

sono state valutate su una scala da 0 a 10, e l'ha fatto una commissione di esperti indipendenti (n=10).

Durante tutte le fasi del processo produttivo la predominante popolazione di microbi nella microflora del 'sudjuk' di Bosnia sono stati i batteri di acido lattico (MKB), prevalentemente il *Lactobacillus* spp. La cosa più importante in questa ricerca era l'analisi dettagliata di microflora e MKB del 'sudjuk' durante il processo di fermentazione, e la descrizione della dinamica e la dominazione dei tipi di MKB. Questo senz'altro aiuterà la descrizione e la protezione del 'sudjuk' di Bosnia, il simbolo della tradizione gastronomica e di cultura di quella zona. Le caratteristiche sensoriche preferibili in questa salsiccia, e l'assenza di certi batteri patogeni che si trasmettono tramite il cibo accentuano il procedimento tecnologico della produzione di salsicce come la base delle future ricerche tecnologiche e la determinazione dei procedimenti operativi standard nella produzione di 'sudjuk' di Bosnia. Alla fin fine, gli autoctoni isolati MKB possono servire come la base alle seguenti ricerche molecolari e tecnologiche.

**Parole chiave:** 'sudjuk' di Bosnia, batteri dall'acido lattico, identificazione API, valutazione sensorica

\* The paper was presented at First European Food Congress, 4-8 November 2008, Ljubljana, Slovenia.

## REFERENCES

Andrighetto, C., De Dea, P., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti L., Giraffa, G. (1998). Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res Microbiol.* 149(9):631-43.

Fontana, C., Sandro, C. P., and Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 25;103(2):131-42.

Guarneri, T., Rossetti, L., and Giraffa, G. (2001). Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 33(5):377-81.

Hadzibeganovic, A. (1975). Mikrobiologija mesa i mesnih prerađevina. Univerzitet u Sarajevu, Sarajevo.

Huerta, R., Jordano, R., Medina, L. M., Lopez, C. (2004). Population dynamics of the constitutive biota of French dry sausages in a pilot-scale ripening chamber. *J Food Prot.* 67(10):2306-9.

Kandler, O., i Weiss, N. (1986). Regular, Nonsporing, Gram-Positive Rods. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Volume 2 - Gram-positive *Bacteria* other than *Actinomycetes*). (Holt, J. G., ed.), 1st Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 1208-1260

Rovira, A., Nieto, J. C., Rodriguez, A., Reguera, J. I., Gonzalez, Z. (1997). Characterization and selection of lactobacilli isolated from Spanish fermented sausages. *Microbiologia.* 13(2):201-8.

Samelis, J., Maurogenakis, F., i Metaxopoulos, J. (1994). Characterization of lactic acid bacteria isolated from naturally fermented Greek dry salami. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 2, 179-196.

Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., Pappa, A. (1998). Stability and safety of traditional Greek Salami – a microbiological ecology study. *Int. J. Food Microbiol.* 44, 1-2, 69-82.

Schleifer, K. H. (1986). Gram-Positive Cocci. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Volume 2 - Gram-positive *Bacteria* other than *Actinomycetes*). (Holt, J. G., ed.), 1st Edition, Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 999-1100.

Received: February, 2, 2009

Accepted: March, 10, 2009

# ANTIMIKROBNA REZISTENCIJA BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE IZ HRANE

Zdolec<sup>1</sup>, N., L. Kozačinski<sup>1</sup>, M. Hadžiosmanović<sup>1</sup>, I. Filipović<sup>1</sup>, B. Njari<sup>1</sup>

## SAŽETAK

Bakterije mliječne kiseline imaju veliko značenje u higijeni i tehnologiji hrane. Poznati su njihovi pozitivni učinci

na zdravlje ljudi (zdravstvene tvrdnje; probiotici), zatim antimikrobni učinci prema štetnim bakterijama (sintetiziranjem antimikrobnih tvari; organskih kiselina, bakteriocina i

<sup>1</sup> Dr.sc. Nevijo Zdolec, znanstveni novak-viši asistent; Dr.sc. Lidija Kozačinski, izvanredna profesorica; Dr.sc. Mirza Hadžiosmanović, redoviti profesor; Ivana Filipović, dr.vet.med., znanstvena novakinja-asistentica; Dr.sc. Bela Njari, redoviti profesor; Zavod za higijenu i tehnologiju animalnih namirnica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10000 Zagreb; e-mail:nzdolec@vef.hr

dr.), te tehnološke prednosti koje se koriste u razvoju proizvoda (senzorna svojstva). S druge strane, novija saznanja upozoravaju na rizik zbog otpornosti «bezopasnih» bakterija mliječne kiseline na antibiotike, posebno zbog horizontalnog prijenosa rezistencije na patogene bakterije. U procjeni sigurnosti potencijalnih starter i probiotskih kultura nezaobilazan je postupak detekcije prenosivih gena odgovornih za antimikrobnu rezistenciju.

**Gljučne riječi:** bakterije mliječne kiseline, antimikrobna rezistencija, hrana

## UVOD

Početak „ere antibiotika“ tridesetih godina prošlog stoljeća ponudio je nova rješenja za suzbijanje prijetećih bakterijskih bolesti ljudi i/ili životinja. Međutim, davanje „čudotvornog“ lijeka u profilaksi, nepoznavanje stvarnog uzročnika bolesti, nepravilno doziranje, neprimjereno trajanje terapije i slične nepravilnosti uvjetovalo je pojavu otpornosti bakterija prema antibioticima, što je danas jedan od gorućih problema u (veterinarskom) javnom zdravlju (Teuber, 2001; Zdolec i sur., 2006). Najveći značaj pripisuje se pojavi antimikrobne rezistencije u klinički značajnih bakterija, no danas je postalo jasno da i

bakterije komenzali mogu biti nosioci „rezistentnih“ gena koje mogu prenositi na patogene bakterijske vrste (Mathur i Singh, 2005). U posljednje vrijeme se u tom smislu sve više potvrđuju bakterije mliječne kiseline iz hrane, što iziskuje stalno praćenje rezistencije u prirodnoj mikroflori hrane, kao i starter kulturama. U kontekstu sigurnosti primjene bakterija mliječne kiseline u proizvodnji hrane Bernardeau i sur. (2008) ističu da je prijenos antimikrobne rezistencije na druge bakterije jedini relevantni razlog za oprez.

## BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE I REZISTENCIJA

Iako se bakterijama mliječne kiseline podrijetlom iz hrane pripisuje GRAS status (engl. Generally Regarded As Safe), ipak se sve više upozorava na rizičan prijenos antimikrobne rezistencije na crijevnu mikrofloru ljudi, uključujući patogene bakterije (Mathur i Singh, 2005). Posljednjih godina najčešće se antimikrobna rezistencija bakterija mliječne kiseline iz hrane prati i potvrđuje kod enterokoka (posebno *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*), a visoka prevalencija multirezistentnih sojeva glavnim činiteljem rizika (Mathu i Singh, 2005). Nedavno istraživanje Kolumana i sur. (2009) potvrđuje i

▼ **Tablica 1.** Enterokoki iz hrane (n=100) i antimikrobna rezistencija (Koluman i sur., 2009)

▼ **Table 1.** Food enterococci (n=100) and antibiotic resistance (Koluman et al., 2009)

Vrsta antibiotika Antibiotic	Rezistencija (%) Resistance (%)	Vrsta antibiotika Antibiotic	Rezistencija (%) Resistance (%)
Sulfametoksazol Sulphamethoxazole	74	Trimetoprim/ sulfametoksazol Trimethoprim/sulphamethoxazole	16
Meticilin Methicillin	64	Amoksicilin Amoxicillin	16
Polimiksin B Polymyxin B	62	Tetraciklin Tetracycline	14
Novobiocin Novobiocin	44	Linkomicin Lincomycin	14
Furazolidon Furazolidone	38	Oksitetraciklin Oxytetracycline	12
Gentamicin Gentamycin	24	Penicilin G Penicillin G	8
Eritromicin Erythromycin	24	Bacitracin Bacitracin	8
Vankomicin Vancomycine	22	Meropenem Meropenem	8
Enrofloksacin Enrofloxacin	18	Ampicilin Ampicillin	2

▼ **Tablica 2.** Broj multirezistentnih sojeva enterokoka iz hrane (n=100) (Koluman i sur., 2009)

▼ **Table 2.** The number of multiple antibiotic resistant strains (n=100) (Koluman et al., 2009)

Broj antibiotika Number of antibiotics	Broj sojeva Number of strains	Broj antibiotika Number of antibiotics	Broj sojeva Number of strains
12	4	5	18
8	8	4	32
7	4	3	22
6	6	2	6

dalje značajnu prisutnost rezistentnih enterokoka u mesu, ribi, gotovoj hrani, sirevima, jogurtu i začinima (Tablica 1 i 2). Također je potrebno naglasiti da procjena zastupljenosti rezistentnih enterokoka i drugih bakterija mliječne kiseline jako ovisi o metodologiji kojom se testira rezistencija, no jasno je da su najpouzdanije molekularne metode odnosno detekcija gena odgovornih za rezistenciju (Temmerman i sur., 2003).

Pored enterokoka, pojava antimikrobne rezistencije i njezin prijenos na druge bakterije moguća je i u ostalih bakterija mliječne kiseline. Profili antimikrobne rezistencije bakterija roda *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bifidobacterium* i *Propionibacterium* poprilično se razlikuju (Ammor i sur., 2007). Za većinu vrsta karakteristična je otpornost na metronidazol, sulfonamide i trimetoprim. Bakterije roda *Lactobacillus*, *Lactococcus* i *Leuconostoc* rezistentne su prema cefoxitinu, za razliku od bifidobakterija. Nadalje, *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp. i *Leuconostoc* spp. pokazuju otpornost prema visokim koncentracijama vankomicina, dok su *Lactococcus* spp. osjetljivi (Ammor i sur., 2007). *Leuconostoc* vrste nisu otporne prema klinički značajnim antibioticima, osim spomenute prirodne otpornosti prema glikopeptidnim antibioticima (Ogier i sur., 2008).

Za laktobacile je utvrđena prirodna otpornost na brojne antibiotike, posebno vankomicin, pa se redoviti monitoring antimikrobne rezistencije provodi pri odabiru starter i probiotskih kultura (Zhou i sur., 2005; Kastner i sur., 2006, Ouoba i sur., 2008). Tako su Katla i sur. (2001) od 189 pretraženih sojeva iz mljekarskih starter kultura i mliječnih proizvoda pronašli samo jedan soj laktobacila rezistentan prema streptomycinu. Ipak, Danielsen i Wind (2003) na 62 soja laktobacila utvrđuju da osjetljivost/otpornost laktobacila unutar pretraživanja 9 vrsta najviše varira prema antibioticima vankomicinu, teikoplaninu, tetraciklinu, norfloksacinu, ciprofloksacinu, fuzidičnoj kiselini i klindamicinu. Kastner i sur. (2006) determinirali su tetraciklin rezistentni gen tet(W) i linkozamid rezistentni gen *Inu(A)* u komercijalnoj probiotskoj kulturi *Lactobacillus reuteri* SD 2112. Učestalost laktobacila u hrani koji su otporni

prema antibioticima mora se promatrati i u ovisnosti o vrsti hrane, pa je jasno da im se toplinskom obradom smanjuje prevalencija (Herrerros i sur., 2005; Devirgiliis i sur., 2008), no ostaje pitanje sigurnosti proizvoda koji se toplinski ne obrađuju (npr. sirevi od nepasteriziranog mlijeka, fermentirane kobasice i dr.).

## ZAVRŠNO RAZMATRANJE

Bakterije mliječne kiseline imaju veliko značenje u higijeni i tehnologiji hrane. Poznati su njihovi pozitivni učinci na zdravlje ljudi (zdravstvene tvrdnje; probiotici), zatim antimikrobni učinci prema štetnim bakterijama (sintetiziranjem antimikrobnih tvari; organskih kiselina, bakteriocina i dr.), te tehnološke prednosti koje se koriste u razvoju proizvoda (senzorna svojstva). Nadalje, slučajevi infekcija ljudi uzrokovanih bakterijama mliječne kiseline ekstremno su rijetki. S druge strane, novija saznanja upozoravaju na rizik zbog otpornosti «bezopasnih» bakterija mliječne kiseline na antibiotike, posebno otpornosti koja se prenosi na patogene bakterije alimentarnim putem. Mathur i Singh (2005) ističu da za razvoj stečene rezistencije ne postoji barijera između patogenih (npr. streptokoki), potencijalno patogenih (npr. enterokoki) i komenzalnih (npr. crijevni laktobacili, laktokoki) bakterija mliječne kiseline, odnosno u svima su pronađeni identični geni odgovorni za rezistenciju prema antibioticima.

## ZAHVALA

Ovaj rad izrađen je u okviru projekata Ministarstva znanosti obrazovanja i športa Republike Hrvatske br. 053-0531854-1851 i 053-0531854-1853.

## SUMMARY

### ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF FOOD LACTIC ACID BACTERIA

*Lactic acid bacteria play a significant role in food hygiene and technology. Their benefits are well known: positive impact on human health (health claims; probiotics), antimicrobial effect on harmful bacteria (due antimicrobials;*

organic acids, bacteriocins) and technological preferences in product's development (sensorial properties). On the other hand, recent data clearly alert on risk related to antibiotic resistance in «harmless» lactic acid bacteria, in particular the horizontal transfer of antibiotic resistance genes to pathogens. In the safety assessment of potential starter and probiotic cultures the important procedure is detection of resistance genes.

**Key words:** lactic acid bacteria, antimicrobial resistance, food

## ZUSAMMENFASSUNG ANTIMIKROBIELLE RESISTENZ DER MILCHSÄUREBAKTERIEN AUS NAHRUNG

Die Milchsäurebakterien haben eine große Bedeutung bei Nahrungshygiene und Nahrungstechnologie. Bekannt sind ihre positiven Einflüsse auf menschliche Gesundheit (wissenschaftliche Behauptungen; Probiotika), weiterhin ihre antimikrobielle Wirkung gegen schädliche Bakterien (Synthetisierung der antimikrobiellen Substanzen; organischen Säuren, Bakteriozinen u.a.), sowie technische Vorteile, die in der Erzeugnisentwicklung benutzt werden (sensorische Eigenschaften). Andererseits wird von den neueren Erfahrungen auf das Risiko der Widerstandsfähigkeit von „ungefährlichen“ Milchsäurebakterien auf Antibiotika aufmerksam gemacht, besonders wegen der horizontalen Übertragung der Resistenz auf pathogene Bakterien. Bei der Sicherheitsschätzung der potentiellen probiotischen und Starterkulturen ist das Detektionsverfahren der übertragbaren Genen verantwortlich für antimikrobielle Resistenz unumgänglich.

**Schlüsselwörter:** Milchsäurebakterien, antimikrobielle Resistenz, Nahrung

## SOMARIO RESISTENZA ANTIMICROBICA DEI BATTERI DALL'ACIDO LATTICO DI ORIGINE ALIMENTARE

I batteri dall'acido lattico hanno un'importanza notevole nell'igiene e tecnologia alimentare. È ben noto il loro effetto positivo sulla salute umana (le conferme della salute; i probiotici), poi gli effetti antimicrobici sui batteri dannosi (tramite la sintesi delle sostanze antimicrobiche, degli acidi organici, di batteriocini, ecc.) ed i vantaggi tecnologici usati nello sviluppo di prodotti (le caratteristiche sensoriche). Dall'altra parte, le recenti scoperte avvertono al rischio dei batteri «non patogeni», resistenti agli antibiotici, grazie alla trasmissione orizzontale di resistenza ai batteri patogeni in particolare. Nella valutazione di sicurezza della culture probiotiche e quelle starter è obbligatorio scoprire e determinare i geni responsabili per la

resistenza antimicrobica.

**Parole chiave:** batteri dall'acido lattico, resistenza antimicrobica, alimentari

## LITERATURA

**Ammor, M. S., A. B. Flórez, B. Mayo (2007):** Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* 24, 559-570.

**Bernardeau, M., J. P. Vernoux, S. H. Dubernet, M. Guéguen (2008):** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 278-285.

**Danielsen, M., A. Wind (2003):** Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* 82, 1-11.

**Devirgiliis, C., A. Caravelli, D. Coppola, S. Barile, G. Peruzzi (2008):** Antibiotic resistance and microbial composition along the manufacturing process of Mozzarella di Bufala Campana. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 378-384.

**Herreros, M.A., H. Sandoval, L. González, J.M. Castro, J.M. Fresno, M.E. Tornadizo (2005):** Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Aranda cheese (a Spanish goat's milk Cheese). *Food Microbiol.* 22, 455-459.

**Kastner, S., V. Perreten, H. Bleuler, G. Hugenschmidt, C. Lacroix, L. Meile (2006):** Antibiotic susceptibility patterns and resistance genes of starter cultures and probiotic bacteria used in food. *Sys Appl. Microbiol.* 29, 145-155.

**Katla, A.-K., H. Kruse, G. Johnsen, H. Herikstad (2001):** Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteria used in Norwegian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 147-152.

**Koluman, A., L. S. Akan, F. P. Çakiroğlu (2009):** Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control* 20, 281-283.

**Mathur, S., R. Singh (2005):** Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 281-295.

**Ogier, J.-C., E. Casalty, C. Farrokh, A. Saïhi (2008):** Safety assessment of dairy microorganisms: The *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 286-290.

**Ouoba, L.I.I., V. Lei, L.B. Jensen (2008):** Resistance of potential probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria of African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 217-224.

**Temmerman, R., B. Pot, G. Huys, J. Swings (2003):** Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81, 1-10.

**Teuber, M. (2001):** Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology* 4, 493-499.

**Zdolec, N., M. Hadžiosmanović, L. Kozačinski, Ž. Cvrtila, I. Filipović, K. Hussein (2006):** Značenje ostataka veterinarskih lijekova u namirnicama životinjskog podrijetla. *Veterinarska stanica* 37, 2, 95-99.

**Zhou, J.S., C.J. Pillidge, P.K. Gopal, H.S. Gill (2005):** Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *Int. J. Food Microbiol.* 98, 211-217.

Zaprimljeno: 30. siječnja 2009.

Prihvaćeno: 20. ožujka 2009. ■