Antimikrobno djelovanje autohtone mikrobne populacije izolirane iz riba i školjkaša Jadranskog mora

Rupčić, Marijana

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:159:284815

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

Marijana Rupčić
6876/BT

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE AUTOHTONE MIKROBNE POPULACIJE IZOLIRANE IZ RIBA I ŠKOLJKAŠA JADRANSKOG MORA

ZAVRŠNI RAD

Modul: Mikrobiologija
Mentor: Prof.dr.sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2016.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

ANTIMIKROBNO DJELOVANJE AUTOHTONE MIKROBNE POPULACIJE IZOLIRANE IZ RIBA I ŠKOLJKAŠA JADRANSKOG MORA

Marijana Rupčić, 6876/BT

Sažetak: Cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobno djelovanje izolata bakterija mliječne kiseline (BMK) na najčešće patogene mikroorganizme proizvoda akvakulture: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio* sp. te *Salmonella typhimurium*. Autohtona mikrobna populacija bakterija mliječne kiseline izolirana je iz uzoraka riba i školjkaša, ulovljenih u ljetnom periodu u Jadranskom moru te obuhvaća sljedeće vrste: *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *Lactobacillus plantarum* D1, *Lactobacillus plantarum* K4. Osim navedenih izolata u eksperimentima je korišten i standard *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433. Antimikrobna aktivnost BMK određivana je s tri metode: pomoću mikrotitarskih pločica, metodom s rupama u agaru i disk difuzijskom metodom. Rezultati svih triju metoda se podudaraju i ukazuju na značajnu antimikrobnu aktivnost izolata BMK prema najčešćim patogenim mikroorganizmima proizvoda akvakulture.

Ključne riječi: antimikrobno djelovanje, bakterije mliječne kiseline,patogeni mikroorganizmi

Rad sadrži: 25 stranica, 6 slika, 5 tablica, 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

Mentor: Prof.dr.sc. Jadranka Frece

Pomoć pri izradi: Iva Čanak, mag. ing.

Rad predan: lipanj, 2016.

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

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF INDIGENOUS MICROBIAL POPULATION ISOLATED FROM FISH AND SHELLFISH FROM ADRIATIC SEA

Marijana Rupčić, 6876/BT

Abstract:

The aim of this study was to determine antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolates (LAB) on the most common pathogens of aquaculture products: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio* sp. and *Salmonella typhimurium*. Indigenous microbial population of lactic acid bacteria is isolated from samples of fish and shellfish caught in the summer in Adriatic Sea and includes the following species: *Lactobacillus plantarum* O1, *Lactobacillus helveticus* O9, *Leuconostoc mesenteroides* L4A, *Lactobacillus plantarum* D1, *Lactobacillus plantarum* K4. Apart from the isolates given above, standard *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433 was also used in experiments. Antimicrobial activity of LAB was determined by three different methods: using microtiter plate, agar well diffusion method and disc diffusion method. The results of all three methods show significant antimicrobial activity of LAB isolates to the most common pathogens of aquaculture products.

Keywords: antimicrobial activity, lactic acid bacteria, pathogens

Thesis contain: 25 pages, 6 figures, 5 tables, 40 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: PhD. Jadranka Frece, Full profesor

Tehnical support and assistance: Iva Čanak, mag. ing.

Thesis delivered: June , 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline 2

2.1.1. Rod *Lactobacillus* 2

2.1.2. Rod *Leuconostoc* 3

2.2. Antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline 3

2.2.1. Organske kiseline 3

2.2.2. Vodikov peroksid 4

2.2.3. Diacetil 5

2.2.4. Bakteriocini 5

2.3. Patogeni mikroorganizmi 5

2.3.1. Bakterije iz roda *Pseudomonas* 6

2.3.2. Bakterije iz roda *Escherichia* 6

2.3.3. *Staphylococcus aureus* 7

2.3.4. Bakterije iz roda *Salmonella* 7

2.3.5. Bakterije iz roda *Proteus* 8

2.3.6. *Vibrio* sp. 8

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali 10

3.1.1. Mikroorganizmi 10

3.1.2. Hranjive podloge 10

3.1.3. Pribor i oprema 11

3.2. Metode 12

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama 12

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama 12

3.2.3. Priprava bakterija mliječne kiseline za ispitivanje antimikrobne aktivnosti 12

3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti pomoću mikrotitarskih pločica 12

3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom s rupama u agaru (Well assay) ... 13

3.2.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (Disk assay) 13

4. REZULTATI

4.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti pomoću mikrotitarskih pločica 14

4.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom s rupama u agaru (Well assay) 18

4.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (Disk assay) 18

5. RASPRAVA 19

6. ZAKLJUČCI 21

7. LITERATURA 22

1. UVOD

Kako bi se osigurala zadovoljavajuća sigurnost hrane, u današnje vrijeme postoje stalna nastojanja za pronalaskom trajnijih rješenja za zaštitu zdravlja potrošača od patogenih mikroorganizama. Stoga se u laboratorijima provode različita istraživanja i osiguravaju nove tehnologije za primjenu u prehrambenoj industriji kako bi se umanjila primjerna fizikalnih metoda u suzbijanju rasta mikroorganizama kao što su sterilizacija, pasterizacija, konzerviranje. Prehrambena vrijednost i kakvoća steriliziranih namirnica je manja jer dolazi do djelomične hidrolize masti, denaturacije proteina, razgradnje termolabilnih vitamina i drugih promjena. Danas postoji veliki interes za primjenu različitih kultura mikroorganizama koje djeluju zaštitno i antimikrobno na patogene mikroorganizme. Stoga različite namirnice mogu poslužiti kao polazna točka proučavanja mikrobnih interakcija čiji se principi mogu pretočiti i u praktične okvire i proizvodnju sigurnije hrane (Zdolec i sur., 2007; Frece i sur., 2014).

Nutricionisti preporučuju konzumaciju nutritivno bogate, sigurne i kvalitetne hrane što se u današnje vrijeme uglavnom odnosi na konzumaciju ribe i morskih plodova. No ti proizvodi kao takvi imaju veliki problem osjetljivosti na kvarenje zbog mikrobiološke i biokemijske razgradnje. Principi zaštite namirnica od mikrobnog kvarenja se odnose na različite fizikalne i kemijske metode. Tim metodama se osigurava produženi rok trajanja i uporabe svježih morskih organizama, ali dolazi do gubitka kvalitete nutritivnih i organoleptičkih svojstava. Stoga se fokus istraživanja sve više usmjerava na korištenje bakterija mliječne kiseline kao starter kultura, za konzerviranje na prirodan način. One djeluju inhibitorno na mikroorganizme koji uzrokuju kvarenje ali bez negativnih posljedica na organoleptička i nutritivna svojstva proizvoda (Nilsson i sur., 2005; Nes, I., 2011; Frece i sur., 2014).

Stoga je cilj ovog rada ispitati antimikrobno djelovanje autohtone mikrobne populacije bakterija mliječne kiseline koje su izolirane iz riba (lubin, orada) i školjkaša (dagnje, kamenice) Jadranskog mora na najčešće mikroorganizme uzročnike kvarenja, odnosno utvrditi da li se radi o potencijalno bioprotektivnim kulturama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline (BMK)

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne, nesporogene bakterije koje se nalaze u obliku koka, kokobacila i štapića. Fermentiraju glukozu prvenstveno do mliječne kiseline, CO_2 i etanola. Sve bakterije mliječne kiseline rastu anaerobno, ali za razliku od većine anaeroba, one rastu i u prisutnosti kisika kao ″aerotolerantni anaerobi“. Uglavnom ne proizvode enzim katalazu. U glavne rodove BMK spadaju *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Lactococcus* i *Streptococcus* dok u preferirane rodove spadaju *Carnobacterium, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* i *Weisella* (Todar, K., 2012).

2.1.1. Rod *Lactobacillus*

Poznato je da rod *Lactobacillus* sadrži 28 vrsta različitih bakterija. Sve su štapićaste, asporogene bakterije. Boje se gram-pozitivno, ali sa starošću i u kiseloj reakciji postaju gram-negativne. Laktobacili su anaerobni, a mogu rasti i u aerobnim uvjetima. Saharolitičke su bakterije i fermentiraju brojne ugljikohidrate uz proizvodnju znatnih količina mliječne kiseline (Grgurić i sur., 1996).

Rod se dijeli u tri grupe: obligatno homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obligatno heterofermentativne bakterije (Hammes i Vogel, 1995). U prvu grupu pripadaju bakterije *Lactobacillus helveticus* i *Lactobacillus acidophilus,* dok drugoj grupi pripada *Lactobacillus plantarum*. *Lactobacillus helveticus* je homofermentativna vrsta koja optimalno raste na temperaturi od 40-45°C. Stvara DL- mliječnu kiselinu (2-3%) i ima jak fermentativni učinak te dobar proteolitički sustav. Za razliku od ostalih laktobacila može transformirati galaktozu. *Lactobacillus acidophilus* je homofermentativna vrsta koja slabo raste u mlijeku i javlja se u obliku dužih i kraćih štapića. Optimalna temperatura za rast joj je 37°C. Može stvarati bakteriocin acidophilin ili acidolin te proizvodi DL-mliječnu kiselinu (1,8%) (Obradović, D., 2002). *Lactobacillus plantarum* je štapićasta, gram-pozitivna bakterija mliječne kiseline. Obično se nalazi u ljudskom i gastrointestinalnom traktu drugih sisavaca, u slini i u raznim prehrambenim proizvodima. Može rasti na temperaturi između 15-45 °C i pri pH razinama nižim od 3,2 (Kleerebezem i sur., 2003). Fakultativno heterofermentativna je bakterija, ali ovisno o izvoru ugljika može prebaciti način metabolizma sa heterofermentativnog na homofermentativni način (Siezen i Vlieg, 2011). Predstavlja veliki značaj znanstvenicima i prehrambenoj industriji jer se smatra sigurnim probiotikom koji može smanjiti

količinu patogenih bakterija koje imaju negativan utjecaj na ljudsko zdravlje.

2.1.2. Rod *Leuconostoc*

U ovom rodu nalazi se 11 vrsta gram-pozitivnih heterofermentativnih koka. Bakterije su katalaza-negativne te proizvode dekstran iz saharoze. Bakterije ovog roda se vrlo često koriste u proizvodnji fermentirane hrane budući da imaju sposobnost proizvodnje mliječne kiseline i diacetila. *Leuconostoc mesenteroides* se koristi kao starter kultura u proizvodnji maslaca i sireva. Karakteristika ove bakterije je stvaranje diacetila pri pH=5,5 te toleriranje veće koncentracije soli.

2.2. Antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline

Između mikroorganizama postoje različite interakcije od kojih jedne stimuliraju, a druge interakcije inhibiraju mikrobni rast odnosno metaboličku aktivnost. Bakterije mliječne kiseline, zbog svoje sposobnosti stvaranja mliječne, octene i drugih organskih kiselina, snižavaju pH-vrijednost sredine i na taj način inhibiraju rast koliformnih i psihrotrofnih bakterija. Osim toga, određeni sojevi bakterija mliječne kiseline stvaraju mnoštvo antagonističkih spojeva, uključujući i antimikrobne peptide ili bakteriocine (Havranek i sur., 2014).

Bakterije mliječne kiseline mogu djelovati antagonistički uslijed: a) sniženja pH uslijed nakupljanja organskih kiselina; b) proizvedenog H_2O_2 u aerobnim uvjetima; c) proizvedenog diacetila; d) proizvedenih specifičnih inhibicijskih supstancija, primjerice bakteriocina (Šušković i sur., 1997).

2.2.1. Organske kiseline

Bakterije mliječne kiseline tijekom rasta i fermentacije proizvode značajne količine organskih kiselina (tablica 1). Organske kiseline djeluju inhibicijski na rast i razmnožavanje mikroorganizama (Brkić i sur., 1991; Brkić, B., 1995). Mliječna i octena kiselina su lipofilne kiseline koje kada su u nedisociranom obliku mogu prodrijeti u mikrobnu stanicu i tako interferirati sa metabolizmom i sniziti intracelularni pH (Baird-Parker, A.C., 1980; Kashket, E.R., 1987). Od navedene dvije kiseline, octena ima jače inhibicijsko djelovanje, posebice

prema plijesnima i kvascima (Baird-Parker, A.C., 1980). To je zbog toga što je količina disocirane octene kiseline 2-4 puta veća od nedisocirane u usporedbi sa mliječnom kiselinom. Octena i mliječna kiselina mogu sinergistički djelovati u inhibiciji rasta bakterija iz roda *Salmonella* (Rubin, 1987; Adams i Hali, 1988) i kvasaca (Moon, N.J., 1983). Za proizvodnju mliječne kiseline, najviše su odgovorne homofermentativne vrste, a bakterije iz roda *Lactobacillus* proizvode znatno više mliječne kiseline u odnosu na bakterije iz roda *Lactococcus* i *Streptococcus*. Postoje dva tipa mliječne kiseline ovisno o zakretanju ravnine polarizirane svijetlosti- L(+) i D(-). U tablici 1 su prikazane vrste mliječne kiseline koje proizvode bakterije mliječne kiseline (Gregurek, Lj., 1999).

Tablica 1. Vrste mliječne kiseline i bakterije producenti (Gregurek, Lj., 1999)

BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE	**D (-) MLIJEČNA KISELNA**	**L (+) MLIJEČNA KISELINA**
Lactobacillus delbrueckii spp *bulgaricus*	+	-
Lactococcus lactis	+	-
Streptococcus spp. (neki)	-	+
Lactobacillus casei	-	+
Lactobacillus helveticus	+	+
Lactobacillus acidophilus	+	+

2.2.2. Vodikov peroksid

Bakterije mliječne kiseline proizvode i vodikov peroksid u prisutnosti kisika djelovanjem flavoprotein oksidaze ili NADH peroksidaze (Dahya i Speck, 1968). Koncentracija vodikovog peroksida raste do one koncentracije koja će djelovati antimikrobno zbog nedostatka katalazne aktivnosti ovih bakterija (Price i Lee, 1970). Proizvodnjom vodikovog peroksida, bakterije mliječne kiseline pokazuju inhibicijsko djelovanje prema *Pseudomonas sp.* i *Staphylococcus aureus* jer vodikov peroksid ima snažno oksidacijsko djelovanje prema stanici i staničnim proteinima. Uzrokuje oksidaciju SH-grupa u enzimima koji sudjeluju u metabolizmu kao što su heksokinaza, aldolaza i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (Bjorck, L., 1985).

2.2.3. Diacetil

Diacetil ili 2,3-butandion je metabolit kojeg proizvode svi rodovi bakterija mliječne kiseline i ima inhibicijsko djelovanje prema velikom broju gram-negativnih bakterija (Joy i sur., 1983). Nastaje u prisutnosti organskih kiselina, primjerice limunske, koje preko piruvata konvertiraju i diacetil.

2.2.4. Bakteriocini

Bakteriocini su ekstracelularne supstance proteinske prirode koji djeluju prema sojevima iste ili srodne vrste (Koninsky, J., 1982). Smatralo se da se bakteriocini sintetiziraju na multienzimskom kompleksu međutim ustanovilo se da se biosinteza odvija na ribosomima kao i kod uobičajenih proteina ali se posttranslacijski modificira uz pomoć specifičnih enzima u biološki aktivan bakteriocin. Najpoznatiji bakteriocin, kojeg proizvodi bakterija mliječne kiseline *Lactococcus lactis,* je nizin (Hurst, A., 1983). Prema Hollandu (1967) postoje dvije hipoteze o načinu djelovanja bakteriocina. Prema prvoj hipotezi bakteriocin prodire kroz stijenku stanice na mjestu specifičnog vezivanja. Dolazi do inhibicije sinteze DNA i proteina te oštećenja stanične stijenke. Druga hipoteza tvrdi da nakon povezivanja s receptorom na stanici, bakteriocin djeluje ekstracelularno s mjesta vezanja. Bakteriocini mogu djelovati i na regulatorni sustav stanice i na taj način utjecati na mnoge stanične funkcije budući da su regulacijski centri uglavnom dijelovi citoplazmatske membrane ili su za nju vezani, te su zbog toga pristupačni za interakciju s bakteriocinima koji se specifično vežu na površinu stanice (Daeschel i sur., 1990).

2.3. Patogeni mikroorganizmi

Zahvaljujući stalnim poboljšanjima higijensko-sanitarnih i svih ostalih uvjeta u proizvodnji te sustavnoj kontroli kvalitete, rizik dobivenih proizvoda za zdravlje ljudi je znatno smanjen. Toksini (proteini, polisaharidi) su supstance kemijske prirode koje su štetne za ljudsko tkivo i fiziološke rekacije i većinom su mikrobnog podrijetla. Postoje 4 vrste toksina koje sintetiziraju mikroorganizmi: 1. Enterotoksini- u intestinalnom traktu, uzrokuju promjene metabolizma; 2.Citotoksini- dovode do automatske smrti stanice; 3.Neurotoksini- oštećuju živčani sustav; 4. Endotoksini-oslobađaju se iz autoliziranih stanica (Obradović, D., 2002). Mikroorganizmi mogu ponekad izlučivati te toksine u sredini u kojoj raste npr.

Staphylococcus aureus. Zbog toga konzumacija primjerice mlijeka i sira koji su kontaminirani tom bakterijom može izazvati trovanje iako u njima nije prisutna vegetativna stanica. Druge bakterije, poput *Clostridium perfringens*, uzrokuju trovanje u ljudskom organizmu samo kao vegetativne stanice. Ulaskom vegetativne stanice u probavni sustav, najprije se unutar stanice stvore spore i tek se nakon pucanja stanice i oslobađanja spora počinju izlučivati i bakterijski enteroroksini. Manifestacija bolesti, odnosno trovanje ljudi uzrokovano patogenim bakterijama ovisi o vrsti, mehanizmu djelovanja i broju i/ili razini/vrsti toksina (Havranek i sur., 2014).

2.3.1. Bakterije iz roda *Pseudomonas*

Pseudomonas je sveprisutna skupina gram-negativnih bakterija. Obuhvaća niz pravih *Pseudomonas* vrsta, kao i mnoge vrste kasnije razvrstane u ovaj rod. Neke vrste, posebno *Pseudomonas aeruginosa* su oportunistički ljudski patogeni, dok su drugi biljni patogeni (Stead, D., 1992). Neki vrste potiču rast biljke i inhibiraju rast nametnika te se mogu koristiti u biološkoj kontroli (Keel i sur., 1996). Važno svojstvo nekih vrsta je metabolička raznolikost koja omogućuje korištenje u bioremedijaciji. Osim toga, *Pseudomonas* vrste često su povezane s ribama (Cahill, M.M., 1990) te su izolirane iz kože, škrga i crijeva. Općenito, bakterijska flora riba, uključujući i *Pseudomonas* odražava mikrofloru morskog staništa i pod utjecajem je ostalih bakterija u vodi i saliniteta. Obzirom da su *Pseudomonas* vrste toliko raširene i brojne, mogu biti uključene u procese bolesti i djelovati kao sekundarni nametnici (Tripathy i sur., 2007).

2.3.2. Bakterije iz roda *Escherichia*

Rodu *Escherichia* pripada samo jedna bakterijska vrsta *E. coli*. Bakterija je gram-negativni pokretni ili nepokretni štapić. Fermentira glukozu i laktozu i neke druge šećere te stvara mliječnu, octenu i mravlju kiselinu (Havranek i sur., 2014).

To je koliformna bakterija koja naseljava debelo crijevo. Karakteristika je da razlaže žučne soli i dovodi do zgrušnjavanja mlijeka. Optimalna temperatura rasta je 37 °C a može i rasti na 44 °C. Pojedini sojevi su patogeni te dovode do crijevnih poremećaja i izazivaju

urinarne infekcije. Njeno prisustvo u prehrambenim proizvodima ukazuje da se radi o nehigijenskoj proizvodnji. Samo neki sojevi su enteropatogeni.

2.3.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna, katalaza-pozitvna te fakultativno anaerobna bakterija. Raste u rasponu temperature od 7-48°C te u rasponu pH-vrijednosti od 4 do 10 pri čemu su optimalni uvijeti temperatura od 37°C i pH vrijednost 6,7. Velik broj sojeva je sposoban stvarati ekstracelularne termostabilne enterotoksine koji svoju biološku aktivnost zadržavaju i nakon toplinske obrade. Stafilokokni enterotoksini-SE su proteini male molekulske mase (26,900-29,600 Da). Do danas ih je identificirano i opisano oko 20 vrsta. Neke vrste SE, npr. A i E, nastaju u vrijeme eksponencijalne faze rasta stanice dok druge npr. B i C, nastaju uglavnom u stacionarnoj fazi rasta. Enterotoksin B se smatra najtoksičnijim jer dovodi do β-hemolize (Obradović, D., 2002). Najvećim mikrobiološkim rizikom smatraju se fizikalna i kemijska svojstva SE kao što je termorezistentnost, zatim rezistentnost na većinu proteolitičkih enzima probavnog sustava čovjeka i primjerice proteolitičkih enzima sira i otpornost na nisku pH vrijednost (npr. želudac čovjeka). Simptomi trovanja ovom bakterijom su bolovi u želucu, mučnina, povraćanje, dijareja. Na temelju epidemioloških studija (1991.-2006.) infektivna doza za čovjeka je od 1-40 mikrograma (Havranek i sur., 2014).

2.3.4. Bakterije iz roda *Salmonella*

Salmonela spp. su bakterije koje broje više od 2200 serotipova a svstavaju se prema njihovom staništu i vrsti bolesti koju uzrokuju. Pripadaju skupini gram-negativnih bakterija. Optimalna temperatura je 37°C, ali je otporna na niske temperature (Obradović, D., 2002). Najveća opasnost za čovjeka i životinje je bakterija *Salmonella thyphimurium*. Ona je uzročnik gastrointestinalnih infekcija različite jakosti. Simptomi trovanja hranom kod ljudi podijeljeni su u tri klinička oblika bolesti- salmoneloze. Prvi se odnosi na dijareju uz visoku temperaturu, drugi oblik je septikemija koja se općenito smatra blažom infekcijom krvi te je obilježena smrtnošću do 13% te treći oblik manifestira oštećenje inficiranih tkiva i organa (Havranek i sur., 2014).

2.3.5. Bakterije iz roda *Proteus*

U rodu *Proteus* svsrtane su dvije vrste, *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris*. Raspostranjeni su na zemlji, u vodi, fekalijama, organskim materijama te namirnicima. Obje vrste su gram-negativne, štapićaste bakterije. Imaju flagele, vrlo su pokretljive te nemaju sposobnost sinteze kapsule. Rastu i razmnožavaju se kako u aerobnim tako i u anaerobnim uvjetima- fakultativni anaerobni. Značajne probleme koje izazivaju su urinarne infekcije, meningitisi, infekcije rana, pneumonija i dr. *Proteus mirabilis* izaziva češće oboljenja kod ljudi nego *Proteus vulgaris*. Raspon temperatura na kojima mogu obstati je od 0-43°C a optimalna je 37°C. *P. vulgaris* je otporan na pencilin i većinu cefalosporina, a osjetljiv je na dezinfekcijska sredstva (fenolna i halogenska). *P. mirabilis* je otporan na pojedine dezinficijense, a osjetljiv je prema antibioticima (Anonimno 2009; Anonimno 2012).

Proteus mirabilis obično nije patogen, ali postaje problem kada dođe u dodir sa ureom u urinarnom traktu. Tako se infekcija širi na druge dijelove tijela. Za tu bakteriju veže se većina infekcija mokraćnog sustava koje se pojavljuju u bolničkom okruženju (Gonzales, G., 2015).

2.3.6. *Vibrio* sp.

Bakterija iz roda *Vibrio* su fakultativno anaerobni mikroorganizmi, gram-negativni štapići veličine 0,5-3 mm. Rastu na temperaturama od 5-43 °C a minimalna pH vrijednost za rast iznosi 4,5. Rasprostranjeni su u zemlji, slanoj vodi, mesnim proizvodima i sl. Halofilni su mikroorganizmi i uzrokuju kvarenje slanih namirnica. Samo su neki sojevi patogeni. Čovjek se može inficirati korištenjem nedovoljno termički obrađene ribe i školjki.

Vibrio parahaemoliticus je halofilna bakterija koja uzrokuje akutni gastroenteritis. Najčešće se javlja nakon konzumacije hrane poput sirovih školjaka i riba iz mora. Bakterija tvori enterotoksin koji uzrokuje gubitak tekućine, a ima sposobnost oštećivanja tkiva s posljedičnim dizenteričnim sindromom. Uglavnom nema komplikacija i dolazi do spontanog ozdravljenja. *Vibrio alginolyticus* je prirodni domaćin estuarija i obalnih voda, kao i plodova mora. Ova bakterija je sveprisutna u morskoj vodi i često uzrokuje površinske rane i infekcije uha (Sabir et al., 2013). Većina infekcija proizlazi iz izloženosti posjekotine ili ogrebotine kontaminiranoj morskoj vodi.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Materijali

3.1.1. Mikroorganizmi

Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu izolirani su i identificirani u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu istraživanja autohtone mikrobne populacije riba i školjaka Jadranskog mora. Osim izoliranih sojeva u radu je korišten i standard *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433. Sojevi nose oznake prema uzorku iz kojih su izolirani (npr. LJ.O.3.- ljetni period, orada,uzorak 3) (tablica 2).

Tablica 2. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz riba i školjkaša Jadranskog mora

Oznaka	BMK	Uzorak
O1	*Lactobacillus plantarum*	LJ.O.3
09	*Lactobacillus helveticus*	LJ.O.3
L4A	*Leuconostoc mesenteroides*	LJ.L.3
K4	*Lactobacillus plantarum*	LJ.K.3
D1	*Lactobacillus plantarum*	LJ.D.1
Standard	*Lactobacillus acidophilus* LMG 9433	

3.1.2. Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/L destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvaščev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80; $MgSO_4 \times 7H_20$ 0,2; $MnSO_4 \times 7H_2O$ 0,05; Na-acetat 5; agar 13. pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15min.
- MRS (de Man, Rogosa i Sharpe) bujon je istog sastava kao MRS-agar, samo bez dodanog agara.

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj test-mikroorganizama:

- HA (hranjivi agar), sastava (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5; K_3PO_4 0,3; agar 18. pH vrijednost podloge je 7.3; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15min.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara.
- SA (sladni agar), sastava (g/L destilirane vode): sladni ekstrakt 6; maltoza 1,8; glukoza 6,0; kvaščev ekstrakt 1.2. pH vrijednost podloge je 4.7; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15min.
- SB (sladni bujon) je istog sastava kao i sladni agar, samo bez dodanog agara.

3.1.3. Pribor i oprema

- automatske pipete (Eppendorf, SAD)
- vibracijska miješalica (Tehnica, Slovenija)
- čitač mikrotitarskih pločica (Tecan, Švicarska)
- Centrifuga Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Njemačka)
- Inkubator MEMMERT BE 600 (Memmert GmbH + Co.KG, Njemačka)
- Autoklav (Sutjeska, Jugoslavija)
- tehnička vaga (Adam Equipment Inc., SAD)

3.2. Metode

3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz riba i školjaka čuvaju se na +4℃ u MRS bujonu, a test mikroorganizmi u hranjivom bujonu. Svi sojevi su trajno pohranjeni na -70℃ uz dodatak 30% (v/v) glicerola.

3.2.2. Uzgoj mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline uzgojeni su preko noći u MRS bujonu pri 37˚C. Test mikroorganizmi iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica *Escherichia coli* 3014, *Proteus mirabilis* 3008, *Salmonella typhimurium* 3064, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Staphilococcus aureus* 3048 *i Vibrio* sp. su uzgojeni preko noći u hranjivom bujonu pri 37˚C.

3.2.3. Priprava bakterija mliječne kiseline za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Kulture bakterija mliječne kiseline (*L.plantarum* O1, *L.helveticus* O9, *L.mesenteroides* L4A, *L.plantarum* D1, *L.plantarum* K4 i *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433) uzgojene su preko noći u MRS bujonu i centrifugirane 15 minuta pri 6000 rpm. Dobiveni supernatant se koristio dalje u analizama.

3.2.4. Određivanje antimikrobne aktivnosti pomoću mikrotitarskih pločica

U jažice mikrotitarskih pločica otpipetira se 240µL supernatanta bakterija mliječne kiseline i 10 µL kulture test mikroorganizma. Antimikrobno djelovanje bakterija mliječne kiseline na test mikroorganizme prati se tijekom 8 sati uzgoja pri 37˚C, spektofotometrijski, mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini od 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica (Tecan, Švicarska) svaka 2 sata. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen bujon bez dodanog supernatanta) i uzorka s dodanim supernatantom, mjera je inhibicije rasta test mikroorganizma.

3.2.5. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom s rupama u agaru (Well assay)

Rastopljeni hranjivi i sladni agar inokuliraju se s test mikroorganizmom. Nakon skrutnjavanja na agaru se izbuše rupe određenog promjera koje se potom inokuliraju sa 100 μL supernatanta ispitivane bakterije mliječne kiseline. Nakon prekonoćne inkubacije pojava zone inhibicije ukazuje na osjetljivost ispitivanog test mikroorganizma prema antimikrobnoj supstanciji.

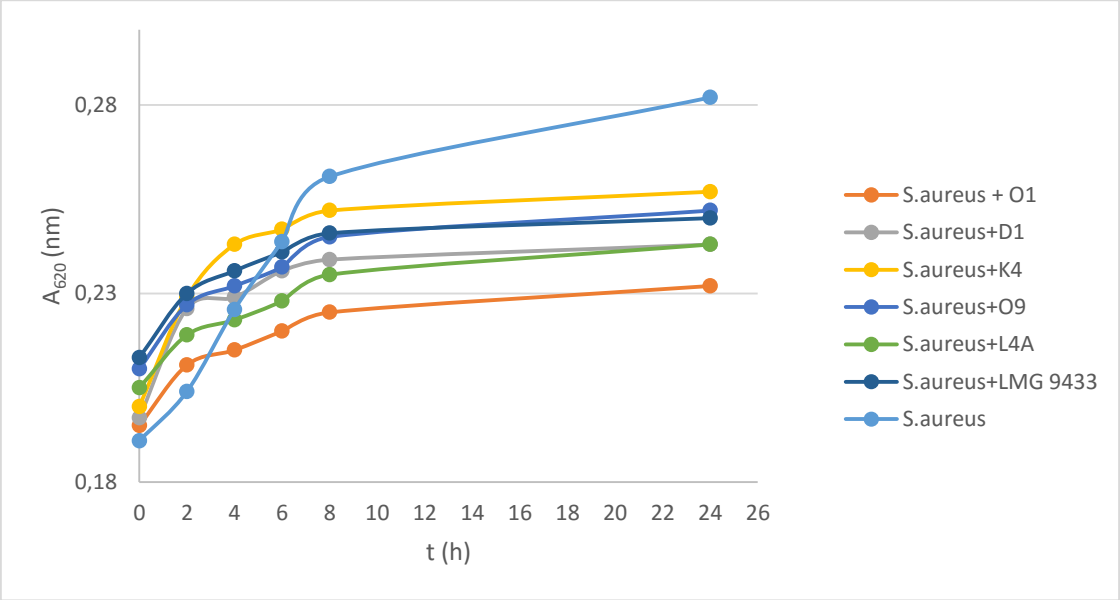
3.2.6. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (Disc assay)

Metoda se provodi na isti način kako je opisano u poglavlju 3.2.5. osim što se ispitivana antimikrobna supstancija stavlja na filter diskove.

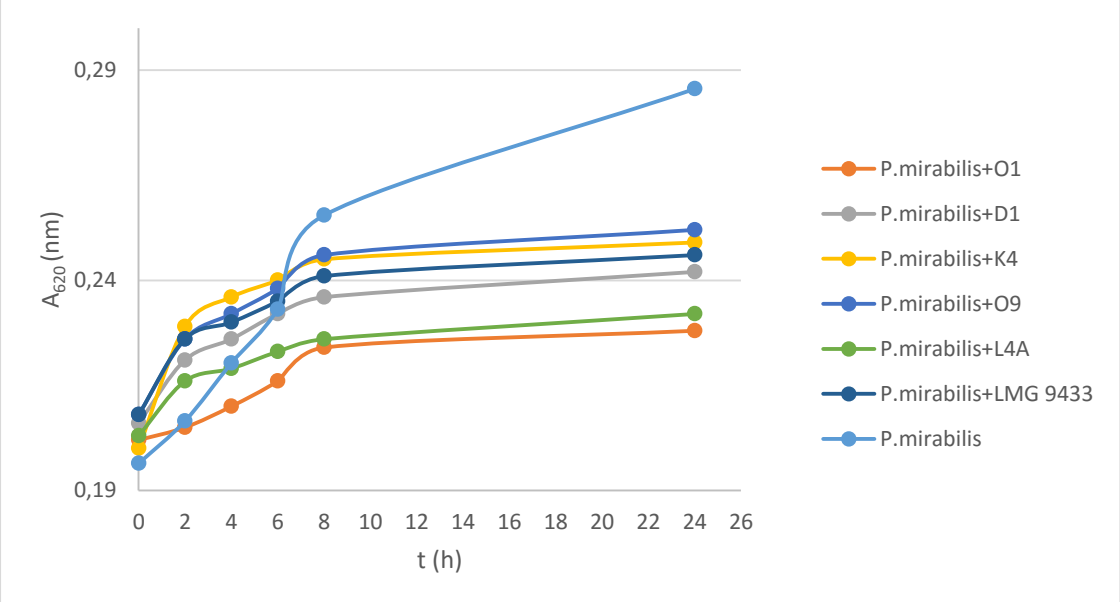
4. REZULTATI

4.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti pomoću mikrotitarskih pločica

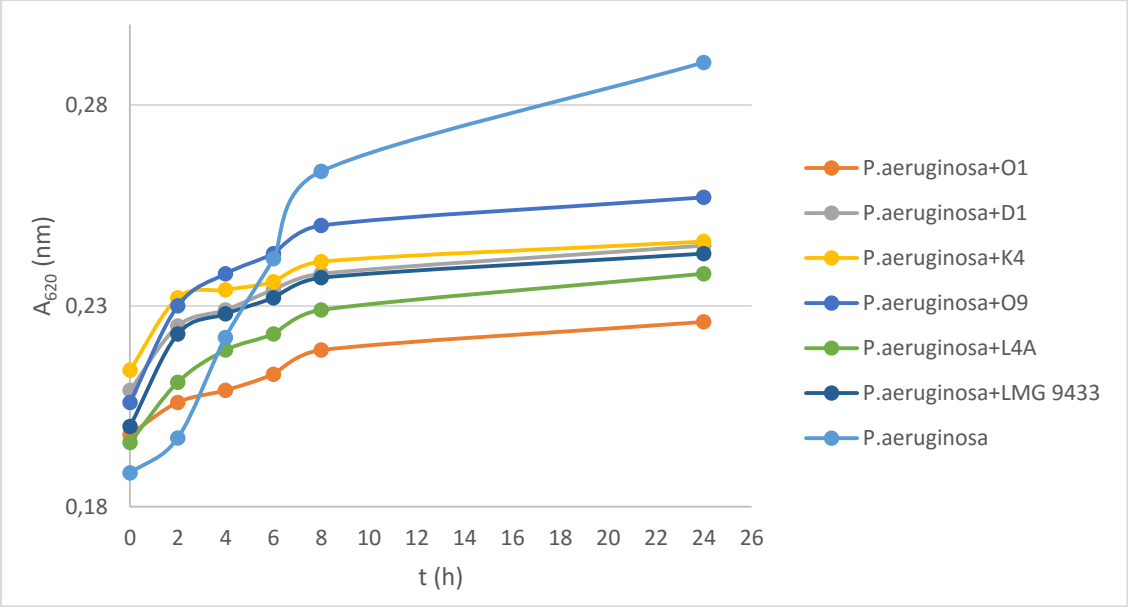
Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline prvo je ispitana pomoću mikrotitarskih pločica. Apsorbancija je mjerena pri 620 nm svaka dva sata, sveukupno kroz osam sati uključujući i mjerenje nakon 24 sata. Dobivene vrijednosti prikazane su grafički u ovisnosti o vremenu (slika 1.-slika 6.) te računski kroz postotak preživljavanja. (tablica 3).



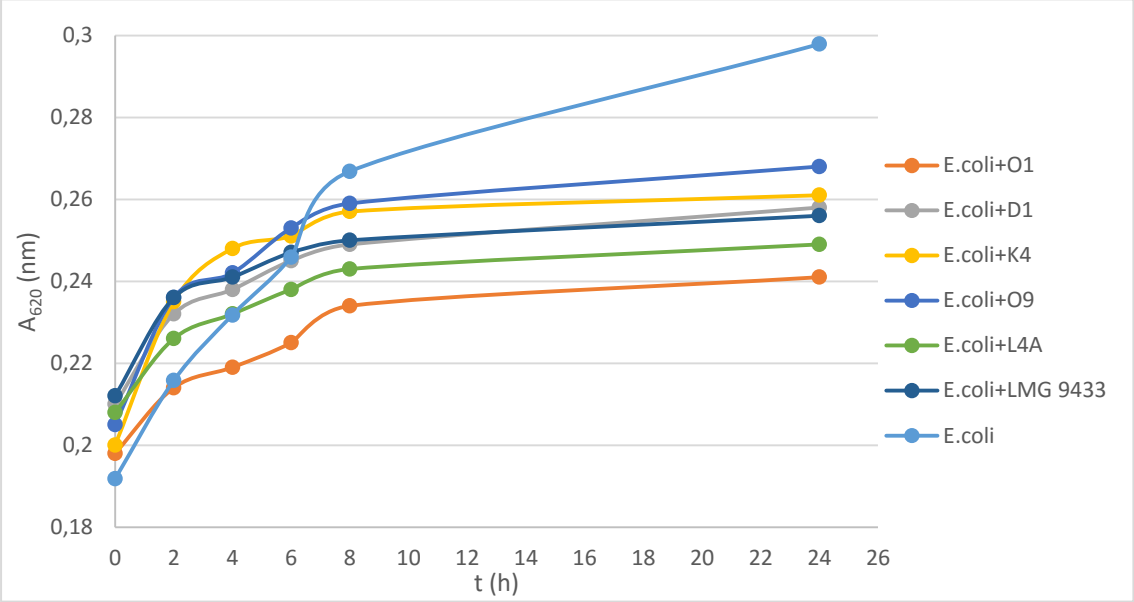
Slika 1. Inhibicija rasta bakterije *S.aureus* 3048 u prisutnosti izolata BMK



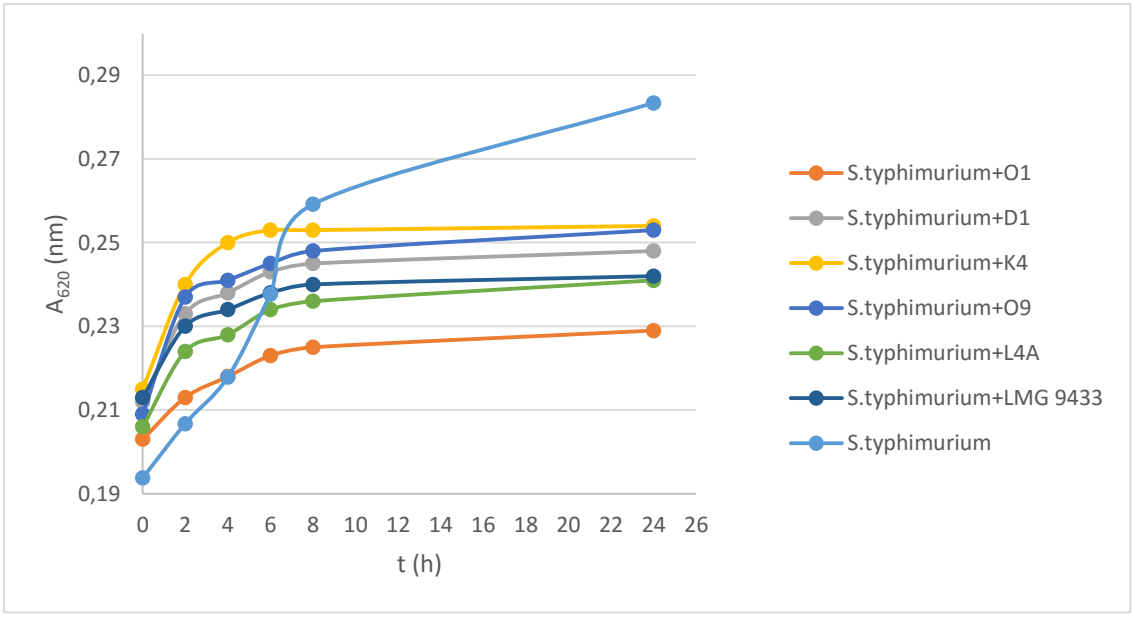
Slika 2. Inhibicija rasta bakterije *P.mirabilis* 3008 u prisutnosti izolata BMK



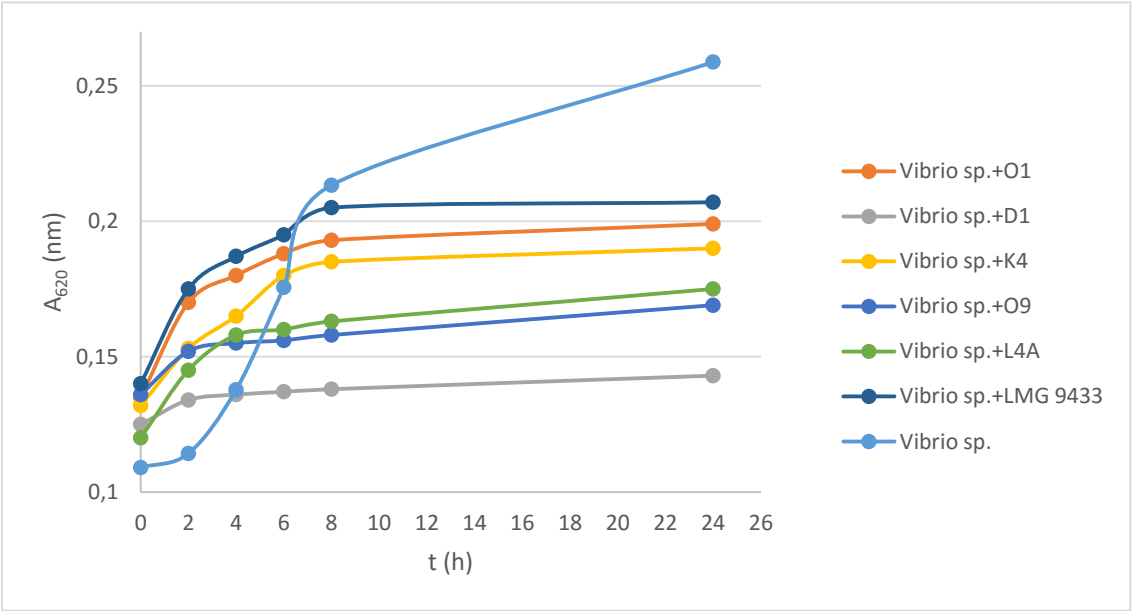
Slika 3. Inhibicija rasta bakterije *P.aeruginosa* 3024 u prisutnosti izolata BMK



Slika 4. Inhibicija rasta bakterije *E.coli* 3014 u prisutnosti izolata BMK



Slika 5. Inhibicija rasta bakterije *S.typhimurium* 3064 u prisutnosti izolata BMK



Slika 6. Inhibicija rasta bakterije *Vibrio* sp. u prisutnosti izolata BMK

Tablica 3. Postotak preživljavanja patogenih mikroorganizama uz dodatak izolata BMK

		Patogeni mikroorganizmi					
BMK	Sati (h)	*S.aureus*	*P.mirabilis*	*P.aeruginosa*	*E.coli*	*S.thypimurium*	*Vibrio* sp.
L4A	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	73%	100%	89%	100%	88%	55%
	6	54%	100%	73%	85%	56%	39%
	8	44%	63%	47%	66%	40%	31%
	24	36%	45%	37%	50%	30%	20%
O1	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	70%	100%	85%	100%	84%	53%
	6	52%	96%	70%	80%	53%	38%
	8	48%	63%	45%	63%	38%	30%
	24	34%	44%	35%	48%	29%	20%
D1	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	75%	100%	93%	100%	92%	57%
	6	56%	100%	77%	88%	58%	41%
	8	54%	66%	49%	67%	41%	32%
	24	36%	46%	38%	51%	31%	21%
O9	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	76%	100%	97%	100%	93%	59%
	6	56%	100%	80%	90%	58%	41%
	8	45%	69%	51%	70%	42%	33%
	24	37%	48%	40%	53%	32%	22%
K4	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	80%	100%	95%	100%	97%	60%
	6	58%	100%	78%	90%	60%	42%
	8	47%	69%	49%	70%	42%	34%
	24	38%	48%	38%	52%	32%	22%
LMG 9433	0	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	2	100%	100%	100%	100%	100%	100%
	4	77%	100%	93%	100%	91%	58%
	6	57%	105%	76%	88%	57%	40%
	8	46%	68%	49%	68%	40%	32%
	24	37%	47%	38%	51%	30%	21%

4.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti metodom s rupama u agaru (Well assay)

Antimikrobna aktivnost izoliranih sojeva bakterija mliječne kiseline ispitana je i metodom s rupama u agaru. Nakon inkubacije od 24 sata antimikrobno djelovanje je utvrđeno na osnovu prisutnosti zona inhibicije (tablica 4).

Tablica 4. Antimikrobna aktivnost izolata BMK određena metodom s rupama u agaru

BMK	**Patogeni mikroorganizmi**					
	P. mirabilis	*S. aureus*	*E. coli*	*Vibrio* sp.	*P. aeruginosa*	*S. typhimurium*
L. plantarum O1	-	+	+	+	+	+
L. helveticus O9	-	+	+	+	+	+
L. plantarum K4	+	+	+	+	+	+
L. plantarum D1	+	+	+	+	+	+
L. mesenteroides L4A	+	+	+	+	+	+
L. acidophilus LMG 9433	-	+	+	+	+	+

+ primjetna inhibicija; ++ jaka inhibicija; +++ vrlo jaka inhibicija; -nema inhibicije

4.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti disk difuzijskom metodom (Disc assay)

Posljednja korištena metoda u ispitivanju antimikrobne aktivnosti bila je metoda s filter diskovima. Interpretacija dobivenih rezultata je napravljena kao i u poglavlju 4.2. a rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Antimikrobna aktivnost izolata BMK određena metodom s filter diskovima

BMK	**Patogeni mikroorganizmi**					
	P. mirabilis	*S. aureus*	*E. coli*	*Vibrio* sp.	*P. aeruginosa*	*S. typhimurium*
L. plantarum O1	-	+	+	+	+	+
L. helveticus O9	-	+	+	+	+	+
L. plantarum K4	+	+	+	+	+	+
L. plantarum D1	+	+	+	+	+	+
L. mesenteroides L4A	+	+	+	+	+	+
L. acidophilus LMG 9433	-	+	+	+	+	+

+ primjetna inhibicija; ++ jaka inhibicija; +++ vrlo jaka inhibicija; -nema inhibicije

5. RASPRAVA

U ovom radu su za određivanje antimikrobne aktivnosti izolata bakterije mliječne kiseline prema najčešćim patogenim mikroorganizmima upotrijebljene tri metode. Svi izolati BMK su pokazali značajnu inhibiciju rasta patogenih test mikroorganizama u proizvodima akvakulture. Iz rezultata dobivenih metodama s rupama u agaru i s filter diskovima (tablica 4 i tablica 5) vidljivo je da su svi izolati BMK inhibirali rast *S. aureus*, *E. coli*, *Vibrio* sp., *P. aeruginosa* i *S. typhimurium* obzirom na prisutnost zona inhibicije, dok je do inhibicije rasta *P. mirabilis* došlo prilikom korištenja *L. plantarum* O1, *L. helveticus* O9 i *L. acidophilus* LMG 9433. Ovakvi rezultati se ne mogu uzeti kao konačni budući da njihova interpretacija uvelike ovisi o sposobnosti difundiranja ispitivane komponente kroz agar te o činjenici da na samom filter disku ipak ostane određena količina ispitivanog uzorka. Stoga smo unatoč tome što su obje metode pokazale identične rezultate koristili i treću metodu - metodu s mikrotitarskim pločicama koja je pouzdanija budući da osigurava izravnu interakciju među stanicama. Postotci preživljavanja patogenih mikroorganizama prikazani u tablici 3 pokazuju da je inhibicija većine patogena započela nakon 4. ili 6. sata, kada su bakterije mliječne kiseline ušle u eksponencijalnu fazu rasta i krenule antagonistički djelovati na patogene mikroorganizme. Rast svih ispitivanih test mikroorganizama je inhibiran za više od 50% što ukazuje na izrazito jaku antimikrobnu aktivnost dobivenih izolata BMK (slike 1-6). Najmanji postotak preživljavanja primjećen je kod *Vibrio* sp. i iznosi 20-22% nakon 24 sata za sve izolate BMK, dok je najmanja inhibicija rasta zabilježena kod *E.* coli te iznosi 48-53% nakon 24 sata. Kao izolat s najvećom antimikrobnom aktivnošću pokazao se *L. plantarum* O1 dok je za *L. helveticus* O9 izmjerena najmanja inhibicija rasta u odnosu na druge izolate. Obzirom na dobivene rezultate možemo zaključiti da se radi o potencijalno bioprotektivnim kulturama te se dosadašnje istraživanje može nastaviti u smjeru biokonzerviranja riba i školjkaša navedenim izolatima. Biokonzerviranje podrazumijeva metodu produženja održivosti i povećanja sigurnosti hrane uporabom mikroorganizama i/ili njihovih produkata. U okviru zaštitnog koncepta primjenjuju se zaštitne kulture bakterija mliječne kiseline tj. antagonističke kulture koje inhibiraju patogene mikroorganizme i/ili produžuju održivost hrane uz istovremeno očuvanje senzornih svojstva proizvoda (Zdolec i sur., 2007; Frece i sur., 2014). BMK proizvodnjom mliječne kiseline snižavaju pH proizvoda i na taj način inhibiraju rast acidonetolerantnih patogenih mikroorganizama (Šušković i sur., 2001; Frece i sur., 2005 b). Obzirom da je danas sve veći trend konzerviranja hrane na prirodan način, rezultati ovog završnog rada će svakako naći primjenu u budućim istraživanjima i eventualnoj primjeni u prehrambenoj industriji.

6. ZAKLJUČCI

1. Autohtona mikrobna populacija bakterija mliječne kiseline koje su izolirane iz riba (lubin, orada) i školjkaša (dagnje, kamenice) Jadranskog mora ima jako antimikrobno djelovanje na najčešće patogene mikroorganizme proizvoda akvakulture.

2. Najbolju antimikrobnu aktivnost je pokazao *Lactobacillus plantarum* O1 prema *Vibrio* sp.

3. Obzirom na dobivene rezultate, možemo zaključiti da se radi o potencijalno bioprotektivnim kulturama.

7. LITERATURA

Adams, M. R., Hall, J.C. (1988) Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acid and their mixtures. *Int. J. Food Sci. Technol*. **23**, 287-292.

Anonymous (2009). *Proteus* <http://www.stetoskop.info/Proteus-1915-c57-sickness.htm>. Pristupljeno 9. lipnja 2016.

Anonymous (2012). Rod *Proteus*, Mikrobiologija hrane. Tehnologija hrane- enciklopedija, <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/rod-proteus> Pristupljeno 9. lipnja, 2016.

Baird-Parker, A. C. (1980) Organic acids. U: Microbial Ecology of Foods. (Silliker, J. H. ured.), Academic Press, New York, str. 126-135.

Bjorck, L. (1986) The lactoperoxidase system. U: Natural antimicrobial systems. (Gould G.W., Rhodes-Roberts, M.E., Charnley, A.K., Cooper, R.M., Board, R.G.,ured.), University of Bath, London, str. 18-30.

Brkić, B., Šušković, J., Matošić, S. (1991) Antimicrobial activity of lactobacilli and streptococci. *World J. Microbiol. Biotechnol*. **7**, 533-536.

Brkić, B. (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. Magistarski rad. Zagreb: Prehrambeno-biotehnološki fakultet.

Cahill, M.M. (1990) Bacterial of fishes: A review. *Microbiol. Ecol*. 19, 21–41.

Daeschel, M.A., McKenney, M.C., McDonald, L.C. (1990) Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. *Food Microbiol*. **7**, 91-98.

Dahya, R. S., Speck, M. L. (1968) Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effects on *Staphylococcus aureus J. Dairy Sci*. **51**, 1568-1572.

Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005b) *In vitro* testing of functional propertis of three selectef probiotic strain, *World J. Microbiol. & Biotechnol*. **21**, 1401-1408.

Frece, J., et al. (2014) Comparison of sensory properties, shelf live and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and sommercial starter cultures (starter cultures for sausages production). *Food Technol. Biotechnol.* **52** (3), 307-316.

Gonzales, G. (2015) Proteus Infections. eMedicine from WebMD <http://emedicine.medscape.com/article/226434-overview> Pristupljeno 8. lipnja 2016.

Grgurić, J., Percl, M., Kolaček, S., Bačić V. (1996) Mikroflora u probavnom sustavu djece. *Mljekarstvo* **46** (4), 291-296.

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

Havranek, J., et al. (2014) Sirarstvo, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

Holland, J. B. (1967) Bacteriocins. U: Antibiotics: Volume 1 Mechanism of Action, (Gottlieb, D., Shaw, P.D. ured.), Springer Berlin Heidelberg, Berlin/Heidelberg, str.684-687.

Hurst, A. (1983) Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria, U: Antimicrobials in Foods, (Branen, A, L., Davidson, P. M., ured.), Marcel Dekker, New York, str. 327-351.

Joy, J. M., Rivers, G. M. , Boisvert, W. E. (1983) Antimicrobial properties of alpha-dicarbonyl and related compounds, *J. Food Prot.* **46**, 325-329.

Kashket, E. R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Rev.* **46**, 233-244.

Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., Defago, G., Cook, R.J., Thomashow, L.S. (1996) Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographical locations. *Appl. Environ. Microbiol*. **62**, 552–563.

Kleerebezem, M.. et al. (2003) Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **100** (4), 1990–1995.

Koninsky, J. (1982) Colicins and other bacteriocins with an established mode of action. *Ann. Rev. Microbiol*. **36**, 125-144.

Gregurek, Lj. (1999) Antimikrobno i antimutageno djelovanje probiotika. *Mljekarstvo* **49**(4), 255-260.

Meštrović, T. (2015). *Candida albicans*, Plivazdravlje.

<http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/26191/Candida-albicans.html>

Pristupljeno 7. lipnja 2016.

Moon, N. J. (1983) Inhibition of the growth of acid tolerant yeats by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *J. App. Bacteriol*. **43**, 215-230.

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

Nilsson, L. et al. (2005) Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*. *J.Appl.Microbiol*. **98**(1), 172-183.

Obradović, D. (2002/03). Tehnološka mikrobiologija, skripta

Price, R. J. Lee, J. (1970) Inhibition of *Pseudomonas* sp. by hydrogen peroxide producing lactobacili. *J. Milk Food Technol*. **33**, 13-18.

Rubin, H. E. (1987) Toxicological model for a two-acid system. *App. Environ. Microbiol*. **36**, 623-624.

Sabir M., Ennaji M. M., Cohen N. (2013) *Vibrio Alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases. *Int.J.Sci.Tehnol*. **2**(4), 302-309.

Siezen, R.J., Vlieg, J.E. (2010) Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb.Cell Fact*. **10**, 1-13.

Stead, D. (1992) Grouping of plant pathogens and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 42, 281–295.

Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S. (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo* **47**(1), 57-63.

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.

Todar, K. (2012) Kenneth Todar, Ph.D.- Home Page, <http://textbookofbacteriology.net/lactics.html> Pristupljeno 9. lipnja 2016.

Tripathy, S., Kumar, N., Mohanty, S., Samanta, M., Mandal, R.N., Maiti N.K. (2007) Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from freshwater culture systems. *Microbiol. Res.* 162(4), 391-396.

Zdolec, N. et al. (2007) Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu- mikrobiološka kakvoća . *Meso* **9**(6), 318-324.

Zdolec, N. et al. (2007) Inhibicijsko djelovanje bakterija mliječne kiseline izoliranih iz svježeg kravljeg sira. *Mljekarstvo* **57**(1), 5-13.