

Usporedba mikrobiološke slike signalnog raka (*Pacifastacus leniusculus*) i uskoškarnog raka (*Pontastacus leptodactylus*)

Straga, Ana

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:159:914038>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-06**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Ana Straga
0058216144**

**USPOREDBA MIKROBIOLOŠKE SLIKE
SIGNALNOG RAKA (*Pacifastacus leniusculus*) I
USKOŠKAROG RAKA (*Pontastacus leptodactylus*)**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof.dr.sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Usporedba mikrobiološke slike signalnog raka (*Pacifastacus leniusculus*) i uskoškarog raka (*Pontastacus leptodactylus*)

Ana Straga, 0058216144

Sažetak:

Slatkovodne ekosustave u Hrvatskoj nastanjuje sedam vrsta rakova. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti mikrobiološku sliku rakova, a korištene su domaća vrsta *Pontastacus leptodactylus* i invazivna strana vrsta *Pacifastacus leniusculus*. Ispitana je prisutnost bakterija mliječne kiseline (BMK) i mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane (enterobakterija, sulfitoreducirajućih klostridija i koagulaza-pozitivnih stafilokoka) s obzirom da se ovi rakovi koriste u prehrani ljudi. Dobiveni rezultati su pokazali da nema značajne razlike u mikrobiološkoj slici ovih dvaju rakova te da koncentracije ispitanih mikroorganizama prelaze one dopuštene pravilnikom pa takvi rakovi nisu sigurni za konzumaciju. Bakterije mliječne kiseline su pronađene samo kod autohtone vrste raka *P. leptodactylus* u koncentraciji od 2×10^1 CFU/g. Za utvrđivanje roda i vrste detektiranih BMK potrebno je provesti dodatnu identifikaciju.

Ključne riječi: mikrobiološka analiza, bakterije mliječne kiseline, slatkovodni rakovi

Rad sadrži: 28 stranica, 5 slika, 2 tablica, 50 literaturnih navoda, 0 priloga

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. Anđela Miljanović

Datum obrane: 7. 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

Comparison of the microbial gut composition of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*)
and the narrow-clawed crayfish (*Pontastacus leptodactylus*)

Ana Straga, 0058216144

Abstract:

Freshwater ecosystems in Croatia are inhabited by seven crayfish species. The aim of this research was to compare the microbial gut composition of crayfish, using the domestic species *Pontastacus leptodactylus* and the invasive foreign species *Pacifastacus leniusculus*. The presence of lactic acid bacteria (LAB) and microorganisms that cause food contamination (enterobacteria, sulphite-reducing clostridia and coagulase-positive staphylococci) were examined, considering that these crayfish are used in human nutrition. The obtained results showed that there are no significant differences in the microbial gut composition of these two crayfish, and that the concentrations of tested microorganisms exceed those allowed by national guidelines, so such crabs are not safe for consumption. Lactic acid bacteria were found only in the autochthonous type of crayfish *P. leptodactylus* in a concentration of 2×10^1 CFU/g. To determine the genus and species of detected LAB it is necessary to carry out additional identification.

Keywords: microbial analysis, lactic acid bacteria, freshwater crabs

Thesis contains: 28 pages, 5 figures, 2 tables, 50 references, 0 supplements

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: Jadranka Frece, PhD, Full Professor

Technical support and assistance: Iva Čanak, PhD; Anđela Miljanović, PhD

Thesis defended: September 7, 2022.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. ANIMALNE VRSTE U SLATKOVODNIM EKOSUSTAVIMA	2
2.1.1. SLATKOVODNI DESETERONOŽNI RAKOVI	3
2.2. VRSTE SLATKOVODNIH RAKOVA U HRVATSKOJ	4
2.2.1. AUTOHTONE VRSTE SLATKOVODNIH RAKOVA U HRVATSKOJ	4
2.2.2. ALOHTONE VRSTE SLATKOVODNIH RAKOVA U HRVATSKOJ	5
2.2.3. UTJECAJ INVAZIVNIH VRSTA	7
2.3. MIKROBIOTA PROBAVNOG SUSTAVA SLATKOVODNIH RAKOVA.....	8
2.4. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE.....	10
2.4.1. ROD <i>STREPTOCOCCUS</i>	11
2.4.2. ROD <i>ENTEROCOCCUS</i>	11
2.4.3. ROD <i>LACTOCOCCUS</i>	12
2.4.4. ROD <i>PEDIOCOCCUS</i>	12
2.4.5. ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	12
2.4.6. ROD <i>LEUCONOSTOC</i>	13
2.4.7. ROD <i>OENOCOCCUS</i>	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. MATERIJALI.....	14
3.1.1. UZORCI.....	14
3.1.2. HRANJIVE PODLOGE.....	15
3.1.3. PRIBOR I OPREMA	16
3.2. METODE	17
3.2.1. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA MIKROORGANIZAMA UZROČNIKA ZDRAVSTVENE NEISPRAVNOSTI HRANE.....	17
3.2.2. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH MIKROORGANIZAMA INDIREKTNOM METODOM.....	17
3.2.3. IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE.....	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČCI	22
6. POPIS LITERATURE	23

1. UVOD

Slatkovodne ekosustave u Hrvatskoj danas nastanjuje ukupno sedam vrsta deseteronožnih rakova. Četiri vrste se smatraju autohtonim europskim vrstama i njima pripadaju riječni rak *Astacus astacus*, potočni rak *Austropotamobius torrentium*, bjelonogi rak *Austropotamobius pallipes* i uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus* (Maguire i Gottstein Matočec, 2004). Preostale tri vrste ne potječu iz Europe, a na teritoriju Hrvatske su zabilježene tijekom proteklih 20 godina. One su redom: bodljibradi rak *Orconectes limosus*, signalni rak *Pacifastacus leniusculus* i mramorni rak *Procambarus virginalis* (Dragičević i sur., 2020).

Neke od ovih vrsta su namjerno unesene na područje Europe kako bi se nadomjestila populacija domaćih rakova koja je bila znatno smanjena zbog nekontroliranog izlova, uništenja staništa, ali i širenja smrtonosne bolesti – račje kuge (Holdich i sur., 2009; Holdich, 2003). Druge su pak unesene slučajno, putem balastnih voda, ili kao rezultat neodgovornog postupanja sa ljubimcima nabavljenim iz drugih zemalja putem internet trgovine (Samardžić i sur., 2014; Gherardi, 2007). Ove vrste se zbog veće agresivnosti (Maguire, 2010 prema Souty-Grosset i sur., 2006), veće plodnosti, bržeg rasta, i otpornosti prema promjenama u okolišu (Gherardi, 2007) brzo šire i istiskuju domaće (Maguire i sur., 2018), zbog čega ih smatramo invazivnima (Kolar i Lodge, 2001).

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti mikrobiološku sliku slatkovodnih rakova, a korištene su domaća vrsta *Pontastacus leptodactylus* i invazivna strana vrsta *Pacifastacus leniusculus*. Ispitana je prisutnost mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane (enterobakterija, sulfitoreducirajućih klostridija i koagulaza-pozitivnih stafilokoka) s obzirom da se ovi rakovi koriste u prehrani ljudi (Helfrich i DiStefano, 2003), te prisutnost bakterija mliječne kiseline s obzirom njihove pozitivne učinke u probavnom sustavu domaćina (Bermudez-Brito i sur., 2012).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ANIMALNE VRSTE U SLATKOVODNIM EKOSUSTAVIMA

Slatkovodne ekosustave možemo podijeliti na vode stajaćice i vode tekućice. Vode stajaćice, kao što su jezera i bare, karakterizira mala brzina strujanja i odsustvo stalnog toka, dok vode tekućice poput rijeka i potoka imaju stalan tok i veliku brzinu strujanja (Mochek i Pavlov, 2021). Ove vode zauzimaju tek 0,01 % površine Zemlje, a novija istraživanja pokazuju da u njima obitava gotovo 10 % svih poznatih animalnih vrsta. Taj broj predstavlja samo naše trenutno znanje i nije prava slika bioraznolikosti ovih ekosustava jer mnoge vrste tek treba otkriti. Najveći broj dosad opisanih vrsta iz vodenih ekosustava otpada na kukce (*Insecta*, preko 60 %), a slijede ih kralježnjaci (*Vertebrata*, 14,5 %), rakovi (*Crustacea*, 10 %) te paučnjaci (*Arachnids*, 5 %) i mekušci (*Molluscus*, 4 %). Manji broj vrsta pripada skupini beskralježnjaka, a najzastupljeniji među njima su kolnjaci (*Rotifera*), oblići (*Nematoda*), kolutićavci (*Annelidae*) i virnjaci (*Turbellaria*) (Balian i sur., 2008).

Najviše predstavnika iz razreda kukaca (*Insecta*) pripada redu dvokrilaca (*Diptera*, 43 %), kornjaša (*Coleoptera*, 18 %) i tulara (*Trichoptera*, 15 %). Zabilježen je i velik broj različitih stjenica (*Heteroptera*), oblačara (*Plecoptera*), vretenaca (*Odonata*) i vodencvjetova (*Ephemeroptera*) (Balian i sur., 2008).

U slatkovodnim sustavima pronađeno je i gotovo 35 % svih opisanih vrsta kralježnjaka (*Vertebrata*). Najveći broj vrsta pripada ribama (*Pisces*, 69 %) i vodozemcima (*Amphibia*, 24 %), a manji udio čine ptice, kornjače, zmije, sisavci, gušteri i krokodili. Ako u obzir uzmemo ukupan broj vrsta na svijetu možemo zaključiti da slatkovodne sustave nastanjuje 73 % svih vodozemaca i gotovo 50 % svih riba (to uključuje i ribe koje žive u boćatim vodama) (Balian i sur., 2008).

Zabilježeno je gotovo 12 000 vrsta slatkovodnih rakova (*Crustacea*) što je gotovo trećina svih opisanih vrsta na svijetu. Najzastupljenije skupine su deseteronošci (*Decapoda*, 24 %) i veslonošci (*Copepoda*, 23 %), a slijede ih ljuskari (*Ostracoda*, 16 %) i amfipodni rakovi (*Amphipoda*, 16 %) te škrgonošci (*Branchipoda*, 9 %) i jednakonošci (*Isopoda*, 8 %) (Balian i sur., 2008).

2.1.1. Slatkovodni deseteronožni rakovi

Slatkovodni rakovi su veoma raznolika skupina organizama s više od 640 opisanih vrsta. Pripadaju podredu *Astacidea* u redu *Decapoda*. Taksonomski ih možemo podijeliti u dvije natporodice: *Astacoidea* na sjevernoj Zemljinoj polutci i *Parastacoidea* na južnoj polutci. Natporodica *Astacoidea* je podijeljena u dvije porodice, *Cambaridae* i *Astacidae*, dok natporodici *Parastacoidea* pripada samo jedna porodica – *Parastacidae*. Porodica *Cambaridae* je rasprostranjena je na području Sjeverne Amerike i Azije te je po pitanju broja vrsta najbogatija od spomenutih. U Europi i Sjevernoj Americi rasprostranjena je porodica *Astacidae*, a u Australiji, Južnoj Americi, na Novom Zelandu i Madagaskaru natporodica *Parastacoidea* (Crandall i Buhay, 2007).

Ovi rakovi izgledom podsjećaju na jastoga. Tijelo im je sastavljeno od dva dijela, glavopršnjak i zadak, a obavija ga čvrsta kutikula (oklop) koja služi za zaštitu i koju rakovi periodično odbacuju kako bi mogli rasti. Zadak je sastavljen od sedam segmenata i velikog lepezastog repa koji im služi za brzo plivanje unatrag. Na glavopršnjaku se nalazi pet pari nogu, od kojih je prvi par transformiran u kliješta, a ostala četiri služe za hodanje. Dišu pomoću škrga no mnoge vrste mogu boraviti izvan vode kroz duži vremenski period (Helfrich i DiStefano, 2003).

Slatkovodni rakovi su uglavnom noćne životinje - preko dana skrivaju se unutar skloništa, a noću love. Zaklon pronalaze pod kamenjem i korijenjem, te u rupama na obalama koje mogu sami izbušiti (Maguire, 2010). Ovakva skloništa im služe za zaštitu od predatora, visokih temperatura i dehidracije, te su im posebno bitna u osjetljivim fazama života (tijekom presvlačenja i razmnožavanja). Postoje vrste koje većinu svog života provode unutar skloništa i koje nisu ovisne o povezanosti sa slatkom vodom te one koje u skloništima obitavaju samo u određenim periodima (tijekom zime, sušnih perioda ili tijekom sezone parenja) i kojima je povezanost skloništa s vodom veoma bitna (Gherardi i sur., 2010). Životni vijek većine vrsta je oko dvije godine, a zabilježene su vrste koje mogu živjeti i više od 20 godina (Crandall i Buhay, 2007).

Po pitanju prehrane su svejedi (Crandall i Buhay, 2007). Mogu se hraniti različitim namirnicama kao što su detritus, alge, vodeno bilje, jaja i ličinke vodozemaca, ribe i njihova jaja, različiti beskralježnjaci i drugi rakovi (Gherardi i sur., 2010). Mladi rakovi su uglavnom

mesojedi, a odrasli biljojedi (Helfrich i DiStefano, 2003). Veoma su proždrljivi i mogu djelovati destruktivno kada se nalaze u području koje im nije nativno (Crandall i Buhay, 2007). Osim što su sami predatori, mogu biti i plijen drugim vodenim i kopnenim životinjama kao što su štika, jegulja, vidra, kuna i čaplja. Ove karakteristike čine ih bitnim sudionicima hranidbenog lanca i važnim katalizatorima obrtaja organske tvari (Maguire, 2010).

Većina vrsta ima odvojene spolove, ali postoje i neke vrste koje su dvospolci (Gherardi i sur., 2010) te neke koje se mogu razmnožavati partenogenezom (Scholtz i sur., 2003). S obzirom na reproduktivni ciklus razlikujemo vrste rakova koje se liježu tijekom zime (primjerice native Europske vrste) i one koje se liježu tijekom ljeta (primjerice *Orconectes limosus*) (Gherardi i sur., 2010). Mladi rakovi su prvih nekoliko dana nepokretni i ostaju pričvršćeni za majku, a slobodno se počinju kretati tek nakon prvog presvlačenja. Život im se nastavlja kroz ciklus periodičnih presvlačenja (Maguire, 2010).

2.2. VRSTE SLATKOVODNIH RAKOVA U HRVATSKOJ

2.2.1. Autohtone vrste slatkovodnih rakova u Hrvatskoj

Danas na teritoriju Europe obitava pet autohtonih vrsta slatkovodnih rakova koji pripadaju porodici *Astacidae* (Maguire, 2010). Maguire i Gottstein Matočec (2004) su u istraživanju iz 2004. godine na području Hrvatske zabilježili prisutnost četiri od tih pet autohtonih vrsta. Njima pripadaju riječni rak *Astacus astacus*, potočni rak *Austropotamobius torrentium*, bjelonogi rak *Austropotamobius pallipes* i uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus*.

Prisutnost *Austropotamobius pallipes* zabilježena je na raznim područjima duž Jadranske obale (Istra, Dalmacija, otoci). Rijeke tog područja uglavnom nisu zagađene, a tlo je kamenito (Maguire i Gottstein Matočec, 2004). Za ovu vrstu rakova temperatura vode u ljetnim mjesecima mora biti veća od 10 °C, zbog čega se ne zadržava u izvorišnim dijelovima rijeka i brzacima (Maguire, 2010).

Austropotamobius torrentium i *Astacus astacus* obitavaju na području kontinentalne Hrvatske, u rijekama crnomorskog slijeva (Sava, Drava i Dunav) i njihovim pritocima. Zabilježeni su podaci o lokacijama na kojima ove dvije vrste koegzistiraju, ali su njihova mikro-staništa

različita. *A. torrentium* preferira brže struje i kamenito tlo na višim nadmorskim visinama, dok *A. astacus* obitava u dijelovima toka koji su sporiji i gdje je tlo šljunčano ili pješčano. Vrsta *A. astacus* je također nađena u rijekama jadranskog slijeva u koje je vjerojatno unesena za potrebe akvakulture, s obzirom da se konzumira u velikoj mjeri (Maguire i Gottstein Matočec, 2004).

Pontastacus leptodactylus (Slika 1) pronađen je u pritocima Dunava, a nedavno i Save zbog čega se pretpostavlja da se širi od istoka prema zapadu zemlje. Obitava samo u nizinskim eutrofnim rijekama s glineno-blatnim dnom te u močvarama (Maguire i Gottstein Matočec, 2004). Novija istraživanja pokazuju da ova vrsta polako gubi svoje stanište i potisnuta je širenjem stranih invazivnih vrsta rakova (Maguire i sur., 2018). Od četiri autohtone vrste rakova u Hrvatskoj jedino uskoškari rak nije zaštićen Zakonom o zaštiti prirode (Narodne novine, 80/13) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine, 144/13).



Slika 1. Uskoškari rak *Ponastacus leptodactylus* (Tarandek, 2021)

2.2.2. Alohtone vrste slatkovodnih rakova u Hrvatskoj

Danas je brojnost autohtonih populacija rakova u stalnom padu. Tome doprinose nekontroliran izlov, velike količine otpada i gubitak staništa zbog regulacije vodenih tokova. Padu populacije doprinosi i širenje različitih bolesti, kao što je račja kuga. Bolest uzrokuje oomiceta *Aphanomyces astaci*, a Europom se proširila krajem 19. stoljeća (Maguire, 2010). Zbog brzog širenja bolesti uništene su mnoge domaće populacije rakova što je dovelo do unosa sjevernoameričkih vrsta kako bi se nadomjestio njihov nedostatak (Holdich i sur., 2009).

Smatralo se da su sjevernoameričke vrste rezistentne na bolest zbog njihove koegzistencije sa patogenom kroz milijune godina (Aydin i sur., 2014), ali kasnije je dokazano da u stresnim uvjetima i one mogu biti podložne obolijevanju (Aydin i sur., 2014; Keller i sur., 2014). Iako rezistentne, ove vrste su prirodni domaćini i prijenosnici bolesti (Keller i sur., 2014), a danas je poznato da ju ne prenose samo rakovi već se prenosi i preko vode ili „zaražene“ opreme (Maguire, 2010) jer se spore *A. astaci* mogu pričvrsti na vlažne površine (Gherardi, 2007).

U slatkovodnim ekosustavima Hrvatske su u posljednjih 20 godina zabilježene 3 alohtone vrste slatkovodnih deseteronožnih rakova: bodljobradi, signalni i mramorni rak (Dragičević i sur., 2020).

Bodljobradi rak *Orconectes limosus*, poznat kao i prugasti ili američki rak, je vrsta koja je na područje Europe prvi put unesena 1890-e (Holdich, 2003). Porijeklom je iz Sjeverne Amerike, a unesen je kako bi se nadomjestila domaća populacija rakova uništena zbog širenja račje kuge u 19. stoljeću (Holdich i sur., 2009). U Hrvatskoj joj je prvi put zabilježena 2003. godine na području Parka prirode Kopački rit (Maguire i Gottstein Matočec, 2004). Tamo se proširila iz Mađarske preko rijeke Dunav (Hudina i sur., 2009), a u njoj i njezinim pritocima na krajnjem istoku Hrvatske obitava i danas (Maguire i sur., 2018).

Signalni rak *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) (Slika 2) je iz Amerike u Švedsku unesen 1959. godine. Vrsta se smatrala ekološkim homologom native vrste *A. astacus* čija je populacija bila zahvaćena račjom kugom. Nakon uspješnih istraživanja pušten u mnoge rijeke i jezera u Švedskoj, a kasnije i u druge Europske zemlje (Holdich, 2003). Ovaj rak je u Hrvatskoj prvi put uočen 2008. godine na rijeci Muri (Maguire, 2010). Vrsta se najvjerojatnije proširila vodotokom Mure preko Austrije, u koju je namjerno unesen tijekom sedamdesetih godina prošlog stoljeća (Govedič, 2006). Ovu vrstu i danas možemo naći u rijekama Muri i Dravi (Maguire i sur., 2018).

Najmlađa alohtona vrsta pronađena na području Hrvatske je mramorni rak *Procambarus virginalis* (Lyko, 2017). Rod *Procambarus* neupitno potječe iz Sjeverne Amerike (Faulkes, 2010) dok je porijeklo ove vrste nepoznato (Faulkes, 2010, Scholtz i sur., 2003). Sama vrsta je otkrivena sredinom 1990-ih u Njemačkoj tijekom trgovinske razmjene vodenih vrsta (Scholtz i sur., 2003). Opažen je 2013. godine u jezeru Šoderica (pritok Drave). S obzirom da je najbliža

zabilježena lokacija na kojoj ova vrsta obitava Toskana u središnjoj Italiji smatra se da je u jezero pušten nakon što je nabavljen preko internet trgovine (Samardžić i sur., 2014).



Slika 2. Signalni rak *Pacifastacus leniusculus* (Tarandek, 2021)

2.2.3. Utjecaj invazivnih vrsta

Svjetska raspodjela slatkovodnih rakova se u proteklih nekoliko desetljeća značajno promijenila. To je posljedica rasta i razvoja međunarodne trgovine zbog koje su neke vrste slučajno unesene na novo područje (putem balastnih voda, kopanjem kanala, bijegom iz uzgajališta), no u većem broju slučajeva unos je bio namjeran (uglavnom za potrebe akvakulture i konzumacije) (Gherardi, 2007). Karakteristike unesene vrste i njezine interakcije sa lokalnom zajednicom određuju da li će ona moći stvoriti samoodrživu populaciju i koliko daleko će se ona proširiti. Ako vrsta ostaje relativno lokalizirana oko područja na koje je unesena ne smatramo ju invazivnom, dok su invazivne vrste koje se brzo šire (Kolar i Lodge, 2001). Novija istraživanja u Hrvatskoj pokazuju da se unesene vrste sve više šire i postupno zamjenjuju domaće. Tako je primjerice vrstu *A. leptodactylus* u vodama na istoku Hrvatske gotovo potpuno zamijenila strana vrsta *O. limosus*, dok je istu vrstu u rijeci Korani kompletno zamijenila vrsta *P. leniusculus* (Maguire i sur., 2018).

Neke karakteristike koje čine invazivne vrste uspješnima u širenju su veća plodnost i brzina rasta te bolja prilagodba na promjene u okolišu, zagađenje i uništenje staništa (Gherardi, 2007). Strane vrste rakova pokazuju i veću agresivnost u odnosu na domaće, zbog čega ih istiskuju u kompeticiji za hranu i stanište (Maguire, 2010). Unesene jedinke mogu imati veću stopu

preživljavanja u odnosu na native zato što na novom području nemaju velik broj prirodnih neprijatelja, parazita i patogena (Gherardi, 2007). Kao primjer možemo uzeti već spomenutu račju kugu, na koju su strane vrste uglavnom rezistentne, dok su europske vrste osjetljive i ugibaju u velikom broju (Maguire, 2010). Veća stopa preživljavanja rakovima omogućuje da postignu veću gustoću naseljenosti i/ili veličinu zbog čega jače direktno (konzumacijom) ili indirektno (kompeticijom) utječu na ostali živi svijet (posebno na druge vrste rakova, ribe, mekušce i vodeno bilje). Kratkoročno mogu utjecati na raznolikost i količinu biomase vodenog bilja i većih beskralježnjaka, dok dugoročno izazivaju smanjenje broja beskralježnjaka, vodozemaca, riba i autohtonih rakova (Gherardi, 2007). Potvrđeno je i da invazivne vrste, u odnosu na autohtone, u svom tkivu i organima mogu bioakumulirati veće količine teških metala što predstavlja potencijalnu opasnost za potrošače (Gherardi, 2007).

2.3. MIKROBIOTA PROBAVNOG SUSTAVA SLATKOVODNIH RAKOVA

Nakon mišićnog sustava, najveći volumen tijela rakova zauzima probavni sustav. On je zaslužan za procesiranje hrane i opskrbu tijela metabolitima, pohranu hranjivih tvari i energije, sintezu krvnih proteina te detoksifikaciju. Sastoji se od tri regije: prednjeg, srednjeg i stražnjeg crijeva. Prednje crijevo se nastavlja na usta, a čine ga jednjak i dvodjelni želudac. Zatim slijedi kratko središnje crijevo, koje je povezano sa slijepim crijevom i hepatopankreasom, i nastavlja se na stražnje crijevo s kojim probavni sustav završava. Prednje i stražnje crijevo obavlja kutikula koju rakovi odbacuju prilikom svakog presvlačenja (Gherardi i sur., 2010).

Stražnje crijevo nastanjuje kompleksna mikroflora, sastavljena od velikog broja bakterijskih sojeva, čija koncentracija može iznositi 10^6 - 10^8 bakterija po gramu sadržaja crijeva (Gherardi i sur., 2010). Još uvijek nije potvrđeno da su bakterije u probavnom sustavu deseteronožaca pravi simbionti i da kao kod ljudske mikroflore doprinose dobrobiti domaćina, ili su slučajno unesene sa hranom (Štrus i sur., 2019).

Postoji vrlo mali broj radova koji opisuje probavnu mikrobiotu vrsta *P. leniusculus* i *P. leptodactylus* zbog čega su u obzir uzeti podaci za ostale vrste slatkovodnih rakova.

Hernandez-Perez i sur. (2022) su u probavnom sustavu raka *P. leniusculus* u najvećoj mjeri potvrdili prisutnost rodova *Aeromonas*, *Chryseobacterium*, *Citrobacter*, *Flavobacterium*, *Shewanella* i *Vibrio*. Nije zabilježena prisutnost nijednog roda bakterija mliječne kiseline.

Dragičević i sur. (2021) su utvrdili da u crijevima iste vrste raka prevladavaju bakterije iz koljena *Tenericutes* (76,7 %) i *Proteobacteria* (16,1 %). Na razini porodice dominirale su bakterije iz nepoznate porodice u razredu *Mollicutes* (68,7 %), a u velikoj mjeri zabilježena je i prisutnost porodice *Mycoplasmataceae*, *Enterobacteriaceae* i *Sphingomonadaceae*. Bakterijski rodovi nisu okarakterizirani.

Feng i sur. (2021) su otkrili veću raznolikost bakterijskih zajednica u sedimentu i vodi u odnosu na one u probavnom sustavu *Procambarus clarkii*. Zabilježili su da u probavnom sustavu *P. clarkii* dominiraju bakterije iz šest koljena: *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, i *Verrucomicrobiota*. U skupini zdravih rakova dominantne bakterije su bile roda *Exiguobacterium* i *Lactococcus garvieae* s potencijalnim probiotičkim djelovanjem. Kod oboljelih su dominirali patogeni *Aeromonas veronii* i potencijalno patogeni *C. bacilloplasma* koji su zabilježeni i kod zdravih jedinki, ali u nižim koncentracijama. Navedene bakterije, iako dominantne u probavnom sustavu, nisu pronađene u sedimentu i vodi u značajnim koncentracijama. Iz ovoga je zaključeno da se prisutnost bakterija u okolišu ne reflektira direktno na njihovu prisutnost u probavnom sustavu. Pretpostavlja se i da *P. clarkii* ima mogućnost probiranja bakterija koje će kolonizirati njegov probavni sustav, slično kao i sisavci. Na ovaj način domaćin može izabrati bakterijske sojeve koji bolje doprinose metabolizmu, razvoju imunološkog sustava i održavanju integriteta epitela. Promjene u mogućnosti efektivnog probiranja korisnih sojeva mogu uzrokovati kolonizaciju neželjenih bakterija i razvoj bolesti.

Zhang i sur. (2020) utvrdili su da u probavnom sustavu odraslih jedinki *Procambarus clarkii* dominiraju porodice bakterija *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae* i *Mycoplasmataceae*. Dokazali su i da je udio bakterija iz koljena *Bacteroidetes* veći kod jedinki koje su hranjene fermentiranom hranom. Fermentirana hrana je sadržavala veći udio polisaharida i probiotika (kvasaca i bakterija mliječne kiseline) od standardne hrane zbog čega se smatra da je doprinijela povećanju broja bakterija iz ovog koljena u probavnom sustavu. Pretpostavlja se da ova skupina mikroorganizama može unaprijediti zdravlje domaćina jer poboljšava apsorpciju nutrijenata i funkciju crijevne barijere.

2.4. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su skupina bakterija koju nije moguće opisati jednom uniformom definicijom zbog različitih iznimaka koje postoje. One su najčešće štapičaste ili okrugle gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne, anaerobne, ali aerotolerantne bakterije koje fermentacijom ugljikohidrata daju mliječnu kiselinu kao glavni produkt (Axelsson, 2004). Za rast zahtijevaju različite hranjive tvari (aminokiseline, nukleotide, peptide, vitamine, minerale, masne kiseline, ugljikohidrate) (Khalid, 2011) zbog čega ih nalazimo u namirnicama bogatim sa njima (mlijeko, meso, povrće) i kao dio normalne mikroflore sisavaca (Axelsson, 2004). Neki od najpoznatijih rodova BMK su *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus* i *Weissella* (Wessels i sur., 2004).

S obzirom na produkte dobivene fermentacijom ugljikohidrata možemo ih podijeliti na homofermentativne i heterofermentativne. U standardnim uvjetima, homofermentativnim metabolizmom kao krajnji produkt nastaje gotovo isključivo mliječna kiselina. Heterofermentativnim metabolizmom osim mliječne kiseline nastaje i znatna količina ostalih produkata poput etanola, octene kiseline i ugljikovog dioksida. U grupu heterofermentativnih bakterija mliječne kiseline spadaju vrste iz roda *Leuconostoc*, *Oenococcus* i *Weissella* te jedna podgrupa iz roda *Lactobacillus*, dok su homofermentativne uglavnom vrste iz roda *Lactobacillus*. Rodovi kao što su *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* i *Vagococcus* mogu biti i homo- i heterofermentativni, ovisno o vrsti supstrata, pa ih nazivamo fakultativno heterofermentativnima (Axelsson, 2004).

Bakterije mliječne kiseline su prepoznate kao sigurne (GRAS status) (Cintas i sur., 2001) zbog čega imaju dugu povijest primjene u proizvodnji fermentirane hrane i pića (Hati i sur., 2013). U industriji se primjenjuju kao starter kulture i biokonzervansi jer proizvodi njihovog metabolizma doprinose aromi, teksturi i trajnosti fermentiranih proizvoda. Neki od metabolita koji doprinose teksturi konačnog proizvoda su polisaharidi i ugljikov dioksid, dok na aromu znatno utječu organske kiseline (mliječna, octena), diacetil, etanol i acetaldehid (Hati i sur., 2013). Trajnost i sigurnost proizvoda su najvećim dijelom poboljšani zbog proizvodnje organskih kiselina koje snižavaju pH proizvoda, ali i zbog proizvodnje različitih antimikrobnih supstanci poput vodikova peroksida, CO₂, diacetila, acetaldehida, D-izomera aminokiselina i bakteriocina (Cintas i sur., 2001; Frece i sur., 2016).

Isto tako, ove bakterije mogu direktno ili indirektno doprinijeti zdravlju potrošača zbog svoje probiotičke i prebiotičke funkcije. Probiotici su proizvodi čija je uloga unijeti potencijalno korisne mikroorganizme u probavni sustav ljudi i životinja, dok su prebiotici neprobavljivi sastojci hrane koji služe kao supstrat za fermentaciju kod određenih bakterija (Hati i sur., 2013). Pozitivni učinci probiotičkih pripravaka mogu biti iskazani kroz različite mehanizme djelovanja, a oni uključuju:

- poboljšanje funkcije epitelne barijere
- povećanje adhezije probiotičkih mikroorganizama na sluznicu crijeva
- kompetitivno isključivanje patogenih mikroorganizama
- proizvodnju antimikrobnih metabolita (primjerice bakteriocina)
- stimulaciju imunološkog sustava domaćina (Bermudez-Brito i sur., 2012)

Neki od sojeva BMK mogu doprinijeti produkciji bioaktivnih peptida i vitamina esencijalnih za sisavce (folat, vitamin B12 i vitamin K) te smanjiti koncentracije toksičnih ili antinutritivnih faktora u namirnicama čime također doprinose zdravlju (Hati i sur., 2013; Frece i sur., 2010).

2.4.1. Rod *Streptococcus*

Bakterije roda *Streptococcus* su gram-pozitivne bakterije, sferičnog ili jajolikog oblika, koje formiraju lance i dio su prirodne mikroflore usne šupljine i probavnog sustava. Mnoge vrste mogu biti uzročnici infekcija kod ljudi, a neke od najčešćih su *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. pyogenes* i *S. agalactiae* (Cole i sur., 2008). Jedina vrsta od industrijskog značaja je *S. thermophilus* koja se koristi u proizvodnji jogurta i određenih sireva. (Axelsson, 2004)

2.4.2. Rod *Enterococcus*

Prirodno stanište ovih bakterija je probavni sustav ljudi i životinja (Axelsson, 2004). Nastanjuju i druga staništa, ali kada se pronađu izvan probavnog sustava smatraju se indikatorima fekalne kontaminacije i sanitarne neispravnosti hrane. Vrlo su otporne na visoke temperature i isušivanje pa mogu uzrokovati kvarenje termički obrađene hrane (Devriese i sur., 2006). Ne smatraju se značajnima za prehrambenu industriju (Axelsson, 2004), iako su neke vrste poželjne za razvijanje određenih aroma kod sireva (Devriese i sur., 2006). Neke vrste,

kao što je *E. faecalis*, mogu djelovati kao oportunistički patogeni izvan probavnog sustava (Axelsson, 2004), dok su druge korištene kao probiotici (Devriese i sur., 2006; Axelsson, 2004). Postoji zabrinutost jer su neke bakterije iz ove skupine sklone antibiotskoj rezistenciji i prenošenju informacije za nju putem pokretnih genetičkih elemenata (Axelsson, 2004).

2.4.3. Rod *Lactococcus*

Ovaj rod se sastoji od sedam vrsta (*L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. rafnolactis*, *L. chungangensis* i *L. fujiensis*) (von Wright, 2012). To su mikroaerofilne, gram-pozitivne bakterije jajolikog oblika koje se pojavljuju kao slobodne, u paru ili tvore lance (Samaržija i sur., 2001). Njegovu prisutnost uglavnom povezujemo sa različitim mliječnim proizvodima (Axelsson, 2004), ali možemo ga naći i u raznim biljnim i životinjskim izvorima (Casalta i Montel, 2008). U mliječnoj industriji koristi se samo jedna vrsta, a to je *L. lactis* (Axelsson, 2004).

2.4.4. Rod *Pediococcus*

Bakterije iz roda *Pediococcus* su fakultativno aerobne, gram-pozitivne, okrugle bakterije koje tvore tetrade. Možemo ih naći u fermentiranim biljnim sirovinama, sirovim i prerađenim mesnim proizvodima te probavnom sustavu ljudi i životinja (Holzapfel i sur., 2006). Vrste koje imaju industrijski značaj su *P. acidilactici* i *P. pentosaceus*, a koriste se kao starter kulture u proizvodnji kobasica i silaže. S druge strane, vrste poput *P. damnosus* mogu uzrokovati kvarenja tijekom proizvodnje piva zbog čega su vrlo nepoželjne (Axelsson, 2004).

2.4.5. Rod *Lactobacillus*

Najraznolikiji rod bakterija mliječne kiseline je rod *Lactobacillus* koji broji preko sto vrsta štapićastih bakterija. Možemo ih naći na raznolikim staništima sa bogatim izvorima ugljikohidrata, kao što su sluznice ljudi i životinja, biljni materijal, fermentirana i pokvarena hrana. Laktobacili su vrlo važni u proizvodnji fermentirane hrane, posebno kod mliječnih proizvoda, zbog čega se u industriji koriste kao starter kulture. U velikoj mjeri se koriste i kao probiotički sojevi (Bernardeau i sur., 2008).

2.4.6. Rod *Leuconostoc*

Bakterije roda *Leuconostoc* su gram-pozitivne, katalaza-negativne, fakultativno anaerobne bakterije jajolikog oblika koje obično dolaze u parovima ili lancima. Mogu se naći na biljkama, svježem i vakumiranom mesu, procesiranim i fermentiranim mesnim proizvodima te u probavnom sustavu ljudi (Björkroth i Holzapfel, 2006). Iz citrata u mlijeku tvore značajne količine diacetila zbog čega se neke vrste, poput *L. mesenteroides subsp. cremoris*, ciljano koriste u mliječnoj industriji. Važne su i kao starter kulture u fermentaciji namirnica biljnog porijekla (poput kupusa) jer su česti začetnici mliječne fermentacije. (Axelsson, 2004).

2.4.7. Rod *Oenococcus*

Jedini predstavnik ove skupine je *Oenococcus oeni* kojega možemo pronaći u vinu gdje je zadužen za provođenje malolaktične fermentacije. On je gram-pozitivna, katalaza-negativna, fakultativno anaerobna i jajolika bakterija koja je prilagođena uvjetima rasta u vinu. Zbog toga može rasti kod niskog pH (<3,9) i podnosi značajne koncentracije etanola (10 %) i SO₂. Danas su komercijalno dostupni selekcionirani sojevi ove vrste, a koriste se kao starter kulture za poboljšano provođenje malolaktične fermentacije (Björkroth i Holzapfel, 2006).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Uzorci

U ovom radu korištene su dvije vrste slatkovodnih rakova: signalni rak *Pacifastacus leniusculus* i uskoškari rak *Pontastacus leptodactylus* (Slika 3). Rakovi su ulovljeni u rijeci Korani Li-Ni vršama, i to jedinke vrste *P. leniusculus* na lokaciji Ladvenjak (N45°24'44" E15°36'30"), a jedinke vrste *P. leptodactylus* na lokaciji Ušće (N45°27'54" E15°33'58"). Rakovi su izlovljeni u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Interakcije slatkovodnih patogenih oomiceta i okoliša“ (UIP-2017-05-6267) voditeljice doc.dr.sc. Ane Bielen.



a)



b)

Slika 3. Jedinke rakova a) *Pontastacus leptodactylus* i b) *Pacifastacus leniusculus*
(vlastita fotografija)

3.1.2. Hranjive podloge

Podloge za određivanje ukupnog broja mikroorganizama

- HA (hranjivi agar) sastava: pepton 15 g/l; mesni ekstrakt 3 g/l; NaCl 5 g/l; K₃PO₄ 0,3 g/l; agar 18 g/l; u destiliranoj vodi; pH podloge je 7,3; sterilizacija pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

Podloga za koagulaza-pozitivne stafilokoke

- BPA (Baird Parker agar) sastava: tripton 10 g/l; goveđi ekstrakt 5 g/l; kvašćev ekstrakt 1 g/l; natrijev piruvat 10 g/l; glicin 12 g/l; litijev klorid 5 g/l; agar 15 g/l, sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/15min. Emluzija žumanjka i telurita (50 ml) se dodaje sterilno, nakon hlađenja, neposredno prije izlijevanja u Petrijeve zdjelice.

Podloga za *Enterobacteriaceae*

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

Podloga za sulfito-reducirajuće klostridije

- Sulfitni agar sastava: kazein hidrolizat 10 g/l; natrijev sulfit 0,5 g/l; željezov citrat 0,5 g/l; agar 15 g/l; pH vrijednost podloge je 7,2; sterilizacija je provedena u autoklavu pri 121 °C/ 15min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

Podloga za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline:

- MRS agar (De Man, Rogosa i Sharpe) sastava: pepton 10,0 g/l; goveđi ekstrakt 10,0 g/l; ekstrakt kvasca 5,0 g/l; glukoza 20,0 g/l; dinatrijev hidrogenfosfat 2,0 g/l; natrijev acetat 5,0 g/l; amonijev citrat 2,0 g/l; magnezijev sulfat 0,2 g/l; manganov sulfat 0,05 g/l; agar 15,0 g/l; Tween 80 1,0 g/l; pH vrijednost podloge je 6,5; sterilizacija pri 121 °C/ 15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven u Petrijeve zdjelice.

- MRS bujon- istog sastava kao MRS agar, samo bez dodanog agara. Sterilizacija pri 121 °C/15 min. Sadržaj je dobro promiješan i razliven po 10 ml u epruvete s čepom.

3.1.3. Pribor i oprema

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

3.2. METODE

3.2.1. Izolacija i identifikacija mikroorganizama uzročnika zdravstvene neispravnosti hrane

Izolacija i identifikacija bakterija koje uzrokuju zdravstvenu neispravnost hrane iz uzoraka rakova provedena je primjenom klasičnih mikrobioloških metoda. Po 1 g uzorka probavnog sustava obje vrste rakova je sterilno prenesen u epruvetu s 9 ml fiziološke otopine kako bi se dobilo prvo razrjeđenje iz kojeg su napravljena još četiri razrjeđenja. Nakon homogenizacije, razrjeđenja su nacijepljena na selektivne podloge za određene vrste mikroorganizama navedene u Tablici 1. te razmazana štapićem po Drigalskom. Pokus je proveden u tri paralele, u aerobnim uvjetima. Nakon 48 sati, broj živih mikroorganizama određen je indirektnom metodom.

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

Mikroorganizmi	Metoda	Hranjivi medij	Uvjeti uzgoja (aerobno)
Aerobne mezofilne bakterije	HRN EN ISO 4833-2:2013	Hranjivi agar (Biolife)	37 °C
			24-48 h
<i>Enterobacteriaceae</i>	HRN ISO 21528-2:2017	VRBG (Biolife)	37 °C
			24-48 h
Sulfitoreducirajuće klostridije	ISO 15213:2003	Sulfitni agar (Biolife)	37 °C
			24-48 h
Koagulaza-pozitivni stafilokoki	ISO 6888-1:2021	BP agar (Biolife)	37 °C
			24-48 h

3.2.2. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

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

3.2.3. Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline

Izolacija i identifikacija bakterija mliječne kiseline provedena je klasičnim mikrobiološkim metodama uzgojem na MRS selektivnom agaru. Nakon 48 sati, sitne bijele kolonije su pomoću mikrobiološke ušice precijepljene na svježe selektivne podloge i opet inkubirane 48 sati pri 37 °C. Nakon toga su izolati precijepljeni u 10 ml sterilne tekuće i na kose podloge i inkubirani 48 sati pri 37 °C. Broj živih stanica određen je indirektnom metodom prema poglavlju 3.2.2.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu ispitana je prisutnost bakterija koje uzrokuju zdravstvenu neispravnost hrane, kao i prisutnost bakterija mliječne kiseline kod dvije vrste rakova, autohtone vrste *Pontastacus leptodactylus* i invazivne strane vrste *Pacifastacus leniusculus*, a rezultati su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Mikrobiološka analiza dvije vrste slatkovodnih rakova

Test mikroorganizmi	CFU/g	
	uskoškari rak	signalni rak
	<i>Pontastacus leptodactylus</i>	<i>Pacifastacus leniusculus</i>
Aerobne mezofilne bakterije	2×10^4	$>10^5$
Enterobakterije	$>10^5$	$>10^5$
Sulfitoreducirajuće klostridije	+	+
Koagulaza-pozitivni stafilocoki	4×10^1	8×10^1
Bakterije mliječne kiseline	2×10^1	n.d.

Broj aerobnih mezofilnih bakterija u probavnom sustavu autohtone vrste *P. leptodactylus* je nešto manji (2×10^4 CFU/g) u odnosu na invazivnu vrstu *P. leniusculus* ($>10^5$ CFU/g). Dobivene više koncentracije su i bile za očekivati budući da je probavni sustav prirodni rezervoar mikroorganizama. Rezultati se također podudaraju s prethodnim istraživanjem autora Parlapani i sur. (2019) koji su u uzorcima plavog raka (*Callinectes sapidus*) zabilježili koncentraciju aerobnih mezofilnih bakterija $\sim 10^4$ CFU/g kao i s istraživanjem Anupama i sur. (2018) koji su mikrobiološkom analizom plivajuće vrste raka *Charybdis feriatus* odredili ovu skupinu bakterija u koncentraciji od 4,95 log CFU/g.

Mnoga istraživanja (Hernandez-Perez i sur., 2022; Dragičević i sur., 2021; Zhang i sur., 2020) su zabilježila prisutnost bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* u uzorcima probavnog sustava različitih vrsta rakova. U istraživanju autora Uaboi-Egbenni i sur. (2010) zabilježena je visoka koncentracija vrste *Escherichia coli* u gastrointestinalnom sustavu rakova roda *Callinectes*. Koncentracija kod uzoraka čuvanih na temperaturi od 28 °C i 0 °C iznosila je 5,9 odnosno 3 log CFU/mL, što preračunato na masu crijeva iznosi $7,15 \times 10^6$ i 9×10^3 CFU/g.

Rezultati dobiveni tijekom ovog istraživanja slažu se sa prethodnim no u obzir treba uzeti da *E. coli* vjerojatno nije jedina bakterija iz porodice *Enterobacteriaceae* u probavnom sustavu rakova. Kod obje vrste ispitivanih rakova je koncentracija enterobakterija u probavnom sustavu bila veća od 10^5 CFU/g (Slika 4).



Slika 4. Porasle enterobakterije na ljubičasto crveno žučnom agaru (vlastita fotografija)

Prisutnost roda *Staphylococcus* u probavnom sustavu slatkovodnog raka *P. clarkii* uočena je u istraživanju autora Huang i sur. (2022), dok druga istraživanja spominju prisutnost koljena *Firmicutes* (Hernandez-Perez i sur., 2022; Feng i sur., 2021) što može uključivati i rod *Staphylococcus*. Uaboi-Egbenni i sur. (2010) zabilježili su prisutnost vrste *Staphylococcus aureus* u koncentracijama 4 i 3 log CFU/ml kod različitih temperatura čuvanja uzoraka rakova roda *Callinectes*. Te koncentracije preračunate na masu crijeva rakova iznose 9×10^4 i 9×10^3 CFU/g. U ovom završnom radu zabilježena je prisutnost kagulaza-pozitivnih stafilokoka kod obje vrste rakova. Dobivene koncentracije su nešto niže u odnosu na prethodna istraživanja (4×10^1 CFU/g za *P. leptodactylus* i 8×10^1 CFU/g za *P. leniusculus*).

Prisutnost bakterija iz roda *Clostridium* do sada nije zabilježena u istraživanjima probavne mikrobiote rakova *P. leptodactylus* i *P. leniusculus*, ali je zabilježena kod *P. clarkii* (Feng i sur., 2021; Xie i sur., 2021). U ovom istraživanju je kod obje vrste ovih rakova potvrđena prisutnost bakterija roda *Clostridium* koje reduciraju sulfite (Slika 5).



Slika 5. Uzorak pozitivan (lijevo) i negativan (desno) na sulfito-reducirajuće klostridije (vlastita fotografija)

Bakterije mliječne kiseline (BMK) redoviti su stanovnici probavnog sustava životinja i često se provodi njihova izolacija budući da predstavljaju poželjnu skupinu mikroorganizama koja posjeduje veliki broj pozitivnih svojstava. Lim i sur. (2020) su u svom istraživanju dokazali prisutnost BMK u probavnom sustavu slatkovodnog raka *Cherax quadricarinatus* u koncentraciji od $1,21 \times 10^7$ CFU/g. Iz dobivenih izolata izdvojili su one koji mogu sintetizirati spojeve slične bakteriocinima (gotovo 40 % izolata) te je provedena je njihova identifikacija. Utvrđeno je da se radi o vrstama *Enterococcus faecalis* i *Lactobacillus plantarum*, koje su česti stanovnici probavnog sustava ljudi i životinja (Bernardeau i sur., 2008; Axelsson, 2004). Prisutnost BMK u probavnom sustavu slatkovodnih rakova zabilježili su i drugi autori. Xie i sur. (2021) su kod vrste *P. clarkii* u najvećoj mjeri detektirali BMK iz roda *Lactobacillus* i *Lactococcus*, dok su u manjem postotku bili prisutni rodovi *Enterococcus* i *Streptococcus*. Feng i sur. (2021) su kod iste vrste raka zabilježili prisutnost vrsta *Lactococcus garvieae*, *Carnobacterium funditum* i *Weissella cibaria*. Ovim istraživanjem je u probavnom sustavu autohtone vrste raka *P. leptodactylus* zabilježena prisutnost BMK u koncentraciji od 2×10^1 CFU/g, dok kod vrste *P. leniusculus* BMK nisu pronađene. Sljedeći korak u istraživanju biti će identifikacija BMK na razini roda i vrste kako bi se vidjelo o kojim se sojevima radi.

5. ZAKLJUČCI

1. Zabilježena je prisutnost svih ispitivanih mikroorganizama kod obje vrste raka. Budući da koncentracije prelaze maksimalne dozvoljene pravilnikom, može se zaključiti da ispitivani uzorci rakova nisu zdravstveno ispravni za ljudsku konzumaciju.
2. Nema značajne razlike u mikrobiološkoj slici uskoškarog i signalnog raka.
3. Bakterije mliječne kiseline izolirane su iz uzorka probavnog sustava autohtone vrste raka. Potrebna je dodatna identifikacija kako bi se utvrdila vrsta i rod.

6. POPIS LITERATURE

Anupama TK, Laly SJ, Kumar KNA, Sankar TV, Ninan G (2018) Biochemical and microbiological assessment of crucifix crab (*Charybdis feriatus*) stored at 4 °C. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **27**(4), str. 531-541. <https://doi.org/10.1080/10498850.2018.1449154>

Axelsson L (2004) Lactic acid bacteria: classification and physiology. U: Salminen S, von Wright A., Ouwehand A. (ured.) Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 3. izd., Marcel Drakker, New York, str. 1-67.

Aydin H, Kokko H, Makkonen J, Kortet R, Kukkonen H, Jussila J (2014) The signal crayfish is vulnerable to both the As and the PsI-isolates of the crayfish plague. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **413**:03. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014004>

Balian EV, Segers H, Lévêque C, Martens K (2008) The freshwater animal diversity assessment: an overview of the results. *Hydrobiologia*, **595**, str. 627–637. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-9246-3>

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A (2012) Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, **61**(2), str.160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>

Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Guéguen M (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, **126**(3), str. 278-285. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.015>

Björkroth J, Holzapfel WH (2006) Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. U: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (ured.) The Prokaryotes: Volume 4: *Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 3. izd., Springer, Stanford, str. 267-320.

Casalta E, Montel MC (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, **126**(3), str. 271-273. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013>

Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF, Hernández PE (2001) Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology International*, **7**(4), str. 281-305. <https://doi.org/10.1106/R8DE-P6HU-CLXP-5RYT>

Cole JN, Henningham A, Gillen CM, Ramachandran V, Walker MJ (2008) Human pathogenic streptococcal proteomics and vaccine development. *Proteomics–Clinical Applications*, **2**(3), str. 387-410. <https://doi.org/10.1002/prca.200780048>

Crandall KA, Buhay JE (2007) Global diversity of crayfish (*Astacidae*, *Cambaridae*, and *Parastacidae*—*Decapoda*) in freshwater. U: Balian E.V., Lévêque C., Segers H., Martens K. (ured.) Freshwater animal diversity assessment. *Developments in Hydrobiology*, 198, Springer, Dordrecht, str. 295-301. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8259-7_32

Devriese L, Baele M, Butaye P (2006) The genus *Enterococcus*: Taxonomy. U: Dworkin, M, Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (ured.) *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 3. izd., Springer, Stanford, str. 163-175.

Dragičević P, Bielen A, Petrić I, Vuk M, Žučko J, Hudina S (2021) Microbiome of the successful freshwater invader, the signal crayfish, and its changes along the invasion range. *Microbiology Spectrum*, **9**(2), e00389-21. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00389-21>

Dragičević P, Faller M, Kutleša P, Hudina S (2020) Update on the signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: a 10-year report. *BioInvasions Record*, **9**(4), str. 793-807. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.4.13>

Faulkes Z (2010) The spread of the parthenogenetic marbled crayfish, *Marmorkrebs* (*Procambarus* sp.), in the North American pet trade. *Aquatic Invasions*, **5**(4), str. 447-450. <https://doi.org/10.3391/ai.2010.5.4.16>

Feng Y, Li M, Duan H, Li L, Ouyang P, Chen D, Geng Y, Huang X, Yang S, Yin L, Jiang J, Zhang X (2021) Microbial analysis reveals the potential colonization of pathogens in the intestine of crayfish (*Procambarus clarkii*) in traditional aquaculture environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **224**, 112705. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112705>

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, 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. <https://doi.org/10.17113/ftb.54.02.16.4418>

Gherardi F (2007) Understanding the impact of invasive crayfish. U: Gherardi F (ured.) *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats*. Invading Nature - Springer Series in Invasion Ecology, 2. izd., Springer, Dordrecht, str. 507–542. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6029-8_28

Gherardi F, Souty-Grosset C, Vogt G, Diéguez-Uribeondo J, Crandall K A (2010) Infraorder *Astacidea* Latreille, 1802 pp: the freshwater crayfish. U: Schram F., Klein C.V., Daures M.C., Orest J. (ured.) *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea*, 9. izd, 1. dio, Brill Academic Publisher, Leiden, str. 269-424. https://doi.org/10.1163/9789004187801_011

Govedič M (2006) Potočni raki Slovenije: razširjenost, ekologija, varstvo (Življenje okoli nas). Center za kartografijo favne in flore, Miklavž na Dravskem polju.

Hati S, Mandal S, Prajapati JB (2013) Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science*, **1**(1), str. 83-91. <https://doi.org/10.12944/CRNFSJ.1.1.09>

Helfrich LA, DiStefano RJ (2003) Crayfish biodiversity and conservation. U: LA Helfrich LA, Neves RJ, Parkhurst J (ured.) *Sustaining America's aquatic biodiversity: A teacher's guide*. U.S. Fish & Wildlife Service and Virginia Cooperative Extension Service Publication.

Hernandez-Perez A, Zamora-Briseno JA, Söderhäll K, Söderhäll I (2022) Gut microbiome alterations in the crustacean *Pacifastacus leniusculus* exposed to environmental concentrations of antibiotics and effects on susceptibility to bacteria challenges. *Developmental & Comparative Immunology*, **126**, 104181. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2021.104181>

Holdich DM (2003) Crayfish in Europe—an overview of taxonomy, legislation, distribution, and crayfish plague outbreaks. U. Holdich D. M., Sibley P.J. (ured.) Management & conservation of crayfish, Environment Agency, Bristol, str. 15-34.

Holdich DM, Reynolds JD, Souty-Grosset C, Sibley PJ (2009) A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **394-395**:11. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>

Holzappel WH, Franz CMAP, Ludwig W, Back W, Dicks LMT (2006) The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. U: Dworkin, M, Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (ured.) The Prokaryotes: Volume 4: *Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, 3. izd., Springer, Stanford, str. 229-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.08.013>

Huang X, Li M, Huang Y, Yang H, Geng Y, Ouyang P, Defang C, Lizi Y, Shiyong Y, Jun J, Wei L, Zhi H (2022) Microbiome analysis reveals microecological advantages of emerging ditchless rice-crayfish co-culture mode. *Frontiers in Microbiology*, 13:892026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.892026>

Hudina S, Faller M, Lucić A, Klobučar G, Maguire I (2009) Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava River basin, Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **394-395**:09. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009023>

Keller NS, Pfeiffer M, Roessink I, Schulz R, Schrimpf A (2014) First evidence of crayfish plague agent in populations of the marbled crayfish (*Procambarus fallax formavirginalis*). *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, **414**:15. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014032>

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

Kolar CS, Lodge DM (2001) Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**(4), str. 199-204. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02101-2](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02101-2)

Lim YT, Yong ASK, Lim LS, Al Azad S, Mohd Shah AS, Lal TM (2020) Characterization and identification of bacteriocin-like substances producing lactic acid bacteria from the intestine of

freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus*. *International Journal of Aquatic Science*, **11**(1), str. 52-60.

Maguire I (2010) Slatkovodni rakovi. *Priručnik za inventarizaciju i praćenje stanja, Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb*.

Maguire I, Gottstein-Matočec S (2004) The distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia. *Crustaceana*, **77**(1), str. 25–48. <https://doi.org/10.1163/156854004323037874>

Maguire I, Klobučar G, Žganec K, Jelić M, Lucić A, Hudina S (2018) Recent changes in distribution pattern of freshwater crayfish in Croatia– threats and perspectives. *Knowledge & Management of Aquatic Ecosystems*, **419**:2. <https://doi.org/10.1051/kmae/2017053>

Mochek AD, Pavlov DS (2021) Comparative analysis of fish distribution in lentic and lotic ecosystems (Review). *Inland Water Biology*, **14**, str. 196–204. <https://doi.org/10.1134/S1995082921020103>

Parlapani FF, Michailidou S, Anagnostopoulos DA, Koromilas S, Kios K, Pasentsis K, Psomopoulos F, Argiriou A, Haroutounian SA, Boziaris IS (2019) Bacterial communities and potential spoilage markers of whole blue crab (*Callinectes sapidus*) stored under commercial simulated conditions. *Food microbiology*, **82**, str. 325-333. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.011>

Pravilnik (2013) *Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama*. Narodne novine 144, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_12_144_3086.html Pristupljeno 12. kolovoza 2022.

Samardžić M, Lucić A, Maguire I, Hudina S (2014) The first record of the marbled crayfish (*Procambarus falalx* (Hagen, 1870) f. *virginalis*) in Croatia. *Crayfish News*, **36**(4), str. 4.

Samaržija D, Neven Antunac N, Jasmina Lukač Havranek J (2001) Taxonomy, physiology and growth of *Lactococcus lactis*: a review. *Mljekarstvo*, **51**(1), 35-48.

Scholtz G, Braband A, Tolley L, Reimann A, Mittmann B, Lukhaup C, Steuerwald F, Günter V (2003) Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature*, **421**, str. 806. <https://doi.org/10.1038/421806a>

Štrus J, Žnidaršič N, Mrak P, Bogataj U, Vogt G (2019) Structure, function and development of the digestive system in malacostracan crustaceans and adaptation to different lifestyles. *Cell Tissue Research*, **377**, str. 415–443. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-03056-0>

Tarandek A (2021) Usporedba imunskog odgovora zavičajne i invazivne strane vrste desetonožnih rakova rijeke Korane, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Uaboi-Egbenni PO, Okolie PN, Famuyiwa O, Teniola O (2010) The significance of pathogenic bacteria in the gut of swimming crab, *Callinectes* sp. obtained from Lagos lagoon and market samples stored at freezer temperature (0° C). *Pakistan Journal of Nutrition*, **9**(4), str. 398-403. <https://doi.org/10.3923/pjn.2010.398.403>

von Wright A (2012) Genus *Lactococcus*. U: Lahtinen S, Ouwehand AC, Salminen S, von Wright A (ured.) Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects, 4. izd., CRC Press, Boca Raton, str. 63-77.

Zakon (2013) *Zakon o zaštiti prirode*. Narodne novine 80, Zagreb. https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_80_1658.html Pristupljeno 12. kolovoza 2022.

Zhang Z, Liu J, Jin X, Liu C, Fan C, Guo L, Liang Y, Zheng J, Peng, N. (2020) Developmental, dietary, and geographical impacts on gut microbiota of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Microorganisms*, **8**(9), 1376. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091376>

Xie M, Zhang S, Xu L, Wu Z, Yuan J, Chen X (2021) Comparison of the intestinal microbiota during the different growth stages of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). *Frontiers in Microbiology*, **12**. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.696281>

Wessels S, Axelsson L, Hansen EB, De Vuyst L, Laulund S, Lähteenmäki L, Lindgren S, Mollet B, Salminen S, von Wright A (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends in Food Science & Technology*, **15**(10), str. 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>

Izjava o izvornosti

Ja ANA STRAGA izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ana Straga
Vlastoručni potpis