



STRUČNI RAD

Mikrobiološki i kemijski parametri ribe i školjkaša

Iva Čanak¹, Ksenija Markov¹, Ana Gavrilović², Petra Bosanac¹, Jurica Jug-Dujaković³, Željko Jakopović¹, Deni Kostelac¹, Jelka Pleadin⁴, Jadranka Frece^{1*}¹ Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, Zagreb, Hrvatska² Sveučilište Jurja Dobrile u Puli, Pula, Hrvatska³ Sustainable Aquaculture Systems Inc., 715 Pittstown Road, Frenchtown, NJ 08825, SAD⁴ Hrvatski veterinarski institut Zagreb, Savska cesta 143, Zagreb

* Corresponding author: jfrece@pbf.hr

Sažetak

Rezultati brojnih istraživanja ukazuju na to da ribe i školjkaši posjeduju različitu populaciju bakterija na koži, škrgama te u probavnom traktu. Pored toga, unutarnji organi (bubrezi, jetra i slezena) zdrave ribe mogu također sadržavati bakterije. Stoga je cilj ovog istraživanja bio izolirati i identificirati mikrobnu populaciju lubina (*Dicentrarchus labrax*), dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*) Jadranskog mora tijekom zimskog perioda. Od ukupno 15 uzoraka 5 je uzoraka bilo kontaminirano bakterijama iz roda *Vibrio*, iz 4 uzorka je izolirana *E. coli*, 5 uzoraka su bila pozitivna na sulfitoreducirajuće klostridije dok je *Pseudomonas aeruginosa* dokazan samo u uzorcima dagnji i kamenica. U svim uzorcima lubina su dokazane enterobakterije. U niti jednom uzorku lubina i školjkaša nije dokazana prisutnost bakterija iz roda *Salmonella* kao ni *Listeria monocytogenes*. Bakterije mliječne kiseline su izolirane iz samo jednog uzorka lubina i to rod *Lactobacillus*. Fizikalno-kemijska analiza mesa ribe pokazala je da meso ima zadovoljavajući pH, histamin nije detektiran, odnosno koncentracija je bila ispod granice detekcije dok je koncentracija trimetilamina iznosila niskih $0,801 \pm 0,58$ mgN/100 g mesa.

Ključne riječi: akvakultura, mikrobnu populacija, školjke, lubin

Abstract

The results of numerous studies indicate that fish and shellfish have a different population of bacteria on the skin, gills and digestive tract. In addition, the internal organs (kidneys, liver and spleen) of healthy fish may also contain bacteria. Therefore, the aim of this study was to isolate and identify microbial population of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), mussels (*Mytilus galloprovincialis*) and oysters (*Ostrea edulis*) from the Adriatic Sea during the winter period. Out of a total of 15 samples 5 samples were contaminated with bacteria of the genus *Vibrio*, *E. coli* was isolated from 4 samples, 5 samples were positive for sulphite reducing clostridia while *Pseudomonas aeruginosa* was present only in samples of mussels and oysters. In all the samples of sea bass enterobacteria were found. Bacteria from the genus *Salmonella* as well as *Listeria monocytogenes* were not detected in any of samples of sea bass and shellfish.. Lactic acid bacteria, genus *Lactobacillus*, were isolated from only one sample of sea bass. Physico-chemical analysis of fish showed that the meat had a satisfactory pH, histamine was not detected, ie the concentration was below the detection limit while the concentration of trimethylamine was low $0.801 \pm 0,58$ mg / 100 g of meat.

Key words: aquaculture, microbial population, shellfish, sea bass

Uvod

Raznolikost bakterija u morskim vrstama riba i školjaka općenito varira ovisno o okolišnim i biološkim čimbenicima. Neke ribe su sklonije kontaminaciji što ovisi o vrsti, načinu hranjenja, dobi, veličini, godišnjem dobu, karakteristikama staništa i zemljopisnom položaju (Novotny et al., 2004). Stoga bi se studije o bakterijskoj raznolikost riba i školjaka trebale provoditi na većoj prostornoj razini, uzimajući u obzir i osjetljivosti na kontaminacije. Patogene bakterije u morske plodove mogu doći iz autohtone mikrobiote morskog okoliša ili kontaminacijom tijekom obrade. Brza i točna identifikacija bakterija bitna je za učinkoviti program kontrole kako bi se osigurala sigurnost i kvaliteta prerađenih ili minimalno obrađenih plodova mora (Böhme i sur., 2011). Općenito, patogene vrste prisutne su u niskim koncentracijama u svježim plodovima mora, a bakterije koje uzrokuju kvarenje prerastu one patogene, pa time i proizvodi akvakulture prije postaju pokvareni nego tok-

sični (Feldhusen, 2000). Međutim, kod morskih plodova koji dolaze iz toplih, priobalnih voda, konzumiranje sirovih proizvoda i školjaka podrazumijeva zdravstveni rizik zbog prisutnosti toksikogene bakterije *Vibrio* spp. (Lhafi i Kühne, 2007; Eja i sur., 2008). Autohtona mikrobiota svježih plodova mora sadrži uglavnom psihotrofe, gram-negativne bakterije, kao što su *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. i *Shewanella* spp. (Gram i Dalgaard, 2002). Rast normalne psihotrofne mikrobiote inhibira se blagim konzerviranjem i / ili skladištenjem pod anaerobnim uvjetima, što s druge strane pogoduje rastu *P. phosphoreum* i gram-pozitivnih bakterija (Gram i Huss, 1996; Paludan-Müller i sur., 1998). Nadalje, onečišćenje morskog okoliša uslijed djelovanja ljudi i / ili životinja može dovesti do prisutnosti bakterija porodice *Enterobacteriaceae* (Ward, 2001), uključujući ljudske patogene, kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. i *Shigella* spp. koji mogu uzrokovati ozbiljne alimentarne intoksikacije kod ljudi. Očigledno je da su ribe i školjkaši kontinuirano izloženi mikroorganizmima pri-



sutnim u vodi i sedimentu, uključujući i onečišćenja iz otpadnih voda (El-Shafai i sur., 2004). Ovi organizmi nesumnjivo utječu na mikrofloru vanjskih površina, uključujući i škrge, dok kroz probavni trakt prolazi voda i hrana naseljena mikroorganizmima. Kolonizacija mikroorganizmima može započeti u ikri i / ili larvalnoj fazi, te se nastavlja s razvojem ribe (Olafsen, 2001). Dakle, koncentracija i raznolikost mikroorganizama prisutnih u ikri, na hrani i u vodi koja se koristi u ishrani riba i školjakaša, utjecat će na mikrofloru morskih plodova u razvoju. Osim mikroflora, i kemijski sastav ribe varira ovisno o prehrani ribe, starosti, spolu, uvjetima okoliša i godišnjem dobu (Bojanić i sur., 2009). Nakon uginuća ribe dolazi do složenih kemijskih i biokemijskih procesa koji dovode do sinteze trimetilamina (TMA-N) koji daje veoma karakterističan „riblji“ miris te autolize proteina do peptida niske molekulske mase i slobodnih aminokiselina koje dalje sudjeluju u sintezi biogenih amina (histidina) (Aksnes i Brekken, 1988). Nadalje, postmortalni pad pH dovodi do denaturacije proteina i smanjenja njihove sposobnosti za vezanje vode što izrazito negativno djeluje na teksturu mesa i dovodi do raspadanja (Bojanić i sur., 2009). Stoga je cilj ovog rada bio prema direktivi europske komisije odrediti mikrobiološku ispravnost lubina (*Dicentrarchus labrax*) te dagnji (*Mytilus galloprovincialis*) i kamenica (*Ostrea edulis*) iz Jadranskog mora tijekom zimskog perioda i odrediti kemijski sastav lubina nakon izlova.

Materijali i metode

Uzorci

Uzorci lubina (n=5) mase 400-600 g (*Dicentrarchus labrax*) nabavljeni su iz ribogojilišta „Riba Mljet“, dok su uzorci kamenica i dagnji po 5 jedinki od svake vrste nabavljene na uzgajalištu školjakaša smještenom u unutrašnjem dijelu uvale

Bistrina u Malostonskom zaljevu. Neposredno nakon izlovljavanja, uzorci su pakirani u kutije i u prijenosnim hladnjacima na +4°C prebačeni u Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica, Prehrambeno-biotehnoškog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje su odmah analizirani.

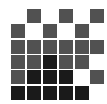
Određivanje mikrobioloških parametara

Za izolaciju i identifikaciju bakterija iz uzoraka lubina i školjakaša upotrijebljene su klasične mikrobiološke metode (ISO postupci) (tablica 1), a analizirani su sljedeći parametri: aerobne mezofilne bakterije (AMB), (*Enterobacteriaceae* (E), *Escherichia coli* (E.c.), *Listeria monocytogenes* (L.m.), sulfitoreducirajuće klostridije (SRK), *Salmonella* sp. (S), *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.), *Vibrio* sp. (V), te bakterije mliječne kiseline (BMK) (NN 125/03; Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu 2009; EC, 2073/2005). Za mikrobiološke analize ribe sterilnim nožem u aseptičnim uvjetima uzeti su uzorci sluzi sa površine kože, škrge kao i sadržaj želuca nakon otvaranja peritonealne šupljine. Školjakašima se ljuštura prvo oprala na način da se premazala alkoholom, a zatim se sterilizirala plamenom. Sterilnim nožem otvorile su se ljuštore školjakaša i pažljivo se odvojila mađuljuštura tekućina i tkivo. Uzorci korišteni u mikrobiološkim analizama prikazani su u tablici 2. Homogenizacijom uzoraka u Stomacher Lab Blenderu (Labox 33, Metal, Zagreb, Hrvatska) uz dodatak 180 mL fiziološke otopine dobiveno je osnovno razrijeđenje iz kojega su načinjena sva potrebna razrijeđenja. Po 0,1 mL određenog razrijeđenja razmazano je štapićem po Drigalskom na selektivne podloge i stavljeno na inkubaciju (tablica 1). Pokusi su provedeni u trostrukom pokusu, u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Identifikacija bakterija na razini vrste potvrđena je API biokemijskim testovima (bioMérieux, Francuska). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ±S.D.

Tablica 1. Klasične mikrobiološke i biokemijske metode za izolaciju i identifikaciju mikroorganizama

Table 1. Classical microbiological and biochemical methods for isolation and identification of microorganisms

Mikroorganizmi/ microorganisms	Metoda/ method	Hranjivi medij/ nutrient media	Uvjeti uzgoja (aerobno i anaerobno) /Growth conditions (aerobically, anaerobi- cally)	API test
Aerobne mezofilne bakterije	HRN EN ISO 4833- 2:2013	Hranjivi agar (Biolife)	37 °C 24-48 h	-
Enterobacteriaceae	HRN ISO 21528-2:2017.	VRB (Biolife)	37 °C 24-48 h	API 20E
Escherichia coli	ISO 16649-2:2001	RAPID E. coli (Biolife)	37 °C 24-48 h	API 20E
Listeria monocytogenes	ISO 11290-1:2017	Fraser, Palcam (Biolife)	37 °C 48-72 h	API Listeria VI.2
Sulfitoreducirajući klostridiji/Sulphite reducing clostridia	HRN EN ISO 26461- 2:2008	Sulfitni agar, (Biolife)	37 °C 24-48 h	-



Pseudomonas aeruginosa	NF EN ISO 6887, 2004	PSA agar (Biolife)	37 °C	API 20 NE
			48–72 h	
Salmonella sp.	ISO 6579-1:2017	RP-bujon, XLD (Biolife)	37 °C	API 20 E V4.1
			24 - 48 h	
Vibrio sp.	ISO 21872-1:2017	TCBS agar (Biolife)	37 °C	API 20E
			48–72 h	
Bakterije mliječne kiseline/Lactic acid bacteria	ISO 13721:1995	MRS agar (Biolife)	30 °C	API 50 CHL V5.1
			24-48 h	

Fizikalno-kemijska analiza ribe

Mišićni pH ribe je izmjeren umetanjem IFSET sonde od nehrđajućeg čelika, PH57-SS pH metar HACH LANGE H160NP u epaksijalni mišić na lijevoj strani ribe, po sredini dorzalne peraje. Histamin je ekstrahiran i analiziran spektrofotometrijski prema Patange i sur. (2005). Za pripravak ekstrakta, 5 g ribljeg mišića je uzeto iz dorzalnog dijela ribe i homogenizirano s 20 mL 0,85% fiziološke otopine 2 minute pomoću miješalice (Gilson Inc., Middleton, SAD) i centrifugirano 10 minuta na 12000×g, pri 4°C (Hermle GmbH & Co., Gosheim, Njemačka). Mišićni ekstrakt je odmah korišten za daljnju analizu. Za određivanje koncentracije trimetilamina (TMA-N) 10 g ribljeg mišića homogenizirano je u 100 mL trikloroctene kiseline (TCA) koncentracije 60g/L i filtrirano kroz Whatman No.1 filter papir u odmjernu tikvicu, od kojih je 10 mL korišteno za spektrofotometrijsko određivanje TMA-N pomoću pikrinske kiseline, prema Dyer (1945). Spektrofotometrijsko određivanje histamina (LOD 1 mg/100 g) i TMA-N (LOD 6×10^{-4} mg/100 g), provedeno je na SECOMAM Uvi Light PC 2 (Nova Analytics, Ales, Francuska). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm S.D.

Rezultati i rasprava

Cilj ovog rada bio je odrediti mikrobnu populaciju svježih ribe i školjkaša (dagnje i kamenice) te kemijska svojstva lubina neposredno nakon izlova iz Jadranskog mora. Od svake vrste za analize je korišteno 5 komada, iz kojih su se izolirali različiti organi i sadržaji koji su podvrgnuti daljnjoj mikrobiološkoj analizi (tablica 2). Od ukupno 15 analiziranih uzoraka klasičnim mikrobiološkim metodama izolacijom na selektivnim podlogama, 5 uzoraka (1 uzorak lubina, 2 uzorka kamenica i 2 uzorka dagnji) bilo je kontaminirano bakterijama iz roda *Vibrio*, u svih 5 uzoraka lubina su dokazane enterobakterije dok je iz 2 uzorka kamenica i 2 uzorka dagnji izolirana *E. coli*. *Listeria* vrste su dokazane na uzorku kamenica i dagnji, sulfireducirajući klostridiji su pronađeni i u ribi i školjkašima, *P. aeruginosa* dokazana je samo u uzorcima dagnji i kamenica dok bakterije iz roda *Salmonella* nisu dokazane u nijednom ispitivanom uzorku (tablice 3, 4 i 5). Iz rezultata je vidljivo da je u uzorcima i ribe i školjkaša dokazana prisutnost bakterija iz roda *Vibrio*. U uzorku crijeva i želuca lubina te njihovog sadržaja dokazan je *Vibrio cholerae*, a *Vibrio parahaemolyticus* je izoliran iz uzoraka škrge te probavne žlijezde i želuca dagnji i kamenica. Prisutnost bakterija roda *Vibrio* je bila i očekiva-

na budući da se u vrijeme zimskih mjeseci začahure u crijevima te jetri. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima Ripabelli i sur. (1999) koji su na dagnjama iz Jadranskog mora dokazali patogene vrste iz roda *Vibrio* od kojih su najveći postotak obuhvaćale *V. alginolyticus* (32,2%), *V. vulnificus* (17,7%), *V. cincinnatiensis* (3,2%), *V. parahaemolyticus* (1,6%), *V. fluvialis* (1,6%) i *V. cholerae* (1,6%) koje su potencijalni uzročnici bolesti kod ljudi ako dagnje nisu pravilno termički obrađene. Vezzulli i sur., 2017, su također potvrdili kako su bakterije roda *Vibrio* dominirale u bakterijskoj populaciji izoliranoj iz probavne žlijezde mediteranske dagnje (28%) i pacifičke kamenice (36%). *Escherichia coli* bila je prisutna u uzorcima dagnji i kamenica (tablice 4 i 5), što se podudara s rezultatima Rees i sur., 2015, koji su također izolirali ovu bakteriju iz dagnji i kamenica Atlantskog oceana u blizini Kanade. Kontaminacija ovom bakterijom najčešće je uočena kod školjkaša koji se uzgajaju u neposrednoj blizini kanalizacijskih ispusta. U ovom istraživanju, u uzorcima lubina određen je broj enterobakterija $< 10^2$ CFU/g (tablica 3). Riblji proizvodi mogu se lako kontaminirati bakterijom *L. monocytogenes* tijekom proizvodnje. Sirova riba predstavlja glavni izvor onečišćenja opreme ovom bakterijom u objektima koje će dovesti do kontaminacije proizvoda (Miettinen i Wirtanen, 2005). Vađenjem utrobe i čišćenjem ribe prije prodaje može doći do širenja *L. monocytogenes* u proizvodnom pogonu što će u konačnici dovesti do unakrsne kontaminacije ribe, opreme, zaposlenika i okoliša općenito (Papadopoulos i sur., 2010). Uzorci probavne žlijezde i želuca dagnji i kamenica bili su prividno pozitivni na bakterije roda *Listeria* na Palcam agaru (tablica 4 i 5). Identifikacija *L. monocytogenes* uključivala je i API *Listeria* test kojim ipak nije potvrđena ni u jednom uzorku, ali je dokazana nepatogena *L. ivanovii*. Svi uzorci lubina su bili negativni na prisutnost *L. monocytogenes*. Relativno širok raspon rodova povezan je s probavnim traktom odraslih slatkododnih i morskih riba te osim vrsta *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Serratia*, *Aeromonas* uključuje i bakterije roda *Clostridium* (Austin, 2006). Naši rezultati su pokazali prisutnost sulfireducirajućih klostridija u crijevima i želucu lubina (10^1 CFU/g), odnosno probavnoj žlijezdi i želucu dagnji (10^2 CFU/g) i kamenica (10^2 - 10^3 CFU/g) (tablice 3, 4 i 5). *Pseudomonas* spp. nalazi se u normalnoj mikrobnjoj flori i slatkododne i slane ribe (Leamaster i sur., 1997). *P. aeruginosa* je poznati uzročnik bolesti škrge te su takve slučajeve kod kalifornijske pastrve zabilježili i Ayaz (2006) te Kayis i sur. (2009). Prisutnost bakterija iz rodova *Pseudomonas* i *Vibrio* dokazali su i Bojanić i sur. (2009) u svojim istraživanjima o kvaliteti mesa



lubina na uzorcima škrga, crijeva te sluzi sa kože. Slični ovim rezultatima su i naši rezultati koji su ukazali na prisutnost *P. aeruginosa* u uzorcima škrga, želuca i probavne žlijezde dagnji i kamenica u koncentraciji od 10^2 - 10^3 CFU/g. Iako je u uzorcima škrga te probavne žlijezde i želuca kamenica promijenjena boje Rappaport-Vassiliadis bujona upućivala na moguće prisustvo *Salmonella* sp., izolacijom na selektivnoj podlozi ova bakterija nije dokazana. Uzorci lubina i dagnji su također bili negativni na prisutnost ove bakterije. S druge strane, Lee i sur. (2010) su potvrdili prisutnost *Salmonella* spp. u uzorcima mesa azijskog lubina. Međutim, populacija bakterija u uzorku je još uvijek bila unutar dopuštene granice za ljudsku potrošnju (10^6 CFU/g). Sve dok se poštuje higijenska procedura tijekom pripreme hrane, rizik prijenosa *Salmonella* spp. preko ribljih proizvoda je minimalan. Od bakterija mliječne kiseline (BMK) u ovom istraživanju izolirana je samo jedna vrsta, *Lactobacillus delbrueckii*, iz sadržaja želuca lubina u koncentraciji 10^2 CFU/g. Mikrobiološka slika riba i školjkaša naročito ovisi o vanjskom okolišu, tj. godišnjem dobu i temperaturi vode. Obzirom da je tijekom zimskog perioda more hladnije te je manja raznolikost mikroflora, manja je i mogućnost pronalaska BMK u uzorcima uzetim u tom periodu. S druge strane, tijekom ljetnog perioda, more je toplije i samim time bogatije raznolikom mikroflorom (Mayhew, 2008.). Ukupni broj mikroorganizama je varirao između 10^2 i 10^3 CFU/g za svježiju ribu i školjkaše. Mikroorganizmi se mogu naći na vanjskoj površini (koža i škrge) i u crijevima žive neposredno ulovljene ribe. Ukupan broj značajno varira od 10^2 - 10^7 CFU/cm² kože i 10^3 - 10^9 CFU/g škrga i crijeva (Bojanić i sur., 2009). Dobivene vrijednosti ovog istraživanja su slične vrijednostima Papadopoulos i sur. (2003). čiji je početni ukupni broj bakterija lubina iznosio 10^4 CFU/g što je indikator dobre kvalitete ribljeg mesa uzimajući u obzir maksimalnu dozvoljenu koncentraciju od 5×10^5 CFU/g za cijelu svježiju ribu (ICMSF, 1986).

Fizikalno-kemijskom analizom ribe ispitana je koncentracija histamina, trimetilamina (TMA-N) i pH u mesu ribe (tablica 6). Metodom prema Pantage i sur. (2005) određena količina histamina u mesu lubina je bila ispod granice detekcije odnosno manje od 1 mg/100 g mesa. Slične rezultate su dobili i Paleologos i sur. (2004) koji u mesu svježeg lubina pohranjenom na ledu također nisu detektirali histamin, kao i Koutsoumanis i sur. (1999) koji su utvrdili odsutnost histamina pri aerobnom skladištenju orade na 0°C, 8°C i 15°C tijekom 14 dana. Odsutnost histamina se i očekuje u supstratima poput svježeg lubina gdje postoji malo ili nimalo slobodnog histidina. Prisutnost histamina veća je u filetiranim uzorcima lubina što može biti povezano sa specifičnom bakterijskom mikroflorom koja je posljedica unakrsne kontaminacije ribe tijekom postupka odstranjivanja utrobe i filetiranja. TMA-N se dobiva razgradnjom trimetilamin oksida (TMAO) usred bakterijskog kvarenja i enzimske aktivnosti čime ovaj spoj postaje važan kao indikator svježine lubina (Bojanić i sur., 2009). U ovom radu određena vrijednost TMA-N svježeg lubina iznosila je $0,801 \pm 0,58$ mg/100 g mesa. U prvom danu mjerenja, 0 mgN/100g mesa lubina su zabilježili Papadopoulos i sur. (2003) dok je vrijednost ovog spoja u lubinu skladištenom na ledu u prvom danu iznosila 0,273 mgN/100g mesa (Cakli i sur., 2007). Niska razina TMA-N u svježem lubinu može biti povezana i sa sastavom mikrobne flore i pH vrijednostima tijekom procesa (Bojanić i sur., 2009). Pokazalo se da je optimalni pH

za aktivnost bakterijskih TMAO-redukcijskih enzima 7,2-7,4 (Castell i Snow, 1949; Eliot, 1952), pa se očekuje da će bakterije koje proizvode TMA-N postati aktivnije kroz duže vrijeme skladištenja ribe. pH svježeg mesa lubina u ovom istraživanju iznosio je $6,9 \pm 0,64$. Periago i sur. (2005) su zabilježili kako je pH lubina iz uzgoja bio nešto manji (6,44) u odnosu na divljeg lubina (6,75). Slično tome, Ofstad i sur. (1996) opazili su da bakalar iz uzgoja ima niži pH od divljeg bakalara. Papadopoulos i sur. (2003) su izmjerili pH vrijednost 7,33 a Cakli i sur. (2007) 6,81 u svježem lubinu iz uzgoja skladištenom na ledu. Nadalje, Parisi i sur. (2002) su utvrdili u svojim istraživanjima da prosječni pH mesa ribe iznosi 6,52 odnosno 6,29 za meso ribe ubijene hipotermijom što je u skladu s rezultatima ovog rada.

Zaključak

Na osnovu dobivenih rezultata može se zaključiti kako je svježiji lubin bio dobre kvalitete, dok su dagnje i kamenice pokazale lošiju mikrobiološku sliku što možemo objasniti mogućom kontaminacijom otpadnim vodama u blizini uzgajališta. Mikrobiološka analiza lubina te dagnji i kamenica iz Jadranskog mora tijekom zimskog perioda ukazala je na prisutnost određenih vrsta patogenih mikroorganizama. Bakterije iz roda *Vibrio*, enterobakterije te sulfitoreducirajući klostridiji izolirani su iz sadržaja crijeva i želuca lubina dok su iz školjkaša izolirani rodovi *Vibrio*, *Escherichia*, *Listeria*, *Pseudomonas* i sulfitoreducirajući klostridiji. *Salmonella* sp. i *Listeria monocytogenes* nisu pronađene u niti jednom od uzoraka. pH mesa lubina te koncentracija histamina i TMA-N su bile u zakonski dopuštenim granicama.

**Tablica 2.** *Uzorci korišteni u eksperimentima***Table 2.** *Samples used in experiments*

lubin/sea bass	sluz s površine tijela/ mucus from the body surface
	škrge/gills
	želudac, crijeva i sluz/ stomach, intestines and mucus
	sadržaj želuca/gut content
dagnje/mussels	međuljuštarna tekućina i sluz/ intravalvular liquid and mucus
	škrge/gills
	želudac i probavna žlijezda/ stomach and digestive gland
kamenice/oysters	međuljuštarna tekućina i sluz/ intravalvular liquid and mucus
	škrge/gills
	želudac i probavna žlijezda/ stomach and digestive gland

Tablica 3. *Mikrobiološka analiza uzoraka lubina***Table 3.** *Microbiological analysis of sea bass*

bakterije/ bacteria	CFU/g							Bakterije mliječne kiseline/lactic acid bacteria
	L. monocytogenes	Salmonella sp.	Enterobacteriaceae	Sulfitoreducirajući klostridiji/sulphite reducing clostridia	Vibrio sp.	Aerobne mezofilne bakterije/aerobic mesophilic bacteria	P. aeruginosa	
uzorci/ samples								
1	nd	nd	8,7 ±0,67×10 ¹	nd	2,7±0,70×10 ¹	2,7 ±0,84×10 ³	nd	nd
2	nd	nd	7,5 ±0,70×10 ¹	1,2±0,50×10 ¹	nd	4,2±0,8×10 ²	nd	9,0±0,65×10 ²
3	nd	nd	9,2 ±0,63×10 ¹	nd	nd	1,5 ±0,65×10 ³	nd	nd
4	nd	nd	8,8 ±0,6×10 ¹	nd	nd	2,2 ±0,74×10 ³	nd	nd
5	nd	nd	6,9 ±0,67×10 ¹	nd	nd	3,8 ±0,68×10 ³	nd	nd

nd- nije dokazano/not detected



Tablica 4. Mikrobiološka analiza uzoraka dagnji

Table 4. Microbiological analysis of mussels

bakterije/ bacteria	CFU/g							Bakterije mliječ- ne kiseline/lactic acid bacteria
	uzorci/ samples	<i>L. monocyto- genes</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i> (/100 g mesa) (/100 g meat)	Sulfitoreducirajući klostridiji/sulphite reducing clostridia	<i>Vibrio</i> sp.	Aerobne mezo- filne bakterije/ aerobic meso- philic bacteria	
1	nd	nd	nd	nd	nd	2,6 ±0,80×10 ³	3,6± 0,69×10 ²	nd
2	nd	nd	2,5 ±0,63×10 ²	1,6±0,70×10 ²	4,2 ±0,47×10 ¹	3 ±0,88×10 ²	4,4± 0,80×10 ²	nd
3	nd	nd	1,9 ±0,55×10 ²	2,3±0,66×10 ²	3,6 ±0,6×10 ¹	2,7 ±0,75×10 ³	2,4± 0,78×10 ³	nd
4	nd	nd	nd	nd	nd	3,3 ±0,69×10 ³	4,8± 0,73×10 ²	nd
5	nd	nd	nd	nd	nd	3,1 ±0,83×10 ³	4,1± 0,66×10 ³	nd

nd-nije dokazano/not detected

Tablica 5. Mikrobiološka analiza kamenica

Table 5. Microbiological analysis of oysters

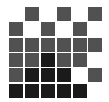
bakterije/ bacteria	CFU/g							Bakterije mliječ- ne kiseline/lactic acid bacteria
	uzorci/ samples	<i>L. monocyto- genes</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>E. coli</i> (/100 g mesa) (/100 g meat)	Sulfitoreducirajući klostridiji/Sulphite reducing bacteria	<i>Vibrio</i> sp.	Aerobne mezo- filne bakterije/ Aerobic meso- philic bacteria	
1	nd	nd	2,1 ±0,71×10 ²	2,3±0,70×10 ²	1,9 ±0,67×10 ²	3,5± 0,86×10 ³	2,6± 0,81×10 ³	nd
2	nd	nd	nd	nd	nd	2,9± 0,9×10 ³	4,2± 0,79×10 ²	nd
3	nd	nd	nd	4,1±0,59×10 ³	nd	3,1± 0,83×10 ³	5,4± 0,74×10 ³	nd
4	nd	nd	nd	nd	2,3 ±0,55×10 ²	3,8± 0,79×10 ²	3,7± 0,66×10 ²	nd
5	nd	nd	3,5 ±0,63×10 ²	nd	nd	3,5± 0,88×10 ³	4,5± 0,72×10 ³	nd

nd-nije dokazano/not detected

Tablica 6. Fizikalno-kemijska analiza ribe

Table 6. Physico-chemical analysis of fish

Histamin/Histamine	Trimetilamin (mg/100 g mesa) / Trimethylamine (mg/100 g meat) (TMA-N)	pH
<1 mg/100 g mesa	0,801±0,58	6,9±0,64



Literatura

- Aksnes A., Brekken, B. (1988) Tissue degradation, amino acid liberation and bacterial decomposition of bulk stored capelin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45(1), 53-60.
- Austin B. (2006) The bacterial microflora of fish, revised. *The Scientific World Journal*, 6, 931-945.
- Ayaz A. (2006) Dominant aerobic bacterial intestinal flora of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L. 1758) larvae in culture conditions. Magistarski rad. Istanbul: Sveučilište u Istanbulu.
- Böhme K., Fernández-No I.C., Gallardo J.M., Cañas B., Calo-Mata P. (2011) Safety assessment of fresh and processed seafood products by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 907-918.
- Bojanić K., Kozačinski L., Filipović I., Cvrtila Ž., Zdolec N., Njari B. (2009) Kvaliteta lubina tijekom pohrane na ledu. *Meso*, XI, 44-48.
- Cakli S., Kilinc B., Cadun A., Dincer T., Tolasa S. (2007) Quality differences of whole ungutted sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) while stored in ice. *Food Control*, 18(5), 391-397.
- Castell C.H., Snow J.M. (1949) The effect of pH on the enzymatic reduction of trimethylamine oxide. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 7, 561-562.
- Dyer W. J. (1945) Amines in fish muscle: I. Colorimetric determination of trimethylamine as the picrate salt. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. 6(5), 351-358.
- Eja M., Aribra C., Etok C., Ikpeme E., Arikpo G., Enyido K., Ofor U.A. (2008) Seasonal occurrence of vibrios in water and shellfish obtained from the Great Kwa River Estuary, Calabar, Nigeria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81(3), 245-248.
- El-Shafai S.A., Gijzen H.J., Nasr F.A., El-Gohary F.A. (2004) Microbial quality of tilapia reared in fecal contaminated ponds. *Environmental Research*. 95, 231-238.
- European Commission, 2005. COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of European Union* L 338/1.
- Feldhusen F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2(13), 1651-1660.
- Gram L., Huss H.H. (1996) Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121-137.
- Gram L., Dalgaard P. (2002) Fish spoilage bacteria—Problems and solutions. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 262-266.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 1986. Sampling plans for fish and shellfish. U: ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications, 2nd Edition, Vol. 2. University of Toronto Press, Toronto, Canada, str. 181-196.
- Kayis S., Capkin E., Fikri B., Altinok I. (2009) Bacteria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in the Southern Black Sea Region of Turkey - a survey. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*. 61 (4), 339- 344.
- Koutsoumanis K., Lampropoulou K., Nychas G.J.E. (1999) Biogenic amines and sensory changes associated with the microbial flora of Mediterranean gilt-head sea bream (*Sparus aurata*) stored aerobically at 0, 8, and 15 C. *Journal of Food Protection*, 62(4), 398-402.
- LeaMaster B.R., Walsh W.A., Brock J.A., Fujioka R.S. (1997) Cold stress-induced changes in the aerobic heterotrophic gastrointestinal tract bacterial flora of red hybrid tilapia. *Journal of Fish Biology*, 50(4), 770-780.
- Lee S. W., Najiah M., Wendy W. (2010) Bacterial flora from a healthy freshwater Asian sea bass (*Lates calcarifer*) fingerling hatchery with emphasis on their antimicrobial and heavy metal resistance pattern. *Veterinarski Arhiv*, 80(3), 411-420.
- Lhafi S.K., Kühne M. (2007) Occurrence of *Vibrio* spp. in blue mussels (*Mytilus edulis*) from the German Wadden Sea. *International Journal of Food Microbiology*, 116(2), 297-300.
- Mayhew P. J., Jenkins G.B., Benton T. G. (2008) A long-term association between global temperature and biodiversity, origination and extinction in the fossil record. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 275(1630), 47-53.
- Miettinen H., Wirtanen G. (2005) Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *International Journal of Food Microbiology*, 104, 135-143.
- Novotny L., Dvorska L., Lorencova A., Beran V., Pavlik I. (2004) Fish: a potential source of bacterial pathogens for human beings. A review. *Veterinarni Medicina-UZPI*, 49, 343-358.
- Ofstad R., Egelanddal B., Kidman S., Myklebust R., Olsen R.L., Hermansson A.M. (1996) Liquid loss as affected by post mortem ultrastructural changes in fish muscle: cod (*Gadus morhua*, L.) and salmon (*Salmo salar*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 71, 301 - 312.
- Olafsen J.A. (2001) Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223-247.
- Paludan-Müller C., Dalgaard P., Huss H.H., Gram L. (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5 °C. *International Journal of Food Microbiology*, 39 (3), 155-166.
- Paleologos E.K., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2004) Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food microbiology*, 21(5), 549-557.
- Papadopoulos V., Chouliara I., Badeka A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G. (2003) Effect of gutting on microbiological, chemical, and sensory properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*, 20(4), 411-420.
- Papadopoulos T., A. Abraham D. Sergelidis I. Kirkoudis K. Bitchava (2010) Prevalence of *Listeria* spp. in freshwater fish (*Oncorhynchus mykiss* and *Carassius gibelio*) and the environment of fish markets in Northern Greece. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 61,15-22.



Parisi G., Franci O., Poli B. M. (2002) Application of multivariate analysis to sensorial and instrumental parameters of freshness in refrigerated sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during shelf life. *Aquaculture*, 214(1-4), 153-167.

Patange, S. B., Mukundan, M. K., Ashok Kumar, K. (2005) A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh. *Food control*, 16(5), 465-472.

Periago M.J., Ayala M.D., López-Albors O., Abdel I., Martínez C., García-Alcázar A., Ros G., Gil F. (2005) Muscle cellularity and flesh quality of wild and farmed sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 249(1-4), 175-188.

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o mikrobiološkim standardima za namirnice, Narodne novine (2003.), br. 125.

Rees E.E., Davidson J., Fairbrother J. M., St. Hilaire S., Saab M., McClure J.T. (2015) Occurrence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in oysters and mussels from Atlantic Canada. *Foodborne pathogens and disease*, 12(2), 164-169.

Ripabelli G., Sammarco M. L., Grasso G. M., Fanelli I., Caprioli A., Luzzi I. (1999) Occurrence of *Vibrio* and other pathogenic bacteria in *Mytilus galloprovincialis* (mussels) harvested from Adriatic Sea, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 49(1-2), 43-48.

Vezzulli L., Stagnaro L., Grande C., Tassistro G., Cane-si L., Pruzzo C. (2017) Comparative 16SrDNA Gene-Based Microbiota Profiles of the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) and the Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a Shellfish Farm (Ligurian Sea, Italy). *Microbial ecology*, 75(2), 495-504.

Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (Lipanj, 2009).austin

Ward D.R. (2001) Chapter I: Description of the situation. *Journal of Food Science Supplement*, 6(7), 1067-1071.