

KARAKTERISTIKE IZOLATA *PSEUDOMONAS* SPP. IZ SIROVOG MLEKA

Biljana Delić Vujanović¹, Ljiljana Tanasić¹, Radoslava Savić Radovanović²

¹Akademija strukovnih studija Šabac, Jedinica za poljoprivredne i poslovne studije i turizam, Dobropoljska 5, 15 000 Šabac, Srbija, biljana_delic@hotmail.com

²Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet, Bulevar oslobođenja 18, 11 000 Beograd, Srbija

SAŽETAK

Rod *Pseudomonas* je heterogena i ekološki značajna grupa mikroorganizama, široko rasprostranjena u spoljnoj sredini, vodi, a mogu dospeti u sirovo mleko. Svrstavaju se u oportune patogene mikroorganizme za ljude, životinje i biljke. Cilj ovog rada je bio da se ispita proteolitička, lipolitička aktivnost i stvaranje biofilma kod izolata poreklom iz mleka. Materijal su predstavljali zbirni uzorci sirovog mleka iz kojih su izolovani izolati *Pseudomonas* vrsta (n=60). Proteolitička sposobnost je ispitana na hranljivom agaru sa kazeinom i lipolitička sposobnost na Tributirin agaru. Sposobnosti izolata *Pseudomonas* vrsta da stvaraju biofilm je ispitano in vitro metodom Crystal Violet (CV) na mikrotitar pločama. Kod svih 60 izolata *Pseudomonas* spp. iz mleka dokazana je proteolitička i lipolitička aktivnost. Izolati *Pseudomonas* spp. poreklom iz mleka su stvarali biofilm. Od 60 izolata 54 (90%) su stvarali biofilm različitog intenziteta, dok 6 (10%) izolata nije uopšte stvaralo biofilm. Najveći broj, 42 (70%) izolata *Pseudomonas* spp. se može svrstati u osrednje-adherentne izolate, 10 (16,67%) izolata kao slabo-adherentni i samo 2 (3,33%) izolata kao jako-adherentni izolati. Izolati *Pseudomonas* spp. iz mleka su dobri producenti biofilma, proteoliti i lipoliti tako da mogu da izazovu kvar, a njihov nalaz je posledica kontaminacije i loših uslova higijene tokom procesa dobijanja mleka.

Ključne reči: biofilm, *Pseudomonas* spp., mleko.

UVOD

Psihrotrofni mikroorganizami, koje čine Gram-negativne bakterije, a među njima bakterije iz roda *Pseudomonas* mogu da dospeju u sirovo mleko. Kontaminacija mleka psihrotrofnim mikroorganizmima nastaje iz spoljašnje sredine, vode, prostirke i hrane. Odsustvo higijene i nepravilno oprani i dezinfikovani sudovi za prihvatanje mleka i oprema/pribor za mužu takođe predstavljaju izvor kontaminacije psihrotrofnim mikroorganizmima.

Rod *Pseudomonas* se svrstava u oportune patogene mikroorganizme za ljude, životinje i biljke, jer mogu da izazovu akutne ili hronične infekcije različitih domaćina-sisara i organa zbog sposobnosti stvaranja širokog spektra faktora virulencije. Kod ljudi izaziva intrahospitalne infekcije u vezi sa kateterizacijom i intubacijom pacijenata, infekcije urinarnog trakta, rana usled opekotina, hronične rane, prati hroničnu opstruktivnu bolest pluća i cističnu fibrozu (Mulcahy, Isabella, & Lewis, 2014). Kod životinja *P.aeruginosa* se navodi kao uzročnik enzootskih i epizootskih epidemija mastitisa goveda (Ohnishi et al., 2011), koza (Bergonier, & Berthelot, 2003; Sela et al., 2007) i ovaca (Leitner, & Krifucks, 2007). Infekcije izazvane *P. aeruginosa* karakteriše 3 stadijuma: bakterijska adhezija i kolonizacija, lokalne infekcije i diseminovane sistemske infekcije. U nastanku zapaljenja važnu ulogu imaju stvaranje egzotoksina i enzima, koji oštećuju tkiva, rezistencija na fagocitozu i druge komponente imunskog sistema, ali i odbrambene karakteristike fiziološke barijere domaćina (Van Delden, & Iglewski, 1998). Perzistentnost pseudomonasnih infekcija omogućena je sposobnošću ove vrste mikroorganizama da formiraju biofilm (Moradali, Ghods, & Rehm, 2017).

Sa aspekta higijene namirnica značaj se ogleda u tome da iako se ovi mikroorganizmi uništavaju procesom pasterezacije, neki njegovi metabolički produkti su termostabilni od kojih su

plavo-zeleni pigment (*pyocyanin*), a enzimi mogu da doprinesu procesu kvara namirnica. Bakterije *Pseudomonas* vrsta lako stvaraju biofilm na površinama opreme za preradu hrane, što ima za posledicu kontaminaciju hrane tokom procesa prerade dovodeći do moguće pojave kvara i skraćivanje roka upotrebe. Po jednoj od definicija biofilm predstavlja strukturnu zajednicu mikroorganizama pričvršćenih za živu ili neživu površinu i uronjenih u ekstracelularni matriks (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). Uloga ovog matriksa je kompleksna, uključujući snabdevanje hranljivim materijama i zaštita od stresnog uticaja spoljašnje sredine (Tolker-Nielsen, 2007).

Pripadnici roda *Pseudomonas* su ubikvitarne bakterije iz okruženja (Jenesen et al., 2004), široko su rasprostranjeni i mogu se naći svuda, u vazduhu, vodi i u zemljištu. Utvrđeno je da su to oportuni patogeni životinja, biljaka i ljudi. Jedna vrsta, *P. aeruginosa* može se naći i kod ljudi i životinja i ima značaja u veterinarskoj i humanoj medicini., dok *P. fluorescens* ima značaja samo u veterinarskoj medicini. *P. aeruginosa* može biti deo normalne mikrobiote kože, mukoznih membrana ili gastrointestinalnog trakta zdravih životinja (Lalošević et al., 2018). *Pseudomonas aeruginosa* je aerobni, gram-negativni i asporogeni bacil, dimenzija 0,5 µm do 1,0 µm i 1,5 µm do 5,0 µm. Bacili su uglavnom pravi ili blago savijeni, a u preparatima bojenim po Gramu mogu biti razmešteni pojedinačno, u parovima ili mogu formirati kratke lance (Slika 1.)



Slika 1. Mikroskopski preparat *P. aeruginosa* (Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2021).
Figure 1. Microscopic preparation of *P. aeruginosa* (Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2021).

To su pokretni bacili, imaju jednu ili više flagela, uglavnom subpolarno smeštenih, i neka ispitivanja pokazuju da mogu imati 3 do 6 flagela (Dasgupta, Arora, & Ramphal, 2000). Flagele su važne i zbog pričvršćivanja bacila na ciljna tkiva, tako da gubitak flagela kod bakterija dovodi do gubitka virulentnosti (Montie, Doyle-Huntzinger, Craven, & Holder, 1982).

Posebna karakteristika *Pseudomonas* vrsta je sposobnost da se kreće na tri različita načina: da pliva, kreće se rojenjem i trzajućim pokretima (Tremblay, & Déziel, 2010).

Pored toga trzajućim pokreti su važni pri kolonizaciji domaćina, formiranju biofilma, patogenezi bolesti i opstanku bacila uopšte (Bradly, 1980). Raste na temperaturama od 10 °C do 42 °C, optimalno 37 °C (Markey, Leonard, Archambault, Cullinane, & Maguire, 2013). Za razliku od *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* ne raste na temperaturi od 5°C, što je važno sa diferencijalno-dijagnostičke tačke gledišta (Markey et al., 2013). Kolonije *P. aeruginosa* imaju karakterističan miris na voće usled prisustva aminoacetofenona (Nišavić, Milić, & Radalj, 2017).

P. aeruginosa stvara pigmente rastvorljive u vodi, a najpoznatiji su piocijanin (*pyocyanin*) plavo-zelene boje, pioverdin žuto-zelene i piorubin crveno-braon boje, i imaju karakterističan miris (miris grožđa ili cveta lipe). Od svih pigmentata, najveći značaj za istraživače ima piocijanin i smatra se da ovaj derivat fenazina ima antibiotsku, antifungalnu i antivirulentnu aktivnost, a naglašena je i uloga piocijanina izolovanog iz sojeva *P. aeruginosa* u bioterapiji kancera (Hassani, Hasan, Al-Saadi, Ali, & Muhammad, 2012). Uzročnik je velikog broja akutnih i hroničnih

infekcija zahvaljujući širokom spektru faktora virulencije. Faktori virulencije obuhvataju: adhezione proteine, ekstracelularne proteine, ili sekundarne metabolite sa proteolitičkom i/ili citotoksičnom aktivnošću (egzotoksin A, elastaza, proteaze, piocijanin, hemolizini. (Driscoll, Brody, & Kollef, 2007).

U literaturi je prisutan podatak da *Pseudomonas aeruginosa* proizvodi pigmente, od kojih je najznačajniji piocijanin koji ima toksičan efekat na ćelije ljudi i životinje (Nišavić i sar., 2017). Ovaj pigment čini kolonije prepoznatljivim. Pigmentacija kolonija, njihov miris i oksidaza test su dovoljni da se u slučaju *P. aeruginosa* postavi tačna mikrobiološka dijagnoza, bez dodatnih testova. Za razliku od toga, ostale *Pseudomonas* vrste ne proizvode pigmente, nemaju specifične mirise i osim što su oksidaza pozitivni, nije ih lako indentifikovati jer su negativni u većini drugih biohemijskih testova. (Nišavić i sar., 2017).

Bakterije iz roda *Pseudomonas* su najzastupljenije psihrotrofne bakterije u sirovom mleku. Najčešće dokazane vrste su *P. fluorescens*, *P. gessardii*, *P. fragi* i *P. lundensis* (Mallet et al., 2012). Veoma su izraženi proteoliti i lipoliti, a slabi saharoliti. Razmnožavaju se pri temperaturi od 0 do 37 °C, a optimalna temperatura razmnožavanja je 21 °C, mogu da se razmnožavaju pri temperaturama od 7 °C i nižim.

U mleku čuvanom duže vreme pri niskim temperaturama, bakterije iz ovog roda, stvaraju proteolitičke i lipolitičke enzime, koji menjaju mleko i dovode do gorkog ukusa. Sve bakterije iz roda *Pseudomonas* su termolabilne, a njihovi enzimi su termostabilni. *P. fluorescens* stvara žuto-zelenkasti pigment fluorescein, koji dovodi do kvara maslaca i mleka. *P. fragi* je izraziti lipolit i izaziva užeglost maslaca, *P. putrefaciens* – truležna vrsta, izaziva kvar na površini sireva i maslaca (Jay, Loessner, & Golden, 2008).

U poslednje dve decenije definicija biofilma se neprestano menjala, jer se svako novo istraživanje nadograđivalo na postojeće znanje o formiranju, strukturi, maturaciji i rezistenciji biofilma (Čabarkapa, 2015). Sažimanjem znanja o već poznatim karakteristikama, i novootkrivenim fiziološkim osobinama, biofilm je danas definisan kao strukturna zajednica mikroorganizama, koji su ireverzibilno vezani za supstrat i uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstance koju sami proizvode, a koji pokazuju izmenjeni fenotip usled promene brzine rasta i transkripcije gena (Donlan, & Costerton, 2002).

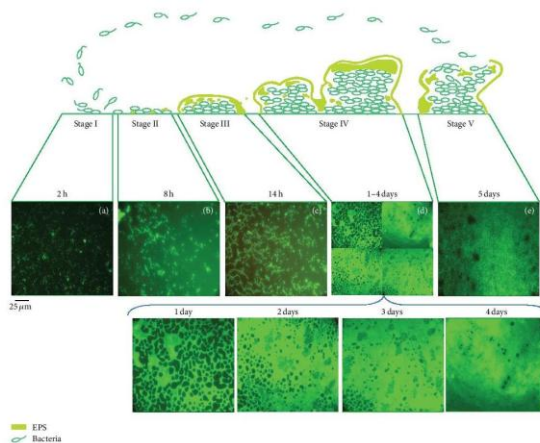
Biofilm je rasprostranjen način života mikroorganizama, koji se može naći u svim sredinama (O'Toole, Kaplan, & Kolter, 2000), a razvija se u cilju povećanja otpornosti i sposobnosti preživljavanja u specifičnom staništu. Preživljavanje u formi biofilma pruža bakterijama mnoge prednosti kao što su: zaštita od delovanja antibakterijskih agenasa, zaštita od fagocitoze, zaštita od isušivanja i nagle promene pH i/ili osmotskog pritiska i zaštita od toksičnog dejstva pojedinih metala (Hall-Stoodley et al., 2004). U biofilmu bakterije razmenjuju hranljive materije, metaboličke produkte i genetički materijal (Donlan, 2002).

Formiranje biofilma posebno je istraživano kod *P. aeruginosa*, kao jedne od najvažnije karakteristike virulencije ovog mikroorganizma. Značaj biofilmova *P. aeruginosa* za humanu i veterinarsku medicinu ogleda se prvenstveno u sposobnosti ove bakterije da izazove hronične infekcije (Tolker-Nielsen, 2014; Westman, Mawish, & Lam, 2010). Ova bakterija može da formira biofilm na svim neživim površinama u domaćinstvu, na farmama i u bolnicama, i da na taj način bude stalno prisutna u okruženju ljudi i životinja (Lee, & Yoon, 2017). Prelazeći iz planktonske forme u formu biofilma *P. aeruginosa* gubi pokretljivost i inhibira virulentne faktore važne za izazivanje akutne infekcije, a dobija zaštitu od fagocitoze, oksidativnog stresa i delovanja antibiotika (Moradali et al., 2017).

Prema istraživanjima formiranje biofilma se odvija kroz 5 faza (Rasamiravaka, Labtani, Duez, & El Jaziri, 2015) (Slika 2).

- Faza I : Karakteriše je formiranje inicijalnog sloja koja nastaje zbog reverzibilne adhezije planktonskih bakterija na pogodnu površinu za rast.
- Faza II: Ireverzibilno vezivanje bakterija koju prati formiranje mikrokolonija uronjenih u egzopolisaharidnu supstancu (EPS)
- Faza III: Dolazi do rasta bakterija i mikrokolonije se progresivno šire.

- Faza IV: Svi nekolonizovani prostori su ispunjeni bakterijama i na kraju pokrivaju celu površinu.
- Faza V: Dolazi do disperzije, bakterije se rasprše, odvajaju se iz strukture i ponovo se vraćaju u planktonsko stanje, odakle se šire i koloniziraju druge površine.



Slika 2. Životni ciklus biofilma, koji stvara *P. aeruginosa* PAO1 na podlozi sa glukozom (Rasamiravaka i sar., 2015).

Figure 2. Life cycle of the biofilm, which produces *P. aeruginosa* PAO1 on glucose medium (Rasamiravaka et al., 2015).

U laboratorijskim uslovima utvrđeno je da biofilm koji proizvodi *P. aeruginosa* kultivisan na čvrstoj podlozi uz dodatak glukoze ima pečurkastu strukturu (Tolker-Nielsen, 2014). Karakteristična trodimenzionalna struktura biofilma veoma je pogodna za protok nutrijenata u biofilmu, tako da se na površini i u unutrašnjosti biofilma zadržavaju hranljive materije, dok se otpadne materije eliminišu iz biofilma.

MATERIJAL I METODE

Materijal su predstavljali zbirni uzorci sirovog mleka iz tankova u kojima je broj somatskih ćelija bio manji od 400 000/ ml. Izolati iz mleka (n=60) su izolovani tokom rutinskog ispitivanja uzoraka mleka. Kao referentni soj korišćen je *P. aeruginosa* ATCC 27 583 iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta, Univerzitet u Beogradu.

Tokom izolacije iz uzoraka mleka kolonije, koje su na XLD agaru bile laktoza negativne sa/bez stvaranja H₂S i sa/bez plave pigmentacije oko kolonija i karakterističnog mirisa su odabrane za dalje ispitivanje. Izolati su identifikovani korišćenjem standardnih laboratorijskih metoda, ispitivanjem bihemijskih osobina. Identifikovani izolati su čuvani pri -70°C.

Proteolitička aktivnost izolata *Pseudomonas* spp. iz mleka ispitana je na agaru sa kazeinom (3% Hranjivi agar-Torlak+sterilno obrano mleko), koji je zasejan sa ispitujućim izolatima i inkubisan pri 37°C 24 h. Prosvetljenja duž linije zasejavanja su procenjivana kao pozitivan rezultat. Ispitivanje lipolitičke sposobnosti izolata iz mleka izvedeno je na Tributirin agaru (Torlak), koji je inkubisan pri 37°C 48 h, a zona prosvetljenja oko izraslih kolonija je tumačena je kao lipolitička aktivnost.

Sposobnost izolata da stvaraju hemolizu je ispitana na krvnom agaru (Baza za krvni agar-Torlak +8% ovčije krvi), koji je inkubisan pri 37°C 24 h.

Sposobnost izolata da stvaraju pigment je ispitana na *Tryptone Soy agar*-u (Merck), koji je posle zasejavanja inkubisan pri 37°C 24 h. Procena boje je vršena vizuelno, posmatranjem izraslih kolonija i stvorenog pigmenta.

Ispitivanje sposobnosti izolata *Pseudomonas* vrsta da stvara biofilm je mereno *in vitro* *Crystal Violet* (CV) metodom (Silva i sar. 2014). Prekonoćna (24h) bakterijska kultura u bujonu *Tryptone soy broth* (TSB) (*BioMerieux*-Francuska) je razblaživana u fiziološkom rastvoru, tako da bakterijska suspenzija za svaki klinički i izolat iz mleka odgovara 0,5 Mc Farland skali (približno 10^8 CFU/ml). Potom je 100 μ l bakterijske suspenzije nanošeno u otvore polistirenskih ploča (Spektar-Čačak, Srbija), koje su inkubisane 24 h pri 37°C. Po inkubaciji, supernatant je odlivan i vršeno je 3 puta ispiranje sa po 200 μ l fiziološkog rastvora. Potom je u otvore polistirenske ploče nanošeno po 100 μ l (0,3%, w/v) rastvora kristal violeta (CV). Posle 15 minuta boja je ispirana pod mlazom vode. Na kraju, posle sušenja na vazduhu boja je rastvarana dodavanjem 100 μ l 70% (v/v) etanola sa 10% (v/v) izopropil alkohola. Apsorbancija je merena spektrofotometrijski *ELISA* čitačem *Labsystems Multiskan MS* (*Thermo CRS, Canada*) na talasnoj dužini od 540 i 620 nm i iskazana kao optička gustina (OD). Stvaranje biofilma je rangirano kao što su prethodno opisali (Silva i sar. 2014), poređenjem apsorbancije stvorenog biofilma za svaki ispitivani izolat sa apsorbancijom negativne kontrole, što je bio bujon bez bakterijskog inokuluma. Tako je apsorbancija biofilma manja od negativne kontrole klasifikovana kao ne-adherentni; između negativne kontrole i 2 puta veće od negativne kontrole apsorbancije kao slabo-adherentni; između 2 i 4 puta veće od negativne kontrole, kao osrednje-adherentni i više od 4 puta veće od negativne kontrole apsorbancije kao jako-adherentni.

Za statističku obradu podataka korišćeni su Microsoft Excell i program Statistica (*TIBCO Software Inc. USA*).

DISKUSIJA

Stvaranje biofilma je beskonačan ciklus u kojem su organizovane zajednice mikroorganizama uronjene u matriksu ekstracelularne polimerne supstance (EPS), koja održava ćelije mikroorganizama zajedno na površini (Donlan, 2002; Karatan, & Watnick, 2009). U tom mikroskopskom svetu, biofilm se može metaforično nazvati „gradom mikroba“ (Watnick, & Kolter, 2000; Nikolaev, & Plakunov, 2007) sa EPS, koja čini 85% ukupne biomase biofilma, kao „kuća ćelija biofilma“ (Flemming, Neu, & Wozniak, 2007). EPS je uglavnom sačinjen od biomolekula, egzopolisaharida, ekstracelularne DNK (*eDNA*) i polipeptida čineći visoko hidratisanu, polarizovanu smešu, koja doprinosi ukupnom strukturnom sastavu i izgradnji biofilma (Sutherland, 2001; Branda, Vik, Friedman, & Kolter, 2005; Flemming, & Wingender, 2010). Mikroorganizmi *Pseudomonas* vrsta dobro rastu na hranljivim podlogama zbog svojih skromnih zahteva za hranljivim materijama, dok je mehanizam stvaranja biofilma složen i u njemu učestvuju veliki broj proteina i gena. Različiti fenotipovi za biofilm mogu da se razviju u zavisnosti od soja *P. aeruginosa* i/ili uslova u pogledu hranljivih materija (Shrout et al., 2006). Na podlogama sa malim sadržajem glukoze životni ciklus stvaranja biofilma se može podeliti na 4 glavna fenotipska koraka. Proces započinje reverzibilnom adhezijom planktonskih bakterija na površinu pogodnu za rast (Faza I), koju prati ireverzibilno pričvršćivanje kolonija bakterija, koje formiraju mikrokolonije u EPS matriksu (Faza II). Bakterijske mikrokolonije se progresivno šire i njihovo spajanje dovodi do veće strukturalnosti fenotipa sa nekolonizovanim prostorom (Faza III). Zatim, nekolonizovani prostor biva ispunjen bakterijama, koje na kraju prekrivaju površinu (Faza IV) (Rasamiravaka et al., 2015).

Nalaz *Pseudomonas* spp. u mleku se može objasniti naknadnom kontaminacijom mleka, jer je broj somatskih ćelija u zbirnim uzorcima mleka bio manji od 400 000/ml, što isključuje poreklo mikroorganizma iz mlečne žlezde i postojanje latentne infekcije. Odavno se zna da na farmi muznih krava kontaminacija *P. aeruginosa* obično potiče od vode i uređaja za distribuciju i zadržavanje vode bilo da su u pitanju bunari, cevi i creva za vodu, bare, kišnice ili osočne jame (Howell, 1972; Packer, 1977). Kao jatrogeni putevi prenošenja u literaturi se navodi kontaminirana posuda za dezinfekciju sisa i oprema za mužu (Nicholls, Barton, & Anderson, 1981; Osborne, Armstrong, Catrysse, Butler, & Versavel, 1982; Kirk i Mellenberger, 2010). Iako se ova vrsta mikroorganizma navodi kao uzročnik mastitisa zastupljenost u stadu muznih životinja je obično manja od 1%, a vrlo retko je preko 3%, što je posledica loših uslova higijene. Nalazi Nucera i saradnici (2016) pokazuju da je veliki broj uzoraka, 180 od 233 uzoraka briseva uzetih sa površina

sisnih čašica, creva i pumpi za vodu na farmi muznih krava bio pozitivan na prisustvo *Pseudomonas* spp.

Naša zakonska regulativa u oblasti higijene hrane ne predviđa pregled uzoraka mleka na prisustvo *Pseudomonas* vrsta, ali naš nalaz kao i nalaz Radovanović i saradnika (2018) pokazuje da je tokom rutinskog pregleda mleka moguće dokazati prisustvo ovog mikroorganizma. Temperature, odnosno hladan lanac u kojem se mleko čuva posle muže pogoduju rastu *Pseudomonas* vrsta. Zbog značaja sa aspekta higijene mleka i mogućeg uzročnika kvara ispitali smo sposobnost izolata iz mleka da stvaraju pigment, ispoljavaju proteolitičku i lipolitičku aktivnost. Kod svih 60 izolata *Pseudomonas* spp. iz mleka dokazana je proteolitička i lipolitička aktivnost, a najveći broj 56 (93,33%) je stvarao žuto-zeleni, a samo 4 (6,67%) izolata plavo-zeleni pigment (Tabela 1.), koji je karakterističan za *Pseudomonas aeruginosa*.

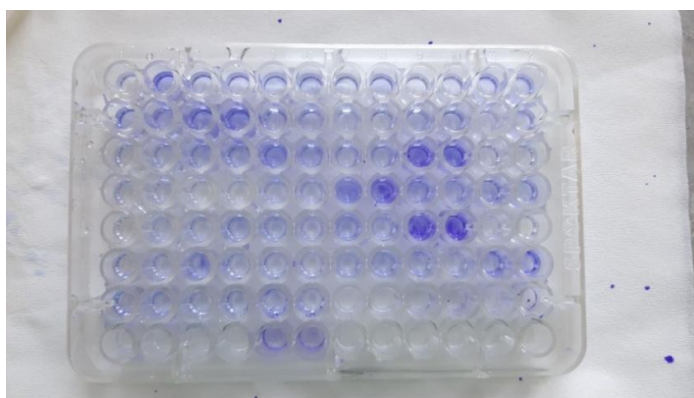
Tabela 1. Rezultati ispitivanja stvaranja pigmenta kolonija *Pseudomonas* spp. iz mleka.

Table 1. Test results of pigment formation of colonies of *Pseudomonas* spp. from milk.

Pigment kolonija	Broj izolata	%
Žuto-zeleni	56	93,33
Plavo-zeleni	4	6,67
Ukupno	60	100

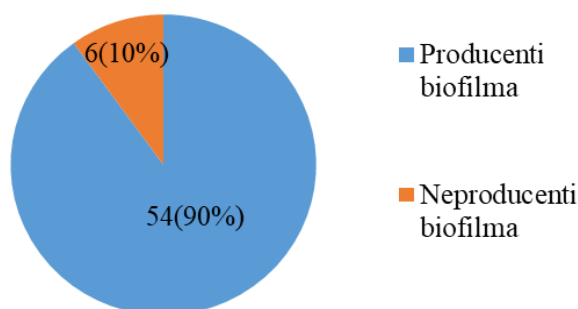
Naši rezultati se slažu sa rezultatima Nucera i sar. (2016), Wang, & Jayarao, (2001), Dogan, & Boor, (2004), koji su dokazali da su izolati *P. fluorescens* bili dominantni u mleku i okruženju, a upravo ova vrsta stvara žuto-zeleni pigment. Tokom čuvanja mleka termo-rezistentni enzimi mogu da smanje kvalitet i održivost termički obrađenog mleka. Niske temperature mogu da pospeše stvaranje EPS, a na taj način formiranje biofilma (Aswathanarayan, & Vittal, 2014).

Sposobnost izolata da stvaraju biofilm smo ispitali *in vitro* metodom na mikrotitar pločama sa bojom *Crystal Violet*, koja omogućava kvantitativnu analizu mase biofilma. Adhezija bakterija je procenjena merenjem optičke gustine bazenčića. Bazencići, koji su imali više pričvršćenih bakterija, su vezali više boje i zbog toga pokazali veću optičku gustinu. Naši rezultati pokazuju razlike u bojenju bazenčića (Slika 3).



Slika 3. Mikrotitar ploča pre očitavanja na ELISA čitaču.
Figure 3. Microtiter plate before reading on an ELISA reader.

Tamnija boja bazenčića ukazuje na veći broj bakterija, koje su adherirane na površinu bazenčića. Izolati iz mleka su pokazali različitu sposobnost stvaranja biofilma. Od 60 ispitanih *Pseudomonas* spp. izolata poreklom iz mleka, 54 (90%) izolata je stvaralo biofilm, dok 6 (10%) izolata nije stvaralo biofilm (Grafikon 1).



Grafikon 1. Ispitivanje sposobnosti izolata *Pseudomonas* spp. poreklom iz mleka da stvaraju biofilm.
Graph 1. Testing the ability of isolates of *Pseudomonas* spp. derived from milk to create a biofilm.

Optička gustina (OD_{540}) biofilma kretala se od 0,069 do 0,373 (Tabela 2.).

Tabela 2. Rezultati ispitivanja sposobnosti izolata *Pseudomonas* spp. da stvaraju biofilm *Crystal Violet* metodom na mikrotitracionim pločama merenjem ekstinkcija (OD_{540}).

Table 2. Results of testing the ability of isolates of *Pseudomonas* spp. to create a *Crystal Violet* biofilm by microtiter plates by measuring extinctions (OD_{540}).

Poreklo izolata	Minimum (X_{min})	Maksimum (X_{max})	Srednja vrednost (\bar{X})	Koeficijent varijacije (CV)
Mleko	0,069	0,372	0,170	32%

Tabela 3. Rezultati ispitivanja intenziteta stvaranja biofilma *Pseudomonas* spp. izolata poreklom iz mleka.

Table 3. Results of the study of the intensity of biofilm formation *Pseudomonas* spp. isolate derived from milk.

Intenzitet stvaranja biofilma										
Poreklo izolata	jako-adherentni		osrednje-adherentni		slabo-adherentni		ne-adherentni		Ukupno	
	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%	Broj	%
Mleko	2	3,33	42	70	10	16,67	6	10	60	100

Naši rezultati se razlikuju od rezultata Jabalameli i saradnika (2012), koji su ispitali kliničke izolate *P. aeruginosa* kod pacijenata sa opekotinama i koji su bili u većem broju (47%) jaki producenti biofilma, dok je kod Lima i saradnika (2018) 77,5% kliničkih izolata stvaralo biofilm i u najvećem broju svrstani su u slabe producente (42,5%). Naši rezultati su u pogledu gradiranja intenziteta stvaranja biofilma u skladu sa rezultatima (Silva i sar. 2014), koji su dokazali da najveći broj kliničkih izolata (61,46%) pripada srednje adherentnim izolatima i nešto veću maksimalnu optičku gustinu biofilma ($OD_{590}=0,676$). Ova razlika se može objasniti različitoj talasnoj dužini na kojoj smo mi određivali optičku gustinu i koja je bila 540 nm, što je predstavljalo modifikaciju metode. Asma i saradnici (2016) su takođe dokazali da 5 izolata *P. aeruginosa* izolovanih sa površina cevi od nerđajućeg čelika u mlekari stvaraju biofilm, od kojih su 2 bila osrednji, a 3 jaki producenti. Uslovi higijene dobijanja mleka, ambijent gde se obavlja muža, zdravstveno stanje muznih životinja, postupak sa mlekom posle muže i transport su ključni faktori, koji utiču na nivo kontaminacije psihrotrofnim bakterijama. Sprovođenje dobre higijenske prakse, kao i HCCP

sistema su dobar način da se ograniči početni nivo kontaminacije sirovog mleka psihrotrofnim mikroorganizmima, kao što su *Pseudomonas* vrste, a na taj način i mogućnost stvaranja biofilma. U humanoj medicini, poznavanje mehanizma prenošenja virulencije, kao i faktora koji utiču na stvaranje biofilma su imperativ u borbi protiv biofilma.

ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja sposobnosti izolata *Pseudomonas* spp. poreklom iz mleka mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Od 60 izolata *Pseudomonas* spp. izolovanih tokom rutinskog pregleda sirovog mleka 56 (93,33%) izolata je identifikovano kao *Pseudomonas fluorescens*, a 4 (6,67%) izolata kao *Pseudomonas aeruginosa*.
- Kod svih 60 izolata *Pseudomonas* spp. iz mleka dokazana je proteolitička i lipolitička aktivnost, a najveći broj 56 (93,33%) je stvarao žuto-zeleni, a samo 4 (6,67%) izolata plavo-zeleni pigment.
- Izolati *Pseudomonas* spp. poreklom iz mleka su dobri producenti biofilma. Od 60 izolata 54 (90%) su stvarali biofilm različitog intenziteta, dok 6 (10%) izolata nije uopšte stvaralo biofilm.
- Najveći broj, 42 (70%) izolata *Pseudomonas* spp. poreklom iz mleka su se mogli svrstati u osrednje-adherentne izolate, 10 (16,67%) izolata kao slabo-adherentni i samo 2 (3,33%) izolata kao jako-adherentni izolati.

NAPOMENA

Rad je podržan od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, projekat II 46009.

LITERATURA

- Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemâa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Flórez, A. B. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy science & technology*, 96(1), 27-38.
- Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2014). Attachment and biofilm formation of *Pseudomonas fluorescens* PSD4 isolated from a dairy processing line. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1903-1910.
- Bergonier, D., & Berthelot, X. (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. *Livestock Production Science*, 79(1), 1-16.
- Bradley, D. E. (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Canadian journal of microbiology*, 26(2), 146-154.
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in microbiology*, 13(1), 20-26.
- Čabarkapa, I. (2015). Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva *Salmonella enteritidis* i inhibicioni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm. Univerzitet u Novom Sadu.
- Dasgupta, N., Arora, S. K., & Ramphal, R. (2000). fleN, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 182(2), 357-364.
- Dogan, B., & Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 130-138.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Driscoll, J. A., Brody, S. L., & Kollef, M. H. (2007). The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, 67(3), 351-368.

- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 95-108.
- Hassani, H. H., Hasan, H. M., Al-Saadi, A., Ali, A. M., & Muhammad, M. H. (2012). A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Exp Biol*, 2(5), 1389-1394.
- Howell, D. (1972). Survey on mastitis caused by environmental bacteria. *The Veterinary Record*, 90(23), 654-657.
- Jabalarneli, F., Mirsalehian, A., Khorarnian, B., Aligholi, M., Khorarnrooz, S. S., Asadollahi, P., ... & Emaricini, M. (2012). Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns*, 38(8), 1192-1197.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2008). *Modern food microbiology*. Springer Science & Business Media.
- Jensen, L. J., Skovgaard, M., Sicerhitz-Pontén, T., Hansen, N. T., Johansson, H., Jørgensen, M. K., ... & Ussery, D. (2004). Comparative genomics of four *Pseudomonas* species. In *Proceedings Pseudomonas* (pp. 139-164). Springer, Boston, MA.
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and molecular biology reviews*, 73(2), 310-347.
- Kirk, J., & Mellenberger, R. (2010). Mastitis Control Program for *Pseudomonas* Mastitis in Dairy Cows.
- Lalošević, V., Jarak, M., Vidić, B., Pašić, Š., Mihajlović Ukropina, M., Jelešić, Z., ... & Boboš, S. (2011). *Mikrobiologija za studente veterinarske medicine*. Popoprivredni fakultet u Novom Sadu, Departman za Veterinarsku medicinu. Mala knjiga Novi Sad.
- Lee, K., & Yoon, S. S. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, a programmed bacterial life for fitness.
- Leitner, G., & Krifucks, O. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* mastitis outbreaks in sheep and goat flocks: antibody production and vaccination in a mouse model. *Veterinary immunology and immunopathology*, 119(3-4), 198-203.
- Lima, J. L. D. C., Alves, L. R., Jacomé, P. R. L. D. A., Bezerra, J. P., Maciel, M. A. V., & Morais, M. M. C. D. (2018). Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 22, 129-136.
- Mallet, A., Guéguen, M., Kauffmann, F., Chesneau, C., Sesboué, A., & Desmasures, N. (2012). Quantitative and qualitative microbial analysis of raw milk reveals substantial diversity influenced by herd management practices. *International Dairy Journal*, 27(1-2), 13-21.
- Markey, B., Leonard, F., Archambault, M., Cullinane, A., & Maguire, D. (2013). *Pseudomonas*, *Burkholderia* and *Stenotrophomonas* species. *Can Vet J*, 275-277.
- Nišavić, J., Milić, N., & Radalj, A. (2020). Overview of the most significant coronavirus infections in veterinary medicine. *Veterinarski glasnik*, 74(1), 1-17.
- Montie, T. C., Doyle-Huntzinger, D., Craven, R. C., & Holder, I. A. (1982). Loss of virulence associated with absence of flagellum in an isogenic mutant of *Pseudomonas aeruginosa* in the burned-mouse model. *Infection and immunity*, 38(3), 1296-1298.
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 39.
- Mulcahy, L. R., Isabella, V. M., & Lewis, K. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease. *Microbial ecology*, 68(1), 1-12.

- Nicholls, T. J., Barton, M. G., & Anderson, B. P. (1981). outbreak of mastitis in a dairy herd due to *Pseudomonas aeruginosa* contamination of dry-cow therapy at manufacture. Veterinary record.
- Nikolaev, Y. A., & Plakunov, V. K. (2007). Biofilm—"City of microbes" or an analogue of multicellular organisms?. *Microbiology*, 76(2), 125-138.
- Nucera, D. M., Lomonaco, S., Morra, P., Ortoffi, M. F., Giaccone, D., & Grassi, M. A. (2016). Dissemination and persistence of *Pseudomonas* spp. in small-scale dairy farms. *Italian journal of food safety*, 5(2).
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Ohnishi, M., Sawada, T., Hirose, K., Sato, R., Hayashimoto, M., Hata, E., ... & Kato, H. (2011). Antimicrobial susceptibilities and bacteriological characteristics of bovine *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* isolates from mastitis. *Veterinary microbiology*, 154(1-2), 202-207.
- Osborne, A. D., Armstrong, K., Catrysse, N. H., Butler, G., & Versavel, L. (1982). An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in dairy cows. *Can. Vet. J.* 22, 215–217.
- Packer, R. A. (1977). Bovine mastitis caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(10 Pt 2), 1166-1166.
- Radovanović-Savić, R., Rajić-Savić, N., Babić, M. i Zdravković, N. (2018). Nalaz *Pseudomonas* spp. u sirovom mleku. U Zborniku apstrakata, 12. Kongres mikrobiologa sa međunarodnjim učešćem, „Mikromed 2018 Regio“ (str. 235). Beograd, Srbija.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed research international*, 2015.
- Sela, S., Hammer-Muntz, O., Krifucks, O., Pinto, R., Weisblit, L., & Leitner, G. (2007). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from mastitis outbreaks in dairy herds. *Journal of dairy research*, 74(4), 425-429.
- Silva-Fonseca, S. A. R., Shitsuka, R., Risemberg, R. I. C. S., & Shitsuka, D. M. (2014). *Biologia no ensino médio: os saberes e o fazer pedagógico com uso de recursos tecnológicos*. *Biota Amazônia (Biote Amazonie, Biota Amazonia, Amazonian Biota)*, 4(1), 119-125.
- Shrout, J. D., Chopp, D. L., Just, C. L., Hentzer, M., Givskov, M., & Parsek, M. R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular microbiology*, 62(5), 1264-1277.
- Sutherland, I. W. (2001). The biofilm matrix—an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in microbiology*, 9(5), 222-227.
- Todar's Online Textbook of Bacteriology. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*. Retrieved May 7, 2021, from <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>
- Tolker-Nielsen, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: from molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *Apmis*, 122, 1-51.
- Tremblay, J., & Déziel, E. (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC genomics*, 11(1), 1-15.
- Van Delden, C., & Iglewski, B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerging infectious diseases*, 4(4), 551.
- Watnick, P., & Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- Westman, E.L., Matewish, J.M., & Lam, J.S. (2010). *Pseudomonas*. In *Proceedings Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* (pp. 443-468). Wiley-Blackwell.
- Wang, L., & Jayarao, B. M. (2001). Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 84(6), 1421-1429.

CHARACTERISTICS OF PSEUDOMONAS SPP. FROM RAW MILK

Biljana Delic Vujanovic¹, Ljiljana Tanasic¹, Radoslava Savic Radovanovic²

¹Academy of Vocational Studies Šabac, Unit of Agricultural and Business Studies and Tourism,
Dobropoljska 5, 15 000 Šabac, Serbia, biljana_delic@hotmail.com

²University of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Bulevar oslobođenja 18, 11 000
Belgrade, Serbia

ABSTRACT

The genus *Pseudomonas* is a heterogeneous and ecologically important group of microorganisms, widely distributed in milk, water and the environment. They are classified as opportunistic pathogenic microorganisms for humans, animals and plants. The aim of this study was to examine the proteolytic, lipolytic activity and biofilm formation in isolates derived from milk. The material was pooled samples of raw milk from which isolates of *Pseudomonas* species (n=60) were isolated. Proteolytic ability was tested on nutrient agar with casein and lipolytic ability on Tributyrin agar. The ability of *Pseudomonas* species isolates to produce biofilm was tested in vitro by the Crystal Violet (CV) method on microtiter plates. In all 60 isolates of *Pseudomonas* spp. proteolytic and lipolytic activity from milk has been demonstrated. Isolates of *Pseudomonas* spp. originating from milk created a biofilm. Of the 60 isolates, 54 (90%) produced a biofilm of varying intensity, while 6 (10%) isolates did not produce a biofilm at all. The largest number, 42 (70%) of isolates of *Pseudomonas* spp. can be classified into medium-adherent isolates, 10 (16,67%) isolates as weakly-adherent and only 2 (3,33%) isolates as strongly-adherent isolates.

Isolates of *Pseudomonas* spp. from milk are good producers of biofilm, proteolytes and lipolytes so that they can cause rotten milk, and their finding is a consequence of contamination and poor hygiene conditions during the process of obtaining milk.

Keywords: biofilm, *Pseudomonas* spp., milk.

ANNOUNCEMENT

The work is supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, project II 46009.