

---

## **PSEUDOMONAS FLUORESCENS IN SHEEP MILK GREEK YOGHURT FROM VLASINA – A BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION**

**Srdan Tasić**

The Academy of Applied Technical and Preschool Studies, Niš, Serbia, [srdjan.tasic@akademijanis.edu.rs](mailto:srdjan.tasic@akademijanis.edu.rs)

**Aleksandar Janjić**

The Academy of Applied Technical and Preschool Studies, Niš, Serbia

**Abstract:** *Pseudomonas fluorescens* is an aerobic, rod-shaped, non-sporulating gram-negative bacteria, mostly found in soil, decaying organic matter and feces. This species contaminates the milk mainly through animal feed dust, silage, utensils and polluted water. In addition to casein digestion, this psychotropic and lipolytic species generates butyric and caproic acids by fermentation of milk fat, which release a strong unpleasant odor and give a rancid and bitter taste to dairy products. In this study we tested 48 hours old sheep's sour milk, produced in a household in Vlasina, southeastern Serbia, using traditional method. Standard bacteriological protocols were used for isolation and identification *Pseudomonas fluorescens* strains. Biochemical identification was performed using the commercial API 32GN E system, and 60473057073 profile was obtained (*Pseudomonas fluorescens*, %Id=99.5 and T=0.74). Positive biochemical tests were: N-acetyl-glukosamine (NAG), D-Ribose (RIB), Sodium malonate (MNT), Sodium acetate (ACE), Lactic acid (LAT), L-Alanine (ALA), D-Mannitol (MAN), D-Glucose (GLU), L-Arabinose (ARA), Capric acid (CAP), Valeric acid (VALT), Trisodium citrate (CIT), L-Histidine (HIS), Potassium 2-ketogluconate (2KG), 3-Hydroxybutyric acid (3OBU), 4-Hydroxybenzoic acid (pOBE), L-Serine (SER), L-Proline (PRO) and Oxidase (OX). Negative biochemical tests were: L-Rhamnose (RHA), Inositol (INO), D-Saccharose (SAC), D-Maltose (MAL), Itaconic acid (ITA), Suberic acid (SUB), Salicin (SAL), D-Melibiose (MEL), L-Fucose (FUC), D-Sorbitol (SOR), Propionic acid (PROP), Potassium 5-ketogluconate (5KG), Glycogen (GLYG) and 3-hydroxybenzoic acid (mOBE). Based on the example of the strain *Pseudomonas fluorescens*, the API ID 32 GN system proved to be precise and very efficient in the identification of this lipolytic type. Given that pasteurization and cooling processes do not entirely inhibit the enzyme activity and growth of this psychotropic bacteria, informing individual milk and milk product manufacturers in the Vlasina region about good manufacturing practices would limit contamination and bacteriological deterioration.

**Keywords:** *Pseudomonas fluorescens*, sheep milk greek yoghurt, ID 32 GN, biochemical characterization.

## **PSEUDOMONAS FLUORESCENS U OVČIJEM KISELOM MLEKU SA VLASINE – BIOHEMIJSKA KARAKTERIZACIJA**

**Srdan Tasić**

Akademija tehničko-vaspitačkih strukovnih studija, Niš, Srbija, [srdjan.tasic@akademijanis.edu.rs](mailto:srdjan.tasic@akademijanis.edu.rs)

**Aleksandar Janjić**

Akademija tehničko-vaspitačkih strukovnih studija, Niš, Srbija

**Rezime:** *Pseudomonas fluorescens* je aerobna štapičasta nesporulišuća gram negativna bakterija koja je uglavnom prisutna u zemljištu, truloj organskoj materiji i fekalijama. Ova vrsta u mleko dospeva najčešće putem prašine iz stočne hrane, silaže, pribora i zagađene vode. Pored razlaganja kazeina ova psihrotrofna lipolitička vrsta u mlečnoj masti stvara buternu i kapronsku kiselinu koje imaju jak neprijatan miris što mlečnim proizvodima daju užegli i gorak ukus. Predmet ispitivanja bilo je ovčije kiselo mleko starosti od 48 h koje je uzeto iz individualnog domaćinstva na Vlasini, jugoistočna Srbija. Za izolaciju *Pseudomonas fluorescens* su korišćene standardne bakteriološke metode. Biohemijska karakterizacija urađena je pomoću automatskog sistema ID 32 GN pri čemu je dobijen profil 60473057073. Dobijen je procenat identifikacije %Id=99.5, T=0.74 (*Pseudomonas fluorescens*). Pozitivni biohemijski testovi bili su: N-acetil-glukozamin (NAG), D-riboza (RIB), natrijum malonat (MNT), natrijum acetat (ACE), laktat (LAT), L-alanin (ALA), D-manitol (MAN), D-glukoza (GLU), L-arabinoza (ARA), kaprat (CAP), valerat (VALT), citrat (CIT), L-histidin (HIS), natrijum 2-ketogluconat (2KG), 3-hidroksibutirat (3OBU), 4-hidroksibenzoat (pOBE), L-serin (SER), L-prolin (PRO) i oksidaza (OX). Negativni biohemijski testovi bili su: L-ramnoza (RHA), inozitol (INO), D-saharoz (SAC), D-maltoza (MAL), itakonat (ITA), suberat (SUB), salicin (SAL), D-melibioza (MEL), L-fukoza (FUC), D-sorbitol (SOR), propionat (PROP), kalijum 5-ketogluconat (5KG), glikogen (GLYG) i 3-hidroksibenzoat (mOBE). Na primeru ispitivanog soja *Pseudomonas fluorescens* API

ID 32 GN sistem pokazao se kao precizan i veoma efikasan u identifikaciji ove lipolitičke vrste. S obzirom da procesi pasterizacije i hlađenja ne inhibiraju u potpunosti enzimsku aktivnost i rast ove psihrotrofne bakterije važno je edukovati individualne proizvođače mleka i mlečnih proizvoda na Vlasini o dobroj proizvođačkoj praksi čime bi se ograničila kontaminacija i bakterijsko kvarenje

**ključne reči:** *Pseudomonas fluorescens*, ovčije kiselo mleko, ID 32 GN, biohemijska karakterizacija.

## 1. UVOD

Cilj ovog istraživanja je identifikacija sojeva *Pseudomonas ps.* izolovanih iz ovčijeg kiselog mleka sa Vlasine, jugoistočna Srbija. Ispitivano je ovčije kiselo mleko starosti od 48 uzeto iz individualnog domaćinstva koje ga priprema na tradicionalan način. Ovčije mleko karakteriše veći sadržaj proteina i mlečne masti u odnosu na kravlje. Autohtoni mlečni proizvodi Vlasine su sve više traženi na tržištu Srbije (Tasić et al., 2021).

Jedinstvena fizičko-hemijska i biohemijska svojstva ovčijeg mleka uključuju prebiotike i probiotike koji ga čine savršenom funkcionalnom hranom za unapređenje zdravlja ljudi i smanjenja rizika od bolesti (Mohapatra et al., 2019).

*Pseudomonas* vrste su aerobne štapičaste nesporelišne gram-negativne bakterije koje su uglavnom prisutne u zemljištu, truloj organskoj materiji i fekalijama. Ove vrste u mleko dospevaju najčešće putem prašine iz stočne hrane, silaže, pribora i zagađene vode. Pored razlaganja kazeina psihrotrofne lipolitički sojevi *Pseudomonas* u mlečnoj masti stvaraju buternu i kapronsku kiselinu koje imaju jak neprijatan miris što mlečnim proizvodima daju užegli i gorak ukus (Martins et al., 2015). Dokazano je od gram-negativnih u pasterizovanom mleku dominiraju vrste roda *Pseudomonas* (Maske et al., 2020). Zbog navedenih osobina, pored detekcije patogenih bakterija, u mlečnim proizvodima neophodno je istraživanje i prisustva *Pseudomonas* vrsta.

Hlađenje mleka i proizvoda od mleka poboljšava rok trajanja ali ne sprečava rast psihrotrofnih mikroorganizama poput *Pseudomonas* vrsta čiji pojedini sojevi imaju sposobnost sinteze tremostabilnih lipaza i proteaza (Dechemi et al., 2005).

## 2. MATERIJAL I METODE

Predmet ispitivanja bilo je pet uzoraka ovčijeg kiselog mleka starosti dva dana čija je pH vrednost bila 4.2 – 4.4.

Za uzorkovanje i izolaciju vrsta roda *Pseudomonas* korišćene su standardne bakteriološke metode.

*Kultivacija izolata Pseudomonas sp.* urađena je u TYEP bujonu (tripton 1%, ekstrakt kvasca 0.25%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1%, i CaCl<sub>2</sub> 0.25%) na 25 °C uz aeraciju.

Biohemijska karakterizacija dobijenih izolata urađena je pomoću automatskog identifikacionog sistema ID 32 GN (BioMérieux).

ID 32 GN je kvalitativni standardizovan sistem za automatsku identifikaciju gram-negativnih štapičastih bakterijskih vrsta (Reynaud et al., 1988). Koristi minijaturizirane testove asimilacije. Nakon manualne inokulacije tzv. stripa očitavanje se izvodi automatski a identifikacija se dobiva pomoću identifikacionog softvera.

ID 32 GN strip se sastoji od 32 kupule, od kojih svaka kao supstrat sadrži dehidrirana organska jedinjenja. Inokulacija se vrši pomoću minimalnog medijuma u koji je prethodno suspendovan soj koji testiramo.

Nakon 24 do 48 sati inkubacije, očitavanje i interpretacija rezultata se vrši automatski pomoću ATB™ aparata i softvera za njegovu identifikaciju. Aparat detektuje da li ima rasta u svakoj kupuli i tu informaciju šalje u računar koji pretvara ovu informaciju u 11-cifarni numerički profil i identifikuje dati soj (Monget et al., 1985).

## 3. REZULTATI

U svim ispitivanim uzorcima nije detektovano prisustvo vrsta familije *Enterobacteriaceae*. Prisustvo *Pseudomonas sp.* dokazano je kod svih pet uzoraka kiselog mleka. Numerički profil svih ovih sojeva bio je isti 60473057073 sa procentom identifikacije %Id=99.5, T=0.74 što je odgovara taksonu *Pseudomonas fluorescens*.

Biohemijska karakterizacija ovih sojeva urađena je pomoću automatskog sistema ID 32 GN. Pozitivni biohemijski testovi bili su: N-acetil-glukozamin (NAG), D-riboza (RIB), natrijum malonat (MNT), natrijum acetat (ACE), laktat (LAT), L-alanin (ALA), D-manitol (MAN), D-glukoza (GLU), L-arabinoza (ARA), kaprat (CAP), valerat (VALT), citrat (CIT), L-histidin (HIS), natrijum 2-ketoglukonat (2KG), 3-hidroksibutirat (3OBU), 4-hidroksibenzoat (pOBE), L-serin (SER), L-prolin (PRO) i oksidaza (OX). Negativni biohemijski testovi bili su: L-ramnoza (RHA), inozitol (INO), D-saharoza (SAC), D-maltoza (MAL), itakonat (ITA), suberat (SUB), salicin (SAL), D-melibzoza (MEL), L-fukoza (FUC), D-sorbitol (SOR), propionat (PROP), kalijum 5-ketoglukonat (5KG), glikogen (GLYG) i 3-hidroksibenzoat (mOBE).

## 4. DISKUSIJA

Koliformne bakterije su najrasprostranjeniji indikator higijenske ispravnost i mleka i mlečnih proizvoda.

U ovu grupu spadaju aerobne ili fakultativno anaerobne štapičaste gram-negativne bakterije koje ne formiraju spore i sposobne su da fermentišu laktozu što rezultira proizvodnjom gasa i kiseline u roku od 48 h na 32 -35 °C (Davidson et al., 2004). U *Enterobacteriaceae* spadaju i vrste koje su prisutne u mlečnim proizvodima a nemaju sposobnost fermentacije laktoze (Masiello et al., 2016). Većina objavljenih istraživanja o indikatorima higijene proizvoda od mleka fokusira se na utvrđivanje prisustva koliformnih vrsta (Martin et al., 2012). Međutim, najnovija istraživanja sugerišu da određivanje ukupnog broja gram-negativnih vrsta preciznije odražava higijenski status ovih namirnica (Hervert et al., 2017). S tim u vezi značajno mesto pripada *određivanju* i vrsta roda *Pseudomonas*. U jogurtu *Pseudomonas sp.* obično strada u roku od 48 časova (Birolo et al., 2001) mada je zabeleženo da u jogurtu pojedine vrste ovog roda (*Pseudomonas paucimobilis*) mogu preživeti i do 45 dana (Canganella et al., 1999). Laktobacili u kiselom mleku pokazuju mnogo bolju antibakterijsku aktivnost protiv pojedinih enterobakterija nego protiv *Pseudomonas aeruginosae* (El-Mokhtar et al., 2020). Dokazana je antimikrobna aktivnost *Lactobacillus bulgaricus* protiv *Pseudomonas aeruginosae* ATCC 9027 (Tumbarški et al., 2021). Za razliku od laktobacila *Streptococcus thermophilus* ne pokazuje antimikrobnu aktivnost protiv *Pseudomonas aeruginosae* (Yerlikaya et al., 2020).

Do kontaminacije ovčijeg kiselog mleka može da dođe i pre i posle fermentacije što znači da bi osim utvrđivanja prisustva gram-negativnih fakultativno anaerobnih bakterija trebalo vršiti i detekciju i ostalih gram-negativnih aerobnih bacila.

Najnovije studije pokazuju da u mleku i mlečnim proizvodima ne dominiraju bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* već gram-negativne vrste rodova *Pseudomonas* i *Acinetobacter* (Hervert et al., 2016) što ukazuje na potrebu i testiranja vrsta roda *Pseudomonas* kao indikatora higijene.

U radu smo dokazivanjem prisustva *Pseudomonas fluorescens*, u svim ispitivanim uzorcima ovčijeg kiselog mleka, potvrdili da ova vrsta može opstati i pri niskoj pH vrednosti (koja je u našem slučaju iznosila 4,4-4,6). Ovo istovremeno znači da *P. fluorescens* opstaje i u mikroflori kiselog mleka gde apsolutnu dominaciju imaju vrste rodova *Lactobacillus* i *Streptococcus* tj. da je otporan na njihova inhibitorna jedinjenja.

Dobijeni rezultati ukazuju da je potrebno maksimizirati detekciju bakterija na širok spektar gram-negativnih vrsta, relevantnih za mlečne proizvode, radi utvrđivanja kontaminacije. Na ovaj način je moguće blagovremeno reagovati i sprečiti narušavanje kvaliteta gotovog proizvoda.

## 5. ZAKLJUČAK

*Pseudomonas fluorescens* je psihrotrofna lipolitička vrsta koja razlaže kazein i u mlečnoj masti stvara buternu i kapronsku kiselinu koje imaju jak neprijatan miris što mlečnim proizvodima daju užegli i gorak ukus. Zbog navedenih osobina neophodno je u mleku i mlečnim proizvodima istraživati i prisustvo *Pseudomonas* vrsta tokom detekcije patogenih bakterija.

Savremene studije pokazuju da u mleku i mlečnim proizvodima ne dominiraju bakterije iz familije *Enterobacteriaceae* već gram-negativne vrste rodova *Pseudomonas* i *Acinetobacter* što ukazuje na potrebu i testiranja vrsta roda *Pseudomonas* kao indikatora higijene.

U svim ispitivanim uzorcima nije detektovano prisustvo vrsta familije *Enterobacteriaceae* a utvrđeno je prisustvo *Pseudomonas sp.* i to kod svih pet uzoraka ovčijeg kiselog mleka. Biohemijskom karakterizacijom potvrđeno je prisustvo *Pseudomonas fluorescens* (%Id=99.5, T=0.74) u svim ovim uzorcima tako da se API ID 32 GN sistem pokazao se kao precizan i veoma efikasan i u identifikaciji ove lipolitičke vrste.

U radu smo dokazivanjem prisustva *Pseudomonas fluorescens*, u svim ispitivanim uzorcima ovčijeg kiselog mleka, potvrdili da ova vrsta može opstati i pri niskoj pH vrednosti (koja je u našem slučaju iznosila 4,4-4,6). Ovo istovremeno znači da *P. fluorescens* opstaje i u mikroflori kiselog mleka gde apsolutnu dominaciju imaju vrste rodova *Lactobacillus* i *Streptococcus* tj. da je otporan na njihova inhibitorna jedinjenja.

Ovo je prva studija u ovom delu Srbije koja je dokazala prisustvo *Pseudomonas fluorescens* u ovčijem kiselom mleku.

Dobijeni rezultati ukazuju da je potrebno maksimizirati detekciju bakterija na širok spektar gram-negativnih vrsta, relevantnih za mlečne proizvode, radi utvrđivanja kontaminacije. Na ovaj način je moguće blagovremeno reagovati i sprečiti narušavanje kvaliteta gotovog proizvoda.

## LITERATURA

- Birolo, G. A., Reinheimer, J. A., & Vinderola, C. G. (2001). Enterococci vs non-lactic acid microflora as hygiene indicators for sweetened yoghurt. *Food Microbiology*, 18(6), 597-604.
- Dechemi, S., Benjelloun, H., & Lebeault, J. M. (2005). Effect of modified atmospheres on the growth and extracellular enzyme activities of psychrotrophs in raw milk. *Engineering in life sciences*, 5(4), 350-356.

- Hervert, C. J., Alles, A. S., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2016). Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. *Journal of dairy science*, 99(9), 7033-7042.
- Hervert, C. J., Martin, N. H., Boor, K. J., & Wiedmann, M. (2017). Survival and detection of coliforms, Enterobacteriaceae, and gram-negative bacteria in Greek yogurt. *Journal of Dairy Science*, 100(2), 950-960.
- Canganella, F., Nespica, M. L., Giontella, D., & Trovattelli, L. D. (1999). Survival of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas paucimobilis* in yoghurts manufactured from cow's milk and soymilk during storage at different temperatures. *Microbiological research*, 154(1), 15-21
- Davidson, P. M. (2004). Coliform and other indicator bacteria. *Standard methods for the examination of dairy products*, 187-226.
- El-Mokhtar, M. A., Hassanein, K. M., Ahmed, A. S., Gad, G. F., Amin, M. M., & Hassanein, O. F. (2020). Antagonistic activities of cell-free supernatants of lactobacilli against extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance*, 13, 543.
- Maske, B. L., Pereira, G. V. D. M., CARVALHO NETO, D. P. D., Lindner, J. D. D., Letti, L. A. J., Pagnoncelli, M. G., & Soccol, C. R. (2020). Presence and persistence of *Pseudomonas* sp. during Caspian Sea-style spontaneous milk fermentation highlights the importance of safety and regulatory concerns for traditional and ethnic foods. *Food Science and Technology*, 41, 273-283.
- Martins, M. L., Pinto, U. M., Riedel, K., & Vanetti, M. C. (2015). Milk-deteriorating exoenzymes from *Pseudomonas fluorescens* 041 isolated from refrigerated raw milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 207-217.
- Martin, N. H., Carey, N. R., Murphy, S. C., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2012). A decade of improvement: New York State fluid milk quality. *Journal of dairy science*, 95(12), 7384-7390.
- Masiello, S. N., Martin, N. H., Trmčić, A., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2016). Identification and characterization of psychrotolerant coliform bacteria isolated from pasteurized fluid milk. *Journal of Dairy Science*, 99(1), 130-140.
- Mohapatra, A., Shinde, A. K., & Singh, R. (2019). Sheep milk: A pertinent functional food. *Small ruminant research*, 181, 6-11.
- Monget, D., Freney, J., BOEUFTRAS, J., Desmonceaux, M., Guicherd, M., & Ponchon, S. (1985). Nouveaux systèmes d'identification des bacilles à gram négatif utilisant des tests d'assimilation: API 20 NE et ATB 32 GN. *Innovation et technologie en biologie et médecine*, 6(2), 228-235.
- Reynaud, A. E., Coude du Foresto, B., & Courtieu, A. L. (1988). Etude comparative de diverses galeries API pour l'identification des bactéries à Gram négatif. In *Annales de biologie clinique (Paris)* (Vol. 46, No. 4, pp. 259-262).
- Tasić, S., Tasić, N., (2021): *Biochemical characterization of Enterobacter cloacae from sheep cheese*, VII International Congress "Engineering, Environment and Materials in Process Industry EEM2021", Book of abstracts, Jahorina, March 17-19, 2021, p. 121.
- Tumbarški, Y. D., Yanakieva, V. B., Denkova-Kostova, R. S., & Denkova, Z. R. (2021). ISOLATION, IDENTIFICATION AND COMPARISON OF SOME PROPERTIES OF LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS STRAINS FROM TRADITIONAL BULGARIAN AND ITALIAN YOGURTS. *Carpathian Journal of Food Science & Technology*, 13(1).
- Yerlikaya, O., Saygili, D., & Akpinar, A. (2020). Evaluation of antimicrobial activity and antibiotic susceptibility profiles of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains isolated from commercial yoghurt starter cultures. *Food Science and Technology*, 41, 418-425.