



Универзитет у Крагујевцу

Природно-математички факултет
Институт за биологију и екологију

Катарина Младеновић

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ENTEROVACTERIACEAE ПОРЕКЛОМ ИЗ
АУТОХТОНОГ СИРА СРБИЈЕ СА ПОСЕБНИМ ОСВРТОМ НА ВРСТЕ ИЗ
РОДОВА *KLEBSIELLA* И *SERRATIA***

Докторска дисертација

Ментор: Професор др Љиљана Чомић

Крагујевац, 2019.

I Аутор

Име и презиме: **Катарина Младеновић**

Датум и место рођења: **18.8.1990. године, Крагујевац, Србија**

Садашње запослење: **истраживач-сарадник, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

II Докторска дисертација

Наслов: **Карактеризација enterobacteriaceae пореклом из аутохтоног сира Србије са посебним освртом на врсте из родова *Klebsiella* и *Serratia***

Број страница: 195, Број слика: 11, Број табела: 49, Број графика: 20

Број библиографских података: 245

Установа и место где је рад израђен: **Природно-математички факултет, Крагујевац**

Научна област (УДК): **Биологија- Микробиологија (Микробиологија хране)**

Ментор: **др Љиљана Чомић**, редовни професор, Природно-математички факултет, Крагујевац

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 28.8.2017.

Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: 870/XI-2 од 22.11.2017. године;
IV-01-l 24l/9 од 13.12.2017. године

Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 630/XIX-4 од 30.08.2017. године; донело одлуку број IV-01-827/14 од 18.10.2017. године

1. **др Љиљана Чомић**, редовни професор, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Ужа научна област: Микробиологија;
2. **др Олгица Стефановић**, доцент, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија;
3. **др Зорица Стојановић-Радић**, ванредни професор, Природно-математички факултет у Нишу, ужа научна област: експериментална биологија и биотехнологија

Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

1. **др Сунчица Коцић-Танацков**, доцент, Катедра за инжењерство конзервисане хране Технолошког факултета Универзитета у Новом Саду, ужа научна област: Прехрамбено инжењерство;
2. **др Олгица Стефановић**, доцент, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија;
3. **др Ивана Радојевић**, виши научни сарадник, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Биологија.

Датум одбране дисертације:

МЕНТОР

др Љиљана Чомић, редовни професор
Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Ужа научна област: Микробиологија

КОМИСИЈА

др Сунчица Коцић - Танацков, доцент
Катедра за инжењерство конзервисане хране
Технолошки факултет
Универзитет у Новом Саду
Ужа научна област: Прехрамбено инжењерство

др Олгица Стефановић, доцент
Институт за биологију и екологију
Природно - математички факултет
Универзитет у Крагујевцу
Ужа научна област: Микробиологија

др Ивана Радојевић, виши научни сарадник
Институт за биологију и екологију
Природно - математички факултет
Универзитет у Крагујевцу
Ужа научна област: Биологија

Захвалница

Приложена докторска дисертација је урађена на Институту за биологију и екологију Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу.

Овом приликом се захваљујем ментору, проф. др Љиљани Чомић, на упуштвима, саветима и подрици током израде докторске дисертације.

Захваљујем се члановима Комисије, др Сунчици Коцић-Танацков, др Олгици Стефановић и др Ивани Радојевић, на корисним саветима и сугестијама.

Захваљујем се и Министарству просвете, науке и технолошког развоја на стипендирању током докторских студија.

Милени, Александри, Стефану, Мирјани који су веровали у мене...

Садржај

Извод.....	I
Summary.....	IV
Листа слика.....	VII
Листа табела.....	VIII
Листа графика.....	XI
1. Увод.....	1
1.1. Класификација сирева.....	3
1.2. Аутохтони сиреви Републике Србије.....	4
1.3. Ферментација и ферментациони производи.....	5
1.3.1. Сир као ферментисани производ.....	6
2. Преглед литературе.....	8
2.1. Фазе раста бактерија.....	9
2.2. Биофилм бактерија.....	10
2.3. Фактори који утичу на раст и развој микроорганизама.....	11
2.4. Основне карактеристике антибиотика.....	11
2.5. Микроорганизми у храни.....	14
2.6. Ентеробактерије: порекло, улога, значај.....	14
2.6.1. Интеракције између ентеробактерија и бактерија млечне киселине у гастроинтестиналном тракту.....	16
2.7. Ентеробактерије – улога у прехранбеним намирницама.....	19
2.8. Преглед родова фам. Enterobacteriaceae који се најчешће могу наћи у храни.....	20
2.9. Ентеробактерије као чиниоци у формирању укуса сира.....	24
2.10. Превенција кварења хране.....	25
2.11. Законски прописи у Србији о технологији производње сира по „Правилнику о квалитету сировог млека”	26
3. Циљеви рада.....	27
4. Материјал.....	29
4.1. Аутохтони сокобањски сир.....	30
4.2. Хранљиве подлоге.....	31
4.3. Апарати и инструменти.....	35

5. Методе.....	36
5.1. Хемијска анализа сира.....	37
5.2. Укупан број аеробних мезофилних бактерија.....	38
5.3. Изоловање и одређивање ентеробактерија.....	39
5.3.1. Изолација микроорганизама.....	39
5.3.2. Одабир бактерија за микробиолошко испитивање.....	39
5.3.3. Идентификација бактерија.....	41
5.4. Системи за идентификацију бактерија.....	46
5.5. Одређивање осетљивости бактерија на антибиотике.....	47
5.6. Microgen <i>E. coli</i> O157 брзи латекс аглутинацијски тест.....	48
5.7. Одређивање утицаја различитих температура, рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе на планктонски раст испитиваних бактерија.....	49
5.8. Испитивање способности формирања биофилма.....	50
5.9. Одређивање утицаја различитих рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе на способност формирања биофилма.....	51
5.10. Одређивање утицаја различитих рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе на формирану биофилм.....	52
5.11. Одређивање способности адхезије бактерија у присуству различитих растварача.....	52
5.12. Одређивање могућности коагрегације бактерија.....	53
5.13. <i>In vitro</i> тест за адхезију бактерија за епител свињског црева.....	54
5.14. Одређивање ензимске активности бактерија.....	54
5.15. Статистичка анализа података.....	62
6. Резултати.....	63
6.1. Хемијске карактеристике сира из Сокобање.....	64
6.2. Укупан број аеробних мезофилних бактерија.....	65
6.3. Идентификација ентеробактерија.....	65
6.4. Дистрибуција ентеробактерија по сезонама и њихове биохемијске карактеристике.....	66
6.5. Учесталост ентеробактерија у односу на коришћено сирило.....	71
6.6. Карактеризација врста из рода <i>Klebsiella</i>	71
6.6.1. Осетљивост на антибиотике.....	71
6.6.2. Утицај еколошких фактора на планктонски раст <i>Klebsiella</i> spp.....	72
6.6.3. Способност формирања биофилма <i>Klebsiella</i> spp.....	79
6.6.4. Утицај еколошких фактора на биофилм <i>Klebsiella</i> spp.....	80

6.6.5. Адхезивна способност <i>Klebsiella</i> spp.....	86
6.6.6. Коагрегација са <i>E. faecalis</i>	87
6.6.7. Ензимска активност <i>Klebsiella</i> spp.....	89
6.7. Карактеризација врста из рода <i>Serratia</i>	91
6.7.1. Осетљивост на антибиотици.....	91
6.7.2. Утицај еколошких фактора на планктонски раст <i>Serratia</i> spp.....	92
6.7.3. Способност формирања биофилма <i>Serratia</i> spp.....	97
6.7.4. Утицај еколошких фактора на биофилм <i>Serratia</i> spp.....	97
6.7.5. Адхезивна способност <i>Serratia</i> spp.....	101
6.7.6. Коагрегација са <i>E. faecalis</i>	103
6.7.7. Ензимска активност <i>Serratia</i> spp.....	103
6.8. Карактеризација врста из рода <i>Escherichia</i>	104
6.8.1. Осетљивост на антибиотици.....	104
6.8.2. <i>E. coli</i> O157 брзи латекс аглутинациони тест.....	105
6.8.3. Утицај еколошких фактора на планктонски раст <i>E. coli</i>	106
6.8.4. Способност формирања биофилма <i>E. coli</i>	112
6.8.5. Утицај еколошких фактора на биофилм <i>E. coli</i>	112
6.8.6. Адхезивна способност <i>E. coli</i>	115
6.8.7. Коагрегација са <i>E. faecalis</i>	116
6.8.8. Ензимска активност <i>E. coli</i>	118
6.9. Карактеризација врста из рода <i>Enterobacter</i>	119
7. Дискусија.....	121
8. Закључци.....	134
9. Литература.....	138
10. Прилози.....	161

Извод

Производња и конзумирање сира датира неколико хиљада година уназад тако да сир представља једну од најстаријих ферментисаних намирница. Традиционални сиреви су аутохтони за неко подручје и представљају културну баштину тог подручја. Производња аутохтоних млечних производа на територији Балканског полуострва је очувана вековима.

Процес ферментације је искоришћен за производњу млечних производа, киселог млека, маслаца, сирева и др. У сиру је присутна природна микрофлора коју чине бактерије млечне киселине које потичу из млека као сировине. Оне се развијају у сиру током зрења, а нису додате у облику стартера (сирила). Ензими поменуте микрофлоре имају значајну улогу у протеолитичким променама током зрења и доприносе формирању специфичних сензорних својстава сирева. Поменути део микрофлоре сирева је у највећој мери неконтролисан. Млечну киселину, као главни производ ферментације у анаеробним условима, стварају бактерије млечне киселине. Због присутне киселине, присутан је и карактеристични кисели укус сира. Поред бактерија млечне киселине, у природну микрофлору се убрајају и друге врсте бактерија које могу доспети у млеко. Сирово свеже, некувано млеко је извор многих врста бактерија без обзира од које врсте животиња се добија. Ентеробактерије су чиниоци нормалне флоре непастеризованих сирева и једни су од представника хетероферментативних бактерија. Варијабилност у бројности и заступљености врста је велика и варира у зависности од сезоне у којој се сир производи. Ентеробактерије могу да утичу на квалитет и сензорне карактеристике сирева.

Циљ ове докторске дисертације је утврђивање хемијских карактеристика и класификација до сада неистраженог аутохтоног млечног производа из Србије (сокобањски сир), утврђивање хигијенско – микробиолошког статуса сокобањског сира на основу присуства врста из фам. Enterobacteriaceae као индикатора, изолација ентеробактерија, њихова идентификација и формирање бактериотеке у оквиру Лабораторије за микробиологију ПМФ-а. Саставни део ових истраживања је анализа динамике бактерија са сезонског аспекта (пролеће, лето, јесен) производње сира. Утврђивање биохемијских особина идентификованих бактерија и поређење биохемијских и физиолошких особина изолата са стандардима – АТСС сојевима, као и проширивање укупних знања о врстама из природне бактериобиоте сокобањског сира са

аспекта контроле микроорганизама, повећања квалитета сира и смањења хигијенског ризика, а која укључују: осетљивост бактерија на антибиотике због могућности резистенције, као и испитивање способности аглутинације *E. coli*, испитивање карактеристика планктонског и биофилм раста изабраних врста ентеробактерија са посебним освртом на утицај еколошких фактора (температура, рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе), испитивање хидрофобности и способности адхезије за епител црева, испитивање коагрегација ентеробактерија са *E. faecalis* KGPMF 49, која је изолована из истог сира, испитивање липолитичке и протеолитичке активности бактерија и способности синтезе екстрацелуларних ензима.

Сокобањски сир је аутохтони прехранбени производ који се се прави од некуваног крављег млека, на традиционалан начин, у домаћинствима околине Сокобање (југоисточна Србија). По својим хемијским карактеристикама сокобањски сир припада младим, киселим сиревима, полумасним до пуномасним и полутврдим сиревима. Доминантну заједницу бактерија у сокобањском сиру чине аеробне мезофилне бактерије чија се бројност мења у односу на сезону у којој је сир прави и сирила која се користи у процесу добијања сира. Сирило је без бактеријских стартера. У оквиру бактериобиоте сокобањског сира идентификована су 32 изолата који су припадали врстама из родова *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* и *Enterobacter*. Изолати *E. coli* су доминатно присутни у пролећним узорцима (узорак 3), а изолати *Klebsiella* spp. су доминантни у сиру прављеном током лета и јесени где је коришћено сирило „Sirela“. У пролећним узорцима 1 и 2 нема ентеробактерија јер се користило хемијско сирило „Маја Рекордерка“ које је онемогућило појаву ентеробактерија. Врста *E. gergoviae* се појављује у летњим узорцима и његова појава се повезује са болешћу млечних жлезда животиње као и са лошијом хигијеном. Биохемијске и физиолошке особине изолованих ентеробактерија не одступају од стандарних сојева АТСС сојева. Бактерије пореклом из сокобањског сира су показале различит степен осетљивости према антибиотицима. 28 изолата су осетљива на хлорафеникол, стрептомицин и тетрациклин, а 4 (два соја *E. coli*, *S. marescens*, *S. odorifera*) изолата показују резистенцију на тетрациклин. Поједини сојеви *E. coli* поседују способност аглутинације. Познавање утицаја различитих еколошких фактора на раст изолованих врста је значајно са аспекта контроле бактерија, повећања квалитета и смањења хигијенског ризика. Познавање утицаја различитих еколошких фактора на биофилм изолованих врста је значајно са аспекта смањења хигијенског ризика. Утицај свих еколошких фактора на формирање и формирани биофилм је зависно од врсте. Ентеробактерије показују су низак степен хидрофобности зависну од растварача

(хлороформ < етил ацетат < ксилен). Утврђена је адхезивна способност *K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica* и *S. marcescens* за епител свињског црева. Изоловани сојеви поседују способност ступања у интеракције са бактеријама из других родова. Познато је да бактерије из фам. Enterobacteriaceae могу утицати на органолептичке особине сира али тестиране бактерије у овом докторату углавном нису показале протеолитичку и липолитичку активност. Ензимска активност бактерија, као и њихов раст у сиру је смањена због ниске рН које стварају бактерије млечне киселине и због веће концентрације NaCl.

Резултати ове дисертације доприносе бољем разумевању неистражене микрофлоре сокобањског сира. Иако су ентеробактерије непожељне у млечним производима, оне чине уобичајену микрофлору непастеризованог млека и производа који се добијају од таквог млека. Њихова бројност и активност је контролисана ниском рН сира и високом концентрацијом NaCl.

Summary

Production and consumption of cheese dates back several thousand years, so cheese is one of the oldest fermented foods. Traditional cheeses are autochthonous for some area and represent the cultural heritage of the area. The production of autochthonous dairy products in the territory of the Balkan area has been preserved for centuries.

The fermentation process is used for production of dairy products, sour milk, butter, cheese. In the cheese, a natural microflora is consisting of lactic acid bacteria derived from milk as a raw material or from environment. They are developing in cheese during ripening, but they are not added in the form of a starter (rennet). The enzymes of these microflora play an important role in proteolytic changes during ripening and contribute to the formation of specific sensory properties of cheese. Mentioned part of cheese microflora is largely uncontrolled. Lactic acid, as the main product of fermentation in anaerobic conditions, is produced by lactic acid bacteria. Due to the presence of acid, there is a characteristic acidic taste of cheese. In addition to lactic acid bacteria, other types of bacteria that can be found in the milk, are also a part of the natural microflora. Raw fresh, uncooked milk is the source of many types of bacteria, no matter what kind of animal is obtained. Enterobacteriaceae are members of the normal flora of non-pasteurized cheeses and they are one of the representatives of heterofermentative bacteria. The variability in the number and species representation is high and varies depending on the season in which the cheese is produced. Enterobacteriaceae can affect the quality and sensory characteristics of cheese.

The aims, of this doctoral dissertation is to determine the chemical characteristics and classification of the so far unexplored autochthonous dairy product from Serbia (Sokobanja cheese), to determine the hygienic - microbiological status of the Sokobanja cheese based on the presence of species from fam. Enterobacteriaceae, isolation of enterobacteria, their identification and collection of bacteria within the Laboratory for Microbiology of PMF. An integral part of this research is the analysis of the dynamics of bacteria from the seasonal aspect (spring, summer, autumn) of cheese production as well as determination of biochemical properties of identified bacteria and comparison of biochemical and physiological properties of isolates with standards - ATCC strains. Also, the aim was the expanding the knowledge of species from the natural bacteriobiota of the Sokobanja cheese from the aspect of control of microorganisms, increasing the quality of cheese and reducing hygienic risk, which include: the susceptibility of bacteria to antibiotics due to the possibility of resistance, as well as the examination of potential ability of agglutination of *E. coli*, examination of the characteristics

of planktonic and biofilm growth of selected types of enterobacteria with special emphasis on the influence of ecological factors (temperature, pH, concentration of NaCl, glucose and lactose); to test hydrophobicity and the ability of adhesion to gut epithelium, coaggregation enterobacteria with *E. faecalis* KGPMF 49, which has been isolated from the same cheese; lipolytic and proteolytic activity of the bacteria and the ability to synthesize extracellular enzymes.

Sokobanja cheese is an autochthonous product made from unwashed cow milk, in the traditional way, in the households of the Sokobanja region (southeastern Serbia). In its chemical characteristics, the Sokobanja cheese belongs to acidic, semi-fat-full-fat cheeses and semi-hard cheeses. The dominant bacterial community in the Sokobanja cheese consists of aerobic mesophilic bacteria whose number changes in comparison to the season in which the cheese is made and the cheese used in the process of cheese production. Bacterial starter was not added. 32 isolates, who belongs to the genera *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Enterobacter*, were identified. Isolates of *E. coli* are dominantly present in spring samples (sample 3) were isolates of *Klebsiella* spp. are dominant in cheese made during the summer and autumn where the "Sirela" was used as a rennet. In spring samples 1 and 2 there are no enterobacteria because a chemical rennet „Maja Rekorderka“ was used, which prevented the occurrence of enterobacteria. *E. gergoviae* appears in summer samples and its occurrence is associated with the disease of the animal's gastric glands as well as with poorer hygiene. The biochemical and physiological properties of isolated enterobacteria (except species from the genus *Serratia*) do not deviate from the standard strains of ATCC strains. Bacteria originating from Sokobanja cheese showed a different degree of antibiotic sensitivity. 28 isolates are susceptible to chlorophenol, streptomycin and tetracycline, and 4 isolates (two strains of *E. coli*, *S. marescens*, *S. odorifera*) showed resistance to tetracycline. Certain strains of *E. coli* have ability of agglutination. Knowing the influence of various ecological factors on the growth of isolated species is significant from the aspect of controlling bacteria, increasing the quality and reducing hygienic risk. Knowing the impact of various ecological factors on biofilm-isolated species is significant from the aspect of reducing hygienic risk. The influence of all ecological factors on the biofilm formation and formed biofilm was species dependent. Tested enterobacteria showed a low degree of hydrophobicity which is dependent to solvent (chloroform < ethyl acetate < xylene). The adhesive ability of *K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica* and *S. marcescens* for the pig epithelium was determined. Certain strains of fam. Enterobacteriaceae have ability to interacts with bacteria from another genera. It is known that bacteria from fam. Enterobacteriaceae may affect the organoleptic properties of the cheese, but

the tested bacteria in this doctoral dissertation, have not shown proteolytic and lipolytic activity. The enzymatic activity of bacteria, as well as their growth in cheese, is reduced. Low pH made by lactic acid bacteria and higher concentration of NaCl reduced their growth and enzymatic activity.

The results of this dissertation contribute to a better understanding of the unexplored microflora of Sokobanja cheese. Although enterobacteria are undesirable in dairy products, they form a common microflora of non-pasteurized milk and dairy products which are produced from them. Their number and activity are controlled by low pH of cheese and high concentration of NaCl.

Листа слика

Слика 1. Аутохтони сиреви Републике Србије са заштићеном ознаком географског порекла

Слика 2. Дејство пробиотика на гастроинтестинални тракт (модификовано)

Слика 3. Тамно плаве колоније *E. coli* на хромогеној подлози после инкубације 24 h

Слика 4. Изглед Microgen GN-ID Oxidase Negative теста после инкубације

Слика 5. Изглед микротитрационе плоче након додавања кристал виолета и етанола спремна за читавање резултата

Слика 6. Изглед Microgen GN-ID Oxidase Negative теста после инкубације 24 h и додавања одговарајућих реагенаса предвиђеним по упутству произвођача

Слика 7. Формирана пеликула А: *K. pneumoniae* KGPMF 11 на МХ; Б: *K. pneumoniae* KGPMF 11 на ТСБ; В: *K. pneumoniae* ATCC 70063 на МХ; Г: *K. pneumoniae* ATCC 70063 на ТСБ

Слика 8. 1. *K. ornithinolytica* KGPMF 9; 2. *K. pneumoniae* KGPMF 13; 3. Контрола ПБС; 4. Контрола неинакулисана ТСБ

Слика 9. 1. *K. ornithinolytica* KGPMF 9 + *E. faecalis* KGPMF 49; 2. *K. ornithinolytica* KGPMF 9; 3. *E. faecalis* KGPMF 49

Слика 10. 1. *S. marcescens* ; 2. Контрола ПБС; 3. Контрола неинакулисана ТСБ

Слика 11. 1- *E. coli* KGPMF 17 + *E. faecalis* KGPMF49; 2- *E. coli* KGPMF 17; 3. *E. faecalis* KGPMF 49

Листа табела

Табела 1. Параметри за ферментисане производе од млека

Табела 2. Коришћени апарати са њиховом наменом

Табела 3. Стандардне вредности пречника зона инхибиције раста бактерија

Табела 4. Хемијске карактеристике сокобањског сира

Табела 5. Дистрибуција ентеробактерија по сезонама

Табела 6. Биохемијске карактеристике врста из рода *Klebsiella*

Табела 7. Биохемијске карактеристике врста из рода *Escherichia*

Табела 8. Биохемијске карактеристике врста из рода *Serratia* и *Enterobacter*

Табела 9. Осетљивост врста из рода *Klebsiella* на антибиотике

Табела 10. Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Табела 11. Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Табела 12. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Табела 13. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Табела 14. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Табела 15. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Табела 16. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Табела 17. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Табела 18. Способност адхезије врста из рода *Klebsiella*

Табела 19. Коагрегација врста из рода *Klebsiella* са *E. faecalis* KGPMF 49

Табела 20. Активност протеазе и укупна количина протеина *Klebsiella* spp.

Табела 21. Активност киселе и алкалне инвертазе *Klebsiella* spp.

Табела 22. Активност амилазе и алкалне фосфатазе *Klebsiella* spp.

Табела 23. Осетљивост врста из рода *Serratia* на антибиотике

- Табела 24.** Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ
- Табела 25.** Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ
- Табела 26.** Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ
- Табела 27.** Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ
- Табела 28.** Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ
- Табела 29.** Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ
- Табела 30.** Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ
- Табела 31.** Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ
- Табела 32.** Способност адхезије врста из рода *Serratia*
- Табела 33.** Коагрегација врста из рода *Serratia* са *E. faecalis* KGPMF 49
- Табела 34.** Активност екстрацелуларних ензима врста из рода *Serratia*
- Табела 35.** Осетљивост врста рода *Escherichia* на антибиотике
- Табела 36.** Утицај различитих рН и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ
- Табела 37.** Утицај различитих рН и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ
- Табела 38.** Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ
- Табела 39.** Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ
- Табела 40.** Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ
- Табела 41.** Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ
- Табела 42.** Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ
- Табела 43.** Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ

Табела 44. Способност адхезије врста из рода *Escherichia*

Табела 45. Коагрегација врста из рода *Escherichia* са *E. faecalis* KGPMF 49

Табела 46. Активност екстрацелуларних ензима врста из рода *Escherichia*

Табела 47. Осетљивост *E. gergoviae* на антибиотике

Табела 48. Способност адхезије *E. gergoviae* у присуству растварача

Табела 49. Активност екстрацелуларних ензима врсте *E. gergoviae*

Листа графика

График 1. Стандардна крива за глукозу

График 2. Стандардна крива за тирозин

График 3. Стандардна крива за фосфор

График 4. Стандардна крива за малтозу

График 5. Стандардна крива за БСА

График 6. Заступљеност изолованих родова фам. Enterobacteriaceae

График 7. Утицај различите рН вредности на способност формирања и формирани биофилм *Klebsiella* spp. у ТСБ (*контрола раста)

График 8. Утицај различите рН вредности на способност формирања и формирани биофилм *Klebsiella* spp. у МХ подлози (*контрола раста)

График 9. Утицај различите концентрације NaCl на способност формирања и формирани биофилм *Klebsiella* spp. у ТСБ (*контрола раста)

График 10. Утицај различите концентрације NaCl на способност формирања и формирани биофилм *Klebsiella* spp. у МХ подлози

График 11. Утицај различите концентрације глукозе на способност формирања биофилма и формирани биофилм *Klebsiella* spp.

График 12. Утицај различите концентрације лактозе на способност формирања биофилма и формиран биофилм *Klebsiella* spp.

График 13. Утицај рН на способност формирања и формирани биофилм *Serratia* spp. (*контрола раста)

График 14. Утицај соли на способност формирања и формирани биофилм *Serratia* spp. (*контрола раста)

График 15. Утицај различитих концентрација глукозе на способност формирања и формирани биофилм *Serratia* spp.

График 16. Утицај различитих концентрација лактозе на способност формирања и формирани биофилм *Serratia* spp.

График 17. Утицај рН на способност формирања биофилма и формирани биофилм *E.coli* (*контрола раста)

График 18. Утицај NaCl на способност формирања биофилма и формирани биофилм *E. coli* (*контрола раста)

График 19. Утицај различитих концентрација глукозе на способност формирања биофилма и формирани биофилм *E. coli*

График 20. Утицај различитих концентрација лактозе на способност формирања биофилма и формирани биофилм *E. coli*

1. Увод

П

роизводња и конзумирање сира датира неколико хиљада година уназад тако да сир представља једну од најстаријих ферментисаних намирница. Сир је свежи или зрели млечни производ добијен из млека (обраног и пуномасног) издвајањем (помоћу сирила или млечне киселине) протеина, ма-сти и великог дела минералних материја. Сир се сматра алтернативним извором протеина. Садржи знатне количине масти, витамина, минерала, а посебно је значајан због високог садржаја калцијума. У сире се, током зрења, дешавају сложени биохемијски процеси при којима се поједини састојци знатно мењају и разлажу на простије компоненте, у односу на млеко које се користи за производњу сира (Vlahović i sar., 2018).

Према Guerrero et al. (2009) „Традиционални прехранбени производ је производ који се често конзумира на одређеном географском подручју или је повезан са специфичним прославама и/или сезонама. Начин прављења се, обично, преноси из генерације у генерацију, прецизно се израђује према гастрономском наслеђу, са мало или без обраде млека. Производ је познатих сензорних карактеристика повезаних са одређеним подручјем, регијом или државом”. Термин „традиционални сир“ може се применити на сиреве произведене на фарми или у малим млекарама на дефинисаном географском подручју и препознатљив је по својим карактеристичним сензорним својствима (Montel et al., 2014). Иако постоје различита мишљења о употреби непастеризованог млека и могућих хигијенских ризика, релативно је мали број епидемија које су проузроковани конзумирањем сирева од непастеризованог млека (Kousta et al., 2010; De Buyser et al., 2001; EFSA European Food Safety Authority, 2011, 2012).

Традиционални сиреви су аутохтони за неко подручје и представљају културну баштину тог подручја. Велики број сирева носи назив места порекла. Индустијски произведени сиреви широм света, потичу из аутохтоне производње. Тако је Швајцарска позната по „Emmental“ сиреу, Италија по „Parmesan“ сиреу, Холандија по „Edamer“ сиреу а Француска по низу сирева са плеснима као што су „Camembert“ и „Roquefort“ (Vlahović i sar., 2018).

1.1. Класификација сирева

На постојање различитих врста сира значајно утичу многи фактори: различити начини производње сира, климатски услови, врста животиње, њихова исхрана и др. Према Vlahović i sar., 2018, сиреви се могу разврстати на основу различитих особина:

Према врсти млека од које се сир производи:

- Кравље млеко
- Овчије млеко
- Козије млеко
- Сиреви од мешавине крављег са неком другом врстом млека и др.

Према врсти протеина:

- Казеински сиреви (од млека)
- Албумински сиреви (од сирутке)
- Казеинско-албумински сиреви

Према начину грушања млека:

- Кисели (свежи меки сиреви)
- Слатки (полумеки, полутврди и тврди сиреви)

Према учешћу масти у сувој материји сира:

- Екстра масни сиреви – садржи најмање 55% млечне масти
- Пуномасни сиреви – садржи најмање 50% млечне масти
- Масни сиреви – садржи најмање 45% млечне масти
- Тричетврт масни – садржи најмање 35% млечне масти
- Полумасни сиреви – садржи најмање 25% млечне масти
- Четврт масни сиреви – садржи најмање 15% млечне маст
- Посни свежи сиреви – садржи мање 15% млечне масти

Према учешћу воде у сиру:

- Јако тврди сир – мала количина воде (мање од 34%)
- Тврди сир – средња количина воде (34-45%)
- Полутврди сир – велика количина воде (45-55%)
- Полумеки/меки сир – јако велика количина воде (55-80%)

Према конзистенцији сира (удео воде у безмасном делу сира):

- Екстра тврди сиреви (мање од 51%)
- Тврди сиреви (49-56%)
- Полутврди сиреви (54-69%)
- Полумеки сиреви (више од 67%)
- Свежи меки сиреви (69-85%)

Према зрењу сира:

- Сиреви без зрења (свежи сиреви, сирни намази)
- Сиреви уз зрење (сиреви типа моззарелла)

1.2. Аутохтони сиреви Републике Србије

Производња аутохтоних млечних производа на територији Републике Србије је очувана вековима. захваљујући богатом културно историјском наслеђу, географском, климатском и биолошком диверзитету. У циљу очувања изворног облика различитих сирева који се традиционално производе у Републици Србији, извршена је заштита аутохтоних сирева на нивоу државе (Vlahović i sar., 2018). У Србији су на националном нивоу заштићени Кривовирски качкаваљ, Хомољски овчији сир, Хомољски козји сир, Хомољски крављи сир, Старопланински качкаваљ, Сјенички овчији сир, Сјенички крављи сир и Пиротски качкаваљ од крављег млека (Сл. 1).



Слика 1. Аутохтони сиреви Републике Србије са заштићеном ознаком географског порекла

(Приручник „Унапређење производње и пласмана сира“ - модификовано, према Пољопривредни факултет, Катедра за технологију анималних производа)

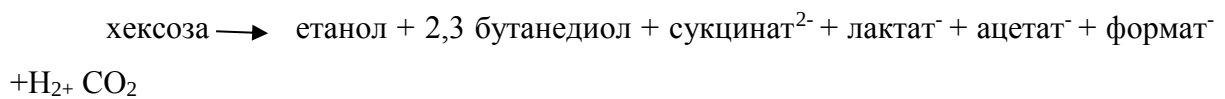
1.3. Ферментација и ферментациони производи

Ферментација (врење) је микробиолошки процес трансформације органских једињења нарочито угљених хидрата у алкоhole, киселине, алдехиде, кетоне и гасове. Ферментација се одиграва услед активности разних микроорганизама у средини богатој шећерима. Микроорганизми користе шећере као храну и преко сложеног система биохемијских реакција, преко низа прелазних једињења, трансформишу их у крајње продукте које отпуштају у спољашњу средину (Madigan et al., 2009).

Према крајњим продуктима који се добијају, ферментација може бити хомоферментативна: алкохолна (добија се етил-алкохол), млечна (млечна киселина), сирћетна (сирћетна киселина) или хетероферментативна где се као крајњи продукти добијају нпр. лактат, ацетат и др, етанол и CO₂ (Madigan et al., 2009).

Млечну киселину, као главни производ ферментације у анаеробним условима, стварају бактерије млечне киселине (БМК). Најпознатији представници БМК су: *Streptococcus lactis* (*Lactococcus lactis* – нов назив), *S. thermophilus*, *S. cremoris*, *S. citrovorus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *L. helveticum*, *L. casei*. Поједине наведене врсте се примењују у производњи млечних производа као стартер културе и чине нормалну микрофлору млека и млечних производа. (Sharpe, 1979; Madigan et al., 2009).

Поред бактерија млечне киселине, ентеробактерије су чиниоци нормалне флоре непастеризованог млека (Montel et al., 2014) и једни су од представника хетероферментативних бактерија. Приликом ферментације хексоза (глукозе или фруктозе) од стране поменутих бактерија добија се:



Врсте из родова, *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. припадају хетероферментативним бактеријама, при чему долази до добијања различитих крајњих производа нпр. бутанедиол је карактеристичан за поједине ентеробактерије, док друге продукују ацетат, етанол и др. (Madigan et al., 2009).

1.3.1. Сир као ферментисани производ

Сир је ферментисани прехранбени производ који се заснива на микробиолошкој ферментацији лактозе и коагулацији казеина након чега се формира груш.

Процес производње сира састоји се из 4 основне фазе:

- а) Коагулација млека и стварање груша (физичко-хемијска модификација казеина под утицајем протеолитичких фермената и млечне киселине, који мењају структуру казеина у коагулум – груш)
- б) Издавање сурутке (парцијална дехидрација груша, уз издавање растворљивих и других састојака млека)
- ц) Сољење (додавање потребне количине соли)
- д) Зрење (биохемијска трансформација састојака сирног теста под утицајем фермената и микроорганизама) (Bogojevski, 2011)

Микроорганизми и њихови ензими имају кључну улогу на процес зрења сира. Најзначајнија и примарна је ацидогена активност (трансформација лактозе у млечну киселину), чиме стартер културе утичу на повећање киселости, поптомажу процес

коагулације, регулишу садржај воде у сир чиме утичу и на текстуру и сензорна својства сира. Код сирева који сазревају, додате мезофилне-термофилне стартер културе (у зависности од типа сира) утичу и на разградњу протеина и млечних масти на примарне и секундарне продукте путем различитих биохемијских, хемијских и микробиолошких процеса (Fox, 1998). Бактерије стартер култура су активне током целог процеса производње сира и производња млечне киселине што представља главни биохемијски процес који се одвија током производње сира. Смањењем рН вредности млека казеинска мицела губи стабилност, коагулише се и прелази у стање гела (Fox, 1998). Деловањем стартера из алдехида, ацетона, диацетила, етил алкохола и неких испарљивих масних киселина настају млечна, пропионска и сирћетна киселина које утичу на укус и мирис сира (Tamime, 2003). Стартер културе које се користе у млекарству, по свом саставу и начину добијања деле су на две групе: традиционални стартери и стартери дефинисаног састава (Hynes et al., 2001):

- Традиционални стартери су мешовите (недефинисане) асоцијације микроорганизама и у њима се налазе и непожељне (колиформне) бактерије (Cogan and Accolas, 1995)
- Мешовити стартери су дефинисане мешавине више сојева познатих карактеристика а могу бити: мезофини, термофилни или мешавине и једних и других

Стартер културе за производњу белог меког сира:

- Мезофилне бактерије (*Leuconostoc lactis* ssp. *Lactis*, *Leuconostoc lactis* ssp. *cremoris*, *sojevi* roda *Leuconostoc*) (Bogojevski, 2011) – оптимална температура око 30°C, употребљавају се за већи број сирева (меки и полутврди)
- Термофилне бактерије (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* и *Lactobacillus helveticus*) (Bogojevski, 2011) – оптимална температура око 40°C (Bogojevski, 2011)

Сирила

Биохемијска реакција хидролизе казеина одвија се под дејством протеолитичких ензима који потичу из сирила или су бактериолошког порекла, из стартер култура. Најпознатији коагулант млека је телеће сирило (енг. rennet) које се добија из желуца младих преживара. У раним 60-тим годинама јавила потреба за алтернативним средставима за коагулацију млека јер је производња сирева била интезивнија. Од алтернативних сирила најважнија су микробна сирила произведена из врсте *Rhizomucor*

miehei и сирило из *Mucor pusillus*. Добијене су киселе протеазе или аспартат протеазе који су врло слични химозину (Repelius, 1998).

2. Преглед литературе

Бактерије у намирницама се могу наћи у две животне форме: у слободноживећем (плактонском) облику и у сесилном (биофилм) облику. Контаминација сира бактеријама се углавном врши након пастеризације, обично контактом са површином опреме која се користи у току технолошког процеса производње сира. Бактеријски биофилмови, који се могу наћи на овим површинама, су један од потенцијалних извора контаминације сира. Познато је да су бактеријски биофилмови отпорнији на процесе термичке обраде и дезинфекције (прање у детерџентима). У млекарској индустрији, бактеријски биофилм, који је формиран од нестартер бактерија, може бити бактеријски резервоар месецима, што се може неповољно одразити на исправност, текстуру и арому сира (Somers et al., 2001).

2.1. Фазе раста бактерија

Карактеристичне фазе у расту бактеријске популације могу се приказати кривом раста. Крива раста је графички приказ односа броја ћелија у популацији и времена инкубације културе и уочавају се четири фазе раста:

Lag фаза обухвата временски период од засејавања до почетка деоба ћелија. Број ћелија не расте, али се одвијају интензивни биохемијски процеси: синтеза протеина, нуклеинских киселина и др. Дужина трајања фазе зависи од старости културе, од количине хранљивих материја у медијуму и др.

Log фаза или експоненцијална фаза где долази до активне деобе ћелија у популацији. Брзина ћелијских деоба зависи од генетичких карактеристика врсте, састава медијума и спољашњих услова.

Стационарна фаза је фаза у којој број живих ћелија не расте. Број ћелија је константан. Код бактеријских култура раст се обично зауставља кад популација досегне 10^9 CFU mL⁻¹.

Фаза одумирања је фаза где долази до смањења укупног броја живих ћелија у популацији. Време одумирања зависи од карактеристика врсте (Simić, 1988).

2.2. Биофилм бактерија

Биофилм је заједница једне или више врста бактерија која је причвршћена за површину и уметнута у екстрацелуларни омотач изграђен од полисахарида и протеина које ћелије бифилма синтетишу (Donlan, 2002).

Фазе раста биофилма:

- Иницијална адхезија – причвршћивање плактонских бактерија за површину где ће бити формиран биофилм
- Иверзибилна адхезија – остварује се посредством продукције ектополисахарида где се бактерије не могу вратити у плактонски облик и остају причврћене за подлогу
- Формирање микроколонија или агрегација – резултат је раста и размножавања бактерија. Даљи развој биофилма је резултат прилепљивања нових бактерија уз континуалан раст и производњу ектополисахарида
- Сазревање биофилма – зрео биофилм подразумева бактеријске ћелије, екстрацелуларне полисахариде и интерстицијалне канале за воду који омогућавају размену хранљивих материја и елиминацију отпадних продуката метаболизма
- Дисперзија – током времена биофилм сазрева и долази до одвајања бактерија од његове структуре (Donlan, 2002)

Биофилм је постао велики изазов модерне науке и прехранбене индустрије јер онемогућава ефикасност процеса дезинфекције. Биофилм се сматра вишим еволутивним ступњем у организације живота код неспорогених бактерија, јер им омогућава успешно преживљавање у спољашњој средини и у неповољним условима (Prunić, 2017). Екстрацелуларни омотач доприноси заштити биофилма концентровањем нутријената, спречавањем приступа биоцида, метала и токсина и др. Бактерије у оквиру биофилма су отпорније на поједина санитарна средства него бактерије у суспензији. Раст биофилма у срединама где се производи храна доводи до могућности повећане микробиолошке контаминације производа. Биофилм може садржати бактерије које доводе до кварења. Из тог разлога присуство биофилма може да доведе до накнадне контаминације што има за последицу скраћење рока трајања као и ширења болести (Obradović, 2007). Не постоје процедуре или прописи о уклањању и дезинфекцији биофилмова. Дезинфекционо

средство се мора користити у концентрацији 10 до 100 пута већој од нормалне како би успео да инхибира организме у биофилму (Marriott and Gravani, 2006). Многа истраживања се заснивају на испитивању услова животне средине која ће смањити или онемогућити раст микроорганизама.

Стварање биофилма представља једну од главних особина и врсте *Pseudomonas aeruginosa* што омогућава врсти преживљавање у различитим, често неповољним условима животне средине (Vujić et al., 2016). *Listeria monocytogenes* је једна од најчешћих испитиваних организама због њене способности преживљавања на ниској температури. Резултати истраживања су показали да је најмања способност формирања биофилма сојева *L. monocytogenes* примећена на температури од 7°C (Tomićić i sar., 2016). *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Serratia* spp. су неки од представника фам. Enterobacteriaceae који поседују способност формирања биофилма (Rice et al., 2005; Beloin et al., 2008; Seifi et al., 2016; Prunić, 2017).

2.3. Фактори који утичу на раст и развој микроорганизама

За раст и развој микроорганизама потребни су повољни физички и хемијски услови животне средине, доступност нутријента и толерантан однос са другим организмима. Температура, рН средине, осмотски притисак и доступност кисеоника утичу на раст микроорганизама и спадају у абиотичке факторе животне средине (Ћомић, 1999). У биотичке еколошке факторе спадају специфични односи у које ступају међусобно микроорганизми. Успостављају се позитивни и негативни односи. Један од негативних односа је аменсализам-антибиоза где један микроорганизам продукује физиолошки активне супстанце (антибиотици) који инхибирају раст и развој других микроорганизама (Stefanović, 2016).

2.4. Основне карактеристике антибиотика

Антибиотици су супстанце које делују на раст и развој бактерија тако што убијају (бактерицидно деловање) или заустављају раст бактерија (бактериостатско деловање). Антибиотике продукују бактерије и гљивице. На постојање природних антибиотика је указао још 1928. године Александар Флеминг (Habrup, 2014). Први хемијски синтетисани антибиотици били су сулфонамиди произведени и примењени 1935. године. Полусинтетисани антибиотици настају када се природни антибиотици

хемијским процедурама модификују, ради побољшања неких њихових особина. Синтетисани антибиотици настају хемијским путем и зато се зову хемиотерапеутици (Jezdimirović, 2005).

Према механизму деловања антибиотици се деле се на (Lalošević i sar., 2011):

- Антибиотици који ометају биосинтезу ћелијског зида
- Антибиотици који ометају синтезу протеина (везивањем за субјединице рибозома)
- Антибиотици који ометају синтезу нуклеинских киселина
- Антибиотици који инхибирају метаболизам тј. синтезу фолата
- Антибиотици који инхибирају функцију цитоплазматске мембране

Најважније особине антибиотика су следеће:

- да поседују селективну токсичност – да делује ефикасно на узрочника инфекције, а да нема токсични ефекат на ћелије домаћина
- потребне концентрације лека за антибактеријски ефекат на месту деловања треба да буду постигнуте брзо, као и да лек остане довољно дуго у активном облику
- да је спектар деловања лека довољно широк да делује на већи број бактерија због могућих мешовитих инфекција
- структура лека треба да буде таква да отежа бактерији могућност да брзо развије своје механизме резистенције (Lalošević i sar., 2011)

Антибиотици од важности за докторску дисертацију:

Тетрациклини (хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин, доксициклин, миноциклин) су бактериостатски антибиотици који се након уласка у бактеријску ћелију иреверзибилно везују за рецепторе на 30S субјединици рибозома и блокирају приступ транспортне RNK комплексу рибозом – рибозомална RNK. Најважнији представници су окситетрациклин и доксициклин, чији је спектар деловања врло широк. Делују на аеробне и анаеробне Грам позитивне и Грам негативне бактерије, микоплазме, хламидије и рикетије (Lalošević i sar., 2011).

Хлорамфеникол је бактериостатик изолован 1947. године из *Streptomyces venezuelae*, а данас се добија из дихлорсирћетне киселине. Хлорамфеникол инхибира синтезу протеина (полипептида) тако што спречава везивање пептидилтрансферазе за 50S субјединицу рибозома. Делује бактериостатски на широк спектар Грам позитивних и Грам негативних бактерија, хламидија, рикеција и микоплазми. Забрањена је примена код животиња које се користе у исхрани људи због потенцијалног токсичног ефекта резидуа у млеку и месу животиња (Lalošević i sar., 2011).

Стрептомицин је антибиотик кога је изоловао, биохемичар и микробиолог, Селман Абрахам Њаксман, 1944. године, из бактерије *Streptomyces griseus*. Делује на већину Грам позитивних и Грам негативних бактерија и микоплазме (Lalošević i sar., 2011) тако што се везује за 30S субјединицу рибозома бактеријске ћелије и инхибира синтезу протеина (Leggett, 2017). Тешко се ресорбује из дигестивног тракта. За употребу у ветерини користи се као бактериостатик, док у већим дозама има бактерицидни ефекат (Lalošević i sar., 2011).

Резистенција на антибиотике

Откриће антибиотика донело је преокрет у борби човека са микроорганизмима и довело до широке примене ових лекова у терапији заразних обољења људи и животиња. Бактерије имају способност брзог размножавања и прилагођавања новим условима животне средине. Врло брзо развијају различите механизме који их чине отпорним, тј. резистентним на бројне антибиотике. Ако су бактерије резистентне на три или више група антибиотика, ради се о мултиплој резистенцији (Lalošević i sar., 2011). Отпорност бактерија на антимикробне лекове условљена је различитим, комплексним механизмима.

Механизми резистенције:

- Ензимском деструкцијом или инактивацијом лека
- Измена циљног ензима или измена циљног места деловања
- Измена структуре рибозома или промена на месту везивања антибиотика за рибозоме
- Измена пропустљивости ћелијских овојница, смањена пермеабилност спољашње и унутрашње мембране бактерија
- Промена DNK гиразе

- Измена метаболичког пута или „заобилажење“ инхибиције антибиотиком
- Активни ефлукс или појачана елиминација лека из бактеријске ћелије
- Измена „претходника“ места везивања у ћелијском зиду и алтернативни путеви синтезе пептидогликана

Антибиотска резистенција је актуелан, значајан и све већи проблем. Резистенција се може повећати уколико се антибиотици не примењују на адекватан начин, нарочито по питању избора антибиотика и времена отпочињања терапије. Из наведених разлога, препоручује се рационална примена антибиотика (Unić-Stojanović i sar., 2015). Антибиотици би требало да се користе једино за лечење бактеријске инфекције (Rice, 2008).

2.5. Микроорганизми у храни

У храни се појављује три типа микроорганизама: корисни, патогени и изазивачи кварења хране. Корисни микроорганизми укључују оне који могу довести до стварања нове хране или хранљивих састојака у процесу ферментације (нпр. БМК). Микроорганизми који узрокују кварење, својим растом и ензимским реакцијама, мењају храну кроз деградацију ароме, текстуре или боје. Патогени микроорганизми након уношења у организам људи преко контаминираних хране могу узроковати алиментарна обољења (интоксикације и токсикоинфекције) (Marriott and Gravani, 2006):

- Алиментарне интоксикације узрокују токсини микроорганизама које они излучују у храни током раста (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*)
- Алиментарне токсикоинфекције настају као последица уноса микроорганизама који изазивају болести (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella*). Поменуте врсте такође имају способност лучења ентеротоксина (Marinculić i sar., 2009)

2.6. Ентеробактерије: порекло, улога, значај

Примарно станиште већине врста ентеробактерија је гастроинтестинални тракт човека и топлокрвних животиња где доприноси процесима варења и здравственом стању човека у целини. Ентеробактерије су саставни део хуманог и анималног микробиома чији је најчешћи ефекат продукција биолошки активних материја (витамина, аминокиселина и сл.) и обезбеђивање заштите од потенцијалних патогена.

У здравом организму човека, корисне бактерије доминирају и контролишу раст и развој свих осталих микроорганизама. Корисне бактерије (аутохтона флора) чине природну баријеру (која може бити физичка или хемијска) и штите од осталих врста „лоших“ бактерија, гљивица, вируса, токсина и сл., који се уносе храном и пићем. Поред формирања физичке баријере – заузимање животног простора другим „лошим“ бактеријама, корисне бактерије производе различите супстанце – антифунгалне против гљивица, антивирусне – које разлажу вирусе, антибактеријске – против штетних бактерија, и на тај начин формирају хемијску баријеру (Ћомић, 1999).

Процењује се да око 500 до 1000 врста бактерија живи у гастроинтестиналном тракту човека (Grice et al., 2009; Rappas, 2009). Поред ентеробактерија, чиниоци микробиоте гастроинтестиналног тракта су бактерије млечне киселине, архее, гљиве, вируси и неке врсте протозоа. Њихов број и разноврсност зависе од функције и особности органа, као и од физиолошког стања и старости организма. Уношењем хране и воде, у желудац, доспева велики број микроорганизама који бивају неутралисани деловањем желудачног сока и ензима. Стога је желудац релативно стерилна средина. *Helicobacter pylori* је једина бактеријска врста која се налази у желуцу, јер показује висок степен толеранције на ниску рН. У танком цреву, број бактерија је већи, а у дебелом цреву се налази највећи број бактерија. Бактерије чине 40% флоре дебелог црева, а осталих 60% је сува маса измета (Guarner and Malagelada, 2003). Заједница микроорганизама се одликује сукцесијама, узрокованих физиолошким стањем и старењем организма. Цревни тракт новорођене бебе је стерилан. Прво се настањују бактерије млечне киселине које чине привремену, а касније и аутохтону заједницу црева. Како се повећава разноврсност исхране детета, тако долази и до насељавања све већег броја корисних бактерија (Ћомић, 1999).

У даљем тексту приказани су представници аутохтоне, опортунистичке и прелазне-транзитне флоре:

Аутохтона бактеријска цревне флора: *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *E. fecalis* и др.

Опортунистичка флора су условно патогени микроорганизми који чине нормалну флору, али при одређеним условима (на пример: пад имунитета) могу да изазивају болести. То су врсте бактерија из родова: *Clostridium*, *Proteus*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Providencia*, *Morganella* и др., затим гљиве *Candida albicans*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp и др.

Прелазну – транзитну флору чине различити микроорганизми, који се свакодневно уносе храном и пићем. Ова група микроорганизама (патогене бактерије, цисте паразита – протозоа, вируси – ентеровируси и др.) само пролазе кроз дигестивни тракт, уколико је дигестивни тракт домаћина насељен корисним бактеријама.

Поред бактерија у гастроинтестиналном тракту људи су присутне гљиве, посебно квасци. Најпознатије су врсте из рода *Candida*, због њихове способности да изазову обољења (Bernhardt and Knoke, 1997).

Архее су такође присутне у цреву човека, али за разлику од разних бактерија у цревима, број археа је доста мањи (Eckburg et al., 2005). Доминантна група су коменсалне метаногене архее, посебно врсте *Methanobrevibacter smithii* и *Methanosphaera stadtmanae* (Duncan et al., 2007). Врста *M. smithii* је веома важна у процесу варења полисахарида и уклањању вишка водоника из цревног тракта (Armougom et al., 2009).

Гастроинтестинални тракт човека и топлокрвних животиња одликује и присуство вируса. Ентеровируси могу изазвати различита обољења. Могу се преносити оралним путем преко конзумације заражене хране. Забележен је случај преноса вирусних инфекција преко сировог млека у Енглеској и Америци. Различити ентеровируси су изоловани из меса и шкољака (Appleton, 2003).

2.6.1. Интеракције између ентеробактерија и бактерија млечне киселине у гастроинтестиналном тракту

У оквиру заједнице се успостављају специфични односи међу популацијама микроорганизама. Између ентеробактерија и бактерија млечне киселине у гастроинтестиналном тракту се најчешће успоставља антагонизам (Сл. 2). Бактерије млечне киселине онемогућавају пренамножавање ентеробактерија, који су у одређеним условима могући патогени (Šušković i sar., 1997).

Могући механизми инхибиције између БМК и ентеробактерија:

Производња антибиотичких једињења: способност бактерија млечне киселине да производе антимиотичка једињења је добро позната, нпр. производња низина (*L. lactis*) (Mota-Meira et al., 2000).

Производња водоник пероксида: токсични ефекти водоник пероксида су доказани. Dahiya and Speck (1968) су идентификовали водоник пероксид као инхибиторни агенс у

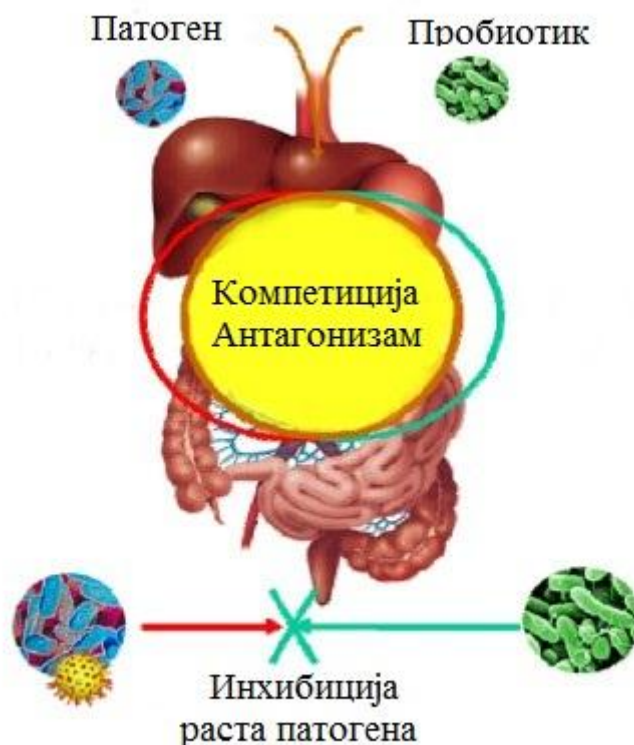
културама *L. lactis* и *L. bulgaricus* који су инхибиторно деловали на *Staphylococcus aureus*.

Недостатак хране – конкуренција за храну: Антагонистичка активност пробиотика на патогене бактерије могло би бити повезано са конкуренцијом за хранљиве материје (Gopal et al., 2001).

Производња киселине и промена pH: због великог ферментативног капацитета бактерија млечне киселине, метаболички производи, посебно произведене киселине, могу се сматрати потенцијалним инхибиторима. Инхибиторне особине киселина, као што су сирћетна, мравља и млечна киселина, су препознате као агенси инхибиције непожељних бактерија (Adams and Hall, 1988).

БМК су микроорганизми који се најчешће користе као пробиотици, јер су препознате као безбедне за коришћење и пожељно је њихово присуство у цревној флори. Пробиотици су чисте или мешане културе живих микроорганизма које, када се користе од стране човека или животиња, имају повољно деловање на домаћина побољшавајући особине постојеће микрофлоре (Topisirović i sar., 2000). Сматра се да пробиотици могу у великој мери да спрече деловање врсте *Enterobacter sakazakii* (нов назив *Cronobacter sakazakii*) (опортунистички патоген који изазива инфекције, најчешће код одојчади) на цревну флору (Collado et al., 2008).

Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus* може да синтетише бактериоцин булгарицин, који инхибира поједине Грам позитивне и Грам негативне бактерије. Неки сојеви стварају и H_2O_2 , који инхибира већину патогених бактерија. *Lactobacillus acidophilus* синтетише ацидолин, који снижава pH средине и тако делује инхибиторно на већину патогених бактерија (Simova et al., 2009). Симбиоза између *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) и *Streptococcus thermophilus* се огледа у томе што је раст *L. bulgaricus* стимулисан у присуству мравље киселине, коју продукује *S. thermophilus*, док је раст *S. thermophilus* стимулисан присуством слободних аминокиселина које се ослобађају приликом ферментације коју врши *L. bulgaricus* (Horiuchi and Sasaki, 2012).



Слика 2. Дејство пробиотика на гастроинтестинални тракт (модификовано)
(Culligan et al., 2009)

Као што је поменуто у предходном тексту, ентеробактерије се налазе нормално у цревној флори. Важно је истаћи да су оне међу најчешћим изазивачима кварења хране (Baylis et al., 2011). У једној од студија је испитивано деловање *L. curvatus* на *Enterobacter cloacae*. Уочено је да раст *L. curvatus* смањује рН подлоге и на тај начин спречава развој *E. cloacae*. На основу резултата, закључено је да пробиотске врсте могу да контролишу или спрече кварење хране од стране бактерија из фам. Enterobacteriaceae и Enterococcaceae (Malakar et al., 1999).

Могућност коришћења бактерија млечне киселине као биопрезерватива се изучава јер оне показују антимикуробни ефекат на потенцијалне патогене (*E. coli*, *L. monocytogenes*) (Fraga Cottelo et al., 2013).

2.7. Ентеробактерије – улога у прехранбеним намирницама

Поред бактерија млечне киселине, у природну микрофлору се убрајају и друге врсте бактерија које могу доспети у млеко. Сирово свеже, некувано млеко је извор многих врста бактерија без обзира од које врсте животиња се добија. Број бактерија је већи него број гљивица. Врсте из рода *Pseudomonas* се могу наћи као кодоминатне у охлађеном, свежем крављем млеку, док су бактерије млечне киселине и бактерије из фам. Enterobacteriaceae кодоминантне у овчијем и козијем сиру. Варијабилност у бројности и заступљености врста је велика и варира у зависности од сезоне у којој се сир производи (Desmasures and Guéguen, 1997; Michel et al., 2001).

Присуство ентеробактерија у прехранбеним намирницама је индикатор фекалног загађења, тј. недовољне хигијене током производње и чувања хране. Намирнице у којима се установи присуство ентеробактерија се сматрају здравствено неисправним. Према Водичу за примену микробиолошких критеријумима за храну („Sl. glasnik RS“, бр. 73/2010), обавезна је контрола на присуство врста из родова *Salmonella* и *Escherichia*.

Кварење хране се дефинише као „свака сензорна промена (промена у текстури, визуелна промена, промена ароме) коју конзумент сматра неприхватљивим. Кварење може настати због физичког оштећења производа, због активности аутохтоног ензима у животињском или биљном ткиву или контаминацијом микроорганизмима. Ензими могу довести до трансформације полимера у храни и до хемијске реакције која проузрокује кварење. Присуство веома опасних продуката бактерија и бактеријских спора често није откривено све до појаве тровања (Rawat, 2015). Поједине бактерије поседују способност продукције биогених амина који допринесе кварењу хране (Rawat, 2015). Кварење хране је често и резултат активности бактеријских ензима. *Pseudomonas* spp. је најчешће уочљив психротроф у сировом млеку, заједно са *Acinetobacter* spp. и *Hafnia alvei* (Martins et al., 2006, Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007; Ercolini et al., 2009). Ове бактерије су препознате као узрочници кварења млека, што може бити последица њихове протеолитичке и липолитичке активности (Hantsis-Zacharov and Halpern, 2007).

Hervet et al. (2016) показују да Грам негативне бактерије поседују способност преживљавања у ферментисаним млечним производима ниске рН вредности (грчки јогурт), при контаминацији након производње. Ради контроле и спречавања развоја патогених бактерија, препорука је да се млеко, као кварљива намирница, чува у фрижидеру до употребе.

2.8. Преглед родова фам. Enterobacteriaceae који се најчешће могу наћи у храни

У фам. Enterobacteriaceae се убрајају следећи родови: *Salmonella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Shigella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Erwinia*. Неки од ових родова су патогени и изазивачи великог броја различитих обољења (Govedarica i Jarak, 1995). Намирнице у којима се установи присуство ентеробактерија се сматрају здравствено неисправним (Cordier, 2006).

У наставку текста дат је детаљнији опис неких од чланова фам. Enterobacteriaceae који су од значаја за ову докторску дисертацију.

Под *Klebsiella*

Представници рода *Klebsiella* су непокретне, Грам негативне штапићасте бактерије са полисахаридном капсулом. Већина сојева поседује фимбрије. Фимбрије и капсула доприносе вируленцији јер омогућавају адхезију бактерија за епителне ћелије штитећи је од фагоцитозе. За поједине сојеве карактеристични су ентеротоксини. Добро се размножавају на хранљивим подлогама, на којима расту у виду великих, конвексних, сјајних, мукозних, сивкастобелих, често сливених колонија. Ферментишу велики број угљених хидрата, уз продукцију киселине и гаса (лактоза позитивне бактерије). Широко су распрострањене у природи, налазе се у земљи, води као и у интестиналном тракту људи и животиња. Значајни су узрочници опортунистичких инфекција нарочито у болничким установама у којима су најчешће присутни мултирезистентни сојеви (Pecić i Jelesić, 2005).

Врсте рода *Klebsiella* које су од значаја за дисертацију:

***Klebsiella oxytoca*:** првобитно позната као *Aerobacter aerogenes*, а касније идентификована као *K. pneumoniae*. Након што је у оквиру врсте утврђено постојање индол позитивних бактерија које су способне да расту на мелезитози, али не на 3 – хидроксибутирату, детерминисана је *K. oxytoca* као посебна врста. *K. oxytoca* као и остале *Klebsiella* spp., се могу наћи у разним условима животне средине и смарају се узрочницима опортунистичких инфекција (Podschun and Ullmann, 1988).

***Klebsiella pneumoniae*:** добро се размножава на обичним хранљивим подлогама, на којима расте у облику великих конвексних, сјајних, мукозних колонија, вискозне конзистенције. Чест је узрочник обољења респираторног и уринарног тракта (Paczosa and Mecsas, 2016). Патогеност ове бактерије се заснива на присуству дебеле капсуле која окружује бактерију и штити је од фагоцитозе домаћина. Ова бактерија се може наћи у

земљишту, води, канализацији и гастроинтестиналном тракту људи и животиња (Švabić-Vlahović i sar., 2008).

Klebsiella ornithinolytica: сврстава се у бактерије које учествују у производњи хистамина (Kanki et al., 2002). Људске инфекције изазване овом бактеријском врстом су ретке (Morais et al., 2009; Nakasone et al., 2015). *K. ornithinolytica* насељава и водене средине (Seng et al., 2016).

Под *Escherichia*

У оквиру рода *Escherichia*, највећи медицински значај има *Escherichia coli* (Feng et al., 2002; Pecić i Jelesić, 2005). Примарно станиште ове врсте је гастроинтестинални тракт човека и топлокрвних животиња. *E. coli* добро расте на свим подлогама. Размножава се при температурама од 10°C до 46°C, а оптимално се размножава на 37°C. Термичком обрадом намирница на температури од 60°C у трајању од 15 минута сматра се да су уништене све ћелије *E. coli*. Минималан рН за раст је 4.3. *E. coli* је осетљива на хлор и хлорна једињења, док према различитим антибиотцима и хемотерапеутицима врло брзо постаје резистентна (Fotadar et al., 2005). *E. coli* припада нормалној флори гастроинтестиналног тракта људи и животиња и доприноси његовом добром функционисању (користе метаболичке продукте човека као нутријенте и на тај начин „чисте“ организам од непотребних продуката, омогућавају ферментацију шећера, потпомажу варење хране и др). Приликом пада имунитета и/или њиховом пренамножавању или њиховим продором у друге системе органа долази до појаве опортунистичких инфекција (Ћомић, 1999). Обољења које изазива *E. coli* увек су у вези и са лошим хигијенским условима живота као и припремања хране (Bem i Adamič, 1991).

Инфекције гастроинтестиналног тракта најчешће су изазване неком од следећих сојева:

- Ентеротоксигени сојеви *E. coli* узрочници су дијареје код човека, свиња, оваца, коза, паса и коња
- Ентеропатогени сојеви *E. coli* доводе до дијареје код човека, зечева, паса, мачака и коња. Веома често ови сојеви изазивају диареју код новорођенчади
- Ентероинвазивни сојеви *E. coli* могу се јавити само код људи. Доводе до механичке деструкције ћелија зида дигестивног тракта човека, тако што продиру кроз слузокожу црева и на тај начин доводе до њеног запаљења
- Ентерохеморагични сојеви *E. coli* пронађени су код човека, телади и коза

- Ентероагрегативни сојеви *E. coli* налазе се само код људи. Доводе до појаве водене диареје код људи, а често и код новорођенчади. Ови сојеви нису инвазивни (Todar, 2007)

Род *Serratia*

Као и остали чланови фам. Enterobacteriaceae, припадници врста из рода *Serratia* се могу наћи у земљи, води и у гастроинтестиналном тракту људи и животиња. У клиничким узорцима је највише заступљена врста *S. marcescens* (Pecić i Jelesić, 2005). У односу на податке о клиничким изолатима који припадају роду *Serratia*, мање има података о изолатима пореклом из прехранбених производа и природних станишта. Врсте рода *Serratia* које су од значаја за дисертацију:

S. marcescens је Грам негативна бактерија (Carricajo et al., 1999; Ciragil et al., 2006) за коју је доказано да може изазивати инфекције у системима органа, а нарочито инфекције респираторног и уринарног тракта (Grimont and Grimont, 2006; Friedman et al., 2008; Buffet-Bataillon et al., 2009). Род *Serratia* је класификован као члан фам. Enterobacteriaceae, а тренутно се састоји од 14 признатих врста са 2 идентификоване подврсте (Mahlen, 2011). Студије показују да је 65% свих „*Serratia*“ инфекција, укључују *S. marcescens* као најчешће изоловану врсту (Laupland et al., 2008). Према Ochieng et al. (2014) *S. marcescens* има афинитет према епителним ћелијама црева и може довести до низа нежељених промена.

S. odorifera је врста чије се име први пут појављује у Approved Lists of Bacterial Names (Skerman et al., 1980). *S. odorifera* биогруп 1 изазива инфекције код људи (Chmel, 1988). Од других сојева се разликује по ферментацији раманоze и по мирису који подсећа на мирис кромпира. Описана су два биотипа врсте *S. odorifera* (Grimont and Grimont, 2006).

Род *Enterobacter*

Припадници рода *Enterobacter* широко су распрострањени у природи, земљишту, води и у интестиналном тракту људи и животиња. То су покретне, Грам негативне штапићасте бактерије, који су за животиње опортунистички патогени, нарочито врсте *E. aerogenes* и *E. cloacae*. Често се изолују у случајевима маститиса код говеда, утериних инфекција код коња, уринарних инфекција паса и инфекција рана код многих врста животиња. Код људи, *Enterobacter* spp. често изазива болничке инфекције уринарног и респираторног тракта, рана и опекотина (Lalošević i sar., 2011).

Род *Salmonella*

Данас је познато више врста из рода *Salmonella*, а болести код људи најчешће изазивају *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. pullorum* и *S. enterica* (Arsenijević, 1999). Синтетишу ендотоксин, који је по свом саставу глицидо – липидо – полипептидни комплекс. Ретко синтетишу егзотоксин. Према Bem and Adamič (1991) инфекција бактеријама из рода *Salmonella* најчешће има следеће токове:

сточна храна → животиње → намирнице → човек

Животне намирнице пореклом од здравих животиња, могу се накнадно контаминирати нехигијенским поступцима обраде хране, употребом хигијенски неисправне воде, излучевинама заражених глодара, преко инсеката, као и неадекватним поступцима у току транспорта, чувања и дистрибуције хране. Салмонелозе код човека настају након конзумирања меса, млека и јаја, која потичу од заражених животиња и њихових производа, или накнадно контаминираних. Контакт са зараженим животињама и водом су знатно ређи начин преношења. Салмонелозе се код људи јављају током целе године, а најчешће лети и почетком јесени (Isaacs et al., 2005).

Род *Proteus*

Врсте рода *Proteus* (*Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, *P. inconstans*) су широко распрострањене у природи: у земљишту, води, намирницама, органским материјама које труле (Coker et al., 2000). Размножавају се у температурном опсегу од 0 до 43°C. Осетљиве су на температуру и повећану влажност, па их влажна топлота од 55°C убија за 1 h. *Proteus* spp. се могу наћи у намирницама које имају рН изнад 4, а не налазе се у сувим, киселим и термички обрађеним намирницама, уколико су задовољени сви хигијенски услови у току припреме, производње и чувања (Bem i Adamič, 1991).

Род *Shigella*

Shigella врсте, које најчешће изазивају болести код људи су *Shigella dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. boydii* и *S. sonnei*. *S. dysenteriae* је позната као изазивач дизентерије (Todar, 2006). *Shigella* врсте луче шига токсин, који када доспе у ћелију домаћина инхибира синтезу протеина и изазива хемолитичко уремички синдром. Овај токсин захтева специфичне рецепторе на ћелијама домаћина за које се прво везује, а затим продире у

ћелије. Неке животиње, као што су телад, свиње и јелен, немају ове рецепторе, али могу бити преносиоци овог токсина преко својих излучевина (Todar, 2006).

2.9. Ентеробактерије као чиниоци у формирању укуса сира

Сензорне карактеристике сира направљеног од некуваног млека, су сматране као боље од стране потрошача у односу на сиреве од непастеризованог млека (сиреве са „недостатком укуса“) (Chambers et al., 2010; Colonna et al., 2011). Сиреви од некуваног, свежег млека су богатији микрофлором и самим тим, интензивнијим укусима (Grappin and Beuvier, 1997; Beuvier and Buchin, 2004; Bachmann et al., 2011; Van Hekken, 2012). Пастеризација денатурише млечне ензиме као што су протеазе или липазе (Hayes et al., 2001; Hickey et al., 2007) и смањује ниво млечне природне микрофлоре и пратећих ензима, а они су важни при процесу прављења сира. Пастеризација утиче и на горчину сира, јер доводи до деградације горких пептида (Beuvier et al., 1997). У сиревима од непастеризованог млека често се могу наћи ентеробактерије (Montel et al., 2014).

Произвођачи сирева говоре о утицају Грам негативних бактерија на укус традиционалних сирева. Сиреви од сировог млека углавном имају већу количину ароматичних једињења (киселине, алдехиди, алкохоли, естери и сумпорна једињења) (Beuvier and Buchin, 2004). Ентеробактерије имају способност да продукују велику број ароматичних једињења и могу да метаболишу цитрат, липиде и протеине (Chaves-López et al., 2006; Zago et al., 2007). На површину меког сира, инокулиран је *Proteus vulgaris* (10^5 CFU g⁻¹) и након зрења сира, достигао је бројност 10^9 CFU g⁻¹. Тада је примећен повећан ниво кетона, алдехида, алкохола и естара, али не и сумпорних једињења (Deetae et al., 2009). Irlinger et al. (2012) су инокулисали *Psychrobacter celer* (10^6 CFU g⁻¹) у сир. Када је раст достигао више од 10^9 CFU g⁻¹ током сазревања, врста је смањила бактеријски биодиверзитет сира. Директно или индиректно, *P. celer* је омогућио ароматичну комплексност захваљујући производњи алдехида из аминокиселина и кетона из масних киселина (Irlinger et al., 2012). У истом моделу сиреви су инокулисани са врстом *Hafnia alvei*, и сир је био богатији сумпорним једињењима. Грам негативне бактерије могу да производе и биогене аminer (Maifreni et al., 2013; Marino et al., 2000, 2008; Martuscelli et al., 2005) који могу утицати на кварање производа (Dogan and Boor, 2003; Franciosi et al., 2011).

2.10. Превенција кварења хране

Многи прехранбени производи су подложни кварењу и захтевају заштиту од кварења током њихове припреме, складиштења и дистрибуције. Прехранбени производи се често продају у подручјима света далеко од њихових производних локација, и због тога се јавља потреба за продуженим безбедним роком трајања. Системи за чување, као што су грејање, хлађење и додавање антимикуробних једињења, могу се користити за смањење ризика од кварења хране. Међутим, ове технике често имају негативан утицај на органолептичке карактеристике производа и доводе до губитака хранљивих материја (Rawat, 2015).

Најчешћи конзерванси који се користе су слабе органске киселине, на пример сирћетна, млечна, бензоева и сорбинска киселина. Ове киселине инхибирају раст бактерија и гљива, а сорбинска киселина инхибира клијање и раст бактеријских спора (Rawat, 2015). Киселост и стерилизација производа су третмани који су кључни фактори у контроли патогених бактерија које формирају споре.

Поред киселина, као конзерванси и адитиви (супстанца или мешавина супстанци) се користе и со, шећер, декстроza, зачини, сирће, соли сумпорне, проприонске, млечне и сорбинске киселине, CO₂, нитрати и др. (Rawat, 2015). Механизам конзервације шећером се заснива на повећању осмотског притиска и изазивању плазмолизе ћелија губитком воде. Концентрација шећера од 68 – 70% се користи за припрему џемова, желеа, мармелада и сл.

Висока концентрација соли такође ограничава раст бактерија. Соли повећавају осмотски притисак и изазива плазмолизу ћелија губитком воде, везују воду и самим тим смањују влажност намирница, смањују растворљивост кисеоника у води, чине ћелију осетљивом на CO₂. Концентрација од 15 – 20% соли се користи за конзервирање зимнице (Rawat, 2015). Међутим, психотрофне бактерије могу расти и производити липазе на хладном сланом путеру ако влага и со нису равномерно распоређени (Lindow and Brandl, 2003). Температура, концентрација соли и pH су најважнији фактори који одређују да ли ће, уколико их има, бактерије покварити храну (Rawat, 2015).

2.11. Законски прописи у Србији о технологији производње сира по „Правилнику о квалитету сировог млека”

Параметри о квалитету млека у Србији су дефинисани у „Правилнику о квалитету сировог млека” (Sl. glasnik RS, br. 106/2017).

У складу са Правилником, сирово млеко мора да испуњава следеће услове:

- минимум 3,2% млечне масти
- минимум 3,0% протеина
- минимум 8,5% немасне суве материје
- густина 1,028 – 1,034 g/cm³ на 20°C
- pH 6,5 – 6,7
- киселост 6,6 – 6,8°SH
- тачка замрзавања не виша од -0,520°C
- алкохолна проба негативна на 72% садржаја етил алкохола

Сирово млеко не сме да садржи резидуе пестицида, метала, металоида и других штетних супстанци, као и резидуе хемиотерапеутика, анаболика и других штетних материја. Не може да садржи механичке нечистоће, додатну воду, као и промене настале као последица обољења вимена – маститиса.

Према Водичу за примену микробиолошких критеријума за храну (2011) за микробиолошку анализу се ферментисаних производа, узима се по пет узорака. Бројност *E. coli*, квасаца и плесни не сме прећи М вредност (Табела 1).

Табела 1. Параметри за ферментисане производе од млека

Категорија производа	Микроорганизам	Број узорака	Граничне вредности	
			м	М
Ферментисани производи од млека	<i>E. coli</i>	5	10 CFU g ⁻¹	10 ² CFU g ⁻¹
	Квасци и плесни	5	10 CFU g ⁻¹	10 ² CFU g ⁻¹

Према Водичу за примену микробиолошких критеријума за храну, 2011 (модификовано)

3. Циљеви рада

Циљ ове докторске дисертације је упознавање заједнице и улоге ентеробактерија у сокобањском сиру и прошире фундаментална знања о изолованим врстама. Из наведеног општег циља, произилазе посебни циљеви:

- Утврђивање хемијских карактеристика и класификација до сада неистраженог сира са подручја Сокобање.
- Утврђивање хигијенско – микробиолошког статуса сокобањског сира на основу присуства врста из фам. Enterobacteriaceae као индикатора.
- Изолација ентеробактерија из аутохтоне врсте сира са подручја Сокобање, њихова идентификација и формирање бактериотеке у оквиру Лабораторије за микробиологију ПМФ-а. Саставни део ових истраживања је анализа динамике бактерија са сезонског аспекта (пролеће, лето, јесен) производње сира.
- Утврђивање биохемијских особина идентификованих бактерија и поређење биохемијских и физиолошких особина изолата са стандардима – АТСС сојевима.
- Проширивање укупних знања о врстама из природне бактериобиоте сокобањског сира са аспекта контроле микроорганизама, повећања квалитета сира и смањења хигијенског ризика, а која укључују:
 - осетљивост бактерија на антибиотике као и испитивање аглутационе способности изоловане *E. coli*
 - испитивање карактеристика планктонског и биофилм раста изабраних врста ентеробактерија са посебним освртом на утицај еколошких фактора (температура, рН, концентрација NaCl, глукоза и лактоза)
 - испитивање хидрофобности и способности адхезије за епител црева
 - испитивање коагрегације ентеробактерија са *Enterococcus faecalis* KGPMF 49, који је изолован из истог сира
 - испитивање екстрацелуларних ензима изолованих врста

Добијени резултати треба да употпуне и прошире сазнања о присуству, улози и заједници ентеробактерија у бактериобиоти сокобањског сира. Да помогну у разумевању присуства ентеробактерија као чиниоцу нормалне микрофлоре и значаја који имају у квалитету и формирању специфичног укуса и ароме традиционалних непастеризованих млечних производа у целини.

4. Материјал

4.1. Аутохтони сокобањски сир

Сокобањски сир анализиран у овој докторској дисертацији се производи у селима из околине Сокобање. Сиреви су прављени у домаћинствима села Језеро, Дуго Поље и Читлук, на традиционалан начин. Домаћинства у којима је сир произведен су изабрана на основу информација добијених од домаћина о начину прављења сира.

Поступак производње сокобањског сира

Сокобањски сир се производи од свежег, пуномасног, некуваног млека. Свеже, пуномасно кравље млеко се након муже (ујутру и увече) цеди, а затим догрева до температуре од 30 – 40°C. У загрејано млеко се додаје сирило у количини препорученој од произвођача („Sirela“ (Чачак, Србија) или „Маја rekorderka“ (Сталаћ, Србија)). Брзина и време грушања зависи од температуре и од врсте сирила приликом прављења сокобањског сира и обично траје пола сата. Груш се меша дрвеном кутлачом или варјачом, а потом се цеди док не изађе сва сурутка. Обликовање сирне груде се врши плочастим каменом тежине до 1 kg. Време пресовања је неколико сати. После пресовања добија се сирна погача пречника 28 ± 3 cm, а дебљине 4,5 cm. Сирна погача се сече на кришке неправилног облика, димензија 12 x 16 x 4,5 cm. Сољење се врши сувом кухињском сољу, 6 – 8% од укупне тежине сира, а сушење сира је на вазудуху. Посољен и осушен сир се налива саламуром (слана и прокувана сурутка или вода) и чува до продаје. Зрење као фаза технолошког процеса је изостављена јер се на овај начин добија млади сир од свежег некуваног млека. Сир се одмах конзумира или се складишти на температури до 10°C. Сир се не пакује већ се продаје у пластичним посудама или кесама.

Карактеристике течног сирила или маје која је коришћена у процесу прављења сира из околине Сокобања

У процесу прављења сокобањског сира се користе сирила „Sirela“ (Чачак, Србија) или „Маја rekorderka“ (Сталаћ, Србија). Наведена сирила не садрже метаболички активне бактеријске стартер културе.

„Sirela“ је течно сирило микробиолошког порекла на бази химозина добијеног од гљиве *Rhizomucor miehei* и *Mucor miehei*. Дозирање је прилагођено како у употреби у домаћинству, тако и за потребе млекарске индустрије при производњи различитих врста сирева. Осим сирила „Sirela“ користи се и „Маја rekorderka“, која садржи бензоеву и сорбинску киселину (1,2%) у односу 1:5000.

4.2. Хранљиве подлоге

Основне хранљиве подлоге коришћене у експерименталном раду докторске дисертације су:

❖ Хранљиви агар (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак.....15,0 g
- Месни екстракт3,0 g
- Натријум хлорид5,0 g
- Калијум хидрогенфосфат.....0,3 g
- Агар18,0 g

❖ Триптон соја бујон-ТСБ (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон из казеина.....17,0
- Пептон из соје.....3,0
- D (+) глюкоза монохифрат..... 2,5
- Натријум хлорид.....4,0
- Ди-калијум хидроген фосфат.....2,5

❖ Милер-Хинтон бујон-МХ (Торлак, Београд, Србија)

- Казеин хидролизат кисели.....17,5 g
- Месни екстракт.....2,0 g
- Скроб.....1,5 g

❖ Милер-Хинтон агар (Торлак, Београд, Србија)

- Казеин хидролизат кисели.....17,5 g
- Месни екстракт.....2,0 g
- Скроб.....1,5 g
- Агар.....17,0 g

Од селективних подлога коришћене су:

❖ Ендо агар (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак.....10,0 g
- Лактоза10,0 g
- Калијум хидрогенфосфат.....3,5 g
- Натријум сулфит2,5 g
- Агар15,0 g
- Фуксин0,4 g

❖ MacConkey бујон (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак.....20,0 g
- Лактоза.....10,0 g
- Жучне соли5,0 g
- Натријум хлорид.....5,0 g
- Бромкрезол пурпур0,01 g

❖ Андраде пептонска вода (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак.....10,0 g
- Натријум хлорид.....5,0 g
- Фуксин С0,01 g

❖ Андраде Лактоза пептонска вода (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак.....10,0 g
- Лактоза10,0 g
- Натријум хлорид.....5,0 g
- Фуксин С0,01 g

❖ Троструки шећер (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак20,0 g
- Месни екстракт.....3,0 g
- Екстракт квасца3,0 g
- Лактоза10,0 g
- Сахароза.....10,0 g
- Декстроза1,0 g
- Натријум хлорид5,0 g
- Гвожђе (III)-амонијумцитат0,3 g
- Натријум тиодульфат0,3 g
- Агар12,0 g
- Фенол црвено0,024 g

❖ Метил црвено подлога (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак.....7,0 g
- Декстроза5,0 g
- Калијум хидрогенфосфат.....5,0 g

❖ Simmons-ov цитратни агар (Торлак, Београд, Србија)

- Амонијум хидрогенфосфат1,0 g
- Калијум хидрогенфосфат1,0 g
- Натријум цитрат.....2,0 g
- Натријум хлорид5,0 g
- Магнезијум сулфат.....0,2 g
- Агар15,0 g
- Бромтимол плаво0,08 g

❖ Пептонска вода (Торлак, Београд, Србија)

- Пептон Торлак10,0 g
- Натријум хлорид5,0 g

❖ HiCrome Coliform агар (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs/Швајцарска)

- Пептон3,0 g
- Натријум хлорид.....5,0 g
- Дикалијум хидроген фосфат.....3,0 g
- Калијум дихидроген фосфат.....1,7 g
- Натријум пируват.....1,0 g
- Триптофан1,0 g
- Натријум лаурил сулфат.....0,1 g
- Хромогени микс.....0,2 g
- Агар2,0 g

Стерилизација коришћених подлога као и одређивање рН и других параметара (очитавање резултата) је вршено на начин који је предвидео сваки произвођач.

4.3. Апарати и инструменти

Апарати и инструменти коришћени у експерименталном раду приказани су у Табели 2.

Табела 2. Коришћени апарати са њиховом наменом

Назив апарата	Основна намена
Суви стерилизатор (Instrumentaria, Загреб)	Стерилизација лабораторијског посуђа од стакла
Аутоклав (VX-55 Systec, Немачка)	Стерилизација хранљивих подлога, пластичног прибора
Инкубатор (Сутејска)	Раст бактерија под оптималним условима
Ламинарна комора (F8-42 Termovent)	Рад под стерилним условима
McFarland дензитометар (Biosan, Latvia)	Одређивање густине бактеријске суспензије
Вортекс (VELP, Scientifica, Italy)	Хомогенизација узорка
Ротациона мешалица (PSU-20I, Енглеска)	Квантитативна анализа узорка
Спектрофотометар (Iskra, Крањ, Словенија)	Квантитативна анализа узорка
Читач микротитарских плоча (Елиза читач) (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China)	Квантитативна анализа узорка
Бутирометар (Funke Gerber, Немачка)	Одређивање садржаја масти
Герберова центрифуга (Funke Gerber, Немачка)	Центрифугирање садржаја у бутирометру
Центрифуга (Hermle Labortechnik GmbH, Wehingen, Germany)	Издавање супернатанта из узорка
рН-метар (inoLab 7110, Немачка)	Одређивање рН вредности
рН-метар (HANNA instruments, Румунија)	Одређивање рН вредности
Водено купатило (Inako, Загреб, Хрватска/Vk6ERN)	Одвијање хемијских реакција на повишеној температури
Флуоресцентни микроскоп (Nikon, Ti-Eclipse, 400x, Аустрија)	Фотографисање адхезије бактерија за епител црева

5. Методе

Сваки узорак младог сира (300 g) је узет из различитих домаћинстава (узорци сирева су обележени бројевима према селу где су узорковани: Језеро (1), Дуго Поље (2), Читлук (3), у три годишња аспекта (пролеће (П), лето (Л) и јесен (Ј)). Обзиром да производња није у контролисаним условима већ зависи од временских и других услова узорковање је у сваком домаћинству обављано три пута годишње (три сезонска аспекта). Одабир узорака је извршен на основу информација добијених од домаћинстава о начину прављења сира. Узорци су асептично траспортовани до лабораторије за микробиологију, Института за биологију и екологију, ПМФ-а, Универзитета у Крагујевцу. Узорци су чувани на 4°C у фрижидеру, без додавања слане воде. Асептично је одмерено 10 g сира који се користи за анализе стерилном кашиком са површине, средине и са дна узорка сира. Сваки узорак сира је узет и пренет у асептичне услове према Водичу за примену микробиолошких критеријума за храну. Микробиолошко истраживање је вршено на 3 – 4 дана старом сиру.

5.1. Хемијска анализа сира

Да би се одредиле хемијске карактеристике сокобањског сира и извршила његова карактеризација извршене су следеће анализе:

Одређивање количине воде у сиру: у претходно осушену, охлађену и измерену алуминијумску посуду, измерено је 2 до 3 g припремљеног узорка сира, са тачношћу од 0,001 g. Затим је посуда са узорком сушена један до два часа на температури од 105°C ± 2°C. Сушење је понављано док разлика између два узастопна мерења није била мања од 1 mg. На истом узорку испитивања су изведена у два понављања. (Katić, 2007).

Садржај воде у материји без масноће израчунава се према формули:

$$[\text{количина воде у сиру} \times 100] / [100 - \text{количина масти у сиру}] \quad (1)$$

Одређивање масти у сиру: садржај масти је одређиван ацидобутирометријском методом (Katić, 2007). Узорак добро хомогенизованог сира (3 g) је лаганим покретима сипан у бутирометар. С горње стране бутирометара додато је пипетом 10 mL сумпорне киселине (Merck, Немачка) и бутирометар се загревао у воденом купатилу на 65°C уз повремено мућкање, да би се беланчевине сира сасвим раствориле. Кад су се беланчевине раствориле, у бутирометар је додато 1 mL амил-алкохола (Merck, Немачка). Потом је кроз горњи отвор бутирометра додато онолико сумпорне киселине колико је потребно да горњи менискус достигне број 35 на скали. Бутирометар је постављен у Герберову центрифугу и центрифугиран, 10 минута на 1000 до 1200 обртаја у минути.

Загревање у воденом купатилу и центрифугирање бутирометра је поновљено још два пута, а затим је прочитан процент масти. На истом узорку испитивања су изведена у два понављања.

Према Мерсер et al. (2010), **проценат масти у сувој материји** израчуната је према формули:

$$[\text{проценат масти} \times 100] / \text{сува материја (\%)} \quad (2)$$

Одређивање киселости сира: одмерено је 5 g узорака сира, са тачношћу од 0,0001 g. Узорак сира је растворен у 100 mL дестиловане воде. Смеси је додато 1 mL 2% фенолфталеина (AppliChem, Немачка) и садржај је титриран децимоларним раствором NaOH (Merck, Немачка) до појаве ружичасте боје, која мора бити постојана два минута. На истом узорку испитивања су изведена у два понављања („Sl. list RS“, бр. 32/83).

Одређивање рН сира: рН вредност сира је одређиван у раствору сира припремљеном мешањем 10 g сира и 10 mL дестиловане воде. Мерење је вршено рН-метром, уз претходну калибрацију стандардним растворима (рН 4,01 и 7,0) (Carić et al., 2000).

Одређивање садржаја натријум хлорида (NaCl) у сиру: за одређивање садржаја натријум хлорида у сиру коришћена је метода титрације, која се заснива на разарању органске супстанце сира уз помоћ калијум-перманганата (KMNO₄) (AppliChem, Немачка) и киселине (HNO₃) (Merck, Немачка). Хлоридни јони су одређивани титрацијом са 0,1 М амонијум роданидом ((NH₄)₂SCN) (Centrohem, Србија) до појаве црвеносмеђе боје која је постојана 30 секунди (Carić et al., 2000).

Однос соли и воде (C/B) израчунава се по формули:

$$C/B = [HC / ВЛ] \times 100 \quad (3)$$

где је HC садржај NaCl (%) и ВЛ је садржај воде (%) у сиру.

5.2. Укупан број аеробних мезофилних бактерија

За одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија припремљена разблажења (1 ml) су аплицирана у петри плочу и наливена хранљивим агаром. Тако засејане подлоге су инкубирани на 37°C/48 h. Након инкубације, петри плоче које су садржале између 20 и 300 колонија су изабране за бројање бактеријских колонија, након чега је одређен и укупан број аеробних мезофилних бактерија према формули:

$$\text{CFU g}^{-1} \text{ сира} = \text{број колонија} \times 10 \times (1/\text{одговарајуће разблажење}) \quad (4)$$

5.3. Изоловање и одређивање ентеробактерија

5.3.1. Изолација микроорганизама

Од изабраног узорка сира, асептично је одмерно 10 g сира који је помешан са 90 mL 2% натријум цитрата предходно загрејаног на 45°C степени. Постепеним додавањем натријум цитрата врши се боље емулговање узорка. Припремљен узорак је асептично пребачен у стерилну ерленмајер боцу и пре пипетирања је добро измешан на вотрексу, пет минута до потпуне хомогенизације. На тај начин је добијено основно разређење. Сва даља разређења (до 10^{-7}) су припремљена у стерилним епруветама са по 9 mL натријум цитрата (Škrinjar, 1994). Свако разређење (1 mL) је разливено у асептичним условима, на припремљене селективне подлоге (Ендо и MacConkey агар). Плоче су инкубирани на 37°C/24 h. Након инкубације, бирано је разређење које је омогућило раст чистих култура тј. појединачних колонија (за потребе дисертације коришћено је основно и 10^{-2} разређење). Након идентификације бактеријске културе су чуване у 80% хранљивом бујону и 20% глицеролу на -80°C на Природно-математичком факултету у Крагујевцу (KGPMF).

5.3.2. Одабир бактерија за микробиолошко испитивање

Сви изолати, инакулисани на хранљивом агару, који су били Грам негативни, каталаза позитивни и оксидаза негативни су подвргнути даљем истраживању са предпоставком да припадају фам. Enterobacteraceae.

Бојење по Граму

Метода се заснива на бојењу бактеријих ћелијских зидова који су различити по хемијском саставу (Грам позитивне садрже 90% пептидоглукана, док Грам негативне садрже танак слој пептидогликана окружен слојем фосфолипида, липопротеина и липополисахарда. Грам позитивне се боје љубичасто, док Грам негативне (нпр. колоније *E. coli*) се боје у црвену боју.

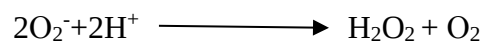
За бојење, коришћен је кристал виолет и шафранин или базни фуксин. На осушени препарат је додат кристал виолет и након три минута додат је Луголов раствор који је стајао два минута. У процесу бојења, Лугов раствор са бојом кристал виолет формира једињење (кристал виолет јод-комплекс) и на тај начин везује боју. Након тога,

вршено је испирање боје дестилованом водом и обезбојавање алкохолом. У фази обезбојавања, Грам позитивне бактерије не губе боју (не губе кристал виолет јод-комплекс) и остају љубичасте. Грам негативне бактерије у овој фази губе кристал виолет јод комплекс због веће количине липида. Оне добијају црвену боју од базног фуксина или шафранина (за 30 секунди) (Stefanović, 2016).

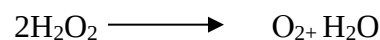
Каталаза тест

У аеробном дисању, приликом транспорта са терминалног цитохрома на кисеоник, поред молекула воде, формирају се и токсични молекули као што су водоник пероксид (H_2O_2) и супероксид радикал O_2^- који могу оштетити ензиме. Зато бактерије синтетишу ензиме који врше детоксикацију:

- Ензим супероксид дисмутаза, преводи супероксид радикал у водоник пероксид



- Ензим каталаза, разлаже водник пероксид на кисеоник и воду



- Ензим пероксидаза, који преводи водоник пероксид у воду



Присуство каталазе се везује за појаву мехурића кисеоника који се стварају при контакту ћелије са 3% раствором водоник пероксида – каталаза тест.

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати
- 3% раствор H_2O_2
- Празна петри кутија
- Пастерова пипета
- 70% алкохол
- Пламеник; бактериолошка еза

Под стерилним условима, пренета је већа количина бактеријске културе на празну стерилну петри кутију или предметну плочицу. На културу је нането 1 – 2 капи 3% раствора H_2O_2 . Појава бурне реакције указује на присуство ензима каталазе.

Присуство цитохрома С

Важне компоненте респираторног ланца су цитохроми. Цитохроми врше транспорт електрона кроз ћелијску мембрану и за детекцију цитохрома *c* примењује се оксидаза тест. Цитохром *c* је укључен у последњим фазама преноса електрона у респираторном ланцу и то у преносу електрона на цитохром *a* и цитохром *az* који преносе електроне на молекул кисеоника, крајњи акцептор електрона. Оксидаза тест се заснива на оксидацији редуковане форме једињења тетраметил – парафенилендиамин – дихидрохлорид, до које долази транспортом електрона на оксидовани цитохром *c*. Једињење тетраметил – парафенилендиамин – дихидрохлорид у оксидованој форми је тамнољубичасте боје.

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати
- Реагенс тетраметил – парафенилендиамин – дихидрохлорид (Tokyo Chemical Industry CO, Јапан)
- Празна петри кутија са тракама филтер папира
- Пастерова пипета
- 70% алкохол
- Пламеник; бактериолошка еза

Под стерилним условима, бактеријска култура је пренета на филтер папир. На културу је додато неколико капи реагенса тетраметил – парафенилендиамин – дихидрохлорида. Мерено је 10 секунди и праћена је присуство/одсуство тамнољубичасте боје (ако је боја присутна резултат је позитиван, ако не, резултат је негативан).

5.3.3. Идентификација бактерија

Чисте културе израсле на хранљивом косом агару су потврђене биохемијским низом. За прелиминарну идентификацију Грам негативних бактерија су коришћени познати биохемијски тестови и селективне подлоге. Прелиминарна идентификација бактерија је обухватала способност ферментације шећера (глукоза, сахароза и лактоза), доказивање продукције киселина и гаса, коришћење цитрата, катаболизам протеина

(разградња аминокиселине триптофан). Хромогена подлога је коришћена за доказивање присуства *E. coli*.

За све тестове у биохемијским низовима инкубација је трајала 24 h на температури 37°C осим за тест ферментације лактозе (MacConkey бујон) где су бактерије инкубирани на 44°C. Коначна идентификација је извршена помоћу Microgen GnA+B-ID Oxidase Negative tests (Mikrogen, Немачка).

Способност ферментације шећера

За идентификацију лактоза ферментујућих ентеробактерија и њихову диференцијацију од лактоза неферментујућих ентеробактерија је коришћен ендо агар. Код сојева који интензивно и брзо ферментишу лактозу (*E. coli*), јавља се зеленкасто метални сјај. Бактерије које не ферментишу лактозу расту као безбојне или прозрачне колоније (Суве подлоге, Торлак, Београд, Србија).

За детекцију Грам негативних бактерија које ферментишу лактозу на 44°C коришћена је диференцијална подлога MacConkey бујон са Дурхамовом цевчицом. Бромкрезол пурпур је рН индикатор који мења боју подлоге из тамно љубичасте у жуту, због присуства киселине настале током ферментације лактозе. Бактерије које врше ферментацију лактозе, поред киселине, производе и гас који се детектује као појава мехурића у Дурхамовој цевчици која је стављена у епрувету (Суве подлоге, Торлак, Београд, Србија).

Способност разлагања глукозе и лактозе испитивана је и коришћењем андраде пептонске воде са додатком лактозе (1%) и глукозе (1%). Као резултат ферментације праћена је продукција киселине и продукција гаса. Гас се издваја у Дурхамовој цевчици током инкубације (уколико гаса има више од 1/10 Дурхамове цевчице – позитивна реакција). Продукција киселина је детектована преко промене боје индикатора (индикатор је састојак подлоге предвиђеном од стране произвођача) у подлози после инкубације.

Способност бактерија да ферментишу лактозу, сахарозу и декстрозу и да стварају водоник сулфид је испитиван на диференцијалној подлози – троструки шећер. Ферментацијом ових шећера настаје кисели продукт у подлози што се уочава као промена боје рН индикатора фенол црвеног из црвене у жуту. Натријум сулфат служи као извор сумпора за бактерије које могу да га користе за стварање водоник сулфида. Сојеви који не ферментишу лактозу или сахарозу, а ферментишу декстрозу (*Salmonella* spp. и *Shigella* spp.) стварају киселину у подлози што се огледа појавом жуте боје. Када

се залиха декстрозе истроши, разграђују се протеинске компоненте и рН подлоге расте при чему косина постаје црвена.

Бактерије које ферментишу лактозу или сахарозу (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus vulgaris*) стварају висок садржај киселине у дубини и на косини подлоге, довољан за одржавање ниске рН вредност и у аеробним условима при чему дубина и косина остају жуте. Бактерије које нису способне да ферментишу ни један од шећера у подлози, разграђују протеинске компоненте и стварају алкалну средину у дубини и на косини при чему се јавља црвена боја. Продукција гаса који настаје ферментацијом шећера од стране неких ентеробактерија, види се по створеним мехурићима који могу да поцепају или раздвоје гел подлоге. Продукција водоник сулфида се види као потпуно црна боја дубине или као црни прстен око места убода (Суве подлоге, Торлак, Београд, Србија).

Продукција киселина је испитивана коришћењем теста са индикатором метил-црвено. При ферментацији долази до продуковања велике количине мравље, сирћетне и млечне киселине, што снижава рН подлоге, која се детектује променом боје индикатора. Индикатор метил црвено је у неутралној средини жуте боје, а у киселој црвене боје.

Коришћење цитрата

Неке бактерије као извор угљеника и енергије користе цитрате – соли лимунске киселине, захваљујући цитрат лиази, ензиму који катализује цитрате до пирогрођане киселине, која се даље укључује у процес ферментације. Присутво ензима се доказује гајењем бактерија на Simmons цитратном агару који садржи цитрат као извор угљеника и амонијум соли као извор азота. Индикатор бромтимол у киселој средини има зелену боју. Уколико бактерија разлаже цитрат и користи амонијум соли из подлоге доћи ће до ослобађања натријум-бикарбоната и амонијака и подлога постаје базна и плаве боје (Stefanović, 2016).

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати
- Епрувете са Дурхмановим цевчицама и по 5 ml стерилне хранљиве послоге – Андарде пептонска вода уз додатак 1% глукозе
- Епрувете са Дурхмановим цевчицама и по 5 mL стерилне хранљиве послоге – ЛАП

- МР подлога и метил црвено реагенс (60 mL етанола 96% (Зорка, Шабац, Србија), 40 ml dH₂O и 0,02 g метил црвене боје (NRK Инženjering, Београд, Србија))
- Подлога Троструки шећер – 5 mL као коси агар
- Подлога MacConkey бујон – 5 mL са Дурхамовим цевчицама за 37°C и 44°C
- Подлога Симонс цитратни агар – 5 mL као коси агар
- Ендо агар разливен као плочасти агар
- 70% алкохол
- Пламеник; бактериолошка еза

Под стерилним условима, пренете су бактеријске колоније на сваку од наведених подлога и остављене на инкубацију на 37°C/24 h. Само подлога са MacConkey бујоном са Дурхамовим цевчицама је остављена на инкубацију на 44°C, због могућег присуства *E. coli*.

Катаболизам протеина

Неке бактерије разлажу аминокиселине (триптофан) да би прибавиле довољну количину угљеника. Реакцију катализује ензим триптофаназа. Аминокиселина – триптофан се разлаже до пирогрождјане киселине уз продукцију индола. Индол се доказује у реакцију са пара – диметил – амино – бензалдехидом из регенса по Ковачу, при чему се формира прстен на површини подлоге, једињење црвенољубичасте боје (Stefanović, 2016).

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати
- 5 mL стерилне хранљиве подлоге – пептонска вода са 1% триптофаном
- Реагенс по Ковачу (25 mL концентроване HCl у 75 mL амил алкохола и 5 g парадиметил – аминокиселина бензалдехид-а)
- Стерилна пипета
- Пастерова пипета
- 70% алкохол
- Пламеник; бактериолошка еза

Под стерилним условима, пренета је већа количина бактеријске културе у хранљиву подлогу и остављена на инкубацију на 37°C/24 h. Након инкубације је додато 0,3 mL реагенса по Ковачу. Појава црвеног прстена је означавала позитивну реакцију.

Детекција *E. coli*

За детекцију *E. coli* је коришћена је селективна хромогена подлога HiCrome Coliform Agar. Натријум лаурил сулфат инхибира раст Грам позитивних бактерија. Хромогена смеша садржи два хромогена супстрата, Salmon-GAL и X-glucuronid. Ензим β -D-галактозидаза произведена од колифорних бактерија разлаже Salmon-GAL, што доводи до појаве црвене боје колонија колиформних бактерија. Ензим β -D-глукуронидаза произведена од *E. coli* раскида X-glucuronid. *E. coli* формира тамно плаве колоније због разградње Salmon-GAL и X-glucuronida (Сл. 3). Додавање триптофана побољшава реакцију индола, чиме се повећава поузданост детекције у комбинацији са два хромогена. Да би се потврдила *E. coli*, додаје се капљица Ковачевог реагенса на тамно плаву до љубичасту колонију. Формирање црвене боје указује на позитивну реакцију (Le Minor and Hamida, 1962; Kilian and Bulow, 1976; Frampton et al., 1988; Manafi and Kneifel, 1989).

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати на косом агару
- Селективна хромогена подлога HiCrome Coliform Agar
- Ковачев реагенс и Пастерова пипета
- 70% алкохол, пламеник, бактериолошка еза



Слика 3. Тамно плаве колоније *E. coli* на хромогеној подлози после инкубације 24 h
(фото: К. Младеновић)

Под стерилним условима су тестирани изолати засејавани на HiCrome Coliform Agar. Засејане плоче су инкубиране на 37°C/24 h.

5.4. Системи за идентификацију бактерија

Поред стандардних биохемијских тестова за одређивање врста бактерија се користе и различити системи за идентификацију. Они обухватају већ стандарне биохемијске тестове али се за њих употребљавају минималне количине хранљивих подлога и реагенса.

Microgen GNA+B-ID Oxidase Negative tests (Microgen, Немачка) системи за идентификацију су коришћени (Сл. 4). У отворене Microgen траке (у бунариће који су већ обележени) су додате бактеријске суспензије густине 0,5 McFarland (10 μ L) и после завршене инокулације, покривене су заштитном фолијом и инкубиране на 37°C/24 h. Након инкубације су додавани реagensи у обележене бунариће и очитани су резултати. Свако тестирано физиолошко својство бактерије је одређено бројем. Резултати (код сачињен од бројева) су уписани у базу која је добијена од произвођача, уз комплет Microgen система за идентификацију. На основу комбинације бројева одређивана је таксономска припадност испитиваног соја. За детаљнију идентификацију, уколико је потребна, поред теста А, користио се и тест Б са додатним биохемијским тестовима. Тест А и тест Б садрже укупно 24 биохемијска теста (разградња лизина, орнитина, желатина, продукција H₂S и TDA (Indole-3-pyruvic acid), ферментација глукозе, манитолa, ксилозе, инозитола, сорбитолa, раманоze, сахарозе, лактозе, арабиноze, адонитолa, рафаноze, салицина, хидролиза ONPG и уреазе, индол тест, цитрат тест, VP тест, детекција малоната као потенцијалног извора угљеника, детекција претварања аргинина у орнитин).

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати на косом агару
- Microgen GNA+B-ID Oxidase Negative tests
- Минерално уље, Ковач реагенс, VP 1 и VP 11 реагенси, TDA реагенс
- Стерилан физиолошки раствор за прављење суспензија
- Стерилне епрувете
- Стерилне пипете-стаклене, стерилни наставци за пипету
- 70% алкохол, пламеник, аутоматска пипета; бактериолошка еза



Слика 4. Изглед Microgen GN-ID Oxidase Negative теста после инкубације
(фото: К. Младеновић)

5.5. Одређивање осетљивости бактерија на антибиотике

Одређивање осетљивости бактерија на антибиотике је вршено помоћу антибиограм теста (Bauer et al., 1966). Поступак се заснивао на густом засејавању Милер-Хинтон агара бактеријама. На подлогу која је засејана стављени су дискови антибиотика – антибиограм таблете, одређене концентрације. Тако припремљене петри кутије су остављене на инкубацију на 37°C 24 h, где су антибиотици дифундовали у подлогу у виду концентричних кругова при чему је концентрација антибиотика опадала што се више удаљавала од ивице таблете. После инкубације, праћена је појава раста бактерија или појава концентричних кругова око антибиотика (зона инхибиције). У одсуству зоне инхибиције раста сматра се да је бактерија резистетна (антибиотик не делује на ту бактерију). Мерен је пречник зоне инхибиције и упоређиван са стандарним вредностима при чему се одређивало да ли је бактерија осетљива на антибиотик или не (Табела 3).

Осетљивост је испитивана у односу на три изабрана антибиотика (стрептомицин (10 µg), хлорамфеникол (30 µg), тетрациклин (30 µg)). Као контроле коришћени су сојеви *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* (клинички изолат) и *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063.

Табела 3. Стандардне вредности пречника зона инхибиције раста бактерија

Антибиотик	Осетљива	Делимично осетљива	Резистетна
Стрептомицин	≥15*	12-14	≤11
Хлорамфеникол	≥18	13-17	≤12
Тетрациклин	≥19	13-17	≤12

*Ширина зона дата у mm

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати
- Петри кутије са хранљивом подлогом-прописана дебљина подлоге 4 mm
- Антибиограм таблете Стрептомицина, Хлорамфеникола, Тетрациклина
- Стерилан физиолошки раствор и стерилни штапићи за брис
- Стерилне епрувете
- Стерилне пипете
- 70% алкохол, пламеник; бактериолошка еза

У епрувете са бактеријама које су расле на косом агару је додато 5 mL стерилног физиолошког раствора. Епрувете су благим покретима мешане између дланова да би се ослободиле бактерије. Затим су прављене почетне бактеријске суспензије у односу 1:10 стерилним физиолошким раствором. Густина бактеријске суспензије је подешавана на 0,5 McFarland. Стерилан брис је натопљен бактеријском суспензијом и бактерије су засејане на хранљиву подлогу.

Стерилном пинцетом су распоређене антибиограм таблете, тако да не буду близу једна другој, ни близу ивице петри кутије. Таблете су мало потиснуте у подлогу да би антибиотик добро дифундовао у подлогу. Тако припремљене петри кутије су остављене на инкубирање на 37°C/24 h. Након инкубације је мерен пречник зоне инхибиције.

5.6. Microgen *E. coli* O157 брзи латекс аглутинацијски тест

Microgen *E. coli* O157 брзи латекс аглутинацијски тест је коришћен за испитивање *E. coli* на способност аглутинације. Тест омогућава брзу диференцијацију између серотипова. Латексне честице су обложене антителима стимулисане против соматског (ћелијског зида) липополисахарида O157 антигена *E. coli* O157. Када се латексне честице помешају са суспензијом која садржи *E. coli* O157 антигене, одвија се осетљива и специфична имунохемијска реакција која узрокује аглутинацију фино диспергованих честица латекса у агрегате који су лако видљиви голим оком.

Потребан материјал:

- Бактеријски изолати
- Microgen *E. coli* O157 брзи латекс аглутинацијски тест
- Реагенси и стерилне пластичне езе

Под стерилним условима, пренета је већа количина бактеријске културе на обележена поља теста за аглутинацију. Начин и редослед додавања реагенса и време посматрања присуства/одсуства аглутинације је урађен према упутству произвођача (Microgen, Немачка).

5.7. Одређивање утицаја различитих температура, рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе на планктонски раст испитиваних бактерија

На основу порекла бактерија и начина прављења сира, одабрани су еколошки фактори за које се сматрало да могу утицати на планктонски раст испитиваних бактерија. За одређивање утицаја различитих еколошких фактора, коришћене су две подлоге: Триптон соја бујон (ТСБ) и Милер Хинтон бујон (МХ).

За испитивање утицаја изабраних еколошких фактора на раст бактерија изолованих из сокобањског сира подлоге су модификоване на следећи начин:

- За испитивање утицаја рН, додавна је HCl, за добијање киселе средине (рН 5,5 и 6,5), а додавањем NaOH, добијена је базна средина (рН 7,5 и 8,5). Контроле раста за рН су биле засејане подлоге стандардног састава ТСБ (рН 7,5) и МХ (рН 7).
- Испитивање деловања концентрација соли вршено је на подлогама са различитим концентрацијама NaCl (4%, 6,5%, 8%). Контроле раста за испитивање утицаја NaCl су биле засејане ТСБ са 4% NaCl и МХ подлога стандардног састава
- Испитивање деловања различитих концентрација шећера добијене су додавањем 0,5%, 1,5%, 2,5%, 3,5% глукозе или лактозе у подлоге. Контроле раста за глукозу и лактозу су биле засејане ТСБ са 0,25% глукозе и МХ подлога стандардног састава

У 3 mL сваке модификоване подлоге додато је 10 μ L бактеријске суспензије ($10^8 - 10^9$ CFU mL⁻¹). Узорци су инкубирани на температурама од 4°C, 37°C и 44°C у току 24 h. Резултати су очитани на спектрофотометру на 600 nm у трипликату. Раст бактерија је одређиван у односу на контролу неинокулисаних модификованих подлога. Од вредности апсорбанце тестираних узорака су одузете вредности апсорбанце неинокулисаних модификованих подлога да би се добила апсорбанца раста бактерија.

5.8. Испитивање способности формирања биофилма

Пеликула тест

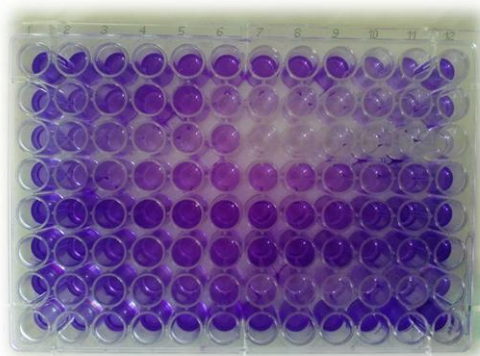
Способност формирања биофилм фенотипа, односно формације пеликуле на међуфази ваздух – течност је одређивана применом пеликула теста према методи коју су описали Vestby et al. (2009), уз модификације. Триптон соја бујон 1,8 mL је инокулисан са 0,2 mL суспензије изолата (10^8 CFU mL⁻¹), а потом инкубиран 96 h на 37°C. Способност изолата да продукују биофилм, испитивана је на основу продукције пеликуле на површини течне фазе према следећој шеми: формирана чврста дебела пеликула (++++) јак биофилм продуцент, формирана танка пеликула (++) умерен биофилм продуцент, формирана врло танка пеликула (+) слаб биофилм продуцент, комплетно одсуство пеликуле (–) одсуство способности продукције биофилма. Пеликула тест је поновљен три пута за сваки тестирани изолат.

Формирање биофилма

Способност врста *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica*, *E. coli*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *Enterobacter gergoviae*, *K. pneumoniae* ATCC 70063 и *E. coli* ATCC 25922 да формирају биофилм је анализирана према методи описаној у O'Toole and Kolter (1998), са модификацијама. Коришћене су две различите подлоге (ТСБ и МХ). У стерилне микротитрационе плоче (Sarstedt, Germany) додато је 100 µL подлоге у сваки бунарић, у које је засејано 10 µL свеже бактеријске суспензије (0,5 McFarland). Након инкубације на 4°C, 37°C и 44°C у току 48 h, садржај из сваког бунарића се одстрани нежно тапкањем микротитрационих плоча. Затим је у сваки бунарић додато 200 µL 0,85% стерилног физиолошког раствора да би се уклониле планктонске бактеријске ћелије. Формирани биофилм је фиксиран са 100 µL метанола и обојен са 100 µL кристал виолета (Acros, Organics, New Jersey, USA) и инкубиран на собној температури 20 минута. Вишак боје је испиран три пута са 200 µL дестиловане воде, па је додато 100 µL 96% етанола у сваки бунарић. Очитавање резултата вршено је на читачу микротитрационих плоча на таласној дужини боје кристал виолета везане за ћелије формираног биофилма бактерија од 630 nm у трипликату (Сл. 5).

Према Mendoza-Olazarán et al. (2014) не постоје универзална референтна вредност која се користи за процену способности формирања биофилма. Апсорбанца биофилма већа од негативне контроле али мања од стандардног (ATCC) соја се

карактерише као слаб продуцент биофилма, док са апсорбанцама већим од стандардног соја сматрају се јаким продуцентима биофилма (Qi et al., 2016).



Слика 5. Изглед микротитрационе плоче након додавања кристал виолета и етанола спремна за читавање резултата (фото: К. Младеновић)

5.9. Одређивање утицаја различитих рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе на способност формирања биофилма

У експерименту су коришћене две различите подлоге (ТСБ и МХ). У стерилне микротитрационе плоче додато је по 100 μL подлоге (описаних у поглављу 5.6), које садрже:

- различите рН вредности (5,5, 6,5, 7, 7,5, 8,5)
- различите концентрације NaCl (4%, 6,5%, 8%)
- различите концентрације глукозе (0,5%, 1,5%, 2,5%, 3,5%)
- различите концентрације лактозе (0,5%, 1,5%, 2,5%, 3,5%).

У сваки бунарић додато је по 10 μL свеже бактеријске суспензије. Након инкубације на 37°C/48 h садржај из сваког бунарића је одстрањен нежно тапкањем микротитрационих плоча. У сваки бунарић је додато 200 μL 0,85% стерилног физиолошког раствора како би се уклониле планктонске бактеријске ћелије. Формирани биофилм је фиксиран са 100 μL метанола и обојен са 100 μL кристал виолета.

Микротитар плоче са бојом су инкубирани на собној температури 20 минута. Вишак боје је испиран три пута са 200 μL дестиловане воде, па је додато 100 μL 96% етанола у сваки бунарић. Очитавање резултата вршено је на читачу микротитрационих плоча на таласној дужини од 630 nm у трипликату. Као контрола стерилности, коришћене су незасејане подлоге са различитим рН и концентрацијама NaCl, глукозе и лактозе. За сваку

врсту бактерије је израчуната средња вредност добијених апсорбанци. Израчуната је и средња вредност контроле стерилности. Од средње вредности контроле раста за сваку појединачну врсту је одузета одговарајућа контрола стерилности. Контроле раста су исте као код испитивања утицаја еколошких фактора на планктонски раст.

5.10. Одређивање утицаја различитих рН, концентрација NaCl, глукозе и лактозе на формирани биофилм

Утицај изабраних еколошких фактора на формирани биофилм је испитиван у микродилуционим плочама у којима је најпре формиран биофилм на стандардним ТСБ и МХ (поглавље 5.8). Након инкубације на 37°C/24 h садржај подлога из сваког бунарића је одстрањен испирањем, а потом су додате модификоване подлоге у запремини од 100 µL:

- рН (5,5, 6,5, 7, 7,5, 8,5)
- концентрације NaCl (4%, 6,5%, 8%)
- концентрације глукозе (0,5%, 1,5%, 2,5%, 3,5%)
- концентрације лактозе (0,5%, 1,5%, 2,5%, 3,5%)

Након инкубације на 37°C/24 h, у сваки бунарић је додато 200 µL 0,85% стерилног физиолошког раствора како би се уклониле планктонске бактеријске ћелије. Формирани биофилм је фиксиран са 100 µL метанола и обојен са 100 µL кристал виолета. Микротитар плоче са бојом су инкубирани на собној температури 20 минута. Вишак боје је испиран три пута са 200 µL дестиловане воде, па је додато 100 µL 96% етанола у сваки бунарић. Очитавање резултата вршено је на читачу микротитрационих плоча на таласној дужини од 630 nm у трипликату.

5.11. Одређивање способности адхезије бактерија у присуству различитих растварача

Микробна (бактеријска) адхезија у присуству различитих растварача мерена је у складу са методом Rosenberg et al. (1980) са модификацијама (Crow and Gopal, 1995; Bellon-Fontaine et al., 1996; Kos et al., 2003). После инкубације бактерија у ТСБ, 24 h, бактерије су центрифугиране на 5000 rpm, 15 минута, затим испиране два пута и ресуспендоване у 0,1 М KNO₃ (рН 6,2) до приближно 10⁸ CFU mL⁻¹. Апсорбанца

суспензије бактерија су мерена на 600 nm (A_0). 1 mL растварача је додато у 3 mL суспензије бактерија. Након 10 минута инкубације на собној температури, двофазни систем је помешан коришћењем вортекса, 2 минута. Водена фаза је уклоњена након 20 минута инкубације на собној температури и измерена је његова апсорбанца на 600 nm (A_1). Проценат бактеријске адхезије у присуству растварача израчунат је као:

$$(1-A_1/A_0) \times 100 \quad (5)$$

Коришћена су три различита растварача: ксилен (Sineks, Београд, Србија), који је аполарни растварач, хлороформ (Alkaloid, Скопље, Македонија), монополарни и кисели растварач и етил ацетат (Zorka, Шабац, Шабац, Србија), као монополарни и базни растварач. Само бактеријска адхезија у присуству ксилена је показатељ хидрофобности или хидрофилности ћелијске површине. Према Осања and Nader-Macías (2002), проценат хидрофобности се изражава као: 0 – 35% - ниска хидрофобност; 36 – 70% - средња хидрофобност; 71 – 100% - висока хидрофобност. Вредности добијене са два друга растварача, хлороформ и етил ацетат, су показатељи способности донора електрона (базних) и акцептора електрона (киселих) (Bellon-Fontaine et al., 1996). Ако бактерија покаже афинитет према хлороформу, онда је она електрон донор, а слаб прималац електрона. Афинитет према етил ацетату показује да је бактерија бољи прималац електрона, а слаб донор (Dias et al., 2013).

5.12. Одређивање могућности коагрегације бактерија

Испитана је коагрегација ентеробактерија са *Enterococcus faecalis* KGPMF 49 која је изолована из истог сокобањског сира. Коагрегација је праћена коришћењем модификованог поступка описаног од стране Осања and Nader-Macías (2002). Преконоћне бактеријске културе су центрифугиране на 5000 rpm у трајању од 15 минута, након чега су два пута испране у ПБС пуферу (Alfa Aesar GmbH & Co, Karlsruhe, Немачка), а затим ресуспендована у 4 mL истог пуфера тако да је број ћелија био приближно 10^8 CFU mL⁻¹. По 2 mL сваке суспензије обе бактерије за које је праћена коагрегација добро су промешане на Вортексу. После мешања, 200 µL са површине суспензије пренето је у микротубу која садржи 1800 µL ПБС, а вредности апсорбанце су очитаване на 600 nm (A_0). Исти поступак је понављен након 2 h (A_t). Проценат коагрегације израчунат је према следећој формули:

$$\text{Коагрегација\%} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \quad (6)$$

Ради потврде резултата (коагрегације бактерија) вршено је бојење по Граму узорка бактерија из смеше ПБС-а, које су коришћене за испитивање.

5.13. *In vitro* тест за адхезију бактерија за епител свињског црева

Способност адхезије *K. pneumoniae* KGPMF13, *K. ornithinolytica* KGPMF9, *S. marcescens* biogr 1 KGPMF 19 и *E. coli* KGPMF 22 за епител свињског црева тестиран је у складу са поступком описаним у Кос et al. (2003) са модификацијама. Испитиване бактерије су одабране на основу њихове способности адхезије у присуству различитих растварача. Узорци цревог епитела су сакупљени од 9 месеци старе животиње (свиње). Непосредно после жртвовања животиње, цревни епител се чувао на 4°C у фрижидеру. Пре експеримента, цревни епител је сечен на коцкице одговарајуће дужине (1 cm²) и стављен је 30 минута у ПБС на 4°C у фрижидер, како би се ослободила површина црева од слузи. Поред тога, епител је испиран три пута у ПБС-у, мешајући се на ротационој мешалици (PSU-20I, Енглеска), како би се уклонио вишак масти. Припремљени узорци су асептично пребачени у 20 mL ТСБ у енлермајере, претходно инокулисане са 200 µL преконоћне бактеријске културе. Енлермајери су инкубирани 24 h на 37°C. Након инкубације, узорци епитела су испрани стерилним физиолошким раствором (уклањање планктонског облика бактерија) и фиксирани са метанолом. После сушења, узорци су обојени флуоресцентном бојом, акридин оранж (Acros, Organics, New Jersey, USA), два минута (Kronvall and Myhre, 1977). Вишак боје је уклоњен испирањем (дестилована вода). Узорци су испитивани и фотографисани помоћу флуоресцентног микроскопа. Интестинални епител у неинокулираној подлози ТСБ и у пуферу ПБС коришћене су као контроле.

5.14. Одређивање ензимске активности бактерија

За испитивање ензимске активности бактерија коришћене су методе за одређивање протеолитичке и липолитичке активности (скрининг метода).

Протеолитичка активност бактерија је испитивана по методи коју су описали Harrigan и McCance (1976), са модификацијама. Подлога је прављена мешањем хранљивог агара и млека (1,6% млечне масти) у односу 1:1. Подлоге су засејане тестираним бактеријама и инкубиране на 37°C/24 h. Након инкубације праћена је појава прозирне зоне око пораслих бактерија. Бактерије поседују протеолитичку активност ако

дође до појаве прозирне зоне око колонија. Као позитивна контрола коришћен је сој *Bacillus subtilis* ATCC 6633, а као негативне контроле сојеви *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Escherichia coli* (клинички изолат).

Липолитичка активност бактерија је испитивана по методи коју су описали Harrigan и McCance (1976), са модификацијама. Подлога је прављена додавањем жуманцета јајета (4%) у хранљиви агар. Подлоге су засејане тестираним бактеријама и инкубиране на 37°C/24 h.. Након инкубације праћена је појава уљане, опалесцентне зоне око колонија. Бактерије поседују липолитичку активност, ако дође до појаве уљане зоне око колонија. Као позитивна контрола коришћен је сој *B. subtilis* ATCC 6633, а као негативне контроле сојеви *K. pneumoniae* ATCC 70063, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* (клинички изолат).

За одређивање присуства екстрацелуларних ензима, неопходно је добити ферментациону течност бактерија. У 10 mL ТСБ и МХ бујона је засејана 100 µL преконоћне културе бактерије. Тако припремљене засејане подлоге су инкубиране 24 h/37°C. Након инкубације, узорци су центрифугирани на 10000 rpm/30 минута/4°C. Супернатант који је издвојен, представљао је ферментациону течност и чуван је у фрижидеру на 4°C, до извођења експеримента. Испитивање ензимске активности ентеробактерија је вршено спектрофотометриски, према методама описаним у Jakovljević (2014).

Одређивање активности киселе и алкалне инвертазе (β -fruktofuranozidaza):

За одређивање активности алкалне инвертазе у ферментационој течности бактерија било је потребно направити реакциону смешу која садржи 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 0,5 mL 0,02 М фосфатног пуфера (pH 8,0) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај тест епрувете је мешан и инкубиран у воденом купатилу на 37°C/15 минута. У другој, контролној епрувети, додати су сви састојци као у тест епрувети и она је остављена на лед док се не заврши инкубација тест епрувете. Одмерено је по 1 mL садржаја обе епрувете и додато је по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете су инкубиране на 100°C/5 минута. Епрувете су охлађене на собној температури и након тога је спектрофотометријски је одређена количина ослобођених редукујућих шећера на 540 nm.

Ензимска активност киселе инвертазе одређена је на исти начин. Реакциона смеша је садржала 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 0,5 mL 0,01 М натријум ацетатног пуфера (pH 4,5) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај тест епрувете је промешан

и инкубиран у воденом купатилу на 55°C/20 минута. У контролној епрувети су додати сви састојци као у тест епрувети и она је остављена на лед док се не заврши инкубација тест епрувете. Одмерено је по 1 mL садржаја епрувете и додато је по 2 mL динитросалицилног реагенса. Пробне епрувете су инкубиране на 100°C/5 минута. Епрувете су охлађене на собној температури и након тога је спектрофотометријски одређена количина ослобођених редукујућих шећера на 540 nm.

За конструисање стандардне криве (График 1) било је потребно направити раствор $5,56 \times 10^{-3}$ М глюкозног стандарда (Sigma Aldrich). У десет епрувета је одпипетирано 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90 mL стандардног раствора глюкозе и епрувете су допуњаване дестилованом водом до запремине од 1 mL. Као бланк коришћена је дестилована вода (1 mL). Садржај епрувета је мешан и епрувете су инкубиране на 55°C/20 минута. Даљи поступак је исти као за одређивање инвертазне активности.

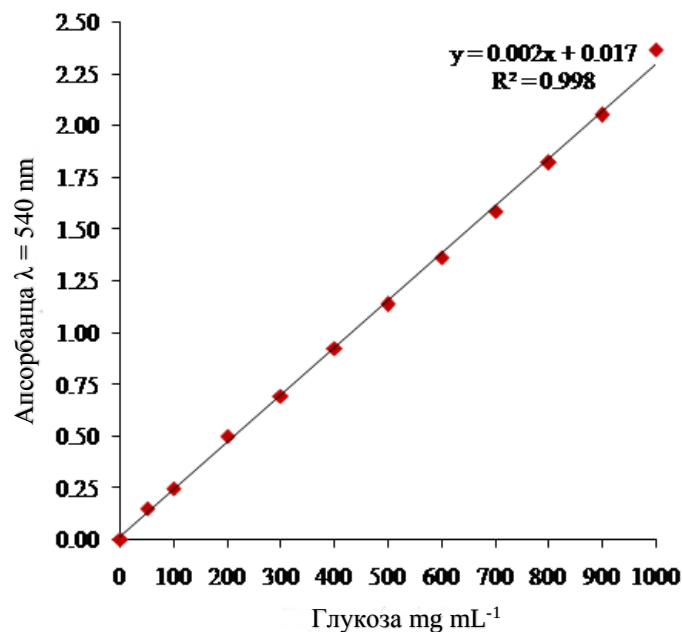


График 1. Стандардна крива за глюкозу

Јединица инвертазне активности (IU) је дефинисана као количина ензима који катализује продукцију 1 μM глукозе у минути на 37°C.

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M глукозе}) \times (\text{df})}{(20) \times (0,5) \times (2)} \quad (7)$$

df – дилуциони фактор

20 – време инкубације (у минутима)

0,5 – запремина ензимског екстракта (у милилитрима)

2 – фактор конверзије 1 μM сахарозе која хидролизује на глукозу и фруктозу.

Одређивање активности алкалне протеазе:

Протеолитичка активност ферментационе течности одређена је на основу присуства ензима у 1 mL течне подлоге Ансоновом методом, индиректно на основу количине тирозина који се ослобађа хидролизом казеина под дејством протеолитичких ензима. Протеолитичка активност ферментационе течности је одређивана на следећи начин: у једну епрувету је одмерено 1 mL ферментационе течности а у другу 5 mL 2% (w/v) раствора казеина. Обе епрувете су загреване у воденом купатилу на 37°C/15 минута. Након тога у епрувету са ферментационом течношћу (тест епрувета) је додато по 2 mL загрејаног казеина, и инкубирана је још 10 минута. Ензимска реакција је прекинута додавањем 5 mL хладне 5% (w/v) трихлорсирћетне киселине (ТСА). Смеша је промућкана и процеђена кроз филтер папир. У контролној епрувети је одмерено 1 mL ферментационе течности и одмах додато 2 mL хладног казеина и 5 mL 5 % (w/v) ТСА. Садржај епрувете је промешан и процеђен кроз филтер папир. Одмерено је по 2 mL филтрата из пробне и контролне епрувете, и додато је 5 mL 6% (w/v) Na_2CO_3 и 1 mL Folin-Ciocalteu реагенса. Садржај епрувета је промућкан и остављен на собној t°C/30 минута до појаве плаве боје. У посебној епрувети (бланк) је одмерно 1 mL дестиловане воде уместо тирозина и додати су сви остали састојци. Вредност апсорбанце је очитана на спектрофотометру на 660 nm.

За одређивање количине тирозина било је потребно конструисати стандардну криву (График 2). Направљен је стандардни раствор тирозина $1,1 \times 10^{-3}$ M (Sigma, Aldrich) (100 mL у дестилованој води, уз пажљиво загревање до растварања и хлађење на собној температури). У десет епрувета је одмерено 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50,

0,60, 0,70, 0, 80, 0, 90 mL стандардног раствора тирозина и епрувете су допуњене дестилованом водом до запремине од 2 mL. Као бланк стандарда је коришћена дестилована вода (2 mL). Све епрувете су инкубиране на 37°C/10 минута, и даљи поступак је био исти као за одређивање активности протеолитичких ензима.

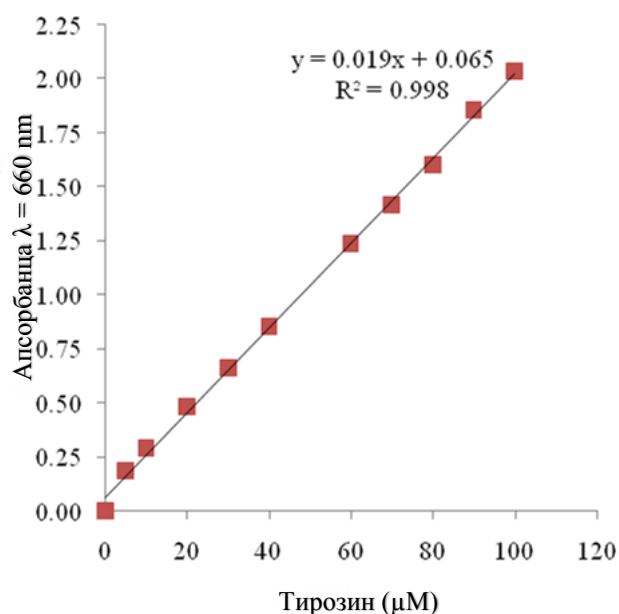


График 2. Стандардна крива за тирозин

Након конструисања стандардне криве за тирозин, вредности су унете апсорбанце тирозина који се налази у филтрату пробе (а) и филтрату контроле (б).

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M тирозина}) \times (8) \times (\text{df})}{(1) \times (10) \times (2)} \quad (8)$$

8 – укупна запремина узорка (у милилитрима)

10 – време инкубације узорка (у минутима)

1 – запремина ензима (у милилитрима)

2 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

df – дилуциони фактор

Одређивање активности алкалне фосфатазе (ortofosfat-monoester-fosfohidrolaza): Ензимска активност алкалне фосфатазе одређена је на основу количине неорганског фосфора Аллен-овом методом. Ензимска активност је мерена у реакционој смеши која садржи 1 mL гликолног пуфера (pH 9,0) са Mg^{2+} , 1 mL ензимског екстракта и 1 mL β -глицерофосфата (супстрата). Епрувете са реакционом смешом су инкубирани на $37^{\circ}C/30$ минута. Након инкубације, ензимска реакција је прекинута додавањем 3 mL 10% ТСА. Епрувете су остављене на лед 15 минута после чега је садржај епрувета филтриран и филтрат сакупљен. Контролне епрувете су припремљене на исти начин али без инкубације (одмах је додата ТСА) и епрувете су држане на леду 15 минута и филтриране. Да би се одредила концентрација фосфора у узорку коришћена је Аленова реакција. Одмерено је по 1 mL филтрата из теста и контроле у две епрувете, и додато је 0,4 mL амидола, 0,4 mL 60% РСА, 0,2 mL NH_4 -молибдата и 3 mL дестиловане воде. Епрувете су инкубирани на собној $t^{\circ}C/11$ минута. Истовремено су припремане серије разблажења стандардног раствора фосфора и понављена је поменута процедура, која је служила за конструисање стандардне криве за фосфор (График 3). Мерење апсорбанце раствора вршено је на 720 nm.

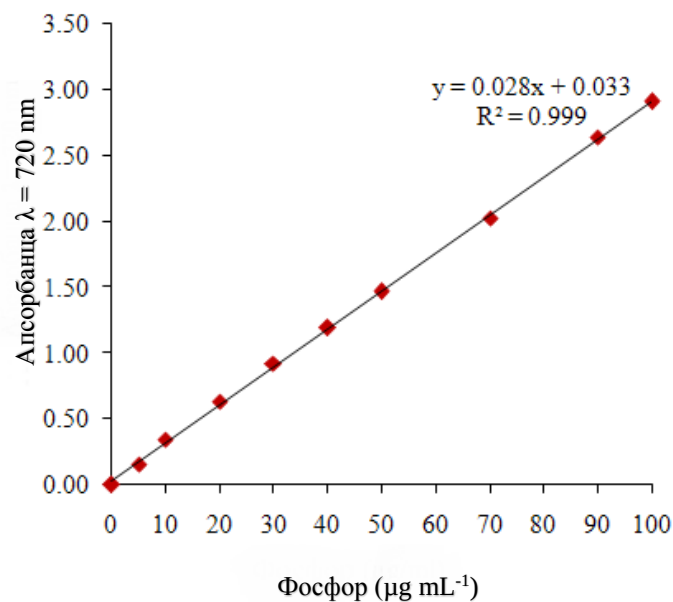


График 3. Стандардна крива за фосфор

Јединица ензимске активности:

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M фосфора}) \times (6) \times (\text{df})}{(1) \times (30) \times (5)} \quad (9)$$

6 – запремина реакционе смеше (у милилитрима)

df – дилуциони фактор

1 – запремина ензимског екстракта (у милилитрима)

30 – време инкубације (у минутима)

5 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

Одређивање активности α -амилазе:

Ензимска активност одређена је методом по Bernfeld-у, са модификацијама. Активност α -амилазе у ферментационој течности одређивана је припремом реакционе смеше која садржи 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 1,5 mL пуфера (pH 6,9) (20 mM натријум фосфат и 6,7 mM NaCl) и 1 mL 1% (w/v) скроба. Садржај тест епрувете је промешан и инкубиран у воденом купатилу на 37°C/15 минута. У контролној епрувети су додати сви састојци као у тест епрувети и она је стављена на лед док се не заврши инкубација тест епрувете. Одмерено је по 1 mL садржаја из обе епрувете и додато је по 1 mL динитросалицилног реагенса (5,3 М К-Na-тартарат и 96 mM 3,5-динитросалицилне киселине). Тест епрувете су инкубиране на 100°C/15 минута. Епрувете су охлађене на собној температури и након тога је спектрофотометријски очитавана апсорбанца на 540 nm.

За конструисање стандардне криве (График 4) прављен је 0,2% раствор малтозе (2 mg mL⁻¹ раствора D-(+)-малтозног стандарда (Sigma Aldrich)). У десет епрувета је одмерено по 2 mL стандарда финалних концентрација: 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90 mg mL⁻¹. Као бланк је коришћена дестилована вода (2 mL) уместо стандарда. У све епрувете је додато по 1 mL динитросалицилног реагенса. Садржај епрувета је пажљиво промешан и инкубиран на 100°C/15 минута. Епрувете су охлађене на собној температури и апсорбанца је очитана на 540 nm. На основу добијених апсорбанци и познатих концентрација стандарда конструисана је стандардна крива и помоћу криве је одређивана количина редукујућег шећера у узорку.

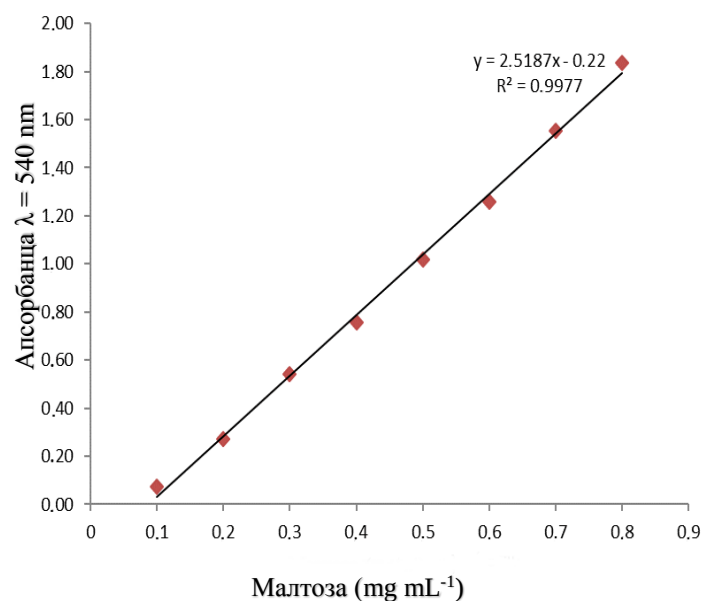


График 4. Стандардна крива за малтозу

Јединица ензимске активности је одређивана применом следеће формуле:

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M малтозе}) \times (3) \times (\text{df})}{(1) \times (15) \times (0,5)} \quad (10)$$

3 – укупна запремина узорка (mL)

15 – време инкубације узорка (минута)

0,5 – запремина ензимског екстракта (mL)

1 – запремина узорка узета за колориметријску детекцију (mL)

Одређивање количине протеина:

Укупна количина протеина у ферментационој течности одређена је методом по Bradford-у. Метода се заснива на стварању комплекса између боје Brilliant Blue G и протеина у раствору. Интензитет боје је пропорционалан количини протеина у раствору. Да би се утврдила количина протеина у узорцима било је потребно припремити стандардну криву за БСА (Sigma, Aldrich) (говеђи серум алумин) почетне концентрације 1 mg mL^{-1} . У десет епрувета је одмерено по 0,1 mL стандарда финалних концентрација: 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0, 80, 0, 90 mg mL^{-1} . Бланк епрувета је садржала 0,1 mL дестиловане воде уместо стандарда. У све епрувете је додато 3 mL Bradford-ов реагенса, а потом су благо промешане. Епрувете су инкубиране на собној температури 30 минута. Након

инкубације, спектрофотометријски је очитана апсорбанца на 595 nm. На основу вредности стандарда познатих концентрација и добијених апсорбанци конструисана је стандардна крива (График 5).

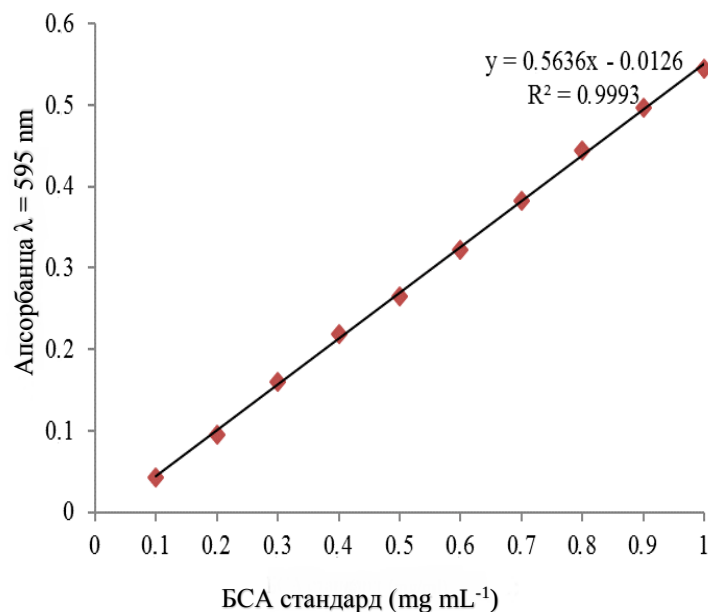


График 5. Стандардна крива за БСА

5.15. Статистичка анализа података

Сви резултати су представљени као средње вредности $\pm$ стандардна девијација за мерења у дупликату и трипликату. Подаци су обрађени коришћењем Microsoft Excel (Redmond, Washington, DC, USA). Упарени Т-тест коришћен је за поређење резултата планктонског бактеријског раста и бактеријског биофилма на различитим температурама и подлогама (IBM SPSS Statistics 20).

6. Резултати

Резултати спроведених хемијских испитивања сокобањског сира и микробиолошких истраживања приказани су у Табелама 4- 49, на Сликама 6-11, и Графицима 6 – 20.

6.1. Хемијске карактеристике сира из Сокобање

Хемијска анализа сокобањског сира је обухватала одређивање садржаја воде, масти, масти у сувој материји, воде у материји без масноће, соли, однос соли и влаге, рН и киселост. Сокобањски сир, припада киселим сиревима јер је рН вредност у распону од $3,94 \pm 0,04$ до $4,20 \pm 0,00$, а киселост од $4,10 \pm 0,07$ до $4,51 \pm 0,01$. Према класификацији сирева коју дају Vlahović i sag. (2018), сокобањски сир припада групи полутврдих и полумасних до пуномасних сирева. Нема одступања у вредностима свих мерених параметара између узорак у различитим сезонама, осим у садржају масти у сувој материји код узорак 1 П и 3 Ј у два од шест испитиваних узорак. Хемијске карактеристике сира су показане у Табели 4.

Табела 4. Хемијске карактеристике сокобањског сира

Хемијске карактеристике	Узорак 1 П	Узорак 2 П	Узорак 3 П	Узорак 1 Ј	Узорак 2 Ј	Узорак 3 Ј
Садржај воде (%)	45,50±0,05*	49,03±0,00	49,50±0,01	48,03±0,01	46,80±0,02	41,80±0,96
Садржај масти (%)	26,50±0,03	24,07±0,01	24,20±0,00	25,03±0,03	26,00±0,00	28,32±0,01
Садржај масти у сувој материји (%)	58,24±0,02	50,38±0,30	48,89±0,90	52,11±0,04	55,56±0,02	67,75±,0,00
Садржај воде у материји без масноће (%)	61,22±0,00	64,57±0,00	65,30±0,00	64,07±0,00	63,24±0,00	58,31±0,01
Садржај соли (NaCl) (%)	1,53±,0,00	1,46±0,02	1,50±0,03	1,50±0,02	1,43±0,05	1,46±0,03
Однос соли и воде (%)	3,36±0,03	2,98±0,05	3,03±0,04	3,12±0,04	3,06±0,09	3,49±0,01
рН	3,98±0,02	4,10±0,00	3,94±0,04	4,20±0,00	4,16±0,01	4,18±0,02
Киселост (°SH) ¹	4,30±0,01	4,22±0,05	4,10±0,07	4,30±0,08	4,51±0,01	4,43±0,00

* средње вредности±стандардна девијација од три независна мерења; ¹ степен по Soxhlet Henkel-у

6.2. Укупан број аеробних мезофилних бактерија

Укупан број аеробних мезофилних бактерија је одређен у сва три узорка из пролећног, летњег и јесењег периода. Укупан број бактерија у пролећним узорцима је био у опсегу од $1,8 \times 10^7$ – $1,2 \times 10^8$, у летњим од $1,6 \times 10^7$ – $4,2 \times 10^7$, а у јесењем $4,3 \times 10^7$ – $8,3 \times 10^7$ CFU g⁻¹ сира. Најмањи број бактерија је нађен у летњим узорцима, а највећи у пролећним.

6.3. Идентификација ентеробактерија

Према Microgen GnA+B-ID Oxidase Negative систему, од 43 изолата, показано је да 32 изолата, припадају фам. Enterobacteriaceae (Сл. 6) .



Слика 6. Изглед Microgen GN-ID Oxidase Negative теста после инкубације 24 h и додавања одговарајућих реагенса предвиђеним по упутству произвођача (фото: К. Младеновић)

Од 32 идентификована изолата 16 припадају роду *Escherichia* spp., (50%), 13 роду *Klebsiella* spp., (41%), 2 изолата роду *Serratia* spp., (6%), и 1 изолат роду *Enterobacter* spp., (3%)) (График 6).

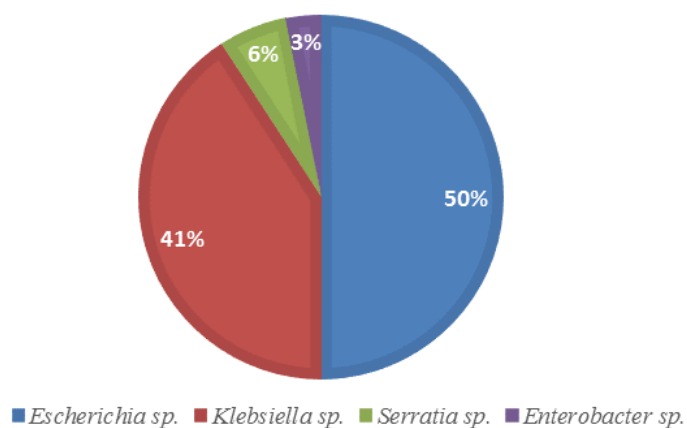


График 6. Заступљеност изолованих родова фам. Enterobacteriaceae

У оквиру рода *Escherichia*, идентификована је само једна врста *E. coli* (16 изолата). Род *Klebsiella*, садржи/броји три врсте *K. oxytoca* (7 изолата), *K. pneumoniae* (4 изолата) и *K. ornithinolytica* (2 изолата). У оквиру рода *Serratia*, две врсте су идентификоване, *S. odorifera* и *S. marcescens* biogr 1, док род *Enterobacter*, броји једну врсту, *E. gergoviae*.

6.4. Дистрибуција ентеробактерија по сезонама и њихове биохемијске карактеристике

Биохемијске карактеристике су одређене за 32 изолата ентеробактерија. Највећи број и разноврсност изолата је из пролећних и јесењих узорака (Табела 5), у којима је истовремено утврђена и највећа бројност аеробних мезофилних бактерија. У узорцима 1 и 2, из пролећног периода, ентеробактерије нису детектоване, а у узорку 3 врсте из рода *Escherichia* су идентификоване (Табела 5).

Табела 5. Дистрибуција ентеробактерија по сезонама

Врста	Изолат	Пролеће	Лето	Јесен
<i>K. oxitoca</i>	KGPMF 1-2	+	-	-
<i>K. oxitoca</i>	KGPMF 3-7	-	+	-
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8-9	+	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10-13	-	+	-
<i>E. coli</i>	KGPMF 14	+	-	-
<i>E. coli</i>	KGPMF 15-17	-	+	-
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	-	+	-
<i>S. marcescens</i>	KGPMF 19	+	-	-
<i>E. gergoviae</i>	KGPMF 20	+	-	-
<i>E. coli</i>	KGPMF 21-32	-	-	+

У Табелама 6, 7 и 8 су приказане биохемијске карактеристике изолата. Све изоловане врсте су Грам негативне, оксидаза негативне и каталаза позитивне. Поређењем резултата биохемијских анализа утврђено је да се изолати из сокобањског сира не разликују од карактеристика стандардних сојева. Прелиминарна идентификација изолата је потврђена на HiChrome колиформном агру (*E. coli* – плаве колоније, *Klebsiella* spp. – розе колоније, *Serratia* spp. – плаве колоније; *E. gergoviae* – светло розе колоније).

Табела 6. Биохемијске карактеристике врста из рода *Klebisella*

Врста	Изолат	Оксидаза тест	Каталаза тест	Индол тест	Цитрат тест	МР тест	Ферментација глюкозе	Ферментација лактозе	Троструки шећер
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 1	-	+	+	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K +/-; Г+ H ₂ S+
	KGPMF 2	-	+	+	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K +/-; Г- H ₂ S-
	KGPMF 3	-	+	+	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г+ H ₂ S-
	KGPMF 4	-	+	+	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г +/- H ₂ S-
	KGPMF 5	-	+	+	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г- H ₂ S-
	KGPMF 6	-	+	+	+	+	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г- H ₂ S-
	KGPMF 7	-	+	+	+	+	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г- H ₂ S-
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	-	+	+	+	+	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г- H ₂ S-
	KGPMF 9	-	+	+	+	+	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г+ H ₂ S-
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	-	+	-	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г+ H ₂ S-
	KGPMF 11	-	+	-	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г +/- H ₂ S-
	KGPMF 12	-	+	-	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г+ H ₂ S-
	KGPMF 13	-	+	-	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г- H ₂ S-
	ATCC 70063	-	+	-	+	+/-	K+ Г+	K+ Г+	K+; Г+ H ₂ S-

K – продукција киселине; Г – продукција гаса; H₂S – водоник сулфид; „+“ позитивна реакција; „-“ негативна реакција; „+/-“ варијабилна реакција

Табела 7. Биохемијске карактеристике врста из рода *Escherichia*

Изолат	Оксидаза тест	Каталаза тест	Индол тест	Цитрат тест	Троструки шећер	МР тест	Ферментација глюкозе	MacConkey подлога на 37°C	MacConkey подлога на 44°C
KGPMF 14	-	+	+	-	K +; Г + H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 15	-	+	+	-	K +/-; Г + H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 16	-	+	+	-	K +/-; Г + H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 17	-	+	+	-	K +; Г + H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 21	-	+	+	-	K +/-; Г -; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +/-; Г +/-
KGPMF 22	-	+	+	-	K +; Г -; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +/-; Г -
KGPMF 23	-	+	+	-	K +; Г +; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K -; Г -
KGPMF 24	-	+	+	-	K +; Г +; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 25	-	+	+	-	K +/-; Г +; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 26	-	+	+	-	K +/-; Г +; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 27	-	+	+	-	K +/-; Г -; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 28	-	+	+	-	K +/-; Г -; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 29	-	+	+	-	K +; Г +; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +/-; Г -
KGPMF 30	-	+	+	-	K +; Г -; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 31	-	+	+	-	K +/-; Г +; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
KGPMF 32	-	+	+	-	K +/-; Г -; H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
<i>E. coli</i> (клинички изолат)	-	+	+	-	K +; Г + H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +
ATCC 25922	-	+	+	-	K +; Г + H ₂ S-	+	K + Г +	K +; Г +	K +; Г +

K – продукција киселине; Г – продукција гаса; H₂S – водоник сулфид; „+“ позитивна реакција; „-“ негативна реакција; „+/-“ варијабилна реакција

Табела 8. Биохемијске карактеристике врста из рода *Serratia* и *Enterobacter*

Врста	Изолат	Оксидаза тест	Каталаза тест	Индол тест	Цитрат тест	МР тест	Ферментација глукозе	Ферментација лактозе	Троструки шећер
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	–	+	+	+	+	K + Г +	K + Г +	K +/- Г + H ₂ S-
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	–	+	+	+	+	K+ Г +	K + Г +	K + Г + H ₂ S-
<i>E. gergoviae</i>	KGPMF 20	–	+	–	+	+/-	K + Г +	K + Г +	K + Г + H ₂ S-

K – продукција киселине; Г – продукција гаса; H₂S – водоник сулфид; „+“ позитивна реакција; „-“ негативна реакција; „+/-“ варијабилна реакција

6.5. Учесталост ентеробактерија у односу на коришћено сирило

У свим узорцима сирева из летњег и јесењег периода, где се користило „Sirela“ сирило, пронађени су изолати који припадају фам. Enterobacteriaceae. У узорцима 1 и 2, из пролећног периода, где се као сирило користила „Маја rekorderka“, припадници фам. Enterobacteriaceae нису детектовани. У узорку 3 из пролећног периода где се као сирило користила „Sirela“, идентификоване су врсте које припадају роду *Escherichia*. Може се закључити да у јако киселој средини која ја настала приликом употребе сирила „Маја rekorderka“ бактерије нису могле да се размножавају. Осетљивост ентеробактерија из сокобањског сира на ниску рН вредност средине је доказана у поглављу 6.6, 6.7, 6.8.

6.6. Карактеризација врста из рода *Klebsiella*

У сокобањском сиру је утврђено присуство 13 изолата који припадају врстама из рода *Klebsiella* и то *K. oxytoca* (7), *K. pneumoniae* (4) и *K. ornithinolytica* (2). У летњим и јесењим узорцима јавља се као доминатна врста (Табела 5). Изоловане *Klebsiella* spp. по својим биохемијским особинама се не разликују од стандардног соја (Табела 6).

Идентификоване врсте из рода *Klebsiella* су даље, испитиване са више аспеката: осетљивост врста на антибиотике, утицај еколошких фактора на планктонски раст и способност формирања биофилма, адхезивна способност зависна од растварача, способност адхезије за епител црева, могућност коагрегације са ентерококама, способност синтезе екстрацелуларних ензима.

6.6.1. Осетљивост на антибиотике

Свих 13 изолата из рода *Klebsiella* показују осетљивост на стрептомицин, хлорамфеникол и тетрациклин. *K. oxytoca* (KGPMF 1 и 2) показују умерену (интермедијарну) осетљивост на тетрациклин. *K. pneumoniae* ATCC 70063 показује осетљивост на стрептомицин и хлорамфеникол, а умерену (интермедијарну) осетљивост на тетрациклин. Изолати показују већу осетљивост на антибиотике у односу на

стандардни сој са изузетком *K. oxytoca* KGPMF 1 (иста осетљивост као стандардни сој на тетрациклин). Резултати су приказани у Табели 9.

Табела 9. Осетљивост врста из рода *Klebsiella* на антибиотике

Врста	Изолат	Антибиотик					
		Стрептомицин 10 µg		Хлорамфеникол 30 µg		Тетрациклин 30 µg	
		ЗИ	О	ЗИ	О	ЗИ	О
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 1	17	C	14	C	15	ИМ
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	20	C	32	C	18	ИМ
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 3	20	C	27	C	25	C
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	20	C	35	C	25	C
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 5	22	C	34	C	25	C
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 6	19	C	35	C	24	C
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 7	18	C	35	C	25	C
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	20	C	28	C	22	C
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	17	C	35	C	20	C
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	19	C	32	C	25	C
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	18	C	35	C	27	C
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 12	20	C	33	C	25	C
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 13	19	C	31	C	27	C
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	23	C	19	C	15	ИМ

„ЗИ“ — пречник зоне инхибиције дат у милиметрима (mm); „О“ — Осетљивост на антибиотик (C — сензитивна/осетљива; ИМ — умерена (интермедијарна) осетљивост)

6.6.2. Утицај еколошких фактора на планктонски раст *Klebsiella* spp.

Од тестираних сојева изабран је по један представник (*K. oxytoca* KGPMF 2, *K. oxytoca* KGPMF 4, *K. ornithinolytica* KGPMF 9, *K. pneumoniae* KGPMF 11) на којима је испитиван утицај различитих температура, рН и концентрација NaCl, глукозе, лактозе на планктонски раст. Одређен је и утицај наведених еколошких фактора на планктонски раст стандардног соја *K. pneumoniae* ATCC 70063.

Утицај температуре на планктонски раст

Бактерије су гајене на стандардним и модификованим подлогама, ТСБ и МХ. Модификација подлога је вршена кориговањем рН вредности и додавањем различитих концентрација NaCl, глукозе и лактозе. Раст бактерија је праћен на различитим температурама (4°C, 37°C и 44°C). Након инкубације, уочено је да нема раста на 4°C, као и

да је раст био бољи на 37°C него на 44°C. Када се пореди раст на две различите подлоге, закључује се да је био бољи на ТСБ него на МХ.

Утицај рН вредности на планктонски раст

Лимитирајући фактор за раст тестираних бактерија на обе подлоге и обе тестиране температуре била је рН 5,5. Утицај осталих рН вредности и температуре разликује се у зависности од таксономских обележја изолованих врста (Табела 10 и 11).

Утицај различите концентрације NaCl на планктонски раст

Повећана концентрација NaCl утицала је на раст свих тестираних врста, без обзира на тип подлоге и температуру раста. Уочено је да је повећањем концентрације соли дошло до инхибиције раста бактерија. Такође је уочено да је раст био бољи у ТСБ са свим концентрацијама соли него у МХ са истим концентрацијама, на обе тестиране температуре (Табела 12 и 13).

Утицај различите концентрације глукозе на планктонски раст

Раст тестираних изолата је био бољи на 37°C у ТСБ подлози која је садржала до 2,5% глукозе, осим за *K. oxytoca* KGPMF 2, која је боље расла у стандардној ТСБ подлози (Табела 14). *K. pneumoniae* ATCC 70063 је показала бољи раст на свим тестираним концентрацијама, осим на 3,5%. На истој подлози, али на температури од 44°C, изолати су показали бољи раст на концентрацији глукозе до 1,5%, него у контроли раста. *K. pneumoniae* ATCC 70063 показује стимулисан раст на 1,5% и 3,5% глукозе (Табела 14).

Раст тестираних изолата је генерално био бољи на 37°C у МХ подлози која је садржала до 2,5% глукозе, осим за *K. pneumoniae* KGPMF 11, која је боље расла у стандардној МХ подлози (Табела 15). *K. pneumoniae* ATCC 70063 је показала бољи раст у модификованој подлози која је садржала до 2,5% концентрације глукозе него у контроли раста. На истој подлози, али на температури од 44°C, изолати су расли боље на свим тестираним концентрацијама глукозе. Раст *K. pneumoniae* ATCC 70063 у 1,5% и 3,5% глукозе је био стимулисан, у поређењу са контролом раста (Табела 15).

Утицај различите концентрације лактозе на планктонски раст

Присуство лактозе у обе подлоге (ТСБ и МХ) је стимулисало раст свих тестираних изолата. Раст на 44°C је био смањен на свим тестираним концентрацијама лактозе, на обе подлоге. Раст је генерално био бољи на 37°C у МХ подлози која је садржала до 2,5% глюкозе. На 37°C, раст изолата KGPMF 2, KGPMF 9 и *K. pneumoniae* ATCC 70063 је био стимулисан, док је раст изолата KGPMF 4 и KGPMF 11 био редукован (Табела 16 и 17).

Табела 10. Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
рН		5,5	6,5	7	7,5*	8,5	5,5	6,5	7	7,5*	8,5
Врста	Изолат										
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	0,02±0,00 ¹	1,72±0,03	1,66±0,00	1,67±0,00	1,61±0,00	0,03±0,00 ¹	0,81±0,12	0,85±0,1	0,84±0,02	0,75±0,08
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	0,02±0,00	0,62±0,04	1,77±0,02	1,64±0,00	1,62±0,00	0,04±0,00	0,69±0,03	0,72±0,04	0,77±0,03	0,85±0,00
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	0,02±0,00	1,80±0,02	1,72±0,00	1,77±0,01	1,73±0,01	0,03±0,00	0,59±0,01	0,69±0,02	0,73±0,02	0,65±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,03±0,00	0,98±0,02	1,05±0,24	1,21±0,22	1,16±0,14	0,01±0,00	0,12±0,01	0,19±0,00	0,28±0,01	0,37±0,03
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	0,03±0,00	1,58±0,25	1,74±0,32	1,69±0,16	1,73±0,13	0,02±0,00	0,68±0,03	0,73±0,04	0,62±0,01	0,78±0,02

¹средња вредност ± стандардна девијација; *Контрола растаТабела 11. Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Температура		37°C					44°C				
рН		5,5	6,5	7*	7,5	8,5	5,5	6,5	7*	7,5	8,5
Врста	Изолат										
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	0,07±0,02 ¹	0,50±0,03	0,58±0,05	0,61±0,00	0,42±0,04	0,02±0,00	0,18±0,01	0,16±0,00	0,16±0,03	0,06±0,02
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	0,06±0,00	0,49±0,08	0,48±0,01	0,60±0,01	0,20±0,01	0,03±0,00	0,19±0,01	0,17±0,04	0,19±0,01	0,13±0,00
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	0,05±0,00	0,62±0,02	0,68±0,00	0,62±0,00	0,45±0,00	0,10±0,02	0,12±0,00	0,10±0,01	0,09±0,00	0,09±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,04±0,00	0,67±0,01	0,71±0,01	0,75±0,00	0,27±0,02	0,04±0,00	0,11±0,00	0,12±0,00	0,12±0,01	0,12±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	0,02±0,00	1,28±0,01	1,28±0,04	1,20±0,02	1,26±0,08	0,04±0,00	0,80±0,00	0,69±0,01	0,81±0,07	0,35±0,00

¹средња вредност ± стандардна девијација; *Контрола раста

Табела 12. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Температура		37°C			44°C		
% соли		4 *	6,5	8	4 *	6,5	8
Врста	Изолат						
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	1,23±0,03 ¹	0,56±0,03	0,13±0,01	0,63±0,03	0,35±0,05	0,03±0,01
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	1,59±0,01	0,86±0,28	0,36±0,04	0,59±0,02	0,44±0,00	0,05±0,02
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	1,42±0,01	0,75±0,02	0,25±0,02	0,63±0,00	0,46±0,01	0,06±0,01
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,74±0,02	0,60±0,01	0,31±0,00	0,61±0,02	0,32±0,03	0,17±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	1,69±0,15	0,88±0,05	0,28±0,02	0,54±0,06	0,44±0,00	0,04±0,01

¹средња вредност ± стандардна девијација; * контрола растаТабела 13. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Температура		37°C				44°C			
% соли		4	6,5	8	Контрола раста	4	6,5	8	Контрола раста
Врста	Изолат								
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	0,23±0,00 ¹	0,09±0,00	0,03±0,00	0,58±0,05	0,06±0,00	0,05±0,04	0,02±0,00	0,16±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	0,11±0,00	0,03±0,00	0,01±0,00	0,48±0,01	0,06±0,00	0,05±0,00	0,01±0,00	0,17±0,04
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	0,24±0,00	0,09±0,01	0,03±0,00	0,68±0,00	0,07±0,01	0,06±0,00	0,01±0,00	0,10±0,01
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,13±0,00	0,07±0,00	0,02±0,00	0,71±0,01	0,11±0,03	0,05±0,00	н. р.*	0,12±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	0,45±0,00	0,13±0,02	0,04±0,00	1,28±0,04	0,13±0,08	0,06±0,00	0,02±0,00	0,69±0,01

¹средња вредност ± стандардна девијација; *нема раста

Табела 14. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
	% глукозе	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	1,92±0,01 ¹	2,0±0,02	1,65±0,01	1,49±0,00	1,67±0,00	0,97±0,03	0,93±0,08	0,83±0,09	0,80±0,15	0,84±0,02
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	1,25±0,01	1,16±0,08	1,05±0,03	1,01±0,00	1,64±0,00	0,89±0,01	0,87±0,02	0,75±0,05	0,70±0,07	0,77±0,03
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	2,03±0,00	1,73±0,01	2,00±0,02	1,59±0,04	1,77±0,01	0,74±0,04	0,69±0,03	0,61±0,03	0,54±0,11	0,73±0,02
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,87±0,00	0,77±0,01	0,68±0,01	0,65±0,01	1,21±0,22	0,34±0,00	0,30±0,00	0,26±0,00	0,20±0,02	0,28±0,01
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	2,19±0,12	2,07±0,08	1,88±0,06	1,89±0,06	1,69±0,16	0,69±0,01	0,61±0,02	0,50±0,02	0,86±0,03	0,62±0,01

¹средња вредност ± стандардна девијацијаТабела 15. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Температура		37°C					44°C				
	% глукозе	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	1,15±0,04 ¹	1,11±0,03	1,04±0,17	1,32±0,29	0,58±0,05	0,33±0,08	0,37±0,05	0,49±0,04	0,34±0,05	0,16±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	0,43±0,02	0,41±0,03	0,74±0,02	0,34±0,02	0,48±0,01	0,39±0,00	0,41±0,02	0,40±0,01	0,37±0,00	0,17±0,04
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	1,19±0,02	0,94±0,00	1,06±0,03	0,82±0,00	0,68±0,00	0,26±0,01	0,23±0,00	0,31±0,00	0,18±0,00	0,10±0,01
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,43±0,00	0,39±0,01	0,44±0,00	0,31±0,00	0,71±0,01	0,29±0,02	0,27±0,01	0,26±0,00	0,23±0,01	0,12±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	1,49±0,01	1,30±0,03	1,75±0,07	1,11±0,03	1,28±0,04	0,63±0,05	1,10±0,05	0,31±0,01	1,58±0,17	0,69±0,01

¹средња вредност ± стандардна девијација

Табела 16. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
% лактозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	2,01±0,02 ¹	1,94±0,03	2,05±0,02	1,95±0,02	1,67±0,00	0,99±0,06	0,97±0,07	0,89±0,02	0,82±0,05	0,84±0,02
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	1,51±0,01	1,20±0,02	1,17±0,01	1,09±0,01	1,64±0,00	1,01±0,02	0,89±0,04	0,84±0,02	0,74±0,02	0,77±0,03
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	2,09±0,02	2,10±0,04	2,13±0,03	2,06±0,02	1,77±0,01	0,75±0,02	0,73±0,03	0,77±0,02	0,68±0,04	0,73±0,02
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	1,19±0,00	0,84±0,01	0,70±0,01	0,64±0,03	1,21±0,22	0,37±0,03	0,39±0,02	0,39±0,01	0,34±0,02	0,28±0,01
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	2,03±0,11	2,16±0,09	2,24±0,09	2,05±0,11	1,69±0,16	0,68±0,04	0,65±0,02	0,68±0,01	0,65±0,00	0,62±0,01

¹средња вредност ± стандардна девијацијаТабела 17. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Klebsiella* spp. у МХ

Температура		37°C					44°C				
% лактозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	1,19±0,02 ¹	1,17±0,02	1,13±0,01	1,08±0,00	0,58±0,05	0,44±0,02	0,46±0,01	0,41±0,04	0,41±0,05	0,16±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 4	0,48±0,02	0,51±0,04	0,44±0,01	0,43±0,03	0,48±0,01	0,50±0,12	0,55±0,00	0,50±0,00	0,49±0,00	0,17±0,04
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	1,12±0,02	1,04±0,01	0,95±0,02	0,86±0,01	0,68±0,00	0,50±0,02	0,55±0,06	0,50±0,06	0,49±0,02	0,10±0,01
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,59±0,02	0,49±0,02	0,48±0,03	0,47±0,03	0,71±0,01	0,29±0,00	0,27±0,00	0,22±0,06	0,26±0,01	0,12±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	1,56±0,02	1,46±0,02	1,48±0,06	1,49±0,10	1,28±0,04	1,52±0,02	1,62±0,13	1,70±0,09	1,69±0,04	0,69±0,01

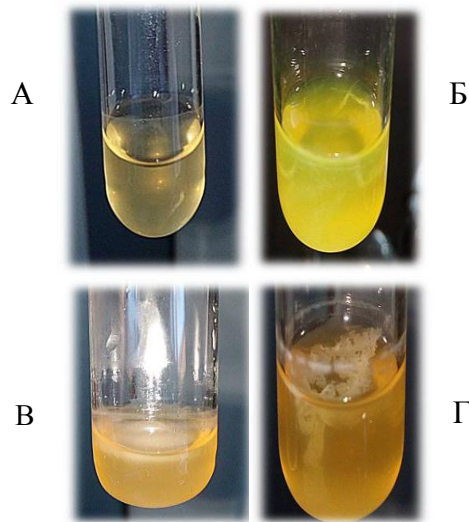
¹средња вредност ± стандардна девијација

6.6.3. Способност формирања биофилма *Klebsiella* spp.

Способност формирања биофилма *Klebsiella* spp. је испитивана на 4°C, 37°C, 44°C. За све изолате чија је апсорбанца раста била већа од контроле стерилности подлоге, сматрано је да поседују способност формирања биофилма. После инкубације, уочено је да *Klebsiella* KGPMF 2, KGPMF 4, KGPMF 9, KGPMF 11 имају способност формирања биофилма на две подлоге (ТСБ и МХ) само на 37°C. *Klebsiella* KGPMF 4 не поседује способност формирања биофилма. Сви резултати су поређени са позитивном контролом *K. pneumoniae* ATCC 70063.

Пеликула тест

За испитивање способности формирања биофилма изолата из рода *Klebsiella* (KGPMF 2, KGPMF 4, KGPMF 9, KGPMF 11 и *K. pneumoniae* ATCC 70063) је коришћен пеликула тест. Након инкубације од 96 h, уочено је да *K. pneumoniae* KGPMF 11 и *K. pneumoniae* ATCC 70063 формирају пеликулу. Карактеристике пеликуле су различите у односу на подлогу на којој су бактерије гајене. *K. pneumoniae* KGPMF 11 је формирала врло танку пеликулу (слаб биофилм продуцент) на МХ (А), док на ТСБ је формирала танку пеликулу (умерен биофилм продуцент) (Б), *K. pneumoniae* ATCC 70063 формира танку пеликулу (умерен биофилм умерен биофилм продуцент) на МХ (В), док на ТСБ формира дебелу пеликулу (снажан биофилм продуцент) (Г) (Сл. 7).



Слика 7. Формирана пеликула А: *K. pneumoniae* KGPMF 11 на МХ; Б: *K. pneumoniae* KGPMF 11 на ТСБ; В: *K. pneumoniae* ATCC 70063 на МХ; Г: *K. pneumoniae* ATCC 70063 на ТСБ
(фото: К. Младеновић)

6.6.4. Утицај еколошких фактора на биофилм *Klebsiella* spp.

Утицај рН вредности на бактеријски биофилм

Промена рН вредности подлоге утицала је на биофилм испитиваних врста, а квалитет промена је био различит у зависности од врсте бактерије и врсте подлоге.

На свим тестираним рН у ТСБ способност формирања биофилма је редукована у односу на контролу рН 7,5. Изузетак је *K. oxytoca* KGPMF 2, чија је способност формирања биофилма стимулисана на рН 5,5 (График 7). Утицај рН у ТСБ на формирану биофилм је зависио од врсте (График 7).

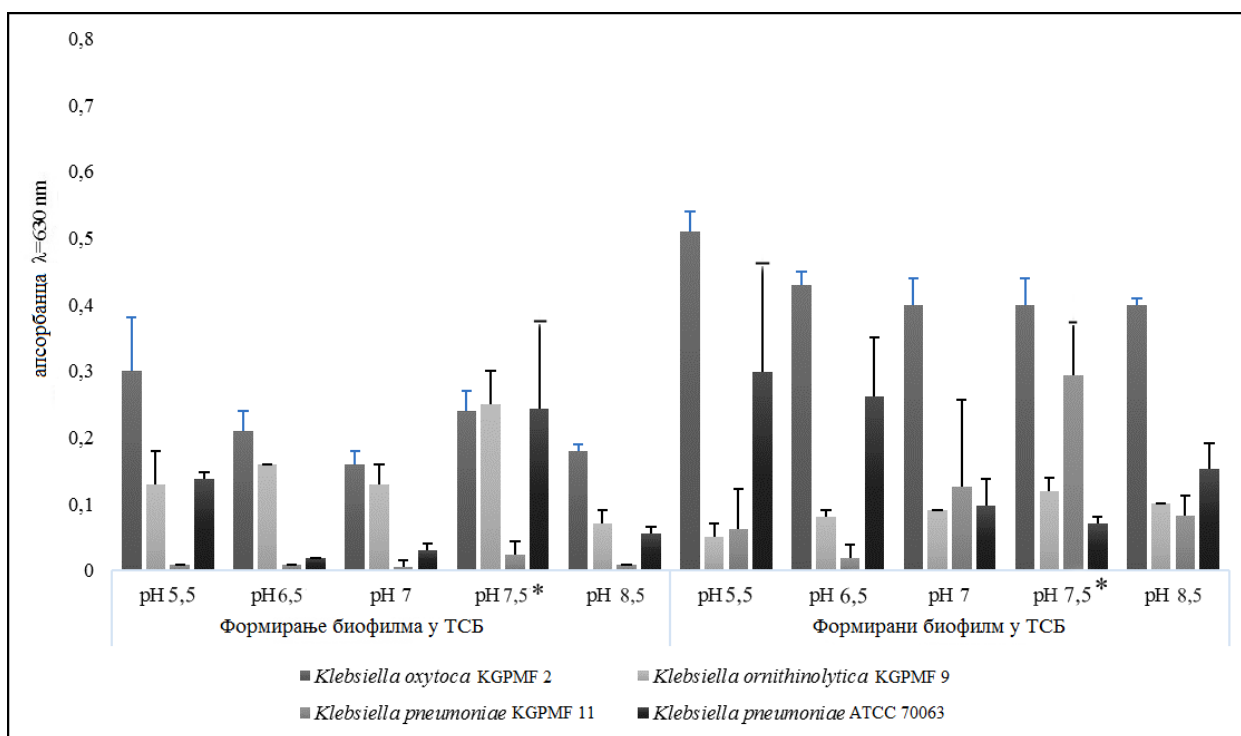


График 7. Утицај различите рН вредности на способност формирања и формираног биофилма *Klebsiella* spp. у ТСБ (*контрола раста)

Утицај рН у МХ на формирање и формираног биофилма је зависио од врсте (График 8). У случају биофилма *K. oxytoca* KGPMF 2 кисела до слабо базне средине (7,5) је имала стимулативни ефекат. Базна средина (рН 8,5) не стимулише развој биофилма (График 8). Утицај рН у МХ на формираног биофилма је зависио од врсте. Детаљнији приказ утицаја рН је дат на Графику 8.

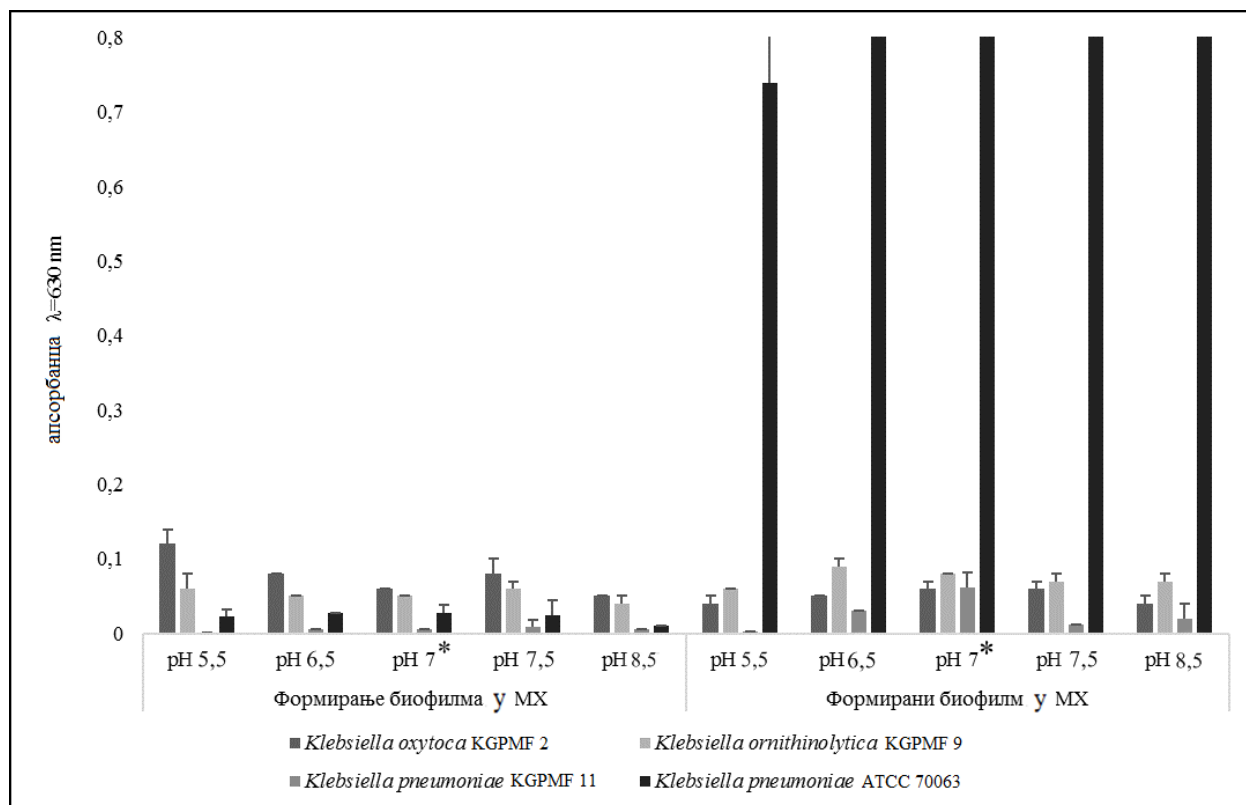


График 8. Утицај различите рН вредности на способност формирања и формираног биофилма *Klebsiella* spp. у МХ подлози (*контрола раста)

Утицај различите концентрације NaCl на бактеријски биофилм

Повећана концентрација NaCl у подлогама је утицала на способност формирања биофилма испитиваних бактерија. Ефекат концентрације NaCl био је различит у односу на састав подлоге и врсте бактерије.

Различите концентрације NaCl у ТСБ делују инхибиторно на формирање биофилма изолата, осим на биофилм *K. oxytoca* KGPMF 2 (6,5%) и *K. pneumoniae* ATCC 70063 (6,5%, 8%). Различите концентрације NaCl делују инхибиторно на формираног биофилм изолата, осим на формираног биофилм *K. oxytoca* KGPMF 2 (8%) и *K. pneumoniae* ATCC 70063 (6,5%) (График 9).

Различите концентрације NaCl у МХ делују инхибиторно на формирање биофилма изолата, осим на биофилм *K. pneumoniae* ATCC 70063 (4%). Различите концентрације NaCl делују инхибиторно на формираног биофилм свих врста, са изузетком *K. pneumoniae* ATCC 70063 где је стимулисан раст формираног биофилма (График 10).

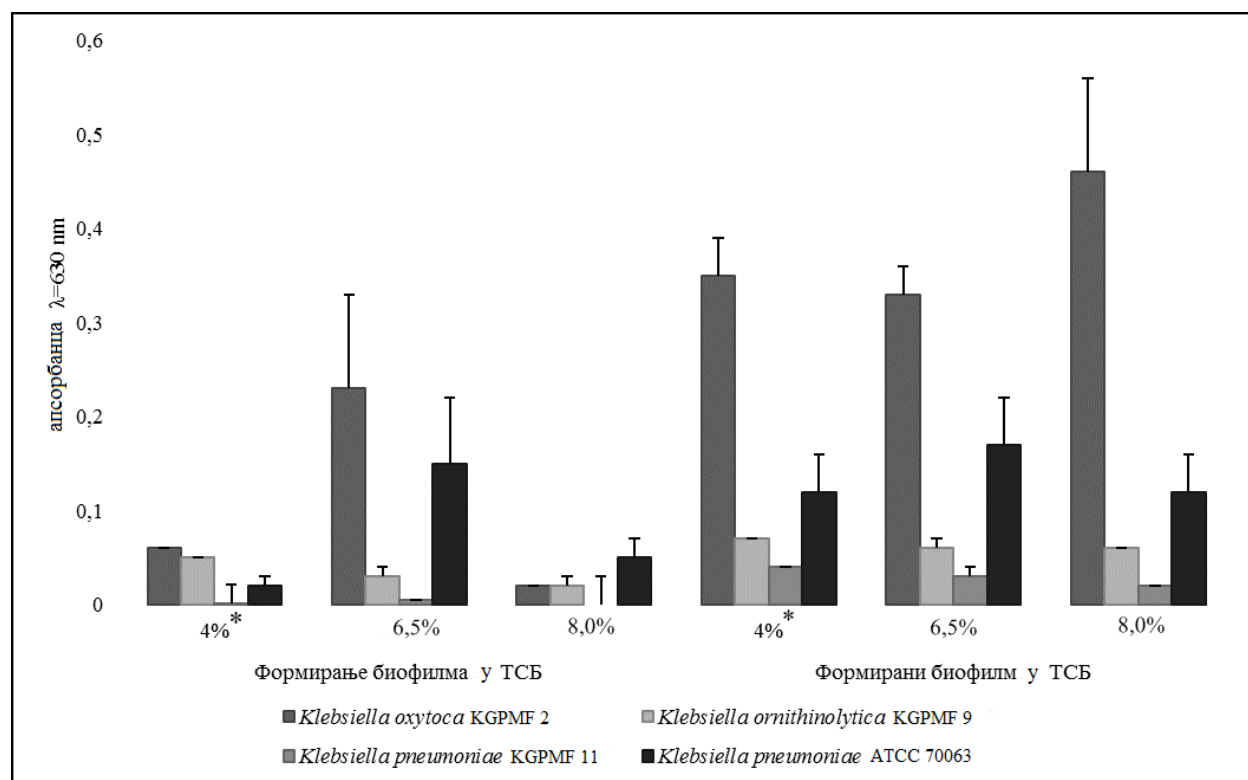


График 9. Утицај различите концентрације NaCl на способност формирања и формираног биофилма *Klebsiella* spp. у ТСБ (*контрола раста)

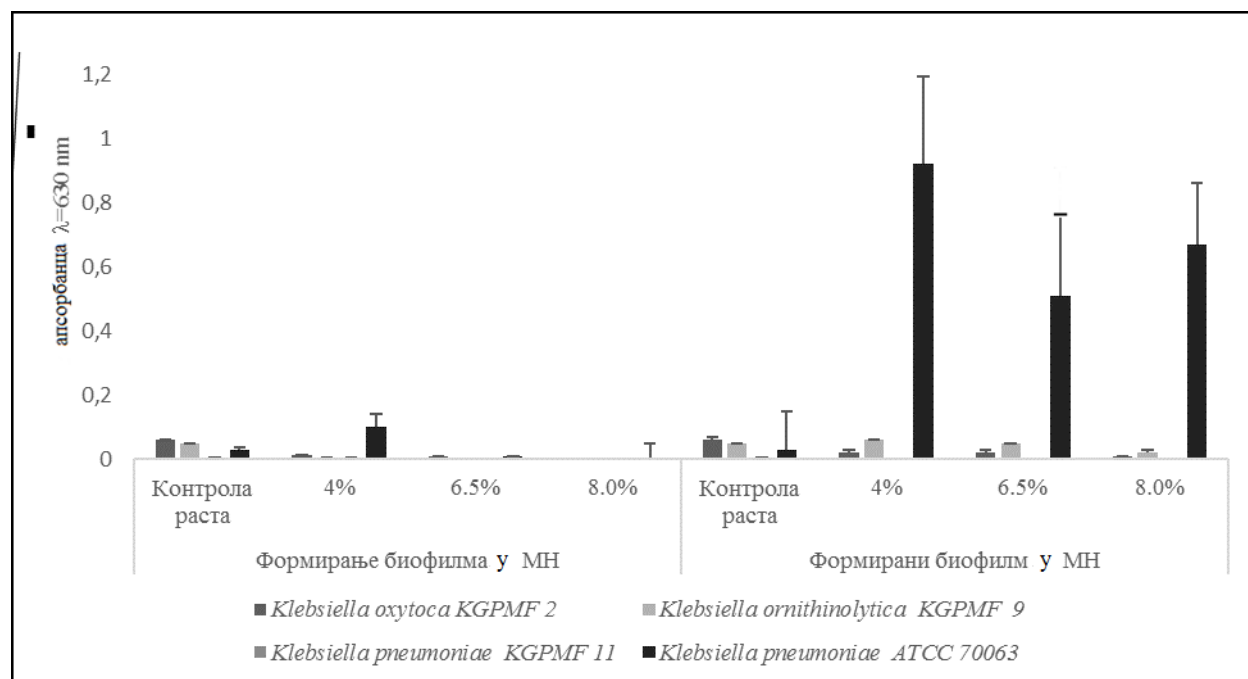


График 10. Утицај различите концентрације NaCl на способност формирања и формираног биофилма *Klebsiella* spp. у МХ подлози

Утицај различите концентрације глукозе на бактеријски биофилм

Испитиван је утицај глукозе на способност формирања и формиран биофилм *Klebsiella* spp. Утицај глукозе је зависио од подлоге за раст и од врсте. На основу резултата се може закључити да је постајао већи утицај различитих концентрација глукозе на формиран биофилм него на процес формирања биофилма у ТСБ код врсте *K. pneumoniae* ATCC 70063 у односу на контролу раста. Утицај различитих концентрација глукозе у МХ на биофилм није изражен као утицај различитих концентрација глукозе у ТСБ (График 11).

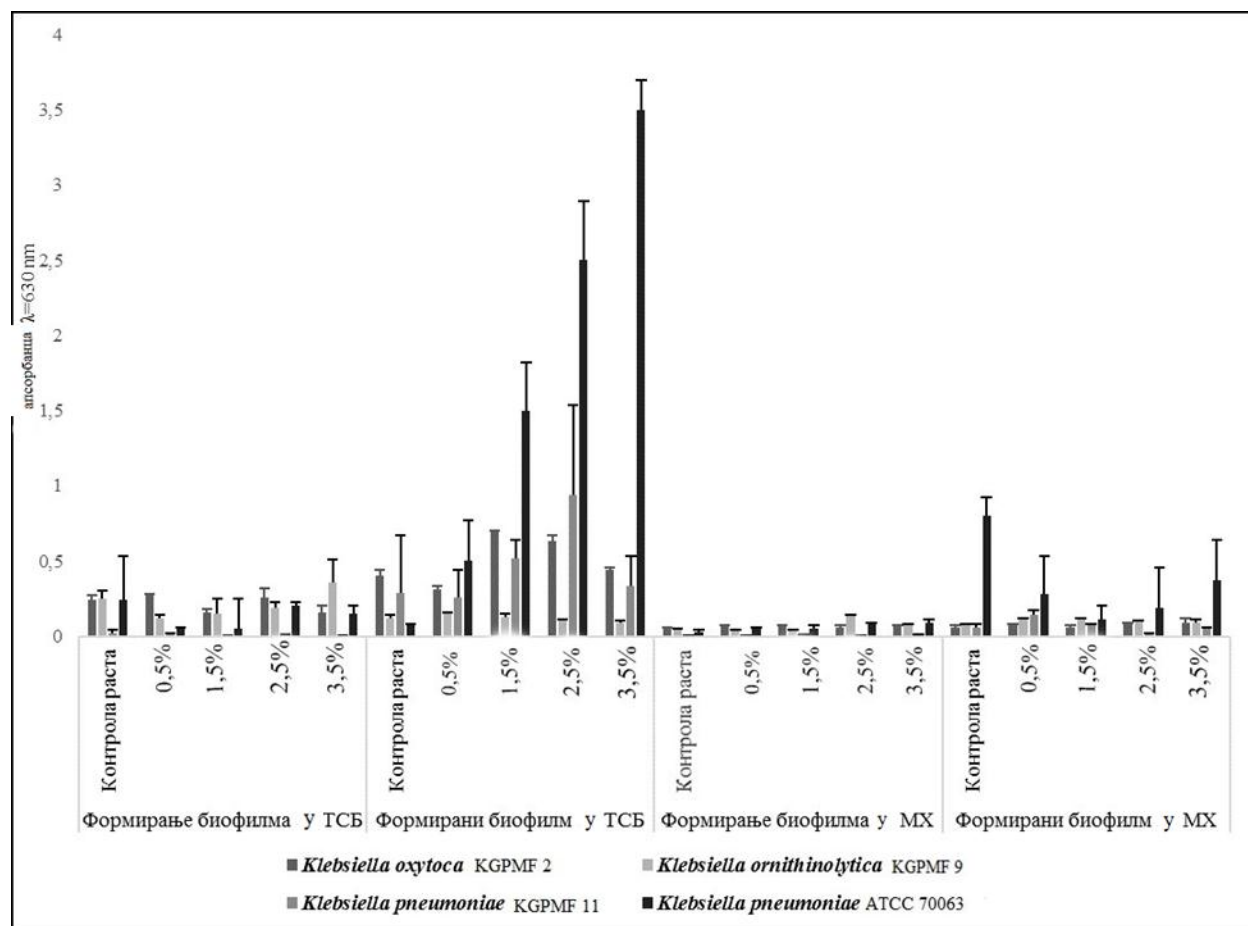


График 11. Утицај различите концентрације глукозе на способност формирања биофилма и формиран биофилм *Klebsiella* spp.

Утицај различите концентрације лактозе на бактеријски биофилм

Испитиван је утицај различитих концентрација лактозе на способност формирања и формиран биофилм *Klebsiella* spp. Утицај лактозе је зависио од подлоге за раст и од врсте. Ефекат лактозе је био израженији на формиран биофилм врста него на процес формирања биофилма на обе подлоге за раст. Утицај различитих концентрација лактозе за сваку врсту је приказан на Графику 12.

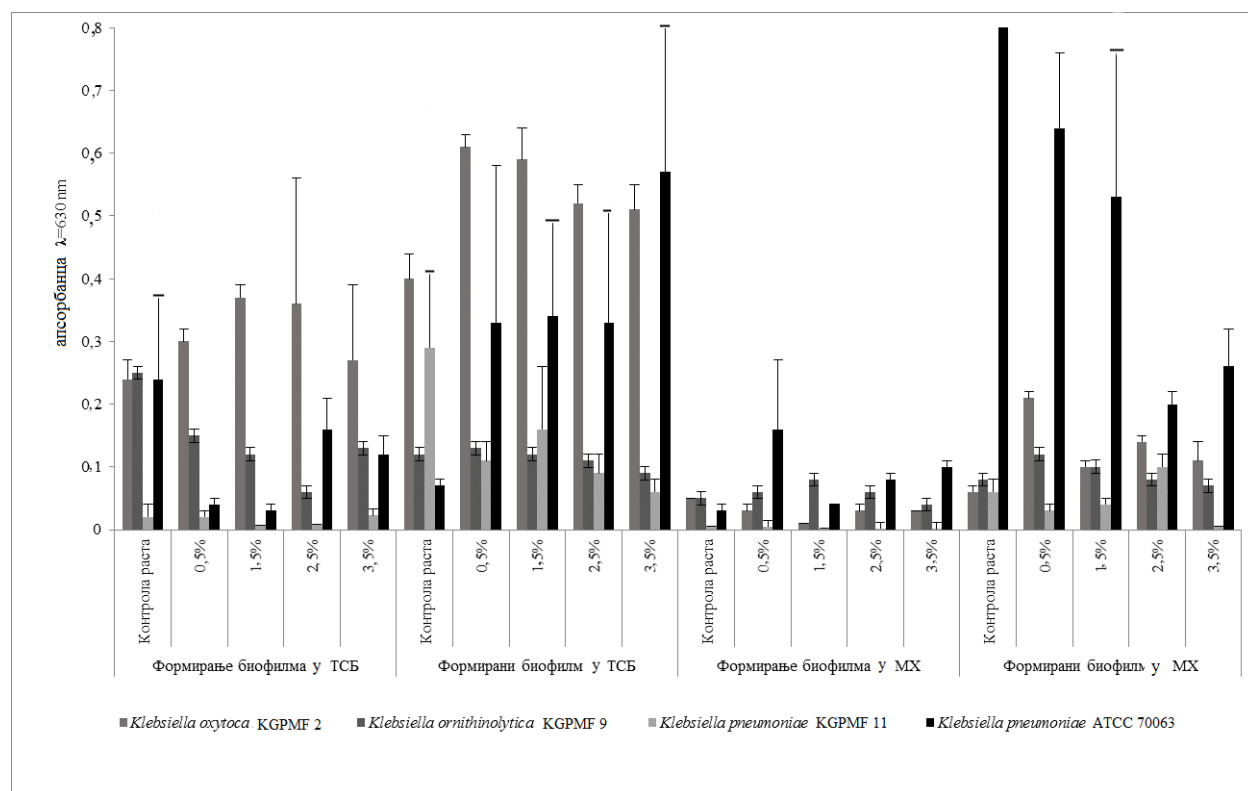


График 12. Утицај различите концентрације лактозе на способност формирања биофилма и формиран биофилм *Klebsiella* spp.

6.6.5. Адхезивна способност *Klebsiella* spp.

Од свих изолати рода *Klebsiella* spp. изабрана су по два представника за испитивање адхезивне способности. Врсте показују различит степен адхезије која је зависила од врсте растварача. Највећа способност бактеријске адхезије утврђена је у присуству хлороформа (*K. ornithinolytica* KGPMF 9 (44,44%), *K. pneumoniae* KGPMF 10 (32,73%), *K. pneumoniae* KGPMF 13 (43,13%)). Адхезивна способност *K. pneumoniae* ATCC 70063 је износила 25,49%. Бактерије из рода *Klebsiella* изоловане из сира су бољи електрон донори, а у исто време су слаби примаоци електрона јер показују већи степен адхезије у присуству хлороформа.

Адхезија у присуству етил ацетата је детектована код *K. oxytoca* KGPMF 2, *K. ornithinolytica* KGPMF 9, *K. pneumoniae* KGPMF 13. Иако је проценат адхезије у присуству етил ацетата мањи у односу на проценат у присуству хлороформа, ове бактерије могу бити и примаоци електрона.

У присуству ксилена, мали проценат адхезије је детектован само код *K. oxytoca* KGPMF 1 и *K. ornithinolytica* KGPMF 8 (Табела 18). На основу резултата се може закључити да изолати имају низак степен хидрофобности.

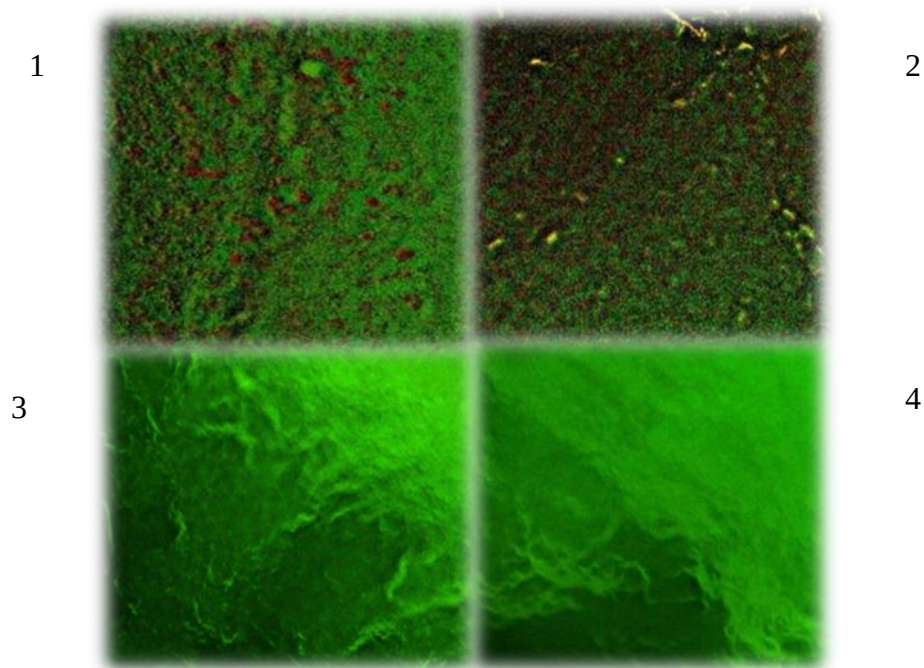
Табела 18. Способност адхезије врста из рода *Klebsiella*

Врста	Изолат	Растварач		
		Хлороформ	Етил ацетат	Ксилен
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 1	17,18*	/	9,01
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	19,77	10,82	/
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	20,55	/	1,70
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	44,44	6,72	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	32,73	/	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 13	43,13	13,10	/
<i>K. pneumonia</i>	ATCC 70063	25,49	10,02	/

* Резултати представљају проценат способности адхезије врста у присуству растварача

In vitro адхезија на епител свињског црева

Испитивана је способност адхезије ентеробактерија изолованих из сира на епител свињског црева. Адхезивна способност је примећена код *K. ornithinolytica* KGPMF 9 и *K. pneumoniae* KGPMF 13 (Сл. 8). Бактерије су одабране према проценту адхезије у присуству хлороформа.



Слика 8. 1. *K. ornithinolytica* KGPMF 9; 2. *K. pneumoniae* KGPMF 13;
3. Контрола ПБС; 4. Контрола неинакулисана ТСБ
(фото: К. Младеновић)

6.6.6. Коагрегација са *E. faecalis*

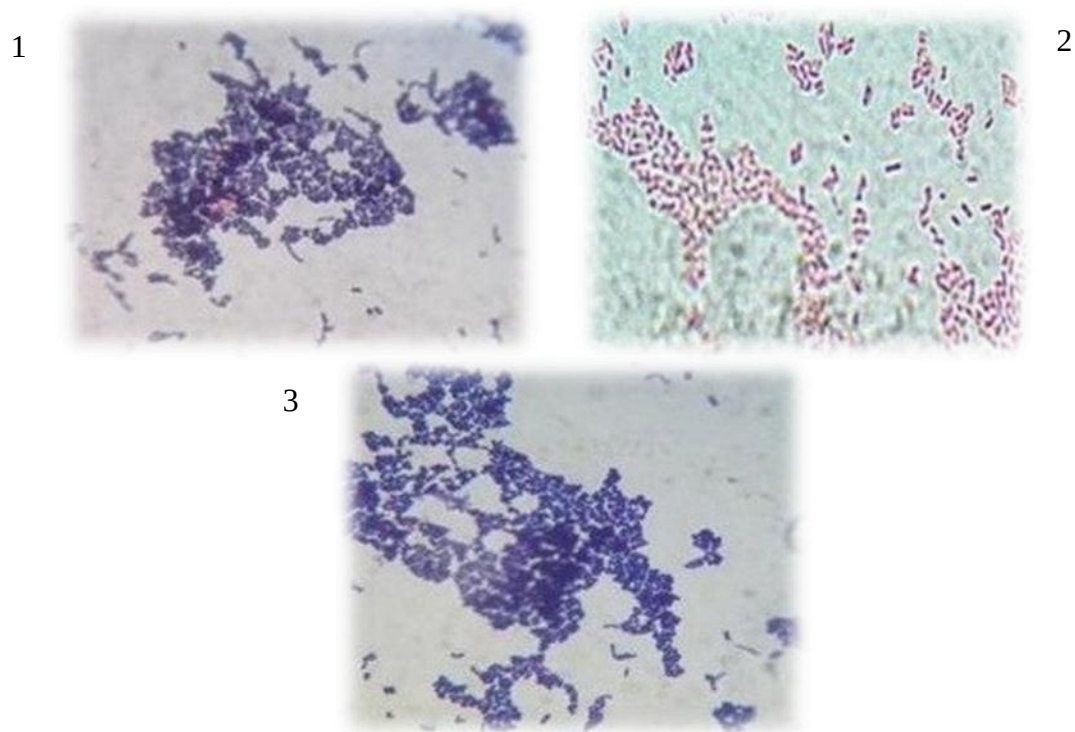
Од свих изолата рода *Klebsiella* spp. изабрана су по два представника за испитивање коагрегације са *E. faecalis* KGPMF 49 пореклом из истог сокобањског сира. Коагрегација није детектована код *K. oxytoca* KGPMF 1, *K. ornithinolytica* KGPMF 9, *K. pneumoniae* KGPMF 10, *K. pneumoniae* KGPMF 13 након 2 h инкубације. *K. ornithinolytica* KGPMF 8 је показала највећи проценат коагрегације са *E. faecalis* KGPMF 49 (32,3%), а затим *K. oxytoca*

KGPMF 2 (16,67%). Резултати су приказани у Табели 19. Коагрегација је потврђена бојењем по Граму и микроскопирањем (Сл. 9).

Табела 19. Коагрегација врста из рода *Klebsiella* са *E. faecalis* KGPMF 49

Врста	Изолат	<i>Enterococcus faecalis</i> KGPMF 49		
		0h*	2h*	%
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 1	0,23	0,25	/
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	0,24	0,20	16,67
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	0,22	0,15	32,3
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 9	0,26	0,31	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	0,23	0,23	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 13	0,21	0,20	/
<i>K. pneumoniae</i>	ATCC 70063	0,31	0,21	32,2

*Апсорбанца измерена на 600 nm



Слика 9. 1. *K. ornithinolytica* KGPMF 9 + *E. faecalis* KGPMF 49; 2. *K. ornithinolytica* KGPMF 9; 3. *E. faecalis* KGPMF 49
(фото: К. Младеновић)

6.6.7. Ензимска активност *Klebsiella* spp.

Бактерије из рода *Klebsiella* изоловане из сокобањског сира не поседују протеолитичку и липолитичку активност, осим *K. oxytoca* KGPMF 1. Као позитивна контрола коришћен је *B. subtilis* ATCC 6633 за који је познато да поседује протеолитичку и липолитичку активност, док је као негативна контрола коришћен сој *E. coli* ATCC 25922.

Да би се детектовала и најмања количина екстрацелуларних ензима коришћен је спектрофотометријски метод. Укупна количина протеина и активност протеазе је одређена у две подлоге. Иако преко скрининг методе није детектована протеолитичка активност, спектрофотометријски је измерена мала активност протеаза. Количина ензима је зависила од подлоге и од врсте бактерије.

Највећа количина укупних протеина је измерена код *K. oxytoca* KGPMF 1, која је расла у МХ (Табела 20).

Активност протеазе је била већа код бактерија које су расле у ТСБ, осим код *K. pneumoniae* KGPMF 11 где је активност протеазе била већа у МХ. Код изолата *K. oxytoca* KGPMF 1, *K. oxytoca* KGPMF 3 није детектована протеазна активност на обе подлоге (Табела 20).

Табела 20. Активност протеазе и укупна количина протеина *Klebsiella* spp.

Врста	Изолат	Протеаза (IU mL ⁻¹)		Укупна количина протеина (mg mL ⁻¹)	
		ТСБ	МХ	ТСБ	МХ
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 1	/	/	0,02±0,00	0,13±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	6,1±0,00*	/	0,02±0,00	0,03±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 3	0	/	0,02±0,00	0,02±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 7	1,4±0,00	0,4±0,00	0,00±0,00	/
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	0,8±0,00	0,4±0,00	0,01±0,00	0,02±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	1,5±0,00	1,4±0,00	0,01±0,00	0,01±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	/	5,1±0,00	/	0,03±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 12	4,3±0,00	2,2±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00

* средња вредност ± стандардна девијација; / -није измерена вредност

Већа активност киселе инвертазе је измерена код *K. oxitoca* KGPMF 1, *K. oxitoca* KGPMF 2, *K. pneumoniae* KGPMF 10, *K. pneumoniae* KGPMF 11 које су расле у МХ док је већа активност киселе инвертазе детектована код *K. oxytoca* KGPMF 3, *K. oxytoca* KGPMF 7, *K. oxytoca* KGPMF 8 које су расле у ТСБ. Активност киселе инвертазе код *K. oxytoca* KGPMF 12 је иста на обе подлоге. Активност алкалне инвертазе није детектована (Табела 21).

Табела 21. Активност киселе и алкалне инвертазе *Klebsiella* spp.

Врста	Изолат	Кисела инвертаза (IU mL ⁻¹)		Алкална инвертаза (IU mL ⁻¹)	
		ТСБ	МХ	ТСБ	МХ
<i>K. oxitoca</i>	KGPMF 1	0,01±0,00*	0,09±0,00	/	/
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	0	0,05±0,00	/	/
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 3	0,09±0,00	0,03±0,00	/	/
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 7	0,62±0,00	0,03±0,00	/	/
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	0,63±0,00	0,09±0,00	/	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	0,03±0,00	0,04±0,00	/	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,01±0,00	0,02±0,00	/	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 12	0,09±0,00	0,09±0,00	/	/

* средња вредност ± стандардна девијација; / - нема активности

Амилазна активност је била већа код бактерија које су расле у ТСБ подлози, осим *K. oxitoca* KGPMF 3, *K. ornithinolytica* KGPMF 8, *K. pneumoniae* KGPMF 10, где је амилазна активност била већа приликом раста у МХ. Амилазна активност *K. pneumoniae* KGPMF 12 је била иста у обе подлоге (Табела 22).

Алкална фосфатаза није детектована код *K. pneumoniae* KGPMF 8 и 10 на обе подлоге (Табела 22), и највећа вредност је очитана за *K. oxytoca* KGPMF 7 која је расла у ТСБ.

Табела 22. Активност амилазе и алкалне фосфатазе *Klebsiella* spp.

Врста	Изолат	Амилаза (IU mL ⁻¹)		Алкална фосфатаза (IU mL ⁻¹)	
		ТСБ	МХ	ТСБ	МХ
<i>K. oxitoca</i>	KGPMF 1	0,25±0,01	0,06±0,00	0,10±0,00	0,01±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 2	0,04±0,00	0,02±0,00	0,10±0,00	0,08±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 3	0,05±0,00	0,07±0,00	0,09±0,00	0,05±0,00
<i>K. oxytoca</i>	KGPMF 7	0,23±0,00	/	0,85±0,00	0,05±0,00
<i>K. ornithinolytica</i>	KGPMF 8	/	0,05±0,00	/	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 10	0,03±0,00	0,07±0,00	/	/
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 11	0,22±0,00	/	0,45±0,00	0,05±0,00
<i>K. pneumoniae</i>	KGPMF 12	0,03±0,00	0,03±0,00	0,50±0,00	0,04±0,00

*средња вредност ± стандардна девијација

6.7. Карактеризација врста из рода *Serratia*

У сокобањском сиру је утврђено присуство врста *S. odorifera* и *S. marcescens*. Биохемијске карактеристике ових врста су приказане у Табели 9. Биохемијске карактеристике врста одступају од особина *Serratia* spp. из литературних извора (Grimont and Grimont, 2006). *S. marcescens* биогр 1 одступа од соја из доступне литературе по: индол, сорбитол и аргинин тесту, док се *S. odorifera* разликује по ксилоза и аргинин тесту.

6.7.1. Осетљивост на антибиотике

Бактерије *S. odorifera* и *S. marcescens* показују осетљивост на стрептомицин и хлорамфеникол, а резистенцију на тетрациклин. Осетљивост ових врста према изабраним антибиотицима је приказана у Табели 23.

Табела 23. Осетљивост врста из рода *Serratia* на антибиотике

Врста	Изолат	Антибиотик					
		Стрептомицин 10 µg		Хлорамфеникол 30 µg		Тетрациклин 30 µg	
		ЗИ	О	ЗИ	О	ЗИ	О
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	19	C	25	C	14	P
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	17	C	26	C	8	P

„ЗИ“ – пречник зоне инхибиције дат у милиметрима (mm); „О“ – Осетљивост на антибиотик (C – сензитивна/осетљива; P – резистентна)

6.7.2. Утицај еколошких фактора на планктонски раст *Serratia* spp.

Карактеристике планктонског раста *S. odorifera* и *S. marcescens* су одређене на стандардној и модификованој ТСБ и МХ подлози и на три тестиране температуре (4°C, 37°C, 44°C). Модификација подлога је вршена кориговањем рН вредности и додавањем различитих концентрација NaCl, глукозе и лактозе. Након инкубације, уочено је да нема раста на 4°C.

Утицај рН вредности на планктонски раст

Утицај рН вредности на планктонски раст *S. odorifera* и *S. marcescens* је била израженија на ТСБ, него на МХ. Кисели медијум је био лимитирајући фактор за раст тестираних бактерија, док је базни медијум био прикладнији за раст. Инхибиторни ефекат рН је био већи при инкубацији на 44°C, на обе тестиране подлоге (Табеле 24 и 25).

Утицај различите концентрације NaCl на планктонски раст

Повећање концентрације соли у подлози инхибира раст *S. odorifera* and *S. marcescens*. Инхибиторни ефекат соли је потврђен у обе тестиране подлоге и на обе температуре (37°C и 44°C). Резултати су приказани у Табелама 26 и 27.

Утицај различите концентрације глукозе на планктонски раст

Повећана концентрација глукозе у ТСБ, на обе тестиране температуре, инхибира раст *S. odorifera* и *S. marcescens* (Табела 28). У МХ са додатком глукозе, на 37°C *S. odorifera* показује бољи раст него у контроли раста (МХ стандардног састава). *S. marcescens* расте исто као у контроли раста на свим концентрацијама глукозе осим на 2,5% где је раст био редукован. На 44°C, обе врсте показују бољи раст у присуству глукозе него у контроли раста (Табела 29).

Утицај различите концентрације лактозе на планктонски раст

Повећана концентрација лактозе у ТСБ, стимулише раст *S. odorifera* (осим у концентрацији лактозе од 3,5%), док је раст *S. marcescens* био инхибиран на 37°C. На 44°C раст обе врсте је инхибиран на свим концентрацијама лактозе у односу на контролу раста (Табела 30). Повећана концентрација лактозе у МХ, на обе тестиране температуре, стимулише раст *S. odorifera* и *S. marcescens* (Табела 31).

Табела 24. Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
рН		5,5	6,5	7	7,5*	8,5	5,5	6,5	7	7,5*	8,5
Врста	Изолат										
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	0,02±0,00 ¹	0,86±0,02	1,81±0,00	1,67±0,00	1,67±0,00	0,02±0,00	0,88±0,22	1,03±0,01	1,42±0,02	1,22±0,01
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,01±0,00	0,71±0,03	0,76±0,01	1,58±0,03	1,51±0,02	0,01±0,00	0,53±0,18	0,67±0,03	1,30±0,24	1,30±0,11

¹средња вредност ± стандардна девијација; * контрола растаТабела 25. Утицај различитих рН вредности и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ

Температура		37°C					44°C				
рН		5,5	6,5	7*	7,5	8,5	5,5	6,5	7*	7,5	8,5
Врста	Изолат										
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	0,05±0,00 ¹	0,60±0,01	0,73±0,00	0,69±0,04	0,41±0,06	0,02±0,00	0,24±0,02	0,21±0,03	0,19±0,04	0,11±0,03
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,07±0,01	0,80±0,01	0,75±0,09	0,72±0,07	0,43±0,01	0,02±0,00	0,38±0,05	0,30±0,05	0,23±0,00	0,17±0,00

¹средња вредност ± стандардна девијација; * контрола растаТабела 26. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ

Температура		37°C			44°C		
% соли		4*	6,5	8	4*	6,5	8
Врста	Изолат						
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	1,41±0,01 ¹	0,50±0,04	0,16±0,00	0,92±0,03	0,47±0,27	0,09±0,03
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,84±0,00	0,62±0,01	0,49±0,02	0,72±0,02	0,50±0,31	0,37±0,23

¹средња вредност ± стандардна девијација; * контрола раста

Табела 27. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ

Температура		37°C				44°C			
% соли		4	6,5	8	Контрола раста	4	6,5	8	Контрола раста
Врста	Изолат								
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	0,25±0,02 ¹	0,08±0,00	0,04±0,02	0,69±0,04	0,06±0,00	0,02±0,00	н.р.	0,19±0,04
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,25±0,01	0,1±0,01	0,02±0,00	0,72±0,07	0,07±0,03	0,04±0,00	н.р.	0,23±0,00

¹средња вредност ± стандардна девијација; н.р.- нема растаТабела 28. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
	% глюкозе	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	1,31±0,04 ¹	1,07±0,11	1,09±0,04	0,96±0,14	1,67±0,00	1,25±0,09	1,15±0,29	1,08±0,04	0,97±0,09	1,42±0,02
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,90±0,23	0,86±0,22	0,77±0,01	0,65±0,01	1,58±0,03	0,84±0,07	0,68±0,04	0,57±0,06	0,47±0,00	1,30±0,24

¹средња вредност ± стандардна девијацијаТабела 29. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ

Температура		37°C					44°C				
% глюкозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	0,81±0,02 ¹	0,72±0,02	0,87±0,01	0,81±0,05	0,73±0,00	0,60±0,01	0,60±0,03	0,61±0,03	0,63±0,02	0,21±0,03
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,76±0,04	0,73±0,02	0,48±0,05	0,74±0,02	0,75±0,09	0,61±0,14	0,65±0,10	0,49±0,01	0,69±0,09	0,30±0,05

¹средња вредност ± стандардна девијација

Табела 30. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
% лактозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола
Врста	Изолат					раста					раста
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	2,05±0,12 ¹	1,80±0,02	1,89±0,01	1,45±0,07	1,67±0,00	1,32±0,01	1,19±0,01	1,14±0,03	1,09±0,03	1,42±0,02
<i>S. marcescens</i>	KGPMF 19	1,33±0,07	1,13±0,02	1,02±0,03	0,93±0,01	1,58±0,03	1,07±0,05	0,96±0,05	0,84±0,06	0,78±0,03	1,30±0,24

¹средња вредност ± стандардна девијацијаТабела 31. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *Serratia* spp. у МХ

Температура		37°C					44°C				
% лактозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола
Врста	Изолат					раста					раста
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	1,00±0,01 ¹	0,83±0,01	0,84±0,01	0,83±0,00	0,73±0,00	0,49±0,08	0,52±0,04	0,51±0,11	0,48±0,13	0,21±0,03
<i>S. marcescens</i>	KGPMF 19	1,04±0,01	0,88±0,08	0,80±0,01	0,73±0,00	0,75±0,09	0,55±0,11	0,59±0,09	0,58±0,09	0,58±0,04	0,30±0,05

¹средња вредност ± стандардна девијација

6.7.3. Способност формирања биофилма *Serratia* spp.

Способност формирања биофилма

S. odorifera и *S. marcescens* су тестиране на способност формирања биофилма у ТСБ и МХ, на температурама 4°C, 37°C и 44°C. Обе врсте формирају биофилм само на температури од 37°C. *S. odorifera* не формира биофилм у ТСБ, док *S. marcescens* формира биофилм на обе подлоге.

Пеликула тест

Ниједан изолат рода *Serratia* spp. не формира пеликулу у ТСБ и МХ на 37°C али формирају биофилм на 37°C у обе подлоге.

6.7.4. Утицај еколошких фактора на биофилм *Serratia* spp.

Утицај рН вредности на бактеријски биофилм

Промена рН средине у ТСБ у односу на контролу су инхибирале способност формирања биофилма. Исти је утицај рН и на формирани биофилм осим код *S. marcescens* где је раст био мало већи од контроле на рН 6,5 (График 13).

Утицај различите рН на способност формирања биофилма бактерија у МХ није био промењен у односу на контролу раста, осим код *S. marcescens* која није формирала биофилм на рН 8,5. Утицај различите рН је имао инхибиторни ефекат на формирани биофилм осим на формирани биофилм *S. odorifera* на рН 8,5 (График 13).

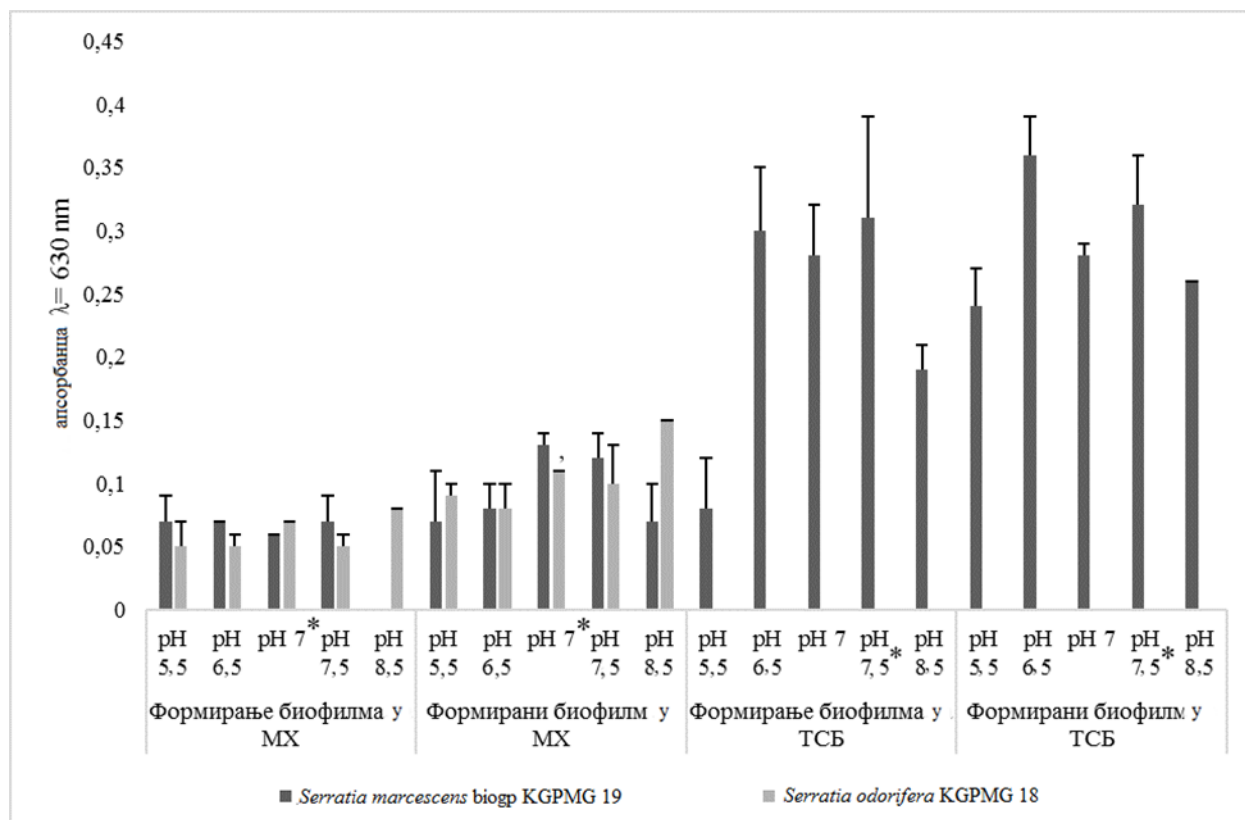


График 13. Утицај рН на способност формирања и формираног биофилма *Serratia* spp. (*контрола раста)

Утицај различитих концентрација NaCl на бактеријски биофилм

ТСБ са различитом концентрацијом NaCl показује редукујући ефекат на способност формирања биофилма и на формираног биофилм *S. marcescens* (График 14). МХ са различитом концентрацијом NaCl показује редукујући ефекат на формирање биофилма обе врсте. 4% и 6,5% NaCl показују стимулишући ефекат на формираног биофилм *S. odorifera*. Исте концентрације NaCl редукују формираног биофилм *S. marcescens* док концентрација 8% стимулише раст формираног биофилма (График 14).

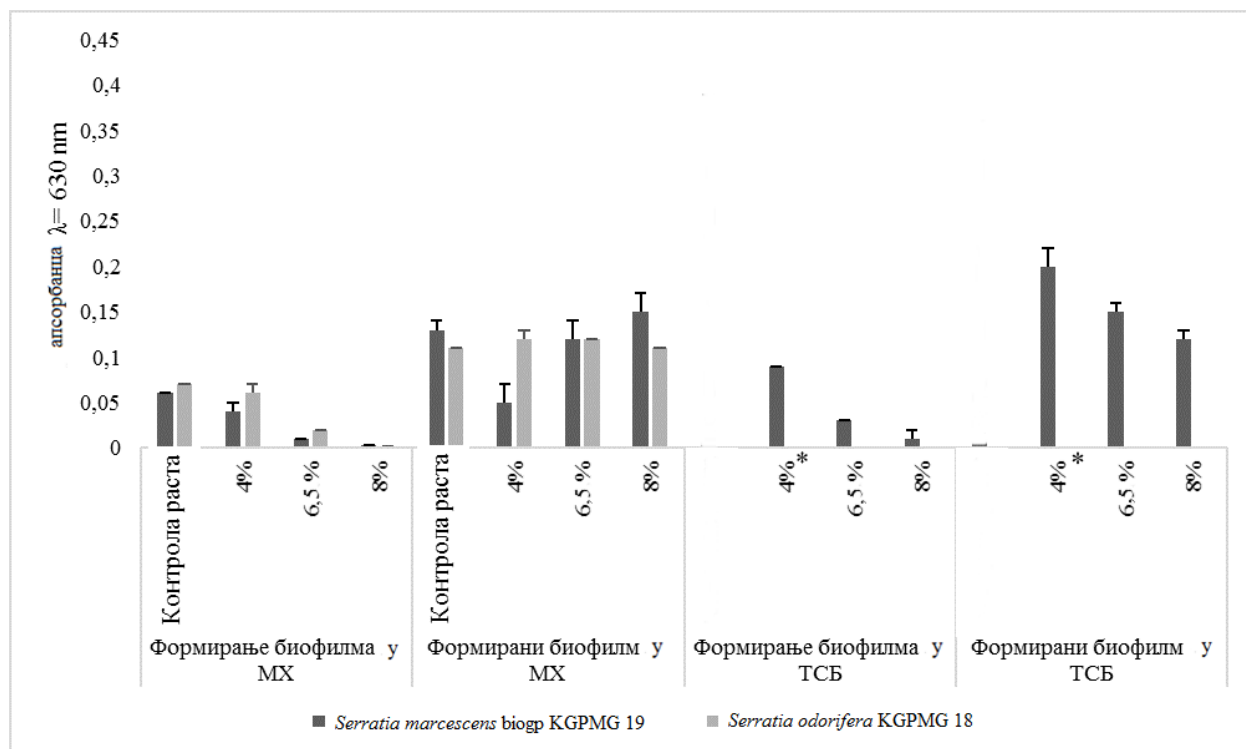


График 14. Утицај соли на способност формирања и формираног биофилма *Serratia* spp.
(*контрола раста)

Утицај различитих концентрација глукозе на бактеријски биофилм

Додатак глукозе у подлогу има различити утицај на процес формирања и формираног биофилма бактерија. Утицај је зависио од подлоге за раст и од врсте. Процес формирања биофилма као и формираног биофилма је већи у ТСБ са додатком глукозе у односу на МХ са истим концентрацијама глукозе. Утицај сваке концентрације на врсте је приказан на Графику 15.

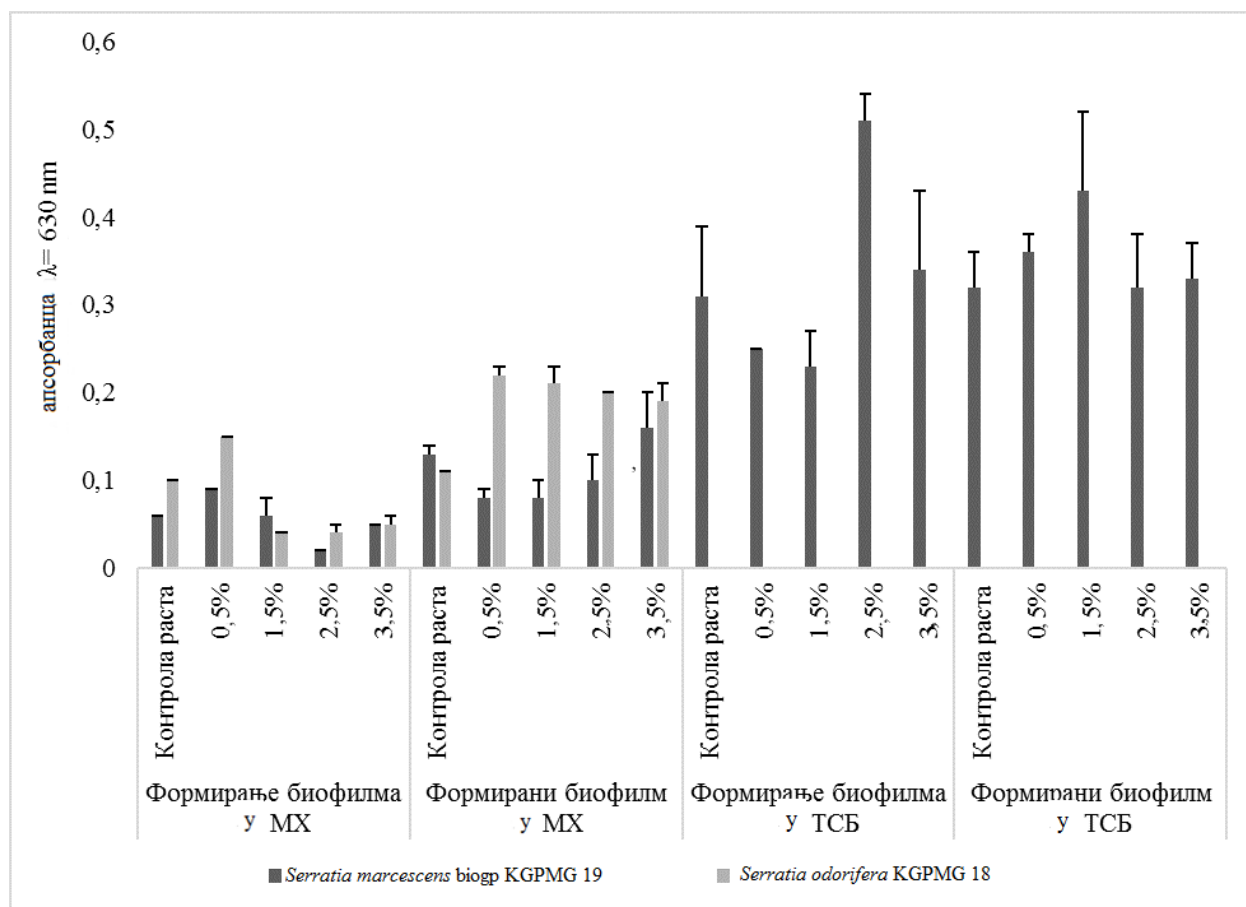


График 15. Утицај различитих концентрација глукозе на способност формирања и формираног биофилма *Serratia* spp.

Утицај различитих концентрација лактозе на бактеријски биофилм

Различите концентрације лактозе су имале инхибиторан утицај на процес формирања биофилма у ТСБ у односу на контролу, а на формираног биофилм показују стимулативан ефекат. Утицај различитих концентрација лактозе у МХ је зависио од врсте. Запажено је да лактоза додата у МХ у било којој концентрацији није поговорила процесу формирања и формираном биофилму *S. odorifera*. Утицај сваке концентрације на врсте је приказан на Графику 16.

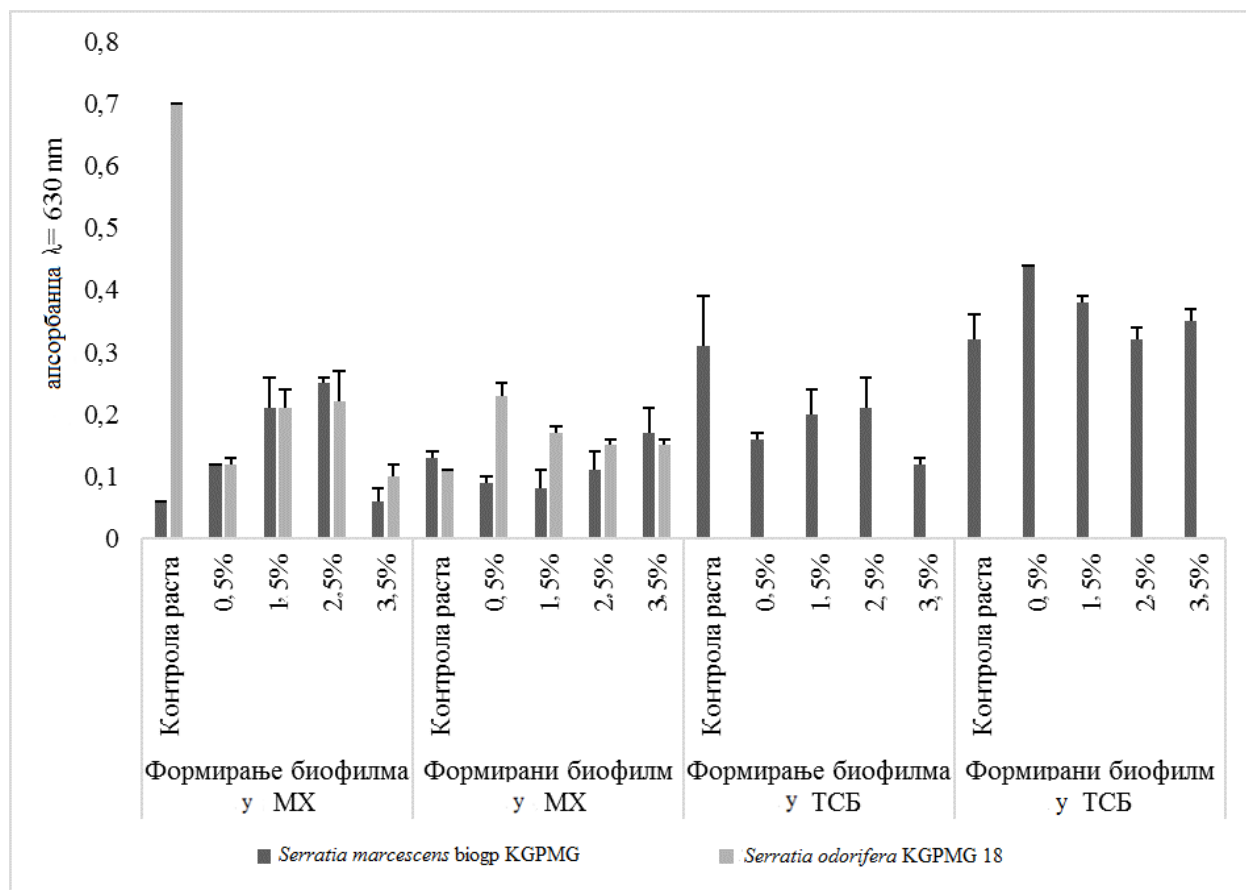


График 16. Утицај различитих концентрација лактозе на способност формирања и формирани биофилм *Serratia* spp.

6.7.5. Адхезивна способност *Serratia* spp.

Највећи проценат адхезије *S. odorifera* (27,19%) је измерен у присуству етил ацетата. *S. odorifera* је бољи електрон прималац него дозор јер показује већу адхезију у присуству етил ацетата. *S. marcescens* показује највећу адхезију у присуству хлороформа, а најмању у присуству етил ацетата. *S. marcescens* из сира је бољи електрон дозор, а у исто време је слаб примаоц електрона јер показује већи степен адхезије уз хлороформ. Није примећена способност адхезије у присуству ксилена. Резултати су приказани као проценат адхезије у присуству растварача у Табели 32. С обзиром да није примећена адхезија у присуству ксилена, врсте имају низак степен хидрофобности.

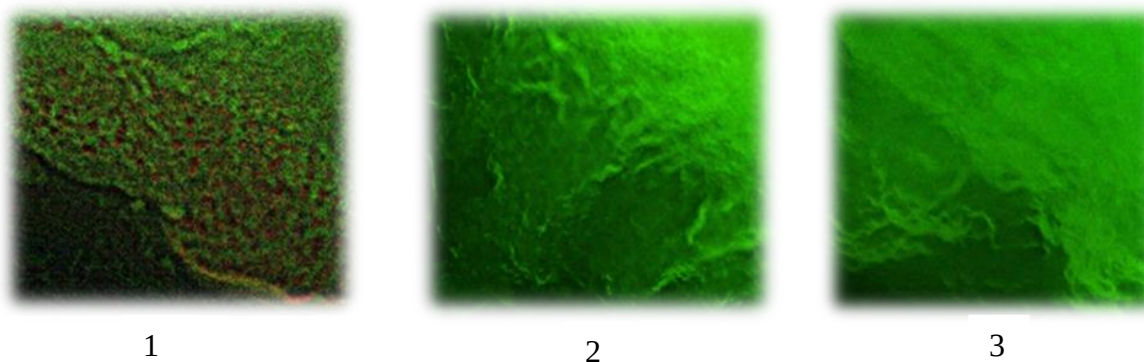
Табела 32. Способност адхезије врста из рода *Serratia*

Врста	Изолат	Хлороформ	Етил ацетат	Ксилен
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	9,95*	27,19	/
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	17,83	2,91	/

* Резултати представљају проценат способности адхезије врста у присуству растварача

In vitro адхезија на епител свињског црева

Испитивана је способност адхезије врста *Serratia* spp. изолованих из сира за свињски епител. Адхезивна способност је примећена само код *S. marcescens* (Сл. 10). Бактерије су одабране према проценту адхезије у присуству хлороформа.



Слика 10. 1. *S. marcescens* ; 2. Контрола ПБС; 3. Контрола неинакулисана ТСБ
(фото: К. Младеновић)

6.7.6. Коагрегација са *E. faecalis*

Испитивана је способност коагрегације врста из рода *Serratia* са *E. faecalis*. *S. marcescens* не ступа у коагрегацију са *E. faecalis*, док је *S. odorifera* показала коагрегацију од 28% (Табела 33).

Табела 33. Коагрегација врста из рода *Serratia* са *E. faecalis* KGPMF 49

Врста	Изолат	<i>Enterococcus faecalis</i> KGPMF 49		
		0h*	2h*	%
<i>S. odorifera</i>	KGPMF 18	0,29	0,21	28
<i>S. marcescens</i> biogp 1	KGPMF 19	0,20	0,20	0

*Апсорбанца читана на 600 nm

6.7.7. Ензимска активност *Serratia* spp.

На основу анализе (скрининг метода), *S. odorifera* и *S. marcescens* поседују протеолитичку и липолитичку активност. Присуство и количина екстрацелуларних ензима је мерена и спектрофотометријски. Укупна количина протеина је измерена код *S. odorifera* на ТСБ и износи $0,11 \text{ mg mL}^{-1}$, док у МХ нису детектовани протеини. Укупна количина протеина код *S. marcescens* је износила $0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ на ТСБ, а на МХ $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$. Протеазна активност *S. odorifera* је била иста у обе подлоге, док код *S. marcescens* протеазна активност је детектована у ТСБ. Активност киселе инвертазе је највећа код *S. odorifera* у МХ, а код *S. marcescens* у ТСБ. Није уочена активност алкалне инвертазе. Активност амилазе није уочена код *S. marcescens* у ТСБ, за разлику од активности алкалне фосфатазе, која је уочена у ТСБ. Резултати су приказани у Табели 34.

Табела 34. Активност екстрацелуларних ензима врста из рода *Serratia*

Врста		<i>S. odorifera</i> KGPMF 18	<i>S. marcescens</i> biogp 1 KGPMF 19
Протеаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	4,8±0,00*	1,5±0,00
	МХ	4,8±0,00	/
Кисела инвертаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	0,09±0,00	0,63±0,00
	МХ	0,75±0,00	0,13±0,00
Алкална инвертаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	/	/
	МХ	/	/
Амилаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	0,04±0,00	/
	МХ	0,02±0,00	0,03±0,00
Алкална фосфатаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	0,07±0,5	0,11±0,00
	МХ	0,03±0,00	0,01±0,00

*средња вредност ± стандардна девијација

6.8. Карактеризација врста из рода *Escherichia*

Из сокобањског сира је изолована само једна врста из рода *Escherichia* (*E. coli*). У летњим узорцима је пронађен један сој, у јесењим три соја, а у пролећном узорку 12 сојева. На основу заступљености *E. coli* (укупно 16 изолата) може се закључити да чини 50% од укупно идентификованих припадника фам. Enterobacteriaceae. Изолована *E. coli* се по својим биохемијским особинама не разликује од клиничког изолата и стандардног соја (Табела 8). Предпоставља се да је *E. coli* доспела у сир због лоше хигијене приликом muže и процеса прављења сира.

6.8.1. Осетљивост на антибиотике

Сви изолати из рода *Escherichia* показују осетљивост на хлорамфеникол и на стрептомицин, изузев *E. coli* KGPMF 17 и *E. coli* KGPMF 29 које показују делимичну осетљивост на стрептомицин. Сви изолати су показали осетљивост на тетрациклин, осим *E. coli* KGPMF 21, *E. coli* KGPMF 22, које показују делимичну осетљивост и *E. coli* KGPMF 15, *E. coli* KGPMF 17 и *E. coli* KGPMF 24 које су показале резистенцију (Табела 35). Стандарни сој *E. coli* ATCC 25922 и клинички изолат показују осетљивост на испитиване

антибиотику, са изузетком клиничког изолат који показује делимичну осетљивост на тетрациклин.

Табела 35. Осетљивост врста рода *Escherichia* на антибиотике

Врста	Изолат	Антибиотик					
		Стрептомицин		Хлорамфеникол		Тетрациклин	
		10 µg		30 µg		30 µg	
		ЗИ	О	ЗИ	О	ЗИ	О
<i>E. coli</i>	KGPMF 14	16	С	30	С	22	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 15	19	С	31	С	8	Р
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	17	С	33	С	22	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	12	ИМ	27	С	7	Р
<i>E. coli</i>	KGPMF 21	19	С	31	С	25	ИМ
<i>E. coli</i>	KGPMF 22	16	С	32	С	25	ИМ
<i>E. coli</i>	KGPMF 23	17	С	30	С	24	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 24	16	С	30	С	11	Р
<i>E. coli</i>	KGPMF 25	15	С	28	С	22	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 26	18	С	29	С	23	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 27	17	С	32	С	21	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 28	15	С	31	С	23	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 29	14	ИМ	32	С	28	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 30	16	С	31	С	21	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 31	15	С	28	С	21	С
<i>E. coli</i>	KGPMF 32	18	С	23	С	23	С
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	17	С	31	С	22	С
<i>E. coli</i>	(клинички изолат)	18	С	25	С	18	ИМ

„ЗИ“ – пречник зоне инхибиције дат у милиметрима (mm); „О“ – Осетљивост на антибиотик (С – сензитивна/осетљива; ИМ – интермедијерно/ делимично-осетљива; Р – резистентна)

6.8.2. *E. coli* O157 брзи латекс аглутинациони тест

Према *E. coli* O157 брзом латекс аглутинационом тесту, 4 соја *E. coli* (KGPMF 14, 15, 22, 23) поседују способност аглутинације. Остали сојеви не показују ту способност.

6.8.3. Утицај еколошких фактора на планктонски раст *E. coli*

За одређивање утицаја еколошких фактора на планктонски раст *E. coli* изабрана су два соја и стандардни сој *E. coli* ATCC 25922. Карактеристике планктонског раста су одређене у стандардној и модификованој ТСБ и МХ подлози и на три тестиране температуре (4°C, 37°C, 44°C). Модификација подлога је вршена кориговањем рН вредности и додавањем различитих концентрација NaCl, глукозе и лактозе. Након инкубације, раст није уочен на 4°C.

Утицај рН вредности на планктонски раст

Промена планктонског раста изабраних изолата из рода *Escherichia* је била израженија у ТСБ, у односу на МХ и условљена је променом рН вредности. Инхибиторни ефекат рН је био већи при инкубацији на 44°C, на обе тестиране подлоге. На ТСБ подлози, на обе тестиране температуре, раст изолата и стандардног соја је био редукован у киселом медијуму. Базна средина је деловала стимулативно на раст тестираних бактерија (Табела 36).

У МХ подлози, на обе тестиране температуре, раст изолата и стандарда је био лимитиран на ниским рН вредностима. Изузетак је *E. coli* ATCC 25922, чији је раст редукован на свим рН вредностима, осим на рН 6,5 (Табела 37).

Утицај различите концентрације NaCl на планктонски раст

Повећање концентрације соли у подлози инхибира раст тестираних бактерија. Инхибиторни ефекат соли је потврђен у обе тестиране подлоге и на обе температуре (37°C и 44°C). Резултати су приказани у Табелама 38 и 39.

Табела 36. Утицај различитих рН и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
рН		5,5	6,5	7	7,5*	8,5	5,5	6,5	7	7,5*	8,5
Врста	Изолат										
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,01±0,00 ¹	0,67±0,01	0,80±0,01	1,04±0,01	1,41±0,02	0,02±0,00	0,65±0,03	0,78±0,02	1,07±0,02	1,38±0,07
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	0,02±0,00	1,46±0,04	1,63±0,01	1,64±0,00	1,60±0,00	0,03±0,00	0,62±0,26	0,82±0,25	1,07±0,02	1,13±0,04
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,03±0,00	1,19±0,04	1,76±0,01	1,72±0,02	1,68±0,01	0,02±0,00	0,82±0,02	0,87±0,01	0,94±0,02	1,38±0,02

¹средња вредност ± стандардна девијација; *Контрола растаТабела 37. Утицај различитих рН и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ

Температура		37°C					44°C				
рН		5,5	6,5	7*	7,5	8,5	5,5	6,5	7*	7,5	8,5
Врста	Изолат										
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,05±0,00 ¹	0,70±0,10	0,80±0,01	0,80±0,00	0,62±0,01	0,01±0,00	0,94±0,36	0,71±0,00	0,72±0,00	0,17±0,01
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	0,06±0,02	0,70±0,01	0,70±0,03	0,70±0,01	0,40±0,06	0,02±0,00	0,29±0,05	0,24±0,04	0,21±0,04	0,12±0,02
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,05±0,00	0,82±0,04	0,75±0,01	0,66±0,00	0,45±0,00	0,04±0,00	0,47±0,01	0,37±0,00	0,32±0,002	0,26±0,12

¹средња вредност ± стандардна девијација; *Контрола раста

Табела 38. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ

Температура		37°C			44°C		
% соли		4*	6,5	8	4*	6,5	8
Врста	Изолат						
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,72±0,01 ¹	0,31±0,02	0,07±0,00	0,60±0,02	0,06±0,02	0,03±0,00
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	1,15±0,02	0,44±0,06	0,12±0,01	0,54±0,00	0,07±0,01	0,05±0,01
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	1,58±0,26	0,86±0,03	0,42±0,02	0,62±0,00	0,54±0,03	0,12±0,02

¹средња вредност ± стандардна девијација; * контрола растаТабела 39. Утицај различитих концентрација NaCl и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ

Температура		37°C				44°C			
% соли		4	6,5	8	Контрола раста	4	6,5	8	Контрола раста
Врста	Изолат								
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,19±0,00 ¹	0,07±0,00	0,02±0,00	0,80±0,01	0,06±0,02	0,03±0,00	н.р.	0,71±0,00
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	0,24±0,03	0,09±0,02	0,02±0,00	0,70±0,03	0,06±0,00	0,03±0,00	н.р.	0,24±0,04
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,16±0,00	0,02±0,00	0,02±0,00	0,75±0,01	0,12±0,00	0,04±0,00	0,01±0,00	0,37±0,00

¹средња вредност ± стандардна девијација; н.р.- нема раста

Утицај различите концентрације глукозе на плактонски раст

Повећана концентрација глукозе у ТСБ, на обе тестиране температуре, утиче на смањење раста бактерија. Једино је раст *E. coli* ATCC 25922 у 0,5% глукозе био стимулисан (Табела 40).

У МХ са глукозом, на 37°C, раст *E. coli* KGPMF 17 је стимулисан на свим концентрацијама, осим у 1,5%, док раст *E. coli* ATCC 25922 је редукован на свим концентрацијама осим у 2,5%. На 44°C, раст *E. coli* KGPMF 17 и *E. coli* ATCC 25922 је био стимулисан на свим концентрацијама, док је раст *E. coli* KGPMF 16 стимулисан у 2,5% и 3,5% глукозе (Табела 41).

Утицај различите концентрације лактозе на плактонски раст

Повећана концентрација лактозе у ТСБ, на обе тестиране температуре редукује раст *E. coli* KGPMF 16 и *E. coli* KGPMF 17. Изузетак је раст изолата KGPMF 17, који је стимулисан само у 0,5% лактозе на 37°C. Раст *E. coli* ATCC 25922 је био редукован на 37°C, док је на 44° био стимулисан у присуству лактозе (осим на 3,5%) (Табела 42).

Повећана концентрација лактозе у МХ, на обе тестиране температуре редукује раст *E. coli* KGPMF 16. Раст *E. coli* KGPMF 17 је стимулисан присуством лактозе на обе температуре, док је раст *E. coli* ATCC 25922 је био редукован на 37°C, док је на 44° био стимулисан у присуству лактозе (Табела 43).

Табела 40. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
% глукозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,84±0,01 ¹	0,81±0,02	0,73±0,00	0,68±0,01	1,04±0,01	0,95±0,03	0,95±0,02	0,86±0,01	0,81±0,02	1,07±0,02
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	1,29±0,00	1,21±0,01	1,08±0,00	1,15±0,01	1,64±0,00	0,94±0,02	0,93±0,01	0,88±0,00	0,83±0,01	1,07±0,02
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	1,19±0,04	1,15±0,01	1,06±0,02	1,03±0,02	1,72±0,02	0,98±0,04	0,93±0,02	0,84±0,06	0,65±0,44	0,94±0,02

¹средња вредност ± стандардна девијацијаТабела 41. Утицај различитих концентрација глукозе и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ

Температура		37°C					44°C				
% глукозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,63±0,03 ¹	0,63±0,03	0,72±0,04	0,65±0,12	0,80±0,01	0,63±0,03	0,67±0,02	0,76±0,05	0,72±0,04	0,71±0,00
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	0,91±0,02	0,69±0,03	0,80±0,02	0,74±0,03	0,70±0,03	0,55±0,11	0,60±0,08	0,73±0,05	0,60±0,10	0,24±0,04
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,51±0,00	0,55±0,01	0,75±0,00	0,52±0,03	0,75±0,01	0,63±0,02	0,65±0,05	0,44±0,04	0,51±0,10	0,37±0,00

¹средња вредност ± стандардна девијација

Табела 42. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *E. coli* у ТСБ

Температура		37°C					44°C				
% лактозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,99±0,00 ¹	0,90±0,00	0,84±0,00	0,76±0,01	1,04±0,01	0,88±0,01	0,79±0,02	0,78±0,03	0,74±0,01	1,07±0,02
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	1,67±0,00	1,62±0,00	1,53±0,00	1,44±0,00	1,64±0,00	0,89±0,01	0,80±0,00	0,78±0,01	0,73±0,00	1,07±0,02
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	1,26±0,01	1,14±0,01	1,09±0,02	1,07±0,03	1,72±0,02	1,10±0,01	1,01±0,05	0,99±0,03	0,87±0,02	0,94±0,02

¹средња вредност ± стандардна девијацијаТабела 43. Утицај различитих концентрација лактозе и температура на планктонски раст *E. coli* у МХ

Температура		37°C					44°C				
% лактозе		0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста	0,5	1,5	2,5	3,5	Контрола раста
Врста	Изолат										
<i>E. coli</i>	KGPMF 16	0,80±0,07 ¹	0,70±0,00	0,70±0,01	0,70±0,01	0,80±0,01	0,49±0,08	0,52±0,04	0,53±0,08	0,55±0,04	0,71±0,00
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	1,10±0,03	0,92±0,02	0,84±0,01	0,85±0,00	0,70±0,03	0,56±0,10	0,57±0,07	0,53±0,06	0,53±0,12	0,24±0,04
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	0,66±0,03	0,66±0,02	0,63±0,02	0,57±0,01	0,75±0,01	0,51±0,03	0,52±0,05	0,51±0,04	0,54±0,04	0,37±0,00

¹средња вредност ± стандардна девијација

6.8.4. Способност формирања биофилма *E. coli*

Испитивана је способност формирања биофилма *Escherichia spp.*, изолованих из сокобањског сира, у две подлоге, на три температуре (4°C, 37°C, 44°C). Након инкубације (48 h), примећено је да бактерије не показују способност формирања биофилма на 4°C, 37°C, 44° С у МХ. У ТСБ, једино *E. coli* KGPMF 17 показује способност формирања биофилма на 37°C.

6.8.5. Утицај еколошких фактора на биофилм *E. coli**Утицај различите рН вредности на бактеријски биофилм*

Стимулативни ефекат на процес формирања биофилма *E. coli* KGPMF 17 показује рН 5,5, док је на рН 6,5 и 8,5 биофилм смањен. На рН 7, биофилм је формиран као у контроли. Раст формираног биофилма је стимулисан на свим рН вредностима (График 17).

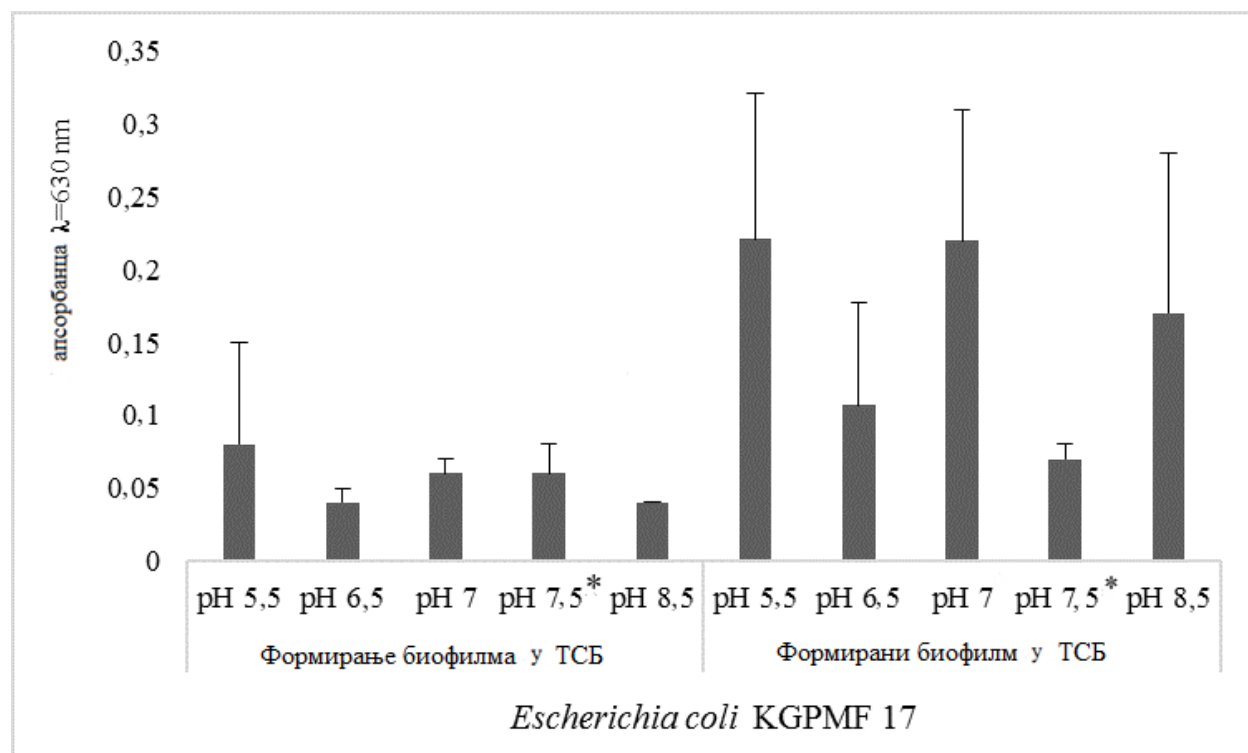


График 17. Утицај рН на способност формирања биофилма и формираног биофилма *E.coli* (*контрола раста)

Утицај различите концентрације NaCl на бактеријски биофилм

Све концентрације NaCl изазивају инхибиторни ефекат на способност формирања биофилма *E. coli* KGPMF 17 у поређењу са контролом. Све концентрације NaCl су показале стимулативни ефекат на формирану биофилм (График 18).

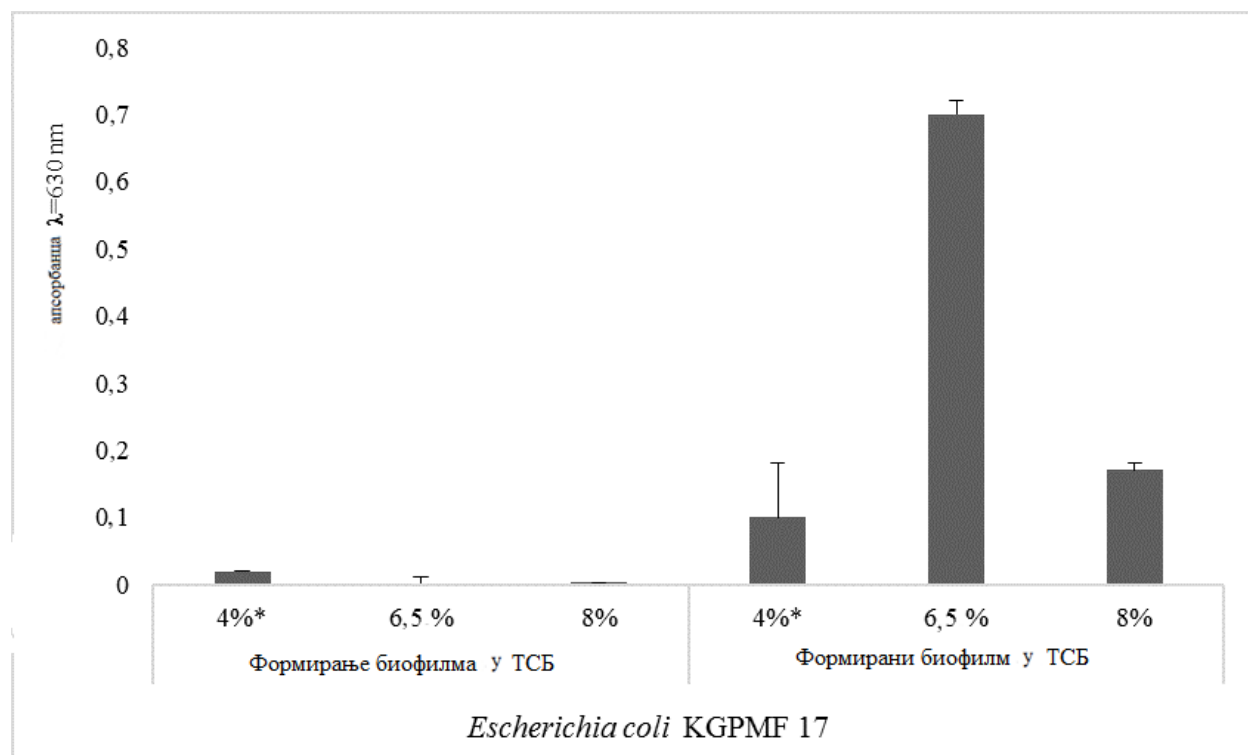


График 18. Утицај NaCl на способност формирања биофилма и формирану биофилм *E. coli* (*контрола раста)

Утицај различите концентрације глукозе на бактеријски биофилм

Све испитане концентрације глукозе показале су инхибиторни ефекат на формирање биофилма, осим 0,5% глукозе, у којој је формирање биофилма исто као у контроли раста. 0,5% глукозе је стимулисала раст формираног биофилма, 1,5% није показала утицај на формирану биофилм, док су веће концентрације глукозе показале способност редукције формираног биофилма (График 19).

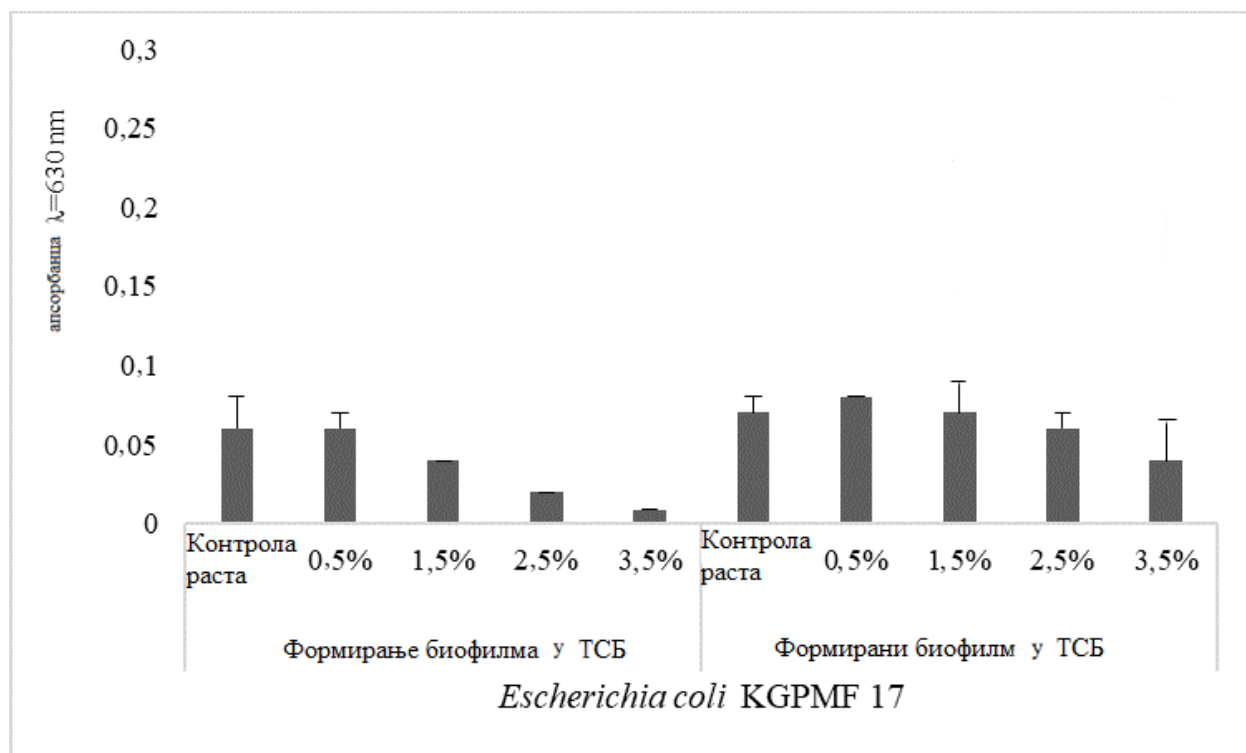


График 19. Утицај различитих концентрација глукозе на способност формирања биофилма и формираног биофилма *E. coli*

Утицај различитих концентрација лактозе на бактеријски биофилм

Концентрација 2,5% лактозе је показала стимулативни ефекат на способност формирања биофилма *E. coli* KGPMF 17, док је 1,5% и 3,5% лактозе има инхибиторан ефекат на формирање биофилма. Све концентрације лактозе показују стимулативан ефекат на формираног биофилм (График 20).

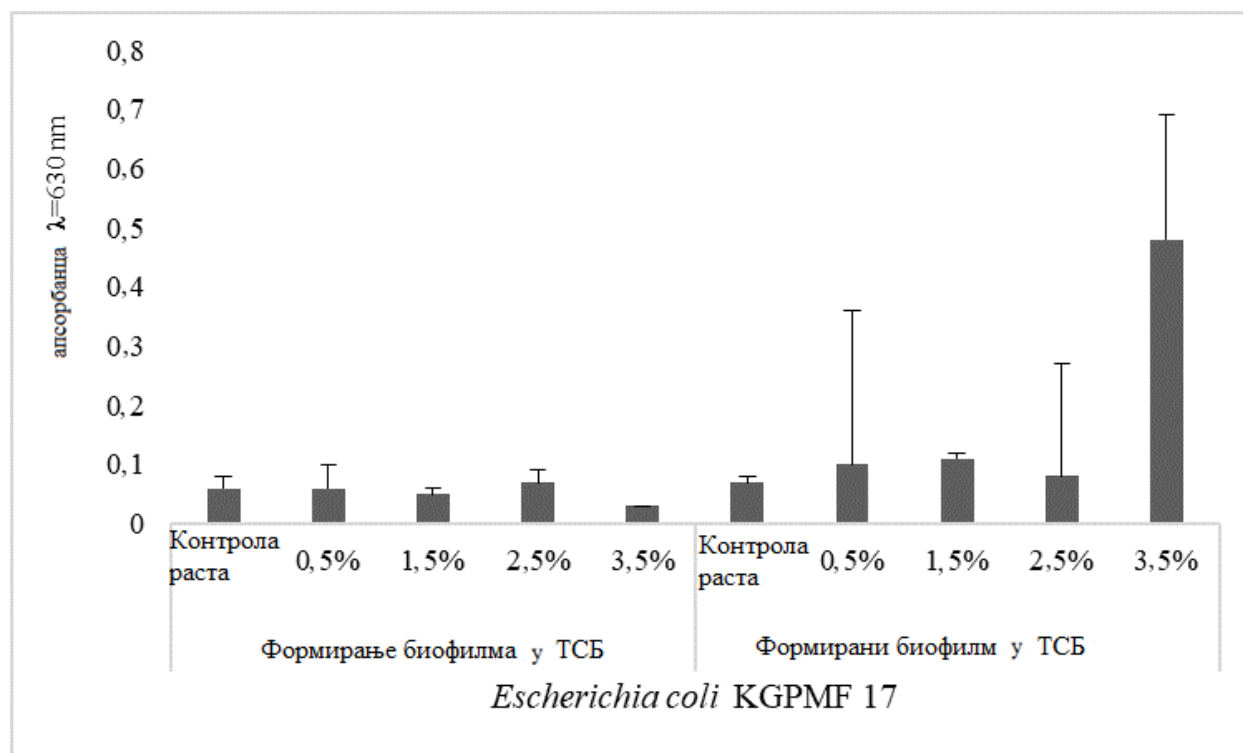


График 20. Утицај различитих концентрација лактозе на способност формирања биофилма и формирани биофилм *E. coli*

6.8.6. Адхезивна способност *E. coli*

За испитивање адхезивне способности у присуству растварача *E. coli* изабрана су два соја која поседују способност аглутинације (KGPMF 14 и 22) и два соја која не поседују (KGPMF 17 и 24). Такође је одређена адхезивна способност клиничког изолата и стандарног соја. Највећа адхезивна способност је примећена код *E. coli* KGPMF 22 и *E. coli* KGPMF 24 у присуству хлороформа. *E. coli* клинички изолат показује сличан проценат адхезије. Мањи проценат адхезије код *E. coli* (KGPMF 14, 17) је детектован у присуству етил ацетата, што говори да овај сој може бити и прималац електрона. Резултати показују да је *E. coli* из сира, бољи електрон донор, а у исто време слаб примаоц електрона јер показује већи степен адхезије уз хлороформ. С обзиром да није примећена адхезија у присуству ксилена, *E. coli* има низак степен хидрофобности. Резултати су приказани у Табели 44.

Табела 44. Способност адхезије врста из рода *Escherichia*

Врста	Изолат	Растварач		
		Хлороформ	Етил ацетат	Ксилен
<i>E. coli</i>	KGPMF 14	7,24*	6,05	/
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	6,97	0,51	/
<i>E. coli</i>	KGPMF 22	37,71	/	/
<i>E. coli</i>	KGPMF 24	31,62	/	/
<i>E. coli</i>	(клинички изолат)	32,35	/	/
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	15,49	/	/

* Резултати представљају проценат способности адхезије врста у присуству растварача

In vitro адхезија на епител свињског црева

Испитивана је способност адхезије *E. coli* (KGPMF 14, 17, 22, 24) изолованих из сира за свињски епител. Бактерије су одабране према проценту адхезије у присуству хлороформа, али нису показале способност адхезије за епител свињског црева.

6.8.7. Коагрегација са *E. faecalis*

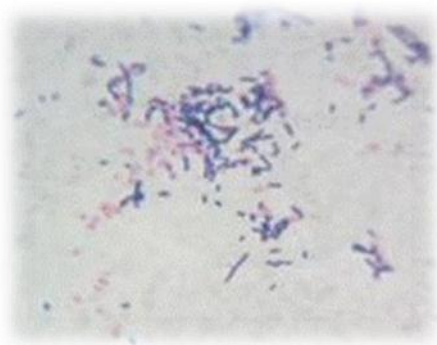
За испитивање коагрегације *E. coli* са *E. faecalis* изабрана су два соја која поседују способност аглутинације (KGPMF 14 и 22) и два соја која не поседују (KGPMF 17 и 24). Такође је одређена адхезивна способност клиничког изолата и стандарног соја. Највећа способност коагрегације је детектована за *E. coli* KGPMF 17 и *E. faecalis* KGPMF 49 (28%). Сви изолати показују већи проценат адхезије са *E. faecalis* KGPMF 49 него *E. coli* ATCC 25922 (0%) и *E. coli* (клинички изолат (8%)). Коагрегација није примећена код *E. coli* KGPMF 24, након 2 h инкубације (Табела 45). Коагрегација је доказана микроскопирањем и бојењем по Граму (Сл. 11).

Табела 45. Коагрегација врста из рода *Escherichia* са *E. faecalis* KGPMF 49

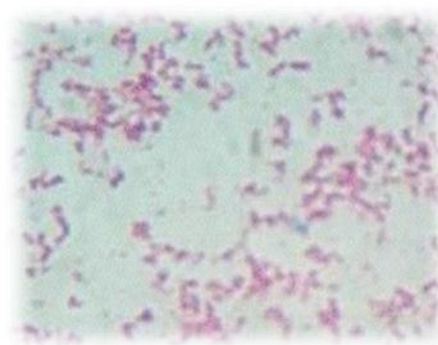
Врста	Изолат	<i>Enterococcus faecalis</i> KGPMF 49		
		0h*	2h*	%
<i>E. coli</i>	KGPMF 14	0,30	0,25	16,7
<i>E. coli</i>	KGPMF 17	0,25	0,18	28
<i>E. coli</i>	KGPMF 22	0,23	0,21	8,7
<i>E. coli</i>	KGPMF 24	0,25	0,27	0
<i>E. coli</i>	(клинички изолат)	0,25	0,23	8
<i>E. coli</i>	ATCC 25922	/	/	/

*Абсорбанца прочитана на 600 nm

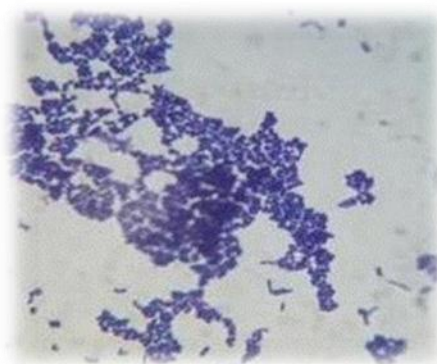
1



2



3



Слика 11. 1- *E. coli* KGPMF 17 + *E. faecalis* KGPMF49; 2- *E. coli* KGPMF 17; 3. *E. faecalis* KGPMF 49

(фото: К. Младеновић)

6.8.8. Ензимска активност *E. coli*

Према скрининг методи, изолати из рода *Escherichia* не поседују протеолитичку и липолитичку активност као ни стандардни сој *E. coli* ATCC 25922. Присуство и количина екстрацелуларних ензима је мерена и спектрофотометријски код 4 соја (KGPMF 14, 16, 21, 24). Одређена је укупна количина протеина у подлогама. Количина протеина код *E. coli* KGPMF 14 и 16 је износила $0,07 \text{ mg mL}^{-1}$ и $0,10 \text{ mg mL}^{-1}$, а код *E. coli* KGPMF 21 и 24 је износила $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ на ТСБ. Код *E. coli* KGPMF 16 и 24 укупна количина протеина је износила $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ до $0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ док код *E. coli* KGPMF 14 и 21 протеини нису детектовани. Активност протеазе је запажена у ТСБ код свих врста и вредности су се кретале од 1,5 до 3,9. Кисела инвертаза је активнија у ТСБ код свих врста него у МХ. Активност алкалне инвертазе није запажена. Највећа активност амилазе је измерена код *E. coli* KGPMF 24 у обе подлоге. Највећа активност алкалне фосфатазе је измерена код *E. coli* KGPMF 24 у ТСБ. Резултати су приказани у Табели 46.

Табела 46. Активност екстрацелуларних ензима врста из рода *Escherichia*

Врста		<i>E. coli</i> KGPMF 14	<i>E. coli</i> KGPMF 16	<i>E. coli</i> KGPMF 21	<i>E. coli</i> KGPMF 24
Протеаза (IU mL^{-1})	ТСБ	$1,6 \pm 0,00^*$	$2,1 \pm 0,00$	$1,5 \pm 0,00$	$3,9 \pm 0,00$
	МХ	$9,5 \pm 0,00$	/	/	$3,6 \pm 0,00$
Кисела инвертаза (IU mL^{-1})	ТСБ	$0,01 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$	$0,01 \pm 0,00$
	МХ	$0,02 \pm 0,00$	$0,02 \pm 0,00$	$0,1 \pm 0,00$	$0,1 \pm 0,00$
Алкална инвертаза (IU mL^{-1})	ТСБ	/	$0,01 \pm 0,00$	/	/
	МХ	/	/	/	/
Амилаза (IU mL^{-1})	ТСБ	$0,02 \pm 0,00$	$0,08 \pm 0,00$	$0,09 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,00$
	МХ	$0,03 \pm 0,00$	$0,07 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,20 \pm 0,00$
Алкална фосфатаза (IU mL^{-1})	ТСБ	/	$0,08 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$	$0,11 \pm 0,00$
	МХ	$0,04 \pm 0,00$	$0,06 \pm 0,00$	$0,04 \pm 0,00$	$0,05 \pm 0,00$

*средња вредност $\pm$ стандардна девијација

6.9. Карактеризација врста из рода *Enterobacter*

У сокобањском сиру је утврђено присуство једног изолата који припада роду *Enterobacter* и то је врста *E. gergoviae*. Појава *E. gergoviae* у сиру је највероватније резултат спонтаног преноса са животиње у свеже млеко. Заступљеност рода *Enterobacter* (3%) је мала у односу на заступљеност других родова (График 5).

На основу прегледане литературе, уочава се да је појава и опис врсте *E. gergoviae* сиромашна у односу на опис и присуство других припадника фам. Enterobacteriaceae. Brenner et al. (1980) описују *E. gergoviae* као нову врсту пронађену у клиничким узорцима и утврђују биохемијске особине сојева. Биохемијске карактеристике *E. gergoviae* изоловане из сокобањског сира су приказане у Табели 9. и по особинама не одступају од особина сојева који су описали Brenner et al. (1980).

У овој докторској дисертацији је испитивана осетљивост *E. gergoviae* на антибиотике. *E. gergoviae* показује осетљивост на сва три испитивана антибиотика (Табела 47).

Утврђена је способност адхезије *E. gergoviae* у присуству хлороформа (13,85%), и етил ацетата (13,89%). Врста не показује способност адхезије у присуству ксилена (Табела 48). Коагрегација *E. gergoviae* са врстом *E. faecalis* KGPMF 49 износи 14,2%.

Према резултатима скрининг методе, *E. gergoviae* не поседује протеолитичку и липолитичку активност. Спектрофотометријски су мерени укупни протеини где у ТСБ износе 0,13 mg mL⁻¹, а у МХ 0,04 mg mL⁻¹. Запажена је само активност протеазе у ТСБ. Измерене су врло мале активности амилазе и алкалне фосфатазе, док активност киселе и алкалне инвертазе није уочена (осим врло мале активности киселе инвертазе у МХ (0,05 ± 0,00) (Табела 49).

Табела 47. Осетљивост *E. gergoviae* на антибиотике

Врста	Изолат	Антибиотик					
		Стрептомицин 10 µg		Хлорамфеникол 30 µg		Тетрациклин 30 µg	
		ЗИ	О	ЗИ	О	ЗИ	О
<i>E. gergoviae</i>	KGPMF 20	17	С	30	С	21	С

„ЗИ“ – пречник зоне инхибиције дат у милиметрима (mm); „О“ – Осетљивост на антибиотик (С – сензитивна/осетљива);

Табела 48. Способност адхезије *E. gergoviae* у присуству растварача

Врста растварача	Хлороформ	Етил ацетат	Ксилен
% адхезије	13,85	13,89	/

Табела 49. Активност екстрацелуларних ензима врсте *E. gergoviae*

Ензим	Врста подлоге	Вредност апсорбанце ¹
Протеаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	7,6 ± 0,00
	МХ	/
Кисела инвертаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	/
	МХ	0,05 ± 0,00
Алкална инвертаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	/
	МХ	/
Амилаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	0,05 ± 0,00
	МХ	/
Алкална фосфатаза (IU mL ⁻¹)	ТСБ	0,11 ± 0,00
	МХ	0,06 ± 0,00

¹средња вредност±стандардна девијација;

ТСБ – триптон соја бујон; МХ – Милер Хинтон бујон

7. Дискусија

Сокобањски сир

Сокобањски сир анализиран у овој дисертацији, произведен је у домаћинствима села у околини Сокобање, од свежег и непастеризованог крављег млека. Припада групи киселих полутврдих и полумасних до пуномасних сирева. Након производње, са старењем, у сир долази до сукцесија у оквиру бактериобиоте. У тренутку производње млади сир садржи највећи број бактерија млечне киселине и тада су оне метаболички најактивније (највећа количина млечне киселине проузрокује ниску рН вредност) (Muguzović et al., 2018a). Поред бактерија млечне киселине, у сиру се могу наћи и друге бактеријске врсте које доспевају у сир случајним путем.

Присуство бактерија уз фам. *Enterobacteriaceae*

У овој дисертацији, по први пут, истраживано је и показано присуство бактерија из фам. *Enterobacteriaceae*, у сиру прављеном на традиционалан начин из околине Сокобање. Бактерије доспевају у сир, највероватније, из млека које се користи за производњу сира, са вимена животиње, са руку особа које врше мужу или са посуда које се користе за сирење. Претпоставља се да су лоши хигијенски услови у процесу прављења сира и коришћење непастеризованог млека узрок појављивања ентеробактерија. Ентеробактерије су изоловане из сира старог 3 – 4 дана, који је чуван на 4°C у фрижидеру без додавања слане воде (саламуре).

Према Deetae et al. (2009) и Trmčić и сар. (2016), ентеробактерије се сматрају нормалном, аутохтоном популацијом сирева произведених на традиционалан начин и нису обавезно потенцијално патогене врсте. Они су такође индикатори хигијене производног процеса. Њихова метаболичка активност, као што је способност производње ароматичних једињења, може имати снажан утицај на органолептичке особине сирева. Ентеробактерије утичу на квалитет хране (млека и сира) због продуката њиховог метаболизма, а њихов број може порасти током сазревања сира или старења намирница. Врсте као што су *E. coli*, *H. alvei* и *Enterobacter* spp. су најчешће врсте изоловане из сирева (Sable et al., 1997; Prado et al., 2001; Tornadijo et al., 2001; Alonso-Calleja et al., 2002; Chaves-López et al., 2006; Ardic et al., 2007).

Бактериобиота сокобањског сира садржи изолате који припадају родовима *Echerichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* и *Serratia*. Сирило не садржи бактеријске стартер културе, тако да се све бактерије сматрају природном микрофлором сира. Динамика присуства ових врста је имала сезонски карактер и зависила је од употребљеног сирила. Ентеробактерије су нађене у сиру, где је коришћена „Sirela“ као сирило. Претпоставља се да је сирило „Маја rekorderka“ која садржи бензоеву и сорбинску киселину, онемогућила појаву ентеробактерија. Ниска рН је онемогућила њихов раст и развој. Биохемијске карактеристике изолата *E. coli* из сваке сезоне, биле су идентичне (Mladenović et al., 2018a; Mladenović et al., 2018b). Биохемијске карактеристике изолованих врста *E. coli* су поређени са биохемијским својствима стандардног соја и са *E. coli* клиничким изолатом. Карактеристике бактерија из рода *Klebsiella* су поређене са биохемијским својствима стандардног соја, док бактерије из рода *Enterobacter* и *Serratia* са подацима из литературе. Изолати се не разликују према биохемијским карактеристикама од стандардних сојева (Mladenović et al., 2018a; Mladenović et al., 2018b). Изолати који припадају роду *Serratia* одступају од биохемијских карактеристика сојева доступних у литератури (Grimont and Grimont, 2006). *E. gergoviae* не одступа од карактеристика сојева из литературе (Brenner et al., 1980). Према резултатима аглутинационог теста, *E. coli* KGPMF 14, 15, 22, 23 поседују способност аглутинације, док остали сојеви нису показали ту способност.

На основу литературе може се закључити да су ентеробактерије често нађене у сиревима. *E. coli* и *Klebsiella* spp. су изоловани из сира под именом „wara“ у Нигерији и њихова бројност је расла од момента производње до складиштења сира (Ogbolu et al., 2014). *E. coli*, *Klebsiella* (*K. oxytoca* и *K. ozaenae*) и *Enterobacter* spp. су биле доминантне Грам негативне бактерије изоловане из 11 различитих узорака „Urfa“ сира из Турске (Guven et al., 2008). Kongo et al. (2008) су испитивали микробиолошки квалитет свежег млека из São Jorge, од кога се производи традиционални, полутврди португалски сир и идентификовали врсте *K. oxytoca*, *K. cloacae*, *K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica*, *K. terrigena*, *E. sakazakii* (*C. sakazakii*), *E. coli* и *S. odorifera*. Резултати ове докторске дисертације потврђују наводе из литературе о доминацији изолата из родова *Echerichia* и *Klebsiella*, у сиревима из традиционалне производње.

E. coli је пронађена у сир у Танти, Египат (Heikal et al., 2014), у сировом млеку и сировим млечним производима (сир), такође из Египта (El nahas et al., 2015; Ombarak et al., 2016), у сиру „Pecorino Abruzzese“, произведеном у Италији, (Chaves-López et al., 2006), у сиру направљеном од непастеризованог овчијег млека (Amagliani et al., 2016), док је у сировом млеку и сиру „mozzarella“ у јужној Италији детектован Shiga токсин, који продукује *E. coli* (Nobili et al., 2016). D'Amico et al. (2010) у својим експериментима су инокулисали сир од непастеризованог млека са *E. coli* O157:H7. Бројност *E. coli* O157:H7 била је највиша у младом сиру, одмах након производње сира. У сиру старом 60 дана бројност бактерија је смањена, али су и даље присутне, што значи да процес старења сира не може елиминисати *E. coli*.

S. odorifera је пронађена у полутврдом крављем сиру португалског порекла (Kongo et al., 2008). Tormo et al. (2011) и Hernández-Saldaña et al. (2016) су пронашли врсте *S. fonticola* и *S. marcescens* у свежем козијем сиру. Предоставља се да врсте из рода *Serratia* доспевају у млеко случајно, током процеса производње као и остале ентеробактерије.

Врста *E. gergoviae* је детектована у сокобањском сир у летњој сезони (Mladenović et al., 2018a). Често се врсте из рода *Enterobacter* изолују у случајевима маститиса код говеда (Wahyuni and Budiarso, 2009; Lalošević i sar., 2011). Према Muruzović et al. (2018c) из истог узорка сира је изолован и *Streptococcus uberis* који узрокује маститис. Врсте из рода *Enterobacter* су пронађене у традиционалним сиревима (Ethiopian cottage cheese) (Melkamsew et al., 2012). *E. gergoviae* је поред других врста нађена у крављем млеку у Индонезији, Yogyakarta (Wahyuni and Budiarso, 2009). Врста може да утиче на сензорне карактеристике сира јер поседује способност синтезе биогених амина (Marino et al., 2000).

Ентеробактерије у храну (у нашем случају у млеко и сир) доспевају случајно, током процеса производње. Већа бројност *E. coli* у сиру је показатељ лоше хигијене производног процеса или присуства инфективног маститиса (Georgescua et al., 2015), а главни разлог је недостатак термичке обраде млека. Сиреви, произведени од непастеризованог млека, сматрају се веома погодним за контаминацију патогеним бактеријама (Gould et al., 2014). Доказано је да излагање сира температури од 63°C/15 мин доводи до потпуног уништавања *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *E. coli* (Massa et al., 1992). Сокобањски сир је направљен од непастеризованог млека, тако да нема инхибиторног ефекта температуре на раст бактерија током процеса производње.

Резистенција на антибиотици

Резистенција на антибиотици је велики глобални проблем, настао као последица честе и неадекватне употребе антибиотика. У нашем истраживању, у већини случајева, изолати су показали осетљивост на антибиотици. Изузетак су изолати *E. coli* KGPMF 15, 17, 24, *S. odorifera*, *S. marcescens*, који су показали резистенцију на тетрациклин (Mladenović et al., 2018a; Mladenović et al., 2018b). Thompson et al. (2007) и Rahimi et al. (2011) су такође показали резистенцију *S. marcescens* и *E. coli* O157 на тетрациклин. *E. coli* изолована из сира направљеног од сировог млека из западног Бразила је такође резистентна на тетрациклин (Paneto et al., 2007). Krnjić et al. (2005) су испитивали осетљивост изолата *E. coli* на 17 антибиотика и хемотерапеутика. Изолати показују осетљивост само на трећу генерацију цефалоспорина и колистин.

Према Bonyadian et al. (2014) ентеротоксични и ентероагрегативни сој *E. coli* из сировог млека и сира од непастеризованог млека, показује резистенцију на стрептомицин. У Анкари (Турска) *E. coli* је изолована из сировог млека, белог сира и сладоледа. Сви изоловани сојеви *E. coli* су показали резистенцију на хлорамфеникол (Gundogan et al., 2014). Сви сојеви *E. coli* из сокобањског сира су показали осетљивост на хлорамфеникол и стрептомицин (Mladenović et al., 2018a; Mladenović et al., 2018b). *Klebsiella* spp. изолована из свежег млека (Dhaka City, Бангладеш) показује резистенцију на тетрациклин (Uddin et al., 2011). Све бактерије из рода *Klebsiella* изоловане из сокобањског сира показују осетљивост на све испитиване антибиотици (Mladenović et al., 2018a). Имајући у виду резистентност бактерија изолованих из сокобањског сира на антибиотици и податке других истраживача о резистентности истих врста претпоставља се да је резистентност резултат фенотипске модификације. Према Muñoz et al. (2014), резистенција на антибиотици може бити резултат фенотипске модификације. Претпоставља се да резистенција појединих изолата на тетрациклин потиче од употребе антибиотика – тетрациклина приликом лечења маститиса.

Утицај еколошких фактора на планктонски раст ентеробактерија

У овој дисертацији, први пут су приказани резултати утицаја одређених еколошких фактора (различита температура, pH, различите концентрације соли, глукозе и лактозе) на планктонски раст ентеробактерија изолованих из сокобањског сира. Упоредјујући две подлоге, бактерије из рода *Klebsiella* су показале бољи раст у ТСБ, него у МХ. Разлика у планктонском расту тестираних бактерија у ТСБ у односу на планктонски раст у МХ је статистички значајна ($p < 0,05$) на 37°C, док на 44°C разлика није значајна ($p > 0,05$). Претпоставља се да је састав подлога узрок различитог раста бактерија. Резултати у нашем истраживању потврдили су способност планктонског раста врста из рода *Klebsiella* на температурама 37°C и 44°C на вредностима pH 5,5 и pH 8,5. Tsuji et al. (1982) су објавили да је раст бактерија *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* и *Acinetobacter calcoaceticus* једнако добар на температурама 25°C, 30°C, 37°C и 42°C, а да су уништени након 30 мин на 60°C или 70°C. Наше истраживање је показало да је температура 37°C била погоднија за планктонски раст врста *Klebsiella* spp. од температуре 44°C (Mladenović et al., 2018c). Према Brisse et al. (2006), *K. ornithinolytica* је расла на 5°C, док *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* нису расле. Наше истраживање је показало да *K. ornithinolytica*, *K. pneumoniae* и *K. oxytoca* изоловане из сира нису расле на 4°C.

Температура на 4°C, ниска pH вредност и све концентрације NaCl инхибирале су планктонски раст врста из рода *Serratia* у ТСБ и МХ (Mladenović et al., 2018d). Планктонски раст на 37°C је бољи у ТСБ него у МХ (статистички значајна разлика, $p < 0,05$). Нема статистички значајне разлике у расту у ТСБ и МХ на 44°C ($p > 0,05$). На основу доступне литературе, нема података о утицају еколошких фактора на планктонски раст *Serratia* spp.

Планктонски раст *E. coli* KGPMF 16 – 17 је био већи у ТСБ на 37°C. Разлика у планктонском расту у ТСБ није статистички значајан у односу на раст у МХ на 37°C ($p > 0,05$) али постоји статистички значајна разлика у расту бактерије у ТСБ у односу на раст у МХ на 44°C ($p < 0,05$). Кисели медијум и со у медијуму су били ограничавајући фактори за раст *E. coli* KGPMF 16 – 17, док је базни медијум био прикладнији за раст. Веће концентрације NaCl повећале су осмоларитет медијума, што је довело вероватно до хиперосмотског шока ћелија *E. coli* и изазвало супресију раста. Значај повећања концентрације NaCl у подлози за раст *E. coli* постао је још очигледнији у синергизму са температуром од 44°C (Mladenović et al., 2018e). Abdulkarim et al. (2009) су испитивали

комбиновани ефекат NaCl и температуре на бактеријски раст. Утврђено је да висока концентрација NaCl повећава осмоларитет медијума, а у синергизму са високом температуром, значајно утиче на смањење способности раста бактерија (Scott, 1989; Troller, 1986). Овакав синергистички ефекат је потврђен и резултатима ове докторске дисертације. На основу резултата приказаних у овој дисертацији, може се закључити да је планктонски раст тестираних бактерија више стимулисан у присуству лактозе него глукозе (Mladenović et al., 2018e).

Утицај еколошких фактора на биофилм ентеробактерија

Познато је да врсте које припадају фам. Enterobacteriaceae имају способност формирања биофилма (Seifi et al., 2016; Prunić, 2017; Vuotto et al., 2017). Контаминација сира ентеробактеријама се може десити у свим фазама производње. Бактеријски биофилмови, који се налазе на разним површинама у средини где се сир производи, су један од потенцијалних извора контаминације сира. Познато је да су бактеријски биофилмови отпорнији од планктонских бактерија и да могу преживети процесе термичке обраде.

У овој дисертацији, први пут је испитиван ефекат различитих температура, pH и концентрација соли, глукозе и лактозе на способност формирања биофилма ентеробактерија изолованих из сокобањског сира. Поред наведених параметара, испитиван је утицај подлога на способност формирања биофилма бактерија. Подлога ТСБ је више погодвала за развој биофилма *Klebsiella* spp. него подлога МХ (статистички значајна разлика ($p < 0,05$)). Разлика у утицају подлога на способност формирања биофилма врста *Serratia* spp. и *Escherichia* spp. није статистички значајана ($p > 0,05$).

Сој *K. pneumoniae* ATCC 70063 је формирао снажнији биофилм у односу на изолате из сокобањског сира. Према Manges et al. (2015), сојеви *Klebsiella* spp., изоловане из меса су потенцијални узрочници кварења хране и показује способност формирања биофилма. Ноштакá et al. (2010) су уочили да формирање биофилма *K. pneumoniae* се повећава на вредности pH 8,5. Mirkar et al. (2016) су показали да висока концентрација NaCl од 8% и више, ниске температуре и алкални pH 9 могу спречити формирање биофилма *K. pneumoniae*. Резултати истраживања овог доктората показују да су бактерије из рода *Klebsiella* биле осетљиве на алкалну pH вредност. Промене у животној средини, могу изазвати промене у бактеријској ћелији и формирању биофилма (Costerton et al., 1995; Jana

et al., 2000). Jackson et al. (2002) и Khangholi and Jamalli (2016) су уочили да концентрација шећера смањује бројност бактерија и способност формирања биофилма у јогурту. У истраживању ове дисертације, различите концентрације глукозе показују ефекат који се зависан од врсте бактерије (Mladenović et al., 2018c; Mladenović et al., 2018d). Све тестиране концентрације глукозе стимулисале су раст формираног биофилма *K. pneumoniae* ATCC 70063 у обе тестиране подлоге (Mladenović et al., 2018c). Резултати пеликула теста су сагласни са резултатима формирања биофилма изолата *K. pneumoniae* KGPMF 11 и *K. pneumoniae* ATCC 70063 (Mladenović et al., 2018c). Биофилм *K. pneumoniae* је већ истражен и сматра се да је њена способност формирања биофилма кључна за резистенцију врсте на антибиотике (Ribeiro et al., 2016).

S. odorifera и *S. marcescens* нису показале способност формирања пеликуле али су показале способност формирања биофилма на 37°C у обе подлоге (Mladenović et al., 2018d). Према Nandhagopal and Subashkumar (2016) формирање биофилма *S. marcescens* на температури од 4°C која је у фрижидеру је од значаја за кварење хране. Такође су показали да је 1% NaCl инхибирао способност формирања биофилма, а да 2% NaCl смањује густину биофилма. Наше истраживање је показало да су све концентрације NaCl смањиле способност формирања биофилма и редуковале већ формирану биофилм изолата из рода *Serratia* у ТСБ (Mladenović et al., 2018d).

Познато је да коменсална и патогена *E. coli* поседује способност формирања биофилма (Beloin et al., 2008; Sharma et al., 2016). *E. coli* KGPMF 17 изолована из сокобањског сира, такође показује способност формирања биофилма у ТСБ (Mladenović et al., 2018e). *In vitro* формирање биофилма *E. coli* варира и зависи од услова раста (Reisner et al., 2006). Zhang et al., 2007 су доказали да „*uscF*“ (вишеструки протеински протресорни протеин BhsA прекурсор) кодира синтезу протеина спољашње мембране и негативно утиче на формирање биофилма *E. coli* у стресним условима. Уклањање „*uscF*“ повећава способност формирања биофилма пет пута, у присуству глукозе. Концентрација шећера и температура стварају могући синергистички ефекат на формирање биофилма (Pan et al., 2010). Истраживање у овој дисертацији је показало да температура и неке концентрације глукозе и лактозе показују синергистички ефекат и стимулишу раст бактерија, али да температура на 4°C инхибира и планктонски раст и формирање биофилма (Mladenović et al., 2018c; Mladenović et al., 2018d; Mladenović et al., 2018e).

Додавање NaCl у сир може спречити раст ентеробактерија и то је један од могућих механизма конзервирања сира (Abdulkarim et al., 2009). Разлике у формирању биофилма у различитим условима животне средине могу се објаснити способношћу неких микроорганизама да реагују на промене услова средине (бројност популације, ограничени хранљиви састојци, осмоларитет, pH или састав медијума). Бактерије у природи живе далеко од оптималних услова раста. Према томе, ћелија мора имати могућност да осети, интегрише и одговори на различите услове да би преживеле (Dragosits et al., 2013). Бактерије могу активирати гене одговорне за експресију површинских протеина које омогућавају адхезију и производњу екстрацелуларне полимерне супстанце (ЕПС), које су директно укључене у формирање биофилма (Frank et al., 2007). Веома је важно разумети метаболичку регулацију у одговору на услове/утицај фактора животне средине, укључујући експресију гена, експресију протеина и сл. (Shimizu, 2014). Према Trémoulet et al. (2002), *E. coli* O157:H7 је модификовала/прилагодила неколико протеина укључених у процес формирања биофилма.

Адхезивна способност у присуству растварача

На основу прегледане литературе, први пут у овом докторату је показана способност адхезије врста *S. odorifera*, *S. marcescens* и *E. gergoviae*, у присуству хлороформа, етил ацетата и ксилена. Када се упореди способност адхезије у присуству сва три растварача, може се закључити да постоји статистички значајна разлика у способности адхезије између хлороформа и етил ацетата ($p < 0,05$) код изолата из родова *Klebsiella* и *Escherichia* док код *Serratia* spp. нема статистички значајне разлике ($p > 0,05$).

Адекватна хидрофобна/хидрофилна својства микроорганизама могу допринети корисним процесима као што су деградација угљоводоника или биоразградивих полиестера током ферментације млека (Obuekwe et al., 2009). *K. pneumoniae* пронађена у узорцима млека и млечним производима показала је одређен степен хидрофобности (Grewal and Ramparkash, 1999). Хидрофобност микроорганизама утиче на њихову адхезију на различите абиотичке и биотичке површине. Хидрофобни микроорганизми поседују способност формирања биофилма (Krasowska and Karel, 2014). Према Tresse et al. (2006) ћелијска хидрофобност је кључна у формирању биофилма. Del Re et al. (2000) и Giaouris et al. (2009) указују да бактерије са хидрофобном површином имају већи афинитет везивања за епителне

ћелије и чврсте површине. У овом докторату највећа адхезија у присуству растварача је примећена у следећем редоследу: хлороформ < етил ацетат < ксилен. У присуству хлороформа, врсте из рода *Klebsiella* су показале највећи проценат адхезије. Такође показују, способност формирања биофилма на абиотичким површинама (микротитарска плоча).

На основу резултата способности адхезије у присуству хексадекана, девет од 22 изолата *E. coli* су умерено хидрофобни. Сојеви O157:H7 су показали ниже адхезивне способности за говеђи мишић од других серотипова. Није пронађена корелација између хидрофобности патогене *E. coli* и адхезивне способности (Li and McLandsborough, 1999). У резултатима ове дисертације, сојеви *E. coli* показали су различит проценат хидрофобности. *E. coli* KGPMF 22 и 24 показују сличан проценат хидрофобности као клинички изолат.

Резултати ове дисертације указују да *S. odorifera* показује већи проценат адхезије у присуству етил ацетата, док *S. marcescens* показује нижи. Хидрофобност *S. marcescens* је важан фактор у адхезији и колонизацији различитих површина. Bar-Ness et al. (1988) су истраживали потенцијалну улогу „serratomolida“ (serratomolide-продукујуће врсте) и закључили да присуство сератамолида на ћелијама *S. marcescens* доводи до смањења хидрофобности, због блокирања хидрофобних локација на површини ћелије. Према Rosenberg et al. (1986), хидрофобност зависи од температуре раста. Сви тестирани серотипови *Serratia* spp., демонстрирали су способност адхезије на 30°C док при већој температури од 38°C губе ту способност.

Бактеријска адхезија у присуству ксилена је показатељ хидрофобности или хидрофилности ћелијске површине. Способност адхезије у присуству друга два растварача, хлороформа и етил ацетата, је показатељ способности бактеријске ћелије као донора базних, односно акцептора киселих електрона (Bellon-Fontaine et al., 1996). На основу резултата може се закључити да сви изолати из сокобањског сира имају ниску хидрофобност.

Адхезивна способност за епител свињског црева

Адхезивна способност бактерија изолованих из сокобањског сира за епител свињског црева, испитана је по први пут у овој докторској дисертацији. Резултати указују да бактерије са већим процентом адхезије у присуству хлороформа показују бољу способност адхезије за свињски епител. Врсте *K. pneumoniae* и *S. marcescens* су показале способност адхезије док *E. coli* изолована из сокобањског сира не показује способност адхезије за епител црева. У овом делу експеримента, тестирани су сојеви *E. coli* који су показали способност аглутинације. Доказано је да они немају способност адхезије за епител танког црева. Способност адхезије микроорганизама зависи од физичко-хемијских, електростатичких и кисело-базних интеракција. Ове интеракције зависе од супстрата и физичко-хемијских особина бактеријске површине, као што су нпр. хидрофобност (Van Loosdrecht et al., 1987), напон (Dickson and Koohmaraie, 1989; Gannon et al., 1991) и електронски акцептор/донор електрона (Van Oss, 1993). Doyle (2000) је показао да хидрофобност има важну улогу у способности изазивања инфекција. Према Magnusson et al. (1980) хидрофобност и негативни напон/наелектрисање може повећати интеракцију бактерија са одређеним ћелијама животиња.

Коагрегација ентеробактерија са *E. faecalis* KGPMF 49

Коагрегација ентеробактерија са *E. faecalis* KGPMF 49 изолованим из сокобањског сира је испитивана први пут у овој дисертацији. Ентеробактерије и ентерококе су припадници нормалне флоре гастроинтестиналног тракта човека (Silva et al., 2012; Pugin et al., 2017). У овој докторској дисертацији највећи проценат коагрегације је детектована код *K. ornithinolytica* PMFKG 8 (32,3%), *S. odorifera* (28%) и *E. coli* KGPMF 17 (28%) са *E. faecalis* KGPMF 49. Осим што могу да живе заједно, према Idoui (2014) доказан је антагонистички ефекат лактобацила на ентеробактерије. Доказан је и инхибиторан ефекат изолата *Lactobacillus* spp. на адхезију уropатогене *E. faecalis* (Velraeds et al., 1996). Према Muruzović et al. (2018a;b) утврђен је антимикуробни потенцијал БМК у односу на ентеробактерије које су изоловане из истог сокобањског сира.

Липолитичка и протеолитичка активност ентеробактерија

Бактерије из фам. Enterobacteriaceae синтетишу протеолитичке и липолитичке ензиме који су одговорни за погоршање квалитета млека и млечних производа (Zajác et al., 2015; Masiello et al., 2016). У производњи сира, ови ензими дестабилизују казеин и могу да модификују или чак спрече млечну коагулацију која може директно утицати на формирање производа (Caldera et al., 2015). Други велики проблем је у томе што ове бактерије могу значајно утицати на боју, мирис, укус и текстуру (Böhme et al., 2013; Caldera et al., 2015). Липолиза може довести до процеса који се назива хидролитички ранцидитет, где производ развија кисели укус и непријатан мирис (Carpiné et al., 2010; Krewinkel et al., 2016). Masiello et al. (2016) су изоловали липолитичке представнике фам. Enterobacteriaceae (родови *Serratia*, *Enterobacter*) из пастеризованог узорка млека који могу довести до кварења млека.

Бројне студије потврђују протеолитичку и липолитичку активност ентеробактерија. *Citrobacter braakii*, *E. sakazakii* (*C. sakazakii*), *E. coli*, *Kluyver* spp., *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* и *S. odorifera*, изолати из млека, су испитивани на способност производње органских киселина, биогених амина и на липолитичку и протеолитичку активност. Протеолитичка активност је примећена само код *S. odorifera* и *Kluyver* spp. (Chaves-López et al., 2006). Према Immanue et al. (2008) *Serratia rubidaea*, изолована из млека, поседује липолитичку активност. Изолати из узорака сировог млека, који су изоловани из различитих локалних центара за млеко у различитим деловима Kanchipuram district, Јужне Индије (Prakash et al., 2007; Karthikeyan et al., 2008), нису показали протеолитичку и липолитичку активност. У овом докторату, испитивана је липолитичка и протеолитичка активност бактерија изолованих из сокобањског сира. На основу резултата скрининг методе, врсте из родова *Escherichia*, *Enterobacter* и *Klebsiella* не показују протеолитичку и липолитичку активност. Изузетак су *K. oxytoca* KGPMF 1, *S. odorifera* и *S. marcescens* које показују липолитичну активност (Mladenović et al., 2018a).

Према Whitaker (1992) и Avendaño et al. (2016) ензимска активност има важну улогу у квалитету хране. Током производње, утичу на сазревање, боју, текстуру, укус. У прехранбеној индустрији, углавном су се користили за оптимизацију процеса, побољшање ефикасности, квалитета, повећање рока трајања и за постизање жељених органолептичких карактеристика финалног производа. Познато је да су лактаза, липаза, протеаза, транслутаминаза, аспарагиназа и пектиназа често коришћени ензими за уклањање лактозе,

сазревање сира и тд. (Avendaño et al., 2016). Киселе протеазе, као што је химозин, су коришћене као коагуланти у производњи сира. Химозин представља око 20-30% млечних коагуланата који се користе широм света (Simpson et al., 2012; Haertlé, 2016). Протеиназе утичу на зрелост сира, убрзавајући хидролизу протеина, што је најважнија биохемијска реакција у овој фази и има велики утицај на текстуру и укус. Осим тога, пептидазе се користе за уклањање горчине које производе протеиназе током зрења (Azarnia et al., 2010; Sandri et al., 2011). Липазе су коришћене за развој карактеристичног укуса. Ови ензими хидролизују масне киселине кратког ланца, тиме смањујући формирање трансмасних киселина (Sanchez and Demain, 2010; Anobom et al., 2014; Teh et al., 2014; Hmidet et al., 2015; Saxena, 2015; Spohner et al., 2015;). Врста сира зависи од процеса сазревања, што даје карактеристичну текстуру и арому (Houde et al., 2004; Aravindan et al., 2007). У зрењу, липазе играју главну улогу у хидролизацији триглицерида, диглицерида, моноглицерида, масних киселина и глицерола до слободних масних киселина, које су одговорне за карактеристичан развој укуса (Houde et al., 2004; Azarnia et al., 2006; Aravindan et al., 2007). Процес зрења са липазама је био око 2 до 5 пута бржи него без њега (Azarnia et al., 2006). Важна је и оптимизација количине додатог ензима и његове ензимске активности, пошто високи нивои липаза могу довести до смањења приноса сира (Houde et al., 2004; Aravindan et al., 2007; Azarnia et al., 2010; Teh et al., 2014; Spohner et al., 2015). У овом докторату, спектрофотометријским мерењем количине екстрацелуларних ензима, показано је да активност екстрацелуларних ензима зависи од врсте подлоге-супстрата и врсте бактерија. Спектофотометријска метода је омогућила детекцију врло мале количине екстрацелуларних ензима.

Резултати ове докторске дисертације, указују да би процес пастеризације онемогућило појаву ентеробактерија јер би се на тај начин смањио укупан број ентеробактерија у узорцима млека (Baranceli et al., 2014) али би се на тај начин нарушио традиционални процес производње сира. Сир садржи већу концентрацију соли, која делује као конзерванс, јер инхибитора раст ентеробактерија, што је потврђено резултатима ове дисертације. Протеини и шећери из сира повољно утичу на раст и развој ентеробактерија, чија је бројност и активност ограничена активношћу бактерија млечне киселине. Ентеробактерије у сир доспевају из млека које је највероватније контаминирано током процеса муке и не утичу на органолептичке карактеристике сира.

8. Закључци

На основу резултата ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

- ❖ Сокобањски сир је аутохтони прехранбени производ који се прави од некуваног крављег млека, на традиционалан начин, у домаћинствима околине Сокобање (југоисточна Србија). По својим хемијским карактеристикама сокобањски сир припада младим, киселим сиревима, полумасним до пуномасним и полутврдим сиревима.
- ❖ Доминантну заједницу бактерија у сокобањском сиру чине аеробне мезофилне бактерије чија се бројност мења у односу на сезону у којој се сир прављен и сирила која се користе у процесу добијања сира. Сирило је без бактеријских стартера.
- ❖ У оквиру бактериобиоте сокобањског сира идентификована су 32 изолата која припадају врстама из фам. Enterobacteraceae.
 - Изолати *E. coli* су доминатно присутни у пролећним узорцима (узорак 3), а изолати *Klebsiella* spp. су доминантни у сиру прављеном током лета и јесени где је коришћено сирило „Sirela“.
 - У пролећним узорцима 1 и 2 нема ентеробактерија јер се користило хемијско сирило (Маја Рекордерка) које је онемогућило појаву ентеробактерија због ниске рН
 - Врста *E. gergoviae* се појављује у летњим узорцима и његова појава се повезује са болешћу млечних жлезда животиње као и са лошом хигијеном
 - Биохемијске и физиолошке особине изолованих ентеробактерија не одступају од стандарних АТСС сојева
- ❖ Бактерије пореклом из сокобањског сира су показале различит степен осетљивости према антибиотицима. Сви изолати су осетљиви на хлорафеникол, стрептомицин и терациклин, а 4 (два соја *E. coli*, *S. marescens*, *S. odorifera*) изолата показују резистенцију на тетрациклин.
- ❖ Сојеви *E. coli* KGPMF 14, 15, 22, 23 поседују способност аглутинације.
- ❖ Показан је значајан утицај различитих еколошких фактора на плактонски раст изолованих врста.
 - ТСБ подлога се показала као погоднија за планктонски раст изолованих бактерија него МХ

- 37°C је одговарајућа температура за раст, затим температура 44°C док на 4°C нема раста
- Врсте из родова *Klebsiella*, *Serratia* и *Escherichia* су показале осетљивост на ниску рН вредност средине
- NaCl показује инхибиторан ефекат на плактонски раст бактерија
- Утицај различитих концентрација глукозе и лактозе је зависио од врсте и углавном показује стимулативни ефекат на планктонски раст бактерија на 37°C и 44°C
- ❖ Показан је значајан утицаја различитих еколошких фактора на биофилм изолованих врста.
 - Способност формирања пеликуле је присутна код *K. pneumoniae* KGPMF 11
 - Способност формирања биофилма свих бактерија је детектована само на 37°C.
 - Све тестиране врсте из рода *Klebsiella*, осим *K. oxytoca* KGPMF 4 формирају биофилм
 - *E. coli* KGPMF 17 показује способност формирања биофилма само у ТСБ док *S. odorifera* нема способност формирања биофилма у ТСБ
 - Утицај свих еколошких фактора на формирање и формирану биофилм је зависио од врсте
 - Инхибиторни утицај еколошких фактора је био већи на способност формирања биофилма него на формирану биофилм
- ❖ Ентеробактерије показују различит проценат адхезије која је зависна од растварача (хлороформ < етил ацетат < ксилен).
- ❖ Утврђена је адхезивна способност *K. pneumoniae*, *K. ornithinolytica* и *Serratia marcescens* за епител свињског црева, док сојеви *E. coli* који су показали аглутациону способност нису показали адхезивну способност.
- ❖ Ентеробактерије поседују способност ступања у интеракције са бактеријама из других родова

- ❖ Познато је да бактерије из фам. Enterobacteriaceae могу утицати на органолептичке особине сира, али тестиране бактерије у овом истраживању углавном нису показале протеолитичку и липолитичку активност. Ензимска активност бактерија, као и њихов раст у сиру је смањена због ниске рН које стварају бактерије млечне киселине и због веће концентрације NaCl која се додаје приликом производње.
- ❖ Резултати ове дисертације доприносе бољем разумевању неистражене микрофлоре сокобањског сира. Иако су ентеробактерије непожељне у млечним производима, оне чине уобичајену микрофлору непастеризованог млека и млечних производа. Њихова бројност и активност је контролисана ниском рН сира и високом концентрацијом NaCl. Због мале бројности и ензимске неактивности, предпоставља се да немају улогу у сензорним карактеристикама (укус, мирис...) сокобањског сира. Уколико би бројност бактерија млечне киселине опала и уколико би дошло до пораста броја ентеробактерија, онда би имале утицај на сензорне карактеристике сокобањског сира.

9. Литература

- Abdulkarim SM, Fatmah AB, Anderson JG** (2009) Effect of salt concentrations on the growth of heat-stressed and unstressed *Escherichia coli*. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 7: 51-54.
- Adams MR, Hall CJ** (1988) Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. *International Journal of Food Science and Technology*, 23: 287-292.
- Alonso-Calleja C, Capita R, Carballo J, Bernardo A, García-López ML** (2002) Changes in the Enterobacteriaceae populations throughout manufacturing and ripening of Valdeteja cheese. *Milchwissenschaft*, 57: 522-525.
- Amagliani G, Petruzzelli A, Carloni E, Tonucci F, Foglini M, Micci E, Ricci M, Di Lullo S, Rotundo L, Brandi G** (2016) Presence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* in raw ovine milk destined for cheese production and evaluation of the equivalence between the analytical methods applied. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13: 626-632.
- Anobom CD, Pinheiro AS, De-Andrade RA, Aguiéiras EC, Andrade GC, Moura M, Freire DM** (2014) From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*, 1-11.
- Appleton H** (2003) Viruses. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition) pp. 6004-6011
- Aravindan R, Anbumathi P, Viruthagiri T** (2007) Lipase applications in food industry. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 141.
- Ardic M, Kav K, Guner A, Dogruer Y** (2007) Identification of Enterobacteriaceae in Urfa cheese. *Acta Alimentaria*, 36: 483-488.
- Armougom F, Henry M, Vialettes B, Raccah D, Raoult D** (2009) Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and methanogens in anorexic patients. *Plos One*, 4: e7125.
- Arsenijević N** (1999) Opšta mikrobiologija, Udžbenik za studente medicine, Savremena Administracija, Beograd, Srbija.
- Avendaño KA, Anguiano M, López EC, Montañez LE, Sifuentes L, Balagurusamy N** (2016) Microbial enzymes: Applications in food processing. *Agro Food Industry Hi Tech*, 27: 1-63.

- Azarnia S, Lee BH, Yaylayan V, Kilcawley KN** (2010) Proteolysis development in enzyme-modified Cheddar cheese using natural and recombinant enzymes of *Lactobacillus rhamnosus* S93. Food chemistry, 120: 174-178.
- Azarnia S, Robert N, Lee B** (2006) Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. Critical Reviews in Biotechnology, 26: 121-143.
- Bachmann HP, Frohlich-Wyder MT, Jakob E, Roth E, Wechsler D, Beuvier E, Buchin S** (2011) Raw milk cheeses. In: Encyclopedia of Dairy Sciences, Fuquay JW, Fox PF, Mc Sweeney PLH eds. 2nd ed., Vol 1, Academic Press, Elsevier Ltd, San Diego, pp. 652–660.
- Baranceli GV, Oliveira CAF, Corassin CH, Camargo TM, Santos MG, Novotny L CM, Porto E** (2014) Occurrence of *Escherichia coli* and coliforms in minas cheese plants from São Paulo, Brazil. Journal Advances in Dairy Research, 2: 1-4.
- Bar-Ness R, Avrahamy N, Matsuyama T, Rosenberg M** (1988) Increased cell surface hydrophobicity of a *Serratia marcescens* Ns 38 mutant lacking wetting activity. Journal of Bacteriology, 170: 4361-4364.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M** (1996) Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology, 45: 493-496.
- Baylis C, Uyttendaele M, Joosten H, Davies A** (2011) The Enterobacteriaceae and their Significance to the Food Industry, ILSI Europe Report Series. Belgium, pp. 17-28.
- Bellon-Fontaine MN, Rault J, Van Oss CJ** (1996) Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. Colloids and Surfaces, 7: 47-53.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM** (2008) *Escherichia coli* biofilms. Current Topics in Microbiology and Immunology, 322: 249-289.
- Bem Z, Adamič J** (1991) Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa, Tehnološki fakultet Univerzitet u Novom Sadu, Srbija.
- Bernhardt H, Knoke M** (1997) Mycological aspects of gastrointestinal microflora. Scandinavian journal of Gastroenterology Supplements, 222: 102–106.
- Beuvier E, Berthaud K, Cegarra S, Dasen A, Pochet S, Buchin S, Duboz G** (1997) Ripening and quality of Swiss-type cheese made from raw, pasteurized or microfiltered milk. International Dairy Journal, 7: 311–323.

Beuvier E, Buchin S, Fox P, Mc Sweeney P, Cogan T, Guinee T (2004) Raw milk cheeses. In: Cheese: Chemistry, Physics & Microbiology, 3rd ed., Vol 1, Elsevier Ltd., London, pp. 319–345.

Bogojevski T (2011) Uticaj tipa starter kulture na fizičko-hemijska i senzorna svojstva belog sira. Journal of Engineering & Processing Management, 3: 101-113.

Böhme K, Fernández-No IC, Barros-Velázquez J, Gallardo JM, Calo-Mata P, Cañas B (2013) Species identification of food spoilage and pathogenic bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. Journal of Proteome Research, 9: 3169-3183.

Bonyadian M, Moshtaghi H, Akhavan Taheri M (2014) Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. Veterinary Research Forum, 5: 29-34.

Brenner JD, Richard C, Steigerwalt GA, Asbury AM, Mandel M (1980) *Enterobacter gergoviae* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens and the environment. International Journal of Systematic Bacteriology: 1-6.

Brisse S, Grimont F, Grimont PAD (2006) The genus *Klebsiella*. Prokaryotes, 6: 159-196.

Buffet-Bataillon S, Rabier V, Betremieux P, Beuchee A, Bauer M, Pladys P, Le Gall E, Cormier M, Jolivet-Gougeon A (2009) Outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: contaminated unmedicated liquid soap and risk factors. Journal of Hospital Infection, 72: 17-22.

Caldera L, Arioli S, Stuknyte M, Scarpellini M, Franzetti L (2015) Setup of a rapid method to distinguish among dead, alive, and viable but not cultivable cells of *Pseudomonas* spp. in mozzarella cheese. Journal of Dairy Science, 98: 8368–8374.

Carić M, Milanović S, Vucelja D (2000) Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Prometej, Novi Sad, Srbija.

Carpiné D, Dagostin JLA, Santa HSD, Alvarez DC, Terra NN, Santa ORD (2010) Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais. Ambiência, 6: 125-132.

Carricajo A, Boiste S, Thore J, Aubert G, Gille Y, Freydière AM (1999) Comparative evaluation of five chromogenic media for detection, enumeration and identification of urinary tract pathogens. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 18: 796-803.

- Chambers DH, Esteve E, Retiveau A** (2010) Effect of milk pasteurization on flavor properties of seven commercially available French cheese types. *Journal of Sensory Studies*, 25: 494–511.
- Chaves-López C, Angelis Md, Martuscelli M, Serio A, Paparella A, Suzzi G** (2006) Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology* 101: 353–360.
- Chmel H** (1988) *Serratia odorifera* biogroup 1 causing an invasive human infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 26:1244-1245.
- Ciragil P, Gul M, Aral M, Ekerbicer H** (2006) Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and identification of common urinary tract pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25: 108-111.
- Cogan TM, Accolas JP** (1995) *Dairy Starter Cultures*, CH Publishers, Incorporation, New York.
- Coker C, Poore CA, Li X, Mobley HL** (2000) Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes and infections*, 2: 1497-505.
- Collado MC, Isolauri E, Salminen S** (2008) Specific probiotic strains and their combinations counteract adhesion of *Enterobacter sakazakii* to intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 285: 58-64.
- Colonna A, Durham C, Meunier-Goddik L** (2011) Factors affecting consumers' preferences for and purchasing decisions regarding pasteurized and raw milk specialty cheeses. *Journal of Dairy Science*, 94: 5217-5226.
- Čomić Lj** (1999) *Ekologija mikroorganizama*. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevacu, Srbija.
- Cordier JL** (2006) 17 – Enterobacteriaceae. In: *Emerging Foodborne Pathogens*. pp. 450-475
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM** (1995) Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49: 711-745.
- Crow VL, Gopal PK** (1995) Cell surface differences of lactococcal strains. *International Dairy Journal*, 5: 45-68.
- Dahiya RS, Speck ML** (1968) Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science* 51:1568-1572.

- Daly C, Sandine WE, Elliker PR** (1972) Interactions of food starter cultures and food-borne Pathogens: *Streptococcus diacetilactis* Versus food pathogens! Journal of Milk and Food Technology, 35: 1- 349.
- D'Amico DJ, Druart MJ, Donnelly CW** (2010) Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk. Journal of Food Protection, 73: 2217-2224.
- De Buyser ML, Dufour B, Maire M, Lafarge V** (2001) Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. International Journal of Food Microbiology 67: 1–17.
- Deetae P, Mounier J, Bonnarme P, Spinnler HE, Irlinger F, Helinck S** (2009) Effects of *Proteus vulgaris* growth on the establishment of a cheese microbial community and on the production of volatile aroma compounds in a model cheese. Journal of Applied Microbiology, 107: 1404–1413.
- Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D** (2000) Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. Letters in Applied Microbiology, 31: 438–442.
- Desmaures N, Guéguen M** (1997) Monitoring the microbiology of high-quality raw milk by monthly sampling over two years. Journal of Dairy Research 64: 271–280.
- Dias FS, Duarte WF, Schwan RF** (2013) Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Bioscience Journal, 29: 1678-1686.
- Dickson JS, Koohmaraie M** (1989) Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. Applied and Environmental Microbiology, 55: 832-836.
- Dogan B, Boor KJ** (2003) Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. Applied and Environmental Microbiology, 69: 130–138.
- Donlan RM** (2002) Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerging Infectious Diseases, 8: 881–890.
- Doyle R** (2000) Contribution of the hydrophobic effect to microbial infection. Microbes and Infection, 2: 391-400.

- Dragosits M, Moyhayskiy V, Quinones-Soto S, Park J, Tagkopoulos I** (2013) Evolutionary potential, cross-stress behavior and the genetic basis of acquired stress resistance in *Escherichia coli*. *Molecular Systems Biology*, 9: 643.
- Dubos F, Ducluzeau R** (1900) Etude *in vitro* du mecanisme de l'inhibition d'une souche de *Staphylococcus pyogenes* par une souche de micrococcus spp. *Annis. Instute Pasteur, Paris*. 117: 86-97.
- Duncan SH, Louis P, Flint HJ** (2007) Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters Applied Microbiology*, 44: 343-350.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA** (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308: 1635-1638.
- EFSA European Food Safety Authority** (2011) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009. *European Food Safety Authority* 9: 2090.
- EFSA European Food Safety Authority** (2012) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *European Food Safety Authority* 10: 2597.
- El nahas A, Mohamed H, El barbary H, Mohamed H** (2015) Incidence of *E. coli* in raw milk and its products. *Benha Veterinary Medical Journal*, 29: 112-117.
- Ercolini D, Russo F, Ferrocino I, Villani F** (2009) Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology*, 26: 228–231.
- Feng P, Weagant S, Grant M** (2002) enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. in *bacteriological analytical manual* (8th ed.). *FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition, Boston*.
- Fotadar U, Zaveloff P, Terracio L** (2005) Growth of *Escherichia coli* at elevated temperatures, *Journal of Basic Microbiology*, 45: 403-404.
- Fox PF** (1998) *Cheese Chemistry, Physics and Mycrobiology*, Volume 1 and 2, Published by applied science publishers, London and New York.
- Fraga Cottelo M, Perelmuter Scehin K, Giacaman Salvo SS, Zunino Abirad PM, Carro Techera SB** (2013) Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from Uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33: 801-804.

- Frampton EW, Restiano L, Blaszkowski N** (1988) Evaluation of the β -Glucuronidase Substrate 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-p-D-Glucuronide (X-GLUC) in a 24-Hour Direct Plating Method for *Escherichia coli*. *Journal of Food Protection*, 51: 402-404.
- Franciosi E, De Sabbata G, Gardini F, Cavazza A, Poznanski E** (2011) Changes in psychrotrophic microbial populations during milk creaming to produce Grana Trentino cheese. *Food Microbiology*, 28: 43–51.
- Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R** (2007) *In vitro* effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 888-895.
- Friedman ND, Kotsanas D, Brett J, Billah B, Korman TM** (2008) Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal unit via a case-control study and molecular typing. *American Journal of Infection Control*, 36: 22-28.
- Gannon JT, Manilal VB, Alexander M** (1991) Relationships between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 190-193.
- Georgescu M, Dobrea M, Georgescu D** (2015) Microbial population dynamics in presence of lactococcal bacteriophage during ripening of traditional raw milk Romanian cheese. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 6: 324-331.
- Giaouris E, Chapot-Chartier MP, Briandet R** (2009) Surface physicochemical analysis of natural *Lactococcus lactis* strains reveals the existence of hydrophobic and low charged strains with altered adhesive properties. *International Journal of Food Microbiology*, 131: 2–9.
- Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS** (2001) *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal Food Microbiology*, 67:207-216.
- Gould LH, Mungai E, Behraves CB** (2014) Outbreaks attributed to cheese: Differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11: 545-551.
- Govedarica M, Jarak M** (1995) Opšta mikrobiologija, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, Institut za ratarstvo i povrtarstvo.
- Grappin R, Beuvier E** (1997) Possible implications of milk pasteurization on the manufacture and sensory quality of ripened cheese 744. *International Dairy Journal*, 7: 751–761.

- Grewal J, Ramparkash T** (1999) Resistance to antibiotics, metals, hydrophobicity and klebocinogeny of *Klebsiella pneumoniae* isolated from foods. *Cytobios*, 98:113-123.
- Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, Turner ML, Segre JA** (2009) Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*, 324: 1190-1192.
- Grimont F, Grimont PAD** (2006) The genus *Serratia*. In: *The Prokaryotes*, Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E, eds. Vol 6, pp 219-244.
- Grimont F, Grimont PAD** (2006) The Genus *Serratia*. *Prokaryotes*, 6:219-244.
- Guarner F, Malagelada JR** (2003) Gut flora in health and disease. *Lancet Infectious Diseases*, 361: 512-519.
- Guerrero L, Guardia MD, Xicola J, Verbeke W, Vanhonacker F, Zakowska-Biemans S, Sajdakowska M, Sulmont-Rosse C, Issanchou S, Contel M, Scalvedi ML, Granli BS, Hersleth M** (2009) Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52: 345–354.
- Gundogan N, Avci E** (2014) Occurrence and antibiotic resistance of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* in raw milk and dairy products in Turkey. *International Journal of Dairy Technology*, 67: 562-569.
- Güven U, Coskun S, Ozer B** (2008) Microflora and pathogen bacteria (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) in Urfa Cheese (a traditional white-brined Turkish chesse). *Pakistan Journal of Nutrition*, 7: 630-635.
- Habrun B** (2014) *Klinička Veterinarska Bakteriologija, Medicinska naklada i Veterinarski institut*, Zagreb.
- Haertlé T** (2016) Enzymes: Analysis and Food Processing. In: *The Encyclopedia of Food and Health*. Caballero B, Finglas P, Toldrá F, eds. Academic Press, Oxford. Vol 2, pp. 524-531.
- Hantsis-Zacharov E, Halpern M** (2007) Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 7162–7168.
- Harrigan WF, McCance ME** (1976) *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. London, UK: Academic Press.

- Hayes M, Hurley MJ, Larsen LB, Heegaard CW, Magboul AAA, Oliveira JC, McSweeney PLH, Kelly AL** (2001) Thermal inactivation kinetics of bovine cathepsin D. *Journal of Dairy Research*, 68: 267–276.
- Heikal GI, Khater D F, Al-Wakeel SA** (2014) Bacteriological hazard of white cheese processed in some small primitive plants (dairy 354 shops) in Tanta city. *Benha Veterinary Medical Journal*, 1: 185-194.
- Hernández-Saldaña OF, Valencia-Posadas M, de la Fuente-Salcido NM, Bideshi DK, Barboza-Corona¹ JE** (2016) Bacteriocinogenic bacteria isolated from raw goat milk and goat cheese produced in the center of Mèxico. *Indian Journal Microbiology*, 56: 301-308.
- Hervet CJ, Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M** (2016) Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt. *Journal of Dairy Science*, 100: 950-960.
- Hickey DK, Kilcawley KN, Beresford TP, Wilkinson MG** (2007) Lipolysis in Cheddar cheese made from raw, thermized and pasteurized milks. *Journal of Dairy Science*, 90: 47-56.
- Hmidet N, Nawani N, Ghorbel S** (2015) Recent development in production and biotechnological application of microbial enzymes. *BioMed Research International*, 1-2.
- Horiuchi H, Sasaki Y** (2012) Short communication: Effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 95: 2904-2909.
- Hošťacká A, Čížnár I, Štefkovičová M** (2010) Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiologica*, 55: 75-78.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D** (2004) Lipases and their industrial applications. *Applied biochemistry and biotechnology*, 118: 155-170.
- Hynes E, Ogier JC, Delacroix-Buchet A** (2001) Proteolysis during Ripening of Miniature Washed Curd Cheeses Manufactured with Different Strains of Starter Bacteria and a *Lactobacillus plantarum* Adjunct Culture. *International Dairy Journal*, 11: 587.
- Idoui T** (2014) Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from gizzard of local poultry. *Iranian Journal of Microbiology*, 6: 120-126.
- Immanue G, Esakkira, P, Jebadhas A, Iyapparaj P, Palavesam A** (2008) Investigation of lipase production by milk isolate *Serratia rubidaea*. *Food Technology and Biotechnology*, 46: 60-65.

- Irlinger F, Yung SA, Sarthou AS, Delbès-Paus C, Montel MC, Coton E, Coton M, Helinck S** (2012) Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 332-338.
- Isaacs S, Aramini J, Ciebin B, Farrar JA, Ahmed R, Middleton D, Chandran AU, Harris LJ, Howes M, Chan E, Pichette AS, Campbell K, Gupta A, Lior LY, Pearce M, Clark C, Rodgers F, Jamieson F, Brophy I, Ellis A** (2005) An international outbreak of salmonellosis associated with raw almonds contaminated with a rare phage type of *Salmonella enteritidis*. *Journal of Food Protection*, 68: 191-198.
- Jackson DW, Simecka JW, Romeo T** (2002) Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 184: 3406-3410.
- Jakovljević DV** (2014) Biohemijske karakteristike izabranih vrsta gljiva u funkciji biodegradacije deterdženta, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Srbija.
- Jana TK, Srivastava AK, Csery K, Arora DK** (2000) Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 28-37.
- Jezdimirović BM** (2005) Veterinarska Farmakologija, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
- Kanki M, Yoda T, Tsukamoto T, Shibata T** (2002) *Klebsiella pneumoniae* produces no histamine: *Raoultella planticola* and *Raoultella ornithinolytica* strains are histamine producers. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3462-3466.
- Karthikeyan V, Karmegam N, Rajasekar CRS, Saravanan M, Sukumar M** (2008) Presence and activity of proteolytic and lipolytic bacteria in raw milk. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology & Environmental Sciences Paper*, 10: 265-268.
- Katić V** (2007) Praktikum iz higijene mleka. Naučna knjiga, Beograd, Srbija.
- Khangholi M, Jamalli A** (2016) The effects of sugars on the biofilm formation of *Escherichia coli* 185pon stainless steel and polyethylene terephthalate surfaces in laboratory model. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9: 401-137.
- Kilian M, Bulow P** (1976) Rapid identification of Enterobacteriaceae. II. Use of a beta-glucuronidase detecting agar medium (PGUA agar) for the identification of *E. coli* in primary

cultures of urine samples. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica* section B, 87: 271-276.

Kongo JM, Gomes AP, Malcata FX (2008) Monitoring and identification of bacteria associated with safety concerns in the manufacture of São Jorge, a Portuguese traditional cheese from raw cow's milk. *Journal of Food Protection*, 71: 986-992.

Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosi S (2003) Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94: 981-987.

Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos EH (2010) Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21: 805–815.

Krasowska A, Karel S (2014) How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Cellular and Infection Microbiology*, 4:1-7.

Krewinkel M, Baur C, Kranz B, Von Neubeck M, Wenning M, Scherer S, Stoeckel M, Hinrichs J, Fischer L (2016) A sensitive and robust method for direct determination of lipolytic activity in natural milk environment. *Food Analytical Methods*, 9: 646-655.

Krnjajić D, Mišić D, Ašanin R (2005) Investigation of sensitivity and resistance to antibiotics and chemotherapeutics in *E. coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions. *Acta Veterinaria*, 55: 501-509.

Kronvall G, Myhre EB (1977) Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica* Series B, 85: 249-254.

Lalošević V, Jarak M, Vidić B, Pašić Š, Mihajlović Ukropina M, Jelesić Z, Kulauzov M, Boboš S (2011) *Mikrobiologija za studente veterinarske medicine*, Mala knjiga, Novi Sad, Srbija.

Laupland KB, Parkins MD, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JD (2008) Population-based laboratory surveillance for *Serratia* species isolates in a large Canadian health region. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 27: 89-95.

Le Minor L, Ben Hamida F (1962) Avantages de la recherche de la β -galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bactériologique. en particulier des *Enterobacteriaceae*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 102: 267-277.

- Leggett JE** (2017) 143-Aminoglycosides. In: Infectious Diseases (Fourth Edition). Vol 2, pp. 1233-1238.
- Li J, McLandsborough LA** (1999) The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle. International Journal Food Microbiology, 53: 185-193.
- Lindow SE, Brandl MT** (2003) Microbiology of the phyllosphere. Applied Environmental Microbiology 2003, 69: 1875-1883.
- Madigan TM, Martinko MJ, Dunlap VP, Clark PD** (2009) Biology of microorganizams, Twelfth edition, Berriman L and Carlson G, eds. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Magnusson KE, Davies J, Grundström T, Kihlström E, Normark S** (1980) Surface charge and hydrophobicity of *Salmonella*, *E. coli*, Gonococci in relation to their tendency to associate with animal cells. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 24: 135-140.
- Mahlen SD** (2011) *Serratia* infections: from military experiments to current practice. Clinical Microbiology Reviews, 24: 755-791.
- Maifreni M, Frigo F, Bartolomeoli I, Innocente N, Biasutti M, Marino M** (2013) Identification of the Enterobacteriaceae in Montasio cheese and assessment of their amino acid decarboxylase activity. Journal of Dairy Research, 80: 122–127.
- Malakar PK, Martens DE, Zwietering MH, Béal C, van 't Riet K** (1999) Modelling the interactions between *Lactobacillus curvatus* and *Enterobacter cloacae*. II. Mixed cultures and shelf life predictions. International Journal of Food Microbiology, 51: 67-79.
- Manafi M, Kneifel W** (1989) A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of coliform groups and *E. coli* in water. Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin, 189: 225-234.
- Manges AR** (2015) Genomic epidemiology: revealing hidden reservoirs *Klebsiella pneumoniae*. Clinical Infectious Diseases, 61: 900-902.
- Marinculić A, Habrun B, Barbić Lj, Beck R** (2009) Biološke opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu, Osijek.ri
- Marino M, Maifreni M, Bartolomeoli I, Rondinini G** (2008) Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. Journal of Applied Microbiology, 105: 540–549.

- Marino M, Maifreni M, Moret S, Rondinini G** (2000) The capacity of Enterobacteriaceae species to produce biogenic amines in cheese. *Letters in Applied Microbiology* 31: 169-173.
- Marriott NG, Gravani RB** (2006). *Principles of food sanitation* (4th ed), Springer-Verlag New York, USA.
- Martins ML, Pinto CLO, Rocha RB, de Araujo EF, Vanetti MCD** (2006) Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 144-148
- Martuscelli M, Gardini F, Torriani S, Mastrocola D, Serio A, Chaves-Lopez C, Schirone M, Suzzi G** (2005) Production of biogenic amines during the ripening of Pecorino Abruzzese cheese. *International Dairy Journal*, 15: 571-578.
- Masiello SN, Martin NH, Trmčić A, Wiedmann M, Boor KJ** (2016) Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 99: 130-140.
- Massa S, Gardini F, Sinigaglia M, Guerzoni ME** (1992) *Klebsiella pneumoniae* as a spoilage organism in Mozzarella cheese. *Journal of Dairy Science*, 75: 1411-1414.
- Melkamsew AT, Pal M, Beda HA** (2012) Bacteriological study on coliform organisms from Ethiopian traditional cheese west showa zone, Ethiopia. *International Journal of Microbiological Research*, 3: 188-191.
- Mendoza-Olazarán S, Camacho-Ortiz A, Martínez-Reséndez MF, Llaca-Díaz J M, Perez-Rodriguez E, Garza-Gonzalez E** (2014) Influence of whole-body washing of critically ill patients with chlorhexidine on *Acinetobacter baumannii* isolates. *American Journal of Infection Control*, 42, 874–878.
- Merčep A, Kirin S, Zdolec N, Cvrtila Fleck Ž, Filipović I, Njari B, Mitak M, Kozačinski L** (2010) Quality of Trappist cheese. *Mljekarstvo*, 60: 288-298.
- Michel V, Hauwuy A, Chamba JF** (2001) La flore microbienne de laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production. *Lait* 81: 575-592.
- Mirkar K, Abhishek R, Satish R** (2016) Effect of environmental factors on biofilm formation. *Indian Journal of Science and Technology*, 5: 53-64.
- Mladenović K, Muruzović M, Čomić Lj** (2018b) *Escherichia coli* identification and isolation from traditional cheese produced in Southeastern Serbia. *Journal of Food Safety*, 38: e12477.

Mladenović K, Muruzović M, Čomić Lj (2018d) The effects of environmental factors on planktonic growth and biofilm formation of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* isolated from traditionally made cheese. *Acta Alimentaria*, 47: 370-378.

Mladenović K, Muruzović M, Vasić S, Čomić Lj (2018c) The simbiotic effect of temperature and sugars on the planktonic growth and biofilm formation of *Klebsiella* spp. isolated from traditionally made cheese. *Romanian Biotechnological Letters*.

Mladenović K, Muruzović M, Žugić Petrović T, Stefanović O, Comić Lj (2018a) Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. *Journal of Food Safety*, 38: 1–9.

Mladenović K, Muruzović M, Žugić-Petrović T, Čomić Lj (2018e) The influence of environmental factors on the planktonic growth and biofilm formation of *Escherichia coli*. *Kragujevac Journal of Science* 40: 205-216.

Montel M, Buchinb S, Mallet A, Delbes-Paus C, Vuittond DA, Desmasures N, Berthier F (2014) Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*, 177: 136-154.

Morais PV, Daporta TM, Bao AF, Campello MG (2009) Enteric fever-like syndrome caused by *Raoultella ornithinolytica* (*Klebsiella ornithinolytica*). *Journal of Clinical Microbiology*, 47: 868-869.

Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC (2000) MICs of mutacin B– Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44: 24-29.

Muñoz MDCC, Benomar N, Lerma LL, Gálvez A, Abriouel H (2014) Antibiotic resistance of *Lactobacillus pentosus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from naturally-fermented Aloreña table olives throughout fermentation process. *International Journal of Food Microbiology*, 172: 110-118.

Muruzović M, Mladenović K, Đilas M, Stefanović O, Comić Lj (2018b) *In vitro* evaluation of antimicrobial potential and ability of biofilm formation of autochthonous *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus* spp. isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia. *Journal of Food Processing and Preservation*.

Muruzović M, Mladenović K, Žugić Petrović T, Comić Lj (2018a) Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian cheese and evaluation of their

antagonistic potential against Enterobacteriaceae. Journal of Food Processing and Preservation.

Muruzović M, Mladenović K, Zugić Petrović T, Comić Lj (2018c) *In vitro* evaluation of the antimicrobial potential of *Streptococcus uberis* isolated from a local cheese from Southeastern Serbia. Veterinarski arhiv, 88: 521-534.

Nandhagopal G, Subashkumar R (2016) Effect of environmental factors on biofilm formation by *Serratia marcescens* isolates. International Journal of Recent Advances in Multidisciplinary Research, 3: 1601-1604.

Nakasone SE, Kaneshiro R, Min K, Tokeshi J (2015) Emergence of *Raoultella ornithinolytica* on O'ahu: A Case of Community-acquired *R. ornithinolytica* Urinary Tract Infection. Hawai'i Journal of Public Health, 74: 174-175.

Nobili G, Franconieri I, Basanisi MG, La Bella G, Tozzoli R, Caprioli A, La Salandra G (2016) Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. Journal of Dairy Science, 99: 7877-7880.

Obradović BD (2007) Biofilmovi- veliki problem prehrambene industrije, Prehrambena industrija, 19: 18-19.

Obuekwe C, Al-Jadi ZK, Al-Saleh E (2009) Hydrocarbon degradation in relation to cell-surface hydrophobicity among bacterial hydrocarbon degraders from petroleum-contaminated Kuwaitdesert environment. International Biodeterioration and Biodegradation, 63: 273-279.

Ocaña V, Nader-Macías ME (2002) Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregation ability. British Journal of Biomedical Science, 59: 183-190.

Ochieng JB, Boisen N, Lindsay B, Santiago A, Ouma C, Ombok M, Fields B, Stine OC, Nataro JP (2014) *Serratia marcescens* is injurious to intestinal epithelial cells. Gut Microbes, 5: 729-736.

Ogbolu DO, Terry Alli AO, Oluremi AS, Olanrewaju AA (2014) Microbial contamination of locally produced cheese and determination of their antimicrobial potential in Nigeria. African Journal of Clinical and Experimental Microbiology, 15: 76-83.

Ombarak RA, Hinenoya A, Awasthi SP, Iguchi A, Shima A, Elbagory AR, Yamasaki S (2016) Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. International Journal of Food Microbiology, 221: 69-76.

O'Toole G, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28: 449-461.

Ottawa, Ontario.

Paczosa KM, Mecsas J (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80: 629-661.

Pan Y, Breidt FJ, Gorski L (2010) Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 1433-1441.

Paneto BR, Schocken-Iturrino RP, Macedo C, Santo E, Marin JM (2007) Occurrence of toxigenic *Escherichia coli* in raw milk cheese in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, 59: 508-512.

Pappas S (2009) Your Body Is a habitat ... for Bacteria. *Science Now Daily News*. (http://cals.arizona.edu/ento/courses/ento310/readings/lect2_Pappas2009.pdf).

Pecić J, Jelesić Z (2005) Porodica Enterobacteriaceae, Medicinska bakteriologija, Grupa autora, Savremena administracija, Beograd, Srbija, pp.233-265.

Podschun R, Ullmann U (1998) "*Klebsiella* spp. as a nonsocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors". *Clinical Microbial Revue*, 11: 489-603.

Prado B, Jara A, Moral AD, Sanchez E (2001) Numerical taxonomy of microorganisms isolated from goat cheese made in Chile. *Current Microbiology*, 43: 396-399.

Prakash M, Rajasekar K, Karmegam N (2007) Bacterial population of raw milk and their proteolytic and lipolytic activities. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3: 848-851.

Pravilnik o kvalitetu sirovog mleka ("Sl. glasnik RS", br. 106/2017)

Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka (Sl. list RS", br. 32/83)

Prunić Z Bojana (2017) Ispitivanje mogućnosti formiranja biofilma u uslovima *in vitro* kod različitih serovarijeteta salmonella vrsta izolovanih iz uzoraka hrane za životinje. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Srbija.

- Pugin B, Barcik W, Westermann P, Heider A, Wawrzyniak M, Hellings P** (2017) A wide diversity of bacteria from the human gut produces and degrades biogenic amines. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 28: 1-9.
- Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, Du X, Liu X, Qiu S, Song H** (2016) Relationship between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology* 2016; 7: 483.
- Rahimi E, Chaleshtori SS, Parsaei P** (2011) Prevalence and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from traditional cheese, ice cream and yoghurt in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5: 3706-3710.
- Rawat S** (2015) Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5: 47-56.
- Reisner A, Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S** (2006) *In vitro* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: impact of environmental and genetic factors. *Journal of Bacteriology*, 188: 3572-3581.
- Repelius C** (1998) Sredstva za koagulaciju proizvedena fermentacijom i njihovo korištenje u proizvodnji sira. *Mljekarstvo*, 48: 253-263.
- Ribeiro SM, Cardoso MH, Cândido ES, Franco OL** (2016) Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiology*, 11: 527-538.
- Rice LB** (2008) Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *Journal of Infectious Diseases*, 197:1079-1081.
- Rice SA, Koh KS, Queck SY, Labbate M, Lam KW, Kjelleberg S** (2005) Biofilm Formation and Sloughing in *Serratia marcescens* Are Controlled by Quorum Sensing and Nutrient Cues. *Journal of Bacteriology*, 187: 3477-3485.
- Rosenberg M, Blumberger Y, Judes H, Bar-Ness R, Rubinstein E, Yardena M** (1986) Cell surface hydrophobicity of pigmented and nonpigmented clinical *Serratia marcescens* strains infection and immunity. *Infection and Immunity*, 51: 932-935.
- Rosenberg M, Gutnick D and Rosenberg E** (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9: 29-33.

- Sable S, Portrait V, Gautier V, Letellier F, Cottenceau G** (1997) Microbiological changes in a soft raw goat's milk cheese during ripening. *Enzyme and Microbial Technology*, 21: 212-220.
- Sanchez S, Demain AL** (2010) Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. *Organic Process Research & Development*, 15: 224-230.
- Sandri IG, Fontana RC, Barfknecht DM, Da Silveira MM** (2011) Clarification of fruit juices by fungal pectinases. *LWT-food Science and Technology*, 44: 2217-2222.
- Saxena S** (2015) Microbial Enzymes and Their Industrial Applications. In: *Applied Microbiology*, Saxena S, eds. Springer India, pp. 121-154.
- Scott VN** (1989) Integration of factors to control microbial spoilage of refrigerated foods. *Journal of Food Protection*, 52: 431-435.
- Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saei Y, Shirvani F, Houri H** (2016) Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9: 306-382.
- Seng P, Boushab BM, Romain F, Gouriet F, Bruder N, Martin C, Paganelli F, Bernit E, Le Treut YP, Thomas P, Papazian L, Raoult D, Stein A** (2016) Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 45: 65-71.
- Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, Gabrani R** (2016) *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121: 309-319.
- Sharpe ME** (1979) Identification of lactic acid bacteria: In: *Identification methods for microbiologists*, Skinner FA & Lovelock DW (Eds). Academic Press, London, pp. 233-259.
- Shimizu K** (2014) Regulation systems of bacteria such as *Escherichia coli* in response to nutrient limitation and environmental stresses. *Metabolites*, 4: 1-35.
- Silva N, Igrejas G, Gonçalves, Poeta P** (2012) Commensal gut bacteria: distribution of *Enterococcus* species and prevalence of *Escherichia coli* phylogenetic groups in animals and humans in Portugal. *Annals of Microbiology*, 62: 449-459.
- Simić Draga** (1988) *Mikrobiologija 1*, Naučna knjiga, Beograd, Srbija.

- Simova ED, Beshkova DB, Dimitrov ZhP** (2009) Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 692-701.
- Simpson BK, Rui X, XiuJie J** (2012) Enzyme-assisted food processing. In: *Green Technologies in Food Production and Processing*. Boye JI, Arcand, Y, eds. Springer USA, pp. 327-361.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA** (1980) Approved lists of bacteria names. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30:225-420.
- Škrinjar M** (1994) Mikrobiološki pregled sira: Metode mikrobiološke kontrole prehrambenih proizvoda. Novi Sad, Serbia.
- Somers EB, Johnson ME, Wong ACL** (2001) Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, 84:1926-1936.
- Spohner SC, Müller H, Quitmann H, Czermak P** (2015) Expression of enzymes for the usage in food and feed industry with *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 202: 118-134
- Stefanović O** (2016) Praktikum iz mikrobiologije sa radnim listovima. Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Srbija.
- Šušковић J, Brkić B, Matošić S** (1997) Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline. *Mljekarstvo*, 47: 57-73.
- Švabić-Vlahović M, Savić B, Ranin L, Đukić S, Berger-Jekić O, Nedeljković M, Stepanović S, Vučković-Opavski N, Vuković D, Kulauzov M, Pecić J, Mihajlović-Ukropina M, Jelesoć Z, Kocić B, Randelović G, Otašević M, Dinić M, Miljković-Selimović B** (2008) *Medicinska bakteriologija, drugo izdanje*, Savremena administracija a.d., Beograd, Srbija.
- Tamime A** (2003), *Brined Cheeses*, Dairy Science and Technology Consultant Ayr, UK Canada.,
- Teh KH, Flint S, Palmer J, Andrewes P, Bremer P, Lindsay D** (2014) Biofilm- An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products. *International Dairy Journal*, 34: 32-40.

- Thompson SA, Maani EV, Lindell AH, King CJ, McArthur JV** (2007) Novel tetracycline resistance determinant isolated from an environmental strain of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 2199-2206.
- Todar K** (2006) *Shigella* and Shigellosis. In *Todar's online textbook of bacteriology*, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
- Todar K** (2007) „Pathogenic *E. coli* “. In *Online Textbook of Bacteriology*, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.
- Tomičić Ružica M, Čabarkapa Ivana S, Vukmirović Đuro M, Lević Jovanka D, Tomičić Zorica M** (2016) Uticaj faktora sredine na formiranje biofilma *Listeria monocytogenes*. *Food and Feed Research*, 43: 19-24.
- Topisirović Lj, Kojić M, Fira Dj, Miladinov N, Strahinić I, Spasojević I** (2000) Savremeni trendovi u mlekarstvu (Zbonik Radova). Beograd, Srbija, pp. 115-120.
- Tormo H, Delacroix-Buchet A, Lopez C, Ali Haimoud Lekhal, Roques C** (2011) Farm management practices and diversity of the dominant bacterial species in raw goat milk. *International Journal of Dairy Science*, 6: 29-43.
- Tornadijo ME, Garcí'a MC, Fresno J M, Carballo JM** (2001) Study of Enterobacteriaceae during the manufacture and ripening of San Simon cheese. *Food Microbiology*, 18: 499-509.
- Trémoulet F, Duché O, Namane A, Martinie B, Labadie JC** (2002) A proteomic study of *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12900 cultivated in biofilm or in planktonic growth mode. *FEMS Microbiology Letters*, 215: 7-14.
- Tresse O, Lebreton V, Benezech T, Faille, C** (2006) Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *Journal of Applied Microbiology*, 101: 53–62.
- Trmčić A, Chauhan K, Kent DJ, Ralyea RD, Martin NH, Boor KJ, Wiedmann M** (2016) Coliform detection in cheese is associated with specific cheese characteristics, but no association was found with pathogen detection. *Journal of Dairy Science*, 99: 6105-6120.
- Troller JA** (1986) Water relations of food borne bacterial pathogens - An update review. *Journal of Food Protection*, 49: 656-70.
- Troller JA, Frazier WC** (1963) Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. II. Causes of inhibition. *Applied Microbiology* 11:183-165.

Tsuji A, Kaneko Y, Takahashi K, Ogawa M, Goto S (1982) The effects of temperature and pH on the growth of eight enteric and nine glucose non-fermenting species of gram-negative rods. *Microbiology and Immunology*, 26: 15-24.

Uddin Md. Aftab, Motazzim-ul-Haque Hasan Md, Noor Rashed (2011) Isolation and Identification of pathogenic *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus* spp. in raw milk samples collected from different areas of Dhaka City, Bangladesh. *Stamford Journal of Microbiology*, 1: 19-23.

Unić-Stojanović D, Palibrk I, Lađević N, Marković D, Stefanović B, Kalezić N (2015) Značaj bakterijske rezistencije i savremene terapijske opcije za rešenje ovog problema. *Bakterijska Rezistencija i Savremene Terapijske Opcije*.

Van Hekken D (2012) Quality aspects of raw milk cheeses. *Food Technology Magazine*, 66: 66-78.

Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W Schraa G, Zehnder AJB (1987) The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*, 53: 1893-1897.

Van Oss CJ (1993) Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 78: 1-49.

Velraeds MM, Mei HC, Reid G, Busscher HJ (1996) Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 1958-1963.

Vestby L, Moretro, T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL (2009) Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5:1- 20.

Vlahović B, Mugoša I, Puškarić A, Užar D (2018) Priručnik „Unapređenje proizvodnje i plasmana sira“.

Vujović B, Rudić Z, Kljujev I, Rajković D, Božić M, Raičević V (2016) Potential of *Pseudomonas aeruginosa* environmental isolates for biofilm formation. *Zaštita materijala*, 57: 449-454.

Vuotto C, Longo F, Pascolini C, Donelli G, Balice MP, Libori MF, Tiracchia V, Salvia A, Varaldo PE (2017) Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123:1003-1018.

Wahyuni AETH, Budiarso TY (2009) Detection of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. from Dairy Cow's Milk in Boyolali and Sleman. Animal production: 74-77.

Whitaker JR (1992) Importance of enzymes to value-added quality of foods. Food Structure, 11: 201-208.

Zago M, Bonvini B, Platero AMM, Mucchetti G, Carminati D, Giraffa G (2007) Characterisation of *Escherichia coli* isolated from raw milk cheeses. Annals of Microbiology, 57: 49-54.

Zajác P, Capla J, Vietoris V, Zubrická S, Curlej J (2015) Effects of storage on the major constituents of raw milk. Potravinarstvo, 9: 375-381.

Zhang XS, Contreras RG, Wood KT (2007) YcfR (BhsA) influences *Escherichia coli* biofilm formation through stress response and surface hydrophobicity. Journal of Bacteriology, 189: 3051-306

Водич за примену микробиолошких критеријума за храну („Sl. glasnik RS“, br. 73/2010).

Извори слика:

Приручник „Унапређење производње и пласмана сира“- модификовано, према Пољопривредни факултет, Катедра за технологију анималних производа

Culligan EP, Hill C, Sleator RD (2009) Probiotics and gastrointestinal disease: successes, problems and future prospects. Gut Pathogens, 19:1-12.

10. Прилози

Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics

Katarina G. Mladenović¹  | Mirjana Ž. Muruzović¹ | Tanja Žugić Petrović² |
Olgica D. Stefanović¹ | Ljiljana R. Čomić¹

¹Department of Biology and Ecology,
Faculty of Science, University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, Kragujevac, 34000,
Republic of Serbia

²College of Agriculture and Food
Technology, Cirila i Metodija 1, Prokuplje,
18400, Republic of Serbia

Correspondence Katarina G. Mladenović,
Faculty of Science, Department of Biology
and Ecology, University of Kragujevac,
Radoja Domanovića 12, Kragujevac, 34000,
Republic of Serbia.
Email: katarinamladenovic90@gmail.com

Funding information
Ministry of Education of Science and
Technological Development. Grant No.
41010

Abstract

In this paper, the presence of enterobacteria in autochthonous cheese from Southeast Serbia (Sokobanja), made in the traditional way, was investigated. The samples from different households, was taken during the summer and the autumn. Chemical and physical characteristics of samples (water content, fat content, acidity, pH, and sodium chloride content) were examined. In the analyzed samples of cheese, four different genera of family Enterobacteriaceae (*Klebsiella* [65%], *Escherichia* [20%], *Serratia* [10%], and *Enterobacter* [5%]) were identified. The members of genus *Klebsiella* were *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Klebsiella ornithinolytica*, while in the genus *Escherichia* only one species, *Escherichia coli* was identified. Besides, two species of the genus *Serratia*, *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* biogp 1, and one species of the genus *Enterobacter*, *Enterobacter gergoviae*, were identified. Biochemical characteristics, proteolytic and lipolytic activity, sensitivity to streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline were, also, determined. According to the rapid latex agglutination test, of the four *E. coli* isolates, two isolates belong to serotype *E. coli* O157.

Practical applications

The results of this study contribute to better understanding of unexplored microflora of cheese from Sokobanja. The isolated genera were *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., and *Serratia* sp. with twenty identified species. It is well known that bacteria from family Enterobacteriaceae could affect organoleptic properties of cheese. Bacteria isolated from cheese from Sokobanja mostly did not manifest proteolytic and lipolytic activity. The most number of isolates were susceptible to tested antibiotics. Further researches may contribute to better understanding of interaction between enterobacteria and lactic acid bacteria in autochthonous cheeses.

1 | INTRODUCTION

Cheeses are generally produced by processing milk, whether pasteurized or unpasteurized, skimmed or whey, following the adequate procedure (Skrinjar, 1994). Cheese is an excellent source of protein, fat, minerals (calcium, iron, phosphorus), vitamins, and amino acids. There are various traditional methods of producing cheese typical for specific regions (Güven, Coskun, & Ozer, 2008). Autochthonous cheese is a product which has been traditionally produced in a certain area for a long period of time. The authenticity of autochthonous cheese, as a quality which makes it distinct from similar types of cheeses, is due to the indigenous microflora, which present by

heterogeneous species of lactic acid bacteria (Savić, Arsić, & Kljajić, 2011).

On account of geographical, climatic, and vegetational diversities, the production of autochthonous cheese has been developed in Serbia. Mountain areas are known for their traditional way of making cheese (Ostojić & Topisirović, 2006). Southeastern region of Serbia is one of the areas known for the traditional way of producing dairy products. In this region, inhabitants produce one type of cheese made from unpasteurized cow's milk. During the summer, for the fermentation of milk, cheese producers use a commercially available starters, while in the winter, they use natural starters obtained from ruminants (enzymes present in the dried rumen of ruminants). Due to the specific method

Escherichia coli identification and isolation from traditional cheese produced in Southeastern Serbia

Katarina G. Mladenović¹  | Mirjana Ž. Muruzović¹ | Tanja Žugić Petrović² | Ljiljana R. Čomić¹

¹Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Kragujevac, Republic of Serbia

²College of Agriculture and Food Technology, Prokuplje, Republic of Serbia

Correspondence

Katarina G. Mladenović, Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia.
Email: katarinamladenovic90@gmail.com

Funding information

Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant/Award Number: 41010

Abstract

In this paper, we investigated the presence of enterobacteria in cheese from Southeastern Serbia which was produced in a traditional way. The samples from different households were collected in spring. Chemical and physical characteristics of samples (water content, fat content, acidity, pH, and sodium chloride content) were examined. In the analyzed samples of cheese, we found one genus of family Enterobacteriaceae, *Escherichia* sp. The genus *Escherichia* sp. includes only one species, *Escherichia coli*. We also determined biochemical characteristics, proteolytic and lipolytic activities, the ability to form a biofilm, sensitivity to streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline. According to the rapid latex agglutination test, two isolates belong to serotype *E. coli* O157.

Practical applications

These results contribute to a better understanding of the presence of enterobacteria in unexplored microbiota of cheese from Sokobanja. *E. coli* is the only member of enterobacteria that appears in the samples collected in spring. Since *E. coli* is among the indicators of contamination, it does not demonstrate the ability to change the organoleptic properties of cheese. *E. coli* does not exhibit lipolytic or proteolytic activity, but it demonstrates sensitivity to antibiotics. The bacteria showed no ability to form biofilm. Further research should focus on finding the sources of contamination, as well as on the interaction of *E. coli* with other members of the cheese microbiota.

1 | INTRODUCTION

Cheese is an excellent source of protein, fat, minerals (calcium, iron, phosphorus), vitamins, and amino acids. There are various traditional cheese-producing methods typical of certain regions (Guven, Coskun, & Ozer, 2008). Most bacteria (pathogenic or non-pathogenic) may grow and multiply in milk and milk products. This leads to changing the quality of products or their contamination (Asamenew, Mahendra, & Addisalem, 2012). The complexity of biochemical composition of milk and milk products, containing higher percentage of water, serves as an excellent medium for growing many types of microorganisms (Soomro, Arain, Khaskheli, & Bhutto, 2002). Cheese is generally considered to be safe and nutritious product. However, many diseases, in many countries are associated with the consumption of cheese (Choi, Lee, Lee, Kim, & Yoon, 2016). Cheese contamination may occur during production (Temelli, Anar, Sen, & Akyuva, 2006), during storage (Brito et al., 2008) or through human contact (Callon, Gilbert, Cremoux, & Montel, 2008).

Escherichia coli is among main indicators of food contamination since it may represent a risk to health (Okura, Rigobelo, & Ávila, 2010). *E. coli*, facultatively anaerobic gram-negative bacteria, is most commonly found in the intestinal microbiota of humans and animals, and certain strains are pathogenic (Olsvik, Wasteson, Lund, & Hornes, 1991). The aim of one of the many studies was the evaluation of the bacteriological quality and safety of traditional white cheese made from raw milk, as well as the research on possible sources of cheese contamination in Tanti, Egypt (Heikal, Khater, & Al-Wakeel, 2014). In milk and milk products (Dahi, Ice cream, Gulabjamun, Burphy, Khoa, and Butter) *E. coli* and *Staphylococcus* sp. were found in and around Pantnagar (India). Due to poor hygiene while processing milk products, these bacteria may cause problems (Kumar & Prasad, 2010). Various metabolic activities of Enterobacteriaceae found in dairy products could affect the sensory quality of the cheese. *E. coli*, *Kluyvera* sp., *Salmonella enterica* sp. *arizonae*, and *Serratia odorifera* were discovered in Pecorino cheese (Italy) (Chavez et al., 2006). *E. coli* was also detected during the production of Minas cheese (Brazil), which can be

Preliminary communication

THE EFFECTS OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON PLANKTONIC GROWTH AND BIOFILM FORMATION OF *SERRATIA ODORIFERA* AND *SERRATIA MARCESCENS* ISOLATED FROM TRADITIONALLY MADE CHEESE

K.G. MLADENović*, M.Ž. MURUZOVIĆ and L.R. ČOMIĆ

Department of Biology and Ecology, Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12,
34000 Kragujevac, Republic of Serbia

(Received: 23 August 2017; accepted: 15 November 2017)

In this study, the effects of different temperature, pH, salt and glucose concentrations on the planktonic growth, biofilm formation, and formed biofilm of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens*, isolated from traditionally made cheese, were investigated using spectrophotometric method. The investigated strains demonstrated best planktonic growth and biofilm formation in Tryptic soy broth. The limiting factors for the planktonic growth and biofilm formation were temperature below 4 °C and salt concentration above 4%. Temperature of 37 °C and 44 °C, as well as various concentrations of glucose, stimulated the planktonic growth of bacteria. Moderate influence on biofilm formation was demonstrated at 37 °C as well as at various concentrations of glucose. These results were in accordance with the origin of bacteria, since the isolates were obtained from cheese.

Keywords: biofilm formation, environmental factors, planktonic growth, *Serratia*

Bacteria from the *Enterobacteriaceae* family may affect the quality of food (usually milk and cheese) by their metabolism, and they might propagate during maturity process (CHAVES-LOPEZ et al., 2005). The ability of enterobacteria (*Enterobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Citrobacter*, and *Klebsiella*), isolated from cheese, to produce acid and biogenic amines was examined by a few researchers. MARINO and co-workers (2000) found a positive correlation between the concentration of cadaverine and the number of enterobacteria.

Serratia marcescens is Gram-negative bacterium, which is able to populate a wide variety of ecological niches (GRIMONT et al., 1977). According to AUCKEN and PITT (1998), it is an opportunistic human pathogen responsible for many infections and resistant to antibiotics. *Serratia odorifera* was identified in a local Italian cheese (CHAVES-LOPEZ et al., 2005).

Environmental factors (temperature, sugar, salt, pH, and nutrients) present in foods and food-processing environments play significant role in adhesion and biofilm formation (MIRKAR et al., 2016). According to KHANGHOLI and JAMALLI (2016), one way of bacterial adaptation to the environmental conditions is the ability to form biofilm. The capability of *S. marcescens* to cause infections and survive in the environment is attributed to its ability to form biofilm (KALIVODA et al., 2010). Bacteria regulate gene expression in response to different environmental signals, such as temperature, oxygen and carbon dioxide concentrations, pH, and nutrient availability (HARJAI et al., 2005).

* To whom correspondence should be addressed.

Phone: +34 336 223; fax: +34 335 040; e-mail: katarinamladenovic90@gmail.com

The simbiotic effect of temperature and sugars on the planktonic growth and biofilm formation of *Klebsiella* spp. isolated from traditionally made cheese

Received for publication, September, 2, 2017

Accepted, November, 11, 2017

KATARINA G. MLADENović*, MIRJANA Ž. MURUZović, SAVA M. VASIĆ, LJILJANA R. ČOMIĆ

University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

**corresponding author: katarinamladenovic90@gmail.com*

Abstract

*In this paper, we investigated the influence of temperatures (4°C, 37°C, 44°C) and different concentrations of glucose and lactose (0.5%, 1.5%, 2.5%, 3.5%) on the planktonic growth, biofilm formation and formed biofilm of *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ornithinolytica* and *Klebsiella pneumonia* in two different broths (TSB and MH). The bacteria were isolated from the cheese produced in Southeastern Serbia. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 was used as a positive control. The planktonic growth and biofilm formation were measured using spectrophotometric method. Different broths caused a different planktonic growth and biofilm formation. At 4°C, the planktonic growth was not observed, neither was the formation of biofilm. Temperatures of 37°C and 44°C, as well as various concentrations of glucose and lactose, stimulated the planktonic growth of bacteria. The biofilm formation was less affected by glucose, but lactose stimulated the biofilm formation. The results of these were in accordance with the origin of bacteria, since the isolates were obtained from cheese. The intensity of the effect of sugars on the planktonic growth and biofilm formation depended on the type of bacteria.*

Keywords: *Klebsiella*, planktonic growth, biofilm, temperature, glucose, lactose

THE INFLUENCE OF ENVIRONMENTAL FACTORS ON THE PLANKTONIC GROWTH AND BIOFILM FORMATION OF *Escherichia coli*

Katarina G. Mladenović^{1*}, Mirjana Ž. Muruzović¹,
Tanja D. Žugić-Petrović², Ljiljana R. Čomić¹

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology,
Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

²College of Agriculture and Food Technology, Ćirila and Metodija 1,
18400 Prokuplje, Republic of Serbia

*Corresponding author; E-mail: katarinamladenovic90@gmail.com

(Received January 8, 2018; Accepted May 17, 2018)

ABSTRACT. In this study, the effects of environmental factors (different media, temperature, pH, salt and sugar concentrations) on the planktonic growth, biofilm formation and formed biofilm of *Escherichia coli* KGPMF 16 and *Escherichia coli* KGPMF 17 were investigated. Tested bacteria were isolated from traditionally made cheese produced in Southeastern Serbia (Sokobanja region). The influence on planktonic growth, biofilm formation and formed biofilm was determined using spectrophotometric method. The limiting factors for the planktonic growth and biofilm formation were temperature of 4 °C and all tested concentrations of salt. The growth of tested bacteria was higher in media enriched with lactose than in media containing glucose. TSB was more congenial media to the planktonic growth of bacteria than MHB broth. None of the tested bacteria demonstrated the ability to form biofilm at 4 °C and 44 °C. Only *E. coli* KGPMF 17 showed ability to form biofilm in TSB at 37 °C. Different concentrations of salt, glucose and lactose exhibited inhibitory effect on biofilm formation, but all tested concentrations of lactose showed stimulating effect on formed biofilm of *E. coli* KGPMF 17. These results contribute to better understanding of the effects of environmental factors on the development of *E. coli* in cheese.

Keywords: biofilm formation, *E. coli*, planktonic growth, traditionally made cheese.

INTRODUCTION

Escherichia coli is one of the members of the microbiota of the intestinal flora. With other bacteria, they contribute 0.1% to the total flora (ECKBURG *et al.*, 2005). *E. coli* possesses the ability to survive outside the host for a certain time which makes it an important indicator of environmental condition (FENG *et al.*, 2002). ISHII and SADOWSKY (2008) confirmed that resistant *E. coli* may survive very long outside the host.

Environmental factors, such as concentration of nutrients, osmotic pressure, temperature, etc., affect bacteria in their environment (BRENHORVD *et al.*, 1992; BOUCHER *et*



Биографија са библиографијом

Катарина Г. Младеновић је рођена 18. 08. 1990. године у Крагујевцу. Основну школу је завршила 2005. године у Крагујевцу, а Средњу медицинску школу 2009. године, такође у Крагујевцу. Дипломске академске студије Биологије уписала је на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу 2009/2010. године, а дипломирала 2011/2012. године, чиме је стекла звање дипломирани биолог, постигавши просечну оцену током студија 9,07. Исте године уписује мастер академске студије на ПМФ-у у Крагујевцу, након којих је стекла звање дипломирани биолог-мастер еколог постигавши просечну оцену 9,68. Докторске академске студије биологије уписује 2014/2015. године на истом Факултету и положи све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 9,83. 2016. године, Катарина Младеновић постаје стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (број уговора 451-03- 01398/2016-14/ев. број 1953).

На Научно-Наставном већу, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, одржаном 22.11.2017. донета је одлука (Број одлуке: 870/XI-2) о оцени научне заснованости докторске дисертације под насловом „**Карактеризација Enterobacteriaceae пореклом из аутохтоног сира Србије са посебним освртом на врсте из родова *Klebsiella* и *Serratia***“, где се утврђује испуњеност свих услова и према одлуци Већа за природно-математичке науке, Универзитета у Крагујевцу, 13.12. 2017. дата је сагласност о научној заснованости теме (Број одлуке: IV-01-1124/9). Катарина Г. Младеновић је изабрана у звање **истраживач - сарадник** за ужу научну област Биологија у Институту за биологију и екологију, Природно - математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, 31.01.2018. године (одлука Наставно-Научног већа Факултета бр. 70/ VIII-3). Као истраживач-сарадник је запослена на пројекту ИИИ 41010 „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ - руководилац доц. др Снежана Марковић.

Познаје рад на рачунару у OS Microsoft Windows и MS Office програму, програмском пакету IBM SPSS и у интернет програмима. Поседује знање енглеског језика.

НАУЧНО ИСТРАЖИВАЧКИ РАД

Катарина Г. Младеновић се, од 2014. године, успешно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за микробиологију, Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу. У току свог научно-истраживачког рада стекла је знања и вештине у области Микробиологије. Бави се испитивањем биохемијских и физиолошких карактеристика бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae*, изолованих из аутохтоног сира из околине Сокобање. Истраживања су проширена у испитивању њихове осетљивости на антибиотике, способности формирања биофилма, утицаја еколошких фактора на њихов планктонски раст и биофилм. Такође је испитивана хидрофобност и адхезија за епител црева, као један од битних карактеристика за потенцијалну патогеност бактерија. Резултати научно-истраживачког рада кандидата Катарине Младеновић публиковани су у виду 36 библиографских јединица: 14 радова у научним часописима са SCI листе (M21a- 1 рад, M21- 1 рад, M22 - 4 рада, M23 - 8 радова), 5 радова у националним часописима (M51-3 рад, M52 - 2 рад), 4 саопштења на међународним скуповима штампана у целини (M33 - 4), 6 саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34 - 6), 7 саопштења на домаћим научним скуповима штампана у изводу (M64-7).

Резултати докторске дисертације публиковани су у виду 7 библиографских јединица, и то 4 рада у научним часописима са SCI листе (M22 - 2 рада) (M23 - 2 рада), 1 рад у врхунском часопису националног значаја (M51 - 1), два саопштења са скупа националног значаја штампано у изводу (M64 - 2).

Публикације 3.1., 3.2., 4.1., 4.2., 5.1., 9.1., 9.4. су везане за докторску дисертацију.

1. Рад у међународном часопису изузетних вредности (категорија M21a)

1.1 Muruzović M, **Mladenović K**, Stefanović O, Vasić S, Čomić Lj. 2016. Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities. *Journal of Food and Drug Analysis*, 24 (3): 539–547. DOI: 10.1016/j.jfda.2016.02.007

ISSN:1021-9498

ИФ 2018: 4,176

2. Рад у врхунском међународном часопису (категорија M21)

2.1. Muruzović M, **Mladenović K**, Čomić Lj. 2018. *In vitro* evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia. Food Bioscience, 23: 54-59. DOI: 10.1016/j.fbio.2018.03.005

ISSN:2212-4292

ИФ₂₀₁₈: 3,220

3. Рад у истакнутом међународном часопису (категорија M22)

3.1. **Mladenović K**, Muruzović M, Žugić Petrović T, Stefanović O, Čomić Lj. 2018. Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. Journal of Food Safety, 38 (1): 1–9. DOI: 10.1111/jfs.12387

ISSN: 0149-6085

ИФ₂₀₁₈: 1,665

3.2. **Mladenović K**, Muruzović M, Čomić Lj. 2018. 2018. *Escherichia coli* identification and isolation from traditional cheese produced in Southeastern Serbia. Journal of Food Safety, DOI:10.1111/jfs.12477

ISSN: 0149-6085

ИФ₂₀₁₈: 1,665

3.3. Muruzović M, **Mladenović K**, Žugić Petrović T, Čomić Lj. 2018. Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian cheese and evaluation of their antagonistic potential against Enterobacteriaceae. Journal of Food Processing and Preservation, 42(4): 1-9. DOI: 10.1111/jfpp.13577

ISSN: 0145-8892

ИФ₂₀₁₇: 1,510

3.4. Muruzović M, **Mladenović K**, Đilas M, Stefanović O, Čomić Lj. 2018. *In vitro* evaluation of antimicrobial potential and ability of biofilm formation of autochthonous *Lactobacillus* spp. and *Lactococcus* spp. isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia. Journal of Food Processing and Preservation, 42(11): 1-10. DOI: 10.1111/jfpp.13776

ISSN: 0145-8892

ИФ₂₀₁₇: 1,510

4. Рад у међународном часопису (категорија M23)

4.1. **Mladenović K**, Muruzović M, Stefanović O, Vasić S, Čomić Lj. 2016. Antimicrobial, antioxidant and antibiofilm activity of extracts of *Melilotus officinalis* (L.) Pall. Journal of Animal and Plant Science, 26 (5): 1436–1444.

ISSN: 1018-7081

ИФ₂₀₁₈: 0,529

4.2. **Mladenović K**, Muruzović M, Stefanović O, Žugić Petrović T, Čomić Lj. 2018. Effects of some potassium preservatives on physiological activities of selected food borne bacteria. Acta Alimentaria, 47 (2), pp. 171–180. DOI: 10.1556/066.2018.47.2.5

ISSN: 0139-3006

ИФ₂₀₁₈: 0,547

4.3. **Mladenović K**, Muruzović M, Čomić Lj. 2018. The effects of environmental factors on planktonic growth and biofilm formation of *Serratia odorifera* and *Serratia marcescens* isolated from traditionally made cheese. Acta Alimentaria, 47(3):370-378. DOI: 10.1556/066.2018.47.3.13

ISSN: 0139-3006

ИФ₂₀₁₈: 0,547

4.4. **Mladenović K**, Muruzović M, Vasić S, Čomić Lj. 2019. The simbiotic effect of temperature and sugars on the planktonic growth and biofilm formation of *Klebsiella* spp. isolated from traditionally made cheese. Romanian Biotechnological Letters, 3: 1-12 DOI: 10.26327/RBL2017.132

ISSN: 1224-5984

ИФ₂₀₁₈: 0,590

4.5. Žugić Petrović T, Ilić P, Muruzović M, **Mladenović K**, Stanisavljević D, Čomić Lj. 2019. Dry-fermented sausage as probiotic carrier food. Fleischwirtschaft, 99(2): 100-103.

ISSN: 0015-363X

ИФ₂₀₁₈: 0,172

4.6. Muruzović M, **Mladenović K**, Zugić Petrović T, Čomić Lj. 2018. *In vitro* evaluation of the antimicrobial potential of *Streptococcus uberis* isolated from a local cheese from Southeastern Serbia. Veterinarski arhiv, 88 (4): 521-534. DOI: 10.24099/vet.arhiv.0007

ISSN: 0372-5480

ИФ₂₀₁₈: 0,426

4.7. Raković I, Radojević I, **Mladenović K**, Popovska-Jovicić B, Petrović S, Čanović P, Čomić Lj, Čanović P, Bogojeski J. 2018. Antimicrobial, antioxidant and DNA-binding studies of palladium (II) complexes with different chelate ligands containing nitrogen donor atoms. Journal of the Serbian Chemical Society, 83:71-71. DOI: 10.2298/JSC180507071R

ISSN:0352-5139

ИФ₂₀₁₈: 0,797

4.8. Grujović M, **Mladenović K**, Žugić Petrović T, Čomić Lj. 2019. Rating of antagonistic potential and ability of biofilm formation of *Enterococcus* spp. isolated from Serbian cheese. Veterinarski arhiv, in press.

ISSN: 0372-5480

ИФ₂₀₁₈: 0,426

5. Рад у врхунском часопису националног значаја (категорија M51)

5.1. **Mladenović K**, Muruzović M, Žugić Petrović T, Čomić Lj. 2018. The influence of environmental factors on the planktonic growth and biofilm formation of *Escherichia coli*. Kragujevac Journal of Science, 40: 205-216. DOI: 10.5937/kgjsci1840205m

ISSN: 1450-9636

5.2. Grujović M, **Mladenović K**, Čomić Lj, Glišović, A. 2019. *In vitro* evaluation of antimicrobial and antibiofilm activity of *Oleum Hyperici*: An original product from Goč Mountain (Serbia). Kragujevac Journal of Science, 41: 97-106.

ISSN: 1450-9636

5.3. Žugić-Petrović T, Stanisavljević D, Ilić P, **Mladenović K**, Muruzović M, Kocić-Tanackov S, Čomić Lj. 2018. Effect of water activity on the radial growth of fungi isolated from dry-cured sheep ham, *in vitro* (Serbia). Matica Srpska Journal for Natural Sciences, 134: 65-75. DOI: 10.2298/ZMSPN1834065Z

ISSN: 0352-4906

6. Рад у часопису часопису националног значаја (категорија M52)

6.1. Žugić-Petrović T, Muruzović M, **Mladenović K**, Ilić P, Kocić Tanackov S, Čomić Lj. 2016. Karakterizacija koagulaza negativnih stafilocoka izolovanih iz suvog mesa ovčijeg trupa-Sjenička ovčija stelja. Veterinarski žurnal Republike Srpske, 16 (1): 26–38. DOI: 10.7251/VETJ1601026Z

ISSN: 1840-2887

6.2. Muruzović M, **Mladenović K**, Stefanović O, Žugić-Petrović T, Čomić Lj. 2017. *In vitro* interaction between *Agrimonia eupatoria* L. extracts and antibiotic. Kragujevac Journal of Science, 39: 169-176. DOI: 10.5937/kgjsci1739157m

ISSN: 1450-9636

7.2. Саопштења на међународним конференцијама штампани у целини (категорија М33)

7.1. Ilić P, Šošević D, Žugic-Petrović T, **Mladenovic K**, Grujović M, Čomić Lj. 2017. Characterization and antibiotic sensitivity of coagulase-negative staphylococci from Zlatibor prosciutto. XXII Conference about Biotechnology with international participation, Čačak, Serbia, Conference Proceeding, Vol. 2, p. 667–672.

ISBN: 978-86-87611-48-1

7.2. Žugic-Petrović T, Ilić P, Muruzović M, **Mladenović K**, Čomić Lj. 2018. Autochthone microbiota from dry-cured sheep ham. XXIII Conference about Biotechnology with international participation, Čačak, Serbia, Conference Proceeding, p. 536–543.

ISBN: 978-86-87611-48-1

7.3. Žugić Petrović T, Stanisavljević D, Ilić P, **Mladenović K**, Muruzović M, Čomić Lj. 2018. Effect of different packaging conditions on shelf–life of ham. XXII International Eco – conference, X Eco – conference on Safe food, Novi Sad, Serbia p. 181–188.

7.4. Žugic-Petrović T, Muruzović M, **Mladenović K**, Stanisavljević D, Kocić Tanackov S, Čomić Lj. 2019. Antifungalni efekat etarskog ulja bosiljka i crnog kima na rast plesni *Penicillium corylophilum* na ovčijoj stelji. XXIV Conference about Biotechnology with international participation, Čačak, Serbia, Conference Proceeding, p. 536–543.

ISBN: 978-86-87611-48-1

8. Саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (категорија М34)

8.1. **Mladenović K**, Muruzović M, Stefanović O, Čomić Lj, Žugić-Petrović T. 2016. *In vitro* determination of antioxidant and antimicrobial activity of extracts of *Agrimonia eupatoria* L. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia, Book of abstracts, p. 116. ISBN: 978-86-6275-055-61

8.2. Muruzović M, **Mladenović K**, Stefanović O, Čomić Lj, Žugić-Petrović T. 2016. Interaction between *Agrimonia eupatoria* L. extracts and antibiotic and antibiofilm activity of two extracts. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia, Book of abstracts, p. 117. ISBN: 978-86-6275-055-61

8.3. Žugić-Petrović T, Ilić P, Muruzović M, **Mladenović K**, Stanisavljević D, Čomić Lj. 2016. Antimicrobial activity of rakija travarica “Sante“. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia, Book of abstracts, p. 118. ISBN: 978-86-6275-055-61

8.4. Žugić-Petrović T, **Mladenović K**, Muruzović M, Čomić Lj. 2017. Probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from Sokobanja sausage. International symposium of animal science (ISAS), Herceg Novi, Montenegro, Book of abstracts, p. 30. ISBN: 978-86-7520-402-2

8.5. Žugić-Petrović T, Stanisavljević D, Ilić P, **Mladenović K**, Muruzović M, Kocić Tanackov S, Čomić Lj. 2017. Effect of water activity on the radial growth of fungi isolated from dry-cured sheep ham, *in vitro*. The 6th international scientific meeting mycology, mycotoxicology and mycoses, Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, p. 64. ISBN: 978-86-7946-194-0

8.6. Radojević I, **Mladenović K**, Muruzović M, Popadić M, Čomić Lj. 2017. Antifungal activity of the Serbia and Montenegro autochthonous wines and evaluation of total phenolic, flavonoid and proanthocyanidin contents. The 6th international scientific meeting mycology, mycotoxicology, and mycoses, Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, p. 551. ISBN: 978-86-7946-194-0

9. Саопштења на домаћим научним скуповима штампана у изводу (категорија М64)

9.1. **Mladenović K**, Muruzović M, Žugić-Petrović T, Stefanović O, Čomić Lj. 2017. Isolation and identification of autochthonous Sokobanja's cheese microbiota. XI Kongres mikrobiologa Srbije - MIKROMED 2017, Beograd, Srbija, Knjiga apstrakata, p. 203. ISBN: 978-86-914897-1-7

9.2. Stefanović O, **Mladenović K**, Grujović M, Ličina B, Radojević I, Čomić Lj. 2015. Biljni ekstrakti: potencijalni prirodni antibakterijski agensi. X Kongres mikrobiologa Srbije - MIKROMED 2015, Beograd, Srbija. Knjiga apstrakata, p. 188–189. ISBN: 978-86-914897-1-7

9.3. Stefanović O, Mladenović D, Ivanović D, **Mladenović K**, Muruzović M, Čomić Lj. 2017. *Escherichia coli*: *in vitro* ability of biofilm formation and inhibitory activity of sage extracts. XI Kongres mikrobiologa Srbije - MIKROMED 2017, Beograd, Srbija. Knjiga apstrakata, p. 128–129. ISBN: 978-86-914897-1-7

9.4. **Mladenović K**, Muruzović M, Žugić-Petrović T, Čomić Lj. 2018. Ispitivanje uticaja ekoloških faktora na planktonski rast i formiranje biofilma *Klebsiella* spp. izolovanih iz Sokobanjskog sira. II Kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga apstrakata, p. 247. ISBN: 978-86-81413-08-1

- 9.5. Muruzović M, **Mladenović K**, Žugić-Petrović T, Čomić Lj. 2018. Izolacija, identifikacija i evaluacija probiotskog potencijala enterokoka izolovanih iz Sokobanjskog sira. II Kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga apstrakata, p. 250. ISBN: 978-86-81413-08-1
- 9.6. Žugić-Petrović T, Ilić P, Muruzović M, **Mladenović K**, Čomić Lj. 2018. Izolacija i karakterizacija *Lactobacillus curvatus* sojeva iz fermentisane tradicionalne kobasice kao potencijalnih startera u mesnoj industriji. II Kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga apstrakata, p. 253. ISBN: 978-86-81413-08-1
- 9.7. Žugić-Petrović T, Ilić P, Muruzović M, **Mladenović K**, Kocić Tanackov S, Čomić Lj. 2018. Kvalitet i autohtona mikrobiota sjeničke ovčije stelje. II Kongres biologa Srbije, Kladovo, Srbija, Knjiga apstrakata, p. 254. ISBN: 978-86-81413-08-1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____ Катарина Младеновић _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Карактеризација Enterobacteriaceae пореклом из аутохтоног сира Србије са посебним освртом на врсте из родова *Klebsiella* и *Serratia*“

која је одбрањена на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу _____ 23.08.2019. _____ године

K. Mladenovic

Потпис аутора

Образац 2

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Катарина Младеновић,



дозвољавам



не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

„Карактеризација Enterobacteriaceae пореклом из аутохтоног сира Србије са посебним освртом на врсте из родова *Klebsiella* и *Serratia*“

која је одбрањена на Природно-математичком факултету

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође



дозвољавам



не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од Creative Commons лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу 23.08.2019. године

K. Mladenovic

Потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>