

# Otpornost na antimikrobne lijekove izolata mliječnokiselinskih bakterija izoliranih tijekom proizvodnje tvrdog ovčjeg sira

---

Horvat, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:867681>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -  
Repository of PHD, master's thesis](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
VETERINARSKI FAKULTET

SVEUČILIŠNI INTEGRIRANI PRIJEDIPLOMSKI I DIPLOMSKI  
STUDIJ *VETERINARSKA MEDICINA*

DIPLOMSKI RAD

Ena Horvat

OTPORNOST NA ANTIMIKROBNE LIJEKOVE IZOLATA MLIJEČNOKISELINSKIH  
BAKTERIJA IZOLIRANIH TIJEKOM PROIZVODNJE TVRDOG OVČJEG SIRA

Zagreb, 2024.

Ena Horvat

Odjel za veterinarsko javno zdravstvo i sigurnost hrane

Zavod za higijenu, tehnologiju i sigurnost hrane

Predstojnica Zavoda:

prof. dr.sc. Željka Cvrtila

Mentor:

prof. dr. sc. Nevijo Zdolec

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. doc. dr. sc. Tomislav Mikuš
2. prof. dr. sc. Željka Cvrtila
3. prof. dr. sc. Nevijo Zdolec
4. prof. dr. sc. Vesna Dobranić (zamjena)

Rad sadržava 32 stranice, 6 slika, 3 tablice, 44 literaturnih navoda.

## ZAHVALA

*Prije svega, zahvaljujem se svojem mentoru prof. dr. sc. Neviju Zdolecu na velikoj pomoći tijekom provođenja istraživanja i pisanja diplomskog rada. Hvala Vam na svom izdvojenom vremenu i prenesenom znanju. Zahvaljujem se i Agronomskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji je omogućio sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta „Potencijal mikroinkapsulacije u proizvodnji sireva“ KK. 01.1.1.04.0058 (voditeljica izv. prof. dr. sc. Nataša Mikulec), kao i Veterinarskom fakultetu kroz projekt “Unapređenje stručne prakse na farmskim životinjama i konjima na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu – VETFARM“ (UP.03.1.1.04.0045)..*

*Veliko hvala mojem zaručniku i kolegi Zvonimiru, bez koga ovaj fakultet ne bih privela kraju. Želim ti se zahvaliti što si bio moja najveća podrška tokom ovog studijskog puta. Tvoja nesebična podrška, strpljenje i ljubav su mi mnogo značili. Zbog tebe sam bila jača i motiviranija. Volim te i radujem se svemu što nas čeka!*

*Zahvaljujem se i svojim kolegicama i prijateljicama. Bez vas bi ovaj put bio mnogo teži. Zajedno smo se smijale, plakale i prolazile kroz sve izazove. Vaša prisutnost mi je značila više nego što možete zamisliti. Radujem se svim našim budućim avanturama!*

*Hvala mojim sestrama Emmi i Steli na pruženoj podršci tokom studiranja. Cijenim svaki trenutak koji smo provele zajedno.*

*I na kraju hvala mojim roditeljima, Danijeli i Tomislavu koji su mi omogućili ovo studiranje i bili podrška tokom cijelog studija. Bez vas ne bih mogla doći ovako daleko.*

## POPIS PRILOGA

Slika 1. Paška ovca; izvor: <https://www.ovce-koze.hr/ovcarstvo-kozarstvo/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/pasmine-ovaca/paska-ovca/>

Slika 2. Gruš za „Paški sir“; izvor: <https://gligora.com/sirana/proizvodnja-sireva/nasa-sirana-i-tehnologija>

Slika 3. Paški sir; snimio: Fabijan Oštarić, projekt Sir je IN

Slika 4. Princip očitavanja MIC vrijednosti E-testom (snimila: Marta Kiš, dr.med.vet.)

Slika 5a. Prikaz MALDI TOF masenih spektara identificiranih vrsta BMK

Slika 5b. Prikaz MALDI TOF masenih spektara identificiranih vrsta BMK

Tablica 1. Minimalne inhibicijske koncentracije (mg/L) odabranih antibiotika za BMK (prilagođeno prema EFSA, 2018.)

Tablica 2. Rezultati identifikacije bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje Paškog sira

Tablica 3. MIC vrijednosti antibiotika u inhibiciji rasta bakterija mliječne kiseline iz lanca proizvodnje Paškog sira

## KRATICE

AMR – antimikrobna rezistencija

BMK – bakterije mliječne kiseline

DGGE – (engl. *Denaturing gradient gel electrophoresis*), elektroforeza u gelu s gradijentom denaturacije

DNA – (engl. *deoxyribonucleic acid*), deoksiribonukleinska kiselina

EFSA – (engl. *European Food Safety Authority*), Europska agencija za sigurnost hrane

HGT – (engl. *horizontal gene transfer*)- horizontalni prijenos gena

MALDI TOF MS – (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), Matricom potpomognuta ionizacija laserskom desorpcijom Vrijeme proleta  
Spektrometrija masa

MIC – (engl. *Minimal Inhibitory Concentration*), minimalna inhibicijska koncentracija

MRS agar – De Man-Rogosa-Sharpe agar

PCR – (engl. *Polymerase Chain Reaction*), lančana reakcija polimeraze

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	3
2.1. Proizvodnja Paškog sira.....	3
2.2. Bakterije mliječne kiseline u ovčjem mlijeku i sirevima .....	6
2.3. Otpornost bakterija mliječne kiseline na antibiotike .....	8
2.3.1. Otpornost bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg mlijeka i sireva na antibiotike .....	9
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	11
3.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje Paškog sira .....	11
3.2. Identifikacija izolata MALDI-TOF masenom spektrometrijom .....	11
3.3. Odabir izolata bakterija mliječne kiseline za određivanje otpornosti na antimikrobne tvari .....	12
3.4. Testiranje osjetljivosti bakterija mliječne kiseline na antimikrobne tvari .....	12
<b>4. REZULTATI</b> .....	15
<b>5. RASPRAVA</b> .....	20
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	24
<b>7. LITERATURA</b> .....	25
<b>8. SAŽETAK</b> .....	30
<b>9. SUMMARY</b> .....	31
<b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....	32

## 1. UVOD

„Paški sir“ je najcjenjeniji i najpoznatiji tvrdi ovčji sir u Hrvatskoj, često nazivan i „paškim parmezanom“. Proizvodi se od mlijeka paške ovce koja se hrani na pašnjacima bogatim raznim vrstama ljekovitog i aromatičnog bilja, što rezultira sirom karakterističnog pikantnog okusa i ugodnog mirisa. Sir se izrađuje od sirovog i/ili pasteriziranog ovčjeg mlijeka, a prirodnu mikrofloru mlijeka većinski čine heterogene vrste bakterija mliječne kiseline (BMK). Dominacija određenih vrsta BMK u procesu proizvodnje „Paškog sira“ ovisi o temperaturi obrade sirovog grušta i uvjetima zrenja, što uvelike utječe na kvalitetu sira. BMK iniciraju složene biokemijske reakcije koje su ključne za razvoj specifičnih organoleptičkih svojstava ovog sira (BARAĆ i sur., 2008.; OŠTARIĆ i sur., 2022.).

Autohtona mikrobiota odnosno BMK do sada nisu istraživane u kontekstu lanca proizvodnje tradicijskog Paškog sira. Identifikaciju laktobacila u siru provela je JENSERLE (2012.) primjenom PCR metode te izvjestila o tri identificirane vrste: *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus paracasei* (danas *Levilactobacillus brevis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lacticaseibacillus paracasei*). Pored toga, prema našim saznanjima nije istražen ni profil antimikrobne rezistencije u tom tipu proizvodnje. Preispitivanje uloge BMK, uključivo enterokoka, u horizontalnom prijenosu gena rezistencije važno je za sigurnost fermentirane hrane čiji doprinos ovom javnozdravstvenom problemu tek treba procijeniti (WOLFE, 2023.). S obzirom da se BMK generalno smatraju tzv. dobrim bakterijama (probiotička svojstva i dr.) rijetko promišljamo o potencijalnim povezanim rizicima, tim više što ih svakodnevno unosimo u velikom broju s premisom njihove dobrobiti za naše zdravlje. Međutim, pod pretpostavkom da je ta prirodna mikrobiota preuzela gene rezistencije od drugih bakterija te potencijalno ih prenosi dalje kroz lanac hrane na (uvjetno) patogene bakterije, daje nam opravdan razlog za oprez (ZDOLEC i sur., 2016.). Problem procjene rizika antimikrobne rezistencije BMK iz hrane životinjskog podrijetla leži i u nedostatku službenih validiranih kriterija (npr. minimalnih inhibicijskih koncentracija; MIC). Najusporedivi i najprimjenjiviji u tu svrhu su kriteriji za procjenu sigurnosti mikroorganizama koji se dodaju u formi dodataka u hranu za životinje, a preporučila ih je Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA, 2018.).

Cilj je ovog diplomskog rada bio izdvojiti i identificirati bakterije mliječne kiseline iz lanca tradicionalne proizvodnje Paškog sira, dakle iz mlijeka ovaca, sirišta janjadi (koristi se za



dobivanje prirodnog sirila), sirnog gruša i sira tijekom zrenja. Također je cilj bio među identificiranim izolatima odabrati sojeve identificiranih vrsta i podvrgnuti ih testiranju osjetljivosti na antibiotike u svrhu preliminarnog uvida u prevalenciju rezistencije u tradicionalnoj proizvodnji Paškog sira.

## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Proizvodnja Paškog sira

Proces proizvodnje sira je složen, a njegova kvaliteta i jedinstvenost ovise o nizu čimbenika. Među važnim čimbenicima koji pridonose jedinstvenosti konačnog proizvoda, sira, svakako su sastav i karakteristike sirovog mlijeka, koje su uvelike određene genetikom životinja uključenih u njegovu proizvodnju. Stoga genetika određene jedinke ili pasmine predstavlja jedan od ključnih elemenata za uspješnu proizvodnju autohtonih mliječnih proizvoda, koji se često komercijalno povezuju sa zaštićenom oznakom izvornosti. Istovremeno, utjecaj genetike životinja na kvalitetu i posebnost sira skladno se uklapa u koncept održivog stočarstva i očuvanja raznolikosti domaćih životinja i mliječnih proizvoda (OŠTARIĆ i sur., 2022.).



Slika 1. Paška ovca; izvor: <https://www.ovce-koze.hr/ovcarstvo-kozarstvo/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/ovcarstvo-i-kozarstvo-u-rh/pasmine-ovaca/paska-ovca/>

„Paški sir“ je sir koji se proizvodi isključivo na području otoka Paga, Skrda i Mauna. Pod pojmom „Paški sir“ podrazumijeva se tvrdi ovčji sir od punomasnog mlijeka pasmine paške ovce

(Slika 1). Prema literaturi paška ovca je „nastala“ 1870. godine (BARAĆ i sur., 2008.). „Paški sir“ se može prepoznati po svom niskom cilindričnom obliku, ravnom do lagano konveksnom plaštu te relativno maloj masi do 3,5 kg. Tvrde i glatke je kore te zlatnožute do svijetlocrvenkasto-smeđe boje. Paški sir nalazi se u skupini ekstra tvrdih, punomasnih sireva koji zriju najmanje 6 mjeseci (UDRUGA PROIZVOĐAČA PAŠKOG SIRA OTOKA PAGA, 2018.). Zreli Paški sir pikantnog je okusa i oštrog okusa i mirisa po ovčijem mlijeku. Prosječno se dobije 15 do 17 kilograma Paškog sira od 100 L ovčjeg mlijeka. Smatra se kako je Paški sir jedan od najpoznatijih autohtonih sireva u Hrvatskoj (TRATNIK, 1998.).

U prošlosti Paški sir proizvodio se na dva načina, „na ruke“ i „na formu“. Paški sir „na ruke“ najčešće se proizvodio na istočnoj strani otoka dalje od Poveljane. Sir „na ruke“ proizvodio se kraj ognjišta. Upotrebljavalo se tvorničko sirilo koje se stavljalo u mlijeko koje se sirilo sat vremena. Nakon sirenja se rajseče i dobro „kalatačom“ istuče, zatim se sirina skuplja u grudu stišćući ju nekoliko minuta prema dnu. Gruda se stavlja u drveni kalup u koji se najprije stavi krpa. Gruda se gnječi rukama, a zatim se na sir stavlja daščica, a na daščicu kamen koji ostane na siru do sutra. Sir se soli dvaput, prvi put 4 do 5 sati nakon pravljenja sira, a drugi put nakon 24 sata. Sir dok zrije okreće se svaki dan i nekoliko puta se opere u morskoj vodi. Sir se stavlja u prodaju najčešće nakon mjesec dana zrenja. Takav sir nije bio punomasan, te je nakon nekoliko mjeseci zrenja bio dosta suh, što ga je činilo izvrsnim sirem za struganje (BAKOVIĆ, 1961.).

Način pravljenja sira „na formu“ je zapravo sir koji se pravio uz pomoć limenih kalupa. Na taj način su pravili sir u razvijenijim dijelovima otoka, oko Novalje i Kolana. Mlijeko se podsiravalo sa sirilom u prahu na 35 °C. Nakon 45 minuta mlijeko se koagulira. Zatim se gruš usitni na veličinu zrna riže uz pomoć „kalatače“ i dogrije na 45 °C. Nakon 10 minuta sušenja sira, dok se dobro istaložila sirutka, sir se mješa 2 do 3 minute, vadi se u lub u sirnu krpu i preša kamenom. Sir se soli dvaput, isti dan i dan poslije, a okreće se nekoliko puta i mijenja mu se sirna krpa. Sir zrije obično mjesec dana prije prodaje, prvo se 10 dana drži na dasci, a kasnije se stavlja u sobu ili konobu gdje je hladnija temperatura, oko 20 °C (BAKOVIĆ, 1961.).

U današnje vrijeme „Paški sir“ proizvodi se od termički obrađenog ili sirovog mlijeka. Dodatci koje je dozvoljeno koristiti su kalcijev klorid, mliječne starterske kulture i lizozim. Mlijeko se siri tijekom 40 do 60 minuta pri 30 do 33 °C. Nakon sirenja dobiva se gruš koji se reže na jednolična zrna veličine pšenice (Slika 2). Zatim slijedi mješanje gruša koji se dogrijava pri 38 do 45 °C tijekom 10 do 30 minuta. Nakon cijedenja gruša i njegovog odvajanja od sirutke, sir se

stavlja na prešanje u kalupe tijekom najkraće 90 minuta. Neposredno prije prešanja na sir se postavlja numerirana kazeinska pločica sa jedinstvenim brojem „koluta“ sira i zajednički znak „Paški sir“. Nakon prešanja sir se stavlja u salamuru slanosti 18 do 24 °Bè tijekom 12 sati. Potom se stavlja na zrenje u prostoriju tijekom 60 dana u kojoj je relativna vlažnost zraka 60-90 %, temperatura zraka 10-20 °C. Tijekom zrenja sir se po potrebi četka te pere salamutom, vodom ili sirutkom, te 4 do 6 puta premazuje uljima biljnog podrijetla. „Paški sir“ se najčešće na tržištu nalazi u cjelovitom obliku (Slika 3), veći kolotovi sira mogu se rezati u komade i potom vakimirati, a sirevi koji zriju više od 12 mjeseci na tržište se mogu stavljati i u naribanom obliku. Ribanjem i rezanjem sira gubi se njegova autentičnost i kvaliteta, te je teže pratiti sljedivost takvog sira jer više nije vidljiv serijski broj kazeinske pločice (UDRUGA PROIZVOĐAČA PAŠKOG SIRA OTOKA PAGA, 2018.).



Slika 2. Gruš za „Paški sir“;

izvor: <https://glogora.com/sirana/proizvodnja-ireva/nasa-sirana-i-tehnologija>



Slika 3. Paški sir; snimio: Fabijan Oštarić, projekt Sir je IN

## 2.2. Bakterije mliječne kiseline u ovčjem mlijeku i sirevima

Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivni, nesporulirajući, anaerobni koki ili štapići koji proizvode mliječnu kiselinu kao jedan od produkata fermentacije ugljikohidrata (LATHINEN i sur., 2012.). Bogat izvor korisnih mikroba, poput bakterija mliječne kiseline s probiotičkim svojstvima, predstavljaju sirovo mlijeko i sirevi od sirovog, nepasteriziranog mlijeka (OŠTARIĆ i sur., 2022.). Dijelimo ih na homofermentativne (produkt fermentacije je mliječna kiselina) i heterofermentativne vrste (uz mliječnu kiselinu, produkti su i octena kiselina, alkohol, CO<sub>2</sub> i dr.) (HEROUT, 2018.). Bakterije mliječne kiseline koriste se za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i sireva te ih ubrajamo u korisne bakterije (TRATNIK, 1998.). Nalazimo ih primjerice u fermentiranim mesnim proizvodima, u mlijeku i fermentiranim mliječnim proizvodima, kruhu od kiselog tijesta ili fermentiranom povrću. Također se prirodno nalaze u probavnom sustavu ljudi i životinja. Bakterije mliječne kiseline također se koriste i kao probiotičke kulture kako bi poboljšale zdravlje ljudi i životinja (KORHNEN, 2010.).

U sirovom mlijeku je njihov broj vrlo promjenjiv i vjerojatno ovisi o fazi proizvodnog lanca te o mjestu i vremenu prikupljanja (OŠTARIĆ i sur., 2022.). Ovčje mlijeko sadrži mnogo veći broj mikroorganizama u odnosu na kravlje mlijeko, a uzrok tome je način držanja, mužnje i hranidbe. U ovčjem mlijeku nalazimo poželjne mikroorganizme koji su tehnološki prihvatljivi u proizvodnji

mliječnih proizvoda (*Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp.), te nepoželjne mikroorganizme koji mogu prouzročiti greške u fermentaciji i zrenju, ali i uzrokovati oboljenja ljudi (ANTUNAC i HAVRANEK LUKAČ, 1999.). Uz laktobacile i laktokoke pronalazimo i enterokoke koje čini 58 vrsta i 2 podvrste (PANDOVA i sur., 2024.). Enterokoki su prisutni u sadržaju crijeva ljudi i domaćih životinja, te su često pokazatelji fekalnog onečišćenja (TEUBER i sur., 1999.). Enterokoki se unutar skupine BMK smatraju vrlo kontroverznim bakterijama te se često nazivaju bakterijama na granici sigurnosti hrane. Putem probavnog sustava ili kontaminiranog okoliša, enterokoki koloniziraju sirovine, uključujući mlijeko, gdje tijekom procesa fermentacije preživljavaju i razmnožavaju se. Enterokoki mogu biti od velike važnosti za razvoj specifičnih senzornih svojstava u siru, ali njihova otpornost na sol, visoke temperature i nizak pH može doprinjeti njihovom pretjeranom rastu i kvarenju hrane (ZDOLEC i KIŠ, 2022.). Sirovo mlijeko i meso, te fermentirani proizvodi od sirovog mlijeka gotovo uvijek sadrže enterokoke, ponajprije *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* (TEUBER i sur., 1999.).

Sastav mikrobiote sirovog ovčjeg mlijeka bio je predmet brojnih istraživanja u različitim podnebljima, pri čemu je korištena klasična i suvremena metodologija identifikacije pa se pri usporedbi takvih rezultata istraživanja to treba uzimati u obzir. Primjerice MALDI TOF masenom spektrometrijom QUINTANA i sur. (2020.) pronalaze 21 vrstu bakterija mliječne kiseline među 703 odabrane kolonije s MRS agara. Prevladavajući rod je bio *Lactobacillus* (74 %), a vrste *Lactobacillus pentosus/plantarum/paraplantarum* (32,4 % svih izolata). Ostale BMK koje su identificirane su *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus mundtii*, *Weissella confusa*, *Weissella paramesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus gallolyticus* i *Streptococcus infantarius*. PATIL i sur. (2019.) su iz ovčjeg mlijeka sekvenciranjem 16S rRNA identificirali tek četiri vrste među izolatima s MRS agara i to *L. plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus* i *Bacillus shackletonii*, a ACURCIO i sur. (2014.) enterokoke; *E. faecium*, *Enterococcus durans* i *E. casseliflavus*. ALEGRIA i sur. (2012.) su pak u poljskom ovčjem siru utvrdili pomoću PCR amplifikacije i DGGE analize prevladavanje vrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (60 % izolata). Drugi prema zastupljenosti bili su laktobacili, uglavnom *L. casei* i *L.*



*plantarum*. Nadalje nekoliko izolata identificirano je iz rodova *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Streptococcus*.

U pogledu tradicionalnog Paškog sira, identifikaciju laktobacila provela je JENSERLE (2012.) primjenom PCR metode te izvjestila o tri identificirane vrste: *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* i *L. paracasei*.

### 2.3. Otpornost bakterija mliječne kiseline na antibiotike

Antimikrobna rezistencija (AMR) je sposobnost bakterija da prežive izloženost definiranoj koncentraciji antibiotika (ACAR i RÖSTEL, 2001.). Antimikrobna rezistencija jedan je od vodećih javnozdravstvenih problema današnjice, a koji se usko veže uz okoliš, domaće životinje, hranu za životinje i hranu životinjskog podrijetla, kao uostalom i za ljude odnosno antimikrobnu terapiju u medicini (ZDOLEC i sur., 2016.).

Pojava otpornosti bakterija na antibiotike usko je vezana uz mehanizam horizontalnog prijenosa gena. Elementi kao što su plazmidi, transpozoni i integroni su ključni elementi u bakterijskom horizontalnom prijenosu gena otpornosti, te su uglavnom odgovorni za prijenos gena unutar ili između bakterijskih vrsta. Također uspješno je testiran i prijenos AMR gena posredovan fagom između različitih enterokoknih vrsta i među različitim sojevima *E. faecalis*. Bakterije mliječne kiseline koje se nalaze u hrani mogle bi biti rezervoar AMR gena za patogene bakterije u ljudi (DEVIRGILLIS i sur., 2013.). Laktokoki i laktobacili pokazuju najveću otpornost unutar BMK na tetracikline, makrolide, glikopeptide, polimiksine (DEVIRGILLIS i sur., 2013.). Prijašnja istraživanja pokazala su kako su enterokoki često nosioci AMR gena te otporni na velik broj antibiotika kao što su penicilin, cefalosporin, vankomicin, streptomycin, eritromicin, fluorokinolon, kloramfenikol, tetraciklin, neomicin, sulfonamidi i trimetoprim, rifampicin i klindamicin (TEUBER i sur., 1999.). Isti autori su utvrdili otpornost laktobacila iz sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda prema tetraciklinu, eritromicinu, penicilinu G, kloksacilinu, streptomycinu, gentamicinu, vankomicinu (intrizično), cefazolinu i kloramfenikolu. Laktokoki su prema istraživanjima rezistentni na većinu klinički važnih antibiotika. *Lc. lactis* subsp. *lactis* pokazuje rezistenciju prema streptomycinu, tetraciklinu, kloramfenikolu (TEUBER i sur., 1999.).

VESKOVIĆ i sur. (2017.) ističu da su bifidobakterije najčešće otporne na vankomicin, streptomycin, kanamicin, gentamicin, trimetoprim, fusidatnu kiselinu, norfloksacin, metronidazol, nalidiksičnu kiselinu, polimiksin B i kolistin; najčešće primarno (prirođena otpornost). Bakterije iz roda *Pediococcus* pokazuju prirodenu otpornost na tetraciklin, streptomycin, kanamicin, glikopeptide, doksiciklin, trimetoprim-sulfametoksazol, ciprofloksacin i sulfametoksazol. Vrsta *P. pentosaceus* je moguć nosioc prenosivih gena rezistencije za eritromicin i tetraciklin. Nadalje, bakterije iz roda *Leuconostoc* pokazuju rezistenciju prema glikopeptidima, metronidazolu, cefoksitinu, nalidiksičnoj kiselini, kanamicinu, gentamicinu, streptomycinu, nitrofurantoinu, trimetoprimu i sulfadiazinu. Prirođena otpornost *Lc. lactis* zabilježena je prema kolistinu, pipemidnoj kiselini, fosfomicinu i rifamicinu. Pojedinačni sojevi *Lc.lactis* rezistentni su i prema kloramfenikolu, streptomycinu, tetraciklinu i eritromycinu. Enterokoki pokazuju sekundarnu (stečenu) otpornost prema kloramfenikolu, klindamicinu, eritromycinu, aminoglikozidima,  $\beta$ -laktamima, tetraciklinima, fluorokinolonima i glikopeptidima. Laktobacili općenito nisu osjetljivi na eritromicin, tetraciklin, kanamicin, neomicin, streptomycin, gentamicin i kloramfenikol (VESKOVIĆ i sur., 2017.).

### 2.3.1. Otpornost bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg mlijeka i sireva na antibiotike

Otpornost bakterija mliječne kiseline na antibiotike istražuje se u kontekstu potencijalnog rizika širenja otpornosti kroz lanac proizvodnje hrane. To je slučaj i u proizvodnji ovčjeg mlijeka i sireva od nepasteriziranog ovčjeg mlijeka kako bi se ponajprije utvrdila prevalencija takvih sojeva što se može upotrijebiti u identifikaciji opasnosti pri procjeni rizika. Tako su primjerice CHEN i sur. (2020.) bili fokusirani na sojeve bakterije *Lc. lactis* izoliranih iz ovčjeg mlijeka te zabilježili različite profile rezistencije među sojevima, a obuhvaćali su oksacilin, amikacin, neomicin, gentamicin, tetraciklin, norfloksacin, furazolidon, sulfametoksazol, polimiksin, ceftazidim, kanamicin, vankomicin, doksiciklin. Enterokoki iz ovčjeg mlijeka u istraživanju ACURCIA i sur. (2014.) bili su otporni na ceftazidim, oksacilin, streptomycin, vankomicin i ciprofloksacin.

MANGIA i sur. (2019.) su na izolatima laktobacila iz tradicionalnog ovčjeg sira *Fiore Sardo* (Sardinija) zabilježili otpornost prema kanamicinu i gentamicinu. Otpornost BMK na antibiotike istraživali su i BULAJIĆ i sur. (2015.) u sjeničkom siru (Srbija) te utvrdili da je većina laktokoka otporna prema streptomycinu, ampicilinu, penicilinu i vankomicinu; laktobacili prema vankomicinu i tetraciklinu, a enterokoki prema vankomicinu i streptomycinu.



Enterokoki iz ovčjeg sira u Slovačkoj (VÝROSTKOVÁ i sur., 2021.) pokazuju izraženu otpornost prema vankomicinu, eritomicinu, teikoplaninu i rimfapicinu, te umjerenu rezistenciju prema minocilinu i nitrofurantoinu. U tom istraživanju se pokazalo da je više od polovine izolata enterokoka sadržavalo vanA gene, uz fenotipsku rezistenciju na vankomicin, a kod svih izolata otpornih na eritromicin utvrđena je najučestalije prisutnost ermA gena, ali i drugih koji kodiraju otpornost na eritromicin. Također su i svi izolati koji su sadržavali vanA gen također pokazali fenotipsku rezistenciju na teikoplanin.

TISIGKRIMANI i sur. (2022.) su istraživali koncentracije antibiotika koje su potrebne za inhibiciju rasta bakterija mliječne kiseline iz ovčjeg mlijeka i grčkih sireva. Za inhibiciju rasta većine izolata *E. faecalis* bila je potrebna koncentracija veća od 128 mg/L antimikrobnih tvari eritromicina, novobiocina, streptomicina, bacitracina, te tetraciklina. Inhibicija rasta ampicilinom je varirala ovisno od izolata, a minimalna koncentracija se kretala u rasponu od 2 do 128 mg/L, dok je za kloramfenikol i vankomicin bila prosječno 64 mg/L. Rast izolata *Lc. lactis* inhibirala bi većinom koncentracija veća od 128 mg/L streptomicina i bacitracina, 128 mg/L eritromicina, 64-128 mg/L kloramfenikola, 2-4 mg/L ampicilina, 32-128 mg/L tetraciklina i novobiocina, te 4-128 mg/L vankomicina. Rast izolata *Lp. pentosus* inhibirale bi većinom koncentracije veće od 128 mg/L bacitracina, kloramfenikola, eritromicina, novobiocina, streptomicina, vankomicina i tetraciklina, te 2-16 mg/L ampicilina. Za prestanak rasta *Lt. curvatus* bila je potrebna koncentracija veća od 128 mg/L bacitracina, novobiocina, streptomicina, vankomicina, 32 mg/L ampicilina, 64 mg/L eritromicina, 128 mg/L tetraciklina te varijabilne koncentracije u slučaju kloramfenikola. Za inhibiciju rasta izolata *E. faecium* bile su potrebne u većini slučajeva koncentracije veće od 128 mg/L bacitracina, kloramfenikola, eritromicina, streptomicina, 64 mg/L novobiocina, te varijabilne koncentracije ampicilina i vankomicina. Rast izolata *P. pentosaceus* inhibirala bi u većini slučajeva koncentracija veća od 128 mg/L bacitracina, streptomicina, vankomicina i tetraciklina, te <128 mg/L ampicilina, kloramfenikola, eritromicina i novobiocina. Izolati *Ln. mesenteroides*, *Lp. plantarum*, *Lv. brevis* i *W. paramesenteroides* bili bi inhibirani u većini slučajeva koncentracijom većom od 128 mg/L bacitracina, streptomicina, vankomicina i tetraciklina, dok bi za preostale antimikrobne tvari u većini slučajeva bilo potrebno manje od 128 mg/L.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Izolacija bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje Paškog sira

Paški sir proizveden je na tradicionalan način u lokalnoj obiteljskoj sirani (Kolan, Pag) iz mlijeka ovaca vlastitog gospodarstva. Tijekom proizvodnje prikupljeni su uzorci mlijeka ovaca, gruš a i sireva tijekom zrenja, kao i uzorci sirišta sisajuće janjadi (KIŠ i sur., 2021.). Mikrobiološka obrada uzoraka opisana je prethodno (KIŠ i sur., 2021.), a za daljnju determinaciju su izdvojene 192 kolonije s MRS agara.

#### 3.2. Identifikacija izolata MALDI-TOF masenom spektrometrijom

Izolati bakterija mliječne kiseline pripremljeni su nasadićivanjem na MRS agar (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska) inakon inkubacije (30 °C, 24 h) i dostavljeni u Zavodu za fizičku kemiju Intituta Ruđer Bošković na identifikaciju. Standardni MALDI-TOF MS postupak sastoji se od nanošenja kolonije na MALDI matricu te dodavanja 1 µL 70% mravlje kiseline (Fisher Chemical, Alcobendas, Španjolska). Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, svaka je točka prekrivena s 1 µL 10 mg/mL alfa-4-cijano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA, Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) u 50% acetonitrilu i 2,5% trifluorocenoj kiselini i ostavljena da se osuši.

Mjerenja su provedena s Microflex LT masenim spektrometrom (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka), a spektri su snimljeni u pozitivnom linearnom modu u rasponu masa od 2 000 do 20 000 Da. Softver MBT Compass HT verzija 5.1 (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka) korišten je za usporedbu spektara s referentnom bazom podataka. Vanjska kalibracija je provedena s Bacterial Test Standardom (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka). Kriteriji identifikacije bili su sljedeći: logaritamska vrijednost od 2,00–3,00 oznaćavala je identifikaciju vrste s visokom pouzdanošću, logaritamska vrijednost od 1,70–1,99 oznaćavala je identifikaciju vrste s niskom pouzdanošću, dok se vrijednost od 0–1,69 smatrala nepouzdanom identifikacija. (MIKULEC i sur., 2024.). Na temelju vrijednosti rezultata koji predstavljaju najveću vjerojatnost ispravne identifikacije, odabrano je ukupno 100 izolata za procjenu zastupljenosti vrsta bakterija mliječne kiseline u uzorcima.

### 3.3. Odabir izolata bakterija mliječne kiseline za određivanje otpornosti na antimikrobne tvari

Za ovo istraživanje koristilo se 16 izolata bakterija mliječne kiseline, predstavnika bakterijskih vrsta koje su identificirane MALDI-TOF MS-om:

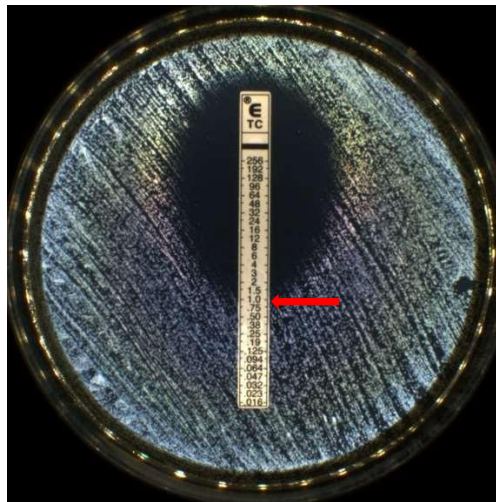
- *Lactococcus lactis*
- *Lactiplantibacillus plantarum*
- *Carnobacterium maltaromaticum*
- *Lactococcus raffinolactis*
- *Loigolactobacillus cornyformis*
- *Enterococcus faecalis*
- *Levilactobacillus brevis*
- *Pediococcus pentosaceus*
- *Leuconostoc mesenteroides*
- *Enterococcus durans*
- *Enterococcus faecium*
- *Enterococcus italicus*
- *Lacticaseibacillus paracasei*
- *Companilactobacillus paralimentarius*
- *Latilactobacillus sakei*
- *Latilactobacillus curvatus*

### 3.4. Testiranje osjetljivosti bakterija mliječne kiseline na antimikrobne tvari

Provedeno je testiranje na ukupno 16 izolata bakterija mliječne kiseline na 9 različitih antimikrobnih tvari pomoću E-testa (BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska). Odabir antimikrobnih tvari proveden je prema preporukama EFSA-e (2018.) koje se odnose na bakterije mliječne kiseline kao dodatke hrani za životinje, s obzirom da nema takvih uputa za izolate iz hrane za ljude. Izolirane bakterije nanosene su troslojno i trosmjerno pomoću sterilnog brisa na MRS agar, a nakon 15 minuta na njih su aplicirane E-test trakice pri čemu su korištene maksimalno 3 trakice po jednoj petrijevoj zdjelici. Antimikrobne tvari koje su se koristile u obliku E-test trakica su:

- Ampicilin
- Vankomicin
- Tetraciklin
- Kanamicin
- Streptomicin
- Klindamicin
- Kloramfenikol
- Gentamicin
- Eritromicin

Nakon inkubacije pri 37 °C tijekom 24 sata očitane su minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) koja je određena donjim dodirnim mjestom zone inhibicije s nanesenim vrijednostima MIC-a na skali trakice E-testa (Slika 4). Intrepretacija rezultata provedena je prema kriterijima EFSA-e (2018.; Tablica 1).



Slika 4. Princip očitavanja MIC vrijednosti E-testom (snimila: Marta Kiš, dr.med.vet.)

Tablica 1. Minimalne inhibicijske koncentracije (mg/L) odabranih antibiotika za BMK (prilagođeno prema EFSA, 2018.)

	Ampicilin	Vankomicin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Eritromicin	Klindamicin	Tetraciklin	Kloramfenikol
<i>Lactobacillus</i> obligatno homofermentativne <sup>(a)</sup>	2	2	16	16	16	1	4	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> grupa	1	2	16	64	16	1	4	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligatno heterofermentativne <sup>(b)</sup>	2	n.p.	16	64	64	1	4	8 <sup>(c)</sup>	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.p.	8	64	64	1	4	32	4
<i>Lactobacillus</i> fakultativno heterofermentativne <sup>(d)</sup>	4	n.p.	16	64	64	1	4	8	4
<i>Lactiplantibacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.p.	16	64	n.p.	1	4	32	8
<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	4	n.p.	16	64	32	1	4	8	4
<i>Lactocaseibacillus casei/paracasei</i>	4	n.p.	32	64	64	1	4	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.p.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.p.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.p.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	n.p.	64	2	2	4	4
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
<i>Enterococcus faecium</i>	2	4	32	1,024	128	4	4	4	16
<i>Corynebacterium</i>	1	4	4	16	8	1	4	2	4

n.p.: nije preporučeno

(a): uključujući *L. delbrueckii*

(b): uključujući *L. fermentum*

(c): Za *L. buchneri* granična vrijednost za tetraciklin je 128.

(d): Uključujući homofermentativne vrste *L. salivarius*

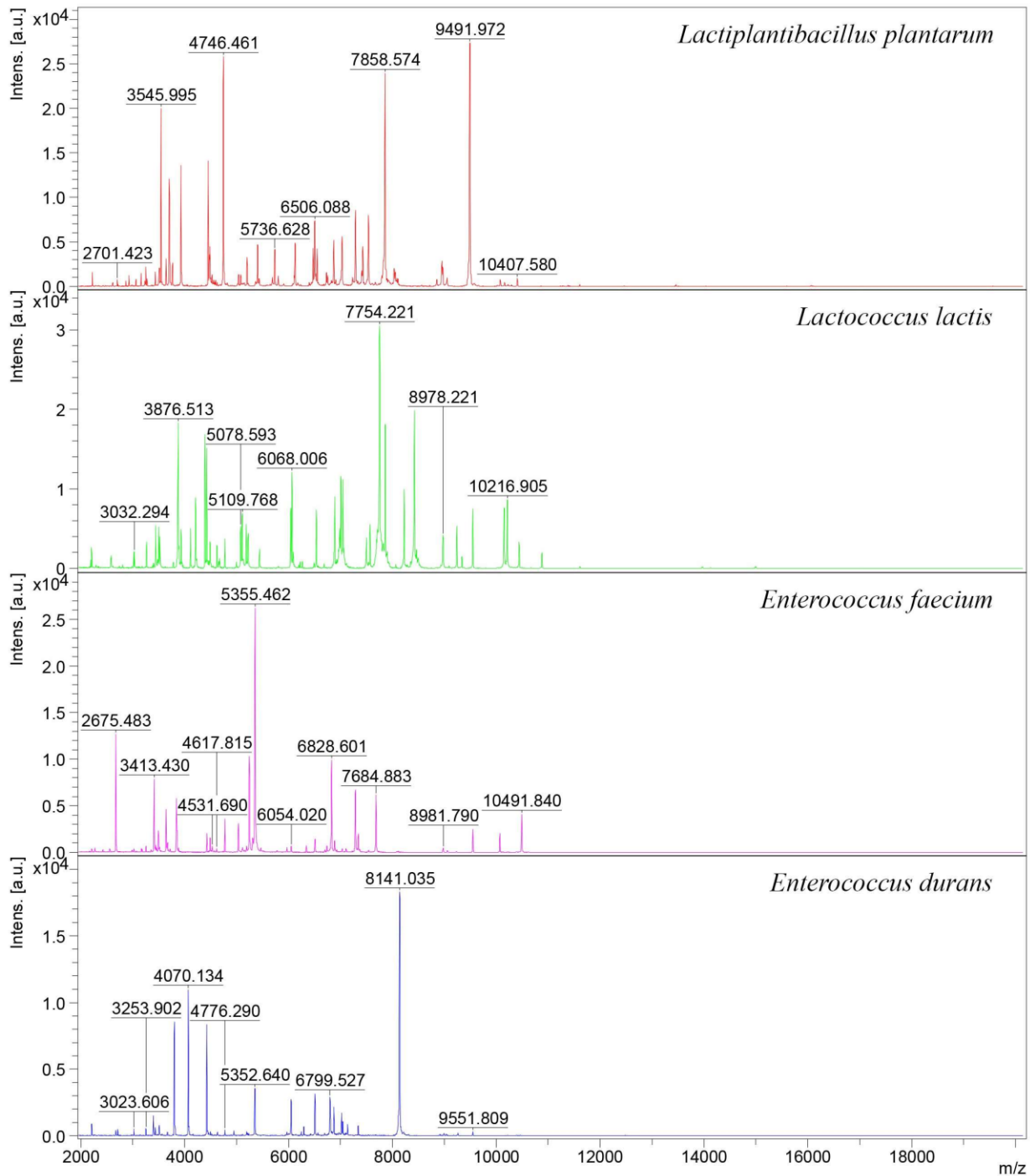
#### 4. REZULTATI

Rezultati identifikacije bakterija mliječne kiseline prikazani su Tablicom 2, a primjeri spektara masa odabranih vrsta su vidljivi na Slikama 5a i 5b. Identificirane vrste navedene su redoslijedom koji odgovara njihovoj zastupljenosti u populaciji identificiranih kolonija. U uzorcima sirovog ovčjeg mlijeka identificirana je samo bakterija *Lactococcus lactis*, koja je kasnije u grušu potisnuta vrstama *Carnobacterium maltaromaticum*, *Leuconostoc mesenteroides* te *Lactococcus raffinolactis*, dok u siru tijekom zrenja nije determinirana. Tijekom zrenja sira uočen je porast bioraznolikosti populacije, odnosno broj identificiranih vrsta odmakom zrenja sira. Mješovita populacija bila je zastupljena ponajviše vrstama laktobacila, potom enterokoka, pediokoka, leukonostoka i karnobakterija. Ukupno je iz mlijeka, sirišta, gruša i sira identificirano 16 različitih vrsta koje su podvrgnute testiranju osjetljivosti na antibiotike: *Lacticaseibacillus paracasei*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Latilactobacillus sakei*, *Latilactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Companilactobacillus paralimentarius*, *Levilactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus italicus*, *Enterococcus durans* i *Carnobacterium maltaromaticum*.

Minimalne inhibicijske koncentracije antibiotika za odabrane izolate BMK (n=16) prikazana je u Tablici 3. Sedam vrsta, odnosno *Lactococcus raffinolactis*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus italicus*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Companilactobacillus paralimentarius* i *Latilactobacillus curvatus* bilo je otporno na najmanje jedan antibiotik prema kriterijima EFSA-e (2018.). Višestruko rezistentne vrste bile su *E. faecalis*, *Lc. raffinolactis*, *E. italicus*, *L. paracasei* i *C. paralimentarius*. Otpornost je najučestalije zabilježena prema kanamicinu i streptomycinu. Važno je napomenuti da su izolati *Lactococcus lactis*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Loigolactobacillus coryniformis*, *Levilactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* i *Latilactobacillus sakei* bili osjetljivi na sve testirane antibiotike.

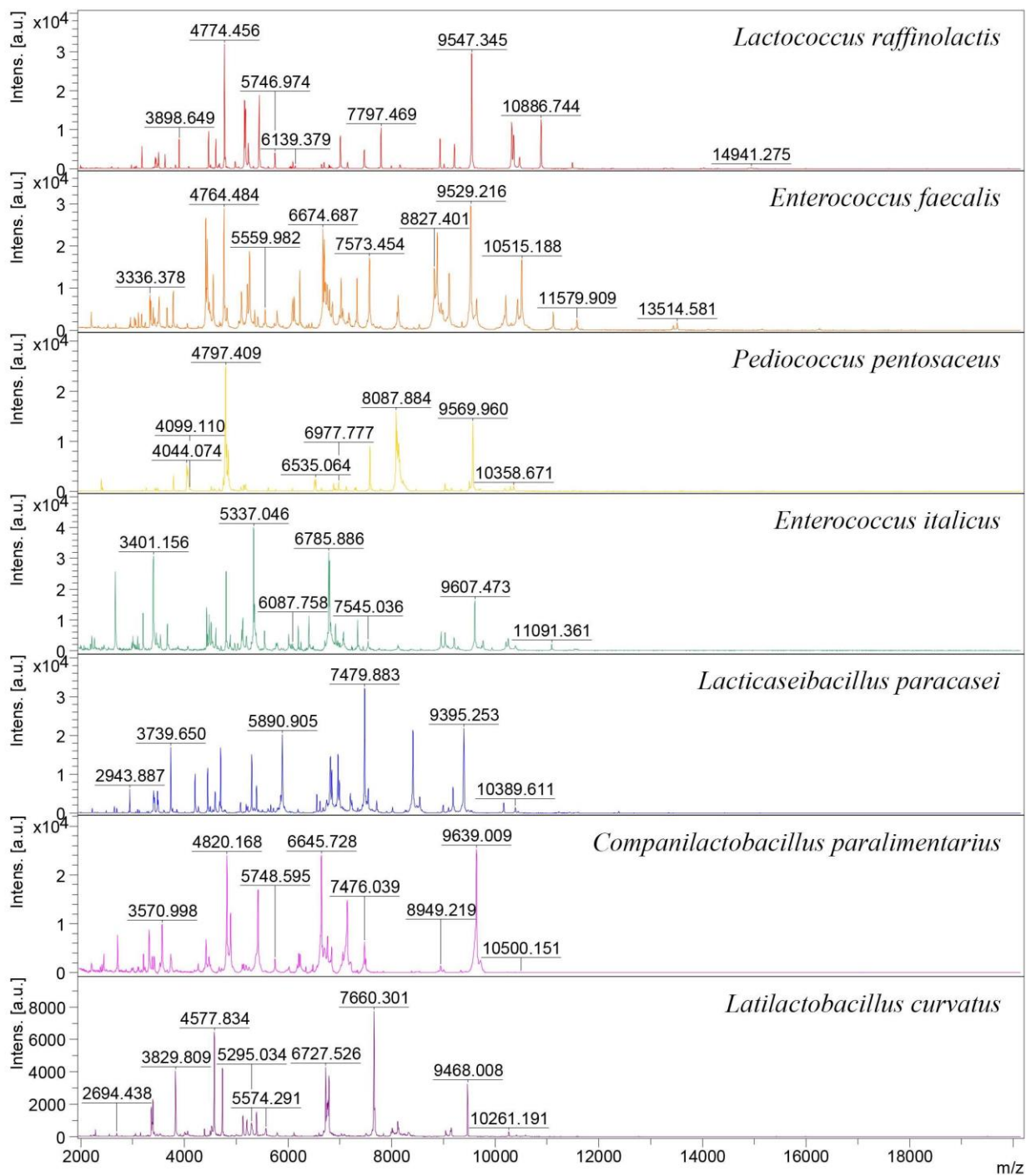
Tablica 2. Rezultati identifikacije bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje Paškog sira

Uzorak	Broj kolonija za identifikaciju	Broj identificiranih kolonija (MALDI score 2,0-3,0)	Identificirane vrste bakterija mliječne kiseline
Ovčje mlijeko (n=18)	18	18	<i>Lactococcus lactis</i>
Sirište janjadi (n=3)	8	8	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
Sirni gruš (n=3)	60	50	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lactococcus raffinolactis</i> <i>Lactococcus lactis</i>
Sir tijekom zrenja (n=4)			
Dan 13.	18	17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> <i>Latilactobacillus curvatus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Dan 50.	20	14	<i>Loigolactobacillus corinyformis</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Levilactobacillus brevis</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Enterococcus faecalis</i>
Dan 80.	24	24	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> <i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Loigolactobacillus coryniformis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus italicus</i>
Dan 120.	44	44	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Loigolactobacillus coryniformis</i> <i>Latilactobacillus sakei</i> <i>Latilactobacillus curvatus</i> <i>Companilactobacillus paralimentarius</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i> <i>Enterococcus durans</i>



Slika 5a. Prikaz MALDI TOF masenih spektara identificiranih vrsta BMK





Slika 5b. Prikaz MALDI TOF masenih spektara identificiranih vrsta BMK

Tablica 3. MIC vrijednosti antibiotika u inhibiciji rasta bakterija mliječne kiseline iz lanca proizvodnje Paškog sira

	Ampicilin	Vankomicin	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Eritromicin	Klindamicin	Tetraciklin	Kloramfenikol
<i>Lc. lactis</i>	0,19	1	2	6	2	0,047	0,064	0,094	1
<i>L. plantarum</i>	1	n.p.	0,125	12	n.p.	0,032	0,125	2	4
<i>Cb. maltaromaticum</i>	0,023	0,5	12	64	128	0,047	0,125	1	1
<i>Lc. raffinolactis</i>	0,064	1	16	<b>96</b>	<b>128</b>	0,047	0,064	0,064	1,5
<i>L. cornyformis</i>	1	1	2	1	4	0,032	0,125	1	1
<i>E. faecalis</i>	0,5	1,5	<b>96</b>	256	<b>1024</b>	1,5	<b>12</b>	<b>16</b>	1,5
<i>L. brevis</i>	0,5	n.p.	1,5	24	12	0,094	3	6	1,5
<i>P. pentosaceus</i>	0,5	n.p.	4	<b>64</b>	24	0,064	0,125	2	1
<i>Ln. mesenteroides</i>	0,25	n.p.	1,5	6	8	0,023	0,125	1	1,5
<i>E. durans</i>	0,094	0,38	12	48	96	0,125	0,016	0,124	1,5
<i>E. faecium</i>	0,094	0,38	8	64	48	2	0,032	0,094	1,5
<i>E. italicus</i>	0,5	1,5	64	256	<b>768</b>	1,5	<b>16</b>	<b>8</b>	1,5
<i>L. paracasei</i>	0,19	n.p.	<b>64</b>	<b>256</b>	<b>384</b>	<b>1</b>	2	<b>4</b>	0,75
<i>C. paralimentarius</i>	1,5	<b>256</b>	12	<b>256</b>	<b>96</b>	0,25	0,064	1	1,5
<i>L. sakei</i>	0,023	0,38	2	2	4	0,125	1	1	1,5
<i>L. curvatus</i>	0,38	<b>256</b>	<b>16</b>	<b>96</b>	0,94	0,94	0,5	0,5	1

n.p. nije preporučeno

## 5. RASPRAVA

Istraživanja autohtone mikrobiote u proizvodnji Paškog sira rijetko su provođena, vjerojatno zbog transformacije u standardiziranu proizvodnju iz pasteriziranog mlijeka uz dodatak starter kultura. Tek je JENSERLE (2012.) primjenom PCR metode identificirala tri prevladavajuće vrste laktobacila u Paškom siru: *L. brevis*, *L. plantarum* i *L. paracasei*. Prema našim saznanjima naše istraživanje predstavlja prvo cjelovitije proučavanje mikrobiote kroz lanac proizvodnje Paškog sira u smislu identifikacije prevladavajućih autohtonih bakterija mliječne kiseline u mlijeku Paške ovce, gršu i siru tijekom zrenja. Pored toga, iz sirišta sisajuće janjadi izoliran je *L. plantarum*, soj koji je korišten u inovaciji u proizvodnji Paškog sira primjenom u mikroinkapsuliranom obliku uz dodatak prirodnog sirila (KIŠ i sur., 2023.). Rezultati MALDI-TOF MS identifikacije odabranih kolonija bakterija mliječne kiseline pokazuju prevladavanje laktobacila u pojedinim fazama zrenja sira, što je u potpunosti različito od mikrobiote ovčjeg mlijeka u kojem je bila prisutna samo vrsta *Lc. lactis*. Ta vrsta laktokoka vrlo je značajna u mljekarstvu i posjeduje brojne poželjne tehnološko-zdravstvene značajke. U tom smislu su PAJAČ i sur. (2021.) potvrdili snažnu acidifikacijsku sposobnost kao i dobru proteolitičku, lipolitičku i antimikrobnu aktivnost laktokoka iz mlijeka Paške ovce. Odabrani soj *Lc. lactis* također je eksperimentalno korišten u proizvodnji Paškog sira u mikroinkapsuliranom obliku (KIŠ i sur., 2023.) što nije narušilo standardnu kvalitetu sira. Vrlo veliku bioraznolikost mikrobiote ovčjeg mlijeka izvjestili su pak QUINTANA i sur. (2020.) primjenom MALDI-TOF MS determinacije pri čemu su prevladavali laktobacili. U ovčjem mlijeku uobičajen je i nalaz enterokoka koji mogu perzistirati u gršu te zrenju sireva (ACURCIO i sur., 2014.). Poznato je kako mikrobiota sirovog mlijeka ovisi o brojnim čimbenicima uključujući zdravlje vimena i higijenu proizvodnje, no svakako ne treba zanemariti ni primijenjenu metodologiju izolacije BMK te pogotovo metodu selekcije kolonija za identifikaciju i primijenjenu metodu identifikacije. U posljednje vrijeme se pažnja pridaje metodama koje zaobilaze klasično izdvajanje živih bakterija na mikrobiološkim podlogama, već se izdvaja bakterijska DNA iz uzorka hrane te podvrgava metagenomskom sekvenciranju (LAUKOVA i sur., 2021.). Jasno je da takve metode daju sasvim nov pogled na sastav mikrobioma mlijeka ili sira, no ipak se u kontekstu kvalitete i sigurnosti proizvoda treba fokusirati na mikrobiotu koja je uzgojiva i izdvojiva iz uzorka (tj. živa) kako bi ju mogli povezivati upravo s dobivenim poželjnim ili nepoželjnim svojstvima gotovog proizvoda.

U našem istraživanju laktokoki su grušanjem mlijeka te zrenjem sira bili potisnuti drugim skupinama bakterija mliječne kiseline, pa su tijekom zrenja sira izdvojeni i identificirani ponajprije laktobacili, a potom enterokoki, pediokoki, leukonostok i drugi. Među laktobacilima prevladavale su homofermentativne vrste što je tehnološki poželjno jer ne stvaraju strane arome, plinove i sl. Međutim, iako u manjem opsegu, izdvojeni su i nepoželjni enterokoki (*E. faecalis*) te u prvim fazama zrenja i *Leuconostoc* vrste koje su heterofermentativne plinotvorne bakterije. U finalnom proizvodu prevladavala je vrsta *L. paracasei*, koja je također prisutna u tvrdim sirevima s našeg tržišta proizvedenima sa starter kulturama (ZDOLEC i sur., 2022.). Prisutnost enterokoka također je uobičajena u tvrdim sirevima u tipu Paškog sira (do 5 log CFU/g), no njihov nalaz može rezultirati većim količinama biogenih amina u siru, posebno tiramina (ZDOLEC i sur., 2022.).

S obzirom na utvrđenu bioraznolikost mikrobiote u ovom istraživanju se preliminarno fenotipski ispitala i njihovi profili osjetljivosti na antibiotike, na po jednom odabranom predstavniku svih 16 izdvojenih vrsta BMK. Poznato je da je antimikrobna rezistencija komenzalnih bakterija hrane u posljednje vrijeme interesantno područje istraživanja zbog potencijalnog horizontalnog prijenosa gena rezistencija u lancu hrane (WOLFE, 2023.). Naime, pokazalo se da populacija tih bakterija u hrani može nositi gene rezistencije za klinički relevantne antibiotike, koji mogu biti i prenosivi (CAMPEDELLI i sur., 2019.). S obzirom da se putem fermentirane hrane u organizam potrošača unosi velik broj tih bakterija, razvidan je značaj potencijalno rezistentne nepatogene mikrobiote poput laktobacila ili enterokoka (CAMPEDELLI i sur., 2019.; ZDOLEC i KIŠ, 2022.). Ulogu fermentirane hrane u prijenosu rezistencije tek treba evaluirati i procijeniti izloženost potrošača i potencijalni javnozdravstveni rizik (WOLFE, 2023.).

U našem istraživanju, među ispitivanim vrstama najotpornijom se pokazao *L. paracasei* kojeg je inhibiralo pet od devet testiranih antibiotika (gentamicin, kanamicin, streptomycin, eritromicin i tetraciklin). Ti su rezultati u skladu s istraživanjem HONI i sur. (2013.), gdje su izolati *L. paracasei* bili rezistentni na iste antibiotike, osim na tetraciklin. U oba rada potvrđena je osjetljivost prema ampicilinu i kloramfenikolu. Posebno se ističe rezistencija prema aminoglikozidima (gentamicin, kanamicin, streptomycin), što je česta pojava među laktobacilima. Ova otpornost može biti klinički značajna u kontekstu probiotika i njihovih potencijalnih učinaka na rezistenciju u mikrobiomima.

Što se tiče drugih vrsta laktobacila, u ovom istraživanju su predstavnici vrsta *L. cornyformis*, *L. brevis*, *L. sakei* i *L. plantarum* bili osjetljivi na sve testirane antibiotike. Suprotno

tome, XU i sur. (2023) su izvijestili o multirezistenciji izolata *L. cornyformis* prema vankomicinu, oksacilinu, imipenemu i norfloksacinu. Nadalje, WU i sur. (2022.) su izvijestili o rezistenciji izolata *L. brevis* prema vankomicinu, fluorokinolonima i fosfomicinu, a DINCER i KIVANC (2022.) u *L. sakei* na kanamicin, lomefloksacinu i ceftriakson. *L. curvatus* u našem je istraživanju pokazao je fenotip rezistencije na vankomicin, gentamicin i kanamicin. Ovi rezultati se razlikuju od nalaza CHEN i sur. (2020), koji su izvijestili o rezistenciji *L. curvatus* na kloramfenikol, eritromicin i tetraciklin.

Prema rezultatima istraživanja, *E. faecalis* je druga najotpornija vrsta, pokazujući otpornost prema gentamicinu, streptomycinu, klindamicinu i tetraciklinu. Pri tome naglasimo da smo procjenu otpornosti na antibiotike za *E. faecalis* i druge enterokoke (*E. durans*, *E. italicus*) provodili prema preporučenim kriterijima za *E. faecium* (EFSA, 2018.). Slične rezultate dobili su i FURLANETO-MAIA i sur. (2014.), koji su izvijestili o rezistenciji *E. faecalis* iz mekog sira u Brazilu prema tetraciklinu, ali i prema eritromicinu i vankomicinu, što nije uočeno u ovom istraživanju. CHINGWARU i sur. (2002.) također su zabilježili visoku rezistenciju izolata *E. faecalis* iz mesa i mlijeka prema ampicilinu, vankomicinu, te vrlo visoku otpornost na tetraciklin. Što se tiče ostalih vrsta enterokoka, *E. italicus* je bio otporan prema streptomycinu, klindamicinu i tetraciklinu, dok su *E. durans* i *E. faecium* bili osjetljivi na sve testirane antibiotike. TEUBER i sur. (1999.) izvijestili su da su enterokoki često otporni na vankomicin, streptomycin, eritromicin, kloramfenikol, tetraciklin i klindamicin. Slično tome, VESKOVIĆ i sur. (2017.) ukazuju na stečenu otpornost enterokoka prema kloramfenikolu, klindamicinu, eritromicinu, aminoglikozidima, beta-laktamima i tetraciklinu. Zabrinutost oko rezistencije enterokoka leži u njihovoj sposobnosti horizontalnog prijenosa gena za ključne antibiotike poput vankomicina i metecilina, što im omogućava brzu prilagodbu i širenje rezistencije među vrstama (EMAMALIPOUR i sur., 2020.; KRAUSE i sur., 2022.). Ovi rezultati ističu važnost kontinuiranog praćenja otpornosti enterokoka u prehrambenom lancu i njihovu sposobnost prijenosa otpornosti na patogene bakterije, što predstavlja ozbiljan javnozdravstveni rizik.

U ovom istraživanju, *Lc. lactis* je bio osjetljiv na sve antibiotike, dok je *Lc. raffinolactis* bio otporan na kanamicin i streptomycin. DEVIRGILIS i sur. (2013.) izvještavaju da laktokoki često pokazuju rezistenciju prema tetraciklinu, makrolidima, glikopeptidima i polimiksinima. CHEN i sur. (2020.) su na izolatima *Lc. lactis* iz ovčjeg mlijeka zabilježili različite profile rezistencije među sojevima, a obuhvaćali su oksacilin, amikacin, neomicin, gentamicin, tetraciklin,

norfloksacin, furazolidon, sulfametoksazol, polimiksin, ceftazidim, kanamicin, vankomicin, doksiciklin, što se razlikuje od naših rezultata. Također, BULAJIĆ i sur. (2015.) su zaključili kako su laktokoki iz sireva često rezistentni na streptomycin, ampicilin, vankomicin i penicilin. Različiti stupanj osjetljivosti/otpornosti laktokoka među različitim istraživanjima, ukoliko zanemarimo eventualne metodološke razlike i kriterije procjene rezistencije, vjerojatno je posljedica različitog stupnja opterećenosti stočarske proizvodnje antibioticima te okolišnim čimbenicima.

Izolat *Pediococcus pentosaceus* iz Paškog sira testiran u ovom istraživanju je pokazao rezistenciju prema kanamicinu, jednoj od osam testiranih antimikrobnih tvari, što je također manji stupanj otpornosti u odnosu na druga istraživanja ove vrste podrijetlom iz mljekarske proizvodnje. Tako su BHUKYA i BHUKYA (2021.) na *P. pentosaceus* iz mlaćenice utvrdili otpornost uz kanamicin i na streptomycin, vankomicin, ciprofloksacin, norfloksacin i trimetoprim. Praćenje otpornosti na antibiotike kod *P. pentosaceus* je važno jer postoji mogućnost da nosi prenosive gene rezistencije, posebice za eritromicin i tetraciklin, što su naglasili VESKOVIĆ i sur. (2017.). Ovakva rezistencija može predstavljati rizik za širenje otpornosti na antibiotike u prehrambenom lancu i javnom zdravstvu. *Leuconostoc mesenteroides* u našem istraživanju također je bio osjetljiv na sve testirane antibiotike, što je povoljan rezultat u odnosu na druga izvješća (VESKOVIĆ i sur., (2017.).

Bakterije mliječne kiseline obično su osjetljive na antimikrobne tvari koje djeluju kao inhibitori stanične stijenke kao što su penicilini i inhibitori beta laktamaze, a najčeće su otporne na aminoglikozide kao što su kanamicin, streptomycin, gentamicin i neomicin (CHEN i sur., 2020.), što je zabilježeno i u ovom radu. Dobiveni rezultati ukazuju na umjerenu prevalenciju antimikrobne rezistencije u odabranim izolatima BMK iz lanca proizvodnje tradicionalno proizvedenog ovčjeg sira. Izolati koji su pokazali potpunu osjetljivost na antibiotike, *L. plantarum*, *Lc. lactis*, *E. faecium* i *E. durans*, potencijalni su kandidati za daljnju karakterizaciju u odabiru sirarskih kultura.

## 6. ZAKLJUČCI

- Obuhvatom uzoraka od sirovog ovčjeg mlijeka, sirišta janjadi, sirnog gruša do Paškog sira u tijeku zrenja ukupno je identificirano 16 različitih vrsta bakterija mliječne kiseline.
- Prevladavale su vrste homofermentativnih laktobacila, potom enterokoka, pediokoka i laktokoka.
- Većina je izolata bila osjetljiva na antibiotike što ide u prilog dobre prakse u ekološkom ovčarstvu otoka Paga
- Fenotipski zabilježenu rezistenciju pojedinih izolata potrebno je dodatno istražiti u smislu potencijala prijenosa rezistencije na izloženu indikatorsku nerezistentnu mikrobiotu

## 7. LITERATURA

ACAR, J., B. RÖSTEL (2001): Antimicrobial resistance: An overview. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20, 797-810.

ACURCIO, L.B., M.R. SOUZA, A.C. NUNES, D.L.S. OLIVEIRA, S.H.C. SANDES, L.B. ALVIM (2014): Isolation, enumeration, molecular identification and probiotic potential evaluation of lactic acid bacteria isolated from sheep milk. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 66, 940-948.

ALEGRÍA, Á., P. SZCZESNY, B. MAYO, J. BARDOWSKI, M. KOWALCZYK (2012): Biodiversity in Oscypek, a Traditional Polish Cheese, Determined by Culture- Dependent and - Independent Approaches. Appl. Environ. Microbiol. 78, 6.

ANTUNAC, N., J. HAVRANEK LUKAČ (1999): Proizvodnja, sastav i osobine ovčjeg mlijeka. Mljekarstvo, 49, 241-254.

BAKOVIĆ, D. (1961): Tehnologija paškog sira. Mljekarstvo 11, 41-44.

BHUKYA, K.K., B. BHUKYA (2021): Unraveling the probiotic efficiency of bacterium *Pediococcus pentosaceus* OBK05 isolated from buttermilk: An in vitro study for cholesterol assimilation potential and antibiotic resistance status. PLOS ONE 16(11):e0259702.

BARAĆ, Z., B. MIOČ, J. HAVARANEK, D. SAMARŽIJA (2008): Paška ovca hrvatska izvorna pasmina. Matica hrvatska Novalja, Novalja, str. 28-40.

BULAJIĆ, S., Z. MIJAČEVIĆ, T. LEDINA, B. GOLIC (2015): Safety evaluation of sjenica cheese with regard to coagulase-positive staphylococci and antibiotic resistance of lactic acid bacteria and staphylococci. Acta Vet.-Beograd 65, 518-537.

CAMPEDELLI, I., H. MATHUR, E. SALVETTI, S. CLARKE, M.C. REA, S. TPRRIANI, R.P. ROSS, C. HILL, P.W. O'TOOLE (2019): Genus-wide assessment of antimicrobial resistance in *Lactobacillus* spp. Appl. Environ. Microbiol. 85:e01738-18.

CHEN, Y., L. YU, N. QIAO, Y. XIAO, F. TIAN, J. ZHAO, H. ZHANG, W. CHEN, Q. ZHAI (2020): *Latilactobacillus curvatus*: A Candidate Probiotic with Excellent Fermentation Properties and Health Benefits. Foods 9, 10, 1366.

CHINGWARU, W., S. F.MPUCHANE, B. A. GASHE (2002): *Enterococcus faecalis* and



*Enterococcus faecium* Isolates from Milk, Beef, and Chicken and Their Antibiotic Resistance. J. Food Protect. 66, 931-936.

DEVIRGILIIS, C., P. ZINNO, G. PEROZZI (2013): Update on antibiotic resistance in foodborne *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. Front. Microbiol. 4, 301.

DINCER, E., M. KIVANC (2022): Evaluation of metabolic activities and probiotic characteristics of two *Lactobacillus sakei* strains isolated from pastirma. World J Microbiol. Biotechnol. 38, 237.

EFSA FEEDAP Panel (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (2018): Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. EFSA Journal 16, 3:5206.

EMAMALIPOUR, M., K. SEIDI, S. ZUNUDI VAHED, A. JAHANBAN- ESFAHLAN, M. JAYMAND, H. MAJDI, Z. AMOOZGAR, L. T. CHITKUSHEV, T. JAVAHERI, R. JAHANBAN-ESFAHLAN, P. ZARE (2020): Horizontal Gene Transfer: From Evolutionary Flexibility to Disease Progression. Front. Cell Dev. Biol. 8, 229.

FURLANETO-MAIA, L., K. R. ROCHA, F. C. HENRIQUE, A. GIAZZI, M. C. FURLANETO (2014): Antimicrobial Resistance in *Enterococcus* sp. Isolated from Soft Cheese in Southern Brazil. Adv. Microbiol. 4, Article ID:43004.

HEROUT, B. (2018): Proteolitička aktivnost probiotičkih starter kultura bakterija mliječne kiseline. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, Hrvatska.

HONI, U., F. SABRIN, T. ISLAM, Md. E. ISLAM, Md. M. BILLAH, K. D. ISLAM (2013): Enzymatic activity and antibiotic resistance profile of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*-1 isolated from regional yogurts of Bangladesh. J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci. 3, 235-239.

JENSTERLE, A. (2012): Genetička analiza autohtone zajednice laktobacila izolirane iz Paškog sira. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb, Hrvatska.

KIŠ, M., S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, N. MIKULEC, N. ZDOLEC (2021): Potencijal mikroinkapsulacije u sirarstvu: odabir autohtone mljekarske kulture za Paški sir. Zbornik radova Znanstveno-stručnog skupa s međunarodnim sudjelovanjem Veterinarski dani 2021, 26.09.-29.09., Vodice, str. 363-370.

KIŠ, M., N. ZDOLEC, S. KAZAZIĆ, M. VINCEKOVIĆ, S. JURIĆ, V. DOBRANIĆ, F. OŠTARIĆ, I. MARIĆ, N. MIKULEC (2023): Implementation of Novel Autochthonous Microencapsulated Strains of *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, and Lamb's Rennet in the Production of Traditional "Paški Sir" Cheese. *Fermentation*, 9, 441.

KORHONEN, J. (2010): Antibiotic Resistance of Lactic Acid Bacteria. Dissertation, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland.

KRAUSE, A.L., T.P. STINEAR, I.R. MONK (2022): Barriers to genetic manipulation of Enterococci: Current Approaches and Future Directions. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 6, fuac036.

LAHTINEN, S., A.C. OUWEHAND, S. SALMINEN, A.V. WRIGHT (2012): Lactic acid bacteria-microbiological and functional aspects. 4. izd. CRC Press, Boca Raton.

LAUKOVÁ, A., L. MICENKOVÁ, M. POGÁNY SIMONOVÁ, V. FOCKOVÁ, J. ŠČERBOVÁ, M. TOMÁŠKA, E. DVOROŽŇÁKOVÁ, M. KOLOŠTA (2021): Microbiome Associated with Slovak Traditional Ewe's Milk Lump Cheese. *Processes*, 9, 1603.

MANGIA, P.N., L. SALIBA, P. DEIANA (2019): Functional and safety characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* FS103 isolated from sheep cheese and its survival in sheep and cow fermented milks during cold storage. *Ann. Microbiol.* 69, 161-170.

MIKULEC, N., J. ŠPOLJARIĆ, D. PLAVLJANIĆ, N. LOVRIĆ, F. OŠTARIĆ, J. GAJDOŠ KLJUSURIĆ, K.M. SARIM, N. ZDOLEC, S. KAZAZIĆ (2024): MALDI-TOF Mass Spectrometry-Based Identification of Aerobic Mesophilic Bacteria in Raw Unpreserved and Preserved Milk. *Processes* 12, 731.

OŠTARIĆ, F., N. ANTUNAC, V. CUBRIC-CURIK, I. CURIK, S. JURIĆ, S. KAZAZIĆ, M. KIŠ, M. VINCEKOVIĆ, N. ZDOLEC, J. ŠPOLJARIĆ, N. MIKULEC (2022): Challenging Sustainable and Innovative Technologies in Cheese Production: A Review. *Processes* 10, 3, 529.

PAJAČ, L., M. KIŠ, S. KAZAZIĆ, N. ZDOLEC (2021): Characterization and selection of *Lactococcus lactis* strains from ewe's milk as potential cheese starter culture. Book of Abstract of the 9th International Congress Veterinary Science and Profession, 09.10., Zagreb, str. 57.

PANDOVA, M., Y. KIZHEVA, M. TSENOVA, M. RUSINOVA, T. BORISOVA, P. HRISTOVA (2024): Pathogenic Potential and Antibiotic Susceptibility: A Comprehensive Study of Enterococci from Different Ecological Settings. *Pathogens* 13, 1, 36.

PATIL, A., J. DISOUZA, S. PAWAR (2019): Shelf life stability of encapsulated lactic acid bacteria isolated from sheep milk thrived in different milk as natural media. *Small Rum. Res.* 170, 19.-25.

QUINTANA, Á. R., J. M. PEREA, M. L. PALOP, A. GARZÓN, R. ARIAS (2020): Influence of Environmental and Productive Factors on the Biodiversity of Lactic Acid Bacteria Population from Sheep Milk. *Animals*, 10, 2180.

TEUBER, M., L. MEILE, F. SCHWARZ (1999): Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 115–137.

TRATNIK, LJ. (1998): Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, str. 56.

TSIGKRIMANI, M., K. PANAGIOTAREA, S. PARAMITHIOTIS, L. BOSNEA, E. PAPPA, E. H. DROSINOS, P. N. SKANDAMIS, M. MATARAGAS (2022): Microbial Ecology of Sheep Milk, Artisanal Feta, and Kefalograviera Cheeses. Part II: Technological, Safety, and Probiotic Attributes of Lactic Acid Bacteria Isolates. *Foods* 11, 3, 459.

UDRUGA PROIZVOĐAČA PAŠKOG SIRA OTOKA PAGA (2018): Specifikacija proizvoda, Paški sir zaštićena oznaka izvornosti. <https://up-paskisir.hr/zoi-paski-sir/> (10.9.2024.)

VESKOVIĆ MORAČANIN, S., D. DJUKIĆ, N. ZDOLEC, M. MILIJAŠEVIĆ, P. MAŠKOVIĆ (2017): Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented food. *J. Hyg. Eng. Des.* 18, 26.-31.

VÝROSTKOVÁ, J., I. REGECOVÁ, E. DUDRIKOVÁ, S. MARČINČAK, M. KOVÁČOVÁ, J. ZAHUMENSKÁ (2021): Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* sp. Isolated from Sheep and Goat Cheeses. *Foods* 10, 8, 1844.

WU, Q. H., D. D. LI, S. C. L. WU., Y., SAN, Q. XING, H. HU, A.Q. WANG, M. LI, P. STRAPPE, Z. K. ZHOU (2022): Whole Genome Sequencing of *Levilactobacillus brevis* HQ1-1 for Understanding the Characteristics of Its Antibiotic Resistance Genes. *Microbiol.* 92, 358-369.

XU, X.,Y. QIAO, Q. PENG, B. SHI (2023): Probiotic Properties of *Loigolactobacillus coryniformis* NA-3 and In Vitro Comparative Evaluation of Live and Heat-Killed Cells for Antioxidant, Anticancer and Immunoregulatory Activities. *Foods* 12, 5, 1118.

WOLFE, B.E. (2023): Are fermented foods an overlooked reservoir of antimicrobial resistance? *Curr. Opin. Food Sci.* 51, 101018.

ZDOLEC, N., S. VESKOVIĆ MORAČANIN, I. FILIPOVIĆ, V. DOBRANIĆ (2016): Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented meat products. U: Zdolec N. (ur.), *Fermented Meat Products: Health Aspect*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, str. 316.-339.

ZDOLEC, N., T. BOGDANOVIĆ, K. SEVERIN, V. DOBRANIĆ, S. KAZAZIĆ, J. GRBAVAC, J. PLEADIN, S. PETRIČEVIĆ, M. KIŠ (2022): Biogenic Amine Content in Retailed Cheese Varieties Produced with Commercial Bacterial or Mold Cultures. *Processes*, 10, 1, 10.

ZDOLEC, N., M. KIŠ (2022): Antimicrobial properties of food enterococci. U: *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology*. Ray, R.C., S. Paramithiotis, V. A. De Carvalho Azevedo, D. Montet (ur.). Elsevier, Amsterdam, str. 195-203.

## 8. SAŽETAK

### Ena Horvat - OTPORNOST NA ANTIMIKROBNE LIJEKOVE IZOLATA MLIJEČNOKIŠELINSKIH BAKTERIJA IZOLIRANIH TIJEKOM PROIZVODNJE TVRDOG OVČJEG SIRA

Autohtona mikrobiota tradicionalnih sireva može biti izvor potencijalnih mljekarskih kultura koje se mogu koristiti u kontroliranoj, standardiziranoj proizvodnji. Cilj ovog rada bio je procijeniti osjetljivost bakterija mliječne kiseline izoliranih tijekom tradicionalne proizvodnje Paškog sira na antimikrobna tvari (antibiotike). Bakterije mliječne kiseline (BMK, n=175) izolirane su iz sirovog ovčjeg mlijeka, sirišta janjadi, grušta i sira tijekom zrenja koristeći de Man, Ragosa i Sharpe agar (MRS) te identificirane pomoću MALDI-TOF masene spektrometrije. Nakon identifikacije do razine vrste, izolati su testirani na osjetljivost prema antibioticima: ampicilinu, vankomicinu, gentamicinu, kanamicinu, streptomycinu, eritromycinu, klindamicinu, tetraciklinu i kloramfenikolu E-testom (minimalna inhibitorna koncentracija) na MRS agaru. Rezultati su interpretirani prema mikrobiološkim graničnim vrijednostima predloženim od strane EFSA-e. Ukupno je identificirano 16 različitih vrsta BMK, a prevladavale su vrste homofermentativnih laktobacila, potom enterokoka, pediokoka i laktokoka. Većina je izolata bila osjetljiva na antibiotike što ide u prilog dobre prakse u ekološkom ovčarstvu otoka Paga. Fenotipski zabilježenu rezistenciju pojedinih izolata potrebno je dodatno istražiti u smislu potencijala prijenosa rezistencije na izloženu indikatorsku nerezistentnu mikrobiotu. Izolati koji su pokazali potpunu osjetljivost na antimikrobna sredstva, kao što su *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* i *Enterococcus durans*, predstavljaju potencijalne kandidate za daljnju karakterizaciju i odabir za primjenu u mljekarstvu.

**Ključne riječi:** antimikrobna rezistencija, bakterije mliječne kiseline, MALDI-TOF MS, „Paški sir“

## 9. SUMMARY

### Ena Horvat – THE RESISTANCE TO ANTIMICROBIAL DRUGS OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATES OBTAINED DURING THE PRODUCTION OF HARD SHEEP CHEESE

The indigenous microbiota of traditional cheeses may be a source of potential dairy cultures that can be used in controlled, standardized production. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated during the traditional production of Pag cheese. Lactic acid bacteria (LAB, n=160) were isolated from raw sheep milk curd and cheese during ripening using de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) and identified by MALDI-TOF mass spectrometry. After identification to species level, isolates were tested for antimicrobial susceptibility to ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, and chloramphenicol by E-test (Minimal Inhibitory Concentrations) on MRS agar. The results were interpreted according to the microbiological cut-off values proposed by EFSA. A total of 16 different species of LAB were identified, with the predominant species being homofermentative lactobacilli, followed by enterococci, pediococci and lactococci. Most isolates were sensitive to antibiotics, which indicates good practice in organic sheep farming on the island of Pag. The phenotypically recorded resistance of individual isolates needs to be further investigated with regard to the potential of resistance transfer to the exposed, non-resistant microbiota. Isolates that showed complete sensitivity to antimicrobial agents, namely - *Lactiplantibacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Enterococcus durans*, are potential candidates for further characterization to be selected for dairy applications.

**Key words:** antimicrobial resistance, lactic acid bacteria, MALDI-TOF MS, „Pag cheese“

## **10. ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 2.12.1998. u Bjelovaru, gdje sam 2013. završila II. osnovnu školu Bjelovar, a po završetku osnovne škole upisujem opći smjer Gimnazije Bjelovar koju sam završila 2017. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2017. godine. Tokom studija sudjelovala sam na 10. međunarodnom kongresu Veterinary science and profession s poster prezentacijom na temu istraživanja iz mog diplomskog rada.