Izolacija i identifikacija mikrobne populacije škampa (Nephrops norvegicus) i hlapa (Homarus gammarus)

Jolić, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:163734

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

prehrambeno biotehnološki fakultet

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Josipa Jolić

0058213985

Izolacija i identifikacija mikrobne populacije škampa (*Nephrops norvegicus*) i hlapa (*Homarus gammarus*)

ZAVRŠNI RAD

Modul: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Izolacija i identifikacija mikrobne populacije škampa (*Nephrops norvegicus*) i hlapa (*Homarus gammarus*)

Josipa Jolić, *0058213985*

Sažetak: Bakterije mliječne kiseline (BMK) široko su rasprostranjene i mogu se pronaći u različitim ekosustavima. Sastavni su dio mikroflore ljudi i životinja, uključujući i morske organizme. U ribljoj industriji u posljednje je vrijeme sve veći naglasak na primjeni probiotika, kao zamjena za dosadašnje konvencionalne metode zaštite morskih životinja. BMK izolirane iz morskog okoliša puno su bolji kandidati za primjenu kao probiotici u akvakulturi u odnosu na sojeve animalnog ili humanog porijekla jer su već adaptirane na navedenu sredinu. Budući da je gastrointestinalni trakt (GIT) životinja najbogatiji mikroorganizmima, cilj ovog rad bila je identifikacija mikrobne populacije GIT-a hlapa i škampa, uključujući i ispitivanje prisutnosti BMK. Rezultati su pokazali prisutnost nekoliko bakterijskih skupina i kvasaca, dok BMK nisu izolirane iz niti jednog od uzorka.

Ključne riječi: akvakultura, bakterije mliječne kiseline, rakovi

Rad sadrži: 24 stranice, 3 slike, 3 tablice, 46 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambenobiotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: dr.sc. Iva Čanak, dr.sc. Snježana Kazazić

Datum obrane:

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering

Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Isolation and identification of microbial population of shrimp (*Nephrops norvegicus*) and common lobster (*Homarus gammarus*)

Josipa Jolić, ***0058213985***

Abstract: Lactic acid bacteria (LAB) are widely spread and can be found in different ekosystems. They are an integral part of the human and animal microflora, also including aquatic organisms. Lately, in fish industry has been an increasing emphasis on the use of probiotics, as a replacement for current conventional methods for protection of marine animals. LAB isolated from marine environment are much better candidates for use as aquaculture probiotics compared to strains of animal or human origin, due to their better adaptation to specific environment. Since the gastrointestinal tract (GI tract) of animals is the richest in microorganisms, the aim of this study was to identify the microbial population of GI tract of lobster and shrimps, including testing for the presence of LAB. Results showed presence of several bacterial groups and yeasts, while LAB were not isolated from any of the samples.

Keywords: aquaculture, lactic acid bacteria, crabs

Thesis contains: 24 pages, 3 figures, 3 tables, 46 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD. Jadranka Frece, Full professor

Technical support and assistance: PhD. Iva Čanak, PhD Snježana Kazazić

Defence date

Sadržaj

1. UVOD 1
2. TEORIJSKI DIO 2
2.1. Bakterije mliječne kiseline 2
2.1.1. Rod *Lactobacillus* 4
2.1.2. Rod *Pediococcus* 5
2.1.3. Rod *Lactococcus* 5
2.1.4. Rod *Leuconostoc* 5
2.2. Akvakultura 6
2.2.1. Rakovi 7
2.3. Mikroorganizmi izolirani iz morskog okoliša 8
2.3.1. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz morskog okoliša 9
2.3.2. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz rakova 10
3. Eksperimentalni dio 11
3.1. Materijali 11
3.1.1. Uzorci 11
3.1.2. Hranjive podloge 11
3.1.3. Pribor i oprema 12
3.2. Metode 13
3.2.1. Izolacija i identifikacija mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane 13
3.2.1.1. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom 13
3.2.2. Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline 14
3.2.2.1. Spektrometrija masa MALDI TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) 14
4. REZULTATI I RASPRAVA 16
5. ZAKLJUČCI 19
6. LITERATURA 20

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine grupu gram-pozitivnih bakterija koje imaju slična obilježja morfologije i metabolizma. BMK su nesporogene, katalaza negativne, fakultativno anaerobne, u obliku štapića ili kuglica. Produkt fermentacije ugljikohidrata je samo mliječna kiselina kod homofermentativnih vrsta, dok kod heterofermentativnih vrsta uz laktat nastaju i ugljikov dioksid te etanol. Klasifikacija BMK bazira se na razlikama u morfologiji, načinu fermentacije glukoze, rastu pri različitim temperaturama, završnim produktima fermentacije, sposobnosti rasta bakterija pri visokim koncentracijama soli te prema toleranciji niskih odnosno visokih pH vrijednosti (Axelsson, 2004). Veliki broj BMK je okarakteriziran kao probiotici, a probiotici su definirani kao jedna ili više kultura živih stanica mikroorganizma koje, primijenjene kod životinja ili ljudi djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore (Šušković i sur., 1997).

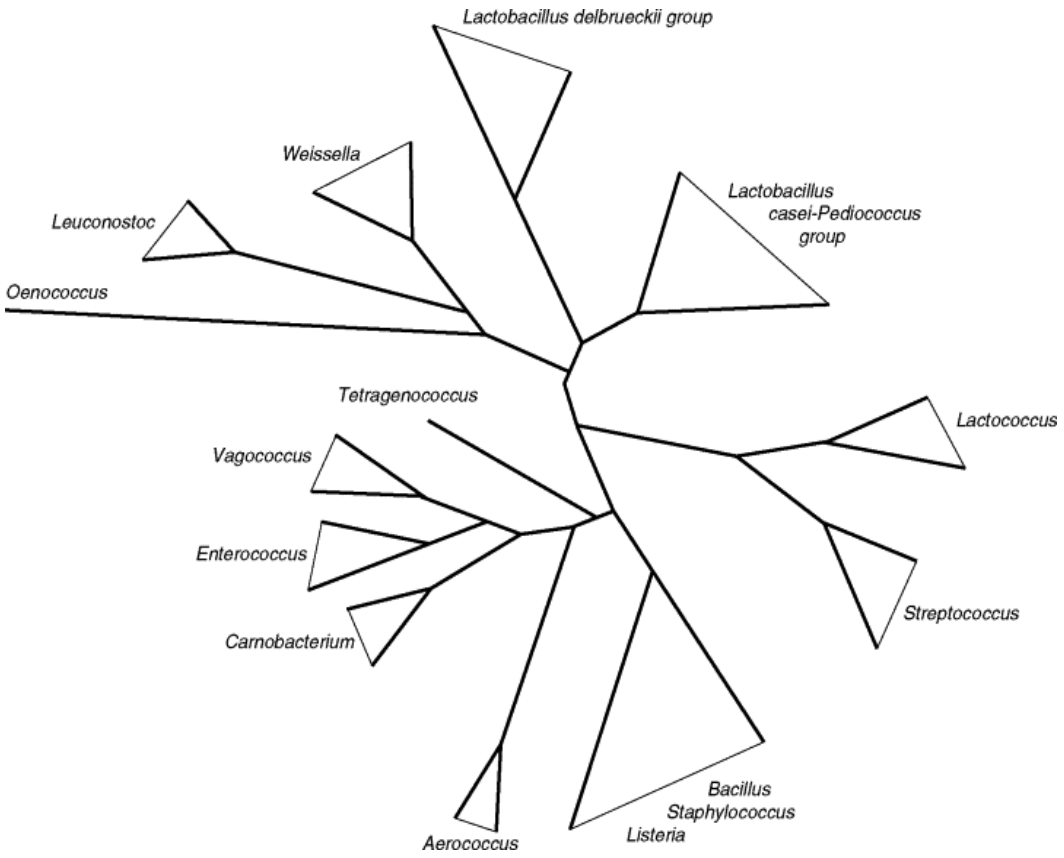
BMK su široko rasprostranjene i česti su stanovnici mikroflore različitih organizama pa ih tako nalazimo i u gastrointestinalnom traktu proizvoda akvakulture. Akvakultura podrazumijeva uzgoj riba, školjaka, rakova, vodenih biljaka i drugih vodenih organizama u uvjetima koje je moguće kontrolirati (Stickney, 2001). Uslijed izbijanja bolesti morskih organizama u uzgoju dolazi do ekonomskih gubitaka, a preventivne mjere obuhvaćaju sve češću primjenu probiotičkih kultura BMK, koje ojačavaju imunitet organizma te luče inhibicijske i antimikrobne supstance koje štite od patogena (Yang i sur., 2019, Frece, 2010a). U posljednje vrijeme sve je veći naglasak na primjeni BMK morskog porijekla budući da su takvi sojevi već adaptirani na morski okoliš i puno bolje mogu ispoljiti svoja pozitivna svojstva u odnosu na sojeve izolirane iz drugih izvora (Čanak i sur., 2019). Dosadašnja istraživanja obuhvaćaju nekolicinu morskih izolata BMK koji su pokazali sposobnost zaštite proizvoda akvakulture te je sve veći naglasak na izolaciji i identifikaciji novih vrsta iz morskih životinja.

Budući da do sada postoji mali broj literaturnih navoda o izolatima BMK iz svježih rakova, cilj ovog rada bio je izolirati i identificirati mikrobnu populaciju dvije vrste morskih rakova te ispitati prisutnost bakterija mliječne kiseline.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) skupni je naziv za velik broj bakterijskih vrsta koje su povezane morfološkim, metaboličkim te fiziološkim karakteristikama. Proizvode mliječnu kiselinu, koja je jedna od glavnih produkata fermentacije ugljikohidrata. Bakterije mliječne kiseline sačinjavaju raznoliku skupinu nepokretnih, gram-pozitivnih bakterija (Hatti-Kaul i sur., 2018). Nesporogene su, anaerobne, mikroaerofilno tolerantne, katalaza-negativne i nemaju sposobnost sinteze citokrom oksidaze. Klasifikacija BMK prikazana je na slici 1.



Slika 1. Shematsko filogenetsko stablo bakterija mliječne kiseline (Von Wright i Axelsson, 2011)

Bakterije mliječne kiseline čine prirodnu mikrofloru ljudi i životinja, posjeduju širok spektar korisnih svojstava za promicanje zdravlja koja uvelike utječu na crijevnu homeostazu i biološke procese domaćina. BMK imaju antimikrobno djelovanje koje se očituje u sposobnosti proizvodnje antimikrobnih supstanci. Antimikrobne supstance BMK mogu se podijeliti u dvije skupine: spojevi male molekulske mase (masa do 1000 Da) i spojevi velike molekulske mase (masa veća od 1000 Da) (Šušković i sur., 2010).

U skupinu spojeva male molekulske mase spadaju organske kiseline, vodikov peroksid, diacetil, acetaldehid, acetoin, ugljikov dioksid, reuterin, reutericiklin i drugi. Najvažnije organske kiseline sa antimikrobnim djelovanjem su mliječna i octena kiselina. Inhibitorni učinak najčešće uzrokuje nedisocirani oblik organske kiseline koji difundira kroz staničnu membranu prema alkalnijem citosolu gdje utječe na funkcije esencijalnih metabolita. Toksični učinci mliječne i octene kiseline uključuju smanjenje unutarstanične pH vrijednosti te remećenje membranskog potencijala (Frece i sur., 2010). Antimikrobnu aktivnost vodikovog peroksida čini sposobnost oksidacije bakterijskih stanica i razaranje molekularnih struktura staničnih proteina. Diacetil, acetaldehid i acetoin su produkti heterofermentativnih BMK. Diacetil i acetaldehid prisutni su u fermentiranim mliječnim proizvodima u kojima reguliraju rast kontaminanata, zbog čega se koriste kao konzervansi. Antimikrobna aktivnost ugljikovog dioksida očituje se kroz stvaranje anaerobnih uvjeta, inhibiciju enzimske dekarboksilacije i utjecaj na permeabilnost membrane zbog sposobnosti akumulacije u lipidnom dvosloju. Reuterin i reutericiklin su produkti bakterije *Lactobacillus reuteri*. Reutericiklin inhibira rast gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, funga i protozoa, dok reuterin inhibira rast gram-pozitivnih bakterija (Šušković i sur., 2010).

Najpoznatiji predstavnici antimikrobnih supstanci velike molekulske mase su bakteriocini. Bakteriocini BMK su ribosomski sintetizirani peptidi ili proteini sa antimikrobnom aktivnosti prema drugim gram-pozitivnim bakterijama. Najpoznatiji bakteriocin bakterija mliječne kiseline je lantibiotik nisin, jedini odobreni konzervans (Šušković i sur., 2010).

Budući da BMK ne posjeduju funkcionalni respiratorni sustav, trebaju pribaviti energiju putem fosforilacije na razini supstrata. Postoje dva temeljna puta fermentacije te se s obzirom na konačni proizvod razgradnje izvora ugljika dijele na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativni put bazira se na glikolizi, jedini proizvod razgradnje izvora ugljika jest mliječna kiselina, a heterofermentativni se bazira na putu pentoza fosfata u kojemu osim mliječne kiseline nastaju i drugi proizvodi metabolizma kao što su značajna količina CO_2, octena kiselina i etanol (Von Wright i Axelsson, 2011). Teoretski, homofermentativnim se putem proizvedu dvije molekule ATP-a po molekuli utrošene glukoze dok se

heterofermentativnim putem dobije jedna molekula ATP-a, no ako se u putu pentoza fosfata acetil fosfat konvertira u octenu kiselinu uz alternativnog elektronskog akceptora, formira se dodatni ATP. Ovaj alternativni elektronski akceptor može biti kisik stoga heterofermentativnim BMK odgovara mala količina kisika (mikroaerofilni uvjeti) jer potiče rast biomase. Dakle homofermentativne bakterije proizvode veće količine mliječne kiseline koja usporava, odnosno onemogućava rast drugih nepoželjnih mikroorganizama prisutnih u hranjivoj podlozi (Von Wright i Axelsson., 2011). BMK također spadaju u skupinu bakterija s niskim G + C sadržajem (osim roda *Bifidiobacterium*). Tijekom dugog procesa evolucije, BMK su izgubile gene koji kodiraju za sintezu kofaktora te su nestali biosintetski putevi za nastanak nekih aminokiselina i vitamina zbog čega BMK zahtijevaju bogatije hranjive podloge (Zhao i sur., 2016).

Široko su korištene u industriji fermentirane hrane zbog svog GRAS statusa (Generally Recognized As Safe). Doprinose okusu, teksturi te hranjivoj vrijednosti fermentirane hrane. Osim u industriji hrane, BMK se mogu koristiti i u biorafinerijama za proizvodnju čistih spojeva, poput mliječne kiseline, poliola i vitamina (Wu i sur., 2017). Do danas je sekvencionirano više od 75 genoma BMK pa se na temelju poznatog slijeda lako mogu odrediti karakteristike i mehanizmi djelovanja određenih BMK, što olakšava industrijsku proizvodnju te razvoj metoda genetičkog inženjerstva, s ciljem dobivanja BMK točno određenih svojstava (Wu i sur., 2017).

2.1.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* pripada koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli* te redu *Lactobacillales* (Von Wright i Axelsson, 2011). BMK roda *Lactobacillus* su fakultativno anaerobne, katalaza negativne, acidofilne, gram-pozitivne, nesporogene bakterije, u obliku štapića te često bolje rastu u mikroaerofilnim uvjetima. Njihova morfologija može varirati od kraćih debljih do duljih tanjih štapićastih oblika (Goldstein i sur., 2015). Red *Lactobacillus* sastoji se od oko 170 vrsti. Laktobacili se mogu pronaći u različitim vrstama okoliša, poput mliječnih proizvoda s mnogo nutrijenata, gastrointestinalnom traktu i usnoj šupljini različitih vrsta životinja te na biljkama i u tlu. Raznolikost okolišnih niša laktobacila za posljedicu ima veliki broj vrsta ovog roda (Von Wright i Axelsson, 2011). Neke od važnijih vrsti su: *L. acidophilus, L. casei, L. delbrueckii ,L. rhamnosus, L. plantarum*. Laktobacili se komercijalno često koriste kao probiotičke kulture (Von Wright i Axelsson, 2011, Frece i sur., 2016).

2.1.2. Rod *Pediococcus*

BMK ovog roda sferično su oblikovane, a prostorno tvore tetraedre. Isključivo su homofermentativne pa se često koriste kao starter kulture u raznim industrijama kao npr. u industriji sira i vina te su jedna od najčešće komercijalno korištenih starter kultura u mesnoj industriji (Von Wright i Axelsson, 2011; Frece i sur., 2016; Porto i sur., 2017).

Rod *Pediococcus* može proizvesti učinkoviti bakteriocin – pediocin, no budući da još nije odobren za ljudsku konzumaciju i dalje se radi na njegovom opsežnom istraživanju (Porto i sur., 2017).

2.1.3. Rod *Lactococcus*

Ove bakterije su kružnog oblika – koki (0,5-1,5 µm) te formiraju kraće lance. Gram-pozitivne su, mezofilne i homofermentativne bakterije. Iako ne posjeduju ciklus limunske kiseline ni respiratorni lanac te bi se zbog toga moglo reći kako su prave anaerobne bakterije, sposobne su rasti u prisutnosti kisika zahvaljujući prisutnosti određenih enzima poput NADH oksidaze. Ovo omogućava uzgoj u mikroaerofilnim uvjetima, odnosno supstrat koji se koristi može sadržavati kisik, što olakšava proizvodnju u industrijskom mjerilu. Pripadnici ovog roda imaju sposobnost proizvodnje određenih vrsta bakteriocina, peptida koji inhibiraju rast drugih bakterijskih sojeva. Komercijalno najvažniji bakteriocin je nisin, lantibiotik širokog spektra djelovanja kojega proizvodi *Lactococcus lactis.* Do danas je to jedini odobreni bakteriocin korišten kao dodatak prehrani koji inhibira patogene gram-pozitivne bakterije. Starter kulture *L. lactis* spp. *lactis* i *L. lactis* spp. *cremoris* često se koriste u mliječnoj industriji za proizvodnju fermentiranog mlijeka i sira (Von Wright i Axelsson, 2011).

2.1.4. Rod *Leuconostoc*

Vrste roda *Leuconostoc* imaju elipsoidne ili sferične stanice koje su najčešće organizirane u obliku parova ili lanaca. Fakultativno su anaerobne i katalaza negativne. Najčešće se mogu izolirati iz biljaka i hrane životinjskog porijekla, rijetko se mogu pronaći u toplokrvnim životinjama, međutim moguće ih je izolirati iz probavnog trakta riba. Svim vrstama roda *Leuconostoc* za rast je potreban medij obogaćen s faktorom rasta i aminokiselinama (Von Wright i Axelsson, 2011).

Za razliku od ostalih rodova BMK, rod *Leuconostoc* je heterofermentativan, što znači da laktat nije glavni produkt fermentacije glukoze, već uz mliječnu kiselinu nastaju i ugljikov dioksid te

etanol. Pripadnici ovog roda proizvode polisaharde (dekstran), oligosaharide, manitol, bakteriocine te vitamine (Shin i Han, 2015).

2.2. Akvakultura

Akvakultura je uzgoj vodenih organizama u kontroliranim i polukontroliranim uvjetima u slatkim, blago slanim, slanim vodama, čak i u vodama visokog saliniteta. Marikultura je dio akvakulture i obuhvaća uzgoj u morskom okolišu ili boćatoj vodi. Akvakulturom se najviše uzgajaju ribe, mekušci i rakovi, no zastupljene su i alge (Stickney, 2001).

Krajem 20. stoljeća akvakulturom se ostvarilo 20 % globalne ribarske proizvodnje (FAO, 1998).

Ovo akvakulturu čini najbrže rastućim sektorom za proizvodnju proteina u svijetu. Ovaj razvoj je poželjan zbog konstantnog rasta svjetske populacije (Gram i Ringø, 2005).

Industrijski sektor akvakulture je usmjeren ka proizvodnji hrane za potrebe čovjeka, no postoje i brojni programi kojima je glavni cilj očuvanje brojnosti vodenih životinja koje su ugrožene zbog prekomjernog izlova poput očuvanja bakalara u Norveškoj (Stickney, 2001).

Hrvatska ima dugu tradiciju uzgoja vodenih organizama. Organizirani uzgoj kamenica u Malostonskom zaljevu zabilježen je još u 16. stoljeću. Hrvatska je pionir u uzgoju brancina i orade. Prvi uzgoj plavoperajne tune u plutajućim kavezima na Mediteranu započeo je na Jadranu, a Hrvatska je i dalje jedna od vodećih zemalja u uzgoju tune. Danas su lubin (*Dicentrarchus labrax*), orada (*Sparus aurata*), tuna (*Thunnus thunnus*), dagnje (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenice (*Ostrea edulis*) najznačajnije vrste u hrvatskoj akvakulturi koja se intenzivno razvija i ima stalni rast produktivnosti i zaposlenosti (Eurofish).

Utjecaj akvakulture na okoliš može biti značajan. Povećana emisija organskih tvari čiji su izvor fekalije iz uzgajanih organizama, lijekovi i druge tvari koje se koriste prilikom uzgoja te rizik prijenosa bolesti između divljih i uzgojenih vrsta mogu negativno utjecati na okolne ekosustave.

Danas se održiva akvakultura oslanja na znanstvena istraživanja i primjenu njihovih rezultata s ciljem poboljšanja poljoprivredne tehnologije koja će smanjiti negativan utjecaj na okoliš. Poboljšanje upravljanja hranjenjem, regulacija količine lijekova, modernizacija, obnova postojeće infrastrukture faktori su potrebni za postizanje ekološki, ekonomski i socijalno održive akvakulture (Stickney, 2001).

Sektor akvakulture se susreće i s problemom povećanog mortaliteta riba i morskih plodova uzrokovanog patogenim mikroorganizmima (Banerjee i Ray, 2017). Bakterijske infekcije uzrokuju najveće gubitke u stadiju ličinke vodenog organizma (Kang i sur., 2017).

Potrebno je zaustaviti oboljenja proizvoda akvakulture te ih pokušati zaštititi od kvarenja kao prehrambenih proizvoda. Prevencija i kontrola tih bolesti je do sada bila usmjerena prema upotrebi cjepiva i antibiotika, međutim liječenje primjenom antibiotika može uzrokovati razvoj rezistentnih bakterija. Kao alternativna metoda prevencije u posljednje vrijeme sve više se koriste probiotici koji su ekološki prihvatljivi i sposobni inhibirati nepoželjne mikroorganizme utječući pozitivno na imunitet samog domaćina (Ringø i sur., 2005).

U posljednje vrijeme, sve je veći naglasak na primjeni sojeva morskog porijekla kao probiotika, budući da su takve vrste već adaptirane na morski ekosustav i puno bolje mogu ispoljiti svoje pozitivne karakteristike.

2.2.1. Rakovi

Rakovi pripadaju skupini člankonožaca (*Arthropoda*) zajedno s paucima, insektima i stonogama te razredu *Crustacea* (Weis, 2012). Podgrupe *Crustacea* su škampi, rakovi, jastozi i krili. Kao i ostali člankonošci, rakovi imaju segmentirano tijelo sastavljeno od ponavljajućih sekcija, spojene udove te egzoskelet sastavljen od hitina. Većini većih vrsta egzoskelet je učvršćen sa kalcijevim karbonatom. Zbog čvrstog egzoskeleta člankonošci mogu rasti samo periodički, nakon što su odbacili stari oklop te prije očvršćivanja novog budući da hitin sprječava kontinuirani rast pa se moraju presvlačiti (Weis, 2012). Unutar razreda *Crustacea* jest red *Decapoda* (10 nogu). Osim pet pari nogu imaju i dva para ticala koji služe kao osjetilni organi (u njima se nalaze kemijski detektori) te par kliješta. Kod nametničkih vrsta rakova noge su zakržljale, a prvi i drugi par preobraženi su u osjetilna ticala, dok kod sesilnih vrsta prva dva para služe za pričvršćivanje, a ostali ekstremiteti služe za prihvaćanje hrane. Otprilike 15 000 vrsta sačinjava red *Decapoda*, a velik broj tih vrsta predstavljaju rakovi. Najveći broj morskih *Decapoda* pronađen je u tropima, malo sjevernije od ekvatora. U tom području, najveća raznolikost uočena je u zapadnom Indo-Pacifiku u kojemu su pronađene vrste koje nisu otkrivene u ostalim dijelovima svijeta (Weis, 2012).

Kod nekih vrsta rakova glava i prsa srasli su u glavopršnjak, dok se kod ostalih tijelo sastoji od tri dijela: glave, prsa i zatka. Čvršći dio vanjskog kostura naziva karapaks prekriva glavopršnjak i škrge. Karapaks štiti vitalne organe kao što je npr. srce, probavni sustav, reproduktivne organe te organe za izlučivanje. Rakove dijelimo u dvije skupine: „pravi

rakovi“ ili *Brachyura,* koji su većinom morski rakovi (procijenjeno oko 6700 vrsta) te *Anomura* (procijenjeno oko 2500 vrsta). Rakovi su odvojena spola te se legu iz jaja, a potomstvo je zaštićeno jer ženka nosi jaja na trbušnim nožicama (Weis, 2012).

2.3. Mikroorganizmi izolirani iz morskog okoliša

Iz morskog okoliša moguće je izolirati veliki broj raznovrsnih mikroorganizama (Habbu i sur., 2016). Populacija mikroorganizama koja je izolirana iz morskih organizama odraz je mikroflore okoliša za vrijeme ulova, pa tako školjke izlovljene u blizini grada sadrže veću brojnost i raznolikost mikroorganizama u odnosu na one izolirane iz morskih područja. Različite mikroorganizme (najčešće bakterije) moguće je izolirati sa hitinske ljuske, škrge riba te iz njihovog probavnog trakta, dok su mišićna tkiva i unutarnji organi svježe izlovljenih morskih organizama sterilni. Neki pripadnici *Crustacea* (npr. rakovi) imaju otvoren krvožilni sustav te se u hemolimfi može nalaziti značajan broj bakterija i to najčešće roda *Vibrio* (Roberts i sur., 2005).

Bakterije *Vibrio* imaju sposobnost zaraze velikog broja vodenih organizama poput školjkaša rakova, riba, ježeva i algi. Fenotipski su jako različita skupina bakterija te su mnoge vrste patogene, a jedna od patogenijih vrsta je *Vibrio parahaemolyticus,* vodeći uzročnik infekcija morskih životinja (Vandenberghe i sur., 2003). Yang i sur. (2017) su izolirali *V. parahaemolyticus* iz morske vode, riba i školjkaša, prilikom čega je od 504 uzorka 19,44 % testirano pozitivno na *V. parahaemolyticus*.

Habbu i sur. (2016) su iz morskih sedimenata izolirali bakterije *Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis,* aktinomicetu *Nocardiopsis dassonvillei* te *Streptomyces* sp., s ciljem pronalaska potencijalno novih vrsti mikroorganizama iz slabo istraženog morskog dna.

Endofitne bakterijske vrste *Arthobacter, Micrococcus* sp. i nova vrsta roda *Bacillus* izolirane su iz dvije vrste spužvi, *Aplysina aerophoba* i *Aplysina cavernicola*. Dobiveni izolati su pokazali antimikrobnu aktivnost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterija, meticilin rezistentnom *Staphylococcus aureus* (MRSA) i *Staphylococcus epidermis* (Ute i sur., 2001).

Dva epibiotička bakterijska roda, *Rhodococcus* i *Pseudomonas* izolirana su iz morske spužve *Petrosia ficiformis* u istraživanju Chelossi i sur. (2004). Oba izolata pokazala su dobru antimikrobnu aktivnost.

Čanak i sur. (2018) su istraživali mikrobnu populaciju svježe ribe i školjkaša Jadranskog mora. Od ukupno 15 uzoraka u 5 su bile prisutne bakterije iz roda *Vibrio*, iz 4 uzorka je izolirana *E. coli*. 5 uzoraka je bilo pozitivno na sulfitoreducirajuće klostridije dok je *Pseudomonas*

aeruginosa dokazan samo u uzorcima dagnji i kamenica. U svim uzorcima lubina su dokazane enterobakterije.

2.3.1. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz morskog okoliša

BMK su zajedno s ostalim pripadajućim bakterijama autohtone mikrobiote vodenih životinja važan dio obrambenog mehanizma protiv patogena (Ringø i sur., 2005). Talpur i sur. (2012) su iz probavnog trakta plavog raka (*Portunus pelagicus*) izolirali i identificirali *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus salivarius, Lactobacillus rhamnosus, Weissella confusa* i *Weissella cibaria*. Ispitana su probiotička svojstva izoliranih BMK te je zaključeno da su kulture *L.plantarum, L.salivarius* i *L.rhamnosus* pokazale najbolja probiotička svojstva, te su odabrane za poboljšanje uzgoja plavog raka u akvakulturi.

Gómez-Sala i sur. (2015) su iz ribe, morskih plodova i proizvoda od ribe izolirali bakterije *W.cibaria, Lactobacillus sakei subsp. carnosus, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis* kako bi izolirali i detektirali potencijalno nove bakteriocine.

Iz školjaka *Venerupis philippinarum, Batillus cornutus, Crassostrea gigas ,Cyclina sinen, Mytilus edulis* Kang i sur. (2016) izolirali su bakterije mliječne kiseline s ciljem izolacije novih probiotičkih kultura. Izolirali su 65 sojeva roda *Lactobacillus*, a od dobivenih izolata poseban naglasak je stavljen na vrstu *L. plantarum*, čiji je rast praćen u simuliranim uvjetima gastrointestinalnog trakta.

Kuda i sur. (2014) su u Japanu izolirali BMK iz gastrointestinalnog trakta raznovrsnih riba s ciljem identificiranja novih probiotika i starter kultura. Od prikupljenih 301 izolata, BMK su bile prisutne u njih 75 te su većinom bile prisutne u rubnom dijelu crijevne mikrobiote riba.

Amin i sur. (2017) proveli su izolaciju BMK iz gastrointestinalnog trakta atlantskog lososa (*Salmo salar*) i testirali im antimikrobnu aktivnost nakon čega su pozitivne uzorke identificirali. Izolati su identificirani kao *Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis* i *Pediococcus pentosaceus* te su kao i Kang i sur. (2016) dodatno ispitali prilagodbu BMK na stimulirane uvjete gastrointinalnog trakta.

2.3.2. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz rakova

Kosin i Rakshit (2010) su ispitivali termorezistenciju autohtonih mikroorganizama izoliranih iz pacifičkog bijelog škampa (*Litopenaeus vannamei*). Od 18 uzetih izolata 6 uzoraka je bilo otporno na visoke temperature, odnosno zabilježen je stabilan i neometan rast. Dva uzorka su identificirana kao BMK i to *L. plantarum* i *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides.*

Mohamad i sur. (2020) su iz probavnog trakta slatkovodnog škampa (*Macrobrachium rosenbergii*) izolirali BMK s ciljem identifikacije sojeva s probiotičkim potencijalom. Iz uzorka škampa identificirali su *Lactobacillus plantarum i Entercoccus faecalis* te su proučavali utjecaj temperature i koncentracije soli na rast BMK. Rezultati eksperimenta su pokazali kako izolati mogu rasti u širokom temperaturnom rasponu kao i pri visokim koncentracijama soli.

Pramono i sur. (2015) su iz gastrointestinalnog trakta blatnog raka (*Scylla serrata*) izolirali BMK koje proizvode bakteriocine i proteaze, s ciljem njihova korištenja u očuvanju riblje hrane.

Od 100 izoliranih uzoraka 34 su proizvodila proteaze, no samo su 4 izolata imala antimikrobnu aktivnost te su identificirana kao laktobacili.

Azahar i sur. (2018) su iz slatkovodnog škampa (*Macrobrachium rosenbergii)* izolirali mikrofloru sa ciljem identifikacije BMK. Antimikrobna aktivnost izolata testirana je prema patogenima *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio alginolyticus* i *Aeromonas hydrophila.* 57 % izolata inhibiralo je rast *V. parahaemolyticus i V. alginolyticus,* dok je 21 % izoliranih sojeva inhibiralo sva tri patogena. 16S rDNK sekvencioniranjem utvrđeno je da se radi o vrstama *Lactococcus garviae, L. lactis* te *Enterococcus faecalis* koji je jedini inhibirao sva tri patogena.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Jedinke škampa (*Nephrops norvegicus*) i hlapa (*Homarus gammarus*) nabavljene su na tržnici Dolac u Zagrebu. Neposredno nakon kupnje prebačene su u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Nakon ispiranja s destiliranom vodom kako bi se uklonile fizičke nečistoće, u aseptičnim uvjetima uzeti su uzorci probavnog sustava koji su kasnije korišteni za analizu mikrobne populacije.



Slika 2. Jedinke hlapa i škampa (vlastita fotografija)

3.1.2. Hranjive podloge

Podloge za određivanje ukupnog broja mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) sastava: pepton 15 g/l; mesni ekstrakt 3 g/l; NaCl 5 g/l; K_3PO_4 0,3 g/l; agar 18 g/l; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

Podloga za kvasce i plijesni

- SA (sladni agar) sastava: sladni ekstrakt 30 g/l; agar 17 g/l. pH vrijednost podloge je 5.5±0.1; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15 min.

Podloga za *Enterobacteriaceae*

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

Podloga za *Vibrio* sp.

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

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

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

3.1.3. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- tehnička vaga (Sartorius, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija i identifikacija mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane

Izolacija i identifikacija bakterija koje uzrokuju zdravstvenu neispravnost hrane iz uzoraka rakova provedena je primjenom klasičnih mikrobioloških metoda. Po 1 g uzorka probavnog sustava, sustava za izbacivanje škampa i hlapa te želuca škampa sterilno su preneseni u epruvetu s 9 ml fiziološke otopine kako bi se dobilo prvo razrjeđenje iz kojeg su napravljena još dva razrjeđenja. Nakon homogenizacije razrijeđenja su nacijepljena na selektivne podloge za određene vrste mikroorganizama navedene u tablici 1 te razmazana štapićem po Drigalskom. Dio Petrijevih zdjelica s hranjivim agarom inkubiran je na temperaturi hladnjaka (4 °C) radi izolacije psihrofilnih bakterija. Pokus je proveden u tri paralele, u aerobnim uvjetima. Nakon 48 sati, broj živih mikroorganizama određen je indirektnom metodom.

Tablica 1. Klasične mikrobiološke metode za izolaciju i identifikaciju mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane

Mikroorganizmi	**Metoda**	**Hranjivi medij**	**Uvjeti uzgoja (aerobno)**
Aerobne mezofilne bakterije	HRN EN ISO 4833-2:2013	Hranjivi agar (Biolife)	37 °C
			24-48 h
Enterobacteriaceae	HRN ISO 21528-2:2017	VRBG (Biolife)	37 °C
			24-48 h
Kvasci i plijesni	ISO 21527-1:2008	Sladni agar (Biolife	28 º C
			24-48 h
Vibrio sp.	ISO 21872-1:2017	TCBS agar (Biolife)	37 °C
			24-48 h

3.2.1.1. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

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

3.2.2. Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline

Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline provedena je klasičnim mikrobiološkim metoda uzgojem na MRS selektivnom agaru. Nakon 48 sati, sitne bijele kolonije su pomoću mikrobiološke ušice precijepljene na svježe selektivne podloge i opet inkubirane 48 sati pri 37 °C. Nakon toga su izolati precijepljeni u 10 mL sterilne tekuće i na kose podloge i inkubirani 48 sati pri 37 °C.

3.2.2.1. Spektrometrija masa MALDI TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight)

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

Priprema lizata stanica i izolacija proteina

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

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

Derivatizacija uzoraka

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

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

Separacija peptida kapilarnom tekućinskom kromatografijom

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

Tablica 2. Parametri analize MALDI TOF/TOF

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

Identifikacija proteina

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

U posljednje vrijeme u akvakulturi je sve veći naglasak na primjeni održivih ekoloških metoda s ciljem zaštite zdravlja morskih životinja. Sve veću primjenu počinju imati probiotičke kulture, a osobito zanimljive za istraživanje su bakterije mliječne kiseline izolirane iz morskog okoliša jer su kao takve već adaptirane na navedenu sredinu i njihove se pozitivne karakteristike i svojstva puno bolje ispoljavaju. Stoga je cilj ovog rada bio odrediti mikrobnu populaciju dvije vrste morskih rakova kao i ispitati prisutnost BMK. Rezultati izolacije i identifikacije mikrobne populacije klasičnim mikrobiološkim metodama prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Mikrobiološka analiza probavnog sustava škampa i hlapa

bakterije / **uzorci**	CFU/g					
	Aerobne mezofilne bakterije	Psihrofilne bakterije	Kvasci	*Enterobacteriacae*	*Vibrio* sp.	Bakterije mliječne kiseline
probavni sustav (hlap)	9×10^3	$1{,}8\times10^3$	1×10^2	n.d.	n.d.	n.d.
probavni sustav (škamp)	9×10^3	9×10^3	$2{,}7\times10^3$	n.d.	n.d.	n.d.
želudac (škamp)	$1{,}44\times10^4$	$7{,}8\times10^4$	$2{,}79\times10^4$	9×10^2	n.d.	n.d.
sustav za izbacivanje (hlap)	3×10^3	$4{,}2\times10^2$	$5{,}1\times10^1$	n.d.	n.d.	n.d.
sustav za izbacivanje (škamp)	$2{,}5\times10^4$	$1{,}3\times10^3$	n.d.	$1{,}4\times10^2$	n.d.	n.d.

Broj aerobnih mezofilnih bakterija se kod svih uzoraka kretao u rasponu od 10^3-10^4 CFU/g. Dobiveni rezultat je sličan onima od Karim i sur. (2015) koji su također zabilježili broj aerobnih mezofilnih bakterija oko 10^4 CFU/g kod svježih blatnih rakova (*Scylla olivacea*) uzorkovanih s tržnice, kao i Dabadé i sur. (2016) koji su ispitali sastav mikroflore tropskog škampa (*Penaeus notialis*) i zabilježili koncentraciju aerobnih mezofilnih bakterija u rasponu 10^4-10^5 CFU/g.

Psihrofilne bakterije su bile prisutne u svim uzorcima u rasponu od 10^2-10^4 CFU/g što je osjetno manje u odnosu na rezultate Barbosa i sur. (2016) koji su detektirali ove bakterije u koncentraciji oko 10^{11} CFU/g. Budući da psihrofili rastu u temperaturnom rasponu od 0-20 °C, a temperatura mora je bila veća u periodu izlova jedinki hlapa i škampa, posljedično je i koncentracija ovih bakterija niža.

Kvasci porasli u uzorcima škampa i hlapa (10^2-10^4 CFU/g) mogu biti posljedica unosa iz vanjskog okoliša tijekom hranjenja, budući da su rasprostranjeni u gotovo svim vrstama vodenog okoliša, tj. oceanima, morima, estuarijima, jezerima i rijekama (Kutty i Phillip, 2008).

Enterobakterije su izolirane iz samo dva uzorka škampa i to u koncentraciji 10^2 CFU/g. Slične rezultate su zabilježili Liu i sur. (2011) prilikom određivanja mikrobne populacije gastrointestinalnog trakta kineskog škampa (*Fenneropenaeus chinensis*).

Bakterije rod *Vibrio* nisu detektirane u niti jednom od uzoraka za razliku od Li i sur. (2012) koji su zabilježili prisutnost ove bakterije pomoću DGGE elektroforeze u uzorcima probavnog sustava blatnog raka (*Scylla paramamosain*) kao i Liu i sur. (2011) koji su zaključili kako su bakterije roda *Vibrio* i proteobakterije prevladavajuće bakterije u crijevima kineskih škampa (*Fenneropenaeus chinensis*).

Bijele kolonije specifičnog kiselkastog mirisa koje su porasle na MRS selektivnoj podlozi za uzgoj BMK su dodatno testirane spektrometrijom masa kako bi se utvrdilo o kojoj se točno vrsti radi. Rezultati su pokazali da niti jedan od 6 uzoraka nije pripadnik skupine BMK već je bila riječ o rodu *Enterococcus* i jednom izolatu roda *Stapylococcus* tj. *Lysinibacillus* (slika 3). Porast *S. saprophyticus* je najvjerojatnije posljedica kontaminacije budući da je ova bakterija često prisutna na ljudskoj koži. Enterokoki i bakterije roda *Bacillus* se često mogu izolirati iz GIT-a morskih životinja (Kaktcham i sur., 2017) i imaju sposobnost rasta na MRS podlozi. Ovakvi rezultati dodatno potvrđuju činjenicu da za identifikaciju mikroorganizama nije dovoljna samo fenotipska karakterizacija već i genetičke, odnosno proteomičke metode.

Sample ID	Target Pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)	Organism (second-best match)	log(score) (Conf.)	Consistency
1	G1	Enterococcus devriesei	1.56 (-)	Flavobacterium saccharophilum	1.38 (-)	(C)
2	G2	Staphylococcus saprophyticus	1.93 (+)	Staphylococcus saprophyticus	1.83 (+)	(B)
3	G3	Enterococcus devriesei	1.84 (+)	Enterococcus gilvus	1.52 (-)	(B)
5	G5	Enterococcus devriesei	1.63 (-)	Staphylococcus sciuri	1.21 (-)	(C)
Sample ID	Target Pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)	Organism (second-best match)	log(score) (Conf.)	Consistency
4	G4	Enterococcus devriesei	2.02 (+++)	Enterococcus gilvus	1.62 (-)	(A)
6	G6	Lysinibacillus xylanilyticus	2.01 (+++)	Lysinibacillus fusiformis	1.84 (+)	(A)

Slika 3. Rezultati identifikacije bakterijskih izolata MALDI-TOF/TOF analizom

5. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobivenih u ovom završnom radu može se zaključiti sljedeće:

1. U uzorcima probavnog sustava škampa i hlapa zabilježena je prisutnost različitih mikroorganizama
2. U niti jednom od uzoraka nije zabilježena prisutnost bakterija mliječne kiseline
3. Obzirom da se većina istraživanja mikrobne populacije rakova provodi u Kini, potrebna su istraživanja autohtonih vrsta rakova i njihovih mikroorganizama kako bi se stekao uvid u mikrobnu raznolikost i biološki potencijal

6. LITERATURA

Amin M., Adams M., Bolch C. J., Burke C. M. (2017) *In vitro* screening of lactic acid bacteria isolated from gastrointestinal tract of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) as probiont candidates. Aquaculture International:Journal of the European Aquaculture Society **25**:485-498.

Axelsson L. (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3.izd., Salminen S., von Wright A., ur., CRC Press. str. 1.

Azahar N. Z., Iehata S., Fadhil F., Bulbul M., Kader M. A. (2018) Antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from Malaysian prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Journal of Environmental Biology **39**:821-824.

Banerjee G., Ray A. K. (2017) The advancement of probiotics research and its application in fish farming industries. Research in veterinary science **115**:66-77.

Barbosa L. J., Ribeiro L. F., Lavezzo L. F., Barbosa M. M. C., Rossi G. A. M., Do Amaral L. A. (2016) Detection of pathogenic *Escherichia coli* and microbiological quality of chilled shrimp sold in street markets. Letters in applied microbiology **62**:372-378.

Chelossi E., Milanese M., Milano A., Pronzato R., Riccardi G. (2004) Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae). Journal of experimental marine biology and ecology **309**:21-33.

Čanak I., Markov K., Gavrilović A., Bosanac P., Jug-Dujaković J., Jakopović Ž., Kostelac D., Pleadin J., Frece J. (2018) Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam **13**:44-51.

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

Dabadé D. S., Wolkers-Rooijackers J. C., Azokpota P., Hounhouigan D. J., Zwietering M. H., Nout M. R., den Besten H. M. (2016) Bacterial concentration and diversity in fresh tropical shrimps (*Penaeus notialis*) and the surrounding brackish waters and sediment. International journal of food microbiology **218**:96-104.

Eurofish International Organisation, < https://www.eurofish.dk/croatia > Pristupljeno 15. srpnja 2021.

Frece J., Markov K., Čvek D., Kovačević D., Krcivoj T. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz "slavonskog kulena" kao probiotičke funkcionalne starter kulture. Meso: prvi hrvatski časopis o mesu **12**:210-216.

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

Frece J., Vrdoljak M., Filipčić M., Jelić M., Čanak I., Jakopović Ž., Pleadin J., Gobin I., Landeka Dragičević T., Markov K. (2016) Mikrobiološka ispravnost i raznolikost autohtone mikrobne populacije sira iz mišine. Food Technology and Biotechnology **54**:129-134.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, < https://www.fao.org/fishery/aquaculture/en > Pristupljeno 16.srpnja 2021.

Goldstein E. J., Tyrrell K. L., Citron D. M. (2015) *Lactobacillus* Species: Taxonomic Complexity and Controversial Susceptibilities. Clinical Infectious Diseases **60**:98–107.

Gómez-Sala B., Muñoz-Atienza E., Sánchez J., Basanta A., Herranz C., Hernández P. E., Cintas, L. M. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. European Food Research and Technology **241**:341-356.

Gram L., Ringø E. (2005) Prospects of fish probiotics. U: Biology of Growing Animals, Mosenthin R., Zentek J., Zebrowska T., ur., Elsevier. str. 379-417.

Habbu P., Warad V., Shastri R., Madagundi S., Kulkarni V. H. (2016) Antimicrobial metabolites from marine microorganisms. Chinese journal of natural medicines **14**:101-116.

Hatti-Kaul R., Chen L., Dishisha T., Enshasy H. E. (2018) Lactic acid bacteria: from starter cultures to producers of chemicals. FEMS Microbiol Letters **365**:1-41.

Kaktcham P.M, Temgoua J-B, Zambou F.N, Diaz-Ruiz G., Wacher C., De Lourdes-Pérez-Chabela M. (2017) Quantitative analyses of the bacterial microbiota of rearing environment, tilapia and

common carp cultured in earthen ponds and inhibitory activity of its lactic acid bacteria on fish spoilage and pathogenic bacteria. World Journal of Microbiology and Biotechnology **33**(2):1-12.

Kang C. H., Shin Y., Kim Y., So J. S. (2016) Isolation of *Lactobacillus* strains from shellfish for their potential use as probiotics. Biotechnology and bioprocess engineering **21**:46-52.

Kang M. S., Jung Y. G., Jang D. H. (2017) A study on the search of optimal aquaculture farm condition based on machine Learning. The Journal of The Institute of Internet, Broadcasting and Communication **17**:135-140.

Karim F., Mustafa M. G., Ahsan D. A., Khan M. A. R. (2015) Bacterial flora of mud crab, *Scylla olivacea*, collected from different markets of Dhaka City. Bangladesh Journal of Zoology **43**:55-62.

Kosin B., Rakshit S. K. (2010) Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous thermotolerant probiotics for application to white shrimp feed. Aquaculture **306**: 302-309.

Kuda T., Kawahara M., Nemoto M., Takahashi H., Kimura B. (2014) *In vitro* antioxidant and anti-inflammation properties of lactic acid bacteria isolated from fish intestines and fermented fish from the Sanriku Satoumi region in Japan. Food research international **64**:248-255.

Kutty S. N., Philip R. (2008) Marine yeasts—a review. Yeast **25**:465-483.

Li S., Sun L., Wu H., Hu Z., Liu W., Li Y., Wen X. (2012) The intestinal microbial diversity in mud crab (*Scylla paramamosain*) as determined by PCR-DGGE and clone library analysis. Journal of applied microbiology **113**:1341-1351.

Liu H., Wang L., Liu M., Wang B., Jiang K., Ma S., Li Q. (2011) The intestinal microbial diversity in Chinese shrimp (Fenneropenaeus chinensis) as determined by PCR-DGGE and clone library analyses. Aquaculture **317**:32–36.

Mohamad N., Manan H., Sallehhuddin M., Musa N., Ikhwanuddin M. (2020) Screening of Lactic Acid Bacteria isolated from giant freshwater prawn (Macrobrachium rosenbergii) as potential probiotics. Aquaculture Reports **18**:1-5.

Porto M. C. W., Kuniyoshi T. M., Azevedo P. O. S., Vitolo M., Oliveira R. S. (2017) *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. Biotechnology Advances **35**:361-374.

Pramono H., Suciati P., Andriyono S. (2015) Isolation of lactic acid bacteria that produce protease and bacteriocin-like substance from mud crab (*Scylla* sp.) digestive tract. ILMU KELAUTAN: Indonesian Journal of Marine Sciences **20**:33-37.

Ringø E., Schillinger U., Holzapfel W. (2005) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. U: Biology of growing animals, Mosenthin R., Zentek J., Zebrowska T., ur., Elsevier. str. 427.

Roberts T. A. , Cordier J.-L., Gram L., Tompkin R. B., Pitt J. I., Gorris L. G. M., Swanson K. M. J. (2005) Fish and fish products. U: Microorganisms in Foods 6, 2. izd., International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ur., Springer. str. 197-198.

Shin S. Y., Han N. S. (2015) *Leuconostoc* spp. as starters and their beneficial roles in fermented foods. U: Beneficial microorganisms in food and nutraceuticals, Liong M. T., ur., Springer. str. 114-115.

Stickney R. (2001) Aquaculture. U: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4.izd., Othmer K., ur., John Wiley & Sons, Inc. str. 182.

Šušković J., Brkić B., Matošić S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. Mljekarstvo: časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka **47**: 57-73.

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010) Antimicrobial activity–the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Technology and Biotechnology **48**:296-307.

Talpur A. D., Memon A. J., Khan M. I., Ikhwanuddin M., Daniel M. D., Abol-Munafi A. B. (2012) Isolation and screening of lactic acid bacteria from the gut of blue swimming crab, P. pelagicus, an in vitro inhibition assay and small scale in vivo model for validation of isolates as probiotics. Journal of Fisheries and Aquatic Science **7**:1.

Ute H., Michael S., Michael W., Fieseler L., Gernert, C., Hacker, J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. FEMS Microbiology Ecology **35**:305-312.

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

Von Wright A., Axelsson L. (2011) Lactic Acid Bacteria: An Introduction. U: Microbiological and Functional Aspects, 4. izd., Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A., ur., CRC Press. str. 2-4.

Weis J. S. (2012) Walking sideways: the remarkable world of crabs. Cornell University Press. str. 4-6.

Wu C., Huang J., Zhou R. (2017) Genomics of lactic acid bacteria: Current status and potential applications. Critical Reviews in Microbiology **43**:393-404.

Yang Q., Lü Y., Zhang M., Gong Y., Li Z., Tran N. T., He Y., Zhu C., Lu Y., Zhang Y., Li S. (2019) Lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis* Y17 and *Pediococcus pentosaceus* G11, improved growth performance, and immunity of mud crab (*Scylla paramamosain*). Fish & shellfish immunology **93**:135-143.

Yang Y., Xie J., Li H., Tan S., Chen Y., Yu H. (2017) Prevalence, antibiotic susceptibility and diversity of *Vibrio parahaemolyticus* isolates in seafood from South China. Frontiers in microbiology **8**: 1-9.

Zhao Y., Wang Y., Song Z., Shan C., Zhu R., Liu F. (2016) Development of a simple, low-cost and eurytopic medium based on *Pleurotus eryngii* for lactic acid bacteria. AMB Express **6**:1-8.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

