

KARAKTERISTIKE *PEDIOCOCCUS* VRSTA IZDVOJENIH IZ KAČKAVALJA

ANDRIĆ Miroslav, dipl. inž., prof dr Marija ŠUTIĆ
Poljoprivredni fakultet, Zemun

Sažetak

Autor opisuje Pediococcus species izoliran iz kačkavalja od ovčjeg mleka. Izolirani koki pripadaju vrstama Pediococcus cerevisiae ili Pediococcus acidilactici. Odnosi između ove grupe bakterija i bakterije mlečne kiseline uglavnom su indiferentni.

Uvod

Uloga mikroorganizama u zrenju sireva je dobro poznata, ali o mikroorganizmima koji učestvuju u zrenju kačkavalja nema mnogo podataka. Poznata su ispitivanja Girginova ((1954) mikroflore bugarskog kačkavalja, Maskella (1951) mikroflore italijanskog kačkavalja, a u našoj zemlji mikrofloru kačkavalja ispitivali su Stević (1960) i Šutić (1964).

Šutić (1964) je u ispitivanjima mikroflore kačkavalja ustanovila prisustvo bakterija mlečne kiseline, mikrokoka i kvasnica te smatra da su za zrenje ovog sira značajne bakterije mlečne kiseline i mikrokoki. Biohemijska aktivnost ovih mikroorganizama dobro je proučena kod drugih vrsta sireva, pa se može zaključiti da imaju istu ulogu i u zrenju kačkavalja.

U toku ovih ispitivanja izdvojene su i okruglaste bakterije, koje nisu identifikovane, ali bi se, prema nekim karakteristikama, mogle svrstati u rod *Pediococcus*. Međutim, od svih izdvojenih vrsta bakterija iz različitih sireva najmanje je proučena uloga bakterija iz roda *Pediococcus*.

Značajan doprinos ovom pitanju dao je Dacre (1958a, 1958b) proučavajući bakterije roda *Pediococcus* izdvojene iz novozelandskog čedara. On je opisao *Pediococcus cerevisiae* Balcke, kao najviše zastupljenu vrstu iz ove grupe, i izučio njena fiziološka i biohemijska svojstva. Dacre smatra da ove bakterije učestvuju u zrenju novozelandskog čedar sira, jer su zastupljene s 25% u ukupnoj mikroflori ovog sira.

Ispitivanja drugih autora odnose se više na identifikaciju i klasifikaciju pediokoka, a manje na njihovu ulogu u zrenju sireva (Pedersen, 1949; Deibeli Niven, 1960; Gunther i White, 1961; Coster i White, 1964; Nakagawa i Kitahara, 1959. i dr.).

Smatrali smo da će biti korisno da se utvrdi koje su vrste pediokoka zastupljene u kačkavalju i kakvi su odnosi ovih bakterija s drugim bakterijama mlečne kiseline.

Materijal i metodika

Za izdvajanje pediokoka korišćena su dva uzorka pirotskog i jedan uzorak rumunjskog kačkavalja iz pokrajine Dobrudže. Sva su tri uzorka rađena od ovčijeg mleka i odgovarala su standardnim organoleptičkim osobinama.

Za mikrobiološku analizu i izdvajanje pediokoka korišćene su ove hranljive podloge: Rogoza (Rogosa i saradnici, (1951) za brojanje bakterija mlečne kiseline i izolaciju pediokoka; Barnes (Barnes, 1956) za streptokoke, hranljivi agar sa 10% NaCl za mikrokoke, kvašćev dekstrozni agar (YDA) za određivanje ukupnog broja bakterija (Naylor i Sharpe, 1953) i Mac Conkey podloga za *Coli-aerogenes* bakterije. Sve zasejane podloge držane su na 30° C, 48 časova izuzev podloge Rogoza koja je držana 5 dana.

S podloge Rogoza vršena je izolacija pediokoka zasejavanjem po 10 kolonija, iz svakog uzorka kačkavalja, u kvašćev dekstrozni buljon. Mikroskopi-
ranjem je utvrđivana pripadnost okruglastim bakterijama, a metodom iscrpljivanja na čvrstoj podlozi dobijene su čiste kulture.

Identifikacija izdvojenih pediokoka vršena je po metodici Gunthera i Whitea predloženoj 1962. godine, a na osnovu karakteristika izloženih u tabeli 1 (Sharpe, Fryer i Smith, 1966), kao i Bergeyovog priručnika (1974).

Tabela 1

Fiziološke karakteristike sojeva roda *Pediococcus* (Sharpe, Fryer i Smith 1966)

	<i>P. cerevisiae</i>	Grupa III Gunthera i Whitea	<i>P. parvulus</i>	<i>P. damnosus</i>	<i>P. halophilus</i>	<i>P. Aerococcus virida</i>
Rast na 37° C	+	+	+	—	+	+
Rast na 45° C	+	—	—	—	—	—
Rast na pH 4,4	+	—	+	+	—	—
Rast na pH 8,6	+	—	—	—	+	+
Rast na 10% NaCl	slab	—	—	—	+	+
Rast na podlozi Rogoza	+	+	+	+	—	—
Katalaza test	±	—	—	—	—	—
Potreba za 5% NaCl za rast	—	—	—	—	+	—
NH ₃ iz arginina	+	—	—	—	+	—
AMC iz glukoze	+	—	—	±	±	—
Kiselina iz:						
saharoze	—	—	—	—	+	+
arabinoze	+	—	—	—	±	—
rafinoze	—	—	—	—	—	+
sorbitola	—	—	—	—	+	—
dekstrina	—	+	—	—	—	—
maltoze	+	±	+	—	+	+
mlečna kiselina	DL	L (+)	DL	DL	L (+)	L (+)

Ispitivanja biocenotskih odnosa izdvojenih pediokoka i drugih bakterija mlečne kiseline vršena su auksonografskom metodom (Stević i dr., 1964). Za ova ispitivanja korišćene su kulture: 11 izolata pediokoka, 18 izolata štapičastih bakterija mlečne kiseline, i to: *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. helveticum*, *Lb. lactis* i 6 neidentifikovanih sojeva izdvojenih iz kačkavalja, zatim 9 izolata okruglastih bakterija mlečne kiseline, i to: *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. thermophilus* i neidentifikovani sojevi. Bakterije mlečne kiseline su iz kolekcije Laboratorije za mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu.

Biocenotski odnosi ispitivani su na dva načina. U jednom slučaju osnovnu kulturu činile su bakterije mlečne kiseline, a njima su pridružene razvijene kulture pediokoka, u drugom slučaju pediokoki su korišćeni kao osnovne kulture, a pridružene su im bakterije mlečne kiseline. Biocenotski odnosi ispitivani su na kvašćevom dekstroznom agaru (YDA).

Rezultati rada

Rezultati analize ukupnog broja mikroorganizama i broja bakterija mlečne kiseline (na podlozi Rogoza) ispitivanih uzoraka kačkavalja prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2

Zastupljenost bakterija mlečne kiseline u ovčijem kačkavalju

Uzorak	Ukupni broj bakterija	Bakterije mlečne kiseline	
		broj	%
I	48.000.000	35.000.000	72,92
II	225.000.000	81.600.000	36,27
III	150.000.000	55.600.000	37,06

Zapaža se da bakterije mlečne kiseline, dobijene na podlozi Rogoza, značajno učestvuju u mikroflori ovčijeg kačkavalja. Ovo je mali broj uzoraka za jedan definitivni zaključak, ali se ipak može reći da procentualno učešće ovih bakterija zavisi od starosti kačkavalja.

S podloge Rogoza izdvojen je znatan broj okruglastih bakterija i utvrđeno da pripadaju rodu *Pediococcus*. U prvom uzorku sira, od 10 izdvojenih kolonija, 7 je pripadalo okruglastim bakterijama (70%), u drugom uzorku takođe 7 (70%), a u trećem uzorku sira (kačkavalj iz Dobruđe) 9 kolonija, što znači 90%. Prema tome, može se reći da u ispitivanim uzorcima kačkavalja mali broj pripada bakterijama mlečne kiseline štapičastog oblika, a da prevladavaju okruglaste bakterije, i to iz roda *Pediococcus*.

Izdvojeni sojevi roda *Pediococcus* imali su ove karakteristike: bili su gram pozitivni, javljali su se u parovima ili tetradama, katalazna proba im je negativna, a u lakmus mleku većina sojeva stvarala je kiselinu i gruš posle 24 časa; jedan soj je davao gruš posle 72 časa, a kod dva soja gruš je bio pihtijast (mekan).

Za potpunu identifikaciju izdvojeno je 7 sojeva i rezultati su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3

Karakteristike izdvojenih sojeva roda *Pediococcus*

	K-R-III-7	K-DR-2	K-DR-8	K-DR-3	K-DR-10	K-DR-5	K-DR-1
Rast na 37° C	+	+	+	+	+	+	+
Rast na 45° C	+	+	+	+	+	+	+
Rast na pH 4,4	+	+	+	+	+	+	+
Rast na pH 8,2	+	—	—	—	—	+	—
Rast na pH 9,0	+	—	—	—	—	+	—
Rast na 10% NaCl	slab	slab	slab	slab	slab	slab	slab
Rast na podlozi Rogoza	+	+	+	+	+	+	+
Katalaza test	—	—	—	—	—	—	—
NH ₃ iz arginina	—	—	—	—	—	—	—
AMC ^a iz glukoze	+	—	+	—	—	+	+
Kiselina iz:							
saharoze	—	—	—	—	—	+	—
arabinoze	+	—	—	—	+	—	—
sorbitola	+	—	—	—	+	—	—
dekstrina	+	+	+	+	+	+	+
maltoze	—	—	+	+	+	—	—

^aAMC = acetil metil karbinol

Upoređujući rezultate u tabeli 3 i karakteristike *Pediococcus* vrsta, prikazane u tabeli 1, može se reći da ispitivani izolati najviše odgovaraju vrsti *Pediococcus cerevisiae*, a naročito sojevi označeni sa K-R-III-7 i K-DR-5. Međutim, od opisane vrste *P. cerevisiae* razlikuju se u fermentaciji pojedinih šećera, jer se u tabeli 1 vidi da ova vrsta stvara kiselinu iz arabinoze i maltoze, a ne iz dekstrina. Dok, međutim, svi izolati iz kačkavalja stvaraju kiselinu iz dekstrina, dotle 4 izolata ne stvaraju kiselinu iz maltoze. Po stvaranju kiseline iz dekstrina pripadale bi grupi III Gunthera i Whitea, ali se u drugim karakteristikama potpuno ne poklapaju.

Prema priručniku *Bergeya* (1974) izolati iz kačkavalja više bi odgovarali vrsti *P. acidilactici*.

Rezultati ispitivanja biocenotskih odnosa izdvojenih pediokoka i bakterija mlečne kiseline prikazani su u tabeli 4, uticaj štapičastih bakterija mlečne kiseline na pediokoke u tabeli 5 i uticaj okruglastih bakterija mlečne kiseline na pediokoke u tabeli 6.

Iz rezultata u tabelama 4, 5 i 6 vidi se da između ispitivanih bakterija vladaju, uglavnom, indiferentni odnosi. Iz tabele 4 zapaža se da tri izolata *Pediococcus* vrsta deluju inhibitorno na tri ispitivane bakterije okruglastog oblika i tri soja štapičastog oblika bakterija mlečne kiseline. Kod ovih ispitivanja nisu u svim slučajevima korišćene sve bakterije mlečne kiseline štapičastog oblika (18), već manji broj (9).

Rezultati u tabeli 5 pokazuju da i neke bakterije mlečne kiseline ispoljavaju inhibiciju na jedan ili dva ispitivana *Pediococcus* izolata, dok, međutim, svi ispitivani streptokoki pokazuju, u odnosu na *Pediococcus* izolate, samc indiferentan odnos (tabela 6).

Tabela 4

Uticaј pridruženih sojeva *Pediococcus* na bakterije mlečne kiseline

Pridruženi sojevi	Uticaј na okruglaste bakterije				Uticaј na štapičaste bakterije				
	Stimulacija	Inhibicija	Indiferentnost	Indiferentnost	Stimulacija	Inhibicija	Indiferentnost	Indiferentnost	
<i>Pediococcus</i>	Broj bakterija	Broj bakterija	Broj bakterija	Broj bakterija	Broj bakterija	Broj bakterija	Broj bakterija	Broj bakterija	
	%	%	%	%	%	%	%	%	
K-R-III-10	—	1	12,50	8	87,50	—	0	9	100
K-dr-10	—	0	0	9	100	—	0	9	100
K-R-3-1	—	1	12,50	8	87,50	—	1	17	94,10
K-dr-5	—	1	12,50	8	87,50	—	0	18	100
K-dr-3	—	0	0	9	100	—	0	9	100
K-dr-8	—	0	0	9	100	—	0	18	100
K-dr-2	—	0	0	9	100	—	0	9	100
K-R-III-7	—	0	0	9	100	—	0	18	100
K-dr-1	—	0	0	9	100	—	0	18	100
1-bk-1	—	—	—	—	—	—	1	17	94,10
K-R-3-2	—	—	—	—	—	—	1	8	87,50

Tabela 5

Uticaj pridruženih sojeva laktobakterija na *Pediococcus* izolate

Pridruženi sojevi laktobakterija	Uticaj na pediokoke					
	Stimulacija		Inhibicija		Indiferentnost	
	Broj bakterija	%	Broj bakterija	%	Broj bakterija	%
R-T-8-2	—	—	—	—	9	100
BM-1-Š	—	—	—	—	9	100
MB-6-Š	—	—	—	—	9	100
BM-10-Š	—	—	—	—	9	100
BM-11-Š	—	—	—	—	9	100
BM-13-Š	—	—	1	11,10	8	88,90
BM-15-Š	—	—	—	—	9	100
BM-16-Š	—	—	—	—	9	100
BM-19-Š	—	—	—	—	9	100
BM-8-Š	—	—	—	—	9	100
BM-14-Š	—	—	1	11,10	8	88,90
BM-12-Š	—	—	—	—	9	100
1-R-K-7	—	—	—	—	9	100
BM-18-Š	—	—	1	11,10	8	88,90
BM-3-Š	—	—	1	11,10	8	88,90
BM-7-Š	—	—	—	—	9	100
BM-9-Š	—	—	2	22,20	7	77,80
BM-4-Š	—	—	1	11,10	8	88,90

Tabela 6

Uticaj pridruženih sojeva streptokoka na *Pediococcus* izolate

Pridruženi sojevi streptokoka	Uticaj na pediokoke					
	Stimulacija		Inhibicija		Indiferentnost	
	Broj bakterija	%	Broj bakterija	%	Broj bakterija	%
BM-6-S	—	—	—	—	9	100
AK-43	—	—	—	—	9	100
AK-60	—	—	—	—	9	100
BM-10-S	—	—	—	—	9	100
Str. cremoris	—	—	—	—	9	100
AK-4	—	—	—	—	9	100
BM-5-S	—	—	—	—	9	100
AK-253	—	—	—	—	9	100

Diskusija

Rezultati ovih ispitivanja pokazuju da u zrenju kačkavalja, pored streptokoka i mikrokoka (Šutić, 1964), učestvuju i okruglaste bakterije roda *Pediococcus*. Budući da nije praćena dinamika ovih bakterija, ne može se reći u kojoj fazi zrenja dostižu najveći broj. Međutim, u ovim ispitivanjima korišćeni su sirevi za tržišta, što znači zreli sirevi, za izdvajanje pediokoka i na podlozi Rogoza njihov je broj bio veći (70 do 90%) nego broj štapičastih bakterija mlečne kiseline. Prema tome, može se reći da su u kasnijim fazama zrenja kačkavalja pediokoki zastupljeni u većem broju nego štapičaste bakterije mlečne kiseline.

Naylor i Sharpe (1958) u ogledima sa čedar sirom utvrdili su prisustvo velikog broja pediokoka kroz ceo period zrenja sira. Budući da rastu na acetatnoj podlozi, ovi autori smatraju da im je metabolizam sličan laktobakterijama i da, prema tome, mogu imati istu ulogu u zrenju sira. Dacre (1958 b) navodi da se pediokoki pojavljuju u čedar siru u isto vreme kada i laktobakterije i da utiču na stvaranje tipičnog mirisa za čedar sir u procesu zrenja.

U rezultatima smo naveli da pediokoki izolovani iz kačkavalja pripadaju vrsti *P. cerevisiae* ili *P. acidilactici*. Mora se istaći da je teško izvršiti tačnu identifikaciju, jer predloženi sistemi prikazuju suprotne karakteristike za *P. cerevisiae*. Tako, npr., u priručniku Bergeya (1974) navodi se da *P. cerevisiae* za razliku od *P. acidilactici* ne raste na pH — 7 i 35° C. Prema tabeli 1, koju smo naveli za identifikaciju (Sharpe i sar., 1966), *P. cerevisiae* raste i pri pH — 4,4 i 8,6, a u odnosu na temperaturu raste i na 37 i 45° C, a pri tome se ne pominje vrsta *P. acidilactici*. Pored toga, postoje i razlike u fermentaciji šećera. Prema Sharpeu i sar. (1966) *P. cerevisiae* ne stvara kiselinu iz dekstrina, a u Bergeyu se ne navodi ova karakteristika, dok za *P. acidilactici* stoji da ne stvara kiselinu iz dekstrina. Međutim, svi izolati iz kačkavalja prikazani u tabeli 3 stvaraju kiselinu iz dekstrina. Dacre je (1958 a) također dobio izolate pediokoka iz čedara, koji su stvarali kiselinu iz dekstrina. Očigledno je da ova grupa bakterija nije dovoljno izučena i da zbog toga postoje neslaganja u karakteristikama pojedinih vrsta.

Za izolate iz kačkavalja može se reći da pripadaju rodu *Pediococcus* i da su veoma slični vrsti *P. cerevisiae* (Sharpe i sar., 1966) ili vrsti *P. acidilactici* (Bergey, 1974).

Svakako bi se morao izolovati veći broj *Pediococcus* sojeva iz kačkavalja različite starosti i ispitati njihove karakteristike, a naročito uloga u procesu zrenja ovog sira.

Interesantno je istaći da ove bakterije nisu pokazale stimulativan odnos ni sa jednom ispitivanom vrstom streptokoka ili laktobakterija. Biocenotski odnosi ovih bakterija bili su uglavnom indiferentni, a u malom broju slučajeva ispoljila se inhibicija.

Zaključak

Iz kačkavalja rađenog iz ovčijeg mleka izdvojene su okruglaste bakterije i utvrđeno je da pripadaju rodu *Pediococcus*.

Izolovani sojevi identifikovani su kao *P. cerevisiae* (Sharpe i sar., 1966) i *P. acidilactici* (Bergey, 1974).

Biocenotski odnosi između izolovanih pediokoka i drugih bakterija mlečne kiseline štapičastog i okruglastog oblika su uglavnom indiferentni (oko 90%) a samo u malom broju slučajeva ispoljila se inhibicija.

CHARACTERISTICS OF PEDIOCOCCI ISOLATED FROM KACHKAVAL CHEESE

Summary

From Kachkaval cheese of sheep milk cocci of *Pediococcus* species were isolated.

The isolated cocci belonged to *Pediococcus cerevisiae* (according to Sharpe et al., 1966) or *Pediococcus acidilactici* (according to Bergey, 1974).

The biocenotic relationship among isolated pediococci and lactobacilli and streptococci were mostly indifferent (in approximately 90% of cases). The antagonistic relationship among them was only in small number (10%) expressed.

Literatura

1. BERGEY'S Manual of Determinative bacteriology. 1974. Co-editors: Buchanan, E. R. and N. E. Gibbons. The Williams & Wilkins Company. Baltimore.
2. BARNES, E. M. 1956. *J. appl. Bact.* 19, 193.
3. COSTER, E. & WHITE, H. R. 1964. Further studies of the Genus *Pediococcus*. *J. gen. Microbiol.*, 37, 15.
4. DACRE, J. C. 1958a. Characteristics of a presumptive *Pediococcus* occurring in New Zealand cheddar cheese. *The J. of Dairy Res.* 25, 3, 409—413.
5. DACRE, J. C., 1958b. A note on the Pediococci in New Zealand Cheddar cheese. *The J. of Dairy Res.* 25, 3, 414—417.
6. DEIBEL, R. H. & NIVEN, C. F. Jr. 1960. Comparative study of *Gaffkya homari*, *Aerococcus viridans*, tetrad-forming cocci from meat curing brines, and the genus *Pediococcus*. *J. Bact.* 79, 175.
7. GIRGINOV, T. 1954. Proučvanija vrhu mlečnokiselata mikroflora v kaškavala. *Naučni trudove*, tom. I.
8. GUNTHER, H. L. & WHITE, H. R. 1961. The cultural and physiological characters of the pediococci. *J. gen. Microbiol.* 26, 185.
9. GUNTHER, H. L. & WHITE, H. R. 1962. Proposed designation of a neotype strain of *Pediococcus cerevisiae* Balcke. *Int. Bull. bact. Nomencl.* 12, 185.
10. MASKELL, K. T., HARGROVE, R. E. and TITSLER, R. P. 1951. A preliminary report on the bacteriology of Provolone and Romano cheese. *J. Dairy Sci.* 34, 476.
11. NAKAGAWA, A. & KITAHARA, K. 1959. Taxonomic studies on the genus *Pediococcus*. *J. gen. Microbiol.* Tokyo, 5, 95.
12. NAYLOR, J. & SHARPE, M. E. 1958. Lactobacilli in Cheddar cheese. I. The use of selective media for isolation and serological typing for identification. *J. Dairy Res.* 25, 92.
13. NAYLOR, J. & SHARPE, M. E. 1958. Lactobacilli in Cheddar cheese. II. Duplicate cheeses. *J. Dairy Res.* 3, 421—430.
14. PEDERSEN, C. S. 1949. The genus *Pediococcus*. *Bact. Rev.* 13, 225.
15. ROGOSA, M., MITCHELL, J. A. & WISEMAN, R. F. 1951. A selective medium for the isolation of oral and faecal lactobacilli. *J. Bact.* 62, 132—133.
16. SHARPE, M. E., T. F. FRYER and D. G. SMITH. 1966. Identification of the Lactic Acid Bacteria. Eds: Gibbs, B. M. & Skinner, F. A. Identification methods for microbiologist, part A. 65—79. New York: Academic Press Inc.
17. STEVIĆ, B. 1960. Konzervisanje namirnica jonizacionim zračenjima. I. Dejstvo gama zrakova na mikrofloru i organoleptičke osobine kaškavalja. *Arhiv za polj. nauku*, III, 40, 97—105.
18. STEVIĆ, B., STOJANOVIĆ, M. i DANIČIĆ, M. 1964. Biocenotski odnosi nekih vrsta kvasnica iz rodova *Saccharomyces*, *Hansenula* i *Kloeckera* pri gajenju u združenim kulturama. *Mikrobiologija*, 1 (1), 85—95.
19. ŠUTIĆ, M. 1964. Odnosi i uloga pojedinih grupa mikroorganizama u toku zrenja kaškavalja. Doktorska disertacija. Zbornik radova Polj. fakulteta, XIV, 410, 1966.