

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/311440480>

Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from dried meat of sheep carcase- sjenica sheep prosciutto

Article · December 2016

DOI: 10.7251/VETJ1601026Z

CITATIONS

0

READS

51

6 authors, including:



Tanja Žugić-Petrović

21 PUBLICATIONS 9 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Mirjana Ž. Grujović

University of Kragujevac

27 PUBLICATIONS 28 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Katarina G. Mladenović

University of Kragujevac

27 PUBLICATIONS 28 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)



Predrag Ilić

18 PUBLICATIONS 0 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Preclinical testing of active substances. The Ministry of Education and Science, No. 41010. [View project](#)



Preclinical testing of active substances. The Ministry of Education and Science, No. 41010. [View project](#)

DOI: 10.7251/VETJ1601026Z

UDK 637.525.53'63:579.861

Т. Жугић Петровић¹, М. Мурузовић², К. Младеновић², П. Илић¹,
С. Коцић Танацков², Љ. Чомић²

Оригинални рад

КАРАКТЕРИЗАЦИЈА КОАГУЛАЗА НЕГАТИВНИХ СТАФИЛОКОКА ИЗОЛОВАНИХ ИЗ СУВОГ МЕСА ОВЧИЈЕГ ТРУПА – СЈЕНИЧКА ОВЧИЈА СТЕЉА

Кратак садржај

Овчија стеља је ферментисани производ од овчијег меса, чији квалитет и органолептичка својства побољшавају микроорганизми дајући производ доброг квалитета. Процес ферментације сјеничке овчије стеље није контролисан, па се у овом случају ради искључиво о дивљим сојевима микроорганизама који чине микробиоту производа.

Коагулаза негативне стафилококе (CNS) има значајно место у дефинисању карактеристика производа. Циљ нашег рада је био: изолација коагулаза негативних стафилокока из сјеничке овчије стеље, као и карактеризација изолованих стафилокока (CNS), како би се прецизније дефинисао сој коагулаза негативних стафилокока који доминира у сјеничкој овчијој стељи и који утичу на квалитет производа.

Материјал за ово испитивање чинило је 9 узорка овчије стеље, који су узети из три домаћинства са подручија Сјенице у две производне године (2014. и 2015. год.).

Фенотипизација изолата рађена је бојењем ћелија по Граму и каталаза тестом, а затим су изолати подвргнути коагулаза тесту. За идентификацију добијених изолата рађени су тестови: способност хемолize на крвном агару, ферментација манитола, раст на различитим температурама (15°C и 45°C), осетљивост на новобиоцин, липолитичка активност, протеолитичка активност и синтеза егзополисахарида.

¹ Висока пољопривредно-прехранбена школа струковних студија, Ђирила и Методија 1, 18 400 Прокупље, Србија

High Agriculture and Food School, Cirila and Metodija 1, 18400 Prokuplje, Republic of Serbia

² Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, Радоја Домановића 12, 34 000 Крагујевац, Србија

Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

³ Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, Булевар цара Лазара 1, 21 000 Нови Сад, Србија

Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad Republic of Serbia

Е-пошта кореспондентног аутора/Е-mail of Corresponding Author: tanja.zugicpetrovic@yahoo.com

На основу добијених резултата, извршена је прелиминарна идентификација 71 изолата коагулаза негативних стафилокока сјеничке овчије стеље као *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus* и *Staphylococcus carnosus*.

Кључне речи: Овчија стеља, коагулаза негативне стафилококе, карактеризација

T. Zugic Petrovic, M. Muruzovic, K. Mladenovic, P. Ilic, S. Kocic Tanackov, Lj. Comic

Original paper

CHARACTERIZATION OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM DRIED MEAT OF SHEEP CARCASE – SJENICA SHEEP PROSCIUTTO

Abstract

Sheep prosciutto is a fermented meat product for whose quality and organoleptic properties are increased by microorganisms making it a high quality product. Fermentation process of sheep prosciutto is not controlled, therefore in this case, the isolated strains that make up the microbiota are wild (occur in nature).

Coagulase-negative staphylococci (CNS) have an important role in defining the characteristics of this product. The aim of our work was: to isolate coagulase-negative staphylococci from sheep prosciutto, as well as characterisation of the isolated staphylococci (CNS) to precisely define and determine the dominating strain of coagulase-negative staphylococci in sheep prosciutto and how it affects the quality of the product.

Materials for this research consisted of 9 samples taken from three households in Sjenica during two production years (2014 and 2015 yr.). Phenotyping of the isolates was performed by Gram staining and catalase test, and then the isolates were subjected to the coagulase test. In order to identify the isolates the following tests were performed: The ability of bacterial colonies to induce hemolysis on blood agar, mannitol fermentation, growth at different temperatures (15°C and 45°C), tolerance to novobiocin, lipolytic activity, proteolytic activity and synthesis of EPS (Exopolysaccharides).

Based on the results, a preliminary identification of 71 isolates of coagulase-negative staphylococci from Sjenica sheep prosciutto as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* was made.

Key words: *Sheep prosciutto, microbiota, coagulase-negative staphylococci, isolation, characterization.*

УВОД/INTRODUCTION

Месо је веома важан састојак људске исхране и најбогатији извор животињских беланчевина (McMichael и сар., 2005). Погодно је за производњу сувомеснатих производа као и разних прерађевина од меса.

У групу специјалитета од овчијег меса спадају и производи добијени сољењем и димљењем већих делова (полутки или читавих трупова) оваца. То су овчије стеље или пастрма (Aktaş и сар., 2005).

Овчија стеља је сувомеснати производ веома комплексног начина производње, а предуслов за његову производњу је здравствена исправност сировине и задовољавање ветеринарско-санитарних услова производње. Много је фактора који утичу на квалитет овчије стеље, основни су фактори одабира сировине и фактори прехранбене технологије (Aktaş и сар., 2005).

За производњу сјеничке овчије стеље користе се товљени мушки кастрати и јалове овце, аутохтоне врсте животиња са Пештера. Начин припреме производа је врло специфичан, користе се цели трупови оваца (осим унутрашњег дела бута-шола) са припадајућим ураслим масним и везивним ткивом, из кога се издвајају кости са изузетком дисталних делова костију коленице и подлактице у дужини до 5 cm, који у суштини служе за вешање производа током процеса сушења и ферментације (Стаменковић и Девић, 2006). Приликом конзервисања овчијег меса губи се вода, чиме се стварају услови за раст и развој микроорганизама који чувају месо од кварења (Aktaş и сар., 2005).

Микробну популацију која се развија током процеса ферментације овчије стеље чине бактерије млечне киселине (LAB) и коагулаза негативне стафилококе (CNS). Састав микробне популације потиче од микроорганизама који се налазе у месу или доспевају током производног процеса.

Присуство коагулаза негативних стафилокока, најчешће представника врста родова *Staphylococcus* spp., током процеса производње је кључан за дефинисање сензорног квалитета овчије стеље и огледа се у стабилизацији боје, разградњи пероксида, протеолизи и липолизи. Број CNS условљен је брзином раста LAB и падом pH (Samelis и сар., 1998).

Циљ овог рада јесте изолација и прелиминарна карактеризација сојева коагулаза негативних стафилокока (CNS) које су изоловане из овчије стеље, сувомеснатог производа са територије Сјенице.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ/ MATERIAL AND METHODS

Узорци овчије стеље за испитивање и утврђивање присуства стафилокока узети су од три иста произвођача (А; Б; и В) са територије Сјенице у две производне године (2015. и 2016. године). Узорци су произведени традиционалним начином производње у идентичним микроклиматским условима и од аутохтоне врсте животиња сјеничкопештарска овца.

У првој производној години (2015. година) од произвођача је узето 5 узорка, при чему треба нагласити да

је по два узорка узето из 2 домаћинства (А и Б), а један узорак из трећег домаћинства (В). Друга производна година (2016. година) имала је укупно 4 узорка, при чему су из првог домаћинства узета 2 узорка (А), а у остала два (Б и В) по један узорак овчије стеље. Начин узорковања сувог овчијег меса спроведен је по Правилнику о општим и посебним условима хигијене хране у било којој фази производње, прераде и промета ("Сл. гласник Р. Србије", бр. 72/2010).

Одређивање броја и изолатија CNS

Узорци овчије стеље (10 g) су асептично пренети у 90 cm³ стерилног (стерилизација у трајању од 20 мин на 121°C) физиолошког раствора са пептоном (0,8 g NaCl/dm³ и 1 g пептона/dm³) и мешани 15 минута. Број CNS одређен је индиректним методом сукцесивног разблажења која се састоји у прављењу разблажења и преношењу одговарајућих разблажења на чврсте подлоге манитол-сланог агара-*Charman*-ова подлога (Торлак, Београд, Србија), што је у складу са стандардним методом за припрему узорака (SRPS EN ISO 6887-1:2008).

Број CNS одређен је бројањем израслих колонија након инкубације на манитол-сланом агару-*Charman*-ова подлога од 37°C/72h. Одређивања броја ћелија које образују колоније на чврстим подлогама коришћен је стандард SRPS EN ISO 6887-1:2008.

Након инкубације и бројања израслих колонија, наизглед различите колоније пренесене су у хранљиви

бујон (Торлак, Београд, Србија) 37°C/48h. Културе су из бујона пренете на Петри плоче и извршено је троструко пречишћавање изолата сукцесивним преношењем појединачних колонија на нове Петри плоче са *Charman*-овом подлогом инкубиране на 37°C/48h (Радуловић и сар., 2004).

Фенотипска карактеризација изолата CNS

Фенотипизација изолата рађена је бојењем ћелија по Граму и каталаза тестом, а затим су изолати подвргнути коагулаза тесту користећи зечију плазму у ЕДТА (BD BBLTM Coagulase plasma, Rabbit with EDTA, Rockville, Md., U.S.A.). Разблажена плазма кунића је разливена у епрувете у количини од 0,5 ml, испитиване колоније су суспендоване у разливену плазму, а затим инкубиране на температури од 37°C/2, 4, 6 и 24h. Посебно су припремљене две епрувете за позитивну и негативну контролу, у позитивној контроли је засејан референтни сој *Staphylococcus aureus* ATTC 11632. Друга је негативна контрола остала незасејана.

За идентификацију добијених изолата рађени су тестови: способност хемолize на крвном агару, ферментација манитола, раст на различитим температурама (15°C и 45°C), осетљивост на новобиоцин, липолитичка активност, протеолитичка активност и синтеза егзополисахарида (Kaban и Кауа, 2008).

Способност хемоллизе на крвном агару

Способност хемоллизе изолованих CNS анализирана је методом коју је у свом раду навела Ледина и сар., (2013), засејавањем плоча са крвним агаром (Торлак, Београд, Србија). Засејане плоче након инкубације на температури од 37°C/24h, испитиване су на постојање светлих зона око колонија које су указивале на позитивну хемолитичку активност, α-хемолиза (зелене зоне око колонија), β-хемолиза (јасне жуто-зелене зоне око колонија) и γ-хемолиза (без ореола око колонија).

Ферментација манитола

Ферментација манитола испитује се засејавањем бактерија на манитол-слани агар-*Charman*-ова подлога (Торлак, Београд, Србија). Бактерије се оставе на инкубацији 37°C/24h. Након тога, прати се промена боје подлоге из црвене у жуту. Бактерије које су промениле боју индикатора имају способност ферментације манитола, а оне које нису промениле боју подлоге, не ферментишу манитол (*Charman*, 1945).

Раст на различитим температурама (15°C и 45°C)

Раст испитиваних бактерија на различитим температурама испитиван је методом коју су описали Kloos, Tornabene and Schleifer (1974), са одређеним модификацијама. Бактерије су засејане на манитол-сланом агару (Торлак, Београд, Србија), а затим инкубиране на температурама

од 15 и 45°C/24h. Након инкубације читава се пораст колонија на различитим температурама.

Осетљивост на новобиоцин

Осетљивост на новобиоцин је једна од особина стафилокока која помаже њиховој идентификацији. Испитивана је плејт методом. Стандардизација суспензија бактерије која се тестира врши се у физиолошком раствору и користи се McFarland стандард број 0.5, који означава густину суспензије 1.5×10^8 CFU/mL. Бактеријска суспензија се преноси стерилним брис штапићем у Петри плочу са хранљивим агаром. Након додавања таблете новобиоцина стерилном пинцетом, Петри плоча се оставља на инкубацију 37°C/24h. Након тога, мери се (у милиметрима) дијаметар зоне инхибиције око таблете новобиоцина и бележи се да ли је бактерија осетљива или резистентна на новобиоцин. Ако је зона инхибиције испод 16 mm, бактерија се сматра резистентном, а ако је већа од 16 mm, бактерија се сматра осетљивом на деловање новобиоцина (Murray и сар., 2003).

Протеолитичка активност

Протеолитичка активност бактерија је испитивана по методи коју су описали Harrigan and McCance (1976), са модификацијама. Подлога се прави мешањем хранљивог агара и млека (1.6% млечне масти) у односу 1:1. Бактерије се асептично преносе на подлогу и оставе на инкубацију на 37°C/24-48h. Након тога, хранљива подлога се прелије реагенсом за

протеолите (Луголов раствор), и прати се појава прозирне зоне око пораслих бактерија. Ако има зоне, бактерије имају протеолитичку активност, ако је нема, онда немају протеолитичку активност. Као позитивна контрола коришћен је сој *Bacillus subtilis*.

Липолитичка активност

Липолитичка активност бактерија је испитивана по методи коју су описали Harrigan and McCance (1976), са модификацијама. Подлози која се прави додавањем жуманцета јајета (4%) у хранљиви агар. Бактерије се асептично преносе на подлогу и оставе на инкубацију на 37°C/72h. Након тога, прати се појава прозирне зоне око пораслих бактерија, која мора бити већа од 1 mm (Škrinjar, 2001). Ако има зоне, бактерије имају липолитичку активност, ако је нема, онда немају липолитичку активност. Као позитивна контрола коришћен је сој *Bacillus subtilis*.

Продукција егзополисахарида

Детектује се визуелно (појава слузавих колонија) након инкубације изолата на модификованом хранљивом агару са (10%) сахарозом, фруктозом, лактозом и глукозом (Торлак, Београд, Србија) на температури од 37°C/48 часа (Smitinont и сар., 1999).

РЕЗУЛТАТИ/RESULTS

На основу морфологије ћелија, ферментације манитола, раста на различитим температурама (45°C и 15°C), присуства хемоллизе, осетљивости на новобиоцин, раста на крвном агару, протеолитичкој и липолитичкој активности и синтезе егзополисахарида, извршена је прелиминарна идентификација испитиваних бактерија као *Staphylococcus* spp. Резултати истраживања су приказани у табели 1 и табели 2.

Табела 1. Диференцијација и идентификација изолата коагулаза негативних стафилокока изоланих из овчије стеље 2015. године

| Прелиминарна идентификација | Број изолата | Морфологија ћелије | Ферментација манитола | Раст на температури | | Присуство хемоллизе | Осетљивост на новобиоцин | Раст на крвном агару | Продукција протеазе | Продукција липазе | ЕПС |
|-------------------------------|--------------|--------------------|-----------------------|---------------------|----------|---------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----|
| | | | | 45° C | 15° C | | | | | | |
| <i>Staphylococcus xylosus</i> | 2 8 | коке | + | + | + | - | Р | - | - | - | - |

Карактеризација коагулаза негативних стафилокока изолованих из сувог меса овчијег група - сјеничка овчија стеља

| | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|---|------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>Staphylococcus carnosus</i> | 6 | коке | + | + | + | - | О | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 1 | коке | - | + | + | - | Р | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 2 | коке | - | + | + | - | О | - | - | - | - |

ЕПС - синтеза егзополисахарида; Р-резистентне; О-осетљиве

Табела 2. Диференцијација и идентификација изолата коагулаза негативних стафилокока изолованих из овчије стеље 2016. године

| Прелиминарна идентификација | Број изолата | Морфологија ћелије | Ферментација манитолa | Раст на температури | | Присуство хемоллизе | Осетљивост на новобиоцин | Раст на крвном агару | Продукција протеазе | Продукција липазе | ЕПС |
|-------------------------------------|--------------|--------------------|-----------------------|---------------------|----------|---------------------|--------------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----|
| | | | | 45° С | 15° С | | | | | | |
| <i>Staphylococcus xylosum</i> | 2 6 | коке | + | + | + | - | Р | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus carnosus</i> | 6 | коке | + | + | + | - | О | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 2 | коке | - | + | + | - | Р | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0 | коке | - | + | + | - | О | - | - | - | - |

ЕПС - синтеза егзополисахарида; Р-резистентне; О-осетљиве

Табела 3. Процентуална заступљеност појединих врста *Staphylococcus* изолованих из овчије стеље

| Прелиминарна идентификација | Процентуална заступљеност соја |
|-----------------------------|--------------------------------|
| <i>S. xylosus</i> | 77,46% |
| <i>S. carnosus</i> | 15,49% |
| <i>S. saprophyticus</i> | 4,22% |
| <i>S. epidermidis</i> | 2,81% |

Током диференцијације стафилокока овчије стеље, нарочито је битно утврдити следеће параметре: ферментација манитола, осетљивост на новобиоцин и појава хемоллизе на крвном агару. На основу ових тестова се могу прелиминарно издефинисати четири групе стафилокока.

Изолати који имају колоније сиве боје, без ферментације манитола и без хемолитичке активности, са зоном осетљивости на новобиоцин, прелиминарно су идентификовани као *Staphylococcus epidermidis* (2 изолата из 2015. год; нема изолата у узорку из 2016. год.).

Изолати који су имали колоније светложуте боје, без ферментације манитола и без хемолитичке активности, са резистенцијом на новобиоцин, су прелиминарно идентификовани као *Staphylococcus saprophyticus* (1 изолат из 2015. год.; 2 изолата из 2016. год.).

Изолати који су имали колоније жуте боје, са добром ферментацијом манитола, са формираним белим колонијама на крвним плочама и без хемолитичке активности, са резистенцијом на новобиоцин, прелиминарно су идентификовани као *Staphylococcus xylosus* (28 изолата из 2015. год.; 26 изолата из 2016. год.).

Изолати који су имали колоније жуте боје, са ферментацијом манитола, без хемолитичке активности и са белим колонијама на крвним плочама, и зоном осетљивости на новобиоцин, прелиминарно су идентификовани као *Staphylococcus carnosus* (6 изолата из 2015. год.; 6 изолата из 2016. год.).

Може се закључити да је најдоминантнији *S. xylosus* (77,46%), затим *S. carnosus* (15,49%), *S. saprophyticus* (4,22%), а *S. epidermidis* је пронађен у врло ниском проценту од 2,81%.

Оваква прелиминарна идентификација показује присуство одређених представника *Staphylococcus* spp. које су одговорне за органолептичке карактеристике производа, што је потврђено у радовима.

ДИСКУСИЈА/DISCUSSION

Резултати нашег истраживања, у коме је рађена изолација CNS из овчије стеље, у сагласности су са резултатима који се срећу по радовима и који су везани за CNS из традиционално месних производа. CNS су најчешће изоловане из производа чији састав је углавном чинило суво и зрело месо (Aymerich и сар., 2003).

Наше истраживање је показало да највећу бројност међу прелиминарно идентификованим CNS припада *Staphylococcus xylosus* (28 изолата из 2015. год.; 26 изолата из 2016. год.); затим *Staphylococcus carnosus* (6 изолата из 2015. год.; 6 изолата из 2016. год.); затим *Staphylococcus saprophyticus* (1 изолат из 2015. год.; 2 изолата из 2016. год.), а најмање је било *Staphylococcus epidermidis* (2 изолата из 2015. год; нема изолата у узорку из 2016. год. (таб. 1 и таб. 2).

Marty и сар., (2012) у свом раду истичу присуство Грам-позитивних, каталаза позитивних стафилокока у високом проценту од 88,2% у спонтано ферментисаним месним производима. Док Kotzekidou (1992) представља резултате идентификације стафилокока и микрокока изолованих из меса, где од 120 изолата 92,5% су класификоване као стафилококе и 7,5% као микрококе.

Од укупног броја изолата CNS овчије стеље (71), сви су успешно расли на крвним плочама са карактеристичним сивим, светложутим или жутим колонијама и без хемолize. Температуре од 45°C и 15°C нису утицале негативно на пораст свих изолата, па и у овом случају имамо 100% пораст CNS изолованих из овчије стеље.

Carvalho и сар. (2012) у својим резултатима истичу добар пораст CNS на различитим температурама, и најинтензивнији пораст у температурном интервалу од 15°C до 20°C, што указује на њихову примену у технолошким процесима при различитим температурама ферментације.

Синтеза егзополисахарида није запажена код истраживаних изолата

сувог овчијег меса. Сличне резултате су у свом раду представили Ferreira и сар. (2014), где су истакли да при niskим концентрацијама сахарозе истраживани сојеви CNS нису производили егзополисахариде.

На основу прегледа литературе, закључује се да је први пут испитивана липолитичка и протеолитичка активност стафилокока које су изоловане из суве овчије стеље. Продукција липазе и липолитичка активност изолата зависи од врсте намирница (Bezerra dos Santos Rodrigues и сар., 2014).

Протеолитичка и липолитичка активност може да промени квалитет меса и да смањи рок трајања. Изолати врсте *S. aureus* из говеђег меса и пилећег меса нису показали протеолитичку и липолитичку активност на + 4°C. 96,2%, 89,1% и 75,0% изолата врсте *S. aureus* показују протеолитичку активност на + 20°C из говеђег меса и пилећег меса, док 22,8% изолата из пилећег меса показују липолитичку активност (Gundočan и Devren, 2010).

Из шпанских сувомеснатих производа изоловане су стафилококе које су коагулаза негативне и остетљиве на антибиотике. Доминатне су две врсте *S. xylosus* и *Staphylococcus equorum*. Детектована је њихова протеолитичка активност и способност редукације нитрата у нитрите (Lanđeta и сар., 2013).

Да би се доказала потенцијална употреба изолата стафилокока као стартер култура 104 изолата *Staphylococcus* spp. су изоловани из кобасица. Међу овим сојевима, 30% има протеолитичку способност, док је 42% имало липолитичку активност.

Након тога, 10 сојева је испитивано на способност раста на различитим температурама, рН и концентрације NaCl. *S. xylosus* и *S. equorum* су показали најбољи раст на 15°C, 20°C и рН 5.5 и на концентрацијама од 10% и 15% NaCl-а (Carvalho и сар., 2012).

Иоловане су бактерије *S. xylosus*, *S. aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus chromogenes* и *Staphylococcus capitis* из суве кобасице централно-западне Шпаније. Испитивана је њихова способност редукације нитрата, протеолитичка, липолитичка активност, способност раста на различитој рН. Седам сојева са најбољим особинама је тестирано на производњу биогених амина. *S. xylosus* показује најбоље особине и показује потенцијлану употребу као стартер култура (Martín et al., 2007). Врста *S. xylosus* изолована из кобасице, која је карактеристична за јужни регион Бразила, показује одрживост приликом контакта са бактеријама млечне киселине у ферментисаној кобасици (Fiorentini и сар., 2009).

S. epidermidis, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, и *S. carnosus* изоловани из овчије стеље (2015, 2016. год.) нису показали протеолитичку и липолитичку активност.

Два соја *Staphylococcus simulans* (Ссм12, Ссм21) и 4 соја *S. carnosus* (СЦ28, СЦ31, СЦ54 и СЦ55) из ферментисане кобасице, показују способност производње хистамина, кадаверина и путресцина. Резултати показују да сви сојеви поседују корисне технолошке активности /особине које их чине погодним за могуће стартер културе (Casaburi et al., 2005).

На основу прелиминарне идентификације CNS можемо истаћи да у сувом овчијем месу са територије Сјенице доминира *S. xylosus* (77,46%) (таб.3), то је такође у складу са литературним подацима о сличним производима. Socolin и сар., (2001) истичу у свом раду да је *S. xylosus* доминантна CNS у традиционалним италијанским кобасицама.

S. xylosus дефинише органолептику производа низом реакција које се дешавају у производу, при чему су њена технолошка својства потврђена. Утиче на развој боје производа кроз нитрит и нитрат редуктазе и активности каталазе, доприноси развоју укуса као резултат протеолитичких и липолитика активности.

S. xylosus сојеви који су изоловани из традиционалних ферментисаних кобасица у Бразилу препоручени су као стартери у производњи кобасица од стране Fiorentini и сар., (2009).

S. carnosus је изолована у доста мањем проценту из овчије стеље (15,49%) (таб. 3) и такође значајно утиче на органолептику производа. У неким радовима је дефинисана заједно са *S. xylosus* као добар стартер у производњи сувомеснатих производа, показало се да је у стању да произведе метил кетон из непотпуне β-оксидације масних киселина (Corbiere Morot-Bizot и сар., 2007).

S. saprophyticus је прелиминарно идентификована и у овчијој стељи у мањем проценту (4,22%) и сматра се да у производ доспева током процеса производње.

S. xylosus и *S. saprophyticus* утичу у великој мери на органолептику грчких ферментисаних кобасица, одакле су и изоловане као доминантна

микробиота (Paratanoli и сар., 2002; Drosinos и сар., 2005).

Код идентификације CNS сјеничке овчије стеље само 2 изолата су прелиминарно идентификована као *S. epidermidis*. Сличне резултате у свом раду су представили García Fontán и сар., (2007) у коме истичу мали број изолованих *S. epidermidis* из шпанског традиционалног производа Botillo. Сматра се да у производе од меса *S. epidermidis* допева у процесу производње најчешће са коже радника.

Доминантна микробиота стафилокока ферментисаних производа од меса је идентификована као: *S. xylosus* (38%), *S. saprophyticus* (29%) или *Staphylococcus warneri* (10%), осам изолата су остали нераспоређени у врсте (Seager и сар., 1986), (Велика Британија).

ЗАКЉУЧЦИ/CONCLUSIONS

У традиционалној производњи сјеничке овчије стеље, микроорганизми потичу од сировина и окружења у којем се производи израђују. Коагулаза негативне стафилококе изоловане из овог производа утиче на органолептику и значајан је део микробиоте који дефинише потпуну сензорику.

Укупан број истраживаних изолата CNS овчије стеље из девет узорка у две производне године је износио 71, сви изолати су успешно расли на крвним плочама са карактеристичним сивим, светложутим или жутим колонијама и без хемоллизе. Синтеза егзополисахарида није запажена код истраживаних изолата, као ни липолитичка и протеолитичка активност. Сви изолати добро су расли на

температурама од 45°C и 15°C, тако да су, на основу ферментације манитола и осетљивости на новобиоцин, прелиминарно издефинисане четири групе стафилокока, од којих доминира *S. xylosus* (77,46%), затим *S. carnosus*, који је изолован у доста мањем проценту из овчије стеље од 15,49%, *S. saprophyticus* 4,22%, и *S. epidermidis* у врло ниском проценту од 2,81%.

Оваква прелиминарна идентификација захтева детаљније истраживање стафилокока сјеничке овчије стеље као и потпуну идентификацију помоћу PCR методе.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Aktaş, N., Aksu, M. I., & Kaya, M. (2005): *Changes in myofibrillar proteins during processing of pastirma (Turkish dry meat product) produced with commercial starter cultures*. Food chemistry, 90(4), 649-654.
2. Aymerich T., Martin B., Garriga M., Hugas M. (2003): *Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages*, Appl. Environ. Microbiol. 69, 4583e4594.
3. Dos Santos Rodrigues J. B., Pinto T. S., de Oliveira C. P., de Sousa Freitas F. I., Pereira, M. D. S. V., de Souza E. L., & de Siqueria-Júnior J. P. (2014): *Lipolytic activity of Staphylococcus aureus from human wounds, animals, foods, and food-contact surfaces in Brazil*, The Journal of Infection in Developing Countries, 8(08), 1055-1058.
4. Carvalho L., Fernandes M. J., Fernandes H., Semedo-Lemsaddek T., Elias, M., Barreto A. S., & Fraqueza M. J. (2012): *Selection of staphylococci*

- strains isolated from a Portuguese traditional fermented/dry sausage for potential use as starter cultures*, in De Pedro E.J. (ed.), Cabezas A.B. (ed.) .7th International Symposium on the Mediterranean Pig Zaragoza: CIHEAM, Série A. Séminaires Méditerranéens; n. 101, pages 427- 430.
5. Casaburi A., Giuseppe B., Gianluigi M., Olimpia P., Francesco V., (2005): *Technological activities of Staphylococcus carnosus and Staphylococcus simulans strains isolated from fermented sausages*, Meat Science 71: 643-650.
 6. Chapman G.H. (1945): *The significance of sodium chloride in studies of staphylococci*, J. Bacteriol. 50:201-203.
 7. Cocolin, L., Manzano, M., Aggio, D., Cantoni, C., Comi, G. (2001): *A novel polymerase chain reaction (PCR) - denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for the identification of Micrococcaceae strains involved in meat fermentations. Its application to naturally fermented Italian sausages*, Meat Science, **58**, 59-64.
 8. Corbiere Morot-Bizot S., Leroy S., & Talon R. (2007): *Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages*, Journal of applied microbiology, 102(1), 238-244.
 9. Drosinos E.H., Mataragas M., Xiraphi N., Moschonas G., Gaitis, F., Metaxopoulos J. (2005): *Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage*, Meat Sci. 69, 307e317.
 10. Ferreira A. A., Souza Tette P. A., Santos Mendonça R. C., de Souza Soares A., De Carvalho M. M. (2014): *Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in Staphylococcus spp. isolated from a poultry processing plant*, Food Sci. Technol.34 10.1590/1678-457x.6446.
 11. Fiorentini Â. M., Sawitzki M. C., Bertol T. M., & Sant'Anna E. S. (2009): *Viability of Staphylococcus xylosois isolated from artisanal sausages for application as starter cultures in meat products*, Brazilian Journal of Microbiology,40(1), 129-133.
 12. Fontán M. C. G., Lorenzo J. M., Martínez S., Franco I., & Carballo J. (2007): *Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage*, LWT-Food Science and Technology, 40(9), 1610-1622.
 13. Gundočan N., Devren A. (2010): *Protease and lipase activity of Staphylococcus aureus obtained from meat, chicken and meatball samples*, GU J Sci 23(4):381-384.
 14. Harrigan W.F., McCance M.E. (1976): *Laboratory methods in food and dairy microbiology*, Academic Press, London.
 15. Kaban, G., & Kaya, M. (2008): *Identification of Lactic Acid Bacteria and Gram Positive Catalase Positive Cocci Isolated from Naturally Fermented Sausage (Sucuk)*, Journal of food science, 73(8), M385-M388.
 16. Kloos W. E., Tornabene T. G., & Schleifer K. H. (1974): *Isolation and characterization of micrococci from human skin, including two new species: Micrococcus lylae and Micrococcus kristinae*, International Journal of Systematic Bacteriology, 24, 79-101.
 17. Kotzekidou P. (1992): *Identification of staphylococci and micrococci isolated from an intermediate moisture meat product*, Journal of food science,57(1), 249-251.

18. Landeta G. J., A. Curiel A., V. Carrascosa, R. Muñoz, B. de las Rivas (2013): *Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from Spanish dry cured meat products*, Meat Sci. 93(3):387-96.
19. Ledina, T., Mijačević, Z., Bulajić, S., Babić, M. (2013): *Probiotski status bakterija mlečne kiseline*, Veterinarski žurnal Republike Srpske, XIII: 176–192.
20. Maragkoudakis P.A., Mountzouris K.C., Psyras 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.
21. Marty E., Buchs J., Eugster-Meier E., Lacroix C., & Meile L. (2012): *Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP*, Food microbiology, 29(2), 157-166.
22. Martín A., Colín B., Aranda E., Benito MJ., Córdoba MG. (2007): *Characterization of Micrococcaceae isolated from Iberian dry-cured sausages*, Meat Sci. 75(4):696-708.
23. McMichael, A. J., & Bambrick, H. J. (2005): *Meat consumption trends and health: casting a wider risk assessment net*, Public Health Nutrition, 8(04), 341-343.
24. Murray P.R., et al. (2003): *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C
25. Papamanoli E., Kotzekidou P., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. (2002): *Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage*, Food Microbiol. 19, 441e449.
26. Правилник о општим и посебним условима хигијене хране у било којој фази производње, прераде и промета. "Сл. гласник Р. Србије 72/2010"
27. Pripremanje uzoraka za ispitivanje, početne suspenzije i decimalnih razblaženja za mikrobiološko ispitivanje SRPS EN ISO 6887-1: 2008
28. Radulović Z., Martinović A., Radin D., Obradovic D. (2004): *Lactic acid bacteria strains isolated from Sjenica cheese*. Biotechnology in Animal Husbandry, 20(3/4): 49-54.
29. Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., Pappa, A. (1998): *Stability and safety of traditional Greek salami—a microbiological ecology study*, International Journal of Food Microbiology 44, 69–82.
30. Seager M. S., Banks J. G., Blackburn C. D. W., & Board R. G. (1986): *A taxonomic study of Staphylococcus spp. isolated from fermented sausages*, Journal of Food Science, 51(2), 295-297.
31. Smitinont, T., Tansakul, C., Tanasupawat, S., Keeratipibul, S., Navarini, L., Bosco, M., & Cescutti, P. (1999): *Exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains from traditional Thai fermented foods: Isolation, identification and exopolysaccharide characterization*, International Journal of Food Microbiology, 51, 105–111
32. Stamenković, T., Dević B. (2004): *Senzorna svojstva ovčije stelje*, Tehnologija mesa UDK: 637.525.03:636.
33. Škrinjar M. (2001): *Mikrobiološka kontrola životnih namirnica*, Tehnološki fakultet, Novi Sad.