

Enterococcus sojevi iz mikrobioma sira

Blagajac, Amalija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:070163>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

Amalija Blagajac

Enterococcus **SOJEVI IZ**
MIKROBIOMA SIRA

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Jasne Novak te uz pomoć dr. sc. Katarine Butorac.

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Jasni Novak, na stručnom vodstvu, pomoći i savjetima tijekom provođenja i pisanja diplomskog rada.

Također, želim zahvaliti dr. sc. Katarini Butorac na pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela ovog rada.

Najveće hvala mojoj obitelji, posebno roditeljima i sestri, koji su bili uz mene tijekom cijelog studiranja. Hvala vam na bezuvjetnoj ljubavi i podršci!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju antibiotika,
enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Bioproceno inženjerstvo

Enterococcus SOJEVI IZ MIKROBIOMA SIRA

Amalija Blagajac, univ. bacc. ing. biotechn. 0058210941

Sažetak: Specifični sojevi *Enterococcus* vrste primjenjuju se u prehrambenoj industriji u fermentaciji hrane te kao probiotici. No s obzirom da su pojedini sojevi oportunistički patogeni potrebna je detaljna karakterizacija sigurnosti primjene. U ovom radu prioritetno je definirati fenotipske karakteristike *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus durans* sojeva, povezane sa sigurnošću primjene kao starter ili probiotičkih kultura, koji su prethodno izolirani iz mikrobioma autohtonih hrvatskih sireva. Definirana je hemolitička i želatinozna aktivnost, mogućnost formiranja biofilma, prisutnost gena za enterocin A i enterocin B. S tehnološkog aspekta proveden je i postupak liofilizacije čistih kultura *Enterococcus* sojeva, kako bi se odredio postotak preživljavanja tijekom pripreme liofilizata. Ustanovljeno je da niti jedan od analiziranih sojeva ne iskazuje hemolitičku ili želatinoznu aktivnost. 55 % sojeva ima sposobnost formiranja biofilma što uz sintezu enterocina A i/ili enterocina B ukazuje kako pojedini sojevi imaju potencijalnu primjenu kao starter kulture. Svi analizirani sojevi dobro preživljavaju liofilizaciju u obranom mlijeku, osim *Enterococcus faecium* /*durans* ZG4-24.

Ključne riječi: *Enterococcus*, probiotičke starter kulture, bakteriocini, biofilm

Rad sadrži: 43 stranice, 6 slika, 9 tablica, 58 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Jasna Novak

Pomoć pri izradi: dr. sc. Katarina Butorac

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
2. prof. dr. sc. Jasna Novak
3. prof. dr. sc. Tonči Rezić
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjena)

Datum obrane: 21. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory of Antibiotics, Enzymes,
Probiotics and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Bioprocess Engineering

Enterococcus STRAINS FROM THE CHEESE MICROBIOME

Amalija Blagajac, univ. bacc. ing. techn. 0058210941

Abstract: Specific strains of *Enterococcus* species are used in the food industry in food fermentation and as probiotics. However, given that certain strains are opportunistic pathogens, a detailed characterization of the safety of application is required. In this paper, it is priority to define the phenotypic characteristics of *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus durans* strains, related to safety of use as starter or probiotic cultures, which were previously isolated from the microbiome of autochthonous Croatian cheeses. Hemolytic and gelatinous activity, the possibility of biofilm formation, the presence of genes for enterocin A and enterocin B were defined. From a technological point of view, the lyophilization procedure of pure cultures of *Enterococcus* strains was carried out, in order to determine the percentage of survival during the preparation of the lyophilizate. It was found that none of the analyzed strains exhibits hemolytic or gelatinous activity. 55 % of the strains have the ability to form biofilms, which, along with the synthesis of enterocin A and/or enterocin B, indicates that certain strains have a potential application as starter cultures. All analyzed strains survive lyophilization in skimmed milk well, except for *Enterococcus faecium/durans* ZG4-24.

Keywords: *Enterococcus*, *probiotic starter cultures*, *bacteriocins*, *biofilm*

Thesis contains: 43 pages, 6 figures, 9 tables, 58 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: Jasna Novak, PhD, Full professor

Technical support and assistance: Katarina Butorac, PhD

Reviewers:

1. Andreja, Leboš Pavunc, PhD, Assistant professor
2. Jasna, Novak, PhD, Full professor
3. Tonči, Rezić, PhD, Full professor
4. Jasna, Mrvčić, PhD, Full professor (substitute)

Thesis defended: September 21st, 2022

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. FIZIOLOŠKA SVOJSTVA BAKTERIJA IZ RODA <i>ENTEROCOCCUS</i>	2
2.2. ROD <i>Enterococcus</i> – KOMENZALNI MIKROORGANIZMI.....	3
2.3. <i>Enterococcus</i> KAO PROBIOTIČKI PRIPRAVCI	4
2.3.1. Bakteriocini <i>Enterococcus</i> sojeva	7
2.3.2. Primjena enterocina	10
2.4. <i>Enterococcus</i> spp. KAO OPORTUNISTIČKI PATOGENI	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Mikroorganizmi.....	16
3.1.2. Hranjive podloge	17
3.1.3. Kemikalije	17
3.1.4. Aparatura i pribor	18
3.2. METODE	19
3.2.1. Određivanje hemolitičke aktivnosti.....	19
3.2.2. Formiranje biofilma na polistirenu	19
3.2.3. Optimiranje metode za određivanje želatinozne aktivnosti.....	20
3.2.4. Liofilizacija bakterijskih stanica	21
3.2.5. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom	21
3.2.6. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva	21
3.2.7. Određivanje koncentracije izolirane DNA.....	22
3.2.8. PCR sa specifičnim početnicama za enterocine	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. PROCJENA SIGURNOSNIH ASPEKATA <i>Enterococcus</i> SOJEVA	25
4.2. DETEKCIJA ENTEROCINA <i>Enterococcus</i> SOJEVA	31
4.3. LIOFILIZACIJA <i>Enterococcus</i> SOJEVA.....	34
5. ZAKLJUČCI	36
6. LITERATURA	37

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su široko rasprostranjena grupa mikroorganizama koje se koriste za fermentaciju hrane u prehrambenoj industriji, ali i kao probiotički pripravci jer prirodno nastanjuju gastrointestinalni trakt ljudi i životinja (Mokoena, 2017). Rod *Enterococcus* pripada grupi BMK te ima važnu ulogu u prehrambenoj industriji. Istraživanja su pokazala kako pojedini mediteranski sirevi sadrže pretežno *Enterococcus* vrste koje doprinose sazrijevanju sireva te senzorskim svojstvima (Popović i sur., 2018; Golić i sur., 2013). Osim što su *Enterococcus* vrste važne za fermentaciju hrane, pojedine vrste uzrokuju kvarenje namirnica. Nadalje, posljednjih godina često su istraživana probiotička svojstva ovog roda te su neki sojevi odobreni kao probiotici (Franz i sur., 2011). Pojedine *Enterococcus* vrste prirodno nastanjuju gastrointestinalni trakt, stoga takvi probiotički pripravci imaju brojne prednosti jer proizvode različite korisne metabolite te doprinose stabilizaciji crijevne mikrobiote (Fugaban i sur., 2021). S druge strane, neke *Enterococcus* vrste su oportunistički patogeni. Takvi patogeni sojevi često su rezistentni na više različitih antibiotika te sadrže virulentne faktore kao što su citolizin i želatinaza (Hanchi i sur., 2018). Istraživanja su pokazala kako *Enterococcus* vrste izolirane iz hrane i ostalih prirodnih izvora, također, mogu sadržavati virulentne faktore i rezistenciju na antibiotike (Franz i sur., 2011). Upravo iz toga razloga, pojedine zemlje zanemaruju uporabu *Enterococcus* vrsta, bez obzira na njihova pozitivna svojstva (Krawczyk i sur., 2021). Stoga je važno standardizirati kriterije koji omogućuju primjenu *Enterococcus* vrsta za uporabu kod ljudi i životinja.

Cilj ovog rada bio je ispitati svojstva sojeva *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus durans* izoliranih iz mikrobioma sireva kako bi se sojevi potencijalno mogli koristiti kao starter kulture. Da bi se određeni soj *Enterococcus* vrste mogao koristiti u prehrambene ili farmaceutske svrhe, potrebno je ispitati virulentna svojstva bakterije. U ovom radu određivane su želatinozna i hemolitička aktivnost. Nadalje, *Enterococcus* vrste moraju imati poželjna svojstva kao što su sposobnost sintetiziranja probiotičkog biofilma te sinteza bakteriocina. Stoga je određivana sposobnost formiranja biofilma na polistirenskoj podlozi te je provedena PCR reakcija kako bi se detektirali geni koji kodiraju za enterocin A i enterocin B. Naposljetku je provedena liofilizacija kako bi se ispitalo preživljavanje bakterijskih sojeva u liofiliziranim pripravcima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FIZIOLOŠKA SVOJSTVA BAKTERIJA IZ RODA *Enterococcus*

Nakon rodova *Lactobacillus* i *Streptococcus*, rod *Enterococcus* je ujedno treći najzastupljeniji rod BMK (Franz i sur., 2011). BMK fermentiraju ugljikohidrate, prvenstveno glukozu, pri čemu kao krajnji elektron akceptor koriste izvor ugljika umjesto kisika. Kao krajnji produkt njihovog metabolizma nastaje mliječna kiselina. Osim što bakterije iz roda *Enterococcus* imaju homofermentativni metabolizam, one su kemoorganotrofi i fakultativni anaerobi te ne stvaraju spore. Optimalne temperature rasta bakterija su između 35 °C i 37 °C, a istraživanja su pokazala kako mogu rasti pri temperaturama između 10 °C i 45 °C (García-Solache i Rice, 2019). Nadalje, većina bakterija iz roda *Enterococcus* su oksidaza, katalaza i ureaza negativne, otporne su na soli te na žučne soli. Bakterije iz roda *Enterococcus* izrazito su otporne na dehidraciju. Vrste *E. faecalis* i *E. faecium* mogu rasti pri 6 % NaCl te imaju homeostazu kationa koja doprinosi rezistenciji na soli i metale. Sve opisane i testirane *Enterococcus* vrste proizvode β -glukozidazu; leucin arilamidazu; kiseline iz šećera D-fruktoze, galaktoze, β -gentiobioze, glukoze, laktoze, maltoze, D-manoze, riboze, trehaloze, celobioze i N-acetilglukozamina; te glikozide salicin, metil β -d-glukozid, amigdalin i arbutin. Do sada je dokazano da su samo vrste *E. gallinarum* i *E. casseliflavus*/*E. flavescens* pokretne, a za ostale vrste bakterija iz roda *Enterococcus* se smatra da su nepokretne (García-Solache i Rice, 2019). Vrste *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. sulfureus*, *E. pallens* i *E. gilvus* imaju kolonije žute boje (Franz i Holzapfel, 2004).

Taksonomski, rod *Enterococcus* pripada porodici *Lactobacillaceae*, redu *Lactobacillales*, razredu Bacilli i koljenu Firmicutes (Mokoena, 2017). Posljednjih godina taksonomska klasifikacija roda *Enterococcus* značajno se promijenila. Naime, krajem 20. stoljeća rod *Enterococcus* sadržavao je samo 20 vrsta, a prema najnovijim podacima do sada je identificirano 58 *Enterococcus* vrsta (García-Solache i Rice, 2019; Lebreton i sur., 2014). *E. alishanensis* i *E. larvae* su vrste otkrivene 2022. godine. *E. alishanensis* izolirana je iz svježih zrnaca kave, dok je *E. larvae* izolirana iz larve kukca *Allomyrina dichotoma* (Chung i sur., 2022; Kim i sur., 2022).

Filogenetički bakterije iz roda *Enterococcus* pripadaju skupini bakterija s niskim udjelom G + C (gvanozin + citozin) koji iznosi oko 34 % do 45 %. Veličina njihovog genoma iznosi u prosjeku između 2,3 do 5,4 Mb s 2154 do 5107 predviđenih gena (García-Solache i Rice, 2019). Rod *Vagococcus* filogenetički je najbližnji rodu *Enterococcus*, a slijede ga *Carnobacterium*,

Tetragenococcus, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Facklamia*, *Globicatella* i *Abitrophia* (Franz i Holzapfel, 2004).

Na temelju metaboličkih aktivnosti, razvijeni su različiti selektivni mediji za izolaciju *Enterococcus* vrsta. Takvi selektivni mediji, osim osnovnih hranjivih tvari, često sadrže žučne soli, natrijev azid, antibiotike te soli eskulina ili tetrazolija. Ne mogu sve *Enterococcus* vrste rasti na selektivnim medijima, ali mogu one klinički značajnije. Identifikacija *Enterococcus* vrsta važna je kako bi se odredila rezistencija na antibiotike kod patogenih sojeva. Posljednjih godina, za klasifikaciju i identifikaciju *Enterococcus* vrsta koriste se molekularne metode kao što su matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom u kombinaciji sa spektrometrijom mase vremena leta (MALDI-TOF MS), testovi amplifikacije nukleinskih kiselina (NAATs), fluorescentna *in situ* hibridizacija peptid nukleinske kiseline (PNA-FISH) i multilokusna sekvencijska tipizacija (MLST) (García-Solache i Rice, 2019).

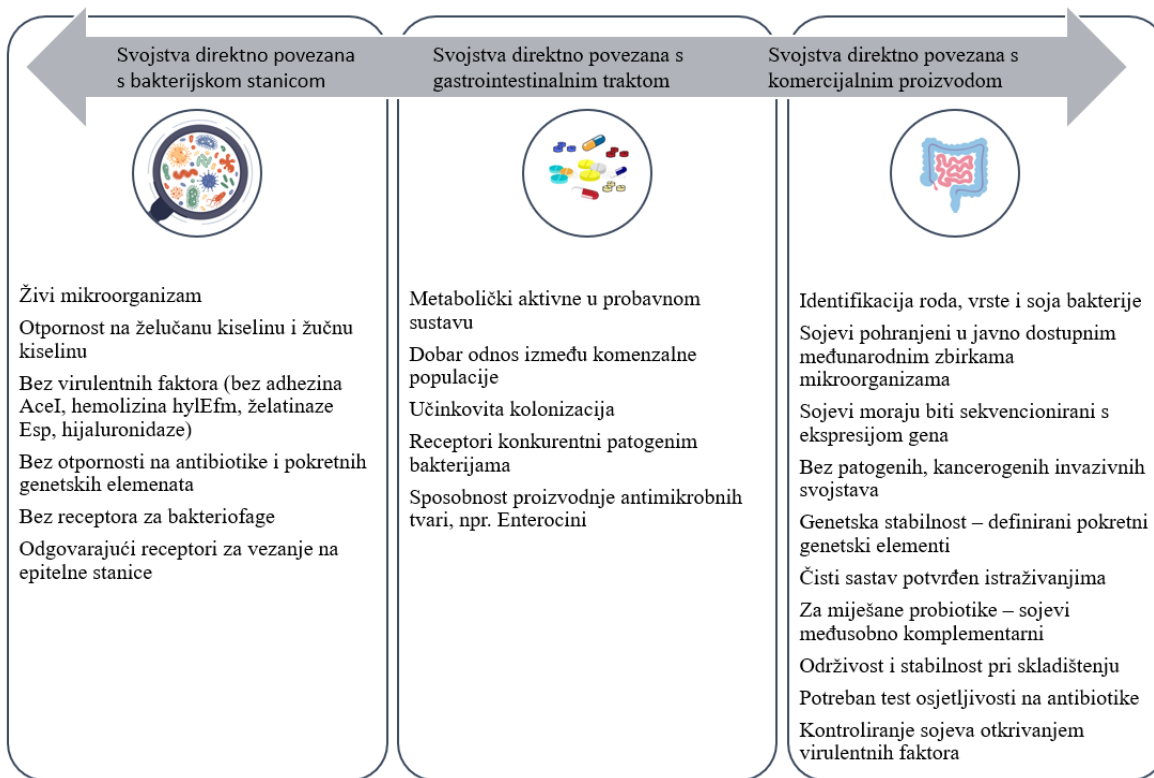
2.2. ROD *Enterococcus* – KOMENZALNI MIKROORGANIZMI

Bakterije iz roda *Enterococcus* nastanjuju različita staništa kao što su tlo, površinske vode, kanalizacija, biljke i gastrointestinalni trakt (Franz i sur., 2011). Vrste *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* i *E. hirae* najčešće su povezane s bakterijama gastrointestinalnog trakta ljudi ili životinja na farmi (Holzapfel i sur., 2018). Osim toga, ove bakterije često su osnovni sastojci u fermentiranim mliječnim proizvodima te u hrani životinjskog porijekla. Primjerice, *E. faecalis*, *E. faecium* i *E. durans* su najzastupljenije *Enterococcus* vrste u tradicionalnim sirevima. *Enterococcus* vrste razgrađuju laktozu i citrate tijekom zrenja sira, što dovodi do stvaranja raznih hlapljivih spojeva, poput acetaldehida, acetoina, diacetila i etanola, koji su zaslužni za stvaranje jedinstvene arome i okusa sireva (Popović i sur., 2018; Terzić-Vidojević i sur., 2015). U fecesu čovjeka pronađene su bakterijske vrste *E. faecalis* između 10^5 i 10^7 CFU/g te *E. faecium* između 10^4 i 10^5 CFU/g (Krawczyk i sur., 2021; Franz i sur., 2011; Franz i Holzapfel, 2004). Na osnovu toga može se zaključiti kako ove bakterije imaju značajnu ulogu u probavnom sustavu jer pripadaju komenzalnim bakterijama. Smatra se da bez bakterija nema funkcioniranja imunološkog sustava jer su one odgovorne za stimulaciju imunološkog sustava crijevne sluznice. Mikrobiota crijeva smatra se endokrinim organom, a mikroorganizmi koji su povezani s mikrobiotom crijeva smatraju se komenzalima (Silva i sur., 2012). Bakterije iz roda *Enterococcus* kao komenzalni

mikroorganizmi sudjeluju u metabolizmu hranjivih tvari kako bi održale pH vrijednost okoliša u kojem žive, sintetiziraju vitamine i druge metabolite koji su važni za njihovo normalno funkcioniranje te sprječavaju vezanje i širenje bakterija koje uzrokuju truljenje. Time bakterije doprinose ljudskom imunološkom sustavu, odnosno humoralnom i staničnom imunitetu. Kolonizacija gastrointestinalnog trakta je dinamičan proces koji ovisi u mnogim čimbenicima kao što su genetske predispozicije, majčina mikrobiota, način poroda, okolišni uvjeti i prehrana (Mu i sur., 2016). Nadalje, *E. faecalis* i *E. faecium* (u manjoj mjeri) zajedno s bakterijom *Escherichia coli* te bakterijama iz rodova *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* koloniziraju probavni sustav zdrave dojenčadi u prvih 7 – 10 nakon rođenja. Otpornost bakterija na žučne soli omogućava kolonizaciju debelog crijeva, a jedan dio korisnih bakterija iz roda *Enterococcus* u probavni sustav se unosi hranom. Osim toga, bakterija *E. faecalis* ima imunomodulatornu ulogu jer posreduje u aktivaciji CD4⁺ i CD8⁺ (engl. *cluster of differentiation*) T stanica te limfocita B (Krawczyk i sur., 2021). Zaštitni mehanizmi gastrointestinalnog trakta za toleranciju na prisutnu crijevnu mikrobiotu su brojni. Primjerice, limfni sustav gastrointestinalnog trakta smatra se imunoorganom, gdje se sintetizira sekretorni imunoglobulin A. Naime sekretorni imunoglobulin A je ključan čimbenik koji posreduje u jačanju intestinalne barijere, te može posredovati u sprečavanju adhezije nepoželjnih mikroorganizama na intestinalni epitel, anulira toksične učinke bakterijskih toksina te iskazuje bakteriostatsko djelovanje. U funkciji intestinalne barijere značajnu ulogu imaju i enterociti koji formiraju snažne adherentne spojeve (lat. *zonulae occludentes*) tvoreći epitelnu barijeru na crijevima. Posljedica narušavanja integriteta epitelne crijevne barijere može uzrokovati poremećaj, sindrom propusnih crijeva čime je moguć prolazak bakterija kroz crijevnu barijeru i pokretanje imunološke kaskade. Međutim, bakterije *E. faecalis* i *E. faecium* naknadno prolaze kroz crijevnu barijeru što može uzrokovati sepsu. Stoga je održavanje ravnoteže sastava intestinalne mikrobiote vrlo važno (Krawczyk i sur., 2003).

2.3. *Enterococcus* KAO PROBIOTIČKI PRIPRAVCI

Većina probiotičkih sojeva pripada BMK iz rodova *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, dok se bakterije iz roda *Enterococcus* koriste u manjoj mjeri (Franz i sur., 2011). Kako bi se bakterije iz roda *Enterococcus* mogle koristiti kao probiotici moraju sadržavati određena svojstva kako je prikazano na slici 1.



Slika 1. Svojstva bakterija iz roda *Enterococcus* značajna za probiotičku primjenu (prema Krawczyk i sur., 2021)

Mnoga istraživanja su provedena kako bi se odredila probiotička svojstva bakterija iz roda *Enterococcus*, uglavnom sojeva *E. faecium* (Fugaban i sur., 2021; Hanchi i sur., 2018). Međutim, zbog nepotpunih informacija, te virulencije kod kliničkih izolata, iako pripadaju BMK, bakterije iz roda *Enterococcus* nemaju GRAS status (engl. *Generally Recognized as Safe*) te su samo određeni sojevi odobreni za probiotičku uporabu (Franz i sur., 2011). Probiotici koji sadrže bakterije iz roda *Enterococcus* mogu se koristiti u prevenciji određenih bolesti kod ljudi i životinja kao što su sindrom iritabilnog crijeva, proljev uzrokovan primjenom antibiotika te prevencija različitih funkcionalnih i kroničnih bolesti crijeva (Bybee i sur., 2011). Nadalje, neki bakterijski sojevi posjeduju antikancerogena i hipokolesterolemična svojstva te mogu utjecati na poboljšanje imuniteta kod ljudi.

Najpoznatiji i vjerojatno najbolje istražen soj je *E. faecium* SF68 (Holzapfel i sur., 2018). Ovaj soj koristi se kao probiotički pripravak za prehrambene i farmaceutske svrhe. Prva država u kojoj je soj SF68 odobren bila je Švicarska 1979. godine (Franz i sur., 2011). Učinkovitost soja SF68

testirana je u više od 20 placebo-kontroliranih kliničkih istraživanja. Radi se o komenzalnom mikroorganizmu gastrointestinalnog trakta čiji se bakterijski rast odlikuje veoma kratkom lag fazom i generacijskim vremenom koje traje otprilike 20 min pri optimalnim uvjetima. Nadalje, soj SF68 je otporan na niske pH vrijednosti i žučne soli te inhibira rast patogenih bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella serovars*, *Shigella spp.* te *Enterobacter spp.* Soj SF68 je rezistentan na antibiotike kanamicin i eritromicin, dok je osjetljiv na ampicilin, vankomicin, gentamicin, streptomycin, tetraciklin, neomicin, trimetoprim i druge. Holzapfel i sur. (2018) navode kako soj SF68 ne posjeduje virulentne faktore kao što su hemolitička aktivnost, agregacijska komponenta, želatinozna aktivnost te ima relativno slabu sposobnost adhezije na epitelne stanice. Klinička istraživanja pokazala su kako je liječenje enteritisa bakterijom *E. faecium* SF68 uspješno kod odraslih i djece jer skraćuje trajanja dijareje kod pacijenata. Zbog svega navedenog, SF68 koristi se za uspostavljanje ravnoteže crijevne mikrobiote tijekom gastrointestinalnih poremećaja kod odraslih, djece i dojenčadi te za terapiju akutne dijareje koji nastaje kao posljedica gastroenteritisa, enteritisa ili enterokolitisa (Holzapfel i sur., 2018; Franz i sur., 2011).

Osim *E. faecium*, pojedini sojevi *E. faecalis* se distribuiraju kao probiotički. *E. faecalis* DSM 16431 je dostupan kao komercijalni probiotik Symbioflor 1, a preporuča se za ublažavanje sindroma iritabilnih crijeva te liječenje kroničnog sinusitisa i bronhitisa. Soj *E. faecalis* DSM 16431 nije patogen, te ne iskazuje rezistenciju na antibiotike (Fritzenwanker i sur., 2013). Istraživanja su pokazala kako Symbioflor 1 sadrži gene koji kodiraju za agregacijsku komponentu, proteine koji su odgovorni za adheziju kolagena, rezistenciju na anione kisika i sposobnost formiranja bakterijske kapsule. Navedene karakteristike omogućavaju bakteriji kolonizaciju crijeva i proliferaciju koje su nužne kako bi bakterija mogla upotrebljavati kao probiotik (Domann i sur., 2007).

Bakterija *E. lactis* IW5 izolirana je iz humanog gastrointestinalnog trakta te su ispitana njezina probiotička svojstva. Istraživanje je pokazalo kako je ova bakterija rezistentna na antibiotike eritromicin i vankomicin, a osjetljiva na ampicilin, gentamicin, penicilin, vankomicin, klinadimicin i sulfametoksazol. Nadalje, *E. lactis* IW5 ne proizvodi toksične enzime, inhibira rast patogenih bakterija te ima antikancerogene učinke iskazane na staničnim modelima HeLa, MCF-z, AGS, HT-29 i Caco-2 (Nami i sur., 2015). Osim toga, probiotička svojstva imaju i sojevi *E. hirae* i *E. durans* te je u budućnosti potrebno provesti klinička istraživanja kako bi se ispitala

mogućnost njihove primjene za proizvodnju probiotičkih pripravaka (Kulikov i sur., 2022; Gupta i Tiwari, 2015).

Primjenu probiotika u animalnoj ishrani regulira Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA). Primjerice, bakterija *E. faecium* M74 (NCIMB 11181) je odobrena kao prehrambeni aditiv Lactiferm kod teladi i svinja (EFSA, 2012). Preporučena doza Laciferma je između 5×10^8 i 2×10^{10} CFU/ kg hrane, odnosno između 2×10^8 i 8×10^9 CFU/L vode. Smatra se da je spomenuti aditiv siguran za primjenu u preporučenim dozama te nije opasan za okoliš jer se bakterija *E. faecium* M74 prirodno nalazi u crijevima. Osim toga, *E. faecium* M74 ne sadrži gene koji kodiraju za virulentne faktore povezane s bolničkim infekcijama te ne sadrži gene koji kodiraju za otpornost na antibiotike. EFSA (2015) je ispitala i svojstva prehrambenog aditiva Cylactina. Radi se o preparatu *Enterococcus faecium* NCIMB 10415 koji je odobren kao dodatak prehrani kod svinja. Spomenuti probiotici *E. faecium* SF68 i Symbioflor 1 se koriste za liječenje dijareje životinja na farmi (Hanchi i sur., 2018; Bybee i sur., 2011). Osim što je *E. faecium* SF68 detaljno istražen kao probiotik namijenjen ljudima, provedena su brojna istraživanja kako bi se istražila sigurnost ovog probiotika za primjenu kod životinja (Krawczyk i sur., 2021; Franz i sur., 2011).

2.3.1. Bakteriocini *Enterococcus* sojeva

Bakteriocini se definiraju kao ribosomski sintetizirani antimikrobni peptidi ili proteini koje proizvode bakterije, a njihov glavni potencijal je primjena kao biokonzervansa za poboljšanje sigurnosti hrane (Rendueles i sur., 2022; Hanchi i sur., 2018; Egan i sur., 2016). Do sada je u zemljama Europske zajednice samo nisin odobren kao prehrambeni aditiv (Rendueles i sur., 2022). Bakteriocini inhibiraju specifične sojeve bakterija te stoga kod potencijalne terapijske primjene, za razliku od antibiotika koji imaju širok spektar antimikrobnog djelovanja, nemaju inhibicijski učinak na autohtonu mikrobiotu crijeva što je značajna prednost u usporedbi s antibioticima. Upravo zato bakteriocini imaju potencijal kao alternativa antibioticima (Hanchi i sur., 2018).

Bakterije iz roda *Enterococcus* proizvode različite strukture bakteriocina koji se često nazivaju enterocinima. Zbog inhibicijskog djelovanja protiv Gram-pozitivnih patogena koji se prenose hranom, enterocini su često proučavani. Mikroorganizmi producenti enterocina pripadaju vrstama *E. faecium* i *E. faecalis*, te *E. mundtii*, *E. avium*, *E. hirae*, i *E. durans* (Hanchi i sur., 2018).

U znanstvenoj literaturi nema ujednačeno prihvaćene klasifikacije bakteriocina BMK. Prema prvim prijedlozima klasifikacije bakteriocini su grupirani u 4 grupe, a kasnije u 3 grupe (Mokoena, 2017). Međutim, Franz i sur. (2007) predlažu podjelu enterocina u 4 grupe (tablica 1).

Tablica 1. Usporedba klasifikacijskih sustava bakteriocina BMK i predložene klasifikacije enterocina (prema Franz i sur., 2007)

Grupa	Nes i sur. (1996)	van Belkum i Stiles (2000)	Predložena reklasifikacija	Primjer
I	Lantibiotici	Lantibiotici	Grupa I. Lantibiotički enterocini	Citolizin
II a	Bakteriocini slični pediocini ili 'Listeria' – aktivni s YGNGVXC blizu N-terminalnog kraja i GG vodećim peptidom	Cistibiotici s 2 disulfidna mosta s YGNGVXC blizu N-terminalnog kraja	Grupa II.1. Enterocini slični pediocinu	Enterocin A
B	Dvokomponentni peptidi s GG vodećim peptidom	Cistibiotici s jednim disulfidnim mostom s YGNGVXC blizu N-terminalnog kraja	II.2. Enterocini koji se sintetiziraju bez vodećeg peptida	Enterocin L50A
C	Bakteriocini izlučeni signalom peptidnog puta	Cistibiotici s jednim disulfidnim mostom bez YGNGVXC blizu N-terminalnog kraja	II.3. Ostali linearni enterocini koji nisu slični pediocinu	Enterocin B
D	-	Tiolbiotici s jednim ili bez cisteinskih ostataka	-	-
E	-	Dvokomponentni peptidi s GG vodećim peptidom	-	-
F	-	Atipični bakteriocini	-	-
III	Veliki, termolabilni proteini	Veliki, termolabilni proteini	Grupa III. Ciklički antibakterijski peptidi	Enterocin AS-48
IV	-	-	Grupa IV. Veliki proteini	Enterolizin A

Lantibiotički enterocini iz Grupe I ne razlikuju se od ostalih klasifikacija. Lantibiotici su ribosomski sintetizirani peptidi male molekule mase koji prolaze kroz posttranslacijsku modifikaciju. Zasad, jedini poznati lantibiotički enterocini su citolizin i enterocin W koje sintetizira *E. faecalis*. Citolizin je dipeptid čije podjedinice sadrže lantioninski ostatak. Ovaj bakteriocin ima hemolitičku funkciju prema eukariotskim stanicama i Gram-pozitivnim bakterijama. Citolizin se strukturno razlikuje od ostalih poznatih lantibiotika kao što su nisin A i nisin Z koji se sastoje od jednog linearnog peptida. Genetski lokus je odgovoran za sintezu citolizina nalazi se na plazmidu pAD1 veličine 58 kb koji reagira na feromone s pet poznatih otvorenih okvira čitanja (ORF). Ekspresija svih 5 ORF-ova je potrebna kako bi citolizin imao hemolitičku i baktericidnu aktivnost (Rahman i sur., 2021; Hanchi i sur., 2018; Franz i sur., 2007).

Franz i sur. (2007) bakteriocine iz grupe II svrstavaju u manje podgrupe temeljem razlika u osnovnoj građevnoj jedinici. Grupa II.1. obuhvaća bakteriocine koji su slični pediocinu, a karakterizira ih hidrofилna kationska regija s YGNGVXC motivom i dva cisteinska ostatka povezana disulfidnim mostom koja stabiliziraju β -strukturu peptida. Grupa II.1 podijeljena je u 2 podgrupe prema klusterskoj analizi. U prvu podgrupu pripadaju enterocin A, mundticini i enterocin CRL35. Enterocini prve podgrupe sadrže sedam jedinstvenih aminokiselinskih ostataka, dok enterocini druge podgrupe sadrže 6 aminokiselinskih ostataka. Drugu podgrupu čine bakteriocin 31, bakteriocin T8, bakteriocin RC714, enterocin SEK4 i enterocin P. Nadalje, podgrupe se međusobno razlikuju i na genetskoj razini. Naime, prva podgrupa posjeduje proteinske transportere tipa ABC koji su odgovorni za prijenos bakteriocina, a enterocini druge podgrupe se prenose pomoću pomoću bakterijske preproteinske translokaze. Enterocin A (entA) je bakteriocin veličine 4829 Da, a sadrži ukupno 47 aminokiselinskih ostataka. Enterocin A proizvodi *E. faecium*, a aktivan je protiv vrsta *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Listeria* spp. (Nes i sur., 1996).

Grupa II.2. obuhvaća enterocine koji se sintetiziraju bez YGNGVXC motiva i bez vodećeg peptida. Glavni predstavnici ove grupe enterocina su dipeptidi enterocin L50, MR10A i MR10B te enterocini RJ-11, Q i EJ97. Smatra se da se ova grupa enterocina transportira pomoću ABC transportera.

Grupu II.3. obuhvaćaju linearni enterocini koji nisu slični pediocinu, a sintetiziraju se pomoću vodećeg peptida. Ovdje pripadaju enterocini B i 1071 te bakteriocin 32. Enterocin B je bakteriocin

veliĉine 5463 Da, a sadrži ukupno 53 aminokiselinskih ostataka. Enterocin B je aktivan protiv vrsta *Enterococcus* i *Lactobacillus* te protiv nekih patogena koji se prenose hranom (Franz i sur., 2007).

Cikliĉki antibakterijski peptidi su treća grupa enterocina. Nes i sur. (2007) te van Belkum i Stiles (2000) smatrali su da ove bakteriocine treba odvojiti od grupe II zbog njihove karakteristiĉne strukture. Najpoznatiji enterocin ove grupe je enterocin AS-48, a proizvodi ga *E. faecalis* S-48 (Hanchi i sur., 2018). Enterocin AS-48 aktivan je protiv rodova *Bacillus* i *Clostridium*. Smatra se da enterocin AS-48 ima sposobnost formiranja agregata koji se ugrađuju u bakterijsku membranu stvarajući pozitivan naboj što posljediĉno dovodi do destabilizacije membranskog potencijala, nastanka pora koje omogućuju propuštanje staniĉnog materijala te u konaĉnici smrti bakterijske stanice (Egan i sur., 2016).

Grupa IV enterocina obuhvaća enterolizin A. Svrstan je u posebnu grupu radi svoje visoke molekulske mase (34501 Da). Osim toga, enterolizin A je termolabilan što je karakteristiĉno za grupu 4, a pokazuje aktivnosti prema *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Listeria* i *Staphylococcus* spp. (Franz i sur., 2007).

2.3.2. Primjena enterocina

Enterocini su znaĉajne raznolikosti u strukturi, te ih sintetiziraju bakterijski izolati iz razliĉitih izvora. Ova raznolikost moţe biti odraz robusne prirode *Enterococcus* vrsta kao i njihove izvanredne sposobnosti prijenosa i primanja genetskog materijala. Upravo uĉinkoviti mehanizmi prijenosa gena mogu objasniti višestruku proizvodnju enterocina te višestruku izolaciju istih enterocina kod razliĉitih *Enterococcus* vrsta (Franz i sur., 2007). Enterocini imaju potencijalnu primjenu u prehrambenoj industriji kao biokonzervansi, te u medicini i veterini kao zamjena za antibiotike (tablica 2). Primjena *Enterococcus* vrsta u procesu fermentacije hrane još uvijek je diskutabilna jer se donedavno njihova prisutnost u hrani smatrala fekalnom kontaminacijom, ali posljednjih godina rod *Enterococcus* prihvaćen je kao dio normalne mikrobiote te je primjena *Enterococcus* vrsta u prehrambenoj industriji sve ĉešća (Franz i sur., 2011). Antimikrobna aktivnost bakteriocina protiv patogena koji se prenose hranom i bakterija koje uzrokuju kvarenje privukla je popriliĉnu pozornost zbog njihove primjene u konzerviranju hrane. Stoga su posljednjih godina uloţeni znaĉajni naponi u primjeni bakteriocina i bakterija koje proizvode bakteriocine u

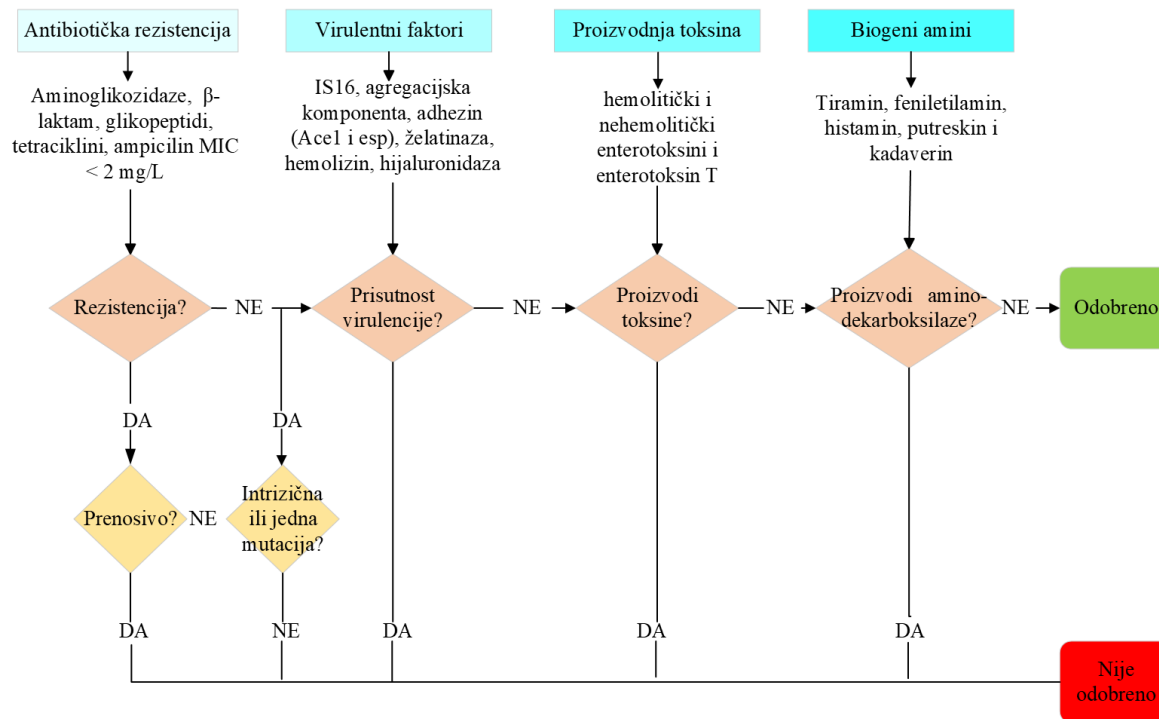
mnogim prehrambenim proizvodima. Primjerice, pojedina istraživanja pokazala su kako enterocini pojedinih *Enterococcus* vrste imaju bakteriostatski učinak protiv bakterija koje proizvode spore. Zbog svojih svojstava, *Enterococcus* vrste predstavljaju važan rezervoar za otkriće bakteriocina te bi razvoj smjernica bio vrlo koristan pri razmatranju njihove prikladnosti za uporabu u hrani (Hanchi i sur., 2018; Egan i sur., 2016).

Tablica 2. Uporaba enterocina u prehrani, veterini i medicini (prema Hanchi i sur., 2018)

Prehrana	Veterina	Medicina
Enterocin RM6	Enterocin E-760	Bolesti GI sustava Enterocin CRL35 Enterocin E50-52 Enterocin S760 Enterocin A
Enterocin AS-48	Enterocin DD14	
Enterocin CRL 35		
Enterocin LM-2		
Enterocin A		Anti-MRSA Bakteriocini E50-52 Bakteriocin B602 Enterocini DD28 Enterocin DD93
Enterocin B		
Dur 152A		
Enterocin 416KI		Kožne bolesti CBT SL-5 Enterocin AS-48

2.4. ENTEROCOCCUS SPP. KAO OPORTUNISTIČKI PATOGENI

Sigurnost primjene bakterija iz roda *Enterococcus* neophodno je definirati. U poglavljima 2.2. i 2.3. opisani su korisni učinci sojeva ovog roda, ali pojedini sojevi bakterija iz roda *Enterococcus* su oportunistički patogeni koji uzrokuju različite infekcije. Patogeni sojevi mogu biti otporni na antibiotike, a u posljednje vrijeme sve je češća i otpornost na više različitih antibiotika (Franz i sur., 2011). Osim toga, važno je odrediti postoje li virulentni faktori prije korištenja određenih sojeva u probiotičkim pripravcima. Na slici 2 shematski je prikazana procjena sigurnosti probiotičkih pripravaka *Enterococcus* vrsta za primjenu u hrani. Oportunistički patogeni su mikroorganizmi koji ne inficiraju zdrave domaćine, već izazivaju infekcije u bolnicama, kod imunokompromitirajućih osoba ili kod osoba koje imaju slabiji imunitet. Ovaj tipa patogenih mikroorganizama najrasprostranjeniji je u bolnicama gdje je često glavni izvor zaraznih bolesti. Komenzalne bakterije su jedne od najčešćih oportunističkih patogena (Martinez i sur., 2014).



Slika 2. Procjena sigurnosti probiotičkih pripravaka *Enterococcus* vrsta za primjenu u hrani (prema Hanchi i sur., 2018)

Pojedine bakterije iz roda *Enterococcus* su oportunistički patogeni (Krawczyk i sur., 2021; Ramos i sur., 2020; Martinez i sur., 2014). Izvan svog prirodnog staništa, ove bakterije uzrokuju različite infekcije kao što su bolesti mokraćnih puteva, sepsa i endokarditis. Najčešće se *E. faecalis* i *E. faecium* povezuju s bolničkim infekcijama (Gaca i Lemos, 2019). Istraživanja su pokazala kako je čak 80 – 90 % kliničkih *Enterococcus* infekcija uzrokovano *E. faecalis*, dok je 5 – 15 % uzrokovano *E. faecium*. Osim toga, u rijetkim slučajevima infekcije mogu biti uzrokovati i druge vrste kao što su *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*, i *E. casseliflavus* (Silva i sur., 2012).

Bakterije *E. faecalis* i *E. faecium* su potencijalno patogene bakterije, a imaju mogućnosti prilagodbe i preživljavanja u različitim okolišnim uvjetima. Razvile su niz mehanizama koje koriste kako bi kolonizirale različita staništa gdje mogu uzrokovati bolesti kod ljudi i životinja (Krawczyk i sur., 2021). Kod bakterija iz roda *Enterococcus* virulentni faktori obično su povezani s kolonizacijom i invazijom tkiva domaćina, kao i rezistencija prema specifičnim i nespecifičnim obrambenim mehanizmima domaćina, uz sintezu toksina. Virulentni faktori bakterija iz roda *Enterococcus* mogu se svrstati u: (a) ekstracelularno izlučene poput citolizina, želatinaze i serin

proteaze; (b) površinski proteini, npr. Acm/Ace adhezini, Ebp pili i izvanstanični površinski proteini Esp; (c) drugi faktori virulencije, npr. hijaluronidaza (Gilmore i sur., 2014).

Citolizin (Cyl- β -hemolizin) je toksin koji lizira crvene krvne stanice i neke ljudske bijele krvne stanice te ima baktericidnu aktivnost prema nekim Gram-pozitivnim bakterijama (Rahman i sur., 2021). Istraživanja su pokazala kako je citolizin često prisutan kod bakterijskih sojeva koje inficiraju životinje, a učestalost kod sojeva *E. faecalis* je procijenjena na 30 % (Ramos i sur., 2020; Gilmore i sur., 2014).

Želatinaza (GelE) je proteolitički enzim koji djeluje na različite supstrate kao što su β -lanac inzulina, kolagenski materijal u tkivima, vazokonstriktor edotelin-1, spolni feromoni i njihovi peptidni inhibitori. Nadalje, želatinaza bakterije *E. faecalis* ima sposobnost cijepanja fibrina što može oštetiti tkivo domaćina i time omogućiti širenje infekcije (Waters i sur., 2003). GelE se transkribira sa *sprE*, genom koji kodira za serin proteazu te zajedno doprinose virulenciji (García-Solache i Rice, 2019).

Agregacijska komponenta (AS) je adhezin koji je kodiran plazmidom koji reagira na feromone. AS inducira nakupljanje stanica bakterije *E. faecalis* što olakšava prijenos plazmida na kojem je kodiran AS gen. Na taj način bakterija se može vezati na eukariotske stanice i inficirati ih. Nadalje, AS se može vezati na proteine izvanstaničnog matriksa kao što su fibronektin, trombospondin, vitronektin i kolagen tipa I (Franz i sur., 2011). Poželjno je da probiotički sojevi posjeduju AS jer postoji veća šansa da će se probiotički sojevi vezati na epitel crijeva kao i mogućnost stvaranja biofilma (Krawczyk i sur., 2021). S druge strane AS može, uz rezistenciju na antibiotike i citolizin, doprinijeti virulenciji. Naime, pojedina istraživanja su pokazala kako AS i citolizin djeluju sinergistički povećavajući bakterijsku virulenciju što posljedično dovodi do oštećenja tkiva domaćina (Gilmore i sur., 2014).

Protein koji veže kolagen omogućuje stvaranje biofilma kod *E. faecalis* (Ace) i *E. faecium* (Acm). Osim za kolagen tipove I – IV., Ace se veže i za laminin dok se Acm veže samo za kolagen tipova I – IV (Nallapareddy i sur., 2003; Nallapareddy i sur., 2000).

Adhezin (Esp) je površinski protein bakterija *E. faecalis* i *E. faecium*, a javlja se na patogenima otocima i može se prenijeti konjugacijom. Esp se pojavljuje u različitim oblicima što mu omogućuje izbjegavanje imunoloških obrambenih mehanizama domaćina. Glavna funkcija Esp je

sudjelovanje u formiranju biofilma čime se povećava održivost bakterija u biopolimerima (Mohamed i Huang, 2007). Proizvodnja biofilma omogućuje bakterijama zaštitu od infekcije bakteriofagima i pojačanu otpornost prema eliminaciji. Biofilm koji sadrži više različitih vrsta bakterija omogućuje razmjenu gena koji su povezani s njihovom virulentnošću (Krawczyk i sur., 2021).

Nekontrolirana uporaba antibiotika na životinjskim farmama i u medicini uzrokovala je povećanje broja bakterija otpornih na antibiotike. Dokazano je kako komenzalni sojevi bakterija iz roda *Enterococcus* mogu razviti veću patogenost prilagodbom na bolničko okruženje (Krawczyk i sur., 2021). Osim toga, terapija antibioticima modulira sastav intestinalne mikrobiote što omogućuje da prisutni izvori neiskorištenih hranjivih tvari su dostupni oportunističkim patogenima. Naime, pacijenti u bolnicama obično se liječe antibioticima širokog spektra kao što su penicilini i cefalosporini što povećava mogućnost kolonizacije *E. faecium* istovremeno nadmašujući predstavnike Gram-negativne crijevne mikrobiote. Bakterije *E. faecalis* i *E. faecium* karakterizira smanjena osjetljivost na mnoge antimikrobne tvari koje su aktivne protiv rodova *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Pojedine terapije antibioticima mogu sniziti razine C-tipa lektina RegIII koji proizvodi domaćin kako bi se održala homeostaza crijevne mikrobiote i spriječila infekcija patogenima. Smanjene razine RegIII dovode do prekomjernog rast *E. faecium* u probavnom sustavu. Intrinzična rezistencija *Enterococcus* sojeva na pojedine antibiotike i njihova sposobnost na razvijanje rezistencije spadaju u glavne čimbenike koji doprinose prilagodbi bakterija na stresne uvjete. Stoga svojstva *Enterococcus* sojeva i disbioza mikrobioma domaćima mogu posljedično rezultirati sekundarnu infekciju patogenom (Ramos i sur., 2020; García-Solache i Rice, 2019; Gilmore i sur., 2014; Franz i sur., 2011). U tablici 3 prikazane su antimikrobne tvari, geni koji kodiraju za njihovu rezistenciju i mehanizam rezistencije koji su najčešće prisutni kod *Enterococcus* sojeva.

Tablica 3. Antimikrobna rezistencija *Enterococcus* sojeva (prema García-Solache i Rice, 2019)

Antimikrobne tvari	Gen/operon koji kodira za rezistenciju	Mehanizam rezistencije
Aminoglikozidi (gentamicin, kanamicin)	<i>aac-2'-aph-2''-le</i> , <i>aph-3'-IIIa</i>	Modifikacija aminoglikozida
β-Laktam	<i>pbp4</i> (<i>E. faecalis</i>), <i>pbp5</i> (<i>E. faecium</i>)	Smanjen afinitet prema antibiotiku
Kloramfenikol	<i>cat</i>	Acetilacija kloramfenikola
Klindamicin	<i>lsa(A)</i>	Pretpostavljeni efluks
Daptomicin	<i>liaFSR</i>	Promjena naboja i fluidnosti membrane
Eritromicin	<i>ermB</i>	Ribosomalna metilacija
Fluorokinoloni	<i>gyrA</i> , <i>parC</i>	Modifikacije u regiji koja određuje rezistenciju na kinolone
Glikopeptidi	<i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanD</i> , <i>vanM</i>	Modificirani prekursori za peptidoglikane koji završavaju u D-laktatu
	<i>vanC</i> , <i>vanE</i> , <i>vanG</i> , <i>vanL</i> , <i>vanN</i>	Modificirani prekursori za peptidoglikane koji završavaju u D-serinu
Oksazolidinoni	rRNA geni	Mutacije koje smanjuju afinitet
	<i>cfr</i>	Metilacija 23S rRNA
Rifampin	<i>rpoB</i>	Točkaste mutacije koje smanjuju afinitet
Streptomicin	<i>ant-6</i>	Modifikacija streptomicina
Tetraciklini	<i>tet(L)</i>	Efluks
	<i>tet(M)</i>	Ribosomska zaštita
Tigeciklin	<i>tet(L)</i> , <i>tet(M)</i>	Povećana ekspresija

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

U ovom radu su korištene bakterije iz roda *Enterococcus* i test-mikroorganizmi prikazani u tablici 4. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 4. Popis sojeva *Enterococcus* vrste i test-mikroorganizama koji su korišteni u ovom radu

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Enterococcus faecium</i>	L3	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	A7	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 9430	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ZG3-16	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ZG5-20	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium</i>	ZG7-10	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecium/durans</i>	ZG4-24	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG2-9	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG3-6	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG6-22	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG6-53	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG6-55	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG7-1	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG7-15	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG9-15	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus faecalis</i>	ZG9-25	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus durans</i>	4 t2	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus durans</i>	ZG1-19	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Enterococcus durans</i>	D8	MRS, 37 °C, aerobno
<i>Escherichia coli</i>	3104	BHI, 37 °C, aerobno
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	MRS, 37 °C, aerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge:

- a) za održavanje i uzgoj bakterija iz roda *Enterococcus*
 - MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar („Biovit“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0; agar 20,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.
 - MRS bujon („Biovit“, Italija), istog sastava kao MRS agar, ali bez dodatka agara.
- b) za održavanje i uzgoj bakterije *Escherichia coli*
 - BHI (Brain Heart Infusion) bujon („Biovit“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 minuta.
- c) za održavanje i uzgoj bakterije *Staphylococcus aureus*
 - MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) bujon („Biovit“, Italija), sastava (g/L destilirane vode): pepton 10,0; mesni ekstrakt 10,0; kvašćev ekstrakt 5,0; glukoza 20,0; Tween 80 1,0; MgSO₄ x 7H₂O 0,1; MnSO₄ x 7H₂O 0,05; natrijev-acetat 5,0. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121 °C tijekom 15 min.

3.1.3. Kemikalije

- kvašćev ekstrakt, „Difco laboratories“, SAD
- agar, „Biolife“, Italija
- pepton, „Torlak“, Srbija
- želatina, „Fischer Scientific“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- etanol 90 %, „Kemika“, Hrvatska
- obrano mlijeko, „Sigma Aldrich“, SAD
- Genomic Wizard DNA purification kit, „Promega“, SAD
- Nuclease-Free Water, „Takara“, Japan
- EmeraldAmp, Max HS PCR MasterMix (2x Premix), „Takara“, Japan
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- λ DNA HindIII standard, „Takara“, Japan

- 50x TAE pufer, „Bio-Rad“, SAD
- agarozna, „Invitrogen“, SAD
- destilirana voda, „PBF“, Hrvatska
- početnice, „Invitrogen“, SAD
- krvni agar, „Biomerieux“, Francuska
- obrano mlijeko, „Fluka“, Njemačka
- EDTA, „Sigma-Aldrich“, SAD
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- Diamond boja za detekciju nukleinskih kiselina, „Promega“, SAD
- kristal violet boja, „Sigma-Aldrich“, SAD
- natrijev klorid (NaCl), „Kemika“, Hrvatska

3.1.4. Aparatura i pribor

- staklene epruvete, „Scherf Präzision Europe GmbH“, Njemačka
- polistirenska mikrotitarska ploča, „Falcon“, SAD
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- stalci za epruvete, „neoLab“, Njemačka
- stalci za mikroeprovete, „Eppendorf“, SAD
- mikroeprovete, „Eppendorf“, SAD
- pinceta, „Isolab“, Njemačka
- mikrobiološke uške, „Syntesys“, Italija
- Petrijeve zdjelice, „Golias“, Slovenija
- Penicilinke, „Macherey-Nagel“, Njemačka
- kivete za centrifugiranje; 15 mL, 50 mL
- magnetna miješalica, „Tehtnica Železniki MM 530“, Slovenija
- vibro-mješač Vortex, V-1 plus, „BioSan“, Latvija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD

- zamrzivač (-80 °C) CryoCube F101h, „Eppendorf“, SAD
- spektrofotometar BioSpec Nano, „Shimadzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- čitač mikrotitarskih ploča Infinite F Plex, „Tecan“, Švicarska
- liofilizator Christ Alpha 1-2 LD plus, „Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH“, Njemačka
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- vaga, „Sartorius“, Njemačka
- kadica za elektroforezu, „Bio-Rad“, SAD
- transiluminator Uvidoc HD6, „Uvitec“, Ujedinjeno Kraljevstvo
- PCR uređaj ABI 2720, „Applied Biosystems“, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Određivanje hemolitičke aktivnosti

Potrebno je inokulirati bakterijske sojeve iz smrznuto čuvane kulture u 15 % glicerolu u 5 mL MRS hranjive podloge optimalne za rast bakterija te provesti inkubaciju pri 37 °C preko noći. 10 µL iz prečnoćne kulture sojeva se inokulira se u četiri paralele na krvni agar. Inokulirani sojevi na krvnom agaru inkubiraju se preko noći pri 37 °C, zatim se promatra pojava prozirnih zona oko poraslih kultura. Kao kontrolni sojevi koriste se *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 i *Enterococcus faecium* A7.

3.2.2. Formiranje biofilma na polistirenu

Svaki soj bakterije prvo se uzgaja u MRS hranjivoj podlozi pri 37 °C preko noći. U slijedećem koraku potrebno je vorteksirati, pa zatim razrijediti uzgojene kulture bakterija u omjeru 1:10 i 1:100 te nacijepiti 200 µL razrijeđene otopine na sterilnu polistirensku mikrotitarsku ploču s 96 jažica. Svaki soj potrebno je nacijepiti u 3 paralele. Ploča se inkubira preko noći pri 37 °C. Nakon inkubacije, jažice je potrebno isprazniti, sušiti 15 minuta te obojati sa 100 µL 1 % (m/v) kristal violet bojom tijekom 15 minuta, a nakon toga se ispiru s 200 µL 70 % (v/v) etanolom. OD₆₂₀ se određuje pomoću čitača mikrolitarskih ploča. *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 se koristi kao pozitivna kontrola (Cebrian i sur., 2012).

Sposobnost formiranja biofilma određuje se na sljedeći način, prema Extremina i sur. (2011):

$$OD < ODc \rightarrow \textit{ne tvori biofilm} \quad [1]$$

$$ODc < OD < 2 \times ODc \rightarrow \textit{slabo tvori biofilm} \quad [2]$$

$$2 \times ODc < OD < 4 \times ODc \rightarrow \textit{dobro tvori biofilm} \quad [3]$$

$$4 \times ODc < OD \rightarrow \textit{izrazito dobro tvori biofilm} \quad [4]$$

ODc se izračuna prema formuli:

$$ODc = ODnc + 3 \times SDnc \quad [5]$$

gdje je OD srednja vrijednost OD₆₂₀ za određeni soj, ODnc srednja vrijednost OD₆₂₀ negativne kontrole te SDnc standardna devijacija negativne kontrole. Kao negativna kontrola korištena je neinokulirana MRS podloga.

3.2.3. Optimiranje metode za određivanje želatinozne aktivnosti

3.2.3.1. Određivanje želatinozne aktivnosti na podlozi koja sadrži agar

Sposobnost bakterija da razgrađuju želatinu određuje se naciepljivanjem bakterijskih sojeva cik-cak metodom ili metodom uboda u agar podlogu. Podloga se priprema prema Cruz i Torres (2012) uz modifikacije: 1 g peptona, 0,6 g ekstrakta kvasca, 6 g želatine i 3 g agara se otopi u 200 mL destilirane vode. U epruvete se doda 7 mL podloge, začepi vatenim čepom i stavi na sterilizaciju. Nakon sterilizacije, ukoliko se provodi naciepljivanje cik-cak metodom, epruvete je potrebno nakositi kako bi se dobila kosa podloga. Na dobro ohlađenu podlogu naciepljuju se prekonoćno uzgojene bakterijske kulture cik-cak metodom ili metodom uboda pomoću sterilne mikrobiološke uške. Uzorci se inkubiraju minimalno 48 h pri 37 °C. Pojava prozirnih zona oko poraslih kolonija ukazuje na razgradnju želatine.

3.2.3.2. Određivanje želatinozne aktivnosti na podlozi bez agara

Sposobnost bakterija da razgrađuju želatinu određuje se metodom ubadanja sterilne mikrobiološke uške u podlogu sa želatinom (Cruz i Torres, 2012). Podloga se priprema otapanjem 1 g peptona, 0,6 g ekstrakta kvasca i 24 g želatine u 200 mL destilirane vode. U staklene epruvete doda se 3 mL podloge, začepi vatenim čepom i stavi na sterilizaciju. U dobro ohlađenu podlogu sterilnom mikrobiološkom uškom se nacijepi prekonoćna bakterijska kultura metodom ubadanja. Epruvete se inkubiraju 48 h pri 37 °C nakon čega se inkubiraju oko 30 min u hladnjaku. Ukoliko je došlo do razgradnje želatine, podloga će ostati tekuća. Kao pozitivne kontrole koriste se bakterije *Escherichia coli* i *Staphylococcus aureus*.

3.2.4. Liofilizacija bakterijskih stanica

Bakterijske kulture uzgojene na MRS hranjivoj podlozi se centrifugiraju pri 4200 g 10 min. Nakon centrifugiranja odlije se supernatant, talog stanica se ispere u 2 mL sterilne fiziološke otopine te se suspenzija ponovno centrifugira. Supernatant se ponovno odlije, a stanice se resuspendiraju u 1 mL 10 % obranog mlijeka. Priređene suspenzije stanica zamrznu se preko noći ili minimalno 2 sata na – 80 °C, a potom se liofiliziraju u liofilizatoru. Broj živih stanica (CFU/mL) se određuje indirektnom metodom prije i poslije liofilizacije, prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.5.

3.2.5. Određivanje broja živih mikroorganizama indirektnom metodom

Broj živih stanica se određuje indirektnom metodom, odnosno nacjepeljivanjem decimalnih razrjeđenja suspenzija stanica u fiziološkoj otopini na MRS agar u obliku kapi (10 µL) u dvije paralele. Nakon 48 h inkubacije pri 37 °C, izbroje se kolonije i izračuna broj živih stanica (engl. *Colony-forming units*, CFU) po mililitru uzorka (CFU/mL).

3.2.6. Izolacija genomske DNA iz bakterijskih sojeva

Ekstrakcija genomske DNA se provodi pomoću Genomic Wizard DNA kita iz bakterijskih sojeva uzgojenih u 5 mL MRS podloge preko noći pri 37 °C. Uzgojeni sojevi se centrifugiraju 5 min pri 4200 g nakon čega se uklanja supernatant. Talog stanica se resuspendira u 480 µL 50 mM EDTA, čitav volumen suspenzije se prebacuje u mikroeprevete, dodaje se 120 µL otopine lizozima

(10 mg/mL) te se talog lagano resuspendira pomoću automatske pipete. Uzorci se inkubiraju u vodenoj kupelji 30-60 min pri 37 °C. Nakon inkubacije, suspenzija se centrifugira 2 min pri 14000 g, supernatant se ukloni, dodaje se 600 µL otopine za lizu jezgre i lagano pipetira dok se talog ne resuspendira. U slijedećem koraku suspenzija se inkubira u vodenoj kupelji 5 min pri 80 °C kako bi se lizirale stanice. Nakon što se stanični lizat ohladi na sobnu temperaturu, dodaje se 3 µL otopine RNAze, sadržaj epice se dobro izmiješa i inkubira 15-60 min pri 37 °C u vodenoj kupelji. Uzorak je potrebno ohladiti na sobnoj temperaturi, nakon čega se dodaje 200 µL otopine za taloženje proteina i vorteksira na visokoj brzini 20 s. Slijedi inkubacija uzoraka na ledu 5 min i centrifugiranje 3 min pri 14000 g. Supernatant koji sadrži DNA se prebacuje u čistu epicu u kojoj je prethodno dodano 600 µL izopropanola sobne temperature. Sadržaj mikroepuvete se izmiješa okretanjem mikroepuvete, dok se niti DNA ne formiraju vidljivu masu. Ponovno slijedi centrifugiranje 2 min pri 14000 g, uklanjanje supernatanta i sušenje mikroepuvete, na čistom apsorbirajućem papiru. Talog DNA se ispiru pomoću 600 µL 70 % etanola sobne temperature, zatim slijedi centrifugiranje 2 min pri 14000 g, uklanjanje etanola i sušenje uzoraka 10-15 min na zraku. Naposljetku se doda 100 µL otopine za rehidraciju DNA te se DNA rehidrira inkubacijom preko noći pri 4 °C. Dobivenim uzorcima DNA se mjeri koncentracija kako je opisano u poglavlju 3.2.7 te se pohranjuju pri 2-8 °C.

3.2.7. Određivanje koncentracije izolirane DNA

Koncentracija DNA izolirana iz bakterijskih sojeva mjeri se na BiospecNano uređaju pri valnoj duljini 0,7 nm, pri čemu se kao slijepa proba koristi otopina za rehidraciju DNA, a u uređaj se dodaje 2 µL uzorka.

3.2.8. PCR sa specifičnim početnicama za enterocine

DNA izolirana iz bakterijskih sojeva koristi se kao kalup za PCR reakciju. Reakcijska smjesa volumena 25 µL sadrži 12,5 µL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix), 1 µL kalupa DNA, 0,05 µL početnice 1 (enterocin A-R ili enterocin B-R), 0,05 µL početnice 2 (enterocin A-F ili enterocin B-F) i 11,4 µL destilirane vode. Za PCR reakciju koriste se početnice prikazane u tablici 5. PCR reakcija odvija se prema uvjetima prikazanim u tablicama 6 i 7. Kao slijepa proba koristi se reakcijska smjesa bez dodatka DNA kalupa, a kao negativna kontrola se, umjesto DNA

kalupa ispitivanog bakterijskog soja, dodaje izolirana DNA *Lactobacillus plantarum* D13. Dobiveni PCR produkti razdvajaju se elektroforezom na 1 % agaroznom gelu pri 150 V. Kao standard se koristi smjesa 2 µL EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (2x Premix), 0,25 µL λ DNA HindIII i 0,5 µL 100 bp DNA Ladder. Nakon završetka DNA elektroforeze, gel se oboja etidijevim bromidom koncentracije 0,5 µg/mL i vizualizira ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture.

Tablica 5. Specifične početnice za detekciju gena koji kodiraju za enterocine. (F) označava *forward primer*, a (R) označava *reverse primer* (Foulquie Moreno i sur., 2003)

Ciljani gen	Početnice	Veličina PCR produkta
<i>entA</i>	(F) 5'-GGTACCACTCATAGTGGAAA-3' (R) 5'-CCCTGGAATTGCTCCACCTAA-3'	138 bp
<i>entB</i>	(F) 5'-CAAAATGTAAAAGAATTAAAGTACG-3' (R) 5'-AGAGTATACATTTGCTAACCC-3'	201 bp

Tablica 6. Uvjeti provođenja -PCR reakcije kada se koriste enterocin A početnice

Broj ponavljanja	T [°C]	Vrijeme
1	95	5 min
30	95	30 s
	58	30 s
	72	30 s
1	72	5 min

Tablica 7. Uvjeti provođenja PCR reakcije kada se koriste enterocin B početnice

Broj ponavljanja	T [°C]	Vrijeme
1	95	5 min
30	95	30 s
	56	30 s
	72	30 s
1	72	5 min

4. REZULTATI I RASPRAVA

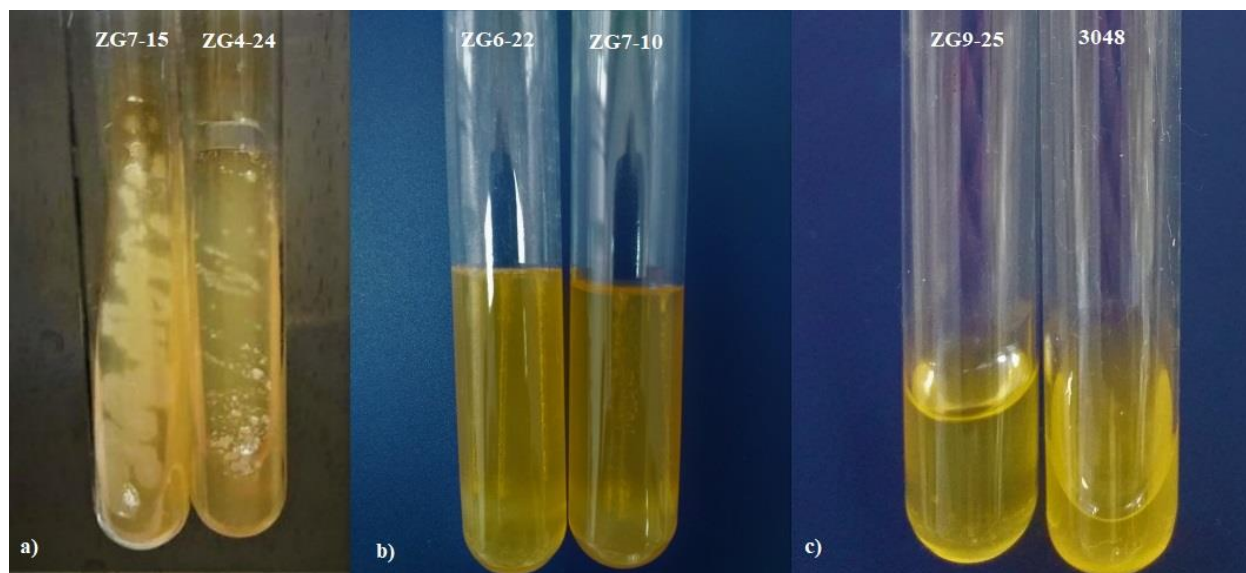
4.1. PROCJENA SIGURNOSNIH ASPEKATA *Enterococcus* SOJEVA

Osim što se *Enterococcus* vrste koriste kao probiotički pripravci, važnu ulogu imaju i u dozrijevanju pojedinih tradicionalnih sireva iz mediteranskih zemalja. Golić i sur. (2013) izolirali su BMK iz hrvatskih svježih mekih sireva te je ukupno 29,8 % bakterija pripadalo *Enterococcus* vrstama koje doprinose aromi i svojstvima povezanim s teksturom sireva. Popović i sur. (2018) izolirali su 75 različitih *Enterococcus* sojeva iz tradicionalnih sireva od kojih su najviše prevladavali sojevi *E. durans*. Istraživanja su pokazala kako su autohtoni sirevi zapadnih balkanskih zemalja bogat izvor novih *Enterococcus* sojeva koji, iako posjeduju rezistenciju na antibiotike i određene virulentne faktore, imaju značajan genetički, metabolički i tehnološki potencijal. Upravo zbog rezistencije na antibiotike i prisutnosti virulentnih faktora nužno je odrediti probiotički potencijal za svaki soj posebno kako bi se spriječili potencijalni rizici njihove primjene kod ljudi i životinja (Terzić-Vidojević i sur., 2015). Nadalje, *Enterococcus* vrste poznate su po proizvodnji bakteriocina, odnosno enterocina koji inhibiraju rast drugih bakterija, uključujući patogene bakterije i bakterije koje uzrokuju kvarenje hrane kao što su *Listeria* i *Clostridium* (Giraffa, 1995). Zbog toga *Enterococcus* vrste imaju potencijalnu primjenu kao starter kulture te kao kulture pri proizvodnji sireva.

Upravo u ovom istraživanju korištene su bakterije iz roda *Enterococcus* izolirane iz mikrobioma autohtonih hrvatskih svježih sireva, koji su pohranjeni nakon identifikacije u Zbirci mikroorganizama Laboratorija, s ciljem krajnje primjene kao funkcionalnih starter kultura i mogućih sojeva s probiotičkim djelovanjem.

Općenito, *Enterococcus* spp. koji su dio mikrobne populacije hrane su komenzalne bakterije koje nisu virulentne u usporedbi s kliničkim izolatima. Ipak za primjenu *Enterococcus* spp. kao starter kultura, neophodno je definirati virulentna svojstva kako bi se spriječila kontaminacija hrane patogenima, i širenje virulentnih sojeva kroz prehrambeni lanac. Zbog sigurnosnih aspekata, određuje se najčešće želatinozna i hemolitička aktivnost što su značajni virulentni faktori *Enterococcus* spp. Enzim želatinaza i citolizin upućuju na patogena svojstva *Enterococcus* sojeva kod životinja (Franz i sur., 2011). Stoga je u ovom radu ispitana prisutnost želatinaze i citolizina kako bi se eliminirali oni bakterijski sojevi koji potencijalno eksprimiraju navedene faktore virulencije.

Također je tijekom eksperimenata optimiran izbor metode za određivanje želatinozne aktivnosti. Prema prvoj metodi za određivanja želatinozne aktivnosti koristi se hranjivi medij koji, uz želatinu, sadrži i agar. Sposobnost razgradnje želatine određivala se naciepljivanjem kulture površinski „cik-cak“ metodom te metodom uboda u agar, te pojava prozirnih zona oko inokulirane bakterijske kulture ukazuje na razgradnju želatine (slika 3a, slika 3b). Nedostatak ovih metoda je upravo izrazito čvrsta podloga koja je nakon dulje inkubacije pucala te je bilo teško odrediti pojavu prozirnih zona. Kako bi se prozirne zone lakše odredile, eksperiment se može provoditi u Petrijevim zdjelicama, a nakon inkubacije pri 37 °C Petrijeve zdjelice mogu se natopiti amonijevim sulfatom kako bi se lakše vidjele prozirne zone (Cruz i Torres, 2012). Nadalje, želatinozna aktivnost ispitana je primjenom metode bez dodatka agara. Pri sobnoj temperaturi takva podloga je u tekućem stanju, pa je nakon inkubacije uzorke trebalo inkubirati u hladnjaku. Ukoliko bakterija ima sposobnost razgradnje želatine, tada je nakon inkubacije u hladnjaku podloga i dalje tekuća (slika 3c). Kao pozitivne kontrole korištene su bakterije *Escherichia coli* 3104 i *Staphylococcus aureus* 3048. Osim toga, Cruz i Torres (2012) predlažu inkubaciju uzoraka u ledenoj kupelji.



Slika 3. Određivanje želatinozne aktivnosti. a) Cik-cak metoda na podlozi s agarom (*Enterococcus faecalis* ZG7-15, *Enterococcus faecium/durans* ZG4-24); b) Metoda uboda na podlozi s agarom (*Enterococcus faecalis* ZG6-22, *Enterococcus faecium* ZG7-10); c) Metoda bez agara (*Enterococcus faecalis* ZG9-25, *Staphylococcus aureus* 3048)

Sve metode pokazale su kako *Enterococcus* sojevi nemaju želatinoznu aktivnost, ali zbog jednostavnosti pripreme kao najbolje metoda pokazala se metoda gdje je korištena podloga bez agara. Rezultati istraživanja (prikazani kao srednja vrijednost svih ispitivanja) su prikazani u tablici 8. Eaton i Gasson (2001) istraživali su *Enterococcus* vrste izolirane iz hrane. Istraživanje je pokazalo kako samo jedan soj *E. faecium* sadrži gene koji kodiraju za želatinazu, ali soj nije pokazao želatinoznu aktivnost. Sojevi *E. durans* nisu sadržavali niti gene koji kodiraju za želatinazu niti su pokazivali želatinoznu aktivnost. Nasuprot tome, više sojeva *E. faecalis* sadrži gene koji kodiraju za želatinazu te pokazuju želatinoznu aktivnost, pri tome se radilo o sojevima izoliranih iz mliječnih proizvoda te kliničkim sojevima izoliranih iz bolnica. Navedeno svojstvo upućuje kako je želatinozna aktivnost češće prisutna kod *E. faecalis* nego kod *E. faecium* i *E. durans*.

Enterococcus sojevi, posebno oni sa širokim spektrom djelovanja, moraju se analizirati na prisutnost citolizina. Hemolitička aktivnost često se povezuje s infekcijama kod životinja, ali i kod ljudi. Ekspresija citolizina ide ruku pod ruku s hemolizom. Učestalost β -hemolize nije samo ograničena na sojeve *E. faecalis*, već se pojavljuje i kod *E. faecium* (DeVuyst i sur., 2013). *Enterococcus* sojevi moraju se ispitati na prisutnost citolizina kao selekcijski kriterij za uporabu u mliječnoj industriji (Giraffa, 1995).

Kako bi preliminarno provjerili da li bakterijski sojevi ekspimiraju citolizin, određena je hemolitička aktivnost na krvnom agaru. Svi analizirani bakterijski sojevi ne iskazuju fenotip tipičan za prisutnost citolizina (tablica 8). Hemolitička aktivnost najčešće se povezuje s različitim sojevima *E. faecalis* (Rahman i sur., 2021). U ovom istraživanju ispitana su svojstva *E. faecium*, *E. faecium/durans* i *E. faecalis* izoliranih iz mikrobioma sira. Iako na temelju rezultata ispitivani *Enterococcus* sojevi ne pokazuju hemolitičku aktivnost, u budućnosti bi trebalo ispitati hemolitičku aktivnost preostalih sojeva *E. faecalis* kako bi se sa sigurnošću eliminiralo odsustvo citolizina. Slično kao i pri određivanju gena koji kodiraju za želatinazu, Eaton i Gasson (2001) navode kako *E. faecalis* izolirani iz hrane i kliničkih uvjeta sadrže gene koji kodiraju za citolizin, dok izolati *E. faecium* i *E. durans* nisu sadržavali gene koji kodiraju za citolizin.

Odsutnost želatinaze i citolizina u ispitivanim uzorcima potvrđuje činjenicu kako su virulentni faktori rjeđe prisutni kod bakterijskih sojeva izoliranih iz hrane nego kod kliničkih izolata.

Tablica 8. Želatinozna i hemolitička aktivnost *Enterococcus* sojeva

Bakterijski sojevi	Želatinozna aktivnost	Hemolitička aktivnost
<i>Enterococcus faecium</i> L3	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> A7	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 9430	-	n.o.
<i>Enterococcus faecium</i> ZG3-16	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ZG5-20	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> ZG7-10	-	-
<i>Enterococcus faecium/durans</i> ZG4-24	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG2-9	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG3-6	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG6-22	-	n.o.
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG6-53	-	n.o.
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG6-55	-	n.o.
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG7-1	-	n.o.
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG7-15	-	n.o.
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG9-15	-	n.o.
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG9-25	-	n.o.
<i>Enterococcus durans</i> 4 t2	-	n.o.
<i>Enterococcus durans</i> ZG1-19	-	n.o.
<i>Enterococcus durans</i> D8	-	n.o.
<i>Escherichia coli</i> 3104	+	n.o.
<i>Staphylococcus aureus</i> 3048	+	n.o.

n.o. = nije određivano; + = bakterijski soj ima želatinoznu/hemolitičku aktivnost; - = bakterijski soj nema želatinoznu/hemolitičku aktivnost

Enterococcus vrste imaju izvanredan potencijal za formiranje biofilma koji omogućuje rezistenciju na antibiotike, posebice u specifičnim uvjetima okoline kao što su mokraćni sustav i usna šupljina (Soares i sur., 2014). Međutim, istraživanja su pokazalo kako je formiranje biofilma češće povezano s adhezijskim svojstvima kao poželjnom karakteristikom probiotika nego s virulentnim faktorima (Pieniz i sur., 2015). Hipotetski biofilmovi probiotičkih bakterija mogu doprinijeti redukciju formiranja patogenih biofilмова u prehrambenoj industriji.

U ovom istraživanju ispitana je sposobnost formiranja biofilma *Enterococcus* sojeva na polistirenu. Provedena su 3 mjerenja u 3 paralele za prvo i drugo decimalno razrijeđenje te su rezultati istraživanja prikazani u tablici 9. Istraživanje je pokazalo kako sojevi *E. faecium* L3, *E.*

faecium A7, *E. faecium* ZG3-16, *E. faecium* ZG7-10, *E. faecalis* ATCC 19433, *E. faecalis* ZG9-15, *E. faecalis* ZG9-25, *E. durans* ZG1-19 te *E. durans* D8 nemaju sposobnost stvaranja biofilma. Sojevi *E. faecium* ATCC 9430, *E. faecium* ZG5-20, *E. faecalis* ZG2-9, *E. faecalis* ZG6-22, *E. faecalis* ZG6-55, *E. faecalis* ZG7-15 i *E. durans* 4 t2, slabo tvore biofilm kod drugog decimalnog razrjeđenja. Sojevi *E. faecium/durans* ZG4-24, *E. faecalis* ZG3-6, *E. faecalis* ZG6-53 i *E. faecalis* ZG7-1 slabo tvore biofilm kod oba decimalna razrjeđenja. U pravilu, ispitivani sojevi nisu imali sposobnost formiranja biofilma kod prvog decimalnog razrjeđenja što se može pripisati činjenici da je koncentracija bakterija bila previsoka te su bakterije trošile hranjive tvari na održavanje osnovnih metaboličkih procesa. Istraživanja su pokazala kako je sposobnost formiranja biofilma značajno povezana s količinom hranjivih tvari te dodatak 1 % glukoze u hranjivu podlogu povećava sposobnost formiranja biofilma kod *E. faecalis* (Mohamed i Huang, 2007; Baldassarri i sur., 2001). Nadalje, iz dobivenih rezultata može se uočiti kako 55 % svih analiziranih sojeva ima sposobnost formiranja biofilma od kojih 64 % čine sojevi *E. faecalis*.

Tablica 9. Sposobnost formiranja biofilma *Enterococcus* sojeva

Soj	Razrjeđenje	OD ₆₂₀	Sposobnost stvaranja biofilma
<i>Enterococcus faecium</i> L3	1:10	0,2220 ± 0,1273	-
	1:100	0, 2396 ± 0,0711	-
<i>Enterococcus faecium</i> A7	1:10	0,4054 ± 0,2256	-
	1:100	0,3488 ± 0,2023	-
<i>Enterococcus faecium</i> ATCC 9430	1:10	0,5103 ± 0,4213	-
	1:100	0,5694 ± 0,4608	+/-
<i>Enterococcus faecium</i> ZG3-16	1:10	0,3142 ± 0,1421	-
	1:100	0,4272 ± 0,2221	-
<i>Enterococcus faecium</i> ZG5-20	1:10	0,5919 ± 0,315	-
	1:100	0,6733 ± 0,2791	+/-
<i>Enterococcus faecium</i> ZG7-10	1:10	0,3391 ± 0,1172	-
	1:100	0,3014 ± 0,0363	-
<i>Enterococcus faecium</i> <i>/durans</i> ZG4-24	1:10	0,8834 ± 0,7093	+/-
	1:100	0,5439 ± 0,2808	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG2-9	1:10	0,5134 ± 0,3335	-
	1:100	0,6529 ± 0,6546	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG3-6	1:10	0,9811 ± 0,957	+/-
	1:100	0,9370 ± 1,1374	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	1:10	0,3513 ± 0,1869	-
	1:100	0,4601 ± 0,2823	-

Tablica 9. Sposobnost formiranja biofilma *Enterococcus* sojeva – nastavak

Soj	Razrjeđenje	OD ₆₂₀	Sposobnost stvaranja biofilma
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG6-22	1:10	0,6064 ± 0,4187	-
	1:100	0,6676 ± 0,4534	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG6-53	1:10	0,9202 ± 0,54	+/-
	1:100	0,822 ± 0,4929	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG6-55	1:10	0,422 ± 0,2369	-
	1:100	0,6849 ± 0,622	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG7-1	1:10	0,8426 ± 0,3292	+/-
	1:100	0,8416 ± 0,4787	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG7-15	1:10	0,5917 ± 0,2684	-
	1:100	0,5857 ± 0,2119	+/-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG9-15	1:10	0,3279 ± 0,0282	-
	1:100	0,3267 ± 0,0961	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ZG9-25	1:10	0,4599 ± 0,1545	-
	1:100	0,4451 ± 0,2020	-
<i>Enterococcus durans</i> 4 t2	1:10	0,5138 ± 0,1723	-
	1:100	0,5356 ± 0,1141	+/-
<i>Enterococcus durans</i> ZG1-19	1:10	0,4012 ± 0,339	-
	1:100	0,369 ± 0,2134	-
<i>Enterococcus durans</i> D8	1:10	0,53 ± 0,1034	-
	1:100	0,4087 ± 0,1894	-

- = bakterijski soj ne tvori biofilm; +/- = bakterijski soj slabo tvori biofilm

Soares i sur. (2014) ispitivali su sposobnost formiranja biofilma kod kliničkih izolata *E. faecalis* i *E. faecium* te je istraživanjem ustanovljeno kako sojevi *E. faecalis* imaju veću sposobnost formiranja biofilma. Osim toga, istraživanjem je potvrđeno kako je sposobnost formiranja biofilma multifaktorski proces koji zahtijeva ekspresiju različitih gena. Prema Popović i sur. (2018) 40 % svih ispitivanih sojeva je imalo sposobnost formiranja biofilma, a među njima su prevladavali sojevi *E. durans*. Međutim, u ovom istraživanju samo *E. durans* 4 t2 slabo tvori biofilm. No s obzirom kako su ispitana samo tri sojeva *E. durans*, rezultati se ne mogu usporediti s prijašnjim istraživanjima. Nadalje, ovim istraživanjem je ustanovljeno kako sojevi *E. faecium* L3, *E. faecium* ZG7-10 te *E. faecalis* ZG9-15 imaju najmanju sposobnost formiranja biofilma na polistirenu uz nisku standardnu devijaciju. Nasuprotno, sojevi *E. faecalis* ZG3-6, *E. faecalis* ZG6-53 te *E. faecalis* ZG7-1 imaju najveću sposobnost formiranja biofilma na polistirenu uz relativno visoku standardnu devijaciju. Dobiveni rezultati ukazuju kako učestalost formiranja biofilma ne ovisi

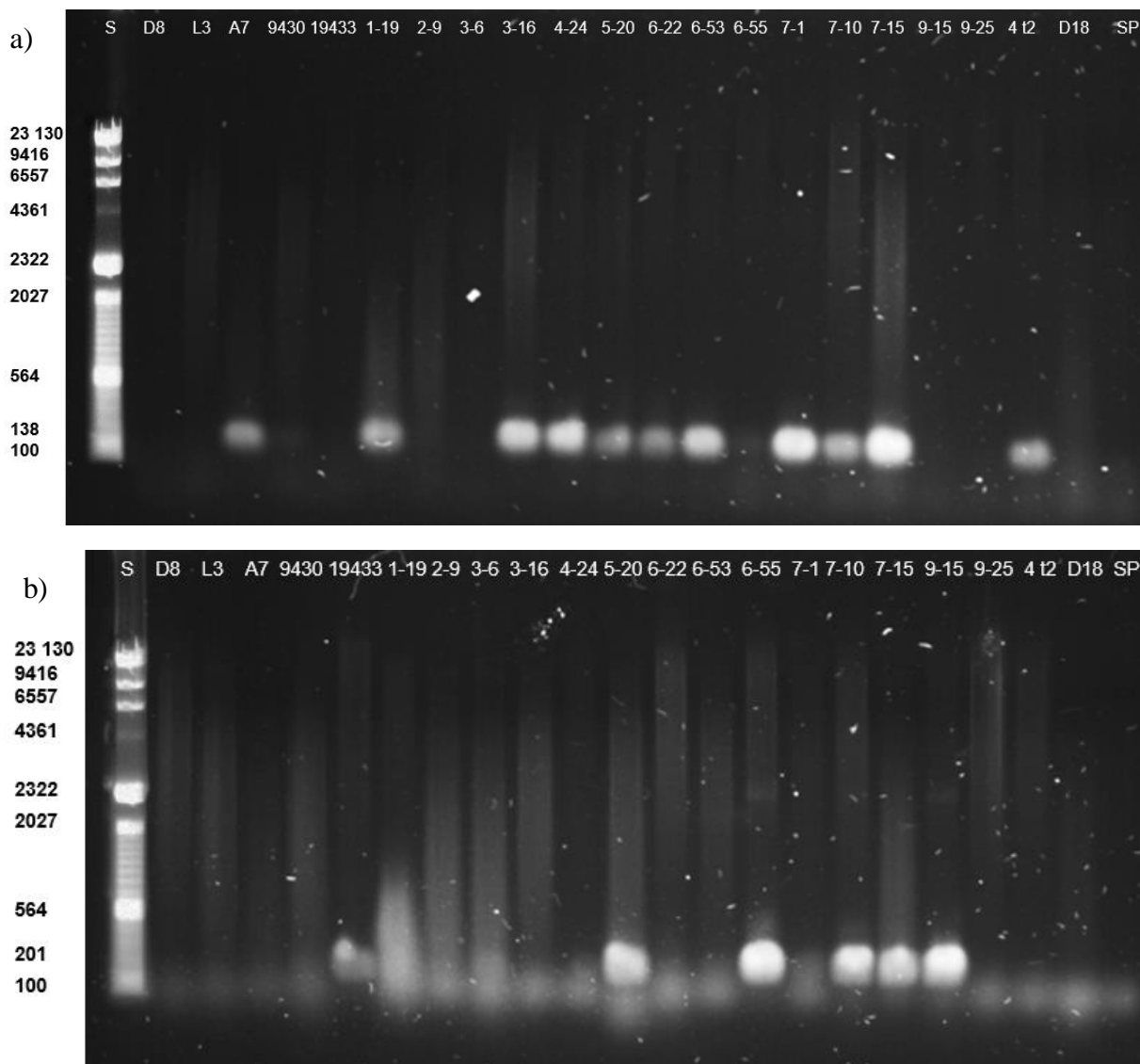
isključivo o soju, već i o drugim faktorima kao što su biotičke i abiotičke površine, količina nutrijenata te prisutnost drugih virulentnih faktora. Iako neki literaturni podaci ukazuju kako je sposobnost formiranja biofilma veća u kliničkim izolatima nego u izolatima hrane (Anderson i sur., 2015), pojedini autori pokazali su kako komenzalni izolati iz ljudskog fecesa imaju veću sposobnost formiranja biofilma nego patogeni sojevi što ukazuje na činjenicu da sposobnost formiranja biofilma više povezana s adhezijskim svojstvima kao važna značajka potrebna za kolonizaciju crijeva (Popović i sur., 2018).

4.2. DETEKCIJA ENTEROCINA *ENTEROCOCCUS* SOJEVA

Enterococcus vrste imaju važnu ulogu u dozrijevanju sireva zbog svojih metaboličkih aktivnosti. *Enterococcus* vrste sintetiziraju nekoliko različitih enzima koji u interakciji s mlijekom mogu potaknuti različite biokemijske transformacije (Giraffa, 2003). Osim toga, mnogi autohtoni *Enterococcus* sojevi su bezopasni i mogu sintetizirati različite vrste bakteriocina, takozvanih enterocina, koji mogu doprinijeti inhibiciji ili usporavanju rasta bakterija *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* i *Clostridium spp.*, uključujući *Clostridium botulinum* and *Clostridium perfringens* tijekom obrade i sazrijevanja sireva (Silva i sur., 2018; Zommiti i sur., 2018; Giraffa, 2003). Osobito *E. faecium*, ima genetske predispozicije za proizvodnju nekoliko različitih bakteriocina kao što su enterocin A, enterocin B i enterocin P koji prema klasifikaciji koju su napravili Franz i sur. (2007) pripadaju grupi II. Istraživanja su pokazala se enterocini A, B i P uobičajeno proizvode pojedinačno ili u kombinaciji te imaju značajnu antimikrobnu aktivnost prema *Listeria spp.* tijekom fermentacije i dozrijevanja različitih sireva (Vandera i sur., 2019). Proizvodnja enterocina u kombinaciji sa širokim rasponom tolerancije na visoke temperature, suhoću i povećanu koncentraciju soli omogućuje *Enterococcus* vrstama preživljavanje pri takvim uvjetima te omogućuju dominaciju *Enterococcus* vrsta u fermentiranim proizvodima (Franz i sur., 2011). Zbog svega navedenog, enterocini i *Enterococcus* vrste koje ih proizvode često su proučavani kako bi se utvrdila njihova potencijalna primjena kao starter kulture za proizvodnju sireva i ostalih mliječnih proizvoda (Giraffa, 2003).

Nakon ispitivanja prisutnosti virulentnih faktora, provedena je PCR metoda (engl. *Polymerase Chain Reaction*) kako bi se utvrdila prisutnost enterocina A i enterocina B u ispitivanim bakterijskim sojevima. Prije same provedbe PCR analize, izolirana je DNA prekonoćne kulture

bakterijskih sojeva te je izmjerena koncentracija DNA kako bi se mogla odrediti koncentracija DNA koja je potrebna za PCR reakciju. Rezultati PCR analize prikazani su na slici 4. Enterocin A koji sadrži 138 pb detektiran je kod sojeva: *E. faecium* A7, ZG3-16, ZG5-20, ZG7-10; *E. faecium/durans* ZG4-24; *E. faecalis* ZG6-22, ZG6-53, ZG7-1, ZG7-15 te *E. durans* ZG1-19 i 4 t2. Enterocin B koji sadrži 201 pb prisutan je kod sojeva *E. faecalis* ATCC 19433, ZG6-55, ZG7-15 i ZG9-15 te *E. faecium* ZG5-20 i ZG7-10.



Slika 4. Elektroforeza produkata dobivenih PCR metodom s a) *entA*-F i *entA*-R početnicama i b) *entB*-F i *entB*-R početnicama

S – standard; D13 - *Lactobacillus plantarum* D13; SP – slijepa proba

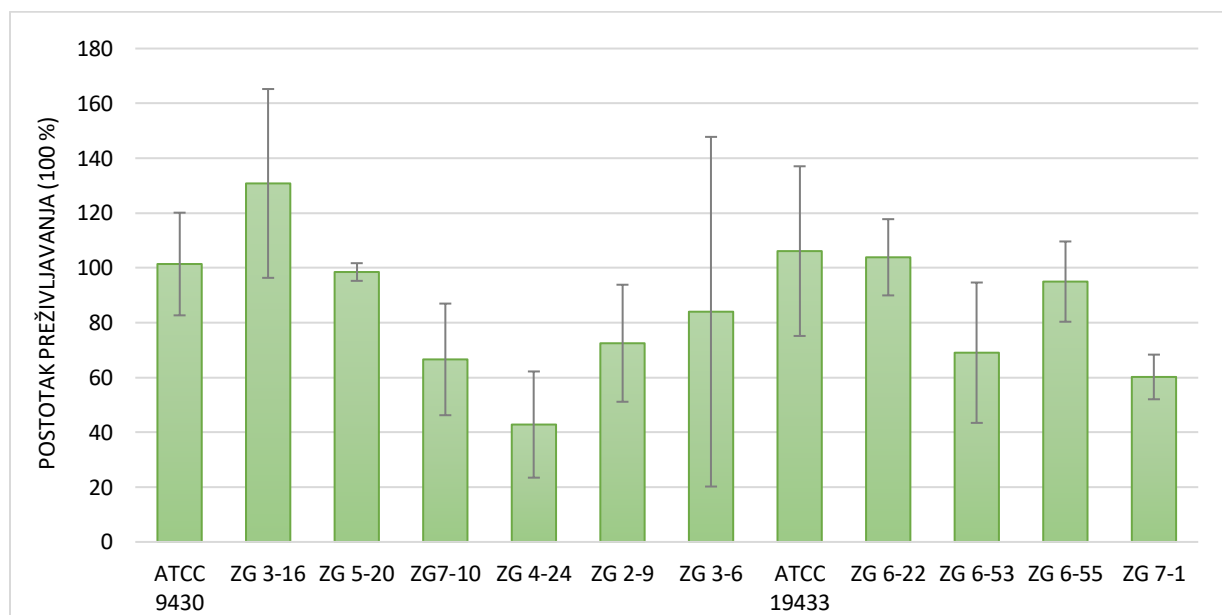
Franz i sur. (1999) navode kako je proizvodnja enterocina B i enterocina A kod *E. faecium* međusobno povezana. To su potvrdili Nami i sur. (2019) koji su izolirali nekoliko različitih *Enterococcus* sojeva iz mliječnih proizvoda te su svi sojevi sadržavali enterocin A i enterocin B. Strukturni gen enterocina A je široko raspostranjen kod sojeva *E. faecium*, dok se gen koji kodira za enterocin B uvijek pojavljuje u prisutnosti enterocina A. To se događa najvjerojatnije zato što nisu otkriveni transportni geni koji kodiraju za proizvodnju enterocina B (De Vuyst i sur., 2003). Međutim, to u ovom slučaju oba enterocina prisutna su samo kod *E. faecium* ZG5-20 i *E. faecium* ZG7-10. Slične rezultate dobili su i Foulquie Moreno i sur. (2003). Ono što je zanimljivo je kako niti u istraživanju koje su proveli Foulquie Moreno i sur. (2003) niti jedan soj *E. faecalis* ne sadrži oba enterocina dok s druge strane, u ovom istraživanju uočeno je kako soj *E. faecalis* ZG7-15 sadrži oba enterocina.

Iako sojevi *E. faecium* ZG5-20 i *E. faecalis* ZG7-15 sadrže enterocin A i enterocin B te imaju sposobnost formiranja biofilma, soj *E. faecium* ZG7-10 je zanimljiv upravo zato što su detektirane vrlo niske vrijednosti OD₆₂₀, a sintetizira oba enterocina. Novak i sur. (2022) u svojem istraživanju ispitivali su svojstva BMK te je soj *E. faecium* ZGZA7-10 pokazao najveću proteaznu aktivnost među ispitivanim izolatima. Osim toga, Novak i sur. (2022) proveli su sekvencioniranje genoma pomoću WGS pristupa te su rezultati pokazali kako ovaj soj ne sadrži hemolitičku aktivnost te značajke rezistencije na antibiotike. *Enterococcus* sojevi predstavljaju značajan dio autohtone mikrobiote hrvatskih sireva, među kojima prevladavaju vrste *E. faecium* i *E. faecalis* (Golić i sur., 2013). Soj ZGZA7-10 izoliran iz sireva s područja Zagorja, koji kao i drugi sirevi iz Južne Europe mogu sadržavati i do 10⁷ CFU/g *Enterococcus* vrsta nakon dozrijevanja sireva (Novak i sur., 2022). Iako, soj *E. faecium* ZG7-10 nema sposobnost formiranja biofilma, zbog svih do sada istraženih svojstava, ovaj soj može imati potencijalnu primjenu kao starter kultura. Osim toga, potencijalnu primjenu kao starter kulture mogu imati *E. faecium* ZG5-20 i *E. faecalis* ZG7-15 te izolati koji su tijekom istraživanja sadržavali barem jedan gen za enterocine te su imali sposobnosti formiranja biofilma. U daljnjim istraživanjima trebalo bi ispitati i ostala svojstva ovih sojeva, kao što su rezistencija na antibiotike, proteolitička aktivnost te prisutnost drugih virulentnih faktora.

4.3. LIOFILIZACIJA *Enterococcus* SOJEVA

Liofilizacija se često upotrebljava za smrzavanje BMK koje se koriste kao starter kulture u prehrambenoj i mliječnoj industriji. Liofilizacijom se sprječava kontaminacija starter kultura, produžava se vijek trajanja mikroorganizama te je jednostavnije skladištenje i distribucija sojeva (Zhan i sur., 2012).

Odabrani su sojevi koji imaju sposobnost formiranja biofilma i/ili imaju gene koji kodiraju za enterocin A i enterocin B te je ispitano njihovo preživljavanje tijekom liofilizacije. Izračunata je uspješnost liofilizacije te su rezultati istraživanja prikazani su na slici 6.



Slika 5. Preživljavanje *Enterococcus* sojeva nakon procesa liofilizacije uz dodatak obranog mlijeka kao lioprotektora

Sojevi *E. faecium* ATCC 9430 i ZG3-16 te *E. faecalis* ATCC 19433 i ZG 6-22 imaju vrijednosti preživljavanja veće od 100 %. Peiren i sur. (2015) proveli su liofilizaciju s različitim lioprotektorima te je preživljavanje bakterije *Xanthomonas fragariae* DSM 3587^T u obranom mlijeko bilo 109 % što upućuje kako je smrtnost stanica bila mala te se radi o dobrom lioprotektoru. S druge strane, *E. faecium/durans* ZG4-24 imao je preživljavanje 43 % što upućuje na činjenicu kako je smrtnost stanica bila velika.

Provedba odgovarajuće analize rizika i koristi, utvrđivanje sigurnosti primjene soja i razmatranje relevantnih smjernica, zakonodavstva i regulatornih aspekata koji okružuju razvoj funkcionalne hrane, može pomoći industriji, zdravstvenom osoblju i potrošačima da prihvate bakterije iz roda *Enterococcus*, kao i druge BMK, kao važne kandidate za korisne primjene u biotehnologiji i prehrambenoj industriji hrane.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata ovog rada može se zaključiti sljedeće:

1. Odsutnost virulentnih faktora želatinaze i citolizina kod ispitivanih *Enterococcus* ukazuje na činjenicu kako su virulentni faktori rjeđe prisutni kod bakterijskih sojeva izoliranih iz hrane nego kod kliničkih izolata.
2. Sposobnost formiranja biofilma *Enterococcus* sojeva nije funkcija virulentnih svojstava, već je rezultat probiotičkih svojstava te je više povezana s kolonizacijom crijeva.
3. Iako je sinteza enterocina B najčešće povezana sa sintezom enterocina A, samo su sojevi *E. faecium* ZG5-20, *E. faecium* ZG7-10 i *E. faecalis* ZG7-15 sadržavali gene za enterocin A i enterocin B.
4. *Enterococcus* vrste izolirane iz mikrobiote sira sadrže potencijalno važna tehnološka svojstva kao što su formiranje biofilma i proizvodnja bakteriocina te je u budućnosti potrebno istražiti mogućnost njihove primjene kao starter kulture.

6. LITERATURA

- Anderson AC, Jonas D, Huber I, Karygianni L, Wölber J, Hellwig E i sur. (2015) *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Front Microbiol* **6**, 1534. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01534>
- Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciolam CR i sur. (2001) *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med Microbiol Immunol* **190**, 113–120. <https://doi.org/10.1007/s00430-001-0096-8>
- Bybee S, Scorza A, Lappin M (2011) Effect of the probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on presence of diarrhea in cats and dogs housed in an animal shelter. *J Vet Intern Med* **25**, 856–860. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x>
- Cebrián R, Baños A, Valdivia E, Pérez-Pulido R, Martínez-Bueno M, Maqueda M (2012) Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48- producer strain. *Food Microbiol* **30**, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.12.002>
- Chung JH, Ootoguro M, Yanagida F, Wu HC, Chang YC, Lee YS, Chen YS (2022) *Enterococcus alishanensis* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from fresh coffee beans. *Int J Syst Evol Microbiol* **72**. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005255>
- Cruz T, Torres JM (2012) Gelatin hydrolysis test protocol. ASM-American Society for Microbiology, <https://asm.org/Protocols/Gelatin-Hydrolysis-Test-Protocol>. Pristupljeno 27. ožujka 2022.
- De Vuyst L, Moreno MRF, Revets H (2003) Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *Int J Food Microbiol* **84**, 299 – 318. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00425-7](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00425-7)
- Domann E, Hain T, Ghai R, Billion A, Kuenne C, Zimmermann K, Chakraborty T (2007) Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int J Med Microbiol* **297**, 533–539. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.02.008>

- Eaton T J, Gasson M J (2001) Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1628–1635. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1628-1635.2001>
- Egan K, Field D, Rea MC, Ross RP, Hill C, Cotter PD (2016) Bacteriocins: novel solutions to age old spore-related problems? *Front Microbiol* **7**, 461. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00461>
- European Food Safety Authority - EFSA (2012) Scientific Opinion on Lactiferm® (*Enterococcus faecium*) as a feed additive for weaned piglets and calves. *EFSA J* **10**, 2574. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2574>
- European Food Safety Authority - EFSA (2015) Scientific opinion on the safety and efficacy of Cylactin® (*Enterococcus faecium* NCIMB 10415) as a feed additive for pigs for fattening, piglets and sows. *EFSA J* **13**, 4158. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4158>
- Extremina C, Costa L, Aguiar A, Peixe L, Fonseca A (2011) Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitre-plates. *J Microbiol Methods* **84**, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.11.007>
- Foulquie Moreno MR, Callewaert R, Devreese B, Van Beeumen J, De Vuyst L (2003) Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *J Appl Microbiol* **94**, 214–229. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01823.x>
- Franz CM, Holzapfel W (2004) The Genus *Enterococcus*: Biotechnological and Safety Issues. U: Salminen S, von Wright A (ured.) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3 izd., CRC Press, Boca Raton, str. 199-231.
- Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A (2011) *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* **151**, 125-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.014>
- Franz CM, van Belkum MJ, Holzapfel W, Abriouel H, Gálvez A (2007) Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 293-310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>
- Franz CM, Worobo RW, Quadri LEN, Schillinger U, Holzapfel WH, Vederas JC, Stiles ME (1999) A typical genetic locus associated with constitutive production of enterocin B by

Enterococcus faecium BFE 900. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2170–2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.5.2170-2178.1999>

Fritzenwanker M, Kuenne C, Billion A, Hain T, Zimmermann K, Goesmann A i sur. (2013) Complete Genome Sequence of the Probiotic *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 Clone DSM 16431. *Genome Announc* **1**, e00165-12. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00165-12>

Fugaban JIII, Holzapfel WH, Todorov SD (2021) Probiotic potential and safety assessment of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* strains with antibacterial activity against *Listeria* and vancomycin-resistant enterococci. *CRMICR.* **2**, 100070. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100070>

Gaca AO, Lemos JA (2019) Adaptation to Adversity: The Intermingling of Stress Tolerance and Pathogenesis in *Enterococci*. *Microbiol Mol Biol Rev* **83**, e00008-19. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00008-19>

García-Solache M, Rice LB (2019) The *Enterococcus*: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clin Microbiol Rev* **32**, e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>

Gilmore MS, Coburn PS, Nallapareddy SR, Murray BE (2014) *Enterococcal* Virulence. U: Gilmore MS, Clewell DB, Courvalin P, Dunny GM, Murray BE (ured.) *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance*, ASM press, Washington DC, str. 301–354. <https://doi.org/10.1128/9781555817923.ch8>

Giraffa G (1995) Enterococcal bacteriocins: their potential as antiListeria factors in dairy technology. *Food Microbiol* **12**, 291 – 299. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(95\)80109-X](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(95)80109-X)

Giraffa G (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *Int J Food Microbiol* **88**, 215-222. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(03\)00183-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(03)00183-1)

Golić N, Čadež N, Terzić-Vidojević A, Šuranská H, Beganović J, Lozo J i sur. (2013) Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *Int J Food Microbiol* **166**, 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032>

- Gupta A, Tiwari SK (2015) Probiotic potential of bacteriocin-producing *Enterococcus hirae* strain LD3 isolated from dosa batter. *Ann Microbiol* **65**, 2333–2342. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1075-4>
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R (2018) The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Front Microbiol* **9**, 1791. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01791>
- Holzappel WH, Arini A, Aeschbacher M, Coppolecchia R, Pot B (2018) *Enterococcus faecium* SF68 as a model for efficacy and safety evaluation of pharmaceutical probiotics. *Benef Microbes* **9**, 375–388. <https://doi.org/10.3920/bm2017.0148>
- Kim SM, Byeon YS, Yang HL, Kim IS, Lee SD (2022) *Vagococcus allomyrinae* sp. nov. and *Enterococcus larvae* sp. nov., isolated from larvae of *Allomyrina dichotoma*. *Int J Syst Evol Microbiol* **72**. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.005382>.
- Krawczyk B, Wityk P, Gałęcka M, Michalik M (2021) The Many Faces of *Enterococcus* spp.—Commensal, Probiotic and Opportunistic Pathogen. *Microorganisms* **9**, 1900. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091900>
- Krawczyk B, Lewandowski K, Bronk M, Samet A, Myjak PS, Kur J (2003) Evaluation of a novel method based on amplification of DNA fragments surrounding rare restriction sites (ADSRRS fingerprinting) for typing strains of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *J Microbiol Methods* **52**, 341–351. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00187-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00187-2)
- Kulikov MP, Statsenko VN, Prazdnova EV, Emelyantsev SA (2022) Antioxidant, DNA-protective, and SOS inhibitory activities of *Enterococcus durans* metabolites. *Gene Rep* **27**, 101544. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101544>
- Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS (2014) *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. U: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N (ured). *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet], Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/>. Pristupljeno 14. kolovoza 2022.

- Martinez JL (2014) Short-sighted evolution of bacterial opportunistic pathogens with an environmental origin. *Front Microbiol* **5**, 239. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00239>
- Mohamed JA, Huang DB (2007) Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol* **56**, 1581–1588. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47331-0>
- Mokoena MP (2017) Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* **22**, 1255. <https://doi.org/10.3390/molecules22081255>
- Mu C, Yang Y, Zhu W (2016) Gut microbiota: The brain peacekeeper. *Front Microbiol* **7**, 345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00345>
- Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE (2000) *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infect Immun* **68**, 5218–5224. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.9.5218-5224.2000>
- Nallapareddy SR, Weinstock GM, Murray BE, (2003) Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* **47**, 1733–1747. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03417.x>
- Nami Y, Bakhshayesh, RV, Jalay HM, Lotfi H, Eslami S, Hejazi MA (2019) Probiotic Properties of *Enterococcus* Isolated From Artisanal Dairy Products. *Front Microbiol* **10**, 300. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00300>
- Nami Y, Haghshenas B, Haghshenas M, Abdullah N, Khosroushahi AY, (2015) The Prophylactic effect of probiotic *Enterococcus lactis* IW5 against different human cancer cells. *Front Microbiol* **6**, 1317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01317>
- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V, Holo H (1996) Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **70**, 113–128. <https://doi.org/10.1007/BF00395929>
- Novak J, Butorac K, Leboš Pavunc A, Banić M. Butorac A Lepur i sur. (2022) A Lactic Acid Bacteria Consortium Impacted the Content of Casein-Derived Biopeptides in Dried Fresh Cheese. *Molecules* **27**, 160. <https://doi.org/10.3390/molecules27010160>

- Peiren J, Buyse J, De Vos P, Lang E, Clermont D, Hamon, S i sur. (2015) Improving survival and storage stability of bacteria recalcitrant to freeze-drying: a coordinated study by European culture collections. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**, 3559–3571. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6476-6>
- Pieniz S, de Moura TM, Cassenego APV, Andrezza R, Frazzon APG, Camargo FA, i sur. (2015) Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. *Food Control* **51**, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.012>
- Popović N, Dinić M, Tolinački M, Mihajlović S, Terzić-Vidojević A, Bojić S i sur. (2018) New Insight into Biofilm Formation Ability, the Presence of Virulence Genes and Probiotic Potential of *Enterococcus* sp. Dairy Isolates. *Front Microbiol* **9**, 78. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.012>
- Ramos S, Silva V, Dapkevicius MdLE, Igrejas G, Poeta P (2020) *Enterococci*, from Harmless Bacteria to a Pathogen. *Microorganisms* **8**, 1118. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081118>
- Rahman IR, Sanchez A, Tang W, van der Donk WA (2021) Structure-Activity Relationships of the *Enterococcal* Cytolysin. *ACS Infect Dis* **7**, 2445-2454. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00197>
- Rendueles C, Duarte AC, Escobedo S, Fernandez L, Rodriguez A, Garcia P, Martinez B (2022) Combined use of bacteriocins and bacteriophages as food biopreservatives. *Int J Food Microbiol* **368**, 109611. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109611>
- Silva N, Igrejas G, Gonçalves A, Poeta P (2012) Commensal gut bacteria: Distribution of *Enterococcus* species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. *Ann Microbiol* **62**, 449–459. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0308-4>
- Soares R, Fedi AC, Reiter K, Caierão J, D'Azevedo P (2014) Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* **5**, 634–637. <https://doi.org/10.4161/viru.28998>
- Terzić-Vidojević A, Veljović K, Begović J, Filipić B, Popović D, Tolinački M I sur. (2015) Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy *enterococci* isolates: are they safe

candidates for autochthonous starter cultures? *Front Microbiol* **6**, 954. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00954>

van Belkum MJ, Stiles ME (2000) Nonantibiotic antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Nat Prod Rep* **17**, 323–365. <https://doi.org/10.1039/a801347k>

Vandera E, Parapouli M, Kakouri A, Koukkou A-I, Hatziloukas E, Samelis J (2019) Structural enterocin gene profiles and mode of antilisterial activity in synthetic liquid media and skim milk of autochthonous *Enterococcus* spp. isolates from artisan Greek Graviera and Galotyri cheeses. *Food Microbiol* **86**, 103335. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103335>

Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM (2003) Role of the *E. faecalis* GeIE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. *J Bacteriol Res* **185**, 3613–3623. <https://doi.org/10.1128/JB.185.12.3613-3623.2003>

Zhan Y, Xu Q, Yang MM, Yang HT, Liu HX, Wang YP, Guo JH (2012) Screening of freeze-dried protective agents for the formulation of biocontrol strains, *Bacillus cereus* AR156, *Burkholderia vietnamiensis* B418 and *Pantoea agglomerans* 2Re40. *Lett Appl Microbiol* **54**, 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03165.x>

Zommiti M, Cambronel M, Maillot O, Barreau M, Sebei K, Feuilloley M i sur. (2018) Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal Tunisian meat “Dried Ossban”. *Front Microbiol* **9**, 1685. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01685>

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Amalija Blagajac izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


Vlastoručni potpis