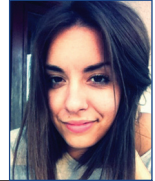


Utjecaj bakteriocina enterokoka na odabrane uzročnike bolesti prenosivih hranom



Nina Vukušić i Nevijo Zdolec*

Sažetak

Enterokoki imaju važnu ulogu u fermentaciji hrane te često pokazuju probiotička svojstva. U ovom radu istražen je njihov antimikrobni učinak *in vitro* prema referentnim sojevima i sojevima izoliranih iz hrane bakterija *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica* i *Salmonella* Typhimurium. Korištena je agar difuzijska metoda, a nadtalozni neutralizirani i tretirani proteazom. *Enterococcus faecalis* EF-101 je pokazao snažno inhibicijsko

djelovanje prema svim sojevima bakterije roda *Listeria*, kao i soja *Y. enterocolitica* O:3. Karakterizacijom inhibitora ustvrđeno je da se radi o tvari proteinske strukture, moguće bakteriocina enterocina čija je aktivnost bila 1280 AU/mL. Potrebna su daljnja istraživanja radi potencijalne primjene enterocina kao prirodnog konzervansa u očuvanju održivosti i povećanja mikrobiološke sigurnosti hrane.

Ključne riječi: enterocin, patogene bakterije, hrana životinjskog podrijetla

Uvod

Primjena bakteriocina, antimikrobnih bakterijskih peptida, jedno je od vodećih područja znanstvenih-primjenjivih istraživanja s ciljem uvođenja prirodnih konzervanasa u proizvodnji hrane. Bakteriocini enterokoka (enterocini) mogu biti širokog ili uskog spektra djelovanja, a najznačajnije enterocin-sintetizirajuće vrste su: *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Njihovi su bakteriocini iz II skupine bakteriocina koje smatramo malim, toplinski stabilnim i membranski aktivnim peptidima (van Belkum i Stiles, 2000.). Enterocini

su opisani kao antimikrobni peptidi aktivni protiv nekih usko povezanih bakterija mliječne kiseline, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus aureus* i stoga pokazuju potencijal u unaprjeđenju sigurnosti hrane (Giraffa, 1995.). Mogu se primjenjivati u hrani kao svojevrsni aditivi, tj. dodatci ili putem bakteriocinogenih sojeva direktno u prehrambenom lancu. Također se ispituje primjenjivost enterokoka kao starter kultura koje sintetiziraju bakteriocine, no tu je nužna potpuna karakterizacija sojeva s obzirom na potenci-

Nina VUKUŠIĆ, dr. med. vet., Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Nevijo ZDOLEC*, dr. med. vet., (dopisni autor, e-mail: nzdolec@vef.hr), izvanredni profesor, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

jalna rizična svojstva (Zdolec i sur., 2017.). U tom smislu moraju zadovoljiti kriterije sigurnosti poput izostanka virulentnih faktora, prenosivih gena rezistencije ili dekarboksilacijske aktivnosti (Zdolec, 2018.).

Pojedini sojevi *E. faecalis* i *E. faecium* ne pokazuju virulentna svojstva, ne tvore biogene amine niti su otporni na antibiotike pa ih to čini potencijalno primjenjivima u fermentiranim proizvodima (Callewaert i sur., 2000.). Zabilježeno je da i njihovi bakteriocini snažno inhibiraju pojedine patogene bakterije u hrani životinjskog podrijetla. Tako su Ananou i sur. (2004.) upotrijebili enterocin AS-48 iz *E. faecalis* s ciljem inhibiranja rasta enterotoksičnih sojeva *S. aureus*. Autori su kombinirali metode čuvanja hrane i dodali enterocin na 4 °C, zajedno s povećanom koncentracijom NaCl (6-7 %) i time dobili željene rezultate. Ennahar i Deschamps (2000.) zapazili su visoku aktivnost enterocina A iz *E. faecium* na 13 sojeva *L. monocytogenes*. Aymerich i sur. (2000.) su demonstrirali učinkovitost enterocina A i B u kontroli *L. innocua* u raznim mesnim proizvodima (kuhana šunka, pašteta, fermentirani proizvodi).

Poznato je da bakteriocini bakterija mliječne kiseline djeluju na Gram-pozitivne bakterije, dok djelovanje na Gram-negativne nije uobičajeno najvjerojatnije zbog složenije strukture njihove stanične membrane koja je nepropusna za većinu makromolekula i hidrofobnih supstanci (Vesković-Moračanin, 2010.). Cilj je ovog rada bio ispitati učinak odabranih sojeva enterokoka iz hrane životinjskog podrijetla na neke od patogenih bakterija važnih u veterinarskom javnom zdravlju, uključujući *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* i *Salmonella* Typhimurium.

Materijali i metode

Izolati enterokoka

Za potrebe ovog istraživanja korišteni su izolati enterokoka iz hrane životinjskog

podrijetla prikupljeni tijekom rutinskih mikrobioloških analiza. 25 grama uzoraka homogenizirano je u slanoj peptonskoj vodi te su načinjena serijska decimalna razrjeđenja iz kojih je uzeto 0,1 mL inokuluma i nasadeno na površinu Compass *Enterococcus* agara (Biokar, Francuska) koji je inkubiran 24 h na 44 °C. Odabrani izolati ($n=10$) namnažani su u De Man, Rogosa i Sharpe bujonu (MRS, Darmstadt, Merck, Njemačka) te korišteni za ispitivanja antimikrobne aktivnosti. Pored 10 izolata enterokoka, korišten je i soj *Enterococcus faecalis* EF-101 iz sirovog mlijeka koji je pokazao antimikrobnu aktivnost u prijašnjim istraživanjima (Zdolec i sur., 2016., Crk i Zdolec, 2018.).

Priprema sojeva za ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Svaki pojedini izolat enterokoka namnažan je u 10 mL MRS bujona na 37 °C. Aktivna kultura (10 mL) je potom prebačena u 100 mL MRS bujona i inkubirana u istim uvjetima. Jedan mL kulture je centrifugiran na 14000 o/min tijekom 10 minuta na 4 °C. Potom je uzet nadtalog koji je korišten za ispitivanje antimikrobnog učinka. Antimikrobna aktivnost nadtaloga provjerena je agar difuzijskim testom u Brain Heart Infusion agaru (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) prekrivenog s 5 mL mekog (0,7 % agara) BHI agara u koji su dodavane indikatorske bakterije. Indikatorske bakterije prethodno su namnožene u primjerenoj tekućoj podlozi; Buffered Peptone Water (BPV, Merck, Njemačka) za salmonelu, BHI za listeriju i Peptone Sorbitol Bile (PSB, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD) za jersiniju.

Nakon pripreme ploča s indikatorskim mikroorganizmom, u agaru su načinjene jažice u koje se stavlja 100 µL nadtaloga. Kako bi se isključilo antimikrobno djelovanje kiselina, pH nadtaloga je neutraliziran na pH 7 pomoću 1N NaOH. Po nanošenju nadtaloga u jažice,

ploče su stavljene u hladnjak na 60 min. te potom inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije provjerena je pojava zone inhibicije rasta indikatorskog mikroorganizma. Istovremena pojava inhibicije rasta indikatorske bakterije oko jažice s nadtalogom te oko jažice s neutraliziranim nadtalogom smatra se preliminarnim dokazom djelovanja antimikrobne tvari koja nije organska kiselina (mliječna, octena i dr.). Proteinska struktura inhibitora provjerena je pomoću enzima proteinaze K (Sigma Aldrich, SAD). U slučaju pojave inhibicije neutraliziranim nadtalogom i potom izostanka inhibicije neutraliziranim nadtalogom tretiranog proteazom, govorimo o djelovanju bakteriocina ili bakteriocin-sličnoj tvari.

Antimikrobna aktivnost enterokoka ispitana je prema sljedećim bakterijama: *Listeria monocytogenes* 8 (izolat iz sirovog mlijeka), *Yersinia enterocolitica* 14 (izolat iz tonzila divljih svinja), *L. monocytogenes* NCTC 10527, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *Listeria ivanovii* ATCC 19111, *Listeria innocua* ATCC 33090, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Mjerenje aktivnosti bakteriocina

Priprema nadtaloga inhibirajuće kulture enterokoka provedena je prema Zdolec i sur. (2008.). Ukratko, soj enterokoka s antimikrobnom aktivnosti prema više indikatorskih bakterija namnažan je u 10 mL MRS bujona, potom je ta kultura namnažana dalje u omjeru 1:10 te je dobiveno 1 L kulture. Kultura je podijeljena u 20 jednakih dijelova po 50 mL radi centrifugiranja (Eppendorf centrifuge 5804R, Hamburg, Njemačka) 10 minuta na 5000 o/min. Centrifugiranje je ponovljeno dva puta. Nadtalog je pažljivo odvojen i prikupljen u novu sterilnu čašu (2 L). Izmjeren je pH (pH510, Eutech Instruments, Nizozemska) koji je potom podešen na pH 7 pomoću 10 N NaOH uz stalno miješanje nadtaloga. Jedan mililitar nadtaloga je steriliziran kroz filtere veličine pora 0,22 µm (FilterBio,

Kina). Nakon sterilizacije otopina je razrijeđena u sterilnoj destiliranoj vodi 1:1, tj. načinjena su razrjeđenja 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024. Potom je 100 µL određenog razrjeđenja korišteno u agar difuzijskom testu s indikatorskom bakterijom kako bi se odredila koncentracija bakteriocina. Ona je jednaka recipročnoj vrijednosti najvećeg razrjeđenja u kojem se pojavljuje inhibicija indikatorske bakterije i izražava se u AU/mL (arbitrarne jedinice/mL).

Rezultati i rasprava

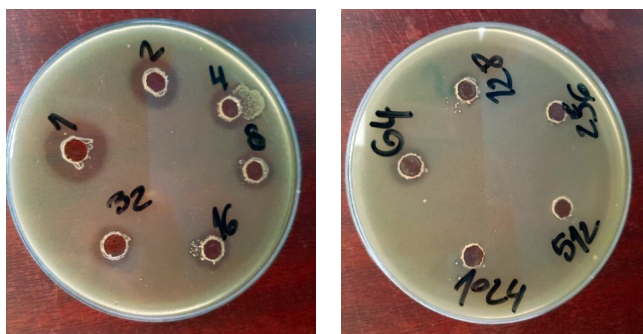
Rast *L. monocytogenes* 8 iz sirovog mlijeka inhibiralo je 7 sojeva enterokoka djelovanjem netretiranog nadtaloga (pH 5,5). Samo jedan soj je inhibirao rast *L. monocytogenes* ATCC 7644 i *L. monocytogenes* NCTC 10527, dok je inhibicija izostala nakon neutralizacije nadtaloga. *E. faecalis* EF-101 inhibirao je rast sva tri navedena soja *L. monocytogenes* i nakon neutralizacije nadtaloga (moguće djelovanjem bakteriocina). *Listeria ivanovii* ATCC 19111 bila je inhibirana primjenom netretiranog i neutraliziranog nadtaloga jednog soja kao i sojem EF-101, dok je soj *L. innocua* ATCC 33090 bio inhibiran samo primjenom *E. faecalis* EF-101. U pogledu Gram-negativnih bakterija, patogena *Y. enterocolitica* 14 (O:3 serotip) je bila inhibirana netretiranim nadtalogom jednog soja enterokoka, dok je EF-101 pokazao inhibiciju i neutralizacijom (moguć učinak enterocina). Na rast *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 nije bilo nikakvog utjecaja ispitivanih sojeva enterokoka kao ni *E. faecalis* EF-101. S obzirom na dobivene rezultate, soj *E. faecalis* EF-101 korišten je za karakterizaciju bakteriocina i određivanje njegove koncentracije postupkom serijskih razrjeđivanja uz indikator mikroorganizam *L. monocytogenes* NCTC 10527 (Slika 1).

U našem istraživanju pokazalo se da enterokoki djeluju inhibirajuće na sojeve bakterije *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* i *L.*

innocua te *Y. enterocolitica*. Antimikrobno djelovanje na sojeve iz roda *Listeria* zabilježeno je i nakon neutraliziranja nadtaloga kulture *E. faecalis* EF-101, što može biti rezultat djelovanja bakteriocina – enterocina. Proteinska struktura inhibitora je i potvrđena primjenom proteinaze K, što se smatra dokazom postojanja bakteriocina u otopini (nadtalogu). Agar-difuzijskim testom nakon razrjeđivanja nadtaloga kulture *E. faecalis* EF-101 u našem istraživanju je zabilježena inhibicija *L. monocytogenes* u razrjeđenju 1:128, primjenom netretiranog i neutraliziranog taloga. Aktivnost enterocina u zadanim uvjetima pripreme otopine je zadovoljavajuća te je potrebno dodatno ispitati sintezu bakteriocina u različitim uvjetima temperature, pH i dr. kao i njegovu stabilnost. Crk i Zdolec (2018.) navode da *Enterococcus faecalis* EF-101 pokazuje u agar spot i agar difuzijskim testovima inhibicijsko djelovanje prema šest izolata *L. monocytogenes* iz uzoraka hrane životinjskog podrijetla. Autori su istovremenom inokulacijom *E. faecalis* EF-101 i *L. monocytogenes* ATCC 7644 u BHI/MRS tekućim hranilištima dokazali evidentno smanjenje populacije patogena u odnosu na tekuća hranilišta bez *E. faecalis*. Pored toga, primjena nadtaloga (neutraliziran nadtalog bez stanica) dovela je do još izraženijeg smanjenja broja *L. monocytogenes* u oba tekuća hranilišta.

Kako smo ranije naveli, bakteriocini bakterija mliječne kiseline mogu biti aktivni samo protiv srodnih Gram-pozitivnih bakterija (Jack i sur., 1995.). U našem istraživanju inhibirane su bile upravo Gram-pozitivne bakterije, dok je inhibicija izostala u slučaju salmonele. Međutim, značajan je naš nalaz inhibicije *Y. enterocolitica* i u odsustvu organskih kiselina, što je potrebno dalje istražiti radi potvrde učinka djelovanja enterocina iz *E. faecalis* EF-101 i na druge Gram-negativne bakterije. Ukupno gledajući, slične rezultate pokazuju Kubašová i sur. (2017.) koji nalaze samo dva soja enterokoka (*E. faecium* IK25 i *E. faecium* BRI) s antimikrobnom aktivnosti prema indikatorskim bakterijama i to samo prema *E. faecium*, *Listeria monocytogenes* i *Lactobacillus* spp., dok inhibicije nije bilo prema *Bacillus* sp., *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Salmonella* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., i *Yersinia* sp. Osim u laboratorijskim uvjetima, antimikrobni učinak enterokoka ispitivan je mnogo puta i u pokusnim proizvodnjama hrane gdje se inhibira *L. monocytogenes* (Rubio i sur., 2013.) ili stafilokoki (Sparo i sur., 2008.).

Naše istraživanje, uz prije provedene eksperimente na ovom soju (Zdolec i sur., 2017., Crk i Zdolec, 2018.) proširuje saznanja o njegovoj antimikrobnoj aktivnosti s obzirom na antimikrobni



Slika 1. Određivanje aktivnosti bakteriocina iz neutraliziranog nadtaloga *E. faecalis* EF-101 (snimila: Nina Vukušić)

spektar te proteinsku strukturu inhibitora. Primjenjivost enterocina iz *E. faecalis* EF-101 u proizvodnji hrane ili animalnoj proizvodnji moguća je nakon daljnjih istraživanja.

Zahvala

Rad je izvadak iz diplomskog rada Nine Vukušić naslova „Karakterizacija bakteriocina enterokoka izoliranih iz hrane životinjskog podrijetla“ (mentor izv.prof.dr.sc. Nevijo Zdolec). Autori se zahvaljuju Ani Konjević na tehničkoj pomoći tijekom laboratorijskih analiza.

Literatura

1. ANANOU, S., E. VALDIVIA, M. MARTINEZ BUENO, A. GALVEZ and M. MAQUEDA (2004): Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J. Appl. Microbiol.* 97, 48-56.
2. AYMERICH, T., M. GARRIGA, J. YLLA, J. VALLIER, J. M. MONFORT and M. HUGAS (2000): Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *J. Food Protect.* 63, 721-726.
3. CALLEWAERT, R., M. HUGAS and L. DE VUYST (2000): Competitiveness and bacteriocin production of enterococci in production of Spanish style dry fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 57, 33-42.
4. CRK, D. and N. ZDOLEC (2018): Antimicrobial potential of enterococci isolated from raw milk. *Hrv. vet. vjesnik* 26, 30-34.
5. ENNAHAR, S. and N. DESCHAMPS (2000): Anti-*Listeria* effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 88, 449-457.
6. GIRAFFA, G. (1995): Enterococcal bacteriocins their potential as anti-*Listeria* factors in dairy technology. *Food Microbiol.* 12, 291-299.
7. JACK, R. W., J. R. TAGG and B. RAY (1995): Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 171-200.
8. KUBAŠOVIĆ, I., V. STROMPFOVÁ and A. LAUKOVÁ (2017): Safety assessment of commensal enterococci from dogs. *Folia Microbiol.* 62, 491-498.
9. RUBIO, R., S. BOVER-CID, B. MARTIN, M. GARRIGA and T. AYMERICH (2013): Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food Microbiol.* 33, 158-165.
10. SPARO, M., G. G. NUÑEEZ, G. G., M. GASTRO, M. L. CALCAGNO, M. A. GARCIA ALLENDE, M. CECI, R. NAJLE and M. MANGHI (2008): Characteristics of an environmental strain, *Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as -additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 25, 607-615.
11. VESKOVIĆ-MORAČANIN, S. (2010): Lactic acid bacteria bacteriocins as natural food protectors – possibilities of applications in food industry. *Tehnologija mesa* 51, 83-94.
12. VAN BELKUM, M. J. and M. E. STILES (2000): Nonantibiotic antibacterial peptides from lactic acid bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 17, 323-335.
13. ZDOLEC, N., M. HADŽIOSMANOVIĆ, L. KOZACINSKI, Ž. CVRITILA, I. FILIPOVIĆ, M. ŠKRIVANKO and K. LESKOVAR (2008): Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Sci.* 80, 480-487.
14. ZDOLEC, N., V. DOBRANIĆ, I. BUTKOVIĆ, A. KOTURIĆ, I. FILIPOVIĆ and V. MEDVID (2016): Antimicrobial susceptibility of milk bacteria from healthy and drug treated cow udder. *Vet. arhiv* 86, 163-172.
15. ZDOLEC, N., M. ČOP i V. DOBRANIĆ (2017): Primjena *Enterococcus faecalis* 101 iz mlijeka u proizvodnji trajnih kobasica. *Hrv. vet. vjesnik* 25, 56-62.
16. ZDOLEC, N. (2018): Technological interventions in fermented meat production: the commercial perspective. In: Panda, S. K., P. H. Shetty: Innovations in technologies for fermented food and beverage industries, *Food Microbiology and Food Safety*. Springer International Publishing AG, Cham (175-188).

The effect of enterococcal bacteriocins on selected foodborne pathogens

Nina VUKUŠIĆ, DVM, Zagreb, Croatia; Nevijo ZDOLEC, DVM, PhD, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Croatia

Enterococci have an important role in food fermentation and often exhibit probiotic properties. In this paper, their antimicrobial effect was investigated *in vitro* against the following reference strains and strains isolated from food: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* Typhimurium. The agar diffusion method was used, and the supernatants were neutralized and treated

with protease. *Enterococcus faecalis* EF-101 showed strong inhibitory activity against all strains of *Listeria* as well as the *Y. enterocolitica* O:3 strain. The activity of the proteinaceous inhibitor was 1280 AU/mL. Further research should be carried out to assess the potential use of enterocin as a natural preservation agent in food protection.

Key words: enterocin; bacterial pathogens; food of animal origin