

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Dajana Crk

**ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ENTEROKOKA
IZOLIRANIH IZ SIROVOG MLIJEKA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2017.

**VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA HIGIJENU, TEHNOLOGIJU
I SIGURNOST HRANE**

Predstojnica:

Izv. prof. dr. sc. Vesna Dobranić

Mentor:

Doc. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi povjerenstva:

- 1. Izv.prof.dr.sc. Vesna Dobranić**
- 2. Prof.dr.sc. Lidija Kozačinski**
- 3. Doc.dr.sc. Nevijo Zdolec**

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PODACI IZ LITERATURE	3
2.1. Mikroflora sirovog mlijeka	3
2.1.1. <i>Enterokoki u mlijeku</i>	4
2.1.2. <i>Antimikrobno djelovanje enterokoka – enterocini</i>	5
2.2. Utjecaj enterokoka na rast bakterije <i>Listeria monocytogenes</i>	7
3. MATERIJAL I METODE	8
3.1. Izolacija i identifikacija enterokoka iz mlijeka	8
3.2. Antimikrobna aktivnost enterokoka agar difuzijskim testom	8
3.3. Antimikrobna aktivnost enterokoka u tekućim hranilištima	9
4. REZULTATI	10
5. RASPRAVA	16
6. ZAKLJUČCI	19
7. LITERATURA	20
8. SAŽETAK	25
9. SUMMARY	26
10. ŽIVOTOPIS	27

1. UVOD

Mlijeko je vrlo pogodna podloga za razmnožavanje većine vrsta mikroorganizama, uključujući patogene bakterije. S druge strane, u sastavu mikroflora nalazimo i poželjne bakterije, tzv. *dobre bakterije* koje mogu djelovati blagotvorno na organizam potrošača, primarno putem fermentiranih mliječnih proizvoda. U tom smislu prirodna, tzv. «divlja» mikroflora mliječnih proizvoda može nam poslužiti polaznom točkom proučavanja mikrobnih međudjelovanja čiji se principi mogu pretočiti i u praktične okvire tj. proizvodnju sigurnije hrane. Tu su posebno bitne bakterije mliječne kiseline (BMK) kao sastavni dio prirodne mikroflora mlijeka, koje svojom metaboličkom aktivnošću utječu i na ukupnu kakvoću mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda (ZDOLEC, 2009.). Bakterije mliječne kiseline su vrlo heterogena skupina gram - pozitivnih bakterija s izrazitom metaboličkom aktivnosti i mliječnom kiselinom kao završnim i najvažnijim produktom (ŠUŠKOVIĆ, 1996.; KLEIN i sur., 1998.; KOS, 2001.). Unutar skupine BMK nalazimo i rod *Enterococcus*, pri čemu u hrani dominira nalaz vrsta *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* (ČANŽEK MAJHENIĆ, 2006.). Enterokoki prevladavaju u probavnom traktu ljudi i životinja; i do prije tridesetak godina smatrani su isključivo izvorom kontaminacije hrane (fekalnim zagađivačima ili bakterijskim kontaminantima). Međutim, postupno su enterokoki prihvaćeni kao autohtona populacija u gasto - intestinalnom sustavu zdravih ljudi i životinja, te dio fiziološke mikroflora sirovog mlijeka i tradicionalnih mliječnih proizvoda gdje pridonose specifičnosti (GIRAFFA i sur., 1997; FULLER, 1989.; FRANZ i sur., 1999.). Industrijski su vrlo važni mikroorganizmi koji se upotrebljavaju kao starter, pomoćne ili zaštitne kulture za dobivanje različitih fermentiranih mliječnih proizvoda (LEBOŠ PAVUNC i sur., 2013.; GELSOMINO i sur., 2001; ANDRIGHETTO i sur., 2001). Također imaju veliko higijensko i tehnološko značenje zbog potencijalno probiotičkog djelovanja i jake antimikrobne aktivnosti producirajući enterocine (BANWO i sur., 2013.; LAUKOVA, 2012.).

Jedno od poželjnih svojstava bakterija mliječne kiseline je, dakle, antimikrobna aktivnost prema bakterijama kvarenja ili patogenim bakterijama. Najznačajniji je mehanizam inhibicije nepoželjne mikroflora stvaranje organskih kiselina ili pak antimikrobnih peptida poput bakteriocina (ZDOLEC, 2007.). Enterokoki koji pokazuju ta svojstva se često mogu izolirati iz hrane, no da bi se razmatrali kao potencijalne probiotičke kulture moraju zadovoljiti kriterije sigurnosti poput izostanka virulentnih

faktora, prenosivih gena rezistencije ili dekarboksilacijske aktivnosti (ZDOLEC, 2016.). Pojedini sojevi *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium* ne pokazuju virulentna svojstva, ne tvore biogene amine niti su otporni na antibiotike pa ih to čini potencijalno primjenjivima u fermentiranim proizvodima. Također, brojni enterokoki produciraju bakteriocine, enterocine koji mogu poslužiti kao zaštitne kulture posebno prema bakteriji *L. monocytogenes* (ČOP, 2016.). U vezi s navedenim, cilj je ovog rada bio izolirati enterokoke iz sirovog mlijeka i ispitati njihovu antimikrobnu aktivnost u smislu *in vitro* inhibicije rasta različitih sojeva *L. monocytogenes* iz hrane.

2. PODACI IZ LITERATURE

2.1. Mikroflora sirovog mlijeka

Smatralo se da je mlijeko prilikom izlaska iz vimena gotovo sterilno, no utvrđeno je da je nemoguće proizvesti mlijeko bez mikroorganizama. Pošto mlijeko od mužnje do potrošača dolazi u dodir sa različitim izvorima mikroorganizama; a idealan je medij za rast i umnožavanje velikog broja bakterija, važno je voditi računa o cijelom procesu proizvodnje kako bismo dobili mikrobiološki ispravno mlijeko i njegove proizvode. Na mikrobiološki sastav sirovog mlijeka utječu različiti čimbenici: održavanje zdravlja na farmi, higijena staje, sanitacija prostorija i opreme, krmiva korištena u hranidbi, higijena mužnje; kao i temperatura i brzina hlađenja mlijeka (PUCOVIĆ i sur., 2012.). Broj i vrsta mikroorganizama prisutnih u sirovom mlijeku određena je sezonom, higijenskim uvjetima proizvodnje, hranidbom i sustavom hlađenja. Tako, ovisno o čimbenicima, ukupan broj mikroorganizama u svježe pomuženom mlijeku može biti od svega par stotina do preko 10^6 /mL mlijeka (FRANK i HASSAN, 2002.), a higijenski ispravno mlijeko mora sadržavati manje od 100 000 mikroorganizama/mL (ANONIMNO, 2000.) te ne smije sadržavati patogene mikroorganizme i njihove toksine (HADŽIOSMANOVIĆ i sur., 2002.).

Treba razlikovati primarnu i sekundarnu mikrofloru. Primarnu čine mikroorganizmi koji su dospjeli u mlijeko iz vimena zdravih krava te ne ugrožavaju zdravstvenu / higijensku ispravnost mlijeka (ZDOLEC, 2011.a,b). Mlijeko i u izrazito visokim higijenskim uvjetima, neposredno nakon mužnje, uvijek sadrži 500-1000 (max. 5000) mikroorganizama/ ml, a radi se većinom o nepatogenim saprofitskim bakterijama poput mikrokoka; te manji broj ostalih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (CAUSIN i BREMLEY, 1985.). U sirovom neohlađenom mlijeku ili ohlađenom na sobnu temperaturu ($\geq 13^{\circ}\text{C}$) uz mikrokoke prevladavaju uglavnom gram-pozitivne bakterije mliječne kiseline *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* i dr. Znači hlađenjem mlijeka mijenja se ta prirodno prisutna mikrobna populacija, dok se istovremeno u neohlađenom mlijeku mijenja jedino njihova razina kontaminacije (SAMARDŽIJA i sur., 2007.). U ohlađenom mlijeku dominantne gram-pozitivne bakterije zamjenjuju se gram-negativnim i gram-pozitivnim psihrotrofnim bakterijama (LAFARGE i sur., 2004.). Rod *Pseudomonas* je dominantni predstavnik psihrotrofnih mikroorganizama. Skladištenjem sirovog mlijeka na niže temperature, dolazi do usporavanja rasta

psihrotrofnih bakterija, te usporavanja njihove proteolitičke i lipolitičke aktivnosti (KUMARSAN i sur., 2007.), no ipak duže skladištenje zbog proteolize i lipolize uzrokuje promjenu svojstava dobivenog mlijeka i mliječnih proizvoda.

Psihrotrofna i koliformna mikrobna populacija spadaju u sekundarnu mikrofloru; a takvo naknadno onečišćenje mlijeka mikroorganizmima iz okoline može nastati u svim fazama proizvodnje mlijeka: s kože/ dlake životinje, ruku/ odjeće mužača, higijenski neispravne vode, stroja za mužnju, zraka u staji, posuda za mlijeko itd. (SANAA i sur., 1993.; KOZAČINSKI i sur., 2003.; MUNSCH-ALATOSSOVA i sur., 2005.; MATKOVIĆ i sur., 2006.). Tipični predstavnici druge skupine mikroorganizama koja često sekundarno kontaminira sirovo mlijeko su koliformne bakterije rodova *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* i *Serratia* (WALKER, 1988.; LEDFORD, 1998.). Kod pojave mastitisa u mlijeku se mogu naći i patogeni mikroorganizmi kao što su *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium bovis* i dr., koji se smatraju glavnim mikrobiološkim rizicima za potrošače sirovog mlijeka (TREMONTI i sur., 2014.).

2.1.1. Enterokoki u mlijeku

Dobro je poznato da su enterokoki ubikvitarni sveprisutni mikroorganizmi koji nastanjuju tlo, hranu, vodu i gasto-intestinalni trakt ljudi i životinja. Zbog njihove široke rasprostranjenosti, značajni su u okolišu, hrani i kliničkoj mikrobiologiji. Rod *Enterococcus* obuhvaća više od 26 vrsta, a *E. faecalis* i *E. faecium* su dvije vrste koje se najčešće nalaze u hrani životinjskog podrijetla (GIRAFFA, 2003.; KLEIN, 2003.) uključujući sirovo mlijeko.

Enterokoki su gram - pozitivne, katalaza negativne, nesporogene, mezofilne bakterije mliječne kiseline, tolerantne na zrak i kiselinu. Njihova najvažnija osobina je sposobnost fermentacije laktoze, gdje je mliječna kiselina glavni završni proizvod. Glavni razlog za uspješno preživljavanje i postojanost u mikrobiološko različitom okruženju je u njihovoj sposobnosti prilagođavanja na različite uvjete i velikoj otpornosti. Enterokoki su otporni na sušenje, toplinu i dezinfekcijska sredstva; rastu na 10-45 °C, preživljavaju zagrijavanje na 62,8 °C tijekom 30 minuta, toleriraju 6,5% NaCl

i rastu pri pH između 4,0 - 9,6 (STILES, 2002.). Zbog svih ovih osobina enterokoki su skloni kompeticiji za hranjivim tvarima, prostorom i smatraju se vodeći mikroorganizmi u fermentacijskim procesima. Enterokoki su se nekada smatrali „fekalni“ / Lancefield skupina D streptokoka, što dokazuje da im je glavno stanište i dalje gastro- intestinalni trakt gdje ispoljavaju poželjne ili nepovoljne aktivnosti (ČANŽEK MAJHENIĆ, 2006.). Stoga je prehrambeni lanac važan izvor enterokoka u ljudskom okruženju. Dugo vremena je prisutnost enterokoka u hrani smatrana pokazateljem loše higijene, ali u današnje vrijeme enterokoke smatramo dijelom uobičajene mikroflore hrane (FRANZ i sur., 1999.). Sirovo mlijeko i mliječni proizvodi od nepasteriziranog mlijeka su jedan od prirodnih i bogatih izvora enterokoka s potencijalnim korisnim ili rizičnim čimbenicima.

2.1.2. Antimikrobno djelovanje enterokoka – enterocini

Sojevi enterokoka za uporabu kao starter kulture/ dodatci hrani ili krmi se izabiru nakon točne identifikacije, karakterizacije i procjene sigurnosti soja, s ciljem preživljavanja tranzicije kroz probavni trakt i dostatne kolonizacije crijeva kako bi se postigao pozitivni željeni učinak zaštite protiv patogenih bakterija u probavnom traktu domaćina. Neki sojevi enterokoka kao npr. *E. faecium* SF-68 imaju dugu povijest sigurne primjene u probiotičkoj terapiji (FRANZ i sur., 1999.).

Sojevi enterokoka koji sintetiziraju bakteriocine enterocine mogu biti uvedeni u prehrambeni proizvod kao dodatak kulturi u komercijalnim starterima. Dodatne kulture za proizvodnju bakteriocina su uglavnom izolirane iz sirovog mlijeka i drugih prirodnih izvora BMK koje sadrži sojeve sa korisnim svojstvima kao što je bakteriocinogena aktivnost.

Različiti su mehanizmi probiotičkog djelovanja :

- Kompetitivna ekskluzija - nadmetanje za mjesta vezanja na epitelnoj površini crijeva i time spriječavanje naseljavanja patogena;
- Kompeticija za hranjivim tvarima – stvaranje uvjeta u probavnom sustavu koji pogoduju korisnim, a inhibiraju razvoj patogenih bakterija;

- Antimikrobno djelovanje – antagonizam prema patogenima proizvodnjom različitih supstanci (organske kiseline, diacetil, vodikov peroksid) i bakteriocina koji djeluju inhibicijski na rast i umnožavanje patogena.

Bakteriocini su produkti metabolizma bakterija mliječne kiseline, a brojnim istraživanjima utvrđen je njihov antimikrobni učinak u kontroliranim laboratorijskim uvjetima i u proizvodnji različitih fermentiranih proizvoda. Biosinteza bakteriocina je poželjna karakteristika za izbor soja, jer služi kao važan mehanizam isključenja patogena kako u fermentiranoj hrani tako i u gastro - intestinalnom okruženju. Kako bi se osiguralo da enterokoki koji se koristi u prehrambenoj industriji nisu potencijalni patogeni, potrebno je ispitati njihove čimbenike virulencije, sintezu biogenih amina ili nositeljstvo gena antimikrobne rezistencije (ZDOLEC i sur., 2016.).

Od samog početka istraživanja, neki enterocini su opisani kao antimikrobni peptidi aktivni protiv srodnih gram - pozitivnih bakterija kao što su *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus* pa su stoga značajni u strategiji osiguravanja sigurnosti hrane (GIRAFFA, 1995.). Širok je raspon načina djelovanja bakteriocina, kao što je enzimska aktivnost, inhibicija izdanaka spora i stvaranje pora u staničnoj membrani; ali u cjelini aktivnost je usmjerena protiv gram - pozitivnih mikroorganizama. Njihovo ciljno mjesto je citoplazmatska membrana bakterija formirajući pore kroz koje se gubi stanični materijal (ABEE, 1995.), a takav učinak na gram-negativne bakterije onemogućen je strukturom njihove stanične membrane (HELANDER i sur. 1997.). Bakteriocini se mogu svrstati u 4 skupine: lantibiotici, kratki termostabilni peptidi, termolabilni proteini i proteinski kompleksi (KLAENHAMMER, 1993., NES i sur., 1996.). Za prehrambenu industriju najznačajniji su lantibiotici i kratki termostabilni peptidi.

RODRIGUEZ i sur. (2000.) potvrdili su visoku učestalost bakteriocina u sirovom mlijeku, sa inhibitornom aktivnosti protiv patogenih mikroorganizama i bakterija kvarenja. Enterocine često proizvode sojevi *E. faecalis* i *E. faecium*, a spadaju u drugu skupinu bakteriocina koji su kratki, termostabilni i membranski aktivni peptidi (van BELKUM i STILES, 2000.). Istraživanja su dokazala da bakteriocin AS-48, peptid kojeg je proizvela bakterija *E. faecalis* izolirana iz sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda, ima širok spektar antimikrobne aktivnosti; djeluje inaktivirajuće na određene patogene mikroorganizme, uključujući i *Listeria* spp. Antimikrobni spektar i aktivnost bakteriocina

može se proširiti zajedničkim djelovanjem različitih antimikrobnih faktora kao što su anorganske soli, organske kiseline i njihove soli (EDTA), fenolni spojevi i druge prirodne antimikrobne tvari.

2.2. Utjecaj enterokoka na rast bakterije *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je gram-pozitivna, nesporogena, fakultativno anaerobna patogena unutarstanična bakterija koja se nalazi posvuda u okolišu; raste unutar velikog raspona pH (4,3–9,6) i temperature (1–45 °C), otporna prema visokim koncentracijama NaCl-a (do 12%). Takve osobine omogućuju preživljavanje postupke obrade hrane i sposobnost umnožavanja na temperaturama skladištenja (+4 °C) čime je prisutna u različitim proizvodima predstavljajući veliki problem u prehrambenoj industriji i javnom zdravstvu (BUBONJA i sur., 2007.). U rizičnu skupinu hrane spadaju mlijeko, meso i sirevi gdje *L. monocytogenes* preživljava tijekom proizvodnje i zrenja. Njen rast primjerice u sirevima ili na površini sireva uvjetovan je pH vrijednostima i aktivitetom vode (GAYA i sur., 1998.). Sprečavanje rasta bakterije na površini moguće je postići dodavanjem bakteriocina u salamuru.

Zabrinutost zbog epidemija listerioze potaknula je istraživanja uporabe fiziološke prirodne mikroflore BMK i njenih produkata- bakteriocina kao starter kultura/ dodataka kulturama u proizvodnji mliječnih proizvoda. Većina istraživanja na mekom siru je koristila bakteriocine u salamuri što je ispalo kao dobro sredstvo koje je inaktiviralo rast i djelovanje prisutne bakterije lokalizirane na površini sira. Istraživanja su bila usmjerana prvenstveno na bijeli plijesnivi sir Camembert (IZQUIERDO i sur., 2009.). U tom smislu velik je interes u prehrambenoj industriji za korištenjem enterokoka zbog antimikrobnog učinka i time inhibiranja različitih patogenih bakterija. Sojevi enterokoka povezani sa lancem hrane su izolirani iz različitih namirnica animalnog podrijetla, a većina njihovih produkata enterocina je aktivna protiv patogene bakterije *L. monocytogenes*. Enterokoki najvjerojatnije utječu na učestalost nalaza i broj *L. monocytogenes* u hrani (IZQUIERDO i sur., 2009.). Štoviše, izolati enterokoka iz slovenskog tradicionalnog kraškog ovčjeg sira pokazali su snažan antimikrobni učinak prema *L. monocytogenes* koji bi mogao biti rezultat bakteriocinogene aktivnosti (MOHAR i sur., 2005.).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Izolacija i identifikacija enterokoka iz mlijeka

Izolati enterokoka (n=10) prikupljeni su iz mlijeka u prijašnjem istraživanju (BUTKOVIĆ, 2015.). Identifikacija soja provedena je pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije nakon ekstrakcije etanolom/formic kiselinom prema preporukama proizvođača (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka). Metodologija identifikacije opisana je u radu DOBRANIĆ i sur. (2016.).

3.2. Antimikrobna aktivnost enterokoka agar spot i difuzijskim testom

Antimikrobna aktivnost enterokoka određivana je agar spot i agar difuzijskim testom primjenom indikatorskog mikroorganizama *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 te šest izolata *L. monocytogenes* iz hrane. Ukratko, izolati enterokoka (n=10) su namnažani u Brain Heart Infusion (BHI) bujonu na 37 °C tijekom 24 sata. Dva mililitra kulture je potom centrifugirano na 10000 okr./min. tijekom 5 minuta na 4 °C nakon čega su nadtalozni odbačeni.

Za agar spot i agar difuzijski test korišten je standardni BHI agar te pokrovni meki BHI agar (s 0,7 % agara) u koji su dodavani indikator mikroorganizmi (BHI bujon, 37 °C, 24 h). Nakon pripreme ploča (tvrđi BHI agar prekriven s 5 ml mekog BHI agara) s indikatorskim mikroorganizmom, na površinu je nanoseno 100 µL nadtaloga kulture pojedinog izolata enterokoka radi provjere inhibicije rasta *L. monocytogenes*. Po nanošenju nadtaloga ploče su stavljene u hladnjak tijekom jednog sata te potom inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Po inkubaciji provjerena je pojava zone inhibicije rasta indikatorskog mikroorganizma.

Za agar difuzijski test su načinjene jažice u koje je dodano 100 µL nadtaloga i neutraliziranog nadtaloga. Neutralizacija nadtaloga provedena je dodavanjem 10N NaOH pri čemu je pH podešen na 7. Prije neutralizacije izmjeren je pH nadtaloga (pH 510 Eutech instruments, Nizozemska). Po nanošenju nadtaloga u jažice ploče su stavljene u hladnjak tijekom jednog sata te potom inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubiranja provjerena je pojava zone inhibicije rasta indikatorskog mikroorganizma.

3.3. Antimikrobna aktivnost enterokoka u tekućim hranilištima

Odabrani soj *Enterococcus faecalis* 101 korišten je za provjeru inhibicije rasta bakterije *L. monocytogenes* ATCC 7644 u BHI i MRS tekućim hranilištima (bujonima). *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 namnažana je u BHI bujonu na 37 °C tijekom 24 sata, te u prisutnosti *E. faecalis* 101, odnosno uz dodatak 1 mL nadtaloga kulture *E. faecalis* 101. Nakon inkubiranja određivan je broj *L. monocytogenes* na Palcam agaru (Merck, Darmstadt, Njemačka). Ista metodologija ponovljena je korištenjem MRS bujona.

4. REZULTATI

Odabrani izolati enterokoka determinirani su pomoću MALDI-TOF MS kako je prikazano u tablici 1.

Tablica 1. Rezultati identifikacije enterokoka metodom MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik MALDI Biotyper)

Oznaka izolata	MALDI-TOF MS	Score MALDI-TOF MS
21	<i>Enterococcus faecium</i>	<u>2.212</u>
22	<i>Enterococcus faecium</i>	<u>2.082</u>
23	<i>Enterococcus faecium</i>	<u>1.958</u>
24	<i>Enterococcus faecium</i>	<u>2.089</u>
26	<i>Enterococcus faecium</i>	2.096
27	<i>Enterococcus faecium</i>	<u>1.921</u>
28	<i>Enterococcus faecium</i>	<u>2.078</u>
29	<i>Enterococcus durans</i>	<u>1.983</u>
101	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.163
102	<i>Enterococcus durans</i>	<u>2.072</u>

Rezultati testiranja antilisterijske aktivnosti enterokoka iz mlijeka prikazani su u tablicama 2-8.

Tablica 2. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC 7644 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	+	+	-
24	-	-	-
26	+	+	+
27	+	+	-
28	+	+	-
29	+	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

Tablica 3. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 1 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

Tablica 4. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 2 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

Tablica 5. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 3 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

Tablica 6. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 4 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

Tablica 7. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 5 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

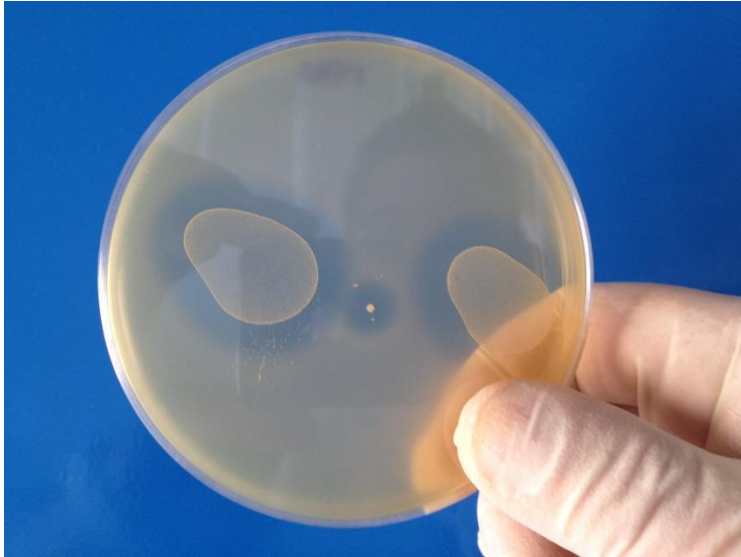
Tablica 8. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* 6 primjenom nadtaloga kulture enterokoka (n=10)

Oznaka uzorka	Zona inhibicije (+/-)		
	Agar spot	Agar difuzijski - nadtalog	Agar difuzijski – neutralizirani nadtalog
21	-	-	-
22	-	-	-
23	-	-	-
24	-	-	-
26	-	-	-
27	-	-	-
28	-	-	-
29	-	-	-
101	+	+	+
102	-	-	-

Temeljem rezultata prikazanih iz prethodnih tablica, izabran je izolat 101 (*Enterococcus faecalis* 101) čije je antilisterijsko djelovanje provjereno i u tekućim hranilištima (BHI i MRS), a rezultati su prikazani tablicom 9.

Tablica 9. Broj *L. monocytogenes* ATCC 7644 u tekućim hranilištima s *Enterococcus faecalis* 101 (24 h na 37 °C)

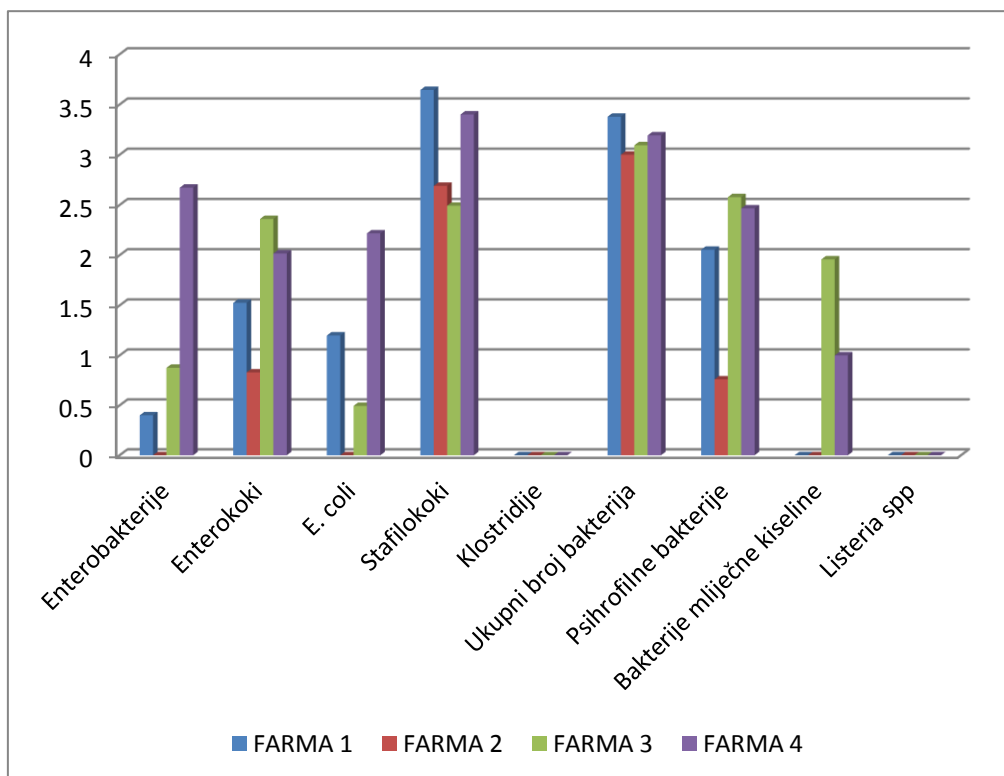
	Broj (cfu/ml) <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	
	BHI	MRS
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 7644	10^9	$3,5 \times 10^7$
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 7644 + <i>E. faecalis</i> 101	10^5	2×10^3
<i>L.monocytogenes</i> ATCC 7644 + nadtalog <i>E.f.</i> 101	$<10^4$	$2,8 \times 10^4$



Slika 1. Inhibicija rasta *L. monocytogenes* u agar spot testu (*E. faecalis* 101)

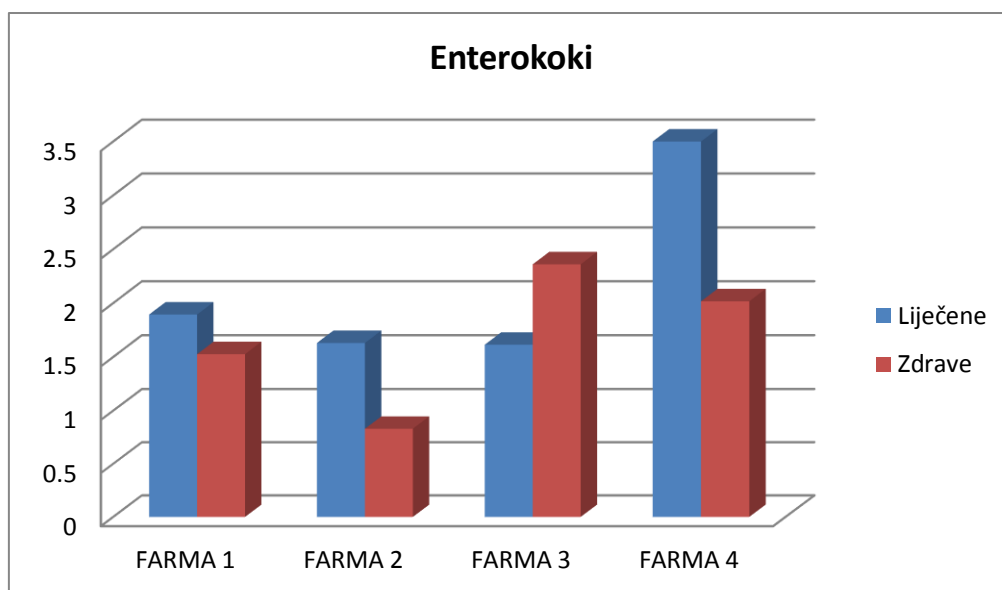
5. RASPRAVA

Nalaz enterokoka u sirovom mlijeku zdravih krava je uobičajen što pokazuju nedavna istraživanja i na našim obiteljskim gospodarstvima (slika 2, BUTKOVIĆ, 2015.).



Slika 2. Prosječni broj (\log_{10} cfu/ml) pojedinih mikroorganizama u mlijeku zdravih vimena krava (BUTKOVIĆ, 2015.)

Pored toga, rezultati navedenog istraživanja pokazali su da su enterokoki prisutni i u mlijeku zdravih i u mlijeku terapiranih (mastitis) krava (slika 3), te da je antimikrobna rezistencija podjednako prisutna u obje skupine.



Slika 3. Prosječni broj (log₁₀ cfu/ml) enterokoka u mlijeku zdravih i terapiраниh vimena krava (BUTKOVIĆ, 2015.)

U ovom našem istraživanju odabrani su izolati enterokoka iz sirovog mlijeka radi utvrđivanja njihovog inhibicijskog potencijala prema sojevima bakterije *L. monocytogenes* iz hrane. Izolati enterokoka podvrgnuti su determinaciji suvremenom metodom MALDI-TOF masene spektrometrije (ljubaznošću dr.sc. Snježane Kazazić, Institut Ruđer Bošković) koja se pokazuje brzom i pouzdanom metodom u rutinskim identifikacijama bakterijskih izolata iz hrane (PAVLOVIC i sur., 2013.). *Enterococcus faecalis* 101 pokazao je u agar spot i agar difuzijskim testovima inhibicijsko djelovanje prema referentnom soju *L. monocytogenes* te prema 6 izolata *L. monocytogenes* iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla, dok drugi ispitivani sojevi enterokoka nisu pokazali antagonistički učinak prema istim indikatorskim bakterijama. Nadalje, zanimljivi su naši rezultati istovremene inokulacije *E. faecalis* 101 i *L. monocytogenes* ATCC 7644 u BHI/MRS bujonima gdje je evidentno smanjenje populacije patogena u odnosu na bujone bez *E. faecalis*. Pored toga, primjena nadtaloga (neutraliziran nadtalog bez stanica) dovela je do još izraženijeg smanjenja broja *L. monocytogenes* u oba bujona.

Općenito, bakterije mliječne kiseline inhibiraju rast srodnih (gram-pozitivnih) bakterija primarno djelovanjem svojih organskih kiselina (octena, mliječna), a potom i sintezom antimikrobnih spojeva poput bakteriocina (LÜCKE, 2000.). U našem

istraživanju inhibicija rasta sojeva *L. monocytogenes* zabilježena je i nakon neutraliziranja kiselina u nadtalogu *E. faecalis* 101 (bez stanica), pa se može pretpostaviti da je inhibicija nastala djelovanjem enterocina ili drugog inhibitora. Brojna su istraživanja primjene enterocina u različitim proizvodima životinjskog podrijetla u smislu testiranja njihova djelovanja na umjetno inokuliranu patogenu mikrofloru, uključujući bakteriju *L. monocytogenes*. Tako su YILDIRIM i sur. (2016.) inokulirali soj *L. monocytogenes* ATCC 7644 (korišten i u našem istraživanju) u sterilizirano mlijeko u različitim koncentracijama zajedno s različitim koncentracijama enterocina KP. Utvrdili su snažno inhibirajuće djelovanje enterocina, no taj je učinak bio obrnuto proporcionalan sadržaju masti u mlijeku i koncentraciji patogena; odnosno što je mlijeko imalo manji sadržaj masti i manji početni broj patogena, enterocin je bio učinkovitiji. Željeni utjecaj enterocina na *L. monocytogenes* potvrđen je i u različitim mliječnim proizvodima, poput jogurta i različitih tradicionalnih i industrijskih sireva (LAUKOVA, 2012.).

6. ZAKLJUČCI

Enterococcus faecalis 101 izoliran iz sirovog mlijeka pokazuje inhibicijski učinak na sojeve *L. monocytogenes* iz hrane životinjskog podrijetla što je početna osnova za daljnju karakterizaciju soja.

Primjena soja ili enterocina u pokusnoj proizvodnji hrane pokazat će njihov doprinos u podizanju mikrobiološke sigurnosti hrane, posebno s obzirom na bakteriju *L. monocytogenes*.

7. LITERATURA

1. ABEE, T. (1995.): Pore-forming bacteriocins of gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. FEMS Microbiol. Lett. 129, 1-10.
2. ANDRIGHETTO, C., E. KNIJFF, A. LOMBARDI, S. TORRIANI, M. VANCANNEYT, K. KERSTERS, J. SWINGS, F. DELLAGLIO (2001.): Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. J. Dairy Res. 68, 303-316.
3. ANONIMNO (2000.): Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka. Narodne novine 122/2000.
4. BANWO, K., A. SANNI, H. TAN (2013.): Technological properties and probiotic potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from cow milk. J. Appl. Microbiol. 114, 229-241.
5. BUBONJA, M., D. VUČKOVIĆ, R. RUBEŠA- MIHALJEVIĆ, M. ABRAM (2007.): Host and bacterial factors in pathogenesis of listeriosis. Medicina 43, 15-20.
6. BUTKOVIĆ, I. (2015.): Osjetljivost bakterija na antimikrobne tvari iz mlijeka zdravih i terapiраних vimena krava. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
7. CAUSINS, C.M., A.J. BRAMLEY (1985.): The Microbiology of Raw Milk. U: Dairy Microbiology, The Microbiology of Milk, (vol. 1). Robinson, R.K. (ur.). Elsevier Applied Science Publishers, New York, 119- 164.
8. ČANŽEK MAJHENIĆ, A. (2006.): Enterokoki: ying-yang microbes; Mljekarstvo 56 (1) 5-20.
9. ČOP, M. (2016.): Utjecaj *Enterococcus faecalis* 101 na kakvoću trajnih kobasica iz domaćinstva. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
10. DOBRANIĆ, V., S. KAZAZIĆ, I. FILIPOVIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2016): Composition of raw cow's milk microbiota and identification of enterococci by MALDI-TOF MS – short communication. Vet. arhiv 86, 4, 581-590.
11. FRANK, J.F., A.N. HASSAN (2002.): Microorganisms associated with milk. Encyclopedia of Dairy Science, Vol. 3. Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P. (ur.). Academic Press, 1786- 1795.
12. FRANZ, C. M.A.P., W.H. HOLZAPFEL, M.E. STILES (1999.): Enterococci at the crossroads of food safety? Int. J. Food Microbiol. 47, 1-24.

13. FULLER, R. (1989.): Probiotics in man and animals, *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
14. GAYA, P., J. SANCHEZ, M. MEDINA, M. NUNEZ (1998.): Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiol.* 15, 551- 555.
15. GELSOMINO, R., M. VANCANNEYT, S. CONDON, J. SWINGS, T.M. COGAN (2001.): Enterococcal diversity in the environment of an Irish Cheddar-type cheesemaking factory. *Int. J. Food Microbiol.* 71, 177-188.
16. GIRAFFA, G. (1995.): Enterococcal bacteriocin: their potencial as anti *Listeria* factors in dairy techology. *Food Microbiol.* 12, 291- 299.
17. GIRAFFA, G. (2003.): Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215-222.
18. GIRAFFA, G., D. CARMINATI, E. NEVIANI (1997.): Enterococci isolated from dairy-products, A rewiw of risks and potencial technological use. *J. Food Protect.* 60, 732-737.
19. HADŽIOSMANOVIĆ, M., B. MIOKOVIĆ, B. NJARI, L. KOZAČINSKI, Ž. CVRTILA (2002.): Aktualna problematika veterinarsko-sanitarnog nadzora namirnica animalnog podrijetla. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
20. HELANDER, I.M, A. von WRIGHT, T.M. MATILLA- SANDHOM (1997.): Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 146–150.
21. IZQUIERDO, E., E. MARCHIONI, D. AOUDE- WERNER, C. HASSELMANN, S. ENNAHAR (2009.): Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multibacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 26, 16-20.
22. KLAENHAMMER, T.R. (1993.): Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 12, 39–85.
23. KLEIN, G. (2003.): Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 123-131.
24. KLEIN, G., A. PACK, C. BONAPARTE, G. REUTER (1998.): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 103-125.
25. KOS, B. (2001.): Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

26. KOZAČINSKI, L., Ž. CVRTILA, M. HADŽIOSMANOVIĆ, D. MAJNARIĆ, B. KUKURUZOVIĆ (2003.): Mikrobiološka ispravnost mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* 53, 17-22.
27. KUMARSAN, G., R. ANNALVILLI, K. SIVAKUMAR (2007.): Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. *J. Appl. Sci. Res.* 3, 1383-1387.
28. LAFARGE, V., OGIER, J.L., GIRARD, MALADEN, V., LEVEAU, J.Y., GRUSS, A., DELACROIX-BUCHNET, A. (2004.): Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5644-5650.
29. LAUKOVA, A. (2012.): Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing enterococci and their bacteriocins. U: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4. Izdanje; CRC Press, Boca Raton, Florida, 39- 42.
30. LEBOŠ PAVUNC, A., B. KOS, J. BEGANOVIĆ, K. UROIĆ, D. BUČAN, J. ŠUŠKOVIĆ (2013.): Antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of autochthonous starter cultures as safety parameters for fresh cheese production. *Mljekarstvo* 63, 185-194.
31. LEDFORD, R.A. (1998.): Raw Milk and Fluid Milk Products. *Appl. Dairy Microbiol.* 41, 55-64.
32. LÜCKE, F.-K. (2000): Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56, 105-115.
33. MATKOVIĆ, K., M. VUČEMILO, B. VINKOVIĆ, Ž. PAVIČIĆ, S. MATKOVIĆ (2006.): Mikroorganizmi u zraku staje kao mogući postsekretorni zagađivači mlijeka. *Mljekarstvo* 56, 369-377.
34. MOHAR, P., A. ČANŽEK MAJHENIČ, I. ROGELJ (2005.): Phenotypic characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of enterococcal population from Karst ewe's cheese. 2nd International ASM-FEMS Conference on Enterococci, August 28-31, 2005, Helsingor, Denmark.
35. MUNSCH-ALATOSSAVA, P., T. ALATOSSAVA (2005.): Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria. *Microbiol. Res.* 161, 334-346.
36. NES, I.F., D.B. DIEP, L.S. HAVARSTUIN, M.B. BRURBERG (1996.): Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 113–128.

37. PAVLOVIĆ, M., I. HUBER, R. KONRAD, U. BUSCH (2013.): Application of MALDI-TOF MS for the identification of food borne bacteria. *Open Microbiol. J.* 7, 135-141.
38. PUČOVIĆ, M., N. ZDOLEC, N. VRAGOVIĆ, I. FILIPOVIĆ, G. ZDOLEC, D. ORMUŽ, V. DOBRANIĆ (2012.): Analiza kakvoće mlijeka na OPG-u Pučović tijekom 2009. i 2010. godine. *Veterinarska stanica* 43, 1, 25-33.
39. RODRIGUEZ, E., B. GONZALES, G. PILAR, M. NUNEZ, M. MEDINA (2000.): Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *Int. Dairy J.* 10, 7-15.
40. SAMARDŽIJA, D., M. PODOREŠKI, S. SIKORA, A. SKELIN, T. POGAČIĆ (2007.): Mikroorganizmi- uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* 57, 251-273.
41. SANAA, M., B. POUTREL, J. L. MENARD, F. SERIEYS (1993.): Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J. Dairy Sci.* 76, 2891-2898.
42. STILES, M. (2002.): Safety aspects of enterococci from food point of view. Symposium on Enterococci in Foods-Functional and Safety aspects, Berlin, 30-31 May 2002. Abstract Book.
43. ŠUŠKOVIĆ, J. (1996.): Bacterial growth and probiotic activity of selected lactic acid bacteria, PhD Thesis, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
44. TREMONTE, P., L. TIPALDI, M. SUCCI, G. PANNELLA, L. FALASCA, V. CAPILONGO, R. COPPOLA, E. SORENTINO (2014.): Raw milk from vending machines: Effects of boiling, microwave treatment, and refrigeration on microbiological quality. *J. Dairy Sci.* 97, 3314-3320.
45. VAN BELKUM, M.J., M.E. STILES (2000.): Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Natural Products Report* 17, 323-335.
46. WALKER, S.J. (1988.): Major Spoilage Microorganisms in Milk and Dairy Products. *J. Society Dairy Technol.* 41, 91-92.
47. YILDIRIM, Z., N. ÖNCÜL, M. YILDIRIM, Ş. KARABIYIKLI (2016.): Application of lactococcin BZ and enterocin KP against *Listeria monocytogenes* in milk as biopreservation agents. *Acta Alimentaria*. U tisku.
48. ZDOLEC, N. (2007.): Utjecaj zaštitnih kultura i bakteriocina na sigurnost i kakvoću fermentiranih kobasica. Disertacija. Veterinarski fakultet Zagreb.

49. ZDOLEC, N. (2009): Dobre bakterije u mliječnim proizvodima. Mljekarski list 45, 11, 40-42.
50. ZDOLEC, N. (2011a.): Pravila higijenske mužnje. Mljekarski list 48, 5, 2-5.
51. ZDOLEC, N. (2011b.): Iz drugog u prvi razred. Mljekarski list 48, 1, 7-9.
52. ZDOLEC, N. (2016.): Antimicrobial resistance of fermented food bacteria. U: Fermented Foods, Part 1: Biochemistry and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida USA, 263-281.
53. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ, V. MEDVID (2016.): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug-treated cow udder. Vet. arhiv 86, 163-172.

8. SAŽETAK

Enterokoki imaju važnu tehnološku i higijensku ulogu u proizvodnji hrane životinjskog podrijetla. U ovom istraživanju izoliran je soj *Enterococcus faecalis* 101 iz sirovog mlijeka te je ispitan njegov inhibicijski potencijal prema izolatima bakterije *L. monocytogenes* iz hrane. Agar spot i agar difuzijskim testom utvrđene su zone inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 7644 i 6 izolata *L. monocytogenes* iz hrane primjenom neutraliziranog nadtaloga kulture *E. faecalis* što može biti rezultat djelovanja enterocina. Smanjenje populacije *L. monocytogenes* ATCC 7644 za 4-5 log zabilježeno je i u tekućim hranilištima primjenom kulture *E. faecalis* 101 odnosno nadtaloga. Ovi povoljni preliminarni rezultati preduvjet su za daljnju karakterizaciju soja s obzirom na sintezu enterocina i moguću biozaštitnu ulogu u pokusnoj proizvodnji hrane.

Ključne riječi: *Enterococcus faecalis*, enterocin, *Listeria monocytogenes*, hrana

9. SUMMARY

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ENTEROCOCCI ISOLATED FROM RAW MILK

Enterococci represents important foodborne bacteria from technological and hygienic point of view. In this study, *Enterococcus faecalis* 101 was isolated from raw milk and subjected to testing its antilisterial activity. Inhibition zones were observed toward *L. monocytogenes* ATCC 7644 and 6 food-originated strains of *L. monocytogenes* by agar spot and agar diffusion methods by applying neutralized supernatant of *E. faecalis*. Reduction of *L. monocytogenes* ATCC 7644 by 4-5 log was found in liquid media inoculated with *E. faecalis* 101 culture and supernatant, respectively. These promising preliminary results are prerequisites for further characterization of the strain with regard to enterocin synthesis and possible protective role in experimental food production.

Key word: *Enterococcus faecalis*, enterocin, *Listeria monocytogenes*, food

10. ŽIVOTOPIS

Dajana Crk rođena je 23. kolovoza 1988. godine u Vukovaru. Osnovnu školu „Dragutin Domjanić“ pohađala je u Zagrebu. 2003. godine seli u Vukovar gdje upisuje Gimnaziju Vukovar- opći smjer. 2007. godine upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij na Veterinarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Apsolvirala je akademske godine 2015./ 2016. Tijekom studiranja, par godina radila je kao demonstratorica na kolegiju „Medicinska kemija“ Zavoda za kemiju i biokemiju. Tijekom cijelog studija obavljala je različite poslove preko Studentskog servisa.