

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno – biotehnološki fakultet

Mattea Živković

***In situ* karakterizacija morskih izolata bakterija mliječne kiseline kao
potencijalnih ribljih probiotika**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Zavoda za biokemijsko inženjerstvo pod vodstvom prof.dr.sc. Jadranke Frece i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

SADRŽAJ RADA:

1. UVOD	1
1.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)	2
1.1.1. Rod <i>Lactobacillus</i>	3
1.1.2. Rod <i>Leuconostoc</i>	3
1.2. Antimikrobna aktivnost BMK	4
1.3. BMK izolirane iz morskih proizvoda	5
1.4. Patogene bakterije u morskim proizvodima	6
1.4.1. Autohtone patogene bakterije u morskim proizvodima.....	6
1.4.2. Alohtone patogene bakterije u morskim proizvodima.....	7
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Materijali	11
3.1.1. Uzorci.....	11
3.1.3. Hranjive podloge.....	12
3.1.4. Uređaji.....	12
3.1.5. Pribor.....	13
3.1.6. Kemikalije.....	13
3.2. Metode	15
3.2.1. Čuvanje mikroorganizama.....	15
3.2.2. Uzgoj mikroorganizama.....	15
3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti izoliranih sojeva BMK.....	15
3.2.4. Turbidimetrijska metoda.....	15
3.2.5. Izolacija DNA.....	16
3.2.6. Analiza <i>pIn</i> lokusa lančanom reakcijom polimeraze (PCR).....	16
3.2.7. Elektroforeza u gelu agaroze (horizontalna).....	17
3.2.8. Priprema suspenzija bakterijskih stanica.....	17
3.2.9. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u morskoj vodi.....	17

3.2.10. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u žučnim solima ribe	18
3.2.11. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u želučanom soku ribe	18
3.2.12. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	18
3.2.13. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva BMK	18
3.2.14. Adhezija izoliranih sojeva BMK na riblju sluz	18
4. REZULTATI	20
4.1. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva BMK	20
4.1.1. Detekcija gena za sintezu bakteriocina lančanom reakcijom polimeraze (PCR)	26
4.2. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u morskoj vodi	27
4.3. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u gastrointestinalnom traktu ribe	28
4.4. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva BMK	30
4.5. Adhezija izoliranih sojeva BMK na riblju sluz	30
5. RASPRAVA	31
5.1. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva BMK	31
5.2. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u morskoj vodi	33
5.3. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u žučnim solima ribe	34
5.4. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u želučanom soku ribe	35
5.5. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva BMK	36
5.6. Adhezija izoliranih sojeva BMK na riblju sluz	36
6. ZAKLJUČCI	37
7. ZAHVALE	38
8. LITERATURA	39
SAŽETAK	50
SUMMARY	51

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) sastavni su dio prirodne mikrobiote viših organizama. Zahvaljujući dosadašnjim istraživanjima, poznat je njihov antimikrobni potencijal koji se primjenjuje u metodama biokonzerviranja te probiotički potencijal u proizvodnji probiotičkih pripravaka. Probiotički sojevi BMK inhibiraju rast štetnih mikroorganizama proizvodnjom antimikrobnih spojeva, natječući se za mjesto vezanja u probavnom sustavu domaćina i konkurirajući za nutrijente s drugim pripadnicima mikrobiote. Osim navedenog, pozitivno djeluju na zdravlje organizma modulirajući imunološki sustav te je njihova primjena kao dodataka prehrani sigurna (Frece i sur., 2014; Šušković i sur., 2010). Upotreba BMK kao biokonzervansa i probiotika smatra se velikim napretkom jer su tradicionalne metode zaštite namirnica štetne za zdravlje potrošača i ekološki neprihvatljive (Reda i sur., 2017). Akvakultura je jedna od grana prehrambene industrije koja bilježi ubrzani razvoj i koja se trenutno susreće s problem povećanog mortaliteta riba i morskih plodova uzrokovanog patogenim mikroorganizmima (Banerjee i sur., 2017). Osim što je potrebno spriječiti oboljenja proizvoda akvakulture, potrebno je pronaći i adekvatni način njihove zaštite od kvarenja kao prehrambenih proizvoda. Novije strategije uključuju odabir BMK prirodno prisutnih u morskim proizvodima, kako bi se osigurao njihov dobar rast u morskoj matrici pohranjenoj na niskim temperaturama. 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). BMK s probiotičkim potencijalom trebaju biti sigurne za zdravlje proizvoda akvakulture, moraju kolonizirati crijevni epitel i preživjeti nepovoljne uvjete u probavilu, te specifičnim mehanizmima djelovati na patogene i nepoželjne mikroorganizme koje susretu na putu kroz gastrointestinalni trakt (Merrifield i sur., 2010a; Ray i sur., 2012). Iako je potencijal BMK velik, trenutačno postoji mali broj pripravaka na tržištu koji se primjenjuju u proizvodima akvakulture. Osim toga, u Europi ne postoji registrirani komercijalni pripravak ribljeg probiotika koji bi se koristio kao dodatak prehrani i sprječavao bakterijske infekcije raširene u akvakulturi. Stoga je cilj ovog rada okarakterizirati BMK, prethodno izolirane iz proizvoda akvakulture, s potencijalnom primjenom kao riblji probiotici.

1.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su mikroorganizmi s raširenom primjenom u području proizvodnje fermentirane hrane i pića, probiotičkih pripravaka i biokonzerviranju namirnica. Kako bi se dobili kvalitetom ujednačeni i standardizirani proizvodi potrebno je otkriti mikroorganizam pogodan za njihovu proizvodnju, poznavati njegovu taksonomiju, fiziološke i morfološke karakteristike, metabolizam pojedinog supstrata i imati mogućnost primjene metoda genetičkog i metaboličkog inženjerstva s ciljem unaprjeđenja njegovih karakteristika. Takav se mikroorganizam onda koristi kao starter kultura u ciljane svrhe i kao takav mora zadovoljiti kriterije tehnološke učinkovitosti, sigurnosti i ekonomičnosti (Šušković i sur., 2009; Markov i Frece, 2016). Osim kvasaca i plijesni, bakterije mliječne kiseline se kao starter kulture najčešće koriste za provedbu kontroliranih fermentacija jer osim što brzo zakiseljavaju prehrambeni proizvod, doprinose njegovoj aromi, teksturi te ga nutritivno obogaćuju (Upadrasta i sur., 2001).

Bakterije mliječne kiseline opisno se definiraju kao Gram – pozitivni, katalaza – negativni i nesporogeni mikroorganizmi prirodno prisutni na različitim supstratima. Ove bakterije nemaju sposobnost sinteze hemoproteina te kao takve preživljavaju u anaerobnim ili mikroaerofilnim uvjetima. Naime, neke mikroaerofilne vrste, unatoč tome što nemaju hemoprotein, imaju sposobnost apsorpcije kisik radikala zbog većih količina intracelularnog magnezija, selena i cinka koji preuzimaju ulogu enzima peroksidaza i katalaza i omogućuju bakterijama toleranciju na kisik. Nadalje, BMK s obzirom na krajnji produkt fermentacije mogu biti homofermentativne proizvodeći samo mliječnu kiselinu, heterofermentativne proizvodeći mliječnu kiselinu, acetat, etanol i ugljični dioksid ili fakultativno heterofermentativne ovisno o prisutnom supstratu u podlozi. Ukoliko rastu na mediju na kojem se kao glavni izvor ugljika nalaze pentoze, one će aktivirati enzim fosfoketolazu zbog koje će metabolizam biti heterofermentativan, a ukoliko su u mediju prisutne heksoze metabolizam će biti homofermentativan. S obzirom na optimalnu temperaturu rasta, BMK se dijele na mezofilne i na termofilne sojeve čiji se temperaturni optimumi kreću od 25 °C do 30 °C, odnosno 40 °C do 44 °C (Samaržija, 2015). Kako bi se koristile kao starter kulture, prema FDA američkoj upravi za hranu i lijekove, BMK moraju posjedovati GRAS (Generally Regarded As Safe) status.

U svrhu filogenetskog proučavanja bakterija provode se istraživanja nad visokokonzervativnim molekulama prisutnim u svim mikroorganizmima, ribosomskim ribonukleinskim kiselinama (rRNK). Usporedbom sekvenci 16S rRNK molekula koje sadrže gene sa konzervativnim i varijabilnim regijama prisutnim kod svih mikroorganizama, utvrđeno je da sve Gram-pozitivne bakterije imaju filogenetsku povezanost i svrstavaju se u jedanaest filogenetskih skupina. Proučavanjem sekvenci 16S i 23S rRNK dokazano je da one tvore dvije linije potomstva od kojih BMK spadaju u onu čije bakterije imaju DNK sa manje od 50% G + C (gvanin + citozin)

parova, granu *Clostridium*. Druga grana, *Actinomyces* obuhvaća bakterije sa više od 50% G + C (gvanin + citozin) parova u DNK molekuli (Leboš Pavunc, 2012).

BMK podijeljene su u dvije velike skupine, prvu koja uključuje porodice *Enterococcaceae* i *Streptococcaceae* te drugu skupinu kojoj pripadaju porodice *Lactobacillaceae* i *Leuconostocaceae*. Glavni rodovi bakterija mliječne kiseline su : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*.

1.1.1. Rod *Lactobacillus*

Bakterije roda *Lactobacillus* pripadaju koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Gram - pozitivne su, nesporogene, katalaza negativne i pojavljuju se u obliku bacila i kokobacila. Iznimno su kiselo – tolerantne i prisutne na različitim staništima uključujući respiratorni i probavni sustav životinja i čovjeka. S obzirom da postoji ukupno opisano 150 različitih vrsta, bakterije iz ovog roda se razlikuju s obzirom na tip metabolizma, konfiguraciju proizvedene mliječne kiseline i optimalne uvjete rasta (Samaržija, 2015). Prvoj skupini bakterija iz roda *Lactobacillus* pripadaju obligatno homofermentativni sojevi koji previru heksoze do mliječne kiseline Embden-Meyerhof-Parnasovim putem (Kleerebezem i sur., 2003). Drugoj skupini pripadaju fakultativno heterofermentativni sojevi koji posjeduju aldolaze i fosfoketolaze koje im omogućuju rast na pentozama, dok se u odsutnosti istih ponašaju kao prva skupina laktobacila. Trećoj skupini pripadaju obligatni heterofermentativni sojevi koji fosfoketolaznim i pentoza-fosfatnim putem proizvode mliječnu kiselinu, acetat, etanol i ugljični dioksid (Samaržija, 2015).

1.1.2. Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* taksonomski pripada koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Leuconostocaceae*. Do sada je opisano petnaest različitih vrsta koje se karakteriziraju kao mezofilne i heterofermentativne Gram-pozitivne bakterije, nepokretne, fakultativno anaerobne i vankomicin-rezistente. Ovisno o mediju na kojem rastu, bakterije ovog roda dolaze u obliku štapića ili tvore nakupine te u obliku kuglica ili tvore lance. Za svoj rast zahtijevaju kompleksnu hranjivu podlogu koja osim magnezija i mangana i različitih aminokiselina mora sadržavati i vitamine B-skupine (Samaržija, 2015).

1.2. Antimikrobna aktivnost BMK

Antimikrobni potencijal BMK se manifestira putem natjecanja za nutrijente s drugim mikroorganizmima i proizvodnjom antimikrobnih metabolita poput bakteriocina, organskih kiselina i vodikovog peroksida (Collins i sur., 2010). Bakteriocini su ribosomski - sintetizirani peptidi koji pokazuju aktivnost protiv vlastitih producenata ili bakterija pronađenih u sličnim okolišnim uvjetima (Drider i sur., 2006) te se klasificiraju s obzirom na mikroorganizam koji ih proizvodi, molekulsku masu, aminokiselinsku sekvencu homologa i/ili organizaciju klastera gena (Mozzi i sur., 2010; Nes i sur., 2007). Među proizvođačima bakteriocina ističu se bakterije mliječne kiseline koje se s obzirom na tip aktivne supstance dijele na razred I (proizvođači bakteriocina koji sadrže lantionin – lantibiotika) i razred II (proizvođači nemodificiranih linearnih peptida) (Cotter i sur., 2005, 2006; Gillor i sur., 2008). Iako je danas veliki problem širenje antibiotičke rezistencije, bakteriocini su prihvatljiviji odabir za zaštitu hrane od kontaminacije jer su se prehrambeni aditivi pokazali toksičnima i neprihvaćenima od strane potrošača (Ghanbari i Jami, 2013). Organske kiseline se proizvode u stanicama bakterija mliječne kiseline metabolizmom ugljikohidrata (glukoze, glikogena, glukoze-6-fosfata i male količine riboze) putem glikolize ili heksoza – monofosfatnog puta (Ghanbari i Jami, 2013), a vrsta i količina proizvedene kiseline ovisiti će o soju BMK, kompoziciji kulture i uvjetima rasta (Lindgren i Dobrogosz, 1990). Antagonističko djelovanje mliječne kiseline, od koje L (+) mliječna kiselina pokazuje veći inhibicijski učinak (Ouweland i Vesterlund, 2004), manifestira se putem acidifikacije i aktivnosti nedisociranih oblika kiseline na biomembrane ciljanih mikroorganizama (Podolak i sur., 1996). Snižavanjem pH vrijednosti, mliječna kiselina djeluje inhibicijski ili inaktivacijski na putrificirajuće (rodovi *Clostridia* i *Pseudomonas*), patogene (*Salmonella* i *Listeria* spp.) i toksične bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*) (Gálvez i sur., 2007). Od ostalih antimikrobnih metabolita ističe se vodikov peroksid (H_2O_2) koji se u stanicama BMK proizvodi iz laktata u prisutnosti kisika pomoću enzima flavoprotein oksidaze i nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) peroksidaze (Ammor i Mayo, 2007). Antimikrobna aktivnost vodikovog peroksida može biti posljedica oksidacije sulfidrilnih grupa čime se denaturiraju brojni enzimi ili peroksidacije lipida biomembrana čime dolazi do njihove disrupcije (Holzapfel i sur., 1995). Među najosjetljivijim bakterijama na vodikov peroksid ističu se one roda *Pseudomonas* te *Staphylococcus aureus* (Ghanbari i Jami, 2013). Ugljični dioksid (CO_2) proizvode heterofermentativne bakterije mliječne kiseline čime u svojoj okolini stvaraju anaerobne uvjete. Navedeni uvjeti dovode do nemogućnosti provedbe enzimske dekarboksilacije, a ulaskom ugljičnog dioksida u citoplazmu dolazi do poremećaja u permeabilnosti membrana (Holzapfel i sur., 1995). Kao posljednja komponenta s antimikrobnim djelovanjem navodi se diacetil, metabolit arome proizveden citratnom fermentacijom uz laktat kao glavni produkt (Holzapfel i sur., 1995). Svi heterofermentativni rodovi BMK proizvode taj metabolit za kojeg se zna da osim što doprinosi

aromi mliječnih proizvoda učinkovito djeluje protiv Gram – negativnih bakterija, plijesni i kvasaca (Ghanbari i Jami, 2013).

1.3. BMK izolirane iz morskih proizvoda

BMK nisu učestalo prisutne u morskom okolišu, ali neki rodovi poput *Carnobacterium*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* pronađeni su u ribi i okolini (Stiles i Holzapfel, 1997; González i sur., 2000; Ringø i sur., 2000). Karnobakterije, uglavnom *Carnobacterium maltaromaticum* i *Carnobacterium divergens*, su dio normalne intestinalne mikrobne populacije mnogih vrsta riba poput atlantskog lososa (*Salmo salar*), divlje štuke (*Esox lucius*) i divlje smeđe pastrve (*Salmo trutta*) (Ringø i Gatesoupe, 1998; González i sur., 1999, 2000; Ringø i sur., 2000). Čanak i sur. (2018) su izolirali *L. plantarum* O1 iz želuca svježe orade (*Sparus aurata*) i okarakterizirali ga kao potencijalnu starter kulturu s ciljem primjene u biokonzerviranju proizvoda akvakulture. Osim iz svježih, BMK su također izolirane i iz procesiranih proizvoda akvakulture. Bakteriocinogeni sojevi vrste *Carnobacterium* i *Lactobacillus* spp. izolirani su iz ribe i hladno dimljenih ribljih proizvoda (Baya i sur., 1991; Leroi i sur., 1998; Duffes i sur., 1999; González-Rodríguez i sur., 2002; Alves i sur., 2005; Laursen i sur., 2005;; Pelle i sur., 2005). Iz slanah škampa, Dalgaard i sur. (2003) su izolirali *C. divergent* i *L. curvatus* tijekom procesa kvarenja pri temperaturi hlađenja. Enterokoki s antilisterijskom aktivnošću izolirani su s kože komercijalno uzgojenog romba (*Psetta maxima*) (Campos i sur., 2006) i hladno dimljenog lososa (Tomé i sur., 2006). U mariniranoj ili sušenoj ribi raznolikost BMK je sasvim drugačija u odnosu na svježu ribu budući da više dominiraju laktobacili i pediokoki (Gancel i sur., 1997). Stanište i mikrookolišni uvjeti kao što su salinitet i stres utječu na vrste prisutne u mikrobioti riba čemu u prilog ide i istraživanje s kojim je dokazano da je broj bakterija iz roda *Lactobacillus* manji kod lososa uzgojenom u slanoj vodi u odnosu na onog uzgojenog u kopnenim vodama (Ringo i Storm, 1994). Karakteristika sojeva BMK izoliranih iz probavnog sustava riba i školjkaša je da proizvode antimikrobne agense što ih čini iznimno kompetentnima prema drugim pripadnicima mikrobiote. Zahvaljujući tom svojstvu, BMK izolirane iz proizvoda akvakulture pronalaze potencijalnu primjenu kod tehnika biokonzerviranja hrane te kao probiotički pripravci.

1.4. Patogene bakterije u morskim proizvodima

Patogene bakterije obično se nalaze u prilično niskim koncentracijama u morskim proizvodima te se od izlova do potrošnje, plodovi mora lako kontaminiraju tim bakterijama (Feldhusen, 2000; Yin i sur., 2007). Ghanbari i sur. (2013) napravili su pregled patogenih bakterija u ribi i morskim plodovima te su pronašli *Aeromonas* spp., *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* i *V. cholerae*. Huss (2004) je patogene bakterije koje se prenose proizvodima akvakulture podijelio u dvije skupine koje uključuju autohtone i alohtone bakterije.

1.4.1. Autohtone patogene bakterije u morskim proizvodima

Bakterije koje pripadaju ovoj skupini su uobičajene i široko rasprostranjene u morskom okolišu različitih dijelova svijeta. Temperatura mora prirodno ima selektivni učinak te je veći broj psihrotrofnih organizama (*Clostridium botulinum* i *Listeria*) uobičajeniji u Arktiku i hladnijoj klimi, dok su mezofilniji tipovi (*Vibrio cholerae* i *V. parahaemolyticus*) prirodna flora riba iz obalnih i estuarijskih sredina umjerenih i tropskih zona (Huss, 2004).

Vibrio sp.

Ovaj rod sadrži niz vrsta koje su patogene za čovjeka. Neki vibriji su morskog podrijetla i zahtijevaju Na⁺ za rast. Patogene vrste su uglavnom mezofilne, tj. uglavnom se javljaju u tropskoj vodi, a najviše u umjereno toploj vodi tijekom kasnog ljeta ili rane jeseni (Huss, 2004). Su i Liu (2007) su zaključili da je *V. parahaemolyticus* ljudski patogen koji je široko rasprostranjen u morskom okolišu. Taj je organizam često izoliran iz raznih sirovih morskih plodova, osobito školjkaša. Čest je uzročnik bolesti koje se prenose hranom u mnogim azijskim zemljama, uključujući Kinu, Japan i Tajvan. Prepoznat je kao vodeći uzrok ljudskog gastroenteritisa povezanog s potrošnjom morskih plodova u SAD-u.

Aeromonas sp.

Aeromonas je sveprisutan u slatkovodnom okruženju, ali može biti izoliran iz slanih i estuarijskih voda (Matyar i sur., 2007; Pianetti i sur., 2005). *Aeromonas* je opisan kao uzročnik kvarenja hrane koji ima sve veću važnost. Ovaj se organizam može lako izolirati iz mesa, ribe i morskih plodova, sladoleda i mnogih drugih namirnica. *Aeromonas* vrste proizvode široki raspon toksina kao što su citotoksični enterotoksin, hemolizini i inhibitor natrijevih kanala sličan tetradotoksinu. *Aeromonas* je vrlo osjetljiv na kiselinu i sol, iako mu rast u namirnicama gdje je pH manji od 6.5, a sadržaj NaCl veći od 3.0% ne predstavlja problem (Huss, 2004). Illanchezian i sur. (2010) proučavali su virulenciju i citotoksičnost *A. hydrophila*. Od 73 soja *A. hydrophila* izoliranih iz uzoraka ribe i škampa, 86.3% je pokazalo hemolizu, 78.1% proizvelo je sluz, 98.63% je proizvelo proteazu i pokazalo citotoksičnost na Vero stanice. Uočena je

pozitivna korelacija između proteolitičke aktivnosti i citotoksičnosti bez obzira na hemolitičku aktivnost sojeva.

1.4.2. Alohtone patogene bakterije u morskim proizvodima

Morska hrana ima potencijal predstavljati širok spektar javnozdravstvenih problema zbog uobičajenih, ali štetnih bakterija, putem kontaminacije tijekom proizvodnje i distribucije od točke izlova do konačne pripreme (Kvenberg, 1991). Neautohtone bakterije su životinjskog ili ljudskog porijekla. Bakterije koji pripadaju ovoj skupini uključuju *Salmonella* sp., *E. coli*, *Shigella* sp., i *Staphylococcus aureus*.

Salmonella sp.

Salmonella je gram-negativni bacil koji nastanjuje ljudski i životinjski gastrointestinalni trakt. Povezana je s gastrointestinalnim problemima i pobačajem zbog sposobnosti stanične invazije i intrafagocitnog opstanka (Figueroa Ochoa i Verdugo Rodríguez, 2005). Prisutnost s *Salmonella* vrsta u morskim plodovima može biti posljedica onečišćenja u prirodnom vodenom okolišu, akvakulturi ili tijekom prerade (Amagliani i sur., 2012). Terenski laboratoriji američke Agencije za hranu i lijekove (FDA) prikupili su i testirali 11 312 uvoznih i 768 domaćih uzoraka morske hrane tijekom 9-godišnjeg razdoblja (1990.-1998.) na prisutnost bakterije *Salmonella*. Ukupna učestalost iznosila je 7.2% za uvezene i 1.3% za domaće plodove mora.

Escherichia coli

E. coli je dominantna nepatogena fakultativna flora ljudskog crijeva. Neki sojevi *E. coli* razvili su sposobnost uzrokovanja bolesti gastrointestinalnog, mokraćnog ili središnjeg živčanog sustava čak i kod najjačih ljudskih domaćina. Kontaminacije *E. coli* u plodovima mora su opsežno proučavane. Teophilo i sur. (2002) izvijestili su da su iz vrsta *Lutjanus purpureus* i *Xiphopenaeus kroyeri* izolirali 32 soja *E. coli*. Ukupno 14 sojeva proizvelo je egzotoksine, i to 7 termolabilnih i 7 termostabilnih. Thampuran i sur. (2005) izvijestili su da su uzorci morske hrane sadržavali broj *E. coli* u rasponu od 2 do 5.5 log CFU / g. Većina izolata *E. coli* pokazala je višestruku otpornost na antibiotike. Kumar i sur. (2005) proučavali su rasprostranjenost *E. coli* u tropskim morskim plodovima. Otkrili su da je 155 uzoraka bilo pozitivno na fekalne koliformne bakterije i da je *E. coli* izolirana iz 47% pozitivnih uzoraka.

Staphylococcus aureus

S. aureus je najčešći uzročnik infekcija kod hospitaliziranih bolesnika. Ayulo i sur. (1994) proučavali su enterotoksigene *S. aureus* u ribi i plodovima mora iz južne regije Brazila. Ova bakterija je izolirana iz 20% ispitanih uzoraka, uključujući 60% uzoraka mesa školjkaša. Samo 9 od 109 *S. aureus* sojeva je proizvelo enterotoksine, uključujući enterotoksin A (4), D (1) i AB (4). Znanstvenici su zaključili da se mora više paziti na smanjenje kontaminacije riba i morskih

plodova tijekom izlova i rukovanja. U sličnoj studiji, Simon i Sanjeev (2007) izvijestili su da je 168 ribljih proizvoda i 87 uzoraka radnika tvornica za preradu ribe bilo pozitivno na enterotoksikogene sojeve *S. aureus*. Među proizvodima, učestalost je bila viša u smrznutim kozicama i smrznutim ribljim kotletima (33%) u odnosu na smrznute oljuštene i devenirane kozice i smrznute lignje (25% odnosno 20%).

1.5. Probiotici i njihova primjena u akvakulturi

Probiotici su prema definiciji pripravci koji se sastoje od jedne ili više vrsta bakterija koje djeluju pozitivno na zdravlje domaćina, životinje ili čovjeka, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore (Šušković, 1996).

Probiotički sojevi BMK djeluju na način da inhibiraju rast nepoželjnih mikroorganizama u probavilu domaćina proizvodeći antimikrobne supstance (bakteriocine, diacetil, vodikov peroksid, laktoperoksidaze te mliječnu i octenu kiselinu) te se osim toga, s drugim pripadnicima prirodne mikrobiote, natječu za hranjive tvari i mjesto vezanja za crijevni epitel. Nadalje, probiotički sojevi modificiraju metaboličke procese u probavnom sustavu tako da potiču aktivnost poželjnih i inhibiraju nepoželjne enzime uključene u kancerogene procese te moduliraju imunološki sustav domaćina povećavajući razinu antitijela i aktivnosti makrofaga (Frece i sur., 2014; Šušković i sur., 2010).

Uzgoj morskih životinja i algi u prehrambene svrhe (akvakultura) predstavlja jednu od vodećih i brzo rastućih industrija današnjice koja se susreće s velikim ekonomskim gubicima uzrokovanih bakterijskim infekcijama. Kao primjer patogenih sojeva bakterija, Schmidt i sur. (2000) istaknuli su *Yersinia ruckeri*, *Flavobacterium psychrophilum* i *Aeromonas salmonicida*, definirane kao endemske vrste u Danskoj koje kao jednog od domaćina odabiru kalifornijsku pastrvu (*Onchorhynchus mykiss*). Primjer bolesti koju navedeni sojevi uzrokuju jest infekcija furunkuloza, zbog koje se povećava stopa smrtnosti slatkovodnih i morskih riba. Osim toga, bakterije iz roda *Yersinia*, poput spomenute *Yersinia ruckeri*, mogu dovesti do ozbiljnog oboljenja kod čovjeka, jersinioze, ukoliko se konzumira nedovoljno termički obrađena zaražena pastrva.

Konvencionalna metoda liječenja bakterijskih infekcija kod riba podrazumijeva primjenu antibiotika te se smatra nesigurnom i ekološki neprihvatljivom. Naime, ne samo da primjena antibiotika pospješuje širenje rezistencije (Miranda i Zemelman, 2002) već supstanca može zaostajati u tragovima u ribljem mesu te na taj način narušiti ravnotežu crijevne mikroflore ribe i uzrokovati pad njenog imunološkog sustava (Sahu i sur., 2008). Stoga, kako bi se smanjila upotreba antibiotika u akvakulturi, danas se istražuje potencijal probiotičkih sojeva koji bi služili kao prevencija razvoja bolesti uzrokovanih bakterijskim patogenima. Probiotici kao takvi promoviraju rast riba jer potiču bolje iskorištenje nutritivnih tvari iz hrane, potiču proizvodnju

probavnih enzima i rast stanica crijevnog epitela (Luo i sur., 2014; Reda i Selim, 2015). Probiotici se u akvakulturi mogu primjenjivati indirektno i direktno: antagonističkim djelovanjem prema patogenima, proizvodnjom antimikrobnih tvari ili modulacijom imunostava (Nayak, 2010; Selim i Reda, 2015).

Kako većina probiotičkih sojeva koji nisu izolirani iz riba ne pokazuje učinkovitost u liječenju bolesti kod proizvoda akvakulture (Balcázar i sur., 2006), danas je predmet brojnih istraživanja probiotički potencijal autohtonih mikroorganizama izoliranih iz gastrointestinalnog (GI) trakta morskih životinja. Probiotici koji se primjenjuju u zaštiti proizvoda akvakulture od infekcija bi trebali zadovoljavati nekoliko osnovnih kriterija: trebali bi pokazivati antagonizam protiv ribljih patogena, biti sigurni za domaćina nakon što su u njega uneseni injekcijom ili putem hrane, nužno je da mogu kolonizirati GI trakt domaćina, preživljavati u žuči domaćina, podnositi niske vrijednosti pH, biti osjetljivi na antibiotike i imati mogućnost proizvodnje probavnih enzima (Merrifield i sur., 2010b; Ray i sur., 2012; Čanak i sur., 2018). Kako bi kroz nekoliko tjedana poticali rast proizvoda akvakulture, povoljno djelovali na njihov imunološki sustav i omogućili rezistenciju na bolesti, potrebno je probiotike putem hrane primjenjivati u koncentraciji od 10^6 do 10^8 CFU/mL (Reda i Selim, 2015).

Najčešće izolirani sojevi bakterija mliječne kiseline iz probavnog sustava riba, korišteni kao probiotici, su *Lactobacillus* sp. i *Bacillus* sp. Predmet istraživanja jednog od brojnih radova na tematiku primjene probiotika u akvakulturi je bio islandski šaran (*Labeo rohita*) koji je u periodu od šezdeset dana tretiran osnovnom ishranom te s četiri eksperimentalne ishrane bazirane na probiotičkim sojevima. Ishrana bazirana na osnovnim namirnicama uz dodatak probiotičkih sojeva *Bacillus subtilis* VSG1, *Pseudomonas aeruginosa* VSG2 i *Lactobacillus plantarum* VSG3 pokazala se kao najučinkovitija jer je pozitivno djelovala na rast islandskog šarana, zaštitila ga od štetnog djelovanja bakterije *Aeromonas hydrophila* i modulirala imunološki sustav povećavajući aktivnost lizozima, fagocita te razinu imunoglobulina M (IgM) (Giri i sur., 2013).

Nadalje, u istraživanju iz 2016. godine iz atlanskog lososa (*Salmon salar*) izolirano je 20 sojeva BMK od kojih su tri pokazala aktivnost protiv barem dva od šest ispitanih sojeva patogenih bakterija. Bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus farraginis*, *Pediococcus acidilactici*, i *P. pentosaceus* korištene su u daljnjem istraživanju kako bi se ispitalo njihov probiotički potencijal za primjenu u akvakulturi. Sve tri navedene vrste BMK pokazale su dobro preživljavanje u uvjetima simuliranog probavnog sustava domaćina, zadovoljavajući adhezijski kapacitet i mogućnost rasta u gastrointestinalnoj sluzi lososa (Amin i sur., 2016).

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Opći cilj ovog rada je okarakterizirati autohtone morske izolate bakterija mliječne kiseline (BMK) radi njihove primjene kao potencijalnih ribljih probiotika.

Specifični ciljevi rada su:

- 1.) Odrediti antimikrobnu aktivnost izolata BMK prema najčešćim ribljim patogenima
- 2.) Ispitati preživljavanje izolata BMK u morskoj vodi *in situ*
- 3.) Ispitati preživljavanje izolata BMK u žučnim solima i želučanom soku *in situ*
- 4.) Izolatima BMK provjeriti sposobnost razgradnje crvenih krvnih stanica
- 5.) Ispitati uspješnost adhezije izolata BMK na površinsku sluz ribe *in situ*

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Svježi lubini (*Dicentrarchus labrax*) korišteni za dobivanje uzoraka žučnog mjehura, želuca i sluzi izlovljeni su u uzgajalištu tvrtke Cromaris, smještenom u blizini uvale Lamjana na otoku Ugljanu. Riba se uzgaja na nekoliko mikrolokacija u plutajućim kavezima, na otvorenom moru. Uzorci su prikupljeni odmah po izlovu te pohranjeni na -20°C do korištenja. Uzorak morske vode prikupljen je na otoku Silbi u zadarskom arhipelagu.

3.1.2. Mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) korišteni u ovom radu izolirani su i identificirani u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu istraživanja autohtone mikrobne populacije riba i školjaka Jadranskog mora (Tablica 1). Standardni sojevi patogenih mikroorganizama dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

Tablica 1. Autohtoni sojevi BMK izolirani iz proizvoda akvakulture

Oznaka	BMK	Uzorak
O1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Orada (sadržaj želuca)
O9	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Orada (sadržaj želuca)
L4A	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Orada (sluz iz škrga)
K4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kamenice (sadržaj želuca)
D1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Dagnje (međuljušturna tekućina)

3.1.3. Hranjive podloge

1.) Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80; $MgSO_4 \times 7H_2O$ 0.2; $MnSO_4 \times 7H_2O$ 0.05; Na-acetat 5; agar 13; pH vrijednost podloge je 6.5; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min.
- MRS (Man, Rogosa i Sharpe) bujon je istog sastava kao MRS-agar, samo bez dodanog agara.

2.) Podloga za održavanje i uzgoj patogenih mikroorganizama:

- HA (hranjivi agar), sastava (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K_3PO_4 0.3; agar 18; pH vrijednost podloge je 7.3; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara.

3.) Podloga za *Vibrio* sp :

TCBS Kobayashi agar (Biolife, Milano, Italija) -agar sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; kvašćev ekstrakt 6; natrij tiosulfat 10; natrij citrat 10; natrij - klorid 10; goveđa žuč 8; saharoza 20; željezo - citrat 1; timol - plavo 0.04; bromtimol - plavo 0,04; agar 16.

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)
- magnetska miješalica, Lab Stir (Gilson, Middleton, WI, SAD)

- DNA-termoblok, Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- Horizontalna elektroforeza, MSMIDI (Cleaver Scientific Ltd, Rugby, UK)
- Transiluminator, MacroVue UVis-20 (Hofer, Inc., Holliston, 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
- kivete za spektrofotometrijsko mjerenje
- 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)
- limunska kiselina (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kristal-violet 1% otopina (Biognost, Zagreb, Hrvatska)
- standardna puferka otopina pH 4 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- standardna puferka otopina pH 7 (Mettler-toledo, Greifensee, Švicarska)
- glicerol (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 DNA boja (Nippon Genetics, Dueren, Njemačka)
- Agarozna (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- TAE-pufer (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- BenchTop 100 pb DNK standardi (Promega, Madison, WI, USA)

3.2. Metode

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Sojevi BMK izolirani iz riba i školjaka čuvaju se na +4 °C u MRS bujonu (Biolife, Milano, Italija). Patogeni mikroorganizmi se čuvaju na +4 °C u hranjivom bujonu. Svi sojevi su trajno pohranjeni na -70 °C uz dodatak 30% (v/v) glicerola.

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama

Sojevi BMK uzgojeni su preko noći u MRS bujonu pri 37 °C. Test mikroorganizmi *Escherichia coli* 3014, *Proteus mirabilis* 3008, *Listeria monocytogenes* ATCC 23074, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphylococcus aureus* 3048 i *Vibrio* sp. (izoliran iz ribe) su uzgojeni preko noći u hranjivom bujonu (Biolife) pri 37 °C.

3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti izoliranih sojeva BMK

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

3.2.4. Turbidimetrijska metoda

U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240 µL supernatanta određenog bakterijskog izolata i 10 µl test mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivom bujonu. Supernatant BMK je prethodno podešen na pH 6.5 sa sterilnim 1M NaOH kako bi se isključio inhibični učinak mliječne kiseline. Kako bi se odredilo antibakterijsko djelovanje supernatanta 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. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepjen hranjivi bujon s test mikroorganizmom bez dodanog supernatanta bakterijskog izolata) i uzoraka s dodanim supernatantom bakterijskog izolata je mjera inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepe probe su bili uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama (Babić i sur., 2011). Stupanj inhibicije određen je prema izrazu:

Stupanj inhibicije [%] = $\frac{(1-A_1)}{A_0} \cdot 100$ (Leboš i sur., 2008).

3.2.5. Izolacija DNA

Slijedeći upute proizvođača, cjelokupna genomska DNK izolirana je iz *L. plantarum* O1 pomoću kita „NucleoSpin® Microbal DNA“ (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka). 100 µL prekonoćne kulture stanica *L. plantarum* O1 otpipetirano je u kivetu i centrifugirano pri 10 000 rpm/10 min. Supernatant je odvojen, a talog stanica otopljen u 100 µL BE pufera. Cjelokupna suspenzija stanica (sadrži otprilike 40 mg vlažne biomase u obliku peleta) otpipetirana je u tubicu s kuglicama „NucleoSpin® B“, dodano je 40 µL pufera MG i 10 µL proteinaze K. Za učinkovitiju lizu bakterija, upotrebljena je vibracijska mješalica u periodu od 10 min.. Lizat stanica je potom centrifugiran 30 s pri 10 000 rpm. U tubicu je dodano 600 µL MG pufera te je sadržaj ponovno centrifugiran pri istim uvjetima. Za vezanje izolirane DNK, korištena je kolonica „NucleoSpin® Microbal DNA“ u koju je prebačen supernatant nakon centrifugiranja, a koja je smještena u sabirnu kivetu (2 mL). Nakon ponovnog centrifugiranja slijedila su dva koraka ispiranja membrane: prvi s 500 µL BW pufera nakon čega je sadržaj centrifugiran te potom s 500 µL B5 pufera uz ponovno centrifugiranje. Za uklanjanje zaostalog eluirajućeg pufera, kolona je ponovno centrifugirana pri istim uvjetima (10 000 rpm/30 s). Za eluciju DNK, 100 µL eluirajućeg BE pufera nakapano je na kolonu „NucleoSpin® Microbal DNA“, prethodno stavljenu u sterilnu tubicu volumena 1.5 mL te je nakon 1 min inkubacije uzorak centrifugiran pri gore navedenim uvjetima.

3.2.6. Analiza *pln* lokusa lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Za potrebe određivanja prisutnosti bakteriocina sintetizirano je osam različitih oligonukleotida koji su prikazani u Tablici 2. Korišteni su kao početnice u lančanoj reakciji polimeraze (PCR). Proizvođač navedenih oligonukleotida je „Metabion“ (Planegg, Njemačka). Za sintezu željenog fragmenta DNA potrebne su 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. U ovom radu, kao DNK-kalup korištena je cjelokupna DNK bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.5 (Materijali i metode). Reakcijska smjesa volumena 25 µl bila je slijedećeg sastava: 12,5 µL HotStarTaq Plus master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), 1 µl P1 (for), 1 µl P2 (rev), 2,5 µL Midori Green Advance DNA boje (Nippon Genetics, Dueren, Njemačka), 1 µl DNA i 7 µL sterilne H₂O. Amplifikacija DNK PCR metodom provedena je u DNA-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, sparivanje početnica na specifičnoj temperaturi tijekom 1 min te polimerizacija 1 min na 72 °C. Dobiveni uzorci fragmenta analizirani su gel-elektroforezom pri 100 V u 1% agaroznom gelu.

Tablica 2. Početnice korištene za lančanu reakciju polimeraze (PCR)

Naziv početnice	Sekvenca
PlnA-for	5'-ATGAAAATTCAAATTAAGGTATGAAGC-3'
PlnA-rev	5'-TTACCATCCCCATTTTTTAAACAGTTTC-3'
PlnEF-for	5'-GGCATAGTTAAAATTCCCCC-3'
PlnEF-rev	5'-CAGGTTGCCGCAAAAAA G-3'
PlnNC8-for	5'-GGTCTGCGTATAAGCATCGC-3'
PlnNC8-rev	5'-AAATTGAACATATGGGTGCTTTAAATTCC-3'
PlnW-for	5'-TCACACGAAATATTCCA-3'
PlnW-rev	5'-GGCAAGCGTAAGAAATAATGAG-3'

3.2.7. Elektroforeza u gelu agaroze (horizontalna)

Otopljeni agarozni gel ohlađen je na oko 60 °C i izliven u nosač gela na koji je postavljen češalj za formiranje jažica. Kad se gel skrutne, češalj se izvadi, a nosač gela se postavi u kadicu za elektroforezu u koju se ulije TAE-pufer (tris-acetat-EDTA), tako da sloj pufera iznad gela bude debeo oko 1 mm. Uzorci DNK nanoseni su mikropipetom u jažice na gelu. Elektroforeza u kadicama se najčešće provodi pri naponu do 70 V u vremenu od 1-3 h (ovisno o koncentraciji agaroze i veličini fragmenta DNK koji se analiziraju). Nakon provedene elektroforeze gel je osvijetljen ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru i fotografiran.

3.2.8. Priprema suspenzija bakterijskih stanica

Kulture BMK (*L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4) uzgojene su preko noći u MRS bujonu i centrifugirane 15 min pri 10 000 rpm. Dobiveni talog je ispran s 1 mL puferirane otopine fosfatnih soli (phosphate buffer saline-PBS; 10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, pH 7.2), ponovno centrifugiran i resuspendiran u 200 µL iste otopine.

3.2.9. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u morskoj vodi

Izolati BMK uzgojeni su u MRS bujonu tijekom 16 h te su centrifugirani 5 min na 6 000 rpm pri 4 °C. Talog stanica ispran je dva puta (1 mL) u sterilnom PBS puferu (pH 7.2) i resuspendiran u manjem volumenu istog pufera (200 µL). BMK izolati su inokulirani (10⁷ 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.

3.2.10. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u žučnim solima ribe

Za dobivanje žuči, zdrava riba žrtvovana je 72 h nakon posljednjeg hranjenja. Lateralnim rezom se otkriva peritonealna šupljina i žučni mjehur se vizualno identificira. Žuč se aseptički prikuplja punkcijom mjehura. Bakterijska suspenzija je pripravljena kako je opisano u poglavlju 3.2.8. 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.

3.2.11. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK 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, uzorci su serijski razrijeđeni (1:9) u sterilnom PBS puferu, pH 7.2, a broj poraslih kolonija je određen indirektnom metodom.

3.2.12. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Iz uzoraka koji su sadržavali bakterijske stanice pripravljena su decimalna razrjeđenja s PBS puferom (pH 7.2) i nacijepljena na MRS agar. Nakon inkubacije od 48 h na 37°C izbrojane su porasle kolonije, a ukupan broj izražen je kao CFU/mL.

3.2.13. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva BMK

BMK izolati se nacijepe na Columbia ploče s krvnim agarom (Biolife) i inkubiraju na 30 °C tijekom 48 h. Prozirne zone oko poraslih kolonija znak su da je došlo do hemolize krvi.

3.2.14. Adhezija izoliranih sojeva BMK na riblju sluz

Uzorci sluzi su dobiveni iz četiri jedinke ribe od 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 PBS 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 BMK izolata da adheriraju na površinsku sluz procijenjena je pomoću mikrotitarske pločice s 96 jažica. Pločica je presvučena sa 150 μ L uzorka sluzi i ostavljena preko noći na 4 °C. Nakon toga jažice su isprane s PBS-om radi uklanjanja nevezane sluzi. Svakoj jažici dodano je 100 μ L svježeg BMK izolata ($\sim 1.0 \times 10^8$ 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 μ l 20 mM acetatnog pufera, pH 4.3. Ukupno bakterijsko vezanje određeno je pomoću optičke gustoće (OD) na valnoj duljini od 600 nm, a postotak bakterijskih stanica vezanih na sluz izračunat je dolje navedenom formulom (Geraylou et al., 2014).

$$AC(\%) = \frac{(A_1 - A_{Ctrl})}{A_0} \times 100$$

gdje je:

AC: kapacitet adhezije (%)

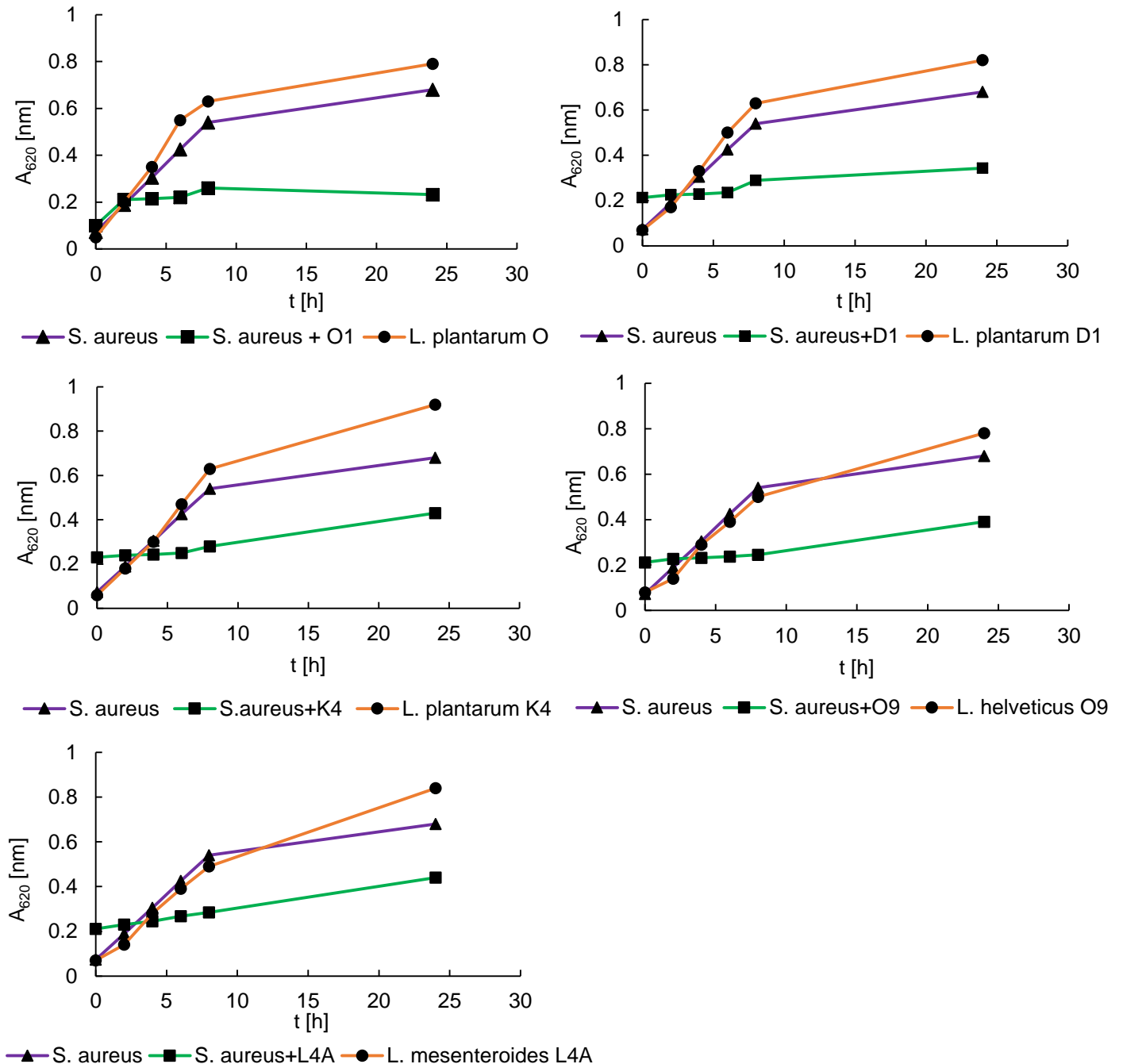
A_{Ctrl} : absorbancija kontrolnog uzorka (obojana sluz)

A_0 : vrijednost absorbancije korištenog BMK soja (108 CFU/mL)

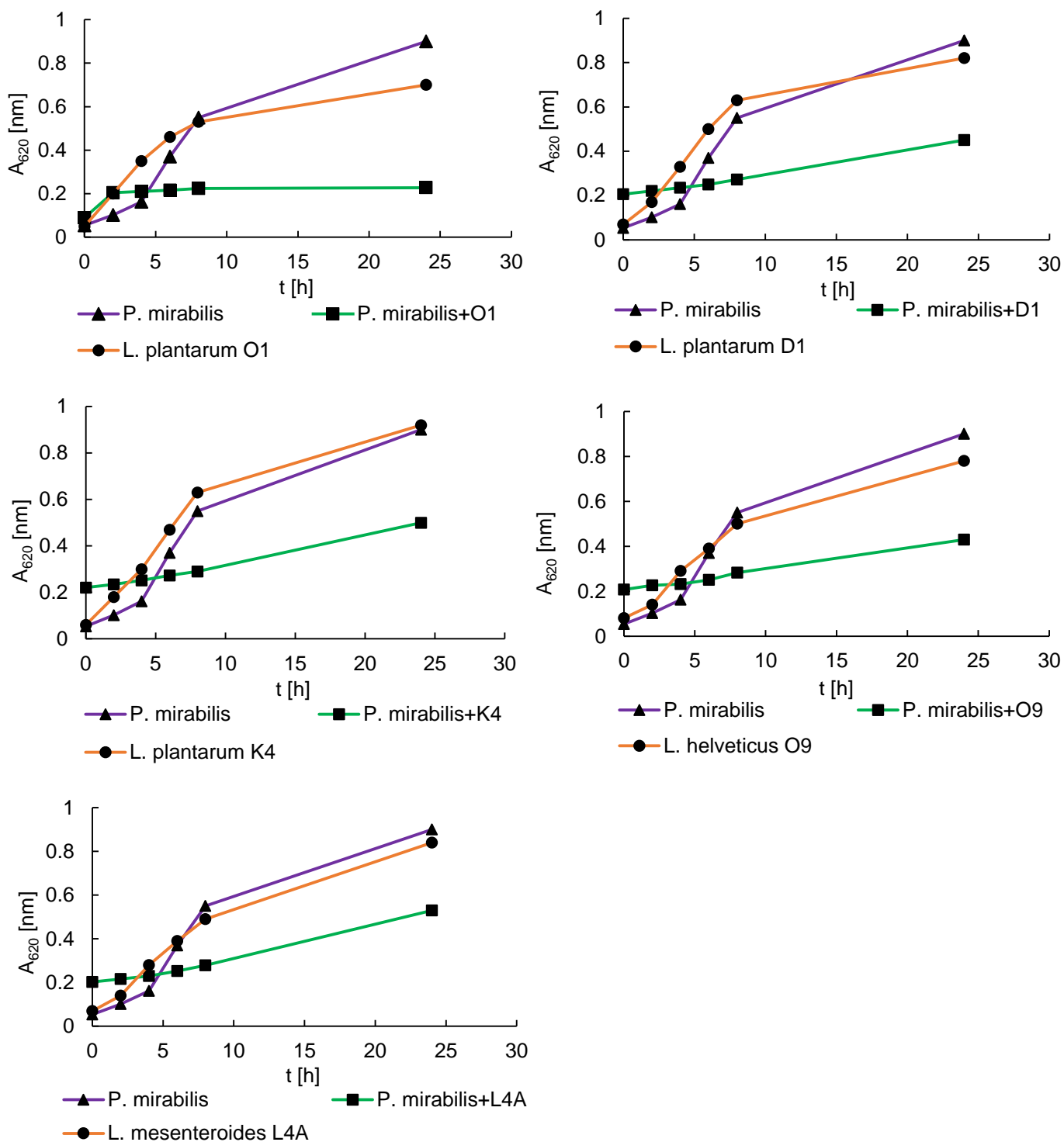
A_1 : vrijednost absorbancije BMK soja vezanog na sluz

4. REZULTATI

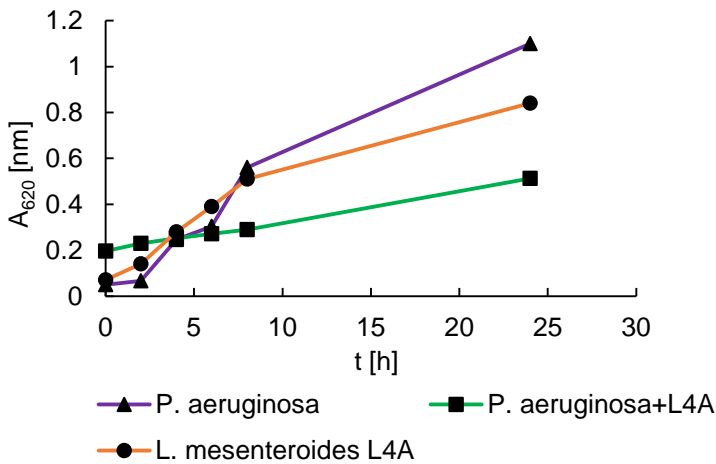
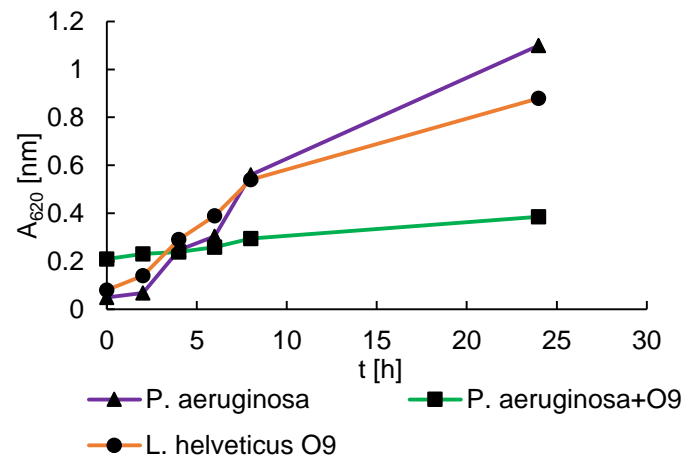
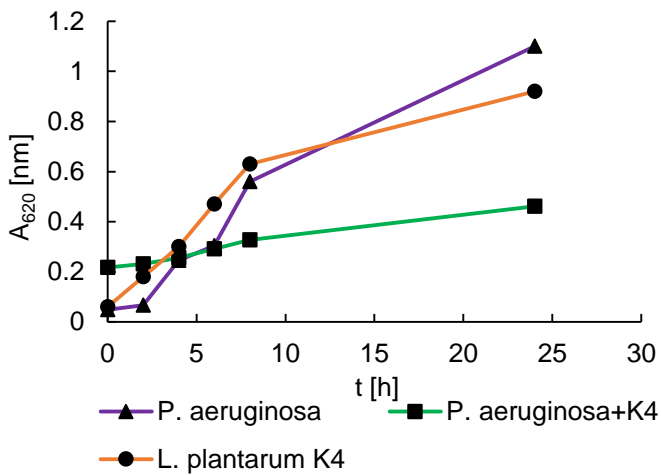
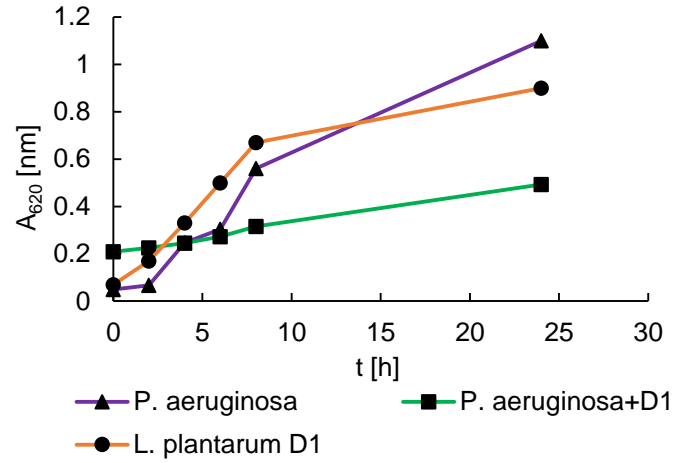
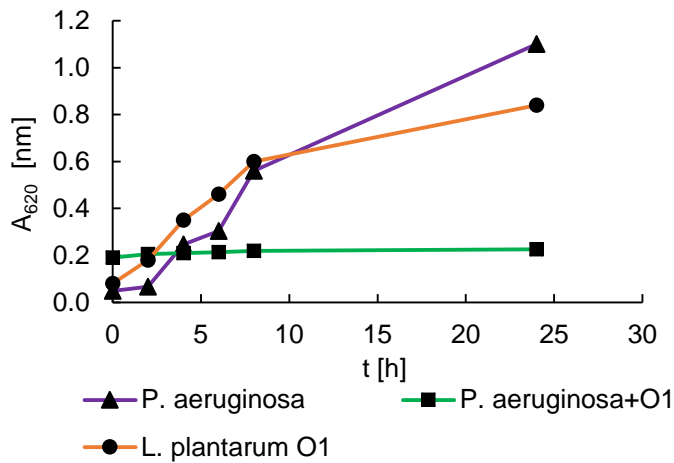
4.1. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva BMK



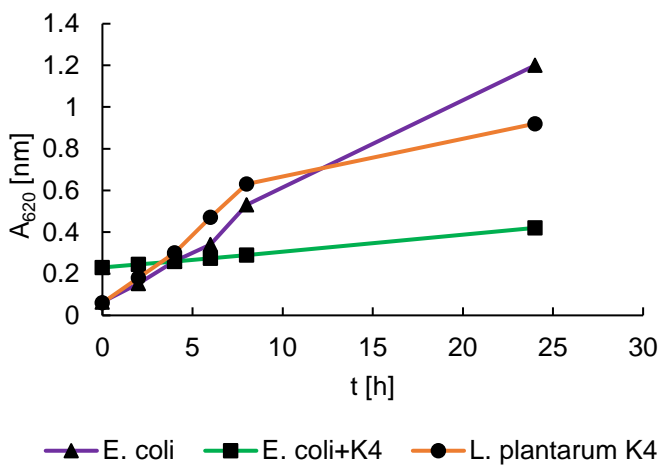
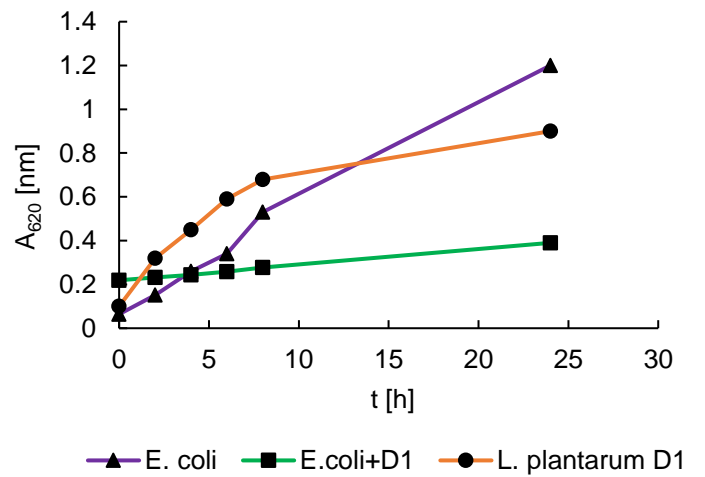
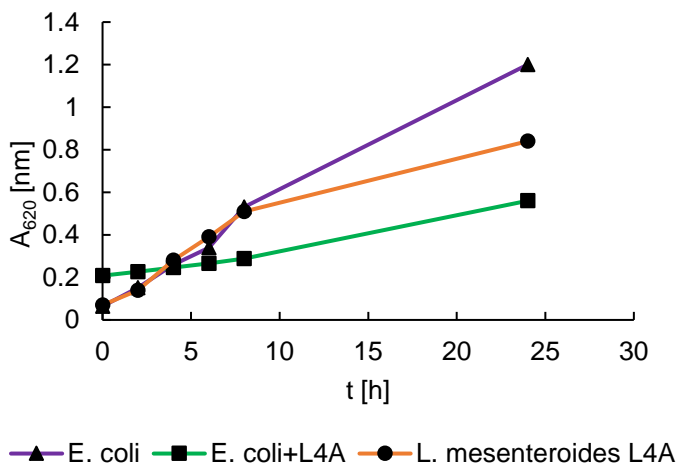
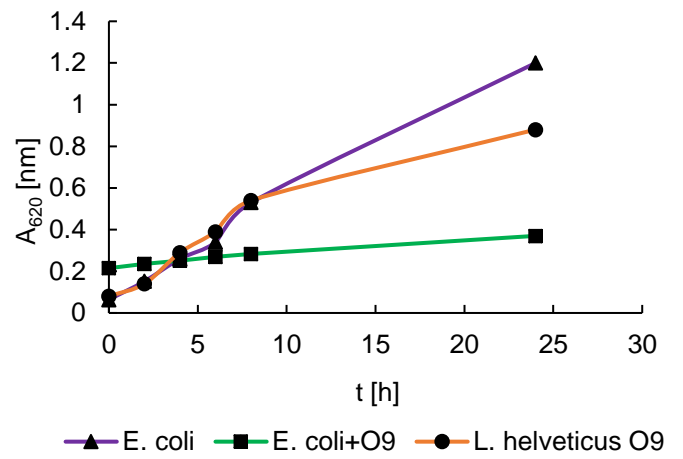
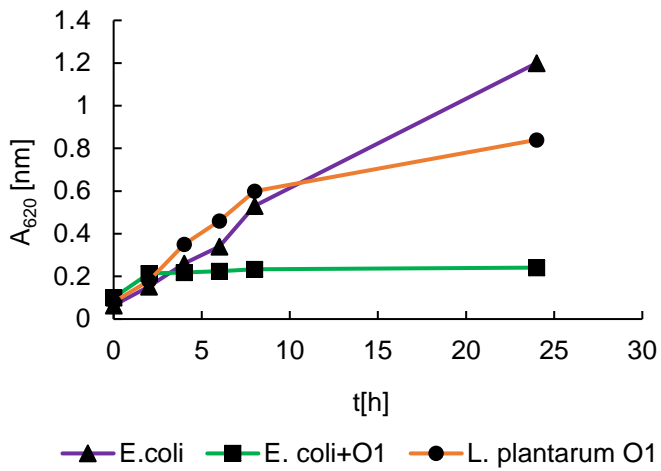
Slika 1. Krivulja rasta bakterije *S. aureus* (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A



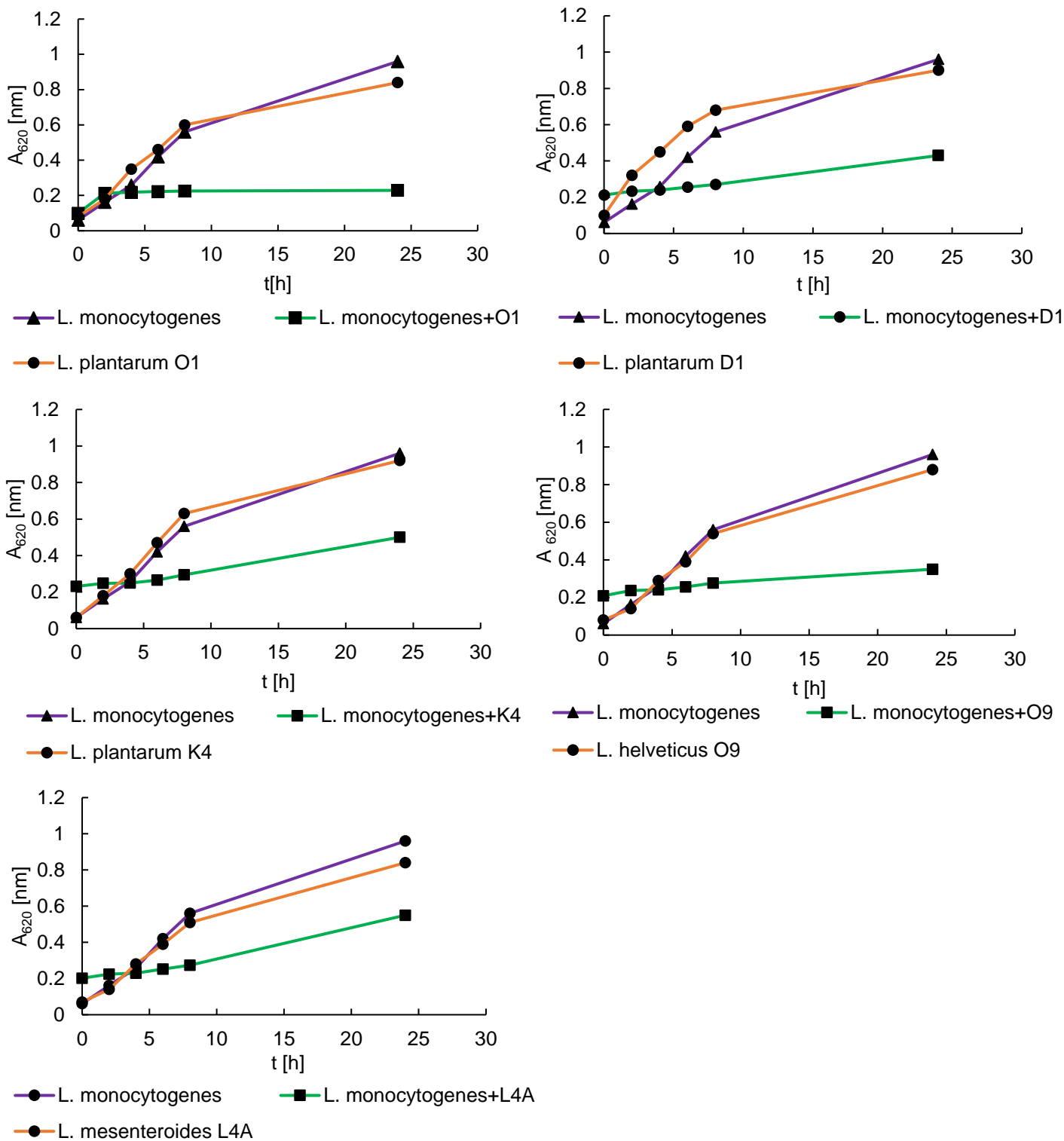
Slika 2. Krivulja rasta bakterije *P. mirabilis* (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A



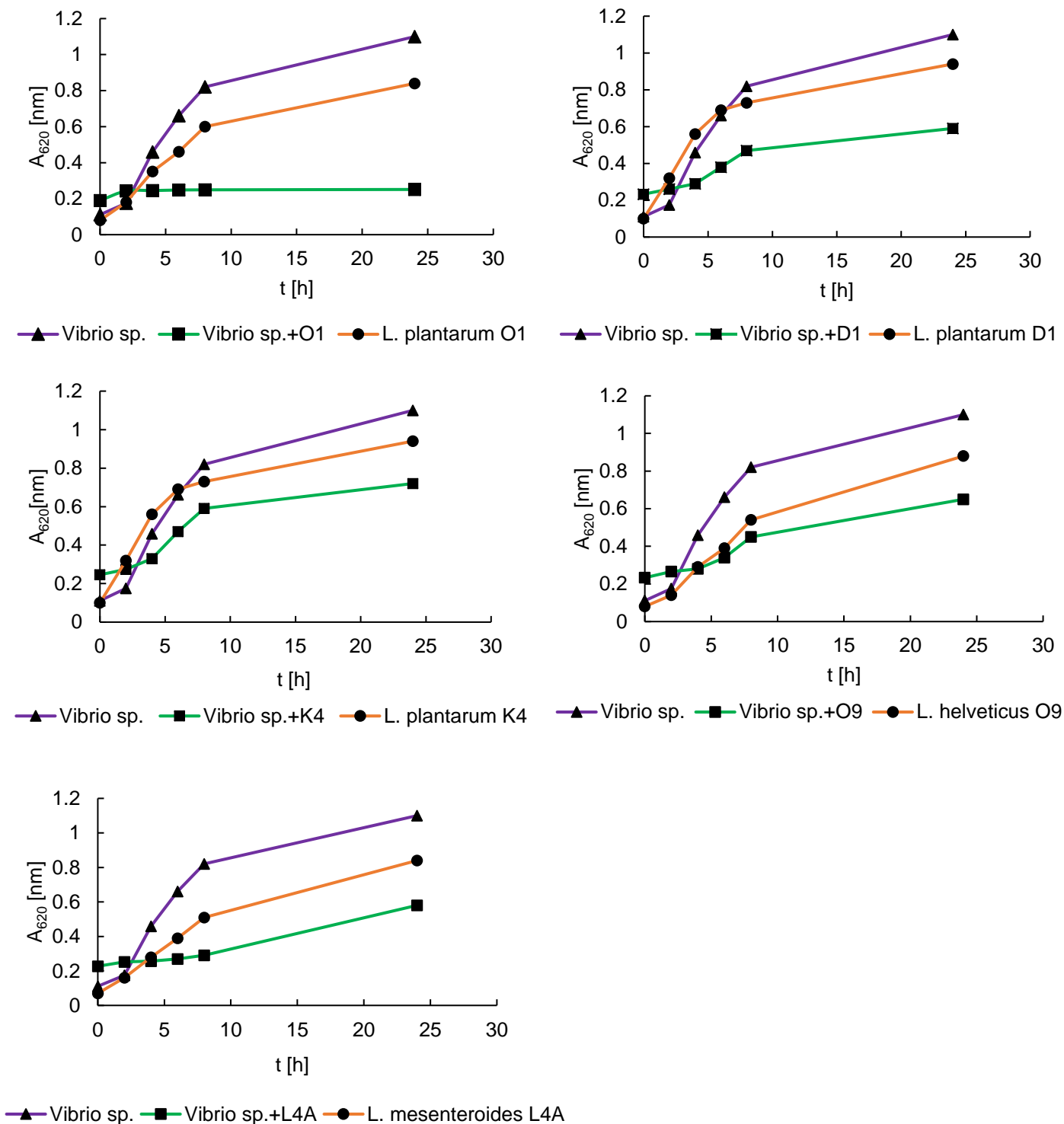
Slika 3. Krivulja rasta bakterije *P. aeruginosa* (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A



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

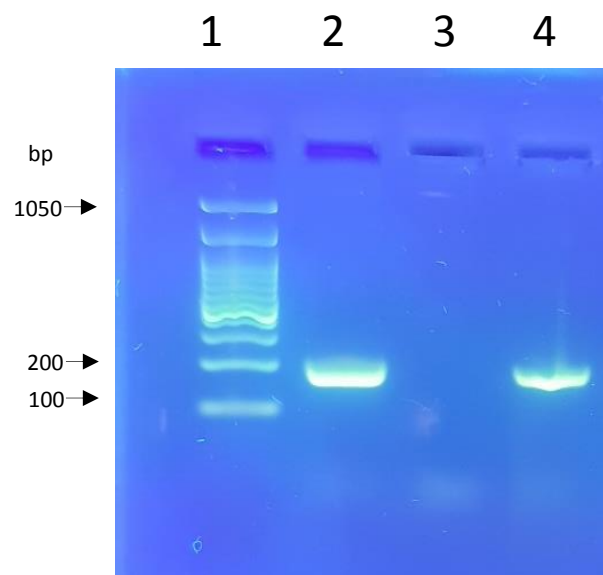


Slika 5. Krivulja rasta bakterije *L. monocytogenes* (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A



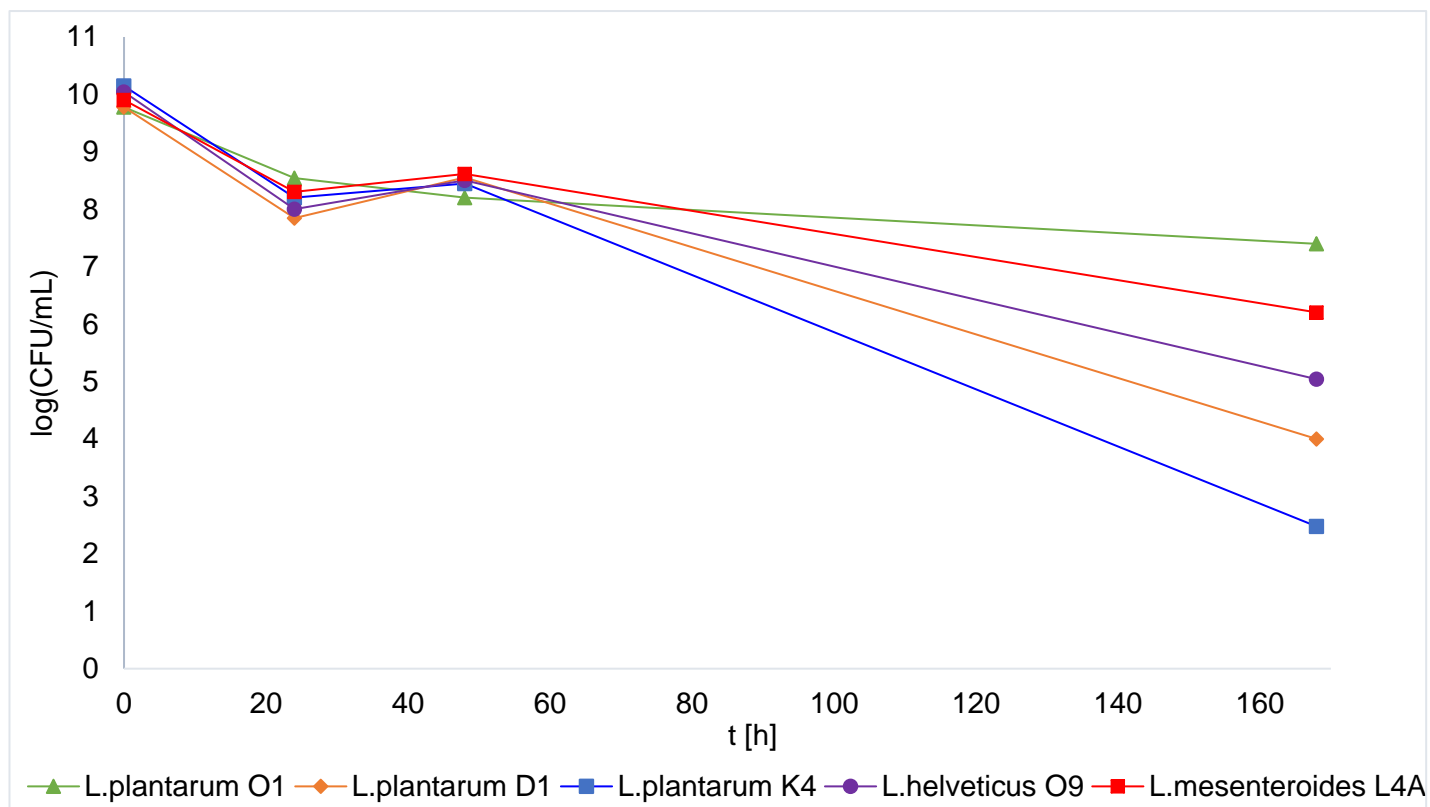
Slika 6. Krivulja rasta bakterije *Vibrio* sp. (tijekom 24 sata uzgoja) u prisutnosti izoliranih sojeva BMK: *L. plantarum* O1, *L. plantarum* D1, *L. plantarum* K4, *L. helveticus* O9, *L. mesenteroides* L4A

4.1.1. Detekcija gena za sintezu bakteriocina lančanom reakcijom polimeraze (PCR)



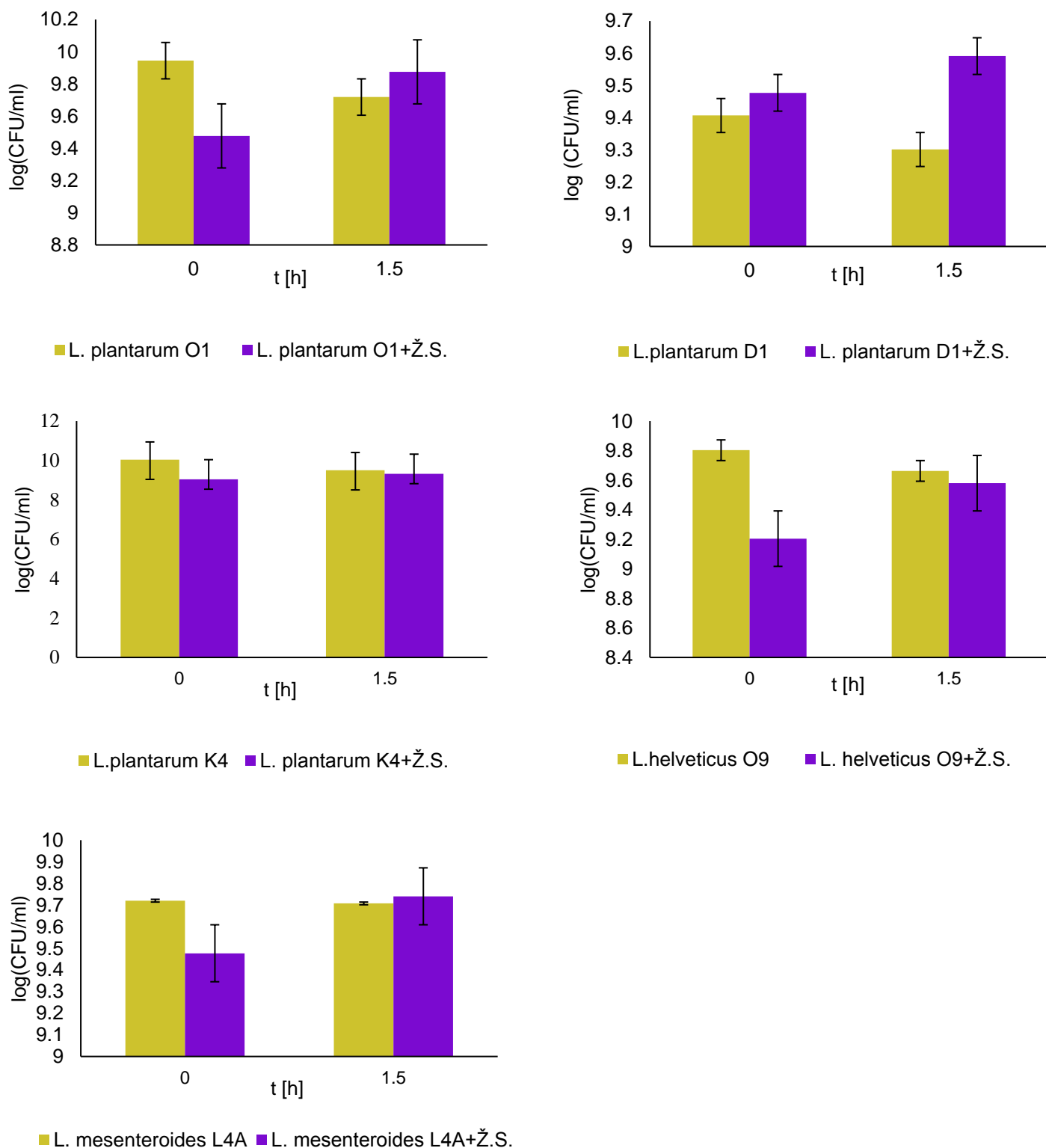
Slika 7. PCR analiza gena *plnA* u soju *L. plantarum* O1. Stupac 1 = markeri (BenchTop 100 pb DNK standardi, Promega, Madison, WI, USA), stupac 2 =*Lactobacillus plantarum* C11 (pozitivna kontrola), stupac 3 =*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG 1363 (negativna kontrola) stupac 4=*Lactobacillus plantarum* O1

4.2. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u morskoj vodi

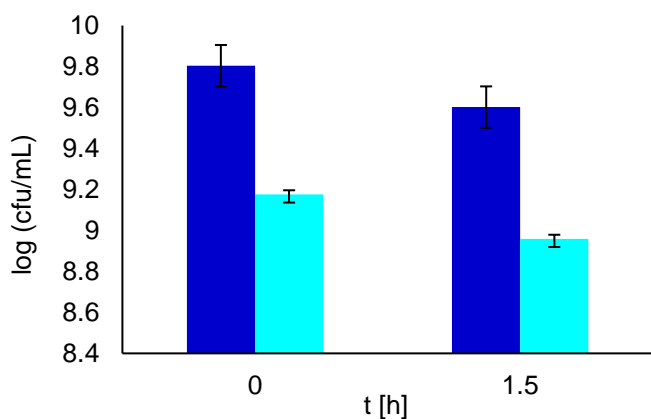


Slika 8. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u uzorku Jadranskog mora *in situ*

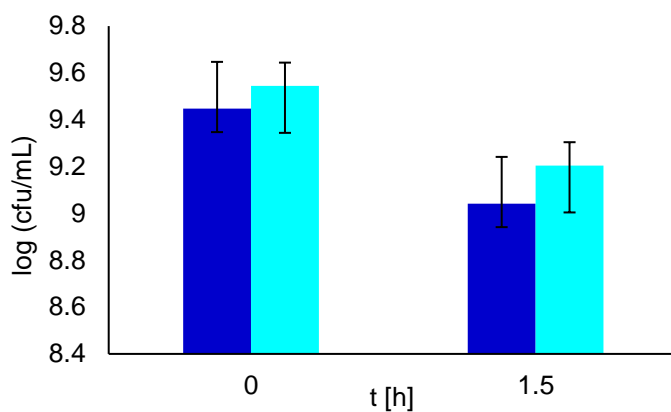
4.3. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u gastrointestinalnom traktu ribe



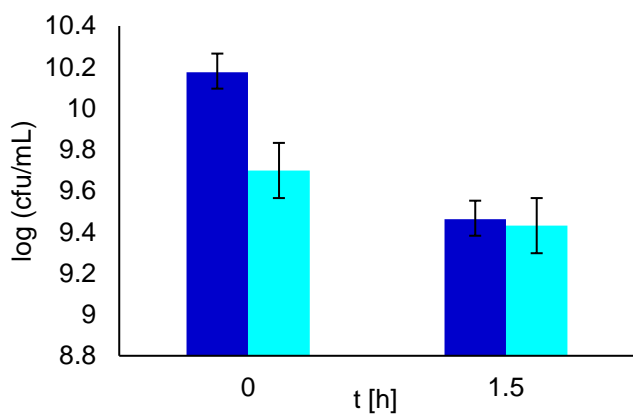
Slika 9. Preživljavanje izolata BMK u žučnim solima (Ž.S.) lubina *in situ*



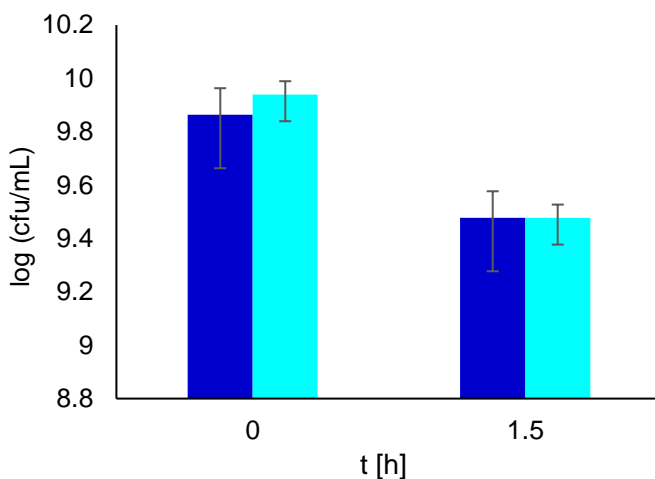
■ *L. plantarum* O1+S.Ž. ■ *L. plantarum* O1



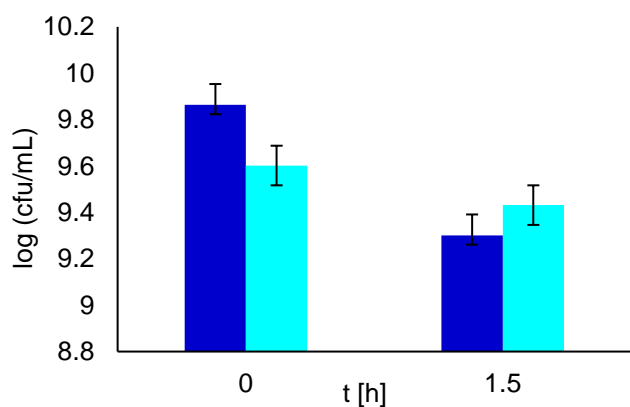
■ *L. plantarum* D1+S.Ž. ■ *L. plantarum* D1



■ *L. plantarum* K4+S.Ž. ■ *L. plantarum* K4



■ *L. helveticus* O9+S.Ž. ■ *L. helveticus* O9



■ *L. mesenteroides* L4A+S.Ž. ■ *L. mesenteroides* L4A

Slika 10. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u soku želuca (S.Ž.) lubina *in situ*

4.4. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva BMK

Tijekom rasta izolata BMK na Columbia krvnom agaru nije došlo do pojave prozirnih zona oko poraslih kolonija što implicira da navedeni izolati nemaju sposobnost razgradnje crvenih krvnih stanica, tj. hemolitičku aktivnost.

4.5. Adhezija izoliranih sojeva BMK na riblju sluz

Tablica 3. Adhezija izoliranih sojeva BMK na površinsku sluz lubina

Izolat bakterija mliječne kiseline	Bakterijska adhezija [%]
<i>L.plantarum</i> O1	30.87
<i>L.plantarum</i> D1	18.53
<i>L.plantarum</i> K4	1.86
<i>L.helveticus</i> O9	8.45
<i>L.mesenteroides</i> L4A	10.83

5. RASPRAVA

Jedan od vodećih problema u industriji proizvodnje morskih organizama jesu oboljenja uzrokovana bakterijskim infekcijama koja se neuspješno rješavaju konvencionalnim metodama. Mikroorganizmi sa probiotičkim potencijalom pronalaze sve veću primjenu u prehrambenoj industriji jer ne samo da smanjuju mogućnost kolonizacije namirnice štetnim mikroorganizmima, poboljšavaju njena organoleptična svojstva, čine ju sigurnom za upotrebu i doprinose njenim funkcionalnim svojstvima. Nerijetko je takva hrana okarakterizirana kao funkcionalna jer njenom konzumacijom dolazi do pozitivnog učinka na zdravlje i prevenciju bolesti. Najčešće se kao probiotici koriste BMK te se pokazalo kako one izolirane iz morskih organizama postaju najboljim izborom kada je u pitanju zaštita zdravlja proizvoda akvakulture (Čanak i sur., 2018). Razlog tome je činjenica da su bakterije izolirane iz tijela kralježnjaka (Iehata et al., 2009) prilagođene drugačijim uvjetima okoliša nego one izolirane iz prirodne mikrobiote riba i plodova mora. Kako bi odabrane BMK mogle manifestirati svoja poželjna probiotička svojstva, nužno je da preživljavaju uvjete staništa morskog organizma, ekstremne uvjete u njegovu gastrointestinalnom traktu i da budu sigurni za organizam čiji su dodatak prehrani.

5.1. Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva BMK

Poželjno je da BMK kao potencijalni riblji probiotici pored ostalih željnih karakteristika, posjeduju i antimikrobnu aktivnost kako bi suzbile rast uzročnika infekcija kod proizvoda akvakulture. Na osnovu rezultata prikazanih na Slikama od 1 do 6 može se uočiti da svi ispitani izolati bakterija mliječne kiseline 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% te *Vibrio* sp. od 22% do 33%. 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% te 79% u slučaju *S. aureus*. Radi usporedbe, u istraživanju Reda i sur. (2017) određivana je antimikrobna aktivnost devet izolata BMK iz probavila nilske tilapije (*Oreochromis niloticus*) na najčešće riblje patogene *Aeromonas sobria*, *A. hydrophila*, *Pseudomonas 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 (Materijali i metode: odlomak 3.2.3.) neutraliziran supernatant BMK, čime je izbjegnuto inhibitorni učinak mliječne kiseline, na osnovu dobivenih rezultata postavilo

se pitanje što je uzrok jake antimikrobne aktivnosti *L. plantarum* O1. Stoga je sljedeći korak bilo ispitivanje prisutnosti antimikrobnih peptida-bakteriocina. Lančanom reakcijom polimeraze (PCR) ispitana je prisutnost gena koji kodiraju za nekoliko bakteriocina, do sada najčešće identificiranih kod BMK. Analizom *pln* lokusa potvrđena je prisutnost gena *plnA*, odnosno plantaricina A (PlnA) (Slika 7). Prisutnost gena *plnEF*, *plnNC8* i *plnW* nije potvrđena. Pln A je peptidni feromon, induktor proizvodnje bakteriocina (Hauge i sur., 1998) i antimikrobni agens u borbi protiv specifičnih mikroorganizama (Zhao i sur., 2006; Čanak i sur., 2018). Mehanizam njegova djelovanja temelji se na interakciji sa membranskim receptorima čime se pokreće aktivnost feromona te se iz navedenog da zaključiti da se antimikrobna aktivnost proizvođača *plnA* temelji na interakciji aktivne supstance sa ciljanim mikroorganizmima (Kristiansen i sur., 2005). Ove ribosomski – sintetizirane makromolekule, između ostalog, mogu djelovati kao kolonizirajući peptidi omogućujući dominaciju njihova producenta unutar populacije različitih vrsta bakterija (Riley i sur., 2002). Dobiveni rezultati se podudaraju s dosadašnjim istraživanjima. Tako su Anacarso i sur. (2014) 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, u radu Brillea i sur. (2005) otkrivena je prisutnost bakteriocina u soju *Carnobacterium divergens* V41 izoliranog iz probavila lososa (*Salmo salar*), a koji pronalazi potencijalnu primjenu u zaštiti namirnica od kvarenja. Do danas su objavljena mnoga istraživanja na temu inhibitorne aktivnosti različitih bakteriocina prema mikroorganizmima uzročnicima kvarenja (posebno *L. monocytogenes*) u ribi te obrađenim morskim plodovima, međutim postoji samo nekoliko izvješća o BMK kao producentima bakteriocina koje su izolirane iz svježih ili rashlađenih proizvoda akvakulture. Budući da su sojevi korišteni u ovom radu izolirani iz svježe ribe i školjkaša, dobiveni rezultati daju značaj doprinos budućim istraživanjima u ovom području.

5.2. Preživljavanje izoliranih sojeva BMKu morskoj vodi

Preživljavanje u morskoj vodi jedna je poželjnih karakteristika sojeva s ciljem njihove primjene kao probiotika u akvakulturi (Vazquez i sur., 2003). 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 8. 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 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 (Linders i sur., 1997; Laroche i Gervais, 2003). Dobiveni rezultati su u skladu s onima Villamila 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 *L. acidophilus* IFO3532 i *L. lactis* subsp. *lactis*, izolata dobivenih iz intestinalnog trakta ribe napuhače (*Takifugu niphobles*) (Hutkins i sur., 1987; 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.

5.3. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u žučnim solima ribe

Prema navodu Reda i sur. (2017), uspješni i sigurni probiotički sojevi bi 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). U tu je svrhu praćeno preživljavanje izoliranih sojeva BMK u 10%-tnoj otopini žučnih soli lubina. 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 probiotici trebali preživljavati. Iz rezultata prikazanih na Slici 9 vidljivo je da je kod svih izolata BMK uočen porast u rasponu od 9.3 do 9.87 log CFU/mL u odnosu na početni broj koji se kretao u rasponu od 9.04 do 9.47 log CFU/mL. Različito preživljavanje između sojeva potkrepljuje činjenica da različiti sojevi bakterija, pripadnici iste vrste, ne pokazuju jednaku toleranciju prema određenoj koncentraciji žučnih soli (Xanthopoulou i sur., 1997) te da je kod nekih sojeva izoliranih bakterija uočen sporiji rast. Soj koji je pokazao najbolji rast u žučnim solima u vrijednosti od 9.87 log CFU/mL je *L.plantarum* O1. 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 pad broja kolonija nakon 1.5 h kod svih kontrolnih uzoraka (9.3-9.7 log CFU/mL) u odnosu na početni broj (9.4 -10.10 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 bakterija mliječne kiseline 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: *Lactococcus lactis* izoliran iz kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), *Citrobacter freundii* i *Enterococcus* iz sivog cipla (*Mugil cephalus*) te *Bacillus* vrste izolirane iz sibirske jesetre (*Acipenser baerii*) (Balcázar i sur., 2008; Geraylou i sur., 2014; Satish i sur., 2011; Sahoo i sur., 2015).

5.4. Preživljavanje izoliranih sojeva BMK u želučanom soku ribe

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 10 te se može uočiti da kod svih sojeva BMK dolazi do pada broja kolonija u rasponu od 9.04 do 9.6 log CFU/mL u odnosu na početni broj od 9.44 do 10.17 CFU/mL. Obzirom da pad broja kolonija nije značajan, može se zaključiti da izolirane bakterije dobro preživljavaju kisele uvjete okoliša. Najmanji pad broja kolonija uočen je kod *L. plantarum* O1 čiji se broj smanjio s početnih 9.80 na 9.62 log CFU/mL. Kod kontrolnih uzoraka također je zabilježen pad broja kolonija nakon 1.5 h (8.95 - 9.2 log (CFU/mL) u odnosu na početni broj (9.17 - 9.93 log CFU/mL). Smanjenje broja kolonija u svim uzorcima se može objasniti činjenicom da bakterijama izoliranim iz morskih organizama za rast ipak najbolje odgovaraju uvjeti njihova prirodnog staništa (O'Sullivan, 2001). 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 pastre (*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 koncentracija protona u mikrookolini te metabolički put arginina u svrhu proizvodnje osnovnih potrebnih spojeva (Franz i Holzapfel, 2011). Treba istaknuti 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.

5.5. Hemolitička aktivnost izoliranih sojeva BMK

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 (Chen i sur., 1995; Lee i sur., 1995) jer hemolitički aktivne bakterije izazivaju stvaranje malih otvorenih rana na površini tijela preko kojih lako dolazi do infekcija (Madigan i sur., 1984). Ni jedan od izoliranih sojeva BMK nije pokazao hemolitičku aktivnost, tj. nema sposobnost razgradnje crvenih krvnih stanica domaćina. Dobiveni rezultati u skladu su 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 kod ispitivanih sojeva BMK, a koji su izolirani iz tilapije (*Oreochromis niloticus*), morske vode i sedimenta te nekoliko tradicionalnih fermentiranih proizvoda.

5.6. Adhezija izoliranih sojeva BMK na riblju sluz

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 Jutfelta i sur. (2006.) te Tobbacka (2009) adhezija patogenih bakterija za sluz ribe esencijalni je uvjet za infekciju i ključni faktor virulencije u domaćina. Iz rezultata prikazanih u Tablici 3 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 dosadašnjim istraživanjima 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*). 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. Površina biomembrana stanica razlikuje se između vrsta, serotipova i sojeva; mijenja se pod utjecajem fizikalnog stanja stanice, uvjeta rasta i različite ekspresije gena površinskih proteina (Sorongon i sur., 1991; Mattos-Guaraldi i sur., 1999).

6. ZAKLJUČCI

1. Svi morski izolati BMK pokazali su dobro preživljavanje u uzorcima Jadranskog mora. Najbolje preživljavanje pokazao je soj *Lactobacillus plantarum* O1.
2. Bakterijski izolati pokazali su dobro preživljavanje u *in situ* uvjetima gastrointestinalnog trakta. Najbolju toleranciju na navedene stresne uvjete pokazao je soj *Lactobacillus plantarum* O1.
3. Ni jedan od morskih izolata BMK nije pokazao hemolitičku aktivnost, tj. sposobnost razgradnje crvenih krvnih stanica domaćina.
4. Najbolju sposobnost adhezije na površinsku sluz ribe pokazao je soj *L. plantarum* O1.
5. Svi izolati BMK su uzrokovali inhibiciju rasta patogenih mikroorganizama pri čemu se *L. plantarum* O1 pokazao kao soj s najboljom antimikrobnom aktivnošću koja je posljedica proizvodnje bakteriocina plantaricina A.
6. Na osnovu svih rezultata može se zaključiti kako soj *L. plantarum* O1 može biti potencijalni riblji probiotik.

7. ZAHVALE

Ponajprije se zahvaljujem prof.dr.sc. Jadranki Frece što mi je pružila priliku da pod njenim mentorstvom izradim i prijavim ovaj rad na natječaj za Rektorovu nagradu.

Neizmjerne hvala asistentici Ivi Čanak, mag. ing. koja mi je bila velika pomoć i podrška pri izvođenju eksperimentalnog dijela rada i pisanju. Zahvaljujem joj se na uloženom trudu, strpljenju, savjetima i znanju koje mi je prenijela.

Zahvaljujem se tvrtki Cromaris d.d. Zadar na suradnji i doprinosu u realizaciji ovog rada.

Posebno se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu i prijateljima na podršci.

8. LITERATURA

Alves, V. F., De Martins, E.C.P., Destro, M.T., Vogel, B.F., Gram, L. (2005) Antilisterial Activity of a *Carnobacterium piscicola* Isolated from Brazilian Smoked Fish (Surubim [*Pseudoplatystoma* sp.]) and Its Activity against a Persistent Strain of *Listeria monocytogenes* Isolated from Surubim. *J. Food Prot.* **68(10)**, 2068–2077.

Amagliani, G., Brandi, G., Schiavano G.F. (2012) Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Res. Int.* **45**, 780–788.

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. *Aquacult. Int.* **25(1)**, 485–498.

Ammor, M.S., Mayo, B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.* **76**, 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 Sci. Technol.* **55(2)**, 604–611.

Ángeles Esteban, M. (2012) An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin. *ISRN Immunology*, 1–29.

Ayulo, A. M. R., Machado, R. A., Scussel, V. M. (1994) Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **24(1-2)**, 171–178.

Babić, I., Markov, K., Kovačević, D., Trontel, A., Slavica, A., Đugum, J., Čvek, D., Svetec, I.K., Posavec, S. and Frece, J. (2011) Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian “brand” product “Slavonski kulen”. *Meat science*, **88(3)**, 517-524.

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

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

- Banerjee, G., Ray, A.K. (2017) The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. *Res. Vet. Sci.* **115**, 66-77.
- Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S., Hetricki, F.M. (1991) Biochemical and Serological Characterization of *Carnobacterium* spp. Isolated from Farmed and Natural Populations of Striped Bass and Catfish. *Appl. Environ. Microbiol.* **57(11)**, 3114-3120.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 309-324.
- 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 Res. Int.* **39(3)**, 356–364.
- Chen, J.D., Lai, S.Y., Huang, S.L. (1995) Cloning of the hemolysin gene from *Edwardseilla tarda*. *J. Fish. Soc. Taiwan.* **22**, 267-277.
- Cohen, P.S., Laux, D.C. (1995) Bacterial adhesion to and penetration of intestinal mucus in vitro. *Methods Enzymol.* **(253)**, 309-314.
- Collins, B., Cotter, P.D., Hill, C., Paul Ross, R. (2010) Applications of Lactic Acid Bacteria - Produced Bacteriocins. U: *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications* (Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G.M., ured.), Blackwell Publishing, New Jersey, str. 89-109.
- Cotter, P.D., Draper, L.A., Lawton, E.M., McAuliffe, O., Hill, C., Ross, R.P. (2006) Overproduction of wild-type and bioengineered derivatives of the lantibiotic lactacin 3147 . *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 4492 – 4496.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 777–788 .
- 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. Bitech.* **56(4)**, 581-589.

- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Euras Vilalta, N., Swings, J., Fruekilde, P., Leisner, J. J. (2003) Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0 °C and 25 °C. *J. Appl. Microbiol.* **94(1)**, 80–89.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L., Prevost, H. (2006) The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **70**, 564 – 582.
- Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P., Dousset, X. (1999) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C. *Int. J. Food Microbiol.* **47(1-2)**, 33–42.
- FAO/WHO (2002) In Joint FAO/WHO Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food, Ontario, Canada, 30. travanja i 1. svibnja, 2002.
- Feldhusen, F. (2000) The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Method. Microbiol.* **2**, 1651-1660.
- Figuroa Ochoa, I.M., Verdugo Rodríguez, A. (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. *Rev. Latinoam. Microbio.* **47 (1-2)**, 25-42.
- Fjellheim, A.J., Klinkenberg, G., Skjermo, J., Aasen, I.A., Vadstein, O. (2010) Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Vet. Microbiol.* **144**, 153–159.
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H. (2011) The Importance of Understanding the Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. U: *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* (Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., ured.), Springer, New York, str. 3-22.
- Frece, J., Cvrtila, J., Topić, I., Delaš, F., Markov, K. (2014) Mogućnost primjene bakterije *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* kao funkcionalne starter kulture. *Food Technol. Biotechnol.* **52(4)**, 489-494.
- Frece, J., Vrdoljak, M., Filipčić, M., Jelić, M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Pleadin, J., Gobin, I., Dragičević, T.L. and Markov, K. (2016) Microbiological quality and variability of natural microbiota in Croatian cheese maturing in lambskin sacks. *Food Tech. Biotech.* **54(2)**, 129.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R., Omar, N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51-70.
- Gancel, F., Dzierszinski, F., Tailliez, R. (1997) Identification and characterization of *Lactobacillus* species isolated from fillets of vacuum-packed smoked and salted herring (*Clupea harengus*). *J. Appl. Microbiol.* **82(6)**, 722–728.

- 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). *Aquac Res* **45(2)**, 341–352.
- Ghanbari, M., Jami, M. (2013) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: A Promising Approach to Seafood Biopreservation. U: *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes* (Kongo, J.M., ured.), IntechOpen, Vienna, str. 381-404.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M. (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biot.* **81**, 591-606.
- 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.
- González, C.-J., Lopez-Diaz, T.-M., Garcia-Lopez, M.-L., Prieto, M., Otero, A. (1999) Bacterial Microflora of Wild Brown Trout (*Salmo trutta*), Wild Pike (*Esox lucius*), and Aquacultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Food Prot.* **62(11)**, 1270–1277.
- González, C.-J., Lopez-Diaz, T.-M., Garcia-Lopez, M.-L., Prieto, M., Otero, A. (2000) Psychrobacters and Related Bacteria in Freshwater Fish. *J. Food Prot.* **63(3)**, 315–321.
- González-Rodríguez, M.-N., Sanz, J.-J., Santos, J.-Á., Otero, A., García-López, M.-L. (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level. *Int. J. Food Microbiol.* **77(1-2)**, 161–168.
- Hauge, H.H., Mantzilas, D., Moll, G.N., Konings, W.N., Driessen, A.J., Eijsink, V.G.H., Nissen-Meyer, J. (1998) Plantaricin A is an amphiphilic α -helical bacteriocin-like pheromone which exerts antimicrobial and pheromone activities through different mechanisms. *Biochemistry*, **37(46)**, 16026–32.
- Holzappel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. (1995) A review paper: biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* **24**, 343-362.
- 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.
- Hutkins, R.W., Ellefson, W.L., Kashket, E.R. (1987) Betaine Transport Imparts Osmotolerance on a Strain of *Lactobacillus acidophilus*. *App. Environ. Microb.* **53(10)**, 2275-2281.

- 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 Sci* **75(5)**, 1285–1293.
- Illanchezian, S., Jayaraman, S., Saravanan Manoharan, M., Valsalam S. (2010) Virulence and Cytotoxicity of Seafood Borne *Aeromonas hydrophila*. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 978-983.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* **121(1)**, 116–121.
- 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). *J. Fish. Dis.* **29**, 255–262.
- Kajfasz, J.K., Quivey Jr, R.G. (2011) Responses of Lactic Acid Bacteria to Acid Stress. U: *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* (Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., ured.), Springer, New York, str. 23-53.
- Kleerebezem, M., Hugenholtz, J. (2003) Metabolic pathway engineering in lactic acid bacteria. *Curr. Opin. Biotech.* **14(2)**, 232-237.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., Matošić, S. (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 981–987.
- 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. *J Biol Chem.* **280(24)**, 22945–50.
- Kumar, H.S., Parvathi, A., Karunasagar I., Karunasagar, I. (2005) Prevalence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in tropical seafood. *World J. Microb. Biot.* **21**, 619-623.
- Kvenberg, J.E. (1991) Nonindigenous Bacterial Pathogens. U: *Microbiology of Marine Food Products* (Ward, D.R., Hackney, C.R., ured.) Springer, Boston, str. 267-284.
- Laroche, C., Gervais, P. (2003) Unexpected thermal destruction of dried, glass bead immobilized microorganisms as a function of water activity. *Appl Environ Microbiol.* **69(5)**, 3015–3019.
- Laursen, B., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P., Leisner, J.J. (2005) *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or

protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Systematic and Applied Microbiology*. **28(2)**, 151–164.

Leboš, A., Habjanič, K., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., & Šušković, J. (2008) The use of *Lactobacillus plantarum* L4 for the production of probiotic drink with cabbage juice. Proceedings of the Joint Central European Congress: 4th Central European Congress on Food and 6th Croatian Congress of food technologists, biotechnologist, and nutritionists (CEFood2008), 15. – 17. ožujka, Cavtat, Hrvatska, 269–276.

Leboš Pavunc A. (2012) *Fenotipska i genotipska karakterizacija sojeva bakterija mliječne kiseline u svrhu proizvodnje probiotika i funkcionalnih starter kultura*. Doktorska disertacija. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

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

Le Marrec, C. (2011) Responses of Lactic Acid Bacteria to Osmotic Stress. U: *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria* (Tsakalidou, E., Papadimitriou, K., ured.), Springer, New York, str. 67-90.

Leroi, F., Joffraud, J.-J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* **39(1-2)**, 111–121.

Linders, L.J. M., Wolkers, W.F., Hoekstra FA, van 't Riet, K. (1997) Effect of added carbohydrates on membrane phase behavior and survival of dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*, **35(1)**, 31–40.

Lindgren, S.E., Dobrogosz, W.J. (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **87(1-2)**, 149-164.

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. *Biochim. Biophys. Acta.* **1768**, 1342–1366.

Luo, Z., Bai, X., Chen, C. (2014) Integrated application of two different screening strategies to select potential probiotics from the gut of channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Fish. Sci.* **80(6)**, 1269–1275.

Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (1984) *Brock Biology of Microorganisms*, 9th edn, Prentice Hall, New York.

- Markov, K., Frece, J. (2016) Sigurnost hrane: mikrobiološki/infektološki aspekti. U: *Prehrana u općoj i kliničkoj pedijatriji* (Kolaček, S., Hojsak, I., Niseteo, T., ured.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 113-121.
- Mattos-Guaraldi, A.L., Formig, L.C.D., Andrade, A.F.B. (1999) Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Curr. Microbiol.* **38**, 37–42.
- Matyar, F., Kaya, A., Dinçer, S. (2007) Distribution and antibacterial drug resistance of *Aeromonas* spp. from fresh and brackish waters in Southern Turkey. *Ann. Microbiol.* **57(3)**, 443-447.
- 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*. *AAFL Bioflux*, **10(2)**, 455-463.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies S.J. (2010a) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.* **16**, 504–510.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T., Børgwald, J., Castex, M., Ringø, E. (2010b) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, **302(1)**, 1–18.
- Miranda, C.D., Zemelman, R. (2002) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean salmon farming. *Aquaculture*, **212(1–4)**, 31–47.
- Mozzi, F., Raya, R., Vignolo, G.M. (2010) *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*, Blackwell Publishing. New Jersey.
- 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 Immun.* **41(2)**, 570–580.
- 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)**, 15.
- Nayak, S. (2010) Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish. Shellfish. Immunol.* **29(1)**, 2–14.

- Nes, I., Yoon, S., Diep, D. (2007) Ribosomally Synthesized Antimicrobial Peptides (Bacteriocins) in Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Sci. Biotechnol.* **16(5)**, 675-690.
- Nikoskelainen, S., Salminen, S., Bylund, G., & Ouwehand, A.C. (2001) Characterization of the Properties of Human- and Dairy-Derived Probiotics for Prevention of Infectious Diseases in Fish. *Appl. Environ. Microb.* **67(6)**, 2430–2435.
- O'Sullivan G.C., (2001) Probiotics. *Brit. J. Surg.* **88**, 161–162.
- Ouwehand, A., Vesterlund, S. (2004) Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. U: *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects* (Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 375-396.
- Pelle, E., Dousset, X., Prevost, H., Drider, D. (2005) Specific molecular detection of *Carnobacterium piscicola* SF668 in cold smoked salmon. *Lett. Appl. Microbiol.* **40(5)**, 364 - 368.
- 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.
- Pianetti, A., Falcioni, T., Bruscolini, F., Sabatini, L., Sisti, E., Papa, S. (2005) Determination of the Viability of *Aeromonas hydrophila* in Different Types of Water by Flow Cytometry, and Comparison with Classical Methods. *Appl. Environ. Microbiol.* **71 (12)**, 7948–7954.
- Podolak, P.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. *J. Food Proect.* **59**, 370-373.
- Ray, A., Ghosh, K., Ringø, E. (2012) Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquac. Nutr.* **18(5)**, 465–492.
- Reda, R.M., Selim, K.M. (2015) Evaluation of *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth performance, intestinal morphology, hematology and body composition of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquac. Int.* **23(1)**, 203–217.
- Reda, R.M., Selim, K.M., El-Sayed, H.M., El-Hady, M.A. (2017) *In Vitro* Selection and Identification of Potential Probiotics Isolated from the Gastrointestinal Tract of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Probiotics & Antimicro. Prot.* (Objavljeno online 17. kolovoza 2017.) doi: 10.1007/s12602-017-9314-6.

- Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002) Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, **84**, 357–364.
- Ringø, E., Bendiksen, H.R., Wesmajervi, M.S., Olsen, R.E., Jansen, P. A., Mikkelsen, H. (2000) Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *J. Appl. Microbiol.* **89(2)**, 317–322.
- Ringø, E., Gatesoupe, F.-J. (1998) Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture*, **160(3-4)**, 177–203.
- 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. *Aquacult. Fish. Manage.* **25**, 623-629.
- Sahoo, T.K., Jena, P.K., Nagar, N., Patel, A.K., Seshadri, S. (2015) In vitro evaluation of probiotic properties of lactic acid bacteria from the gut of *Labeo rohita* and *Catla catla*. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* **7(2)**, 126–136.
- Sahu, M., Swarnakumar, N.S., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., Kannan, L. (2008) Probiotics in aquaculture: importance and future perspectives. *Indian J. Microbiol.* **48(3)**, 299–308.
- Samaržija, D. (2015) Taksonomija, filogeneza, morfologija, fiziologija i metabolizam bakterija mliječne kiseline i bifidobakterija. U: *Fermentirana mlijeka* (Samaržija, D., ured.), Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 27-84.
- Satish Kumar, R., Kanmani, P., Yuvaraj, N., Paari, K., Pattukumar, V., Arul, V. (2011) Purification and characterization of enterocin MC13 produced by a potential aquaculture probiont *Enterococcus faecium* MC13 isolated from the gut of *Mugil cephalus*. *Can. J. Microbiol.* **57(12)**, 993–1001.
- Schmidt, A. S., Bruun, M. S., Dalsgaard, I., Pedersen, K., Larsen, J. L. (2000) Occurrence of Antimicrobial Resistance in Fish-Pathogenic and Environmental Bacteria Associated with Four Danish Rainbow Trout Farms. *Appl. Environ. Microb.* **66(11)**, 4908–4915.
- Selim, K.M., Reda, R.M. (2015) Improvement of immunity and disease resistance in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, by dietary supplementation with *Bacillus amyloliquefaciens*. *Fish. Shellfish. Immunol.* **44(2)**, 496–503.
- Sica, M.G., Brugnoli, 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.

Simon, S. S., Sanjeev, S. (2007) Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers. *Food Control*, **18 (12)**, 1565–1568.

Sorongon, M.I., Bloodgood, R.A., Burchardl, R.P. (1991) Hydrophobicity, adhesion and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Appl Environ. Microbiol.* **57**, 3193–3199.

Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36(1)**, 1–29.

Su, Y.-C., Liu, C. (2007) *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. *Food Microbiol.* **24 (6)**, 549-558.

Šušković, J. (1996) *Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline*. Doktorska dizertacija, Zagreb : Prehrambeno – biotehnološki fakultet.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Pavunc, A.L., Habjanič, K., Matošić, S. (2010) Antimicrobial Activity--The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **48(3)**, 296-307.

Šušković, J., Kos, B., Frece, J., Beganović, J., Leboš Pavunc A. (2009) Probiotički koncept – probiotici kao dodaci hrani i probiotici kao bioterapeutici. *Cro. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **4(3-4)**, 77-84.

Teophilo, G., dos Fernandes Vieira, R., dos Prazeres Rodrigues, D., Menezes, F. R. (2002) *Escherichia coli* isolated from seafood: toxicity and plasmid profiles. *Int. Microbiol.* **5**, 11-14.

Thampuran, N., Surendraraj, A., Surendran P. K. (2005) Prevalence and Characterization of Typical and Atypical *Escherichia coli* from Fish Sold at Retail in Cochin, India. *J. Food Prot.* **68(10)**, 2208–2211.

Tobback, E. (2009) *Early pathogenesis of Yersinia ruckeri infections in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum)*. PhD thesis, Belgium : Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.

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

Upadrasta, A., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Paul Ross, R. (2001) Improving the Stress Tolerance of Probiotic Cultures: Recent Trends and Future Directions. U: *Stress responses of lactic acid bacteria* (Tsakalidou E., Papadimitriou, K., ured.), Springer, Boston, str. 395-438.

Vazquez, J.A., Cabo, M.L., Gonzalez, M.P., Murado M.A. (2003) Survival of Lactic Acid Bacteria in Seawater: A Factorial Study. *Curr. Microbiol.* **47**, 508-513.

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.

Welsh, D.T. (2000) Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 263–290.

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

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

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. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1758(9)**, 1461–74.

***In situ* karakterizacija morskih izolata bakterija mliječne kiseline kao potencijalnih ribljih probiotika**

Mattea Živković

SAŽETAK: Poznato je da bakterije mliječne kiseline (BMK), kao sastavni dio mikrobiote, posjeduju brojne karakteristike kojima doprinose zdravlju svih kralježnjaka. Iako postoji veliki broj probiotičkih pripravaka bakterija izoliranih iz različitih staništa, njihova primjena nije univerzalna i jednako učinkovita za sve više organizme. Kao alternativa kemoterapeuticima i cijepljenju, a s ciljem kontrole bolesti, u akvakulturi se u posljednje vrijeme sve više primjenjuju probiotici. Korištenjem BMK izoliranih iz morskog okoliša osigurava se njihova bolja prilagodba i veća učinkovitost. Kao uspješni 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 organizama. Karakterizacija morskih izolata BMK u ovom radu uključivala je određivanje antimikrobne aktivnosti, praćenje preživljavanja u gastrointestinalnom traktu ribe i morskoj vodi, kao i određivanje adhezije na površinsku sluz ribe te hemolitičku aktivnost. Od svih autohtonih izolata najboljim se pokazao *Lactobacillus plantarum* O1, producent bakteriocina plantaricina A. Svi dobiveni rezultati upućuju na to da *L. plantarum* O1 ima potencijalnu primjenu kao riblji probiotik, a daljnja ispitivanja su potrebna za procjenu tih svojstava prilikom uzgoja akvatičnih vrsta (*in vivo*).

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, akvakultura, probiotik, plantaricin A

***In situ* characterization of marine origin lactic acid bacteria as potential fish probiotics**

Mattea Živković

SUMMARY: It is known that lactic acid bacteria (LAB), as an integral part of microbiota, possess many characteristics that contribute to the health of all vertebrates. Although there is a large number of probiotic formulations based on bacteria isolated from different habitats, their application is not universal and equally effective for higher organisms. Lately, as an alternative to chemotherapy, vaccination and with the aim of controlling diseases, probiotics are increasingly being used in aquaculture. Using LAB isolated from marine environment ensures their better adaptation and greater efficiency. As successful probiotics, LAB must satisfy several basic criteria to survive environmental conditions in which they are applied, and demonstrate desirable characteristics in aquaculture. In this work, characterization of marine LAB isolates included determination of antimicrobial activity, survival in gastrointestinal tract of fish and seawater, as well as determination of adhesion capacity to the fish surface mucus and hemolytic activity. Of all indigenous isolates the best strain was *Lactobacillus plantarum* O1, producer of plantaricin A. All results indicate that *L. plantarum* O1 has potential use as a fish probiotic, and further studies are needed to evaluate these properties in seafood farming (*in vivo*).

Key words: lactic acid bacteria, aquaculture, probiotic, plantaricin A