

Antimikrobni potencijal enterokoka izdvojenih iz sirovog mlijeka



The antimicrobial potential of enterococci isolated from raw milk

Crk, D., N. Zdolec*

Sažetak

Enterokoki imaju važnu tehnološku i higijensku ulogu u proizvodnji hrane životinjskog podrijetla. U ovom je istraživanju istražen inhibicijski potencijal soja *Enterococcus faecalis* 101 iz sirovog mlijeka prema sojevima *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, 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.

30

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

Abstract

Enterococci are important foodborne bacteria from a technological and hygienic point of view. In this study, *Enterococcus faecalis* 101 was isolated from raw milk and subjected to testing of 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 a neutralized supernatant of the strain. Reduction of the population of *L. monocytogenes* ATCC 7644 by 4-5 log was found in liquid media inoculated with *E. faecalis* 101 culture, and the supernatant, respectively. These promising preliminary results are prerequisites for further characterization of the strain with regard to enterocin synthesis and its possible protective role in experimental food production.

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

Uvod

Mlijeko je vrlo pogodna podloga za razmnožavanje većine vrsta mikroorganizama, uključujući patogene bakterije. S druge strane, u sastavu mikroflore nalazimo i poželjne bakterije, tzv. *dobre bakterije* koje mogu djelovati blagotvorno na organizam potrošača, primarno putem fermentiranih mliječnih

proizvoda. Tu su posebno važne bakterije mliječne kiseline (BMK) kao sastavni dio prirodne mikroflore mlijeka, koje svojom metaboličkom aktivnošću utječu i na ukupnu kakvoću mlijeka i fermentiranih mliječnih proizvoda (Zdolec, 2009.). Bakterije mliječne kiseline vrlo su heterogena skupina gram-pozitivnih bakterija s izrazitom metaboličkom aktivnošću i mli-

Dajana CRK, dr. med. vet., Veterinarska stanica Vinkovci; dr. sc. Nevijo ZDOLEC, dr. med. vet., izvredni profesor, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; *e-mail: nzdolec@vef.hr.

ječnom 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 dominiraju vrste *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 onečišćivačima ili bakterijskim kontaminantima). No, postupno su enterokoki prihvaćeni kao autohtona populacija želučano-crijevnog sustava zdravih ljudi i životinja te dio fiziološke mikroflore sirovog mlijeka i tradicionalnih mliječnih proizvoda gdje pridonose specifičnosti proizvoda (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 jest, dakle, antimikrobna aktivnost prema bakterijama kvarenja ili patogenim bakterijama. Najvažniji je mehanizam inhibicije nepoželjne mikroflore stvaranje organskih kiselina ili pak antimikrobnih peptida poput bakteriocina (Zdolec, 2007.). Enterokoki koji pokazuju ta svojstva često se 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* (Zdolec i sur., 2017.). U vezi s navedenim, cilj je ovoga rada bio ispitati antimikrobnu aktivnost enterokoka iz sirovog mlijeka na modelu *in vitro* inhibicije rasta različitih sojeva *L. monocytogenes* iz hrane.

Materijal i metode

Izolacija i identifikacija enterokoka iz mlijeka

Izolati enterokoka (n = 10) prikupljeni su iz mlijeka u prijašnjem istraživanju (Zdolec i sur., 2016). Identifikacija soja provedena je pomoću MALDI-TOF

masene spektrometrije nakon ekstrakcije etanolom/mravljom kiselinom prema preporukama proizvođača (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka). Metodologija identifikacije opisana je u radu Dobranić i suradnika (2016.).

Testiranje antimikrobne aktivnosti

Krute podloge

Antimikrobna aktivnost enterokoka određivana je agar-spot i agar-difuzijskim testom primjenom indikatorskog mikroorganizama *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 te šest sojeva *L. monocytogenes* iz hrane. Ukratko, enterokoki (n = 10) namnažani su u Brain Heart Infusion (BHI) bujonu na 37 °C tijekom 24 sata. Dva mililitra kulture potom je centrifugirano na 10 000 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 dodani indikatorski 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*. Nakon nanošenja nadtaloga ploče su stavljene u hladnjak tijekom jednoga sata te potom inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije provjerena je pojava zone inhibicije rasta indikatorskog mikroorganizma.

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

Tekuće podloge

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 je metodologija ponovljena korištenjem MRS bujona.

Rezultati i rasprava

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

Rezultati testiranja antimikrobne aktivnosti enterokoka iz mlijeka prema *L. monocytogenes* ATCC 7644 prikazani su u tablici 2.

Ostalih 6 indikatorskih sojeva *L. monocytogenes* iz hrane bilo je inhibirano samo primjenom soja oznake 101 (*Enterococcus faecalis*) i nakon neutralizacije nadtaloga. Temeljem tih preliminarnih rezultata izabran je izolat 101 (*Enterococcus faecalis* 101)

čije je antilisterijsko djelovanje provjereno i u tekućim hranilištima (BHI i MRS), a rezultati su prikazani tablicom 3.

Nalaz enterokoka u sirovom mlijeku zdravih krava je uobičajen, što pokazuju nedavna istraživanja i na našim obiteljskim gospodarstvima (Zdolec i sur., 2016.). U ovom su istraživanju odabrani izolati enterokoka iz sirovog mlijeka radi utvrđivanja njihova inhibicijskog potencijala prema sojevima bakterije *L. monocytogenes* iz hrane. Izolati enterokoka podvrgnuti su determinaciji suvremenom metodom MAL-

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

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

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

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

Tablica 3. 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 x 10 ⁷
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 + <i>E. faecalis</i> 101	10 ⁵	2 x 10 ³
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644 + nadtalog <i>E.f.</i> 101	< 10 ⁴	2,8 x 10 ⁴



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

DI-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 istodobne 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*. Osim 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 je istraživanju inhibicija rasta sojeva *L. monocytogenes* zabilježena 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 suradnici (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 je utjecaj enterocina na *L. monocytogenes* potvrđen i u različitim mliječnim proizvodima, poput jogurta i različitih tradicionalnih i industrijskih sireva (Laukova, 2012.).

Zaključak

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*.

Zahvala

Rad je dio diplomskog rada Dajane Crk naslova „Antimikrobna aktivnost enterokoka izoliranih iz sirovog mlijeka“ (mentor: doc. dr. sc. Nevijo Zdolec).

Autori zahvaljuju dr. sc. Snježani Kazazić (Institut Ruđer Bošković) na determinaciji izolata pomoću MALDI-TOF MS i Ani Konjević (Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Veterinarski fakultet) na tehničkoj pomoći pri provođenju laboratorijskih istraživanja.

Literatura

- 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.
- 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.
- ČANŽEK MAJHENIĆ, A. (2006): Enterokoki: ying-yang microbes. *Mljekarstvo* 56, 5-20.
- 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, 581-590.
- 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.
- FULLER, R. (1989): Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
- 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.
- GIRAFFA, G., D. CARMINATI, E. NEVIANI (1997): Enterococci isolated from dairy-products, A review of risks and potential technological use. *J. Food Protect.* 60, 732-737.
- KLEIN, G., A. PACK, C. BONAPARTE, G. REUTER (1998): Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 103-125.
- KOS, B. (2001): Probiotički koncept: in vitro istraživanja s odabranim bakterijama mliječne kiseline. Disertacija, Prehrambeno-bioteknološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- LAUKOVA, A. (2012): Potential applications of probiotic, bacteriocin-producing enterococci and their bacteriocins. U: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, 4th edition; CRC Press. Boca Raton, Florida (39-42).
- 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.
- LÜCKE, F.-K. (2000): Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Sci.* 56, 105-115.
- PAVLOVIC, 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.
- ŠUŠKOVIĆ, J. (1996): Bacterial growth and probiotic activity of selected lactic acid bacteria, PhD Thesis, Prehrambeno- tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- 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* 45, 486-492.
- ZDOLEC, N. (2007): Utjecaj zaštitnih kultura i bakteriocina na sigurnost i kakvoću fermentiranih kobasica. Disertacija. Veterinarski fakultet Zagreb.
- ZDOLEC, N. (2009): Dobre bakterije u mliječnim proizvodima. *Mljekarski list* 45, 40-42.
- 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.
- ZDOLEC, N., M. ČOP, V. DOBRANIĆ (2017): Primjena *Enterococcus faecalis* iz mlijeka u proizvodnji trajnih kobasica. *Hrvatski veterinarski vjesnik* 25, 56-62.