

ORIGINALNI ZNANSTVENI RAD

Pokazatelji sigurnosti tradicionalnog kulena i kulenove seke s područja Brodsko-posavske županije s obzirom na bakteriju *Listeria monocytogenes*

Marija Matijević¹, Nevijo Zdolec^{2*}

Sažetak

Prosudivanje mikrobiološke sigurnosti trajnih kobasica sukladno Uredbi 2073/2005 obuhvaća kriterije za bakterije *Salmonella* spp. i *Listeria monocytogenes*. Pri tome fizikalno-kemijski parametri proizvoda uvjetuju odabir kriterija za *L. monocytogenes* s obzirom na (ne)mogućnost njezinog rasta. Cilj je ovog rada bio odrediti prisutnost/odsutnost *L. monocytogenes* molekularnom metodom, aktivitet vode, pH te sastav autohtone mikrobiote u kulenima i kulenovim sekama (n=18) s područja Brodsko-posavske županije. Prosječne vrijednosti pH, aktiviteta vode, broja bakterija mliječne kiseline te enterokoka nisu se značajno razlikovale među skupinama uzoraka (kulenova seka: kulen; p>0,05). *Listeria monocytogenes* nije detektirana molekularnom metodom ni u jednom uzorku. Dominirale su vrste laktobacila i to *Lactilactobacillus sakei* (44 % uzoraka) i *Lactilactobacillus curvatus* (28 % uzoraka), a u pojedinačnim uzorcima vrste *Leuconostoc carnosum*, *Enterococcus malodoratus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lactiplantibacillus plantarum* te *Pediococcus pentosaceus*. Tradicionalni kulen i kulenova seka mikrobiološki su sigurni proizvodi s obzirom na bakteriju *L. monocytogenes*, a fizikalno-kemijska svojstva, odnosno aktivitet vode, onemogućili bi njezin rast u slučaju prisutnosti tijekom roka trajanja. Međutim, takva se procjena ne može donositi generalno za cijelu skupinu proizvoda, već za pojedinačne proizvodne serije s obzirom na neujednačenost proizvoda između individualnih proizvođača.

Ključne riječi: kulen, kulenova seka, *Listeria monocytogenes*, aktivitet vode, bakterije mliječne kiseline

Uvod

Proizvodnja fermentiranih mesnih proizvoda ima dugu tradiciju u našoj zemlji, među kojima se posebno ističu trajne kobasice poput kulena/kulenove seke i različite vrste suhomesnatih proizvoda. Tradicionalan način proizvodnje glavna je karakteristika po kojoj su kulen i kulenova seka posebni, što

obuhvaća sezonski karakter proizvodnje te prirodan način fermentacije, dimljenja, sušenja i zrenja (Kovačić i Karoly, 2014.). Tradicionalne trajne kobasice proizvode se bez dodavanja starter kultura, pa su organoleptičke karakteristike i mikrobiološka stabilnost ovisne o metaboličkoj aktivnosti prirodno prisut-

¹ Marija Matijević, dr. med. vet., Oriovet, d.o.o., Ante Starčevića 1A, Lužani

² Dr. sc. Nevijo Zdolec, redoviti profesor, Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane, Heinzelova 55, Zagreb.

* Autor za korespondenciju: nzdolec@vef.unizg.hr

ne mikrobiote, a to su bakterije mliječne kiseline i koagulaza negativni koki (Maksimović i sur., 2015.).

Zdravstvena se ispravnost tih proizvoda u mikrobiološkom smislu temelji na fizikalno-kemijskim svojstvima proizvoda, koja onemogućuju rast patogenih bakterija tijekom proizvodnog procesa (Zdolec, 2016.). Pored toga, antimikrobni učinak posjeduje i autohtona mikrobiota, odnosno bakterije mliječne kiseline (BMK), koje su specifične za svaki tradicionalni proizvod (Hendak, 2017.). Istraživanja sastava prirodne mikrobiote u hrvatskim tradicionalnim mesnim proizvodima vrlo su česta i provedena ponajviše na trajnim kobasicama (Šarić, 2022.). Primjerice, Babić i sur. (2011.) su u slavonskom kulenu među BMK zabilježili dominantnu vrstu *Leuconostoc mesenteroides* i *Lactobacillus acidophilus*, a među stafilokokima *Staphylococcus xylosus* i *Staphylococcus warneri*. Potom, Igrec (2020.) provodi istraživanje na uzorcima kulena koji su proizvedeni u kontroliranim i nekontroliranim (tradicionalnim) uvjetima te izolira *Pediococcus pentosaceus* i *Lactobacillus curvatus* iz industrijskih kulena (vjerojatno starter kultura). Također je provedeno ispitivanje na prisutnost *Listeria monocytogenes* molekularnom metodom, pri čemu su svi uzorci kulena bili negativni.

Prosuđivanje mikrobiološke sigurnosti trajnih kobasica sukladno Uredbi 2073/2005 obuhvaća kriterije za bakterije *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes*. Posljednjih godina slučajevi alimentarne listerioze u Europi te slučajevi povlačenja proizvoda s tržišta zbog nalaza *L. monocytogenes* su u porastu, a fermentirane kobasice nisu iznimka (EFSA i ECDC, 2025.). *L. monocytogenes* može perzistirati u pogonima prehrambene industrije, uključujući proizvodnju mesnih proizvoda spremnih za konzamaciju (RTE), odnosno fermentiranih kobasica. Jedan takav slučaj opisali smo i u Hrvatskoj (Pažin i sur., 2018.). S obzirom na cilj sigurnosti hrane (engl. *Food Safety Objective*) od < 100 cfu/g u gotovoj hrani koja ne pogoduje njenom rastu tijekom roka trajanja, važno je ispravno kategorizirati proizvod, odnosno dokazati da proizvod ne pogoduje rastu bakterije. U slučaju da je rast moguć, potrebno je dokazati da se neće nadvisiti kritična granica od 100 cfu/g do kraja roka trajanja. No ako dokazi nisu pruženi, na proizvod se primjenjuje kriterij odsutnosti *L. monocytogenes* u 25 grama tijekom roka trajanja proizvoda (Uredba EZ 2024/2895, primjenjiva od 1.7.2026.). Općenito je prihvaćeno da proizvodi s pH ≤ 4,4 ili aktivitetom vode (aw) ≤ 0,92, te proizvodi s pH ≤ 5,0 i aw ≤ 0,94 ne pogoduju rastu ovog patogena (Ured-

ba EZ 2073/2005). U tom smislu je i cilj ovog rada bio odrediti pokazatelje sigurnosti tradicionalnog kulena i kulenove seke s područja Brodsko-posavske županije, koji su obuhvaćali fizikalno-kemijske parametre aktiviteta vode i kiselosti te prisutnosti *L. monocytogenes* i dominantnih vrsta bakterija mliječne kiseline.

Materijali i metode

Uzorci

Tradicionalno proizvedeni kulen (n=9) i kulenova seka (n=9) uzorkovani su na kraju zrenja, odnosno tijekom roka trajanja, od odobrenih proizvođača i privatnih gospodarstava (n=18) na području Brodsko-posavske županije tijekom sezone 2024/2025. Uzorci su dostavljeni u neoštećenom stanju prijenosnim hladnjakom u mikrobiološki laboratorij Zavoda za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane Veterinarskog fakulteta te podvrgnuti analizama u roku od 24 sata od primitka.

Određivanje broja, izolacija i determinacija bakterija mliječne kiseline (BMK)

Prije mikrobiološke pretrage sterilno je odvojen ovitak te potom uzorkovano 25 grama uzorka u sterilnu vrećicu za homogenizaciju te načinjeno osnovno razrjeđenje (1:9, u fiziološkoj otopini) primjenom gravimetrijskog dilutora (DiluFlow, Interscience, Cantal, Francuska), homogenizirano tijekom 2 minute (BagMixer, Interscience) te je načinjena serija decimalnih razrjeđenja (1:9). Potom je 0,1 ml najvećih razrjeđenja (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5}) površinski naciepljeno na de Man, Rogosa, Sharpe agar (MRS, Merck, Darmstadt, Njemačka) te inkubirano anaerobno (Anaerocult, 2,5L, Merck, Darmstadt, Njemačka) tijekom 48 sati pri 30 °C. Za određivanje broja enterokoka odabrana su niža razrjeđenja (10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1}) te je 0,1 ml naciepljeno na Compass Enterococcus agar (Biokar Diagnostics, Allonne, Francuska) uz inkubaciju tijekom 24 sata pri 44 °C. Po inkubaciji određen je broj poraslih kolonija primjenom automatskog brojača uz programsku podršku (Scan 1200, Interscience) i izražen kao broj kolonija u gramu (CFU/g) te logaritmiran (\log_{10} CFU/g). Za determinaciju BMK nasumično je odabrana kolonija s MRS agara najvećih razrjeđenja svakog uzorka te pohranjena u MRS bujonu s 20 % glicerola pri -80 °C (ULUF4502M, Arctiko, Salisbury, Velika Britanija). Identifikacija je provedena pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije u Zavodu za fizičku kemiju Intitu-

ta Ruđer Bošković. Postupak identifikacije opisan je u prethodnim istraživanjima (Mikulec i sur., 2024.).

Određivanje prisutnosti bakterije *Listeria monocytogenes*

Prisutnost *L. monocytogenes* određivana je molekularnom metodom detekcije Molecular Detection Assay (MDA, 3M, St. Paul, MN, SAD). Za MDA analizu, 25 g uzorka je homogenizirano i obogaćeno u Fraser bujonu (3M, St. Paul, MN, SAD) tijekom 24 sata pri 37 °C. Metoda se temelji na kontinuiranoj izotermnoj amplifikaciji sekvenci DNK, dok se bioluminiscencija koristi za otkrivanje amplifikacije. Pretpostavljeni pozitivni rezultati prikazuju se u stvarnom vremenu, dok se negativni rezultati prikazuju nakon završetka testa (75 minuta). U analizi se pirofosfatni ioni, generirani amplifikacijom ciljane DNK, i supstrat enzimatski pretvaraju u adenozin trifosfat (ATP) pomoću ATP-sulfurilaze. ATP reagira s luciferazom da proizvede svjetlost, koju zatim

detektira 3M instrument za molekularnu detekciju, ukazujući na prisutnost DNK *L. monocytogenes* (3M, St. Paul, MN, SAD).

Određivanje aktiviteta vode i pH

Aktivitet vode određen je aw-metrom (Rotronic, Bassersdorf, Švicarska). Uzorak kobasica usitnjen je u homogenizatoru, nakon čega je napunjena posudica aw-metra laganim utapkavanjem do oznake za poklopac posudice. Posudica s uzorkom je stavljena u mjernu komoru, a mjerenje provedeno pri 23 °C ± 2 °C. Bitno je da su uzorak i mjerna komora temperaturno ujednačeni, zbog čega su uzorci držani neko vrijeme u istoj prostoriji kao i mjerna komora. Vrijednosti aktiviteta vode očitane su nakon ustaljenja vrijednosti na uređaju. Izmjerene vrijednosti su zabiježene na tri decimale (raspon od 0 do 1). Za mjerenje pH homogenizirano je 10 grama uzorka u destiliranoj vodi te korišten pH- metar pH 50 VioLab (XS Instruments, Carpi, Italija).

Tablica 1. Rezultati mikrobioloških i fizikalno-kemijskih analiza kulenovih seka i kulena

Table 1 Results of microbiological and physico-chemical analyses of dry sausages „kulenova seka“ and „kulen“

Uzorak trajnih kobasica Sample	pH	Aktivitet vode Water activity (aw)	Bakterije mliječne kiseline Lactic acid bacteria (log ₁₀ CFU/g)	Enterokoki Enterococci (log ₁₀ CFU/g)	MDS <i>Listeria monocytogenes</i> (prisutnost DNK u 25 g/presence of DNA in 25g)
1	5,32	0,857	8,46	4,00	Neg.
2	5,66	0,862	8,04	3,00	Neg.
3	5,24	0,917	9,00	<2,00	Neg.
4	5,07	0,864	8,55	<2,00	Neg.
5	6,14	0,847	8,57	4,54	Neg.
6	5,22	0,915	6,77	2,00	Neg.
7	5,55	0,826	7,69	3,77	Neg.
8	5,11	0,838	8,30	<2,00	Neg.
9	5,66	0,821	7,77	2,30	Neg.
X±SD	5,44±0,34	0,861±0,035	8,13±0,66	2,18±1,82	
10	5,83	0,949	8,30	3,39	Neg.
11	6,04	0,880	6,00	2,95	Neg.
12	4,85	0,883	7,07	3,54	Neg.
13	5,96	0,854	6,84	3,50	Neg.
14	5,38	0,847	8,36	<2,00	Neg.
15	5,30	0,893	8,04	4,39	Neg.
16	5,16	0,850	7,06	3,00	Neg.
17	5,05	0,839	8,07	5,11	Neg.
18	5,27	0,822	7,38	3,69	Neg.
X±SD	5,43±0,42	0,869±0,038	7,52±0,78	3,29±1,41	

1-9 kulenove seke; 10-18 kuleni

1-9 dry sausages „kulenova seka“; 10-18 dry sausages „kulen“

Statistička obrada

Rezultati su obrađeni metodama deskriptivne statistike u Excel sučelju. Značajnost razlika ($p < 0,05$) među skupinama uzoraka provjerena je korištenjem Mann-Whitney U testa.

Rezultati

Tablicom 1 prikazani su rezultati mjerenja pH vrijednosti, aktiviteta vode, broja bakterija mliječne kiseline, enterokoka te prisustva *L. monocytogenes*.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da se prosječne vrijednosti pH, aktiviteta vode, broja bakterija mliječne kiseline te enterokoka nisu značaj-

no razlikovale među skupinama uzoraka (kulenova seka: kulen; $p > 0,05$). *L. monocytogenes* nije detektirana molekularnom metodom ni u jednom uzorku. Tablicom 2 prikazani su rezultati identifikacije bakterija mliječne kiseline pomoću MALDI TOF masene spektrometrije iz pojedinačnih uzoraka.

Iz tablice 2 vidljivo je da u uzorcima autohtonih trajnih kobasica, kulenovih seka i kulena iz ovog istraživanja dominiraju vrste laktobacila i to *L. sakei* (8/18; 44 %) i *L. curvatus* (5/18; 28 %), a u pojedinačnim uzorcima vrste *L. carnosum*, *E. malodoratus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *L. plantarum* te *Pediococcus pentosaceus*.

Tablica 2. Identificirane bakterije mliječne kiseline (MALDI TOF-MS) u kulenovim sekama i kulenu
Table 2 Identified species of lactic acid bacteria (MALDI TOF-MS) in dry sausages „kulenova seka“ and „kulen“

Uzorak Sample	Identificirana vrsta BMK Identified LAB species	Uzorak Sample	Identificirana vrsta BMK Identified LAB species
1	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	10	<i>Latilactobacillus sakei</i>
2	<i>Latilactobacillus sakei</i>	11	<i>Enterococcus malodoratus</i>
3	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	12	<i>Latilactobacillus sakei</i>
4	<i>Latilactobacillus sakei</i>	13	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
5	<i>Latilactobacillus curvatus</i>	14	<i>Loigolactobacillus coryniformis</i>
6	<i>Leuconostoc carnosum</i>	15	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
7	<i>Latilactobacillus sakei</i>	16	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
8	<i>Latilactobacillus sakei</i>	17	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
9	<i>Latilactobacillus sakei</i>	18	<i>Latilactobacillus sakei</i>

1-9 kulenove seke; 10-18 kuleni

1-9 dry sausages „kulenova seka“; 10-18 dry sausages „kulen“

Rasprava

Mikrobiotu prirodno fermentiranih trajnih kobasica primarno čine bakterije mliječne kiseline, uključujući enterokoke, te stafilokoki/mikrokokki (Šarić, 2022.). Broj bakterija mliječne kiseline se tijekom fermentacije i zrenja kobasica znatno povećava te u krajnjem proizvodu obično iznosi 7-8 log₁₀ CFU/g (Zdolec, 2016.), što je utvrđeno i u našim uzorcima. U uzorcima kulena broj BMK je u odnosu na kulenove seke prosječno manji za 0,6 log, no razlika nije statistički značajna ($P > 0,05$). Unutar populacije bakterija mliječne kiseline nalazimo i enterokoke čija je brojnost vrlo varijabilna u različitim trajnim kobasicama, a ovisi o higijeni proizvodnje te kompetitivnosti enterokoka u fermentaciji (Hendak, 2017.), što je potvrđeno i našim istraživanjem.

Jedan od uvjeta mikrobiološke stabilnosti kulena/kulenovih seka je i mikrobna aktiv-

nost populacije mliječnokiselinskih bakterija koje doprinose i kvaliteti i sigurnosti proizvoda (Igreč, 2020.). Unutar populacije BMK u autohtonim trajnim kobasicama prevladavati će vrste i sojevi koji su najprilagođeniji uvjetima unutar proizvoda te oni s najsnažnijom kompetitivnošću spram prateće mikrobiote. Rezultati MALDI TOF MS identifikacije prikazuju prevladavanje vrsta laktobacila u većini proizvoda iz našeg istraživanja, i to ponajprije *L. curvatus* i *L. sakei*. U pojedinim uzorcima identificirane su vrste *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *L. carnosum*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Pediococcus pentosaceus* te *E. malodoratus*. Slična istraživanja provedena na kulenu pokazuju značajne razlike pri selekciji dominantnih vrsta i sojeva, što ide u prilog prisutnim različitostima među proizvođačima u primjenjenoj sirovini, higijeni, obra-

di i uvjetima fermentacije, zrenja i sušenja. Tako su Babić i sur. (2011.) u uzorcima Slavenskog kulena utvrdili dominantne vrste *L. mesenteroides* i *L. acidophilus*, što nije slučaj u uzorcima iz ovog rada. S obzirom na to da u našim uzorcima kulena dominiraju homofermentativni laktobacili, primarno *L. sakei* i *L. curvatus*, to je tehnološki povoljniji rezultat, jer su te dvije vrste dobro adaptirane mesnom supstratu i ne stvaraju tehnološke greške u proizvodu. Pored toga, acidifikacijom nadjeva i drugim antimikrobnim mehanizmima mogu inhibirati nepoželjne mikroorganizme uključujući patogene vrste (Šarić, 2022.). Igrec (2020.) je u uzorcima kulena s tržišta determinirala dominantnu vrstu *L. curvatus*, kao što je to slučaj i u našim uzorcima. U pojedinim uzorcima kobasica iz našeg istraživanja dominirale su i heterofermentativne vrste poput *L. carnosum* ili *L. mesenteroides*, koji proizvodi manje ili veće količine ugljičnog dioksida te mogu stvarati šupljine (plin) unutar trajnih kobasica.

Trajne su kobasice općenito poznate kao mikrobiološki stabilni i sigurni proizvodi s obzirom na rizik da konačni proizvodi sadrže patogene mikroorganizme, poput *L. monocytogenes*. Međutim, sposobnost rasta i redukcija *L. monocytogenes* ovisi o vrsti fermentirane kobasice i njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima kao što su aktivnost vode, kiselost i primijenjene starter kulture (Zdolec i sur., 2007.; Kamenik, 2017.; Kurpas i sur., 2018.). U uzorcima iz našeg istraživanja nije detektirana njezina prisutnost ni molekularnom metodom, što govori o sigurnosti ovih tradicionalnih proizvoda.

U našim uzorcima je u gotovo svim mjerenjima zabilježena aktivnost vode <0,92, što onemogućuje rast *L. monocytogenes* u slučaju njene prisutnosti. Međutim, varijabilnosti, tj. neujednačenost, proizvodnje među proizvođačima kulena/kuleno-ve seke uvjetuje i pojavu proizvoda s graničnim fizikalno-kemijskim svojstvima koja ne sistiraju rast *L. monocytogenes*, što je i vidljivo iz naših rezultata. U takvim se uvjetima kategorizacija proizvoda s obzirom na mikrobiološke kriterije (Uredba 2073/2005) ne može generalno provesti za skupinu proizvoda, već samo za pojedinačne proizvode pojedinih proizvođača.

Zaključak

U tradicionalno proizvedenim trajnim kobasicama, kulenu i kulenovo-ve seki s područja Brodsko-posavske županije dominantna je populacija laktobacila, i to vrsta *L. sakei* i *L. curvatus*. Mikrobiološki su sigurni proizvodi s obzirom na bakteriju *L. monocytogenes*, a fizikalno-kemijska svojstva, odnosno aktivitet vode, onemogućili bi njezin rast u slučaju prisutnosti tijekom roka trajanja. Međutim, takva se procjena ne može donositi generalno za cijelu skupinu proizvoda, već za pojedinačne proizvodne serije s obzirom na neujednačenost proizvoda između individualnih proizvođača.

* Rad je izvadak iz diplomskog rada Marije Matijević „Prevalencija rezistentnih bakterija mliječne kiseline u tradicionalnim mesnim proizvodima na tržištu“ izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Nevija Zdolca.

Literatura

- [1] Babić, I., K. Markov, D. Kovačević, A. Trontel, A. Slavica, J. Đugum, D. Čvek, I.K. Svetec, S. Posavec, J. Frece (2011): Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from Croatian „brand“ product „Slavonski kulen“. *Meat Sci.* 88, 517-524. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.003>
- [2] EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), (2025): The European Union One Health 2024 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 23(12), e9759. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2025.9759>
- [3] Hendak, M. (2017): Javnozdravstveni značaj fermentiranih mesnih proizvoda. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- [4] Igrec, D. (2020): Usporedba mikrobioloških pokazatelja kvalitete i sigurnosti kulena proizvedenog u kontroliranim i nekontroliranim uvjetima. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- [5] Kamenik, J. (2016): Hurdle technologies in fermented meat production. U: *Fermented Meat Products: Health Aspects*; Zdolec, N. (ur.) CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 95–126. <https://doi.org/10.1201/9781315369846>
- [6] Kovačić, D., D. Karoly (2014): Specifikacija proizvoda, Udruga domaći slavonski kulen – kulin, Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb.

- [7] Kurpas, M., K. Wiczorek, J. Osek (2018): Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. J. Vet. Res. 61, 49–55. <https://doi.org/10.1515/jvetres-2018-0007>
- [8] Maksimović, Ž., N. Hulak, M. Vuko, V. Kovačević, I. Kos, M. Mrkonjić Fuka (2015): Bakterije mliječne kiseline u proizvodnji tradicionalnih trajnih kobasica. Meso XVII, 545-550. <https://hrcak.srce.hr/152388>
- [9] Mikulec, N., J. Špoljarić, D. Plavljanić, N. Lovrić, F. Oštarić, J. Gajdoš Kljusurić, K.M. Sarim, N. Zdolec, S. Kazazić (2024): MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Identification of Aerobic Mesophilic Bacteria in Raw Unpreserved and Preserved Milk. Processes 12, 731. <https://doi.org/10.3390/pr12040731>
- [10] Pažin, V., D. Jankuloski, L. Kozačinski, V. Dobranić, B. Njari, Ž. Cvrtila, J.M. Lorenzo, N. Zdolec (2018): Tracing of *Listeria monocytogenes* Contamination Routes in Fermented Sausage Production Chain by Pulsed-Field Gel Electrophoresis Typing. Foods 2018, 7, 198. <https://doi.org/10.3390/foods7120198>
- [11] Šarić, P. (2022): Bioraznolikost mikrobiote hrvatskih autohtonih mesnih proizvoda. Diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- [12] Zdolec, N. (ur.) (2016): Fermented Meat Products: Health Aspects; CRC Press; Taylor & Francis: Boca Raton FL, SAD. <https://doi.org/10.1201/9781315369846>
- [13] Zdolec, N., L. Kozačinski, M. Hadžiosmanović, Ž. Cvrtila, I. Filipović (2007): Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. Vet. Arhiv 2007, 77, 507–514. <https://hrcak.srce.hr/24355>
- [14] Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 od 15. studenoga 2005. o mikrobiološkim kriterijima za hranu
- [15] Uredba Komisije (EZ) br. 2024/2895 od 20. studenoga 2024. o izmjeni Uredbe (EZ) br. 2073/2005 u pogledu bakterije *Listeria monocytogenes*

Dostavljeno/Received: 07.01.2026.

Prihvaćeno/Accepted: 09.02.2026.

Safety indicators of traditional dry sausages „kulen“ and „kulenova seka“ from Brod-Posavina County, Croatia with regard to *Listeria monocytogenes*

Abstract

The assessment of the microbiological safety of fermented sausages in accordance with Regulation 2073/2005 includes criteria for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. In this context, the physicochemical parameters of the product determine the selection of criteria for *L. monocytogenes* regarding the supporting of its growth. The aim of this study was to determine the presence or absence of *L. monocytogenes* by molecular methods, water activity, pH, and the composition of the autochthonous microbiota in „kulen“ and „kulenova seka“ dry sausages (n=18) from Brod-Posavina County, Croatia. The average values of pH, water activity, and the numbers of lactic acid bacteria and enterococci did not differ significantly between the groups of samples ($p>0.05$). *Listeria monocytogenes* was not detected by molecular methods in any of the samples. *Lactobacillus* species predominated, specifically *Latilactobacillus sakei* (44% of samples) and *Latilactobacillus curvatus* (28% of samples), while in individual samples *Leuconostoc carnosum*, *Enterococcus malodoratus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, and *Pediococcus pentosaceus* were also identified. Traditional fermented sausages „kulen“ and „kulenova seka“ are microbiologically safe products with regard to *L. monocytogenes*, and the physicochemical properties, particularly water activity, would prevent its growth if present during shelf life. However, such an assessment cannot be made in general for the entire group of products, but only for individual production batches, given the non-uniformity of products between individual producers.

Keywords: kulen, kulenova seka, *Listeria monocytogenes*, water activity, lactic acid bacteria

Sicherheitsindikatoren für traditionelle Trockenwürste „Kulen“ und „Kulenova Seka“ aus dem Landkreis Brod-Posavina, Kroatien, in Bezug auf die Bakterie *Listeria monocytogenes*

Zusammenfassung

Die Bewertung der mikrobiologischen Sicherheit fermentierter Würste gemäß der Verordnung 2073/2005 umfasst Kriterien für die Bakterien *Salmonella* spp. und *Listeria monocytogenes*. In diesem Zusammenhang bestimmen die physikalisch-chemischen Parameter des Produkts die Auswahl der Kriterien für *L. monocytogenes* hinsichtlich der Förderung seines Wachstums. Das Ziel dieser Arbeit war es, das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein von *L. monocytogenes* durch molekulare Methoden, Wasseraktivität, pH-Wert und die Zusammensetzung der autochthonen Mikrobiota in den Trockenwürsten „Kulen“ und „Kulenova Seka“ (n = 18) aus dem Bezirk Brod-Posavina, Kroatien, zu bestimmen. Die Durchschnittswerte für pH-Wert, Wasseraktivität und Anzahl der Milchsäurebakterien und Enterokokken unterschieden sich zwischen den Probengruppen nicht signifikant ($p > 0,05$). *Listeria monocytogenes* wurde in keiner der Proben mit molekularen Methoden nachgewiesen. Es überwogen *Lactobacillus*-Arten, insbesondere *Latilactobacillus sakei* (44 % der Proben) und *Latilactobacillus curvatus* (28 % der Proben), während in einzelnen Proben auch *Leuconostoc carnosum*, *Enterococcus malodoratus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lactiplantibacillus plantarum* und *Pediococcus pentosaceus* identifiziert wurden. Die traditionellen fermentierten Würste „Kulen“ und „Kulenova seka“ sind in Bezug auf *L. monocytogenes* mikrobiologisch unbedenkliche Produkte, und die physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere die Wasseraktivität, würden dessen Wachstum verhindern, falls es während der Haltbarkeitsdauer vorhanden sein sollte. Eine solche Bewertung kann jedoch nicht allgemein für die gesamte Produktgruppe vorgenommen werden, sondern nur für einzelne Produktionschargen, da die Produkte der einzelnen Hersteller nicht einheitlich sind.

Schlüsselwörter: Kulen, Kulenova seka, *Listeria monocytogenes*, Wasseraktivität, Milchsäurebakterien

Indicadores de seguridad de los embutidos secos tradicionales “kulen” y “kulenova seka” del cantón de Brod-Posavina, Croacia, en relación con *Listeria monocytogenes*

Resumen

La evaluación de la seguridad microbiológica de los embutidos fermentados de conformidad con el Reglamento (CE) nº 2073/2005 incluye criterios para *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*. En este contexto, los parámetros fisicoquímicos del producto determinan la selección de los criterios aplicables a *L. monocytogenes* en cuanto a la capacidad del producto para favorecer su crecimiento. El objetivo de este estudio fue determinar la presencia o ausencia de *L. monocytogenes* mediante métodos moleculares, así como la actividad de agua, el pH y la composición de la microbiota autóctona en embutidos secos “kulen” y “kulenova seka” (n = 18) procedentes del cantón de Brod-Posavina, Croacia. Los valores medios de pH, actividad de agua y los recuentos de bacterias ácido-lácticas y enterococos no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de muestras ($p > 0,05$). *Listeria monocytogenes* no fue detectada mediante métodos moleculares en ninguna de las muestras. Predominaron especies del género *Lactobacillus*, en particular *Latilactobacillus sakei* (44 % de las muestras) y *Latilactobacillus curvatus* (28 % de las muestras), mientras que en muestras individuales también se identificaron *Leuconostoc carnosum*, *Enterococcus malodoratus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lactiplantibacillus plantarum* y *Pediococcus pentosaceus*. Los embutidos fermentados tradicionales “kulen” y “kulenova seka” son productos microbiológicamente seguros en relación con *L. monocytogenes*, y sus propiedades fisicoquímicas, en particular la actividad de agua, impedirían su crecimiento en caso de estar presente durante la vida útil del producto. No obstante, dicha evaluación no puede generalizarse a todo el grupo de productos, sino únicamente

te a lotes de producción individuales, debido a la falta de uniformidad entre los productos de distintos productores.

Palabras claves: embutido “kulen”, embutido “kulenova seka”, *Listeria monocytogenes*, actividad de agua, bacterias ácido-lácticas

Indicatori di sicurezza del *kulen* tradizionale e della *kulenova seka* tipici dell'area della Contea di Slavonski Brod-Posavina in relazione al batterio *Listeria monocytogenes*

Riassunto

La valutazione della sicurezza microbiologica delle salsicce stagionate, in conformità al Regolamento (CE) n. 2073/2005, comprende i criteri relativi ai batteri *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. I parametri fisico-chimici del prodotto condizionano la scelta dei criteri applicabili per *L. monocytogenes* in funzione della (im)possibilità della sua crescita. L'obiettivo di questo lavoro è consistito nel determinare la presenza/assenza di *L. monocytogenes* mediante metodo molecolare, l'attività dell'acqua, il pH e la composizione del microbiota autoctono nei salumi *kulen* e *kulenova seka* (n = 18) provenienti dall'area della Contea di Slavonski Brod-Posavina. I valori medi di pH, attività dell'acqua, conta dei batteri lattici ed enterococchi non hanno mostrato differenze significative tra i gruppi di campioni (*kulenova seka* vs. *kulen*; $p > 0,05$). *Listeria monocytogenes* non è stata rilevata con il metodo molecolare in nessun campione. È stata rilevata una predominanza della specie *Lactobacilli*, in particolare del *Latilactobacillus sakei* (44 % dei campioni) e del *Latilactobacillus curvatus* (28 % dei campioni), mentre in singoli campioni sono state identificate le specie *Leuconostoc carnosum*, *Enterococcus malodoratus*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Lactiplantibacillus plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*. Il *kulen* tradizionale e la *kulenova seka* risultano prodotti microbiologicamente sicuri rispetto al batterio *L. monocytogenes*, e le loro proprietà fisico-chimiche, in particolare l'attività dell'acqua, impedirebbero la crescita del microrganismo qualora fosse presente durante il periodo di conservazione. Tuttavia, tale valutazione non può essere generalizzata all'intera categoria di prodotti, ma deve essere riferita alle singole partite di produzione, considerando la non uniformità dei prodotti tra i singoli produttori artigianali.

Parole chiave: kulen, kulenova seka, *Listeria monocytogenes*, attività dell'acqua, batteri lattici

