

KARAKTERIZACIJA I ANTIBIOTSKA OSETLJIVOST KOAGULAZA-NEGATIVNIH STAFILOKOKA IZ ZLATIBORSKE PRŠUTE

*Predrag Ilić¹, Danica Šošević¹, Tanja Žugic-Petrović¹, Katarina Mladenović²,
Mirijana Grujović², Ljiljana Čomić²*

Izvod: Koagulaza negativne stafilocoke u procesu fermentacije svinjske pršute utiču na formiranje ukusa, mirisa, i boje, i na taj način formiraju vrhunski kvalitet. Materijal za ovo ispitivanje činila su 3 uzorka pršute, koji su uzeti iz tri domaćinstva sa područja Zlatibora.

Cilj ovog istraživanja je izolacija i preliminarna kategorizacija koagulaza negativnih stafilocoka sa posebnim akcentom na pojavu rezistencije na komercijalne antibiotike.

Preliminarno su izdefinisane četiri grupe stafilocoka, od kojih dominira *Staphylococcus xylosus* (37,5%), zatim *Staphylococcus carnosus* koji je izolovan u nešto manjem procentu iz pršute od 20,83%, *Staphylococcus equorum* 31,25%, i *Staphylococcus epidermidis* u nižem procentu (8,33%). Dva izolata su pokazala rezistenciju na antibiotike.

Ključne reči: suvo meso, katalaza negativne stafilocoke, osetljivost na antibiotike

Uvod

Pršuta je reč koja potiče iz italijanskog jezika, a koji zapravo znači šunka, Ono što je kod nas sušena šunka kod Italijana je Prosciutto Crudo dok je naziv za kuvanu Prosciutto Cotto, bez obzira na to, kada god se kaže Prosciutto, misli se na sušenu šunku.

Uglavnom se pravi na isti način: meso se dobro istrlja solju (često i belim lukom), a onda se prvo dimi na dimu, a posle na promaji ili samo na promaji.

Kod tradicionalnih fermentisanih suvomesnatih proizvoda ključnu ulogu ima autohtona mikrobiota koja se kroz fermentaciju razvija, utičući na ukus, teksturu, nutritivne osobine i sigurnost proizvoda (Martín et al., 2007)

U suvomesnatim proizvodima najčešće su izolovane bakterije mlečne kiseline (LAB) koje su odgovorne za brzu fermentaciju ugljenih hidrata i koagulaza negativne stafilocoke (CNS) koje definišu senzoričku proizvodnju (Landeta et al., 2013).

Materijal i metode rada

U istraživanju su korišćeni uzorci (3 uzorka) svinjske zlatiborske pršute, uzeti iz tri različita domaćinstva sa istim postupkom proizvodnje na području Mačkata, pod identičnim mikroklimatskim uslovima. Posebna pažnja u istraživanju stafilocoka je posvećena pojavi rezistencije na antibiotike, u istraživanju su korišćeni komercijalni

¹ Visoka poljoprivredno-prehrambena Škola, Ćirila i Metodija 1, 18400 Prokuplje, Srbija

² Prirodno-matematički Fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija

antibiotici: Ceftibuten (Bio-Rad) (30 µg), Bacitracin (Bioanalyse) (0,04 v), Cefuroxime (Bioanalyse) (30 µcg).

Određivanje broja i izolacija CNS

Uzorci pršute (10 g) su aseptično preneti u 90 cm³ sterilnog (sterilizacija u trajanju od 20 min na 1210C) fiziološkog rastvora sa peptonom (0,8 g NaCl/dm³ i 1 g peptona/dm³) i mešani 15 minuta. Broj CNS određen je indirektnom metodom sukcesivnog razblaženja koja se sastoji u pravljenju razblaženja i prenošenju odgovarajućih razblaženja na čvrste podloge manitol-slanog agara - *Chapman*-ova podloga (Torlak, Beograd, Srbija), što je u skladu sa standardnom metodom za pripremu uzoraka (SRPS EN ISO 6887-1:2008).

Fenotipska karakterizacija izolata CNS

Fenotipizacija izolata rađena je bojenjem ćelija po Gramu i katalaza testom, izolati su zatim podvrgnuti koagulaza testu koristeći zečiju plazmu u EDTA (BD BBLTM Coagulase plasma, Rabbit with EDTA, Rockville, Md., U.S.A.). Identifikacija dobijenih izolata podrazumevala je testove sposobnosti hemolize na krvnom agaru, fermentaciju manitola, rast na različitim temperaturama (15°S i 45°S), osetljivost na novobiocin, lipolitička aktivnost, proteolitička aktivnost i sinteza egzopolisaharida (Kaban and Kaya, 2008).

Test osetljivosti na antibiotike rađen je pomoću disk difuzione metode uz korišćenje komercijalnih antibiotika (Ledina et al., 2013).

Rezultati istraživanja i diskusija

Stafilokoke koje smo tokom istraživanja izolovali, su bile katalaza i Gram pozitivne, a na osnovu morfologije ćelija, fermentacije manitola, rasta na različitim temperaturama (45°S i 15°S), prisustva hemolize, osetljivosti na novobiocin, rasta na krvnom agaru, proteolitičkoj i lipolitičkoj aktivnosti i sinteze egzopolisaharida, izvršena je preliminarna identifikacija ispitivanih bakterija kao *Staphylococcus* spp. Rezultati istraživanja su prikazani u tabeli 1. Nakon preliminarne identifikacije *Staphylococcus* spp. su podvrgnuti testu osetljivosti na antibiotike.

Tabela 1. Diferencijacija i identifikacija izolata katalaza negativnih stafilokoka izolovanih iz svinjske pršute
 Table 1. Differentiation and identification of catalase negative staphylococci isolated from pork prosciutto

Preliminarna identifikacija <i>Preliminary identification</i>	Broj izolata <i>Number of isolates</i>	Morfologija ćelije <i>Cell morphology</i>	Fermentacija manitola <i>Mannitol fermentation</i>	Rast na temperature <i>Growth temperature</i>		Prisustvo hemolize <i>Presence of hemolysis</i>	Osetljivost na novobiocin <i>Sensitivity to novobiocin</i>	Rast na krvnom agaru <i>Growth on blood agar</i>	Produkcija proteaze <i>Protease production</i>	Produkcija lipase <i>Lipase production</i>
				45°	15°					
<i>Staphylococcus xylosus</i>	28	koke coccus	-	-	-	-	R	-	-	+
<i>Staphylococcus carnosus</i>	6	koke coccus	-	-	-	-	O	-	-	+
<i>Staphylococcus equorum</i>	1	koke coccus	-	-	-	-	R	-	-	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	koke coccus	-	-	-	-	O	-	-	+

EPS- sinteza egzopolisaharida; R-rezistentne; O-osetljive

Preliminarna identifikacija stafilokoka zlatiborske pršute je omogućila da se svi ispitivani izolati mogu svrstati u četiri grupe pri čemu najveća brojnost među izolovanim CNS pripada *St. xylosus* (37,5%), zatim *St. equorum* (31,25%), *St. carnosus* (20,83%), a najmanje je bilo *St. epidermidis* (8,33%).

Ovakva preliminarna identifikacija pokazuje prisustvo određenih predstavnika *Staphylococcus* spp. vrsta koje su odgovorne za organoleptičke karakteristike proizvoda, što je potvrđeno u radovima.

CNS su najčešće izolovane iz proizvoda čiji sastav je uglavnom činilo suvo i zrelo meso (Aymerich et al., 2003).

Stafilokoke su bakterije koje dominiraju u mnogim italijanskim i španskim kobasicama (Blaiotta et al, 2004).

Mauriello i sar., (2004) u svom radu ističu da su CNS identifikovane u Italijanskim tradicionalnim fermentisanim kobasicama, u kojima dominiraju *St. xylosus* (44,8%), *St. equorum* (40%), i *Staphylococcus saprophyticus* (32%).

Danas se u Evropi najčešće kao starteri u proizvodnji fermentisanih kobasica i proizvoda od mesa koriste uglavnom *St. xylosus* i *St. equorum* (Landeta et al.,2011.)

St. xylosus definiše organoleptiku proizvoda nizom reakcija koje se dešavaju u proizvodu, pri čemu su njena tehnološka svojstva potvrđena. Utiče na razvoj boje proizvoda kroz nitrit i nitrat reduktaze i aktivnosti katalaze, doprinosi razvoju ukusa kao rezultat proteolitičkih i lipolitičkih aktivnosti.

St. saprophyticus je izolovan iz južno evropskih kobasica, i u velikom broju je izolovan iz tradicionalnih grčkih salama pored *St. xylosus*.

Montel i sar. (1993) u svom radu ističu da su sojevi *St. saprophyticus* i *Staphylococcus warneri* su komercijalni starteri u proizvodnji francuskih proizvoda od mesa.

St. equorum je često izolovan iz hrane, a posebno iz mlečnih proizvoda, odnosno iz sireva (Bockelmann, 2002; Meugnier et al., 1996), visok procenat *St. equorum* je izolovan i iz španske pršute (Cordero and Zumalacarregui, 2000), što je uskladu sa našim rezultatima.

St. xylosus koji potiče prvenstveno iz ljudskih i životinjskih okruženja u nekoliko studija je opisana prisutnost gena koji su odgovorni za antibiotik rezistenciju ovog soja.

Iz španskih suvomesnatih proizvoda su izolovane stafilokoke koje su koagulaza negativne i osetljive na antibiotike. Dominatne su dve vrste *St. xylosus* i *St. equorum*. Detektovana je njihova lipolitička i proteolitička aktivnost i sposobnost redukcije nitrata u nitrite (Landeta et al., 2013).

Test osetljivosti na antibiotike ukazao je na prisustvo rezistencije kod sojeva CNS izolovanih iz pršute, i ako je mali broj sojeva sa prisutnom rezistencijom (4.16%), ipak je u našem radu rezistencija na antibiotike detektovana. Ona predstavlja negativanu pojavu koja danas postaje veliki problem u medicini prvenstveno, ali i u industriji hrane.

Moschetti i sar. (1997) su istraživali rezistenciju stafilokoka iz italijanskih kobasica, pri čemu nisu pronašli nijedan soj koji je otporan na vankomicin, hloramfenikol i rifampicin i samo jedan soj (među 30) koji je posedovao otporanost na gentamicin. Ovako nizak otpor sojeva stafilokoka na antibiotike (3%), je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Zaključak

Ukupan broja izolata CNS pršute iz tri uzorka je iznosio 48, svi izolati su uspešno rasli na krvnim pločama sa karakterističnim belim kolonijama i bez hemolize. Preliminarno su izdefinisane četiri grupe stafilokoka, od kojih dominira *St. xylosus* u količini od 37,5%, zatim *St. equorum* 31,25%, *St. carnosus* koji je izolovan iz pršute u procentu od 20,83%, i *St. epidermidis* u najnižem procentu od 8,33%.

Ovakva preliminarna identifikacija zahteva detaljnije istraživanje stafilokoka pršute kao i potpunu identifikaciju pomoću PCR metode.

Literatura

1. Aymerich T., Martin B., Garriga M., Hugas M. (2003): Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages, Appl. Environ. Microbiol. 69, 4583e4594.
2. Bockelmann, W. (2002). Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. Int Dairy J 12, 123–13

3. Blaiotta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., & Parente, E. (2004). Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 97(2), 271-284.
4. Chapman G.H. (1945): The significance of sodium chloride in studies of staphylococci, *J. Bacteriol.* 50:201-203.
5. Cordero, M. R., & Zumalacárregui, J. M. (2000). Characterization of Micrococcaceae isolated from salt used for Spanish dry-cured ham. *Letters in Applied Microbiology*, 31(4), 303-306.
6. Kaban, G., & Kaya, M. (2008): Identification of Lactic Acid Bacteria and Gram-Positive Catalase-Positive Cocci Isolated from Naturally Fermented Sausage (Sucuk), *Journal of food science*, 73(8), M385-M388.
7. Ledina, T., Mijačević, Z., Bulajić, S., Babić, M. (2013): Probiotski stats bakterija mlečne kiseline, *Veterinarski Jurnal Republike Srpske (Banja Luka)*, Vol.XIII, No.2, 176-192
8. Landeta, G., Reverón, I., Carrascosa, A. V., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2011). Use of recA gene sequence analysis for the identification of *Staphylococcus equorum* strains predominant on dry-cured hams. *Food Microbiology* 28, 1205-1210
9. Landeta, G., Curiel, J. A., Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & De Las Rivas, B. (2013). Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products. *Meat science*, 93(3), 387-396.
10. Martín, B., Colin, B., Aranda, E., Benito, M. J., & Cordoba, M.G. (2007). Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science* 75, 696-708.
11. Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., & Villani, F. (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science* 67, 1549-1558
12. Meugnier, H., Bes, M., Vernozy-Rozand, C., Mazuy, C., Brun, Y., Freney, J. and Fleurette, J. (1996) Identification and ribotyping of *Staphylococcus xylosum* and *S. equorum* strains isolated from goat milk and cheese. *International Journal of Food Microbiology* 31, 325-331.
13. Montel M. C., Talon R., Berdague J. L., Cantonnet M. Effects of starter cultures on biochemical characteristics of French dry sausages. *Meat Sci.* (1993);35:229-240. doi: 10.1016/0309-1740(93)90053-K.
14. Moschetti, G., Mauriello, G. & Villani, F. (1997) Differentiation of *Staphylococcus xylosum* strains from Italian sausages by antibiotyping and low frequency restriction fragment analysis of genomic DNA. *Systematic Applied Microbiology* 20, 432-438.

CHARACTERIZATION AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI FROM ZLATIBOR PROSCIUTTO

Predrag Ilić¹, Danica Šošević¹, Tanja Žugic Petrović¹, Katarina Mladenović², Mirijana Grujović², Ljiljana Čomić²

Abstract

Coagulase-negative staphylococci participating in the fermentation process of pork prosciutto affect the creation of taste, smell and color and in that way give the product top quality.

The material for this study consisted of 3 samples of prosciutto taken from three households in Zlatibor area.

The aim of this research was isolation and preliminary categorization of coagulase-negative staphylococci with special emphasis on the emergence of resistance to commercial antibiotics.

Four groups of *Staphylococcus* were preliminary identified, of which *Staphylococcus xylosus* (37.5%) dominated, followed by *Staphylococcus carnosus* which was isolated from prosciutto in a somewhat smaller percentage of 20.83% *Staphylococcus equorum* 31.25%, and *Staphylococcus epidermidis* in a lower percentage (8.33%). Two strains showed resistance to antibiotics.

Key words: dried meat, coagulase-negative staphylococci, antibiotic resistance

¹College of Agriculture and Food Technology, Ćirila I Metodija 1, 18400 Prokuplje, Serbia

²Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia