

Fenotipska identifikacija bakterija mliječne kiseline izoliranih iz školjkaša *Aequipecten opercularis*

Ćužić, Marija

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:681823>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Marija Čužić
0058217391**

**Fenotipska identifikacija bakterija mliječne kiseline
izoliranih iz školjkaša**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: dr. sc. Iva Čanak

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija
Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Fenotipska identifikacija bakterija mliječne kiseline izoliranih iz školjkaša

Marija Čužić, 0058217391

Sažetak: Posljednjih godina sve je veće zanimanje za bakterijama mliječne kiseline (BMK) morskog podrijetla zbog njihovog neistraženog potencijala. Zbog prilagodbe na posebne uvjete života u morskoj vodi bitno se razlikuju od BMK kopnenog podrijetla, stoga se još istražuje njihova primjena u svim sferama života. Dosad utvrđen potencijal odnosi se na prebiotička i probiotička svojstva BMK, biokonzerviranje, bioremedijaciju teških metala i sl. Stoga je cilj ovog rada bio identificirati potencijalne izolate BMK iz probavnog sustava češljače *Aequipecten opercularis*, te ih identificirati fenotipskim metodama. Rezultati su potvrdili da se radi o skupini bakterija mliječne kiseline, a MALDI TOF analizom su dobiveni konačni rezultati identifikacije i zaključak da su sva tri bakterijska izolata vrste *Lactobacillus plantarum*. Kako bi se utvrdio potencijal navedenih izolata potrebno je provesti dodatne karakterizacije.

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, fenotipska identifikacija, češljače

Rad sadrži: 29 stranica, 6 slika, 1 tablica, 48 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

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

Mentor: dr. sc. Iva Čanak

Pomoć pri izradi: dr.sc. Snježana Kazazić

Datum obrane: . rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Biochemical identification of lactic acid bacteria isolated from shellfish

Marija Čužić, 0058217391

Abstract: In recent years, there has been an increasing interest in lactic acid bacteria (LAB) of marine origin due to their unexplored potential. Due to their adaption to special conditions of life in seawater, they differ significantly from LAB of terrestrial origin, therefore their application in all spheres of life is still being investigated. The potential that has been researched so far relates to the prebiotic and probiotic properties of LAB, biopreservation, bioremediation of heavy metals, etc. Therefore, the aim of this work was to identify potential isolates of LAB from the digestive system of the scallop *Aequipecten opercularis*, and to identify them using phenotypic methods. The results showed the presence of LAB, and MALDI TOF analysis provided the final identification results and concluded that all three bacterial isolates belong to *Lactobacillus plantarum* species. In order to determine the potential of the mentioned isolates, it is necessary to carry out additional characterizations.

Keywords: lactic acid bacteria, phenotypical identification, scallops

Thesis contains: 29 pages, 6 figures, 1 table, 48 references

Original in: Croatian

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

Mentor: Iva Čanak, PhD

Co-mentor: Snježana Kazazić, PhD

Thesis defended: September , 2022.

SADRŽAJ

<u>1. UVOD</u>	1
<u>2. TEORIJSKI DIO</u>	2
<u>2.1. MIKROORGANIZMI IZOLIRANI IZ MORSKOG OKOLIŠA</u>	2
2.1.1. MIKROORGANIZMI IZOLIRANI IZ ŠKOLJKAŠA	5
<u>2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE</u>	7
2.2.1. ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	8
2.2.2. ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	8
2.2.3. ROD <i>LEUCONOSTOC</i>	9
2.2.4. ROD <i>STREPTOCOCCUS</i>	9
2.2.5. ROD <i>PEDIOCOCCUS</i>	9
<u>2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE MORSKOG PORIJEKLA</u>	10
2.3.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE IZOLIRANE IZ ŠKOLJKAŠA	12
<u>2.4. METODE IDENTIFIKACIJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE</u>	13
2.4.1. MIKROBIOLOŠKE METODE	13
2.4.2. BIOKEMIJSKE METODE	14
2.4.3. MOLEKULARNE (GENETIČKE) METODE	16
<u>3. EKSPERIMENTALNI DIO</u>	17
<u>3.1. MATERIJALI</u>	17
3.1.1. HRANJIVE PODLOGE	17
3.1.2. PRIBOR I OPREMA	18
<u>3.2. METODE</u>	18
3.2.1. BOJANJE PO GRAMU	18
3.2.2. KATALAZA TEST	18
3.2.3. ODREĐIVANJE PH VRIJEDNOSTI	19
3.2.4. API 50 CHL BIOKEMIJSKI TEST	19
3.2.5. SPEKTROMETRIJA MASA MALDI TOF/TOF (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION-TIME OF FLIGHT)	20
<u>4. REZULTATI I RASPRAVA</u>	22
<u>5. ZAKLJUČCI</u>	25
<u>6. REFERENCE</u>	26

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) predstavljaju skupinu organizama od iznimne važnosti kako za ljudsko zdravlje, tako za zdravlje i normalnu funkciju životinja i cjelokupnog ekosustava u kojima se nalaze. Pojam „bakterije mliječne kiseline“ uveo je znanstvenik Orla-Jensen tek u 20. stoljeću, međutim, njihova uloga i važnost prepoznate su još od davnih vremena.

BMK čine skupinu bakterija koje imaju morfološke, metaboličke i fiziološke sličnosti, a filogenetski su relativno blisko povezani. Opći opis bakterija unutar skupine su gram-pozitivni, nesporulirajući koki ili štapići koji fermentacijom ugljikohidrata proizvode mliječnu kiselinu kao svoj glavni krajnji proizvod. Prvotno su korištene u fermentaciji i pripremi hrane produljenog roka trajanja pomoću niza biokemijskih promjena, kao što su mliječni kiseli proizvodi, ukiseljeno povrće, a zatim i alkoholna pića poput piva i vina (Khalid, 2011).

Širok je spektar mogućnosti korištenja BMK u svakodnevnom životu, od bakteriocina koji se koriste kao dodaci hrani zbog inhibitorne aktivnosti do kultura koje pospešuju fermentaciju. Koriste se kao probiotici, kontrola rasta plijesni i sinteze mikotoksina, kod očuvanja prehrambenih proizvoda, potencijalni imunomodulatori, te brojni drugi primjeri (Khalid, 2011).

U novije vrijeme znanost se sve više okreće BMK morskog podrijetla zbog brojnosti BMK u morskom okolišu i njihovoj sposobnosti prilagodbe na specifične uvjete okoliša. Brojne su prednosti BMK morskog podrijetla, međutim, istraživanja su još u tijeku. Dosad utvrđeni potencijal odnosi se na poboljšanje antikoagulacijskih i antioksidacijskih svojstva tijekom fermentacije određene vrste morske trave, korištenje BMK izoliranih iz gastrointestinalnog trakta morskih životinja kao probiotika, za bioremedijaciju teških metala, primjenu izoliranih egzopolisaharida kao prebiotika i sl. (Ameen i sur., 2020; Hongpattarakere i sur., 2012; Shobharani i sur., 2012; Buntin i sur., 2008).

Cilj ovog rada bio je izolirati i fenotipski identificirati BMK iz morskih školjkaša s ciljem istraživanja njihovog punog potencijala.

2. TEORIJSKI DIO

Oceani i mora pokrivaju više od 70 % Zemljine površine i predstavljaju više od 95 % biosfere što ih čini najvažnijim izvorom biološki važnih spojeva koji bi se mogli iskazati povoljnima za ljudsko zdravlje. Među mnogim oblicima života koji se mogu pronaći u morskom okolišu, najbitniju ulogu imaju mikroorganizmi zbog svojih specifičnih fizioloških i kemijskih karakteristika koji ih čine otpornim i na najekstremnije životne uvjete. U morskom ekosustavu mogu se naći predstavnici svih skupina mikroorganizama, počevši od prokariota (bakterije i cijanobakterije) te viših skupina – eukariota (alge, protisti, filamentne gljive i kvasci), uključujući i viruse kao zasebne oblike života (Krstulović i Šolić, 2006).

Glavno obilježje svih morskih okoliša je povišen tlak; oko 70 % oceana je pod pritiskom od najmanje 38 MPa. S obzirom na tako specifične i ekstremne uvjete života, malo organizama može preživjeti. Što se mikroorganizama tiče, većina vrsti može normalno funkcionirati pod tim visokim tlakovima te potiču mnoge oceanske biogeokemijske cikluse i kataliziraju reakcije među stijenama i sedimentima. Štoviše, u dubokomorskim staništima prebivaju obligatni barofilni mikroorganizmi koji ne mogu rasti ispod tlaka od 350 atmosfera, a kod atmosferskog tlaka ugibaju (Krstulović i Šolić, 2006).

2.1. MIKROORGANIZMI IZOLIRANI IZ MORSKOG OKOLIŠA

U svakoj litri morske vode nalazi se više od milijardu mikroorganizama – oni upravljaju raznolikošću i metaboličkom aktivnošću oceana. Čine 98 % biomase oceana (DeLong, 2007), opskrbljuju atmosferu kisikom, glavni su razgrađivači plinova koji uzrokuju efekt staklenika te mogu pozitivno utjecati na klimatske promjene. Nastanjuju sve vrste različitih okoliša oceana kao što su duboko more, polarni led, hidrotermalni izvori i koraljni grebeni, a njihova prisutnost i ekološka uloga variraju ovisno o okolišnim uvjetima (Webster i Hill, 2007). Mogu preživjeti u svim ekstremima: ledenim polarnim vodama Antarktičkog oceana jednako kao i na 350 °C u termalnim izvorima.

Brojni su bioaktivni spojevi koji potječu od morskih mikroorganizama, a neki od njih su antibiotski spojevi, polisaharidi, inhibitori, enzimi, peptidi te pigmenti koji se koriste u raznim granama znanosti. Nedavna znanstvena istraživanja otkrila su da mikrobnii spojevi iz morskih

organizama pokazuju široka svojstva – protuupalna, antihipertenzijska, antimalarijska, antikoagulacijska, antivirusna, antitumorska, protiv HIV-a, dijabetesa te raznih drugih bolesti i medicinskih stanja (Imhoff i sur., 2011).

Waters i sur. (2010) naglasili su činjenicu da je vrlo vjerojatno da će više od polovice molekula koje su trenutno uključene u proces razvoja lijekova proizvesti upravo morski mikroorganizmi. Osim toga, velik broj metabolita prehrambene kvalitete s obećavajućim farmaceutskim svojstvima također je izoliran iz morskih mikroba, a postoji očiti potencijal za daljnji razvoj tih aktivnih sastojaka.

Zbog velike raznovrsnosti mikroorganizama u morskom okolišu moguće je izolirati i istraživati velik broj vrsti. Populacija mikroorganizama koja se izolira uvelike ovisi o uvjetima pod kojima se izolacija provodi: lokacijskim – školjke izlovljene blizu kanalizacijskih ispusta i gradova imat će veću raznolikost i brojnost mikroorganizama, pogotovo patogenih, za razliku od onih izlovljenih u čistom moru; o vremenskim uvjetima – tijekom toplijih mjeseci veća je kontaminiranost patogenim mikroorganizmima zbog povoljnijih uvjeta za razvoj, geografskim – organizmi podrijetlom iz toplijih mora imaju veću mikrobnu raznolikost i sl. (Habbu i sur., 2016., Čanak i sur., 2018.)

Morske bakterije su bogati proizvođači sekundarnih metabolita zbog rasta i razvoja u oštroj i često nepovoljnoj oceanskoj klimi. Sve veći zahtjevi za novim antimikrobnim molekulama učinkovitima protiv rezistentnih sojeva mikroorganizama potaknuli su brojne istraživačke skupine da istražuju oceane u potrazi za novim bioaktivnim spojevima. Tijekom godina razvijene su opsežne metode odabira i veliki naponi uloženi su u svrhu izolacije novih metabolita iz morskih bakterija. Glavna prepreka u potrazi za metabolitima iz morskih bakterija je nemogućnost laboratorijskog uzgoja većine njih (preko 99 %) (Krypides i sur., 2014). Morske bakterije izolirane su iz površinskih i dubokih voda, no većina potječe s površina kao što su spužve, makroalge i zooplanktoni te koralji. Velik broj njih također se pronalazi i u unutrašnjosti organizma viših životinja: od mekušaca, spužvi, rakova, sve do riba hrskavičnjača i koštunjača te morskih sisavaca. (Long i Azam, 2001). Najgušća mikrobna populacija bakterija može se pronaći u probavnom sustavu pojedinog organizma, gdje dostiže svoje najviše i najraznovrsnije vrijednosti i predstavlja bogat izvor za daljnje mikrobiološke analize (Krstulović i Šolić, 2006).

Najveći broj bakterija pronađen u moru pripada rodovima *Pseudomonas sp.*, *Vibrio sp.*, *Achromobacter sp.*, *Flavobacterium sp.* i *Micrococcus sp.*, međutim, rod streptomiceta posljednjih godina postaje glavni izvor novih molekula. Od morskih bakterija se očekuje da posjeduju fiziološka, biokemijska i molekularna svojstva po kojima će se razlikovati od kopnenih bakterija, a zahvaljujući njima mogu proizvoditi drukčije spojeve. Kao takve, morske bakterije predstavljaju mikroorganizme s najvećim potencijalom za otkrivanje novih molekula s antibakterijskim svojstvima (Ameen i sur., 2020).

Bakterije roda *Vibrio* fenotipski su jako različita skupina bakterija, a njihova iznimna važnost očituje se u patogenosti; imaju sposobnost zaraze velikog broja organizama: školjkaša, rakova, ježeva, algi i riba, a konzumacijom tih životinja zaraza se prenosi i na čovjeka. Bile su uzročnici brojnih pandemija, a očekuje se još veći porast broja infekcija koji se može pripisati globalnom zatopljenju, rastu stanovništva i lošim sanitarnim uvjetima (Baker-Austin i sur., 2018).

Aktinomicete su bakterije roda *Actinomycetia*, a njihova specifičnost je formiranje razgranate mreže hifa nalik gljivama. Morske aktinomicete dobro su poznate kao novi izvori bioaktivnih spojeva uključujući sredstva protiv biofilma kojeg izlučuju određene bakterije s različitim terapijskim primjenama. U studiji koju su proveli Leetanasaksakul i Thamchaipenet 2018. godine otkrili su da su određeni sojevi aktinomiceta smanjili stvaranje filma *Escherichie coli* i *Staphylococcus aureus* za čak 60 %. Daljnjom analizom potvrđeno je da izlučuju netoksične tvari za okoliš protiv tog biofilma, a neke su čak popraćene proteaznom aktivnošću, te sprečavaju spomenute bakterije da stvore otpornost.

Filamentne gljive prilagođene na život u okolišu visoke slanosti mogu biti osmotrofni ili saprofitni organizmi, što znači da kao izvor hrane koriste otoplenu organsku tvar ili razgrađuju organsku tvar (Krstulović i Šolić, 2006). Njihova važnost je upravo u toj razgradnji organskih tvari, najviše celuloznih materijala, ali mogu razgrađivati i uginule životinje. Pored toga, postoje filamentne gljive koje razvijaju simbiotske odnose s drugim organizmima, kao i one koje su patogene za živi svijet. Patogenost se najviše očituje u gljivičnim infekcijama koje su povezane s bolestima kod makroalgi, koralja, rakova, pa čak i morskih sisavaca. Diljem svijeta gljive se povezuju uz smrt koralja u grebenima što uvelike negativno utječe na klimatske promjene (Gladfelter i sur., 2019). Samim postojanjem, rastom i razvojem gljive imaju veliku ulogu u lancu prehrane.

Kvasci imaju nešto manju važnost, a populacije uglavnom ovise o vrsti i koncentraciji organskih materijala. Prvi put su otkriveni u Atlantskom oceanu, a nakon tog otkrića izolirani su iz brojnih izvora: morske vode, morskih naslaga, algi, riba, sisavaca i sličnih organizama. Aerobni oblici su zastupljeniji u čistim vodama, a fermentativni u onečišćenim; te su kvasci općenito više zastupljeni u muljevitim staništima nego pjeskovitim sedimentima (Kutty i Philip, 2008).

2.1.1. Mikroorganizmi izolirani iz školjkaša

S obzirom na svoju specifičnu građu, školjkaši su vrsta koja je izrazito podložna kontaminaciji raznim mikroorganizmima, među kojima se najčešće mogu pronaći razne vrste patogenih bakterija. Školjkaši (razred *Bivalvia*) pripadaju koljenu mekušaca (*Mollusca*), a oni su važni za funkcioniranje brojnih ekosustava jer sudjeluju u kruženju tvari i filtriranju vode.

Specifičnost njihove građe je sustav za filtriranje vode, što je zapravo način na koji se oni hrane: optokom vode u kojoj su otopljene hranjive tvari, odnosno fitoplanktoni i detritusi iz vode. Skupa s vodom u svom tkivu zadržavaju raznorazne bakterije, viruse, biotoksine podrijetlom iz algi, morske gljive i sl. (Mašić, 2004).

Mikrobiološka kakvoća školjkaša procjenjuje se brojanjem fekalnih indikatorskih bakterija *E. coli* i enterokoka. Te vrijednosti daju informaciju o mogućoj prisutnosti fekalnih mikroorganizama potencijalno patogenih za ljude kao što su već spomenuti pripadnici vrste *E. coli* ili roda *Enterococcus* te bakterije kao što su *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* Međutim, ovi pokazatelji ne uzimaju u obzir prisustvo bakterija kao što je rod *Vibrio* (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, i *V. cholerae*), koje se obično mogu pronaći u obalnim vodama Europe, a rizik od budućih infekcija mogao bi se povećati u nadolazećim desetljećima zbog klimatskih promjena (Rincé, 2018). Osim spomenutih vrsta, za ljudsko zdravlje opasne su još: *Clostridium botulinum* tip E i F, *Proteus spp.*, *Streptococcus faecalis* te *C. perfringens*, a sve se mogu naći u školjkašima (Mašić, 2004).

Uz ljudske bakterijske patogene, u školjkašima se mogu pronaći i crijevni virusi kao što je HuNoV – humani Norovirus; oni su vodeći uzročnici gastroenteritisa u svijetu (de Graaf i sur., 2016). Osim fizioloških toksina, opasnost za tkivo školjke i čovjeka kao konzumenta predstavljaju biotoksini koje proizvode eukariotske mikroalge i cijanobakterije (Mašić, 2004), a najsmrtonosnije toksine među njima proizvode alge kremenjašice i dinoflagelati.

Čanak i suradnici 2018. godine proveli su istraživanje mikrobioloških i kemijskih parametara svježih školjkaša. U uzorcima dagnji i kamenica dokazana je prisutnost bakterije *Vibrio parahaemolyticus* koja je bila očekivana zbog začahurenosti tih bakterija u probavnom sustavu školjkaša tijekom zimskih mjeseci; dokazana je prisutnost *E.coli* koja se najčešće nalazi kod školjkaša uzgojenih blizu kanalizacijskih ispusta, nepatogene vrste *Listeria*, *Pseudomonas aeruginosa* te sulfitoreducirajućih klostridija.

Normanno i suradnici proveli su 2006. istraživanje o prisustnosti bakterija roda *Vibrio* i mikroorganizama fekalnog podrijetla u mediteranskim dagnjama (*Mytilus galloprovincialis*) koje se prodaju u regiji Puglia u Italiji. Mediteranska dagnja jedan je od školjkaša koji se najčešće konzumira, i shodno tomu uzrokuje česte epidemije trovanja hranom uzrokovane bakterijama *V. parahaemolyticus* i *V. vulnificus*. U radu je istraženo 600 uzoraka dagnji; čak 7,83 % njih bilo je zaraženo s *V. parahaemolyticus*, a 2,83 % s *V. vulnificus*. 28 uzoraka imalo je razinu mikroorganizama fekalnog podrijetla višu od dopuštenih. Zaključak istraživanja je da je potreban oprez i javna svijest o mogućim zdravstvenim opasnostima povezanim s konzumacijom školjkaša, sirovih ili nedovoljno kuhanih.

2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) svoje ime su dobile po zajedničkoj osobini da iz šećera i drugih ugljikohidrata nizom reakcija stvaraju mliječnu kiselinu. BMK su fakultativne anaerobne bakterije s fermentativnim metabolizmom. One su gram-pozitivne, nepokretne su i nesporogene, bez citokroma, tolerantne na kiseline; najčešće oblika koka ili štapića. Negativne su na katalaza test; imaju baktericidna i antimikrobna svojstva koja inhibiraju rast patogenih bakterija i drugih mikroba pa se zato dugi niz godina koriste za fermentiranje hrane (Obradović, 2002). BMK se općenito povezuju sa staništima bogatim hranjivim tvarima, kao što su razni prehrambeni proizvodi (mlijeko, meso, pića, povrće), ali se pronalaze i u flori probavnog sustava, i u nekim slučajevima, reproduktivnom sustavu sisavaca.

BMK imaju potrebu za kompleksnim faktorima rasta kao što su vitamini, aminokiseline, nukleotidne baze, minerali, ugljikohidrati, masne kiseline. Optimalan pH za rast je između 5,5 i 5,8; mliječna kiselina kao produkt dodatno snižava pH i time onemogućava rast neželjenih mikroorganizama (Mokoena, 2017).

Važna karakteristika koja se koristi u diferencijaciji BMK rodova je način fermentacije glukoze u standardnim uvjetima, a ti uvjeti su neograničene koncentracije glukoze i već spomenutih faktora rasta te ograničena dostupnost kisika. Pod ovim uvjetima BMK se mogu podijeliti u dvije skupine: homofermentativne, koje razgrađuju glukozu u mliječnu kiselinu i heterofermentativne, koje fermentiraju glukozu u mliječnu kiselinu, etanol/octenu kiselinu i CO₂ (Axelsson, 2004).

Prema taksonomskoj klasifikaciji, BMK pripadaju koljenu *Firmicutes* i mogu se podijeliti u 5 rodova: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Streptococcus*. Znanstvenik Orla-Jensen u svojim brojnim radovima pokušao je što točnije klasificirati BMK, a koristio je sljedeće karakteristike kao osnovu: morfologiju (koke ili štapići, formiranje tetrada), način fermentacije glukoze (homo- ili heterofermentacija), rast na određenim temperaturama (npr. 108 °C i 458 °C) i opseg korištenja šećera (Axelsson, 2004).

2.2.1. Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* daleko je najveći od svih rodova BMK te je vrlo heterogen: obuhvaća vrste s velikom raznolikošću fenotipskih, biokemijskih i fizioloških svojstava. Ovaj rod specifičan je po svome štapičastom obliku. Osim njega, još samo rod *Carnobacterium* ima isti oblik, a svi su ostali rodovi su kugličastog oblika. Rezultati klasičnih fenotipskih testova rodova *Carnobacterium* i *Lactobacillus* neće se razlikovati, ali karnobakterije se mogu diferencirati od laktobacila po njihovoj sposobnosti rasta na pH 9,0 i nemogućnosti rasta na acetatnom mediju selektivnom za laktobacile (Axelsson, 2004).

Bakterije ovog roda su gram-pozitivne i mikroaerofilne, a klasični načini razlikovanja između vrsta laktobacila su način fermentacije ugljikohidrata, oblik optičkih izomera proizvedene mliječne kiseline, hidroliza arginina, specifični zahtjevi za faktore rasta i rast na određenim temperaturama. Laktobacili su široko rasprostranjeni u prirodi te postoji više od 100 vrsta, a mnoge od njih našle su primjenu u prehrambenoj industriji. Općenito su najtolerantniji na kiseline u odnosu na ostale BMK, a također su povezani s usnom šupljinom, gastrointestinalnim traktom i spolnim sustavom ljudi i životinja (Salvetti i sur., 2012).

2.2.2. Rod *Lactococcus*

Laktokoki su gram-pozitivne koke veličine 0,5 do 1,5 mikrometara i pripadaju skupini homofermentativnih BMK te proizvode isključivo L-(+) mliječnu kiselinu iz šećera heksoze. Rod uključuje sedam vrsta, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. chungangensis*, *L. fujiensis* i najpoznatiju vrstu među njima: *L. lactis*.

Laktokoki se općenito nalaze na biljkama i koži životinja. *L. plantarum* se uglavnom izdvaja iz biljaka, *L. garvieae* iz riba, životinja i mlijeka, a *L. piscium* iz lososa. Prisutnost laktokoka u sirovom mlijeku posljedica je kontaminacije krmom tijekom mužnje. Dva laktokoka koja se najčešće nalaze u sirovom mlijeku, siru i drugim mliječnim proizvodima su *L. lactis subsp. lactis* i *L. lactis subsp. cremoris* (Casalta i Montel, 2008).

2.2.3. Rod *Leuconostoc*

Bakterije ovog roda, morfološki gledano, stanice su sferičnog ili eliptičnog oblika raspoređene u parove ili lance. Za rast najpovoljniji je pH oko 6,5, a temperatura između 20 i 30 °C. *Leuconostoc spp.* često se može izolirati iz svježih biljaka. Iz ovog prirodnog staništa šire se u različite niše uključujući sirovo mlijeko ili rashlađene prehrambene proizvode. Igraju važnu ulogu u nekoliko industrijskih procesa fermentacije hrane kao što su fermentirane kobasice, fermentirano povrće i proizvodi od žitarica te mliječni proizvodi (npr. maslac, vrhnje, svježe mlijeko, sirevi). Neke vrste također su prisutne u vakuum pakiranim mesnim proizvodima (*L. carnosum*) ili u otopini šećera (*L. gelidum*) (Ogier i sur., 2008).

2.2.4. Rod *Streptococcus*

Rod *Streptococcus* sastoji se od Gram-pozitivnih, sferičnih ili jajolikih stanica koje su obično raspoređene u lance ili parove. Ovi koki su homofermentativni i imaju složene nutritivne zahtjeve, a neki od njih osim kisika zahtijevaju i prisutnost ugljikovog dioksida.

Od 49 vrsta ovog roda, čak 35 njih su identificirane kao uzročnici invazivnih infekcija kod čovjeka. Najčešći uzročnici su *Streptococcus pneumoniae* i *S. pyogenes* koji pripadaju grupi A, *S. agalactiae* grupi B, te *S. mutans*. *S. pneumoniae* vodeći je uzrok upale pluća i time je postala vrsta odgovorna za 18 % smrtnih slučajeva kod djece mlađe od 5 godina. Specifična karakteristika ove vrste BMK je genetska fleksibilnost, stoga je podložna prirodnim transformacijama koje joj omogućuju dobivanje novih fenotipskih značajki. Nadalje, bakterija *S. pyogenes* odgovorna je za pola milijuna smrti godišnje, većinom zbog sindroma toksičnog šoka kojeg uzrokuje. *S. algaticae* uzrokuje spontane pobačaje, sepsu i meningitis, a *S. mutans* sudjeluje u stvaranju ugrušaka te dovodi do moždanih i srčanih udara (Krzyściak i sur., 2013).

2.2.5. Rod *Pediococcus*

Bakterije ovog roda su fakultativni anaerobi u obliku koka te jedine BMK koje su raspoređene u tetrade. U uvjetima bez kisika provode fermentaciju glukoze, a krajnji produkt je mliječna kiselina. Optimalan rast imaju pri pH 5, sve do pH vrijednosti 9 kada više ne mogu rasti.

Bakterije se najčešće pronalaze u raznim kašama, sladovinama, kvascima i pivu, a do danas je

otkriveno 12 vrsta. Koriste se u fermentaciji povrća, alkoholnih pića, kao probiotici te dodaci prehrambenim proizvodima (Vidergar, 2020.).

2.3. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE MORSKOG PORIJEKLA

BMK jedne su od najpoznatijih i najviše korištenih organizama u svim sferama ljudskog života; međutim, BMK porijeklom iz mora puno su slabije istražene i njihova uloga tek se počela spoznavati u novije vrijeme.

Kao što su BMK kopnenog porijekla široko raširene na svim vrstama staništa, tako se i BMK morskog porijekla mogu naći na svježim spužvama i onima u procesu razlaganja, morskim travama, školjkašima, rakovima i ribama. Imaju bitnu ulogu u razlaganju organske tvari, pogotovo na površini dubokih morskih sedimenata. Novija istraživanja pokušavaju dokazati ulogu i mogućnosti morskih BMK u proizvodnji i preradi hrane, fermentaciji i farmaceutskoj industriji.

U morskom okolišu prisutan je velik broj različitih rodova i vrsta bakterija, međutim, BMK nisu zastupljene u tolikom broju. Najčešća staništa iz kojih se izoliraju su obalni sedimenti i estuariji, a osobito mjesta gdje je prisutno raspadanje organske materije ili kanalizacijski ispusti (Krstulović i Šolić, 2006).

Morske BMK imaju specifične karakteristike kojima se razlikuju od kopnenih; na primjer, bakterije roda *Carnobacterium* iz Antarktičkog oceana su neutrofili, odnosno optimalan pH za njihov rast je 7,0. Kad se nalazi u moru, bakterija *Mycobacterium psychrotolerans* povoljnije će rasti u lužnatijem okolišu u rasponu pH od 6,0 do 10,0, što znači da ne stvara kisele uvjete kao kopnene BMK koje time onemogućavaju rast drugih organizama. Navedena bakterija također raste u širokom rasponu temperatura, od -1,8 do 45 °C, s optimalnim rasponom temperature od 40 do 45 °C, tolerantna je na salinitet i može rasti do koncentracije od 20.5 % NaCl. Navedene karakteristike su samo primjer specifičnih prilagodbi koje su BMK razvile za život i preživljavanje u morskom okolišu (Kathiseran i Thiruneelakandan, 2008).

Panigrahi i suradnici su 2005. godine u svom istraživanju zaključili da vrsta *L. rhamnosus* inducira imunostimulacijski efekt kod kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tako što povećava razinu imunoglobulina u plazmi. Nadalje, istraživanje koje su proveli Shobharani i suradnici 2012. godine bilo je fokusirano na BMK izolirane iz morskog okoliša i njihovu učinkovitost u fermentaciji morskih algi. Korištena je kultura *Enterococcus faecium* te je u usporedbi s kontrolom

dokazano da morska alga *Sargassum* fermentirana tim sojem pokazuje dva puta jaču antikoagulacijsku aktivnost, kao i znatno veću antioksidacijsku aktivnost. Stoga, ova studija pruža osnovu za primjenu BMK u proizvodnji novih vrsta morske hrane sa svojstvima povoljnim za ljudsko zdravlje, a može se dalje proširiti na pročišćavanje bioaktivnih molekula s ciljem razjašnjenja njihovog mehanizma za terapijsku primjenu.

Čanak je u svom doktorskom radu 2020. godine provela opsežno istraživanje 5 sojeva BMK u svrhu njihove primjene kao probiotika s ciljem sprječavanja i smanjivanja bolesti morskih životinja te kao bioloških konzervansa proizvoda akvakulture. Soj *L. plantarum* O1 izoliran iz probavnog sustava orade pokazao se kao soj s najboljim predispozicijama za primjenu u ribljoj industriji, zadovoljavajući je sve tehnološke kriterije za primjenu kao probiotik ili bioprotektivna kultura.

Mnoga druga istraživanja uspješno su provedena sa ciljem istraživanja primjene morskih BMK u svakodnevnom životu, međutim, njihov negativan utjecaj na akvakulturu također je od velikog značaja. *Streptococcus iniae* je patogen koji se nalazi kako u slatkovodnim, tako i u morskim vodama te uzrokuje bolesti kod riba i ljudi. Otkriven je 1970-ih godina u potkožnim apscesima slatkovodnih dupina iz rijeke Amazone; jedan je od najsmrtonosnijih uzročnika bolesti kod riba jer uzrokuje 30-50 % smrtnosti u pogođenim područjima. Može se prenijeti i na ljude koji dolaze u dodir sa zaraženim ribama; uzrokuje sepsu, sindrom toksičnog šoka, kožne upale koje se mogu prenijeti na kralježnicu i srce te u konačnici smrt. Osim *S. iniae*, druge patogene BMK zabilježene kao uzrok smrti kod riba su *L. pisciola*, *L. garviae* i *L. piscium* (Kathiseran i Thiruneelakandan, 2008).

2.3.1. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz školjkaša

U školjkašima se zbog njihovog već spomenutog načina prehrane, odnosno filtriranja vode kroz organizam nalaze mnoge kulture mikroba koje se mogu podijeliti na autohtone i alohtone mikroorganizme. Mikrobiota školjkaša odražava mikrobnu populaciju vode u kojoj rastu, među kojima se mogu pronaći razne vrste i rodovi BMK.

Znanstveno je dokazano da pojedini sojevi imaju inhibitorni učinak i antimikrobnu aktivnost prema nekim bakterijama. Pinto i sur. (2009) su zabilježili da vrste *Enterococcus faecium* i *Pediococcus pentosaceus* izolirane iz svježih kamenica i dagnji posjeduju antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *Listeria monocytogenes*.

Ibryamova i suradnici proveli su opsežno istraživanje 2020. godine o antifungalnoj aktivnosti BMK izoliranih iz mediteranske dagnje (*Mytilus galloprovincialis*). Fokus rada bilo je zagađenje dagnji raznim patogenim mikroorganizmima (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera*) zbog onečišćenja mora do kojeg je došlo razvojem turizma i građevinskih aktivnosti na obali Crnog mora. U istraživanju su izuzeta 2 izolata BMK i identificirana kao *Lactobacillus sp.* s antifungalnom aktivnošću. Otkriveno je da je nekoliko spojeva odgovorno za to antifungalno djelovanje BMK, poput organskih kiselina, spojeva niske molekulske težine, feniloctene kiseline i masnih kiselina, cikličkih dipeptida, proteinskih spojeva i drugih raznih spojeva poput laktona. Na temelju tih rezultata, zaključeno je da bi se BMK izolirane iz dagnje mogle koristiti kao biozaštitna kultura za sprečavanje rasta patogena.

Lee i suradnici su 2010. godine proveli izolaciju *Lactobacillus spp.* iz morske kamenice (*Crassostrea gigas*), sa ciljem odabira sojeva otpornih na vanjski stres i utjecaje. Izolirana su ukupno 83 soja laktobacila. *In vitro* antagonistički učinak odabranih sojeva protiv patogena ispitan je mjerenjem promjera inhibicije, a najveći promjer među njima pokazao je soj *Lactobacillus rhamnosus*. On je ujedno odabran kao najotporniji soj te ima najveći potencijal primjene kao dodatak hrani za morsku akvakulturu.

Cilj istraživanja kojeg su 2014. proveli Fajardo i suradnici bio je izolirati bakterije potencijalno probiotičkih svojstava iz školjkaša koje bi ujedno mogle olakšati pročišćavanje mekušaca za komercijalnu uporabu. Iz probavnih žlijezda školjkaša izolirano je ukupno 365 bakterija i istraženo je njihovo djelovanje protiv različitih patogena. Najučinkovitijim se pokazao soj označen kao 3M21, a identificiran kao soj BMK *Enterococcus hirae*, koji je pokazao antibakterijsko djelovanje prema *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* i antivirusno djelovanje

prema hepatitisa A i mišjeg norovirusa, a također proizvodi aktivnu tvar koja je okarakterizirana kao bakteriocin. Uporaba takvih probiotičkih baterija postaje sve popularnija u industriji akvakulture, a ovim istraživanjem potaknuta je i njihova primjena u depuraciji mekušaca za komercijalne svrhe.

2.4. METODE IDENTIFIKACIJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Mnogi su kriteriji za podjelu metoda koje se koriste u području identifikacije mikroorganizama, no općenito ih se može podijeliti na izravne i neizravne tehnike.

Indirektne, odnosno konvencionalne metode podrazumijevaju izolaciju i kulturu mikroorganizama i određivanje njihovih različitih fenotipskih karakteristika. Direktne metode ne ovise o kulturi te se koriste za identifikaciju specifičnih mikroba u mješovitoj populaciji, kao i za identifikaciju mikroba koji se ne mogu uzgojiti. Na primjer, mikroskopske tehnike su moćni alati koji se koriste u identifikaciji mikroorganizama vizualizacijom karakterističnih struktura i za organizme u VBNC (engl. *viable but not culturable*) stanju.

Važno je napomenuti da fenotipske metode nisu uvijek korisne za jednoznačnu identifikaciju mikroorganizama na razini vrste, ili mnogo češće na razini soja. Jedna od strategija za smanjenje vremena za identifikaciju mikroba je korištenje tehnika molekularne biologije i genetičkog inženjerstva koje se također mogu nadopuniti brojnim i preciznim tehnikama molekularnog otiska prsta. Svaka metoda ima svoje prednosti i nedostatke, a najnoviji istraživački pristup uključuje korištenje kompilacije multivarijantnih tehnika. Za što precizniju identifikaciju, klasifikaciju i sistematiku mikroorganizama iznimno je važno odabrati odgovarajuće tehnike, kao i temeljito poznavanje mehanizama njihova djelovanja (Sandle, 2016).

2.4.1. Mikrobiološke metode

Prva i osnovna metoda je mikroskopiranje te shodno tomu, bojenje mikroskopskog preparata kako bi se vizualirali mikroorganizmi od interesa. Postoje razne tehnike diferencijalnog bojenja koje dijelom daju odgovor na pitanje o gustoći populacije, morfološkim karakteristikama bakterija, obliku, veličini, postojanju bičeva, eventualnoj prisutnosti spora i o tome radi li se o monokulturi

ili više različitih vrsta.

Dvije su osnovne vrste bojenja: jednostavno i složeno (diferencijalno) bojenje. Jednostavno bojenje provodi se pomoću samo jednog bojila; obično su to kristal violet, šafranin ili metilensko modriilo. Upotrebljava se kad se želi jasnije proučiti bakterije pod mikroskopom: njihov oblik i gustoću populacije. Diferencijalno bojenje provodi se za međusobno razlikovanje pojedinih grupa i vrsta bakterija te njihovu identifikaciju. Ovim bojanjima mogu se utvrditi postojanja određenih organela ili spojeva u bakterijskoj stanici, građa bakterija, prisustvo sporednih organela (bičeva), prisustvo spora i slično. Najbitnija diferencijalna bojenja su bojenje po Gramu, postupak po Ziehl-Neelsenu (za acidorezistentne bakterije), postupak po Schaeffer-Fulton (za endospore) i bojenje kapsula (Delaš i Hajsig, 2016).

Za BMK od izuzetne važnosti je bojenje po Gramu, budući da su one Gram pozitivne – zadržavaju boju kristal-violet pri odbojavanju etanolom, što se manifestira ljubičastom bojom.

Još neke od mikrobioloških metoda koje se koriste kao prvi korak u identifikaciji i analizi željenih mikroorganizama su decimalna razrjeđenja osnovnog uzorka – potrebna su da bi se pomoću njih odredio ukupan broj živih bakterija metodom brojenja na podlozi, te za izolaciju čistih kultura. Izolacija se provodi naciepljivanjem tih decimalnih razrjeđenja na čvrstu kulturu, a potrebno je biti pažljiv s odabirom razrjeđenja s obzirom da se svako razrjeđenje razlikuje od prethodnog za 0.1. Indikator mikrobnog rasta je zamućenje podloge. (Delaš i Hajsig, 2016).

2.4.2. Biokemijske metode

Tradicionalne mikrobiološke metode uglavnom se oslanjaju na postupke uzgoja koji koriste različite medije za prebrojavanje, izolaciju i identifikaciju mikroorganizama. Iako su jeftine i omogućuju kvantitativne i kvalitativne informacije o raznolikosti mikroorganizama prisutnih u uzorku, ove metode su iscrpne i dugotrajne (priprema medija, razrjeđivanje, postavljanje na ploče, inkubacija, brojanje, izolacija i karakterizacija), a rezultati se opažaju tek nakon nekoliko dana. Često se dobivaju lažno pozitivni rezultati, posebno kada se razmatraju slične mikrobne vrste. (Buszewski i sur., 2017)

Svi navedeni razlozi doveli su do razvoja mnogih biokemijskih testova i metoda koje brzo i pouzdano pokazuju o kojem mikroorganizmu je riječ. Brojnost metoda je velika, a neke od njih su:

1. jednostavna vizualna detekcija rasta testiranog organizma u prisutnosti supstrata pomoću povećane zamućenosti – rezultati se određuju usporedbom mikroba
2. imunotestovi – kao što je enzimski imunotest (ELISA), jako skupi i dizajnirani za posebne vrste bakterija
3. uzgoj na podlogama sa točno određenim sastavom

Što se bakterija tiče, same morfološke i uzgojne osobine istražene klasičnim mikrobiološkim metodama nisu dovoljne za identifikaciju, stoga se pristupa istraživanju fizioloških svojstava, odnosno prisutnost ili odsutnost bakterijskih enzima po kojima se one međusobno razlikuju. Osnovni princip jest da se bakterija uzgoji na hranjivim podlogama koje sadrže hranjive tvari koje bakterijski enzimi razgrađuju. Najčešće se provode testovi hidrolize škroba, uree, želatine i kazeina, a osim njih poznati su testovi tvorbe hemolize, tvorbe indola, Voges Proskauerov pokus (tvorba spoja acetoina), iskorištavanje citrata, katalaza i oksidaza test. Postoje i kombinirane podloge koje dokazuju više osobina istovremeno: Kliglerov agar (razgrađivanje glukoze i laktoze te stvaranje sumporovodika) te API-test (Delaš i Hajsig, 2016).

Indeks analitičkog profila (API) standardizirani je sustav koji se sastoji od određenog broja biokemijskih testova za proučavanje metabolizma ugljikohidrata nekog organizma od interesa. Osim sposobnosti fermentacije ugljikohidrata, testovi pokazuju produkciju sumporovodika, produkciju indola, acetona, nitrita, dokazivanje beta-galaktozidaze i sl., a rezultati se označavaju kao pozitivni ili negativni prema promjeni boje API traka. Oni se unose u softver *apiweb* koji pokazuje o kojem je mikroorganizmu riječ, te točnosti identifikacije. Postoji više vrsta API-testova s obzirom na brzinu kojom rezultati nastaju (API 20E i API Rapid 20E, obe određuju enterobakterije, ali različitom brzinom) i s obzirom na to koje organizme mogu identificirati: API Gram negativni testovi, API Gram pozitivni testovi, API testovi za anaerobe, kvasce, te specifični testovi za enzimatske aktivnosti (Ozgun i Cingilli Vural, 2011).

2.4.3. Molekularne (genetičke) metode

Dolaskom vremena molekularne biologije nastalo je mnoštvo alata i tehnika za detekciju, identifikaciju, karakterizaciju i tipizaciju bakterija za niz kliničkih i istraživačkih svrha. Prethodno se identifikacija i karakterizacija bakterijskih vrsta uglavnom vršila fenotipskim i biokemijskim metodama, koje su se oslanjale na preliminarnu izolaciju i kulturu. Dok ove metode i dalje postoje u određenim okruženjima, tehnike temeljene na molekularnoj osnovi pružile su dosad nevidene uvide u identifikaciju i tipizaciju bakterija. Ove metode omogućile su identifikaciju velike raznolikosti prethodno nepoznatih sojeva, karakterizaciju bakterija koje zahtijevaju posebne uvjete uzgoja i stoga se otežano uzgajaju i olakšale studije na velikim i raznolikim bakterijskim zajednicama. Studije su pružile detaljan uvid u bakterijsku virulentnost, patogenezu, otpornost na antibiotike i epidemiološku tipizaciju. Većina molekularnih metoda za identifikaciju bakterija temelji se na nekim varijacijama analize DNK, bilo na temelju amplifikacije ili sekvencioniranja. Te se metode kreću od relativno jednostavnih pristupa koji se temelje na umnožavanju DNK (PCR, „*real time*“ PCR, RAPD-PCR) do složenijih metoda koje se temelje na analizi restriksijskih fragmenata, ciljanom sekvencioniranju gena i cijelog genoma te spektrometriji mase. Uz to, istraživane su jedinstvene metode kao što je laserska desorpcija/ionizacija uz pomoć matrice, spektrometrija masa (MALDI-TOF-MS) i slične varijacije (Galluzzi i sur., 2007).

Osim jednostavnih i složenih, molekularne metode dijele se na neovisne i ovisne o kulturi, što isključivo ovisi o tome da li je bakterijska DNK ekstrahirana izravno iz uzorka ili iz bakterijskih kolonija uzgojenih na podlozi kulture. Međutim, istraživanja o raznolikosti i dinamici mikrobiote BMK sve više uključuju ekstrakciju ukupnog bakterijskog genoma izravno iz uzorka te umnožavanje PCR-om. Već postoje brojne kombinacije početnica (primera), gena i varijabilnih regija koje se koriste u ovim metodama (Emerson i sur., 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

U ovom radu korištena je vrsta školjkaša češljača (*Aequipecten opercularis*) (slika x). Školjkaši su izlovljeni u Istarskom akvatoriju (44°43'58.49"N, 13°56'48.94"E) s dubine od 49 m i u odgovarajućim uvjetima skladištenja pri niskim temperaturama poslani su u laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica na Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Prikupljanje i analiza školjkaša je dio projekta financiranog iz EU fondova naslova "Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena". Iz uzoraka probavnog sustava prethodno su izolirane potencijalne kolonije bakterija mliječne kiseline na MRS agaru koje će se identificirati u sklopu ovog završnog rada.



Slika 1. Svježe izlovljene češljače (vlastita fotografija)

3.1.1. Hranjive podloge

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

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

3.1.2. Pribor i oprema

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

3.2. METODE

3.2.1. Bojanje po Gramu

Prvi korak bojanja po Gramu uključio je fiksiranje predmetnice s ciljem odmaščivanja provlačenjem tri puta kroz plamen. Na ohlađenu predmetnicu nanese se bakterijska kultura u tankom sloju. Osušeni preparat je fiksiran provlačenjem kroz plamen s donje strane preparata, te je na ohlađenu predmetnicu nanese prvo bojilo - kristal violet. Nakon 1 minute na postojeću boju je dodana lugolova otopina te je nakon jedne minute sva boja isprana s preparata. Prvi korak je uključivao lagano ispiranje s 96 % etanolom kako bi se uklonio višak nevezane boje a drugi korak ispiranje pod laganim mlazom vodovodne vode. Na vlažni preparat je nanese kontrastno bojilo-safranin koje stoji na preparatu 3-5 min. Nakon proteklog vremena boja je isprana s preparata pod mlazom vodovodne vode, a višak tekućine pokupljen staničevinom. Na tako pripremljeni preparat je stavljena kap imerzijskog ulja, a mikroskopiranje je provedeno na imerzijskom objektivu pri povećanju 1000×.

3.2.2. Katalaza test

Pomoću sterilne mikrobiološke ušice uzorak bakterijske kulture s krute hranjive podloge prenešen je na predmetnicu. Jedna kap 3 %-tnog H₂O₂ kapnuta je na nanešenu bakterijsku kulturu, a pojava šuma i mjehurića plina - pjenjenje potvrda je pozitivnog testa.

3.2.3. Određivanje pH vrijednosti

Pomoću indikator trakica određena je približna pH vrijednost hranjive podloge nakon bakterijskog rasta na način da se pH papirić uronio na 3 sekunde u hranjivu podlogu, a dobivena boja papirića je uspoređena sa skalom boja pH raspona od 0-14.

3.2.4. API 50 CHL biokemijski test

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



Slika 2. API biokemijski profili ispitivanih bakterijskih izolata (vlastita fotografija)

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

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

Priprema lizata stanica i izolacija proteina

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

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

Derivatizacija uzoraka

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

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

Separacija peptida kapilarnom tekućinskom kromatografijom

Na posušene uzorke je dodano 25 µl 0,1 %-tne mravlje kiseline, peptidi su resuspendirani u otopini i preneseni u mikroviale. Za separaciju peptida korišten je CapLC sustav s UV/VIS detektorom koji je povezan s TempoTM LC MALDI sustavom za frakcioniranje direktno na MALDI pločicu. Separacija peptida provodila se na koloni Inertsil WP300-C8 pri 40 °C, protoku od 2 µl min⁻¹ i

volumenu injektiranja od 5 μ l. Mobilne faze koje su korištene su mobilna faza A koja se sastojala od 2 % acetonitrila/ 0,1 %- tne mravlje kiseline i mobilna faza B koja se sastojala 98 % acetonitrila/ 0,1 %-tne mravlje kiseline. Korištena je metoda u trajanju od 55 min s gradijentalnom elucijom u trajanju od 30 min pri čemu faza B raste od 5 % do 80 % te se zatim uvjeti na koloni vraćaju na početno stanje. Eluirani peptidi su detektni pri UV absorbaniciji od 280 nm. Frakcioniranje i miješanje eluiranih peptida s matricom (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 3 mg/ml u 50 %-tnoj vodenoj otopini acetonitrila) provodilo se korištenjem automatskog TempoTM LC MALDI sustava pri protoku od 2 μ l min⁻¹. Parametri analize prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Parametri analize MALDI TOF/TOF

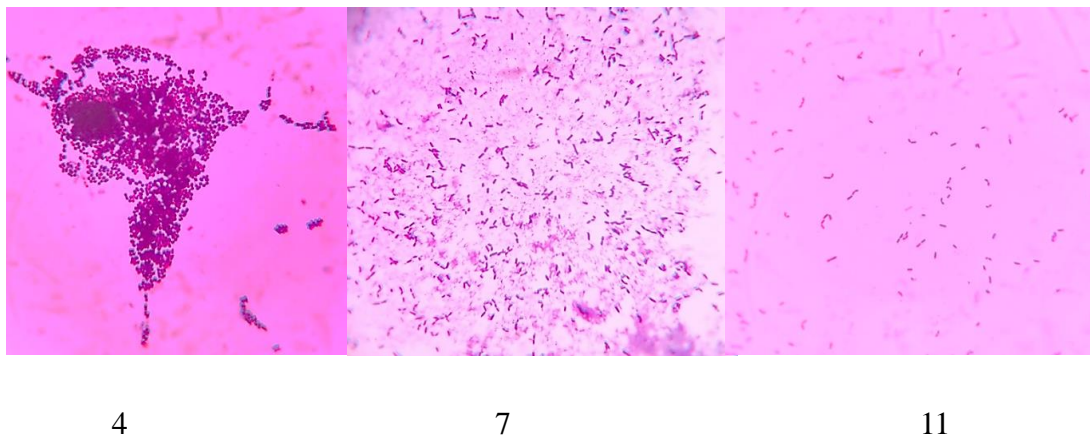
Tip analize	MS-	MS/MS-	MS/MS+
Detekcija iona	Negativna	Negativna	Pozitivna
Zrcalo	Reflektron	Reflektron	Reflektron
Broj snimaka/spektru	1000	2000	2000
Raspon masa/Da	1000-4000	9-3833	9-3833
Vrijeme odziva/ns	200	200	200

Identifikacija proteina

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

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je fenotipski identificirati bakterijske izolate iz probavnog sustava češljače (*Aequipecten opercularis*). Korištena su tri izolata označena brojevima 4, 7 i 11 a dobiveni rezultati prikazani su niže u tekstu. Bojanjem po Gramu zaključeno je da se radi o gram pozitivnim bakterijama štapićastog oblika što je karakteristična slika bakterija mliječne kiseline (slika 3).



Slika 3. Bakterijski izolati obojani po Gramu

Još jedna od glavnih karakteristika BMK je da su katalaza negativne tj. nemaju sposobnost sinteze enzima peroksidaze (Bratulić i sur., 2019; von Wright i Axelsson, 2019). Dodatkom vodikovog peroksida nije došlo do pojave pjenjenja nit kod jednog izolata pa se može zaključiti da su sva tri katalaza negativni. Ono što je još karakteristično za BMK je da tijekom rasta u hranjivoj podlozi, uslijed proizvodnje mliječne kiseline dolazi do smanjenja pH vrijednosti pa je u sljedećem koraku pokusa provjerena pH vrijednost primjenom indikator trakica (slika 4).



Slika 4. Izmjerene pH vrijednosti hranjive podloge nakon prekonocnog rasta bakterijskih izolata (vlastita fotografija)

Usporedbom dobivenih rezultata sa skalom boja vidljivo je da se pH vrijednost izolata kreće između 4 i 6 što je u skladu s dosadašnjim istraživanjima i dodatno potvrđuje pretpostavku da je riječ upravo o BMK izolatima (Sidooski i sur., 2019).

Kako bi sa sigurnošću mogli reći o kojoj se bakterijskoj kulturi radi potrebno je izolate dodatno testirati API biokemijskim testom i još jednom metodom kao finalnom potvrdom.

Biokemijski profil svakog izolata identificiran je pomoću programa na računalu koji sadrži bazu podataka, a program daje podatke o razini pouzdanosti identifikacije. S obzirom da su pojedine jažice imale neodređenu boju, nije se moglo sa sigurnošću utvrditi da se radi o pozitivnom testu pa su u software unešene dvije verzije rezultata za te jažice: pozitivna i negativna što u konačnici nije utjecalo na finalni rezultat identifikacije (slika 5).

COMMENT							
Izolat 4, anaerobno							
DOUBTFUL PROFILE							
Strip	API 50 CHL V5.2						
Profile	+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....						
Note	ID, NOT VALID BEFORE 48 HOURS						
Significant taxa	% ID	T	Tests against				
Lactococcus lactis ssp lactis 1	80.3	0.54	0	0%	AMY 75%	MEL 13%	
Lactococcus lactis ssp lactis 2	18.8	0.35	0	0%	LARA 4%	MAN 20%	MEL 4%

COMMENT							
Izolat 7, anaerobno							
DOUBTFUL PROFILE							
Strip	API 50 CHL V5.2						
Profile	+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....						
Note							
Significant taxa	% ID	T	Tests against				
Lactobacillus plantarum 1	99.6	0.62	0	0%			

COMMENT							
Izolat 11, anaerobno							
DOUBTFUL PROFILE							
Strip	API 50 CHL V5.2						
Profile	+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....+++++.....						
Note							
Significant taxa	% ID	T	Tests against				
Lactobacillus plantarum 1	99.4	0.64	0	0%			

Slika 5. Rezultati API biokemijske identifikacije bakterijskih izolata (vlastita fotografija)

Za izolate 7 i 11 dobiveni su visoki postotci identifikacije od 99,6 % tj. 99,4 % dok je izolat s nešto nižim postotkom od 80,3 % identificiran kao *Lactococcus lactis*. Budući da se postotci identifikacije ispod 90 % ne smatraju u potpunosti sigurnima, te da je rezultate API testa uvijek potrebno provjeriti barem još jednom metodom, sva tri izolata su dodatno identificirana primjenom spektrometrije masa. Ova metoda potvrdila je rezultate identifikacije API biokemijskog testa s visokom razinom točnosti osim za izolat 4 tj. *L. lactis* koji je MALDI-TOF metodom identificiran kao *L. plantarum*. Ovi rezultati su dodatno potvrdili da je potrebno više koraka identifikacije kako bi se sa sigurnošću reklo o kojoj se vrsti točno radi.

Result Overview

Result overview table--start						
Sample ID	Target Pos.	Organism (best match)	log(score) (Conf.)	Organism (second-best match)	log(score) (Conf.)	Consistency
4	F7	Lactobacillus plantarum	2.45 (+++)	Lactobacillus plantarum	2.38 (+++)	(A)
7	F8	Lactobacillus plantarum	2.44 (+++)	Lactobacillus plantarum	2.43 (+++)	(A)
11	F9	Lactobacillus plantarum	2.20 (+++)	Lactobacillus plantarum	2.20 (+++)	(A)
Result overview table--end						

Slika 6. Rezultati MALDI-TOF identifikacije bakterijskih izolata (vlastita fotografija)

5. ZAKLJUČCI

1. Bakterijski izolati iz probavnog sustava češljače uspješno su identificirani fenotipskim metodama kao bakterije mliječne kiseline
2. MALDI-TOF spektrometrijom masa potvrđeno je da su sva tri izolata vrste *Lactobacillus plantarum*

6. REFERENCE

Ameen F, AlNadhari S, Al-Homaidan AA (2021) Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds. *Saudi Journal of Biological Sciences* **28**, 224-231. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.052>.

Ameen F, Hamdan A, El-Naggar M (2020) Assessment of the heavy metal bioremediation efficiency of the novel marine lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* MF042018. *Scientific Reports* **10**, 314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57210-3>

Biomerieux (2020) API <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/api> pristupljeno 8 rujna 2022.

Axelsson L (2004) *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. 3. izd., Marcel Dekker, New York.

Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M, Ali A, Waldor MK, Qadri F i sur. (2018) *Vibrio* spp. infections. *Nat Rev Dis Primers* **4**, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>

Bratulić M, Mikuš T, Cvrtila Ž, Cenci-Goga BT, Grispoldi L, Pavunc AL., i sur. (2021). Quality of traditionally produced Istrian sausage and identification of autochthonous lactic acid bacteria strains as potential functional starter cultures. *European Food Research and Technology* **247**(11), 2847-2860.

Buntin N, Chanthachum S, Hongpattakere T (2008) Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* **30**(1), 141-148.

Buszewski B, Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V (2017) Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *Journal of AOAC International* **100**(6), 1607–1623. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0207>

Casalta E, Montel MC (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *International journal of food microbiology* **126**(3), 271–273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013>

Čanak I (2020) Karakterizacija probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* O1 za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture (doktorski rad), Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Čanak I, Markov K, Gavrilović A, Bosanac P, Dujaković J, Jakopović Ž i sur. (2018) Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition* **13** (1-2), 44-49.

de Graaf M, van Beek J, Koopmans MP (2016) Human norovirus transmission and evolution in a changing world. *Nature reviews. Microbiology* **14**(7), 421–433.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.48>

Delaš, F, Hajsig D (2016) *Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije*. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb

DeLong, E (2007) Sea change for metagenomics? *Nat Rev Microbiol* **5**, 326
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1674>

Emerson D, Agulto L, Liu H, Liu L (2008) Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *Bioscience* **58** (10) 925-936.

Galluzzi L, Magnani M, Saunders N, Harms C, Bruce IJ (2007) Current molecular techniques for the detection of microbial pathogens. *Science Progress* **90**(1), 29–50.
<https://doi.org/10.3184/003685007780440521>

Gladfelter AS, James TY, Amend AS (2019) Marine fungi. *Current Biology : CB* **29**(6), 191–195.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.009>

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

Hongpattarakere T, Cherntong N, Wichienhot S, Kolida S, Rastall RA (2012) In vitro prebiotic evaluation of exopolysaccharides produced by marine isolated lactic acid bacteria. *Carbohydrate polymers* **87**(1), 846–852. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.085>

Ibryamova SF, Arhangelova NN, Doichev DD, Ivanov RI, Chipev NH, Natchev ND i sur. (2020) Integrative Investigation on the Ecology of the Black Sea Mussel *Mytilus galloprovincialis* Lam. and its Habitat. *Ecologia Balkanica* **3**, 10-17.

Imhoff JF, Labes A, Wiese J (2011) Bio-mining the microbial treasures of the ocean: new natural products. *Biotechnology advances* **29**(5), 468–482.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.03.001>

Kathiseran K, Thiruneelakandan G (2008) Prospects of lactic acid bacteria of marine origin. *Indian Journal of Biotechnology* **7**, 170-177.

Khalid K (2011) An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences* **1**(3) 1-13.

Krstulović N, Šolić M (2006) *Mikrobiologija mora*, 1. izd., Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split.

Kyrpides NC, Hugenholtz P, Eisen JA, Woyke T, Göker M, Parker CT i sur. (2014). Genomic encyclopedia of bacteria and archaea: sequencing a myriad of type strains. *PLoS biology* **12**(8),

e1001920. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001920>

Krzyściak W, Pluskwa KK, Jurczak A, Kościelniak D (2013) The pathogenicity of the *Streptococcus* genus. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **32**(11), 1361–1376. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1914-9>

Kutty SN, Philip R (2008) Marine yeasts - a review. *Yeast* **25**(7), 465-536. <https://doi.org/10.1002/yea.1599>

Lee HI, Hee Kim M, Young KK, So JS (2010) Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe* **16**(5), 522-526. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.07.002>.

Leetanasaksakul K, Thamchaipenet A (2018) Potential anti-biofilm producing marine actinomycetes isolated from sea sediments in Thailand. *Agriculture and Natural Resources* **52**(3), 228-233. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.09.003>.

Long RA, Azam F (2001). Antagonistic interactions among marine pelagic bacteria. *Applied and environmental microbiology* **67**(11), 4975–4983. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4975-4983.2001>

Mašić M (2004) Higijena i tehnologija prerade školjaka. *MESO: Prvi hrvatski časopis o mesu* **6**(4), 40-45. Preuzeto s <https://hrcak.srce.hr/21215> (Datum pristupa: 09.09.2022.)

Mokoena, MP (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. *Molecules* **22**(8) 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>

Normanno G, Parisi A, Addante N, Quaglia NC, Dambrosio A, Montagna C, Chiocco D (2006). *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International journal of food microbiology*, **106**(2), 219–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.020>

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

Ogier JC, Casalta E, Farrokh C, Saihi A (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International journal of food microbiology*, **126**(3), 286–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.012>

Ozgun D, Cingilli VH (2011) Identification of *Lactobacillus* strains isolated from faecal specimens of babies and human milk colostrum by API 50 CHL system. *Journal of Medical Genetics and Genomics*, **3**(3), 46-49. <https://doi.org/10.5897/JMGG.9000027>

Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus*

mykiss. Aquaculture, **243**, 241-254..

Pinto, AL, Fernandes M, Pinto C, Albano H, Castilho F, Teixeira P i sur. (2009) Characterization of anti-Listeria bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. *International Journal of Food Microbiology* **129**(1): 50–58.

Rincé A, Balière C, Hervio-Heath D, Cozien J, Lozach S, Parnaudeau S i sur. (2018). Occurrence of Bacterial Pathogens and Human Noroviruses in Shellfish-Harvesting Areas and Their Catchments in France. *Frontiers in microbiology*, **9**, 2443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02443>

Salvetti E, Torriani S, Felis, GE (2012). The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics and antimicrobial proteins*, **4**(4), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s12602-012-9117-8>

Sandle T (2016) *Microbial identification.*, 1.izd, Woodhead Publishing, Sawston, str. 103-113.

Shobharani P, Halami PM, Sachindra NM (2013). Potential of marine lactic acid bacteria to ferment *Sargassum sp.* for enhanced anticoagulant and antioxidant properties. *Journal of applied microbiology*, **114**(1), 96–107. <https://doi.org/10.1111/jam.12023>

Sidooski T, Brandelli A, Bertoli SL, Souza CKD, Carvalho LFD (2019). Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria—A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, **59**(17), 2839-2849.

Fajardo P, Atanassova M, Garrido-Maestu A, Wortner-Smith T, Cotterill J, Cabado AG (2014) Bacteria isolated from shellfish digestive gland with antipathogenic activity as candidates to increase the efficiency of shellfish depuration process. *Food Control*, **46** 272-281.

Vidergar C (2020) Times-Call: Beer becomes food in sour ales. <https://web.archive.org/web/20201118143115/https://www.timescall.com/2020/11/17/cyril-vidergar-beer-becomes-food-in-sour-ales/> pristupljeno 17. kolovoza 2022.

Von Wright A, Axelsson L (2019). Lactic acid bacteria: an introduction. *In Lactic acid bacteria* (pp. 1-16). CRC Press.

Waters AL, Hill RT, Place AR, Hamann MT (2010) The expanding role of marine microbes in pharmaceutical development. *Current opinion in biotechnology*, **21**(6) 780-786. <https://doi.org/10.1016%2Fj.copbio.2010.09.013>

Webster N, Hill R (2007) Vulnerability of marine microbes on the Great Barrier Reef to climate change. U *Climate change and the Great Barrier Reef: a vulnerability assessment*. The Great Barrier Reef Marine Park Authority, Townsville, 96.

Izjava o izvornosti

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

Marija Čužić
Vlastoručni potpis