Autohtona mikrobna populacija riba i školjkaša

Logarušić, Marijan

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:159:936030

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

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

Marijan Logarušić

6623/BT

AUTOHTONA MIKROBNA POPULACIJA RIBA I ŠKOLJKAŠA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Mikrobiologija

Mentor: Dr.sc. Jadranka Frece, izv.prof.

Zagreb, 2015.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

AUTOHTONA MIKROBNA POPULACIJA RIBA I ŠKOLJKAŠA

Sažetak: Svrha ovog rada bila je izolirati i odrediti autohtonu mikrobnu populaciju iz uzoraka riba (lubin i orada) i školjaka (dagnje i kamenice), ulovljenih u zimskom i ljetnom periodu u Jadranskom moru, kao izvor potencijalnih bioprotektivnih starter kultura. Iz uzoraka su izolirani prirodno prisutni sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) porasli na MRS i M17 agaru. Korištenjem biokemijskih (API) metoda identifikacije ustanovljena je prisutnost slijedećih bakterijskih vrsta: *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus helveticus, Leuconostoc mesenteroides, Lactococcus lactis* i *Pediococcus damnosus.*

Ključne riječi: lubin, orada, dagnje, kamenice, autohtona mikrobna populacija, bakterije mliječne kiseline, starter kulture

Rad sadrži: 29 stranica, 10 slika , 10 tablica, 24 literaturne reference

Jezik izvornika: Hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: izv. prof. dr.sc. Jadranka Frece

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of food Technology and Biotechnology

Undergraduate study Biotechnology

Department of biochemical engineering

Laboratory for general microbiology and food microbiology

INDIGENOUS MICROBIAL POPULATIONS IN FISHES AND SHELLFISHES

Abstract: The purpose of this study was to isolate and identificate the indigenous microbial population of samples from fishes (sea bass and sea bream) and shellfishes (mussels and oystres), caught in winter and summer period in the Adriatic Sea, as a source of potential bioprotective starter cultures. From the samples, naturally occurring strains of lactic acid bacteria (LAB) grew on MRS and M17 agar, were isolated. Using biochemical (API) methods of identification established the presence of the following bacteria species: *Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus helveticus, Leuconostoc mesenteroides, Lactococcus lactis* and *Pediococcus damnosus.*

Keywords: sea bass, sea bream, mussels, oystres, indigenous microbial population, lactic acid bacteria, starter culture

Thesis contain: 29 pages, 10 figures, 10 tables, 24 literature references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Associate prof. dr.sc. Jadranka Frece

Thesis delivered: September, 2015.

Sadržaj

1. **Uvod**……..1

2. **Teorijski dio**……....3

2.1. Lubin.....3

2.2. Orada……...3

2.3. Kemijski sastav ribe……....4

2.4. Školjkaši……..4

2.4.1. Kamenice……...5

2.4.2. Dagnje……...5

2.5. Bakterije mliječne kiseline (BMK)……6

2.5.1. Rod *Lactobacillus* ……7

2.5.2. Rod *Lactococcus* ……7

2.5.3. Rod *Leuconostoc*……8

2.5.4. Rod *Pediococcus*……8

2.6. Starter kulture……8

3. **Eksperimentalni dio**.....10

3.1. Materijali……10

3.1.1. Uzorci za mikrobiološku analizu……...10

3.1.2. Pribor i oprema……..11

3.1.3. Podloga za mikrobiološku analizu……12

3.2. Metode rada…….……..13

3.2.1. Uzgoj i izolacija mikroorganizama……13

3.2.1.1. Bakterije mliječne kiseline……..13

3.2.1.2. Bojanje po Gramu……...…..13

3.2.1.3. Biokemijski testovi (API)…….....14

4. **Rezultati**……..17

5**. Rasprava**……25

6. **Zaključak**……26

7. **Literatura**……27

1.Uvod

Ribe i školjkaši su od davnina poznati kao jedan od glavnih izvora hrane u priobalnim područjima, kako mora tako i rijeka i jezera. U današnje vrijeme raste interes potrošača za nutritivno bogatom, ali sigurnom, odnosno kvalitetnom hranom što je doprinjelo povećanoj konzumaciji riba i ribljih proizvoda. Takva vrsta proizvoda smatra se hranom visoke prehrambene vrijednosti i visoko je preporučena od strane nutricionista.

Riba se općenito razlikuje od crvenog mesa po strukturi i kemijskom sastavu i to je najbolje vidljivo u količini masnoga tkiva koje kod ribe nije izraženo u obliku masnih naslaga, ali može dosegnuti i do 25% te je rasprostranjeno unutar mišića. Važna osobina koja doprinosi kvaliteti ribe je mala količina vezivnoga tkiva koja iznosi oko 3% te mali udio kostura u ukupnoj tjelesnoj masi. Na populaciju i sastav mikroflore u ribama najviše utječe okoliš iz kojeg potječu, određena temperatura tog okoliša, godišnje doba u koje su te iste izlovljene te sami uvjeti izlova, prerade i rukovanja ribom (Duraković i suradnici, 2002).

Školjkaši se po svom kemijskom sastavu razlikuju od riba i rakova po značajnijoj koncentraciji ugljikohidratnih tvari, a manjoj koncentraciji ukupnog dušika u svome mesu. Ugljikohidrati iz mesa školjkaša su pohranjeni u obliku glikogena te je upravo to najveća razlika u sastavu mesa između riba i rakova te školjkaša i mekušaca. Mikroflora u školjkaša varira ovisno o kvaliteti vode u kojoj su ulovljeni, temperaturi okoliša te godišnjem dobu u kojem su izlovljeni te sami uvjeti izlova, prerade i rukovanja ribom (Duraković i suradnici, 2002).

Međutim, ribe, školjkaši i ostali morski organizmi kao izvor hrane velike prehrambene vrijednosti, imaju problem velike osjetljivosti na kvarenje zbog mikrobiološke i biokemijske razgradnje. Stoga se javila potreba za razvojem učinkovitog tretmana obrade koji bi produžio rok trajanja svježih morskih organizama, ali i sačuvao njihova organoleptička i nutritivna svojstva. Dosad su se koristile metode zasnovane na dodavanju kemijskih konzeravanasa, antibiotika te različitim fizičkim tretmanima, kao šta su zagrijavanje, hlađenje ili primjena visokog hidrostatskog tlaka, ali te metode nisu zadovoljile gore navedene zahtjeve. Alternativa ovim metodama je upotreba bakterija mliječene kiseline (BMK), kao starter kultura, za konzerviranje riba i školjaka na prirodan način. One imaju antagonističku i inhibicijsku sposobnost prema mikroorganizmima kvarenja, bez negativnih posljedica na organoleptička i nutritivna svojstva domaćina (Nilsson i sur., 2005; Nes, 2011).

Cilj ovog rada je izolirati i odrediti autohtonu mikrobnu populaciju iz uzoraka riba (lubin i orada) i školjaka (dagnje i kamenice), ulovljenih u zimskom i ljetnom periodu u Jadranskom moru, kao izvor potencijalnih protektivnih starter kultura.

2. Teorijski dio

2.1.Lubin

Lubin (lat. *Dicentrarchus labrax*), pripada obitelji lubina (*Moronidae*), čije ime vuče korijenje od latinske riječi lupus,što znači vuk. Tijekom života može narasti do 1 metar duljine i dosegnuti težinu od 14 kg. Glava mu je srednje veličine, s nerazmjerno velikim ustima. Lubin nema velike zube, ali su zato brojni i oštri. Tijelo lubina pokriveno je malim ljuskama, svijetle je olovnosive boje koja postrance prelazi u sivosrebrnastu, a dolje u srebrnasto bijelu. Iznad škržnog poklopca na tijelu ima crnkastu mrlju, dok na samom škržnom poklopcu ima nekoliko jakih bodlji. Možemo ga pronaći duž cijele jadranske obale i to na svakoj vrsti dna, u mutnom, bočatom i bistrom, slanom moru. Najčešće ga se može pronaći oko ušća rijeka i uvala gdje se osjeća prisutnost slatke vode iz podmorskih izvora na malim dubinama od 2 do 5 metara, iako zna zaći u u veće dubine. Najpoznatija lovišta u Hrvatskoj su izvan zapadne Istre, Novigradsko more, vode oko sjevernojadranskih otoka (Silba, Olib i Pag), Šibenski zaljev s Prokljanom, okolica Splita te ušće Neretve. Meso mu je odlična okusa i vrlo je traženo. (Ivanišević, 1987. , Milišić, 2007.)

2.2. Orada

Orada ili komarča (lat. *Sparus aurata*), pripada obitelji ljuskavki (*Sparidae*). Orada se ističe velikom i robusnom glavom s razvijenim čeljustima i krupnim usnama. Gornja vilica je malo isturena nad donjom. Tijelo joj je čvrste građe, ovalnog oblika, a u boku je stisnuta. Na gornjem dijelu tijela je modrikastozelenkastosive boje, a postrance je sivosrebrnaste boje. Donji dio tijela je srebrnastobijel. Na gornjem dijelu škržnog otvora nalazi se živozlatna do narančasta mrlja, a gornji kut škržnih otvora obuhvaćen je ljubičastocrnom mrljom. Između očiju je karakteristični svijetlozlatni most. U Jadranskom moru se orade mrijeste u prosincu i djelomično u sječnju na pješčanim terenima. Orada je dvospolac. U prvom razdoblju spolne zrelosti je mužjak, a čim prijeđe težinu od 0,50 do 0,60 kg, pretvara se u ženku i tako ostaje do kraja života. Naraste do 60 cm u duljinu, a dostigne težinu do 10 kg. Rasprostranjena je u cijelom primorju i to bez obzira na vrstu dna, iako preferira pjeskovita i šljunkovita dna. Voli dubine od 5 do 10 metara i nikad ne ide dublje od 50 m (Ivanišević, 1987. , Milišić, 2007.).

2.3. Kemijski sastav ribe

Kemijski sastav ribe značajno varira ovisno o vrsti ribe, prehrani, starosti, spolu, migraciji, uvjetima okoliša te godišnjem dobu. Sastavom se bitno ne razlikuje od mesa toplokrvnih životinja. Meso ribe ima mnogo manje vezivnog tkiva pa je nježnije, podložnije fermentativnoj i mikorbiološkoj razgradnji, a i lakše se probavlja. Količina vode u ribama se kreće od 60 do 80 % što je više nego u mesu toplokrvnih životinja. Kao najvredniji sastojci ribljeg mesa ističu se bjelančevine, koje uz uglikohidrate i masti čine osnovu pravilne prehrane. Količina i sastav bjelančevina u ribi variraju od 12 do 24 % te se znatno brže probavljaju nego bjelančevine toplokrvnih životinja. Također riblje bjenančevine imaju izrazitu vrijednost u boljem iskorištenju te pogodnom aminokiselinskom sastavu ribljeg mesa. Riblje bjelančevne sadrže sve esencijalne aminokiseline (Šoša,1989.). Riba se prema rasporedu masti u tijelu dijeli na plavu i bijelu. Kod plave ribe mast se pohranjuje u masnim stanicama po cijelom tijelu, dok je mast u bijeloj ribi uglavnom pohranjena u jetru i dijelom u trbušnu šupljinu. Količina masti u mesu ribe kreće se od 0,7 do 20%. U sastavu masti riba nalazi se nerijetko i više od 50 različitih masnih kiselina (Šoša, 1989.; Hadžiosmanović i sur., 2002.). Meso riba sadrži svega 0,5 do 0,8% ugljikohidrata i to u najvećem dijelu glikogena te je bogato vitaminima A, D, E i B kompleksa kao i mineralnim tvarima (soli kalija, natrija, kalcija, magnezija i fosfora, željezo, bakrom, jod, krom, cink i fluor), (Bogut i sur., 1996.).

2.4. Školjkaši

Školjkaši *(Bivalvia)* ulaze u razred beskralježnjaka iz koljena mekušaca *(Mollusca).* Vodene su, pretežito morske životinje, sploštena tijela obavijena mekim plaštom vanjskog epitela kojega izlučuje lijevu i desnu vapnenastu ljušturu (školjku). Ljušture su spojene elastičnom vezom te se stezanjem iste ljuštura otvara, a pomoću dva snažna mišića zatvara. Glava školjkaša je reducirana. Na prednjem je dijelu tijela usni otvor, nastavlja se u jednjak i želudac s parnim jetrima. Organi za disanje sastoje se od dvaju redova škržnih listića *(lamella)* smještenih ispod plašta. Na krajevima tijela nalaze se izmetni i škržni otvori. S donje strane tijela prstasto je ili sjekirasto mišićavo stopalo, koje životinji uglavnom služi za ukopavanje u pijesak ili mulj, a u manjoj mjeri za puzanje. Poznato je preko 20 000 vrsta. U ljudskoj su

prehrani od davnina te se najviše cijene i umjetno uzgajaju kamenice *(Ostrea)* i dagnje *(Mytilus)*.

2.4.1.Kamenice

Kamenica (*lat. Ostrea edulis*), ili Europska kamenica, je morska školjka iz porodice kamenica (*Ostreidae*). Hrvatska je jedno od rijetkih područja gdje je opstala europska kamenica, koja je u ostatku Europe početkom prošlog stoljeća uništena bolešću. Tijelo kamenice (meso) smješteno je unutar dviju nesimetričnih ljuštura. Ljušture spaja jaki mišić. Duguljastog je i srcolikog oblika te nazubljenih rubova ljušture. Boja ljušture varira od kameno do bjelkasto sive boje. Naraste do 13 cm te se hrani isključivo planktonima. Dvospolac je,a mrijesti se u svibnju i rujnu. Živi u plitkim, priobalnim vodama do 10 m dubine. Hrvatska ima mnogo dobrih položaja za život kamenice. Ističu se: svi zaljevi i kanali Istre, Creska uvala, Klimno (Krk), Novigradsko more, Pirovački zaljev, Pašmanski kanal, Šibenski zaljev, manje uvale oko Splita, Malostonski zaljev i Mljetska jezera. Kamenice se smatraju delikatesom koja se jede sirova s dodatkom limunova soka, jako je hranjiva, jer meso sadrži puno bjelančevina, ugljikohidrata i vitamina. Od vitamina se u kamenicama nalaze vitamini A, B1, B2, C, D te E. U mesu kamenica nalazimo i važne esencijalne aminokiseline (lizin, histidin, tirozin) te je njihovo meso također bogato mineralnima. Masne kamenice sadrže veću količinu glikogena koja se mijenja tijekom godine, pa tako i kvaliteta kamenica, naročito u doba mrijesta. Miris, izgled i okus kamenica varira s njezinim fiziološkim stanjem i zavise o sezoni u kojoj se jede (Mašić M., 2004.).

2.4.2. Dagnje

Mediteranska dagnja (lat. *Mytilus galloprovincialis*) je školjkaš koji živi u Mediteranu, uključujući i Jadranskom moru. Dagnja ima tamno modru do crnu boju ljušture. Ljušture imaju oblik izduženog trokuta te su simetrične i s oštrim rubovima. Prosječna veličina do koje jedinke narastu iznosi 5 cm, a može narasti i do maksimalnih 12 cm. Jedinke nalazimo na zaklonjenim i umjereno izloženim stijenama i općenito ih ne nalazimo na visoko zamućenim i pjeskovitim područjima. Prevladava u području izmjene plime i oseke, a u većim dubinama u prirodi je ne nalazimo, iako vrlo dobro raste i na većim dubinama, ali u uzgojnim parkovima (Bajnoci Alen, 2014.). Samoniklu dagnju nalazimo uzduž istočne obale Jadrana. Naselja

dagnji uglavnom su gusta i dosta prostrana. To osobito vrijedi za neka područja, kao npr. Novigradsko more, Šibenski zaljev i kanal, Malostonski i Pulski zaljev. Dagnja je jestiva školjka ukusna mesa. Iz mora se dagnja može vaditi tijekom čitave godine, ali su topliji mjeseci pogodniji za takvu aktivnost, a tada je punija nego obično. Dagnja je zdrava za jelo samo s kamena, drva ili konopa, te iz čistoga mora, daleko od bilo kakvih oblika zagađivanja. Takve uvjete dagnja ima na mnogim dijelovima naše obale, a još bolje u uzgajalištima, gdje se strogo kontrolira sanitarna kakvoća mora. (S.N.R.U. Marjan, 2015.) Kao i kod većina školjkaša, meso dagnji je bogato bjelančevinama. Njihova vrijednost je u lakšoj probavljivosti,odličnom iskorištenju kao i boljem aminokiselinskom sastavu. Osim toga meso je bogato vitaminima A, C, D i E te vitaminima iz B-kompleksa. I mineralne tvari obilato su zastupljene i to u optimalnom omjeru. (Mašić M.,2014.)

2.5. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline čine skupinu Gram-pozitivnih, mezofilnih, nesporogenih bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu kao jedini ili glavni krajnji produkt metabolizma ugljikohidrata u procesu fermentacije. U glavne BMK rodove spadaju *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, i *Streptococcus* dok u periferne rodove spadaju *Aerococcus*,*Carnobacterium*,*Enterococcus*,*Oenococcus*,*Sporolactobacillus*,*Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weisella*. Javljaju se u obliku štapića i koka i uglavnom ne proizvode enzim katalazu. Izvori bakterija mliječne kiseline su hrana (mliječni proizvodi, fermentirano meso, kiselo tijesto, fermentirano povrće, silaža, bezalkoholna pića, probiotički proizvodi) biljke i otpadne vode, ali nalaze se i u genitalnom, intestinalnom i respiratornom traktu ljudi i životinja (Schleifer i Ludwig 1995; Šušković i Kos, 2000). Veoma duga tradicija upotrebe bakterija mliječne kiseline bez štetnog utjecaja na zdravlje čovjeka pribavila im je GRAS (Generally Recognized As Safe) status prema US FDA, odnosno QPS status (Qualified Presumption of Safety) prema regulativi Europske unije (Frece i sur., 2010 a i c). Bakterije mliječne kiseline mogu djelovati antagonistički zbog sniženja pH uslijed nakupljanja organskih kiselina, proizvedenog vodikovog peroksida (u aerobnim uvjetima), proizvedenog diacetila i proizvedenih specifičnih inhibicijskih supstancija primjerice bakteriocina (Šušković, 2000). Organske kiseline (mliječna i octena) djeluju na staničnu membranu bakterija, mijenjaju potencijal membrane i inhibiraju aktivni transport. Inhibitorni učinak kiselina ovisi o vrsti kiseline i njenoj množinskoj koncentraciji. Vodikov peroksid se nakuplja

u stanici nekih mikroorganizama i djeluje kao jako oksidativno sredstvo na lipide i proteine u staničnoj membrani. Ugljikov dioksid nastaje kao produkt heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline i stvara anaerobne uvjete, koji su toksični za neke aerobne mikroorganizme, a osim toga on snižava pH vrijednost unutar i izvan stanice. Kod male koncentracije ugljikovog dioksida on može stimulirati rast nekih bakterija. Diacetil nastaje kao produkt citratnog ciklusa i odgovoran je za miris i okus maslaca i drugih fermentiranih mliječnih proizvoda. Proizvodnja specifičnih inhibicijskih supstancija, kao što su bakteriocini, također je osobina bakterija mliječne kiseline. Bakteriocini su po definiciji ekstracelularne supstancije proteinske prirode, djelotvorne prema sojevima iste ili srodne vrste. Najpoznatiji bakteriocin iz bakterija mliječne kiseline je nizin. (Šušković, 1997).

2.5.1. Rod *Lactobacillus*

Bakterije roda *Lactobacillus* su Gram-pozitivni, nesporogeni štapići ili kokobacili, sa udjelom gvanina i citozina u DNA od 33% do 55%, koji mogu rasti samo na kompleksnim podlogama. To su strogo fermentirane, aerotolerantne ili anaerobne, acidofilne bakterije i imaju složene prehrambene potrebe (za ugljikohidrate, aminokiseline, peptide, estere masnih kiselina, soli, derivate nukleinskih kiselina i vitamine). Na temelju fermentativnih karakteristika bakterije roda *Lactobacillus* mogu se svrstati u tri grupe: obligatno homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne (Hammes i Vogel, 1995.).
Lactobacillus delbrueckii subsp. *Bulgaricus* jedna je od nekoliko bakterija koje se koriste za proizvodnju jogurta. To je Gram-negativna, štapičasta bakterija koja je nepokretna i ne tvori spore. Smatra se acidofilnom, budući da joj je za efikasan rast potreban nizak pH (oko 5.4-4.6). Bakterije fermentiraju laktozu u mliječnu kiselinu, koja onda djeluje kao konzervans.

2.5.2. Rod *Lactococcus*

Bakterije roda *Lactococcus* su Gram-pozitivne, katalaza-negativne, obično su kružne ili ovoidne, dimenzija 0.5–1.2 μm sa 0.5–1.5 μm. Nalazimo ih u parovima ili kraćim lancima, ne stvaraju spore i nisu pokretne. Poznate su kao homofermentativne bakterije koje u procesu

glukozne fermentacije proizvode mliječnu kiselinu. *Lactococcus* se koristi i u biotehnološkoj industriji jer se jednostavno uzgajaju u industrijskom mjerilu na bazi sirutke.

2.5.3. Rod *Leuconostoc*

Leuconostoc je rod Gram-pozitivnih bakterija, koje se nalaze unutar obitelji *Leuconostocaceae*. Obično su kružne te tvore lance. Bakterije roda *Leuconostoc* su katalaza-negativne i heterofermentativne te proizvode dekstran iz saharoze. Bakterije ovog roda vrlo često se koriste u proizvodnji fermentirane hrane budući da imaju sposobnost proizvodnje mliječne kiseline i diacetila.

2.5.4. Rod *Pediococcus*

Bakterije roda *Pediococcus* su Gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline, koji se nalaze unutar obitelji *Lactobacillaceae*. Oni su isključivo homofermentativni. Mogu se koristiti kao probiotici, a najčešće se dodaju kao mikrobna kultura u proizvodnji sireva i jogurta.

2.6. Starter kulture

Starter kulture su pripravci koji sadrže žive mikroorganizme, a primjenjuju se za dobivanje različitih fermentiranih namirnica s krajnjim ciljem oplemenjivanja tih namirnica s različitim proizvodima metabolizma upotrijebljenih starter kultura. Funkcionalne starter kulture se mogu definirati kao kulture koje posjeduju barem jedno funkcionalno svojstvo, s krajnjim ciljem poboljšanja kvalitete konačnog proizvoda koji će imati pozitivan učinak na zdravlje i fiziologiju potrošača (Šušković i Kos, 2001). Raznolikost gotovih proizvoda, njihova funkcionalna i organoleptička vrijednost uvelike ovise o pravilnom izboru starter kulture koja gotovom proizvodu daje željena svojstva kao što su okus, miris i konzistencija. Bakterije mliječne kiseline su najviše upotrebljavane starter kulture u industrijskoj proizvodnji fermentiranih proizvoda. Identifikacija tehnoloških bakterija nužna je kako bi se odabarale vrste koje će se koristiti kao autohtone starter kulture (Villani i sur., 2007). Poželjno djelovanje BMK na zdravlje domaćina u prvom redu obuhvaća: antimikrobno djelovanje prema patogenim mikroorganizama, pospješuje reproducibilnost, rast i toleranciju na stres, poboljšanje probavljivosti nutrijenata i metabolizma laktoze, stimulaciju imunološkog

sustava, antikancerogeno djelovanje i snižavanje koncentracije kolesterola u serumu (Myers D., 2007.). Starter kulture mogu imati i nepoželjno djelovanje, ako stvaraju nepoželjne metaboličke produkte H_2O_2, CO_2, biogene amine, mikotoksine itd. (Frece i sur., 2010 a i b).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci za mikrobiološku analizu

Eksperimenti su provedeni na uzorcima lubina, orade, dagnji i kamenica uzgojenih u Jadranskom moru tijekom zimskog i ljetnog perioda. Svježi uzorci lubina, dagnji i kamenica bili su pohranjeni u ledu do obavljanja mikrobioloških analiza te su analizirani u roku od 24 sata. Postupak uzorkovanja pojedinih dijelova svakog organizma proveden je u sterilnim uvjetima.

Tablica 1. Uzorci korišteni u eksperimetima – **zimski period**

Primjer: Z.L.1. – zimski period, lubin, uzorak 1

LUBIN	UZORAK 1 (Z.L.1.)	SLUZ S POVRŠINE TIJELA
	UZORAK 2 (Z.L.2.)	ŠKRGE
	UZORAK 3 (Z.L.3.)	ŽELUDAC,CRIJEVA I SLUZ
	UZORAK 4 (Z.L.4.)	SADRŽAJ ŽELUCA
DAGNJE	UZORAK 1 (Z.D.1.)	MEĐULJUŠTURNA TEKUĆINA I SLUZ
	UZORAK 2 (Z.D.2.)	ŠKRGE
	UZORAK 3 (Z.D.3.)	ŽELUDAC I PROBAVNA ŽLIJEZDA
	UZORAK 1 (Z.D.K.1.)	MEĐULJUŠTURNA TEKUĆINA
KAMENICE	UZORAK 1 (Z.K.1.)	MEĐULJUŠTURNA TEKUĆINA I SLUZ
	UZORAK 2 (Z.K.2.)	ŠKRGE
	UZORAK 3 (Z.K.3.)	ŽELUDAC I PROBAVNA ŽLIJEZDA

Tablica 2. Uzorci korišteni u eksperimetima – **ljetni period**

Primjer: LJ.L1. – ljetni period, lubin, uzorak 1

LUBIN	UZORAK 1 (LJ.L.1.)	SLUZ S POVRŠINE TIJELA
	UZORAK 2 (LJ.L.2.)	SLUZ SA ŠKRGA
	UZORAK 3 (LJ.L.3.)	ŠKRŽNI LISTIĆI
	UZORAK 4 (LJ.L.4.)	CRIJEVA I SADRŽAJ CRIJEVA
	UZORAK 5 (LJ.L.5.)	ŽELUDAC
ORADA	UZORAK 1 (LJ.O.1.)	SLUZ S POVRŠINE TIJELA
	UZORAK 2 (LJ.O.2.)	ŠKRGE
	UZORAK 3 (LJ.O.3.)	ŽELUDAC
	UZORAK 4 (LJ.O.4.)	CRIJEVA I SADRŽAJ CRIJEVA
DAGNJE	UZORAK 1 (LJ.D.1.)	MEĐULJUŠTURNA TEKUĆINA
	UZORAK 2 (LJ.D.2.)	ŠKRGE
	UZORAK 3 (LJ.D.3.)	ŽELUDAC SA SADRŽAJEM I PROBAVNA ŽLIJEZDA
KAMENICE	UZORAK 1 (LJ.K.1.)	MEĐULJUŠTURNA TEKUĆINA
	UZORAK 2 (LJ.K.2.)	ŠKRGE
	UZORAK 3 (LJ.K.3.)	SADRŽAJ ŽELUCA I SLUZNICA
	UZORAK 4 (LJ.K.4.)	SLUZ CRIJEVA I SADRŽAJ PROBAVNE ŽLIJEZDE

3.1.2. Pribor i oprema

- sterilan pribor (plastičan ili metalan) za uzimanje uzoraka
- pipete (V=1mL i 10mL)
- mikrobiološke epruvete (16x160 mm, 18x180 mm)
- mikrobiološka ušica
- Bunsenov plamenik
- Petrijeve zdjelice (Ø 10 cm)
- brojač kolonija (WTW, BZG 30)

- vibracijska miješalica - za homogenizaciju (EV - 10^2 , Tehnica, Železnik)
- štapić po Drigalskom
- laboratorijski stalci
- mikroskop Olympus
- API test trake

3.1.3. Podloga za mikrobiološku analizu

Podloge za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- **MRS**

MRS agar (De Man, Rogosa i Sharpe agar) sastav (g/L):

pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvaščev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80; MgSO4 7H20 0,2; MnSO4 7H2O 0,05; Na-acetat 5; agar 13; u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 C/15min.

MRS agar uveli su De Man, Rogosa i Sharpe pa od tuda dolazi i njegovo ime. Ova vrsta podloge se koristi za razmnožavanje, uzgoj i izolaciju *Lactobacillus sp.* iz svih vrsta materijala. Podloga sadrži natrijev acetat koji onemogućava rast drugih kompetativnih bakterija. Svi laktobacili (primjerice *L.brevis* i *L.ferment* koji se vrlo teško uzgajaju) rastu na MRS podlozi, nasuprot ostalim podlogama za uzgoj. Podloga bogata nutrijentima sadrži acetat, polisorbat, magnezij i mangan koji su poznati kao osobiti faktori rasta u laktobacila.

MRS bujon (De Man, Rogosa i Sharpe agar) istog je sastava kao MRS-agar, samo bez dodanog agara.

- **M17**

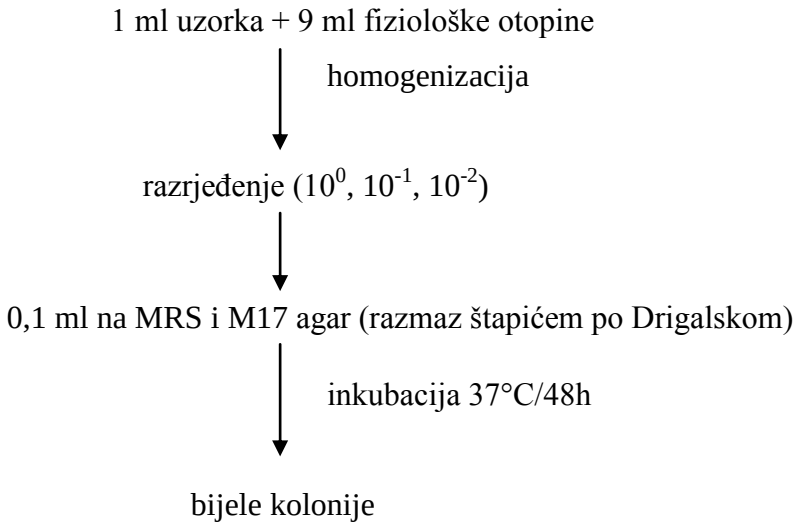
M17 agar sastav (za 950 ml): 5 g Pepton C, 5 g peptona iz soje, 5 g ekstrakta govedine, 2,5 g ekstrakta kvasca, 0,5 g askorbinske kiseline, 0,25 g $MgSO_4$, 10 g dinatrij-β-glicerofosfat, 11g agara ; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 C/15min ,dodat 50 ml sterilizirane 10% otopine laktoze i dobro promješati.

Ova hranjiva podloga nastala je 1971.god za *Lactococcus sp.* izolirane iz mlijeka. Izvorno se zvala M16, ali se naziv mijenja 1975.god kada su Terzaghi and Sandine u podlogu kao pufer dodali dinatrij-β-glicerofosfat.

3.2. Metode rada

3.2.1. Uzgoj i izolacija mikroorganizama

3.2.1.1. Bakterije mliječne kiseline



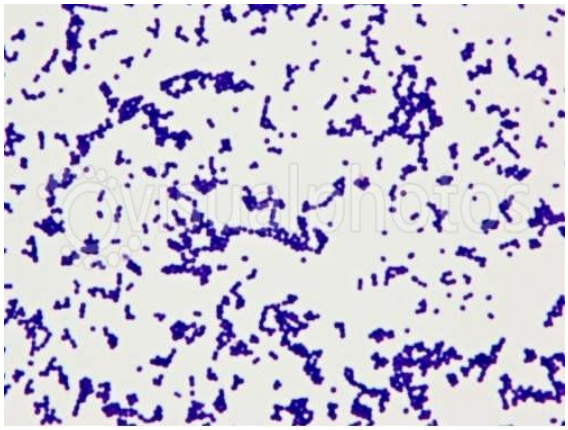
Potvrdni testovi:

- Bojanje po Gramu
- API testovi

3.2.1.2. Bojanje po gramu

Metoda bojanja po Gramu empirijska je metoda razlikovanja bakterija u dvije velike skupine (Gram-pozitivna bakterija i Gram-negativna bakterija) koja se temelji na reakcijama bakterijskih stanica na boje u fiksiranom razmazu. Metoda je nazvana po danskom znanstveniku Hans Christian Gramu (1853 – 1938). Gram je izumio i razvio ovu tehniku 1884.god. U postupku se koristi kristal violet, lugol, alkohol i safranin. Uzorak se nanosi na predmetnicu u što tanjem sloju te se suši na zraku i fiksira u plamenu. Dodaje se kristal violet te se bakterije boje ljubičasto. Lugol koji se dodaje nakon kristal violet bojila, fiksira boju unutar stanične stijenke. Nakon 1-2 min ispire se alkoholom i vodom. Primarno bojilo se ne

može isprati iz stanične stijenke ako je mreža peptidoglikana stijenke dovoljno gusta, što znači da će bakterije sa više slojeva peptidoglikana u stijenci ostati obojena ljubičasto, dok će bakterije bez dovoljne količine peptidoglikana postati ponovno neobojene. Na kraju postupka bojanja po Gramu dodaje se safranin (kontrastno bojilo) koji Gram-negativne bakterije boji u ružičastu ili crvenu boju, te se nakon 5 min ispire vodom. Takav preparat se suši na zraku, te kasnije mikroskopira pod imerzijskim objektivom. Gram-pozitivne bakterije imaju staničnu stijenku koju čine debeli, višeslojni sloj peptidoglikani (50-90% stanične stijenke). Peptidoglikani zadržavaju boju (kristal violet) unutar stijenke i nakon ispiranja alkoholom. Gram-negativne bakterije imaju tanji sloj peptidoglikana (10% stanične stijenke) te se kristal violet ispire alkoholom pa te bakterije reagiraju s kontrastnim bojilom, safraninom. Te stanice su obojene crveno ili ružičasto (Duraković, 1991).



Slika 1. Mikroskopska slika bakterije mliječne kiseline (internet izvor)

3.2.1.3. Biokemijski test (API)

API (Analytical Profile Index) testovi se koriste za identifikaciju širokog spektra mikroorganizama. Obuhvaćaju plastične trake koje općenito sadrže 20 minijaturnih cjevčica. Gotovo sve bakterijske skupine i preko 550 različitih vrsta mogu se identificirati koristeći API testove. Identifikacija je vrlo jednostavan način i API testovi daju gotovo točne identifikacijske rezultate. Sustavi za identifikaciju imaju široke baze podataka karakterističnih biokemijskih reakcija mikroorganizama i standardizirani su. Plastične sterilne trake (API test) se inokuliraju s izoliranom čistom kulturom iz suspenzije mikroorganizama. Rezultati se čitaju nakon inkubacije (24 sata ili manje, ovisno koji API test se koristi) u vlažnoj komori,

gledaju se boje reakcije i reakcije se konvertiraju u sedmeroznamenkasti kod, koji se nalazi u bazi podataka proizvođača (kodna knjiga) , te se identificira rod i vrta mikroorganizma.

- **API 50 CHL**

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na MRS i M17 agaru u obliku kolonija anaerobno i aerobno kroz 24 sata pri 37°C. U ampulu, koja sadrži API 50 CHL medij za laktobacile, je pomoću sterilne mikrobiološke ušice dodano nekoliko identičnih kolonija MRS i M17 agara. Gustoća inokuluma, koja se mjeri u denzitometru je standardizirana prema 2 McFarland. Pripremljena suspenzija nakapana je u cjevčice API 50 CHL stripa koji sadrži 49 različitih ugljikohidrata pazeći da se ne formiraju mjehurići. U sve cjevčice nakapano je mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Inkubacija je trajala 48 h pri 37°C nakon čega je provedeno očitavanje rezultata na temelju boje reakcije. Pozitivnim se smatraju testovi kod kojih je uslijed acidifikacije i prisutnosti bromkrezol purpurnog indikatora došlo do promjene boje u žuto. Biokemijski profil je identificiran pomoću softvera s bazom podataka.



Slika 2. Predložak za API 50 CHL test

- **API 20 Strep**

Ispitivana bakterijska kultura uzgojena je na MRS i M17 agaru u obliku kolonija anaerobno i aerobno kroz 24 sata pri 37°C. U ampulu, koja sadrži API 20 Strep medij za streptokoke i enterokoke, je pomoću sterilne mikrobiološke ušice dodano nekoliko identičnih kolonija MRS i M17 agara. Gustoća inokuluma, koja se mjeri u denzitometru je standardizirana prema 4 McFarland. Pripremljena suspenzija nakapana je u cjevčice API 20 Strep pazeći da se ne formiraju mjehurići. U sve cjevčice nakapano je mineralno ulje kako bi se osigurali anaerobni uvjeti. Inkubacija je trajala 24 h pri 37°C nakon čega je provedeno očitavanje rezultata na temelju boje reakcije. Biokemijski profil je identificiran pomoću softvera s bazom podataka.



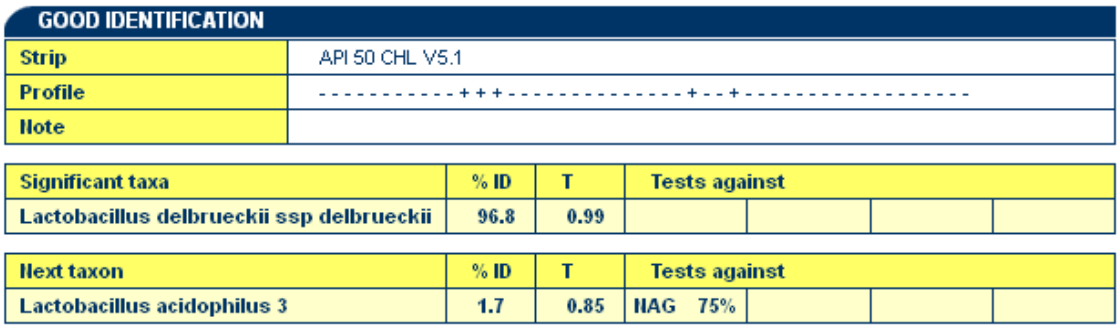
Slika 3. Predložak za API 20 Strep test

4. Rezultati

U ovom radu provedena je analiza prirodno prisutne mikrobne populacije u ribama i školjkama iz zimskog i ljetnog perioda iz Jadranskog mora. Iz uzoraka lubina, orade, kamenica i dagnji izolirani su prirodno prisutni sojevi bakterija mliječne kiseline (BMK) porasli na MRS i M17 agaru. Za identifikaciju bakterija izoliranih iz uzoraka upotrijebljene su biokemijske (API) metode. Fenotipska identifikacija izoliranih sojeva BMK provedena je API 50 CHL i API 20 Strep testovima.

Tablica 3. Bakterije mliječne kiseline identificirane u uzorcima riba i školjkaša pomoću biokemijskih metoda (API testovi)

ZIMSKI PERIOD	LJETNI PERIOD
Lactobacillus delbrueckii (Z.L.2.)	*Lactobacillus plantarum* (LJ.O.3.)
Lactobacillus delbrueckii (Z.D.K.1.)	*Lactobacillus helveticus* (LJ.O.3.)
	Pediococcus damnosus (LJ.O.2.)
	Leuconostoc mesenteroides (LJ.L.3.)
	Lactobacillus plantarum (LJ.K.3.)
	Lactococcus lactis (LJ.D.1.)



GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHL V5.1
Profile	----------+++---------------+--+-----------------
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Lactobacillus delbrueckii ssp delbrueckii	96.8	0.99				

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Lactobacillus acidophilus 3	1.7	0.85	NAG 75%			

Slika 4. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (izoliran iz Z.L.2. i Z.D.K.1.) dobiven računalnom analizom (software apiweb™ stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 50 CHL testa

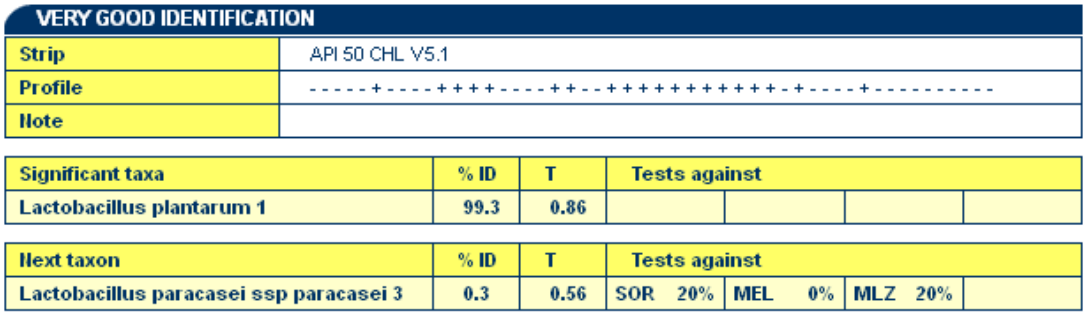
Napomena: za *Lactobacillus delbrueckii* samo je jedna slika API testa jer je isti soj nađen u dva zimska uzorka (Z.L.2. i Z.D.K.1.), ali u različitim postocima - Z.L.2. : 96,8% , Z.D.K.1. : 79,1%

Tablica 4. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Lactobacillus delbrueckii* iz uzorka Z.L.2. i Z.D.K.1. dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

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

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;



Slika 5. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Lactobacillus plantarum* 1 (izoliran iz LJ.O.3.) dobiven računalnom analizom (software apiweb^{TM} stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 50 CHL testa

Tablica 5. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1 iz uzorka LJ.O.3. dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

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

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;

GOOD IDENTIFICATION	
Strip	API 50 CHL V5.1
Profile	----------+-+-+---------+------+--------------------
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Lactobacillus helveticus	97.9	0.96				

Next taxon	% ID	T	Tests against			
Lactococcus lactis ssp cremoris 2	1.3	0.78	FRU 100%			

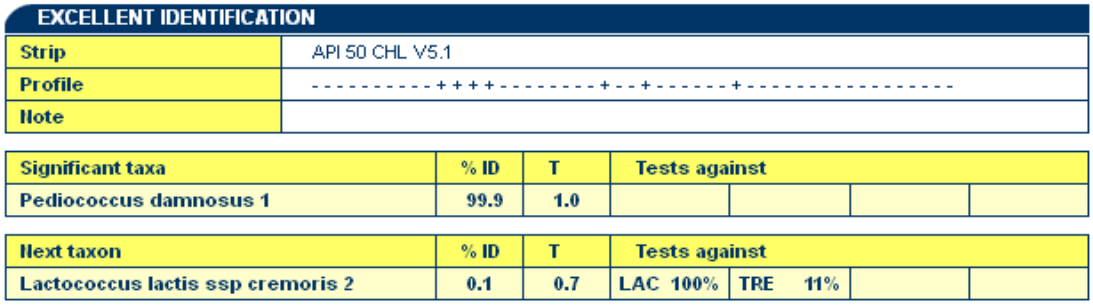
Slika 6. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Lactobacillus helveticus* (izoliran iz LJ.O.3.) dobiven računalnom analizom (software apiweb^{TM} stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 50 CHL testa

Tablica 6. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Lactobacillus helveticus* iz uzorka LJ.O.3. dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

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

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;



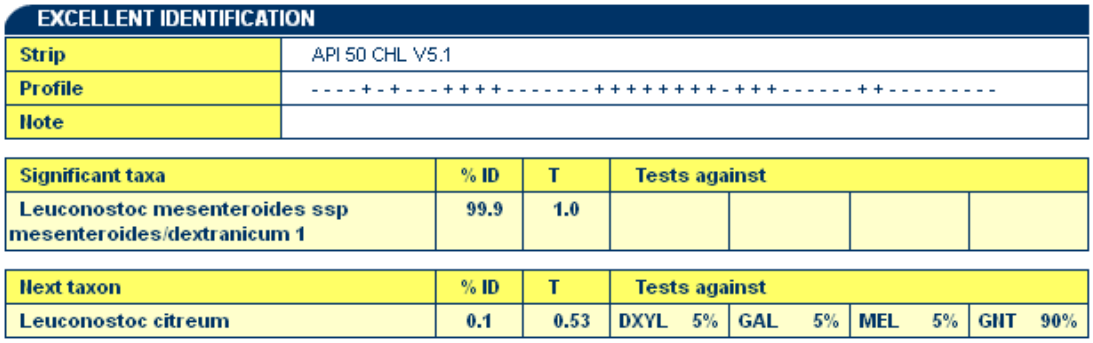
Slika 7. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Pediococcus damnosus* 1 (izoliran iz LJ.O.2.) dobiven računalnom analizom (software apiweb™ stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 50 CHL testa

Tablica 7. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Pediococcus damnosus* 1 iz uzorka LJ.O.2. dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

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

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;



EXCELLENT IDENTIFICATION

Strip	API 50 CHL V5.1
Profile	----+-+---++++-------++++++++-+++------++---------
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides/dextranicum 1	99.9	1.0				

Next taxon	% ID	T	Tests against							
Leuconostoc citreum	0.1	0.53	DXYL	5%	GAL	5%	MEL	5%	GNT	90%

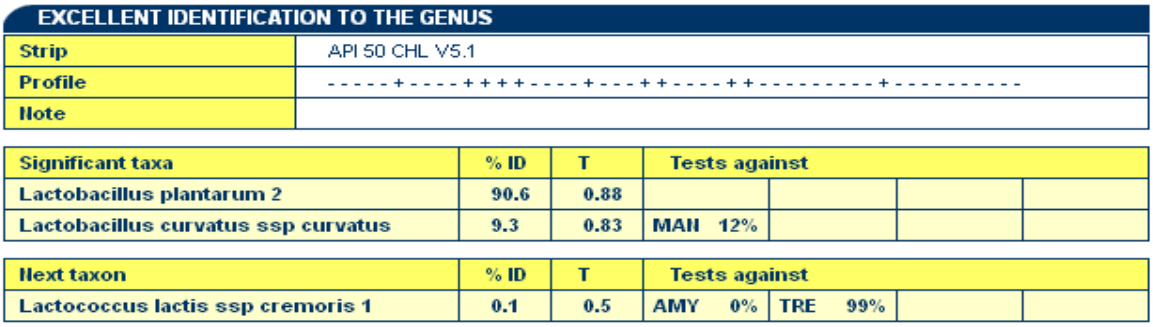
Slika 8. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* (izoliran iz LJ.L.3.) dobiven računalnom analizom (software apiweb^{TM} stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 50 CHL testa

Tablica 8. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Leuconostoc mesenteroides* iz uzorka LJ.L.3. dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

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

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;



EXCELLENT IDENTIFICATION TO THE GENUS	
Strip	API 50 CHL V5.1
Profile	-----+----++++----+---++----++----------+----------
Note	

Significant taxa	% ID	T	Tests against			
Lactobacillus plantarum 2	90.6	0.88				
Lactobacillus curvatus ssp curvatus	9.3	0.83	MAN 12%			

Next taxon	% ID	T	Tests against					
Lactococcus lactis ssp cremoris 1	0.1	0.5	AMY 0%	TRE 99%		

Slika 9. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Lactobacillus plantarum* 2(izoliran iz LJ.K.3.) dobiven računalnom analizom (software apiweb^{TM} stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 50 CHL testa

Tablica 9. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* iz uzorka LJ.K.3. dobiven biokemijskim testom API 50 CHL

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

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u žutu u 48 sati;

GOOD IDENTIFICATION

Strip	API 20 STREP V7.0
Profile	5 0 4 3 0 1 1
Note	ID. NOT VALID BEFORE 24 HOURS

Significant taxa	**% ID**	**T**	**Tests against**			
Lactococcus lactis ssp lactis	**98.8**	**0.93**				

Next taxon	**% ID**	**T**	**Tests against**			
Enterococcus durans	**0.9**	**0.57**	**PYRA 97%**	**ßGAL 76%**	**LAC 84%**	

Slika 10. Fenotipski profil bakterijskog izolata *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (izoliran iz LJ.D.1.) dobiven računalnom analizom (software apiweb™ stand alone V1.2.1) rezultata očitanih s API 20 Strep testa

Tablica 10. Fermentacijski profil izoliranog bakterijskog soja *Lactococcus lactis* iz uzorka LJ.D.1. dobiven biokemijskim testom API 20 Strep

Test		Ugljikohidrati	
Voges-Proskauer	+	Riboza	+
Hidroliza hipurata	-	Arabinoza	-
Hidroliza eskulina	+	Manitol	-
Pirolidonil arilamidaza	-	Sorbitol	-
α-galaktozidaza	-	Laktoza	-
β-glukuronidaza	-	Trehaloza	+
β-galaktozidaza	-	Inulin	-
Alkalna fosfataza	-	Rafinoza	-
Leucin aminopeptidaza	+	Škrob	+
Arginin dihidrolaza	+	Glikogen	-

-, negativna reakcija, nije došlo do promjene boje;

+, pozitivna reakcija, promjena boje u 24 sata;

5. Rasprava

Uobičajeno, bakterije mliječne kiseline se ne smatraju izvornom mikroflorom vodenog staništa. Međutim, određeni rodovi, kao što su *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* ssp., *Carnobacterium* spp. *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. *Aerococcus* spp. i *Vagococcus* spp. su nađeni u ribama slatkih i slanih voda (Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., Kneifel, W., 2013.). Tako smo i tijekom našeg provođenja istraživanja identificirali biokemijskim metodama (API testovi) šest bakterija mliječne kiseline u sedam različitih uzoraka iz lubina, orade, dagnji i kamenica. To su, iz zimskog perioda: *Lactobacillus delbrueckii* (lubin, zajednički uzorak dagnji i kamenica,) te iz ljetnog perioda: *Lactobacillus plantarum* (orada, kamenica), *Lactobacillus helveticus* (orada), *Pediococcus damnosus* (orada), *Lactococcus lactis* (dagnje) i *Leuconostoc mesenteroides* (lubin). Iz dobivenih rezultata uočljivo je da je mikroflora riba raznovrsnija od mirkoflore školjkaša. Cilj ovoga rada bio je izolirati i odrediti autohtonu mikrobnu populaciju iz uzoraka riba i školjaka kao izvor potencijalnih bioprotektivnih starter kultura. Promatrajući rad „Use of Probiotics in Aquaculture“ (P. Martınez Cruz, A. L. Ibanez, O. A. Monroy Hermosillo, H.C. Ramırez Saad, 2012.), u kojem su navedene BMK i njihova svojstva kao starter kultura, možemo pretpostaviti da smo izolirali potenicijalne bioprotektivne starter kulture, budući da smo uspjeli identificirati neke od BMK spomenutih u samom radu. Tako u radu „Use of Probiotics in Aquaculture“ *Lactobacillus helveticus* ima svojstvo promotora rasta te pospješuje razgradnju nutrijenata, *Lactobacillus delbrueckii* kao i *Pediococcus damnosus* poboljšava toleranciju na stres te *Lactococcus lactis* posjeduje svojstvo inhibitora patogena i svojstvo promotora rasta. (P.Martınez Cruz, A. L. Ibanez, O. A. Monroy Hermosillo, H.C. Ramırez Saad, 2012.). Uspoređujući rezultate zimskog i ljetnog perioda uočljiva je razlika u broju dobivenih, odnosno identificiranih BMK. Dok je u ljetnom periodu identificirano pet različitih bakterijskih vrsta, u zimskom je uspješno identificiran samo jedna bakterijska vrsta. Mikrobiološka slika vodenih životinja naročito ovisi o vanjskom okolišu, tj. godišnjem dobu i temperaturi vode. Tako je tijekom zimskog perioda more hladnije te je zbog toga manja raznolikost mikroflore. Stoga je i manja mogućnost pronalaska BKM u uzorcima uzetim u zimskom periodu. S druge strane, tijekom ljetnog perioda, more je toplije i samim time bogatije raznolikom mikroflorom, pa je dakle bila i veća vjerojatnost pronalaska različitijih BMK (Mayhew, 2008.).

6. Zaključak

1. Autohtoni bakterijski izolati izolirani iz uzoraka lubina, orade, dagnji i kamenica pripadaju bakterijskim rodovima *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactococcus*
2. Fenotipskom (API) identifikacijom identificirano je šest bakterijskih vrsta: iz zimskog perioda *Lactobacillus delbrueckii*, te iz ljetnog perioda *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Pediococcus damnosus*, *Lactococcus lactis* i *Leuconostoc mesenteroides*
3. BMK su prisutnije u uzorcima uzgojenim u ljetnom periodu.

7. Literatura

Bajnoci Alen, Učinci organskog unosa kaveznim uzgojem ribe na kondiciju dagnji (Mytilus galloprovincialis) u Bistrini, 2014.

Bogut I., A. Opačak,I. Stević, S. Bogut, (1996.) Nutritivna i protektivna vrijednost riba s osvrtom na omega-3 masne kiseline. Ribarstvo 54, 1, 21-38

Duraković, S. (1991) Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb, str. 233-235.

Duraković, S., Redžepović, S.(2002) Uvod u opću mikrobiologiju, Durieux, knjiga prva.

Duraković, S., suradnici (2002) Moderna mikrobiologija namirnica, Durieux, knjiga prva.

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

Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kovačević, D. (2010b) Stafilokoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. *Meso* **12**, 150-155.

Frece, J., Čvek, D., Kovačević, D., Gobin, I. (2010c) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz „slavonskog kulena“, kao probiotičke funkcionalne starter kulture. *Meso* **12**, 208-214.

Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J., Kneifel, W., Seafood biopreservation by lactic acid bacteria, 2013.

Hadžiosmanović, M., L. Kozačinski, Ž. Cvrtila (2002) : Kakvoća morske ribe. *Meso* IV, 16, 31-33

Hammes, W. P., Vogel, R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*. U: Genera of lactic acid bacteria, **2** (Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H., ured.), Blackie Academic & Professional, Glasgow, str. 19-54.

Ivanišević Aldo, Sportski ribolov na moru, Zagreb: Mladost, 1987. ISBN 86-05-00152-6

Martınez Cruz P., A. L. Ibanez, O. A. Monroy Hermosillo, H.C. Ramırez Saad, Use of Probiotics in Aquaculture, 2012.

Mašić Mario, Higijena i tehnologija prerade školjaka, 2004.

Mayhew P.J., G.B. Jenkins, T.G. Benton, A long-term association between global temperature and biodiversity, origination and extinction in the fossil record, 2008.

Milišić Neven, Sva riba Jadranskoga mora (prvi dio), Split: Marijan tisak, 2007

Myers D., "Probiotics,"Journal of Exotic Pet Medicine, vol. 16 no. 3, pp. 195–197, 2007

Nes, I. (2011). History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in actic acid bacteria. In D. Drider, & S. Rebuffat (Eds.), Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications (pp. 3-12). New York: Springer Publishing Company.

Nilsson, L., Hansen, T., Garrido, P., Buchrieser, C., Glaser, P., Knochel, S., et al. (2005). Growth inhibition of Listeria monocytogenes by a non bacteriocinogenic Carnobacterium piscicola.

Schleifer, K. H., Ludwig, W. (1995) Phylogenetic relationships of lactic acid bacteria. *Genera of lactic acid bacteria*, 2 (Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H., ured.), Blackie Academic & Professional, Glasgow, str. 7-18.

Šoša, B. (1989) : Higijena i tehnologija prerade morskle ribe, Školska knjiga, Zagreb, 1989.

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S., (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. Mljekarstvo 47 (1), 57-73.

Šušković, J., Kos, B. (2000) Interna skripta iz kolegija „Probiotici i starter kulture“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* 39, 227-235.