

# Antimikrobna aktivnost bakterije mliječne kiseline izolirane iz morske vrste školjkaša (*Aequipecten opercularis*)

---

**Mladina, Dora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*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:159:310355>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija**

**Dora Mladina**

0058211218

**Antimikrobna aktivnost bakterije mliječne kiseline  
izolirane iz morske vrste školjkaša  
(*Aequipecten opercularis*)**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Mikrobiologija namirnica

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

**Zagreb, 2021.**

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**

**Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

## **Antimikrobna aktivnost bakterije mliječne kiseline izolirane iz morske vrste školjkaša (*Aequipecten opercularis*)**

**Dora Mladina, 0058211218**

**Sažetak:** Posljednjih godina sve je veći interes za konzumacijom svježih morskih plodova radi njihovog dobrog nutritivnog sastava i povoljnog učinka na zdravlje. Obzirom da su morske životinje podložne stresu i različitim bolestima tijekom rasta i razvoja, cilj je poboljšati njihovu kvalitetu života te ojačati imunološki odgovor organizma. Sve više istraživanja u posljednje vrijeme se okreće primjeni probiotičkih kultura, kao prirodnoj metodi zaštite, s ciljem postepene zamjene dosadašnjih metoda prevencije bolesti koje uključuju primjenu kemoterapeutika i cijepljenje. Također, sve se veći naglasak stavlja na izolaciju novih sojeva bakterija mliječne kiseline (BMK) morskog porijekla, radi njihove prilagođenosti na morski okoliš i bolje ispoljavanje pozitivnih karakteristika. U ovom radu odredila se antimikrobna aktivnost bakterije *Lactobacillus brevis*, izolirane iz morske vrste školjkaša, prema najčešćim morskim patogenima. Rezultati su pokazali umjereno inhibitorno djelovanje koje se razlikovalo ovisno o soju patogene bakterije.

**Ključne riječi:** akvakultura, antimikrobna aktivnost, bakterije mliječne kiseline, patogeni

**Rad sadrži:** 22 stranice, 5 slika, 34 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:** prof. dr. sc. Jadranka Frece

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

**Datum obrane:** 8. rujna 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**University undergraduate study Food Technology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**

**Scientific field: Food Technology**

**Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sea shellfish**

***(Aequipecten opercularis)***

**Dora Mladina, 0058211218**

**Abstract:** In recent years, there has been a growing interest in the consumption of fresh seafood due to their good nutritional composition and beneficial effect on health. Given that marine animals are susceptible to stress and various diseases during growth and development, the goal is to improve their quality of life and strengthen the body's immune response. More and more research in recent times is turning to the use of probiotic cultures, as a natural method of protection, with the aim of gradually replacing existing methods of disease prevention that include the use of chemotherapy and vaccination. Also, increasing emphasis is placed on the isolation of new strains of lactic acid bacteria (LAB) of marine origin because of the ratio of their adaptation to the marine environment and better display of positive characteristics. In this work, the antimicrobial activity of bacterium *Lactobacillus brevis*, isolated from the marine species of shellfish, against the most common marine pathogens was determined. The results showed a moderate inhibitory activity that varied depending on the pathogenic bacteria.

**Keywords:** aquaculture, antimicrobial activity, lactic acid bacteria, pathogens

**Thesis contains:** 22 pages, 5 figures, 34 references

**Original in:** Croatian

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

**Mentor:** PhD. Jadranka Frece, Full professor

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

**Defence date:** September 8<sup>th</sup> 2021

## SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Teorijski dio</b> .....	2
<b>2.1. Bakterije mliječne kiseline</b> .....	2
2.1.1. Rod <i>Lactococcus</i> .....	3
2.1.2. Rod <i>Lactobacillus</i> .....	4
2.1.3. Rod <i>Pediococcus</i> .....	4
2.1.4. Rod <i>Leuconostoc</i> .....	4
2.1.5. Rod <i>Streptococcus</i> .....	5
<b>2.2. Bakterije mliječne kiseline morskog porijekla</b> .....	5
2.2.1. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz školjkaša .....	6
<b>2.3. Probiotici u akvakulturi</b> .....	8
<b>3. Eksperimentalni dio</b> .....	10
<b>3.1. Materijali</b> .....	10
3.1.1. Mikroorganizmi.....	10
3.1.2. Hranjive podloge.....	10
3.1.3. Pribor i oprema .....	11
<b>3.2. Metode</b> .....	11
3.2.1. Čuvanje mikroorganizama .....	11
3.2.2. Uzgoj mikroorganizama .....	11
3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti izoliranih sojeva BMK.....	11
3.2.4. Turbidimetrijska metoda.....	12
<b>4. Rezultati i rasprava</b> .....	13
<b>5. Zaključci</b> .....	17
<b>6. Literatura</b> .....	18

## 1. Uvod

Obzirom na sve veći i brži razvoj industrija, pa tako i akvakulture, ali i zbog težnje prema zdravijim životnim navikama i očuvanju zdravlja, potrebno je osigurati namirnice koje će biti zdravstveno ispravne za ljudsku konzumaciju. Kao alternativa kemoterapeutičima i cijepljenju, a s ciljem kontrole bolesti, u akvakulturi se u posljednje vrijeme sve više primjenjuju probiotici. Korištenjem bakterija mliječne kiseline (BMK) izoliranih iz morskog okoliša osigurava se njihova bolja prilagodba i veća učinkovitost (Čanak, 2020).

Probiotici u akvakulturi djeluju kao promotori rasta, inhibitori patogena, u svrhu poboljšanja probave hranjivih sastojaka, kvalitete vode i poboljšavaju toleranciju na stres (Martínez Cruz i sur., 2012).

Još nije poznato na koji način probiotici iniciraju rast kultiviranih vrsta; poticanjem probave, povećanjem apetita ili kombinirano, ali oba faktora svakako utječu na rast. Nekoliko istraživanja je pokazalo kako dodatak određenih probiotičkih kultura povećava rast vrsta i preko 100 %. U većini istraživanja su korištene upravo BMK, a neki od sojeva koji su pokazali dobre karakteristike su *Lactococcus casei* ssp. *casei*, *Pediococcus acidilactici*, i *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis*. Nadalje, probiotici djeluju inhibirajuće na patogene tako što oslobađaju kemijske tvari s bakteriocidnim i bakteriostatskim učinkom što sprječava rast i širenje u probavnom sustavu domaćina (Frece i sur., 2010). Neka istraživanja su dokazala kako dodatak *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* u prehrani riba smanjuje razine kortizola („hormona stresa“) što povoljno utječe na rast i razvoj životinja (Martínez Cruz i sur., 2012).

U posljednje vrijeme sve je veći naglasak na izolaciji BMK morskog porijekla s ciljem njihove karakterizacije kao probiotika budući da su takvi sojevi već adaptirani na morski okoliš i puno bolje mogu ispoljiti svoja pozitivna svojstva u odnosu na sojeve animalnog ili humanog porijekla (Gómez-Sala i sur., 2016).

Stoga je cilj ovog rada bio je ispitati antimikrobnu aktivnost BMK izolirane iz morske vrste školjkaša, kako bi se odredila mogućnost njene primjene kao potencijalnog probiotika u akvakulturi.

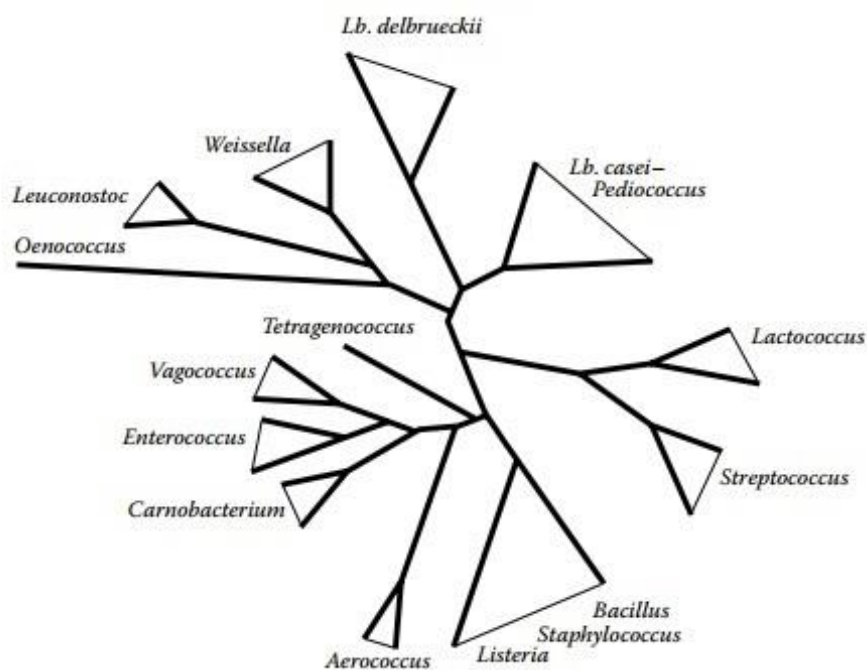
## 2. Teorijski dio

### 2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) pripadaju grupi gram-pozitivnih, nesporogenih bakterija. Najčešće su oblika koka ili štapića, katalaza negativne, zahtijevaju posebne uvjete rasta te imaju visoku toleranciju na niže vrijednosti pH (1-3). Kada se govori o fermentaciji, BMK su najvažniji mikroorganizmi te imaju ulogu u poboljšanju okusa, arome i teksture fermentiranih prehrambenih proizvoda. Ono što je karakteristično za njih, po čemu su dobile i naziv, jest proizvodnja mliječne kiseline iz šećera i drugih ugljikohidrata (Mokoena, 2017).

Bakterije mliječne kiseline rastu pri optimalnom pH 5,5-5,8 te su im prehrabene potrebe vrlo složene jer zahtijevaju aminokiseline, nukleotidne baze, peptide, vitamine, minerale, ugljikohidrate i masne kiseline. Kategorički se dijele na homofermentativne i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Homofermentativne bakterije proizvode mliječnu kiselinu iz šećera. Heterofermentativne, uz mliječnu kiselinu, proizvode i octenu kiselinu, alkohol te ugljikov dioksid. Prema nekim autorima, bakterije mliječne kiseline inhibiraju rast patogenih mikroorganizama, razgrađuju mikotoskine te imaju probiotičko i antimikrobno djelovanje (Mokoena, 2017).

Prema taksonomskoj klasifikaciji, BMK pripadaju koljenu *Firmicutes*, razredu *Bacilli* te redu *Lactobacillales*. Najpoznatiji rodovi su *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Streptococcus* (Lahtinen i sur., 2012).



**Slika 1.** Shematsko filogenetsko stablo bakterija mliječne kiseline (Lahtinen i sur., 2012)

### 2.1.1. Rod *Lactococcus*

Bakterije roda *Lactococcus* izolirane su iz biljnih materijala, mlijeka i drugih animalnih izvora te ljudskih crijeva. U ovaj rod ubraja se sedam vrsta: *Lactococcus lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. rafnolactis*, *L. chungangensis* te *L. fujiensis* koji je relativno nedavno okarakteriziran. Identifikacija vrsta je temeljena na fiziološkim, kemotaksonomskim te molekularno biološkim kriterijima (Lahtinen i sur., 2012).

Prema morfološkim karakteristikama, bakterije roda *Lactococcus* su gram-pozitivni koki veličine 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ . Tvore kratke lance, mezofilne su te proizvode mliječnu kiselinu fermentacijom šećera heksoze (Lahtinen i sur., 2012). Također, imaju vrlo složene zahtjeve za uvjete rasta. Za minimalan rast u mediju treba biti najmanje 6 aminokiselina i 3 vitamina B skupine, dok za optimalan rast treba više aminokiselina i vitamina (Van Niel i Hahn-Hägerdal, 1999).



### 2.1.2. Rod *Lactobacillus*

Bakterija roda *Lactobacillus* su gram-pozitivne i mikroaerofilne. Moguće ih je izolirati iz različitih proizvoda i staništa, uključujući mlijeko i mliječne proizvode, ljudsku sluznicu te biljke i tlo. Rod *Lactobacillus* broji preko sto vrsta, a neke značajnije su *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* i *L. salivarius*. Navedene vrste su vrlo dobro okarakterizirane te su od važnog biološkog, tehnološkog i komercijalnog značaja. Bakterije roda *Lactobacillus* prirodno se nalaze u probavnom, mokraćnom i spolnom sustavu, usnoj šupljini i na koži životinja i ljudi. Vrste ovog roda se često koriste kao probiotici jer imaju povoljan utjecaj na zdravlje čovjeka (Lahtinen i sur., 2012).

### 2.1.3. Rod *Pediococcus*

Bakterije roda *Pediococcus* su gram-pozitivne bakterije, oksidaza i katalaza negativne. Morfološki, to su stanice sfernog oblika koje oblikuju tetrade, za razliku od ostalih koka koji oblikuju lance. One su fakultativni anaerobi koji u uvjetima bez kisika provode fermentaciju glukoze i kao krajnji produkt stvaraju mliječnu kiselinu. Optimalan rast imaju pri pH 5, a oko pH 9 više ne mogu rasti. Bakterije roda *Pediococcus* najčešće se mogu pronaći na sirovoj ili prerađenoj hrani te u probavnom sustavu ljudi i životinja. Rod *Pediococcus* obuhvaća 10 vrsta, ali najviše se proučavaju *Pediococcus acidilactici* i *Pediococcus pentosaceus* jer imaju velik ekološki značaj i biotehnološki potencijal, a izoliraju se najčešće iz voća, povrća i žitarica (Lahtinen i sur., 2012).

### 2.1.4. Rod *Leuconostoc*

Bakterije roda *Leuconostoc* su također gram-pozitivne, nepokretne i nesporogene. Morfološki gledano, to su stanice sferičnog ili eliptičnog oblika, često i duguljaste, a formiraju parove ili lance. Bakterije ovog roda su heterofermentativne te proizvode dekstran iz saharoze. Također su fakultativni anaerobi i negativni na katalazu. Za rast preferiraju početni pH oko 6,5 a optimalna temperatura rasta im je između 20 °C i 30 °C. Fermentiraju glukozu do mliječne kiseline, CO<sub>2</sub> te etanola ili acetata.

Najčešće se nalaze u biljkama ili na biljnom materijalu koji je u procesu raspadanja i razgradnje, ali može ih se naći i u hrani animalnog podrijetla (Lahtinen i sur., 2012).

### 2.1.5. Rod *Streptococcus*

Bakterije roda *Streptococcus* su gram-pozitivne, fakultativno anaerobne te katalaza i citokrom oksidaza negativne. Oblik im je sferičan ili jajolik, a promjer manji od 2  $\mu\text{m}$ . Većina bakterija roda *Streptococcus* rastu u prisustvu kisika, no neke vrste zahtijevaju i prisutnost  $\text{CO}_2$ . Fermentiraju glukozu do mliječne kiseline, ali bez nastanka plina. Optimalna temperatura za rast većine bakterija ovog roda je 37 °C (Lahtinen i sur., 2012).

## 2.2. Bakterije mliječne kiseline morskog porijekla

Iako su BMK skupina bakterija koja je vrlo dobro proučena, istražena i okarakterizirana, tek je nekolicina istraživanja objavljena o onima morskog porijekla. Ono što je manje poznato jest značaj BMK morskog porijekla u razgradnji organskih tvari te u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (Kathiresan i Thiruneelakandan, 2008).

U dubokim morskim sedimentima nalazi se velika količina bakterija iz koljena *Firmicutes*, *Cytophaga*, *Spirochaetes* i *Proteobacteria*. Već je poznato kako BMK pozitivno utječu na zdravlje riba. Primjerice, *Lactobacillus rhamnosus* potiče imunostimulacijski učinak kod kalifornijske pastrve (Kathiresan i Thiruneelakandan, 2008).

Također, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* i *Weissella cibaria* pokazali su vrlo dobro probiotičko djelovanje kod ribe romba (*Scophthalmus maximus* L.) te su potaknuli imunološki odgovor prema patogenim bakterijama *Tenacibaculum maritimum* i *Vibrio splendidus* koji najčešće uzrokuju bolesti kod ove komercijalno važne vrste (Muñoz-Atienza i sur., 2014).

Istraživanje koje su proveli Sica i sur. (2010) s uzorcima izoliranim iz ribljih vrsta ušća Bahía Blanca pratilo je antimikrobnu aktivnost sojeva iz rodova *Weissella*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* i *Pedicoccus*. Ispitivani su sojevi BMK protiv patogena *Listeria monocytogenes* kao indikatorskog mikroorganizma, obzirom da su ribe i riblji proizvodi česti prijenosnici tog patogena i često se izolira iz njih, ali i protiv patogena *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri* te *Lactococcus garvieae*. Dobiveni rezultati pokazali su određeni stupanj antimikrobnog djelovanja svih izoliranih sojeva BMK prema navedenim patogenima što upućuje na njihovu potencijalnu primjenu kao probiotika i biokonzervansa u akvakulturi.

Nadalje, Muñoz-Atienza i sur. (2013) pratili su antimikrobnu aktivnost i bakteriocidno djelovanje izolata BMK iz morskih životinja koje se konzumiraju kao ljudska hrana. Od 99 sojeva ispitivanih *in vitro*, 33 soja (8 *Enterococcus faecium*, 11 *Pediococcus pentosaceus*, 1 *Lactobacillus sakei* subsp. *carneus*, 1 *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus*, 3 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 3 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* i 6 *Weissella cibaria*) će se potencijalno moći koristiti kao probiotici u akvakulturi, ali i za sprječavanje širenja patogena u morski okoliš, no potrebno je provesti još *in vivo* istraživanja kako bi se navedeni sojevi BMK nedvojbeno smatrali sigurnima za korištenje.

Čanak i sur. (2018) su u svom istraživanju karakterizirali *L. plantarum* O1 prethodno izoliran iz orade prema selekcijskim kriterijima za izbor BMK kao probiotika u akvakulturi. Rezultati su pokazali dobro preživljavanje u širokom pH i temperaturnom rasponu te jaku antimikrobnu aktivnost kao posljedicu produkcije plantaricina A. Nastavno na ovo istraživanje, provela su se i ispitivanja preživljavanja u *in vitro* uvjetima gastrointestinalnog trakta ribe i morske vode pri čemu je soj *L. plantarum* O1 pokazao visoki postotak preživljavanja i potencijal za primjenu u akvakulturi (Čanak i sur., 2019).

Međutim, poznato je i kako neke BMK morskog porijekla loše utječu na morske životinje, primjerice patogena bakterija *Streptococcus iniae* koja se nalazi u slatkim i u slanim vodama, a izvorno je izolirana iz potkožnih apscesa amazonskih riječnih dupina. *S. iniae* jedan je od najozbiljnijih uzročnika bolesti riba uzgajanih u akvakulturi sa stopom smrtnosti 30-50 %. Također, još neki patogeni sojevi BMK, kao što su *Carnobacterium piscicola*, *Lactococcus garvieae* i *Lactococcus piscium*, zabilježeni su kao povremeni uzročnici smrtnosti riba (Kathiresan i Thiruneelakandan, 2008).

### 2.2.1. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz školjkaša

Pinto i sur. (2009) izolirali su BMK iz svježih kamenica (*Ostrea edulis*) i dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i identificirali vrste *Enterococcus faecium* i *Pediococcus pentosaceus*. Navedenim izolatima se odredila i antimikrobna aktivnost prema bakteriji *Listeria monocytogenes*, pri čemu je zabilježen dobar inhibitorski učinak svih sojeva. U sličnom istraživanju autori Lee i sur. (2010) izolirali su bakterije roda *Lactobacillus* iz japanskih kamenica (*Crassostrea gigas*) i ispitali koji od izoliranih sojeva bi mogao biti okarakteriziran kao probiotik s primjenom u akvakulturi. Testirani su prema tome koji soj najbolje podnosi stres i pokazuje antimikrobnu aktivnost prema patogenima, što su bitni faktori kada se

upotrebljavaju u industriji, izvan svog prirodnog okoliša. Najotporniji na stres se pokazao *Lactobacillus rhamnosus* te je pokazivao i najveću antimikrobnu aktivnost prema dva soja patogena *Vibrio* spp.

Također, u istraživanju Čanak (2020) izolirani su sojevi *Lactobacillus plantarum* iz kamenica i dagnji Jadranskog mora te su testirani kao potencijalni probiotički sojevi za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture. Navedeni sojevi pokazivali su inhibitorno djelovanje prema najčešćim morskim patogenima, kao i preživljavanje u širokom rasponu pH i temperature što je vrlo važno jer su BMK izložene različitim nepovoljnim uvjetima tijekom industrijske proizvodnje.

Nadalje, Kang i sur. (2016) izolirali su 65 sojeva *Lactobacillus* spp. iz 6 vrsta školjkaša: japanska školjka malog vrata (*Venerupis philippinarum*), rogati turban (*Batillus cornutus*), japanska kamenica (*Crassostrea gigas*), kineska venera (*Cyclina sinensis*), plava dagnja (*Mytilus edulis*) i koritasta školjka (*Macra veneriformis* Reeve) te su ispitivali njihovu antimikrobnu aktivnost prema 8 patogena (*S. aureus*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *V. ichthyenteri*, *E. tarda*, *S. iniae* i *E. coli*), toleranciju na soli i različite pH vrijednosti. Najveću osjetljivost na izolate *Lactobacillus* spp. pokazao je *V. ichthyenteri* dok se *S. typhimurium* pokazala najmanje osjetljivim patogenom. Izolati identificirani kao *L. plantarum* pokazali su najveću otpornost pri niskim pH vrijednostima i visokim koncentracijama soli što upućuje na potencijalno dobro preživljavanje u morskom okolišu, a time i na potencijalnu primjenu u akvakulturi.

U istraživanju koje su proveli Abasolo-Pacheco i sur. (2016) izolirane su bakterije iz dvije vrste školjki, divovske lavove šape (*Nodipecten subnodosus*) i biserne oštrige (*Pteria sterna*), te su ispitivana njihova probiotička svojstva. Dva soja su identificirana kao BMK, i to *Lactobacillus graminis* i *Lactobacillus plantarum*. U dosadašnjim istraživanjima je zabilježen inhibitorni učinak *L. plantarum* na patogene *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* i *V. vulnificus* (Vazquez i sur., 2005; Kongnum i Hongpattarakere, 2012), dok su u gore navedenom istraživanju prvi put zabilježene probiotičke karakteristike soja *Lactobacillus graminis*.

### 2.3. Probiotici u akvakulturi

Zbog velike potražnje za plodovima mora, akvakultura je u posljednje vrijeme postala vrlo važna gospodarska djelatnost stoga su i potrebe za objektima koji se bave akvakulturom i uzgajaju vrste porasle. Sve to je dovelo, osim negativnog ekološkog utjecaja na kvalitetu vode i staništa, do velikog stresa kod morskih životinja što kao posljedicu ima pojavu širenja bolesti i smanjenja produktivnosti. Kako bi se bolesti liječile i suzbile koriste se mnogi lijekovi, a najviše antibiotici, koji zaostaju u tkivima životinja te se time povećava i otpornost mikroorganizama na antibiotike (Alonso i sur., 2019).

Obzirom da se neki antibiotici korišteni u akvakulturi koriste i za liječenje bakterijskih infekcija kod ljudi, javljaju se bakterijski sojevi koji postaju rezistentni na antibiotike što za posljedicu ima povećanje smrtnosti od nekih bolesti. Zbog svega navedenog, kao alternativa u akvakulturi su se počeli koristiti nepatogeni mikroorganizmi, osobito probiotici, s ciljem očuvanja zdravlja morskih životinja. Probiotici su mikroorganizmi koji na različite načine inhibiraju rast patogenih mikroorganizama, primjerice modificiraju crijevnu mikrofloru, jačaju imunološki sustav ili sprečavaju rast patogenih mikroorganizama izlučivanjem bakteriocina, enzima, vodikovog peroksida i organskih kiselina (Alonso i sur., 2019; Frece i sur., 2016; Šušković i sur., 2010).

Zapaženo je kako BMK koje se koriste kao probiotici inhibiraju rast morskih patogena *Aeromonas salmonicida* i *Vibrio anguillarum* čime se smanjuje učestalost bolesti riba. Iako većina vrsta iz skupine BMK ima QPS oznaku (Qualified Presumption of Safety) Europske agencije za sigurnost hrane (EFSA) i GRAS status (Generally Recognized as Safe) od strane američke agencije za hranu i lijekove (FDA), samo je soj *Pediococcus acidilactici* MA 18/5M odobren kao probiotik za primjenu u akvakulturi u zemljama Europske unije (Alonso i sur., 2019).

Posljednjih godina izolirane su mnoge BMK iz morskih proizvoda poput hladno dimljenog lososa, kamenica i drugih školjkaša, atlantskog bakalara, mediteranske ribe i dr. (Gómez-Sala i sur., 2015). Pérez-Sánchez i sur. (2011) su proveli izolaciju i identifikaciju BMK iz crijeva kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) te karakterizaciju dobivenih izolata s ciljem primjene kao probiotika. Istraživanjem su zaključili kako su izolati BMK pripadali rodovima *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* te je 3,28 % izolata pokazalo antimikrobnu aktivnost prema *Lactococcus garvieae*, što podupire navode ostalih istraživanja kako prirodna mikroflora morskih životinja ispoljava probiotička svojstva u borbi protiv patogena (Merrifield i sur., 2010; Pérez i sur. 2010).

Nadalje, istraživanje provedeno na blatnim rakovima (*Scylla paramamosain*), koji su komercijalno vrlo važni u jugoistočnom dijelu Kine, pokazalo je kako BMK *Enterococcus faecalis* i *Pediococcus pentosaceus* izolirane iz crijeva rakova imaju inhibitorno djelovanje na glavne patogene koji pogađaju ovu vrstu (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Staphylococcus aureus* i grupu B streptokoka) te vrlo širok raspon tolerancije na različite pH vrijednosti (2-10) (Yang i sur., 2019).

Prema dobivenim rezultatima, autori su zaključili kako će se navedeni sojevi BMK u budućnosti moći koristiti kao probiotici jer su pokazali poboljšani imunološki odgovor i brži rast rakova te povećanu zaštitu crijevnog sustava (Yang i sur., 2019).

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroorganizmi

Soj bakterije mliječne kiseline (BMK) korišten u ovom radu prethodno je izoliran iz kaneštrela (*Aequipecten opercularis*) izlovljenih u Istarskom akvatoriju, a MALDI TOF spektrometrijom masa koja je provedena na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu identificirana je vrsta *Lactobacillus brevis*. Eksperimenti izolacije i identifikacije napravljeni su u Laboratoriju za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u sklopu projekta „Integrirani sustav uzgoja alternativnih vrsta školjkaša u uvjetima klimatskih promjena“. Standardni sojevi patogenih mikroorganizama dio su zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu.

##### 3.1.2. Hranjive podloge

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

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

###### 2.) Podloga za održavanje i uzgoj patogenih mikroorganizama:

- HA (hranjivi agar), sastava (g/L destilirane vode): pepton 15; mesni ekstrakt 3; NaCl 5;  $K_3PO_4$  0,3; agar 18; pH vrijednost podloge je 7,3; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15 min.
- HB (hranjivi bujon) je istog sastava kao i hranjivi agar, samo bez dodanog agara.

### 3.) Podloga za *Vibrio* sp :

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

#### 3.1.3. Pribor i oprema

- centrifuga, Z 206 A (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Njemačka)
- inkubator, MEMMERT BE 600 (Mettler GmbH + Co.KG, Schwabach, Njemačka)
- pH-metar, MP220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- vibracijska miješalica, V-1 plus (Biosan, Riga, Latvija)
- čitač mikrotitarskih pločica, Sunrise (Tecan, Grödig, Austrija)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Čuvanje mikroorganizama

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

### 3.2.2. Uzgoj mikroorganizama

Soj BMK uzgojen je preko noći u MRS bujonu pri 37 °C. Test mikroorganizmi *Escherichia coli* 3014, *Proteus mirabilis* 3008, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Aeromonas hydrophila* JCM 1027 su uzgojeni preko noći u hranjivom bujonu (Biolife) pri 37 °C.

### 3.2.3. Određivanje antimikrobne aktivnosti izoliranih sojeva BMK

Antimikrobna aktivnost izolata BMK ispitana je turbidimetrijskom metodom na test mikroorganizmima: *Escherichia coli* 3014, *Proteus mirabilis* 3008, *Pseudomonas aeruginosa* 3024, *Aeromonas hydrophila* JCM 1027.

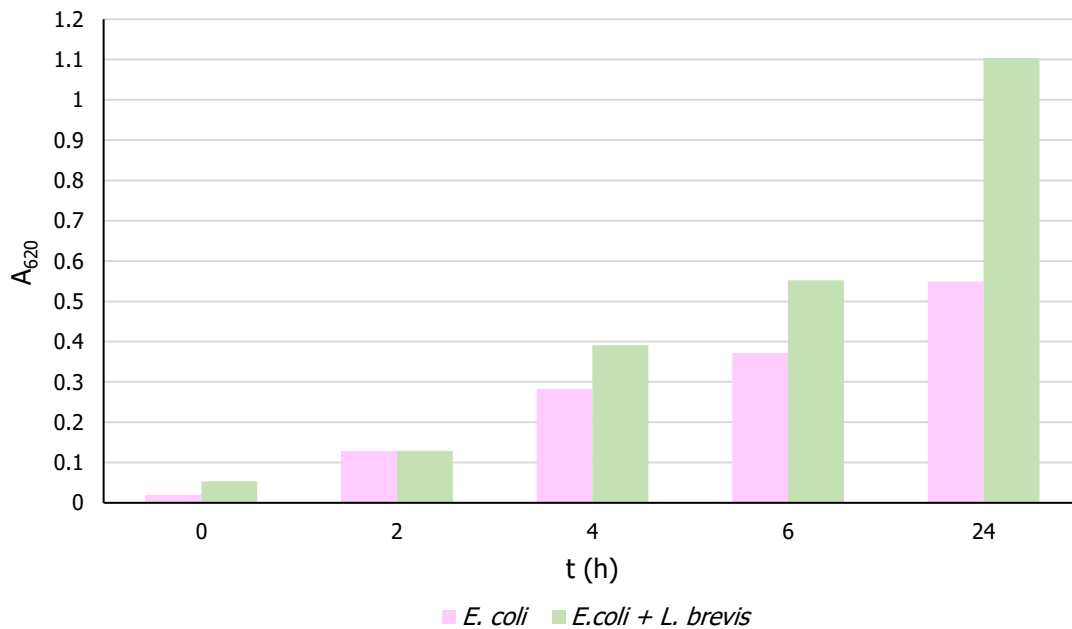


#### 3.2.4. Turbidimetrijska metoda

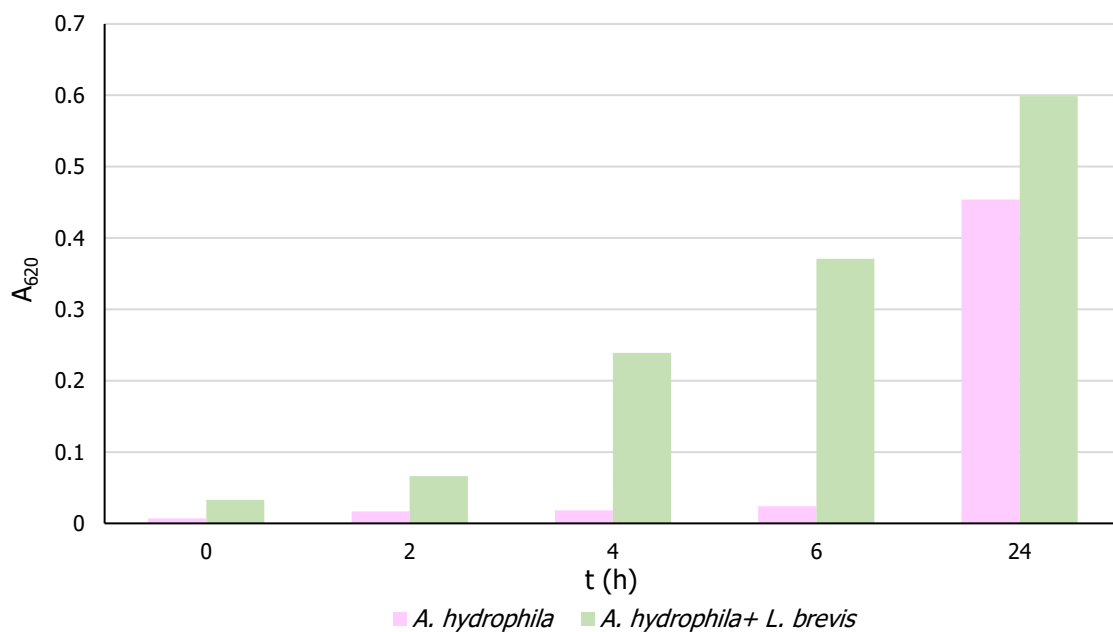
U jažice mikrotitarske pločice dodano je 240  $\mu\text{L}$  supernatanta određenog bakterijskog izolata i 10  $\mu\text{L}$  test mikroorganizma prethodno uzgojenog u hranjivom bujonu. Supernatant BMK je prethodno podešen na pH 6,9 sa sterilnim 1M NaOH kako bi se isključio inhibitorni učinak mliječne kiseline. Kako bi se odredilo antibakterijsko djelovanje supernatanta bakterijskih izolata na test mikroorganizme, tijekom 24 sata uzgoja (2, 4, 6 i 24 h) pri 37 °C, određivano je spektrofotometrijskim mjerenjem prividne apsorbancije pri valnoj duljini 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica. Razlika u prividnoj apsorbanciji kontrole (nacijepljen hranjivi bujon s test mikroorganizmom bez dodanog supernatanta bakterijskog izolata) i uzoraka s dodanim supernatantom bakterijskog izolata je mjera inhibicije rasta test mikroorganizma. Slijepe probe su bili uzorci pripremljeni bez dodatka mikroorganizama (Frece, 2010a).

#### 4. Rezultati i rasprava

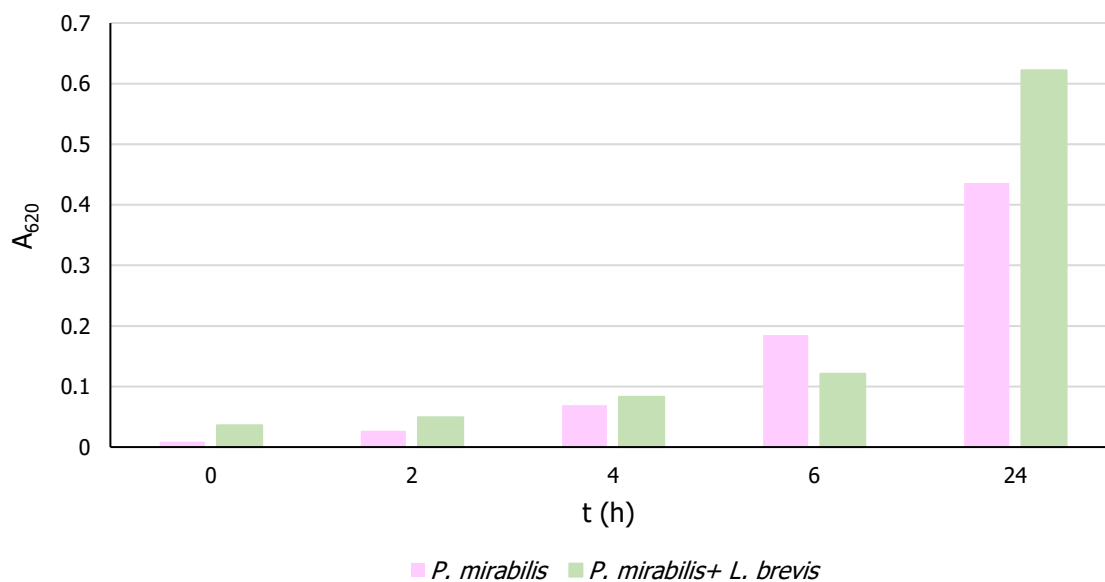
Antimikrobna aktivnost jedna je od važnijih karakteristika svakog probiotičkog soja. Obzirom na relativno mali broj istraživanja koja se bave karakterizacijom BMK morskog porijekla kao potencijalnih probiotika, cilj ovog rada bio je odrediti antimikrobnu aktivnost BMK *Lactobacillus brevis* izolirane iz morske vrste školjkaša, kao polaznu točku za daljnju karakterizaciju. Određivanje antimikrobne aktivnosti provedeno je turbidimetrijskom metodom a dobiveni rezultati su prikazani su na slikama 2-5.



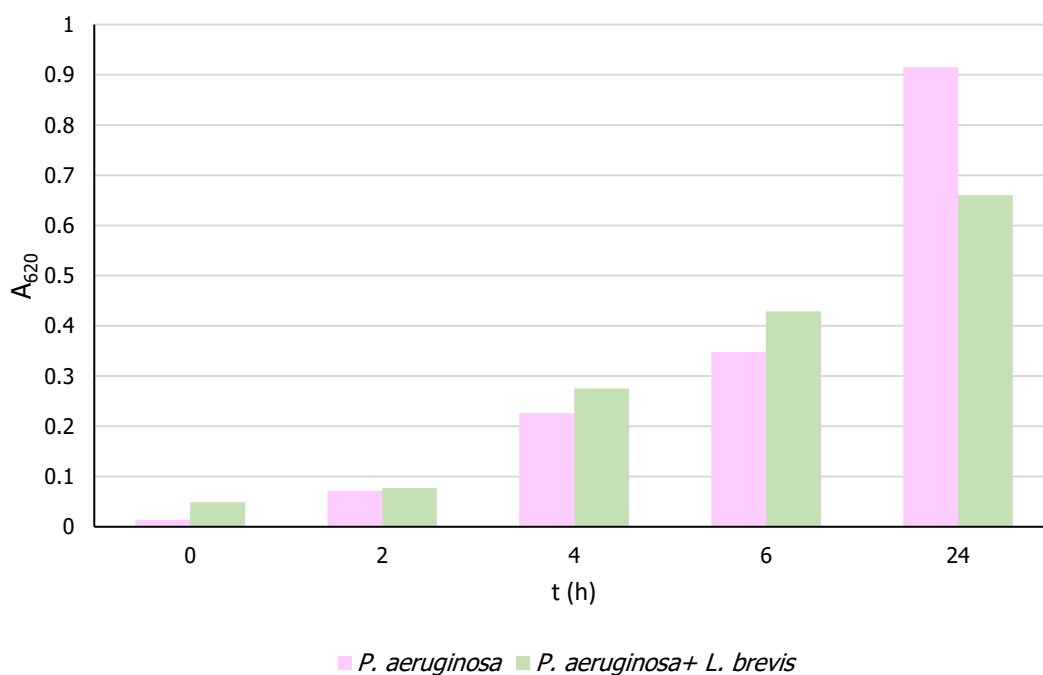
**Slika 2.** Inhibicija rasta bakterije *E. coli* u prisutnosti *L. brevis* tijekom 24 h



**Slika 3.** Inhibicija rasta bakterije *A. hydrophila* u prisutnosti *L. brevis* tijekom 24 h



**Slika 4.** Inhibicija rasta bakterije *P. mirabilis* u prisutnosti *L. brevis* tijekom 24 h



**Slika 5.** Inhibicija rasta bakterije *P. aeruginosa* u prisutnosti *L. brevis* tijekom 24 h

Iz rezultata je vidljivo kako je *L. brevis* pokazao umjerenu inhibiciju prema patogenima *P. mirabilis* i *P. aeruginosa*, pri čemu je najbolja inhibicija zabilježena prema bakteriji *P. mirabilis* (slika 4), dok je izostanak inhibicije zabilježen kod bakterija *E. coli* i *A. hydrophila* (slike 2-3). Eksplozivni rast uočeno je kod kontrolnih uzoraka u kojima je bila prisutna samo patogena bakterija kao i u uzorcima u koje je dodan neutralizirani supernatant *L. brevis*. Izostanak inhibicije navedenih patogenih bakterija podudara se s rezultatima koje su zabilježili Lee i sur. (2000) tijekom praćenja antimikrobne aktivnosti *L. brevis* izoliranog iz uzoraka tradicionalnog korejskog jela pripremljenog od morskih plodova (Jeot-gal).

Kod bakterije *P. mirabilis* uočeno je nešto bolji inhibični učinak *L. brevis* jer sve do 6. h nema značajnog porasta mikroorganizama što je vidljivo prema niskim vrijednostima izmjerene apsorbancije u odnosu na kontrolni uzorak. Nakon 24 h zabilježen je izražen porast koncentracije oba uzorka i prestanak inhibicije rasta *P. mirabilis* (slika 3). Praćenjem krivulje rasta *P. aeruginosa* vidljivo je kako dodatak supernatanta *L. brevis* najbolji učinak pokazuje tek nakon 24 sata gdje dolazi do inhibicije od 27,86 % (slika 5). Dobiveni rezultati su u skladu s onima od Shanthi i sur. (2011) koji su također zabilježili sličnu razinu inhibicije *L. brevis* izoliranog iz gastrointestinalnog trakta morskih riba prema *P. mirabilis* i *P. aeruginosa*.

Kako je u ovom radu korišten neutralizirani supernatant, čime je isključen inhibitorni učinak mliječne kiseline, zapažena antimikrobna aktivnost se može pripisati djelovanju primjerice diacetila, vodikova peroksida, ali i djelovanju bakteriocina. Međutim, da supernatant nije bio neutraliziran, mliječna kiselina bi vjerojatno pojačala inhibitorni učinak jer se prema nekim dosadašnjim istraživanjima (Da Costa i sur., 2018; Teixeira de Carvalho i sur., 2006) upravo organske kiseline smatraju primarnim metabolitima BMK koji imaju inhibitorni učinak prema patogenima (Arrijoja-Bretón i sur., 2020).

## 5. Zaključci

1. Bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus brevis* izolirana iz morske vrste školjkaša, pokazala je umjereno inhibitorno djelovanje prema patogenim mikroorganizmima *Proteus mirabilis* i *Pseudomonas aeruginosa* dok inhibicija rasta nije zabilježena za bakterije *Escherichia coli* i *Aeromonas hydrophila*
2. Najbolja antimikrobna aktivnost uočena je prema bakteriji *Proteus mirabilis*
3. Potrebno je provesti dodatna ispitivanja kako bi se ispitao mogući probiotički učinak *L. brevis* u akvakulturi

## 6. Literatura

Abasolo-Pacheco, F., Saucedo, P. E., Mazón-Suástegui, J. M., Tovar-Ramírez, D., Araya, R., Ramírez-Orozco, J. M., & Campa-Córdova, Á. I. (2016) Isolation and use of beneficial microbiota from the digestive tract of lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* and winged pearl oyster *Pteria sterna* in oyster aquaculture. *Aquaculture Research* **47(10)**: 3042–3051.

Alonso, S. i sur. (2019) Isolation and Partial Characterization of Lactic Acid Bacteria from the Gut Microbiota of Marine Fishes for Potential Application as Probiotics in Aquaculture. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **11(2)**: 569–579.

Arrijoa-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2020) Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control* **115**: 1-11.

Da Costa, W. K. A., de Souza, G. T., Brandão, L. R., de Lima, R. C., Garcia, E. F., dos Santos Lima, M., et al. (2018) Exploiting antagonistic activity of fruit-derived *Lactobacillus* to control pathogenic bacteria in fresh cheese and chicken meat. *Food Research International* **108**: 172–182.

Čanak, I., Markov, K., Melvan, E., Starčević, A., Živković, M., Zadavec, M., Pleadin, J., Jakopović, Ž., Kostelac, D., Frece, J. (2018). Isolation and characterisation of *L. plantarum* O1 producer of plantaricin as potential starter culture for the biopreservation of aquatic food products. *Food technology and biotechnology*, **56(4)**: 581-589.

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

Čanak, I. (2020) Karakterizacija probiotičke bakterije *Lactobacillus plantarum* O1 za biološko konzerviranje proizvoda akvakulture. Disertacija. Zagreb: Sveučilište u zagrebu

Frece, J., Markov, K., Čvek, D., Kovačević, D., Krcivoj, T. (2010) Karakterizacija bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* 1K izoliranog iz "slavonskog kulena" kao probiotičke funkcionalne starter kulture. Meso: prvi hrvatski časopis o mesu, **12(4)**:210-216.

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

Frece, J., Vrdoljak, M., Filipčić, M., Jelić, M., Čanak, I., Jakopović, Ž., Pleadin, J., Gobin. I., Landeka Dragičević, T., Markov, K. (2016) Microbiological quality and variability of natural microbiota in Croatian cheese maturing in lambskin sacks. Food technology and biotechnology, **54(2)**: 129-134.

Gómez-Sala, B., Herranz, C., Díaz-Freitas, B., Hernández, P. E., Sala, A., & Cintas, L. M. (2016) Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. International Journal of Food Microbiology **223**: 41–49.

Gómez-Sala, B. i sur. (2015) Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from fish, seafood and fish products. European Food Research and Technology **241(3)**: 341–356.

Kang, C. H., Shin, Y. J., Kim, Y. G., & So, J. S. (2016) Isolation of *Lactobacillus* strains from shellfish for their potential use as probiotics. Biotechnology and Bioprocess Engineering, **21(1)**: 46–52.

Kathiresan, K. and Thiruneelakandan, G. (2008) Prospects of lactic acid bacteria of marine origin. Indian Journal of Biotechnology **7(2)**: 170–177.



Kongnum K. & Hongpattarakere T. (2012) Effect of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish & Shellfish Immunology **32**: 170–7.

Lahtinen, S. i sur. (2012) Microbiological and functional aspects, 4. izd., Taylor & Francis, London. str. 2-4; 65; 71; 7-79; 94-95; 99-100; 126-127.

Lee, H. I. i sur. (2010) Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus spp.* isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). Anaerobe **16(5)**: 522–526.

Lee, N.K., Jun, S.A., Ha, J.U., Paik, H.D. (2000) Screening and characterization of bacteriocinogenic lactic acid bacteria from Jeot-gal, a Korean fermented fish food. Journal of Microbiology and Biotechnology **10**: 423–428.

Merrifield D.L., Dimitroglou A., Foey A., Davies S.J., Baker R.T.M., Børgwald J., Castex M., Ringø E. (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture **302**: 1–18.

Martínez Cruz, P., Ibáñez, A. L., Monroy Hermsillo, O. A., Ramírez Saad, H. C. (2012) Use of Probiotics in Aquaculture. ISRN Microbiology: 1-13.

Mokoena, M. P. (2017) Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. Molecules **22(8)**

Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Magadán, S., Hernández, P. E., Herranz, C., Santos, Y., & Cintas, L. M. (2014) *In vitro* and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus L.*) farming. Fish and Shellfish Immunology **41(2)**: 570–580.

Muñoz-Atienza, E. i sur. (2013) Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of lactic acid bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiology* **13(1)**

Vázquez J.A., Gonzalez M.P. & Murado M.A. (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* **245**: 149–61.

Van Niel, E. W. J. and Hahn-Hägerdal, B. (1999) Nutrient requirements of lactococci in defined growth media. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52(5)**: 617–627.

Pérez T., Balcázar J.L., Ruiz-Zarzuela I., Halaihel N., Vendrell D., de Blas I., Múzquiz J.L. (2010) Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology* **3**: 355–360.

Pérez-Sánchez, T. i sur. (2011) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases* **34(7)**: 499–507.

Pinto, A. L. 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.

Shanthi, V., Borgia, J., Bhavani, S., & Sathya, M. (2011) Inhibitory Effects of *Lactobacillus* Species Against Human Pathogens. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* **3(4)**: 174–177.

Sharma, C., Singh, B. P., Thakur, N., Gulati, S., Gupta, S., Mishra, S. K., & Panwar, H. (2017) Antibacterial effects of *Lactobacillus* isolates of curd and human milk origin against food-borne and human pathogens. *3 Biotech* **7(1)**: 1–9.

Sica, M. G., Olivera, N. L., Brugnoli, L. I., Marucci, P. L., López Cazorla, A. C., & Cubitto, M. A. (2010) Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca Estuary. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **45(3)**: 387–397.

Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K. and Matošić, S. (2010) Antimicrobial activity—the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology* **48(3)**: 296-307.

Teixeira de Carvalho, A. A., Aparecida de Paula, R., Mantovani, H. C., & Alencar de Moraes, C. (2006) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. *Food Microbiology* **23(3)**: 213–219.

Yang, Q. i sur. (2019) Lactic acid bacteria, *Enterococcus faecalis* Y17 and *Pediococcus pentosaceus* G11, improved growth performance, and immunity of mud crab (*Scylla paramamosain*). *Fish and Shellfish Immunology* **93(7)**: 135–143.

## Izjava o izvornosti

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

---

ime i prezime studenta