



**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ИНСТИТУТ ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ**

МИРЈАНА Ж. ГРУЈОВИЋ

**ФИЗИОЛОШКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА БАКТЕРИЈА МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ
ИЗОЛОВАНИХ ИЗ АУТОХТОНОГ СИРА ЈУГОИСТОЧНЕ СРБИЈЕ И
ЕВАЛУАЦИЈА ЊИХОВИХ БИОТИЧКИХ ПОТЕНЦИЈАЛА**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: Професор др Љиљана Р. Чомић

Крагујевац, 2019.

I Аутор

Име и презиме: **Мирјана Грујовић**

Датум и место рођења: **18.01.1990. године, Крагујевац, Србија**

Садашње запослење: **истраживач-сарадник на пројекту ИИИ 41010, Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу**

II Докторска дисертација

Наслов: **Физиолошка карактеризација бактерија млечне киселине изолованих из аутохтоног сира југоисточне Србије и евалуација њихових биотичких потенцијала**

Број страница: 212, Број слика: 19, Број табела: 29, Број графика: 10

Број библиографских података: 326

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

Научна област (УКД): **Биологија – Микробиологија (Микробиологија хране)**

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

III Оцена и одбрана

Датум пријаве теме: 28.08.2017. године

Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: 870/XI-3 од 22.11.2017. године; IV-01-1124/8 од 13.12.2017. године

Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 630/XIX-3 од 30.08.2017. године; IV-01-827/13 од 18.10.2017. године

1. **др Љиљана Чомић**, редовни професор, Природно-математички факултет у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија

2. **др Олгица Стефановић**, доцент, Природно-математички факултет 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, Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, ужа научна област: Прехрамбено инжењерство (председник комисије);

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 желим да се захвалим свом ментору,
проф. др Љиљани Чомић, на указаној прилици, стрпљењу, саветима и
неизмерној подршци током израде ове докторске дисертације.*

*Захваљујем се члановима Комисије,
др Сунчици Коцић - Танацков, др Олгици Стефановић и др Ивани Радојевић
на уложеном труду и корисним саветима и сугестијама приликом израде и
писања докторске дисертације.*

*Највећу и посебну захвалност дугујем члановима своје породице,
нарочито оцу, мајци, брату и Сузи,
као и свим пријатељима, а посебно Каћи, Зоки, Мирку и Ђупи,
мом Ненаду,
на њиховој безусловној љубави, стрпљењу,
и подршци коју су ми пружили
и што су увек веровали у мене.*

Марку.....

*Захвалност дугујем и Министарству просвете, науке и технолошког развоја
Републике Србије на стипендирању током прве две године докторских студија.*

Мирјана Грујовић

САДРЖАЈ

ИЗВОД.....	I
SUMMARY.....	IV
ЛИСТА СЛИКА.....	VI
ЛИСТА ТАБЕЛА.....	VIII
ЛИСТА ГРАФИКА.....	X
1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	4
2.1. Основне карактеристике родова бактерија млечне киселине.....	5
2.2. Значај природних изолата.....	12
2.3. Пробиотици, пребиотици и симбиотици.....	14
2.4. Фактори који утичу на активност пробиотика.....	18
2.5. Бактерије млечне киселине као пробиотици.....	19
2.6. Метаболички продукти бактерија млечне киселине и њихова антимикробна активност.....	23
3. ЦИЉЕВИ РАДА.....	28
4. МАТЕРИЈАЛ.....	30
4.1. Сокобањски сир.....	31
4.2. Микробиолошке подлоге.....	32
4.3. Раствори и реагенси.....	36
5. МЕТОДЕ.....	39
5.1. Узорковање сира.....	40
5.2. Испитивање хемијских карактеристика сира.....	40
5.2.1. Одређивање количине воде у сиру.....	40
5.2.2. Одређивање садржаја масти у сиру.....	40
5.2.3. Одређивање киселости сира.....	41
5.2.4. Одређивање рН вредности сира.....	41
5.2.5. Одређивање садржаја натријум хлорида (NaCl) у сиру.....	42
5.3. Методе микробиолошких испитивања.....	42
5.3.1. Припрема узорака сира за изолацију и одређивање укупног броја вијабилних бактерија млечне киселине и укупног броја аеробних мезофилних бактерија.....	42

5.3.2. Изолација и идентификација бактерија млечне киселине.....	43
5.3.4. МАЛДИ-ТОФ масена спектрофотометрија у идентификацији бактерија млечне киселине.....	52
5.3.5. Прелиминарно испитивање антимикубног потенцијала изолованих бактерија млечне киселине.....	53
5.4. Методе за евалуацију бактерија млечне киселине као пробиотика.....	55
5.4.1. Испитивање способности преживљавања у гастроинтестиналном тракту.....	55
5.4.2. Способност синтезе биогених амина.....	56
5.4.3. Способност раста бактерија у присуству фенола.....	57
5.4.4. Испитивање способности синтезе хемолизина на крвном агару.....	57
5.4.5. Испитивање осетљивости изолата на антибиотике.....	58
5.4.6. Способност асимилације различитих шећера.....	59
5.4.7. Способност аутоагрегације и коагрегације изолата.....	60
5.4.8. Способност бактерија млечне киселине за формирање биофилма.....	60
5.4.9. Микробиолошка адхезија са различитим врстама растварача.....	62
5.4.10. <i>In vitro</i> испитивање способности адхезије изолата за епител танког црева свиње.....	62
5.5. Испитивање ензимске активности бактерија млечне киселине.....	64
5.5.1. Добијање ферментационе течности бактерија млечне киселине.....	64
5.5.2. Одређивање активности киселе и алкалне инвертазе.....	65
5.5.3. Одређивање активности алкалне протеазе.....	66
5.5.4. Одређивање активности алкалне фосфатазе.....	68
5.5.5. Одређивање активности α -амилазе.....	70
5.5.6. Одређивање укупне количине протеина.....	71
5.6. Испитивање утицаја еколошких фактора на планктонски раст бактерија млечне киселине.....	72
5.6.1. Ефекат синергистичког деловања различитих рН и температуре на раст бактерија.....	73
5.6.2. Ефекат синергистичког деловања различитих концентрација соли и температуре на раст бактерија.....	73
5.7. Статистичке методе.....	74

6. РЕЗУЛТАТИ.....	75
6.1. Хемијске карактеристике сокобањског сира.....	76
6.2. Квантитативни састав заједнице бактерија у сокобањском сиру.....	76
6.3. Физиолошка карактеризација и идентификација изолованих бактерија млечне киселине.....	78
6.4. Антимикробни потенцијал изолованих бактерија млечне киселине.....	86
6.5. Испитивање пробиотског потенцијала изабраних бактерија млечне киселине.....	91
6.6. Ензимска активност испитиваних изолата бакрерија млечне киселине.....	111
6.7. Утицај еколошких фактора на раст изолованих бактерија млечне киселине.....	113
7. ДИСКУСИЈА.....	120
7.1. Антимикробни потенцијал изолованих бактерија млечне киселине.....	124
7.2. Пробиотски потенцијал изабраних бактерија млечне киселине.....	126
7.3. Ензимска активност бактерија млечне киселине.....	132
7.4. Утицај еколошких фактора на раст изолованих бактерија млечне киселине.....	134
8. ЗАКЉУЧЦИ.....	136
9. РЕФЕРЕНЦЕ.....	141
10. ПРИЛОЗИ.....	172

ИЗВОД

У овом рукопису, испитано је и утврђено присуство и физиолошке карактеристике бактерија млечне киселине (БМК) изолованих из традиционално произведеног сира из југоисточне Србије (подручје Сокобање). Три узорка, из различитих сеоских домаћинстава, узоркована су током пролећа, лета и јесени. Испитане су хемијске карактеристике узорака сира. Идентификација БМК је извршена коришћењем биохемијских тестова и МАЛДИ-ТОФ масене спектрофотометрије. Утврђен је антимикробни потенцијал у односу на раст *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Proteus mirabilis* ATCC 12453, као и на раст неких Грам-негативних бактерија, изолованих из истог сира (*Klebsiella oxytoca* KGPMF1, *Klebsiella ornithinolytica* KGPMF8 и *Aeromonas hydrophila* KGPMF64), коришћењем методе дифузије из бунарића у агар. За даље истраживање, одабрано је 16 изолата, на основу претходно истражених и утврђених биохемијских карактеристика и антимикробног потенцијала у односу на изабране ентеробактерије. Извршена је процена пробиотског потенцијала одабраних БМК (толеранција на различите гастроинтестиналне услове и осетљивост на клинички релевантне антимикробне агенсе). Испитан је утицај различитих врста шећера на раст изолованих БМК, способност формирања биофилма, способност бактерија да се везују за раствараче и епителне ћелије танког црева свиње, као и способност ауто- и коагрегације између њих и клиничког изолата *Escherichia coli*. Активност ензима (кисела и алкална инвертаза, алкална фосфатаза, алкална протеаза, инвертаза) као и укупна концентрација протеина у ферментационој течности је измерена спектрофотометријском методом. Процењен је утицај различитих температура у синергизму са различитим рН и концентрацијама соли на планктонски раст изолата БМК.

Према проценту масноће у сувој материји, сокобањски сир припада пуномасној групи сирева, док према садржају воде у материји без масноће, сокобањски сир припада киселој групи сирева. Бројност бактерија је зависила од сезоне, домаћинства и врсте подлоге која се користила за изолацију и бројање. Идентификована су четири различита рода БМК (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* и *Streptococcus*). У оквиру рода *Lactobacillus* идентификовани су *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* и *Lb. plantarum*. У оквиру рода *Lactococcus* идентификовани су *L. lactis* subsp. *lactis* и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. У оквиру рода *Enterococcus* идентификовани су *E. faecium*, *E. faecalis*, *E.*

hirae и *E. durans*. У оквиру рода *Streptococcus* идентификовани су *S. uberis* и *S. agalactiae*. Сви тестирани изолати, осим изолат из рода *Streptococcus*, показали су добру ацидификациону способност у стандардном и обогаћеном млеку. Тестирани изолати су инхибирали раст бар једне од пет индикаторских врста, са пречником зоне инхибиције од 10 до 26 mm.

S. uberis (7 изолат) и *S. agalactiae* (1 изолат) су изоловани из сира узоркованог током лета. Тестирани *Streptococcus* изолати су показали осетљивост на тетрациклин, хлорамфеникол, новобиоцин и рифампицин, са пречником зоне инхибиције од 36 до 48 mm. Због специфичности традиционалног начина производње сокобањског сира, сматра се да су ови изолати доспели у млеко, а касније у сир са вимена крива.

Изабрани изолати БМК су показали толеранцију на симулиране гастроинтестиналне услове и осетљивост на антибиотике, посебно на ампицилин (МИК на 0,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за лактобациле; од 0,195 – 3,125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за лактококе; од 0,19 – 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ за ентерококе). Способност формирања биофилма изолат БМК је била изолат специфична. Највећи проценат адхезије је детектован са хлороформом, док је адхезиона способност одабраних изолат на епител танког црева свиње у корелацији са резултатима адхезионе способности према растварачима. Способност аутоагрегације изолат је била јака. *Lactobacillus* spp. су показали снажну коагрегацију са *E. coli*, док је коагрегација изолат из родова *Lactococcus* и *Enterococcus* била изолат специфична. Сви изолати из рода *Lactobacillus* су показали активност протеазе, амилазе и алкалне фосфатазе, док активност киселих и алкалних инвертаза није уочена. Изолати из рода *Lactococcus* су показали активност протеазе, киселе инвертазе и алкалне фосфатазе, осим изолат KGPMF50, који није показао активност алкалне фосфатазе. Изолати из рода *Enterococcus* су показали слабу и изолат специфичну ензимску активност. Протеини су детектовани у ферментационој течности свих изолат. Изолати из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* су показали већу толеранцију на киселу рН, док су изолати из рода *Enterococcus* били толерантнији на базну рН, на 37°C. Температура на 4°C је била лимитирајући фактор за раст свих тестираних изолат. Ограничавајући фактори за планктонски раст изолат из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* су били базна рН, концентрација соли изнад 6,5% и температура на 20°C. Ограничавајући фактори за раст изолат из рода *Enterococcus* су били кисела рН, концентрација соли око 8% и температура на 20°C. У комбинацији са 8% соли и температуром од 20°C, само су изолати из рода *Lactococcus* показали минималану способност раста, док изолати из рода *Lactobacillus* нису показали способност раста.

Резултати су указали на потенцијална пробиотска својства БМК изолованих из сокобањског сира и отворила могућност за даља истраживања и потенцијалну примену у млечној индустрији. Изолати су углавном показали високу толеранцију на екстремне услове који владају у гастроинтестиналном тракту, осетљивост на антибиотике, као и способност преживљавања у присуству фенола. Изолати нису показали способност да синтетишу хистамин и тирамин, што је пожељна карактеристика при избору могућих пробиотика или стартер култура. На основу резултата способности адхезије и агрегације, издвојили су се изолати *Lb. fermentum* KGPMF28, *Lb. fermentum* KGPMF29, *Lb. brevis* KGPMF35 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactic* KGPMF57, који су показали потенцијал за употребу и будућа истраживања.

SUMMARY

In this paper, the presence and physiological characteristics of lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia (Sokobanja area) were examined. Three samples, from different households, were obtained during the spring, summer and autumn. Chemical characteristics of cheese samples were examined. Identification of LABs was done by using the biochemical tests and MALDI-TOF mass spectrometry. The antimicrobial potential on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Proteus mirabilis* ATCC 12453 as well as on the growth of some Gram-negative bacteria, isolated from the same cheese (*Klebsiella oxytoca* KGPMF1, *Klebsiella ornithinolytica* KGPMF8 and *Aeromonas hydrophila* KGPMF64) was examined by using agar-well diffusion method. The 16 isolates were chosen for further investigation, according to the previously investigated biochemical characteristics and antagonistic potential against enterobacteria isolated from the same cheese. The evaluation of the probiotic potential of chosen LABs (tolerance to different gastrointestinal conditions and sensitivity to clinically relevant antimicrobial agents) was evaluated. The effect of different type of sugars on the growth of isolated LAB, was examined. The ability of biofilm formation of LAB, the ability of bacteria to adhere to solvents and to pig intestinal epithelium, as well as the ability of auto- and co-aggregation between them and *Escherichia coli* clinical isolate, were investigated. The enzymatic activities (acid and alkaline invertase, alkaline phosphatase, alkaline protease, invertase) as well as the total concentration of protein in fermentation liquid were measured by using the spectrophotometry method. The effect of different temperature in synergism with different pH and salt concentration, on the ability of planktonic growth of selected LAB, was also evaluated.

According to the fat in dry matter, the cheese belong to full-fat, while according to moisture in nonfat substance in acid-curd soft cheese group. The number of viable bacterial cells showed seasonal, household and type of substrate dependence. Briefly, four different genera of LAB (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* and *Streptococcus*) were identified. The members of the genus *Lactobacillus* were *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* and *Lb. plantarum*. The members of the genus *Lactococcus* were *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. The members of the genus *Enterococcus* were *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* and *E. durans*. The members of genus *Streptococcus* were *S. uberis* and *S. agalactiae*. All tested isolates, except the members of genus *Streptococcus*, showed good acidification ability in pure and enriched milk. Tested isolates inhibited the growth of at least one indicator strain. Diameter of the growth inhibition zone was from 10 to 26 mm.

S. uberis (7 isolates) and *S. agalactiae* (1 isolate) were isolated from the cheese samples taken in summer. All isolates were susceptible to tetracycline, chloramphenicol, novobiocin and rifampicin, with a growth inhibition zone from 36 – 48 mm. Due to the specific making of cheese from Sokobanja, these isolates are, probably, originating from cows' udders.

Chosen isolates were tolerant to the simulated gastrointestinal condition and showed sensitivity to antibiotics, especially to ampicillin (MIC at 0.195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for lactobacilli; from 0.195 – 3.125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for lactococci; from 0.19 – 2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for enterococci). The sugar metabolism and the ability of biofilm formation of LABs were strain specific. The highest percentage of adhesion was detected with chloroform, while the adhesion ability of selected isolates to pig intestinal epithelium was in the correlation with the results of adhesion ability to solvents. The auto-aggregation ability of isolates was strong. *Lactobacillus* spp. demonstrated high co-aggregation with *E. coli*, while co-aggregation of *Lactococcus* spp. and *Enterococcus* spp. was strain specific. All *Lactobacillus* isolates showed the protease, amylase and alkaline phosphatase activity, while the activity of acid and alkaline invertase was not observed. The *Lactococcus* isolates showed the protease, acid invertase and alkaline phosphatase activity, except KGPMF 50 isolate, which showed no alkaline phosphatase activity. Tested *Enterococcus* isolates showed weak and strain specific enzymatic activity. The proteins were detected in the fermentation liquid of all isolates. Tested *Lactobacillus* and *Lactococcus* isolates showed tolerance to acidic pH, while *Enterococcus* isolates showed tolerance to basic pH, at 37°C. Temperature at 4°C was limiting factor for the growth of all tested bacteria. The limiting factors for the planktonic growth of *Lactobacillus* and *Lactococcus* isolates were basic pH, salt concentration above 6.5% and temperature at 20°C. The limiting factors for the growth of *Enterococcus* isolates were acidic pH, salt concentration around 8% and temperature at 20°C. In combination of 8% of salt and 20°C, only *Lactococcus* isolates showed minimal growth, while *Lactobacillus* isolates showed no growth at all.

These results indicated the potential probiotic properties of the LABs isolated from Sokobanja cheese and give evidence for further potential application in the dairy industry. Isolates mostly showed a high tolerance to extremes of gastrointestinal conditions, sensitivity to antibiotics, as well as the ability of surviving in the presence of phenol. They showed no ability to synthesize histamine and tyramine, which is desirable characteristic when selecting possible probiotics or starter cultures. Based on the results of adhesion and aggregation ability, *Lb. fermentum* KGPMF28, *Lb. fermentum* KGPMF29, *Lb. brevis* KGPMF35 and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF57 isolates showed the potential for usage and future investigation.

ЛИСТА СЛИКА

- Слика 1.** Изглед колонија бактерија млечне киселине на MRS агару
- Слика 2.** Изглед Грам-позитивних бактерија под микроскопом
- Слика 3.** Пример негативног каталаза теста (нема мехурића кисеоника)
- Слика 4.** Ферментација лактозе (лево – појава гаса у Дурхамовој цевчици; средина – контрола стерилности (неинокулисана MRS модификована подлога); десно – одсуство гаса у Дурхамовој цевчици)
- Слика 5.** Приказ способности хидролизе L-аргинина (лево – контрола стерилности подлоге; средина – позитивна реакција; десно – негативна реакција)
- Слика 6.** Приказ способности хидролизе ескулина (лево и средина – позитивна реакција, десно – негативна реакција)
- Слика 7.** Приказ способности хидролизе хипурата
- Слика 8.** Приказ способности коришћења цитрата БМК (плава боја – позитивна реакција; безбојна колонија – негативна реакција)
- Слика 9.** Приказ ацидификационе способност изолата БМК (лево – појава груша; средина и десно – појава груша и гаса)
- Слика 10.** Приказ активности изолата БМК у млеку обогашеном са метиленским плавим (слика лево – редукција метиленског плавог (појава плавог прстена) уз појаву груша и гаса; слика десно – редукција метиленског плавог уз појаву груша и негативна контрола)
- Слика 11.** Приказ способности бактерија да продукују диацетил (појава црвеног прстена означава позитивну реакцију)
- Слика 12.** Изглед Microgen Strep ID трака након инкубације и додавања реагенаса
- Слика 13.** Изглед API CH50 трака након инкубације
- Слика 14.** Изглед плоче након прелиминарног испитивање антимикробне активности БМК (појава светле зоне око засејаних колонија БМК указује на потенцијалну антимикробну активност изолата)
- Слика 15.** Изглед хемолизе на крвном агару
- Слика 16.** Испитивање осетљивости изолата БМК на антибиотике – изглед микротитар плоче након инкубације
- Слика 17.** Способност формирања биофилма БМК – изглед микротитар плоче након бојења кристал виолетом (љубичаста боја – формирани биофилм; бела боја – контрола стерилности)

Слика 18. Изглед узорака танког црева обојених акридин оранжом и припремљених за микроскопирање

Слика 19. Способност адхезије за епител танког црева свиње
(1 – *Enterococcus faecalis* KGPMG47; 2 – *Lactobacillus brevis* KGPMF35; 3 – *Lb. fermentum* KGPMF29; 4 – *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF57; 5 – Контрола – MRS подлога; 6 – Контрола - ПБС)

ЛИСТА ТАБЕЛА

- Табела 1.** Хемијске карактеристике сокобањског сира
- Табела 2.** Укупан број бактерија млечне киселине (БМК) у сокобањском сиру
- Табела 3.** Физиолошке карактеристике *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. изолованих из сокобањског сира
- Табела 4.** Физиолошке карактеристике *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. изолованих из сокобањског сира
- Табела 5.** Способност ферментације шећера *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. применом API 50CH система
- Табела 6.** Способност ферментације шећера *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. применом Microgen Strep ID система
- Табела 7.** Заступљеност изолата бактерија млечне киселине у сокобањском сиру
- Табела 8.** Антимикробни ефекат *Lactobacillus* spp. изолата на индикаторске врсте
- Табела 9.** Антимикробни ефекат *Lactococcus* spp. изолата на индикаторске врсте
- Табела 10.** Антимикробни ефекат *Enterococcus* sp. изолата на индикаторске врсте
- Табела 11.** Антимикробни ефекат *Streptococcus* spp. изолата на индикаторске врсте
- Табела 12.** Толеранција бактерија млечне киселине према условима ниске рН
- Табела 13.** Толеранција бактерија млечне киселине према симулираним условима желудачне киселине
- Табела 14.** Толеранција бактерија млечне киселине премса симулираним условима дуоденума
- Табела 15.** Способност раста бактерија у присуству фенола, способност синтезе биогених амина и способност хемолизе на крвном агару
- Табела 16.** Осетљивост одабраних изолата бактерија млечне киселине на антибиотике
- Табела 17.** Способност раста *Lactobacillus* spp. у присуству различитих шећера
- Табела 18.** Способност раста *Lactococcus* spp. у присуству различитих шећера
- Табела 19.** Способност раста *Enterococcus* spp. у присуству различитих шећера
- Табела 20.** Способност изолованих бактерија млечне киселине за коагрегацију са *E. coli*
- Табела 21.** Способност изолованих бактерија млечне киселине за формирање биофилма

- Табела 22.** Способност изолованих бактерија млечне киселине за адхезију са ксилолом, хлороформом и етил ацетатом
- Табела 23.** Ензимска активност тестираних изоата бактерија млечне киселине
- Табела 24.** Ефекат синергистичког деловања рН и температуре на раст изоата из рода *Lactobacillus*
- Табела 25.** Ефекат синергистичког деловања рН и температуре на раст изоата из рода *Lactococcus*
- Табела 26.** Ефекат синергистичког деловања рН и температуре на раст изоата из рода *Enterococcus*
- Табела 27.** Ефекат синергистичког деловања рН и различитих концентрација соли на раст изоата из рода *Lactobacillus*
- Табела 28.** Ефекат синергистичког деловања рН и различитих концентрација соли на раст изоата из рода *Lactococcus*
- Табела 29.** Ефекат синергистичког деловања рН и различитих концентрација соли на раст изоата из рода *Enterococcus*

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 стандард
- График 6.** Ацидификациона активност тестираних изолата *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp.
- График 7.** Ацидификациона активност тестираних изолата *Enterococcus* spp.
- График 8.** Способност аутоагрегације изолат из рода *Lactobacillus*
- График 9.** Способност аутоагрегације изолат из рода *Lactococcus*
- График 10.** Способност аутоагрегације изолат из рода *Enterococcus*

1. УВОД

Исхрана савременог човека подразумева унос различитих ферментационих производа, добијених биотехнолошким процесима, уз испуњење високог нивоа квалитета и безбедности хране. Поред ферментационих производа добијених у савременим прехранбеним индустријама, у исхрани су присутни и ферментисани производи који се добијају у локалним заједницама (домаћинствима), на традиционалан начин, и најчешће су географски локализовани. Традиционални прехранбени производи се добијају устаљеним, старинским поступцима у оквиру домаћинства одређеног географског подручја, користе се у исхрани локалног становништва и представљају на манифестацијама посвећеним гастрономији и култури одређене регије. Начин прављења традиционалних производа је прецизно и специфично израђен према гастрономском наслеђу, са мало или без промена у поступку производње. Обично се преноси са генерације на генерацију. Овакви производи су познати по својим сензорним особинама и повезани су са културом и традицијом локалних подручја у којима се производе (Guerrero et al., 2009). Сиреви направљени од непастеризованог, сировог млека се у великој мери уклапају у опис традиционалних производа, јер се производе у конкретно дефинисаном географском подручју, користећи специфична знања и вештине домаћег становништва. Guerrero et al. (2009) указују да се термин „традиционални сир“ може користити и за сиреве произведене на фармама или у малим млекарарама, које користе пастеризовано млеко инокулисано са различитим врстама стартер култура (микробиолошким или хемијским).

Неки од бактеријских сојева присутни у непастеризованом млеку (аутохтони и/или стартер сојеви) могу се умножавати, преживети и чак постати доминантни током процеса производње сира. Та способност најчешће зависи од метаболичког потенцијала микроорганизама и могућности испољавања тог потенцијала, што у великој мери зависи од услова животне средине и од саме врсте (чак и соја у оквиру врсте). Микробиолошка заједница млека и сирева се, у току свог развоја, сусреће са различитим условима животне средине у којој треба да опстане. Биохемијски састав млека, модификација млека загревањем до одређене температуре и додавање стартера, који доводи до закишељавања, технолошки процес зрења сира (сољење, температура, релативна влажност), као и састав ваздуха у просторији у којој се сир налази, су фактори који доводе до промена у заједници микроорганизама током процеса прављења и зрења сира (Callon et al., 2011a). Познато је да се заједница микроорганизама на површини и унутар сира разликује код различитих врста сирева и да зависи од временског периода када се

сир производи. На микробиолошку заједницу сира утиче сложена и слабо проучена мрежа интеракција, која укључује биотичке факторе (састав микробиолошке заједнице у зависности од врсте сира и нивоа зрелости, равнотежа популација, итд.) и абиотичке факторе, од којих су најзначајнији физичко-хемијски састав и структура млека од кога се сир прави – рН, a_w (активност воде), редокс потенцијал, количина натријум-хлорида (NaCl), присуство или одсуство гаса (CO_2), анаеробиоза, (не)дисосоване киселине, аминокиселине, масне киселине и производи њиховог катаболизма, мали пептиди и извор угљеника као и физичко-хемијске особине простора у коме се сир налази (Charlet et al., 2009; Irlinger & Mounier, 2009; Callon et al., 2011a, 2011b).

Сиреви произведени на традиционалан начин, направљени од сировог, непастеризованог млека, без додавања бактеријских стартер култура, или сирила анималног порекла, представљају извор аутохтоних бактерија млечне киселине (не-стартер бактерије млечне киселине). У процесу прављења и сазревања традиционалних сирева, стално се мења састав заједнице и бројност микроорганизама. Аутохтоне бактерије млечне киселине, које се налазе у млеку, а касније и у сирџу, расту само у унутрашњости сира и најбоље су прилагођене условима средине који ту владају. Бактерије млечне киселине (БМК) чине доминантну заједницу микроорганизама у традиционалним, али и у комерцијалним врстама сирева. Мезофилне врсте из рода *Lactobacillus* су међу најчешће изолованим не-стартер врстама БМК. Њихова присутност и бројност варира у току процеса зрења сирева направљених од сировог млека, у зависности од врсте технологије (Quigley et al., 2012) и дужине зрења (Gatti et al., 2008), али и од састава стартера (Masoud et al., 2011; Feutry et al., 2012a). Физичко-хемијски састав и структура унутрашњости сира су у великој мери променљиви. На пример, садржај воде може да варира између 42% и 55%. БМК су доминантна група микроорганизама, чија бројност може бити и изнад 9×10^7 CFU g⁻¹ сира током првог дана производње сира, али оне остају доминантне до краја зрења, упркос варијацијама у билансу врста, током процеса зрења. Најмање 21 врста у оквиру седам различитих родова БМК се може наћи у традиционално направљеним сиревима. Најчешће доминантне врсте су *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium*. Поред тога, генетичка хетерогеност сојева који припадају истој врсти међу не-стартер бактеријама млечне киселине је широка, а најчешће зависи од порекла сира (Feutry et al., 2012a, 2012b).

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

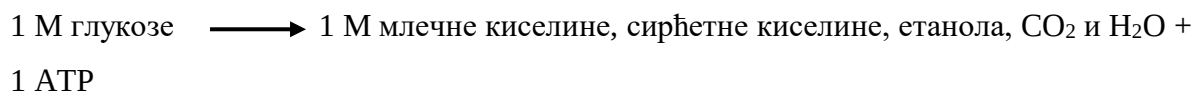
2.1. Основне карактеристике родова бактерија млечне киселине

Бактерије млечне киселине (БМК) су хетерогена група микроорганизама која се широко користи у прехранбеној биотехнологији и има све шири апликативни спектар у ветерини и медицини, због чега се налази у животи савремених микробиолошких и биотехнолошких истраживања. Заједничка карактеристика им је ферментативни метаболизам са млечном киселином, као главним производом. Такође су значајни продуценти биотички активних супстанци – бактериоцина, егзополисахарида и ароматичних једињења (Mogensen et al., 2003; Vries et al., 2006). БМК се разликују по способности ферментације угљених хидрата и продуката ферментације под утицајем лактат-дехидрогеназе, на основу чега се деле на хомоферментативне и хетероферментативне. Крајњи производ ферментације глукозе код хомоферментативних врста у анаеробним условима је млечна киселина, док се код хетероферментативних представника добијају још и еквимоларне количине ацетата, етанола, угљен диоксида (CO₂), мравље киселине или сукцината (Sharpe, 1979).

Хомоферментативне врсте:



Хетероферментативне врсте:



Групи БМК припадају врсте из родова *Lactobacillus* (род са највећим бројем врста), *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Streptococcus*, *Lactococcus* и *Lactosphaera* (Mogensen et al., 2003; Vries et al., 2006; Madigan et al., 2009). Врсте из ове групе бактерија су Грам-позитивне, каталаза негативне, неспорогене, анаеробне, аеротолерантне и ацидофилне (оптимални рН за раст између 4,0 и 4,5). Мезофилне врсте имају оптимум гајења на 30°C, а термофилне до 42°C и могу имати различите морфолошке облике (бацили, коке и кокобацили) (Todorov & Franco, 2010).

Бактерије млечне киселине се широко употребљавају у индустрији хране и пољопривреди. Производи који се базирају на коришћењу БМК су кисело-млечни напаци, сиреви, вина, различите ферментисане прерађевине (кобасице, саламе и др.), укисељено поврће (краставци, лук, купус), као и квалитетна силажа за исхрану животиња. БМК имају велики утицај на квалитет наведених производа, јер доприносе развоју укуса, мириса и изгледа производа, као и дужини трајања производа (Topisirević i sar., 2000).

Род *Lactobacillus*

Род *Lactobacillus* обухвата Грам-позитивне, неспорогене, штапићасте бактерије или кокобациле, које су често повезане у ланце и које не поседују флагеле (Hammes & Vogel, 1995). То су микроаерофилне или анаеробне бактерије које најбољи раст постижу при концентрацији CO₂ од 5% до 10%, а могу бити хомоферментативни и хетероферментативни. Лактобацили су високо специјализоване бактерије млечне киселине, са високим захтевима за нутритивним компонентама у медијумима за раст. Поред угљених хидрата као главних извора атома угљеника и енергије, за раст су им неопходне и различите аминокиселине, пептиди, нуклеотиди, соли, масне киселине као и естри масних киселина. Нутритивни захтеви су углавном карактеристика врсте, али често су и карактеристика појединачних сојева (Bergey, 2009). Бактерије из рода *Lactobacillus* расту на температурама од 2°C – 53°C, док је оптимална температура за већину врста од 30°C – 40°C. Неке од врста овог рода (*Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. fuchuensis*, *Lb. aligidus*, *Lb. plantarum*) расту, иако споро, чак и на температурама близу тачке смрзавања, нпр. у смрзнутом месу и смрзнутим рибљим намирницама (Sakala et al., 2002). Оптимална рН вредност за њихов раст се креће од 5,5 до 6,2, иако поједине врсте добро расту и када је рН средине 5 или мања.

Лактобацили насељавају различите еколошке нише и представљају значајан део микрофлоре гастроинтестиналног (ГИТ) и урогениталног тракта људи и животиња (Hammes & Hertel, 2003). Еколошке студије показују да је већина бактерија рода *Lactobacillus* које се налазе у ГИТ-у вероватно транзитна, пореклом најчешће из усне дупље (Dal Bello & Hertel, 2006) или су унете путем ферментисане хране (Dal Bello et al., 2003). Према Vasquez et al. (2002) и Zhou et al. (2004), доминантне врсте микробиома женског урогениталног тракта су *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. jensenii* и *Lb. iners*.

Лактобацили се у природи, у мањем броју, јављају и на површинама биљака (Mundt & Hammer, 1968), а најчешће изоловане врсте су *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis*, *Lb. paracasei*, *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* и *Lb. fermentum* (Hammes & Hertel, 2003).

Велики број врста из рода *Lactobacillus* заузима кључно место у производњи ферментисаних млечних производа (појединачно или у комбинацији са другим бактеријским врстама, плеснима и квасцима), ферментисаних месних производа, а присутни су и као доминантни организми у ферментисаном поврћу и производима од житарица. Улога лактобацила (*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei*, *Lb. kefir*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*) у формирању финалних производа је вишеструка. У току ферментације шећера долази до синтезе млечне киселине и других продуката који снижавају рН производа што доводи до редукције или потпуне обуставе раста непожељне микрофлоре. У прехранбеним производима, лактобацили продукују и секундарне метаболите (као што су диацетил, сирћетна киселина и ацеталдехид; једињења која потичу из метаболизма угљених хидрата или једињења настала катаболизмом аминокиселина као што су водоник сулфид (H_2S), амини, карбонилна једињења, крезол, скатол, бензалдехид и метанетиол) који утичу на сензорне карактеристике финалног производа (Bergey, 2009). Поред активног учешћа у процесима ферментације, лактобацили имају улогу и у конзервирању месних прерађевина. Последњих деценија, у току процеса производње, као стартери се додају сојеви произвођачи бактериоцина који делују негативно на раст *Listeria monocytogenes* и других Грам-негативних бактерија, контаминената месних производа.

Лактобацили се све више користе и у медицини. Интензивно се изучавају позитивни ефекти које лактобацили имају на здравље домаћина. Установљена је делотворност неких лактобацила у стабилизацији или колонизацији интестиналне микрофлоре код акутних дијареја. Примећен је и утицај у превенцији дијареје узроковане узимањем антибиотика, као и у превенцији и лечењу болести запаљења црева и лечењу рака дебелог црева (Rafter et al., 2007).

Род *Pediococcus*

Овај род обухвата хомоферментативне врсте, повезане у виду парова или кратких ланаца. Врсте из овог рода расту на концентрацијама соли до 5,5%. Температурни оптимум за раст је 25 – 32°C, а температурни опсег раста је од 7 – 45°C. До сада је

описано шест врста: *Pediococcus acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. claussenii*. Налазе се у млеку и млечним производима, а често се могу наћи у киселом купусу. *Pediococcus cerevisiae* се користи у производњи ферментисаних кобасица (Holzapfel et al., 2006).

Род *Carnobacterium*

Род *Carnobacterium* чине штапићасте, Грам-позитивне бактерије, повезане у виду кратких ланаца. Могу бити покретне или непокретне и не формирају споре. Иако су то бактерије које производе млечну киселину, могу расти у опсегу рН од 7 до 9. Врсте из рода *Carnobacterium* углавном производе млечну киселину као крајњи продукт ферментације глукозе. *C. pleistocenium*, као крајње продукте метаболизма производи и CO₂, етанол и сирћетну киселину. Могу живети у анаеробним условима. *C. maltaromaticum* и *C. mobile* производе гас приликом ферментације глукозе (Joborn et al., 1999). Према Leisner et al. (2007), род *Carnobacterium* садржи девет описаних врста (*C. alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. inhibens*, *C. maltaromaticum*, *C. mobile*, *C. pleistocenium*, *C. viridans*), али се само *C. divergens* и *C. maltaromaticum* (стари назив *C. piscicola*) могу наћи у храни.

Врсте из рода *Carnobacterium* могу се наћи у морској води, млечним производима, као и у производима од рибе и меса. Имају способност раста и размножавања при температурама од -10 до +20°C. Такви примери су психрофилне, анаеробне врсте *C. maltaromaticum*, *C. divergens* и *C. pleistocenium*. Оне су такође толерантне према условима високог притиска (до 2500 m). Поједине врсте (*C. maltaromaticum*, *C. divergens*, *C. mobile*) имају способност конзервирања, јер је доказано да продукују бактериоцине (Leisner et al., 2007).

Род *Enterococcus*

Enterococcus је велики род у оквиру БМК, а чине га факултативно анаеробне, Грам-позитивне коке, које су обично груписане у паровима (диплококе) или у кратким ланцима. Могу да преживе у широком опсегу еколошких услова: температуру (10 – 45°C), рН (4,5 – 10,0) и високе концентрације NaCl. Обично показују способност γ-хемолIZE на крвном агару. До сада је класификовано 17 врста у оквиру овог рода, од којих су за квалитет и арому прехранбених производа најбитнији *E. faecalis* и *E. faecium*. Ове две врсте живе и као коменсали у интестиналном тракту човека (Fisher & Phillips, 2009). Mundt (1986) је доказао да присуство *E. faecalis* у прехранбеним производима није

увек повезано са фекалном контаминацијом. Због еуривалентности у смислу температуре и прилагодљивости различитим условима животне средине, могу расти и током периода хлађења и преживети након пастеризације.

Ентерококе могу својим метаболичким продуктима утицати на квалитет и специфичан укус млечних производа. Деградација казеина коју врше ентерококе има важну улогу у развоју мириса и текстуре сира али неки пептиди доприносе специфичној ароми сира, док други непожељни пептиди са горким укусом могу довести до супротног ефекта (Čanžek Majhenič, 2006). Липолитичка активност ентерокока у сиру доприноси укусу сира због формирања масних киселина (Bhardwaj et al., 2008). Синтеза биогених амина је неповољна активност ентерокока јер су биогени амини повезани са бројним случајевима тровања храном (Čanžek Majhenič, 2006). Оксидација ових масних киселина доводи до формирања метил кетона и лактона који формирају незасићене алдехиде, што доводи до оксидативне ужеглости сира (Bhardwaj et al., 2008). Бактерије у оквиру рода *Enterococcus* могу показати резистенцију на антибиотике, нарочито на гликопептиде (нпр. ванкомицин и теикопланин) и на аминогликозиде. Могућа је појава и мултирезистентних врста (Kasmaz & Aksoy, 2005), што може утицати на безбедност производа и потрошача.

Род *Vagococcus*

Овај род обухвата Грам-позитивне, каталаза негативне коке. До сада је познато осам врста овог рода: *V. fluvialis*, *V. salmoninarum*, *V. lutrae*, *V. fessus*, *V. carniphilus*, *V. elongatus*, *V. penaei* и *V. acidifermentans*. Мало је података о њиховом значају као узрочницима инфекција код животиња и људи. Изолација *V. salmoninarum* код оболелих риба, *V. lutrae* и *V. fessus* из различитих оболелих водених сисара, *V. fluvialis* код животиња и људи са различитим инфекцијама указује на то да ове бактерије могу бити патогени и извор заразе за животиње које се користе у исхрани људи. Правилна идентификација врста из овог рода може довести до више информација о значају ових бактерија, њиховој улози приликом настанка болести код животиња и људи, и њиховом потенцијалу и економском утицају у прехранбеној индустрији (Teixeira et al., 2014).

Род *Leuconostoc*

Врсте из рода *Leuconostoc* су Грам-позитивне, хетероферментативне коке. Основна карактеристика овог рода је продукција диацетила при рН 5,5 и толеранција на веће концентрације соли (Björkroth & Holzapfel, 2006). Бактерије овог рода су отпорне на ванкомицин и каталаза негативне су (Kulwichit et al., 2007). Најзначајнији представници су *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicus*. *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* се користи као стартер у производњи маслаца и сирева (Björkroth & Holzapfel, 2006).

Род *Oenococcus*

Род *Oenococcus* обухвата Грам-позитивне бактерије сврстане у породицу Leuconostocaceae. Род обухвата две врсте, *Oenococcus oeni* (до 1995. године познат као *Leuconostoc oeni*) и *O. kitaharae*. *O. oeni* има велики значај у области енологије, где је примарна бактерија у завршној фази малолактичке ферментације, у којој продукује диацетил, као крајњи продукт (Kunkee, 1973).

Род *Weissella*

Овај род обухвата Грам-позитивне, каталаза негативне, факултативно анаеробне бактерије, које су хетероферментативне. Оптимална температура за раст је око 25°C, а рН је 6. Расту добро на концентрацији NaCl мањој од 8 – 10%. Имају способност хидролизе аргинина и формирају декстран од сахарозе. Продукују киселину приликом ферментације рибозе, ксилозе и L-арабинозе. Продукују гас приликом ферментације глукозе (Lee et al., 2002). Описано је девет врста у оквиру рода: *Weissella confusa*, *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. minor*, *W. paramesenteroides*, *W. thailanensis*, *W. viridescens* и *W. Koreensis* (Björkroth & Holzapfel, 2006).

Род *Streptococcus*

Овом роду припадају факултативно анаеробне, Грам-позитивне бактерије које се групишу у паровима или у ланцима различите дужине, што је последица специфичности њихове деобе. Аспорогене су и покретне или слабо покретне. Познате су као хемоорганотрофи. Обухватају бројне патогене врсте, врсте које су уобичајени чиниоци микробиома човека, као и бројне сапрофите. Са аспекта добијања ферментисаних производа и примене у биотехнологији, посебно је значајна врста *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (предходни назив *Streptococcus thermophilus*). Она је

хомоферментативна, факултативно анаеробна бактерија, која оптимално расте на 43°C. Оксидаза и каталаза је негативна и позитивна на α -хемолитичку активност. Непокретна је и не формира ендоспоре.

S. thermophilus се налази у ферментисаним производима, а обично се користи у производњи јогурта, заједно са *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Њихов синергизам доводи до убрзане и ефикасне ацидификације млека и умножавања организама културе на основу унакрсне исхране оба организма. Киселкасти укус јогурта се постиже узајамним односом лактобацила и стрептокока, а највише зависи од температуре ферментације и продукције киселине у току ферментације. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* продукује аминокиселине и пептиде који су неопходни за раст *S. thermophilus*, док фолате продукује *S. thermophilus* и на тај начин помаже раст *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Испарљиве компоненте које доприносе ароми јогурта, (мале количине сирћетне киселине, диацетила и ацеталдехида), продукује *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Sieuwerds et al., 2010; Horiuchi & Sasaki, 2012, Kanurić, 2014).

Род *Lactococcus*

Lactococcus је род који обухвата БМК које су раније биле класификоване у оквиру рода *Streptococcus* групе N1 (Schleifer et al., 1985). Оне су познате као хомоферментативне бактерије, али њихов хомоферментативни карактер може бити измењен, јер поседују способност прилагођавања различитим условима животне средине, попут рН, концентрације глукозе и ограничених нутријената. То су Грам-позитивне, каталаза негативне, непокретне коке који се налазе појединачно, у паровима или у ланцима. Род садржи сојеве за које се зна да расту на или испод 7°C (James, 1992). У оквиру рода *Lactococcus* је класификовано девет врста, са четири подврсте.

Lactococcus spp. се обично користе у биотехнолошкој индустрији, млекарству, у производњи ферментисаних млечних производа као што сиреви. Могу се користити у једнократним стартер културама или у мешовитим културама са другим бактеријама млечне киселине као што су врсте из родова *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Посебно су значајни *L. lactis* subsp. *lactis* и *L. lactis* subsp. *cremoris*, чији се сојеви користе као стартер културе у индустрији ферментисаних млечних производа. Њихов главни утицај у производњи је смањење рН млека (закишељавање ферментисаног производа), чиме се спречава раст бактерија које су узрочници кварења хране. Ове бактерије доприносе формирању укуса финалног производа (Kok, 1991).

Род *Lactosphaera*

Род *Lactosphaera* обухвата Грам-позитивне, каталаза негативне, факултативно анаеробне коке. Врсте из овог рода немају способност спорулације и непокретне су. Температурни оптимум за раст је између 0 и 42°C, рН оптимум од 5,5 до 9,0. Толеришу присуство соли до 2%. Не показују оксидазну и уреазну активност, као ни способност продукције индола. Немају способност хидролизе желатина, али хидролизују ескулин. До сада је описана врста *Lactosphaera pasteurii*. Род је слабо истражен. Janssen et al. (1995) су га одвојили од врсте *Ruminococcus pasteurii*.

2.2. Значај природних изолата

Досадашња молекуларно генетичка истраживања БМК су првенствено усмерена на изучавање сојева који се рутински користе у већ постојећим биотехнолошким процесима, нарочито врста из рода *Lactococcus*. Мало је пажње било усмерено ка изучавању БМК пореклом из природних извора. Неке анализе природних изолата су доказале њихово својство производње бактериоцина, протеиназа или егзополисахарида. БМК изоловане из производа добијених на традиционалан начин, могу бити извор нових стартер култура аутохтоног порекла, са новим физиолошким особинама. Додавањем оваквих стартера, добили би се аутохтони прехранбени производи. Изолација нових пробиотских сојева из колекције природних изолата је велики изазов и потреба (Topisirević i sar., 2000).

У Србији постоји више врста различитих сирева који се праве на традиционалан начин, у сеоским домаћинствима, од сировог, непастеризованог млека добијеног од домаћих животиња. У већини случајева, ферментација млека врши се без додавања комерцијалних бактеријских стартер култура, па је ферментација млека повезана са присуством „природних сојева“ БМК (Parente & Cogan, 2004; Terzić-Vidojević et al., 2007; 2009). Различите врсте традиционалних сирева поседују специфичну, јединствену и међусобно различиту микрофлору. Микрофлора сира најчешће зависи од квалитета млека, технологије производње, као и еколошких карактеристика локалитета у којима се производи (Terzić-Vidojević et al., 2007; 2009). Југоисточна Србија је једно од географских подручја Србије, познато по традиционалном начину производње ферментисаних млечних производа. Међу ове производе, убраја се и једна врста сира,

сокобањски сир, који се прави од сировог, непастеризованог крављег млека, без додавања бактеријских стартер култура (Muruzović et al., 2018a). „Стартер културе су културе једног или више сојева, једне врсте или више сојева, две или више врста микроорганизама, које својом активношћу усмеравају технолошки процес производње ферментисаних производа од млека и истовремено им дају одређена сензорска својства“ („Sl. glasnik RS“, br. 33/2010).

Ферментација млечних производа добијених уз помоћ БМК доводи до побољшања текстуре, укуса и нутритивне вредности добијених производа (Marcelino Kongo, 2013). Поједини аутори истичу да значајну улогу у формирању специфичног укуса и типичних органолептичких особина сира могу да имају и услови гајења и исхране крава, традиционални процес производње сира као и изворне бактерије одговорне за процес ферментације и сазревања (Terzić-Vidojević et al., 2009; Franz et al., 2011). Овакве врсте млечних производа могу бити главни извор пробиотских бактерија (Motahari et al., 2017).

Liu et al. (2013) наводе да БМК поседују способност да синтетишу ензиме који утичу на органолептичке карактеристике сира. Wijesundera et al. (1997) су доказали да *Lactobacillus* spp. могу побољшати протеолизу и утицати на формирање укуса сира. Метаболички и ензимски потенцијал БМК, који не припадају стартер културама, огледа се у њиховој доминацији у оквиру бројности бактерија у сиревима (Peterson & Marshall, 1990) и њиховој метаболичкој активност (Fox et al., 1998). Novik et al. (2007) и Patel et al. (2012) су указали на то да неке врсте из родова *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* и *Bifidobacterium*, изоловане из ферментисане хране, имају способност да производе ензиме који врше деградацију угљених хидрата. Поред тога, изолати који показују способност синтезе есенцијалних биомолекула (витамини, ензими или бактериоцини), могу значајно утицати на функционалне и технолошке особине прехранбених производа.

Londoño-Zapata et al. (2017) су указали да су *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Lactococcus* доминантни родови, који су одговорни за процесе ацидификације и формирање ароме и укуса сира. *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. су доминантни родови бактерија изолованих из сирева прављених на традиционалан начин (Terzić-Vidojević et al., 2007; 2009; Abdullah & Osman, 2010). Lejková et al. (2015) су показали да је *L. lactis* subsp. *lactis* доминантна врста изолована из овчијих сирева из Словачке, праћена врстама *Lb. curvatus*, *Lb. casei* и осталим врстама из родова *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Leuconostoc*. У традиционалном „Pico“ сирџу, направљеном

од сировог крављег млека, на традиционалан начин, без додавања стартер културе, доминантан род био је *Enterococcus*, а затим род *Lactobacillus* (Domingos-Lopes et al., 2017). *Lb. rhamnosus*, *Lb. helveticus* и *Lb. fermentum* су доминантне врсте изоловане из тврдых сирева, добијених од сировог млека, без термичке обраде и без додавања индустријских стартера (Bautista-Gallego et al., 2014).

Ентерококе су присутне у сиревима прављеним од сировог млека, као природна (еколошка) или као додата микрофлора. Оне представљају велики део укупног броја бактерија у различитим врстама традиционалних сирева (Giménez-Pereira, 2005). Доказано је да се велики број ентерокока може се наћи у Фета сиру (Manolopoulou et al., 2003), турском белом сиру, „Caprino“, „Mozzarella“, „Venaco“, „Monte Veronese“, „Fontina“ и „Comté“ сиревма (Giraffa, 2003; Batt, 2014; Özmen Toğay et al., 2016), као и у француским сиревима направљеним од сировог млека (Jamet et al., 2012).

2.3. Пробиотици, пребиотици и симбиотици

Реч „пробиотик“ потиче од грчке речи „pro bios“, што значи „за живот“. Пробиотици су дефинисани као микроорганизми који имају позитиван утицај на здравствено стање човека или животиње, који их на неки начин конзумирају (FAO/WHO, 2006). Неопштећен гастроинтестинални епител, настањен оптималном микрофлором, представља веома важну баријеру за патогене микроорганизме, антигене и опасне материје које се могу наћи у лумену црева. Улога пробиотских бактерија је да стимулишу одржавање равнотеже микрофлоре у дигестивном тракту (Topisirević i sar., 2001). БМК резистентне на антибиотике могу учествовати у хоризонталном трансферу гена или као детерминанте између бактеријских врста (Kaktcham et al., 2012, Vesković Moračanin et al., 2017). Будућа истраживања могу довести до бољег разумевања улоге стартер или пробиотских микроорганизама у хоризонталном трансферу гена који носи резистенцију на антибиотике, на цревне микроорганизме и патогене бактерије из хране.

У ферментисане млечне производе се могу додати неки познати пробиотски сојеви (Patel et al., 2013). Већ постоје поуздани клинички подаци за неке сојеве *Lb. acidophilus* да се могу користити као пробиотици. Способност преживљавања врста из рода *Bacillus* је већа од других врста бактерија које се користе као пробиотици. Ове бактерије у свом вегетативном стању, имају краћи животни циклус. Већина њих може

да преживи само неколико недеља када се чува у млечним производима. Ендоспоре врста из рода *Bacillus* могу лако да достигну виталност у неповољним условима животне средине и због тога показују велики потенцијал за примену. Комерцијални производи који садрже ендоспоре врста рода *Bacillus* (појединачне дозе иду до 10^9 спора g^{-1} или 10^9 спора mL^{-1}) се користе као пробиотици. Многи комерцијални производи који садрже споре *B. subtilis* се већ налазе у продаји, али истраживање које су извели Green et al. (1999) је показало да већина тих производа заправо садрже друге *Bacillus* врсте, укључујући *B. clausii*, *B. pumilus*, и разне варијетете сојева *B. cereus*. Врсте из рода *Bifidobacterium* су уобичајени становници људског и животињског цревног тракта и могу се користити као пробиотске културе. Заједно са *Lb. acidophilus* се користе у производњи неких ферментисаних млечних производа, где ове две врсте расту у симбиози. Симбиоза се огледа у бржем стварању киселине и снижавању рН средине (Alves et al., 2012). Имајући у виду ова могућа пробиотска својства бактерија, све више расте интерес за добијањем млечних производа, чија ће се производња базирати на додавању БМК са карактеристикама које доприносе побољшању здравља човека. Овакви производи се једним именом зову „функционална храна“. Може се рећи да је функционална храна заправо храна која подиже здравствени ниво људи изнад граница које су обезбеђене нормалном исхраном (Topisirević i sar., 2000).

Безбедоносни аспект БМК, који укључује антимикуробну резистенцију (Vesković Moračanin et al., 2017) и способност хемолизе на крвном агару (Kaktcham et al., 2012), су међу главним критеријумима за одабир бактерија као пробиотика. Према Topisirević i sar. (2000), значајни параметри за селекцију ефикасних пробиотских микроорганизама су:

- 1) њихова отпорност на киселину (проблем проласка кроз желудац);
- 2) њихова отпорност на жучне соли (проблем проласка кроз дуоденум);
- 3) способност адхезије за ћелије епитела танког или дебелог црева;
- 4) способност производње антимикуробних супстанци;
- 5) способност стимулације мукозног имуног система са или без стимулације системског имунитета;
- 6) ефикасност преживљавања у ГИТ-у након уношења;
- 7) дужина боравка и степен колонизације ГИТ-а;
- 8) да није патоген ни токсичан за људе;
- 9) да има висок степен преживљавања током технолошких поступака производње и чувања.

Неколико је фактора који могу утицати на способност преживљавања пробиотика у ферментисаном производу и његове активности приликом уласка у ГИТ домаћина. Ови фактори укључују:

- 1) физиолошко стање додатих пробиотских организама (да ли су ћелије у експоненцијалној или стационарној фази раста);
- 2) физички услови складиштења производа (нпр. температура);
- 3) хемијски састав производа у који се додају пробиотици (нпр. киселост, доступност и садржај угљених хидрата, извори азота, минерални садржај, активност воде и садржај кисеоника);
- 4) могуће интеракције пробиотика са стартер културама (нпр. производња бактериоцина, антагонизам и синергизам). Интеракција пробиотика са храном или стартер културама може бити још интензивнија када се користе пробиотици као компонента стартер културе (Heller, 2001).

Према Birovljev (2010) и LeBlanc et al. (2017), пробиотске бактерије унете преко кисело-млечних производа, имају низ терапеутских ефеката:

- ✓ Имају улогу у превенцији и терапији дијареја (профилактика и терапија дијареје изазване антибиотском терапијом, Кронова болест и иритабилни колон, акутна дијареја изазвана рота вирусима) – пробиотске бактерије колонизују интестинални тракт и делују као природна баријера за инфективне микроорганизме (*E. coli*, *S. typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, *Pseudomonas* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*) и на тај начин имају значајну улогу у терапији дијареја тј. у успостављању равнотеже цревне микрофлоре. *Lb. acidophilus* је ефикаснија од *Lb. bulgaricus* који је способан да у дигестивном тракту остане функционалан десет дана па и дуже. Она ствара неповољне услове за опстанак разних узрочника болести (микрокока, кластридија, разних ентеробактерија и гљивица). За сада није познат ниједан сој *Lb. acidophilus* који је штетан по здравље;
- ✓ Имају улогу у превенцији и лечењу кандидијазе – перорално унети антибиотици уништавају корисну цревну флору и због тога се у превенцији настанка оралне или интестиналне кандидијазе пробиотици дају истовремено или после терапије антибиотцима;
- ✓ Имају способност синтезе витамина групе Б;

- ✓ Имају хипохолестеролемијски ефекат – стварају специфичне метаболите који инхибирају синтезу холестерола у организму и доприносе снижењу холестерола;
- ✓ Имају антиканцерогену активност – БМК инхибрају деловање ензима које синтетишу микроорганизми у дебелом цреву, а који редукују ароматична једињења у канцерогене супстанце – поред превенције карцинома ГИТ-а, посебно дебелог црева, смањују ризик од других карцинома. Механизам дејства се огледа у томе што смањују продукцију канцерогена – нитрозамина и смањују ресорпцију афлатоксина;
- ✓ Побољшавају дигестију лактозе;
- ✓ Повољно делују на имунитет – стимулација слободног IgA, производња и активација макрофага.

Стратегија развоја функционалне хране заснива се и на припреми специфичних пребиотика и/или симбиотика. Пребиотици су састојци хране (нпр. олигосахариди), или припремљени производи који су несварљиви али који се могу ферментисати у танком или дебелом цреву од стране већ присутних микроорганизама за које се предпоставља да имају пробиотска својства. Овакви састојци хране или препарати немају ефекта на стимулацију других бактерија, тако да пробиотски микроорганизми постају доминантна популација. Олигосахариди фруктозе могу да стимулишу раст бифидобактерија у танком и дебелом цреву, за које се сматра да имају пробиотска својства. Поред њих, пребиотски ефекат показују и препарати галактоолигосахарида. Пребиотици омогућавају да се превазиђе проблем уношења пробиотика у организам човека или животиње. Симбиотици представљају комбинацију пробиотика и пребиотика. Селективни пробиотски микроорганизми се примењују у смеси са супстратом високо специфичним за њихов раст. Комбинација пробиотика, пребиотика и симбиотика у производњи функционалне хране је високо интересантан подухват, како са научног тако и са економског аспекта (Topisirević i sar., 2000).

2.4. Фактори који утичу на активност пробиотика

Активност пробиотика је условљена низом фактора међу којима се издвајају таксономске карактеристике врста које их чине, карактеристике супстрата и квалитет животне средине у којој се ферментација одвија, као и величина инокулума пробиотских бактерија.

Тако се, на пример, *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp. карактеришу спорим растом у млеку, као и slabим ацидогеним потенцијалом, што има за последицу продужење времена ферментације, при чему су бифидобактерије изузетно осетљиве на присуство кисеоника и на ниску рН. *Bifidobacterium longum* представља изузетак у овом случају, док је код *Lactobacillus* spp. ово својство изражено у мањем степену. Бифидобактерије у току ферментације стварају сирћетну и млечну киселину у односу 3:2, што у случају претераног раста може да доведе до укуса који подсећа на сирће, а који је апсолутно неприхватљив за потрошача (Obradović i sar., 2002).

Основни супстрат за добијање ферментисаних производа је млеко, али се његов квалитет разликује у односу на порекло (кравље, козје, овчије), начин обраде и др. Млеко као супстрат за ферментацију подлеже различитим третманима од којих су најважнији: добијање жељеног састава, избор одговарајућих термичких третмана како би се добили оптимални услови за развој стартер култура, денатурација протеина сурутке у циљу уклапања у мрежу казеина и самим тим побољшања вискозних производа и деградације супстрата која омогућава бољи развој БМК, а самим тим и пробиотика. Повећање количине суве материје зависи од повећања пуферског капацитета средине. Стварање оптималних услова за развој микроорганизама је омогућено повећањем количине храњивих састојака и продужетком „log“ фазе, тако да стартер културе остају активне у продуженом временском интервалу (Obradović i sar., 2002).

Код производње воћног јогурта, млеку се често додају сахароза или неки од заслађивача али је битно да количина шећера није већа од 10%. Већи садржај шећера је повезан са осмотским притиском који се негативно одражава на ток ферментације. Из тог разлога, оптималан садржај шећера се постиже додавањем 12 – 18% воћа.

Величина инокулума пробиотских бактерија је један од кључних фактора који доприноси жељеном броју живих ћелија у финалном производу. Једно од најједноставних решења овог проблема јесте примена концентрованих култура које представљају велики напредак у примени стартер култура у ферментацији а поготово у

индустрији млека. Са сигурношћу се може констатовати да је савремена прерада млека незамислива без примене ових култура, које се испоручују у лиофилизованом или у смрзнутом стању. Код производње ферментисаних напитака који садрже бактерије *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *B. bifidum* и *B. longum*, примена концентрованих култура представља једино решење. Познато је да наведене бактерије веома споро расту у млеку, а да позитивна својства могу доћи до изражаја само ако број живих ћелија у производима није мањи од 10^6 CFU по јединици запремине. Закључује се да су делотворне само оне ферментације за које се користе стартери са високим концентрацијама живих ћелија (Obradović i sar., 2002).

Фактори средине у којој се прехранбени производ добија су важни за активност пробиотских сојева у њима. На пример, температура ферментације пресудно утиче на карактеристике финалног производа. Пробиотици имају за свој температурни оптимум на 37°C, што је логично јер им је интестинални тракт природна средина. С обзиром да се ферментације обично врше на 43°C, што је оптимум за културу јогурта, примена нижих температура погодује продужавању трајања ферментације и доприноси већим концентрацијама пробиотика. Ацидогена способност стартера у периоду од добијања напитака до конзумирања истог зависи од већег броја фактора као што су финални рН или најнижа могућа рН вредност, температуре чувања као и способност појединих сојева да спорије продукују млечну киселину, при чему се и могући утицај термосензитивности не може изгубити из вида (Obradović i sar., 2002).

2.5. Бактерије млечне киселине као пробиотици

Бактерије млечне киселине су микроорганизми који се најчешће користе као пробиотици у савременој прехранбеној биотехнологији. Ове бактерије су препознате као безбедне за коришћење (енгл. Generally Recognized As Safe – GRAS) и пожељни су чланови цревне микрофлоре (Shokryazdan et al., 2014). То су најчешће врсте из родова *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Bifidobacterium*. Све је већи број молекуларно-биолошких истраживања БМК и потраге за пробиотцима. Познато је да млечни производи направљени на традиционалан начин представљају извор аутохтоних врста бактерија који могу имати пробиотски потенцијал или бити коришћене као природне стартер културе (Uroić et al., 2014).

Током последњих деценија, многи истраживачи су испитивали врсте из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* као пробиотице, за потенцијалну људску употребу (Kimoto-Nira et al., 2007; Hernandez-Hernandez et al., 2012; Shokryazdan et al., 2014). Armas et al. (2017) су указали на могућност употребе БМК у контроли патогена који изазивају маститис. Постоје и подаци који указују на инфекције изазване врстама *Lb. paracasei* и *Lb. rhamnosus*, али су оне су пронађене код особа са ослабљеним имунитетом, што је погодовало развоју инфекције (Hammes & Hertel, 2003; Tolinački, 2012).

У савременим истраживањима, интензивира се испитивање врста из рода *Lactobacillus*, изолованих из традиционалних и природно ферментисаних млечних производа, са аспекта комерцијалне употребе. Упознавањем са особинама ових бактерија, развијају се могућности за њихову примену у производњи ферментисаних напитака у којима се користе пробиотици као стартер културе (Magdoub et al., 2015). Експериментална производња ферментисаног ацидофилног напитка у облику јогурта или киселог млека, где је као стартер култура коришћен природни изолат *Lb. acidophilus* BGRA 43, спроведена је у „Млекари Земун“ у Земуну. Добијени производ је био добрих сензорних својстава која се нису мењала у периоду од 17 дана при чувању на +50°C. Главне потешкоће су везане за спор раст већине сојева *Lb. acidophilus* у млеку, поготову без додатака стимулатора раста, као и одржавање вијабилности бактерија током складиштења до финалне употребе, релативно високе киселости и веома често услед неприхватљивог мириса или конзистенције производа. Ферментисани напитака „YAKULAT“ је направљен коришћењем *Lb. casei* Shirota, као стартер културом. Доказано је да су и једна и друга врста лактобацила пробиотици (Topisirević i sar., 2001). Од велике важности је напоменути да су биолошки ефекти које поседују пробиотске бактерије специфични за одређени сој. Не постоји универзални сој који би испунио све наведене критеријуме, чак ни изолати у оквиру исте врсте (Vasiljević & Shat, 2008; Solieri et al., 2014; Pavli et al., 2016).

Бактерије из родова *Bifidobacterium* и *Lactobacillus* су добро познате пробиотске културе, док се врсте из рода *Enterococcus* ретко користе као пробиотици за људе и животиње (Franz et al., 2003; Temmerman et al., 2003). Иако су ентерококе познате као контаминанти хране, неколико истраживања указује на потенцијалну употребу ентерокока као пробиотика (Sivieri et al., 2008; Franz et al., 2011; Ferreira Araújo & de Lucis Fortes Ferreira, 2013). Доминантне врсте овог рода пронађене у храни су *E. faecalis* и *E. faecium* (Hardie & Whiley, 1997; Muruzović et al., 2018a). До сада, ентерококе су коришћене као додатак за исхрану животиња (Ferreira Araújo & de Lucis Fortes Ferreira,

2013). Неки аутори показују да ентерококе имају неке пожељне карактеристике пробиотика, као што су отпорност на желудачни сок и жучне соли (Rossi et al., 2003) и способност продукције антимикробних једињења, као што је ентероцин (Franz et al., 1999; Saarela et al., 2000). Ограничење за коришћење ентерокока као пробиотика је у томе што показују отпорност на антибиотике и могу учествовати у хоризонталном трансферу гена за резистенцију (Billström et al., 2008; Erbas et al., 2016).

Способност формирања биофилма

У процесу ферментације, БМК су изложени варијабилним условима животне средине (који прате поступак прављења сира), укључујући разлике у температури, другачијој врсти и концентрацији шећера, рН и различитој концентрацији соли (Rao et al., 2004). Ови услови животне средине имају значајну улогу у способности адхезије и формирању бактеријског биофилма (Mirkar et al., 2016). Gravesen et al. (2005) и Abdallah et al. (2014) сугеришу да је формирање биофилма бактеријски одговор на стресне услове средине.

Према Vert et al. (2012), биофилм је заједница адхерентних ћелија микроорганизама у којима су ћелије често уроњене у самопроизведени омотач изграђен од екстрацелуларне полимерне супстанце (ЕПС), адхерентни једни за друге и/или за површину. Познато је да бактерије из млека имају способност да формирају мултиспецијске биофилмове (Teh et al., 2014). У неким студијама је показана способност БМК изолованих из сира да формирају биофилм (Somers et al., 2001; Gómez et al., 2016). Способност бактерија да формирају биофилм се углавном везивала за њихову потенцијалну патогеност. Постоји све већи број студија које показују да је способност формирања биофилма БМК у корелацији са адхезивном способношћу бактерија, која је један од показатеља пробиотских потенцијала БМК (Johansson & Rasmussen, 2013; Elhadidy & Zahran, 2014; Živković et al., 2016; Popović et al., 2018). Winkelströter et al. (2013) су показали да биофилмови формиран од стране БМК присутних у намирницама могу бити средство за спречавање формирања биофилма патогених бактерија. Crowley et al. (2011) су закључили да је формирање биофилма *Streptococcus uberis* у корелацији са регулацијом гена који су важни за патогенезу. Macovei et al. (2009) истичу да *Enterococcus hirae* производи до сада непознату, слабу протеазу, која не доприноси формирању биофилма. Сојеви *Lactobacillus* spp., који су показали способност формирања биофилма, били су у стању да контролишу развој врсте *L. monocytogenes* на абиотичким површинама (Pérez-Ibarreche et al., 2014). Salas-Jara et al. (2016) су

истраживали и потврдили корисни ефекат биофилма *Lb. fermentum*, укључујући повећану отпорност на температуру и рН вредност желуца. Kubota et al. (2009) су истраживали реакције биофилма и планктонских ћелија *Lb. plantarum* subsp. *plantarum* на стресне животне услове. Закључили су да планктонске бактеријске ћелије показују смањену отпорност на сирћетну киселину, док биофилмови показују већу отпорност. Указали су и на значај контроле биофилмова БМК у прехранбеној индустрији. Охаган et al. (2012) су показали способност *L. lactis* да формира биофилм на чврстим површинама. Gaglio et al. (2016) су истраживали способност *L. lactis* subsp. *cremoris* да формира биофилм на дрвеним површинама посуда, које су коришћене у процесу производње „Vastedda“ сира. Они су показали да је, у присуству биофилма *L. lactis* subsp. *cremoris* на дрвеним површинама, смањена микробиолошка варијабилност сира.

Хидрофобност, способност аутоагрегације и коагрегације

Поред толеранције на гастроинтестиналне услове, који је један је од основних критеријума на основу којих се нека аутохтона бактерија може сматрати потенцијалним пробиотиком (Hernandez-Hernandez et al., 2012), способност адхезије на слузи и епителне ћелије црева је важна особина пробиотика (Kos et al., 2003; Botes et al., 2008). Способност бактеријске адхезије може спречити њихову непосредну елиминацију перисталтиком црева и пружа конкурентску предност у овом екосистему (Alander et al., 1997; Kos et al., 2003). Постоји велики број *in vitro* модела који се користи за проучавање адхезије пробиотских ћелија за епителне ћелије, у којима је пронађено много потешкоћа, што је довело до развоја *in vitro* моделних система за прелиминарну селекцију потенцијално адхерентних сојева (Kimoto-Nira et al., 1999; Kos et al., 2003; Botes et al., 2008; Carasi et al., 2014; Garriga et al., 2014; Sitepu et al., 2016).

Аутоагрегација се дефинише као везивање бактерија које припадају истом соју, док је коагрегација процес којим се генетски различите бактерије везују једна за другу преко специфичних молекула. Такав начин повезивања може утицати на развој мултиспецијских биофилмова (Rickard et al., 2003). Многи аутори су указали да је аутоагрегација БМК неопходан предуслов за адхезију на цревне епителне ћелије и да способност коагрегације може да представља баријеру која спречава колонизацију црева патогеним микроорганизмима (Del Re et al., 2000; Kos et al., 2003; Aslim et al., 2007; Mc Millan et al., 2011; Younes et al., 2012).

Хидрофобност површине ћелије може утицати на аутоагрегацију и адхезију бактерија на различите површине (Del Re et al., 2000). Постоји неколико студија које су показале да су, у механизам аутоагрегације код лактобацила, укључени протеини присутни у супернатанту културе и протеини или липопротеини који се налазе на површини ћелије (Kmet & Lucchini, 1997; Kos et al., 2003; Schachtsiek et al., 2004; Ekmekci et al., 2009).

Jin et al. (2007) и Ekmekci et al. (2009) су доказали да су *Lactobacillus* spp., изоловани из цревног и вагиналног тракта, показали способност коагрегације са *Candida* sp. или *E. coli*. Janković et al. (2012) су показали да *Lb. plantarum*, изолован код домаћих крава и из овчијих сирева, показује способност коагрегације са неким патогенима који се преносе храном, као што су *S. enterica* serotype *typhimurium* и *L. monocytogenes*. Li et al. (2015) истичу да неки родови БМК (*Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Enterococcus*), изоловани из кинеске традиционалне ферментисане хране, показују добре способности коагрегације са врстама из рода *Salmonella*.

2.6. Метаболички продукти бактерија млечне киселине и њихова антимикробна активност

БМК, изоловане из млечних производа, показују способност производње антимикробних једињења, што онемогућава раст и развој нежељених бактерија у млечним производима (Scatassa et al., 2015; 2017). Један од критеријума за селекцију пробиотских сојева је њихова способност да побољшају природну одбрамбену моћ домаћина у односу на патогене, лучењем антимикробних супстанци (Morelli, 2000). Многи аутори истичу да је антимикробна активност БМК веома варијабилна и да је то једна од генерално лоших особина БМК (Casei et al., 2004; Hernandez et al., 2005; Fayol-Messaoudi et al., 2005; Casey et al., 2007; Alomar et al., 2008; Lievin-Le Moal et al., 2013; Atanasova et al., 2014).

Могућност коришћења БМК као природних биоконзерванаса хране се интензивно проучава зато што БМК показују антимикробну активност у односу на бројне патогене (Galvez et al., 2007; Fraga Cottelo et al., 2013). Антимикробна једињења која производе ова бактерије могу инхибирати раст патогена попут *E. coli*, *S. aureus*, или *L. monocytogenes*. Cheong et al. (2014) су показали да БМК, изоловане из различитих

биљака, воћа и поврћа, поседују антифунгалну активност. Врсте из рода *Lactobacillus*, заједно са другим припадницима БМК, показују потенцијал да инхибирају раст других конкурентских микроорганизама у еколошким нишама које насељавају. У току своје еволуције, бактерије из рода *Lactobacillus* су се често налазиле у комплексним бактеријским заједницама, и сматра се да то може бити релевантно објашњење за развој њиховог антимикуробног потенцијала (Makarova et al., 2006; Makarova & Koonin, 2007), које углавном остварују снижавањем рН у својој околини, стварајући на тај начин неповољне услове за развој других бактерија, које нису толерантне на ниску рН. *Lb. fermentum*, изоловани из „Tulum“ сира, показује антимикуробни ефекат у односу на раст других бактерија и испуњава одређене критеријуме као пробиотик (Tulumoglu et al., 2014). Heredia-Castro et al. (2015) истичу да *Lactobacillus* spp., изоловани из мексичког „Cocido“ сира, показују антимикуробни ефекат на раст *S. aureus*, *Listeria innocua*, *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. *L. lactis* subsp. *lactis*, изоловани из сировог млека и сирева пореклом из Сардиније, показује инхибиторну активност на раст *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp. и *Clostridium* spp. (Pisano et al., 2015). Неке ентерококе се успешно користе као природни конзерванси хране, јер имају потенцијал да инхибирају раст микроорганизама у храни. Ентерококе производе млечну киселину, која смањује рН и узрокује поремећај транспортних система бактеријске ћелије кроз промену пермеабилности ћелијске мембране. Ентерококе могу да продукују и друге антимикуробне супстанце као што су водоник пероксид и бактериоцини (Amor et al., 2006; Zheng et al., 2015). Поред свих наведених особина, БМК имају и способност синтезе бројних једињења чија производња зависи од фактора средине, али и од генетичког потенцијала одређене врсте или соја (Hammes & Tichaczek, 1994; Ouwehand, 1998; Tolinački, 2012).

Хемијску основу антимикуробне активности БМК најчешће чине органске киселине, водоник пероксид (H_2O_2), угљен диоксид (CO_2), диацетил, ацетилалдехид, масне киселине, пироглутаматска киселина (РСА) и бактериоцини.

Органске киселине. Ферментација шећера од стране БМК одликује се акумулацијом органских киселина, чиме долази до снижавања рН и постиже се антимикуробни ефекат (Gould, 1991). Најчешће органске киселине које продукују су млечна, сирћетна и пропионска киселина.

Млечна киселина је главни метаболички производ ферментације БМК, где се у равнотежи налазе њена дисосована и недисосована форма. Степен дисоцијације зависи

од рН средине. При ниским рН, велика количина млечне киселине, у недисосованој форми, испољава антимикурно дејство на различите врсте бактерија, плесни и квасаца. Позната је инхибиторна способност млечне киселине према микроорганизмима. Млечна киселина се јавља у два оптичка изомера: D(-) млечна киселина и L(+) млечна киселина, од чега се L(+) млечна киселина више примењује током прераде хране. L(+) форма млечне киселине је природно заступљена у људском организму преко ензима L-лактат-дехидрогеназе (Couto & Sanromán, 2006). Веће дозе D(-) изомера су штетне за људско здравље, посебно за новорођенчад (Zhang et al., 2007). *E. coli* је осетљива на L(+) млечну киселину, док је раст *L. monocitogenes* инхибиран у присуству D(-) млечне киселине (Gravesen et al., 2004).

Сирћетну и пропионску киселину производе хетероферментативни сојеви БМК. Антимикурно дејство се испољава у интеракцији са ћелијском мембраном и изазивању интрацелуларног снижавања рН и денатурације протеина. Показано је да сирћетна и пропионска киселина имају јачи антимикурни ефекат од млечне киселине јер на ниским рН имају већи проценат недисосоване форме од млечне киселине (Earnshaw, 1992). Сирћетна киселина може деловати синергистички са млечном киселином која, снижавањем рН вредности медијума, повећава токсичност сирћетне киселине (Adams & Hall, 1988).

Водоник пероксид (H_2O_2). Неке БМК имају способност продукције водоник пероксида, који се продукује у присуству кисеоника као резултат деловања флавинских оксидаза, NADH оксидаза или супероксид дисмутаза. Антимикурно дејство H_2O_2 се огледа у снажном оксидујућем ефекту на ћелије бактерија. На тај начин, долази до денатурације бројних ћелијских ензима, протеина и мембранских липида чиме се повећава пермеабилност ћелијске мембране (Kong & Davison, 1980). H_2O_2 може да буде и прекурсор за настанак слободних радикала, као што су супероксид (O_2^-) и хидроксилни јон (OH^-), који могу оштетити ДНК (Byczkowski & Gessner, 1988). Неке врсте из рода *Lactobacillus* синтетишу H_2O_2 , а с обзиром да не поседују ензим каталазу, долази до акумулирања H_2O_2 у медијуму, чиме се постиже антимикурни ефекат (Kandler & Weiss, 1986; Tolinački, 2012).

Угљен диоксид (CO_2). Угљен диоксид се продукује у процесу ферментације код хетероферментативних БМК. Прецизан механизам његовог антимикурног деловања је још увек непознат, али се зна да CO_2 има улогу у формирању анаеробног окружења, па

је највероватније да доводи до инхибиције ензимске декарбоксилације или да акумулацијом у двослоју мембране може да проузрокује промену њене пропустљивости (Eklund, 1984; Tolinački, 2012).

Диацетил. Диацетил настаје као крајњи производ у метаболизму цитрата код појединих врста из родова *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* и *Streptococcus*. Диацетил интерферира са аргинин-везујућим протеинима и на тај начин онемогућава искоришћеност аргинина, чиме се постиже инхибиција раста Грам-негативних бактерија. Диацетил може деловати синергистички са другим антимикуробним факторима и на тај начин допринети очувању ферментисаних намирница (Jay, 1982; Tolinački, 2012).

Ацеталдехид. Ацетилалдехид се синтетише под деловањем ензима треонин алдолазе. Способност његовог синтетисања показује врста *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Показано је да *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *S. thermophilus* у јогурту не могу да метаболишу ацеталдехид, па се он нагомилава у производу и при концентрацијама од 10 – 100 ppm спречава раст *S. aureus*, *S. typhimurium* и *E. coli* у млечним производима (Piard & Desmazeaud, 1991; Tolinački, 2012).

Масне киселине. Под специфичним условима, неке врсте из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* показују липолитичку активност (Sanz et al., 1988). Незасићене масне киселине делују инхибиторно на раст Грам-позитивних бактерија (Gould, 1991), а дејство остварују преко недисосованих форми, јер је уочено да на нижим рН испољавају већи антимикуробни потенцијал (Kabara, 1993). Доказано је да антифунгална активност масних киселина зависи од дужине ланца, концентрација и рН медијума (Gould, 1991; Tolinački, 2012).

Пироглутаматска киселина. Способност да синтетишу пироглутаматску киселину показали су *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* и *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (Mucchetti et al., 2002). Показано је да она испољава инхибиторну активност у односу на раст *B. subtilis*, *Enterobacter cloacae* и *Pseudomonas putida* (Huttunen et al., 1995; Tolinački, 2012).

Бактериоцини. Бактериоцини су протеини или протеински комплекси који испољавају антимикробно дејство (Nes & Johnsborg, 2004). Углавном су мали, термостабилни, позитивно наелектрисани пептиди који интерреагују са бактеријском мембраном, након чега заузимају амфифилну (дуалну) конформацију. Бактериоцини своје дејство испољавају повећањем мембранске пропустљивости, а то доводи до губитка малих метаболита из бактеријске ћелије (Heng et al., 2007). Мањи број до сада окарактерисаних бактериоцина Грам-позитивних бактерија инхибира широк спектар бактерија као што је случај са лантибиотицима, низином или мутацином В-Ny266 који делују на врсте из родова *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*, а испољавају дејство и на патогене Грам-негативне бактерије, као што су врсте из родова *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* и *Neisseria* (Mota-Meira et al., 2000, 2005; Tolinački, 2012). Неке студије су описале могућност коришћења бактериоцина који производе БМК, за биоконзервацију сирева (Hernandez et al., 2005; O'Sullivan et al., 2006). Познато је да различита рН вредност, различити медијуми за раст и температура могу утицати на производњу бактериоцина врста из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* (Aasen et al., 2000; Juarez Tomás et al., 2002; Mataragas et al., 2003). Познато је да *S. uberis* производи уберилизин који изазива лизу метаболички активних, осетљивих бактерија (Wirawan et al., 2007). Бактериоцини су јако разноврсни у смислу њихове величине, антимикробног спектра, начина деловања и механизма помоћу којих се остварује имуност или резистенција на њихово дејство. Све ове особине јасно указују на важну улогу коју бактериоцини имају, али је мање познато како је таква разноликост настала и које то све улоге бактериоцини имају у оквиру бактеријских заједница. De Vuyst & Leroy (2007) су изнели мишљење да је основна улога бактериоцина да соју који га производи обезбеди еколошку предност над компетиторима у оквиру комплексних микробиолошких заједница. Drider et al. (2006) износе став да се еколошка предност огледа и у способности појединих сојева БМК да произведу више од једног бактериоцина са различитим инхибиторним спектром, што им омогућава опстанак у окружењу које деле са блиско сродним врстама са којима су у конкуренцији за исте нутријенте.

Имајући у виду да заједница БМК у сокобањском сиру представља неистражену, аутохтону бактериобиоту сира која може поседовати особине значајне за прехранбену биотехнологију или потенцијалну примену изолата као пробиотика, постоји потреба за интензивирањем истраживања о својствима ове групе бактерија.

3. ЦИЉЕВИ РАДА

Ц

иљ докторске дисертације је да се у условима *in vitro* упозна заједница бактерија млечне киселине у сокобањском сиру и прошире фундаментална знања о изолованим врстама БМК пореклом из аутохтоног прехранбеног производа (сокобањски сир), као и да се створи основа за развој нових стартер култура или пробиотских сојева. Из овог општег циља, произилазе посебни

циљеви, а то је да се:

- Испита хемијски састав сокобањског сира, традиционалног прехранбеног производа, који је одабран као извор аутохтоних БМК.
- Испита квалитативни и квантитативни састав, као и динамика заједнице БМК у сокобањском сиру.
- Испитају биохемијска и физиолошка својства БМК пореклом из аутохтоног производа и изврши компаративна анализа у односу на стандардне сојеве и сојеве који се користе у биотехнологији (као пробиотици).
- Испита антимикуробни ефекат изолованих БМК у односу на изабране ентеробактерије изоловане из истог сира.
- Испита пробиотски потенцијал изабраних аутохтоних БМК, у односу на дефинисане критеријуме које треба да испуне (раст и преживљавање у условима гастроинтестиналног тракта, раст у различитим концентрацијама различитих врста пребиотских супстрата, способност формирања биофилма, хидрофобност и способност аутоагрегације, коагрегације и адхезије, осетљивост на релевантне антибиотике, способности синтезе хемолизина на крвном агару и синтезе биогених амина, као и способност преживљавања у присуству фенола) и формира колекција изолата који показују потенцијал за даље истраживање и примену.
- Испита способност продукције одређених ензима и процени улога БМК у органолептичким особинама сира.
- Испита способности преживљавања изолата БМК у различитим условима животне средине. Добијени подаци ће указати који је опсег еколошких фактора који изолати могу да толеришу и бити основа за развој и оптимизацију метода за контролу микроорганизама у технологији производње сира.

4. МАТЕРИЈАЛ

4.1. Сокобањски сир

У домаћинствима из села Језеро, Дуго Поље и Читлук из југоисточне Србије (околина Сокобање), постоји традиција производње једне врсте белог сира познатог као „сокобањски сир“. Свеже, пуномасно, кравље млеко се процеди након јутарње и вечерње муже, а затим догрева до температуре од 30 – 40°C. Количина сирила која се додаје у млеко зависи од количине млека.

За прављење сокобањског сира, користе се два врста сирила (маје): „СИРЕЛА“ и „РЕКОРДЕРКА“. Често се при традиционалном прављењу Сокобањског сира, мешају обе маје или се користе појединачно једна или друга. Ни једна ни друга маја не садрже бактеријске стартер културе. „СИРЕЛА“ (Чачак, Србија) је течно сирило на бази химозина добијеног од гљива *Rhizomucor miehei* и *Mucor miehei*. Дозирање је прилагођено како за употреби у домаћинству, тако и за потребе млекарске индустрије при производњи различитих врста сирева (<http://www.sirela.co.rs/>). Осим маје „СИРЕЛА“, користи се и „РЕКОРДЕРКА“ (Саталаћ, Србија), која садржи бензоеву и сорбинску киселину (1,2%) у односу 1:5000 (<http://www.pttimenik.com/prehrambeni-proizvodi-i-repromaterijal-za-prehrambenu-industriju-zdrava-hrana/stalac/rekorderka>).

Време трајања подсиравања је око 30 минута. Брзина грушања млека зависи од температуре и од врсте сирила. Мешање груша се врши дрвеном варјачом или кутлачом, а цеђење се врши у грудњачама, док не изађе сва сурутка. Пресовање груде (сирне погаче) се врши плочастим каменом, тежине до 1 kg, неколико сати. Груда која се добије је пречника 28 ± 3 cm, а дебљине 4,5 cm. Сир се оставља да зри у дрвеним посудама. Према времену зрења, сир може бити млади или се оставља на ферментацију док се на површини не формира превлака која га штити од кварења и формира његов мирис и укус. Сирна погача се сече на кришке неправилног облика, обично димензија $12 \times 16 \times 4,5$ cm. Сир се соли, тако што се додаје 6 – 8% NaCl на укупну масу сира. Саламура за чување сира прави од слане и прокуване сурутке или воде. Овако добијен сир се складишти у оставама, на температури око 10°C. Сир коришћен у току израде докторске дисертације је био млад, стар три дана, тако да није било процеса зрења. До сада се сир није паковао као оригинални производ, већ се одмах продавао.

4.2. Микробиолошке подлоге

За потребе истраживања ове дисертације су коришћене дехидратисане подлоге (Торлак, Београд, Србија и Merck GmbH, Darmstadt, Germany), које су растваране у дестилованој води (dH₂O), према инструкцијама произвођача. Након растварања, проверавана је рН сваке подлоге и вршена је стерилизација подлога на 121°C при притиску од 1,5 бар-а, у трајању од 15 – 20 минута.

MRS бујон (Торлак, Београд, Србија); рН 6,4 ± 0,2

– подлога за култивисање и умножавање *Lactobacillus* spp.

Пепрон Торлак	10,0 g
Месни екстракт	10,0 g
Екстракт квасца	5,0 g
Декстроza	20,0 g
Калијум-хидрогенофосфат	2,0 g
Натријум-хлорид	5,0 g
Натријум-ацетат	2,5 g
Магнезијум-сулфат	1,1 g
Манган-сулфат	0,2 g
dH ₂ O	1000 mL

MRS агар (Торлак, Београд, Србија); рН 6,4 ± 0,2

– подлога за изоловање, култивисање, бројање и одржавање *Lactobacillus* spp.

Пепрон Торлак	10,0 g
Месни екстракт	10,0 g
Екстракт квасца	5,0 g
Декстроza	20,0 g
Калијум-хидрогенофосфат	2,0 g
Натријум-хлорид	5,0 g
Натријум-ацетат	2,5 g
Магнезијум-сулфат	1,1 g
Манган-сулфат	0,2 g
Агар	12 g
dH ₂ O	1000 mL

M17 бујон (Merck GmbH, Darmstadt, Germany); pH 7,2 ± 0,2

– подлога за култивисање и умножавање *Lactococcus* spp.

Пептон из соје меса	5,0 g
Пептон из меса	2,5 g
Пептон из казеина	2,5 g
Екстракт квасца	2,5 g
Екстракт меса	5,0 g
Лактоза-монохидрат	5,0 g
Аскорбинска киселина	0,5 g
Натријум β-глицерофосфат	19,0 g
Магнезијум-сулфат	0,25 g
dH ₂ O	1000 mL

M17 агар (Merck GmbH, Darmstadt, Germany); pH 7,2 ± 0,2

– подлога за изоловање, култивисање, бројање и одржавање *Lactococcus* spp.

Пептон из соје меса	5,0 g
Пептон из меса	2,5 g
Пептон из казеина	2,5 g
Екстракт квасца	2,5 g
Екстракт меса	5,0 g
Лактоза-монохидрат	5,0 g
Аскорбинска киселина	0,5 g
Натријум β-глицерофосфат	19,0 g
Магнезијум-сулфат	0,25 g
Агар	12,75 g
dH ₂ O	1000 mL

Ескулин жучни агар или Рошера (Rochaix) подлога (Торлак, Београд, Србија); рН $7,1 \pm 0,2$

– подлога за идентификацију ентерокока

Пептон Торлак	10,0 g
Говеђа жуч	20,0 g
Ескулин	1,0 g
Гвожђе(III)-амонијумцитрат	1,0 g
Агар	16,0 g
dH ₂ O	1000 mL

Ескулин бујон (Торлак, Београд, Србија); рН $7,5 \pm 0,2$

– подлога за детекцију способности ентерокока да хидролизују ескулин

Хранљиви бујон Торлак	15,0 g
Ескулин	1,0 g
Декстроza	1,0 g
dH ₂ O	1000 mL

Аргинин бујон (Торлак, Београд, Србија); рН $7,5 \pm 0,2$

– подлога за детекцију способности хидролизе аргинина

Триптон Торлак	5 g
Екстракт квасца	5 g
L-аргинин	3 g
Декстроza	0,5 g
Калијум-хидрогенофосфат	2 g
dH ₂ O	1000 mL

Хранљиви агар (Торлак, Београд, Србија); pH $7,3 \pm 0,2$

– подлога за култивацију индикаторских бактерија (ентеробактерија) и бројање аеробних мезофилних микроорганизама

Пептон Торлак	15,0 g
Месни екстракт	3,0 g
Натријум-хлорид	5,0 g
Калијум-хидрогенофосфат	0,3 g
Агар	18,0 g
dH ₂ O	1000 mL

Крвни агар (Oxoid, Hampshire, United Kingdom); pH $7,4 \pm 0,2$

– подлога за испитивање потенцијалне патогености изолованих бактерија

Хранљиви супстрат (екстракт срца и пептони)	20,0 g
Натријум-хлорид	5,0 g
Агар	15,0 g
Дефибринисана овчија крв	50 – 80 mL
dH ₂ O	1000 mL

Подлога са обраним млеком; pH $6,6 \pm 0,2$

– подлога за прелиминарно испитивање протеолитичке активности

Обрано млеко у праху	44 g
Натријум-цитрат	8 g
Екстракт квасца	1 g
Декстроza	5 g
Агар	15 g
dH ₂ O	1000 mL

Подлога са лецитином

– подлога за прелиминарно испитивање липолитичке активности

Амонијум-сулфат	0,5 g
Магнезијум-хлорид	0,3 g
Натријум-хлорид	0,3 g
Манган-сулфат	у траговима
Гвожђе-сулфат	у траговима
Декстроза	20 g
Калцијум-карбонат	10 g
Агар	17 g
dH ₂ O	1000 mL
Лецитин	0,3 у 1 mL етил алкохола

Цитратни агар; pH 6,8 ± 0,2

– подлога за испитивање способности коришћења цитрата

Обрано млеко у праху	10 g
Хидролизат казеина	2,5 g
Декстроза	5 g
Агар	18 g
dH ₂ O	1000 mL

4.3. Раствори и реагенси

Фосфатни пуфер – PBS (10 ×) (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany); pH 7,4

Na ₂ HPO ₄	80 mM
NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	100 mM

Водоник пероксид (3%) – H₂O₂ (Зорка Шабац, Шабац, Србија)

Физиолошки раствор

Натријум-хлорид	8,9 g
dH ₂ O	1000 mL

7% раствор гвожђе (III)-хлорида – за испитивање способности коришћења ескулина

Гвожђе (III)-хлорид	7 g
dH ₂ O	100 mL

Фенил црвено

– индикатор за испитивање способности коришћења аргинина

У 0,2 g индикатора фенил црвено додати 1 mL етил алкохола, добро промућкати и затим додати дестиловану воду, до 10 mL раствора. Реагенс добро промућкати и чувати у тамној, стакленој бочици.

Раствори за испитивање способности коришћења цитрата

Раствор А – 10% K₃Fe(CN)₆

Раствор Б – 0,025 g mL⁻¹ гвожђе-цитрата и 0,025 g mL⁻¹ натријум-цитрата

Раствори за испитивање пробиотског потенцијала

AGF (*Artificial Gastric Fluid*, вештачки желудачни сок, pH 2,0)

Пепсин	0,22%
Натријум-хлорид	0,5%
Калијум-хлорид	0,7 mM
Натријум-хидрогенкарбонат	0,45 mM
dH ₂ O	100 mL

AIF (*Artificial Intestinal Fluid*, вештачки интестинални сок, pH 8,0)

Панкреатин USP	0,2% (w/v)
Жучне соли	0,4% (w/v)
Натријум-хлорид	0,5%
dH ₂ O	100 mL

Реагенси за доказивање активности ензима

Кисела и алкална инвертаза: Стандард глюкозе (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA), динитросалицилни реагенс, фосфатни пуфер (pH 8,0), натријум-ацетатни пуфер (pH 4,5)

Алкална протеаза: 2% казеин, 5% ТСА, 6% Na₂CO₃, Folin-Ciocalteu, стандардни раствор L-тирозина (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA)

Алкална фосфатаза: β-глицерофосфат, гликолни пуфер (pH 9,0), 10% ТСА (трихлорсирћетна киселина), амидол, 60% PCA, NH₄-молибдат

α-амилаза: Скроб, стандард малтозе (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA), динитросалицилни реагенс, фосфатни пуфер (pH 6,9)

Концентрација протеина у ферментационој течности: Bradford-ов реагенс, БСА протеински стандард (**B**ovine **S**erum **A**lbumin) (1 mg mL⁻¹) (Sigma Aldrich Co., St. Louis, USA)

5. МЕТОДЕ

5.1. Узорковање сира

За потребе овог истраживања коришћен је сокобањски сир старости три дана. Узорковање је вршено у изабраним домаћинствима села Језеро (1), Дуго Поље (2) и Читлук (3) из југоисточне Србије. Избор домаћинстава је вршен случајним одабиром међу онима у којима се сир производи традиционално, на исти начин, дужи низ година. Узорци сира, тежине 300 g, узимани су у сваком изабраном домаћинству, у три годишња доба (пролеће (П), лето (Л) и јесен (Ј)) ради процене динамике бактериобиоте у сиру, у зависности од еколошких услова. Узорци су асептично узети и чувани на 4°C у фрижидерима и транспортовани до Лабораторије за Микробиологију, Института за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу. Изолација је започета највише након 24 сата од узорковања („Sl. glasnik RS“, br. 73/2010; Vodić za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, 2011).

5.2. Испитивање хемијских карактеристика сира

Испитивање хемијских карактеристика сира је вршено сагласно Правилнику о методама узимања узорака и методама хемијских и физичких анализа млека и производа од млека („Sl. Glasnik RS“, br. 32/83).

5.2.1. Одређивање количине воде у сиру

За испитивање количине воде у сиру одмерено је $3 \text{ g} \pm 0,001 \text{ g}$. Посуда са узорком је осушена 2 h на температури од $105^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ а потом охлађена и измерена. Сушење је понављано док разлика између два узастопна мерења није била мања од 1 mg. Извршена су два мерења на истом узорку.

5.2.2. Одређивање садржаја масти у сиру

Садржај масти у сиру је одређен ацидобутирометријском методом (International IDF Standard 221, 2008). Добро хомогенизован узорак сира (3 g) је унет у бутирометар (Funke Gerber, Berlin, Germany). С горње стране бутирометра је унето пипетом

одмерених 10 mL сумпорне киселине (Merck, Darmstadt, Germany) и бутирометар је загреван у воденом купатилу на 65°C уз повремено мућкање, да се беланчевине сира сасвим растворе. Када су беланчевине растворене, у бутирометар је унето 1 mL амил-алкохола (Merck, Darmstadt, Germany) и поново промућкано неколико пута. Потом је кроз горњи отвор бутирометра додато онолико сумпорне киселине колико је потребно да горњи менискус достигне број 35 на скали. Бутирометар је промућкан и центрифугиран Герберовом центрифугом (Funke Gerber, Berlin, Germany), 10 минута на 1000 до 1200 обртаја у минути. Загревање у воденом купатилу и центрифугирање бутирометра поновљено је још два пута. Извршена су два мерења.

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

$$[\text{Проценат масти} \times 100] / \text{Сува материја (\%)} \quad (1)$$

Садржај воде у материји без масноће израчунава се према формули:

$$[\text{Количина воде у сиру} \times 100] / [100 - \text{количина масти у сиру}] \quad (2)$$

5.2.3. Одређивање киселости сира

За испитивање киселости сира одмерено је $5 \text{ g} \pm 0,0001 \text{ g}$ испитиваног узорка сира. Узорак сира је измешан са 100 mL дестиловане воде. Тој смеши је додато 1 mL 2% фенолфталеина (AppliChem, Darmstadt, Germany) и садржај је титриран децимоларним раствором NaOH (Merck, Darmstadt, Germany) док се не појави ружичаста боја, која мора бити постојана два минута. На истом узорку за испитивање извршена су два мерења.

5.2.4. Одређивање pH вредности сира

pH вредност сира је одређена потенциометријски, у раствору сира припремљеног мешањем 10 g сира и 10 mL дестиловане воде. Мерење је вршено pH-метром (pH-vision 246071, Ex tech instruments) уз претходну калибрацију стандардним растворима (pH 4,01 и 7,0).

5.2.5. Одређивање садржаја натријум-хлорида (NaCl) у сиру

За испитивање садржаја натријум-хлорида (NaCl) у сиру, коришћена је титриметријска метода, која се заснива на разарању органске супстанце сира уз помоћ KMnO_4 (калијум перманганата, AppliChem, Darmstadt, Germany) и HNO_3 (нитритне киселине, Merck, Darmstadt, Germany). Хлоридни јони су одређени титрацијом са 0,1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SCN}$ (амонијум роданид, Centrohem, Србија) до појаве црвеносмеђе боје која је постојана 30 секунди.

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

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

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

5.3. Методе микробиолошких испитивања

5.3.1. Припрема узорака сира за изолацију и одређивање укупног броја вијабилних бактерија млечне киселине и укупног броја аеробних мезофилних бактерија

Припрема узорака сира, почетне суспензије и серије децималних разблажења узорака сира су вршене према ISO 6887-5:2010 стандарду. Узорци су узимани стерилном кашиком из средине сира, пребачени у стерилну посуду, одакле је, по принципу стерилности, измерено 10 g радног узорка. Радни узорак је затим хомогенизован у 90 mL 2% раствора натријум-цитрата (pH 7,5) (Alkaloid, Skoplje, Makedonija), који је предходно стерилисан (121°C / 15 – 20 минута) и охлађен до 45°C . Узорак сира у натријум-цитрату је мешан на вортексу све док се не постигне потпуна хомогенизација, а затим се сукцесивно припремају серије децималних разблажења (до 10^{-7}) са 2% натријум-цитратом (1 mL узорка се одпипетира у 9 mL натријум-цитрата). По 1 mL сваког разблажења је одпипетирано у стерилну петри кутију и мешано са селективним подлогама: за изолацију лактобацила, коришћен је MRS агар; за изолацију лактокока, коришћен је M17 агар, док је за изолацију ентерокока, коришћен ескулин жучни агар (Manu et al., 2002). За бројање укупних аеробних мезофилних бактерија, коришћен је хранљиви агар. Након солидификације, M17, MRS и ескулин жучни агар се наливају

танким слојем истог медијума, како би се обезбедили микроаерофилни услови за раст бактерија. Након инкубације (37°C / 48 h), плоче које су садржале између 20 и 300 колонија су изабране за бројање и изолацију бактеријских колонија (сл. 1). Укупан број живих микроорганизама је одређен према формули:

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



Слика 1. Изглед колонија бактерија млечне киселине на MRS агару
(Фото: М. Грујовић)

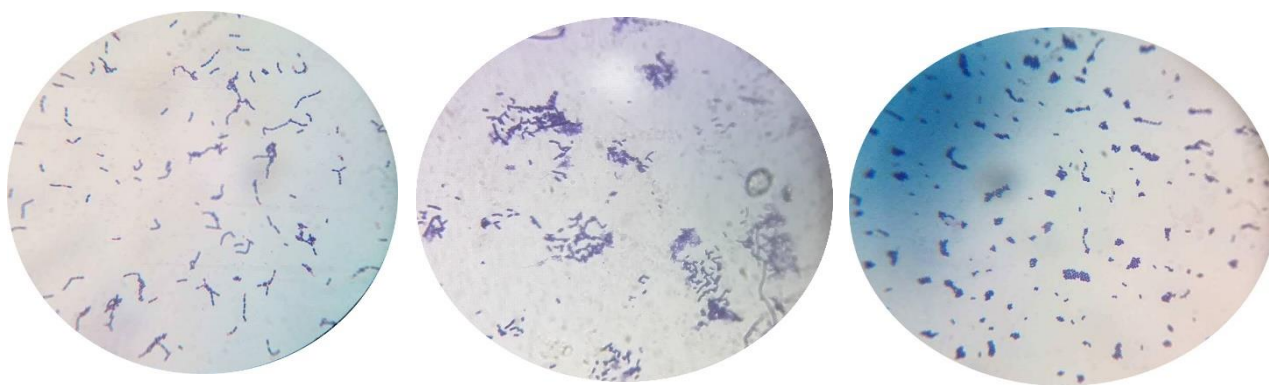
5.3.2. Изолација и идентификација бактерија млечне киселине

Одабране су појединачне колоније са M17, MRS и ескулин жучног агара и пренете на нове, стерилне петри плоче, ради пречишћавања. Након раста на 37°C / 48 h, пикиране су појединачне колоније и пренете у одговарајуће бујоне. Након инкубације, вршена је прелиминарна идентификација изолата која обухвата:

1. Бојење ћелија по Граму
2. Каталаза тест
3. Испитивање физиолошких и биохемијских карактеристика изолованих сојева
4. Испитивање способности ферментација угљених хидрата (Mundt, 1986; 1986a; Sneath et al., 1986; Isenberg, 1992; Prescott et al., 1996).

Бојење по Граму

Бојење по Граму је метода сложеног диференцијалног бојења која омогућава сврставање бактерија у две групе, Грам-позитивне или Грам-негативне, у зависности од хемијског састава ћелијског зида (Berić & Nikolić, 2014). Основ методе јесте различито бојење бактеријских ћелија, због разлика по хемијском саставу ћелијских зидова. Грам-позитивне бактерије садрже и до 90% пептидогликана, док Грам-негативне садрже танак слој пептидогликана окружен слојем фосфолипида, липопротеина и липополисахарда. Због тога се Грам-позитивне боје љубичасто (сл. 2), док се Грам-негативне боје у црвену боју.



Слика 2. Изглед Грам-позитивних бактерија под микроскопом
(Фото: М. Грујовић)

Чисте културе бактерија, предходно гајене у M17 или MRS бујону (37°C / 24 h) су коришћене за микроскопирање препарата. За процедуру бојења, коришћени су кристал виолет и базни фуксин. На осушени препарат је прво додат кристал виолет и након три минута, додаје се Луголов раствор, који стоји два минута. У процесу бојења, Луголов раствор у реакцији са кристал виолетом формира једињење парајодрозанилин (кристал виолет јод-комплекс) који се задржава у ћелији Грам-позитивне бактерије. Након тога, вршено је испирање боје дестилованом водом и обезбојавање алкохолом. У фази обезбојавања, Грам-позитивне бактерије не губе боју и остају љубичасте, док Грам-негативне бактерије у овој фази губе парајодрозанилин због веће количине липида. Зато оне добијају црвену боју од базног фуксина. Сви Грам-позитивни изолати су подвргнути даљем испитивању.

Каталаза тест

У процесу аеробног дисања, поред молекула воде, могу да се формирају и токсични молекули, као што су водоник пероксид (H_2O_2) и супероксид радикал (O_2^-), чије је деловање на активност ових бактерија негативно. Због тога бактерије синтетишу одређене ензиме који врше детоксикацију:

- Супероксид дисмутаза, која преводи супероксид радикал у водоник пероксид
- Каталазу, која разлаже водоник пероксид на кисеоник и воду
- Пероксидазу, који преводи водоник пероксид у воду



Слика 3. Пример негативног каталаза теста (нема мехурића кисеоника)

(Фото: М. Грујовић)

Присуство ензима каталазе се детектује додавањем 3% раствором водоник пероксида (H_2O_2), а уочава се кроз појаву мехурића кисеоника који настају као резултат разлагања H_2O_2 од стране каталазе. Култура која се испитује мора бити стара од 18 до 24 h, јер је овај ензим присутан само у живим ћелијама. Езом је захваћена велика количина ћелија са M17 или MRS агара и нанешена на чисту и обележену микроскопску плочицу. На тако припремљен размаз је нането 2 – 3 капи 3% водоник пероксида и праћена је појава мехурића кисеоника, који су индикатори присуства ензима каталазе. Каталаза негативни изолати су подвргнути даљем испитивању (сл. 3).

Испитивање физиолошких и биохемијских карактеристика изолованих сојева

Грам-позитивни и каталаза негативни изолати су детерминисани до нивоа рода уз помоћ следећих тестова:

- **Способност раста бактерија на 15°C и 45°C на MRS и M17 агару**

Способност раста на две тестиране темпаретуре је испитивана тако што су преконоћне културе бактерија (старе од 18 – 24 h), методом тачкања, пренете на MRS и

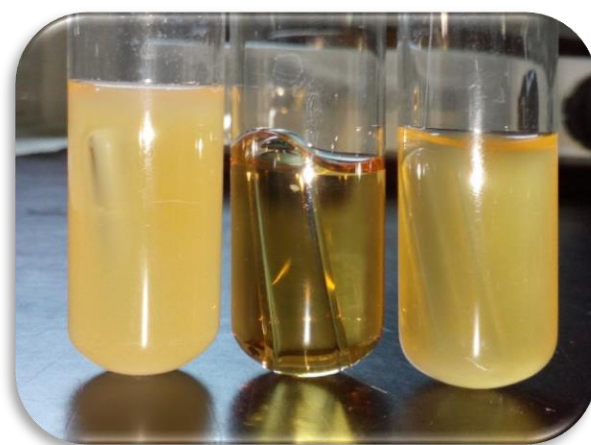
M17 агар и инкубиране 24 h на 15, односно на 45°C. Након инкубације, утврђена је појава раста.

- **Способност раста на модификованом MRS и M17 агару, који садржи 4, 6,5 и 8% (w/w) NaCl**

За испитивање способности раста изолата БМК на подлогама са различитом концентрацијом соли, припремљени су модификовани MRS и M17 агар. На подлоге је, методом тачкања нането по 20 μ L преконоћне културе бактерија. Тако засејане подлоге су инкубиране на 37°C / 24 h. Након инкубације, утврђена је способност раста бактерија на одређеној концентрацији соли.

- **Способност продукције угљен диоксида током ферментације лактозе**

Епрувете модификованог MRS бујона са додатком лактозе и Дурхамовим цевчицама су припремљене и стерилисане, а затим су инокулисане са 1% (v/v) преконоћних култура испитиваних изолата. Епрувете су инкубиране на 37°C / 24 h. Након инкубације, очитани су резултати, а праћена је појава гаса у Дурхамовој цевчици, што је детектовано као позитивна реакција (сл. 4).



Слика 4. Ферментација лактозе

(лево – појава гаса у Дурхамовој цевчици;

средина – контрола стерилности (неинокулисана MRS модификована подлога);

десно – одсуство гаса у Дурхамовој цевчици)

(Фото: М. Грујовић)

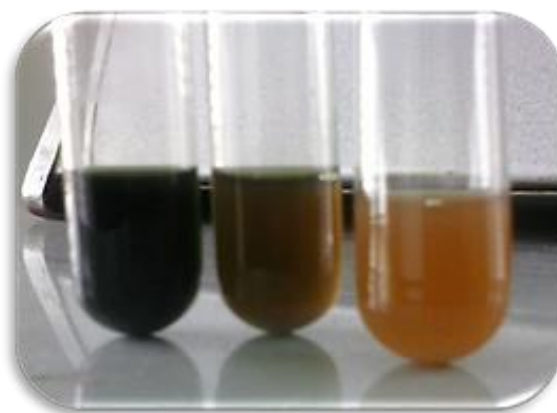
- **Способност раста и продукције екзополисахарида**

На модификованом MRS и M17 агару са додатком сахарозе (20 g L⁻¹), методом тачкања су пренете преконоћне културе изолата БМК и остаљене на инкубацију на 37°C

/ 24 h. Након инкубације, утврђена је појава слузавих колонија, која представља позитивну реакцију (продукцију егзполисахарида).

- **Способност хидролизе L-аргинина и ескулина**

Способност хидролизе L-аргинина је утврђена у подлози са аргинином. У подлогу која је инокулисана изолатом БМК и инкубирана на 37°C / 24 h, је додато неколико капи фенол црвеног. Појава црвене боје означава позитивну реакцију, а појава жуте боје негативну реакцију (сл. 5). Способност хидролизе ескулина је утврђена у ескулин бујону. У засејану и инкубирану подлогу, на 37°C / 24 h, је додато неколико капи 7% раствора гвожђе (III)-хлорида. Појава црног талога представља позитивну реакцију (сл. 6).



Слика 5. Приказ способности хидролизе L-аргинина
(лево – контрола стерилности подлоге; средина – позитивна реакција;
десно – негативна реакција)
(Фото: М. Грујовић)



Слика 6. Приказ способности хидролизе ескулина
(лево и средина – позитивна реакција, десно – негативна реакција)
(Фото: М. Грујовић)

- **Способност хидролизе хипурата**

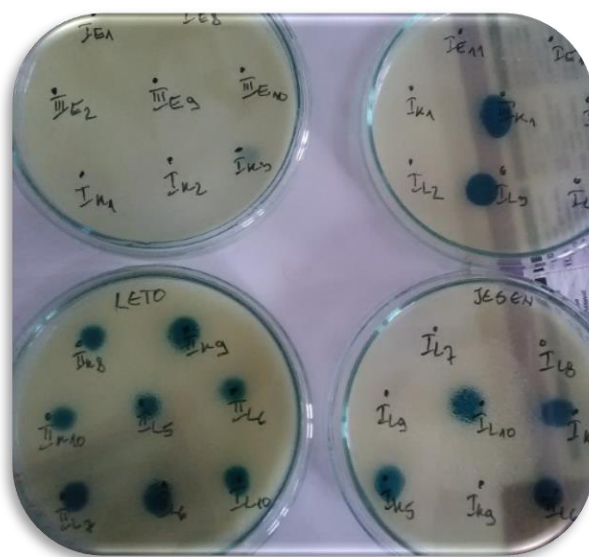
Испитана је способност тестираног изолата да хидролизује киселину (натријум хипурат) до натријум бензоата и глицина, уз помоћ ензима хипуриказе. Додавање нинхидрина доводи до ослобођања амонијум јона из глицина, који реагује са резидуалним нинхидрином и ствара комплекс љубичасте боје. Тест се изводи тако што се у раствор натријум хипурата инокулише густа суспензија испитиване бактерије и то се инкубира на 37°C, 2 h, након чега се додаје неколико капи нинхидрина, па се остави на инкубацији још 10 – 15 минута. Појава љубичасте боје означава позитивну реакцију (сл. 7).



Слика 7. Приказ способности хидролизе хипурата
(Фото: М. Грујовић)

- **Способност коришћења цитрата**

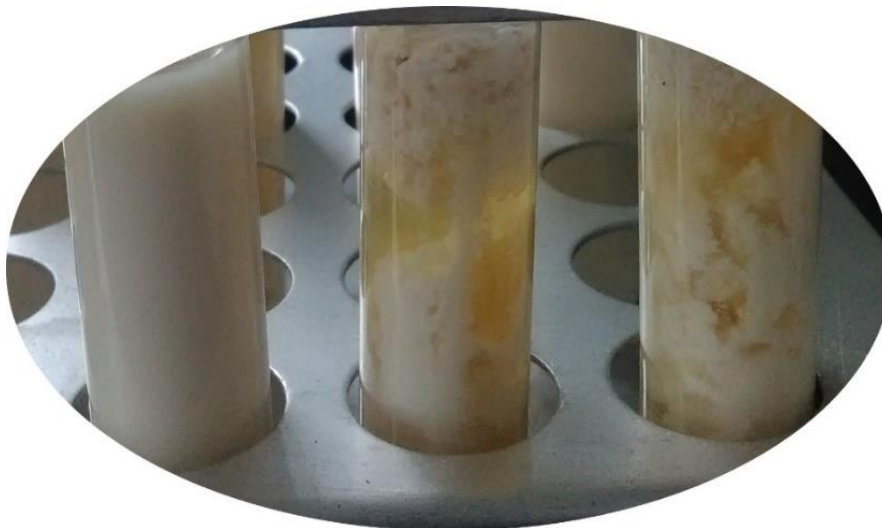
Способност коришћења цитрата је испитивана на цитратном агару. Након стерилизације, у подлогу се додаје по 1% Раствора А и 1% Раствора Б, подлога се промеша и разлије у стерилне петри кутије. Овако припремљена се засејава културом бактерија и инкубира на 37°C / 24 h. Појава тамно-плавих колонија означава да тестирани изолат има способност коришћења цитрата из подлоге (сл. 8).



Слика 8. Приказ способности коришћења цитрата БМК
(плава боја – позитивна реакција; безбојна колонија – негативна реакција)
(Фото: М. Грујовић)

- **Ацидификациона способност бактерија**

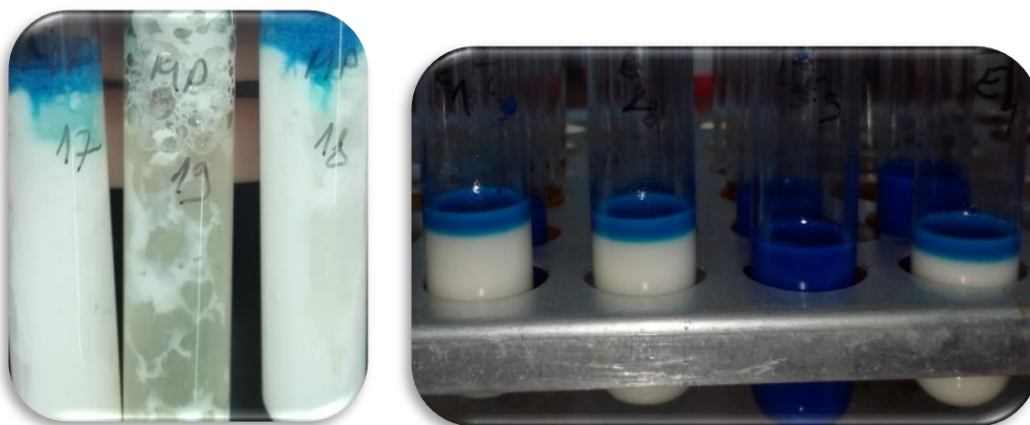
Способност изолата бактерија млечне киселине да редукују рН вредност млека се испитује у стандардном млеку, које садржи 1,6% млечне масти и обогаћеном млеку. Обогаћено млеко је прављено додавањем 2% глукозе и 1% екстракта квасца, уз благо загревање, до растварања. Негативне контроле су биле рН вредности неинокулисаног обичног и обогаћеног млека. У тако припремљене узорке млека је додавано 2% (v/v) инокулума бактерије коју тестирамо. Инкубација је вршена на 37°C. Мерење рН вредности је вршено након 6 h и 24 h, уз помоћ рН метра (Basic pH meter, Arvada, Colorado). Праћена је и појава груша и гаса у обе врсте млека (сл. 9).



Слика 9. Приказ ацидификационе способност изолата БМК
(лево – појава груша; средина и десно – појава груша и гаса)
(Фото: М. Грујовић)

- **Активност изолата у млеку обогаћеном са метиленским плавим**

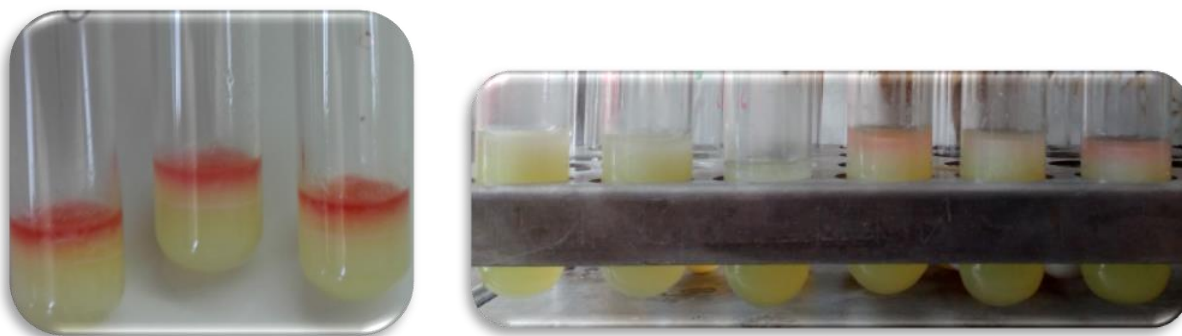
Тестирана је способност изолата БМК да расту у млеку обогаћеном са 0,1% метиленским плавим, које је инокулирано са 2% (v/v) инокулума бактерије коју тестирамо. Инкубација је вршена на 37°C у трајању од 24 h. Након инкубације, детектује се промена боје и закључује о способности бактерија да редукују метиленско плаво (сл. 10).



Слика 10. Приказ активности изолата БМК у млеку обогаћеном са метиленским плавим (слика лево – редукција метиленског плавог (појава плавог прстена) уз појаву груша и гаса; слика десно – редукција метиленског плавог уз појаву груша и негативна контрола)
(Фото: М. Грујовић)

- **Способност продукције диацетила**

Способност изолат БМК да продукују диацетил је испитивана у млеку које је претходно засејано бактеријама и инкубирано на 37°C / 24 h. Након инкубације, култури је додато 1 mL 30% NaOH и 1 – 2 mg креатина у 1 mL згрушаног млека. Овако припремљена култура је додатно инкубирана на собној температури, 1 – 2 h. Појава црвеног прстена означава позитивну реакцију (сл. 11).



Слика 11. Приказ способности бактерија да продукују диацетил
(појава црвеног прстена означава позитивну реакцију)
(Фото: М. Грујовић)

Испитивање способности ферментације угљених хидрата

Након фенотипске, биохемијске и физиолошке идентификације изолат до нивоа рода уз помоћ кључева за детерминацију, испитивана је способност ферментације угљених хидрата уз помоћ комерцијалних китова Microgen Strep ID (Microgen Bioproducts, Germany) (сл. 12) и API CH50 (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) (сл. 13). Резултати су очитани и уз помоћ добијених кодова, коришћењем базе података произвођача, изолати су идентификовани до нивоа врсте (Charteris et al., 2001).



Слика 12. Изглед Microgen Strep ID трака након инкубације и додавања реагенаса
(Фото: М. Грујовић)



Слика 13. Изглед API CH50 трака након инкубације
(Фото: М. Грујовић)

Чување изолата

Изоловане и детерминисане бактерије се чувају у Лабораторији за микробиологију, ПМФ-а у Крагујевцу. Чување се врши на -20°C и -80°C у M17 бујону (коке) и у MRS бујону (бацили), који садрже 20% глицерола (v/v) (Mannu et al., 2002). Културе које се користе за даља микробиолошка истраживања се два пута пресејавају у M17 бујон и у MRS бујон и инкубирају на 37°C / 24 h.

5.3.4. МАЛДИ-ТОФ масена спектрофотометрија у идентификацији бактерија млечне киселине

Потврда и коначна идентификација изолата БМК, урађена је применом МАЛДИ ТОФ масене спектрофотометрије, у Институту за јавно здравље Војводине. Изолати ентерокока су инкубирани на M17 агару, лактокока у M17 бујону и лактобацила у MRS бујону, на 37°C / 24 h. Узорци ентерокока су анализирани уз помоћ стандардне процедуре (Bruker's direct transfer sample preparation procedure for MALDI-TOF MS). Појединачне бактеријске колоније су директно пренете на 96-МАЛДИ плочу (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), остављене пар минута да се осуше, након чега су

прекривене са 1 μL раствора матрикса (Bruker Matrix HCCA; α -цијано-4-хидроксикинаминска киселина). Узорци лактобацила и лактокока су анализирани помоћу методе протеинске екстракције, са модификацијама. 500 μL преконоћне културе бактерије гајене у MRS бујону (лактобацили) или M17 бујону (лактококе) је центрифугирано на 12000 rpm / 4°C / пет минута. Супернатант је одбачен, а у преостали пелет је додато 300 μL дестиловане воде и 900 μL апсолутног етанола. Суспензија је мешана на вортексу један минут а затим центрифугирана на 13000 rpm / 4°C / два минута. Супернатант је затим одбачен, а пелет је осушен на 55°C, најмање 30 минута, како би испарила вода и етанол у потпуности. Након тога је додато 50 μL 70% мравље киселине и темељно помешано уз помоћ пипете. Затим је додато 50 μL 50% ацетонитрила и узорци су поново центрифугирани на 13000 rpm / 4°C / два минута. Након тога, 1 μL супернатанта је пренет директно на 96-МАЛДИ плочу, која је остављена да се осуши 10 минута, након чега се узорак прекрива са 1 μL раствора матрикса.

MALDI-TOF масени спектри су добијени коришћењем Microflex LT/SH BioTyper на спектофотометру (Bruker Daltonics), опремљеним азотним ласером (337 nm), који ради под контролом Flexcontrol софтвера, верзија 3.1. (Bruker Daltonics). Аквазација спектра у масеном опсегу од 2 до 20 kDa се скупља уз помоћ опције Auto Execute, акумулирајући 240 ласерских снимака (фреквенција ласера 60 Hz; јонски напон једног волта 19,9 kV; јонски напон другог волта 18,53 kV; напон објектива 6 kV) набављених на 30 – 40% максималне снаге ласера.

Резултати су изражени резултатима МАЛДИ-биоТипер-а (од 0,000 до 3,000), што указује на сличност са непознатим бактеријским профилем доступним профилима на бази података софтвера МАЛДИ-биоТипер. Одговарајуће вредности (оцена) $\geq 2,000$ (зелена боја) узете су као тачна идентификација до нивоа врсте изолата. Оцена између 1,700 и 2,000 (жута боја) подразумева само вероватну идентификацију рода, док вредност резултата испод 1,700 (црвена боја) указује да постоји сличност између непознатог профила и било ког од оних у бази података.

5.3.5. Прелиминарно испитивање антимикробног потенцијала изолованих бактерија млечне киселине

Пре испитивања антимикробног потенцијала БМК, урађено је прелиминарно антимикробно испитивање методом према NCCLS (2003), са модификацијама, како би се издвојили изолати који поседују антимикробну активност а касније урадила и

квантификација резултата методом бунарића у агару (agar-well difusion (AWD) method). На стерилне MRS и M17 подлоге, асептично је нането 10 μ L суспензије тестираних БМК које су остављене да се осуше (метода тачкања). У 10 mL стерилног хранљивог агара (у епрувети), је додато 100 μ L бактеријске суспензије изабраних индикаторских врста бактерија (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella oxytoca* KGPMF1, *Klebsiella ornithinolytica* KGPMF8 и *Aeromonas hydrophila* KGPMF65). Колекција изолата и ATCC индикаторских врста је чувана у мешавини 20% (v/v) глицерола и хранљивог бујона, на -80°C , на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу. Изолати Грам-негативних бактерија су изоловани такође из сокобањског сира (Mladenović et al., 2018) Након мешања на вортексу, преливена је плоча са осушеним сојевима БМК. Плоче се оставе на инкубацију на 37°C / 24 h. Појава прозирне зоне око засејаних БМК указује на потенцијални антимикробни ефекат (сл. 14). Сојеви БМК коју су показали такву зону су коришћени у даљем истраживању.



Слика 14. Изглед плоче након прелиминарног испитивање антимикробне активности БМК (појава светле зоне око засејаних колонија БМК указује на потенцијалну антимикробну активност изолата)
(Фото: М. Грујовић)

Антимикробни потенцијал изолованих БМК је испитиван методом бунарића у агару (agar-well difusion (AWD) method), коју су описали Tagg & Mc Given (1971). Направљена је суспензија преконоћних индикаторских врста бактерија која садржи 10^8 CFU mL^{-1} (100 μ L) у хранљивом агару (20 mL) (Торлак, Београд, Србија), охлађеног на $44 - 47^{\circ}\text{C}$, који је потом разливен у стерилне петри кутије. Супернатант бактерија млечне

киселине које су тестиране је добијен центрифугирањем преконоћних култура (18 h) бактерија на 10000 грт / 4°C / 30 минута. рН супернатанта је подешена на 6,2 додавањем 1 М NaOH, и затим је извршена стерилизација супернатанта филтрирањем кроз 0,22 µm целулозно-ацетатне филтре (Rotilabo syringe filters, Roth). У разливеном хранљивом агару са индикаторском врстом бактерије су направљени бунарићи пречника 6 mm у које је додато 100 µL супернатанта. Након тога, петри плоче су остављене у фрижидеру, 2 h на 4°C, да би се омогућила потпуна дифузија супернатанта у подлогу. Петри плоче су затим инкубирани на 37°C / 24 h. Након инкубације, мерен је пречник без раста (приказан у милиметрима (mm)) индикаторских врста око бунарића са супернатантом.

5.4. Методе за евалуацију бактерија млечне киселине као пробиотика

5.4.1. Испитивање способности преживљавања у гастроинтестиналном тракту

Способност преживљавања бактерија млечне киселине у условима гастроинтестиналног тракта подразумева испитивање способности раста изолата у условима ниске рН вредности, гастро тест и тест жучних соли.

Способност раста изолата у условима ниске рН вредности

Способности раста изолата у условима ниске рН је испитана на преконоћним културама изолата (18 – 24 h), које су инокулисане у M17 бујону (коке) и у MRS бујону (бацили), чија је рН подешена додавањем 0,1 М раствора HCl, на 3, 4 и 5. Раст изолата је детектован након инкубације на 37°C / 48 h, на ELISA читачу микротитар плоча (RT-2100C, Rayto, Shenzhen, China), на таласној дужини од 600 nm. Експеримент је урађен у трипликату а изолати који су показали способност раста на рН 3 су даље испитивани (гастро тест и тест жучних соли).

Способност раста изолата у симулираним условима желудачног сока - гастро тест

За симулацију услова који владају у желуцу користи се гастро тест, који су описали Huang & Adams (2004) и Radulović et al. (2010), са модификацијама. Преконоће културе изолата су инокулисане у односу 1:10 у вештачки направљен желудачни сок (одељак Раствори и реагенси), а затим су инкубирани на 37°C, у трајању од 1, 2 и 3 h јер

је то време у коме се бактерије задржавају у желуцу (Zoumporoulou et al., 2008). Након инкубације, апсорбанце раста су очитане на ELISA читачу микротитар плоча (Bassyouni et al., 2012), а број живих бактерија је одређен пресејавањем из тестираних услова на плоче са MRS и M17 агаром, у три понављања (Radulović et al., 2010). Бактеријске колоније су бројане након 24 h а проценат преживљавања је одређен у односу на контролу раста према формули (Hernandez-Hernandez et al., 2012):

$$\% \text{ преживљавања} = \text{тест (CFU mL}^{-1}\text{)} / \text{контролна (CFU mL}^{-1}\text{)} \times 100 \quad (5)$$

Изолати који су показали толеранцију на симулиране услове желудачног сока су даље подвргнути тесту жучних соли.

Способност раста изолата у симулираним условима дуоденума - тест жучних соли

Како би се испитала способност преживљавања у симулисаним условима дуоденума, примењује се тест жучних соли. Преконоћне културе изолата су инокулисани у вештачки направљеном интестиналном соку (одељак Раствори и реагенси) и инкубирани на 37°C / 4 h, јер је то време задржавања хране у танком цреву (Kumar & Muragalatha, 2012). Након инкубације, апсорбанце раста су очитане на ELISA читачу микротитар плоча (600 nm), а број живих бактерија је одређен пресејавањем из тестираних услова на плоче са MRS и M17 агаром, у три понављања (Radulović et al., 2010). Бактеријске колоније су бројане након 24 h а проценат преживљавања је одређен у односу на контролу раста према формули (Hernandez-Hernandez et al., 2012):

$$\% \text{ преживљавања} = \text{тест (CFU mL}^{-1}\text{)} / \text{контролна (CFU mL}^{-1}\text{)} \times 100 \quad (6)$$

5.4.2. Способност синтезе биогених амина

Способност изолата БМК да синтетишу биогене аmine (хистамин и тирамин) из модификованих подлога са додатком аминокиселине хистидин и тирозин (посебно) се испитује анализом која је описана у Do-Won & Jong-Hoon (2015). Засејане, модификоване подлоге су инкубиране на 37°C / 24 h. Појава љубичасто-пурпурне боје у подлози са хистидином или појава седимента у подлози са тирозином, потврђује присуство декарбоксилаза.

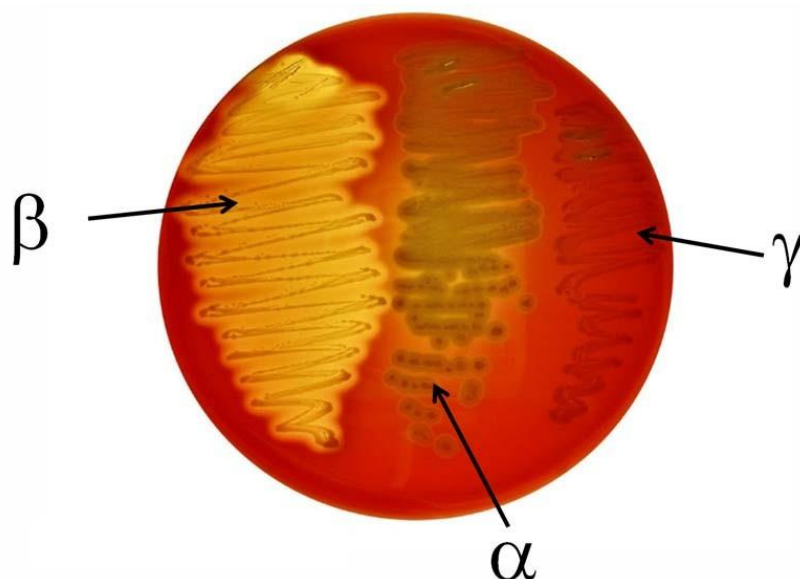
5.4.3. Способност раста бактерија у присуству фенола

Способност раста изолата у присуству фенола је испитивано засејавањем 2% (v/v) преконоћне културе у MRS и M17 бујон, у кога су предходно додате финалне концентрације фенола од 0,1%, 0,2% и 0,3%. Након инкубације на 37°C / 24 и 48 h, праћена је појава раста бактерија, што указује на способност преживљавања у присуству фенола (Šušković et al., 2001).

5.4.4. Испитивање способности синтезе хемолизина на крвном агару

Неке врсте бактерија се одликују способношћу синтезе екстрацелуларних протеина хемолизина, који доводе до оштећења различитих ћелијски елемената, посебно до лизе еритроцита и ослобађања хемоглобина. Способност синтезе хемолизина се испитује на крвном агару.

Грам-позитивни и каталаза негативни изолати су тестирани на способност синтезе хемолизина. Преконоћне културе су засејане на крвни агар, инкубиране на температури од 37°C / 24 h, након чега је праћена појава зоне хемолизе (Lombardi et al., 2004; Maragkoudakis et al., 2009). Хемолиза се детектује појавом или одсуством светлих зона око колонија (α -хемолиза – недовољно светле зоне око колонија; β -хемолиза – јасне светле зоне око колонија; γ -хемолиза – одсуство светлих зона око колонија) (сл. 15).



Слика 15. Изглед хемолизе на крвном агару

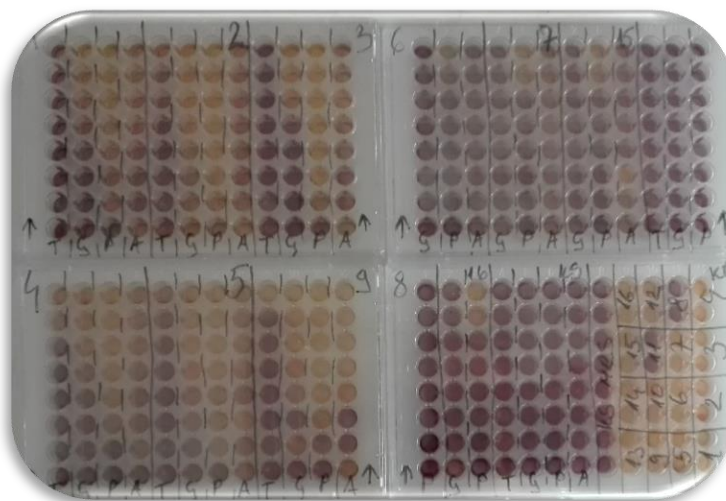
(<http://svet-biologije.com/wp-content/uploads/2013/12/hemoliza-800x600.jpg>)

5.4.5. Испитивање осетљивости изолата на антибиотике

Испитивање осетљивости изолата на антибиотике заснива се на одређивању минималне инхибиторне концентрације (МИК), која се дефинише као најнижа концентрација тестираног антибиотика на којој је инхибиран раст микроорганизма. Минимална инхибиторна концентрација се одређују применом микродилуционе методе (Sarker et al., 2007). Микродилуциона метода се изводи у микротитар плочама са 96 бунарића, под стерилним условима. Од антибиотика, коришћени су тетрациклин, ампицилин, гентамицин, ванкомицин и полимиксин Б (Sigma Chemicals Co., USA). Тестирани антибиотици су растварани у MRS бујону (до 100% укупне запремине).

Преконоћне култура испитиваних изолата бактерија, гајених на MRS агару, су коришћене за припрему суспензија бактерија. За стандардизацију бактеријских суспензија користи се Mc Farland стандард број 0,5 који означава густину суспензије од $1,5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹. Почетне суспензије су додатно разблажене да би се добио број бактерија од 1×10^6 CFU mL⁻¹.

У микротитар плочама са 96 бунарића, направљена је серија дуплих разблажења тестираних антибиотика, у распону од 0,05 µg mL⁻¹ to 4000 µg mL⁻¹. Укупна запремина у бунарићу је износила 100 µL. У сваки бунарић је додато по 10 µL суспензије тестираних изолата. Микротитар плоче су инкубирани на 37°C / 24 h. За читавање резултата инхибиторног ефекта антибиотика на изолате, додат је ресазурин, индикатор ћелијског метаболизма и раста. Промена боје индикатора из плаво-љубичасте у розе указује на појаву раста (сл. 16). Најнижа концентрација на којој није дошло до промене боје индикатора одређена је као минимална инхибиторна концентрација. Сваки експеримент је садржао контролу раста тестиране бактерије и контролу стерилности (неинокулисан MRS бујон). Свако тестирање је урађено у дупликату и резултати су приказани као средња вредност.



Слика 16. Испитивање осетљивости изолата БМК на антибиотике – изглед микротитар плоче након инкубације
(Фото: М. Грујовић)

5.4.6. Способност асимилације различитих шећера

Испитивање способности асимилације шећера изабраних БМК је урађено методом коју су описали Rada et al. (2008), са модификација описаним у даљем тексту. За експеримент је коришћен модификовани MRS бујон, који је садржао све компоненте осим декстрозе, уместо које су додати лактоза, фруктоза, манитол и инулин (Торлак, Београд, Србија). MRS бујон са 2% декстрозе је коришћен као контрола раста. Експеримент је рађен у микротитар плочама са 96 бунарића (Sarstedt, Germany), где је направљена серија дуплих разблажења тестираних шећера у распону од 8 до 0,25% (w/v). Укупна запремина у бунарићу је износила 100 μL . У сваки бунарић је додато по 10 μL суспензије тестираних изолата. Бактеријски инокулум се припрема од преконоћне културе тестираних бактерија. Густина бактеријске суспензије је подешена уз помоћ McFarland дензитометра, тако да број бактерија буде $1,5 \times 10^8 \text{ CFU mL}^{-1}$. Микротитар плоче су инкубиране на 37°C / 24 h. Апсорбанца раста бактерије је одређена помоћу ELISA читача микротитар плоча, на таласној дужини од 600 nm.

Неинокулисан MRS бујон или неинокулисан бујон са одређеном концентрацијом шећера је коришћен као контрола стерилности, као и за добијање апсорбанце чистог раста бактерија. Сваки тест је изведен у трипликату.

5.4.7. Способност аутоагрегације и коагрегације изолата

Аутоагрегација изабраних БМК, као и њихова коагрегација са *E. coli* (клиничким изолатом) су испитивани методама које су описали Осања & Nader-Macías (2002), са модификацијама описаним у даљем тексту.

Аутоагрегација изабраних изолата је испитивана у PBS пуферу. Ћелије преконоћних култура изолата су центрифугиране на 5000 гpm, у трајању од 15 минута, након чега су испране у PBS пуферу. Поступак центрифугирања је поновљен још два пута а ћелије су затим ресуспендоване у 4 mL истог пуфера, тако да број ћелија буде око 10^8 CFU mL⁻¹. Суспензија је измешана на вортексу и 200 µL са површине суспензије је пренето у стерилне флашкове, где је додато 1800 µL PBS, након чега је измерена апсорбанца на 600 nm (A_0). Иста процедура је поновљена након 1, 2, 3, 4, 5 и 24 h (A_t).

Проценат аутоагрегације је израчунат према формули:

$$\% \text{ аутоагрегације} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \quad (7)$$

где A_t представља апсорбанцу супернатанта након 1, 2, 3, 4, 5 и 24 h.

За испитивање способности коагрегације са *E. coli*, ћелије испитиваних изолата БМК су припремљене на исти начин као и за испитивање аутоагрегације, и затим су ресуспендоване у PBS пуферу, одакле је узето 2 mL суспензије испитиваног изолата и измешано са 2 mL суспензије *E. coli*. Овако направљена мешавина суспензија је измешана на вортексу, и 200 µL са површине суспензије је пренето у стерилне флашкове, у које је додато 1800 µL PBS, након чега је измерена апсорбанца на 600 nm (A_0). Иста процедура је поновљена након 2 h (A_t). Проценат коагрегације је израчунат према формули:

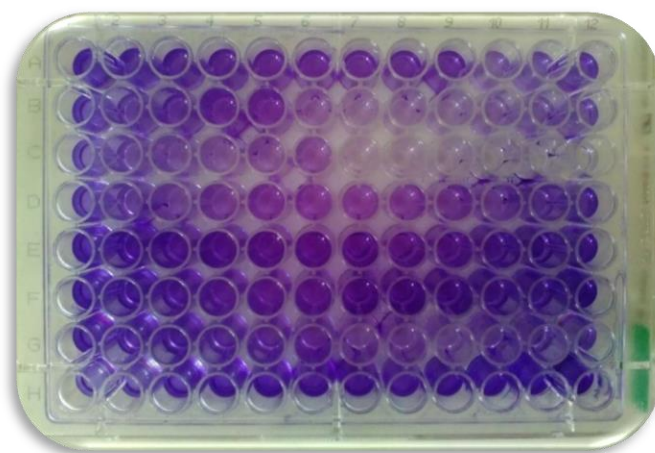
$$\% \text{ коагрегације} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100 \quad (8)$$

5.4.8. Способност бактерија млечне киселине за формирање биофилма

Способност изолованих БМК да формирају биофилм је тестирана методом са кристал виолетом (biofilm formation assay), која је описана у O'Toole et al. (2000) и Stepanović et al. (2007), са модификацијама описаним у даљем тексту.

У сваки бунарић микротитар плоче (Sarstedt, Germany) је додато по 100 μL M17 бујна (за коке) и по 100 μL MRS бујона (за бациле). 10 μL свеже бактеријске суспензије која је садржала 10^8 CFU mL^{-1} и потом раблажена у доносу 1:100, је додато у сваки бунарић. Тако инокулисане микротитар плоче су остављене на инкубацију на 37°C / 48 h. Након инкубације, садржај сваког бунарића је нежно избачен из плоче. Бунарићи су испрани са 200 μL стерилног физиолошког раствора, како би се ослободили планктонских бактеријских ћелија. Формирани биофилм је фиксиран додавањем 100 μL метанола. Када испари метанол на собној температури, у сваки бунарић се додаје 100 μL 0,1% (w/v) кристал виолета и микротитар плоче се остављају на инкубацији у мраку, 20 минута. Након тога, плоче су испирене три пута са дестилованом водом, након чега је у сваки бунарић додато по 200 μL 96% етанола. Резултати су очитани на ELISA читачу микротитар плоча, на таласној дужини од 630 nm. Сваки експеримент је садржао контролу стерилности (неинокулисан M17 и MRS бујон), чија је апсорбанца послужила да се добије коначна апсорбанца формираног биофилма.

Према Mendoza-Olazarán et al. (2014), не постоји универзална референтна вредност апсорбанце која се користи за процену способности формирања бактеријског биофилма. Апсорбанца бактеријског биофилма већа од негативне контроле али мања од стандардног (ATCC) соја се карактерише као слаб продуцент биофилма, док се апсорбанца већа од стандардног соја карактерише као јак продуцент биофилма (Qi et al., 2016).



Слика 17. Способност формирања биофилма БМК – изглед микротитар плоче након бојења кристал виолетом (љубичаста боја – формирани биофилм; бела боја – контрола стерилности)

(Фото: М. Грујовић)

5.4.9. Микробиолошка адхезија са различитим врстама растварача

Микробиолошка адхезија са растварачима је мерена према методи која је описана у Rosenberg et al. (1980) са модификацијама (Crow & Gopal, 1995; Bellon-Fontaine et al., 1996; Kos et al., 2003). Ћелије преконоћне културе бактерија (расле у MRS бујону) су центрифугиране на 5000 rpm у трајању од 15 минута, након чега су два пута испране и ресуспендоване у 0,1 М KNO₃ (pH 6,2), до 10⁸ CFU mL⁻¹. Измерена је почетна апсорбанца на спектофотометру, на таласној дужини од 600 nm (A₀). У 3 mL ћелијске суспензије је додато 1 mL растварача. Након инкубације од 10 минута, на собној температури, две фазе садржаја епрувете су измешане на вортексу два минута. Водена фаза је издвојена након 20 минута инкубације на собној температури и измерена је апсорбанца на 600 nm (A₁). Проценат бактеријске адхезије са одређеним растварачем је израчунат преко следеће формуле:

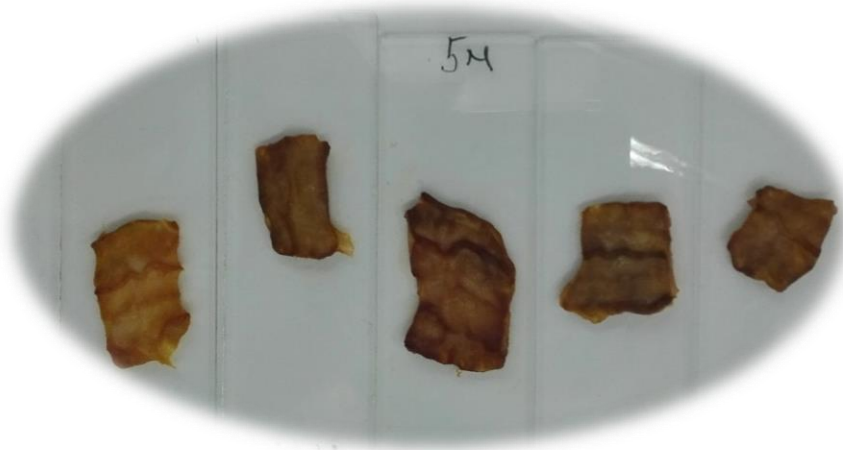
$$\% \text{ адхезије} = (1 - A_1 / A_0) \times 100 \quad (9)$$

Коришћене су три различите врсте растварача: ксилол, као аполаран растварач; хлороформ као монополаран и кисели растварач и етил ацетат, као монополаран и базни растварач. Бактеријска адхезија са ксилолом је показивач бактеријске хидрофобности или хидрофилности. Способност адхезије са остала два растварача су рађена у сврху испитивања капацитета бактерија као донора електрона (хлороформ) или акцептора електрона (етил ацетат) (Bellon-Fontaine et al., 1996). Уколико тестирана бактерија покаже афинитет према хлороформу, онда је она донор електрона, а слаб акцептор електрона. Афинитет према етил ацетату показује да је тестирана бактерија бољи акцептор електрона, а слаб донор (Dias et al., 2013). Према Осања & Nader-Macías (2002), проценат хидрофобности се изражава као: од 0 до 35% – ниска хидрофобност; од 36 до 70% – средња хидрофобност; од 71 до 100% – висока хидрофобност.

5.4.10. *In vitro* испитивање способности адхезије изолата за епител танког црева свиње

Испитивање способности адхезије *E. faecalis* KGPMG47, *Lb. brevis* KGPMF35, *Lb. fermentum* KGPMF29, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF57 за епител танког црева свиње је тестирана методом описаном у Kos et al. (2003), са модификацијама описаним у даљем тексту. За потребе испитивања, коришћен је илеум (део танког црева)

свиње. Узорци црева су узети од свиње старе девет месеци. Одмах након жртвовања животиње, узет је узорак црева, који је механички испран и чуван на 4°C у фрижидеру. Пре почетка експеримента, танко црево је исечено на комадиће (1 cm²), који су стављени у PBS, 30 минута на 4°C у фрижидер, како би се узорци црева ослободили вишка слузи. Након тога, црево је испрано три пута у стерилном PBS-у на ротационој мешалици, како би се узорци ослободили масних капљица. У еленмајерима је стерилисан MRS бујон (20 mL), који је инокулисан са 200 µL преконоћне културе тестиране бактерије и у сваки еленмајер је додат по један узорак црева. Тако припремљени еленмајери су инкубирани на 37°C / 24 h. Након инкубације, узорци црева су испрани стерилним физиолошким раствором, како би се испрале ћелије бактерија које се нису везале за црево, и узорци су фиксирани у метанолу. Након сушења, узорци црева су бојени флуоресцентном бојом, акридин оранж (Acros Orgnics, New Jersey, USA), два минута (Kronvall & Myhr, 1977). Вишак боје је испран стерилном дестилованом водом (сл. 18). Тако припремљени узорци су посматрани и фотографисани на флуоресцентном микроскопу (Nikon, Ti-Eclipse, 400×, Austria). Као негативне контроле, коришћени су узорци црева додати у MRS бујон и PBS, који нису инокулисани бактеријама.



Слика 18. Изглед узорака танког црева обојених акридин оранжом и припремљених за микроскопирање
(Фото: М. Грујовић)

5.5. Испитивање ензимске активности бактерија млечне киселине

Прелиминарно испитивање протеолитичке активности је испитивано засејавањем преконоћне културе изолата на подлогу са обраним млеком у праху (Essid et al., 2009). У подлози су, под стерилним условима, направљени бунарићи пречника 8 mm, у које су додате тестиране културе изолата. Након инкубације на 37°C / 24 h, праћена је појава бистре зоне око бунарића са испитиваном бактеријом (позитивна реакција). Бистра зона настаје као последица хидролизе казеина.

Прелиминарно испитивање липолитичке активности је испитивано засејавањем преконоћне културе изолата на подлогу са лецитином. У подлози су, под стерилним условима, направљени бунарићи пречника 8 mm, у које су додате тестиране културе изолата. Након инкубације на 37°C / пет дана, прати се појава бистрих зона око бунарића са испитиваном бактеријом (позитивна реакција). Бистра (провидна) зона потврђује хидролизу лецитина и указује на способност бактерија да продукује ензим липазу.

Испитивање ензимских активности БМК је обухватило одређивање активности киселе и алкалне инвертазе, алкалне протеазе, алкалне фосфатазе и α -амилазе. Такође, испитана је укупна количина протеина у ферментационој течности бактерија. Сва мерења су вршена спектрофотометријски.

5.5.1. Добијање ферментационе течности бактерија млечне киселине

За испитивање ензимске активности БМК, неопходно је добити ферментациону течност бактерија. У 10 mL MRS (за бациле) и M17 (за коке) бујона је засејано по 100 μ L преконоћне културе бактерије. Тако припремљене засејане подлоге су инкубиране на 37°C / 24 h. Након инкубације, узорци су центрифугирани на 10000 rpm / 4°C / 30 минута, издвојен је супернатант који представља ферментациону течност. Ферментациона течност се чува у фрижидеру, на 4°C, до извођења експеримента. Методе за испитивање ензимске активности су преузете из Jakovljević (2014).

5.5.2. *Одређивање активности киселе и алкалне инвертазе (β -fruktofuranozidaza)*

За одређивање активности алкалне инвертазе у ферментационој течности бактерија, потребно је направити реакциону смешу која садржи 0,5 mL ферментационе течности, 0,5 mL 0,02 М фосфатног пуфера (pH 8) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај тест епрувете је промешан и инкубиран у воденом купатилу на 37°C / 15 минута. У другој, контролној, епрувети се додају сви састојци као у тест епрувети и она се остави на лед док се не заврши инкубација теста. Узима се по 1 mL садржаја обе епрувете и додаје по 2 mL динитросалицилног реагенса. Тест епрувете се инкубирају на 100°C / пет минута. Епрувете су затим охлађене на собној температури и након тога се одређује количина ослобођених редукујућих шећера. Вредност апсорбанце се читава на таласној дужини од 540 nm.

Ензимска активност киселе инвертазе се одређује на исти начин, у реакционој смеси, која садржи 0,5 mL ферментационе течности, 0,5 mL 0,01 М натријум-ацетатног пуфера (pH 4,5) и 1 mL 1% (w/v) сахарозе. Садржај епрувете (тест) се промеша и инкубира у воденом купатилу на 55°C / 20 минута. У другој, контролној епрувети се додају сви састојци као у тест епрувети и она се оставља се на леду док се не заврши инкубација теста. Узима се по 1 mL садржаја обе епрувете и додаје по 2 mL динитросалицилног реагенса. Тест епрувете се инкубирају на 100°C / пет минута. Епрувете су охлађене на собној температури и након тога, резултати се читају на 540 nm.

За конструисање стандардне криве (График 1) потребно је направити $5,56 \times 10^{-3}$ М глукозног стандарда (Sigma Aldrich). У десет епрувета се отпипетира 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50 и 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 mL стандардног раствора глукозе и епрувете допуне дестилованом водом до запремине од 1 mL. Као бланк стандарда, узима се 1 mL дестиловане воде. Садржај епрувета се промеша и епрувете се инкубирају на 55°C / 20 минута. Даљи поступак је исти као за одређивање инвертазне активности.

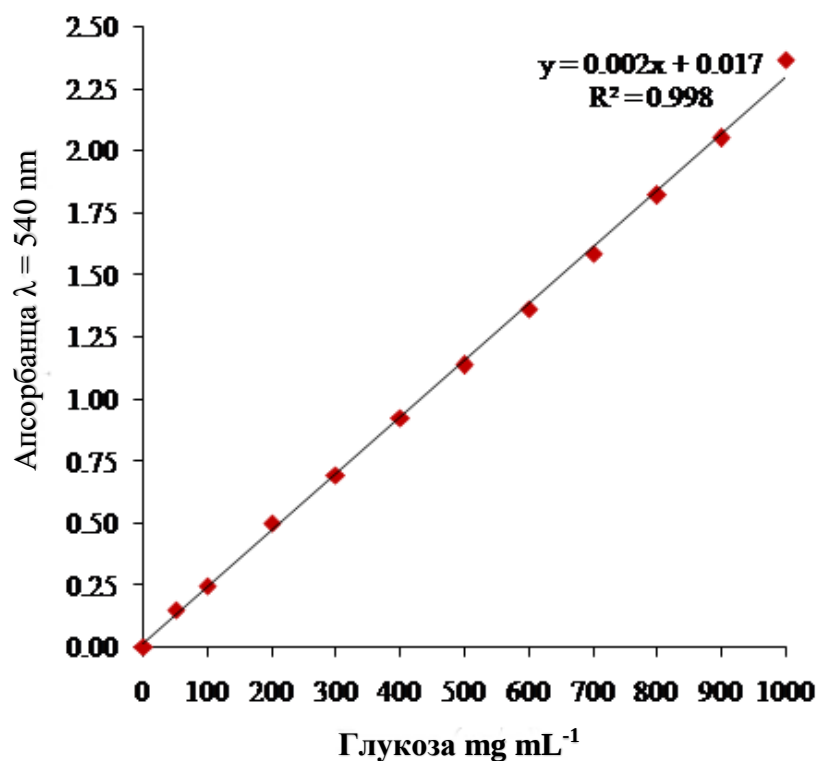


График 1. Стандардна крива за глукозу

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

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M глукозе}) \times (\text{df})}{(20) \times (0,5) \times (2)} \quad (10)$$

df – дилуциони фактор

20 – време инкубације (у минутима)

0,5 – запремина ферментационе течности (у милилитрима)

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

5.5.3. Одређивање активности алкалне протеазе

Количина алкалне протеазе у ферментационој течности је одређена индиректно, на основу количине тирозина који се ослобађа хидролизом казеина под дејством протеолитичких ензима у 1 mL течне подлоге Ансоновом методом (Anson, 1938). У једну епрувету је отпипетирано 1 mL ферментационе течности а у другу 5 mL 2% (w/v)

раствора казеина. Обе епрувете се загревају у воденом купатилу на 37°C / 15 минута. Након тога, у епрувету са ферментационом течношћу (тест) се додаје 2 mL загрејаног казеина, промеша и врати на инкубацију још 10 минута. Ензимска реакција је прекинута додавањем 5 mL хладне 5% (w/v) трихлорсирћетне киселине (ТСА). Смеша је промућкана и потом процеђена кроз филтер папир. У другој, контролној, епрувети је отпипетирано 1 mL ферментационе течности и одмах додато 2 mL хладног казеина и 5 mL 5% (w/v) ТСА, а затим је садржај епрувете промешан и процеђен кроз филтер папир. Узето је по 2 mL филтрата из тест и контролне епрувете и додато 5 mL 6% (w/v) Na₂CO₃ и 1 mL Folin-Ciocalteu реагенса. Садржај епрувета је промућкан и остављен на собној температури, 30 минута док се не развије плава боја. У посебној епрувети (бланк) је отпипетирано 1 mL дестиловане воде уместо тирозина и додати су сви остали састојци. Вредност апсорбанце се читава на 660 nm.

За одређивање количине тирозина потребно је конструисати стандардну криву (График 2). Потребно је направити $1,1 \times 10^{-3}$ М стандардног раствора тирозина (спремљеног у 100 mL дејонизоване воде, уз пажљиво загревање до растварања и хлађења на собној температури). У десет епрувета се отпипетира 0,05, 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,05, 0,60, 0,07, 0,08 и 0,09 mL стандардног раствора тирозина и епрувете се допуне дестилованом водом до запремине од 2 mL. Као бланк стандарда, узима се 2 mL дестиловане воде. Све епрувете су инкубиране на 37°C / 10 минута, и даљи поступак је исти као за одређивање активности протеолитичких ензима.

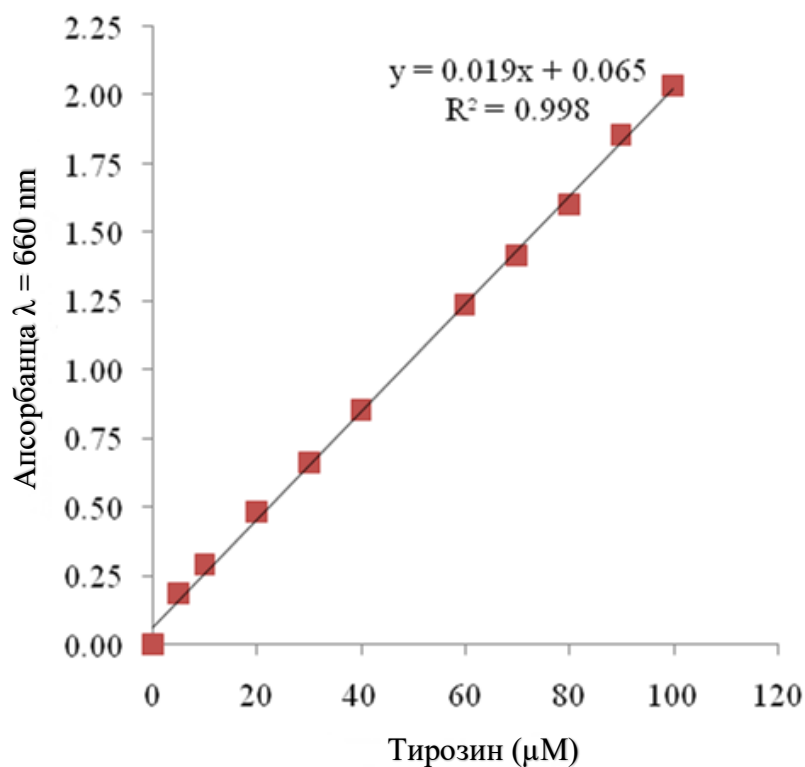


График 2. Стандардна крива за тирозин

Јединица ензимске активности:

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M тирозина}) \times (8) \times (\text{df})}{(1) \times (10) \times (2)} \quad (11)$$

df – дилуциони фактор

8 – укупна запремина узорка (у милилитрима)

10 – време инкубације узорка (у минутима)

2 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

1 – запремина ферментационе течности (у милилитрима)

5.5.4. Одређивање активности алкалне фосфатазе

Количина алкалне фосфатазе у ферментационој течности је одређена на основу количине неорганског фосфора, Allen-овом методом (Allen, 1940). Ензимска активност је мерена у реакционој смеси 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 инкубиране на 37°C / 30 минута. Након инкубације, ензимска реакција је прекинута додавањем 3 mL 10% ТСА. Епрувете су остављене на леду, 15 минута, након чега се садржај епрувета филтрира и филтрат се сакупља. Контролне епрувете су припремљене на исти начин, без инкубације. Одмах се додаје ТСА, епрувете су чуване на леду 15 минута и филтриране. Да би се одредила концентрација фосфора у узорку потребно је урадити Аленову реакцију. Одмерено је по 1 mL филтрата пробне и контролне смеше, у две епрувете, додаје се 0,4 mL амидола, 0,4 mL 60% РСА (перхлорна киселина), 0,2 mL NH₄-молибдата и 3 mL дестиловане воде. Епрувете су инкубиране на собној температури, 11 минута. Истовремено су припремљене серије разблажења стандардног раствора фосфора и понавља се поменута процедура, које служе за конструисање стандардне криве за фосфор (График 3). Мерење апсорбанце раствора је вршено на 720 nm.

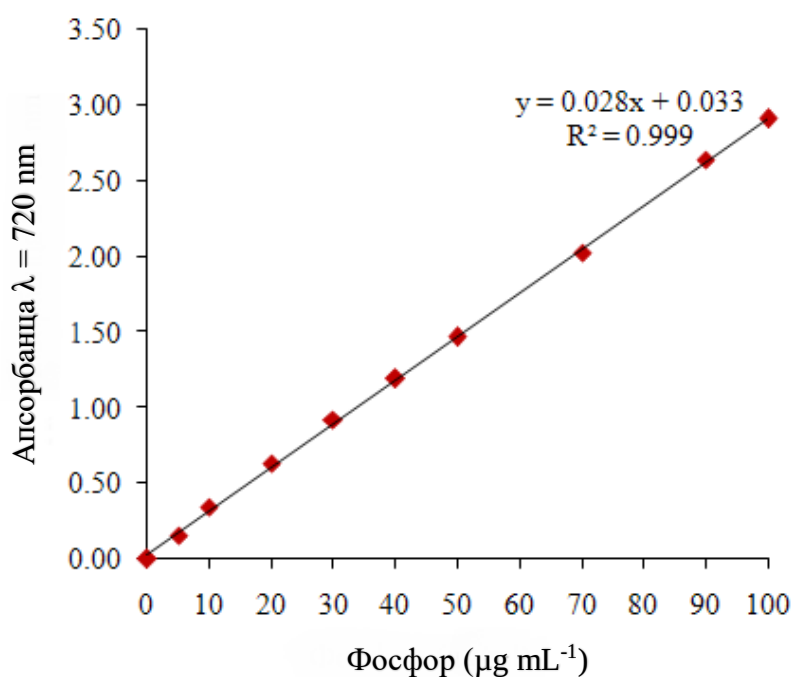


График 3. Стандардна крива за фосфор

Јединица ензимске активности:

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M фосфора}) \times (6) \times (\text{df})}{(1) \times (30) \times (5)} \quad (12)$$

df – дилуциони фактор

6 – укупна запремина узорка (у милилитрима)

30 – време инкубације узорка (у минутима)

5 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

1 – запремина ферментационе течности (у милилитрима)

5.5.5. Одређивање активности α -амилазе

Активност ензима α -амилазе у ферментационој течности је одређена припремом реакционе смеше која садржи 0,5 mL сировог ензимског екстракта, 1,5 mL пуфера (pH 6,9) (20 mM натријум-фосфата и 6,7 mM NaCl) и 1 mL 1% (w/v) скроба. Садржај тест епрувете је мешан и инкубиран у воденом купатилу на 37°C / 15 минута. У другој контролној епрувети се додају сви састојци као у тест епрувети и епрувета се оставља на леду док се не заврши инкубација пробе. Узето је по 1 mL садржаја обе епрувете и додато по 1 mL динитросалицилног реагенса (5,3 M К-Na-тартарата 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 очитана апсорбанца на 540 nm.

За конструисање стандардне криве (График 4) направљен је 0,2% раствор малтозе (2 mg mL⁻¹ раствора D-(+)-малтозног стандарда (Sigma, Aldrich)). У осам епрувета се одмери по 2 mL стандарда финалних концентрација: 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70 и 0,80 mg mL⁻¹. Као бланк се користи 2 mL дестиловане воде. У све епрувете се додаје по 1 mL динитросалицилног реагенса. Садржај епрувета се пажљиво промеша и инкубира 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, конструира се стандардна крива и из ње се одређује количина редукујућег шећера у узорку.

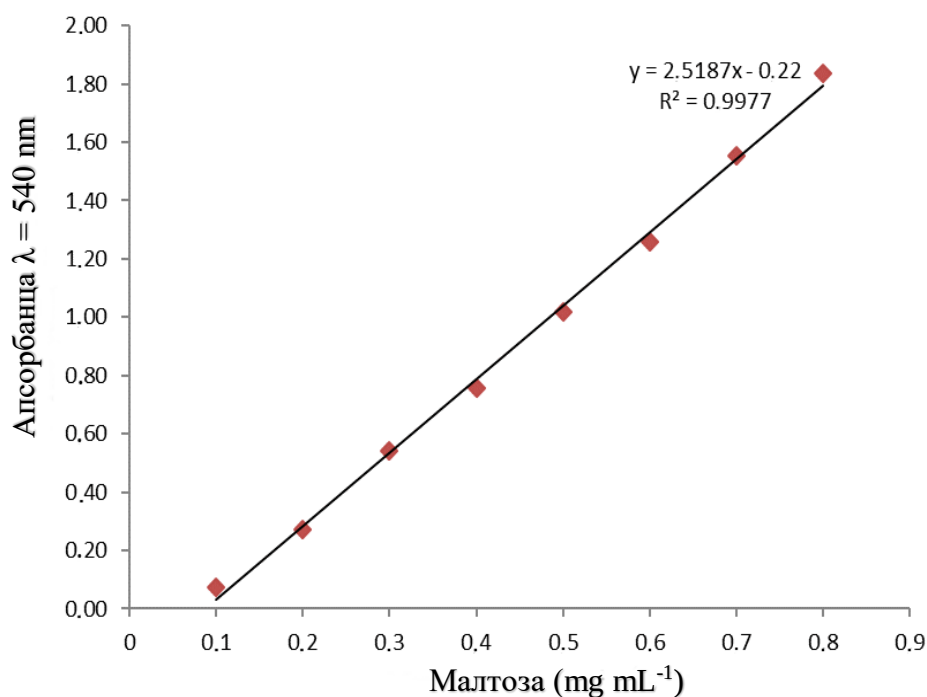


График 4. Стандардна крива за малтозу

Јединица ензимске активности:

$$\text{IU mL}^{-1} = \frac{(\mu\text{M малтозе}) \times (3) \times (\text{df})}{(1) \times (15) \times (0,5)} \quad (13)$$

df – дилуциони фактор

3 – укупна запремина узорка (у милилитрима)

15 – време инкубације узорка (у минутима)

0,5 – запремина узета за колориметријску детерминацију (у милилитрима)

1 – запремина ферментационе течности (у милилитрима)

5.5.6. Одређивање укупне количине протеина

Укупна количина протеина у ферментационој течности је одређена методом која 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 узорку, потребно је припремити стандардну криву за БСА (bovine serum albumin) почетне концентрације 1 mg mL⁻¹. У десет епрувета је одмерено по 0,1 mL стандарда, финалних концентрација: 0,10, 0,20, 0,30, 0,40, 0,50, 0,60, 0,70, 0,80, 0,90

и $1,00 \text{ mg mL}^{-1}$. Бланк епрувета садржи $0,1 \text{ mL}$ дестиловане воде. У све епрувете је додато по 3 mL Bradford-овог реагенса а потом су благо промешане. Епрувете су инкубиране на собној температури, 30 минута. Након истека инкубације, апсорбанца је очитана на 595 nm . На основу вредности стандарда познатих концентрација и добијених апсорбанци, конструише се стандардна крива (График 5). Количина протеина у испитиваном узорку се одређује на идентичан начин.

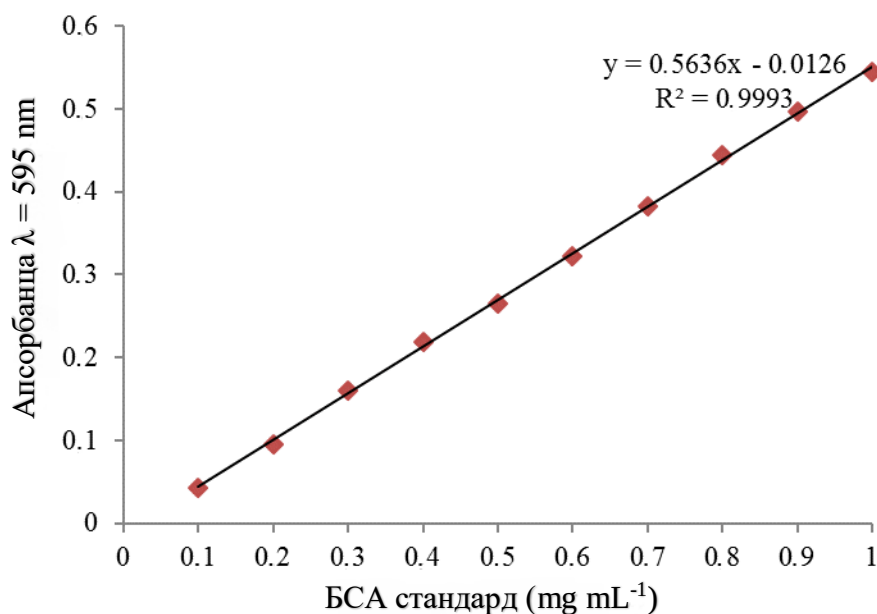


График 5. Стандардна крива за БСА стандард

5.6. Испитивање утицаја еколошких фактора на планктонски раст бактерија млечне киселине

Испитање утицаја различитих еколошких фактора (различита рН вредност подлоге и различите концентрације соли у синергизму са различитом температуром) на планктонски раст тестираних изолата је урађено према методама описаним у Thayer et al. (1987), са модификацијама, које су описане у даљем тексту.

5.6.1. Ефекат синергистичког деловања различитих рН и температуре на раст бактерија

Синергистичко деловање рН и температуре на раст бактерија је испитивано у модификованом MRS бујону, чије су рН вредности биле подешене на 5,5, 6,5, 7, 7,5 и 8,5. Контрола раста је била на рН 6,5 (то је рН MRS бујона). Додатком 36% HCl (Зорка Шабац, Шабац, Србија), су добијене киселе вредности рН, док је додатком 30% NaOH (Зорка Шабац, Шабац, Србија) постигнута неутрална и базна вредност подлоге. У 3 mL сваке врсте подлоге је додато 10 μ L иницијалне бактеријске суспензије (10^8 CFU mL⁻¹). Узорци су инкубирани на 4°C, 20°C и 37°C / 24 h. Након инкубације, резултати су очитани на спектрофотометру, на 600 nm. Контрола стерилности је био неинокулисан MRS бујон, као и бујони са одређеном рН вредности. Средње вредности апсорбанци контроле стерилности су одузете од средњих вредности апсорбанци теста, како би се добила апсорбанца чистог раста бактерија. Мерење за сваку бактеријску врсту је рађено у трипликату, а резултати су приказани као средња вредност.

5.6.2. Ефекат синергистичког деловања различитих концентрација соли и температуре на раст бактерија

За потребе овог експеримента, направљен је модификовани MRS бујон, који је садржао различите концентрације соли (4%, 6,5%, 8%). У 3 mL сваке врсте подлоге је додато 10 μ L иницијалне бактеријске суспензије (10^8 CFU mL⁻¹). Узорци су инкубирани на 4°C, 20°C и 37°C / 24 h. Након инкубације, резултати су очитани на спектрофотометру, на 600 nm. Контрола стерилности је био неинокулисан MRS бујон, као и бујони са одређеном концентрацијом соли. Средње вредности апсорбанци контроле стерилности су одузете од средњих вредности апсорбанци теста, како би се добила апсорбанца чистог раста бактерија. Мерење је вршено у трипликату за сваку бактеријску врсту, а резултати су приказани као средња вредност.

5.7. Статистичке методе

Резултати су приказани као средња вредност $\pm$ стандардна девијација (СД). Подаци добијени испитивањем хемијских карактеристика узорака сира, као и испитивање утицаја еколошких фактора на планктонски раст бактерија су анализирани уз помоћ Microsoft Excel (Redmond, Washington, DC, USA). Пеарсон-ов коефицијент корелације и Спирман-ов коефицијент корелације су коришћени за одређивање корелације између времена инкубације и добијене рН вредности у ацидификационом процесу. Анализа варијанси (ANOVA) је коришћена за поређење раста бактерија у различитим условима гастроинтестиналног тракта, за поређење осетљивости БМК према тестираним антибиотикима, за поређење раста БМК у присуству различитих шећера, као и за поређење утицаја различитих еколошких фактора на раст БМК. Упарени Т - тест је коришћен за поређење инхибиторног ефекта антибиотика и изолованих БМК на индикаторске врсте, као и за поређење утицаја различитих растварача на проценат хидрофобности бактерија. Резултати су анализирани уз помоћ SPSS софтвера, верзија 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

6. РЕЗУЛТАТИ

М

икробиолошким истраживањима сокобањског сира утврђен је квалитативни и квантитативни састав заједнице бактерија млечне киселине и формирана бактериотека аутохтоних врста и њихових изолата. Извршена је карактеризација раста БМК и испитан пробиотски потенцијал изолата, као и утицај еколошких фактора на планктонски раст изолата. Резултати истраживања приказани су графички (График 6 – 10, сл. 18) и табеларно (Табела 1 – 29).

6.1. Хемијске карактеристике сокобањског сира

Хемијске карактеристике сокобањског сира су испитиване у узорцима сакупљеним на пролеће (П) и у јесен (Ј), из изабраних домаћинства из села Језеро (1), Дуго Поље (2) и Читлук (3), како би се утврдило да ли постоји разлика у хемијском саставу сира која би утицала на сезонску заједницу бактерија млечне киселине. Резултати испитивања хемијских карактеристика сокобањског сира су приказани у Табели 1. Према садржају масти у сувој материји, сир припада полумасној до пуномасној групи, док према садржају воде у материји без масноће, сир припада групи полумеканих киселих сирева (енгл. acid-curd soft cheese group). На основу резултата утврђено је да разлике у хемијском саставу између сирева узоркованих на пролеће и на јесен нису статистички значајне ($p > 0,05$).

6.2. Квантитативни састав заједнице бактерија у сокобањском сиру

Укупна бројност БМК које расту на 37°C, је приказана у Табели 2. Укупан број бактерија био је у распону од 4×10^5 до $2,9 \times 10^8$ и разликовао се у односу на врсту подлоге, сезону изолације и домаћинство одакле је сир узоркован. Највећа бројност бактерија била је на М17 агару. У пролећним узорцима сира, већа бројност БМК је детектована у узорку из села Читлук (1 П), на М17 и MRS агару, док је у летњим и јесењим узорцима највећа бројност БМК детектована у узорку из села Дуго Поље (2 Л и 2 Ј). Узорак из села Језеро, у свим сезонама садржао највише ентерокока. Узорак из села Дуго Поље ни у једној сезони није садржао ентерококе. Аеробне мезофилне бактерије су детектоване у свим узорцима, што је и очекивано, с обзиром на традиционалан начин прављења сира.

Табела 1. Хемијске карактеристике сокобањског сира

Хемијске карактеристике	Узорак					
	1 П	2 П	3 П	1 Ј	2 Ј	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
pH	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 ± СД; ¹ степен по Soxhlet Henkel-y

Табела 2. Укупан број бактерија млечне киселине (БМК) и аеробних мезофилних бактерија у сокобањском сиру

Тип Подлоге	Узорак								
	1 П ^е	2 П	3 П	1 Ј	2 Ј	3 Ј	1 Ј	2 Ј	3 Ј
MRS ^а	1,4 × 10 ⁷	1,3 × 10 ⁷	3,2 × 10 ⁷	3,2 × 10 ⁶	8,2 × 10 ⁷	4,3 × 10 ⁷	6,3 × 10 ⁷	7,5 × 10 ⁷	6,5 × 10 ⁷
M17 ^б	8,1 × 10 ⁷	8,3 × 10 ⁷	9 × 10 ⁷	4,2 × 10 ⁷	8,5 × 10 ⁷	5,7 × 10 ⁷	7,9 × 10 ⁷	2,9 × 10 ⁸	2,1 × 10 ⁸
ХА ^с	2,9 × 10 ⁷	1,8 × 10 ⁷	1,2 × 10 ⁸	3,5 × 10 ⁷	1,6 × 10 ⁷	4,2 × 10 ⁷	4,3 × 10 ⁷	8,3 × 10 ⁷	5,4 × 10 ⁷
ЕЖА ^д	4 × 10 ⁵	н.д.	2 × 10 ⁵	1 × 10 ⁶	н.д.	2 × 10 ⁵	2,4 × 10 ⁶	н.д.	3,1 × 10 ⁵

^аMRS агар; ^бM17 агар; ^сХранљиви агар; ^дЕскулин жучни агар;

^еCFU g⁻¹ сира – средње вредности три различита бројања;

н.д. – бактерије нису детектоване

6.3. Физиолошка карактеризација и идентификација изолованих бактерија млечне киселине

Прелиминарна идентификација изолованих бактерија млечне киселине је урађена уз помоћ физиолошких и биохемијских тестова. Резултати су приказани у Табелама 3 и 4.

Табела 3. Физиолошке карактеристике *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. изолованих из сокобањског сира

Својство	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. plantarum</i> 229v	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
Морфологија	бацил	бацил	бацил	бацил	кока	кока
Раст на 15°C	+	+	+	+	+	+
Раст на 45°C	+	—	—	—	—	—
Раст на 4% NaCl	+	+	+	+	+	+
Раст на 6,5% NaCl	—	—	—	—	+	+
Раст на 8% NaCl	—	—	—	—	—	—
Хидролиза аргинина	—	+	—	—	+	+
Хидролиза ескулина	+	+	—	—	+	+
Способност коришћења цитрата	+	+	—	—	+	+
Производња CO ₂	+	+	—	—	—	—
Производња диацетила	—	—	—	—	—	+
Производња слузи на MRS агару	—	—	—	—	—	—
Раст у млеку са 0,1% метиленским плавим	+	+	+	+	+	+

„+“ – позитивна реакција; „—“ – негативна реакција

Табела 4. Физиолошке карактеристике *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. изолованих из сокобањског сира

Својство	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i> ATCC 29211	<i>S. uberis</i>	<i>S. agalactiae</i>
Морфологија	кока	кока	кока	кока	кока	кока	кока
Раст на 15°C	+	+	+	+	+	+	+
Раст на 45°C	+	+	+	+	+	+-	+-
Раст на 4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Раст на 6,5% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
Раст на 8% NaCl	+	+	+	+	+	+-	+-
Хидролиза аргинина	+	+	+	-	+	+	+
Хидролиза ескулина	+	+	+	+	+	+	-
Хидролиза хипурата	+	+	+	+	+	+	+
Способност коришћења цитрата	+	+	+	+	+	+-	+
Производња CO ₂	-	-	-	-	-	+-	+
Производња диацетила	-	-	-	-	-	-	-
Производња слузи на MRS агару	-	-	-	-	-	-	-
Раст у млеку са 0,1% метиленским плавим	+	+	+	+	+	-	-

„+“ - позитивна реакција; „-“ - негативна реакција; „+-“ - делимично позитивна реакција

Након идентификације до нивоа рода, урађена је идентификација бактерија до нивоа врсте, уз помоћ система за идентификацију, API CH50 (за *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp.) и Microgen Strep ID (за *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp.). Резултати су приказани у Табелама 5 и 6.

Табела 5. Способност ферментације шећера *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. применом API 50CH система

Својство	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
D-рибоза	+	+	+	+	+
D-галактоза	+	+	+	+	+
D-глюкоза	+	+	+	+	+
D-фруктоза	+	+	+	+	+
D-маноза	+	+	+	+	+
D-манитол	–	+	–	–	–
D-трехалоза	–	+	+	+	+
D-лактоза	+	+	+	+	+
D-малтоза	+	+	+	+	+
D-целиобиоза	–	+	+	+	+
D-тагатоza	–	–	+	–	–
D-фукоза	–	–	–	–	–
L-фукоза	–	–	–	–	–
D-арабитол	–	–	–	–	–
L-арабитол	–	–	–	–	–
D-арабиноза	–	–	–	–	–
L-арабиноза	–	+	–	–	–
L-ксилоза	–	–	–	–	–
L-сорбоза	–	–	–	–	–
L-рамноза	–	–	–	–	–
Галактитол (дулцитол)	–	–	–	–	–
Амигдалин	–	+	+	–	–
Салицин	–	+	+	–	–
Инулин	–	–	–	–	–
Амодон	–	–	–	–	–
Гликоген	–	–	–	–	–
Индоситол	–	–	–	–	–
Ксилитол	–	–	–	–	–
Глицерол	–	–	–	–	–
Еритритол	–	–	–	–	–
Калијум глюконат	+	–	+	–	–
Калијум 2-кетоглуконат	–	–	–	–	–
Калијум 5-кетоглуконат	–	–	–	–	–

„+“ – позитивна реакција; „–“ – негативна реакција

Табела 6. Способност ферментације шећера *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. применом Microgen Strep ID система

Својство	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. agalactiae</i>
Мелибиоза	+	–	+	+	+	+
Сорбитол	–	+	–	–	+	–
Инулин	–	–	–	–	–	–
Лактоза	+	+	+	+	+	+
Арабитол	–	–	–	–	–	–
Рибоза	+	+	+	+	+	+

„+“ – позитивна реакција; „–“ – негативна реакција

У испитиваним узорцима сокобањског сира изоловано је укупно 108 изолата од којих су сви били Грам-позитивни и каталаза негативни. Из пролећних узорка сира изоловано је 18 изолата БМК, из летњих 41 изолат, док је из јесењих узорка изоловано 49 изолата. Највећи број изолата добијен је из села Дуго Поље, током лета (2 Л). Изолати су били подвргнути даљој физиолошкој карактеризацији и идентификацији до нивоа врсте. Детерминисано је 11 врста, од којих 33,03% идентификованих врста припада роду *Enterococcus*, 31,19% припада роду *Lactococcus*, 28,44% припада роду *Lactobacillus* и 7,4% припада роду *Streptococcus*. У оквиру рода *Enterococcus*, четири врсте су идентификоване: *E. faecium* (15 изолата), *E. faecalis* (13 изолата), *E. durans* (4 изолата) и *E. hirae* (4 изолата). У оквиру рода *Lactococcus*, две врсте су идентификоване: *L. lactis* subsp. *lactis* (21 изолат) и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (13 изолата). У оквиру рода *Lactobacillus*, три врсте су идентификоване: *Lb. fermentum* (13 изолата), *Lb. brevis* (9 изолата) и *Lb. plantarum* (8 изолата). У оквиру рода *Streptococcus*, две врсте су идентификоване: *S. uberis* (7 изолата) и *S. agalactiae* (1 изолат).

Бројност врста и изолата показује разлике у саставу заједнице у односу на произвођаче и на сезоне (Табела 7). *Lb. brevis* и *L. lactis* subsp. *lactis* нису изоловани у пролећним узорцима сира. Род *Enterococcus* није детектован у узорцима из села Дуго Поље ни у једној сезони (узорци 2 П, 2 Л и 2 Ј). *E. durans* и *E. hirae* нису детектовани у пролећним узорцима сира (узорак 1 П, 2 П и 3 П), док *E. hirae* није детектован ни у летњим узорцима сира (узорак 1 Л, 2 Л и 3 Л). Род *Streptococcus* је изолован само из летњих узорка сира у домаћинству из села Дуго Поље (2 Л).

Табела 7. Заступљеност изолата бактерија млечне киселине у сокобањском сиру

Врста		<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>S. uberis</i>	<i>S. agalactiae</i>
Узорак	1П	1*	/	1	/	5	1	4	/	/	/	/
	2П	/	/	/	/	4	/	/	/	/	/	/
	3П	/	/	/	/	1	/	1	/	/	/	/
	1Ј	3	1	/	3	/	2	2	/	/	/	/
	2Ј	2	2	3	5	1	/	/	/	/	7	1
	3Ј	1	1	/	2	/	3	1	/	1	/	/
	1Ј	2	1	/	2	/	6	2	1	3	/	/
	2Ј	3	3	4	4	2	/	/	/	/	/	/
	3Ј	1	1	/	5	/	3	3	3	/	/	/

*Број изолата; „/“ – изолат није детектован у узорку

Након идентификације комерцијалним системима за идентификацију, урађена је коначна идентификација коришћењем МАЛДИ-ТОФ масене спектрофотометрије. Вредности оцена $\geq 2,000$ (зелена боја) узете су као тачна идентификација до нивоа врсте (видети прилоге). За сваки одабрани изолат је потврђена предходно урађена идентификација преко биохемијских система за идентификацију.

Ацидификациона активност бактерија

Сви идентификовани *Lactobacillus* изолати су показали способност формирања груша након инкубације у стандардном (чистом) и обогаћеном млеку, након периода инкубације од 24 h. Поређењем резултата са вредностима контролног узорка/стандардног млека утврђено је да су све врсте из рода *Lactobacillus* показале добру ацидификациону активност (pH око 5,6 након 6 h и 4,8 након 24 h). У обогаћеном млеку (pH 6), ацидификациона активност је била још боља (pH око 5,1 након 6 h и 4,1 након 24 h) (График 6). Сви идентификовани *Lactococcus* изолати су показали способност формирања груша након 24 h инкубације у стандардном и обогаћеном млеку. Поређењем резултата са вредностима контролног узорка/стандардног млека утврђено је да су све врсте из рода *Lactococcus* показале добру ацидификациону активност (pH око 5,8 након 6 h и 4,73 након 24 h). У обогаћеном млеку (pH 6), ацидификациона активност је била још боља (pH око 4,8 након 6 h и 4,1 након 24 h) (График 6).

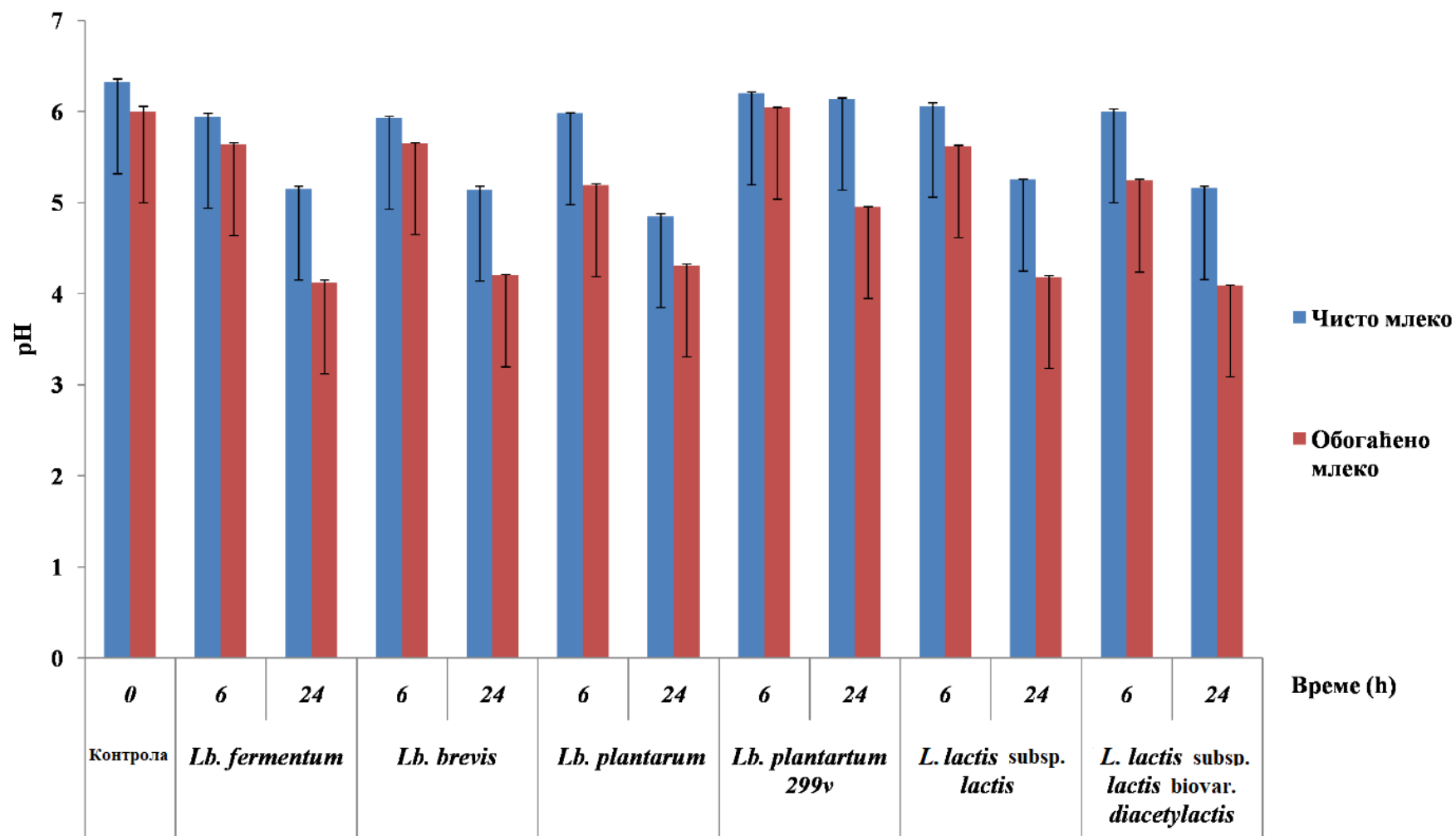


График 6. Ацидификациона активност тестираних изолата *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp.

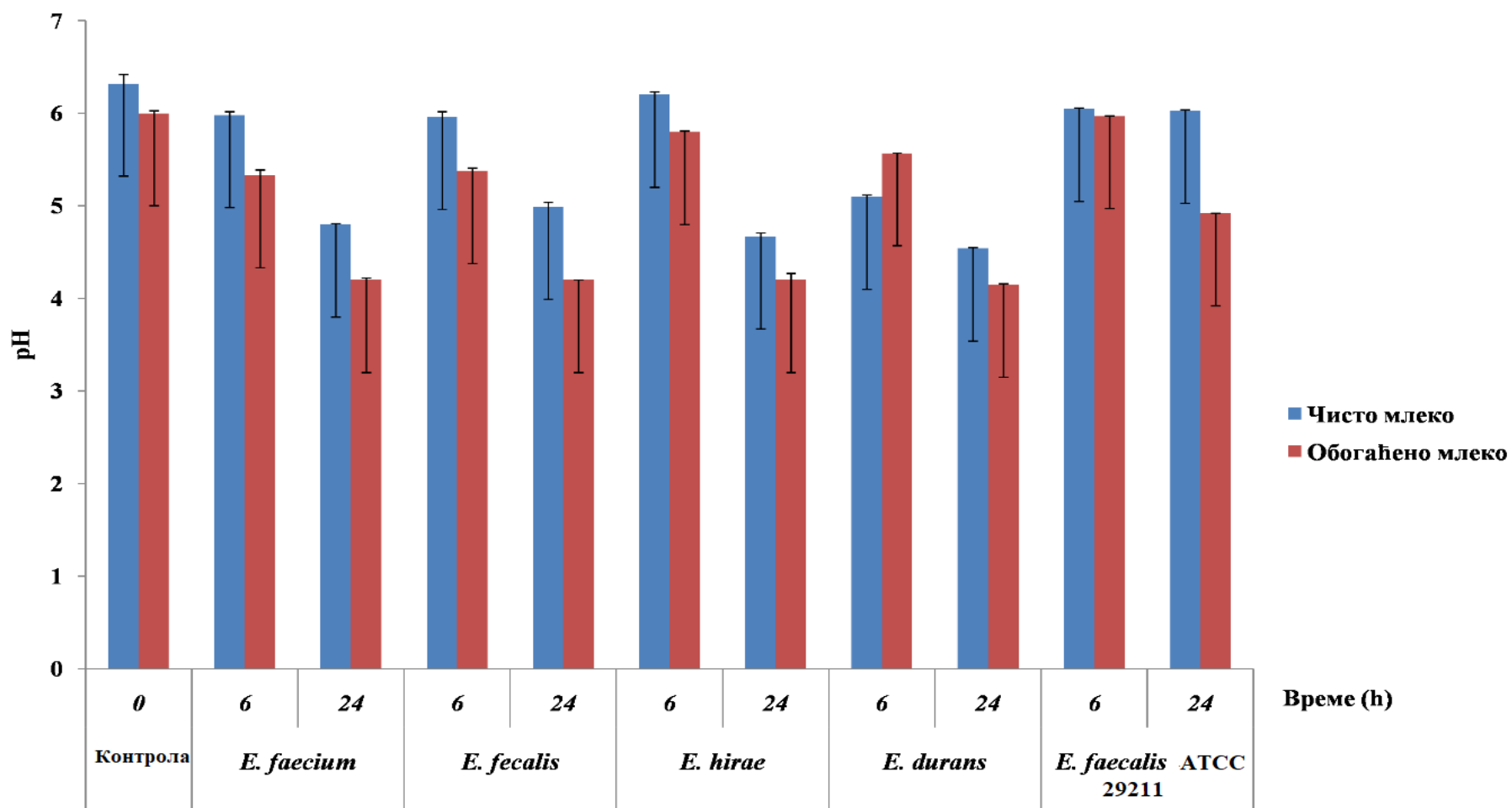


График 7. Ацидификациона активност тестираних изолата *Enterococcus* spp.

Сви идентификовани *Enterococcus* изолати су показали способност формирања груша након 24 h инкубације у стандардном и обогаћеном млеку. Поређењем резултата са вредностима контролног узорка/чистог млека утврђено је да су све изоловане врсте из рода *Enterococcus* показале добру ацидификациону активност (pH око 5,6 након 6 h и 4,6 након 24 h). У обогаћеном млеку (pH 6), ацидификациона активност је била боља (pH око 4,9 након 6 h и 4,2 након 24 h) (График 7).

Идентификовани *Streptococcus* изолати су показали умерену ацидификациону активност, али без формирања груша и гаса, у стандардном и обогаћеном млеку. Изолати *S. uberis*, у чистом млеку, након 6 h инкубације, нису утицали на pH, док је након 24 h, pH био 5,9. У обогаћеном млеку, након 6 h, pH је био 5,82 док је након 24 h, pH био 5,27. *S. agalactiae* у чистом млеку, након 6 h инкубације, је снизио pH на 5,94, док је након 24 h, измерена pH износила 5,85. У обогаћеном млеку, након 6 h, измерена pH је износила 5,66 док је након 24 h, измерена pH била 5,20. На основу резултата, може се закључити да су сви изолати БМК, осим стрептокока, показали одличну ацидификациону активност.

6.4. Антимикробни потенцијал изолованих бактерија млечне киселине

Антимикробни потенцијал изолованих БМК је испитиван на пет индикаторских врста, и то два ATCC соја и три изолате ентеробактерија из сокобањског сира. У табелама 8, 9, 10 и 11 су приказани резултати за изолате бактерија млечне киселине које су показале антимикробни потенцијал.

Тестирани *Lactobacillus* spp. изолати су показали антимикробни ефекат на најмање једну од пет испитаних индикаторских врста. Изолати *Lb. fermentum* су деловали инхибиторно на *E. coli* ATCC 25922 у опсегу од 12 – 18 mm, од 18 – 24 mm на *P. mirabilis* ATCC 12453, од 14 – 22 mm на *K. oxytoca* KGPMF1 и *K. ornithinolytica* KGPMF8 и од 14 – 20 mm на *A. hydrophila* KGPMG65. Изолати *Lb. brevis* су деловали инхибиторно у опсегу од 16 – 22 mm, док су изолати *Lb. plantarum* деловали инхибиторно у опсегу од 12 – 21 mm на све тестиране индикаторске ћелије (Табела 8). Бистра зона највероватније указује на јачи (бактерицидни) ефекат, мутна зона на бактериостатички. Најбољу антимикробну активност су показали изолати *Lb. fermentum* KGPMF28, *Lb. fermentum* KGPMF29, *Lb. brevis* KGPMF37 и *Lb. plantarum* KGPMF62.

Табела 8. Антимикробни ефекат *Lactobacillus* spp. изолата на индикаторске врсте

Врста	Изолат	Индикаторске врсте									
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453		<i>K. oxytoca</i> KGPMF1		<i>K. ornithinolytica</i> KGPMF8		<i>A. hydrophila</i> KGPMF65	
		ЗИ*	И*	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF61	/	/	19	М	21	М	20	М	16	Б
	KGPMF27	/	/	19	М	21	Б	18	Б	20	Б
	KGPMF28	/	/	21	М	20	Б	20	Б	18	Б
	KGPMF29	12	Б	22	М	18	Б	18	Б	18	Б
	KGPMF30	/	/	24	М	20	Б	18	Б	20	Б
	KGPMF31	16	Б	18	Б	14	Б	12	Б	14	Б
	KGPMF32	18	М	/	/	22	М	16	Б	18	Б
	KGPMF33	14	Б	/	/	20	Б	14	Б	20	Б
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF34	/	/	/	/	22	Б	22	Б	16	Б
	KGPMF35	/	/	/	/	20	Б	20	Б	18	Б
	KGPMF36	/	/	20	Б	20	Б	20	Б	18	Б
	KGPMF37	/	/	22	Б	18	Б	18	Б	18	Б
	KGPMF38	22	Б	26	М	22	Б	18	Б	20	Б
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF39	16	Б	/	/	14	Б	/	/	14	Б
	KGPMF40	16	М	18	М	/	/	12	Б	12	Б
	KGPMF62	/	/	21	М	21	М	21	М	18	Б

„ЗИ“– зона инхибиције (пречник изражен у mm); „И“– изглед зоне инхибиције (Б – бистра зона; М – мутна зона); „/“– нема инхибиције

Тестирани *Lactococcus* spp. изолати су показали антимикробни ефекат на најмање једну од пет испитаних индикаторских врста. Изолати *L. lactis* subsp. *lactis* су деловали инхибиторно у опсегу од 12 – 24 mm, док су изолати *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* деловали инхибиторно у опсегу од 10 – 20 mm (Табела 9). Најбољу антимикробну активност су показали изолати *L. lactis* subsp. *lactis* KGPMF23, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF26, KGPMF55 и KGPMF57.

Табела 9. Антимикробни ефекат *Lactococcus* spp. изолата на индикаторске врсте

Врста	Изолат	Индикаторске врсте									
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453		<i>K. oxytoca</i> KGPMF1		<i>K. ornithinolytica</i> KGPMF8		<i>A. hydrophila</i> KGPMF65	
		ЗИ*	И*	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF21	19	М	19	М	16	Б	/	/	12	Б
	KGPMF22	19	М	22	М	12	Б	/	/	14	Б
	KGPMF23	/	/	24	М	22	М	18	Б	14	Б
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF24	10	Б	/	/	16	М	12	Б	20	Б
	KGPMF25	/	/	12	Б	20	М	16	Б	18	Б
	KGPMF26	20	М	16	Б	18	М	16	Б	20	Б
	KGPMF50	/	/	/	/	12	Б	12	Б	16	Б
	KGPMF51	12	Б	12	Б	10	Б	10	Б	10	Б
	KGPMF52	10	Б	12	Б	10	Б	10	Б	12	Б
	KGPMF53	16	Б	16	Б	14	Б	14	Б	16	Б
	KGPMF54	14	Б	12	Б	16	Б	14	Б	16	Б
	KGPMF55	14	Б	16	Б	16	Б	16	Б	16	Б
	KGPMF56	10	Б	12	Б	12	Б	/	/	10	Б
	KGPMF57	10	Б	10	Б	12	Б	12	Б	16	Б
	KGPMF58	12	Б	10	Б	12	Б	12	Б	14	Б
	KGPMF59	/	/	/	/	10	Б	10	Б	10	Б

„ЗИ“– зона инхибиције (пречник изражен у mm); „И“– изглед зоне инхибиције (Б – бистра зона; М – мутна зона); „/“– нема инхибиције

E. hirae и *E. durans* изолати су показали јако слаб антимикробни ефекат на испитиване индикаторске врсте. Само по један изолат (KGPMF9 и KGPMF10) су деловали инхибиторно у опсегу од 10 – 15 mm. *E. faecalis* изолати су деловали инхибиторно у опсегу од 10 – 17 mm, док су *E. faecium* изолати деловали инхибиторно у опсегу од 12 – 22 mm (Табела 10). Најбољу антимикробну активност су показали изолати *E. faecium* KGPMF14, KGPMF17 и *E. faecalis* KGPMF49.

Табела 10. Антимикробни ефекат *Enterococcus* sp. изолата на индикаторске врсте

Врста	Изолат	Индикаторске врсте									
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453		<i>K. oxytoca</i> KGPMF1		<i>K. ornithinolytica</i> KGPMF8		<i>A. hydrophila</i> KGPMF65	
		ЗИ*	И*	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	15	Б	/	/	17	Б	10	Б	14	Б
<i>E. durans</i>	KGPMF10	12	М	13	Б	11	М	12	Б	14	Б
<i>E. faecium</i>	KGPMF11	/	/	19	М	12	Б	12	Б	12	Б
	KGPMF12	/	/	14	Б	15	Б	12	Б	12	Б
	KGPMF13	/	/	18	М	20	М	14	Б	12	Б
	KGPMF14	20	М	22	М	14	Б	12	Б	12	Б
	KGPMF15	/	/	22	М	12	Б	12	Б	12	Б
	KGPMF16	17	М	19	М	12	Б	/	/	12	Б
	KGPMF17	20	М	17	М	/	/	12	Б	12	Б
	KGPMF18	16	Б	15	М	12	Б	16	Б	14	Б
	KGPMF19	12	Б	16	Б	14	Б	12	Б	12	Б
	KGPMF20	/	/	20	М	/	/	10	Б	12	Б
<i>E. faecalis</i>	KGPMF41	16	Б	17	М	/	/	16	Б	10	Б
	KGPMF42	17	М	10	Б	12	Б	10	Б	12	Б
	KGPMF43	/	/	10	Б	12	Б	10	Б	12	Б
	KGPMF44	/	/	/	/	10	Б	14	Б	12	Б
	KGPMF45	12	Б	/	/	12	Б	10	Б	12	Б
	KGPMF47	/	/	12	Б	/	/	/	/	12	Б
	KGPMF48	/	/	/	/	10	Б	10	Б	12	Б
	KGPMF49	10	Б	14	Б	14	Б	/	/	10	Б
	ATCC 29211	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

„ЗИ“ - зона инхибиције (пречник изражен у mm); „И“ - изглед зоне инхибиције (Б – бистра зона; М – мутна зона); „/“ - нема инхибиције

Тестирани *Streptococcus* spp. изолати су показали антимикуробни ефекат на најмање једну од пет испитаних индикаторских врста. Изолати *S. uberis* су деловали инхибиторно у опсегу од 12 – 20 mm, док је изолат *S. agalactiae* деловао инхибиторно у опсегу од 16 – 18 mm (Табела 11).

Табела 11. Антимикуробни ефекат *Streptococcus* spp. изолата на индикаторске врсте

Врста	Изолат	Индикаторске врсте									
		<i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453		<i>K. oxytoca</i> KGPMF1		<i>K. ornithinolytica</i> KGPMF8		<i>A. hydrophila</i> KGPMF65	
		ЗИ*	И*	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И	ЗИ	И
<i>S. uberis</i>	KGPMF1	19 *	М	14	Б	20	М	9	Б	18	М
	KGPMF2	10	Б	14	М	20	М	10	Б	20	М
	KGPMF3	/	/	12	Б	20	М	15	М	18	М
	KGPMF4	16	М	18	М	14	М	12	Б	15	М
	KGPMF5	16	М	18	М	16	М	14	М	16	М
	KGPMF6	19	М	/	/	12	Б	12	Б	13	Б
	KGPMF7	20	М	/	/	15	М	/	/	15	М
<i>S. agalactiae</i>	KGPMF8	/	/	16	М	18	М	16	М	16	М

„ЗИ“ - зона инхибиције (пречник изражен у mm); „И“ - изглед зоне инхибиције (Б – бистра зона; М – мутна зона); „/“ - нема инхибиције

На основу резултата, може се закључити да су изолати показали умерен инхибиторни ефекат на тестиране индикаторске врсте. Ови резултати су искоришћени при одабиру сојева за испитивање потенцијалног пробиотског потенцијала.

6.5. Испитивање пробиотског потенцијала изабраних бактерија млечне киселине

На основу резултата ацидификационе активности и антимикуробног потенцијала, одабрано је 16 изолата за испитивање пробиотског потенцијала: четири изолата из рода *Lactobacillus*, шест изолата из рода *Lactococcus* и шест изолата из рода *Enterococcus*. Као контролни сојеви, коришћени су комерцијалан пробиотски сој *Lb. plantarum* LP 299v и ATCC сој *E. faecalis* ATCC 29211.

Један од најважнијих критеријума да би се један сој означио као потенцијални пробиотик, јесте његова способност толеранције према условима који владају током проласка кроз гастроинтестинални тракт. Да би преживеле до танког црева, бактерије морају да прођу и екстремне услове желуца (ниска рН). Резултати су приказани у Табели 12. Сви тестирани изолати су показали високи проценат преживљавања у условима ниске рН вредности (рН 5, 4 и 3). Најбољу способност преживљавања су показали лактобацили. С обзиром на резултате, сви изолати су подвргнути испитивању способности преживљавања у условима желудачне киселине (Табела 13) и условима дуоденума (Табела 14).

Сви тестирани изолати су показали способност преживљавања у симулираним условима желуца (желудачна киселина и пепсин), након три сата инкубације, са процентом раста од 56,9 – 90% (CFU mL⁻¹), у поређењу са контролом раста, на чврстој подлози (описано у поглављу 5. Методе). Сви изолати су подвргнути даљем испитивању. Изолати *Lactobacillus* spp. су порасли у сличном проценту као комерцијални пробиотски сој, док су изолати *Enterococcus* spp. боље расли него ATCC сој (Табела 13).

Након раста у симулираним условима желуца, изолати су пребачени у подлогу која симулира услове у дуоденуму. Остављени су на инкубацији 4 сата, јер се сматра да се храна толико задржава у тим условима. Након инкубације, извршено је пресејавање на чврсту подлогу, како би се извршило бројање живих ћелија. Свих 16 изолата су показали способност преживљавања, али у значајно мањем проценту него у подлози са симулираним условима желуца. Проценат раста се кретао од 30,4 – 63% (CFU mL⁻¹), у поређењу са контролом раста, на чврстој подлози (Табела 14). Изолати *Lactobacillus* spp. су порасли у мањем проценту него комерцијални пробиотски сој, док су изолати *Enterococcus* spp. боље расли него ATCC сој.

Табела 12. Толеранција бактерија млечне киселине према условима ниске рН

Врста	Изолат	Контрола раста	pH 5		pH 4		pH 3	
		A	A	%	A	%	A	%
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	1,07 ± 0,04	0,99 ± 0,02	92,52*	0,87 ± 0,02	81,31*	0,75 ± 0,04	70,09*
	KGPMF29	1,02 ± 0,04	0,96 ± 0,02	94,12*	0,83 ± 0,02	81,37*	0,74 ± 0,05	72,55*
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	1,01 ± 0,04	0,97 ± 0,01	96,04	0,82 ± 0,02	81,19*	0,74 ± 0,04	73,27*
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	1,08 ± 0,04	0,99 ± 0,02	91,67*	0,88 ± 0,00	81,48*	0,80 ± 0,03	74,07*
	LP 299v	0,29 ± 0,08	0,16 ± 0,02	55,17*	0,15 ± 0,02	51,72*	0,13 ± 0,03	44,83*
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	KGPMF23	1,04 ± 0,02	0,93 ± 0,00	89,42*	0,77 ± 0,01	74,04*	0,73 ± 0,03	70,19*
<i>L. lactis subsp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	0,71 ± 0,01	0,65 ± 0,01	91,55*	0,21 ± 0,00	29,58*	0,16 ± 0,02	22,54*
	KGPMF54	1,02 ± 0,01	0,98 ± 0,02	96,08	0,86 ± 0,00	84,31*	0,78 ± 0,03	76,47*
	KGPMF55	0,84 ± 0,06	0,59 ± 0,02	70,24*	0,29 ± 0,03	34,53*	0,24 ± 0,00	28,57*
	KGPMF57	1,04 ± 0,05	1,00 ± 0,00	96,15	0,84 ± 0,01	80,77*	0,83 ± 0,00	79,81*
	KGPMF59	0,98 ± 0,05	0,85 ± 0,01	86,73*	0,74 ± 0,01	75,51*	0,69 ± 0,03	70,41*
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	0,22 ± 0,04	0,16 ± 0,01	72,71*	0,15 ± 0,02	68,18*	0,14 ± 0,01	63,64*
<i>E. durans</i>	KGPMF10	0,25 ± 0,01	0,16 ± 0,01	64*	0,14 ± 0,02	56*	0,14 ± 0,00	56*
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0,28 ± 0,00	0,26 ± 0,00	92,85	0,24 ± 0,01	85,71*	0,17 ± 0,03	60,71*
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	0,26 ± 0,04	0,22 ± 0,02	84,62	0,18 ± 0,01	69,23*	0,17 ± 0,01	65,38*
	KGPMF48	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,02	89,29	0,17 ± 0,01	60,71*	0,15 ± 0,01	53,57*
	KGPMF49	0,26 ± 0,06	0,22 ± 0,04	84,62	0,20 ± 0,00	76,92*	0,18 ± 0,00	69,23*
	ATCC 29211	0,28 ± 0,05	0,08 ± 0,05	28,57*	0,07 ± 0,04	25,00*	0,04 ± 0,03	14,29*

„А“ - апсорбанца раста приказана као средња вредност ± СД; „%“ - процентуални раст бактерија;

*статистички значајна разлика у поређењу са контролом раста ($p < 0,05$)

Табела 13. Толеранција бактерија млечне киселине према симулираним условима желудачне киселине

Врста	Изолат	1 ^h		2 ^h		3 ^h		% преживљавања након 3 ^h (CFU mL ⁻¹)
		A	%	A	%	A	%	
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	0,63 ± 0,01	90*	0,62 ± 0,01	88,57*	0,55 ± 0,01	78,57	79,8 ± 0,11
	KGPMF29	0,62 ± 0,02	96,87*	0,62 ± 0,02	96,87*	0,54 ± 0,02	84,37	81,6 ± 0,21
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	0,62 ± 0,01	101,64*	0,59 ± 0,03	96,72	0,55 ± 0,02	90,13	88,9 ± 0,12
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	0,62 ± 0,01	89,85*	0,66 ± 0,02	95,65*	0,54 ± 0,01	78,26	79,5 ± 0,33
	LP 299v	0,18 ± 0,02	94,74	0,17 ± 0,02	89,47	0,17 ± 0,00	89,47	89,6 ± 0,31
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF23	0,61 ± 0,00	103,39*	0,60 ± 0,04	101,69*	0,47 ± 0,02	79,66*	75,2 ± 0,20
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	0,27 ± 0,00	90	0,25 ± 0,01	83,33*	0,25 ± 0,01	83,33*	86,6 ± 0,13
	KGPMF54	0,58 ± 0,03	84,06*	0,56 ± 0,02	81,16	0,57 ± 0,04	82,61*	79,6 ± 0,26
	KGPMF55	0,29 ± 0,00	67,44	0,31 ± 0,02	72,09	0,26 ± 0,01	60,46	58,2 ± 0,41
	KGPMF57	0,60 ± 0,01	92,31*	0,57 ± 0,02	87,69*	0,54 ± 0,01	83,08	84,8 ± 0,33
	KGPMF59	0,58 ± 0,03	87,88*	0,57 ± 0,02	86,36*	0,54 ± 0,02	81,81	80,4 ± 0,22
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	0,12 ± 0,00	92,31	0,12 ± 0,00	92,31	0,12 ± 0,00	92,31	90 ± 0,64
<i>E. durans</i>	KGPMF10	0,27 ± 0,02	90	0,24 ± 0,01	80	0,20 ± 0,02	66,67*	56,9 ± 0,60
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0,15 ± 0,00	100	0,13 ± 0,01	86,67	0,12 ± 0,00	80*	82,9 ± 2,33
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	0,15 ± 0,00	100	0,14 ± 0,03	93,33	0,13 ± 0,01	86,67	85,5 ± 0,20
	KGPMF48	0,18 ± 0,02	85,71	0,18 ± 0,02	85,71	0,17 ± 0,02	80,95*	80,9 ± 4,56
	KGPMF49	0,15 ± 0,01	100	0,14 ± 0,04	93,33	0,13 ± 0,02	86,67*	86,4 ± 0,36
	ATCC 29211	0,10 ± 0,01	66,67	0,10 ± 0,01	66,67	0,09 ± 0,02	60*	72,8 ± 2,12

„А“- апсорбанца раста приказана као средња вредност ± СД; „%“- процентуални раст бактерија;

* статистички значајна разлика у поређењу са контролом раста ($p < 0,05$)

Табела 14. Толеранција бактерија млечне киселине према симулираним условима дуоденума

Врста	Изолат	1 ^h		2 ^h		3 ^h		4 ^h		% преживљавања након 4 ^h (CFU mL ⁻¹)
		A	%	A	%	A	%	A	%	
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	0,46 ± 0,01	59,74	0,46 ± 0,02	59,74	0,40 ± 0,02	51,95	0,40 ± 0,01	51,95	41,9 ± 0,33
	KGPMF29	0,44 ± 0,02	61,97	0,43 ± 0,03	60,56	0,36 ± 0,03	50,70	0,33 ± 0,01	46,48*	56,5 ± 0,52
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	0,56 ± 0,00	90,32	0,56 ± 0,03	90,32	0,50 ± 0,01	80,65	0,49 ± 0,00	79,03	63 ± 0,20
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	0,51 ± 0,02	69,86	0,50 ± 0,01	68,49	0,41 ± 0,00	56,16*	0,41 ± 0,01	56,16*	26,2 ± 0,62
	LP 299v	0,25 ± 0,01	89,29	0,21 ± 0,01	75	0,19 ± 0,02	67,86*	0,18 ± 0,00	64,29*	58,4 ± 0,20
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF23	0,46 ± 0,01	71,87*	0,49 ± 0,02	76,56*	0,48 ± 0,02	75	0,46 ± 0,01	71,87	52,8 ± 0,44
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	0,22 ± 0,00	61,11	0,24 ± 0,02	66,67*	0,22 ± 0,02	61,11	0,21 ± 0,01	58,33	52,3 ± 0,12
	KGPMF54	0,50 ± 0,01	63,29	0,49 ± 0,00	62,02	0,40 ± 0,02	50,63*	0,39 ± 0,02	49,37*	49,4 ± 0,08
	KGPMF55	0,25 ± 0,01	56,82	0,26 ± 0,02	59,09	0,23 ± 0,01	52,27*	0,22 ± 0,02	50	43,9 ± 0,23
	KGPMF57	0,49 ± 0,02	79,03*	0,47 ± 0,00	75,81	0,40 ± 0,00	64,52	0,38 ± 0,01	61,29	51,3 ± 0,21
	KGPMF59	0,45 ± 0,05	62,5	0,46 ± 0,03	63,89*	0,40 ± 0,02	55,56	0,39 ± 0,02	54,17	55,6 ± 0,64
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	0,13 ± 0,02	54,17	0,14 ± 0,03	58,33	0,14 ± 0,02	58,33	0,14 ± 0,02	58,33	56,3 ± 0,88
<i>E. durans</i>	KGPMF10	0,24 ± 0,01	82,76*	0,25 ± 0,01	86,21*	0,21 ± 0,02	72,41	0,21 ± 0,00	72,41	30,4 ± 0,12
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0,12 ± 0,00	52,17	0,13 ± 0,00	56,52*	0,11 ± 0,01	47,82	0,10 ± 0,00	43,47	40,5 ± 0,36
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	0,15 ± 0,00	60	0,16 ± 0,00	64*	0,15 ± 0,01	60	0,14 ± 0,01	56	52,3 ± 0,64
	KGPMF48	0,19 ± 0,02	82,61*	0,21 ± 0,02	91,30*	0,18 ± 0,00	78,26*	0,17 ± 0,00	73,91*	52,7 ± 0,16
	KGPMF49	0,11 ± 0,01	44	0,12 ± 0,00	48*	0,11 ± 0,00	44	0,11 ± 0,00	44	40,4 ± 0,26
	ATCC 29211	0,10 ± 0,01	66,67	0,08 ± 0,01	53,33	0,05 ± 0,00	33,33*	0,05 ± 0,02	33,33*	26,7 ± 0,54

„А“ - апсорбанца раста приказана као средња вредност ± СД; „%“ - процентуални раст бактерија;

* статистички значајна разлика у поређењу са контролом раста ($p < 0,05$)

Способност тестираних изолата да синтетишу биогене аминe

За избор пробиотске или стартер културе, веома важан критеријум је да не синтетише биогене аминe. Биогени амини се сматрају непожељним метаболичким продуктима и микроорганизам који поседује способност синтезе биогених амина се не може користити као стартер култура. На подлози са хистидином и тирозином (појединачно), тестирани изолати БМК нису показали способност синтезе биогених амина, што је пожељна карактеристика приликом селекције могућих пробиотика (Табела 15).

Способност раста на различитој концентрацији фенола

Физиолошки ниво фенола код људи у садржају црева је мали. Због тога је значајно анализирати осетљивост потенцијалних пробиотика у односу на ову супстанцу у концентрацијама од 0,1%, 0,2% и 0,3%. На основу резултата ове докторске дисертације, може се закључити да је већина испитиваних изолата БМК расла на медијумима са 0,1%, 0,2% и 0,3% фенола (Табела 15). Изузетак су били *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (сојеви KGPMF50 и KGPMF55) и све изоловане стрептококе.

Способност синтезе хемолизина на крвном агару

Способност синтезе хемолизина тестираних изолата се прати како би се прелиминарно утврдила могућа патогеност сојева. Тестирани *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. изолати нису показали α - или β -хемолизу на крвном агару, што искључује патогеност испитиваних сојева (Табела 15). Изолати *Enterococcus* spp. и *Streptococcus* spp. нису показали β -хемолизу на крвном агару.

Табела 15. Способност раста бактерија у присуству фенола, способност синтезе биогених амина и способност хемолизе на крвном агару

Врсте	Раст на различитој концентрацији фенола (%)			Синтеза биогених амина		Хемолиза на крвном агару
	0,1	0,2	0,3	Хистидин	Тирозин	
<i>Lb. fermentum</i>	+	+	+	—	—	γ
<i>Lb. brevis</i>	+	+	+	—	—	γ
<i>Lb. plantarum</i>	+	+	+	—	—	γ
<i>Lb. plantarum</i> LP 299v	+	+	—	—	—	γ
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	+	+	+	—	—	γ
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	+	+	+—	—	—	γ
<i>E. hirae</i>	+	+	+	—	—	α
<i>E. durans</i>	+	+	+	—	—	α
<i>E. faecium</i>	+	+	+	—	—	α
<i>E. faecalis</i>	+	+	+	—	—	α
<i>E. faecalis</i> ATCC 29211	+	+	+	—	—	α
<i>S. uberis</i>	+	+	—	—	—	α
<i>S. agalactiae</i>	+	+	—	—	—	γ

„+“ – позитивна реакција; „—“ – негативна реакција; „+—“ – делимично позитивна реакција

Испитивање осетљивости изолата на антибиотике

Коришћењем микродилуционе методе, испитана је осетљивост изабраних изолата на следеће антибиотике: тетрациклин, гентамицин, полимиксин Б, ванкомицин и ампицилин. Резултати су додатно проверени у складу са предложеним критеријумима отпорности БМК према антибиотицима хумане и ветеринарске важности, које је дала Европска агенција за сигурност хране (ЕФСА). Резултати су приказани у Табели 16.

Резултати су показали да су сви тестирани изолати били осетљиви на све тестиране антибиотике. Изолати *Lactobacillus* spp. су показали значајну осетљивост на ампицилин и тетрациклин, у поређењу са другим тестираним антибиотицима ($p < 0,05$). МИК вредност је била од $0,125 - 3 \mu\text{g mL}^{-1}$ на тетрациклин и од $0,195 - 64 \mu\text{g mL}^{-1}$ на ампицилин.

Изолати *Lactococcus* spp. су показали значајну осетљивост на ампицилин, тетрациклин и ванкомицин, у поређењу са другим тестираним антибиотицима ($p < 0,05$). МИК вредност је била од $1,56 - 3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ на тетрациклин, од $0,195 - 3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ на ампицилин и од $1,56 - 3,125 \mu\text{g mL}^{-1}$ на ванкомицин.

Изолати *Enterococcus* spp. су показали значајну осетљивост на ампицилин и тетрациклин, у поређењу са другим тестираним антибиотиком ($p < 0,05$). МИК вредност је била од $2,5 - 12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ на тетрациклин и од $0,19 - 2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ на ампицилин. Према добијеним резултатима, може се закључити да су сви сојеви БМК показали значајну осетљивост на тестиране антибиотике.

Табела 16. Осетљивост одабраних изолата бактерија млечне киселине на антибиотике

Врста	Изолат	Антибиотици				
		Тетрациклин	Гентамицин	Полимиксин Б	Ампицилин	Ванкомицин
		МИК				
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	2*	2,5	12,5	0,195	н.п.
	KGPMF29	2	2,5	12,5	0,195	н.п.
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	3	2,5	12,5	0,195	н.п.
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	2	8	12,5	0,195	н.п.
	LP 299v	0,125	н.д.	н.д.	64	н.п.
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF23	3,125	2	12,5	0,195	3,125
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	3,125	12,5	25	1,56	1,56
	KGPMF54	3,125	18,75	12,5	3,125	3,125
	KGPMF55	2,5	12,5	25	0,195	1,56
	KGPMF57	3,125	18,75	25	1,56	3,125
	KGPMF59	1,56	12,5	12,5	1,56	3,125
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	6,25	25	250	2,5	125
<i>E. durans</i>	KGPMF10	2,5	25	125	2,5	125
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	2,5	25	125	0,19	125
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	12,5	25	250	0,19	125
	KGPMF48	12,5	25	250	2,5	125
	KGPMF49	2,5	50	250	2,5	125
	ATCC 29211	8	н.д.	н.д.	1	250

МИК – минимална инхибиторна концентрација; *Вредности изражене у $\mu\text{g mL}^{-1}$; н.д. – није детерминисано; н.п. – није потребно према EFSA

Способност бактерија за асимилацију различитих врста шећера

С обзиром да су тестирани изолати показали способност преживљавања у условима гастринтестиналног тракта (Табела 13 и 14), одабрана су четири различита шећера (фруктоза, лактоза, манитол и инулин) како би се утврдило који од њих најбоље метаболишу. Испитивана је способност асимилације у присуству различитих концентрација испитиваних шећера (8, 4, 2, 1, 0,5 и 0,25%) и резултати су поређени са растом у присуству 2% декстрозе у подлози (позитивна контрола). Резултати су приказани у Табелама 17, 18 и 19.

Сва четири шећера су стимулисала раст тестираних лактобацила (веће апсорбанце раста од позитивне контроле). Изузетак су били *Lb. plantarum* KGPMF62 и *Lb. plantarum* LP 299v, који су показали бољи раст у присуству фруктозе него инулина (Табела 17). Према предходно приказаним резултатима (Табела 6), *Lb. fermentum* KGPMF28, *Lb. fermentum* KGPMF29 и *Lb. brevis* KGPMF35 немају способност ферментације манитола и инулина, тако да њихов раст у присуству ова два шећера није испитиван.

Према предходно добијеним резултатима (Табела 5), *Lactococcus* spp. изоловане из сокобањског сира нису показале способност ферментације манитола и инулина. Лактоза је показала сличан ефекат на раст као декстроza, осим за *L. lactis* subsp. *lactis* KGPMF23, чији је раст био стимулисан на нижим тестираним концентрацијама. Раст у присуству фруктозе био је ограничен, у поређењу са растом у присуству декстрозе (Табела 18).

Према предходно добијеним резултатима (Табела 6), *Enterococcus* spp. изолати из сира немају способност ферментације инулина. Све тестиране ентерококе су расле на осталим концентрацијама тестираних шећера. Веће апсорбанце раста *E. hirae* KGPMF9, *E. durans* KGPMF10, *E. faecium* KGPMF14 и *E. faecalis* KGPMF47 су измерене у подлози са лактозом и манитолом. Раст у присуству фруктозе је био ограничен, у поређењу са растом у присуству декстрозе. Може се закључити да је раст *Enterococcus* spp. у подлози са декстрозом значајно бољи ($p < 0,05$) у поређењу са растом у присуству фруктозе (Табела 19).

Табела 17. Способност раста *Lactobacillus* spp. у присуству различитих шећера

Шећер	Садржај шећера (%)	Врста	<i>Lb. fermentum</i>		<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	
		Изолат	KGPMF28	KGPMF29	KGPMF35	KGPMF62	LP 299v
Декстроза	2		0,94 ± 0,06 ¹	0,94 ± 0,04	0,61 ± 0,09	0,95 ± 0,04	0,31 ± 0,03
Фруктоза	8		0,51 ± 0,08*	0,52 ± 0,03*	0,53 ± 0,00*	0,06 ± 0,07*	0,14 ± 0,02*
	4		0,82 ± 0,03*	0,96 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,72 ± 0,02*	0,20 ± 0,02*
	2		0,90 ± 0,02	0,98 ± 0,00*	0,61 ± 0,00	0,96 ± 0,01	0,21 ± 0,01*
	1		0,92 ± 0,01	0,99 ± 0,02*	0,62 ± 0,04	1,03 ± 0,04*	0,34 ± 0,01
	0,5		0,96 ± 0,03	1,00 ± 0,00*	0,68 ± 0,03*	1,00 ± 0,02*	0,31 ± 0,02
	0,25		0,94 ± 0,00	0,92 ± 0,01	0,48 ± 0,01*	0,51 ± 0,02*	0,24 ± 0,01*
Лактоза	8		0,56 ± 0,02*	0,53 ± 0,04*	0,02 ± 0,06*	0,05 ± 0,06*	0,15 ± 0,01*
	4		0,81 ± 0,00*	0,74 ± 0,01*	0,12 ± 0,00*	0,77 ± 0,04*	0,19 ± 0,02*
	2		0,90 ± 0,02	0,82 ± 0,01*	0,25 ± 0,02*	0,94 ± 0,02	0,20 ± 0,02*
	1		0,91 ± 0,01	0,88 ± 0,03*	0,32 ± 0,00*	1,02 ± 0,03*	0,31 ± 0,02
	0,5		0,94 ± 0,03	1,01 ± 0,01*	0,58 ± 0,04	0,96 ± 0,03	0,24 ± 0,00*
	0,25		0,92 ± 0,00	0,86 ± 0,02*	0,41 ± 0,00*	0,44 ± 0,04*	0,23 ± 0,00*
Манитол	8		н.д	н.д	н.д	0,09 ± 0,09*	0,21 ± 0,00*
	4		н.д	н.д	н.д	0,87 ± 0,02*	0,28 ± 0,01
	2		н.д	н.д	н.д	0,96 ± 0,01	0,30 ± 0,02
	1		н.д	н.д	н.д	0,97 ± 0,03	0,26 ± 0,01*
	0,5		н.д	н.д	н.д	0,94 ± 0,01	0,19 ± 0,03*
	0,25		н.д	н.д	н.д	0,44 ± 0,03*	0,17 ± 0,01*
Инулин	8		н.д	н.д	н.д	0,60 ± 0,05*	0,18 ± 0,01*
	4		н.д	н.д	н.д	0,68 ± 0,01*	0,20 ± 0,01*
	2		н.д	н.д	н.д	0,88 ± 0,01*	0,23 ± 0,00*
	1		н.д	н.д	н.д	0,79 ± 0,00*	0,22 ± 0,00*
	0,5		н.д	н.д	н.д	0,47 ± 0,00*	0,21 ± 0,01*
	0,25		н.д	н.д	н.д	0,38 ± 0,03*	0,19 ± 0,01*

¹Средња вредност ± СД; н.д. – није детерминисано; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$)

Табела 18. Способност раста *Lactococcus* spp. у присуству различитих шећера

Шећер	Садржај шећера (%)	Врста	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>				
		Изолат	KGPMF23	KGPMF50	KGPMF54	KGPMF55	KGPMF57	KGPMF59
Декстроза	2		0,64 ± 0,03 ¹	0,34 ± 0,08	0,52 ± 0,02	0,36 ± 0,05	0,93 ± 0,02	0,81 ± 0,06
Фруктоза	8		0,17 ± 0,02*	0,15 ± 0,01*	0,16 ± 0,02*	0,18 ± 0,00*	0,52 ± 0,04*	0,40 ± 0,02*
	4		0,19 ± 0,02*	0,17 ± 0,03*	0,34 ± 0,02*	0,19 ± 0,02*	0,73 ± 0,02*	0,64 ± 0,00*
	2		0,20 ± 0,03*	0,20 ± 0,02*	0,42 ± 0,01*	0,22 ± 0,01*	0,79 ± 0,00*	0,66 ± 0,00*
	1		0,30 ± 0,01*	0,27 ± 0,02*	0,46 ± 0,02*	0,27 ± 0,00*	0,84 ± 0,03*	0,67 ± 0,01*
	0,5		0,25 ± 0,02*	0,22 ± 0,04*	0,48 ± 0,00	0,33 ± 0,03	0,82 ± 0,01*	0,66 ± 0,00*
	0,25		0,21 ± 0,01*	0,22 ± 0,01*	0,45 ± 0,01*	0,31 ± 0,02*	0,81 ± 0,00*	0,64 ± 0,00*
Лактоза	8		0,08 ± 0,04*	0,31 ± 0,04	0,31 ± 0,02*	0,23 ± 0,00*	0,60 ± 0,04*	0,40 ± 0,02*
	4		0,11 ± 0,02*	0,18 ± 0,03*	0,33 ± 0,01*	0,25 ± 0,01*	0,79 ± 0,03*	0,58 ± 0,02*
	2		0,26 ± 0,01*	0,15 ± 0,04*	0,35 ± 0,02*	0,27 ± 0,02*	0,86 ± 0,04*	0,63 ± 0,01*
	1		0,65 ± 0,01	0,10 ± 0,01*	0,44 ± 0,02*	0,36 ± 0,01	0,90 ± 0,04	0,69 ± 0,02*
	0,5		0,64 ± 0,00	0,09 ± 0,00*	0,42 ± 0,00*	0,32 ± 0,00	0,89 ± 0,02	0,63 ± 0,00*
	0,25		0,52 ± 0,02*	0,09 ± 0,01*	0,41 ± 0,01*	0,30 ± 0,00*	0,88 ± 0,01*	0,60 ± 0,00*

¹ Средња вредност ± СД; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у поређењу са контролом раста

Табела 19. Способност раста *Enterococcus* spp. у присуству различитих шећера

Шећер	Садржај шећера (%)	Врста	<i>E. hirae</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>			
		Изолат	KGPMF9	KGPMF10	KGPMF14	KGPMF47	KGPMF48	KGPMF49	ATCC 29211
Декстроза	2		0,20 ± 0,02 ¹	0,23 ± 0,08	0,28 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,21 ± 0,02	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,03
Фруктоза	8		0,08 ± 0,05*	0,16 ± 0,00*	0,19 ± 0,01*	0,18 ± 0,01*	0,05 ± 0,06*	0,21 ± 0,04*	0,13 ± 0,02*
	4		0,15 ± 0,01*	0,18 ± 0,01*	0,21 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*	0,12 ± 0,02*	0,21 ± 0,02*	0,16 ± 0,02*
	2		0,16 ± 0,02*	0,17 ± 0,02*	0,25 ± 0,00	0,25 ± 0,02	0,13 ± 0,02*	0,19 ± 0,02*	0,18 ± 0,01*
	1		0,15 ± 0,00*	0,24 ± 0,00	0,26 ± 0,00	0,25 ± 0,03	0,13 ± 0,01*	0,19 ± 0,02*	0,20 ± 0,03*
	0,5		0,19 ± 0,00	0,21 ± 0,03	0,28 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,17 ± 0,02*	0,19 ± 0,00*	0,17 ± 0,00*
	0,25		0,17 ± 0,00	0,20 ± 0,02	0,25 ± 0,01	0,24 ± 0,03	0,13 ± 0,03*	0,13 ± 0,02*	0,11 ± 0,01*
Лактоза	8		0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01*	0,22 ± 0,00*	0,22 ± 0,00*	0,13 ± 0,01*	0,22 ± 0,00*	0,17 ± 0,00*
	4		0,18 ± 0,00	0,18 ± 0,03*	0,24 ± 0,02*	0,24 ± 0,00*	0,10 ± 0,02*	0,19 ± 0,01*	0,19 ± 0,00*
	2		0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,03	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,12 ± 0,00*	0,19 ± 0,00*	0,21 ± 0,01*
	1		0,16 ± 0,01*	0,24 ± 0,03	0,29 ± 0,00	0,27 ± 0,02	0,11 ± 0,00*	0,17 ± 0,00*	0,23 ± 0,02*
	0,5		0,16 ± 0,00*	0,25 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,12 ± 0,00*	0,14 ± 0,02*	0,18 ± 0,00*
	0,25		0,14 ± 0,00*	0,16 ± 0,01*	0,27 ± 0,00	0,27 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,11 ± 0,01*	0,13 ± 0,01*
Манитол	8		0,23 ± 0,02	0,19 ± 0,03*	0,22 ± 0,02*	0,23 ± 0,00*	0,19 ± 0,03	0,20 ± 0,03*	0,19 ± 0,02*
	4		0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,02*	0,26 ± 0,02	0,17 ± 0,02*	0,23 ± 0,03*	0,21 ± 0,02*
	2		0,15 ± 0,01*	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,01*	0,27 ± 0,00	0,15 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*	0,25 ± 0,01
	1		0,15 ± 0,00*	0,27 ± 0,02*	0,21 ± 0,00*	0,29 ± 0,03	0,15 ± 0,00*	0,24 ± 0,01*	0,19 ± 0,01*
	0,5		0,13 ± 0,01*	0,24 ± 0,00	0,21 ± 0,00*	0,27 ± 0,01	0,13 ± 0,00*	0,23 ± 0,00*	0,16 ± 0,01*
	0,25		0,11 ± 0,02*	0,21 ± 0,00	0,17 ± 0,01*	0,24 ± 0,00	0,13 ± 0,01*	0,21 ± 0,00*	0,11 ± 0,02*

¹ Средња вредност ± СД; * статистички значајна разлика ($p < 0,05$) у поређењу са контролом раста

Способност изолат БМК за аутоагрегацију и коагрегацију са *E. coli*

Способност аутоагрегације БМК изолованих из традиционално направљеног сокобањског сира је мерена током периода од 5 h. Резултати указују да тестирани сојеви показују јак фенотип аутоагрегације. Способност аутоагрегације није изгубљена након испирања и ресуспендовања бактеријских ћелија у PBS-у, што је вероватно повезано са компонентом ћелијске површине. Када се упоређи способност аутоагрегације између врста из различитих родова, примећује се да нешто бољу способност имају врсте из рода *Lactobacillus*, (График 8), затим *Lactococcus* (График 9), и на крају, *Enterococcus* (График 10).

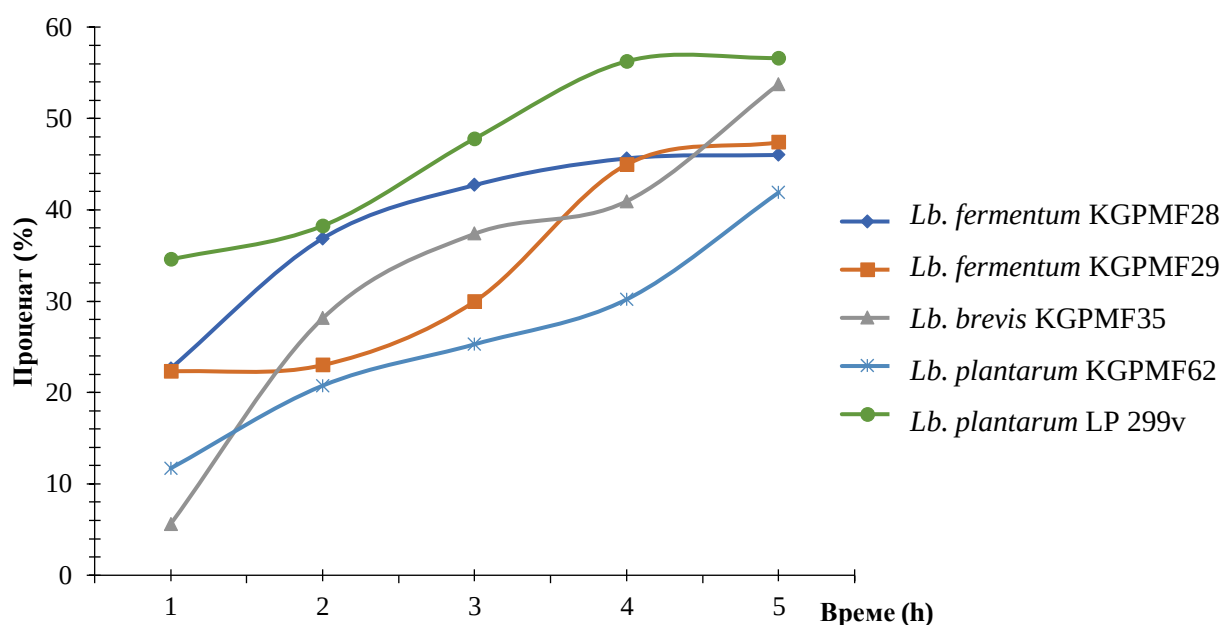


График 8. Способност аутоагрегације изолат из рода *Lactobacillus*

Сви испитивани *Lactobacillus* spp. су показали добру способност аутоагрегације, у PBS-у, након инкубације у трајању од 5 h (График 8). Проценат аутоагрегације, у поређењу са нултим сатом, кретао се у проценту од 41,89 – 53,74%. Најбољу способност аутоагрегације је показао *Lb. brevis* KGPMF35.

Тестирани изолати *Lactococcus* spp. су показали способност аутоагрегације у проценту од 35,82 – 50,2%, што је за незнатно слабије од способности аутоагрегације изолат из рода *Lactobacillus*.

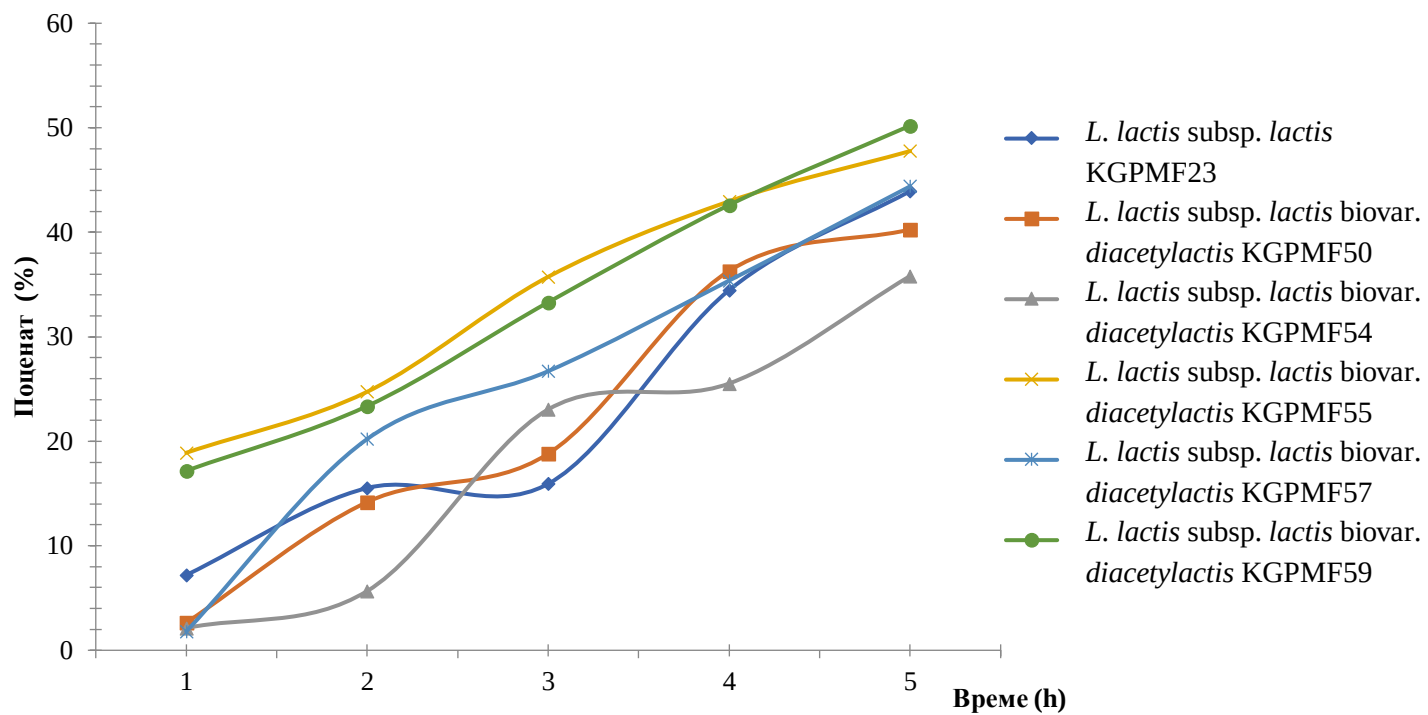


График 9. Способност аутоагрегације изолата из рода *Lactococcus*

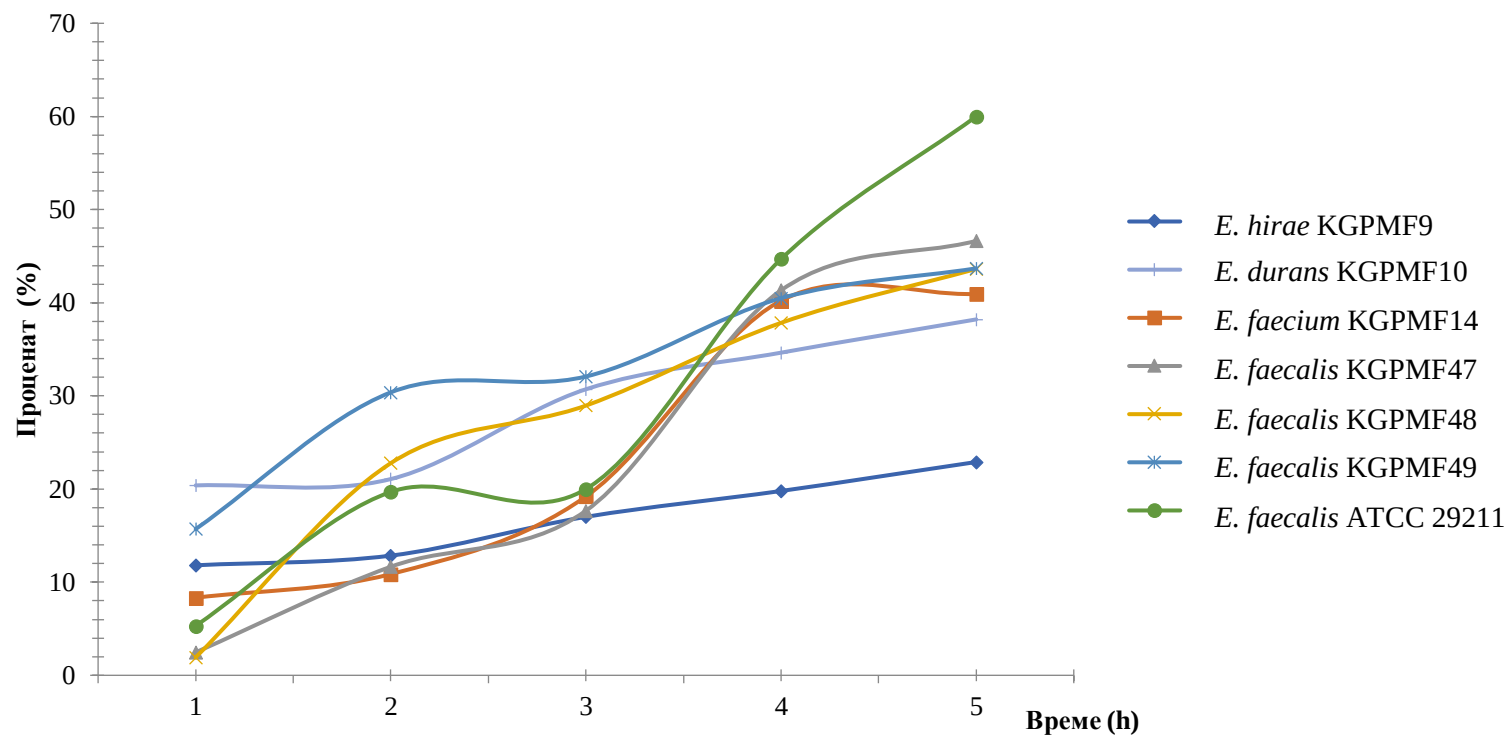


График 10. Способност аутоагрегације изолата из рода *Enterococcus*

Enterococcus spp. су показале најслабију способност аутоагрегације (График 10). Проценат аутоагрегације након 5 h је био у опсегу од 22,9 – 46,64%. На основу резултата, може се закључити да су тестирани изолати БМК показали умерену способност аутоагрегације, која је у просеку била око 50%.

Следећи корак у истраживању је био испитивање способност коагрегације изолованих БМК са *E. coli* (клиничким изолатом). Резултати су приказани у Табели 20, и изражени су процентуално, као резултат коагрегације након 2 h у мешаној суспензији БМК и *E. coli*. Сви тестирани лактобацили су показали значајну способност коагрегације са *E. coli*. Изолати у оквиру родова *Lactococcus* и *Enterococcus* су показали изолат специфичну коагрегацију. Заправо, изолати у оквиру рода *Enterococcus* су показали бољу способност коагрегације (Табела 20).

Табела 20. Способност изолованих бактерија млечне киселине за коагрегацију са *E. coli*

Врста	Изолат	Коагрегација са <i>E. coli</i> (%)
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	41,45 ± 1,30 ¹
	KGPMF29	34,65 ± 2,68
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	39,06 ± 2,12
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	31,82 ± 2,41
	LP 299v	13,92 ± 3,22
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF23	2,84 ± 3,78
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	0
	KGPMF54	3,59 ± 2,46
	KGPMF55	0
	KGPMF57	0
	KGPMF59	0
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	15,13 ± 0,44
<i>E. durans</i>	KGPMF10	23,32 ± 0,36
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	10,53 ± 1,56
	KGPMF48	0
	KGPMF49	0
	ATCC 29211	15,22 ± 0,87

¹ Средња вредност ± СД

Сви изолати из рода *Lactobacillus* су показали способност коагрегације са *E. coli* у проценту од 31,82 – 41,45%, док су од свих лактокока, једино *L. lactis* subsp. *lactis* KGPMF23 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF54 показали способност коагрегације, али у јако малом проценту. Од тестираних шест, два изолат *E. faecalis* су показала способност коагрегације са *E. coli* у проценту од 10,53 – 23,32%. Изолати *Lactobacillus* spp. су показали бољу коагрегацију него комерцијални пробиотски сој, док су изолати *Enterococcus* sp. показали сличну коагрегацију као ATCC сој.

Способност изолованх БМК за формирање биофилма

Изолати БМК су тестирани на способност формирања биофилма, уз помоћ методе са кристал виолетом. Резултати су приказани у Табели 21. Ова карактеристика изолат *E. faecalis* се сматра битном због испитивања способности адхезије и доказивања пробиотског потенцијала одређеног бактеријског соја.

Табела 21. Способност изолованих бактерија млечне киселине за формирање биофилма

Врста	Изолат	Вредност апсорбанце ¹
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	0,07 ± 0,04
	KGPMF29	0,05 ± 0,04
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	0,08 ± 0,03
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	0,05 ± 0,02
	LP 299v	0,04 ± 0,02
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF23	0,05 ± 0,02
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	0,04 ± 0,02
	KGPMF54	0,06 ± 0,03
	KGPMF55	0,11 ± 0,01
	KGPMF57	0,12 ± 0,03
	KGPMF59	0,06 ± 0,03
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	0,03 ± 0,02
<i>E. durans</i>	KGPMF10	0,02 ± 0,01
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0,03 ± 0,02
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	0,04 ± 0,02
	KGPMF48	0,01 ± 0,00
	KGPMF49	0,03 ± 0,02
	ATCC 29211	0,03 ± 0,01

¹Средња вредност ± СД

Резултати показују да су сви тестирани изолати имали умерену способност формирања биофилма, која се може приказати према следећој градацији: лактобацили > лактококе > ентерококе. Од врста из рода *Lactobacillus*, издвајају се изолати KGPMF28 и KGPMF35. Сви *Lactobacillus* изолати су показали бољу способност формирања биофилма од комерцијалног пробиотског соја. Од врста из рода *Lactococcus*, нарочито се издвајају изолати KGPMF55 и KGPMF57, који показују најбољу способност формирања биофилма од свих тестираних изолата БМК. Врсте из рода *Enterococcus* су показале најслабију способност формирања биофилма од свих тестираних изолата БМК.

Процена способности микробиолошке адхезије са растварачима

Испитивање способности адхезије у присуству растварача (хлороформ, етил ацетат и ксилол) је коришћено за процену хидрофобних/хидрофилних изолата БМК изолованих из сира. Резултати су поређени са комерцијалним пробиотским сојем, *Lb. plantarum* LP 299v и АТСС врстом *E. faecalis* АТСС 29211. Резултати показују да су тестиране бактерије показале јачи афинитет са хлороформом, који је кисели растварач и акцептор електрона, него са етил ацетатом, који је базни растварач и довор електрона (Табела 22). То значи да су тестиране бактерије бољи довори него акцептори електрона. Изузетак су *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF50 и KGPMF55, који показују јачи афинитет према етил ацетату, што указује да су ова два изолата бољи акцептори него довори електрона.

Тестирани *Lactobacillus* spp. су показали значајну корелацију између аутоагрегације и афинитета са хлороформом ($p < 0,05$) док су *Enterococcus* изолати показали значајну корелацију између аутоагрегације и афинитета са етил ацетатом ($p < 0,05$). Показано је и да постоји значајна разлика између тестираних изолата у афинитету са хлороформом и етил ацетатом ($p < 0,05$).

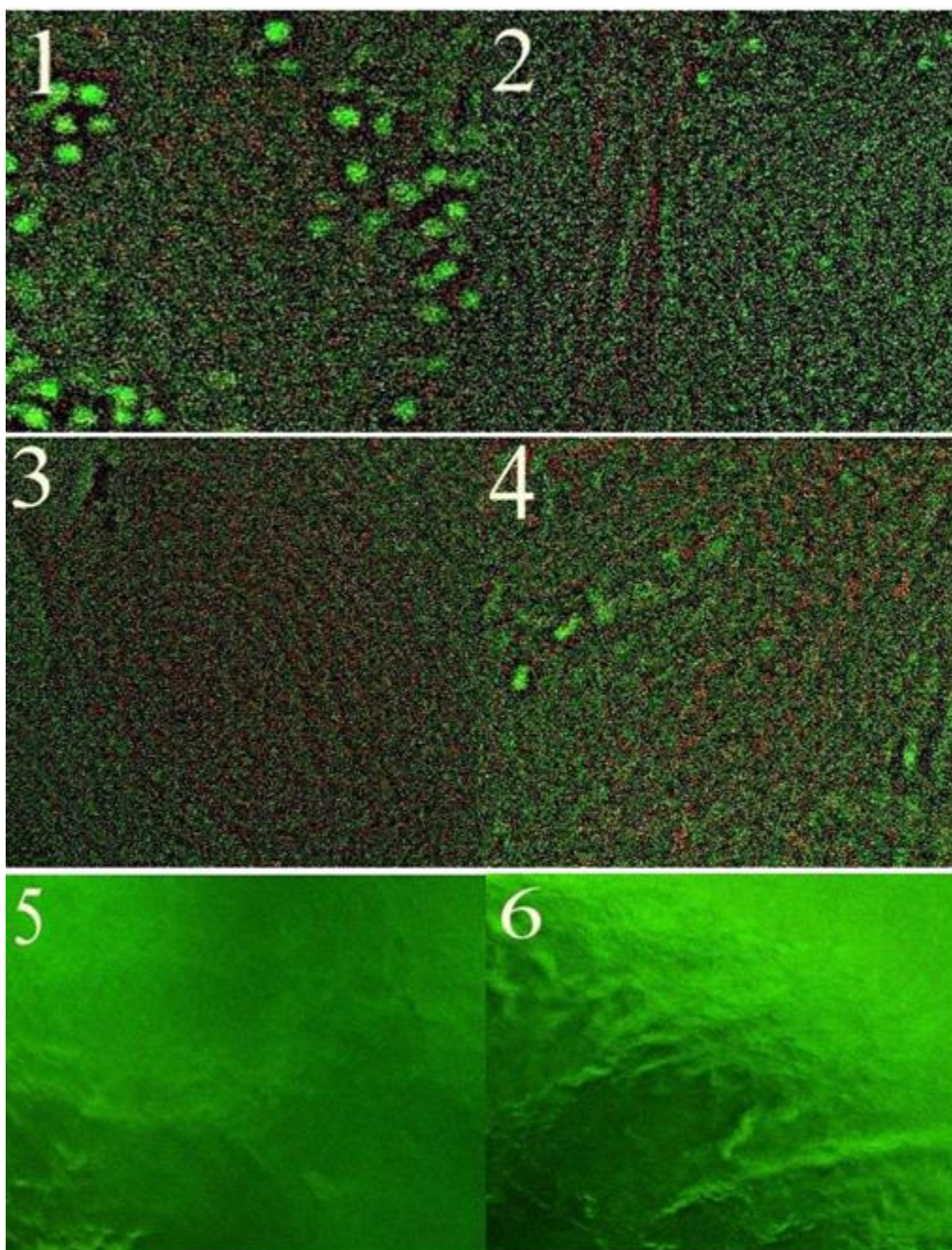
Табела 22. Способност изолованих бактерија млечне киселине за адхезију са ксилолом, хлороформом и етил ацетатом

Врста	Изолат	Растварач		
		Ксилол	Хлороформ	Етил ацетат
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	0 ¹	16,83 ± 1,23	10 ± 0,84
	KGPMF29	0	18,31 ± 0,95	12,84 ± 0,47
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	0	21,57 ± 1,02	4,95 ± 1,07
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	0	10,79 ± 1,85	7,92 ± 0,26
	LP 299v	0	21,54 ± 0,74	4,43 ± 0,18
<i>L. lactis subsp. lactis</i>	KGPMF23	0	8,15 ± 2,01	0
<i>L. lactis subsp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	0	30,62 ± 0,65	52,33 ± 0,03
	KGPMF54	0	93,46 ± 0,22	0
	KGPMF55	0	30,82 ± 0,25	31,03 ± 0,28
	KGPMF57	0	91,08 ± 0,38	0
	KGPMF59	0	59,75 ± 0,75	0
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	0	14,21 ± 0,08	0
<i>E. durans</i>	KGPMF10	0	3,85 ± 1,56	0
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0	13,17 ± 0,41	9,41 ± 0,12
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	0	23,97 ± 0,63	15,86 ± 0,74
	KGPMF48	0	22,48 ± 0,84	6,24 ± 0,24
	KGPMF49	0	5,4 ± 0,04	3,17 ± 1,36
	ATCC 29211	0	19,66 ± 1,24	12,13 ± 1,05

¹Средња вредност ± СД (% адхезије)

Способност адхезије за епител танког црева свиње

На основу способности БМК да формирају биофилм и адхезије са различитим растварачима, одабрани су изолати БМК, како би се испитала способност адхезије за епител танког црева. Резултати су показали да БМК, нарочито изолати *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. поседују јаку способност адхезије (сл. 19).



Слика 19. Способност адхезије за епител танког црева свиње
(1 – *Enterococcus faecalis* KGPMG47; 2 – *Lactobacillus brevis* KGPMF35; 3 – *Lb.*
fermentum KGPMF29; 4 – *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF57; 5 –
Контрола - MRS подлога; 6 – Контрола - PBS)

6.6. Ензимска активност испитиваних изолати бактерија млечне киселине

У оквиру ове докторске дисертације, по први пут је испитивана ензимска активност БМК изолованих из сокобањског сира. На основу резултата скрининг метода за протеолитичку и липолитичку активност, закључује се да изолати из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* нису показали липолитичку, али су показали протеолитичку активност. Изузетак су били изолати из рода *Enterococcus*, јер нису показали довољно јасне резултате везане за протеолитичку активност, у поређењу са позитивном (*B. subtilis* ATCC 6633) и негативном (*E. coli* ATCC 2592) контролом.

У даљем току експеримената, квантификована је протеолитичка активност свих изолати. Сви изолати из рода *Lactobacillus* су показали активност протеазе, амилазе и алкалне фосфатазе, док активност киселе и алкалне инвертазе није забележена. Изолати су показали различиту количину укупних протеина у ферментационој течности (0,039 – 0,063 mg mL⁻¹). Активност протеазе била је значајна, у поређењу са другим тестираним ензимима ($p < 0,05$). Изолат *Lb. fermentum* KGPMF28 је показао најбољу ензимску активност од свих тестираних лактобацила.

Изолати из рода *Lactococcus* су показали активност протеазе, киселе инвертазе и алкалне фосфатазе, осим изолати KGPMF50, где нема активности алкалне фосфатазе. Активност алкалне инвертазе и амилазе није детектована. Изолати су показали различиту количину укупних протеина у ферментационој течности (0,016 – 0,048 mg mL⁻¹), и количина протеина је била нижа у односу на лактобациле (Табела 23). Активност протеазе је била значајна, у поређењу са другим тестираним ензимима ($p < 0,05$).

Изолати из рода *Enterococcus* нису показали активност протеазе, киселе и алкалне инвертазе, док активност амилазе није детектована једино код *E. hirae* KGPMF9. Активност алкалне фосфатазе није детектована код изолати KGPMF47 и KGPMF48. Изолати су показали различиту количину укупних протеина у ферментационој течности (0,007 – 0,041 mg mL⁻¹), и укупна количина протеина је била нижа у односу на укупну концентрацију протеина код изолати из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus*. На основу приказаних резултата, може се закључити да изоловане ентерококе немају протеолитичку активност и да имају слабу и изолат специфичну ензимску активност (Табела 23).

Табела 23. Ензимска активност тестираних изолата бактерија млечне киселине

Врста	Изолат	Укупни протеини (mg mL ⁻¹)	Протеаза (IU mL ⁻¹)	Кисела инвертаза (IU mL ⁻¹)	Алкална инвертаза (IU mL ⁻¹)	Амилаза (IU mL ⁻¹)	Алкална фосфатаза (IU mL ⁻¹)
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	0,063 ± 0,00 ¹	5,8 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,564 ± 0,00	0,006 ± 0,00
	KGPMF29	0,042 ± 0,01	2,1 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,257 ± 0,00	0,005 ± 0,00
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	0,046 ± 0,00	1,4 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,135 ± 0,00	0,003 ± 0,00
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	0,039 ± 0,00	2,3 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,301 ± 0,00	0,002 ± 0,00
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMG23	0,048 ± 0,01	0,7 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,004 ± 0,00
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMG50	0,019 ± 0,00	3,9 ± 0,00	0,035 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00
	KGPMG54	0,016 ± 0,00	5,3 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,002 ± 0,00
	KGPMG55	0,044 ± 0,00	4,6 ± 0,00	0,017 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,006 ± 0,00
	KGPMG57	0,036 ± 0,00	5,2 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,010 ± 0,01
	KGPMG59	0,046 ± 0,00	4,2 ± 0,00	0,09 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,002 ± 0,00
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	0,016 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,014 ± 0,01
<i>E. durans</i>	KGPMF10	0,041 ± 0,01	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,216 ± 0,00	0,006 ± 0,00
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	0,028 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,186 ± 0,00	0,007 ± 0,01
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	0,039 ± 0,01	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,208 ± 0,00	0 ± 0,00
	KGPMF48	0,007 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,230 ± 0,00	0 ± 0,00
	KGPMF49	0,025 ± 0,01	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0 ± 0,00	0,243 ± 0,00	0,005 ± 0,00

¹Средња вредност ± СД

6.7. Утицај еколошких фактора на раст изолованих бактерија млечне киселине

Утицај различитих температура, рН и различитих концентрација соли, на планктонски раст БМК изолованих из сокобањског сира је испитиван спектрофотометријском методом. БМК су инкубиране у MRS бујону на три различите температуре (4°C, 20°C, 37°C). Утврђено је одсуство раста на 4°C за испитиване врсте бактерија. Остали резултати су приказани у Табелама 24 – 29.

Тестиране БМК су показале бољу способност раста у киселим рН, на 37°C, у поређењу са истим рН на 20°C ($p < 0,05$). Тестирани изолати *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. су показали способност раста на обе тестиране температуре, с тим што је раст на 37°C био очекивано бољи. Раст изолата, на 20°C, је био бољи на рН 7 него у контроли раста. Што се тиче утицаја рН, тестирани изолати су боље расли на нижим вредностима (испод рН 7), али је раст и на базним рН вредностима био присутан (Табела 24 и 25). На основу резултата, може се закључити да су базна средина и температура од 20°C инхибирајући фактор за раст тестираних лактобацила и лактокока, с тим што је температура показала статистички већи утицај ($p < 0,05$).

Тестирани изолати *Enterococcus* spp. су показали способност раста на свим тестираним рН, на обе температуре. Бољи раст је детектован у базној средини. Изузетак је био *E. hirae* KGPMF9, који је најбољи раст показао у киселој средини, на 37°C (Табела 26). На 20°C, сви тестирани изолати ентерокока су расли добро у базној средини. На основу резултата, може се закључити да су кисела средина и температура од 20°C инхибирајући фактор за раст тестираних ентерокока, с тим што је температура показала статистички већи утицај ($p < 0,05$).

Табела 24. Ефекат синергистичког деловања рН и температуре на раст изолата из рода *Lactobacillus*

pH		5,5		6,5*		7		7,5		8,5		
Температура		20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	
Врста	Изолат											
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	A	0,22 ± 0,00 ^a	1,70 ± 0,04 ^b	0,33 ± 0,00 ^c	1,74 ± 0,08 ^b	0,41 ± 0,01 ^d	1,93 ± 0,02 ^e	0,36 ± 0,02 ^f	0,80 ± 0,01 ^g	0,04 ± 0,00 ^h	0,65 ± 0,05 ⁱ
		%	63,67	97,7			124,24	110,92	109,09	45,98	12,12	37,36
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF29	A	0,16 ± 0,00 ^a	1,07 ± 0,00 ^b	0,27 ± 0,04 ^c	1,20 ± 0,03 ^d	0,38 ± 0,02 ^e	1,34 ± 0,03 ^f	0,25 ± 0,00 ^g	0,81 ± 0,49 ^h	0,07 ± 0,00 ⁱ	0,76 ± 0,01 ^j
		%	59,26	89,17			140,74	111,67	92,59	67,5	25,93	63,33
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	A	0,23 ± 0,01 ^a	1,98 ± 0,02 ^b	0,43 ± 0,02 ^c	2,07 ± 0,03 ^d	0,49 ± 0,02 ^e	2,05 ± 0,02 ^d	0,38 ± 0,00 ^e	1,90 ± 0,00 ^f	0,17 ± 0,00 ^g	1,66 ± 0,02 ^h
		%	53,49	95,65			113,95	99,03	88,37	91,79	39,53	80,19
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	A	0,13 ± 0,03 ^a	1,98 ± 0,02 ^b	0,44 ± 0,03 ^c	2,04 ± 0,00 ^d	0,40 ± 0,02 ^c	2,00 ± 0,03 ^d	0,28 ± 0,00 ^e	1,83 ± 0,02 ^f	0,11 ± 0,00 ^{g,a}	1,69 ± 0,03 ^h
		%	29,55	97,06			90,91	98,04	63,64	89,71	25	82,84
<i>Lb. plantarum</i>	LP 299v	A	0,25 ± 0,00 ^a	0,62 ± 0,02 ^b	0,29 ± 0,02 ^c	0,49 ± 0,02 ^d	0,30 ± 0,00 ^c	0,70 ± 0,01 ^e	0,30 ± 0,00 ^c	0,67 ± 0,01 ^e	0,01 ± 0,00 ^f	0,09 ± 0,02 ^g
		%	86,21	126,53			103,45	142,86	103,45	136,74	3,15	18,37

*Контрола раста (100%); „А“ – Средња вредност ± СД; % – проценат раста у поређењу са контролом раста; приказане средње вредности у колонама за две различите температуре означене различитим словима у суперскрипту су статистички значајне ($p < 0,05$)

Табела 25. Ефекат синергистичког деловања рН и температуре на раст изолата из рода *Lactococcus*

pH		5,5		6,5*		7		7,5		8,5		
Температура		20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	
Врста	Изолат											
<i>L. lactis</i> <i>subsp. lactis</i>	A KGPMF23		0,14 ± 0,00 ^a	1,70 ± 0,04 ^b	0,32 ± 0,01 ^c	1,75 ± 0,08 ^d	0,29 ± 0,02 ^e	1,63 ± 0,07 ^f	0,29 ± 0,00 ^g	1,40 ±0,05 ^h	0,04 ± 0,00 ⁱ	1,17 ± 0,05 ^j
		%	43,75	97,14			90,63	93,14	90,63	80	12,5	66,86
<i>L. lactis</i> <i>subsp. lactis</i> <i>biovar. diacetylactis</i>	A KGPMF50		0,09 ± 0,00 ^a	1,39 ± 0,28 ^b	0,23 ± 0,02 ^c	1,17 ± 0,01 ^d	0,24 ± 0,00 ^c	1,96 ± 0,14 ^e	0,19 ± 0,02 ^f	1,68 ±0,02 ^g	0,14 ± 0,01 ^h	0,64 ± 0,02 ^g
		%	39,13	118,80			104,35	167,52	82,61	143,59	60,87	54,70
	A KGPMF54		0,12 ± 0,01 ^a	2,03 ± 0,02 ^b	0,17 ± 0,02 ^c	2,02 ± 0,03 ^b	0,19 ± 0,00 ^c	1,97 ± 0,00 ^d	0,14 ± 0,00 ^{e,a}	1,86 ±0,00 ^f	0,09 ± 0,00 ^g	1,69 ± 0,03 ^h
		%	70,59	100,50			111,76	97,52	82,35	92,08	52,94	83,67
	A KGPMF55		0,06 ± 0,02 ^a	1,23 ± 0,00 ^b	0,26 ± 0,02 ^c	1,93 ± 0,01 ^d	0,26 ± 0,03 ^c	1,79 ± 0,35 ^e	0,23 ± 0,02 ^f	1,76 ± 0,01 ^{g,e}	0,18 ± 0,01 ^h	1,30 ± 0,08 ⁱ
		%	23,08	63,73			100	92,75	88,46	91,19	69,23	67,36
	A KGPMF57		0,21 ± 0,02 ^a	2,03 ± 0,02 ^b	0,22 ± 0,01 ^a	2,04 ± 0,00 ^b	0,19 ± 0,00 ^a	1,98 ± 0,03 ^c	0,14 ± 0,01 ^d	1,87 ± 0,02 ^{e,c}	0,11 ± 0,00 ^f	1,72 ± 0,00 ^g
		%	95,45	99,51			86,36	97,06	63,64	91,67	50	84,31
	A KGPMF59		0,23 ± 0,01 ^a	1,98 ± 0,02 ^b	0,26 ± 0,01 ^a	2,04 ± 0,00 ^c	0,25 ± 0,02 ^a	1,98 ± 0,03 ^{d,b}	0,24 ± 0,00 ^a	1,86 ± 0,00 ^e	0,12 ± 0,00 ^f	1,71 ± 0,03 ^g
		%	88,46	97,06			96,15	97,06	92,31	91,18	46,15	83,82

*Контрола раста (100%); „А“ – Средња вредност ± СД; % – проценат раста у поређењу са контролом раста; приказане средње вредности у колонама за две различите температуре означене различитим словима у суперскрипту су статистички значајне ($p < 0,05$)

Табела 26. Ефекат синергистичког деловања рН и температуре на раст изолата из рода *Enterococcus*

рН		5,5		6,5*		7		7,5		8,5	
Температура		20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C
Врста	Изолат	А									
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	A	0,13 ± 0,01 ^a	1,71 ± 0,04 ^b	0,75 ± 0,01 ^c	1,50 ± 0,03 ^d	0,93 ± 0,01 ^e	1,32 ± 0,01 ^f	1,18 ± 0,01 ^g	1,40 ± 0,04 ^h	1,22 ± 0,04 ⁱ
		%	17,33	114			124	88	157,33	93,33	162,67
<i>E. durans</i>	KGPMF10	A	0,09 ± 0,01 ^a	1,16 ± 0,01 ^b	0,64 ± 0,02 ^c	1,69 ± 0,01 ^d	0,63 ± 0,00 ^c	1,72 ± 0,01 ^d	0,52 ± 0,02 ^e	1,81 ± 0,01 ^f	0,44 ± 0,02 ^g
		%	14,06	68,64			98,44	101,77	81,25	107,10	68,75
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	A	0,01 ± 0,00 ^a	0,19 ± 0,00 ^b	0,09 ± 0,01 ^c	0,49 ± 0,00 ^d	0,16 ± 0,01 ^e	0,55 ± 0,01 ^f	0,12 ± 0,00 ^g	0,69 ± 0,00 ^h	0,11 ± 0,00 ^g
		%	11,11	38,78			177,78	112,24	133,33	140,81	122,22
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	A	0,07 ± 0,00 ^a	0,46 ± 0,02 ^b	0,08 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,01 ^b	0,11 ± 0,00 ^a	0,67 ± 0,01 ^c	0,12 ± 0,01 ^a	0,79 ± 0,00 ^d	0,09 ± 0,01 ^a
		%	87,5	95,83			137,5	139,58	150	164,58	112,5
	KGPMF48	A	0,06 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,03 ^b	0,12 ± 0,02 ^c	0,79 ± 0,01 ^d	0,14 ± 0,01 ^c	0,89 ± 0,01 ^e	0,16 ± 0,01 ^c	1,11 ± 0,01 ^f	0,12 ± 0,00 ^c
		%	50	35,44			116,67	112,66	133,33	140,51	100
	KGPMF49	A	0,03 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,02 ^b	0,18 ± 0,00 ^c	0,51 ± 0,00 ^d	0,16 ± 0,01 ^c	0,56 ± 0,00 ^d	0,15 ± 0,00 ^c	0,68 ± 0,01 ^e	0,16 ± 0,00 ^c
		%	16,67	31,37			88,89	109,80	83,33	133,33	88,89
	ATCC 29211	A	0,01 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,01 ^c	0,48 ± 0,03 ^d	0,16 ± 0,02 ^c	0,63 ± 0,01 ^e	0,14 ± 0,00 ^c	0,59 ± 0,01 ^f	0,14 ± 0,00 ^c
		%	7,69	12,5			123,08	131,25	107,69	122,92	107,69
		A									
		%									

*Контрола раста (100%); „А“ – Средња вредност ± СД; % – проценат раста у поређењу са контролом раста; приказане средње вредности у колонама за две различите температуре означене различитим словима у суперскрипту су статистички значајне ($p < 0,05$)

Табела 27. Ефекат синергистичког деловања рН и различитих концентрација соли на раст изолата из рода *Lactobacillus*

		% соли		4		6,5		8	
		Температура		20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C
Врста	Изолат								
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF28	A	0,06 ± 0,00 ^a	0,46 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,01 ^c	н.р.	0,02 ± 0,00 ^d	
		%	18,18	26,44	12,12	24,14		1,15	
<i>Lb. fermentum</i>	KGPMF29	A	0,10 ± 0,02 ^a	0,26 ± 0,04 ^b	0,04 ± 0,00 ^c	0,05 ± 0,01 ^c	н.р.	0,01 ± 0,00 ^d	
		%	37,04	21,67	14,81	4,17		0,83	
<i>Lb. brevis</i>	KGPMF35	A	0,32 ± 0,00 ^a	1,62 ± 0,01 ^b	0,12 ± 0,01 ^c	0,22 ± 0,02 ^d	н.р.	0,09 ± 0,01 ^e	
		%	74,42	78,26	27,91	10,63		4,35	
<i>Lb. plantarum</i>	KGPMF62	A	0,32 ± 0,02 ^a	1,70 ± 0,02 ^b	0,09 ± 0,00 ^c	0,13 ± 0,01 ^{cd}	н.р.	0,10 ± 0,00 ^d	
		%	72,72	83,33	20,45	6,37		4,91	
<i>Lb. plantarum</i>	LP 299v	A	0,19 ± 0,01 ^a	0,45 ± 0,01 ^b	0,08 ± 0,00 ^c	0,17 ± 0,01 ^d	н.р.	0,03 ± 0,00 ^e	
		%	65,52	91,84	27,59	34,69		6,12	

„А“ – Средња вредност ± СД; % – проценат раста у поређењу са контролом раста; приказане средње вредности у колонама за две различите температуре означене различитим словима у суперскрипту су статистички значајне ($p < 0,05$); н.р.-нема раста

Различите концентрације соли су показале инхибиторан ефекат на раст тестираних изолата БМК (Табела 27 – 29). У поређењу са контролом раста, на обе тестиране температуре, раст свих изолата је, већ на 4% соли, био инхибиран. Инхибиторни ефекат соли, истих концентрација био је изразитији на температури од 20°C ($p < 0,05$). Тестиране ентерококе су показале нешто већу отпорност на присуство соли у медијуму, нарочито на 37°C (Табела 29). Лимитирајући фактор раста за све тестиране БМК била је температура од 20°C у комбинацији са 8% соли. У овој комбинацији еколошких фактора, једино су лактококе показале минималан раст, док код лактобацила раст није детектован. Тестиране ентерококе су показале способност минималног раста, осим изолата KGPMF14, KGPMF47 и KGPMF49, за које раст није детектован.

На основу добијених резултата испитивања, утицаја еколошких фактора на планктонски раст тестираних изолата, (Табела 24 – 29), може се закључити да су температура од 20°C и високе концентрације соли лимитирајући фактори за раст свих изолата. рН је лимитирајући фактор за планктонски раст изолата БМК само за одређену групу бактерија (кисела средина за ентерококе, а базна средина за лактобациле и лактококе).

Табела 28. Ефекат синергистичког деловања рН и различитих концентрација соли на раст изолата из рода *Lactococcus*

		% соли		4		6,5		8	
		Температура		20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C
Врста	Изолат								
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KGPMF23	A		0,05 ± 0,00 ^a	1,46 ± 0,20 ^b	0,03 ± 0,00 ^c	0,12 ± 0,01 ^d	0,01 ± 0,00 ^e	0,02 ± 0,00 ^e
		%		15,63	83,43	9,38	6,86	3,13	1,14
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	KGPMF50	A		0,10 ± 0,00 ^a	0,61 ± 0,01 ^b	0,05 ± 0,01 ^c	0,22 ± 0,01 ^d	0,02 ± 0,00 ^{e,c}	0,05 ± 0,01 ^f
		%		43,49	52,14	21,74	18,80	8,70	4,27
	KGPMF54	A		0,08 ± 0,01 ^a	1,42 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,01 ^c	0,11 ± 0,00 ^d	0,03 ± 0,00 ^c	0,09 ± 0,00 ^d
		%		47,06	70,30	23,53	5,45	17,65	4,46
	KGPMF55	A		0,05 ± 0,01 ^a	0,78 ± 0,01 ^b	0,02 ± 0,00 ^a	0,20 ± 0,01 ^c	0,01 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,00 ^d
		%		31,25	45,09	12,5	11,56	6,25	1,73
	KGPMF57	A		0,12 ± 0,02 ^a	1,69 ± 0,02 ^b	0,05 ± 0,01 ^c	0,13 ± 0,00 ^d	0,02 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,00 ^d
		%		54,55	82,84	22,73	6,37	9,09	4,90
	KGPMF59	A		0,14 ± 0,02 ^a	1,62 ± 0,02 ^b	0,12 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,00 ^c	0,03 ± 0,00 ^d	0,12 ± 0,00 ^c
		%		53,85	79,41	46,15	7,84	11,54	5,88

„А“ – Средња вредност ± СД; % – проценат раста у поређењу са контролом раста; приказане средње вредности у колонама за две различите температуре означене различитим словима у суперскрипту су статистички значајне ($p < 0,05$)

Табела 29. Ефекат синергистичког деловања рН и различитих концентрација соли на раст изолата из рода *Enterococcus*

% соли			4		6,5		8	
Температура			20°C	37°C	20°C	37°C	20°C	37°C
Врста	Изолат							
<i>E. hirae</i>	KGPMF9	A	0,28 ± 0,00 ^a	0,93 ± 0,10 ^b	0,07 ± 0,00 ^c	0,15 ± 0,02 ^d	0,04 ± 0,02 ^e	0,03 ± 0,01 ^e
		%	37,33	62	9,33	10	5,33	2
<i>E. durans</i>	KGPMF10	A	0,32 ± 0,01 ^a	0,97 ± 0,03 ^b	0,11 ± 0,01 ^c	0,22 ± 0,00 ^d	0,02 ± 0,00 ^e	0,08 ± 0,01 ^f
		%	50	75,40	17,19	13,02	3,13	4,73
<i>E. faecium</i>	KGPMF14	A	0,06 ± 0,01 ^{a f}	0,45 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^c	н.р.	0,03 ± 0,00 ^d
		%	66,67	91,84	33,33	20,41		6,12
<i>E. faecalis</i>	KGPMF47	A	0,03 ± 0,00 ^a	0,40 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^c	н.р.	0,03 ± 0,00 ^d
		%	37,5	83,33	12,5	14,58		6,25
	KGPMF48	A	0,09 ± 0,00 ^a	0,31 ± 0,11 ^b	0,06 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^c	0,02 ± 0,00 ^a	0,03 ± 0,01 ^d
		%	75	39,24	50	12,66	16,67	3,80
	KGPMF49	A	0,12 ± 0,00 ^a	0,43 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,00 ^c	0,08 ± 0,00 ^d	н.р.	0,03 ± 0,00 ^e
		%	66,67	84,31	16,67	15,69		5,88
	ATCC 29211	A	0,08 ± 0,01 ^a	0,43 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,00 ^c	0,09 ± 0,01 ^d	0,01 ± 0,00 ^c	0,03 ± 0,00 ^e
		%	61,54	89,58	23,08	18,75	2,08	6,25

„А“ – Средња вредност ± СД; % – проценат раста у поређењу са контролом раста; н.р.- нема раста; приказане средње вредности у колонама за две различите температуре означене различитим словима у суперскрипту су статистички значајне ($p < 0,05$)

7. ДИСКУСИЈА

У овој докторској дисертацији, по први пут су утврђени састав и динамика бактериобиоте аутохтоног сокобањског сира и извршена је физиолошка карактеризација БМК са посебним освртом на њихове пробиотске потенцијале. Сокобањски сир се прави на традиционалан начин, без додавања бактеријских стартер култура. Због тога, он представља одличан извор аутохтоних сојева БМК, које потенцијално могу поседовати карактеристике пожељне у биотехнологији. Тестиране хемијске карактеристике сокобањског сира у пролећним и јесењим узорцима су показале да међу њима не постоје статистички значајне разлике ($p > 0,05$). Садржај масти у сувој материји је био нешто већи у пролећном узорку из села Језеро (1 П) и јесењем узорку из села Читлук (3 Ј).

Бројност БМК је одређена у сваком узорку сира, сакупљеном у току све три сезоне. У пролећним узорцима сира, просечан број *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. и *Enterococcus* spp. био је $1,8 \times 10^7$, $8,5 \times 10^7$ и 3×10^5 CFU g⁻¹ сира (Muruzović et al. 2018a). Просечан број *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. и *Enterococcus* spp. у летњим узорцима је био 6×10^7 , 2×10^7 и 6×10^5 CFU g⁻¹ сира. Јесењи узорци сокобањског сира су садржали просечно 9×10^7 , $6,7 \times 10^7$ и $3,7 \times 10^5$ CFU g⁻¹ сира *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. и *Enterococcus* spp. (Muruzović et al., 2018b). Узорци сокобањског сира из села Дуго Поље нису садржали *Enterococcus* spp. ни у једној сезони узорковања, док је већи број *Enterococcus* spp. пронађен у летњем и јесењем узорковању сира из села Језеро. Пролећни узорци су садржали најмањи број БМК, без обзира на домаћинство из кога су узети. Разлог за такав резултат је највероватније различита врста хране која се користи у исхрани животиња, у зависности од сезоне (Muruzović et al., 2018a; 2018b). Бројност БМК варира у зависности од коришћеног стартера и сезоне производње. На бројност *Enterococcus* spp. у сиревима може утицати њихова способност преживљавања и раста у току технолошког процеса производње и зрења сира (Giraffa, 2003; Giménez-Pereira, 2005). Према Godić-Torkar & Golc Teger (2004), просечан број *Lactococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. у словеначким традиционалном сиревима је $2,5 \times 10^7$ и $9,8 \times 10^7$ CFU g⁻¹ сира. Menendez et al. (2001) су проучавали карактеристике „Tetilla“ сира, направљеног од сировог крављег млека, и показали да је бројност *Lactococcus* spp. на M17 агару био 2×10^7 CFU g⁻¹ сира. Бројност *Enterococcus* spp. може бити у распону од 10^4 до 10^6 CFU g⁻¹ сира, што је потврђено и резултатима ове дисертације. Код потпуно зрелог сира, бројност ентерокока може да варира од 10^5 до 10^7 CFU g⁻¹ сира (Franz et al., 2003). Повећан број аеробних мезофилних бактерија у сиру се може детектовати у зависности

од сезоне производње сира и температуре околине током сазревања сира (Bonetta et al., 2008). Према Levkov et al. (2014), број аеробних мезофилних бактерија има тенденцију повећања током зрења, а свој максимум достижу другог дана зрења ($5,22 \times 10^6 - 1,25 \times 10^7$ CFU g⁻¹ сира). У овој дисертацији се радило на узорцима младог сира, старости три дана и није се пратила динамика током зрења. У пролећним узорцима сокобањског сира, број аеробних мезофилних бактерија кретао се између $1,8 \times 10^7$ и $1,2 \times 10^8$ CFU g⁻¹ сира, што је више него у летним и јесењим узорцима (Muruzović et al., 2018a; 2018b).

Позитивни коефицијенти корелације између pH сира и бројности *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. и *Enterococcus* spp. ($r = 0,94$, $r = 0,90$ и $r = 0,90$, $p < 0,01$) указују на прилагођавање микроорганизама на ниже вредности pH у сире. Овакав резултат је очекиван, јер је познато да БМК могу утицати на спуштање pH вредности сира. Негативни коефицијенти корелације између садржаја NaCl, односа соли и воде и бројности *Enterococcus* spp. ($r = -0,90$ и $r = -0,92$, $p < 0,01$) указују на инхибиторни ефекат високог садржаја соли и односа соли и воде на раст врста из рода *Enterococcus*. Негативни коефицијенти корелације између садржаја NaCl, односа соли и воде и бројности аеробних мезофилних бројева ($r = -0,94$ и $r = -0,37$, $p < 0,05$) указују на инхибиторни ефекат високог садржаја соли и односа соли и воде на раст мезофилних бактерија. Негативан коефицијент корелације између pH сира и бројности аеробних мезофилних бактерија ($r = -0,97$, $p < 0,01$) указује на могућност адаптације микроорганизама на снижене pH вредности сира.

Велики број истраживања показује да су врсте из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* доминантне у традиционално направљеним, домаћим сиревима (Terzić-Vidojević et al., 2007, 2009; Abdullah & Osman, 2010). Bluma & Ciprovica (2015) су показали да су у сировом млеку најчешће изоловане БМК врсте из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* и да су најчешће идентификоване врсте *L. lactic*, *Lb. brevis* и *Lb. fermentum*. Šaková et al. (2015) су показали присуство бројних лактокока и лактобацила у „May bryndza“ сире. *L. lactic* subsp. *lactic* и *L. lactic* subsp. *lactic* biovar. *diacetylactic*, су били доминантни изолати у „Arzúa-Ulloa“ и „Tetilla“ сире, направљеним од непастеризованог млека (Menéndez et al., 2000; 2001), што је у складу резултатима ове дисертације. У узорцима сира из Сокобање, доминантне бактерије су *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, *L. lactic* subsp. *lactic* и *L. lactic* subsp. *lactic* biovar. *diacetylactic*. Giraffa (2003) и Strateva et al. (2016) указују да су у оквиру ентерокока, *E. faecium* и *E. faecalis* најчешће врсте изоловане из сирева. Mormile et al. (2016) су показали да је *E. faecium* доминантна врста у „Pecorino di Tramont“ сире, а затим врсте *E. faecalis* и *E. durans*. Giraffa (2003) и

Mrkonjić Fuka et al. (2017) су приметили да су *E. faecium*, *E. faecalis* и *E. hirae* најчешће врсте ентерокока изоловане из сирева, што је потврђено и у овој дисертацији. У току истраживања заједнице БМК у узорцима сокобањског сира, примећено је да нема значајних разлика у броју и разноликости бактеријских врста у летњим и јесењим узорцима сира. У пролећним узорцима сокобањског сира, пронађене су само врсте *E. faecium* и *E. faecalis* (Muruzović et al., 2018a; 2018b).

У овој дисертацији, по први пут је утврђено присуство врста из рода *Streptococcus* у сокобањском сиру и испитана су њихова биохемијска и физиолошка својства. *S. uberis* се обично третира као патоген пореклом из животне средине, због чињенице да показује значајну способност преживљавања и умножавања у екстремним условима. *S. uberis* се може изоловати из сламе која је у контакту са животињама (Bramley, 1982). Wilesmith et al. (1986) су описали учесталост клиничког маститиса код животиња (крава) и детектовали бактерије које су узрочници болести. *S. uberis*, праћен врстом *S. agalactiae*, били су најчешћи патогени изоловани из клиничких случајева маститиса (Ward & Schultz, 1974). Francis et al. (1986) су показали сличне епидемиолошке карактеристике клиничког маститиса код крава у свом трогодишњем истраживању. Показано је да је *S. uberis* доминанан патоген повезан са клиничким случајевима маститиса у току сувог периода године. Случајеви клиничког маститиса су учестали током зимског периода (октобар – март), док је у августу забележен секундарни максимум (Francis et al., 1986). Према досадашњим истраживањима и прегледу литературе, практично нема података о присуству ове врсте у млеку, сиру или неким другим млечним производима у Србији. *S. uberis* KGPMF1 – 7 и *S. agalactiae* KGPMF8 су изоловани само у летњим узорцима сокобањског сира. Имајући у виду специфичну технологију производње сира из Сокобање, ови изолати су највероватније пореклом са вимена крава (Muruzović et al., 2018d). Muruzović et al. (2018d) су испитали осетљивост *S. uberis* KGPMF1 – 7 и *S. agalactiae* KGPMF8 на тетрациклин, хлорамфеникол, рифампицин и новобиоцин и показали да су тестирани изолати показали осетљивост на сваки тестирани антибиотик. Пречник зоне инхибиције је био у опсегу од 36 – 48 mm. Састав и динамика заједнице БМК у сокобањском сиру зависи од исхране крава у току различитих сезона, али и од хигијенских услова током процеса прављења и складиштења сира. Ацидификациона способност тестираних изолата из све три сезоне била је добра, али знатно боља у обогаћеном млеку ($p < 0,05$). Утврђена је негативна линеарна корелација за време инкубације и рН у чистом и обогаћеном млеку ($r = -0,91$ и $-0,93$). Обе корелације су биле значајне ($p < 0,05$).

7.1. Антимикробни потенцијал изолованих бактерија млечне киселине

Истраживања су показала да БМК изоловане из сокобањског сира имају антимикробни ефекат у односу на ентеробактерије (Muruzović et al., 2018a; 2018 b; 2018d). Разни адитиви и конзерванси могу штетно утицати на здравље људи (Silva & Lidon, 2016) док су БМК препознате као сигурне (GRAS), због њиховог доприноса здравој микрофлори слузокоже црева човека. Бројне студије су потврдиле антимикробни потенцијал БМК. Из тог разлога, постоји потреба да се истражи како се метаболички продукти БМК могу користити у биоконзервацији хране. Klapáčová et al. (2015) су показали значајно антимикробно деловање *Lactobacillus* spp. на одабране непожељне или патогене микроорганизме, који могу бити опасни контаминанти хране и указали да се на тај начин може спречити појава биогених амина, које луче микроорганизми доспели услед контаминације у процесу прераде млека. Коришћењем диск-дифузионе методе, Heredia-Castro et al. (2015) су доказали да сирови екстракти (непречишћен супернатант) *Lb. fermentum* показују јаку инхибиторну активност према *S. aureus*, *L. innocua*, *E. coli* и *S. cholerae*. *Lactobacillus* spp. су најпознатији по способности продукције бактериоцина (Moјgani & Amimia, 2007). Према Fraga Coteló et al. (2013), *L. lactis* 8L1A и 8L1B, изоловани из сира, показују значајну антимикробну активност у односу на патогене бактерије. Одабрани сојеви БМК могу се користити као стартери или за биоконзервацију сира. *E. faecalis* and *E. faecium* производе ентерококни бактериоцин, познатији као „ентероцин“. Ентероцини су ензими који показују антимикробну активност, нарочито према припадницима врста из родова *Listeria* и *Clostridium* (Giménez-Pereira, 2005). Природни изолат из сира, *E. faecium* RZS C5, је један од произвођача бактериоцина који је показао веома јаку активност у односу на раст *L. monocytogenes*. Ентерококе се могу користити као природни адитиви за очување хране, пошто њихова инхибиторна активност обухвата и патогене који се преносе храном, али могу бити и потенцијални контаминатори хране па је њихова употреба селективна и ограничена (Leroy et al., 2003; Hassanzadazar et al., 2014). Бактериоцин који продукује *E. faecium* GHB21, изолован из алжирске традиционалне пасте „ghars“, показује инхибиторну активност према Грам-позитивним или Грам-негативним бактеријама, укључујући неке патогене и/или узрочнике кварења хране (Merzoug et al., 2016). Özmen Toğay et al. (2016) су показали да *Enterococcus* spp., изоловани из традиционалног турског сира, показују антимикробни ефекат према *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L.*

ivanovii и *S. aureus*. *S. uberis* је припадник групе БМК, за који је доказано да производи нову варијанту низина, названу нисин „U“ (Klaenhammer, 1993; Cotter et al., 2005; Patrovský et al., 2016). Wirawan et al. (2007) указују да, поред нисина „U“, *S. uberis* производи и други бактериоцин, који изазива лизу метаболички активних бактерија, због чега је назван уберолизин. У овој дисертацији, по први пут је истражена способност *S. uberis* и *S. agalactiae*, изолованих из сокобањског сира, да инхибирају раст изабраних тестираних Грам-негативних бактерија.

Mladenović et al. (2018) и Muruzović et al. (2018d) су испитивали осетљивост индикаторских врста (ентеробактерија чији је раст био инхибиран под утицајем БМК) на антибиотике (тетрациклин, стрептомицин и хлорамфеникол). Резултати су показали да су све индикаторске врсте биле осетљиве на стрептомицин и хлорамфеникол, са пречником зоне инхибиције у опсегу од 17 – 45 mm. Изузетак су били: *P. mirabilis* ATCC 12453, који је резистентан на тетрациклин (10 mm) и *K. oxitoca* KGPMF1 и *A. hydrophila* KGPMF65, на које је тетрациклин деловао интермедијерно (15 mm). На основу резултата, може се закључити да изолати БМК показују селективну и ограничену антимикуробну активност на раст тестираних индикаторских врста, у поређењу са антибиотицима.

7.2. Пробиотски потенцијал изабраних бактерија млечне киселине

У овој дисертацији, по први пут је испитан пробиотски потенцијал одабраних сојева БМК, изолованих из традиционално направљеног сокобањског сира. Да би доспели до танког црева, потенцијални пробиотици морају имати способност да преживе услове гастроинтестиналног тракта (ниска рН вредност, присуство пепсина, жучне соли и панкреатина) и способност адхезије и агрегације (Kavitha & Devasena, 2013). Резистенција на антибиотике је важна јер може указати на потенцијалну патогеност бактерије или опасност од хоризонталног трансфера гена између бактеријских врста. Бактерија са пробиотским својствима, која је резистентна на већину антибиотика, може имати негативне последице по здравље људи (Dixit et al., 2013). Пробиотици се комбинују са пребиотцима (шећери), као симбиотици, што повољно утиче на домаћина, јер се на тај начин побољшава способност њиховог преживљавања у гастроинтестиналном тракту.

Способност преживљавања у симулираним условима гастроинтестиналног тракта

Одабрани изолати БМК, су тестирани на толеранцију и опстанак у киселој средини, као и на способност раста у присуству пепсина, панкреатина и жучних соли. Већина бактерија млечне киселине изолованих из сокобањског сира показују толеранцију на симулиране гастроинтестиналне услове. Не постоји научни консензус о рН вредности и концентрацији жучних соли на коју би требали бити толерантан бактеријски сој, да би се могао прогласити пробиотиком (Zago et al., 2011). Hosseini et al. (2009) су указали на отпорност *E. faecium* на услове у танком цреву, при чему је након 4 h инкубације у условима са 0,5%, 1% и 2% жучне соли и панкреатина (1 mg mL⁻¹) при рН 8, примећено да изолати преживљавају у високом проценту (96 – 98%). Према Nami et al. (2014), *E. durans* 6HL показује способност преживљавања у ниским рН вредностима, жучним солима и симулираним условима дигестије, *in vitro*. Divyashri et al. (2015) су доказали да *E. faecium* показује толеранцију на услове гастроинтестиналног стреса (рН 1,5, 2 и 3 и концентрација жучних соли 0,45%). Guo et al. (2016) су доказали да су *Enterococcus* spp., изоловани из традиционално прављених, природно ферментисаних кремова, били веома толерантни и преживели 2 h при рН 3,0, док су у присуству жучи преживеле 4 h. *E. faecium* изолован из различитих органа слатководних риба, показује способност преживљавања при рН 3,0 и у присуству жучних соли, панкреатина и пепсина (El-Jeni et al., 2016). Слични резултати су потврђени и у другим

истраживањима, у којима су аутори анализирали сојеве БМК (*Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp.) изоловане из различитих извора (Delgado et al., 2007; Vinderola et al., 2008; Zago et al., 2011; Ramos et al., 2013; Leite et al., 2015; Pavli et al., 2016).

Способност синтезе биогених амина и хемолизина

БМК изоловане из сокобањског сира нису показале способност продукције биогених амина. Немогућност бактеријске културе да формира биогене аminer је један од критеријума за избор потенцијалног пробиотика. Амин-негативне стартер културе, које показују способност брзог снижавања рН вредности, могу у великој мери спречити акумулацију биогених амина у ферментисаним месним производима (Stadnik & Dolatowski, 2010). Стартер културе које показују конкуренцију са нестартерима, могу спречити прекомерну производњу биогених амина, коју потенцијално лучше нестартер културе (Suzzi & Gardini, 2003; Stadnik & Dolatowski, 2010).

Испитивање способности синтезе хемолизина на крвном агару може указати на потенцијалну патогеност бактерија. Резултати ове дисертације указују на то да БМК изолати из сира нису показали β -хемолизу на крвном агару. Leite et al. (2015) су такође указали да БМК изоловане из бразилског кефира нису показале хемолитичку активност. El-Jeni et al. (2016) указују да *E. faecium* не показује хемолитичку активност.

Способност раста у присуству фенола

Фенол у организму настаје у процесу бактеријске деаминације ароматичних аминокиселина насталих хидролизом протеина из хране или ендемном производњом (Šušković et al., 2001). Количина фенола која се може детектовати у дебелом цреву варира и има веома негативан утицај на људско здравље. Сматра се да је количина фенола до 0,3% нормална, па се зато испитује раст БМК до ове концентрације. Nowak et al. (2014) су показали да већа концентрација фенола ($> 0,3\%$) утиче на појаву карцинома дебелог црева. Резултати ове дисертације указују да већина испитиваних сојева БМК расте на подлогама са 0,1, 0,2% и 0,3% фенола. Изузетак су били *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF50 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF55.

Осетљивости изолата на антибиотике

Вишеструка резистенција на антибиотике бактерија са пробиотским својствима може указивати на њихову патогеност, што може имати негативне последице по здравље људи (Dixit et al., 2013; Lei et al., 2014). Према EFSA, (2008), бактеријска резистенција која је последица мутације хромозомских гена бактерије, носи велики ризик од могућности хоризонталног трансфера резистентних гена. Антибиотска резистенција, која је генетски условљена, може довести до ризика по јавно здравље (Bernardeau et al., 2008; Pavli et al., 2016). Све бактерије млечне киселине изоловане из сокобањског сира, према EFSA, (2012) критеријумима, показују осетљивост према тестираним антибиотцима. Uroić et al. (2014) су истраживали осетљивост изолата из родова *Lactobacillus* и *Lactococcus* изолованих из српских и хрватских сирева на антибиотике и показали да су сви изолати осетљиви на испитиване антибиотике. Leite et al. (2015) су показали да су *Lactococcus* spp., изоловани из бразилског кефира, осетљиви на тетрациклин, еритромицин, клиндамицин, ампицилин и аминогликозиде. Резистенција је детектована само према ванкомицину. *Lactococcus* spp. изоловани из сокобањског сира су били осетљиви на ванкомицин. Истраживање *Enterococcus* spp., као потенцијалних пробиотика је и даље контраверзно питање, јер је познато да ванкомицин резистентне ентерококе изазивају проблеме у болницама (Franz et al., 2011). Nami et al. (2014) су показали да је *E. durans* 6HL био осетљив на ванкомицин, тетрациклин, ампицилин и гентамицин. У истраживању ове дисертације, *Enterococcus* spp. нису показале резистенцију на клинички релевантне антибиотике (ванкомицин, тетрациклин, ампицилин, гентамицин и полимиксин Б). С обзиром да тестирани изолати БМК нису показали резистенцију на тестиране антибиотике, подвргнути су даљем испитивању на потенцијалне пробиотске особине.

Способност асимилације различити врста шећера

Уношење пробиотске културе у облику симбиотика повољно утиче на здравље домаћина, јер се на тај начин побољшава способност преживљавања пробиотика у гастроинтестиналном тракту (Sarangi et al., 2016). У овој докторској дисертацији, извршена је процена способности раста одабраних БМК у присуству фруктозе, лактозе, манитола и инулина. Већина истраживања је фокусирана на испитивање утицаја ових шећера на раст бифидобактерија и лактобацила, али мало је познато како они утичу на корисне бактерије из других родова, као што су лактококе, који се широко користе у прехранбеној индустрији (Gänzle & Fallador, 2012; Prankutė et al., 2014). Због тога,

результати ове докторске дисертације доприносе знању о могућностима коришћења и других родова БМК као пробиотика или симбиотика. У овој дисертацији је истражена и упоређена способност коришћења фруктозе и декстрозе са способношћу коришћења полисахарида, у виду инулина од стране бактерија. Разлике у апсорбаци раста у присуству инулина, и фруктозе и декстрозе (појединачно) нису биле значајне ($p > 0,05$). da Silva Sabo et al. (2015) су показали да је раст *Lb. plantarum* ST16 Ра у медијуму без инулина, био за 54% већи, што је потврђено и резултатима у овој дисертацији. Almståhl et al. (2013) указују да врсте из рода *Lactobacillus* имају способност ферментације, не само шећера, већ и супститута шећера, као што је манитол. Резултати ове дисертације показују да једино *Lb. plantarum* показује способност ферментације манитола. Према Uroić et al. (2014), *L. lactis* BGAL1-1 није показао способност да користи манитол као пребиотик, што је у складу са нашим резултатима. Присуство одређених шећера може да утиче на бољу продукцију бактериоцина код неких бактерија. de Souza de Azevedo et al. (2017) су показали да је стимулирана производња бактериоцина *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 у корелацији са присуством сахарозе и инулина, комбинованих са глукозом. Ognik et al. (2017) указују да давање пробиотика (који садрже живе сојеве *E. faecium* DSM 7134 уз додатак холокалциферола и аскорбинске киселине) живини, помаже одржавању редокс хомеостазе, без негативних ефеката на метаболизам јетре. Chen et al. (2007) су истраживали раст *E. faecium* MR006 у бујонима са различитим шећерима и показали да је најбољи раст био у подлози са декстрозом, што је потврђено и резултатима ове дисертације. Uroić et al. (2014) су показали да ентерококе изоловане из белог киселог сира, показују раст у модификованом MRS бујону са манитолом, као пребиотским супстратом, што је потврђено у нашем истраживању.

Хидрофобност, аутоагрегација и коагрегација тестираних изолата БМК

У овој дисертацији, први пут су приказани резултати испитивања хидрофобности, као и способности адхезије и агрегације 16 сојева БМК изолованих из традиционално направљеног сокобањског сира. Једна од главних карактеристика БМК, које се потенцијално могу користити као пробиотици је њихова способност адхезије и агрегације. Пробиотски сојеви БМК обично показују већу способност аутоагрегације, у поређењу са условно патогеним врстама (Lee & Salminen, 2009). Ово је важна особина, јер бактерије које је поседују, могу формирати биофилм и омогућити механичку заштиту домаћина од колонизације од стране патогена (Li et al., 2015). Постоје многе студије које су показале да је способност формирања биофилма БМК повезана са својствима

адхезије, као важном особином за колонизацију гастроинтестиналног тракта и пробиотског потенцијала БМК (Elhadidy & Zahran, 2014; Živković et al., 2016; Popović et al., 2018).

Већина студија је усмерена ка истраживању моноспецијских биофилмова бактерија, али се сматра да су у природи много више заступљени мултиспецијски (мешовити) биофилмови. Kawarai et al. (2007) су показали да БМК и квасци могу да формирају мешовите биофилмове. Pérez-Ibarreche et al. (2014) су показали да *Lactobacillus* spp., који имају способност формирања биофилма, могу контролисати раст и развој *L. monocytogenes* на абиотичким површинама. Salas-Jara et al. (2016) су истраживали и потврдили повољан ефекат *Lb. fermentum* у облику биофилма. Gomes et al. (2008) су показали да неки изолати *E. faecalis* и *E. faecium* из хране, имају способност да формирају слаб, умерен или снажан биофилм, док неки изолати немају способност формирања биофилма. Necidová et al. (2009) су истраживали способност формирања биофилма *E. faecalis* и *E. faecium*, изолованих из млека и неких финалних млечних производа (нпр. сир) и показали да је *E. faecium* формирао биофилм у већем броју изолата него *E. faecalis*. Исти резултат је потврђен и у овој докторској дисертацији. Necidová et al. (2009) су такође указали на то да ентерококе, изоловане из сира и сурутке, не показују способност формирања биофилма, док су изолати из узорака млека углавном формирали биофилм. Описано је да *E. durans* показује способност формирања јаког или умереног биофилма (Amel et al., 2015), док је према Diaz et al. (2016), *E. hirae* је слаб произвођач биофилма, што је потврђено у резултатима ове дисертације. Нове студије показале су да је способност формирања биофилма БМК у корелацији са њиховом способношћу адхезије и пробиотским потенцијалом (Johansson & Rasmussen, 2013; Elhadidy & Zahran, 2014; Živković et al., 2016; Popović et al., 2018). Изолати из сокобањског сира су показали способност формирања умереног биофилма, тако да засигурно показују потенцијал за даља пробиотска истраживања (Muruzović et al., 2018b; 2018c).

БМК, које поседују способност аутоагрегације, побољшавају хидрофобност површинског дела ћелије и самим тим, побољшавају способност адхезије за површину ћелијског епитела црева (Del Re et al., 2000). Tuo et al. (2013) су показали значајну корелацију између аутоагрегације и хидрофобности врсте *Lb. plantarum*. У истраживању ове дисертације, *Lactobacillus* spp. показују значајну корелацију између способности аутоагрегације и афинитета према хлороформу ($p < 0,05$), док су *Enterococcus* spp. показали значајну корелацију између способности аутоагрегације и афинитета за етил

ацетат ($p < 0,05$). Генерално, тестирани изолати показали су бољи афинитет према хлороформу (кисели растварач) него према етил ацетату (базни растварач) ($p < 0,05$). БМК, које поседују способност коагрегације са неким патогенима и које могу бити пронађене у гастроинтестиналном и урогениталном тракту човека, показују способност инхибиције раста тог патогена (Botes et al., 2008). Kaewnopparat et al. (2013) су указали да БМК, осим способности за колонизацију људског црева, поседују и способност повећања концентрације излучених антимикробних супстанци, у процесу коагрегације. То би могао бити још један механизам контроле раста и развоја патогених бактерија. *Lactobacillus* spp., изоловани из сокобањског сира, показују висок проценат коагрегације са клиничким изолатом *E. coli*, након 2 h инкубације. Li et al. (2015) указују да одабир БМК за испитивање хидрофобности, на основу критеријума показане способности аутоагрегације, није пожељан, док други аутори истичу да је хидрофобност изолат специфична особина (Ehrmann et al., 2002; Lee & Salminen, 2009; Li et al., 2015), што је потврђено и у испитивању изолата из сокобањског сира.

Tresse et al. (2006) указују да је бактеријска хидрофобност кључна у формирању биофилма, док Onifade (1997) и Giaouris et al. (2009) истичу да проценат хидрофобности директно указује на способност адхезије БМК на ћелије епитела црева. Способност адхезије БМК изолованих из сокобањског сира је додатно потврђена кроз *in vitro* испитивање адхезије одабраних изолата БМК за епителне ћелије танког црева свиње. Показано је да одабрани изолати БМК, нарочито *Lactobacillus* spp., поседују способност колонизације епитела танког црева свиње. Неке од ранијих студија су показале да се избор пробиотских БМК првенствено врши на основу њихове хидрофобности према ксилену (Palomares et al., 2007), хексадекану (Pringsulaka et al., 2015) и толуену (Dowarah et al., 2018). Способност адхезије и колонизације ћелија цревног епитела домаћина је важна карактеристика, која има улогу у инхибицији колонизације патогена (Pringsulaka et al., 2015). Доказано је да су *Lb. acidophilus* PF01, *Lb. acidophilus* CF07 и *Pediococcus acidilactici* FT28 показали *in vitro* способност адхезије на епителне ћелије дуоденума свиње (Ahn et al., 2002; Dowarah et al., 2018).

7.3. Ензимска активност бактерија млечне киселине

У овој дисертацији, испитивана је ензимска активност БМК изолованих из сокобањског сира. Детекција ензимске активности изолата је значајна јер бактерије у различитим животним срединама показују способност да синтетишу екстрацелуларне ензиме. Микробиолошки ензими се користе у различитим областима индустрије, а најчешће у хемијској, пољопривредној и биофармацеутској. До сада је показано да микробиолошки ензими имају веома важну улогу у квалитету хране (Avendaño et al., 2016). Сокобањски сир, на пример, се производи додавањем стартера који у себи садржи ензиме гљива (поглавље Материјал).

Формирање укуса у процесу зрења сира је спор процес који укључује различите хемијске и биохемијске конверзије млечних компоненти. Постоје три главна пута у конверзији млека: конверзије лактозе (гликолиза), масти (липолиза) и казеина (протеолиза). Стартер културе које се користе у наведеним ферментацијама (*L. lactis*, *Lactobacillus* spp., *S. thermophilus*) су главни извор ензима који су укључени у предходно наведене путеве метаболизма (Bockelmann & Horpe Seyle, 2001). Smit et al. (2005) указују да лактобацили, који потичу из млека, показују способност раста у млечним производима (као стартер културе) и учествују у ензимској трансформацији млека, што доводи до стварања специфичног укуса сира. Резултати ове дисертације указују да изолати БМК из сокобањског сира имају добру ацидификациону активност и да *Lactobacillus* spp. имају знатно бољу ензимску активност од остала два тестирана рода.

Доказано је да БМК релативно мало доприносе липолизи (Molimard & Spinnler, 1996; Medina et al., 2001), што је потврђено и резултатима ове дисертације, јер тестиране БМК нису показале липолитичку активност.

Lb. plantarum изолован из „Genestoso“ сира показује снажну казеинолитичку (протеолитичку) активност (González et al., 2007). У овој дисертацији, протеолитичка активност је била значајно различита између родова БМК и у оквиру изолата исте врсте. *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. су показали протеолитичку активност, док *Enterococcus* spp. нису показали протеолитичку активност. Ови резултати су потврдили претходно урађене и описане скрининг тестове. Неколико изолата *Lactococcus* spp. показује бољу протеолитичку активност од неких изолата *Lactobacillus* spp. Ови резултати су у корелацији са студијама које су урадили Herreros et al. (2003). На основу резултата у овој дисертацији, може се закључити да није забележена статистички

значајна разлика у протеазној активности између тестираних изолат *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. ($p > 0,05$).

Амилолитичке БМК имају велику улогу у прехранбеној индустрији, посебно у производњи адитива за храну, као што су органске киселине (млечна киселина) и ензими (α -амилаза) (Panda & Ray, 2016). Shibata et al. (2007) указују да су БМК, са амилазном активношћу, тражене на тржишту, јер могу значајно смањити трошкове прераде супстрата. Shin et al. (2008) и су показали да БМК из рода *Enterococcus* показују високу активност амилазе, што је потврђено и резултатима ове дисертације.

Todorov et al. (2017) су истраживали активност алкалне фосфатазе код *Lactobacillus* spp. изолованих из бугарске луканке (месни производ) и показали да већина тестираних сојева није показала активност алкалне фосфатазе. Најбољу активност показали су изолати *Lb. brevis*. Medina et al. (2001) указују да су *Lactococcus* spp., изоловане из млека и сирева из Аргентине, имале добру активност алкалне фосфатазе. Резултати ове дисертације указују да су врсте из рода *Lactobacillus* имале добру активност алкалне фосфатазе, док је активност врста из родова *Lactococcus* и *Enterococcus* била изолат специфична.

БМК поседују способност да производе екстрацелуларне протеине који укључују бактериоцине, ензими, липопротеине и протеине на површинском слоју (Kleerebezem et al., 2010), што је од суштинског значаја за њихов опстанак у различитим еколошким нишама (Zhou et al., 2010). Досадашња истраживања су показала да такви изолати БМК углавном поседују антимикуробна својства, нпр. резултати ове дисертације показују антимикуробну активност БМК у односу на раст ентеробактерија изолованих из истог сира. Може се закључити да екстрацелуларни протеини, заједно са другим метаболичким продуктима БМК, делују синергистички, као одбрамбени механизам.

7.4. Утицај еколошких фактора на раст изолованих бактерија млечне киселине

У овој дисертацији, по први пут је испитиван синергистички ефекат различитих температура, рН и концентрација соли на планктонски раст БМК, изолованих из сокобањског сира. Turpin et al. (2011) су показали да *Lb. fermentum* може расти при ниској рН вредности (рН 4,5). Tulunoğlu et al. (2014) су показале да *Lb. fermentum*, изолован из „Tulum“ сира, може преживети на рН 2,5 и у присуству 1% жучне соли. У истраживању ове дисертације, *Lb. fermentum* KGPMF29 показује способност толеранције на ниске вредности рН (Muruzović et al., 2018c). Rao et al. (2004) су доказали да *Lb. fermentum* не показује изузетну толеранцију на присуство соли, што је потврђено и резултатима ове дисертације. *Lb. fermentum* показује способност преживљавања у рН вредности желуца (рН између 1,5 и 3), и у условима горњег дела танког црева, које садржи око 3 – 5 g жучних соли (Pan et al., 2011). Soliman et al. (2015) су показали да *Lb. plantarum* показује способност толеранције на ниску рН (2,0 и 3,0) и присуство жучних соли (0,1, 0,3, 0,5 и 0,7%), на 37°C, током 24 h. *Lb. plantarum* ATCC 14917 показује способност раста у подлози са 6% NaCl (Wang et al., 2016), што је потврђено и резултатима ове дисертације. *Lb. brevis* RK03 (изолат из рибе) показује значајну толеранцију на желудачну киселину и жучне соли (Wu et al., 2018).

Бактерија *L. lactis* је позната као стартер култура, која, у процесу производње сира, треба да буде толерантна на различите еколошке услове, као што су висока и ниска температура, висок осмотски притисак и кисело окружење (Sanders et al., 1999). Velly et al. (2014) су истраживали ефекте параметара ферментације (различите температуре (22°C, 30°C и 38°C)) и рН (5,6, 6,2 и 6,8) на раст *L. lactis* subsp. *lactis* TOMSC161, природни изолата из сира. Закључили су да, у сурутци, као медијуму, *L. lactis* показује најбољи раст на 32°C, при рН 6,2. Kim et al. (1999) су показали да *L. lactis* subsp. *lactis* може расти на 40°C и у присуству 4% NaCl. Резултати ове дисертације потврђују да *L. lactis* subsp. *lactis* добро расте у присуству 4% соли на 37°C.

E. faecium може да расте у широком опсегу рН вредности. Оптимум за раст је рН 7,5 (Van den Berghe et al., 2006). *E. faecalis* може да расте у присуству 6,5% NaCl (Fisher & Phillips, 2009). Ivanov et al. (1999) су показали да температура, у комбинацији са 3% NaCl, има утицаја на пропустљивост мембране *E. faecalis*. Nami et al. (2014) су показали да *E. durans* 6HL може да преживи у подлози са ниском рН и у присуству жучних соли.

Према Divyashri et al. (2015), *E. faecium* показује толеранцију на гастроинтестиналне услове (pH 1,5, 2 и 3 и 0,45% жучних соли). Guo et al. (2016) су показали да *Enterococcus* spp. могу преживети у MRS медијуму са жучном соли око 4 h. Слични резултати су добијени у другим студијама, где су аутори анализирали сојеве БМК изоловане из различитих окружења (Vinderola et al., 2008; Zago et al., 2011; Ramos et al., 2013; Leite et al., 2015; Pavli et al., 2016). Резултати ове дисертације указују да изоловане врсте из рода *Enterococcus* толеришу и киселу и базну средину, али да боље расту у базној средини, на 37°C.

Сокобањски сир, као традиционалан прехранбени производ, је први пут истражен са хемијског и микробиолошког аспекта, у оквиру ове докторске дисертације. Резултати добијени током експерименталног извођења ове дисертације, као и резултати многобројних истраживања млека и традиционалних млечних производа који су приказани у оквиру дисертације, указују да су овакви производи извор аутохтоних сојева бактерија млечне киселине који могу поседовати особине од значаја за прехранбену биотехнологију и медицину. Резултати указују и на значај и улогу аутохтоних бактерија млечне киселине у млеку и млечним производима као и на важност њиховог даљег проучавања. Сходно наведеним чињеницама, у наредном поглављу биће изведени назначајнији закључци произашли из резултата приказаних у овој дисертацији.

8. ЗАКЉУЧЦИ

На основу хемијског и микробиолошких истраживања сокобањског сира, могу се извести следећи закључци:

- Сокобањски сир је аутохтони ферментисани производ који се прави на традиционалан начин у селима у околини Сокобање (југоисточна Србија).
 - Према садржају масти у сувој материји, сир припада пуномасној групи сирева
 - Према садржају воде у материји без масноће, сир припада групи полумеканих киселих сирева (acid-curd soft cheese group)
- Дисертација садржи прве и оригиналне податке о улози и динамици БМК у оквиру бактериобиоте сокобањског сира.
- Квантитативни састав заједнице бактерија у сокобањском сиру има вредности од 4×10^5 до $2,9 \times 10^8$ и не разликује се од сличних производа.
- Бројност заједнице се разликовала у односу на произвођача (домаћинство одакле је сир узоркован) и у односу на сезону узорковања.
 - Највећи број изолата БМК добијен је у летњој изолацији из села Дуго Поље
 - Узорци сокобањског сира из села Дуго Поље нису садржали *Enterococcus* spp. ни у једној сезони узорковања
 - Пролећни узорци су садржали најмањи број БМК, без обзира на домаћинство из кога су узети
- Значајан чинилац заједнице бактерија сокобањског сира чине бактерије млечне киселине. Формирана је колекција бактерија и идентификоване су следеће врсте: *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *L. lactic* subsp. *lactic*, *L. lactic* subsp. *lactic* biovar. *diacetylactic*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. faecium* и *E. faecalis*.
 - *Lb. brevis* и *L. lactic* subsp. *lactic* нису изоловани у пролећним узорцима сира.
 - Велики број *Enterococcus* spp. је пронађен у летњем и јесењем узорковању из села Језеро
 - *Streptococcus* spp. су изоловани само у летњим узорцима сира
 - *S. uberis* је први пут описан у ферментисаном млечном производу на територији Србије. Ова дисертација има фундаменталан значај и доприноси проширивању знања о овој врсти

- Разлике у биохемијским карактеристикама изолата из различитих домаћинстава, у различитим сезонама, нису уочене.
 - Ацидификациона активност тестираних изолата из све три сезоне била је добра, али знатно боља у обогаћеном млеку ($p < 0,05$)
 - Изолати из рода *Streptococcus* су показали најслабију ацидификациону активност, без способности формирања груша
- Антимикробна активност тестираних изолата БМК на раст индикаторских врста ентеробактерија је била селективна и ограничена. Пречник зоне инхибиције је показатељ на основу кога закључујемо да ли изолати имају антимикробни ефекат на раст индикаторских врста ентеробактерија.
 - Антимикробни ефекат на раст индикаторских врста је изолат специфичан
 - Најбољу антимикробну активност су показали изолати *Lb. fermentum* KGPMF28, *Lb. fermentum* KGPMF29, *Lb. brevis* KGPMF37, *Lb. plantarum* KGPMF62, *L. lactis* subsp. *lactis* KGPMF23, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF26, KGPMF55, KGPMF57, *E. faecium* KGPMF14, *E. faecium* KGPMF17 и *E. faecalis* KGPMF49
 - Инхибиторно дејство БМК на индикаторске врсте је један од критеријума за одабир врста које ће се користити за испитивање пробиотског потенцијала
- Одабрани изолати БМК су тестирани на толеранцију и опстанак у киселој средини, као и на способност раста у присуству пепсина, панкреатина и жучних соли.
 - Сојеви БМК показују толеранцију на *in vitro* симулиране гастроинтестиналне услове
 - Проценат преживљавања био је око 50%
 - Сви одабрани сојеви су показали могућност за даље испитивање пробиотског потенцијала
- Изолати нису показали способност производње биогених амина
- Већина испитиванх сојева БМК расту у медијумима са 0,1%, 0,2% и 0,3% фенола. Изузеци су били изолати *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF50 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF55
- БМК изолати нису показали β-хемолизу на крвном агару

- Способност раста БМК у присуству лактозе, фруктозе, инулина и манитола показује да:
 - *Lb. plantarum* KGPMF62 и *Lb. plantarum* LP 299v показују бољи раст у присуству фруктозе него инулина
 - Лактоза је показала сличан ефекат на раст врста из рода *Lactococcus* као декстроза, осим за изолат *L. lactis* subsp. *lactis* KGPMF23, чији је раст био стимулисан у нижим тестираним концентрацијама; раст у присуству фруктозе био је ограничен, у поређењу са растом у присуству декстрозе
 - Раст врста из рода *Enterococcus* је био ограничен у присуству фруктозе, у поређењу са растом у присуству декстрозе
- Резистенција изолат БМК на тестиране антибиотике није уочена.
 - Ампицилин и тетрациклин су показали најбољи утицај на тестиране БМК
- Изоловане БМК показују способност формирања биофилма и имају способност адхезије и агрегације.
 - Сви изолати су показали способност да формирају умерени биофилм, што је у корелацији са способношћу адхезије за епител црева
 - Корелација између способности адхезије и аутоагрегације тестираних изолат је била изолат специфична
 - Способност адхезије изолованих БМК додатно је потврђена кроз *in vitro* испитивање адхезије одабраних изолат БМК за епител танког црева свиње
 - Одабрани изолати БМК, нарочито врсте из рода *Lactobacillus*, показују способност колонизације епитела танког црева свиње
- Изоловане БМК имају значајну ензимску активност која је изолат специфична.
 - Врсте из рода *Lactobacillus* имају значајно бољу ензимску активност од врста из родова *Lactococcus* и *Enterococcus*
 - Тестиране БМК нису показале липолитичку активност
 - *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. су показали протеолитичку активност, док *Enterococcus* spp. нису показали протеолитичку активност
 - Врсте из рода *Enterococcus* показују високу активност α -амилазе
 - *Lactobacillus* spp. имају добру активност алкалне фосфатазе, док је у оквиру врста из родова *Lactococcus* и *Enterococcus*, активност била изолат специфична

- Планктонски раст БМК на различитим температурама, као и у синергизму различитих температура и рН подлоге, и различитих температура и концентрација соли је тестирана како би се испитали услови преживљавања ових бактерија и проценила потенцијална употреба као пробиотика или стартер култура.
 - Температура на 4°C је била лимитирајући фактор за раст свих тестираних изолатата
 - Инхибирајући фактор за раст *Lactobacillus* spp. и *Lactococcus* spp. су биле базна рН подлоге, концентрације соли изнад 6,5% и температура на 20°C
 - Инхибирајући фактор за раст *Enterococcus* spp. су биле кисела рН подлоге, концентрација соли од 8% и температура на 20°C
- Врсте из рода *Enterococcus* имају добру способност преживљавања у симулираним условима гастроинтестиналног тракта и осетљиве су на тестиране антибиотике, али су показале присуство α -хемолизе, па је даље испитивање њиховог пробиотског потенцијала селективно и ограничавајуће.
- Међу идентификованим БМК, на основу испитиваних карактеристика, пробиотски потенцијал су показали *Lb. fermentum* KGPMF28, *Lb. fermentum* KGPMF29, *Lb. brevis* KGPMF35 и *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* KGPMF57. Ове врсте су предмет даљих истраживања са аспекта примене у биотехнологији или у производњи ферментисаних млечних производа.
- Резултати добијени у току израде ове дисертације могу бити корисни за потенцијални развој симбиотских (комбинација пробиотика и пребиотика) производа.
- Даља истраживања изолатата треба проширити на проналажење стимулативних средстава за производњу бактериоцина, јер су изолати претходно показали антимикробну активност.

9. РЕФЕРЕНЦЕ

- Aasen, M., Møretrø, T., Katla, T., Axelsson, L., & Storror I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(2), 159.
- Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, Dj., Dhulster, P., & Chihib, N.E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196(7), 453 – 472.
- Abdullah, S.A., & Osman, M.M. (2010). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and rob in Sudan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(12), 1203 – 1206.
- Adams, M.R., & Hall, C.J. (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.
- Ahn, Y.T., Lim, K.L., Ryu, J.C., Kang, D.K., Ham, J.S., Jang, Y.H., & Kim, H.U. (2002). Characterization of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Piglets and Chicken. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 15(12), 1790 – 1797.
- Alander, M., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Matilla-Sandholm, T., & Wright, A. (1997). Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 361 – 364.
- Allen, R.J.L. (1940). The estimation of phosphorus. *Biochemistry Journal*, 34, 858 – 865.
- Almståhl, A., Lingström, P., Eliasson, L., & Carlén, A. (2013). Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque *Lactobacillus* strains. *Clinical Oral Investigation* 17(6), 1465 – 1470.
- Alomar, J., Loubire, P., Delbes, C., Nouailee, S., & Montel, M.C. (2008). Effect of *Lactococcus garivieae*, *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecalis* on the behavior of *Staphylococcus aureus* in microfiltered milk. *Food Microbiology*, 25(3), 502 – 508.
- Alves, L.L., Richards, N.S., Mattanna, P., Andrade, D.F., S Rezer, A.P., Milani, L.I., Cruz, A.G., & Faria, J.A. (2013). Cream cheese as a symbiotic food carrier using *Bifidobacterium animalis* Bb-12 and *Lactobacillus acidophilus* La-5 and inulin. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 63 – 69.
- Amel, A.M., Farida, B., & Djamila, S. (2015). Anti-adherence potential of *Enterococcus durans* cells and its cell-free supernatant on plastic and stainless steel against foodborne pathogens. *Folia Microbiologica (Praha)*, 60, 357 – 363.

- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E., & Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*, 17, 454 – 461.
- Anson, M.L. (1938). The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *The Journal of General Physiology*, 20, 79 – 89.
- Armas, F., Camperio, C., & Marianelli, C. (2017). *In vitro* assessment of the probiotic potential of *Lactococcus lactis* LMG 7930 against ruminant mastitis-causing pathogens. *PLoS One*, 12(1), e0169543. DOI: 10.1371/journal.pone.0169543.
- Aslim, B., Onal, D., & Beyatli Y. (2007). Factors influencing auto-aggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *Journal of Food Protection*, 70, 223 – 227.
- Atanasova, J., Moncheva, P., & Ivanova, I. (2014). Proteolytic and antimicrobial activity of lactic acid bacteria grown in goat milk. *Biotechnology, biotechnological equipment*, 28(6), 1073 – 1078.
- Avendaño, K.A., Anguiano, M., López, E.C., Montañez, L.E., Sifuentes, L., & Balagurusamy, N. (2016). Microbial enzymes: Applications in food processing. *Agro Food Industry Hi Tech*, 27(4), 63.
- Bassyouni, R.H., Abdel-all, W.S., Fadl, M.G., Abdel-all, S., & Kamel, Z. (2012). Characterization of lactic acid bacteria isolated from dairy products in Egypt as a probiotic. *Life Science Journal*, 9, 2924 – 2933.
- Batt, C.A. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2nd edition. Academic Press, Elsevier, pp. 676.
- Bautista-Gallego, J., Alessandria, V., Fontana, M., Bisotti, S., Taricco, S, Dolci, P., Cocolin, L., & Rantsiou, K. (2014). Diversity and functional characterization of *Lactobacillus* spp. isolated throughout the ripening of a hard cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 60 – 66.
- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J. & Van Oss, C.J. (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.
- Bergey, D. (2009). *Bergeys manual of systematic bacteriology* Vol. 3. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
- Berić, T., & Nikolić B. (2014). *Mikrobiološki praktikum*. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd, Srbija.

- Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S., & Guéguen, M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278 – 285.
- Bhardwaj, A., Malik, R.K., & Chauhan, P. (2008). Functional and safety aspects of enterococci in dairy food. *Indian Journal of Microbiology*, 48, 317 – 325.
- Billström, H., Lund, B., Sullivan, A., & Nord, C.E. (2008). Virulence and antimicrobial resistance in clinical *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 32, 374 – 377.
- Birovljev, B. (2010). Probiotici. (<http://www.studpol.rs/dokumenta/bilten/probiotici.pdf>)
- Björkroth, J., & Holzapfel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dvorkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 3th edition. New York, Springer, pp. 267 – 319.
- Bluma, A., & Ciprovica, I. (2015). Diversity of lactic acid bacteria in raw milk. *Annual 21st International Scientific Conference: "Research for Rural Development"*, Jelgava, Latvia, pp. 157 – 161.
- Bockelmann, W., & Hoppe Seyler, T. (2001). The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *International Dairy Journal*, 11, 307 – 314.
- Bonetta, S., Coïson, J.D., Barile, D., Travaglia, F., Piana, G., Carraro, E., & Arlorio, M. (2008). Microbiological and chemical characterization of a typical Italian cheese: Ribola di Roccaverano. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7223 – 7230.
- Botes, M., Loos, B., van Reenen, C.A., & Dicks, L.M. (2008). Adhesion of the probiotic strains *Enterococcus mundtii* ST4SA and *Lactobacillus plantarum* 423 to Caco-2 cells under conditions simulating the intestinal tract, and in the presence of antibiotics and anti-inflammatory medicaments. *Archives of Microbiology*, 190, 573 – 584.
- Bramley, A.J. (1982). Source of *Streptococcus uberis* in the dairy herd. Isolation from bovine feces and from straw bedding of cattle. *Journal of Dairy Research*, 49, 369 – 373.
- Byczkowski, J., & Gessner, T. (1988). Biological role of superoxide ion-radical. *International Journal of Biochemistry*, 20, 56 – 580.
- Callon, C., Picque, D., Corrieu, G., & Montel, M.C. (2011a). Ripening conditions: a tool for the control of *Listeria monocytogenes* in uncooked pressed type cheese. *Food Control*, 22, 1911 – 1919.

- Callon, C., Saubusse, M., Didienné, R., Buchin, S., & Montel, M.C. (2011b). Simplification of a complex microbial antilisterial consortium to evaluate the contribution of its flora in uncooked pressed cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 379 – 389.
- Čanžek Majhenič, A. (2006). Enterococci: yin-yang microbes. *Mljekarstvo*, 56(1), 5 – 20.
- Carasi, P., Ambrosio, N.M., De Antoni, G.L., Bressollier, P., Urdaci, M.C., & de los Angeles Serradell M. (2014). Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *Journal of Dairy Research*, 81(1), 1 – 23.
- Casei, P.G., Casei, G.D., Cardiner, G.E., Tangney, M., Stanton, S., Ross, R.P., Hill, C., & Fitzgerald, G.F. (2004). Isolation and characterization of anti-*Salmonella* lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 431 – 438.
- Casey, A.L., Lambert, P.A., & Elliot, T.S. (2007). Staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(3), 23 – 32.
- Charlet, M., Duboz, G., Faurie, F., Le Quéré, J.-L., & Berthier, F. (2009). Multiple interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 131(1), 10 – 19.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., & Collins, J.K. (2001). Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50 CH and API ZYM systems at 37 degrees C. *Journal of Basic Microbiology*, 41, 241 – 251.
- Chen, Y.S., Srionnual, S., Onda, T., & Yanagida, F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 45, 190 – 193.
- Cheong, E.Y.L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T.T., Nhiep, N.T., My Ho, H.T., Zwielehner, J., Bansal, N., & Turner, M.S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, 46, 91 – 97.
- Cotter, P.D., Hill, C., & Ross R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777 – 788.
- Couto, S.R., & Sanromán, M.A. (2006). Application of solid-state fermentation to food industry - a review. *Journal of Food Engineering*, 76, 291 – 302.
- Crow, V.L. & Gopal, P.K. (1995). Cell surface differences of lactococcal strains. *International Dairy Journal*, 5, 45 – 68.

- Crowley, R.C., Leigh, J.A., Ward, P.N., Lappin-Scott, H.M., & Bowler, L.D. (2011). Differential protein expression in *Streptococcus uberis* under planktonic and biofilm growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 77 (1), 382 – 384.
- da Silva Sabo, S., Converti, A., Todorov, S.D., Domínguez, J.M., & de Souza Oliveira, R.P. (2015). Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in stationary and shaken cultures. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 864 – 870.
- Dal Bello, F., & Hertel, C. (2006). Oral cavity as natural reservoir for intestinal lactobacilli. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(1), 69 – 76.
- Dal Bello, F., Walter, J., Hammes, W.P., & Hertel, C. (2003). Increased complexity of the species composition of lactic acid bacteria in human feces revealed by alternative incubation conditions. *Microbial Ecology*, 45, 455 – 463.
- de Souza de Azevedo, P.O., Converti, A., Domínguez, J.M., & de Souza Oliveira, R.P. (2017). Stimulating effects of sucrose and inulin on growth, lactate, and bacteriocin productions by *Pediococcus pentosaceus*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(4), 466 – 472.
- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13, 194 – 199.
- 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.
- Delgado, S., O’Sullivan, E., Fitzgerald, G., & Mayo, B. (2007). Subtractive screening for probiotic properties of *Lactobacillus* species from the human gastrointestinal tract in the search for new probiotics. *Journal of Food Science*, 72, 310 – 315.
- Dias, F.S., Duarte, W.F., & Schwan, R.F. (2013). Evaluation of adhesive properties of presumptive probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Bioscience Journal*, 29, 1678 – 1686.
- Diaz, M., Ladero, V., del Rio, B., Redruello, B., Fernández, M., Martin, M.C., & Alvarez, M.A. (2016). Biofilm-forming capacity in biogenic amine-producing bacteria isolated from dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 7, 591.
- Divyashri, G., Krishna, G., Muralidhara, & Prapulla, S.G. (2015). Probiotic attributes, antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory effects of *Enterococcus faecium* CFR 3003: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Journal of Medicinal Microbiology*, 64, 1527 – 1540.

- Dixit, G., Samarth, D., Tale, V., & Bhadekar, R. (2013). Comparative studies on potential probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* strains. *EurAsian Journal of BioScience*, 7, 1 – 9.
- Domingos-Lopes, M.F.P., Stanton, C., Ross, P.R., Dapkevicius, M.L.E., & Silva C.C.G. (2017). Genetic diversity, safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. *Food Microbiology*, 63, 178 – 190.
- Dowarah, R., Verma, A.K., Agarwal, N., Singh, P., & Singh, B.R. (2018). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria and its impact on growth, nutrient digestibility, health and antioxidant status in weaned piglets. *PLoS One*, 13(3), e0192978. DOI: 10.1371/journal.pone.0192978
- Do-Won, J., & Jong-Hoon, L. (2015). Antibiotic resistance, hemolysis and biogenic amine production assessments of *Leuconostoc* and *Weissella* isolates for kimchi starter development. *LWT- Food Science and Technology*, 64(2), 1078 – 1084.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L.M., & Prevos, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70, 564 – 582.
- Earnshaw, R.G. (1992). The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: Wood, B.J.B. (Eds.), *The lactic acid bacteria in health and disease*. Elsevier Applied Science, London and New York, pp: 211 – 232.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 966 – 975.
- Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 179 – 185.
- Ekmekci, H., Belma, A., & Sahlan, O. (2009). Characterization of vaginal lactobacilli coaggregation ability with *Escherichia coli*. *Microbiology and Immunology*, 53, 59 – 65.
- Elhadidy, M., & Zahran, E. (2014). Biofilm mediates *Enterococcus faecalis* adhesion, invasion and survival into bovine mammary epithelial cells. *Letters in Applied Microbiology*, 58, 248 – 254.
- El-Jeni, R., El Bour, M., Calo-Mata, P., Böhme, K., Inmaculada, C., Fernández, N., Velázquez, J.B., & Bouhaouala-Zahar, B. (2016). *In vitro* probiotic profiling of novel *Enterococcus faecium* and *Leuconostoc mesenteroides* from Tunisian freshwater fishes. *Canadian Journal of Microbiology*, 62, 60 – 71.

- Erbas, G., Parin, U., Turkyilmaz, S., Ucan, N., Ozturk, M., & Kaya, O. (2016). Distribution of antibiotic resistance genes in *Enterococcus* spp. isolated from mastitis bovine milk. *Acta Veterinaria*, 66(3), 336 – 346.
- Essid, I., Medini M., & Hassouna M. (2009). Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 81, 203 – 208.
- European Food Safety Authority-EFSA. (2008). Technical guidance prepared by the panel on additives and products or substances used in animal feed on the update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance. *EFSA Journal*, 732, 1 – 15.
- European Food Safety Authority-EFSA. (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human or veterinary importance, *EFSA Journal*, 10, 1 – 10.
- FAO/WHO (World Health Organization). (2006). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Food and Nutrition Paper*, 85. Available at: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>
- Fayol-Messaoudi, D., Berger, C.N., Coconnier-Polter, M.H., Liévin-Le Moal, V., & Servin, A.L. (2005). pH-, lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(10), 6008 – 6013.
- Ferreira Araújo, T., & de Lucena Fortes Ferreira, C.L. (2013). The genus *Enterococcus* as probiotic: safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56(3), 457 – 466.
- Feutry, F., Oneca, M., Berthier, F., & Torre, P. (2012a). Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau–Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiology*, 29, 33 – 42.
- Feutry, F., Torre, P., Arana, I., Garcia, S., Desmasures, N., & Casalta, E. (2012b). *Lactococcus lactis* strains from raw ewe's milk samples from the PDO Ossau–Iraty cheese area: levels, genotypic and technological diversity. *Dairy Science and Technology*, 92, 655 – 670.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749 – 1757.
- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H. & Lynch, C.M. (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 83 – 89.

- Fraga Cottelo, M., Perelmuter Schein, K., Giacaman Salvo, S.S., Zunino Abirad, P.M., & Carro Techera, S.B. (2013). Antimicrobial properties of lactic acid bacteria isolated from uruguayan artisan cheese. *Food Science and Technology (Campinas)*, 33(4), 801 – 804.
- Francis, P.G., Wilesmith, J.W., & Wilson, C.D. (1986). Observations on the incidence of clinical bovine mastitis in non-lactating cows in England and Wales. *Veterinary Record*, 17, 549 – 552.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H., & Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47, 1 – 24.
- Franz, C.M.A.P., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W.H., & Gálvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151(2), 125 – 140.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., & Holzapfel, W.H. (2003). Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 105 – 122.
- Gaglio, R., Cruciata, M., Di Gerlando, R., Scatassa, M.L., Cardamone, C., Mancuso, I., Sardina, M.T., Moschetti, G., Portolano, B., & Settanni, L. (2016). Microbial activation of wooden vats used for traditional cheese production and evolution of neoformed biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2), 585 – 595.
- Galvez, A., Abriouel, H., López, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, 51 – 70.
- Gänzle, M.G., & Fallador, R. (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Food Microbiology*, 340(3), 1 – 15.
- Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T., & Ruas-Madiedo, P. (2014). Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Beneficial Microbes*, 6(3), 337 – 343.
- Gatti, M., Lindner, J.D.D., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M., Bernini, V., & Neviani, E. (2008). Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano–Reggiano cheese production and ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6161 – 6167.
- Giaouris, E., Chapot-Chartier, M. P., & 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.

- Giménez-Pereira, M.L. (2005). Enterococci in milk products. Master's degree, Massey University Palmerston North, New Zealand.
- Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215 – 222.
- Godič Torkar, K., & Golc Teger, S. (2004). The microbiological quality of some critical control points in the cheese production of individual slovenian cheese-makers. *Acta Agriculturae Slovenica*, 84, 43 – 61.
- Gomes, B.C., Esteves, C.T., Palazzo, I.C., Darini, A.L., Felis, G.E., Sechi, L.A., Franci, B.D.G.M., & De Martinis, E.C.P. (2008). Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiology*, 25, 668 – 675.
- Gómez, N.C., Ramiro, J.M.P., Quecan, B.X.V., & de Melo Franco, B.D.G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7, 863.
- González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J.M., Fresno, J.M., & Tornadijo, M.E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 118, 716 – 722.
- Gould, G.W. (1991). Antimicrobial compound. In: Goldberg, I., & Williams, R. (Eds.), *Biotechnology and Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 461 – 483.
- Gravesen, A., Diao, Z., Voss, J., Budde, B.B., & Knöchel, S. (2004). Differential inactivation of *Listeria monocytogenes* by d- and l-lactic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 39, 528 – 532.
- Gravesen, A., Lekkas, C., & Knöchel, S. (2005). Surface attachment of *Listeria monocytogenes* induced by sublethal concentrations of alcohol at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 5601 – 5603.
- Green, D.H., Wakeley, P.R., Page, A., Barnes, A., Baccigalupi, L., Ricca, E., & Cutting, S.M. (1999). Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4288 – 4291.
- Guerrero, L., Guardia, M.D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans, S., Sajdakowska, M., Sulmont-Rosse, C., Issanchou, S., Contel, M., Scalvedi, M.L., Granli, B.S., & Hersleth, M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52, 345 – 354.

- Guo, L., Li, T., Tang, Y., Yang, L., & Huo, G. (2016). Probiotic properties of *Enterococcus* strains isolated from traditional naturally fermented cream in China. *Microbial Biotechnology*, 9, 737 – 745.
- Hammes, W.P., & Hertel, C. (2003). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin et al. (Eds.), *The Prokaryotes*, 3rd edition. Springer- Verlag, New York.
- Hammes, W.P., & Tichaczek, P.S. (1994). The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *European Food Research and Technology*, 198, 193 – 201.
- Hammes, W.P., & Vogel, R.F. (1995). The Genus *Lactobacillus*. In: Wood, B.J.B., & Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2. Chapman and Hall, London, UK, pp. 19 – 54.
- Hardie, J.M., & Whiley, R.A. (1997). Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series*, 26, 1 – 11.
- Hassanzadazar, H., Ehsani, A., & Mardani, K. (2014). Antibacterial activity of *Enterococcus faecium* derived from Koopeh cheese against *Listeria monocytogenes* in probiotic ultra-filtrated cheese. *Veterinary Research Forum*, 5(3), 169 – 175.
- Heller, J.K. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2), 374 – 379.
- Heng, N.C.K., Wescombe, P.A., Burton, J.P., Jack, R.W., & Tagg, J.R. (2007). The diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. In: Riley, M.A., & Chavan, M. (Eds.), *Bacteriocins: ecology and evolution*. Springer. Berlin, pp, 45 – 92.
- Heredia-Castro, P.Y., Méndez-Romero, J.I., Hernández-Mendoza, A., Acedo-Félix, E., González-Córdova, A.F., & Vallejo-Cordoba, B. (2015). Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from artisanal Mexican cheese. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8285 – 8293.
- Hernandez, D., Cardell, E., & Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantacin TF 711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF 711. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 77 – 84.
- Hernandez-Hernandez, O., Muthaiyan, A., Moreno, F. J., Montilla, A., Sanz, M. L., & Ricke, S. C. (2012). Effect of prebiotic carbohydrates on the growth and tolerance of *Lactobacillus*. *Food Microbiology*, 30, 355 – 361.

- Herreros, M.A., Fresno, J.M., González Prieto, M.J., & Tornadijo, M.E. (2003). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *International Dairy Journal*, 13, 469 – 479.
- Holzapfel, W.H., Franc, C.M.A.P., Ludwig, W., Back, W., & Dicks, L.M.T. (2006). The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: Dvorkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., & Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 3th edition. New York, Springer, pp. 234.
- Horiuchi, H., & Sasaki, Y. (2012). Short communication: effect of oxygen on symbiosis between *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*, 95(6), 2904 – 2909.
- Hosseini, S.V., Arlindo, S., Bohme, K.C., Fernandez, N., Calo-Mata, P., & Barros-Velazquez, J. (2009) Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 1392 – 1403.
- Huang, Y., & Adams, M.C. (2004). *In vitro* assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 253 – 260.
- Huttunen, E., Noro, K., & Yang, Z.N. (1995). Purification and identification of antimicrobial substances produced by two *Lactobacillus casei* strains. *International Dairy Journal*, 5, 503 – 513.
- IDF. (2008). International IDF Standard 221: Cheese – Determination of Fat Content – Van Gulik Method. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
- Irlinger, F., & Mounier, J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 142 – 148.
- Isenberg, H.D. (1992). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. vol.1, part 2. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, pp. 1 – 18.
- ISO 6887-5. (2010). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
- Ivanov, I.T., Boytcheva, S., & Mihailova, G. (1999). Parallel study of thermal resistance and permeability barrier stability of *Enterococcus faecalis* as affected by salt composition, growth temperature and pre-incubation temperature. *Journal of Thermal Biology*, 24, 217 – 227.

- Jakovljević, V. (2014). Biohemijske karakteristike izabranih vrsta gljiva u funkciji biodegradacije deterdženata. Doktorska disertacija, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac
- James, M. (1992). Modern Food Microbiology, 4th edition, Van Nostrand Reinhold, New York
- Jamet, E., Akary, E., Poisson, M. A., Chamba, J.F., Bertrand, X., & Serror, P. (2012). Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. Food Microbiology, 31(2), 191 – 198.
- Janković, T., Frece, J., Abram, M., & Gobin, I. (2012). Aggregation ability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. International Journal of Sanitary Engineering Research, 6, 19 – 24.
- Janssen, P.H., Evers, S., Rainey, F.A., Weiss, N., Ludwig, W., Harfoot, C.G., & Schink, B. (1995). *Lactosphaera* gen. nov., a new genus of lactic acid bacteria, and transfer of *Ruminococcus pasteurii* Schink 1984 to *Lactosphaera pasteurii* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 45(3), 565 – 571. DOI: 10.1099/00207713-45-3-565
- Jay, J.M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. Applied and Environmental Microbiology, 44, 525 – 532.
- Jin, L., Tao, L., Pavlova, S.I., So, J.S., Kiwanuka, N., Namukwaya, Z., Saberhein, B.A., & Wawer, M. (2007). Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. Journal of Applied Microbiology, 102(4), 1107 – 1115.
- Joborn, A., Dorsch, M., Christer, O.J., Westerdahl, A., & Kjelleberg, S. (1999). *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). International Journal of Systematic Bacteriology, 49, 1891 – 1898.
- Johansson, D., & Rasmussen, M. (2013). Virulence factors in isolates of *Enterococcus faecalis* from infective endocarditis and from the normal flora. Microbial Pathogenesis, 55, 28 – 31.
- Juarez Tomás, M.S., Bru, E., Wiese, B., De Ruiz Holgado, A.A.P., & Nader-Macías, M.E. (2002). Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. Journal of Applied Microbiology, 93, 714 – 724.
- Kabara, J.J. (1993). Medium-chain fatty acids and esters. In: Davidson, P.M., & Brannen, A.L. (Eds.), Antimicrobials in Foods, 2nd edition. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 307 – 342.

- Kacmaz, B., & Aksoy, A. (2005). Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25, 535 – 538.
- Kaewnopparat, S., Dangmanee, N., Kaewnopparat, N., Srichana, T., Chulasiri, M., & Settharaksa, S. (2013). *In vitro* probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* SK5 isolated from vagina of a healthy woman. *Anaerobe*, 22, 6 – 13.
- Kaktcham, P.M., Zambou, N.F., Tchouanguep, F.M., El-Soda, M., & Choudhary, M.I. (2012). Antimicrobial and safety properties of lactobacilli isolated from two Cameroonian traditional fermented foods. *Sci-Pharm Journal*, 80(1), 189 – 203.
- Kandler, O., & Weiss, N. (1986). Genus *Lactobacillus*. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., & Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9th edition. Baltimore (MD): Williams & Wilkins, pp. 1063 – 1065.
- Kanurić, K. (2014). Promene komponentata i strukture mleka tokom fermentacije dodatkom nekonvencionalnog startera. Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
- Kavitha, J.R., & Devasena, T. (2013). Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Pharmaceutical and Biological Science*, 7, 1 – 7.
- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2007). Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4673 – 4676.
- Kim, W.S., Ren, J., & Dunn, N.W. (1999). Differentiation of *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* and subspecies *cremoris* strains by their adaptive response to stresses. *FEMS Microbiology Letters*, 171, 57 – 65.
- Kimoto-Nira, H., Kurisaki, J., Tsuji, T.M., Ohmomo, S., & Okamoto, T. (1999). Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 313 – 316.
- Kimoto-Nira, H., Mizumachi, K., Nomura, M., Kobayashi, M., Fujita, Y., Okamoto, T., Suzuki, I., Tsuji, N.M., Kurisaki, J., & Ohmomo, S. (2007). *Lactococcus* sp. as potential probiotic lactic acid bacteria. *Food Technology*, 41(3), 181 – 189.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 12, 39 – 85.
- Klapáčová, L., Greif, G., Greifová, M., Tomáška, M., Hanuš, O., & Dudriková, E. (2015). Antimicrobially active lactobacilli from goats' milk that do not produce biogenic amines *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(3), 270 – 274.

- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., & Zhou, M. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 13, 199 – 230.
- Kmet V., & Lucchini F. (1997). Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 19, 111 – 114.
- Kok, J. (1991). Genetics and molecular biology of *Streptococci*, *Lactococci*, and *Enterococci*. In: Dunny, B., Cleary, G.M., McKay, P., & Larry, L. (Eds.), *Special purpose vectors for Lactococci*. American Society for Microbiology, pp. 97.
- Kong, S., & Davison, A.J. (1980). The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 204, 1329.
- Kos, B., Šušković, J., Vuković, S., Šimpraga, M., Frece, J., & Matošić, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981 – 987.
- Kronvall, G., & Myhre, E.B. (1977). Differential staining of bacteria in clinical specimens using acridine orange buffered at low pH. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica - Section B, Microbiology*, 85, 249 – 254.
- Kubota, H., Senda, S., Tokuda, H., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2009). Stress resistance of biofilm and planktonic *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* JCM 1149. *Food Microbiology*, 26(6), 592 – 597.
- Kulwichit, W., Nilgate, S., Chatsuwat, T., Krajiw, S., Unhasuta, C., & Chongthaleong, A. (2007). Accuracies of *Leuconostoc* phenotypic identification: a comparison of API systems and conventional phenotypic assays. *BMC Infectious Diseases*, 7, 69.
- Kumar, A.M., & Murugalatha, N. (2012). Isolation of *Lactobacillus plantarum* from cow milk and screening for the presence of sugar alcohol producing gene. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 4, 16 – 22.
- Kunkee, R.E. (1973). Malo-Lactic fermentation and winemaking. In: Webb, A.D. (Eds.), *The chemistry of winemaking*, American Chemical Society. Washington DC.
- LeBlanc, J.G., Florian Chain, F., Martín, R., Bermúdez-Humarán, L.G., Courau, S., & Langella, P. (2017). Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microbial Cell Factories*, 16, 79 – 89.

- Lee, J.S., Lee, K.C., Ahn, J.S., Mheen, T.I., Pyun, Y.R., & Park, Y.H. (2002). *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1257 – 1261.
- Lee, Y.K., & Salminen, S. (2009). *Handbook of Probiotics and Prebiotics*. John Wiley & Sons, pp. 386.
- Lei, M., Dai, X., & Liu, M. (2014). Biological characteristics and safety examination of five enterococcal strains from probiotic products. *Journal of Food Safety*, 35, 324 – 335.
- Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider D., & Dalgaard P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 592 – 613.
- Leite, A.M.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Paschoalin, V.M.F., Mayo, B., & Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3622 – 3632.
- Lejková, J., Koreňová, J., Ženišová, K., Valík, L., & Kuchta, T. (2015). Isolation of autochthonous lactic acid bacteria from ewes' lump cheese, bryndza cheese and barrelled ewes' cheese, and their characterization using Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(4), 308 – 313.
- Leroy, F., Foulquie Moreno, M.R., & De Vuyst, L. (2003). *Enterococcus faecium* RZS C5, an interesting bacteriocin producer to be used as a co-culture in food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 235 – 240.
- Levkov, V., Srbinovska, S., & Gjorgovska, N. (2014). Microbiological and chemical characteristics of traditional ewe's milk cheese from Mariovo region. *Mljekarstvo*, 64(3), 195 – 206.
- Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *International Journal of Agricultural Policy and Research*, 3(2), 84 – 92.
- Lievin-Le Moal, V., Fayol-Messaudi, D., & Servin, A.L. (2013). Compound(s) secreted by *Lactobacillus casei* strain Shirota YIT 9029 irreversibly and reversibly impair the swimming motility of *Helicobacter pylori* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, respectively. *Microbiology*, 159(9), 1956 – 1971.
- Liu, L., Yang, H., Shin, H., Chen, R.R., Li, J., Du, G., & Chen, J. (2013). How to achieve high-level expression of microbial enzymes: strategies and perspectives. *Bioengineered*, 4(4), 212 – 223.

- Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., & Giraffa, G. (2004). Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian rawmilk cheeses. *International Dairy Journal*, 14, 967 – 976.
- Londoño-Zapata, A.F., Durango-Zuleta, M.M., Sepúlveda-Valencia, J.U., & Herrera, C.X. (2017). Characterization of lactic acid bacterial communities associated with a traditional Colombian cheese: Double cream cheese. *LWT – Food Science and Technology*, 82, 39 – 48.
- Macovei, L., Ghosh, A., Thomas, V.C., Hancock, L.E., Mahmood, S., & Zurek, L. (2009). *Enterococcus faecalis* with the gelatinase phenotype regulated by the *fsr* operon and with biofilm-forming capacity are common in the agricultural environment. *Environmental Microbiology*, 11(6), 1540 – 1547.
- Madigan, T.M., Martinko, M.J., Dunlap, V.P., & Clark, P.D. (2009). *Brock Biology of microorganizams*. 12th edition. Benjamin Cummings, San Francisco.
- Magdoub, M.N.I., Hassan, Z.M.R., Effat, B.A.M., Sadek, Z.I.M., Tawfik, N.F., & Mabrouk. A.M.M. (2015). Probiotic properties of some lactic acid bacteria isolated from Egyptian dairy products. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(12), 758 – 766.
- Makarova, K., Slesarev, A., Wolf, Y., Sorokin, A., Koonin, E., Pavlov, A., Pavlova, N., Karamychev, V., Polouchin, N., Shakhova, V., Grigoriev, I., Lou, Y., Rohksar, D., Lucas, S., Huang, K., Goodstein, D.M., Hawkins, T., Plengvidhya, V., Welker, D., Hughes, J., Goh, Y., Benson, A., Baldwin, K., Lee, J.H., Diaz-Muniz, I., Dosti, B., Smeianov, V., Wechter, W., Barabote, R., Lorca, G., Altermann, E., Barrangou, R., Ganesan, B., Xie, Y., Rawsthorne, H., Tamir, D., Parker, C., Breidt, F., Broadbent, J., Hutkins, R., O'Sullivan, D., Steele, J., Unlu, G., Saier, M., Klaenhammer, T., Richardson, P., Kozyavkin, S., Weimer, B., & Mills, D. (2006). Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103, 15611 – 15616.
- Makarova, K.S., & Koonin, E.V. (2007). Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *Journal of Bacteriology*, 189, 1199 – 1208.
- Mannu, L., Riu, G., Comunian, R., Frozzi, M.C., & Scintu, M.F. (2002). A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes, milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 12, 17 – 26.

- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., & Anifantakis, E.M. (2003). Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 82(2), 153 – 161.
- Maragkoudakis, P.A., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M.D., & Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 219 – 226.
- Marcelino Kongo, J. (2013). Lactic acid bacteria as starter-cultures for cheese processing: past, present and future developments. pp. 4. Available at: http://cdn.intechopen.com/pdfs/42344/InTech-Lactic_acid_bacteria_as_starter_cultures_for_cheese_processing_past_present_and_future_developments.pdf
- Masoud, W., Takamiya, M., Vogensen, F.K., Lillevang, S., Abu Al-Soud, W., Sorensen, S.J., & Jakobsen, M. (2011). Characterization of bacterial populations in Danish raw milk cheeses made with different starter cultures by denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *International Dairy Journal*, 21, 142 – 148.
- Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., & Drosinos, E.H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64(3), 265 – 271.
- Mc Millan, A., Dell, M., Zellar, M.P., Cribby, S., Martz, S., Hong, E., Fu, J., Abbas, A., Dang, T., Miller, W., & Reid, G. (2011). Disruption of urogenital biofilms by lactobacilli. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 86, 58 – 64.
- Medina, R.M., Gonzalez, K.S., & Oliver, G. (2001). Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from Northwest Argentina. *Journal of Food Protection*, 64(4), 559 – 563.
- Mendoza-Olazarán, S., Camacho-Ortiz, A., Martínez-Reséndez, M. F., 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.
- Menéndez, S., Centeno, J.A., Godínez, R., & Rodríguez-Otero, J.L. (2000). Effects of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzúa-Ulloa cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 59(1–2), 37 – 46.

- Menéndez, S., Godínez, R., Centeno, J.A., & Rodríguez-Otero, J.L. (2001). Microbiological, chemical and biochemical characteristics of Tetilla raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, 18(2), 151 – 158.
- Merćep, A., Kirin, S., Zdolec, N., Cvrtila Fleck, Ž., Filipović, I., Njari, B., Mitak, M., & Kozačinski, L. (2010). Quality of Trappist cheese. *Mljekarstvo*, 60(4), 288 – 298.
- Merzoug, M., Dalache, F., Zadi Karam, H., & Karam, N.E. (2016). Isolation and preliminary characterisation of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GHB21 isolated from Algerian paste of dates “ghars”. *Annals of Microbiology*, 66(2), 795 – 805.
- Mirkar, K., Rawat, A., & Satish, R. (2016). Effect of environmental factors on biofilm formation. *Indian Journal of Life Science*, 5(2), 53 – 64.
- 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 – 9.
- Mogensen, G., Salminen, S., & O'Brien, J. (2003). Food microorganisms-health benefits, safety evaluation and strains with documented history of use in foods. *Bulletin of International Dairy Federation*, 377, 4 – 9.
- Mojgani, N., & Amimia, C. (2007). Kinetics of growth and bacteriocin production in *L. casei* RN 78 isolated from dairy sample in IR Iran. *International Journal of Dairy Science*, 2(1), 1 – 12.
- Molimard, P., & Spinnler, H.E. (1996). Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169 – 184.
- Morelli, L. (2000). *In vitro* selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 1(2), 59 – 67.
- Mormile, A., Barile, M., Mercogliano, R., Johansson, P., Björkroth, K.J., Aponte, M., & Murru, N. (2016). Dynamics of lactic acid bacteria in “Pecorino di Tramonti”—a ewe’s milk cheese—with particular emphasis on enterococci: a preliminary study. *Annals of Microbiology*, 66, 179.
- Motahari, P., Mirdamadi, S., & Kianirad, M. (2017). Safety evaluation and antimicrobial properties of *Lactobacillus pentosus* 22C isolated from traditional yogurt. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11, 972.
- Mota-Meira, M., LaPointe, G., Lacroix, C., & Lavoie, M.C. (2000). MICs of mutacin B– Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 24 – 29.

- Mota-Meira, M., Morency, H., Lavoie, M.C. (2005). *In vivo* activity of mutacin B–Ny266. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 869 – 871.
- Mrkonjić Fuka, M., Maksimović, A.Z., Tanuwidjaja, I., Hulak, N., & Schlöter, M. (2017). Characterization of Enterococcal community isolated from an Artisan Istrian raw milk cheese: biotechnological and safety aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 55(3), 368 – 380.
- Mucchetti, G., Locci, F., Massara, P., Vitale, R., & Neviani, E. (2002). Production of pyroglutamic acid by thermophilic lactic acid bacteria in hard-cooked minicheeses. *Journal of Dairy Science* 85, 2489 – 2496.
- Mundt, J.O. (1986a). Lactic acid streptococci. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., & Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 1064 – 1071.
- Mundt, J.O., & Hammer, J.L. (1968). Lactobacilli on plants. *Applied Microbiology*, 16, 1326 – 1330.
- Mundt, J.O. (1986). Enterococci. In: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., & Holt, J.G. (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Williams, Wilkins and Baltimore, pp. 1063 – 1065.
- Muruzović, M., Mladenović, K., Žugić Petrović, T., & Čomić, 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*, 42(4), 1 – 9. DOI: 10.1111/jfpp.13577
- Muruzović, M., Mladenović, K., Đilas, M., Stefanović, O., & Čomić, 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*, 42(11), 1 – 10. DOI: 10.1111/jfpp.13776
- Muruzović, M., Mladenović, K., & Čomić, Lj. (2018c). *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
- Muruzović, M., Mladenović, K., Žugić Petrović, T., & Čomić, Lj. (2018d). *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

- Nami, Y., Abdullah, N., Haghshenas, B., Radiah, D., Rosli, R., & Khosroushahi, A.Y. (2014). Probiotic assessment of *Enterococcus durans* 6HL and *Lactococcus lactis* 2HL isolated from vaginal microflora. *Journal of Medical Microbiology*, 63, 1044 – 1051.
- NCCLS – National Commitette for Clinical Laboratory Standards, Document M100-S11. (2003). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Comitete for Clinical Laboratory Standard, Wayne, PA, USA.
- Necidová, L., Janštová, B., Karpíšková, S., Cupáková, Š., Dušková, M., & Karpíšková, R. (2009). Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. *Czech Journal of Food Science*, 27, 354 – 356.
- Nes, I.F., & Johnsborg, O. (2004). Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics. *Current Opinion in Biotechnology*, 15, 100 – 104.
- Novik, G., Astapovich, N., & Ryabaya, N. (2007). Production of hydrolases by lactic acid bacteria and bifidobacteria and their antibiotic resistance. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 43, 164 – 169.
- Nowak, A., Śliżewska, K., Błasiak, J., & Libudzisz, Z. (2014). The influence of *Lactobacillus casei* DN 114 001 on the activity of faecal enzymes and genotoxicity of faecal water in the presence of heterocyclic aromatic amines. *Anaerobe*, 30, 129 – 136.
- O’Sullivan, L., O’Connor, E.B., Ross, R.P., & Hill, C. (2006). Evaluation of live-culture producing lacticin 3147 as a treatment for the control of *Listeria monocytogenes* on the surface of smear-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 135 – 143.
- O’Toole, G., Kaplan, H.B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49 – 79.
- Obradović, B.D., Ristić, N.G., & Karić, A. (2002). Prehrambena industrija – Mleko i mlečni proizvodi, 13, 4 – 6.
- Ocaña, V., & Nader-Macías, M.E. (2002). Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregation ability. *British Journal of Biomedical Science*, 59, 183 – 190.
- Ognik, K., Krauze, M., Cholewińska, E., & Abramowicz, K. (2017). The effect of a probiotic containing *Enterococcus faecium* DSM 7134 on redox and biochemical parameters in chicken blood. *Annals of Animal Science*, 17, 1075 – 1088.
- Onifade, A.A. (1997). Growth performance, carcass characteristics, organ measurements and haematology of broiler chickens fed a high fibre diet supplemented with antibiotics or dried yeast. *Die Nahrung*, 41, 370 – 374.

- Ouwehand, A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2nd edition. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 139 – 159.
- Oxaran, V., Ledue-Clier, F., Dieye, Y., Herry, J.M., Péchoux, C., Meylheuc, T., Briandet, R., Juillard, V., & Piard, J.C. (2012). Pilus biogenesis in *Lactococcus lactis*: Molecular characterization and role in aggregation and biofilm formation. *PLoS One*, 7(12), 1 – 18.
- Özmen Toğay, S., Ay, M., Sandikçi Altunatmaz, S., Yilmaz Aksu, F., Erol Tinaztepe, Ö., İssa, G., & Büyükcinal, S.K. (2016). Antimicrobial activity potential of *Enterococcus* spp. isolated from some traditional Turkish cheeses. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 22(5), 765 – 770.
- Palomares, I.C., Morales, P.R., & Felix, A.E. (2007). Evaluation of probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 49(3–4), 46 – 54.
- Pan, D.D., Zeng, Y.Q., & Yan, T. (2011). Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(3), 512 – 518.
- Panda, S.H., & Ray R.C. (2016). Amylolytic lactic acid bacteria microbiology and technological interventions in food fermentations. In: Monted, D., & Ray R.C. (Eds.), *Fermented Foods: Part 1. Biochemistry & Biotechnology Edition*, CRC Press, Boca raton, USA, pp. 149 – 166.
- Parente, E., & Cogan, T.M. (2004). Starter cultures: general aspects. In: Fox, P.F., Mc Sweeney, P.L.H., Cogan, T.M., & Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Elsevier, London, England, pp. 123 – 148.
- Patel, A., Shah, N. & Prajapat, J.B. (2013). Biosynthesis of vitamins and enzymes in fermented foods by lactic acid bacteria and related genera - A promising approach. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 5(2), 85 – 91.
- Patel, A.R., Lindström, C., Patel, A., PrajapatI, J.B. & Olle, H. (2012). Probiotic properties of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria isolated from vegetables and traditional Indian fermented foods. *International Journal of Fermented Foods*, 1, 87 – 101.
- Patrovský, M., Kouřimská, L., Havlíková, Š., Marková, J., Pechar, R., & Vojtěch, R. (2016). Utilization of bacteriocin-producing bacteria in dairy products. *Mljekarstvo*, 66(3), 215 – 224.

- Pavli, P.G., Argyri, A.A., Papadopoulou, O.S., Nychas, G.E., Chorianopoulos, N.G., & Tassou, C.C. (2016). Probiotic potential of lactic acid bacteria from traditional fermented dairy and meat products: assessment by *in vitro* tests and molecular characterization. *Journal of Probiotics and Health*, 4(3), 157 – 165.
- Pérez-Ibarreche, M., Castellano, P., & Vignolo, G. (2014). Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Science*, 96, 295 – 303.
- Peterson, S.D., & Marshall, R.T. (1990). Nonstarter lactobacilli in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 73, 1395 – 1410.
- Piard, J.C., & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*, 71, 525 – 541.
- Pisano, M.B., Fadda, M.E., Melis, R., Ciusa, M.L., Viale, S., Deplano, M., & Cosentino, S. (2015). Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control*, 51, 1 – 8.
- Popović, N., Dinić, M., Tolinački, M., Mihajlović, S., Terzić-Vidojević, A., Bojić, S., Djokić, J., Golić, N., & Veljović, K. (2018). New insight into biofilm formation ability, the presence of virulence genes and probiotic potential of *Enterococcus* sp. dairy isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9, 78.
- Pranckutė, R., Kaunietis, A., Kuisienė, N., & Čitavičius, D. (2014). Development of synbiotics with inulin, palatinose, α -cyclodextrin and probiotic bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 63(1), 33 – 41.
- Prescott, L M., Harley, J.P., & Klein, D.A. (1996). *Microbiology*. 3th edition. Wm. C. Brown Publishers, London, pp. 685 – 688.
- Pringsulaka, O., Rueangyotchanthana, K., Suwannasai, N., Watanapokasin, N., Amnueysit, P., Sunthornthummas, S., Sukkhum, S., Sarawaneeyaruk, S., & Rangsiruji, A. (2015). *In vitro* screening of lactic acid bacteria for multi-strain probiotics. *Livestock Science*, 174, 66 – 73.
- 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*, 7, 483.

- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., & Cotter, P.D. (2012). High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. High-throughput sequencing for detection of subpopulations of bacteria not previously associated with artisanal cheeses. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5717 – 5723.
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., & Killer, J. (2008). Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in *in vitro* conditions. *Anaerobe*, 14, 205 – 208.
- Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, M., & Paunović, D. (2010). Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo*, 60(2), 86 – 93.
- Rafter, J., Bennett, M., Caderni, G., Clune, Y., Hughes, R., Karlsson, P.C., Klinder, A., O'Riordan, M., O'Sullivan, G.C., Pool-Zobel, B., Rechkemmer, G., Roller, M., Rowland, I., Salvadori, M., Thijs, H., Van Loo, J., Watzl, B., & Collins, J.K. (2007). Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, 85, 488 – 496.
- Ramos, C.L., Thorsen, L., Schwan, R.F., & Jespersen, L. (2013). Strain-specific probiotics properties of *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus brevis* isolates from Brazilian food products. *Food Microbiology*, 36, 22 – 29.
- Rao, M.S., Pintado, J., Stevens, W.F., & Guyot, J.P. (2004). Kinetic growth parameters of different amyolytic and non-amyolytic *Lactobacillus* strains under various salt and pH conditions. *Bioresource Technology*, 94(3), 331 – 337.
- Rickard, A.H., Gilbert, G., High, N.J., Kolenbrander, P.E., & Handley, P.S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*, 11(2), 94 – 100.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., & Rosenberg, E. (1980). Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9, 29 – 33.
- Rossi, E.A., Vendramine, R.C., Carlos, I.Z., Oliveira, M.G., & Valdez, G.F. (2003). Efeito de um novo produto fermentado de soja sobre lípides séricos de homens adultos normocolesterolêmicos. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 53, 47 – 55.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., & Matilla, S.T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84, 197 – 215.

- Sakala, R.M., Kato, Y., Hayashidani, H., Murakami, M., Kaneuchi, C., & Ogawa, M. (2002). *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 1151 – 1154.
- Šaková, N., Sádecká, J., Lejková, J., Puškárová, A., Korenová, J., Kolek, E., Valík, L., Kuchta, T., & Pangallo, D. (2015). Characterization of May bryndza cheese from various regions in Slovakia based on microbiological, molecular and principal volatile odorants examination. *Journal of Food and Nutrition Research*, 54(3), 239 – 251.
- Salas-Jara, M.J., Ilabaca, A., Vega, M., & García, A. (2016). Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 4(3), 35.
- Sanders, J. W., Venema, G., & Kok, J. (1999). Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 483 – 501.
- Sanz, B., Selgas, D., Parejo, I., & Ordóñez, J.A. (1988). Characteristics of lactobacilli isolated from dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 6, 199 – 205.
- Sarangi, N.R., Babu, L.K., Kumar, A., Pradhan, C.R., Pati, P.K., & Mishra, J.P. (2016). Effect of dietary supplementation of prebiotic, probiotic, and synbiotic on growth performance and carcass characteristics of broiler chickens, *Veterinary World*, 9, 313 – 319.
- Sarker, S.D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321 – 324.
- Scatassa, M.L., Gaglio, R., Cardamone, C., Macaluso, G., Arcuri, L., Todaro, M., & Mancuso, I. (2017). Anti-*Listeria* activity of lactic acid bacteria in two traditional Sicilian cheeses. *Italian Journal of Food Safety*, 6(1), 61 – 91.
- Scatassa, M.L., Gaglio, R., Macaluso, G., Francesca, N., Randazzo, W., Cardamone, C., Di Grigoli, A., Moschetti, G., & Settanni, L. (2015). Transfer, composition and technological characterization of the lactic acid bacterial populations of the wooden vats used to produce traditional stretched cheeses. *Food Microbiology*, 52, 31 – 41.
- Schachtsiek, M., Hammes, W.P., & Hertel C. (2004). Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 2001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7078 – 7085.
- Schleifer, K.H., Kraus, J., Dvorak, C., Kilpper-Balz, R., Collins, M.D., & Fischer, W. (1985). Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 6, 183 – 195.

- Sharpe, M.E. (1979). Identification of lactic acid bacteria. In: Skinner, F.A., & Lovelock, D.W. (Eds.), Identification methods for microbiologists. Academic Press, London, pp. 233 – 259.
- Shibata, K., Flores, D.M., Kobayashi, G., & Sonomoto, K. (2007). Direct l-lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium, *Enterococcus faecium*. Enzyme and Microbial Technology, 41(1–2), 149 – 155.
- Shin, M.S., Han, S.K., Ji, A.R., Kim K.S., & Lee, W.K. (2008). Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. Journal of Applied Microbiology, 105(6), 2203 – 2212.
- Shokryazdan, P., Sieo, C.C., Kalavathy, R., Liang, J.B., Alithee, N.B., Jahromi, M.F., & Ho, Y.W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. BioMed Research International, 2014, 1 – 16.
- Sieuwerts, S., Molenaar, D., Van Hijum, S.A.F.T., Beerthuyzen, M., Stevens, M.J.A., Janssen, P.W.M., Ingham, C.J., De Bok, F.A.M., De Vos, W.M., & Van Hylckama Vlieg, J.E.T. (2010). Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Applied and Environmental Microbiology, 76(23), 7775 – 7784.
- Silva, M.M., & Lidon, F. (2016). Food preservatives – An overview on applications and side effects. Emirates Journal of Food and Agriculture, 28(6), 366 – 373.
- Sitepu, G.R., Nursyirwani, Efriyeldi. (2016). Adhesion of lactic acid bacteria (LAB) to intestinal epithelial cells of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) in inhibiting *Vibrio alginolyticus*. Journal Online Mahasiswa, 3(2), 1 – 10.
- Sivieri, K., Spinardi-Barbisan, A.L.T., Barbisan, L.F., Bedani, R., Pauly, N.D., Carlos, I.Z., Benzatti, F.P., Vendramini, R.C., & Rossi, E.A. (2008). Probiotic *Enterococcus faecium* CRL 183 inhibit chemically induced colon cancer in male Wistar rats. European Food Research and Technology, 228(2), 231 – 237.
- Službeni glasnik RS, 32/83. Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i metodama hemijskih i fizičkih analiza mleka i proizvoda od mleka. Dostupno na: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/srb141816.pdf>
- Službeni glasnik RS, 33/2010. Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura. Dostupno na: <https://www.tehnologijahrane.com/pravilnik/pravilnik-o-kvalitetu-proizvoda-od-mleka-i-starter-kultura>
- Službeni glasnik RS, 73/2010. Pravilnik o uslovima higijene hrane. Dostupno na: <https://www.tehnologijahrane.com/pravilnik/pravilnik-o-uslovima-higijene-hrane>

- Smit, G., Smit, B.A., & Engels, W.M.J. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Review*, 29(3), 591 – 610.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., & Holt, J.G. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Solieri L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F., & Giudici, P. (2014). Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by *in vitro* screening and principal component analysis, *Food Microbiology*, 38, 240 – 249.
- Soliman, A.H.S., Sharoba, A.M., Bahlol, H.E.M., Soliman, A.S., & Radi, O.M.M. (2015). Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. *Middle East Journal of Applied Science*, 5(1), 10 – 18.
- Somers, E.B., Johnson, M.E., & Wong, A.C. (2001). Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *Journal of Dairy Science*, 84(9), 1926 – 1936.
- Stadnik, J., & Dolatowski, Z.J. (2010). Biogenic amines in meat and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 9, 251 – 263.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukic, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 115, 891 – 899.
- Strateva, T., Dimov, S.G., Atanasova, D., Petkova, V., Savov, E., & Mitov, I. (2016). Molecular genetics study of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy *Enterococcus* spp. isolates from Bulgaria. *Annals of Microbiology*, 66(1), 381.
- Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., & Matosić, S. (2001). Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 227 – 235.
- Suzzi, G., & Gardini, F. (2003). Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 41 – 54.
- Tagg, J.R., & Mc Given, A.R. (1976). Assay system for bacteriocins. *Applied Microbiology*, 21, 943.
- Teh, K.H., Lindsay, D., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., & Flint, S. (2014). Proteolysis in ultra-heat-treated skim milk after exposure to multispecies biofilms under conditions modelling a milk tanker. *International Journal of Dairy Technology*, 67, 176 – 181.

- Teixeira, L.M., Merquior, V.L.C., & Shewmaker, P.L. (2014). *Vagococcus*. In: Robinson, R., Batt, C., & Batt, A.C. (Eds), Encyclopedia of Food Microbiology, 2nd edition. Elsevier, pp. 673 – 679.
- Temmerman, R., Pot, B., Huys, G., & Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. International Journal of Food Microbiology, 81(1), 1 – 10.
- Terzić-Vidojević, A., Veljović, K., Tolinacki, M., Nikolić, M., Ostojić, M., & Topisirević, Lj. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlata cheese produced at two different geographical locations. Genetika, 41(1), 117 – 136.
- Terzić-Vidojević, A., Vukašinović, M., Veljović, K., Ostojić, M., & Topisirević, Lj. (2007). Characterization of microflora in homemade semi-hard white Zlata cheese. International Journal of Food Microbiology, 114, 36 – 42.
- Thayer, D.W., Muller, W.S., Buchanan, R.L., & Phillips, J.G. (1987). Effect of NaCl, pH, temperature and atmosphere on growth of *Salmonella typhimurium* in glucose-mineral salts medium. Applied and Environmental Microbiology, 53(6), 1311 – 1315.
- Todorov, S.D., & Franco, B.G.M. (2010). *Lactobacillus plantarum*: Characterization of species and application in food production. Food Reviews International, 26, 205 – 229.
- Todorov, S.D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L.A., & Ivanova, I.V. (2017). Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka.”. Brazilian Journal of Microbiology, 48(3), 576 – 586.
- Tolinački, M. (2012). Korelacija prisustva bakteriocinskih gena i proizvodnje bakteriocina prirodnih izolata *Lactobacillus casei/paracasei* grupe. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Beograd
- Topisirević, Lj., Kojić, M., Fira, Dj., Miladinov, N., Strahinić, I., & Spasojević, I. (2000). Savremeni Trendovi u Mlekarstvu (Zbonik Radova). Beograd, 115 – 120.
- Topisirević, Lj., Pušnja, J., Vukašinović, M., & Ostojić, M. (2001). Savremeni Trendovi u Mlekarstvu (Zbonik Radova). Vrnjačka Banja, 99 – 101.
- Tresse, O., Lebret, 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.

- Tulumoğlu, S., Kaya, H. I., & Şimşek, O. (2014). Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese. *Anaerobe*, 30, 120 – 125.
- Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., & Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96, 4252 – 4257.
- Turpin, W., Humblot, C., & Guyot, J.P. (2011). Genetic screening of functional properties of lactic acid bacteria in fermented pearl millet slurry and in the metagenome of fermented starchy foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), 8722 – 8734.
- Uroić, K., Nikolić, M., Koslć, B., Leboš, P., Beganović, J., Lukić, J., Jovčić, B., Filipić, B., Miljković, M., Golić, N., Topisirević, Lj., Čadež, N., Raspor, P., & Šušković, J. (2014). Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from Croatian fresh soft cheese and Serbian white pickled cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 52(2), 232 – 241.
- Van den Berghe, E., De Winter, T., & De Vuyst, L. (2006). Enterocin A production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 159 – 170.
- Vasiljević, T., & Shah, N.P. (2008). Probiotics-from metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18, 714 – 728.
- Vasquez, A., Jakobsson, T., Ahrne, S., Forsum, U., & Molin, G. (2002). Vaginal lactobacillus flora of healthy Swedish women. *Journal of Clinical Microbiology*, 40, 2746 – 2749.
- Velly, H., Fonseca, F., Passot, S., Delacroix-Buchet, A., & Bouix, M. (2014). Cell growth and resistance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TOMSC161 following freezing, drying and freeze-dried storage are differentially affected by fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 729 – 740.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., & Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2), 377 – 410.
- Vesković Moračanin, S., Djukić, D., Zdolec, N., Milijašević, M., & Mašković, P. (2017). Antimicrobial resistance of lactic acid bacteria in fermented food. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 18, 25 – 35.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., & Reinheimer, J. (2008). Usefulness of a set of simple *in vitro* tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 1678 – 1688.

- Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu (2011). Republika Srbija, Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede. Dostupno na: http://www.vet.minpolj.gov.rs/veterinarsko_javno_zdravstvo/instrukcije_i_vodici/Vodic%20za%20mikrobioloske%20kriterijume%20za%20hranu.pdf
- Vries, M.C., Vaughan, E.E., Kleerebezem, M., & Vos, W.M. (2006). *Lactobacillus plantarum* - Survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *International Dairy Journal*, 16, 1018 – 1028.
- Wang, P., Wu, Z., Wu, J., Pan, D., Zen, X., & Cheng. (2016). Effects of salt stress on carbohydrate metabolism of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Current Microbiology*, DOI: 10.1007/s00284-016-1087-8
- Ward, G.E., & Schultz, L.H. (1974). Incidence and control of mastitis during the dry period. *Journal of Dairy Science* 57, 1341.
- Wijesundera, C., Roberts, M., & Limsowtin, G.K.Y. (1997). Flavour development in aseptic cheese curd slurries prepared with single-strain starter bacteria in the presence and absence of adjuncts. *Lait*, 77, 121 – 131.
- Wilesmith, J.W., Francis, P.G., & Wilson, C.S. (1986). Incidence of clinical mastitis in a cohort of British dairy herds. *Veterinary Record*, 118, 199 – 204.
- Winkelströter, L.K., Reis, F.B., Silva, E.P., Alves, V., & De Martins, E.C.P. (2013). Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microbial Ecology*, 68, 35 – 46.
- Wirawan, R.E., Swanson, K.M., Kleffmann, T., Ralph, J.W., & Tagg, J.R. (2007). Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology*, 153, 1619 – 1630.
- Wu, C.H., Hsueh, Y.H., Kuo, J.M., & Liu, S.J. (2018). Characterization of a potential probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and efficient production of γ -aminobutyric acid in batch fermentation. *International Journal of Molecular Science*, 19(1), 143.
- Younes, J.A., van der Mei, H.C., van den Heuvel, E., Busscher, H.J., & Reid, G. (2012). Adhesion forces and coaggregation between vaginal staphylococci and lactobacilli. *PLoS One*, 7(5), 1 – 8.
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., & Giraffa, G. (2011). Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiology*, 28, 1033 – 1040.
- Zhang, Z.Y., Jin, B., & Kelly, J.M. (2007). Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochemical Engineering Journal*, 35, 251 – 263.

- Zheng, W., Zhang, Y., Hui-Min, L., Dan-Ting, L., Zhang, Z.L., Tang, Z.X., & Shi, L.E. (2015). Antimicrobial activity and safety evaluation of *Enterococcus faecium* KQ 2.6 isolated from peacock feces. BMC Biotechnology, 15, 30.
- Zhou, M., Theunissen, D., Wels, M., & Siezen, R. (2010). LAB-secretome: a genome scale comparative analysis of the predicted extracellular and surface associated proteins of lactic acid bacteria. BMC Genomics, 2010, 13.
- Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R., & Forney, L.J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. Microbiology, 150, 2565 – 2573.
- Živković, M., Miljković, M. S., Ruas-Madiedo, P., Markelić, M. B., Veljović, K., Tolinački, M., Soković, S., Korać, A., & Golić, N. (2016). EPS-SJ exopolisaccharide produced by the strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8 is involved in adhesion to epithelial intestinal cells and decrease on *E. coli* association to Caco-2 cells. Frontiers in Microbiology, 7, 286.
- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., & Tsakalidou, E. (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential *in vitro* and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models. International Journal of Food Microbiology, 121, 18 – 26.

Интернет странице:

<http://www.pttimenik.com/prehrambeni-proizvodi-i-repromaterijal-za-prehrambenu-industriju-zdrava-hrana/stalac/rekorderka>

<http://www.sirela.co.rs/>

<http://svet-biologije.com/wp-content/uploads/2013/12/hemoliza-800x600.jpg>

10. ПРИЛОЗИ

Резултати истраживања спроведених у оквиру ове докторске дисертације објављени су у следећим радовима:

Рад у врхунском међународном часопису (категорија M21)

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

Рад у истакнутом међународном часопису (категорија M22)

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

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

Рад у међународном часопису (категорија M23)

Muruzović M, Mladenović K, Žugić 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

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

Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (категорија М64)

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

Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian Cheese and evaluation of their antagonistic potential against Enterobacteriaceae

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

¹Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Radoja Domanović 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

²College of Agriculture and Food Technology, Ćirila and Metodija 1, 18000 Prokuplje, Serbia

Correspondence

Mirjana Ž. Muruzović, Faculty of Sciences, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Radoja Domanović 12, Kragujevac 34000, Republic of Serbia.
Email: mirkagrujovic@gmail.com

Funding information

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

Abstract

In this article, the presence and physiological characteristics of lactic acid bacteria (LAB) isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia were examined. Three samples, from different households, were obtained in spring. The screening of antagonistic potentials, using agar-well diffusion method, was evaluated. Briefly, three different genera of LAB (*Enterococcus* [32%], *Lactococcus* [53%], and *Lactobacillus* [15%]) were identified. The members of the genus *Enterococcus* were *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. The member of genus *Lactococcus* was *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. The members of genus *Lactobacillus* were *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. The antagonism of LAB on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella oxytoca* KGPMF1, *Klebsiella omithinolytica* KGPMF8, and *Aeromonas hydrophila* was examined. All tested isolates inhibited the growth of at least one indicator strain with growth inhibition zone from 10 to 21 mm. Results indicated that LAB demonstrated the potential of food biopreservation.

Practical applications

Traditionally made cheeses represent excellent source of unexplored microflora, especially of autochthonous lactic acid bacteria (LAB). In cheese from Sokobanja, the isolated LAB genera were *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., and *Enterococcus* sp. Also, the physiological activity of LAB, as well as their interaction with enterobacteria, which also was isolated from the mentioned cheese, was investigated. The results of this study demonstrated potential of LAB to interact agonistically with the growth of enterobacteria, which was important due to the well-known fact that enterobacteria could affect the organoleptic properties of cheese. LAB showed potential of food biopreservation. Further investigation should include antagonistic potential related to food-borne bacteria and the mechanisms of action.

1 | INTRODUCTION

There are many specific geographical areas in Serbia, which are known for their traditional way of producing dairy products. Some traditional Serbian cheeses are manufactured in countryside households using raw, unpasteurized milk from domestic animals. In Southeastern region of Serbia, inhabitants produce one type of autochthonous cheese, called Sokobanja cheese using raw, unpasteurized cow's milk without adding the bacterial starter culture. Therefore, lactic acid bacteria (LAB)

from this cheese (native microflora) mediate fermentation processes and could be used to inhibit pathogenic or spoilage microorganisms (Heredia-Castro et al., 2015).

A large number of researches indicated that dominant LAB genera in the traditional, home-made cheese, which were responsible for acidification processes, were *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Enterococcus* (Abdullah & Osman, 2010; Londoño-Zapata, Durango-Zuleta, Sepúlveda-Valencia, & Herrera, 2017; Terzić-Vidojević, Vukasinovic, Veljovic, Ostojic, & Topisirovic, 2007; Terzić-Vidojević et al., 2009).

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

Mirjana Ž. Muruzović¹  | Katarina G. Mladenović¹  | Milan D. Djilas² |
Olgica D. Stefanović¹ | Ljiljana R. Čomić¹

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

²Institute for Public Health of Vojvodina, Novi Sad, Serbia

Correspondence

Mirjana Ž. Muruzović, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, University of Kragujevac, Radoja Domanović 12, Kragujevac, 34000, Serbia.
Email: mirkagrujovic@gmail.com

Funding information

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

Abstract

The presence, biochemical and physiological characteristics of *Lactobacillus* and *Lactococcus* species isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia (Sokobanja), was investigated. The screening of their antimicrobial potentials, using agar-well diffusion method, and the ability of biofilm formation, using crystal violet method, was evaluated. The cheese samples, from different households, were obtained during the summer and the autumn. Chemical characteristics of cheese samples were examined. The members of genus *Lactobacillus* were: *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*, and *Lb. plantarum*. The members of genus *Lactococcus* were: *Lc. lactis* subsp. *lactis* and *Lc. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. The antagonism of *Lactobacillus* and *Lactococcus* isolates on the growth of some Gram-negative bacteria, isolated from the same cheese, was examined. The zones of growth inhibition ranged from 10 to 26 mm. The ability of biofilm formation of isolates was strains-specific. *Lactobacillus* (KGPMF 28, KGPMF 29, KGPMF 35) and *Lactococcus* (KGPMF 23 and KGPMF 26) isolates demonstrated the potential for further investigation in natural preservation of food.

Practical applications

Lactic acid bacteria, which can be found in traditional dairy products, presents unique and autochthonous microflora responsible for fermentation and quality of dairy products. These bacteria often have a great potential in natural food preservation, but their number and diversity are depending of season, vegetation, and the nutrition of animals. In this paper, the seasonal differences in bacterial community (especially community of lactobacilli and lactococci) between cheese samples, were investigated. In addition, the antagonism against some enterobacteria, which can affect the hygienic safety of cheese, was screened. Also, it was showed that some isolates had the ability of biofilm formation. Further investigation need to include the potential of isolates to be uses like probiotic or starter cultures.



In vitro evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia

Mirjana Ž. Muruzović*, Katarina G. Mladenović, Ljiljana R. Čomić

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

ARTICLE INFO

Keywords:

Biofilm
Cheese
Environmental factors
Lactic acid bacteria
Planktonic growth

ABSTRACT

In this study, the effects of different temperature, pH, different concentrations of salt, glucose and lactose, on the planktonic growth, biofilm formation and formed biofilm of *Enterococcus hirae* KGPMF9, *Streptococcus uberis* KGPMF2, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KGPMF23 and *Lactobacillus fermentum* KGPMF29 was investigated. These lactic acid bacteria were previously isolated from traditionally made cheese from Southeastern Serbia. Evaluation of the effect of different environmental conditions on the planktonic growth, biofilm formation and formed biofilm were determined by spectrophotometric method. The limiting factor for the planktonic growth of tested bacteria was the salt concentration above 6.5%, while temperature of 4 °C was limiting factor for planktonic growth and biofilm formation. Temperature of 37 °C as well as various concentrations of glucose and lactose, stimulated planktonic growth and biofilm formation of all tested bacteria, except *E. hirae* KGPMF9. *S. uberis* KGPMF2 showed no ability of biofilm formation. Tested bacteria showed better planktonic growth and ability of biofilm formation in acidic media. Basic media was limiting factor for biofilm formation. These results provide a basis for further research of influence of more environmental conditions on the development of lactic acid bacteria and their use like probiotics or starter cultures.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are widely used in food fermentation and it plays an important role in the development of the organoleptique and hygienic quality of fermented products. But, in the fermentation process, they need to survive in variable environmental conditions including differences in temperature, different type of sugar, pH and salinity (Rao, Pintado, Stevens, & Guyot, 2004). Also, these environmental conditions play significant role in adhesion and biofilm formation of bacteria (Mirkar, Rawat, & Satish, 2016). Gravesen, Lekkas, and Knochel (2005) suggested that the biofilm formation is bacterial stress response on environmental conditions. Abdallah, Benoliel, Drider, Dhulster, and Chihib (2014) also has suggested that environmental conditions, which can be met in food and medical area, also enhance the biofilm formation. Van de Guchte, Serror, Chervaux, Smokvina, and Ehrlichet (2002) indicated that LAB evolved defense mechanisms against stress that allow them to survive in harsh conditions and sudden environmental changes.

According to the International Union of Pure and Applied Chemistry, biofilm is an “aggregate of microorganisms in which cells

that are frequently embedded within a self-produced matrix of extra-cellular polymeric substance (EPS) adhere to each other and/or to a surface” (Vert et al., 2012). It is well-known that bacteria from milk have the ability to form multispecies biofilms (Teh et al., 2014). Some studies have reported the ability of LAB isolated from cheese to form biofilm (Gómez, Ramiro, Quecan, & de Melo Franco, 2016; Somers, Johnson, & Wong, 2001). Winkelströter, Reis, Silva, Alves, and De Martins (2013) indicated that biofilms formed by LAB present in foods may offer a promising means to counteract the establishment of pathogenic biofilms. Crowley, Leigh, Ward, Lappin-Scott, and Bowler (2011) has concluded that biofilm formation of *S. uberis* is correlated with an up regulation of several gene products, which are important for pathogenesis. Macovei et al. (2009) indicated that *E. hirae* produce an unknown weak protease that does not contribute to biofilm formation. Lactobacilli that showed the ability of biofilm formation were able to control development of *Listeria monocytogenes* on abiotic surfaces (Pérez-Ibarreche, Castellano, & Vignolo, 2014). Salas-Jara, Ilabaca, Vega, and García (2016) investigated and verified the beneficial effect of *Lactobacillus fermentum* in biofilm form, including increased resistance to temperature and gastric pH. Kubota, Senda, Tokuda,

* Corresponding author.

E-mail address: mirkagrujovic@gmail.com (M.Ž. Muruzović).

***In vitro* evaluation of the antimicrobial potential of *Streptococcus uberis* isolated from a local cheese from Southeastern Serbia**

Mirjana Ž. Muruzović^{1*}, Katarina G. Mladenović¹, Tanja D. Žugić-Petrović², and Ljiljana R. Čomić¹

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

²College of Agriculture and Food Technology, Prokuplje, Serbia

MURUZOVIĆ, M. Ž., K. G. MLADENOVIĆ, T. D. ŽUGIĆ-PETROVIĆ, LJ. R. ČOMIĆ: *In vitro* evaluation of the antimicrobial potential of *Streptococcus uberis* isolated from a local cheese from Southeastern Serbia. Vet. arhiv 88, 521-534, 2018.

ABSTRACT

Streptococcus uberis is an environmental bacterium responsible for bovine mastitis. It is occasionally described as a human pathogen. In our study, the isolation was undertaken of lactic acid bacteria from a local cheese from Southeastern Serbia, produced in a traditional way. *S. uberis* (7 isolates) and *S. agalactiae* (1 isolate) were isolated from the cheese samples taken in the summer. The biochemical and physiological characteristics of the isolates were examined. Using tetracycline, chloramphenicol, novobiocin and rifampicin, the antibiotic susceptibility of the isolates was evaluated. The results demonstrated that all the isolates were susceptible to all the tested antibiotics, with a growth inhibition zone from 36-48 mm. Also, the antagonism was examined of *S. uberis* KGPMF1-7 and *S. agalactiae* KFPMPF8 isolates on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Klebsiella oxytoca* KGPMF1, *Klebsiella ornithinolytica* KGPMF8 and *Aeromonas hydrophila*, as indicator stains. The results were compared with the activities of chloramphenicol, streptomycin and tetracycline on the tested indicator stains. The strongest antagonism was demonstrated by all *Streptococcus* isolates on the growth of *K. oxytoca* KGPMF1 (growth inhibition zone from 12-20 mm) and the *A. hydrophila* (growth inhibition zone from 13-20 mm). When these results were compared with the results of the sensitivity of tested indicator stains to antibiotics, *S. uberis* KGPMF1-7 and *S. agalactiae* KGPMF8 isolates showed a moderate antagonistic effect. Due to the specific way cheese is made in from Sokobanja, these isolates probably originate from cows' udders.

Key words: *Streptococcus uberis*; *Streptococcus agalactiae*; cheese; antagonism; sensitivity to antibiotics

*Corresponding author:

Muruzović Mirjana, University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanović 12, 34000 Kragujevac, Serbia, Phone: +381 69 57 01 555; E-mail: mirkagrujovic@gmail.com

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project name: **Kragujevac II 11-05-2018**
 Project Description:
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2018-05-11T17:07:30:780
 Project Analyte Count: 4
 Project Type: Development
 Validation: not present
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (+++) A	KGPMF 28	Lactobacillus fermentum	<u>2.361</u>	Lactobacillus fermentum	<u>2.176</u>
<u>A2</u> (++) A	KGPMF 29	Lactobacillus fermentum	<u>2.263</u>	Lactobacillus fermentum	<u>2.22</u>
<u>A3</u> (++) A	KGPMF 35	Lactobacillus brevis	<u>2.297</u>	Lactobacillus brevis	<u>2.158</u>
<u>A4</u> (++) A	KGPMF 62	Lactobacillus plantarum	<u>2.205</u>	Lactobacillus plantarum	<u>2.15</u>

Matching Hints

Matched Pattern	Comment
-----------------	---------

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.169	Not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A-C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte1

Analyte Name: A1
Analyte Description:
Analyte ID: KGPMF 28
Analyte Creation Date/Time: 2018-05-11T17:07:51:283
Applied MSP Library(ies):
Applied Taxonomy Tree: Bruker Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (+++)	Lactobacillus fermentum 21_PG_1 ZZMK	2.361	1613
2 (++)	Lactobacillus fermentum DSM 20391 DSM	2.176	1613
3 (++)	Lactobacillus fermentum 20_PG2_BHI ZZMK	2.144	1613
4 (++)	Lactobacillus fermentum DSM 20055 DSM	2.062	1613
5 (+)	Lactobacillus fermentum CIP102006 CIP	1.998	1613
6 (+)	Lactobacillus fermentum DSM 20049 DSM	1.948	1613
7 (-)	Lactobacillus curvatus DSM 20495 DSM	1.428	28038
8 (-)	Lactobacillus suebicus DSM 2008 DSM	1.384	152335
9 (-)	Thauera mechernichensis TI1 MPB	1.352	82788
10 (-)	Photobacterium iliopiscarium DSM 9896T HAM	1.328	56192

Analyte2

Analyte Name: A2
Analyte Description:
Analyte ID: KGPMF 29
Analyte Creation Date/Time: 2018-05-11T17:07:51:303
Applied MSP Library(ies):
Applied Taxonomy Tree: Bruker Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Lactobacillus fermentum DSM 20391 DSM	2.263	1613
2 (++)	Lactobacillus fermentum 21_PG_1 ZZMK	2.22	1613
3 (++)	Lactobacillus fermentum DSM 20055 DSM	2.206	1613
4 (++)	Lactobacillus fermentum 20_PG2_BHI ZZMK	2.148	1613
5 (+)	Lactobacillus fermentum DSM 20055 DSM	2.097	1613
6 (+)	Lactobacillus fermentum CIP 102006 CIP	2.016	1613
7 (+)	Lactobacillus curvatus DSM 20495 DSM	1.722	28038
8 (-)	Lactobacillus parabuchneri DSM 5708 DSM	1.47	152331
9 (-)	Lactobacillus sakei ssp carnosus DSM 15740 DSM	1.237	214325
10 (-)	Lactobacillus sakei ssp carnosus DSM 15740 DSM	1.2	214325

Analyte3

Analyte Name: A3
Analyte Description:
Analyte ID: KGPMF 35
Analyte Creation Date/Time: 2018-05-11T17:07:51:278
Applied MSP Library(ies):
Applied Taxonomy Tree: Bruker Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Lactobacillus brevis ATCC 14869 CHB	2.297	1580
2 (++)	Lactobacillus brevis CIP 102806 CIP	2.158	1580
3 (++)	Lactobacillus brevis DSM 20054 DSM	2.106	1580
4 (++)	Lactobacillus brevis JCM 1059	2.056	1580
5 (+)	Lactobacillus brevis LMG 6906 LMG	1.938	1580
6 (+)	Lactobacillus brevis LMG 7944 LMG	1.821	1580
7 (+)	Lactobacillus brevis CCUG 14869 CCUG	1.749	1580
8 (-)	Lactobacillus diolivorans DSM 14421T DSM	1.284	179838
9 (-)	Lactobacillus parabuchneri DSM 5706 DSM	1.256	152331
10 (-)	Lactobacillus acidipiscis DSM 15353 DSM	1.238	809059

Analyte4

Analyte Name: A4
Analyte Description:
Analyte ID: KGPMF 62
Analyte Creation Date/Time: 2018-05-11T17:07:51:312
Applied MSP Library(ies):
Applied Taxonomy Tree: Bruker Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	2.205	<u>1590</u>
2 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	2.15	<u>1590</u>
3 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	2.142	<u>1590</u>
4 (++)	Lactobacillus plantarum DSM 13275 DSM	2.086	<u>1590</u>
5 (+)	Lactobacillus paraplantarum DSM 10641 DSM	1.998	<u>60520</u>
6 (+)	Lactobacillus plantarum ssp plantarum DSM 20174T DSM	1.902	<u>337330</u>
7 (+)	Lactobacillus parabuchneri DSM 5706 DSM	1.701	<u>152331</u>
8 (-)	Lactobacillus curvatus DSM 20495 DSM	1.601	<u>28038</u>
9 (-)	Lactobacillus sakei ssp carnosus DSM 15740 DSM	1.59	<u>214325</u>
10 (-)	Lactobacillus brevis DSM 20054 DSM	1.574	<u>1580</u>

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Project Info:

Project name: **Kragujevac II 28-03-2018**
 Project Description:
 Project Owner: Admin@FLEX-PC
 Project Creation Date/Time: 2018-03-28T12:43:26:138
 Project Analyte Count: 12
 Project Type: Development
 Validation: not present
 Validation Position:

Result Overview

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<u>A1</u> (++) A	KGPMF 10	Enterococcus durans	<u>2.161</u>	Enterococcus durans	<u>2.098</u>
<u>A2</u> (++) A	KGPMF 9	Enterococcus hirae	<u>2.183</u>	Enterococcus hirae	<u>2.172</u>
<u>A3</u> (++) A	KGPMF 14	Enterococcus faecium	<u>2.391</u>	Enterococcus faecium	<u>2.291</u>
<u>A4</u> (++) A	KGPMF 47	Enterococcus faecalis	<u>2.292</u>	Enterococcus faecalis	<u>2.256</u>



БИОГРАФИЈА СА БИБЛИОГРАФИЈОМ

Мирјана Ж. Грујовић је рођена 18. 01. 1990. године у Крагујевцу. Основну школу „Рада Шубакић“ завршила је 2005. године у Гружи као носилац Вукове дипломе и ђак генерације. Средњу медицинску школу са домом ученика „Сестре Нинковић“ завршила је у Крагујевцу, 2009. године.

Дипломске академске студије Биологије уписала је на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу 2009. године, а дипломирала 2012. године, чиме је стекла звање дипломирани биолог постигавши просечну оцену током студија 9,10. Кандидат исте године уписује мастер академске студије на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу, и стиче звање дипломирани биолог-мастер еколог постигавши просечну оцену 9,74.

Докторске академске студије биологије уписала је 2014. године на Природно-математичком факултету, Универзитета у Крагујевцу и положила све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 9,83. Добитник је награде Проф. др Радослав В. Жикић, 2015. године. 2016. године, кандидат је постао стипендиста-докторанд Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије.

На Двадесет четвртој седници Већа за природно-математичке науке, Универзитета у Крагујевцу, одржаној 13.12.2017. године, донета је одлука (бр. IV-01-1124/8) о прихватању теме Докторске дисертације под називом **„Физиолошка карактеризација бактерија млечне киселине изолованих из аутохтоног сира југоисточне Србије и евалуација њихових биотичких потенцијала“**, кандидаткиње **Мирјане Ж. Грујовић**. У звање истраживач-сарадник за ужу научну област Биологија у Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу је изабрана 31.01.2018. године (одлука Наставно-Научног већа Факултета бр. 70/ VIII-4). Запослена је на пројекту ИИИИ 41010 „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци“ – руководилац доц. др Снежана Марковић.

НАУЧНО-ИСТРАЖИВАЧКИ РАД

Мирјана Ж. Грујовић се од 2014. године, у Лабораторији за микробиологију, Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу, успешно бави научно-истраживачким радом, где је овладава техникама и методама микробиолошких истраживања. У току свог научно-истраживачког рада стекла је знања у области биохемијских и физиолошких карактеристика бактерија млечне киселине изолованих из аутохтоног сира из околине Сокобање, као и *in vitro* испитивању биотичких потенцијала изолованих бактерија. Истраживања су проширена и на *in vitro* испитивање пробитоских карактеристика одабраних сојева.

Резултати научно-истраживачког рада **Мирјане Грујовић** публиковани су у виду 35 библиографских јединица: 13 радова у научним часописима са SCI листе (M21a – 1 рад; M21 – 1 рад; M22 – 4 рада; M23 – 7 радова), 3 рада у врхунском часопису националног значаја (M51 – 3), 2 рада у националном научном часопису (M52 – 2), 4 саопштења на међународним скуповима штампана у целини (M33 – 4), 6 саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34 – 6) и 7 саопштења са скупова националног значаја штампаних у изводу (M64 – 7).

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

1.1. **Muruzovic 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

ИФ₂₀₁₈: 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. **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

3.2. **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

3.3. 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

3.4. 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

4. Рад у међународном часопису (категорија M23)

4.1. **Muruzović M**, Mladenović K, Žugić 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

4.2. 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

4.3. 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): 171 – 180. DOI: 10.1556/066.2018.47.2.5

ISSN: 0139-3006

ИФ₂₀₁₈: 0,547

4.4. 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

4.5. 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. 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*, 24(3): 400 – 406. DOI: 10.26327/RBL2017.132

ISSN: 1224-5984

ИФ₂₀₁₈: 0,590

4.7. **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. 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

5.2. 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/kgjsoci1840205m; ISSN: 1450-9636

5.3. **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. DOI: 10.5937/KgJSci1941097G; ISSN: 1450-9636

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-Sjеничка овчја 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. Саопштење са међународног скупа штампано у целини (**категорија M33**)

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 packagink conditions on shelf–life of ham. XXII International Eco – conference, x Eco – conference on Safe food, Novi Sad, Sebia p. 181 – 188.

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

ISBN: 978-86-87611-48-1

8. Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (категорија М34)

- 8.1. **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 extract. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia. Book of abstracts, p. 117. ISBN: 978-86-6275-055-61
- 8.2. Mladenović K, **Muruzović M**, Stefanović O, Čomić Lj, Žugić-Petrović T. 2016 *In vitro* determination of antioxdant 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
- 8.3. 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, Mladenovic K, **Muruzović M**, Čomić Lj. 2017. Probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from Sokobanja sausage. International symposium on 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 MJ, 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. 55. ISBN: 978-86-7946-194-0

9. Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (категорија М64)

- 9.1. 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

- 9.2. 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
- 9.3. 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
- 9.4. 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, Мирјана Ж. Грујовић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

„Физиолошка карактеризација бактерија млечне киселине изолованих из аутохтоног сира југоисточне Србије и евалуација њихових биотичких потенцијала“

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, 23.8.2019. године,

M. Grujovic

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Мирјана Ж. Грујовић,



дозвољавам



не дозвољавам

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

„Физиолошка карактеризација бактерија млечне киселине изолованих из аутохтоног сира југоисточне србије и евалуација њихових биотичких потенцијала“

која је одбрањена на Природно-математчком 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 _____, 23.8.2019. године,



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/>