

**LIETUVOS SVEIKATOS MOKSLŲ UNIVERSITETAS
VETERINARIJOS AKADEMIJA**

Veterinarijos fakultetas

Kamilė Kavaliauskaitė

***Lactococcus lactis* padermių, išskirtų iš žuvies, identifikavimas ir mikrobiologinės saugos
savybių įvertinimas**

**Identification and microbiological safety properties evaluation of *Lactococcus lactis* strains
isolated from fish**

Veterinarinės maisto saugos nuolatinių studijų
MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovas: Doc. dr. Aleksandr Novoslavskij

Maisto saugos ir kokybės katedra

Kaunas, 2022

DARBAS ATLIKTAS MAISTO SAUGOS IR KOKYBĖS KATEDROJE

PATVIRTINIMAS APIE ATLIKTO DARBO SAVARANKIŠKUMĄ

Patvirtinu, kad įteikiamas magistro baigiamasis darbas „*Lactococcus lactis* padermių, išskirtų iš žuvies, identifikavimas ir mikrobiologinės saugos savybių įvertinimas“:

1. Yra atliktas mano paties (pačios).
2. Nebuvo naudotas kitame universitete Lietuvoje ir užsienyje.
3. Nenaudojau šaltinių, kurie nėra nurodyti darbe, ir pateikiu visą naudotos literatūros sąrašą.

Kamilė Kavaliauskaitė

(data)

(autorius vardas, pavardė)

(parašas)

PATVIRTINIMAS APIE DARBO LIETUVIŲ KALBOS TAISYKLINGUMĄ

Patvirtinu, kad darbo lietuvių kalba taisyklinga.

(data)

(redakatoriaus vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMOJO DARBO VADOVO IŠVADA DĖL DARBO GYNIMO

Doc. dr. Aleksandr

Novoslavskij

(data)

(darbo vadovo vardas, pavardė)

(parašas)

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS APROBUOTAS KATEDROJE (INSTITUTE)

Prof. dr. Mindaugas

Malakauskas

(aprobacijos data)

(katedros vedėjo vardas, pavardė)

(parašas)

Magistro baigiamojo darbo recenzentai

1)

2)

(vardas, pavardė)

(parašai)

Magistro baigiamųjų darbų gynimo komisijos įvertinimas:

(data)

(gynimo komisijos sekretorės (-iaus) vardas, pavardė)

(parašas)

TURINYS

SANTRAUKA	4
SANTRUMPOS	6
ĮVADAS	8
1. LITERATŪROS APŽVALGA	10
1.1 Pieno rūgšties bakterijos.....	10
1.2 Pieno rūgšties bakterijų nauda organizmui.....	10
1.3 Pienarūgščių bakterijų antimikrobinės savybės.....	11
1.4 Bakteriocinai.....	12
1.5 <i>L. lactis</i> charakteristika.....	13
1.6 <i>L. lactis</i> pritaikymas maisto pramonėje	13
1.7 <i>L. lactis</i> žuvyje.....	14
2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGA.....	16
2.1 Tyrimų laikas, vieta, tirtas objektas.....	16
2.2 Tyrimo eiga	16
2.3 Tyrimo metodika	17
2.3.1 <i>Lactococcus</i> spp. padermių išskyrimas iš žuvies	17
2.3.2 DNR išskyrimas iš <i>Lactococcus</i> spp.	18
2.3.3 <i>L. lactis</i> identifikavimas PGR metodu.....	19
2.3.4 <i>L. lactis</i> atsparumas antimikrobinėms medžiagoms	19
2.4 Statistinė duomenų analizė	21
3. TYRIMO REZULTATAI	22
3.1 <i>Lactococcus</i> spp. padermių išskyrimas ir <i>L. lactis</i> identifikavimas iš žuvies	22
3.2 <i>L. lactis</i> atsparumas antimikrobinėms medžiagoms	23
4. REZULTATŲ APTARIMAS	29
IŠVADOS.....	31
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	32

SANTRAUKA

***Lactococcus lactis* padermių, išskirtų iš žuvies, identifikavimas ir mikrobiologinės saugos savybių įvertinimas**

Kamilė Kavaliauskaitė

Magistro baigiamasis darbas

Pienarūgštės bakterijos (PRB) yra puikiai žinomi probiotikai, kurie gerina produkto mikrobiologinės kokybės ir saugos savybes. Probiotikai dažnai yra įvardijami kaip galima alternatyva kontroliuojant antibiotikus ir užkertant kelią patogeninių bakterijų plitimui. PRB gali gaminti įvairius antimikrobinius agentus, kurie turi stiprų antagonistinį aktyvumą prieš įvairius patogeninius mikroorganizmus. Nors PRB šaltinis dažniausiai yra pieno, sūrio ir kiti produktai, pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio sulaukia ir žuvis, kaip galimas pienarūgščių bakterijų šaltinis.

Tyrimo metu buvo atliktas *Lactococcus lactis* bakterijų išskyrimas iš žuvies vidaus organų (europinio šapalo, paprastosios raudės ir paprastosios kuojos). Iš viso 45 mėginiai buvo homogenizuoti, praskiesti dešimtkarčiais skiedimais iki 10^{-7} ir užsėti ant PCA agarų su priedais. Sekančiame etape atliktas dažymas Gramo būdu, po kurio, mikroskopo pagalba, atsižvelgiant į savybes (rutulio formos bakterijos, aptinkamos pavienės arba trumpose kokių grandinėse), vizualiai buvo nustatomos *Lactococcus* spp. bakterijos. Išskirtos *Lactococcus* spp. buvo įvertintos PGR metodu, kuomet ieškant specifinio 380 bp fragmento buvo identifikuotos *L. lactis* padermės. Paskutiniame etape įvertinamas pasitvirtinusių *L. lactis* bakterijų jautrumas prieš 9 antibiotikus (vankomiciną (VA), ampiciliną (AMP), gentamiciną (CN), kanamiciną (K), streptomiciną (S), eritromiciną (E), klindamiciną (CD), tetracikliną (TE), chloramfenikolį (C)) taikant E - testą.

Tyrimo metu *Lactococcus* spp. bakterijos buvo nustatytos 36 (80 proc.) visų tirtų žuvies vidaus organų mėginių. PGR reakcijos metu *L. lactis* padermės nustatytos tik 3 iš 36 tirtų *Lactococcus* spp. Vertinant *L. lactis* padermių antimikrobinį atsparumą prieš antibiotikus nustatyta, kad visos trys padermės buvo jautrios ampicilinui (MSK nuo 0,19 µg/ml iki 0,38 µg/ml), gentamicinui (MSK nuo 0,19 µg/ml iki 0,25 µg/ml), kanamicinui (MSK nuo 1 µg/ml iki 2 µg/ml), streptomicinui (MSK nuo 3 µg/ml iki 6 µg/ml), eritromicinui (MSK nuo 0,064 µg/ml iki 0,125 µg/ml), klindamicinui (MSK nuo 0,016 µg/ml iki 0,19 µg/ml), tetraciklinui (MSK 2 µg/ml), chloramfenikoliui (MSK nuo 2 µg/ml iki 6 µg/ml) ($p < 0,001$), tačiau buvo visiškai atsparios vankomicinui (MSK 256 µg/ml) ($p \geq 0,05$).

Raktažodžiai: *Lactococcus lactis*, pieno rūgšties bakterijos, žuvis, jautrumas antibiotikams

SUMMARY

Identification and microbiological safety properties evaluation of *Lactococcus lactis* strains isolated from fish

Kamilė Kavaliauskaitė

Master's Thesis

Lactic acid bacteria (LAB) are well known probiotics which improve microbiological quality and safety of a product. Probiotics are often mentioned as an alternative to antibiotics in case of controlling and preventing of pathogenic bacteria. LAB can produce various antimicrobial agents which have strong antagonistic activity against different pathogenic microorganisms. Although most common LAB sources are dairy, cheese and other products, for the last few years more attention is focused to the fish as a possible source of lactic acid bacteria.

Lactococcus lactis bacteria were isolated from internal organs of fish (European chub, common rudd and common roach) in this study. In total 45 samples were homogenized, diluted in ten-fold dilutions till 10^{-7} and inoculated into a Plate count agar with supplements. During the next stage Gram staining was performed and *Lactococcus* spp. were visually detected with the microscope, based on the properties like spherical forms of bacteria, a single or short chains of cocci. *Lactococcus* spp. were tested with the PCR assay for a specific 380 bp fragment to identify *L. lactis* strains. At the last stage confirmed *L. lactis* strains were tested to antimicrobial resistance by E-test with 9 antibiotics (vancomycin (VA), ampicillin (AMP), gentamicin (CN), kanamycin (K), streptomycin (S), erythromycin (E), clindamycin (CD), tetracycline (TE), chloramphenicol (C)).

Lactococcus spp. were detected in 36 (80 %) out of 45 examined internal fish organs samples. Based on PCR results *L. lactis* was confirmed only in 3 out of 36 tested *Lactococcus* spp. Antimicrobial resistance revealed that all three *L. lactis* strains were susceptible to ampicillin (MIC from 0.19 µg/ml up to 0.38 µg/ml), kanamycin (MIC from 1 µg/ml up to 2 µg/ml), streptomycin (MIC from 3 µg/ml up to 6 µg/ml), erythromycin (MIC from 0.064 µg/ml up to 0.125 µg/ml), clindamycin (MIC from 0.016 µg/ml up to 0.19 µg/ml), tetracycline (MIC 2 µg/ml), chloramphenicol (MIC from 2 µg/ml up to 6 µg/ml) ($p < 0.001$), although they were completely resistant to vancomycin (MIC 256 µg/ml) ($p \geq 0.05$).

Key words: *Lactococcus lactis*, lactic acid bacteria, fish, susceptibility to antibiotics

SANTRUMPOS

ATCC - Amerikos referentinių kultūrų kolekcija (angl. *American Type Culture Collection*);

AMP - ampicilinas;

apsis./min - apsisukimų per minutę;

BA - biogeniniai aminorai;

C - chloramfenikolis;

CN - gentamicinas;

CD - klindamicinas;

DNR - deoksiribonukleorūgštis;

E - eritromicinas;

EFSA - Europos maisto saugos tarnyba (angl. *European Food Safety Authority*);

FDA - Maisto ir vaistų administracija (angl. *Food and Drug Administration*);

g - gramas;

K - kanamicinas;

kSV - kolonijas sudarantys vienetai;

M17 - medium 17 mitybinė terpė;

ml - mililitras;

min - minutė;

MRS - De Man, Rogosa Sharpe mitybinė terpė;

NaCl - natrio chloridas;

p - aritmetinių vidurkių skirtumų patikimumas;

pav. - paveikslėlis;

PCA - Plate count agar mitybinė terpė;

PGR - polimerazinė grandininė reakcija;

pH - vandenilio jonų (H^+) koncentracijos tirpale matas;

PRB - pieno rūgšties bakterijos;

proc. - procentai;

pVZ - pavyzdys;

S - streptomocinas;

spp. - gentis;

TE - tetraciklinas;

TEA - nukleorūgščių elektroforezei skirtas buferis;

V - voltai;

VA - vankomicinas;

val. - valandos;

vnt. - vienetai;

μ l - mikro litrai;

μ g/ml - mikro gramai mililitre;

$^{\circ}$ C - Celcijaus laipsnis.

IVADAS

Maisto sauga yra neatsiejamą maisto įmonių dalis, kuri užtikrina, kad produkte nebūtų mikrobinės taršos bei cheminių teršalų, kurie kelia didelį pavojų sveikatai. Nuolat kyla naujų grėsmių maisto saugumui, dėl kurių didėja ir per maistą plintančių ligų protrūkių. Be to, maisto tiekimas vis labiau globalizuojasi ir tai reikalauja didesnio dėmesio maisto saugai visame pasaulyje. Produktuose naudojami konservantai siekiant sumažinti maisto nuostolius ir užtikrinti aukštesnę maisto kokybę bei saugumą, tačiau šiandienos vartotojai labiau renkasi produktus be konservantų, nes jiems jie dažniausiai asocijuojasi su nesveiku maisto produktu jų sveikatai. Dėl šios priežasties siekiama sukurti produktus, kuriuose naudojama mažiau priedų arba naudojami natūralūs priedai. Vieni iš labiausiai ištirtų natūralių maisto priedų yra mikroorganizmai, tokie kaip pieno rūgšties bakterijos. Tai yra probiotikai, kuriuos daugelis renkasi dėl jų naudos sveikatai ir pasižymėjimu antimikrobinėmis savybėmis (1).

Pieno rūgšties bakterijos, tokios kaip *Lactobacillus* ir *Bifidobacterium*, dažniausiai naudojamos kaip probiotikai. Šios bakterijos gali gaminti įvairius antimikrobinis agentus, kurie turi stiprų antagonistinį aktyvumą prieš įvairias patogenines bakterijas (2). Tam puikiai tinka visuotinai pripažinta saugia vartoti *Lactococcus lactis*, išsiskirianti ne tik antimikrobinėmis savybėmis, bet ir gerinanti produkto mikrobiologinę saugą ir kokybę (3). Nors *L. lactis* daugiausia aptinkama pieno produktuose, tačiau vis daugiau tyrimų įrodo, kad ši bakterija dažnai aptinkama ir žuvyje. Taip pat nurodoma, kad kai kurios žuvyje aptinkamos *L. lactis* padermės pasižymi stipresniu slopinamuoju aktyvumu prieš įvairius infekcijų sukėlėjus (4).

Didėjantis atsparumo antimikrobinėms medžiagoms paplitimas yra pasaulinė problema. Antimikrobinėms medžiagoms atsparios bakterijos gali sukelti sunkių ir sudėtingiau gydomų infekcijų. Infekcijos, kurias sukelia atsparios antimikrobinėms medžiagoms bakterijos, sunkina sveikimo procesą, kuris dažnai būna ilgesnis ir sunkesnis, taip pat pailgėja ligos trukmė ir padidėja mirtingumas. Daugelis veiksnių prisideda prie žmogaus patogenų atsparumo antimikrobinėms medžiagoms didėjimo, įskaitant antimikrobinų medžiagų naudojimą žmonėms ir maistui skirtiems gyvūnams. Antimikrobinės medžiagos plačiai naudojamos maistui skirtiems gyvūnams gydyti, profilaktikai (sveikų gyvūnų, kuriems gresia užsikrėtimo rizika, ligų prevencijai) ir kai kur pasaulyje vis dar naudojami augimui skatinti (padidinti prieaugį arba pašarų efektyvumą). Toks jų naudojimas gali paskatinti maistui skirtų gyvūnų antimikrobinėms medžiagoms atsparių bakterijų augimą ir išplitimą (5).

Bakterijų, pasižyminčių antimikrobinio veikimu, taikymas gamyboje gali būti papildomas apdorojimo parametras, siekiant ne tik pagerinti produkto saugą ir užtikrinti maisto kokybę, bet išlaikyti ar sustiprinti jos savybes (6). Siekiant kontroliuoti patogenų plitimą, tame tarpe ir

patogenų atsparių antimikrobinėms medžiagoms, mokslininkai nuolat ieško alternatyvų antibiotikams. Pastaruoju metu būtent probiotikai pristatomi kaip galima alternatyva antibiotikams, padedanti užkirsti kelią patogeninėms bakterijoms (2).

Darbo tikslas: identifikuoti *Lactococcus lactis* padermes, išskirtas iš žuvies, ir įvertinti jų mikrobiologinės saugos savybes.

Darbo uždaviniai:

1. Išskirti galimai *L. lactis* padermes iš žuvies;
2. PGR metodo pagalba identifikuoti *L. lactis* padermes;
3. Įvertinti išskirtų padermių mikrobiologinę saugą (atsparumas antimikrobinėms medžiagoms).

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Pieno rūgšties bakterijos

Pieno rūgšties bakterijos (PRB) yra gram teigiamos, sporų neformuojančios, kokių arba lazdelės formos bakterijos, kurios gamina pieno rūgštį kaip galutinį produktą angliavandenių fermentacijos metu (3). Pieno rūgšties bakterijų pagrindinės gentys: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* ir *Weissella* (7). PRB klasifikavimas į skirtingas gentis yra pagrįstas morfologija, gliukozės fermentacijos būdu, augimu skirtingoje temperatūroje, pagamintos pieno rūgšties konfigūracija, gebėjimu augti didelėje druskos koncentracijoje ir rūgštyje (8). PRB galima aptikti augaluose, vaisiuose, pieno produktuose, fermentuotoje mėsoje ir žuvyje, marinuotose daržovėse, fermentuotuose gėrimuose, nuotekose ir žmonių bei gyvūnų organizmuose (9).

Maisto pramonėje pieno rūgšties bakterijos yra panaudojamos gaminti fermentuotus produktus, turinčius antibakterinį poveikį, kaip pvz. bio - konservantai, kurie pagerina maisto saugą, užkerta kelią maisto produktų gedimui ir prailgina jų galiojimo laiką bei išsaugomo produkto maistines savybes, skonį (10). Fermentacija pieno rūgšties bakterijomis yra pigus ir efektyvus maisto išsaugojimo metodas, kuris gali būti taikomas ne tik didelėse, bet ir mažose įmonėse. Fermentacija pagerina daugelio maisto produktų tekstūrą, skonį ir maistinę vertę (11).

Labiausiai žinoma PRB savybė, susijusi su konservantais, yra jų gebėjimas gaminti rūgštį, kuri savo ruožtu pasižymi antimikrobinio poveikiu (12). Todėl pieno rūgšties bakterijos turi puikų antimikrobinį poveikį fermentuotuose maisto produktuose. Tai daugiausia susiję su organinių rūgščių bei kitų junginių, pvz. etanolio, vandenilio peroksido, diacetilo, reuterino ir bakteriocinų gamyba (8).

Maiste esantys patogenai kelia didelę grėsmę vartotojų sveikatai, nes jie gali sukelti įvairias ligas. Siekiant pašalinti galimą šių ligų sukėlėjų riziką, skiriama daug dėmesio pieno rūgšties bakterijoms, nes jos atlieka esminę funkciją, kad būtų užkirstas kelias bakterijų augimui ir sumažėtų biogeninių aminių (BA) susidarymas. Patogenų sukeltos su maistu susijusios ligos pasižymi viduriavimu, vėmimu, pilvo skausmu ir kitais požymiais. Tuo tarpu BA susidarymas maisto produktuose gali sukelti mitybos ir juslinių savybių pablogėjimą bei gali turėti toksikologinį poveikį ir sukelti įvairių rūšių apsinuodijimus (10).

1.2 Pieno rūgšties bakterijų nauda organizmui

Moksliniais tyrimais nustatyta, kad PRB, pagrindinė gram teigiamų bakterijų grupė, yra naudinga žmonių sveikatai, nes veikia kaip probiotikas. Probiotikai yra gyvi mikroorganizmai, kuriuos vartojant atitinkamais kiekiais, gaunama nauda sveikatai (13). Su sveikata susijusios

savybės, priskiriamos probiotiniams mikroorganizmams, yra daugialypės. Probiotikai žinomi dėl: vertingų junginių gamybos, antagonistinio poveikio patogeninėms bakterijoms, imuninio atsako stimuliavimo ir daugelio kitų poveikių. Išlaikant nuolatinį probiotikų buvimą žarnyne stimuliuojama imuninė sistema, dėl to sumažėja autoimuninių susirgimų sunkumas ir sumažėja alerginės reakcijos (14).

Pieno rūgšties bakterijos turi teigiamą poveikį odos sveikatos palaikymui ir gerinimui (15). PRB ir jų probioaktyvios ląstelinės medžiagos virškinimo trakte yra labai naudingos, nes neleidžia susikurti, sukibti ar daugintis žarnyno gleivinės patogenams. Šios medžiagos taip pat gerina virškinimą, lengvina malabsorbcijos simptomus. Toks poveikis yra susijęs su mutageninio aktyvumo slopinimu, fermentų, susijusių su kancerogenų, mutagenų arba naviką stimuliuojančių dalelių sumažėjimu bei epidemiologija, susijusia su mitybos režimu bei vėžiu (16). Kitos žarnyno ligos taip pat gali būti sumažintos vartojant probiotikus. Probiotikų naudojimas taip pat susijęs ir su laktozės netoleravimo mažinimu, infekcijų mažinimu (17).

Probiotikų įtaka kūno svoriui geriausiai ištirta suaugusiems. Probiotikai padeda sumažinti adipocitų dydį mažindami riebalų rūgščių absorbciją ir padidina genų raišką, susijusią su riebalų rūgščių oksidacija. Vartojant 100 g jogurto, kuriame yra *L. amylovorus* arba *L. fermentum*, per 6 savaites galima sumažinti bendrą kūno riebalų masę. Nustatyta, kad poveikis stipresnis vartojant *L. amylovorus* turinčių papildų. Atsvario turintiems asmenims papildomai vartojant probiotinį preparatą, kurio sudėtyje yra *L. plantarum* ir *L. curvatus*, per 1-12 savaičių žymiai sumažėja kūno svoris ir poodinis riebalinis audinys (18).

Tam, kad būtų užtikrintas naudingas poveikis sveikatai, rekomenduojama, kad probiotikų koncentracija produkte turi būti ne mažesnė kaip 10^6 ksv mililitre arba grame, tačiau geriausia, kad probiotiniam poveikiui kasdien būtų suvartojama apie 10^8 – 10^9 ksv mililitre arba grame probiotinių mikroorganizmų (19).

1.3 Pienarūgščių bakterijų antimikrobinės savybės

Per daugelį metų sveikatos mokslų srityje padaryta didelė pažanga naudojant antimikrobines medžiagas. Dauguma žmonių ir gyvūnų miršta dėl mikrobinių infekcijų, kurių padidėjęs atsparumas antibiotikams pastebėtas per kelis dešimtmečius. Antibakterinio atsparumo atsiradimas žymiai sumažino infekcijų gydymo veiksmingumą. Norint išspręsti šią visuomenės sveikatos problemą reikia ištirti naujus metodus, kurie padėtų sustiprinti tradicinius antibiotikus, tiriant naujas antimikrobines molekules. Pieno rūgšties bakterijų naudojimas puikiai tam tinka ir gali būti laikomas alternatyva antibiotikams (20).

Kadangi atsparumas antimikrobinėms medžiagoms yra nauja problema, ji gali sukelti neigiamų pasekmių sveikatos, aplinkos ir žemės ūkio sektoriuose dėl privalomų vartoti didesnių

antibiotikų koncentracijų. Be to, padidėjęs atsparumas antibiotikams padidina infekcinių ligų plitimo ir užsitęsimo riziką. Pasaulio sveikatos organizacija 2017 metais išvardijo antibiotikus, reikalingus tokioms patogeninėms bakterijoms, kaip *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ir *Enterobacter* spp. Antibiotikų neveiksmingumas prieš patogenus padidėjo dėl jų atsparumo vaistams, kurie naudojami visame pasaulyje, todėl sunkiau gydyti infekcijas ir mažinti mirtinus atvejus. Siekiant kontroliuoti patogenų plitimą, skubiai reikia naujų alternatyvių antibiotikų (2).

Ligų protrūkiai paprastai gydomi chemoterapiniais vaistais ir antibiotikais, tačiau tai dažnai turi nepageidaujamą šalutinį poveikį: aplinkos ir gyvūnų užteršimą antibiotikais, todėl padidėja atsparumas antibiotikams, sumažėja antibiotikų veiksmingumas ligoms gydyti. Pastaruoju metu probiotikų, prebiotikų ir imunostimuliatorių skyrimas atrodo labai perspektyvi kontrolės priemonė (21).

Probiotikai pristatomi kaip galima alternatyva antibiotikams kontroliuoti ir užkirsti kelią patogeninių bakterijų plitimui. PRB gali gaminti įvairius antimikrobinius agentus, kurie turi stiprų antagonistinį aktyvumą prieš įvairius patogeninius mikrobus. Taip pat PRB gali užkirsti kelią patogenų adhezijai, konkuruodama dėl žarnyno epitelio ląstelių surišimo vietų ir sumažindama kolonizaciją, taip užkertant kelią infekcijų atsiradimui. *L. lactis* laikomas stipriu probiotiku, gerinančiu sveikatą. Taip pat *L. lactis* dažniausiai sintetina bakteriocinus, kurie kovoja su patogeniniais mikroorganizmais (2).

PRB sukuria žemo pH aplinką fermentuodama keletą maistinių medžiagų ir gamina antimikrobinius veiksnius, kurie gali užkirsti kelią užteršimui patogeninėmis bakterijomis (22). Taip pat antimikrobinių kultūrų taikymas gamyboje gali būti papildomas apdorojimo parametras, siekiant pagerinti produkto saugą ir užtikrinti maisto kokybę, išlaikyti ar sustiprinti juslines savybes (6).

1.4 Bakteriocinai

Bakteriocinai yra genų užkoduoti, ribosomų sintetinami antimikrobiniai peptidai, kuriuos gamina ir gramteigiami, ir gramneigiami mikroorganizmai. Bakteriocinai gauti iš PRB turi daug įvairių galimų pritaikymų, pavyzdžiui, užkertant kelią patogeninėms bakterijoms maiste ir kaip alternatyva antibiotikams medicinoje ir veterinarijoje (23).

Kai kurie bakteriocinai, tokie kaip nizinas, yra plačiai paplitę kaip biologiniai konservantai maisto sistemose ir naudojami jau kelis dešimtmečius (24). Nizinas ir lakticinas yra pagrindiniai *L. lactis* gaminami bakteriocinai (25). Bakteriocinų gamyba yra daugelio pieno rūgšties bakterijų probiotinis požymis, kuris gali padėti išvengti patogenų augimo žarnyno aplinkoje (26). Nors daugelis bakteriocinų turi siaurą aktyvumo spektrą slopindami panašių ar glaudžiai susijusių

bakterijų rūšių augimą, kiti bakteriocinai rodo antimikrobinį aktyvumą prieš daugybę bakterijų genčių. Paprastai gram neigiamų bakterijų bakteriocinų aktyvumo spektras yra siauresnis nei gram teigiamų bakterijų (27).

Gram teigiamų bakterijų pagaminti bakteriocinai yra skirstomi į dvi pagrindines klases: I klasė, turinti labai modifikuotų peptidų, vadinamų lantibiotikais ir II klasė, turinti nemodifikuotų peptidų arba peptidų su nedideliais pakitimais. II klasės bakteriocinai gali toliau būti suskirstyti į poklasių: II a klasė, pediocinų tipo bakteriocinai, kurie yra labai aktyvūs prieš *Listeria* spp. ir turi gana siaurą spektrą. II b klasės, dviejų peptidų bakteriocinai, kurių aktyvumas priklauso nuo dviejų skirtingų peptidų sinergijos. II c klasė, cirkuliniai bakteriocinai ir II d klasė, kita grupė, apimanti visus kitus bakteriocinus, kurie netelpa į bet kurią iš minėtų grupių (26).

Bakteriocinai turi didelę paklausą tiek kaip maisto konservantas, tiek kaip alternatyva antibiotikams, kurie naudojami daugelyje vaistų prieš atsparius patogenus gamyboje. PRB bakteriocinai natūraliai toleruoja aukštą terminį stresą ir yra žinomi dėl savo aktyvumo plačiame pH diapazone. Šie antimikrobiniai peptidai taip pat yra bespalviai, bekvapiai, beskoniai ir tai dar labiau padidina jų galimą panaudojimą (28).

1.5 *L. lactis* charakteristika

Lactococcus gentis yra glaudžiai susijusi su *Streptococcus* gentimi, nes jos abi yra *Streptococcaceae* šeimos narės ir turi 12 rūšių: *L. lactis*, *L. raffinolactis*, *L. garviae*, *L. plantarum*, *L. piscium*, *L. chungengensis*, *L. fujiensis*, *L. taiwanensis*, *L. formosensis*, *L. nasutitermitis* ir dvi naujai identifikuotas *L. hircilactis* ir *L. laudensis* rūšis. Iki šiol *L. lactis* yra geriausiai žinoma laktokokų rūšis (29).

L. lactis yra gram teigiamos, aerotoleruojančios, sporų nesudarančios bakterijos. Rūšis yra suskirstyta į keturias porūšius: *lactis*, *cremoris*, *hordniae*, *tractae* ir vieną *Diacetylactis* biovarą. Tai yra mezofilinis mikroorganizmas, dalyvaujantis fermentuotų pieno produktų gamyboje, tačiau tik *L. lactis* ir *L. cremoris* yra ypač svarbios pramonei. Pagrindinės *L. lactis* savybės yra gebėjimas augti 4% NaCl esant 40 °C, taip pat šis mikroorganizmas geba mažinti arginimą bei augti terpėje, kurios pH yra 9,2 (29).

1.6 *L. lactis* pritaikymas maisto pramonėje

L. lactis — fermentacinė bakterija, gaminanti pieno rūgštį iš cukraus (heksozės) fermentacijos. Tai svarbus mikroorganizmas, turintis plačią ir įvairią maisto fermentacijos paskirtį (30). Žalias pienas dažnai yra apibūdinamas kaip pagrindinis pieno rūgšties bakterijų šaltinis, kuriame gausu *L. lactis* (31).

L. lactis šimtmečius buvo naudojama fermentuojant maistą, ypač sūrį, jogurtą, raugintus kopūstus ir kitus produktus, todėl Maisto ir vaistų administracija (angl. Food and Drug

Administration FDA) bei Europos maisto saugos tarnyba (angl. European Food Safety Authority, EFSA) šį mikroorganizmą pripažino saugiu vartoti (32). Raugintų pieno produktų gamyboje *L. lactis* naudojama mišiniuose arba įvairiomis kombinacijomis su kitomis pieno rūgšties bakterijomis (30).

L. lactis yra vienas iš dažniausiai naudojamų pieno pramonės mikroorganizmų. Pieno produktuose yra naudojama kaip pieno starterinė kultūra. Šis mikroorganizmas pieno rūgštį gamina pieno fermentacijos metu. Be savo vaidmens pirmajame rūgštinimo etape, *L. lactis* prisideda prie pieno produktų skonio, taip pat gebėjimo gaminti diacetilą ir acetoiną. Ši fermentacinė bakterija taip pat yra susijusi su mikrobiologiniu saugumu, didele pieno rūgšties gamyba bei antimikrobinėmis medžiagomis, tokiomis kaip bakteriocinai (29).

Fermentuotų maisto produktų kiekis visame pasaulyje didėja, ypač maisto produktų, kuriuose yra probiotikų ar sveikatą gerinančių bakterijų. Gaminant fermentuotus produktus daugiausiai naudojami *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ir *Pediococcus* genčių mikroorganizmai (33).

Maisto medžiagų pakuotės palaipsniui tapo mokslinių tyrimų dėmesio centre dėl įvairių privalumų, įskaitant ekologiškumą, barjerinių savybių gerinimą. Moksliniais tyrimais patvirtintas sėkmingas *L. lactis* panaudojimas kuriant bakteriostatines plėveles. Pridėjus *L. lactis* plėvelės storis nepakito, skaidrumas sumažėjo ir pastebėtas didelis raudonos ir geltonos spalvos atspalvių padidėjimas. Tuo tarpu, bakterijų ląstelių dispersija plėvelės tirpaluose, plėvelių susidarymo metu, sugriovė tarpmolekulinę sąveiką tirpaluose ir padidino tūrį *L. lactis* turinčiose plėvelėse, taip šiek tiek sumažindama plėvelių tempiamąjį stiprumą, tačiau žymiai padidino vandens garų pralaidumą. Be to, plėvelei, į kurią buvo pridėta *L. lactis*, pastebėtas didelis bakteriostatinis aktyvumas prieš *Staphylococcus aureus* 4 °C temperatūroje. Septynių dienų bakteriostatinio tyrimo metu 1,5 g/100 g *L. lactis* pridėtos plėvelės sumažino gyvybingų *S. aureus* ląstelių skaičių mažiausiai keturiais logaritminiais vienetais. Šis *L. lactis* turinčių plėvelių tyrimas suteikė naują metodą ir strategiją maisto produktų antibakteriniam konservavimui (34).

1.7 *L. lactis* žuvyje

Pienarūgštės bakterijos gausiai aptinkamos bei išskiriamos iš pieno, sūrio ir kitų produktų. Pastaraisiais metais mokslininkų dėmesio sulaukia ir žuvis, kaip galimas pienarūgščių bakterijų šaltinis. Nors jūrų žuvų žarnyno mikrobiota yra tiriama įvairiais tikslais, tačiau yra labai mažai informacijos apie PRB, išskirtas iš žuvų, bei jų poveikį žmogui (4).

Naujausi duomenys parodė, kad kai kurios PRB, ypač *Lactococcus* ir *Carnobacterium* gentys, yra svarbios laikinos ir nuolatinės žuvų virškinamojo trakto gyventojos. Šios bakterijos žuvies organizme atlieka apsaugą nuo patogenų bei gamina antimikrobinis junginius (35).

Įrodyta, kad jūrinės žuvys, ypač tokios kaip plekšnės ir karšiai, yra geri PRB ir *Bacillus* šaltiniai. Nustatyta, kad kai kurios PRB padermės, išskirtos iš plekšnių ir karšių, pasižymi stipresniu slopinamuoju aktyvumu prieš įvairius bakterijų sukėlėju, labiau toleruoja žemą pH bei tulžies rūgštį, palyginus su kitomis PRB padermėmis, išskirtomis iš kitų jūrinių žuvų. Panašiai kaip žinduolių virškinimo sistema, žuvų žarnos taip pat suteikia sąlygas daugeliui mikrobus rūšių augimui, kurios turi įtakos įvairiems fiziologiniams procesams, kolonizacijai ir dauginimuisi. Tam tikros bakterijų rūšys pirmiausia kolonizuoja žuvų virškinamąjį traktą per vandenį ir maistą vandens aplinkoje, kuris labai skiriasi nuo sausumos aplinkos (4).

Daugelis mokslininkų įvertino pieno rūgšties bakterijas ir įvairius *Bacillus* genties atstovus kaip probiotinius preparatus akvakultūroje, įskaitant *Lactobacillus* spp., *L. lactis*, *Pediococcus acidilactici* ir *B. subtilis*. Žuvų žarnyno mikrobiotos tyrimas, toleruojant įvairias aplinkos sąlygas, tokias kaip temperatūra, žemas pH, osmosinis slėgis, tulžies druskos ir antimikrobinis aktyvumas, gali atskleisti vertingas ir naudingas probiotikų savybes. In vivo patikrinimas dėl probiotikų gebėjimo slopinti patogenus yra labai svarbus procesas, nes jis gali pašalinti klaidingai teigiamus duomenis iš in vitro patikros. Taip pat probiotinės bakterijos virškinimo trakte gali vaidinti svarbų vaidmenį ginantis nuo įsiveržiančių patogeninių mikroorganizmų ir stimuliuojant imuninę sistemą šeimininke (36).

L. lactis, išskirta iš žuvies, gamina bakteriociną, pasižymintį antibakteriniu poveikiu prieš platų, patogeninių ir gedimą sukeliančių, bakterijų spektrą. Šio antibakterinio agento, kaip biologinio konservanto, panaudojimas menkės žuvies filė pratęsė jo galiojimo laiką iki >21 dienos esant normaliai šaldymo temperatūrai (4°C), lyginant su 0 ir –18°C temperatūra. Bakteriocino naudojimas, kaip biologinio konservanto, suteikia didesnę apsaugą, ilgesnį produkto galiojimo laiką ir yra geresnė alternatyva vertingų jūros gėrybių konservavimui šaldymo temperatūroje (37).

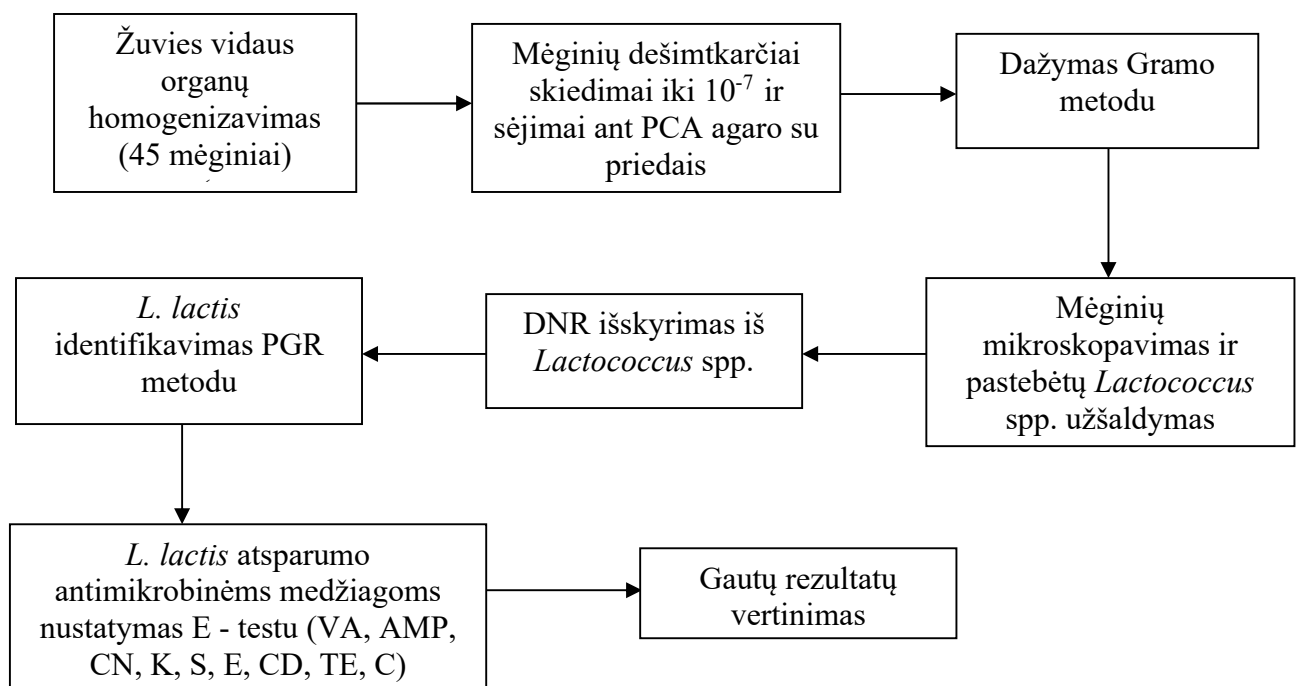
2. TYRIMO METODAI IR MEDŽIAGA

2.1 Tyrimų laikas, vieta, tirtas objektas

Tyrimas buvo atliekamas 2020 - 2021 metais Lietuvos sveikatos mokslų universitete, Veterinarijos akademijoje, Maisto saugos ir kokybės katedroje, Maisto mikrobiologijos laboratorijoje. Buvo tiriamos *L. lactis* padermės išskirtos iš žuvies vidaus organų.

2.2 Tyrimo eiga

Šiame darbe buvo atliktas *L. lactis* padermių, išskirtų iš žuvies vidaus organų (skrandžio, žarnų, inkstų, kepenų, blužnies), identifikavimas ir mikrobiologinės saugos savybių įvertinimas. *L. lactis* išskyrimui buvo naudojami žuvies vidaus organai, kurie buvo homogenizuoti, mėginiai praskiesti dešimtkarčiais skiedimais ir įvykdyti sėjimai. Po sėjimų atrinktos *Lactococcus* spp. dažytos Gramo būdu, po kurio mikroskopo pagalba vizualiai įvertintos. *Lactococcus* spp. pagal bakterijoms būdingas ovalias, baltos spalvos kolonijas, buvo surinktos ir atliktas bakterijų užšaldymas. Vėlesniame tyrimo etape užšaldyti bakterijų izoliatai buvo atgaivinti bei buvo išskirtas šių izoliatų DNR, po kurio atlikta PGR analizė, kurios metu identifikuotos *L. lactis* padermės. Paskutiniame tyrimo etape PGR patvirtintos *L. lactis* bakterijos buvo įvertintos dėl atsparumo antimikrobinėms medžiagoms su 9 antibiotikais taikant E - testą (1 pav).



1 pav. *L. lactis* padermių, išskirtų iš žuvies, identifikavimo ir mikrobiologinės saugos savybių įvertinimo principinė darbo schema

2.3 Tyrimo metodika

2.3.1 *Lactococcus* spp. padermių išskyrimas iš žuvis

Lactococcus spp. išskyrimui naudoti europinio šapalo, paprastosios raudės ir paprastosios kuojos vidaus organai, kuriose galimas šių bakterijų buvimas. Kauno marių regioniniam parkui priklausančiose Kauno mariose buvo pagauta reikalinga tyrimui atlikti žuvis, kuri iškart pristatyta į laboratoriją ir pradėtas tyrimas (2 pav). Tyrimo metu buvo įvertinti 45 žuvų mėginiai. Iš europinio šapalo vidaus organų tirta 16 mėginių, iš paprastosios raudės – 17, o iš paprastosios kuojos tirta 12 mėginių.



2 pav. *Lactococcus* spp. išskyrimui naudota žuvis (darbo autorės nuotrauka)

Pirmiausia laboratorijoje buvo pagaminamos tolimesnėje eigoje reikalingos PCA agarų (Oxoid, Basingstokas, Hampšyras, Anglija) su priedais lėkštelės. PCA agarų gamybai PCA agarų milteliai buvo maišomi su atitinkamu distiliuoto vandens kiekiu: ruošiant apie 400 ml agarų kiekį naudota 400 ml distiliuoto vandens ir 7 g PCA agarų miltelių. Paruošiami ir pieno milteliai, kuriais bus pildomas PCA agaras. Milteliai ruošiami maišant 6,8 g pieno miltelių (Oxoid, Basingstokas, Anglija) su 40 ml distiliuoto vandens kiekiu. Į PCA agarą supilamas paruoštas pieno miltelių kiekis, taip pat agaras pildomas 4 mg natamicino (Sigma - Aldrich, St. Louis, Vokietija), 8 mg bromkrezolio purino (Sigma - Aldrich, St. Louis, Vokietija) ir 16 mg naladiksino (Sigma - Aldrich, St. Louis, Vokietija) kiekiu, viskas gerai išmaišoma, išpilstoma į lėkštes.

Išskrodus žuvį ir atskyrus vidaus organus jie buvo homogenizuoti (BagMixer, Interscience, Prancūzija) prieš tai juos praskiedus su fiziologiniu peptono tirpalu (Oxoid, Basingstokas, Anglija) santykiu 1:9. Steriliuose maišeliuose patalpintas 1 g mėginio, kuris užpilamas 9 ml fiziologiniu peptono tirpalu ir gauta masė homogenizuojama 90 sekundžių, taip gaunant pirmąjį skiedinį 10^{-1} .

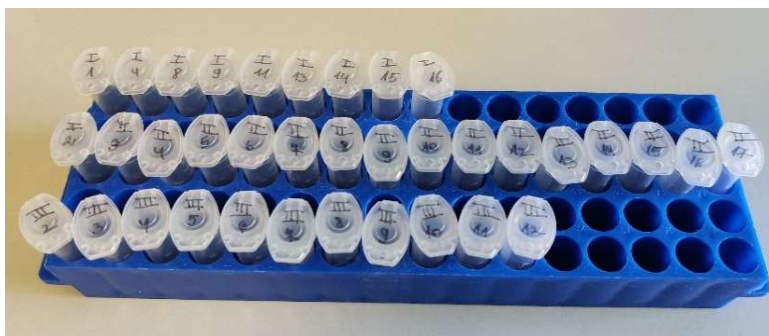
Naudojant sterilią pipetę 1 ml skiedinio yra perkeliamas į sterilų mėgintuvėlį, kuriame yra 9 ml fiziologinio peptono tirpalo, ir viskas gerai išmaišoma elektrinėje mėgintuvėlių maišyklėje. Tokiu principu atliekami dešimtkarčiai praskiedimai iki 10^{-7} . Atlikus praskiedimus visi mėginiai pasėti ant paruoštų PCA agarų su priedais lėkštelių ir inkubuojami 48 ± 3 val. aerobinėmis sąlygomis $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje.

Sekančiame etape, po inkubavimo, numanomos *Lactococcus* spp. kolonijos buvo persėjamos į M17 (Oxoid, Basingstokas, Hampšyras, Anglija) agarą Petri lėkšteles, inkubuotos 48 ± 3 val. aerobinėmis sąlygomis $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Persėjimo, bakterijų kultūros gryninimo procedūra buvo kartojama 2 - 3 kartus.

Išaugusios ir atrinktos bakterijų kolonijos, vadovaujantis pateikta instrukcija, dažytos naudojant Gramo (Sigma - Aldrich, St. Louis, Vokietija) būdą. Po dažymo mėginiai mikroskopuoti ir vizualiai ieškotos *Lactococcus* spp. būdingos savybės: pavieniai kokai arba kokų grupės po du ar daugiau. Rastos *Lactococcus* spp. užšaldytos $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje M17 sultinyje (Merck, Darmstadas, Vokietija) su 30 proc. glicerolio iki sekančių tyrimų atlikimo.

2.3.2 DNR išskyrimas iš *Lactococcus* spp.

Prieš DNR išskyrimo procedūrą, *Lactococcus* spp. atgaivintos MRS sultinyje (Biolife, Milan, Italija) vykdant inkubaciją 24 val. $+37\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po inkubavimo, kilpele bakterijų kultūros buvo perkeltos į sterilius 1,5 ml mėgintuvėlius, kurie pripildyti 500 μl distiliuoto vandens kiekiu (3 pav). Viskas gerai išmaišoma elektrinėje mėgintuvėlių maišyklėje ir dedama į termomikserį (Thermo Fisher Scientific, Lietuva) kaitintis 10 min. $+99\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Po bakterijų suspensijų kaitinimo mėgintuvėliai 5 min. 16 000 apsis./min greičiu centrifuguoti ir atsiskyręs viršutinis sluoksnis su sterilia pipete buvo perkeltas į naujus 1,5 ml mėgintuvėlius. Mėgintuvėliai vėl centrifuguoti 5 min. 16 000 apsis./min greičiu, viršutinis sluoksnis vėl sterilia pipete perkeliamas į 200 μl mėgintuvėlius. Išskirta DNR laikyta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje iki *L. lactis* rūšies identifikavimo PGR metodu.



3 pav. *Lactococcus* spp. kultūrų mėginiai DNR išskyrimui (darbo autorės nuotrauka)

2.3.3 *L. lactis* identifikavimas PGR metodu

L. lactis identifikavimui į specialius mėgintuvėlius pilama 5 µl DNR ir 45 µl reagentų mišinio, kurį sudaro: 25 µl DreamTag Green PGR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva), 18,6 µl sterilus distiliuotas vanduo, 0,4 µl pradmenų mišinio sudaryto iš 0,2 µl *G1* (GAAGTCGTAACAAGG) ir 0,2 µl *L1* (CAAGGCATCCACCGT) oligonukleotidų pradmenų (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lietuva), 1 µl magnio chlorido. Viskas išmaišoma ir 2 val. aliekama amplifikacija „PTC-100 Programmable“ termocikleryje (MJ. Research Inc., JAV) pagal G. Moschetti ir kt. (38) pateiktas rekomendacijas.

Elektroforezės atlikimui paruoštas 2,5 proc. agarozės gelis, kurio ruošimui 2,75 g agarozės (Merck. Darmstadas, Vokietija) maišomas su 110 ml 1 x TAE buferiu (Merck. Darmstadas, Vokietija). Gelis pildomas 6,5 µl pagamintu etidžio bromido (Sigma - Aldrich, St. Louis, Germany) tirpalu, viskas gerai išmaišoma, pilama į specialų plastikinį rėmą ir laukiama kol supiltas gelis sustings. Sustingus geliui labai atsargiai išimamos šukutės, kurios gelyje padarė šulinėlius. Rėmas su geliu dedamas į elektroforezės vonelę, kuri pripildyta buferiniu tirpalu (1 x TAE buferis), maišytu su 13 µl etidžio bromido tirpalu. Tirpalas turi pilnai apsemti rėmą.

Pirmas ir paskutinis šulinėlis užpildytas bazių porų žymeklio po 3 µl (markerio) (Sigma - Aldrich, St. Louis, Germany), o visi kiti šulinėliai užpildyti po 8 µl PGR produkto. Reakcijos metu buvo naudotos dvi kontrolės: teigiama - *L. lactis* ATCC 11454 padermė ir neigiama - distiliuotas vanduo. Elektroforezė vykdoma 50 min. leidžiant 100 V elektros srovę. Atlikus elektroforezę gelis buvo fotografuotas „Uvitec“ aparatu.

2.3.4 *L. lactis* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

Vertinant *L. lactis* atsparumą antimikrobinėms medžiagoms buvo taikytas E - testas naudojant 9 antibiotikų (vankomicino (VA), ampicilino (AMP), gentamicino (CN), kanamicino (K), streptomicino (S), eritromicino (E), klindamicino (CD), tetraciklino (TE), chloramfenikolio (C)) minimalios slopinančios koncentracijos (MSK) juosteles (Liofilchem, Italija). Tyrimo metu buvo vertinama susidariusi skaidri zona aplink juostelę, kuri parodo minimalią antimikrobinių medžiagų koncentraciją, slopinančią bakterijų augimą. Kiekvienas antibiotikas turėjo koncentracijos diapazoną: vankomicino 0,016 - 256 µg/ml, ampicilino 0,016 - 256 µg/ml, gentamicino 0,016 - 256 µg/ml, kanamicino 0,016 - 256 µg/ml, streptomicino 0,064 - 1024 µg/ml, eritromicino 0,016 - 256 µg/ml, klindamicino 0,016 - 256 µg/ml, tetraciklino 0,016 - 256 µg/ml, chloramfenikolio 0,016 - 256 µg/ml.

Tyrimo metu ant MRS agaro (Biolife, Milan, Italija) pasėtos atgaivintos *L. lactis* padermės buvo perkeltos į 5 ml 0,85 proc. natrio chlorido tirpalu (Merck. Darmstadas, Vokietija) užpildytus mėgintuvėlius. Turinys išmaišomas ir atliktas vizualus tankio vertinimas mėgintuvėlių lyginant su

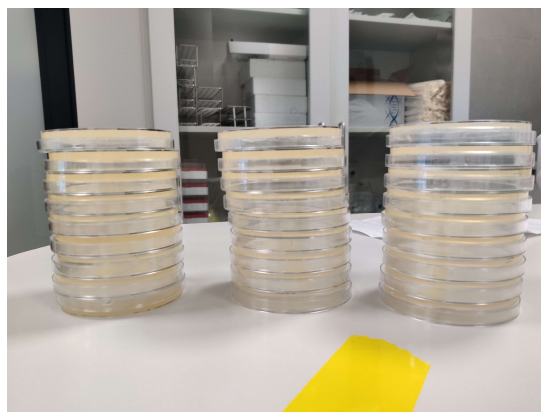
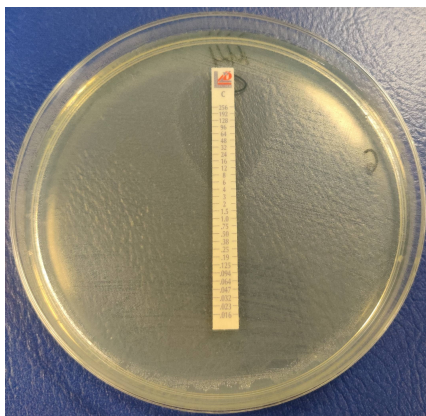
drumstumo standartu - 0,5 McFarland standartas, atitinkantis $1,5 \times 10^8$ ksv/ml bakterijų koncentraciją.

Sekančiame etape steriliu tamponu paruošta kultūra tolygiai brūkšniuojant trimis kryptimis perkeliama ant Mueller - Hinton (Oxoid, Besingstokas, Anglija) agaro Petri lėkščių ir palaikoma 10 - 15 min. kambario temperatūroje, kol kultūra įsigers į agarą. Pincetu švelniai uždedama viena MSK (Liofilchem, Italija) testo juostelė ir paruoštos lėkštelės inkubuojamos 20 val. +37 °C temperatūroje.

Po inkubacinio laiko *L. lactis* atsparumas vertinamas nustatant skaidrios zonos išplitimo ribas aplink MKS (Liofilchem, Italija) testo juostelę. Atsparumas antimikrobinėms medžiagoms buvo tirtas su 3 *L. lactis* padermėmis. Remiantis EFSA duomenimis nustatyti visų naudotų antibiotikų mikrobiologinės ribinės vertės intervalai, pagal kuriuos buvo vertinamas *L. lactis* padermės atsparumas antibiotikui (4 pav). Ribinės vertės pagal antibiotikus: vankomicino 4 µg/ml, ampicilino 2 µg/ml, gentamicino 32 µg/ml, kanamicino 64 µg/ml, streptomicino 32 µg/ml, eritromicino 1 µg/ml, klindamicino 1 µg/ml, tetraciklino 4 µg/ml, chloramfenikolio 8 µg/ml (39) (1 lentelė).

1 lentelė. EFSA duomenimis nustatyti naudotų antibiotikų mikrobiologinės ribinės vertės intervalai (39)

	Antibiotikas								
	VA	AMP	CN	K	S	E	CD	TE	C
Ribinės antibiotikų ribos pagal EFSA rekomendacijas	4 µg/ml	2 µg/ml	32 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml



4 pav. *L. lactis* atsparumo antimikrobinėms medžiagoms nustatymas E - testu (darbo autorės nuotrauka)

2.4 Statistinė duomenų analizė

Atlikto tyrimo duomenų analizei buvo naudotos *Microsoft Office Excel* ir „*SPSS Statistics 20.0*“ programos. Taikyta aprašomoji statistika skaičiuojant *L. lactis* padermių koncentracijų vidurkius prieš kiekvieną antibiotiką, mažiausias ir didžiausias reikšmes. Atlikta ANOVA dispersinė analizė naudojant Fišerio LSD kriterijų. Rezultatai laikomi statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,001$. Rezultatai nėra statistiškai reikšmingi, kai $p \geq 0,05$.

3. TYRIMO REZULTATAI

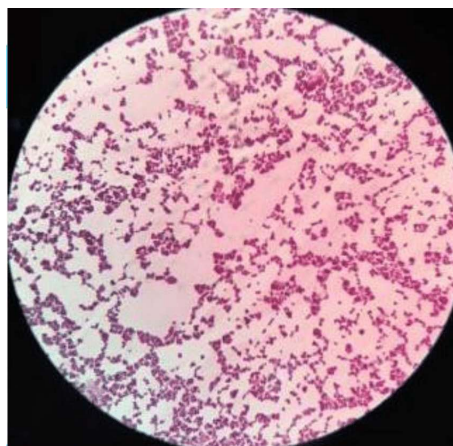
3.1 *Lactococcus* spp. padermių išskyrimas ir *L. lactis* identifikavimas iš žuvies

L. lactis išskyrimui iš žuvies produkcijos buvo pasirinktos 3 skirtingos žuvies rūšys, kurių vidaus organuose buvo ieškotos pieno rūgšties bakterijos. Pirmą dieną tyrimui atlikti naudoti europinio šapalo vidaus organai, kurie pasėti ant 16 PCA agaro lėkštelių ir 48 val. inkubuoti optimalioje *Lactococcus* spp. augimo temperatūroje (+37 °C). Kitą tyrimo dieną bakterijos išskiriamos iš paprastosios raudės vidaus organų. Gauti mėginiai pasėti ant 17 PCA agaro lėkštelių ir tokiais pačiomis sąlygomis inkubuojami. Paskutiniai mėginiai imti iš paprastosios kuojos vidaus organų, iš kurių gauti mėginiai pasėti ant 12 lėkštelių ir inkubuoti 48 val. +37 °C temperatūroje. Po inkubacinio laiko lėkštelėse aptikus *Lactococcus* spp. kolonijas, kelis kartus atlikti persėjimai. Jų metu iš 45 ant PCA agaro pasėtų mėginių *Lactococcus* spp. pasitvirtino 36 mėginiuose. Iš 16 europinio šapalo vidaus organų imtų mėginių *Lactococcus* spp. nustatytos 9 mėginiuose, iš 17 paprastosios raudės paimtų ir pasėtų ant PCA agaro *Lactococcus* spp. nustatytos 16 mėginių, o iš 12 paprastosios kuojos mėginių *Lactococcus* spp. pasitvirtino 11 mėginių (2 lentelė).

2 lentelė. *L. lactis* išskyrimui iš žuvies produkcijos gautų mėginių skaičius

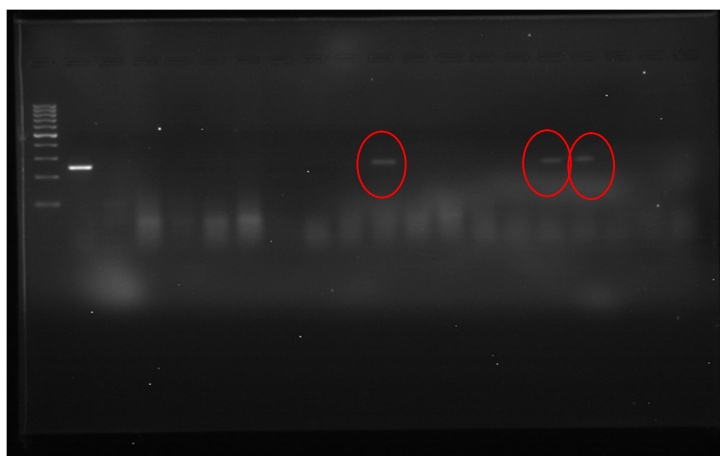
Žuvies rūšis iš kurios imtas mėginys	Tirtas mėginių skaičius	<i>Lactococcus</i> spp. mėginių skaičius	Mėginių skaičius, kuriuose dažant Gramo būdu, mikroskopuojant, nustatytos <i>Lactococcus</i> spp.	<i>L. lactis</i> teigiamų mėginių skaičius
Europinis šapalas	16 (35 proc.)	9 (20 proc.)	9 (20 proc.)	0 (0 proc.)
Paprastoji raudė	17 (38 proc.)	16 (35 proc.)	16 (35 proc.)	1 (2 proc.)
Paprastoji kuoja	12 (27 proc.)	11 (25 proc.)	11 (25 proc.)	2 (5 proc.)
VISO	45 (100 proc.)	36 (80 proc.)	36 (80 proc.)	3 (7 proc.)

Atrinktus mėginius dažius Gramo būdu jie mikroskopuoti ir vizualiai ieškotos *Lactococcus* spp. Visuose 36 mėginiuose buvo pastebėtos *Lactococcus* spp. būdingos savybės: rutulio formos, kurios aptinkamos pavienės arba trumpose kokių grandinėlose (5 pav.).



5 pav. Gramo būdu dažyta *Lactococcus* spp. (100x) (40)

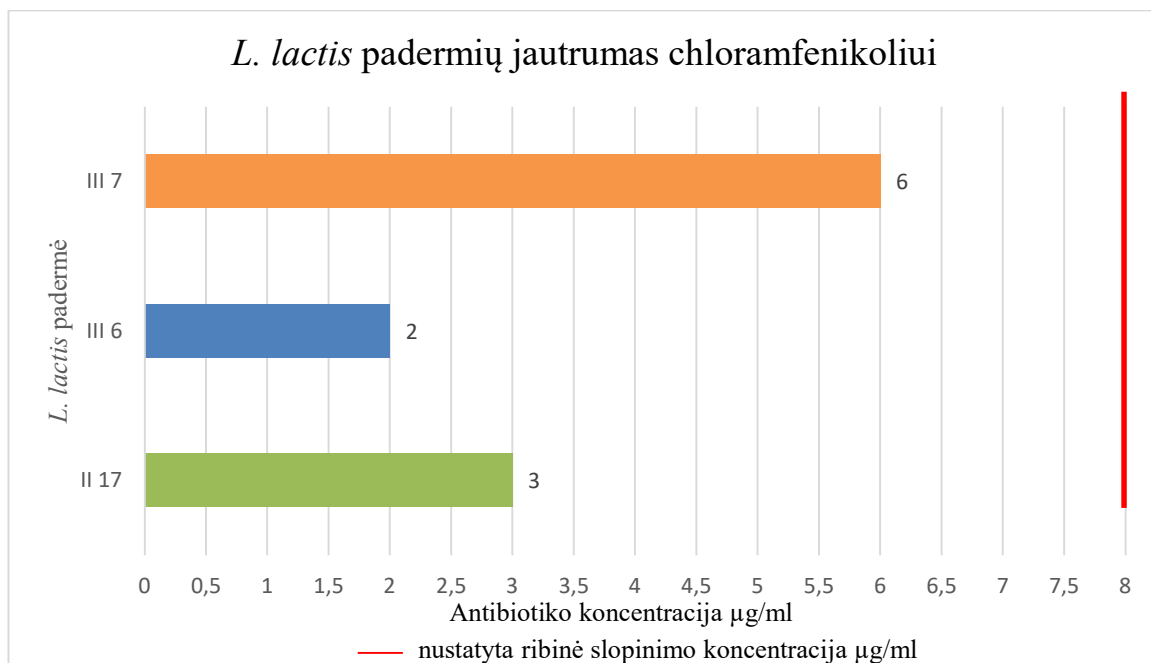
Atliekant *L. lactis* identifikavimą iš visų turimų mėginių išskirtas DNR ir atliktas polimerazės grandininės reakcijos metodas. PGR tyrimo metu, rūšiai specifiniais pradmenimis, buvo patvirtintos tik 3 padermės iš 36, kurios priklauso *L. lactis* rūšiai. Tyrimo metu gauti specifiniai 380 bp amplifikavimo produktai (6 pav.). *L. lactis* bakterijos patvirtintos iš paprastosios raudės (1 mėginys) ir paprastosios kuojos (2 mėginiai).



6 pav. Gelio nuotrauka „Uvitec“ aparatu, rodanti tris identifikuotas *L. lactis* padermes (darbo autorės nuotrauka)

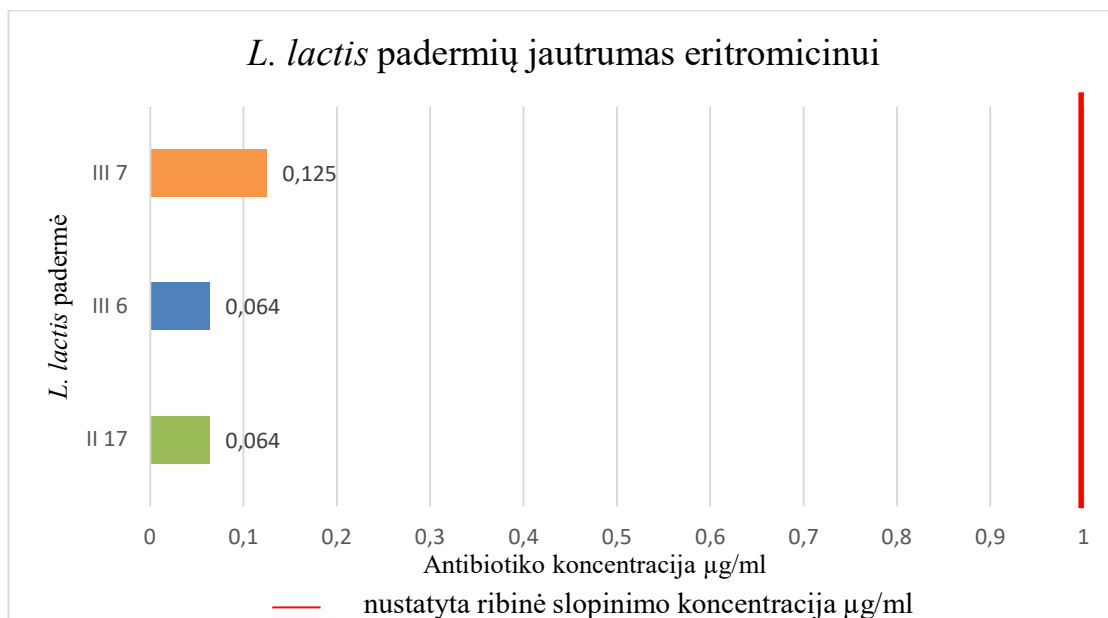
3.2 *L. lactis* atsparumas antimikrobinėms medžiagoms

Vertinant *L. lactis* jautrumą chloramfenikoliui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 2 µg/ml iki 6 µg/ml ir nei viena iš trijų padermių neviršijo 8 µg/ml nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija 3,6 µg/ml ($p < 0,001$) (7 pav.).



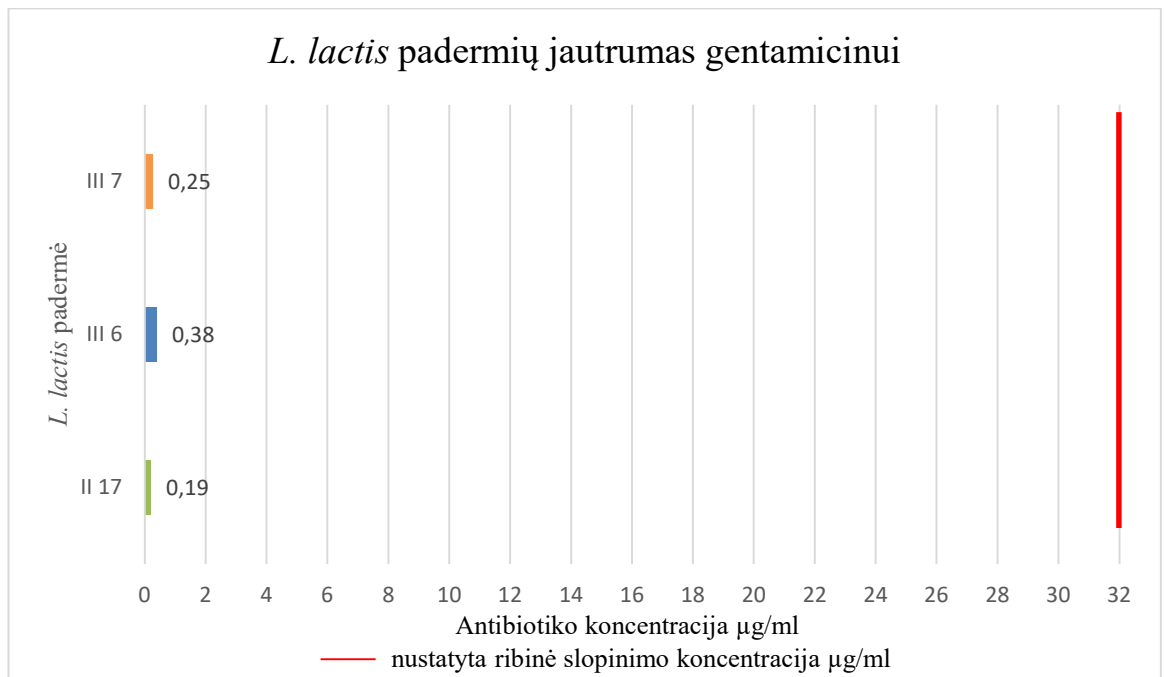
7 pav. *L. lactis* padermių jautrumas chloramfenikoliui

Tiriant *L. lactis* jautrumą eritromicinui, nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 0,064 µg/ml iki 0,125 µg/ml ir nei viena iš trijų padermių neviršijo 1 µg/ml nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija 0,084 µg/ml ($p < 0,001$) (8 pav.).



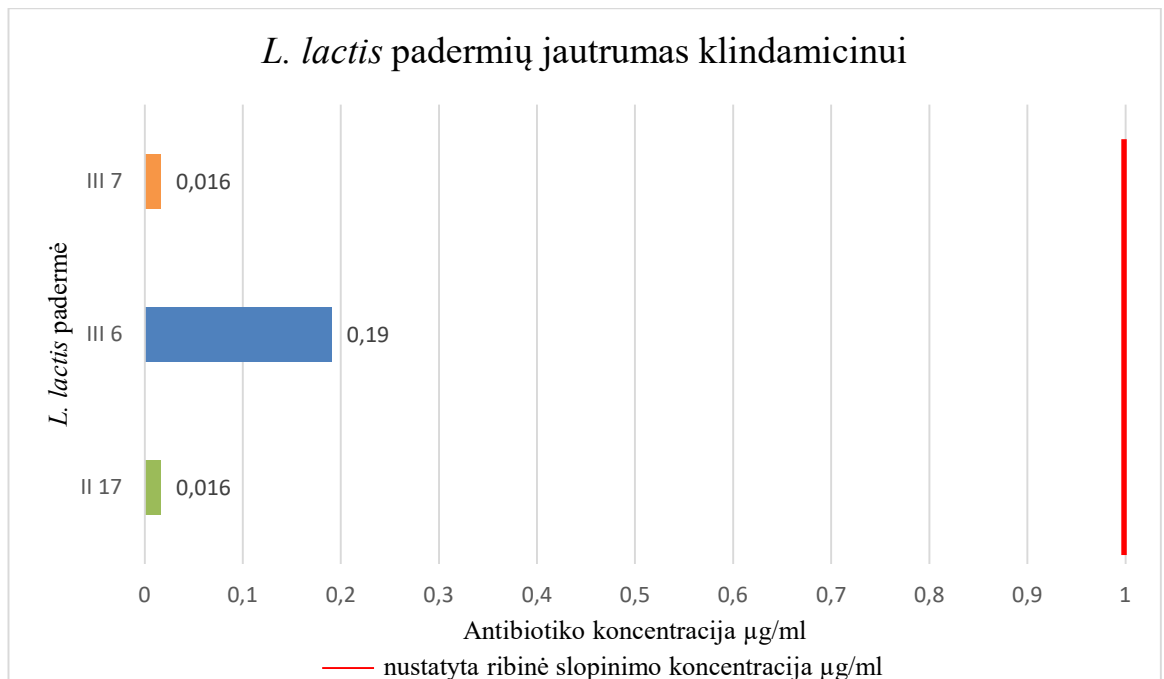
8 pav. *L. lactis* padermių jautrumas eritromicinui

Vertinant *L. lactis* jautrumą gentamicinui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 0,19 µg/ml iki 0,38 µg/ml ir nei viena padermė neviršijo 32 µg/ml nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų trijų padermių minimali slopinama koncentracija 0,273 µg/ml ($p < 0,001$) (9 pav.).



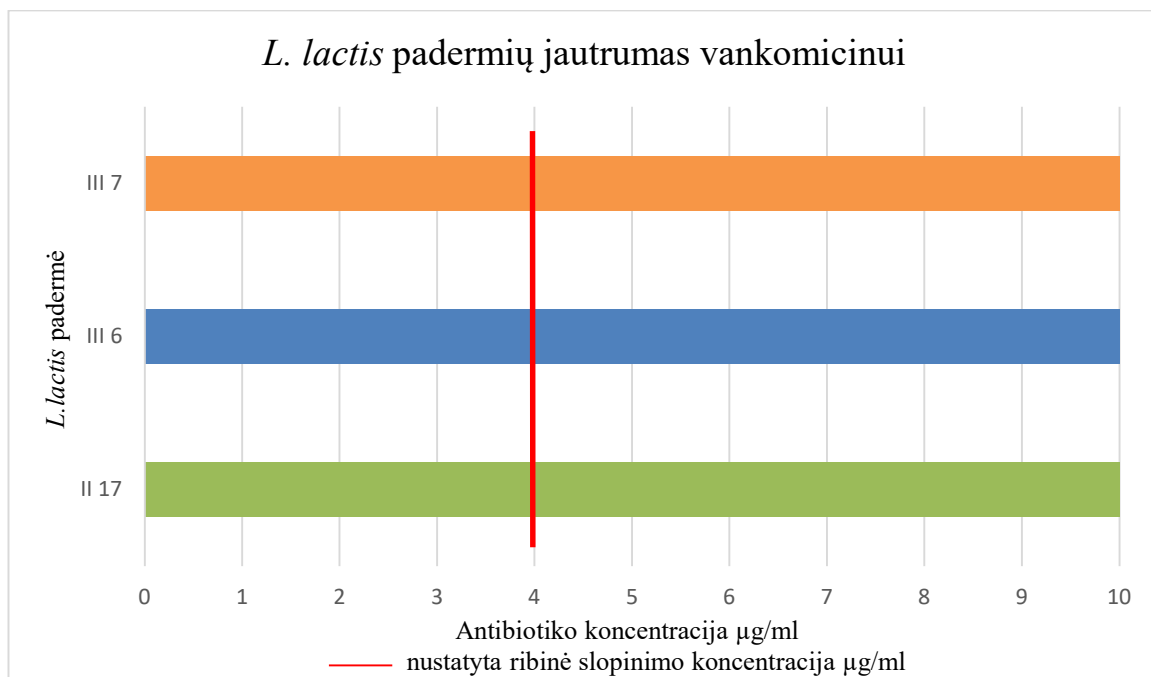
9 pav. *L. lactis* padermių jautrumas gentamicinui

Tiriant *L. lactis* padermių jautrumą klindamicinui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 0,016 µg/ml iki 0,19 µg/ml ir nei viena iš trijų padermių neviršijo 1 µg/ml nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija siekė 0,074 mg/l ($p < 0,001$) (10 pav.).



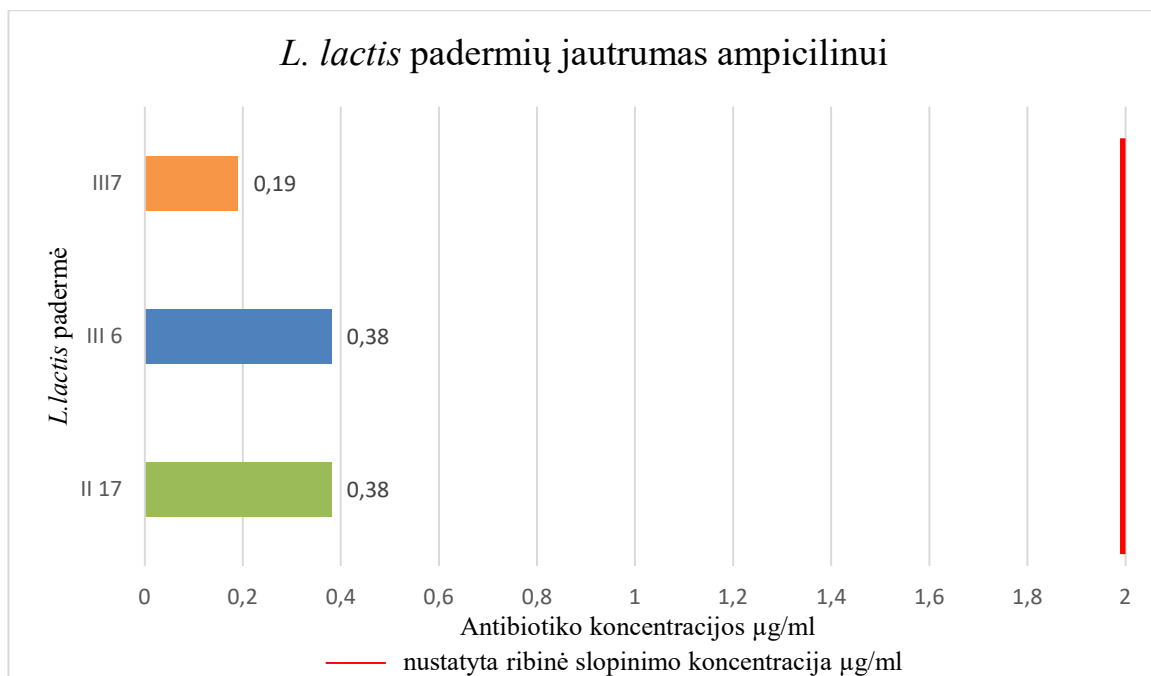
10 pav. *L. lactis* padermių jautrumas klindamicinui

Tiriant *L. lactis* jautrumą vankomicinui nustatyta, kad visos padermės buvo atsparios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių siekė 256 µg/ml ir visos trys padermės viršijo 4 µg/ml nustatytą ribinę vertę ($p \geq 0,05$) (11 pav.).



11 pav. *L. lactis* padermių jautrumas vankomicinui

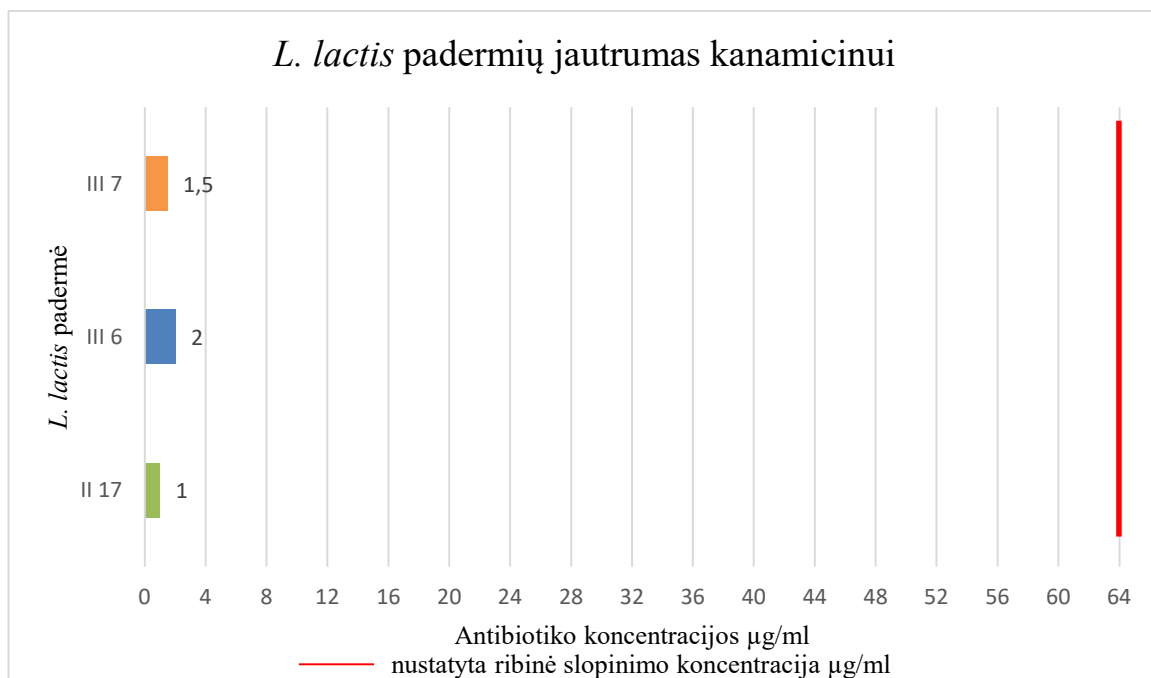
Vertinant *L. lactis* jautrumą ampicilinui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 0,19 $\mu\text{g/ml}$ iki 0,38 $\mu\text{g/ml}$ ir nei viena iš trijų padermių neviršijo 2 $\mu\text{g/ml}$ nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija 0,316 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) (12 pav.).



12 pav. *L. lactis* padermių jautrumas ampicilinui

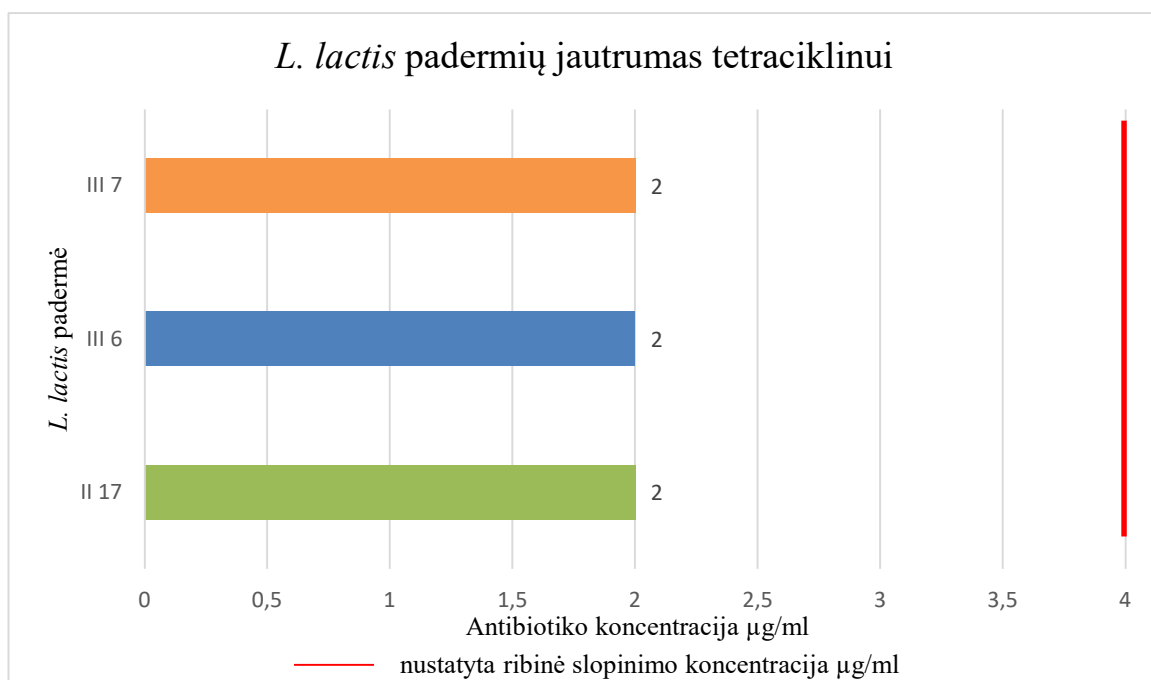
Tiriant *L. lactis* jautrumą kanamicinui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 1 $\mu\text{g/ml}$ iki 2 $\mu\text{g/ml}$ ir nei

viena iš trijų padermių neviršijo 64 $\mu\text{g/ml}$ nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija 1,5 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) (13 pav.).



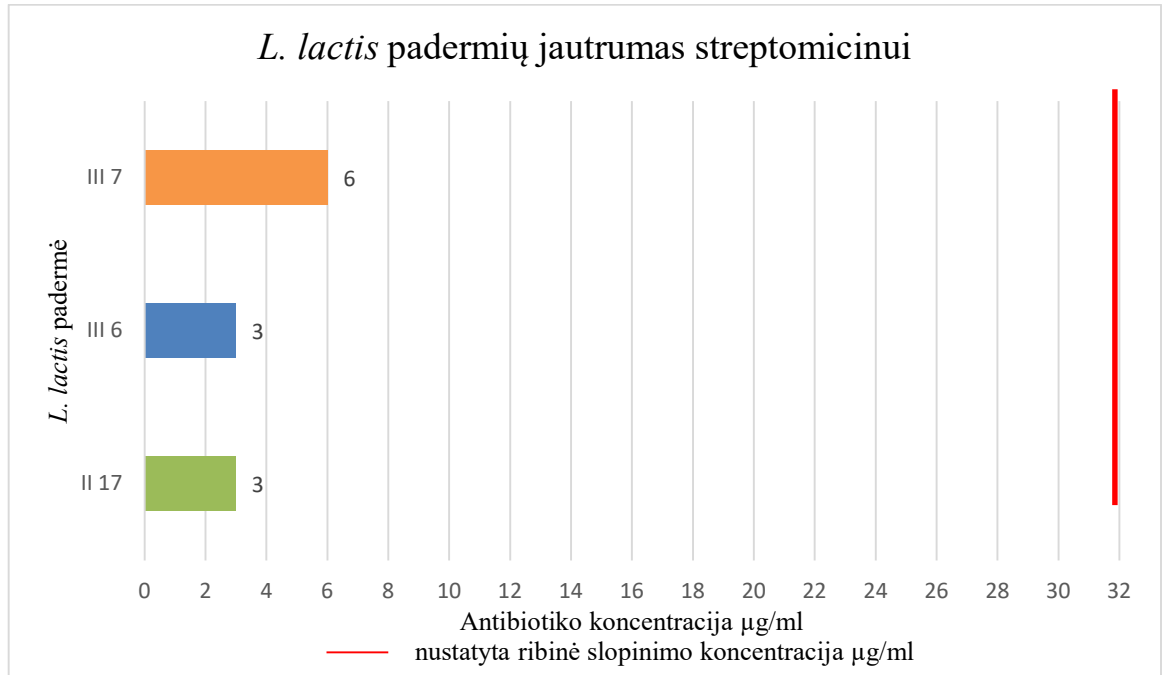
13 pav. *L. lactis* padermių jautrumas kanamicinui

Tiriant *L. lactis* jautrumą tetraciklinui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių gauta vienoda - 2 $\mu\text{g/ml}$ ir nei viena iš trijų padermių neviršijo 4 $\mu\text{g/ml}$ nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija 2 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,001$) (14 pav.).



14 pav. *L. lactis* padermių jautrumas tetraciklinui

Vertinant *L. lactis* jautrumą streptomycinui nustatyta, kad visos padermės buvo jautrios šiam antibiotikui. MSK koncentracija tarp tirtų *L. lactis* padermių svyravo nuo 3 µg/ml iki 6 µg/ml ir nei viena iš trijų padermių neviršijo 32 µg/ml nustatytos ribinės vertės. Vidutinė visų tirtų padermių minimali slopinama koncentracija 4 µg/ml ($p < 0,001$) (15 pav.).



15 pav. *L. lactis* padermių jautrumas streptomycinui

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Pastaraisiais metais žuvininkystė tapo viena greičiausiai augančių pramonės šakų, todėl labiau pradėtos nagrinėti žuvų savybės. Viena iš įdomių tyrimo sričių - PRB ieškojimas žuvyje bei šių bakterijų savybių nustatymas. Nors PRB paprastai nėra laikoma komensalinės žuvies mikrobiotos dalimi, šio tyrimo metu įvertinus 3 žuvies rūšių (europinio šapalo, paprastosios raudės, paprastosios kuojos) vidaus organus, *Lactococcus* spp. buvo išskirtos 36 mėginių (80 proc.) bakterijos. PGR metodo pagalba buvo identifikuotos 3 (7 proc.) *L. lactis* padermės, kas leidžia manyti, jog PRB gali būti išgaunama ir iš žuvies produkcijos.

Informaciją apie tai, kad pienarūgštės bakterijos aptinkamos žuvyse, nurodo ir kiti moksliniai tyrimai, kuomet PRB buvo išskirtos iš karpių žarnyno turinio. Vėliau mokslininkai išskirtomis *L. lactis* bakterijomis pildė žuvų pašarą, siekiant pastebėti poveikį augimui ir žuvų atsparumą ligoms, nes patogenų sukeltos ligos padidina auginamų vandens gyvūnų mirtingumą ūkiuose ir sukelia didžiulius ekonominius nuostolius. Rezultatai parodė, kad PRB padermės gali veiksmingai išgyventi virškinimo trakto sąlygomis ir turėti stiprų antibakterinį poveikį. Rodikliai, skirti įvertinti galimų probiotikų poveikį auginimui, parodė išskirtų *L. lactis* bakterijų gebėjimą pagerinti augimą ir vandens gyvūnų sveikatą (41).

Kiti mokslininkai nurodo, kad PRB buvo išskirtos ir iš nelaisvėje laikomo paprastojo delfino tiesiosios žarnos turinio. Papildomi tyrimai parodė, kad kai kurios *L. lactis* padermės gali išgyventi žinduolių virškinamajame trakte, todėl *L. lactis* padermės taip pat gali egzistuoti banginių šeimos gyvūnų virškinimo trakte kaip natūrali mikroflora (40).

Kadangi probiotikų vartojimas yra vienas iš būdų pakeisti antibiotikus, jie laikomi vienu iš galimų veiksmingiausių antibiotikų pakaitalų. Žinoma, jog ilgalaikis antibiotikų naudojimas gali sugriauti mikroekologinę pusiausvyrą ir sumažinti imunines organizmų funkcijas, taip pat antibiotikams atsparių padermių atsiradimas gali padidinti antibiotikų vartojimą, todėl labai svarbu išnagrinėti naudojimą *L. lactis* padermių saugą, nes tai turi įtakos žmonių sveikatai (42).

2020 metais buvo atliktas tyrimas, kurio metu taip pat buvo vertinamas *L. lactis* padermių jautrumas prieš tokius pat 9 antibiotikus, tačiau padermės buvo išskirtos ne iš žuvies, o iš pieno kilmės produktų. Atsparumo antibiotikams įvertinimas atskleidė didelį skirtumą tarp *L. lactis* padermių. Aštuonios tirtos *L. lactis* padermės parodė atsparumą antibiotikui streptomycinui, viršijus Europos maisto saugos tarnybos nustatytą 32 µg/ml jautrumo ribą. Kai kurios *L. lactis* padermės buvo atsparios ir tetraciklinui ir viršijo EFSA nurodomą 6 µg/ml jautrumo ribą (43).

Mūsų tyrimo metu, norint išsiaiškinti *L. lactis* mikrobiologinės saugos galimybes, buvo vertinamas išskirtų padermių jautrumas 9 antimikrobinėms medžiagoms (vankomicinui, ampicilinui, gentamicinui, kanamicinui, streptomycinui, eritromicinui, klindamicinui, tetraciklinui,

chloramfenikoliui) naudojant E - testo juosteles. Nustatėme, kad *L. lactis* padermės, išskirtos iš žuvies vidaus organų, buvo atsparios vankomicinui ir ženkliai viršijo pagal EFSA rekomendacijas nustatytą 4 µg/ml jautrumo ribą. Prieš visus kitus 8 antibiotikus išskirtos padermės buvo jautrios. Tokie rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad ir pačios PRB gali būti vertinamos kaip atsparumą antimikrobinėms medžiagoms platinančios bakterijos bei ateityje gali sukelti didesnę antibiotikams atsparių padermių atsiradimą.

Vertinant išskirtų *L. lactis* padermių jautrumą antibiotikams rezultatai parodė, kad didžiajai daliai (88 proc.) tirtų antibiotikų *L. lactis* yra jautrios ir galėtų būti priskiriamos prie saugių vartoti, tačiau atsparumas vankomicinui skatina atsakingiau daryti tokią prielaidą. Ateityje reikalingi papildomi tyrimai, siekiant įvertinti *L. lactis* padermių galimas mikrobiologinės saugos galimybes.

IŠVADOS

1. *Lactococcus* spp. bakterijos buvo nustatytos 36 (80 proc.) žuvų (europinio šapalo, paprastosios raudės, paprastosios kuojos) organų mėginiuose iš 45 mėginių:

1.1. Dažniausiai *Lactococcus* spp. buvo nustatytos paprastosios raudės vidaus organų mėginiuose (16 mėginių (94 proc.) iš 17 mėginių). Panašus PRB bakterijų paplitimas nustatytas ir paprastosios kuojos vidaus organų mėginiuose (11 mėginių (92 proc.) iš 12 mėginių). Kiek rečiau PRB aptiktos europinio šapalo vidaus organų mėginiuose (9 mėginių (56 proc.) iš 16 mėginių).

2. Polimerazės grandininės reakcijos metodu, nustatant specifinį 380 bp dydžio DNR fragmentą, identifikuotos 3 (7 proc.) *L. lactis* padermės iš 36 vertintų PRB padermių.

3. Vertinant išskirtų *L. lactis* padermių mikrobiologinės saugos galimybes nustatėme, kad bakterijos pasižymėjo jautrumu 88 proc. (8 iš 9) tirtų antibiotikų ($p < 0,001$), o 12 proc. (1 iš 9) buvo atsparios ($p \geq 0,05$):

3.1. Visos trys išskirtos *L. lactis* padermės buvo jautrios ampicilinui, gentamicinui, kanamicinui, streptomycinui, eritromicinui, klindamicinui, tetraciklinui ir chloramfenikoliui;

3.2. Visos trys išskirtos *L. lactis* padermės buvo atsparios vankomicinui ženkliai viršijant nurodomą 4 µg/ml jautrumo ribą (nustatyta MSK visoms padermėms siekė 256 µg/ml).

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Moradi M, Seyede A. K, Almasi H, Alizadeh A, Guimarães J, Nurten Y, Lotf A. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: the next frontier in food safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2020; 3390-3415.
2. Soundharajan I, Yoon H. Y, Muthusamy K, Jung J, Ouk - Kyu H, Ki Choon C. Isolation of *Lactococcus lactis* from whole crop rice and determining its probiotic and antimicrobial properties towards gastrointestinal associated bacteria. *Microorganisms*. 2021; 9(12), 2513.
3. Gemechu T. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science*. 2015; 9(4): 170-175.
4. LuanNguyen T, Chan I, Do - HyungKim. Improved growth rate and disease resistance in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, by probiotic *Lactococcus lactis* WFLU12 isolated from wild marine fish. *Aquaculture*. 2017; 113-120.
5. Aidara - Kanel A, Angulo F, Conly J, Minato Y, Silbergeld E, McEwen S, Collignon P, WHO guideline development group. World Health Organization (WHO) guidelines on use of medically important antimicrobials in food producing animals. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2018.
6. Arqués J. L, Rodríguez E, Langa S, Landete M. J, Medina M. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: effect on pathogens. *BioMed Research International*. 2015.
7. Parada J, Caron C, Medeiros A, Soccol C. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal*. 2007; 50: 521-542.
8. Rattanachaikunsopon P, Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research*. 2010; 1(4): 218-228.
9. Mokoena M. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini - review. *Molecules*. 2017; 22(8): 1-13.
10. Hamed I, Özogul F. The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Food Science and Nutrition*. 2018; 58(10): 1660-1670.
11. Kongo J. Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. 2012.
12. Widyastuti Y, Rohmatussoliha, Febrisiantosa A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. *Food and Nutrition Sciences*. 2014; 5: 435-442.

13. Cameron D, Hock Q, Kadim M, Mohan N, Ryoo E, Bhupinder S, Yuichiro Y, Jie C, Hoekstra H, Guarino A. Probiotics for gastrointestinal disorders: proposed recommendations for children of the Asia pacific region. *World Journal of Gastroenterology*. 2017; 23(45): 7952-7964.
14. Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B. Eating fermented: health benefits of LAB fermented foods. *Foods*. 2021; 10(11), 2639.
15. Jeong J, Chang L, Chung D. Probiotic lactic acid bacteria and skin health. *Food Science and Nutrition*. 2013; 2331-2337.
16. Naidu A. S, Bidlack W. R, Clemens R. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Food Science and Nutrition*. 2010; 13-126.
17. Vinusha Sri K, Deepika K, Johnson S. T, Agrawal G. K, Rakwal R. Proteomic studies on lactic acid bacteria: a review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2018; 14: 140-148.
18. Wicinski M, Gebalski J, Gołbiewski J, Malinowski B. Probiotics for the treatment of overweight and obesity in humans: a review of clinical trials. *Microorganisms*. 2020; 8(8): 1148.
19. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri M. E. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutrition*. 2013; 2013: 481651.
20. N'tcha C, Sina H, Pierre A, Kayodé P, Gbenou J. D, Baba - Moussa L. Antimicrobial activity and chemical composition of “Kpètè - Kpètè”: a starter of benin traditional beer tchoukoutou. *BioMed Research International*. 2017.
21. Junchang F, Xulu C, Yuru Z, Xiao Y, Jianxin Z, Guoxing N. Effects of *Lactococcus lactis* from *Cyprinus carpio* L. as probiotics on growth performance, innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019; 73-81.
22. Castellone V, Bancalari E, Rubert J, Gatti M, Neviani E, Bottari B. Eating fermented: health benefits of LAB fermented foods. *Foods*. 2021; 10(11), 2639.
23. Suzuki A, Suzuki M. Antimicrobial activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from a stranded cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) against gram positive and gram negative bacteria. *Microorganisms*. 2021; 9(2), 243;
24. Collins W. J, O'Connor M. P, O'Sullivan O, Gómez - Sala B, Rea M, Hill C, Ross R. Bacteriocin gene trait matching across the complete *Lactobacillus* pan genome. *Scientific Reports*. 2017; 7:3481.
25. Carson D, Barkema H, Naushad S, De Buck Jeroen. Bacteriocins of non-aureus staphylococci isolated from bovine milk. 2017; Sep 1; 83(17): e0101517.

26. Umu C. O, Bäuerl C, Oostindjer M, Pope P. B, Hernández P. E, Pérez - Martínez G, Diep D. B. The potential of class II bacteriocins to modify gut microbiota to improve host health. *Plos One*. 2016; 11(10).
27. Lagha A. B, Haas B, Gottschalk M, Grenier D. Antimicrobial potential of bacteriocins in poultry and swine production. *Veterinary Research*. 2017; 48:22.
28. Furtado D, Todorov S, Landgraf M, Destro M; Franco B. Bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DF04Mi isolated from goat milk: characterization of the bacteriocin. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 2014; 45(4): 1541-1550.
29. Laroute V, Tormo H, Couderc C, Mercier - Bonin M, Bourgeois Le P, Cocaïgn - Bousquet M, Daveran M. From genome to phenotype: an integrative approach to evaluate the biodiversity of *Lactococcus lactis*. *Microorganisms*. 2017; 5(2): 27.
30. Wegmann U, O'Connell - Motherway M, Zomer A, Buist G, Shearman C, Canchaya C, Ventura M, Goesmann A, Gasson J, Kuipers O, Douwe S, Kok J. Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *Journal of Bacteriology*. 2007; 189(8): 3256-3270.
31. Tormo H, Lekhal A, Roques C. Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from raw goat milk and effect of farming practices on the dominant species of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 2015; 210: 9-15.
32. Ai - Lian Song A, Lionel L. A, Lim E. H, Rahim R. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. *Microbial Cell Factories*. 2007; 16:55.
33. Soomro A. H, Masud T, Kiran A. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health - a review. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2002; 20-24.
34. Jingsong Y, Donghui M, Wen Q, Yaowen L. Physical and antibacterial properties of sodium alginate - sodium carboxymethylcellulose films containing *Lactococcus lactis*. *Molecules*. 2018.
35. Sarika A, Lipton A, Aishwarya M, Dhivya R. Isolation of a bacteriocin producing *Lactococcus lactis* and application of its bacteriocin to manage spoilage bacteria in high value marine fish under different storage temperatures. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 167: 1280-1289.
36. Shuxin Z, Yu X, Chongmiao Z, Weihua C. Isolation of marine *Bacillus* spp. with antagonistic and organic substances degrading activities and its potential application as a fish probiotic. *Marine Drugs*. 2018; 16(6): 196.
37. Sequeiros C, Garcés M. E, Marisol V, Marguet E, R, Olivera N. L. Potential aquaculture probiont *Lactococcus lactis* TW34 produces nisin Z and inhibits the fish pathogen *Lactococcus garvieae*. *Archives of Microbiology*. 2015; 197(3): 449-58.

38. Moschetti G, Blaiotta G, Villani F, Coppola S. Nisin - producing organisms during traditional “For di latte” cheese - making monitored by multiplex - PCR and PFGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 63 (1-2): 109-116.
39. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance EFSA panel on additives and products or substances used in animal feed (FEEDAP) 3,4 European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy Endorsed for public consultation on 1 February 2012.
40. Rozila A, Nizam M, Jyusmi M, Kashim Z, Ibrahiml A. Potential antibacterial property of cell free supernatant (cfs) *lactococcus* isolates from local goat’s milk against *staphylococcus aureus*, *staphylococcus epidermis* and *escherichia coli*. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*. 2018; 2321-8991.
41. Millette M, Smoragiewicz W, Lacroix M. Antimicrobial potential of immobilized *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 against selected bacteria. *Journal of Food Protection*. 2004; 1184-1189.
42. Chuan - Zhong Z, Dong L, Wei - Jun C, Sai-Nan B, Tao L, Hua W, Ming J. Effects of dietary host-associated *Lactococcus lactis* on growth performance, disease resistance, intestinal morphology and intestinal microbiota of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*). *Aquaculture*. 2021; 736702.
43. Kondrotienė K, Laučienė L, Andrulevičiūtė V, Kašetienė N, Šernienė L, Sekmokienė D, Malakauskas M. Safety assessment and preliminary in vitro evaluation of probiotic potential of *Lactococcus lactis* strains naturally present in raw and fermented milk. *Current Microbiology*. 2020; 77(10): 3013-3023.