,81 \times 10^3$	$4,2 \pm 0,79 \times 10^2$	$5,4 \pm 0,74 \times 10^3$	$3,7 \pm 0,66 \times 10^2$	$4,5 \pm 0,72 \times 10^3$
Bakterije mliječne kiseline	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije dokazano

Tablica 14. Mikrobiološka analiza uzoraka kamenica tijekom ljetnog perioda (CFU/g)

	CFU/g				
uzorci / mikroorganizmi	uzorak 1	uzorak 2	uzorak 3	uzorak 4	uzorak 5
L. monocytogenes	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Salmonella sp.	$2,9 \pm 0,76 \times 10^3$	n.d.	n.d.	$5,3 \pm 0,67 \times 10^4$	$3,8 \pm 0,85 \times 10^3$
E. coli *(/100 g mesa)*	$6,3 \pm 0,75 \times 10^4$	$5,3 \pm 0,8 \times 10^5$	$1,3 \pm 0,75 \times 10^2$	$7,9 \pm 0,77 \times 10^4$	$4,6 \pm 0,67 \times 10^3$
Sulfitoreducirajući klostridiji	$2,3 \pm 0,70 \times 10^2$	$8,5 \pm 0,61 \times 10^3$	n.d.	$4,1 \pm 0,55 \times 10^4$	$9,3 \pm 0,57 \times 10^5$
Vibrio sp.	$3,5 \pm 0,64 \times 10^4$	$4,7 \pm 0,62 \times 10^3$	$3,9 \pm 0,59 \times 10^5$	$2,4 \pm 0,59 \times 10^6$	$6,1 \pm 0,53 \times 10^5$
Aerobne mezofilne bakterije	$2,9 \pm 0,84 \times 10^5$	$4,7 \pm 0,92 \times 10^4$	$8,2 \pm 0,84 \times 10^6$	$5,6 \pm 0,65 \times 10^6$	$4,7 \pm 0,82 \times 10^7$
P. aeruginosa	$4,9 \pm 0,75 \times 10^5$	$6,7 \pm 0,8 \times 10^4$	$3,6 \pm 0,74 \times 10^3$	$6,5 \pm 0,54 \times 10^3$	$5,5 \pm 0,76 \times 10^4$
Bakterije mliječne kiseline	n.d.	$3,7 \pm 0,75 \times 10^4$	n.d.	n.d.	n.d.

n.d.-nije dokazano

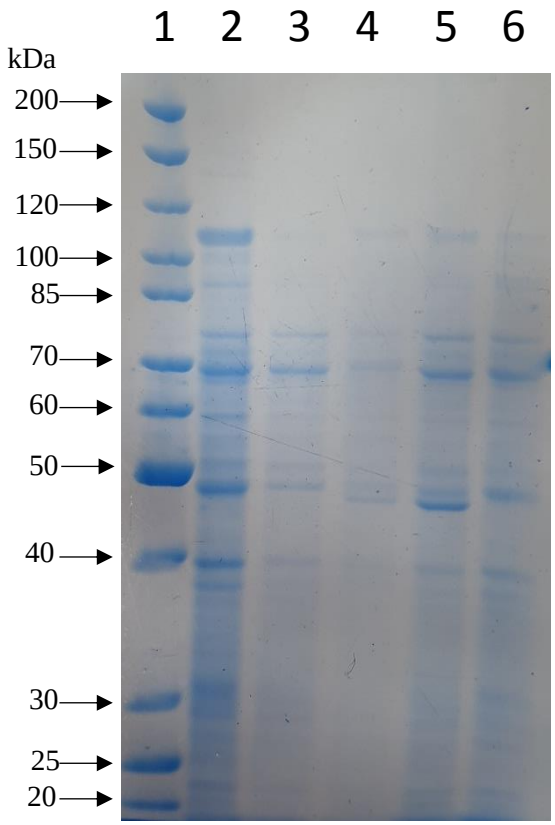
Tablica 15. Rezultati identifikacije autohtonih izolata čistih kultura bakterija mliječne kiseline

Oznaka	**Uzorak**	**BMK**	**API ID (%)**	**MALDI-TOF Score**
O1	Orada (sadržaj želuca)	*Lactobacillus plantarum*	99,9	*Lactobacillus plantarum* (2,555)
O9	Orada (sadržaj želuca)	*Lactobacillus helveticus*	98,7	*Lactobacillus helveticus* (2,443)
L4A	Orada (sluz sa škrga)	*Leuconostoc mesenteroides*	99,1	*Leuconostoc mesenteroides* (2,238)
K4	Kamenice (sadržaj želuca)	*Lactobacillus plantarum*	98,5	*Lactobacillus plantarum* (2,059)
D1	Dagnje (međuljušturna tekućina)	*Lactobacillus plantarum*	99,0	*Lactobacillus plantarum* (2,108)
L2	Lubin (želudac)	*Lactobacillus delbrueckii*	64,2	*Enterococcus mundtii* (2,336)

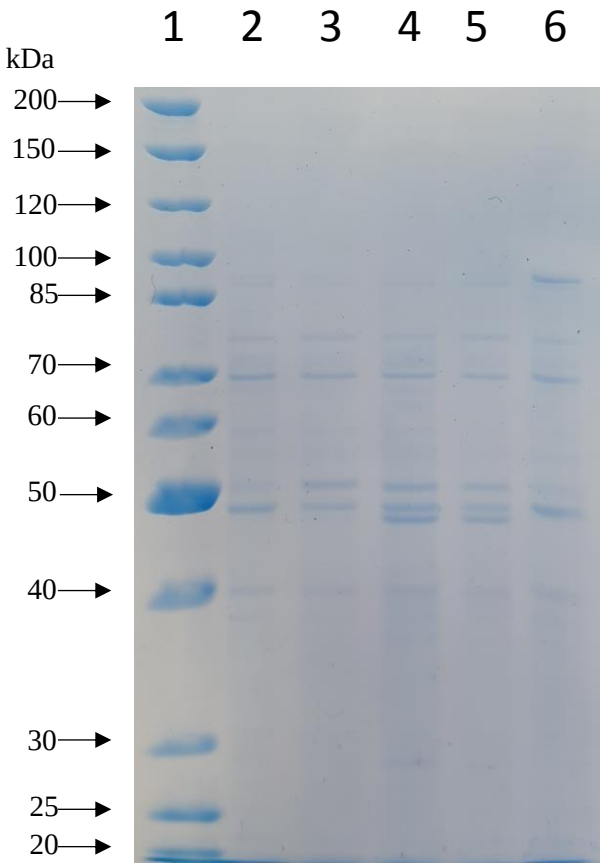
Tablica 16. Fermentacijski profil izoliranih izolata čistih kultura bakterija mliječne kiseline

Ugljikohidrati	**Izolati**					**Ugljikohidrati**	**Izolati**				
	O1	**O9**	**L4A**	**K4**	**D1**		**O1**	**O9**	**L4A**	**K4**	**D1**
Kontrola	+	-	-	-	-	Arbutin	+	-	+	+	-
Glicerol	-	-	-	-	-	Eskulin	+	-	+	+	-
Eritriol	-	-	-	-	-	Salicin	+	-	+	+	-
D-arabinoza	-	-	-	-	-	Celobioza	+	-	+	+	-
L-arabinoza	+	-	+	-	-	Maltoza	+	-	+	+	+
Riboza	+	-	-	+	+	Laktoza	+	+	-	+	+
D-ksiloza	-	-	+	-	-	Melibioza	+	-	+	+	-
L-ksiloza	-	-	-	-	-	Saharoza	+	-	+	+	-
Adonitol	-	-	-	-	-	Trehaloza	-	-	+	+	-
β-metil-ksilozid	-	-	-	-	-	Inulin	+	-	-	-	-
Galaktoza	+	+	+	+	+	Melezitoza	+	-	-	+	-
D-glukoza	+	+	+	+	+	D-rafinoza	-	-	-	-	-
D-fruktoza	+	-	+	+	+	Amidon	-	-	-	-	-
D-manoza	+	+	+	+	+	Glikogen	-	-	-	-	-
L-sorboza	-	-	-	-	-	Ksilitol	±	-	-	-	-
Ramnoza	±	-	-	-	-	β-gentobioza	+	-	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	D-turanoza	-	-	+	-	-
Inozitol	-	-	-	-	-	D-liksoza	-	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	+	+	D-tagatoza	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	+	-	D-fukoza	-	-	-	-	-
α-metil-D-manozid	-	-	-	-	-	L-fukoza	-	-	-	-	-
α-metil-D-glukozid	-	-	+	-	-	D-arabitol	-	-	-	-	-
N-acetil glukozamin	+	+	+	+	+	L-arabitol	±	-	-	-	-
Amigdalin	+	-	+	+	+	Glukonat	-	-	-	-	-
2-keto-glukonat	+	-	-	-	-	5-keto-glukonat	-	-	-	-	-

Kratice: -: negativna reakcija, nije došlo do promjene boje; +: pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati; ±: promjena boje između zelene i žute



Slika 2. SDS-PAGE površinskih staničnih proteina izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline. Stupci: 1: standard proteina poznatih molekulskih masa; 2: *Lactobacillus plantarum* O1; 3: *Lactobacillus plantarum* D1; 4: *Lactobacillus plantarum* K4; 5: *Leuconostoc mesenteroides* L4A; 6: *Lactobacillus helveticus* O9



Slika 3. SDS-PAGE ukupnih staničnih proteina izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline. Stupci: 1: standard proteina poznatih molekulskih masa; 2: *Lactobacillus plantarum* O1; 3: *Lactobacillus plantarum* D1; 4: *Lactobacillus plantarum* K4; 5: *Leuconostoc mesenteroides* L4A; 6: *Lactobacillus helveticus* O9

4.2. Karakterizacija bakterijskih izolata

Rezultati istraživanja sposobnosti rasta izolata čistih BMK pri 0 °C, 4 °C, 13 °C, 28 °C, 37 °C, 45 °C, 60 °C te u pH rasponu od 2-6 prikazani su u tablicama 17 i 18.

Tablica 17. Preživljavanje bakterijskih izolata pri različitim temperaturama u vremenu od 24 h

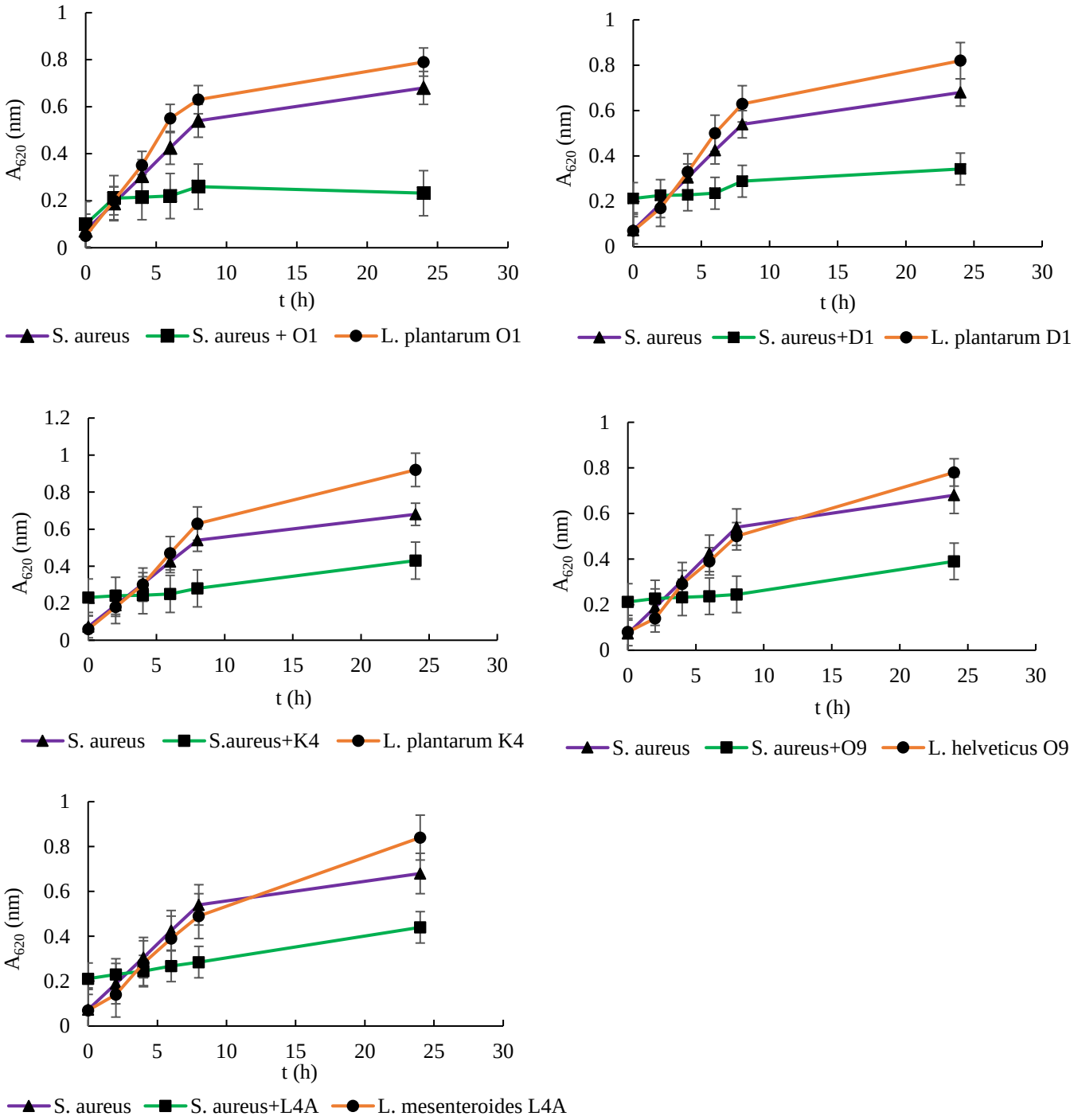
	CFU/ml						
temperatura (°C) / izolati	početni broj	4	13	28	37	45	60
L. plantarum O1	$1{,}1\times10^{9}$	$2{,}5\times10^{5}$	$3{,}2\times10^{7}$	2×10^{8}	5×10^{9}	6×10^{4}	-
L. plantarum D1	4×10^{9}	$6{,}8\times10^{4}$	$7{,}5\times10^{6}$	$1{,}1\times10^{10}$	3×10^{9}	$1{,}9\times10^{5}$	-
L. plantarum K4	5×10^{9}	$8{,}2\times10^{4}$	$1{,}3\times10^{7}$	5×10^{9}	4×10^{9}	$5{,}3\times10^{5}$	-
L. helveticus O9	3×10^{9}	$3{,}4\times10^{5}$	1×10^{6}	4×10^{9}	4×10^{9}	2×10^{5}	-
L. mesenteroides L4A	4×10^{9}	$5{,}4\times10^{4}$	$4{,}9\times10^{5}$	2×10^{9}	4×10^{9}	$1{,}8\times10^{5}$	-

Tablica 18. Preživljavanje bakterijskih izolata pri različitom pH u vremenu od 24 h

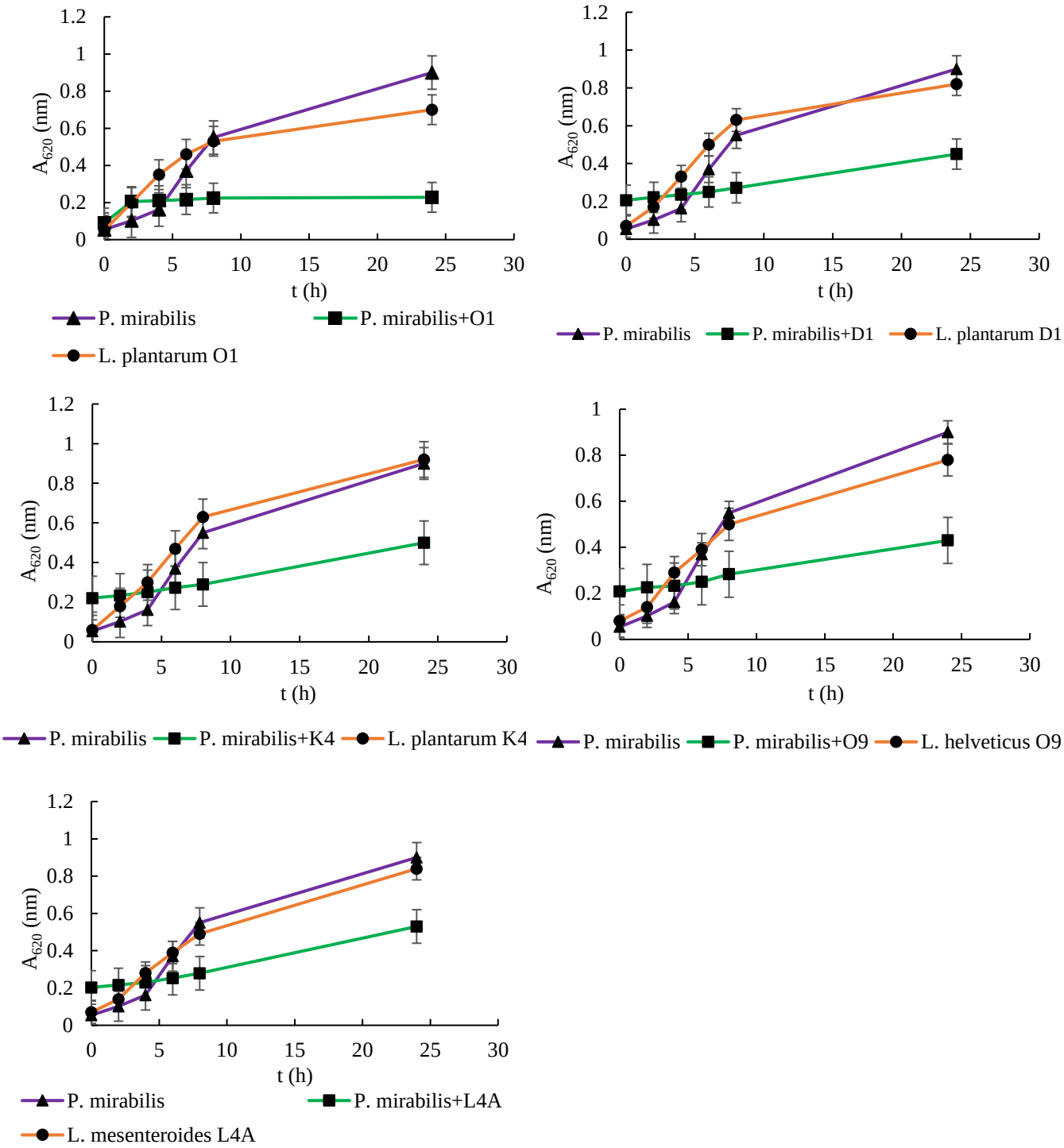
	CFU/ml			
pH / izolati	početni broj	2	4	6
L. plantarum O1	$1{,}1\times10^{9}$	4×10^{6}	8×10^{7}	$1{,}2\times10^{7}$
L. plantarum D1	4×10^{9}	$1{,}4\times10^{5}$	$2{,}3\times10^{7}$	$1{,}5\times10^{8}$
L. plantarum K4	5×10^{9}	2×10^{6}	7×10^{7}	$5{,}8\times10^{7}$
L. helveticus O9	3×10^{9}	5×10^{6}	$1{,}2\times10^{8}$	$4{,}7\times10^{8}$
L. mesenteroides L4A	4×10^{9}	$6{,}2\times10^{4}$	$1{,}4\times10^{7}$	$2{,}8\times10^{7}$

4.2.1. Antimikrobna aktivnost izoliranih bakterijskih izolata

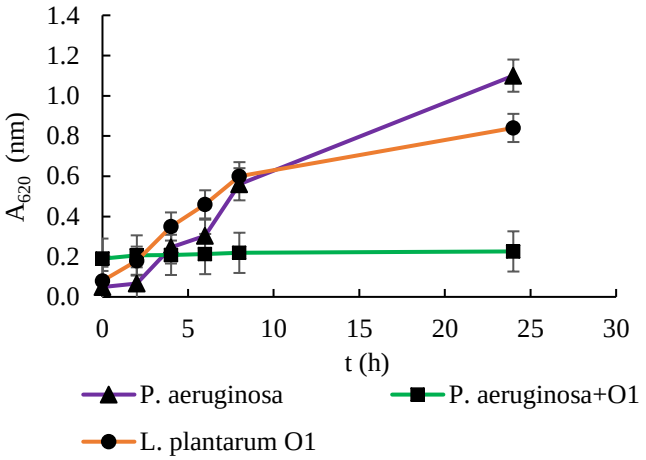
Inhibitorno djelovanje bakterijskih izolata na najčešće riblje patogene ispitano je turbidimetrijskom metodom, a rezultati koji ukazuju na učinkovitu antimikrobnu aktivnost svih sojeva prikazani su na slikama 4-10. Kao soj s najboljom antimikrobnom aktivnošću pokazao se *L. plantarum* O1. Kako bi se ispitao uzrok jakog antimikrobnog djelovanja proveden je dodatni test na pristunost gena koji kodira za bakteriocine lančanom reakcijom polimeraze. Dobiveni rezultati koji ukazuju na prisutnost gena za plantaricin A prikazani su na slici 11 i dodatno su potvrđeni LC/MS ESI spektrometrijom masa kojom je utvrđena prisutnost proteina povezanih sa sintezom bakteriocina (tablica 19, slika 12).

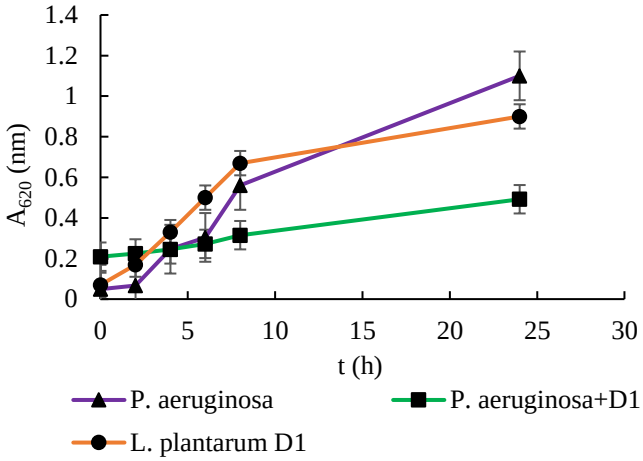


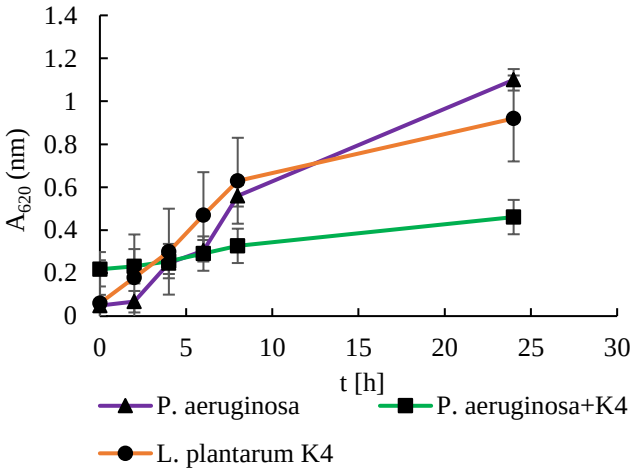
Slika 4. Krivulja rasta bakterije *S. aureus* 3048 (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A

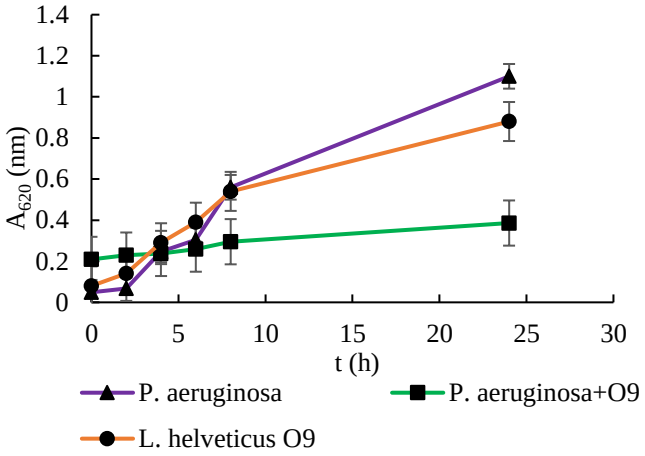


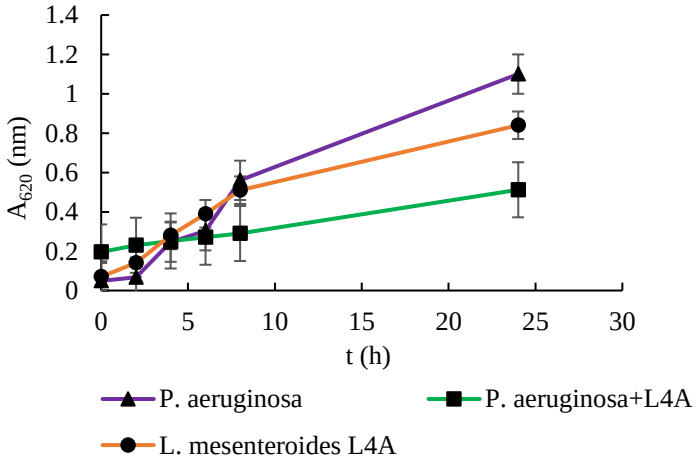
Slika 5. Krivulja rasta bakterije *P. mirabilis* 3008 (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A



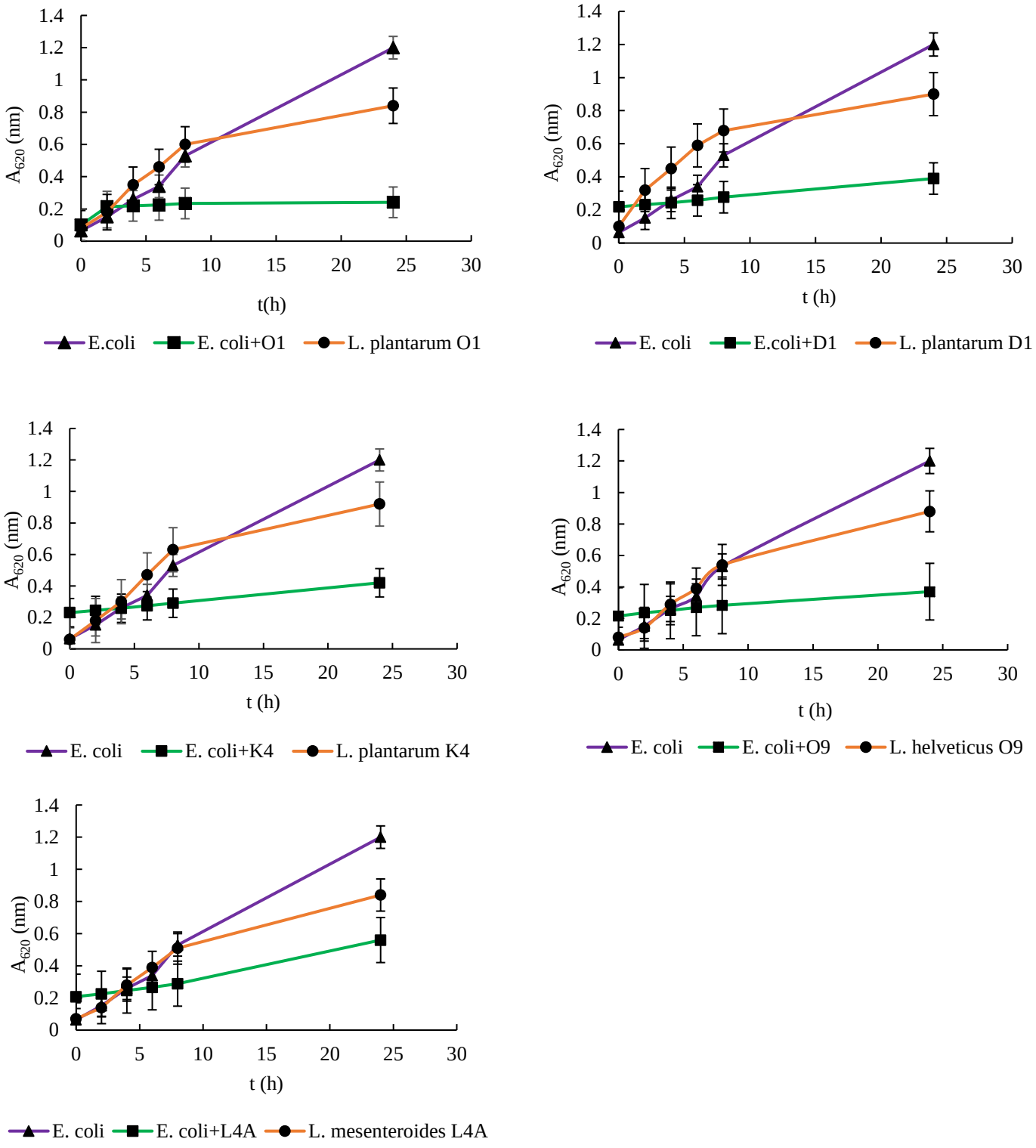




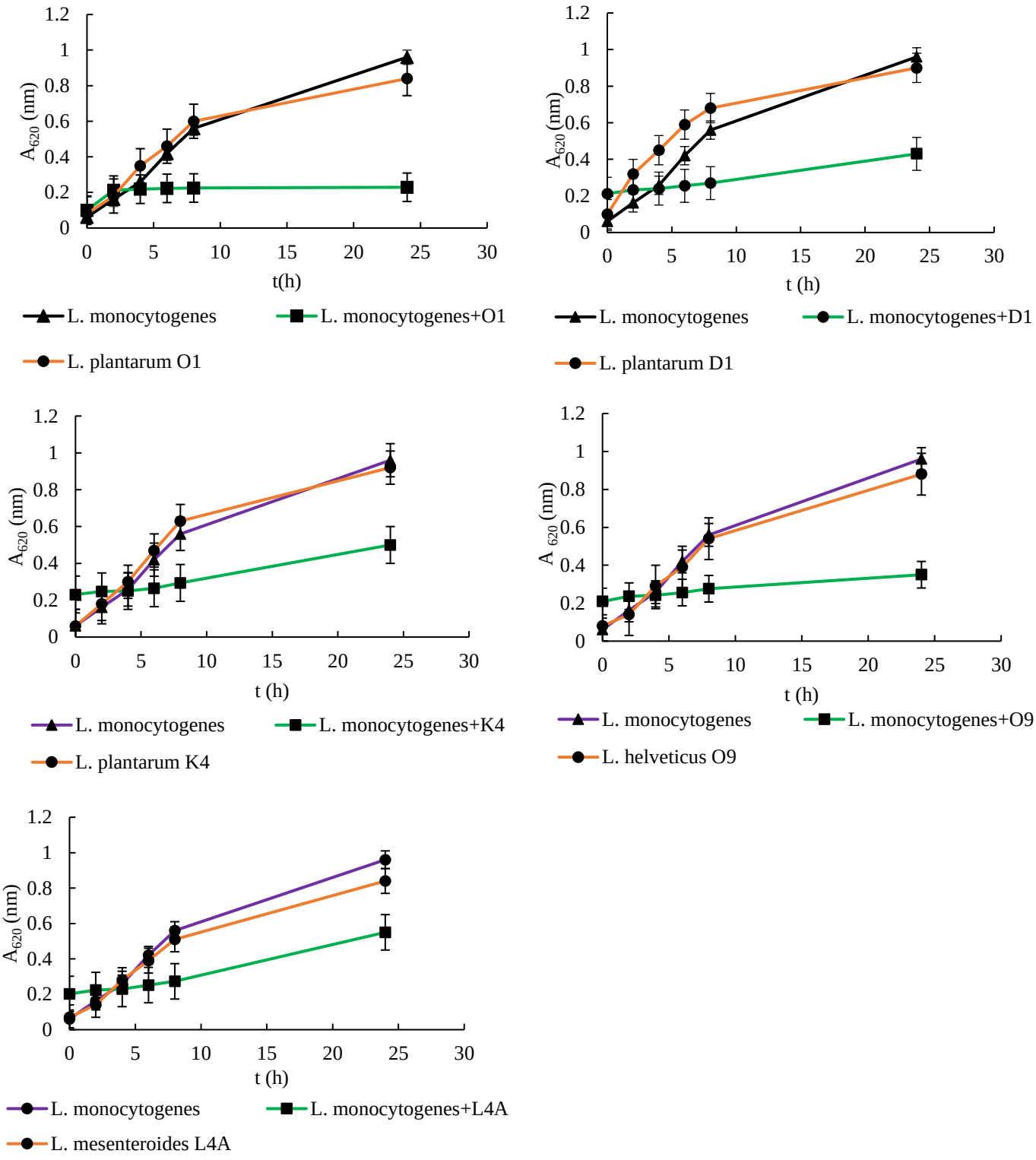




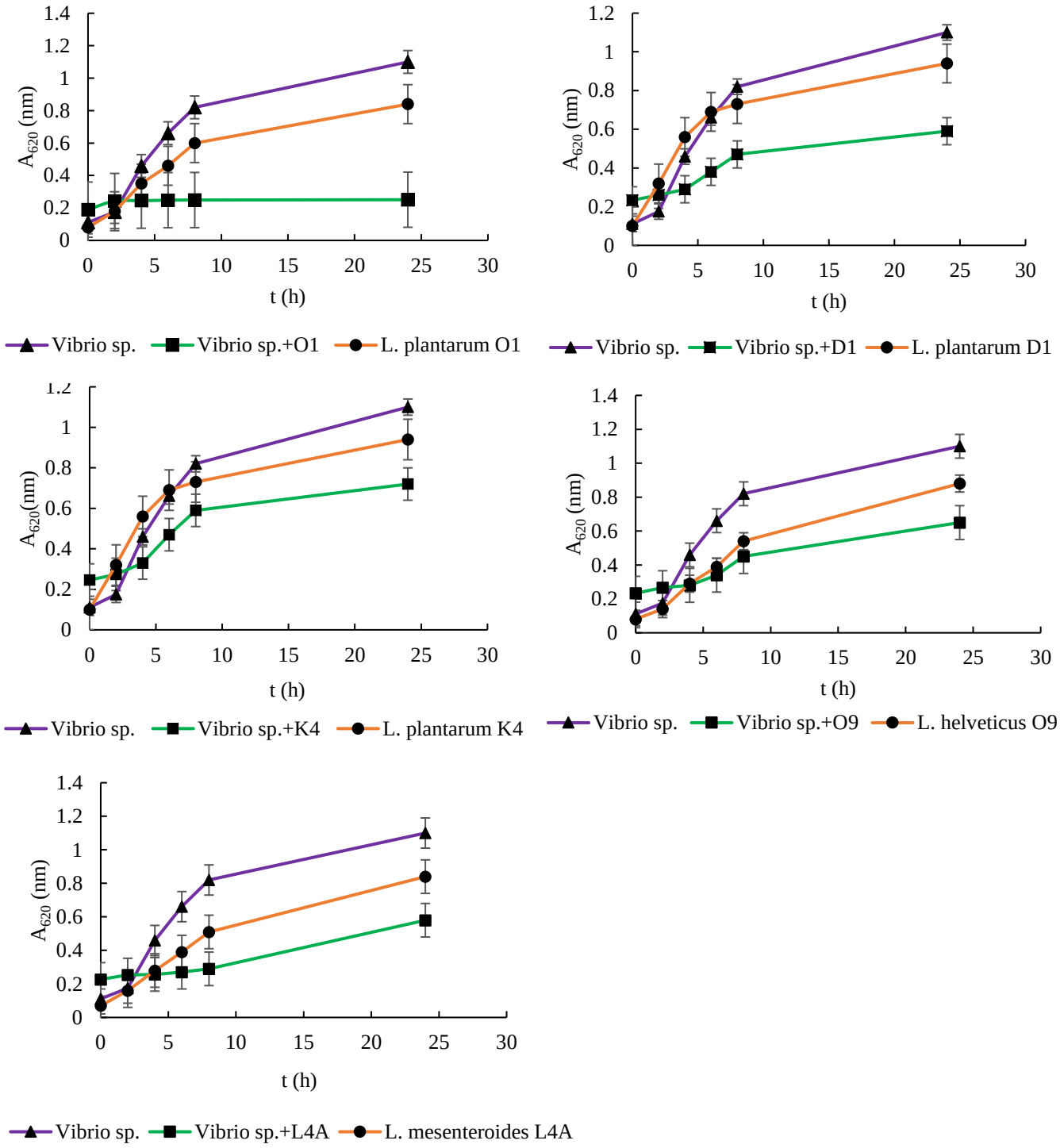
Slika 6. Krivulja rasta bakterije *P. aeruginosa* 3024 (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A



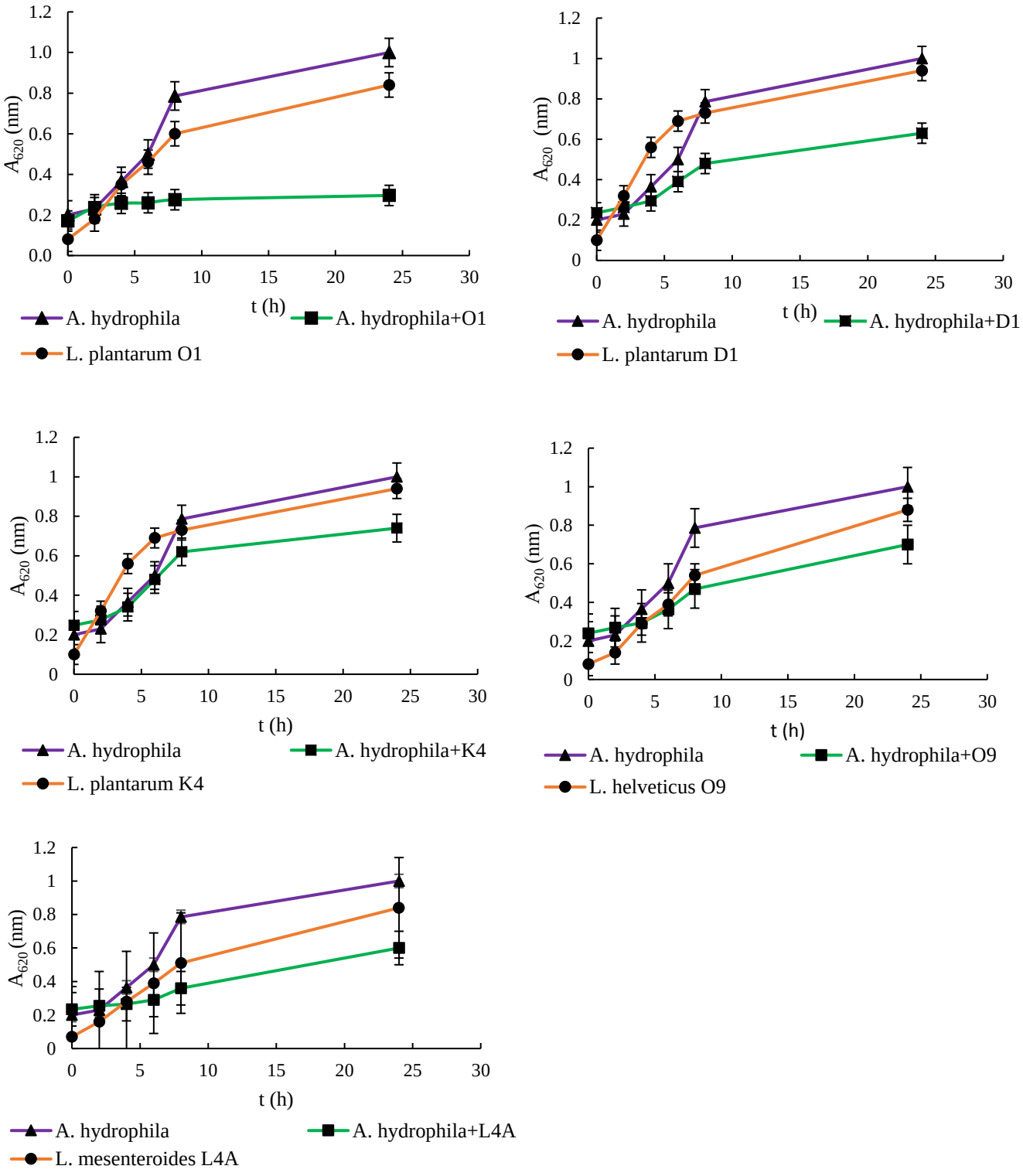
Slika 7. Krivulja rasta bakterije *E. coli* 3014 (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A



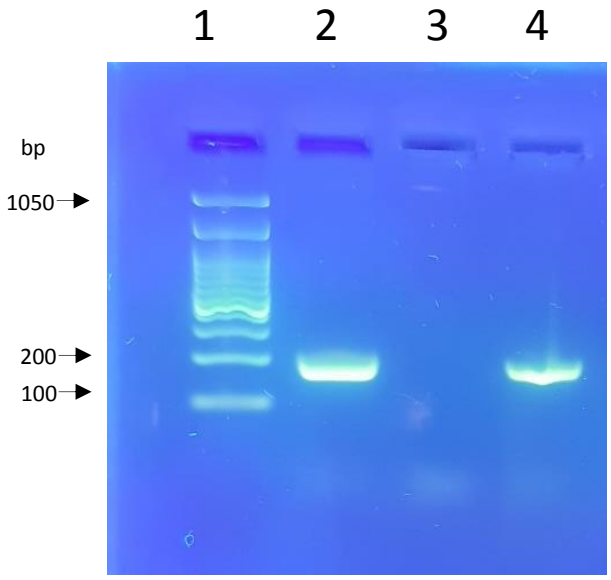
Slika 8. Krivulja rasta bakterije *L. monocytogenes* ATCC 23074 (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A



Slika 9. Krivulja rasta bakterije *Vibrio* sp. (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A



Slika 10. Krivulja rasta bakterije *Aeromonas hydrophila* JCM 1027 (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, L. *mesenteroides* L4A



Slika 11. PCR analiza *plnA* gena soja *L. plantarum* O1. Stupac 1 = DNK markeri (BenchTop 100 pb DNK standardi, Promega, Madison, WI, SAD), stupac 2 =*Lactobacillus plantarum* C11 (pozitivna kontrola), stupac 3 =*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363 (negativna kontrola) stupac 4=*Lactobacillus plantarum* O1

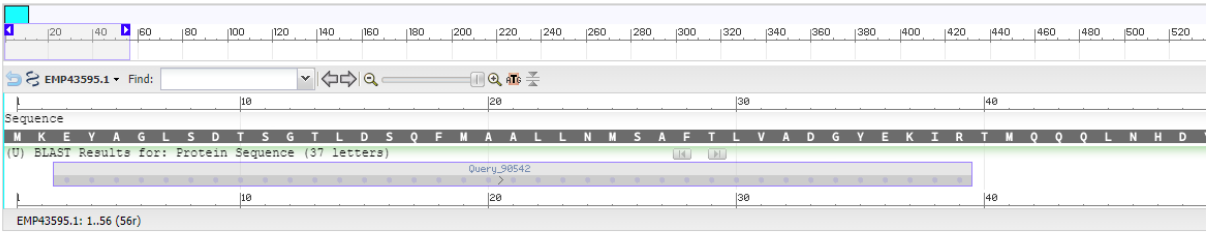
Tablica 19. Proteini slični bakteriocinima identificirani vezanim sustavom nano-tekućinske kromatografije i spektrometrije masa te pretragom ne-redunantne baze podataka proteinskih sekvenci američkog Centra za biotehnologiju (NCBI)

Identificirani proteini	MS2 fragment peptida
PHY43767.1 bacteriocin immunity protein [*Lactobacillus plantarum*]	AIPELQQALAK
EMP43595.1 putative bacteriocin activator [*Lactobacillus plantarum*]	EYAGLSDTSGTLDSQFMAALLNMSAFTLVADGYEKIR

bacteriocin immunity protein [Lactobacillus plantarum]
gi|1272548769|gb|PHY43767.1|



Putative Bacteriocin activator [Lactobacillus plantarum UCMA 3037]
GenBank: EMP43595.1
GenPept Identical Proteins FASTA



Slika 12. Peptidi dobiveni pretragom MS2 spektara u proteinskoj bazi podataka GenBank "nr".

4.2.2. Procjena sigurnosti bakterijskih izolata

U ovom radu ispitana je antibiotička rezistencija izolata na 12 različitih antibiotika. Svi izolati su bili osjetljivi na sve testirane antibiotike (tablica 20). Sposobnost proizvodnje biogeninih amina ispitana je uzgojem izolata na DA-H odnosno DA-T pločama. Sudeći prema potpunoj odsutnosti ljubičastih kolonija s okruglim ljubičastim tj. prozirnim zonama, niti jedan od izolata ne proizvodi histamin tj. tiramin. Kao dodatni faktor sigurnosti ispitana je i sposobnost hemolize stanica domaćina. Tijekom rasta izolata na Columbia krvnom agaru nije došlo do pojave prozirnih zona oko poraslih kolonija iz čega proizlazi da navedeni izolati nemaju sposobnost razgradnje crvenih krvnih stanica, tj. hemolitičku aktivnost.

Tablica 20. Osjetljivost izoliranih bakterijskih izolata na različite antibiotike

Antibiotici	**Izolati BMK**				
	L. plantarum O1	*L. plantarum* D1	*L. plantarum* K4	*L. helveticus* O9	*Leuconostoc mesenteroides* L4A
Kanamicin	-	-	-	-	-
Meticilin	-	-	-	-	-
Neomicin	-	-	-	-	-
Eritromicin	-	-	-	-	-
Tobramicin	-	-	-	-	-
Ampicilin	-	-	-	-	-
Steptomicin	-	-	-	-	-
Gentamicin	-	-	-	-	-
Kloramfenikol	-	-	-	-	-
Rifampicin	-	-	-	-	-
Vankomicin	-	-	-	-	-
Tetraciklin	-	-	-	-	-

Kratice:+: rezistentan; -: osjetljiv

4.2.4. Preživljavanje bakterijskih izolata tijekom liofilizacije

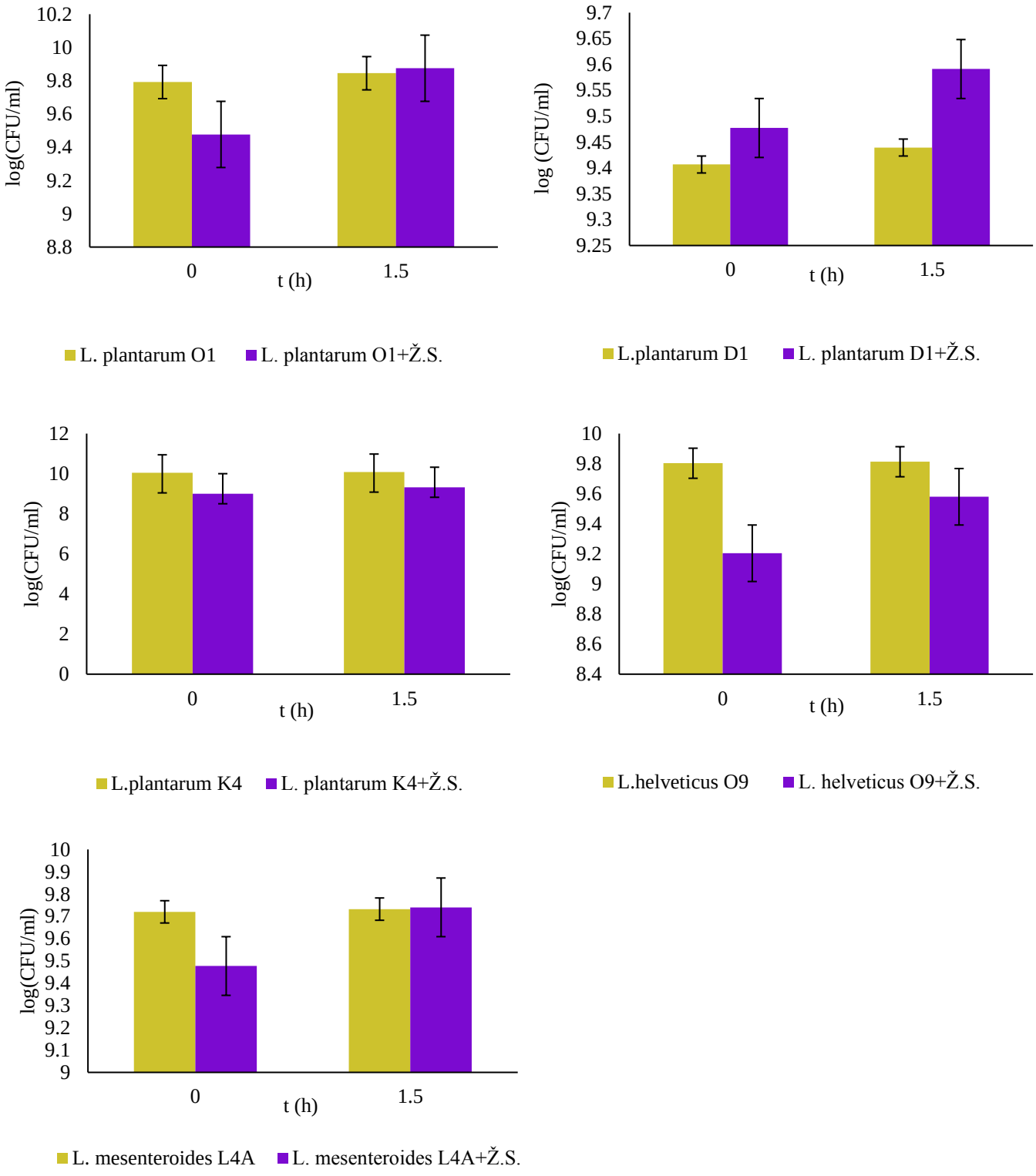
Preživljavanje bakterijskih izolata određeno je praćenjem početnog i konačnog broja stanica nakon liofilizacije a rezultati su prikazani u tablici 21.

Tablica 21. Utjecaj procesa liofilizacije na preživljavanje bakterijskih izolata

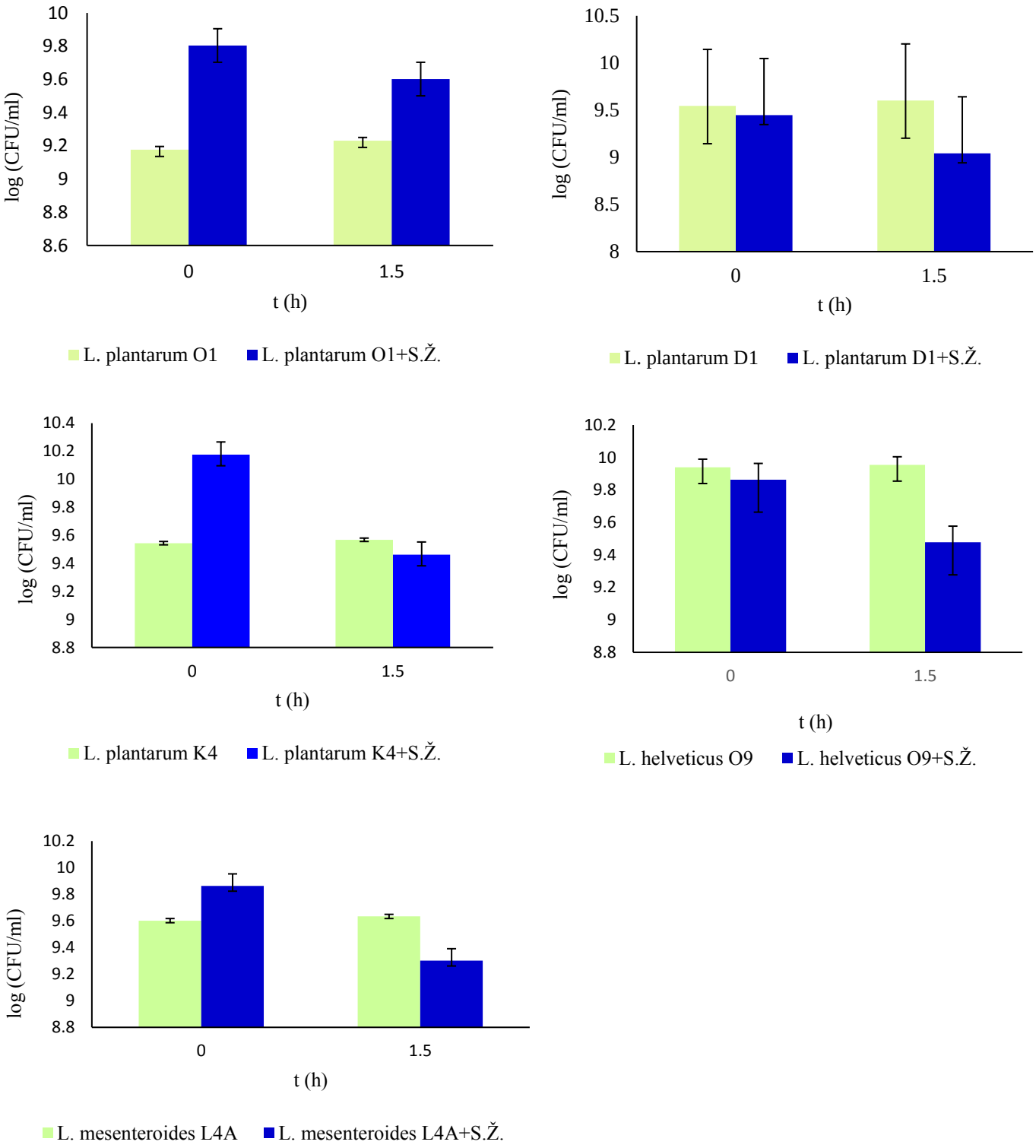
Izolati BMK	**log (CFU/mL) prije liofilizacije**	**log (CFU/mL) poslije liofilizacije**	**Preživljavanje (%)**
L. plantarum O1	9,4	9,25	98,4
L. plantarum D1	9,6	8,9	92,7
L. plantarum K4	9,69	8,77	90,5
L. helveticus O9	9,47	8,39	88,59
L. mesenteroides L4A	9,6	7	72,91

4.2.3. *In situ* karakterizacija bakterijskih izolata

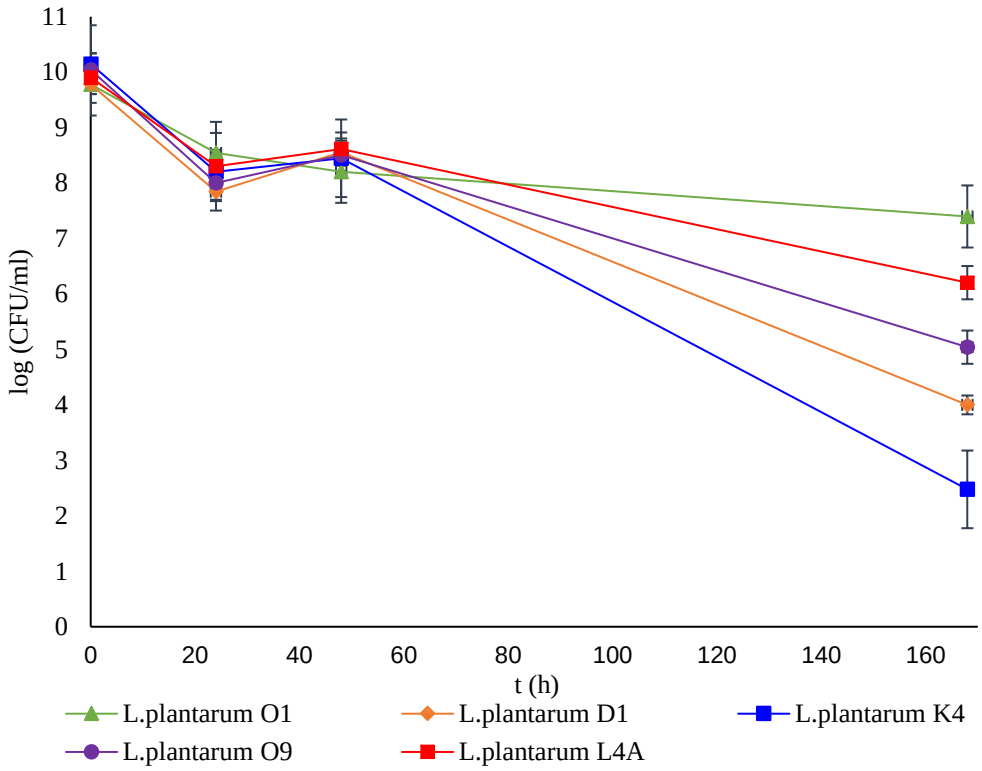
Dobiveni rezultati preživljavanja u žučnim solima i želučanom soku lubina *in situ* prikazani su na slici 13 i slici 14. Rast izolata proveden je u uzorku Jadranskog mora, a rezultati su prikazani na slici 15. Kako bi se spriječila kolonizacija sluzi patogenim bakterijama, a time i infekcije, probiotički korisne bakterije trebaju biti brojnije u odnosu na patogene i konkurirati im za mjesto vezanja (Sica i sur., 2012). Uspješnost vezanja bakterijskih izolata prikazana je u tablici 22.



Slika 13. Preživljavanje bakterijskih izolata u žučnim solima (Ž.S.) lubina *in situ* u vremenu od 1,5 h



Slika 14. Preživljavanje bakterijskih izolata u soku želuca (S.Ž.) lubina *in situ* u vremenu od 1,5 h



Slika 15. Preživljavanje bakterijskih izolata u uzorku Jadranskog mora *in situ*

Tablica 22. Adhezija izoliranih bakterijskih sojeva na površinsku sluz lubina

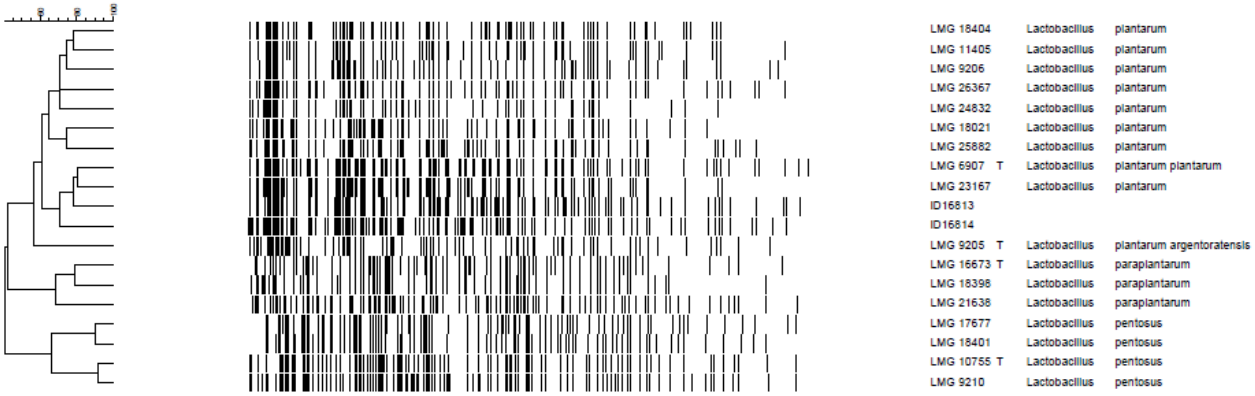
Izolat BMK	**Bakterijska adhezija (%)**
L. plantarum O1	30,87
L. plantarum D1	18,53
L. plantarum K4	1,86
L. helveticus O9	8,45
L. mesenteroides L4A	10,83

4.2.4. Dodatna karakterizacija bakterijskog izolata *L. plantarum* O1

Obzirom da se *L. plantarum* O1 pokazao kao soj sa najboljim karakteristikama, rezultati identifikacije dobivene pomoću API biokemijskih testova i MALDI TOF-MS spektrometrije dodatno su potvrđeni. Izolat je testiran metodom tekućinske kromatografije sa spektrometrijom masa uz ionizaciju elektroraspršenjem (LC-MS ESI). Daljnja potvrda LC-MS analize uključivala je poklapanje dobivenih 51.415 MS spektara masa sa skupom podataka koji je dobiven *in silico* digestijom proteina s tripsinom u bazi podataka GenBank. Za identifikaciju soja uzeto je 407 najuspješnijih MS/MS spektara. Rezultati su potvrdili *L. plantarum*, s najboljim podudaranjem *L. plantarum subsp. plantarum* P-8 (tablica 23). Osim proteomičke analize soj je dodatno potvrđen i genotipski, pomoću amplifikacije DNK fragmenata (AFLP) koja je napravljena u BCCM^{TM}/LMG identifikacijskom servisu (Gent, Belgija) (Slika 16).

Tablica 23. LC-MS identifikacija bazirana na 407 najuspješnijih MS2 spektra

Vrste	Najuspješniji MS2 fragmenti	Pretraživački prostor baze podataka	Identifikacijska vjerojatnost
Lactobacillus plantarum	233	5390	100.00
Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* P-8	180	2557	77.16
Lactobacillus plantarum WCFS1	179	2640	76.72
Lactobacillus plantarum ZJ316	179	2558	76.72
Lactobacillus plantarum UCMA 3037	175	2425	75.00
Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* ATCC 1491	175	2604	75.00
Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* NC8	170	2470	72.84
Lactobacillus plantarum IPLA88	169	2480	72.41
Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* ST-III	168	2536	71.98
Lactobacillus plantarum JDM1	166	2364	71.12
Lactobacillus pentosus	139	2190	59.48
Lactobacillus pentosus KCA1	138	2146	59.05
Lactobacillus pentosus IG1	134	2137	57.33
Lactobacillus pentosus MP-10	132	2096	56.47
Lactobacillus brevis	127	3414	54.31
Lactobacillus brevis subsp. *gravesensis* ATCC 27305	70	1061	29.74
Lactobacillus brevis KB290	60	716	25.43
Lactobacillus brevis ATCC 367	50	515	21.12
Lactobacillus buchneri	48	1278	20.26
Lactobacillus buchneri ATCC 11577	48	723	20.26
Lactobacillus hilgardii ATCC 8290	45	683	18.97
Lactobacillus hilgardii	34	327	14.22
Lactobacillus parafarraginis	17	333	6.90



Slika 16. Dendrogram dobiven nakon AFLP identifikacije *L. plantarum* O1

5. RASPRAVA

5.1. Izolacija i identifikacija mikrobne populacije izabranih proizvoda akvakulture

Morski organizmi kontinuirano su izložene širokom rasponu mikroorganizama prisutnih u okolišu pri čemu njihov gastrointestinalni trakt predstavlja povoljnu ekološku nišu za rast i razmnožavanje različitih mikrobnih zajednica (Birkbeck i Ringø, 2005; Bøgwald i Dalmo, 2014). Mikrobiota gastrointestinalnog trakta više se proučava od one na koži ili sluzi zbog njene važne uloge u probavi, ishrani i bolestima u akvakulturi (Spanggaard i sur., 2000).

Ovisno o sposobnosti kolonizacije crijeva bakterijske zajednice grubo su podijeljene u dvije skupine: prolazne ili povremene (alohtone) i stalne (autohtone). Geografska regija, sezona izlova, vrsta ribe (pelagijska ili demersalna) i hranjenje, utječu na broj i vrste mikroorganizama prisutnih na svježe ulovljenim morskim plodovima. Utvrđeno je da je intestinalna mikroflora riba složena te da je nekoliko vrsta bakterija mliječne kiseline dio prirodne crijevne mikroflore zdravih riba (Asfie i sur., 2003).

Dobro je poznato da na razinu populacije bakterija mliječne kiseline povezanih s probavnim traktom utječu nutritivni i okolišni čimbenici kao što su polinezasićene masne kiseline iz prehrane, kromov oksid, stres i slanost. Bolje razumijevanje mnogih čimbenika koji utječu na brojnost bakterija mliječne kiseline u probavnom traktu može biti od interesa za komercijalnu akvakulturu budući da se ova vrsta mikroorganizama često koristi kao probiotik u zaštiti od patogenih mikroorganizama.

U ovom je istraživanju izolirana i identificirana mikrobna populacija koja može utjecati na zdravstvenu ispravnost svježe ribe i školjkaša, primjenom klasičnih mikrobioloških, i fenotipskih metoda (API). Primjenom istih metoda iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša izolirane su i identificirane prisutne kulture BMK, nakon čega je za svaku pojedinačnu vrstu obavljena analiza staničnih proteina primjenom SDS PAGE elektroforeze i proteomičke metode (MALDI-TOF). Mikrobiološke analize bakterija uzročnika zdravstvene neispravnosti kao i ukupnog broja BMK u uzorcima svježe orade i lubina bile su međusobno slične kako u zimskom periodu tako i u ljetnom periodu. Prema rezultatima broj aerobno mezofilnih bakterija iznosio je između 10^1 i 10^3 CFU/g kod orade te između 10^2 i 10^3 CFU/g kod lubina (tablice 7, 8). Ovi rezultati su su u skladu s Papadopoulos i sur. (2003) čiji je početni ukupni broj bakterija lubina iznosio 10^4 CFU/g što je indikator dobre kvalitete ribljeg mesa uzimajući u obzir maksimalnu dozvoljenu koncentraciju od 5×10^5 CFU/g za cijelu svježu ribu (ICMSF, 2005). Enterobakterije, bakterije iz roda *Vibrio* te sulfitoreducirajući klostridiji su bili zastupljeni u koncentraciji od 10^1 CFU/g kod obje vrste ribe u uzorcima crijeva i želuca. *Vibrio cholerae* dokazan je u uzorku crijeva i želuca lubina te njihovog sadržaja.

Prisutnost bakterija roda *Vibrio* bila je i očekivana budući da se u vrijeme zimskih mjeseci začahure u crijevima te jetri. Patogeni vibrioni obično uzrokuju zaraze larvi te mogu uzrokovati i iznenadne smrtnosti. Međutim, pretpostavljeno je da mnoge vrste *Vibrio* nisu pravi već oportunistički patogeni čija je virulencija naglašena u uvjetima intenzivne akvakulture (Thompson i sur., 2004). *L. monocytogenes, Salmonella* sp. i *P. aeruginosa* nisu izolirane iz niti jednog od uzoraka tijekom zimskog perioda (tablice 7, 9).

Iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša BMK su izolirane samo iz sadržaja želuca lubina i to u koncetraciji od 10^2 CFU/g. Relativno niske koncentracije izoliranih mikroorganizama mogu se objasniti niskim temperaturama tijekom zimskog perioda i činjenicom da se obje vrste tijekom zime povlače u dublje more gdje zbog slabijeg metabolizma i nedovoljnog unosa raznovrsne hrane dolazi i do smanjenja mikrobne populacije (Mayhew, 2008). U ljetnom periodu, uslijed porasta temperature mora, došlo je i do povećanja broja svih mikroorganizama kod obje vrste ribe te je koncentracija svih mikroorganizama porasla do 10^4-10^6 CFU/g. (tablice 8, 10). Mikroorganizmi se mogu naći na vanjskoj površini (koža i škrge) i u crijevima žive neposredno ulovljene ribe. Ukupan broj značajno varira od 10^2-10^7 CFU/cm^2 kože i 10^3-10^9 CFU/g škrga i crijeva (Bojanić i sur., 2009). Zabilježena je i pojavnost *P. aeruginosa* u odnosu na zimski period. *Pseudomonas* spp. nalazi se u mikrobnoj flori slatkovodne i morske ribe (Leamaster i sur., 1997). *P. aeruginosa* je poznati uzročnik bolesti škrga te su takve slučajeve kod kalifornijske pastrve zabilježili i Ayaz (2006) te Kayis i sur. (2009). Prisutnost bakterija iz rodova *Pseudomonas* i *Vibrio* dokazali su i Bojanić i sur. (2009) u svojim istraživanjima o kvaliteti mesa lubina na uzorcima škrga, crijeva te sluzi sa kože, kao i Parlapani i sur. (2013) koji su dokazali da dominantne rodove orade čine *Acinetobacter, Psychrobacter, Pseudomonas* i *Flavobacterium*. Enterobakterije su izolirane iz svih uzoraka lubina i orade (10^3-10^6 CFU/ml), dok su *P. aeruginosa* (10^3-10^4 CFU/ml), *Vibrio* sp. (10^2-10^4 CFU/ml), *Salmonella* sp. (10^2-10^3 CFU/ml) i sulfitoreducirajući klostridiji (10^4-10^5 CFU/ml) izolirani samo iz sadržaja crijeva i želuca obje vrste ribe (tablice 8, 10). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima Egerton i sur. (2018) koji su naveli da su u gastrointestinalnom traktu morskih vrsta najčešće zastupljene bakterije iz rodova *Vibrio, Pseudomonas, Citofaga, Flavobacterium* kao i obitelj *Enterobacteriaceae*. *L. monocytogenes* nije identificirana niti u uzorcima u ljetnom periodu. Ovakav rezultat je i očekivan budući da se riblji proizvodi mogu lako kontaminirati ovom bakterijom tek tijekom proizvodnje. Vađenjem utrobe i čišćenjem ribe prije prodaje može doći do širenja *L. monocytogenes* u proizvodnom pogonu što će u konačnici dovesti do unakrsne kontaminacije ribe, opreme, zaposlenika i okoliša općenito (Papadopoulos i sur., 2010). S druge strane, u Italiji je

dvogodišnje istraživanje pokazalo da je *Salmonella* zastupljena u morskim proizvodima oko 0,5%, a *L. monocytogenes* oko 6,5% (Busani i sur., 2005). Koncentracija bakterija mliječne kiseline u ljetnom periodu povećala se do 10^5 CFU/g (tablice 8, 10) te su izolirana i biokemijskim API testom identificirana tri soja: *Lactobacillus plantarum* O1, *L. plantarum* O9 i *Leuconostoc mesenteroides* L4A. Na prisutnost bakterija mliječne kiseline mogu utjecati različiti čimbenici, poput slanosti vode, hrane, temperature, količine otopljenog kisika ili stresa.Na primjer, broj laktobacila u gastrointestinalnom traktu jezerske zlatovčice (*Salvelinus alpinus*) bio je manji kod onih uzgajanih u morskoj vodi nego u slatkoj vodi, dok je broj bakterija roda *Leuconostoc* i enterokoka ostao isti (Ringø i Strom, 1994).

Mikroflora školjkaša varijabilnija je od riblje i može, između ostalog, uključivati i vrste poput *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Clostridium* spp. i *Bacillus* spp (Jay, 2000). Sastav mikroflore školjkaša usko je povezan s vodenim staništem i mijenja se pod utjecajem saliniteta, temperature vode, prehrane, načina izlova i metode hlađenja (Feldhusen, 2000). Dominantne skupine koje se nalaze u školjkaša su gram-negativne bakterije iz rodova *Vibrio, Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Aeromonas, Flavobacterium* i *Alcaligenes*. Manji broj gram-pozitivnih bakterija također može biti prisutan, poput vrsta *Bacillus, Lactobacillus, Corynebacterium* i *Micrococcus* (Bolivar i sur., 2016). Mikrobiološka slika dagnji i kamenica u zimskom periodu pokazala je nisku koncentraciju svih ispitivanih mikroorganizama pri čemu je broj aerobnih mezofilnih bakterija bio u rasponu 10^2-10^3 CFU/g (tablice 11, 13). Ovaj podatak ukazuje na dobru kvalitetu dagnji i kamenica budući da su prema ICMSF (2005) svježi školjkaši kvalitetni kada im je broj aerobnih mezofilnih bakterija $< 5\times10^5$ CFU/g. Slične rezultate zabilježili su i Bongiorno i sur. (2015) prilikom mikrobiološke karakterizacije mediteranske dagnje u Tršćanskom zaljevu tijekom godine dana. Prosječna koncentracija aerobnih mezofilnih bakterija u njihovim uzorcima bila je $7{,}9\times10^3$ CFU/g. *P. aeruginosa* (10^2-10^3 CFU/g) i *Vibrio parahaemolyticus* (10^1-10^2 CFU/g) identificirani su u uzorcima škrga te želuca i probavne žlijezde dagnji i kamenica. Ovi rezultati su slični onima od Cao i sur. (2009) koji su zaključili kako mikrofloru kamenica čine gram negativne bakterije od kojih dominiraju rodovi *Pseudomonas* (22 %) i *Vibrio* (20 %), te Gu i Mitchella (2002) koji navode kako među bakterijskom populacijom invazivne vrste dagnji (*Dreissena polymorpha*) prevladava *Pseudomonas* spp. (89,2%). Robert-Pillot i sur. (2004) su naveli kako je među potencijalno patogenim bakterijama roda *Vibrio* koje se prirodno pojavljuju u ribama i školjkašima najbrojniji upravo *V. parahaemolyticus*. Kako je uzgoj mekušaca obično povezan s obalnim sredinama, njihova mikroflora može odražavati zemaljske utjecaje, prilikom čega se mogu izolirati i bakterije obitelji *Enterobacteriaceae*. Akumulacija *E. coli* i ostalih enteričkih

bakterija u školjkaša je dinamičan proces. Vezana je za brzinu filtracije, sadržaj bakterija u okolišnoj vodi i učinkovitost filtracije škrge (Jozić, 2012). U ovom istraživanju, *E. coli* je bila je prisutna u uzorcima želuca i probavne žlijezde obje vrste školjaka (10^2 CFU/g), što se podudara s rezultatima Rees i sur., 2015, koji su također izolirali ovu bakteriju iz dagnji i kamenica Atlantskog oceana u blizini Kanade. Kontaminacija ovom bakterijom najčešće je uočena kod školjkaša koji se uzgajaju u neposrednoj blizi kanalizacijskih ispusta. Čimbenici za koje se pokazalo da imaju najviše utjecaja na koncetraciju *E. coli* u svježe izlovljenim morskim proizvodima su godišnje doba, plima i kiša u danima prije izlova (Lee i Morgan, 2003). Sulfitoreducirajući klostridiji su izolirani iz uzoraka probavne žlijede i želuca dagnji (10^2 CFU/g) i kamenica (10^2-10^3 CFU/g). Slične rezultate ($1{,}99\times10^2$ CFU/g) su zabilježili Goulas i sur. (2004) u nultom danu prilikom analize mediteranske dagnje u grčkom akvatoriju. Međutim, nešto niže prosječne vrijednosti (10 CFU/g) zapazili su kod iste vrste dagnje u Tršćanskom zaljevu Bongiorno i sur. (2015). Iz navedenih rezultata može se zaključiti kako područje izlova i mikroflora okoliša uvelike utječu na brojnost i raznolikost bakterija. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. i BMK nisu izolirane iz niti jednog od uzoraka. Topić Popović i sur. (2010) također nisu izolirali ova dva patogena prilikom analize nekih vrsta svježih školjkaša Jadranskog mora uključujući i mediteransku dagnju, tijekom ljetnog i zimskog perioda.

Mikrobiološka slika dagnji i kamenica u ljetnom periodu pokazala je veće koncentracije svih ispitanih mikroorganizama s maksimalnom koncentracijom ukupnog broja bakterija od 10^7 CFU/g (tablice 12, 14). Niže vrijednosti ukupnog broja bakterija ($1{,}7\times10^3$ CFU/g) zabilježili su Caglak i sur. (2008) prilikom analize mediteranske dagnje u ljetnom periodu u Egejskom moru kao i Cruz-Romero i sur. (2008) koji su prateći mikrobnu populaciju pacifičke kamenice u zaljevu Cork (Irska) odredili koncentraciju od 10^4 CFU/g. Brojnost populacije mekušaca pokazuje izrazitu promjenu ovisno o temperaturi mora s koncentracijom $\leq10^3$ CFU/g u hladnom nezagađenom moru do $\geq10^6$ CFU/g u toplim morima ili kada je razina zagađenja bakterijama visoka (ICMSF, 2005). Dobiveni povišeni ukupni broj bakterija kod obje vrste školjaka može se objasniti činjenicom da ljeti temperatura Jadranskog mora iznosi 23-25°C, čime ovo more spada u topla mora. Također treba uzeti u obzir činjenicu da mekušaci obično imaju stalno prisutnu populaciju bakterija koja u slučaju kamenica fluktuira između 10^4 i 10^6 CFU/g tkiva, pri čemu je veći broj prisutan kada su temperature vode visoke (ICMSF, 2005). *Vibrio alginolyticus* izoliran je iz škrga kamenica (10^3-10^6 CFU/g), a *Vibrio parahaemolyticus* iz međuljušturne tekućine dagnji (10^2-10^5 CFU/g). Vezzulli i sur. (2017) su također potvrdili kako su bakterije roda *Vibrio* dominirale u bakterijskoj populaciji izoliranoj iz probavne žlijezde

mediteranske dagnje (28%) i pacifičke kamenice (36%) tijekom ljeta. Gayathri i sur. (2011) navode kako veća koncentracija *Vibrio* sp. u morskom okruženju je obično posljedica toga što se vibriji mogu pojaviti u širokom rasponu vodenih okoliša, uključujući estuarije, morske i obalne vode te sediment. Nadalje, *Vibrio parahaemolyticus* se lako prilagođava širokom rasponu slanosti te se obično nalazi u školjkašima i različitim sortama ribe koje se tradicionalno izlovljavaju iz morskih i obalnih područja (Vandenberghe et al., 2003). *P. aeruginosa* je kod obje vrste školjaka izoliran iz uzoraka želuca i probavne žlijezde u koncentraciji od 10^5 CFU/g što je u skladu s navodom Cruz-Romero i sur. (2008) da je *Pseudomonas* sp. dominantna bakterijska skupina svježih dagnji i kamenica. Međutim, kako je riječ o humanom patogenu koja izaziva različite infekcije i bolesti, može se zaključiti kako je pojavnost ove bakterije u relativno visokoj koncentarciji posljedica fekalnog zagađenja okoliša, čemu ide u prilog istraživanje Maravić i sur. (2018) koji su detektirali ovu bakteriju u Kaštelanskom zaljevu onečišćenom usred pritoka otpadnih voda. *E. coli* izolirana je iz međuljušturne tekućine i želuca dagnji (10^2-10^4 CFU/g) i želuca i probavne žlijezde kamenica (10^2-10^5 CFU/g). *Salmonella* sp. izolirana je iz želuca dagnji (10^2-10^3 CFU/g) i kamenica (10^3-10^4 CFU/g). Prema Baffone i sur. (2000) razlog ovog enterobakterijskog onečišćenja mogao bi biti povezan s pogreškama i propustima pri rukovanju morskom hranom, uključujući hlađenje svježe ulovljenih proizvoda kontaminiranom morskom vodom, prisutnost nelegalnog ispusta otpadnih voda u vodama namijenjenim za uzgoj mekušaca i naviku branja školjkaša u nekontroliranom području. Povećani broj enterobakterija zapazili su i Topić Popović i sur. (2010) prilikom ispitivanja kvalitete komercijalnih vrsta ribe i školjkaša iz Jadranskog mora. Najlošiju kvalitetu obzirom na brojnost obitelji *Enterobacteriaceae* zabilježili su kod svježih školjkaša i ribe u ljetnom periodu.

Sulfitoreducirajući klostridiji izolirani su iz želuca i probavne žlijezde dagnje (10^1-10^3 CFU/g) i probavne žlijezde kamenice (10^2-10^5 CFU/g) (tablice 12, 14). Nešto manju koncentraciju (1.9×10^2 CFU/g) zabilježili su Goulas i sur. (2005) kod mediteranske dagnje. *L. monocytogenes* nije detektirana u niti jednom od uzoraka dagnji i kamenica. U pravilu ne detektira se u svježe ulovljenoj ribi i školjkašima iz otvorenih mora, dok kontaminacija ovom bakterijom može biti velika kod riba ulovljenih u vodama s pritokom otpadnih voda (ICMSF, 2005). BMK su izolirane iz želuca kamenice i međuljušturne tekućine dagnji u koncentraciji od 10^4 CFU/g prilikom čega su API biokemijskim testom identificirani sojevi *L. plantarum* K4 i *L. plantarum* D1 (tablica 15). Ovi rezultati su veći u odnosu na rezultate Caglak i sur. (2008) koji su zabilježili pojavnost BMK kod mediteranske dagnje u ljetnom periodu od 6.16×10^2 CFU/g.

Prevladavajući rodovi BMK u školjkašima su *Pediococcus* i *Lactobacillus*, uključujući vrste *L. plantarum*, *L. sporogenes*, *L. helveticus* i *P. acidilactici* (Merrifield i sur., 2014). Iako BMK nisu dominantna vrsta kod riba i školjkaša, ne treba zanemariti njihovu važnost i značaj za domaćina u obliku antagonističkog djelovanja prema patogenim mikroorganizmima. Kako bi se utvrdila točna taksonomska identifikacija izoliranih BMK sojeva provedena je fenotipska (SDS-PAGE) i proteomička (MALDI-TOF) analiza izoliranih sojeva. Iz rezultata analize ukupnih staničnih i površinskih proteina (slike 2-3) vidi se da je proteinski profil kod svih BMK sojeva drugačiji što je dodatna potvrda različitosti sojeva. Prednost analize ukupnih staničnih proteina pomoću SDS-PAGE je što je prilično brza i jednostavna metoda kada se izvodi u visoko standardiziranim uvjetima, te ima dobru razinu taksonomske razlučivosti na razini vrste ili podvrste. MALDI-TOF metoda potvrdila je rezultate identifikacije API biokemijskog testa s visokom razinom točnosti osim za soj *L. delbrueckii* L2 koji je MALDI-TOF metodom identificiran kao *Enterococcus mundtii* te je isključen izdaljnji istraživanja (tablica 15).

5.2. Karakterizacija bakterijskih izolata kao potencijalnih probiotičkih sojeva za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture

Akvakultura je jedan od najbrže rastućih sektora proizvodnje hrane. Zarazne bolesti sve više postaju značajno ograničenje u proizvodnji i prodaji morskih proizvoda, što utječe na ekonomski razvoj sektora akvakulture u mnogim zemljama (Sica i sur., 2012). Trenutno su ribe zaštićene od bakterijskih bolesti cijepljenjem ili kemoterapijskim tretmanom. Nijedan od ovih pristupa ne rješava u potpunosti potrebu za terapijom s ciljem sprječavanja ili liječenja infekcija. Nadalje, iako je prevencija bolesti cijepljenjem sve veća, postupak je često neučinkovit kada se primjenjuje na imunološki nezreloj ribi. Povećanje antibiotičke rezistencije širom svijeta potaknulo je istraživanja koja bi poboljšala strategije za kontrolu bolesti. Ove studije uključuju bolji uzgoj i prehranu, cjepiva, nespecifične imunostimulanse, a sve je veće zanimanje za upotrebu probiotika (Balcázar i sur., 2008). Najčešće se kao probiotici koriste bakterije mliječne kiseline te se pokazalo kako one izolirane iz morskih organizama postaju najboljim izborom kada je u pitanju zaštita zdravlja proizvoda akvakulture. Razlog tome je činjenica da su bakterije izolirane iz tijela kralježnjaka prilagođene drugačijim uvjetima okoliša nego one izolirane iz prirodne mikrobiote riba i plodova mora (Iehata i sur., 2009). Također, neki sojevi morskog porijekla posjeduju određene karakteristike koje se ne mogu naći kod kopnenih vrsta (Hamdan i sur., 2016).

Kako bi odabrani izolati mogli manifestirati svoja poželjna probiotička svojstva, nužno je da budu morskog porijekla, da preživljavaju uvjete staništa morskog organizma i ekstremne uvjete u njegovu gastrointestinalnom traktu, dobro adheriraju na površinu životinje i da budu sigurni za organizam čiji su dodatak prehrani. BMK za primjenu u biokonzerviranju proizvoda akvakulture, pored navedenih karakteristika, moraju i uspješno preživljavati nepovoljne uvjete industrijske obrade.

S obzirom na njihovu optimalnu temperaturu rasta BMK se djele na mezofilne ili termofilne. U industrijskim procesima, poput zamrznutog skladištenja, sazrijevanja ili hlađenog skladištenja fermentiranih proizvoda, BMK su izložene temperaturama daleko ispod njihove optimalne temperature rasta. Optimalno preživljavanje BMK tijekom zamrzavnja i pri niskim temperaturama pridonosi znatno boljoj industrijskoj primjeni sojeva. Bolje razumijevanje odgovora na niske temperature i zamrzavanje može pridonijeti optimizaciji fermentacijskih procesa, skladištenja proizvoda i uvjeta očuvanja (van de Guchte i sur., 2002). Optimalna temperatura rasta izoliranih sojeva BMK određena je prekonoćnim rastom pri različitim temperaturama (4 °C, 13 °C, 28 °C, 37 °C, 45 °C, 60 °C) a rezultati su prikazani u Tablici 17.

Sojevi *L. plantarum* D1 I *L. plantarum* K4 pokazali su najbolje preživljavanje pri temperaturi od 28 °C, a *L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* L4A pri temperaturi od 37 °C. Broj živih stanica je ostao nepromjenjen u odnosu na početni koji je iznosio 10^9 CFU/ml. Daljnjim povećanjem temperature na 45 °C broj stanica se smanjio između 10^4 i 10^5 CFU/ml, dok pri temperaturi od 60 °C nije zabilježen rast niti kod jednog soja. Pri temperaturi uzgoja od 13 °C broj stanica snizio se na vrijednosti između 10^5 i 10^7 CFU/ml iz čega se da zaključiti kako BMK rastu bolje pri višim temperaturama. Ovakvi rezultati su u skladu s literaturom (Ahmed i sur., 2006; Grosu-Tudor i sur., 2016) gdje je navedena optimalna temperatura rasta BMK između 30 °C i 40 °C. Također, Ishikawa i sur. (2003) navode raspon od 37-40 °C kao optimalan za rast *Marinilactibacillus psychrotolerans*, BMK morskog porijekla. Ovisno o vrsti, BMK mogu rasti i pri niskim temperaturama (5 °C) i visokim (53 °C). Prednost svih izolata je činjenica da relativno dobro rastu i pri 4 °C, odnosno temperaturi koja se koristi za hladno skaldištenje morskih proizvoda. Ovaj je rezultat u skladu s navodom Ghanbari i sur. (2013) da BMK izolirane iz morskih plodova često može podnijeti temperaturu hlađenja kao i okoliš u kojem se morski plodovi čuvaju, poput niskog pH i visoke koncentracije soli.

Ne samo da većina BMK raste sporije pri niskom pH, već uslijed djelovanja kiseline dolazi do oštećenja i gubitka vijabilne sposobnosti. Na temelju pH optimuma, većina BMK sojeva ima visoku aktivnost kisele fosfataze u pH rasponu između pH 4–6 s optimalnom pH vrijednosti od 5 (Haros i sur., 2008; Tham i sur., 2010). Stoga je pH jedan od važnih aspekata koji je potrebno uzeti u obzir s ciljem optimalnog rasta i bolje funkcionalnosti. Optimalna pH vrijednost izoliranih sojeva BMK određena je prekonoćnim uzgojem pri različitim pH vrijednostima (2, 4, 6) i prikazana je u tablici 18. Prema dobivenim rezultatima izolati *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9 i *L. mesenteroides* L4A su pokazali najbolje preživljavanje pri pH 6, dok *L. plantarum* O1 najbolje preživio pri pH 4. Ovakvi rezultati se podudaraju s rezultatima von Wright i Axselson (2011) koji navode da se maksimalni rast bakterija postiže pri pH 5-6 s mogućim iznimkama ovisno o soju. Iz tablice 18 također se može uočiti dobro preživljavanje izoliranih sojeva BMK u cijelom rasponu pH što je važno budući da prilikom industrijske proizvodnje BMK često budu izložene različitim nepovoljnim uvjetima kao što su visoke koncentracije soli, niske ili visoke vrijednosti pH i temperature te nedostupnost kisika (Grosu-Tudor i sur., 2016). Nešto drugačije rezultate su dobili Ishikawa i sur. (2003) za morski izolat BMK *M. psychrotolerans.* Ovom soju optimalna pH vrijednost je bila između 8 i 9,5 a rast nije zapažen ispod pH 4 i iznad pH 10,5. BMK koje se često mogu izolirati iz morskih proizvoda su obično tolerantne na kisele uvjete, a optimalno rastu kod neutralnog ili blago

kiselog pH (Ishikawa i sur. 2003). Nadalje, kao i drugi mikroorganizmi, BMK su sposobne različitim mehanizmima održati homeostazu tj.neutralni pH u citoplazmi čak i uz visoke pH vrijednosti vanjskog okoliša (Nyaga-Koumou i sur., 2012).

Bakterije mliječne kiseline su nadaleko poznate po svojoj sposobnosti inhibiranja bakterijskih patogena proizvodnjom antimikrobnih spojeva kao što su organske kiseline, vodikov peroksid i ribosomalno sintetizirani peptidi nazvani bakteriocini, što predstavlja poželjno svojstvo kao potencijalnih probiotika i održivu alternativu antibioticima (Gatesoupe, 2008). Upotrebom BMK koje pokazaju antimikrobnu aktivnost odnosno sposobnost inhibicije patogena i mikroorganizama kvarenja može se povećati sigurnost i povećanje trajnosti proizvoda akvakulture. Upotreba takvih kultura ili njihovih metabolita naziva se biokonzerviranje (Lücke, 2000). Antimikrobna aktivnost bakterijskih izolata prema najčešćim ribljim patogenima prikazana je na slikama 4-10. Vidljivo je da svi ispitani izolati inhibiraju rast patogenih bakterija u različitim rasponima. Postotak preživljavanja *S. aureus* bio je u rasponu od 31 % do 38 %, *P. mirabilis* 27 % do 48 %, *P. aeruginosa* 21 % do 42 %, *E. coli* 29 % do 37 %, *L. monocytogenes* 30 % do 44 %, *Vibrio* sp. od 22 % do 33 % te *A. hydrophila* od 25 % do 32 %. Kao soj s najboljom antimikrobnom aktivnošću pokazao se *L. plantarum* O1 koji je tijekom 24 h smanjio rast *E. coli* za 85 %, *L. monocytogenes* za 81 %, *P. aeruginosa* za 82 %, *Vibrio sp.* za 83 %, *P. mirabilis* za 80 %, 79 % u slučaju *S. aureus te* 86 % *za A. hydrophila*. Usporedbe radi, u istraživanju Red i sur. (2017) prilikom određivanja antimikrobne aktivnosti devet izolata BMK iz probavila nilske tilapije (*Orechromis niloticus*) na najčešće riblje patogene *A. sobria, A. hydrophila, P. aeruginosa, P. putida* i *S. aureus*, samo je jedan izolirani soj *Lysinibacillus* sp. 38HT uspješno inhibirao rast svih patogena dok se kao najotporniji patogen pokazao *S. aureus* inhibiran samo s tri izolata BMK. Budući da je prilikom ispitivanja antimikrobne aktivnosti supernatant bakterijskih izolata neutraliziran, čime je izbjegnut inhibitorni učinak mliječne kiseline, ispitana je prisutnost gena koji kodiraju za bakteriocine. Bakteriocini su peptidi ili proteinski kompleksi s baktericidnim djelovanjem koji se ribosomalno sintetiziraju te inhibiraju rast srodnih vrsta ili čak različitih sojeva iste vrste (Ringø i sur., 2005). Geni koji kodiraju za nekoliko bakteriocina, do sada najčešće identificiranih kod BMK ispitani su lančanom reakcijom polimeraze (PCR). Analizom *pln* lokusa potvrđena je prisutnost gena *pln*A, koji kodira za plantaricin A (PlnA) (Slika 11). Prisutnost gena *plnEF, plnNC8* i *plnW* nije potvrđena. Rezultati su dodatno potvrđeni LC-MS/ESI metodom koja je potvrdila prisutnost proteina sličnih bakteriocinima, imunog proteina te peptida za kojeg se pretpostavlja da aktivira sintezu bakteriocina (tablica 19, slika 12). Karakteristika većine bakteriocina BMK je prisustvo

vlastitog imunog proteina čiji se gen nalazi odmah pored strukturnog gena bakteriocina (Ringø i sur., 2005). PlnA je peptidni feromon, induktor proizvodnje bakteriocina (Hauge i sur., 1998) i antimikrobni agens u borbi protiv specifičnih mikroorganizama (Zhao i sur., 2006). Mehanizam njegova djelovanja temelji se na interakciji s membranskim receptorima čime se pokreće aktivnost feromona te se iz navedenog da zaključiti da se antimikrobna aktivnost soja producenta PlnA temelji na interakciji aktivne supstance s ciljanim mikroorganizmima (Kristiansen i sur., 2005). Ove ribosomski – sintetizirane molekule, između ostalog, mogu djelovati kao kolonizirajući peptidi omogućujući dominaciju njihova producenta unutar populacije različitih vrsta bakterija (Riley i Wertz, 2002). Dobiveni rezultati podudaraju se s istraživanjem Anacarso i sur. (2014) koji su uočili sposobnost *Lactobacillus pentosus* 39, soja koji proizvodi supstancu sličnu bakteriocinu, u inhibiciji rasta *A. hydrophila* ATCC 14715 i *L. monocytogenes* ATCC 19117 umjetno dodane u svježe filete lososa (*Salmo salar*). Nadalje, Brillet i sur. (2005) su potvrdili prisutnost bakteriocina u soju *Carnobacterium divergens* V41 izoliranog iz probavila lososa (*Salmo salar*), a koji pronalazi potencijalnu primjenu u zaštiti namirnica od kvarenja. Izolacija bakterija koje proizvode bakteriocine iz morskog okoliša u kojem optimalno rastu je bolji pristup, jer se očekuje da će ovi sojevi biti učinkovitiji za primjenu akvakulturi u usporedbi s bakterijama koje nisu iz mora. Morske životinje su uobičajeni izvori bakterija koje proizvode bakteriocine, a zabilježena je i izolacija takvih sojeva iz izvora osim morskih životinja poput morskog tla, sedimenata, vode i morskih algi (Maria i sur., 2012), što sugerira raznolikost bakteriocinogenih sojevi iz morskog okoliša. Među glavnim proizvođačima bakteriocina su *Vibrio* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp., bakterije mliječne kiseline i morske cijanobakterije (Ahmad i sur., 2013; Selvendran i Babu, 2013; Singh i sur., 2013). Nadalje, Ringø i sur. (2005) zaključuju da su BMK zajedno s drugim bakterijama koje pripadaju autohtonoj mikrobioti morskih životinja, čine važan dio obrambenog mehanizma protiv ribljih patogena.

Rodovi *Lactobacillus* i *Lactococcus* koji se koriste u prehrambenom lancu za ljude i životinje imaju GRAS (FDA, 2001) i QPS (EFSA, 2007) status. Kako bi se osigurala njihova sigurnost za upotrebu kod morskih životinja, izoliranim bakterijskim sojevima ispitana je otpornost na antibiotike, hemolitička aktivnost, kao i sposobnost proizvodnje biogenih amina. Širenje antimikrobne rezistencije veliki je javnozdravstveni problem, jer se neki antibiotici koji se koriste u akvakulturi primjenjuju i u medicini, što smanjuje učinkovitost antibiotika u liječenju infekcija u ljudi i povećava obolijevanje povezano s određenim bolestima (Lee i sur., 2013). Ta je činjenica uzrokovala postupno ograničenje uporabe antibiotika protiv najčešćih bakterijskih

patogena u akvakulturi (Nomoto, 2005), a Europska unija je zabranila uporabu antibiotika za ubrzavanje rasta u hrani za životinje. Niti jedan od ispitan bakterijskih sojeva nije pokazao otpornost na ispitane antibiotike (tablica 20). S druge strane, Muñoz-Atienza i sur., 2013 zabilježili su rezistenciju na antibiotike kod rodova *Weissella* (60 %), *Pediococcus* (44 %), *Lactobacillus* (33 %), ali ne i kod rodova *Leuconostoc* i *Lactococcus* izoliranih iz najčešćih morskih proizvoda. Otpornost BMK na aminoglikozide (gentamicin, streptomicin i kanamicin) smatra se intrinzičnom (tj. kromosomski kodiranom) stoga se ne može horizontalno prenositi na druge bakterije (Danielsen i Wind, 2003). Naši rezultati stoga nadopunjuju ograničeni broj studija usredotočenih na sigurnosne aspekte BMK namijenjenih upotrebi kao probiotika u akvakulturi. Histamin i tiramin su najopsežnije proučene vrste biogenih amina zbog svojih toksikoloških učinaka. (Zaman i sur., 2009). Fenotipskim testom nije dokazana sposobnost proizvodnje histamina i tiramina kod niti jednog bakterijskog izolata. Ovakvi rezultati su u skladu s istraživanjem Muñoz-Atienza i sur., (2011) koji također nisu zabilježili sposobnost sinteze tiramina i histamina kod različitih rodova BMK morskog porijekla uključujući i rodove *Lactobacillus* i *Leuconostoc.* Odsustvo hemolizina smatra se osnovnim uvjetom za selekciju probiotičkih sojeva i potvrdom da je soj siguran za domaćina (FAO/WHO, 2002). Hemolitička aktivnost uzima se kao indikator nepoželjnih bakterija (Lee i sur., 1995) jer hemolitički aktivne bakterije izazivaju stvarenje malih otvorenih rana na površini tijela preko kojih lako dolazi do infekcija. Ni jedan od izoliranih sojeva BMK nije pokazao hemolitičku aktivnost, tj. nema sposobnost razgradnje crvenih krvnih stanica domaćina. Dobiveni rezultati podudaraju se s istraživanjem Muñoz-Atienza i sur. (2013) u kojem hemolitička aktivnost nije zabilježena za BMK izolirane iz plodova mora i obrađenih ribljih proizvoda, kao i s rezultatima Meidong i sur. (2017) koji nisu zabilježili sposobnost hemolize ispitivanih sojeva BMK izoliranih iz tilapije (*Oreochromis niloticus*), morske vode i sedimenta te nekoliko tradicionalnih fermentiranih morskih proizvoda.

U industrijskoj primjeni bakterije su izložene stresu povezanim s mehaničkom obradom, toplinskom obradom i kemijskim mikrookolišem (Yonekura i sur., 2014). Procesi poput sušenja smrzavanjem i sušenja u vakuumu dovode do osmotskog oštećenja probiotičkih stanica i narušavaju staničnu membranu (Kos i sur., 2008). Izolirani bakterijski sojevi su uspješno podnijeli proces liofilizacije uz visoki postotak preživljavnja (tablica 21) a najveće preživljavanje (98,4 %) pokazao je soj *L. plantarum* O1, te bi se kao takav mogao uspješno koristiti i u industrijskim procesima.

Reda i sur. (2018) navode kako bi uspješni i sigurni probiotički sojevi osim mogućnosti kolonizacije gastrointestinalnog trakta (GIT) trebali tolerirati visoke koncentracije žučnih soli i kiseli pH, tj. zbog takvih bi karakteristika imali veću vjerojatnost da prežive prolazak kroz GIT i rasprostrane se u njemu (Pérez- Sánchez i sur., 2011). Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u 10 %-tnoj otopini žučnih soli lubina prikazano je na slici 13. Iako se koncentracija žučnih soli u probavnom sustavu ribe kreće od 0,4 do 1,3 % (Balcázar i sur., 2008), koncentracija od 10 % izabrana je na osnovu nekolicine dosadašnjih istraživanja (Nikoskelainen i sur., 2001; Muñoz-Atienza i sur., 2014; Balcázar i sur., 2008; Sica i sur., 2012) budući da još uvijek nije definirano pri kojoj bi koncentraciji žučnih soli potencijalni riblji probiotici trebali preživljavati. Iz rezultata prikazanih na slici 15 vidljivo je da je kod svih izolata BMK uočen rast u rasponu od 9,32 do 9, 93 log CFU/ml u odnosu na početni broj koji je bio u rasponu vrijednosti 9 do 9,85 log CFU/ml. Različitost preživljavanja između sojeva potkrepljuje činjenica da različiti sojevi bakterija, pripadnici iste vrste, ne pokazuju jednaku toleranciju prema određenoj koncentraciji žučnih soli (Xanthopoulusa i sur., 1997) te da je kod nekih sojeva izoliranih bakterija uočen sporiji rast. *L.plantarum* O1 je pokazao najbolji rast u žučnim solima u vrijednosti od 9,85 log CFU/ml. Dobro preživljavanje u sadržaju žučnog mjehura može se objasniti proizvodnjom hidrolaza žučnih soli ili egzopolisaharida koji štite neke sojeve bakterija od njegova štetnog utjecaja (Geraylou i sur., 2014). Obzirom da navedeni mehanizmi djelovanja nisu u potpunosti razjašnjeni, iste je nužno istražiti u budućim istraživanjima (Amin i sur., 2016). Iz rezultata je također vidljiv slabi rast svih kontrolnih uzoraka nakon 1,5 h kod (9,73-10,079 log CFU/ml) u odnosu na početni broj (9,72 -10,04 log CFU/ml). Ova pojava ide u prilog zaključku kako u žučnim solima postoje određene komponente koje pogoduju rastu izolata BMK. Međutim, kako još uvijek nije poznat sastav žučnih soli lubina, buduća istraživanja je potrebno provoditi u tom smjeru. Rezultati dobiveni u ovom radu slažu se s dosadašnjim istraživanjima u kojima je ispitivan probiotički potencijal BMK morskog porijekla. Prema istraživanju Sica i sur. (2012) svi sojevi BMK izolirani iz kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) su preživjeli u 10 % otopini žučnih soli u periodu od 1,5 h. Sličan rezultat zabilježen je i za potencijalne probiotičke bakterije: *Lactoccocus lactis izoliran iz* kalifornijske pastrve, *Citrobacter freundii* i *Enterococcus* sp. iz sivog cipla (*Mugil cephalus*) te *Bacillus* vrste izolirane iz sibirske jesetre (*Acipenser baerii*) (Balcázar i sur., 2008; Satish i sur., 2011; Geraylou i sur., 2014; Sahoo i sur., 2015).

Jedan od kriterija za karakterizaciju mikroorganizma kao probiotika jest i mogućnost njegova preživljavanja pri niskom pH. Jednom kada se konzumira, probiotik bi trebao podnijeti susret

sa stresnim uvjetima kakvi vladaju u GI traktu i ostati metabolički aktivan (Frece i sur., 2016). Mogućnost preživljavanja BMK u kiselom okruženju predstavlja prednost jer na taj način mogu konkurirati s drugim mikroorganizmima i dominirati u navedenom području (Kajfasz i Quivey Jr., 2011). Dobiveni rezultati su prikazani na slici 14 te se može uočiti da je kod svih sojeva BMK došlo do smanjenja broja bakterijskih kolonija u rasponu od 9,04 do 9,6 log CFU/ml u odnosu na početni broj od 9,44 do 10,17 log CFU/ml. Obzirom da pad broja kolonija nije značajan, može se zaključiti da izolirane bakterije dobro preživljavaju kisele uvijete okoliša. Najmanji pad koncentracije uočen je kod *L. plantarum* O1 čiji se broj smanjio s početnih 9,80 na 9,6 log CFU/ml. Kod kontrolnih uzoraka zabilježen je neznatan rast broja kolonija nakon 1,5 h (9,23 – 9,81 log (CFU/ml) u odnosu na početni broj (9,17 – 9,77 log CFU/ml). Dobiveni rezultati su u skladu s istraživanjem Sica i sur. (2012) u kojem je zabilježeno uspješno preživljavanje svih ispitivanih sojeva BMK u simuliranim uvjetima želuca kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), kao i s rezultatima Amina i sur. (2016) gdje su ispitivani sojevi uspješno preživjeli izloženost uvjetima simuliranog želučanog soka atlantskog lososa (*Salmo salar*). Kao heterogena grupa bakterija, BMK imaju sposobnost rasta u različitim nepovoljnim uvjetima što im omogućuju mehanizmi odgovorni za prilagodbu na specifični supstrat, okolinu i/ili proces. Sekvencioniranje genoma probiotičkih BMK te onih uključenih u fermentaciju mesa i mlijeka pokazalo je prisutnost specifičnih gena koji kodiraju za regulatore uključene u specifični odgovor BMK na niski pH (Franz i Holzapfel, 2011). Prema podacima skupine autora koji su se bavili mehanizmima odgovora na različite nepovoljne uvjete, BMK pri niskom pH aktiviraju protonske pumpe kojima, uz prisustvo ATP-a, reguliraju koncentraciju protona u mikrookolini te metabolički put arginina u svrhu proizvodnje osnovnih potrebnih spojeva (Franz i Holzapfel, 2011). Treba istaknuti i kako se u dosadašnjim istraživanjima koristio simulirani sok želuca, a budući da je u ovom radu korišten originalni sok, dobiveni rezultati svakako daju bolji uvid u ispitivane uvjete.

Preživljavanje u morskoj vodi jedna je poželjnih karakteristika sojeva s ciljem njihove primjene kao probiotika u akvakulturi (Vazquez i sur., 2003). Mikroflora morske ribe i školjkaša često se pogrešno naziva pretežno halofilnom. U većini slučajeva mikroflora nije obligatno halofilna. Mikroorganizmi su pretežno halotolerantni; u stanju rasti u širokom rasponu koncentracija soli, s optimalnim rastom pri koncentracije NaCl od 1–3 %. Preživljavanje se povećava uobičajenom upotrebom leda u transportu za hlađenje ribe i školjkaša, koji izlaže populaciju bakterija smanjenoj slanosti tijekom skladištenja, pogodujući opstanku i rastu halotolerantnih vrsta (ICMSF, 2005). Rast izolata BMK u uzorku Jadranskog mora praćen je u periodu od sedam

dana pri temperaturi od 18 °C, a dobiveni rezultati prikazani su na slici 15. Tijekom dva dana, svi izolirani sojevi su i dalje zadržali relativno visoko preživljavanje u rasponu od 7 do 8 log CFU/ml u odnosu na početni broj stanica u rasponu od 9,7 do 10,14 log CFU/ml. Nakon sedam dana inkubacije najbolje preživljavanje je pokazao soj *L. plantarum* O1 u vrijednosti od 7,34 log CFU/ml dok su ostali sojevi preživjeli u rasponu od 2,47 do 6,2 log CFU/ml. Razlog dobrog preživljavanja navedenog soja pri visokom salinitetu (38 – 39 ‰) može se objasniti stabilnošću stanične membrane i otpornosti na osmotski stres (Laroche i Gervais, 2003). Dobiveni rezultati su u skladu s onima Villamil i sur. (2010) koji su zabilježili preživljavanje *Pediococcus acidilactici* u morskoj vodi dulje od četiri dana te s rezultatima Muñoz-Atienza i sur. (2014) koji su također uočili preživljavanje sojeva BMK morskog porijekla tijekom sedam dana. Nadalje, visoka razina halotolerancije zabilježena je i za *Lactobacillus acidophilus* IFO3532 i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, izolata dobivenih iz intestinalnog trakta ribe napuhače (*Takifugu niphobles*) (Itoi i sur., 2008). Budući da je *L. plantarum* O1 izoliran iz želuca svježe orade može se uočiti pozitivna korelacija s prethodno navedenim literaturnim rezultatom. Bakterije kontroliraju turgor aktivnim moduliranjem citoplazme, čime se omogućuje podešavanje sadržaja vode pomoću osmoze. Mehanizmi koji su izravno uključeni u oporavak turgora predstavljaju jedan od najviše istraženih mehanizama odgovora BMK na osmotski stres (Welsh, 2000). Intracelularno nakupljanje organskih osmolita (glicin betain, karnitin, kolin) smatra se osnovom hiperosmotskog stresnog odgovora BMK. Ti se spojevi mogu akumulirati do molarnih razina bez negativnih učinaka i kompatibilni su s makromolekularnom strukturom i funkcijom stanice (Le Marrec, 2011). Također, s ciljem što boljeg određivanja mehanizma otpornosti BMK na visoke koncentracije osmolita, nedavno su sekvencionirani genomi različitih BMK i identificirani su mogući akvaporini (Lorca i sur., 2007) čiju fiziološku ulogu u osmoregulaciji tek treba u potpunosti istražiti.

Prisutnost nepatogene mikrobiote s antibakterijskom aktivnošću na površini sluznice važna je za zaštitu jer se pretpostavlja da su koža, lateralne linije, škrge i gastrointestinalni trakt (GIT) ili kombinacija ovih organa putevi infekcije patogenim bakterijama (Ringø i sur., 2005). Sluz je proizvod stanica riblje epiderme i predstavlja prvu liniju obrane ribe od infekcije patogenima (Ángeles Esteban, 2012). Sluz pored ostalog posjeduje antimikrobnu aktivnost pomoću koje, mehanizmom natjecanja za mjesto vezanja, sprječava kolonizaciju površine ribe određenim mikroorganizama. Naime, da bi određeni mikroorganizmi kolonizirali površinu tijela ribe potrebno je da sa sluzi ostvare nespecifične, odnosno specifične interakcije putem adhezina i komplementarnih receptora. Kako bi se spriječila kolonizacija sluzi patogenim bakterijama, a

time i infekcije, probiotički korisne bakterije trebaju biti brojnije u odnosu na patogene i konkurirati im za mjesto vezanja (Sica i sur. 2012). Prema istraživanju Jutfelt i sur. (2006.) te Tobback (2009) adhezija patogenih bakterija za sluz ribe esencijalni je uvjet za infekciju i ključni faktor virulencije u domaćina. Glavni bakterijski patogeni proizvoda akvakulture uključuju gram-negativne vrste, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio salmonicida* i *Yersinia ruckeri*, uzročnike furunkuloze, vibrioze i bolesti crvenih usta. Osim toga, *Aeromonas hydrophila* može uzrokovati infekcije kod riba i općenito je povezan s malim površinskim lezijama, lomljenjem ljusaka, lokalnim krvarenjem i septikemijom. Iz rezultata prikazanih u tablici 22 vidljivo je da najbolju sposobnost adhezije ima soj *L. plantarum* O1 (30,87 %). Slijede ga *L. plantarum* D1 (18,53 %), *L. mesenteroides* L4A (10,83 %), *L. helveticus* O9 (8,45 %) te *L. plantarum* K4 (1,86 %). Navedeni postotci bakterijske adhezije slični su nekolicini dosadašnjih istraživanja među kojima se ističe ono Amin i sur. (2016) koji su zabilježili dobru adheziju bakterija *Lactobacillus farraginis* (36 %), *Pediococcus acidilactici* (24 %) i *P. pentosaceus* (8 %) na sluz atlanskog lososa (*Salmo salar*). Značajno manju adheziju u odnosu na rezultate iz ovog istraživanja zabilježili su Giri i sur. (2012) u rasponu od 7,5-10,23 % na sluz šarana. Različitu sposobnost adhezije izoliranih sojeva BMK moguće je objasniti kao posljedicu razlike u kemijskoj strukturi biomembrana (Kos i sur., 2003) te samim time i razlikom u interakcijama koju mogu ostvariti sa sluzi. Adhezija mikroorganizama se temelji na nespecifičnim fizikalno-kemijskim interakcijama dviju površina. Nespecifično vezanje bakterije i supstrata može biti posljedica hidrofobnih interakcija ili vezanja vodika. Specifične interakcije između bakterija i sluznice domaćina posredovane su bakterijskim adhezinima i komplementarnim receptorima (Sica i sur., 2012). Opće je prihvaćeno da kod odraslih jedinki ribe mukozni i i sekretorni imunitet igraju važnu ulogu u zaštiti od bakterijskih infekcija (ICMSF, 2005).

Budući da se koncept probiotika temelji na poboljšanju mikrobioma crijeva unošenjem populacije korisnih mikroba, važno je uzeti u obzir varijacije mikrobiote crijeva riba ili školjaka unutar istih i/ili različitih vrsta koje će vjerojatno utjecati na učinkovitost probiotika i na taj način ometati njegovo umnažanje. Stoga je teško, iako nije nemoguće, pronaći probiotičke sojeve koji imaju jednako dobar utjecaj na više vrsta riba i školjaka, prilikom različitih uvjeta uzgoja i životne dobi. Za sada, jedini soj koji ima zabilježene dobre rezultate je *Pediococcus acidilactici* CNCM 18/5MA, komercijalnog imena Bactocell® (Lallemand SAS, Francuska). Trenutno je to jedini soj odobren za upotrebu kao probiotik u akvakulturi u EU, namjenjen isključivo za salmonidne vrste ribe i škampe (Rodiles i sur., 2018). Budući da probiotik mora

povoljno modulirati mikrobiotu domaćina, potrebno je bolje razumijevanje sastava i funkcionalnosti mikrobiote crijeva morskih životinja. Nadalje, bolje poznavanje mikrobioma ribe i školjaka u fazi ličinki, s naglaskom na biogeografiju, povijest vrste, genotipove domaćina, promjene povezane s godišnjim dobima, pomoći će boljem odabiru probiotika prikladnih za određenu vrstu, u određenoj životnoj fazi ili fazi proizvodnog ciklusa (Rodiles i sur., 2018).

6. ZAKLJUČCI

1. Iz izolata autohtone mikroflore probavnog sustava te sluzi kože i škrga ribe i školjkaša uspješno je izolirano i identificirano pet sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK): *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus plantarum* D1, *Lactobacillus plantarum* K4, *Lactobacillus helveticus* O9 i *Leuconostoc mesenteroides* L4A

2. Izolati BMK su uspješno okarakterizirani sukladno kriterijima za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture te izbor BMK kao ribljih probiotika

3. Soj *L. plantarum* O1 se pokazao kao najbolji soj koji je zadovoljio sve zadane tehnološke kriterije za primjenu BMK kao probiotika ili bioprotektivnih kultura za proizvode akvakulture

4. Izolirani sojevi BMK dobro inhibiraju rast najčešćih morskih patogenih mikroorganizama pri čemu se *L. plantarum* O1 pokazao kao soj s najboljom antimikrobnom aktivnošću koja je posljedica proizvodnje bakteriocina plantaricina A

5. Soj *L. plantarum* O1 zadovoljio je sigurnosne aspekte, tj. nije pokazao hemolitičku aktivnost, rezistenciju na antibiotike niti sposobnost proizvodnje biogenih amina

6. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako BMK morskog porijekla imaju veliki potencijal za upotrebu u akvakulturi, dok *L. plantarum* O1 ima sve predispozicije za primjenu u ribljoj industriji kao probiotički soj

7. LITERATURA

Aasen, I. M., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., Storrø, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(2), 159-166.

Abasali, H., i Mohamad, S. (2010). Effect of dietary supplementation with probiotic on reproductive performance of female livebearing ornamental fish. *Research Journal of Animal Sciences*, *4*(4), 103-107.

Ahmad, A., Hamid, R., Dada, A. C., Usup, G. (2013). *Pseudomonas putida* strain FStm2 isolated from shark skin: a potential source of bacteriocin. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *5*(3), 165-175.

Ahmed, T., Kanwal R., Ayub, N. (2006), Influence of temperature on growth pattern of *Lactococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* isolated from camel milk. *Biotechnology*, *5*, 481-488.

Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A., Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *Journal of applied microbiology*, *99*(6), 1294-1302.

Amin, M., Adams, M., Bolch, C.J.S., Burke, C.M. (2016). *In vitro* screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. *Aquaculture International*, *25*(1), 485–498.

Ammor, M. S., Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat science*, 76(1), 138-146.

Anacarso, I., Messi, P., Condò, C., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C., & de Niederhäusern, S. (2014). A bacteriocin-like substance produced from Lactobacillus pentosus 39 is a natural antagonist for the control of Aeromonas hydrophila and Listeria monocytogenes in fresh salmon fillets. *LWT-Food Science and Technology*, 55(2), 604-611.

Andrighetto, C., Lombardi, A., Ferrati, M., Guidi, A., Corrain, C., Arcangeli, G. (2009). Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, *20*(5), 462-468.

Ángeles Esteban, M. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, 1–29.

Angulo, F. (2000). Agentes antimicrobianos en acuicultura: Impacto potencial en la salud pública. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, *20*(6), 217-219.

Anonymous 1. Diseases (Finfish, Molluscs and Crustaceans). (https://www2.gov.scot/Topics/marine/Fish-Shellfish/aquaculture/diseases). Pristupljeno: 22.10.2019.

Asfie, M., Yoshijima, T., Sugita, H. (2003). Characterization of the goldfish fecal microflora by the fluorescent in situ hybridization method. *Fisheries science*, *69*(1), 21-26.

Ayaz, A. (2006). Dominant aerobic bacterial intestinal flora of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae in culture conditions. Magistarski rad. İstanbul: Sveučilište u Istanbulu.

Baffone, W., Pianetti, A., Bruscolini, F., Barbieri, E., Citterio, B. (2000). Occurrence and expression of virulence-related properties of *Vibrio* species isolated from widely consumed seafood products. *International Journal of Food Microbiology*, *54*(1-2), 9-18.

Balcázar, J.L., Decamp, O., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I. (2006). Health and nutritional properties of probiotics in fish and shellfish. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *18*(2), 65-70.

Balcázar, J. L., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J. L., & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, *278*(1-4), 188-191.

Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., & Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, *114*(3-4), 173-186.

Bindiya, E. S., Bhat, S. G. (2016). Marine bacteriocins: A review. *Journal of Bacteriology & Mycology*, *2*(5), 140-147.

Birkbeck, T. H., Ringø, E. (2005) Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. U: Mosenthin, R., Zentek, J., Żebrowska, T. (ur)., *Biology of Growing Animals*. Vol. 2, Amsterdam: Elsevier, str. 208-234.

Blom, H., Katla, T., Hagen, B. F., & Axelsson, L. (1997). A model assay to demonstrate how intrinsic factors affect diffusion of bacteriocins. *International journal of food microbiology*, *38*(2-3), 103-109.

Bogut, I., Milaković, Z., Brkić, S., Novoselić, D., Bukvić, Ž. (2000). Effects of *Enterococcus faecium* on the growth rate and content of intestinal microflora in sheat fish (*Silurus glanis*). *Veterinarni medicina*, *45*(4), 107-109.

Bøgwald J, Dalmo RA (2014) Gastrointestinal pathogenesis in aquatic animals. U: Merrifield, D.L., Ringø, E. (ur)., *Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics*. Oxford: Wiley, str. 53–74.

Bojanić, K., Kozačinski, L., Filipović, I., Cvrtila, Ž., Zdolec, N., Njari, B. (2009), Kvaliteta lubina tijekom pohrane na ledu. *Meso*, *11*, 44-48.

Bolivar, A., Costa, J. C. C. P., Posada-Izquierdo, G. D., Pérez-Rodríguez, F., Bascón, I., Zurera, G., Valero, A. (2016) Characterization of foodborne pathogens and spoilage bacteria in Mediterranean fish species and seafood products. U: Singh, O.V. (ur.), *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, Oxford: John Wiley & Sons, str. 21-39.

Bongiorno, T., Iacumin, L., Tubaro, F., Marcuzzo, E., Sensidoni, A., Tulli, F. (2015). Seasonal changes in technological and nutritional quality of *Mytilus galloprovincialis* from suspended culture in the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Food chemistry*, *173*, 355-362.

Brillet, A., Pilet, M.F., Prevost, H., Cardinal, M., Leroi, F. (2005). Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens* V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, chemical and sensory quality of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, *104*, 309-324.

Budu-Amoako, E., Ablett, R. F., Harris, J., Delves-Broughton, J. (1999). Combined effect of nisin and moderate heat on destruction of *Listeria monocytogenes* in cold-pack lobster meat. *Journal of food protection*, *62*(1), 46-50.

Burr, G., Gatlin III, D., Ricke, S. (2005). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in finfish aquaculture. *Journal of the World Aquaculture society*, *36*(4), 425-436.

Busani L, Cigliano A, Taioli E, Caliguiuri V, Chiavacci L, Di Bella C, Battisti A, Duranti A, Gianfranceschi M, Nardella MC, Ricci A, Rolesu S, Tamba M, Marabelli R, Cprioli A (2005). Prevalence of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* contamination in foods of animal origin in Italy. *Journal of Food Protection* 68, 1729–1733.

Caglak, E., Cakli, S., Kilinc, B. (2008). Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, *226*(6), 1293-1299.

Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M., Barros-Velázquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*, *39*(3), 356-364.

Campos, C.A., Castro, M.P., Aubourg, S.P., Velazquez, J. (2012) Use of natural preservatives in seafood. U: Mc Elhatton, A., Sobral, P. (ur.)., *Novel Technologies in Food Science: Their Impact on Products, Consumer Trends and the Environment.* New York: Springer Publishing Company, str. 325-360.

Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, *258*(1-4), 430-438.

Cao, R., Xue, C. H., Liu, Q., Xue, Y. (2009). Microbiological, chemical, and sensory assessment of Pacific Oysters (*Crassostrea gigas*) stored at different temperatures. *Czech Journal of Food Sciences*, *27*(2), 102-108.

Chahad, O. B., El Bour, M., Calo-Mata, P., Boudabous, A., Barros-Velàzquez, J. (2012). Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products. *Research in microbiology*, *163*(1), 44-54.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International journal of food microbiology*, *71*(1), 1-20.

Cohen, P.S., Laux, D.C. (1995). Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro. *Methods in Enzymology*, *253*, 309-314.

Collins B, Cotter P, Hill, P., Ross R (2010). Applications of lactic acid bacteria - produced bacteriocins. U: Mozzi, F., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (ur)., *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications*. Ames: Blackwell Publishing. str. 89-109.

Cortesi, M. L., Panebianco, A., Giuffrida, A., Anastasio, A. (2009). Innovations in seafood preservation and storage. *Veterinary research communications*, *33*(1), 15-23.

Cruz-Romero, M., Kelly, A. L., Kerry, J. P. (2008). Effects of high-pressure treatment on the microflora of oysters (*Crassostrea gigas*) during chilled storage. *Innovative food science & emerging technologies*, *9*(4), 441-447.

Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zadravec, M., Pleadin, J., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Frece, J. (2018). Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food Technology and Biotechnology, 56* (4), 581-589.

Dalgaard, P., (2003). Spoilage of seafood. U: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. (ur.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. London: Academic Press. str: 2462-2472.

Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N., Emborg, J. (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*)–effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(1), 80-95.

Danielsen, M., & Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *International journal of food microbiology*, *82*(1), 1-11.

Devlieghere, F., i Debevere, J. (2000). Influence of dissolved carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, *33*(8), 531-537.

Dharmaraj, S., Dhevendaran, K. (2010). Evaluation of *Streptomyces* as a probiotic feed for the growth of ornamental fish *Xiphophorus helleri*. *Food technology and Biotechnology*, *48*(4), 497-504.

Diep, D.B., Nes, I. F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Current drug targets*, *3*(2), 107-122.

Dortu, C., Thonart, P. (2009). Bacteriocins from lactic acid bacteria: interest for food products biopreservation. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, *13*(1), 143-154.

Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L.M., Prévost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *70*(2), 564-582.

European Food Safety Authority (EFSA) (2007). Opinion of the Scientific Committee on a request from EFSA on the introduction of a Qualified Presumption of Safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA Journal 587:1-16.

Egerton, S., Culloty, S., Whooley, J., Stanton, C., Ross, R.P. (2018). The gut microbiota of marine fish. *Frontiers in microbiology*, *9*, 1-17.

Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, H., Brurberg, M. B., Nes, I. F. (1998). Comparative studies of pediocin-like bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 3275-3281.

Einarsson, H., Lauzon, H.L. (1995). Biopreservation of brined shrimp (*Pandalus borealis*) by bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(2), 669-676.

Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., DePaola, A. (2018). Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food microbiology*, *70*, 85-93.

El Bassi, L., Hassouna, M., Shinzato, N., Matsui, T. (2009). Biopreservation of refrigerated and vacuum-packed *Dicentrarchus labrax* by lactic acid bacteria. Journal of food science, 74(6), 335-339.

El-Dakar, A.Y., Shalaby, S.M., Saoud, I.P. (2007). Assessing the use of a dietary probiotic/prebiotic as an enhancer of spinefoot rabbitfish *Siganus rivulatus* survival and growth. *Aquaculture Nutrition*, *13*(6), 407-412.

El-Haroun, E.R., Goda, A.S., Kabir Chowdhury, M.A. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (L.). *Aquaculture Research*, *37*(14), 1473-1480.

Elotmani, F., Assobhei, O. (2004). *In vitro* inhibition of microbial flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. *Letters in applied microbiology*, *38*(1), 60-65.

Emborg, J., Dalgaard, P. (2006). Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *Journal of food protection*, *69*(4), 897-906.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization (FAO). (2012). Public health risks of histamine and other biogenic amines from fish and fishery products.

Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterialfoodborne diseases. *Microbes and infection*, *2*(13), 1651-1660.

Felis, G. E., Salvetti, E., Torriani, S. (2015). Systematics of lactic acid bacteria: current status. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, 25-32.

Fjellheim, A. J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I. M., Vadstein, O. (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary microbiology*, *144*(1-2), 153-159.

Food and Drug Administration (FDA) (2001). Fish and fisheries products hazards and controls guide, 3.izd.

Francis, G. A., O'Beirne, D. (1998). Effects of storage atmosphere on *Listeria monocytogenes* and competing microflora using a surface model system. *International journal of food science & technology*, *33*(5), 465-476.

Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. (2011) The Importance of Understanding the Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. U: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (ur.) *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. New York: Springer Publishing Company, str. 3-22.

Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Beganović, J., Leboš, A., Šušković, J. (2009). Synbiotic effect of *Lactobacillus helveticus* M92 and prebiotics on the intestinal microflora and immune system of mice. *Journal of Dairy Research*, *76*(1), 98-104.

Frece J., Markov K., Kovačević D. (2010a). Određivanje autohtone mikrobne populacije i mikotoksina te karakterizacija potencijalnih starter kultura u slavonskom kulenu. *Meso*, **12** (2): 92-98.

Frece J., Markov K., Čvek D., Kovačević, D. (2010c). Stafilokoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. *Meso*, **12** (3): 156-160.

Frece, J., Vrdoljak, M., Filipčić, M., Jelić, M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Pleadin, J., Gobin. I., Landeka Dragičević, T., Markov, K. (2016). Microbiological quality and variability of natural microbiota in Croatian cheese maturing in lambskin sacks. *Food technology and biotechnology*, *54*(2), 129-134.

Frece, J., Markov, K., Čanak, I., Jakopović, Ž., Kostelac, D. (2019) *Fermentirana hrana: mikrobiologija i starter kulture*. Koprivnica: Sveučilište Sjever.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Omar, N. B. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International journal of food microbiology*, *120*(1-2), 51-70.

Gänzle, M. G., Weber, S., Hammes, W. P. (1999). Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins. *International Journal of Food Microbiology*, *46*(3), 207-217.

García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., Martínez, B. (2010). Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in food science & technology*, *21*(8), 373-382.

Gatesoupe, F.J. (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, *14*(1-3), 107-114.

Gavrilović, A., Frece, J., Markov, K., Jug-Dujaković, J. (2016) Development and evaluation of marinade on the basis of bitter orange with *Lactobacillus plantarum* O1 for bio-preservation and flavouring of sea Food. U: Vidaček, S. (ur.), Proceedings of *46th WEFTA CONCERENCE, From Local Fish to Global Dish*. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet, str. 47-50.

Gayathri, V., Ganga Baheerathi, C., Revathi, K., Sethi, S. N. (2011). Identification of gut microflora from green mussel (*Perna viridis*). *Journal of Advanced Biotechnology*, (Suppl.) *10*, (10), 119–122.

Gelman, A., Drabkin, V., Glatman, L. (2000). Evaluation of lactic acid bacteria, isolated from lightly preserved fish products, as starter cultures for new fish-based food products. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *1*(3), 219-226.

Geraylou, Z., Vanhove, M.P.M., Souffreau, C., Rurangwa, E., Buyse, J., Ollevier, F. (2014). *In vitro* selection and characterization of putative probiotics isolated from the gut of *Acipenser baerii* (Brandt, 1869). *Aquaculture Research*, *45*(2), 341–352.

Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., Kneifel, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria–a review. *LWT-Food Science and Technology*, *54*(2), 315-324.

Ghosh, S., Sinha, A., Sahu, C. (2008). Dietary probiotic supplementation in growth and health of live-bearing ornamental fishes. *Aquaculture Nutrition*, *14*(4), 289-299.

Giri, S.S., Sukumaran, V., Sen, S.S., Jena, P.K. (2013). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Bacillus subtilis* VSG1 singularly or in combination with *Lactobacillus plantarum* VSG3 or/and *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 on the growth, immunity and disease resistance of *Labeo rohita*. *Aquaculture Nutrition*. *20*(2),163–171.

Glatman, L., Drabkin, V., Gelman, A. (2000). Using lactic acid bacteria for developing novel fish food products. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *80*(3), 375-380.

Goulas, A.E., Chouliara, I., Nessi, E., Kontominas, M.G., Savvaidis, I.N. (2005). Microbiological, biochemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(3), 752-760.

Grosu-Tudor, S.S., Ștefan, I.R., Zamfir, M. (2016), Growth/survival of some functional lactic acid bacteria under different stress conditions. *AgroLife Scientific Journal*, 5 (2), 71-78.

Gu, J. D., Mitchell, R. (2002). Indigenous microflora and opportunistic pathogens of the freshwater zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Hydrobiologia*, *474*(1-3), 81-90.

Hamdan, A.M., El-Sayed, A.F.M., Mahmoud, M.M. (2016). Effects of a novel marine probiotic, *Lactobacillus plantarum* AH 78, on growth performance and immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of applied microbiology*, *120*(4), 1061-1073.

Haros, M., Bielecka, M., Honke, J., Sanz, Y. (2008). Phytate degrading activity in lactic acid bacteria. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, *58*(1), 33-40.

Hidalgo, M.C., Skalli, A., Abellán, E., Arizcun, M., Cardenete, G. (2006). Dietary intake of probiotics and maslinic acid in juvenile dentex (*Dentex dentex* L.): effects on growth performance, survival and liver proteolytic activities. *Aquaculture nutrition*, *12*(4), 256-266.

Hisar, Ş.A., Kaban, G., Hisar,, O., Yanik, T., Kaya, M. (2005). Effect of *Lactobacillus sakei* Lb706 on behavior of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed rainbow trout fillets. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *29*(4), 1039-1044.

Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, *24*(3), 343-362.

Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T., Gram, L. (2004). Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, *96*(1), 117-132.

Huss, H.H., Gram, L., Ababouch, L. (2004) Assessment and management of seafood safety and quality. FAO Fisheries Technical Paper, 444. Food and Agriculture organization of the United Nations, Rome.

Hwanhlem, N., Aran, H. (2015) Biopreservation of seafood by using bacteriocins and bacteriocinogenic lactic acid Bacteria as potential bio-control agents. U: Liong, M.T. (ur)., *Beneficial Microorganisms in Agriculture, Aquaculture and Other Areas*. Cham: Springer Publishing Company , str. 183-213.

Hwanhlem, N., Jaffrès, E., Dousset, X., Pillot, G., Choiset, Y., Haertlé, T., H-Kittikun, Aran, Chobert, J. M. (2015). Application of a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L isolated from brackish water for biopreservation in cooked, peeled and ionized tropical shrimps during storage at 8 °C under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*, *240*(6), 1259-1269.

Ibrahim, S.M., Salha, G.D. (2009) Effect of antimicrobial metabolites produced by lactic acid bacteria on quality aspects of frozen Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillets. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, *1*, 40-45.

Iehata, S., Inagaki, T., Okunishi, S., Nakano, M., Tanaka, R., Maeda, H. (2009). Colonization and probiotic effects of lactic acid bacteria in the gut of the abalone *Haliotis gigantea*. *Fish Science*, *75*(5), 1285–1293.

International Commission on Microbiological Specifications of Foods (ICMSF) (2005) Fish and fish products. U: *Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities*, 2.izd. New York: Kluwer Academic i Plenum Publishers, str. 174-249.

Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., Yamasato, K. (2003). *Marinilactibacillus psychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *53*(3), 711-720.

Itoi, S., Abe, T., Washio, S., Ikuno, E., Kanomata, Y., Sugita, H. (2008). Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International journal of food microbiology*, *121*(1), 116-121.

Jay, J.M. (2000) *Modern food microbiology*, 6.izd. Gaithersburg: Aspen Publishers Inc.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, & World Health Organization. (2002). Compendium of Food Additive Specifications: Addendum 10 (No. 52). Food & Agriculture Org.

Jones, E., Salin, V., Williams, G. W. (2005). *Nisin and the market for commercial bacteriocins* (No. 1406-2016-117331).

Joosten, H.M.L.J., Northolt, M.D. (1989). Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(9), 2356-2359.

Jozić, S., Šolić, M., Krstulović, N. (2012). The accumulation of the indicator bacteria *Escherichia coli* in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) under experimental conditions. *Acta adriatica*, *53*(3), 353-361.

Jutfelt, F., Olsen, R.E., Glette, J., Ringø, E., Sundell, K. (2006). Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, *29*, 255–262.

Kajfasz, J.K., Quivey Jr, R.G. (2011) Responses of Lactic Acid Bacteria to Acid Stress. U: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (ur.), *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. New York: Springer Publishing Company, str. 23-53.

Katikou, P., Ambrosiadis, I., Georgantelis, D., Koidis, P., Georgakis, S. A. (2007). Effect of *Lactobacillus* cultures on microbiological, chemical and odour changes during storage of rainbow trout fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *87*(3), 477-484.

Katla, T., Møretrø, T., Aasen, I. M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K. (2001). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiology*, *18*(4), 431-439.

Kayis, S., Capkin, E., Fikri, B., Altinok, I. (2009). Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the southern Black Sea region of Turkey - a survey. Israeli Journal of Aquaculture, *61*(4), 339- 344.

Kisla, D., Ünlütürk, A. (2004). Microbial shelf-life of rainbow trout fillets treated with lactic culture and lactic acid. *Advances in food sciences*, *26*(1), 17-20.

Kos, B. V. Z. E., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain Lactobacillus acidophilus M92. *Journal of applied microbiology*, *94*(6), 981-987.

Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008). Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*(5), 699-707.

Kristiansen, P.E., Fimland, G., Mantzilas, D., Nissen-Meyer, J. (2005). Structure and mode of action of the membrane-permeabilizing antimicrobial peptide pheromone plantaricin A. The *Journal of Biological Chemistry*, *280*(24), 22945–50.

Küley, E., Özogul, F., Balikçi, E., Durmus, M., Ayas, D. (2013). The influences of fish infusion broth on the biogenic amines formation by lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(2), 407-415.

Lalloo, R., Ramchuran, S., Ramduth, D., Görgens, J., Gardiner, N. (2007). Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(5), 1471-1479.

Lanciotti, E., Santini, C., Lupi, E., Burrini, D. (2003). *Actinomycetes*, cyanobacteria and algae causing tastes and odours in water of the River Arno used for the water supply of Florence. *Journal of Water Supply: Research and Technology-Aqua*, *52*(7), 489-500.

Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B.E., López-Madrid, W. (2003). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, *216*(1-4), 193-201.

Laroche, C., Gervais, P. (2003). Unexpected thermal destruction of dried, glass bead-immobilized microorganisms as a function of water activity. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(5), 3015-3019.

Le Marrec, C. (2011) Responses of lactic acid bacteria to osmotic stress. U: Tsakalidou, E., Papadimitriou, K. (ur.), *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Boston: Springer Publishing Company, str. 67-90.

Leamaster, B.R., Walsh, W. A., Brock, J.A., Fujioka, R.S. (1997). Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology*, *50*(4), 770-780.

Lee, K.K., Chen, F.R., Liu, P.C. (1995). A haemocytolytic assay for tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Fish and Shellfish Immunology*, *5*, 385-387.

Lee, R.J., Morgan, O.C. (2003). Environmental factors influencing the microbiological contamination of commercially harvested shellfish. *Water Science and Technology*, *47*(3), 65-70.

Lee, R.J., Rangdale, R.E., Croci, L., Hervio-Heath, D., Lozach, S. (2008) Bacterial pathogens in seafood. U: Børresen, T. (ur.), *Improving seafood products for the consumer*. Cambridge: Woodhead Publishing, str. 247-291.

Lee, H. I., Kim, M. H., Kim, K. Y., So, J. S. (2010). Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe*, *16*(5), 522-526.

Lee, C.R., Cho, I., Jeong, B., Lee, S. (2013). Strategies to minimize antibiotic resistance. *International journal of environmental research and public health*, *10*(9), 4274-4305.

Leroi, F. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food microbiology*, *27*(6), 698-709.

Lin, H. Z., Guo, Z., Yang, Y., Zheng, W., & Li, Z. J. (2004). Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp Litopenaeus vannamei Boone. *Aquaculture Research*, *35*(15), 1441-1447.

Liston, J. (1980) Microbiology in fishery science. U: Connell, J.J. (ur.) *Zbornik radova konferencije Torry Research Station „Advances in fish science and technology". 23-27 srpnja 1979., Aberdeen, Škotska.* Farnham: Fishing News Books, str. 138-157.

Liu, J. Y., Li, A. H., Ji, C., & Yang, W. M. (2009). First description of a novel *Weissella* species as an opportunistic pathogen for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) in China. *Veterinary microbiology*, *136*(3-4), 314-320.

Lorca, G.L., Barabote, R.D., Zlotopolski, V., Tran, C., Winnen, B., Hvorup, R.N., Stonestrom, A.J., Nguyen, E., Huang, L.W., Kim, D.S., Saier, M.H. Jr. (2007). Transport capabilities of

eleven Gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. *Biochimica et Biophysica Acta, 1768*, 1342–1366.

Lücke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science, 56*(2), 105-115.

Macey, B. M., Coyne, V. E. (2005). Improved growth rate and disease resistance in farmed *Haliotis midae* through probiotic treatment. *Aquaculture, 245*(1-4), 249-261.

Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Mirkin, B., Koonin, E. i sur. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 103*(42), 15611-15616.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Kim, S.K. (2014) Lactic acid bacteria in seafood products: current trends and future perspectives. U: Kim, S.K. (ur.), *Seafood Science: Advances in Chemistry, Technology and Applications***.** Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis, str. 182-201.

Maravić, A., Šamanić, I., Šprung, M., Fredotović, Ž., Ilić, N., Dragičević, J., Puizina, J. (2018). Broad-spectrum resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from shellfish: infrequent acquisition of novel resistance mechanisms. *Environmental monitoring and assessment, 190*(2), 81-92.

Maria, L.P., Laurie, O.S., Shiau, P.T., Peter, M., Helen, H., Paul,a M.O.C., Paul, D.C., Peader, G.L., Gillian, E.G. (2012). Assessment of the bacteriocinogenic potential of marine bacteria reveals lichenicidin production by seaweed-derived *Bacillus* spp. *Marine Drugs, 10*, 2280-2299.

Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermosillo, O. A., & Ramírez Saad, H. C. (2012). Use of probiotics in aquaculture. *ISRN microbiology, 2012*.

Matamoros, S., Leroi, F., Cardinal, M., Gigout, F., Kasbi Chadli, F., Cornet, J., Prevost, F., Pilet, M.F. (2009). Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. *Journal of food protection, 72*(2), 365-374.

Mayhew, P.J., Jenkins, G.B., Benton, T.G. (2008). A long-term association between global temperature and biodiversity, origination and extinction in the fossil record. *Proceedings of the Royal Society B, 275*(1630), 47-53.

Meidong, R., Doolgindachbaporn, S., Sakai, K., Tongpim, S. (2017). Isolation and selection of lactic acid bacteria from Thai indigenous fermented foods for use as probiotics in tilapia fish *Oreochromis niloticus*. *AACL Bioflux*, *10*(2), 455-463.

Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M. B., Boknas, N., Koort, J., Björkroth, J., Dalgaard, P. (2008). Microbial spoilage and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology*, *124*, 250-259.

Merrifield, D.L., Balcázar, J.L., Daniels, C., Zhou, Z., Carnevali, O., Sun, Y.Z., Seyed H.H., Ringø, E. (2014) Indigenous Lactic Acid Bacteria in Fish and Crustaceans. U: Merrifield, D.L., Ringø, E. (ur.), *Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics*. Oxford: John Wiley & Sons, str. 128-168.

Moriarty, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, *164*(1-4), 351-358.

Morzel, M., Fitzgerald, G.F., Arendt, E.K. (1997). Fermentation of salmon fillets with a variety of lactic acid bacteria. *Food research international*, *30*(10), 777-785.

Muller, J.A., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Stanton, C. (2009). Manufacture of probiotic bacteria. *Prebiotics and probiotics science and technology*, 725-759.

Muñoz-Atienza, E., Landeta, G., de las Rivas, B., Gómez-Sala, B., Muñoz, R., Hernández, P. E., Cintas, L.M. Herranz, C. (2011). Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *International journal of food microbiology*, *146*(2), 212-216.

Muñoz-Atienza, E., Gómez-Sala, B., Araújo, C., Campanero, C., del Campo, R., Hernández, P. E., Heranz, C., Cintas, L.M. (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology*, *13*(1), 1-22.

Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Magadán, S., Hernández, P.E., Herranz, C., Santos, Y., Cintas, L.M. (2014). *In vitro* and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. *Fish & Shellfish Immunology*, *41*(2), 570–580.

Nes, I. F., Yoon, S. S., Diep, D. B. (2007). Ribosomally synthesiszed antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science and Biotechnology*, *16*(5), 675-690.

Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture*, *198*(3-4), 229-236.

Nilsson, L., Hansen, T. B., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knøchel, S., Gram, L., Gravesen, A. (2005). Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic Carnobacterium piscicola. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(1), 172-183.

Nomoto, K. (2005). Prevention of infections by probiotics. *Journal of bioscience and bioengineering*, *100*(6), 583-592.

Noonpakdee, W., Jumriangrit, P., Wittayakom, K., Zendo, J., Nakayama, J., Sonomoto, K., Panyim, S. (2009). Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 17 (1), 19-25.

Nyanga-Koumou, A. P., Ouoba, L. I. I., Kobawila, S. C., Louembe, D. (2012). Response mechanisms of lactic acid bacteria to alkaline environments: a review. *Critical reviews in microbiology*, *38*(3), 185-190.

Ouwehand, A., Vesterlund, S. (2004) Antimicrobial components from lactic acid bacteria. U: Salminen, S., Wright, V., Ouwehand, A. (ur.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3.izd. New York: Marcel Dekker, Inc., str. 375-396.

Paludan-Müller, C., Huss, H. H., Gram, L. (1999). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *46*(3), 219-229.

Papadopoulos, V., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I. N., Kontominas, M. G. (2003). Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, *20*(4), 411-420.

Papadopoulos, T., Abrahim, A., Sergelidis, D., Kirkoudis, I., Bitchava, K. (2010). Prevalence of *Listeria* spp. in freshwater fish (*Oncorhynchus mykiss* and *Carassius gibelio*) and the

environment of fish markets in Northern Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *61*,15–22.

Parlapani, F.F., Meziti, A., Kormas, K.A., Boziaris, I.S. (2013). Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food microbiology*, *33*(1), 85-89.

Pérez-Sánchez, T., Balcázar, J. L., García, Y., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., Merrifield, D.L., Ruiz-Zarzuela, I. (2011). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*, *34*(7), 499–507.

Pilet, M.F., Leroi, F. (2011) Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products. U: Lacroix, C. (ur.), *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation.* Cambridge: Woodhead Publishing, str. 324-347.

Podolak, R.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L., Fung, D.Y.C. (1996). Inhibition of Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157: H7 on beef by application of organic acids. Journal of food protection, 59(4), 370-373.

Rees, E.E., Davidson, J., Fairbrother, J.M., St. Hilaire, S., Saab, M., McClure, J.T. (2015). Occurrence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in oysters and mussels from Atlantic Canada. *Foodborne pathogens and disease*, **12**(2), 164-169.

Reda, R.M., Selim, K.M., El-Sayed, H.M., El-Hady, M.A. (2018). *In vitro* selection and identification of potential probiotics isolated from the gastrointestinal tract of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics and antimicrobial proteins*, *10*(4), 692-703.

Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie, 84*, 357–364.

Ringø, E., Strøm, E. (1994). Microflora of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.): gastrointestinal microflora of free-living fish and effect of diet and salinity on intestinal microflora. *Aquaculture Research*, *25*(6), 623-629.

Ringø, E., Olsen, R.E., Øverli, Ø., Løvik, F. (1997). Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.). *Aquaculture Research*, *28*(11), 901-904.

Ringø, E., Birkbeck, T.H. (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture research, 30*(2), 73-93.

Ringø, E., Schillinger, U., Holzapfel, W. (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. U: Mosenthin, R., Zentek, J., Żebrowska, T. (ur)., *Biology of Growing Animals*. Vol. 2, Amsterdam: Elsevier, str. 418-453.

Ringø, E. (2008). The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquaculture Research, 39*(2), 171-180.

Ringø, E., Doan, H. V., Lee, S., Song, S. K. (2019). Lactic acid bacteria in shellfish: Possibilities and challenges. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture,* 1-31.

Robert-Pillot, A., Guenole, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L. (2004). Occurrence of the *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *International Journal of Food Microbiology, 91*(3): 319–325.

Rodgers, S. (2001). Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures-a review. *Trends in Food Science & Technology, 12*(8), 276-284.

Rodiles, A., Rawling, M.D., Peggs, D.L., do Vale Pereira, G., Voller, S., Yomla, R., Standen, B.T., Bowyer, P., Merrifield, D.L. (2018) Probiotic Applications for Finfish Aquaculture. U: Di Gioia, D., Biavati, B. (ur.), *Probiotics and prebiotics in animal health and food safety.*Cham: Springer Publishing Company, str.197-217.

Selvendran, M., Babu, M. (2013). Studies on novel bacteriocin like inhibitory substance (BLIS) from microalgal symbiotic *Vibrio* spp MMB2 and its activity against aquatic bacterial pathogens. *Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3*(2), 169–175.

Seppola, M., Olsen, R. E., Sandaker, E., Kanapathippillai, P., Holzapfel, W., Ringø, E. (2006). Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) typing of carnobacteria isolated from hindgut chamber and large intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Systematic and applied microbiology, 29*(2), 131-137.

Shirazinejad, A. R., Noryati, I., Rosma, A., Darah, I. (2010). Inhibitory effect of lactic acid and nisin on bacterial spoilage of chilled shrimp. *World Academy of Science, Engineering and Technology, 41,* 163-167.

Sica, M. G., Brugnoni, L. I., Marucci, P. L., Cubitto, M. A. (2012). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *101*(4), 869-879.

Singh, R., Sivasubramani, K., Jayalakshmi, S., Kumar, S. S., Selvi, C. (2013). Isolation and production of bacteriocin by marine *Lactobacillus fermentum* SBS001. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 2*, 67-73.

Slover, C. M., Danziger, L. (2008). *Lactobacillus*: a review. *Clinical Microbiology Newsletter*, *30*(4), 23-27.

Spanggaard, B., Huber, I., Nielsen, J., Nielsen, T., Appel, K. F., Gram, L. (2000). The microflora of rainbow trout intestine: a comparison of traditional and molecular identification. *Aquaculture*, *182*(1-2), 1-15.

Sudalayandi, K. (2011). Efficacy of lactic acid bacteria in the reduction of trimethylamine-nitrogen and related spoilage derivatives of fresh Indian mackerel fish chunks. *African Journal of Biotechnology*, *10*(1), 42-47.

Šušković J. (2019) Starter kulture-temelj fermentativne i funkcionalne hrane, predavanja iz kolegija „Probiotici, prebiotici i starter kulture“.

Taira, W., Funatsu, Y., Satomi, M., Takano, T., Abe, H. (2007). Changes in extractive components and microbial proliferation during fermentation of fish sauce from underutilized fish species and quality of final products. *Fisheries Science*, *73*(4), 913-923.

Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Kim, S.M., Park, S.I., Yoshikawa, T., Sakata, T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fisheries Science*, *72*(4), 755-766.

Tham, S., Chang, C., Huang, H., Lee, Y., Huang, T., Chang, C.C. (2010). Biochemical characterization of an acid phosphatase from *Thermus thermophilus*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, *74*(4), 727-735.

Thompson, F.L., Iida, T., Swings, J. (2004). Biodiversity of vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, *68*(3), 403-431.

Tobback, E. (2009). Early pathogenesis of *Yersinia ruckeri* infections in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Doktorski rad. Belgija: Sveučilište u Ghentu.

Tomé, E., Teixeira, P., Gibbs, P. A. (2006). Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. *Food Microbiology*, *23*(4), 399-405.

Popović, N.T., Skukan, A.B., Džidara, P., Čož Rakovac, R., Strunjak Perović, I., Kozačinski, L., Jadan, M. (2010). Microbiological quality of marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Veterinární medicína*, *55* (5): 233-241.

Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C. L., Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, *300*(1-4), 142-147.

Uchida, M., Ou, J., Chen, B. W., Yuan, C.H., Zhang, X.H., Chen, S.S., Funatsu, Y., Kawasaki, K.I., Satomi, M., Fukuda, Y. (2005). Effects of soy sauce koji and lactic acid bacteria on the fermentation of fish sauce from freshwater silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Fisheries science*, *71*(2), 422-430.

van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *82*(1-4), 187-216.

Vandenberghe, J., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Swings, J. (2003). Phenotypic diversity amongst *Vibrio* isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture*, *219*(1-4), 9-20.

Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J.M., García-Millán, I., del Río, M.P.M., Moriñigo, M.A., Mancera, J.M. (2010). Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, *309*(1-4), 265-271.

Vazquez, J.A., Cabo, M.L., Gonzalez, M.P., Murado M.A. (2003). Survival of lactic acid bacteria in Seawater: A factorial study. *Current Microbiology*, *47*, 508-513.

Vescovo M., Scolari G., Zacconi C. (2006) Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimirobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. *Food Microbiology*, *23*, 689-693.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B. (2010). *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: Administration pathways. *Aquaculture*, *307*(1-2), 83–88.

von Wright, A., Axelsson, L. (2011). Lactic Acid Bacteria: An Introduction. U: Lahtinne S., Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (ur.), L*actic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis, str. 1-17.

Wilson, B., Danilowicz, B.S., Meijer, W.G. (2008). The diversity of bacterial communities associated with Atlantic cod *Gadus morhua*. *Microbial ecology*, *55*(3), 425-434.

Wang, Y.B., Xu, Z.R., Xia, M.S. (2005). The effectiveness of commercial probiotics in northern white shrimp *Penaeus vannamei* ponds. *Fisheries science*, *71*(5), 1036-1041.

Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS microbiology reviews*, *24*(3), 263-290.

Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (1997) *In vitro* study of *Lactobacillus* species strains on bile tolerance and cholesterol removal. U: Xanthopoulos, V., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N., (ured.), *Lactic Acid Bacteria-Lactic*. Caen: Presses Universitaires de Caen, str. 97.

Yang, G., Bao, B., Peatman, E., Li, H., Huang, L., Ren, D. (2007). Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish Takifugu obscurus. *Aquaculture*, *262*(2-4), 183-191.

Yamazaki K, Suzuky M, Kawai Y, Inoue N, Montville T.J. (2003) Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by *Carnobacterium piscicola* CS526 isolated from frozen surimi. *Journal of Food Protection*, *66*, 1420-1425.

Yin, L.J., Wu, C.W., Jiang, S.T. (2007). Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Science*, *73*, 907-912.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. *Journal of functional foods*, *6*, 205-214.

Zaman, M.Z., Abdulamir, A.S., Abu-Bakar, F., Selamat, J. Bakar, J. (2009). A review: microbiological, physicochemical and health impact of high level of biogenic amines in fish sauce. *American Journal of Applied Sciences*, *6*, 1199–1211.

Zhao, H., Sood, R., Jutila, A., Bose, S., Fimland, G., Nissen-Meyer, J., Kinnunen, P.K.J. (2006). Interaction of the antimicrobial peptide pheromone plantaricin A with model membranes: Implications for a novel mechanism of action. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes, 1758(9), 1461–74.

Zhou, G., Xu, X., Liu, Y. (2010). Preservation technologies for fresh meat. *Meat Science*, *86*, 119-128.

Životopis

Iva Čanak rođena je 25.12.1989. u Zadru gdje je završila osnovnu školu i Gimnaziju Franje Petrića (MIOC). Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu završila je 2013. godine i stekla zvanje magistre inženjerke bioprocesnog inženjerstva. Od 2014. godine zaposlena je kao asistent u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu. Koautorica je 15 znanstvenih radova od kojih je 8 iz a1 skupine, 6 iz a2 i 1 iz a3 skupine. Sudjelovala je na 11 znanstvenih skupova te je koautorica jednog sveučilišnog udžbenika i poglavlja u knjizi. Usavršavala se na brojnim tečajevima i radionicama. Dobitnica je Rektorove nagrade, nagrade Zoran Zgaga te godišnje nagrade Biotehničke zaklade za rezultate istraživačkog rada primjenjive u neposrednoj proizvodnji. Do sada je aktivno sudjelovala na jednom projektu Hrvatske zaklade za znanost i četiri Potpore Sveučilišta, a trenutno je aktivna na jednoj Potpori Sveučilišta, dva projekta Hrvatske zaklade za znanost (Hibridno sušenje i valorizacija biljnog prehrambenog otpada i nusproizvoda; Primjena visokog hidrostatskog tlaka u proizvodnji funkcionalnih sokova na bazi voća i povrća) te projektu „Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena“ financiranom iz fonda Europske unije. Osim znanstvene aktivnosti sudjeluje u nastavi kao suradnica na kolegijima Mikrobiologija, Mikrobiologija namirnica, Bakteriologija i Mikologija na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, te na kolegiju Prehrambena mikrobiologija na Sveučilištu Sjever u Koprivnici.

Znanstveni radovi iz skupine A1

Tominac Trcin, M., Zdraveva, E., Dolenec, T., Vrgoč Zimić, I., Bujić Mihica, M., Batarilo, I., Dekaris, I., Blažević, V., Slivac, I., Holjevac-Grgurić, T., Govorčin-Bajsić, E., Markov, K., **Čanak, I**., Kuzmić, S., Tarbuk, A., Tomljenović, A., Mrkonjić, N., mijović, B. (2020). Poly (ε-caprolactone) titanium dioxide and cefuroxime antimicrobial scaffolds for cultivation of human limbal stem cells. *Polymers*, 12 (8), 1758.

Kostelac, D., Vrdoljak, M., Markov, K., Delaš, I., Jug, T., Gajdoš Kljusurić, J., Jakopović, Ž., **Čanak, I**., Jelić, M., Frece, J. (2020). SPME-GC-MS and multivariate analysis of sensory properties of cheese in a sack matured with probiotic starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 58 (2), 128-137.

Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zadravec, M., Pleadin, J., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Frece, J. (2018) Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food Technol Biotechnol*, 56 (4), 581-589.

Radošević, K., **Čanak, I**., Panić, M., Markov, K., Cvjetko Bubalo, M., Frece, J., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I. (2018) Antimicrobial, cytotoxic and antioxidative evaluation of natural deep eutectic solvents. *Environ Sci Pollut Res Int*, 25 (14) 14188-14196.

Kuharić, Ž., Jakopović, Ž., **Čanak, I**., Frece, J., Bošnir, J., Pavlek, Ž., Ivešić, M., Markov, K., (2018) Removing aflatoxin M_1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Arh hig rada toksikol*, *69* (4), 334-339.

Jakopović, Ž., Hanousek Čiča, K., Mrvčić, J., Pucić, I., **Čanak, I**., Frece, J., Pleadin, J., Stanzer, D., Zjalić, S., Markov, K. (2018) Properties and fermentation activity of industrial yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum*, *Candida utilis*, and *Kluyveromyces marxianus* exposed to AFB_1, OTA, and ZEA. *Food Technol Biotechnol*, 56 (2), 208-217.

Grbavac, A., **Čanak, I.,** Stuparević, I., Teparić, R., Mrša, V. (2017) Proteolytic processing of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein Scw4 regulates its activity and influences its covalent binding to glucan. *Biochim Biophys Acta*, 1864 (3), 507-515.

Frece, J., Vrdoljak, M., Filipčić, M., Jelić, M., **Čanak, I.,** Jakopović, Ž., Pleadin, J., Gobin, I., Landeka Dragičević, T., Markov, K. (2016) Microbiological quality and variability of natural microbiota in Croatian cheese maturing in lambskin sacks. *Food Technol Biotechnol*, 54 (2), 129-134

Znanstveni radovi iz skupine A2

Čanak, I., Markov, K., Gavrilović, A., Bosanac, P., Jug- Dujaković, J., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Pleadin, J., Frece, J. (2018) Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša. *Cro J Food Technol Biotechol Nutr*, 13 (1-2), 44-51.

Jakopović, Ž., **Čanak, I**., Romac, A., Kuharić, Ž., Bošnir, J., Ivešić, M., Frece, J., Pavlek, Ž., Markov, K. (2018) Usporedba vezanja AFM_1 iz mlijeka živim, mrtvim i liofiliziranim stanicama BMK. *Cro J Food Technol Biotechnol Nutr*, 13 (1-2), 32-37.

Mikulka, P., **Čanak, I.,** Mohácsiné Farkas, C., Frece, J. (2017). Investigation of the antimicrobial effect of black cumin seed oil using *Staphylococcus aureus* strains. *J Food In*, 63 (3), 1642-1645.

Jakopović, Ž., **Čanak, I.,** Lešić, T., Pleadin, J., Frece, J., Markov, K. (2016) Usporedba osnovnog kemijskog i masno-kiselinskog sastava te mikrobiološke ispravnosti guščjih, kokošjih, pačjih i purećih jaja. *Cro J Food Technol Biotechol Nutr*, 11(3-4), 152-158.

Markov, K., Sokolić, D., **Čanak, I.,** Jakopović, Ž., Frece, J. (2016) Prisutnost aflatoksina i okratoksina A u proizvodima na bazi kakaovca. *Cro J Food Technol Biotechol Nutr*, 11 (1-2) 65-70.

Čanak, I., Berkics, A., Bajcsi, N., Kovacs, M., Belak, A., Teparić, R., Maraz, A., Mrša, V. (2015) Purification and characterization of a novel cold-active lipase from the yeast *Candida zeylanoides*. *J Mol Microb Biotech*, 25 (6), 403-411.

Znanstveni radovi iz skupine A3

Čanak, I., Markov, K., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Čolak, S., Mejdandžić, D., Živković, M., Ježek, D. (2019). *In vitro* Characterization of *Lactobacillus plantarum* O1 isolated from gut of sea bream (*Sparus aurata*) as potential fish probiotic. Proceedings of 4th I.C. FABE 2019 / Petros, K. ; Leontopoulos, S. (ur.). Kreta, Grčka: University of Thessaly, 2019. 170-175.