

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Diana PAVELJŠEK

**IDENTIFIKACIJA IN PRIMERJAVA VRST
MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V
TRADICIONALNIH OVČJIH SIRIH S PODROČJA
ZAHODNEGA BALKANA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Diana Paveljšek

**IDENTIFIKACIJA IN PRIMERJAVA VRST MLEČNOKISLINSKIH
BAKTERIJ V TRADICIONALNIH OVČJIH SIRIH S PODROČJA
ZAHODNEGA BALKANA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION AND COMPARISON OF LACTIC ACID
BACTERIA SPECIES FROM TRADITIONAL EWES' CHEESES
FROM WESTERN BALKAN REGION**

GRADUATION THESIS
(University studies)

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Irena Rogelj in za recenzentko prof. dr. Barbara Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Recenzentka: prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Diana Paveljšek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579.67.083:637.35:636.3(043)=163.6
KG	siri/tradicionalni ovčji siri/mikrobiota sira/Kraški ovčji sir/Dolenjski ovčji sir/Bovški ovčji sir/Paški ovčji sir/Krčki ovčji sir/Travnički ovčji sir/Livanjski ovčji sir/Pirotski ovčji sir/Sjenički ovčji sir/mlečnokislinske bakterije/identifikacija bakterij/fenotipske metode/genotipske metode/BIOLOG/izolacija DNA/PCR
AV	PAVELJŠEK, Diana
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2012
IN	IDENTIFIKACIJA IN PRIMERJAVA VRST MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V TRADICIONALNIH OVČJIH SIRIH S PODROČJA ZAHODNEGA BALKANA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 76 str., 7 pregl., 17 sl., 9 pril., 85 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Identifikacija in študije mikrobne združbe tradicionalnih sirov so pomembne za ohranjanje biodiverzitete in zaščito tipičnih lastnosti tradicionalnih sirov. Namen diplomskega dela je bil identificirati 170 prevladajočih sevov MKB, osamljenih iz ovčjih sirov s področja zahodnega Balkana, s sistemom za fenotipsko identifikacijo BIOLOG. Rezultate identifikacij s sistemom BIOLOG smo potrjevali z identifikacijo, dobljeno s PCR in začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za posamezne rodove in vrste bakterij. V vseh sirovih so predstavljeni pomemben delež mikrobne populacije laktobacili (27-37 %), enterokoki (20-35 %) in laktokoki (18-22 %). Najbolj pogosto prisotne bakterijske vrste so bile <i>Lb. casei/paracasei</i>, <i>Lb. plantarum</i>, <i>Ent. faecalis</i>, <i>Ent. casseliflavus</i>, <i>Ent. faecium</i>, <i>Ent. durans</i>, <i>Lac. lactis</i> in <i>Str. thermophilus</i>. Siri s posameznimi področji so se razlikovali po pestrosti mikroflore od tipično MKB (slovenski siri) do zelo neobičajnih bakterij, ki so vključevale tudi vrste rodu <i>Corynebacterium</i>, <i>Microbacterium</i>, <i>Cellulomonas</i>, <i>Dermobacter</i> in <i>Bacillus</i>. Z metodo BIOLOG smo uspeli identificirati 55 % izolatov na nivoju rodu in 51 % izolatov na nivoju vrste. V 44 % pa smo pridobili le predlog o najverjetnejši identifikaciji. Pri primerjavi rezultatov fenotipske in genotipske identifikacije se je 61 % identifikacij ujemalo na nivoju rodu in le 33 % na nivoju vrste. Po naših izkušnjah je sistem BIOLOG premalo zanesljiv, da bi ga uporabili kot edino metodo za identifikacijo bakterij, ki izhajajo iz specifičnih mikrobnih združb. Kljub temu pa smo uspeli, na osnovi rezultatov fenotipske in genotipske identifikacije, ki so se ujemale, opisati prevladajočo mikrofloro ovčjih sirov zahodnega Balkana.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.67.083:637.35:636.3(043)=163.6
CX cheeses/traditional ewes' cheeses/microbial communities in cheese/Karst ewe's cheese/Dolenjski ewe's cheese/Bovški ewe's cheese/Paški ewe's cheese/Krčki ewe's cheese/Travnički ewe's cheese/Livanjski ewe's cheese/Pirotski ewe's cheese/Sjenički ewe's cheese/lactic acid bacteria/identification of bacteria/phenotypic methods/genotypic methods/BIOLOG/DNA isolation/PCR
AU PAVELJŠEK, Diana
AA ROGELJ, Irena (supervisor)/JERŠEK, Barbara (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2012
TI IDENTIFICATION AND COMPARISON OF LACTIC ACID BACTERIA SPECIES FROM TRADITIONAL EWES' CHEESES FROM WESTERN BALKAN REGION
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XIII, 76 p., 7 tab., 17 fig., 9 ann., 85 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Identification and studies of microbial community from artisanal cheeses are important for maintenance of their biodiversity and specific characteristics. The aim of this study was to identify 170 dominant strains of LAB, isolated from ewes' cheeses produced in western Balkan region, with phenotypic identification system BIOLOG. The results of identification preformed by BIOLOG system were confirmed by PCR with genus and species specific primers. Lactobacilli (27-37 %), enterococci (20-35 %) and lactococci (18-22 %) represented an important part of prevailing microbiota of cheeses. The most common species of prevailing microbiota were *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Ent. faecalis*, *Ent. casseliflavus*, *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Lac. lactis* and *Str. thermophilus*. Cheeses from each region differentiated in microbiota diversity from typical LAB (Slovenian cheeses) to more diverse including also *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Dermobacter* and *Bacillus* species. BIOLOG system successfully identified 55 % of isolates at genus level and 51 % at species level. In 44 % of isolates the identification by BIOLOG was not certain (described as "most probable"). Comparison of phenotypic and genotypic identification showed that 61 % of results were identical at genus level and only 33 % at species level. In our experience the BIOLOG system was not reliable enough to be used as the only method for identification of bacteria that originate from specific microbial communities. We were able to describe the dominant microflora of ewes' cheeses from western Balkan by combining phenotypic and genotypic identifications.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	X
KAZALO PRILOG.....	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII

1 UVOD	1
1.1 CILJ NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE	3
2.2 OVČJE MLEKO KOT SUROVINA ZA IZDELAVO SIRA	5
2.3 TRADICIONALNI OVČJI SIRI S PODROČJA ZAHODNEGA BALKANA.....	6
2.3.1 Slovenski tradicionalni ovčji siri	6
2.3.1.1 Kraški ovčji sir.....	6
2.3.1.2 Bovški ovčji sir	7
2.3.1.3 Dolenjski ovčji sir	8
2.3.2 Hrvaški tradicionalni ovčji siri.....	8
2.3.2.1 Paški ovčji sir.....	9
2.3.2.2 Krčki ovčji sir	9
2.3.3 Tradicionalni ovčji siri s področja Bosne in Hercegovine	9
2.3.3.1 Travnički ovčji sir	10
2.3.3.2 Livanjski ovčji sir	10
2.3.4 Tradicionalni ovčji siri iz Srbije.....	11
2.3.4.1 Pirotski ovčji sir	11

2.3.4.2	Sjenički ovčji sir	12
2.4	METODE IDENTIFIKACIJE MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ	12
2.4.1	Identifikacijske metode s predhodno kultivacijo.....	14
2.4.1.1	Fenotipske metode	14
2.4.1.2	Genotipske metode.....	16
2.4.2	Identifikacijske metode, ki ne potrebujejo predhodne kultivacije	19
3	MATERIAL IN METODE DELA.....	22
3.1	POTEK DELA	22
3.2	MATERIAL	24
3.2.1	Bakterijski sevi izolirani iz prevladujoče mikroflore ovčjih sirov	24
3.2.2	Gojišča.....	24
3.2.2.1	Priprava tekočega gojišča MRS	24
3.2.2.2	Priprava tekočega gojišča M17.....	25
3.2.2.3	Priprava trdnega gojišča MRS	25
3.2.2.4	Priprava trdnega gojišča M17.....	25
3.2.2.5	Priprava trdnega gojišča BUG	25
3.2.3	Material in oprema za delo s sistemom BIOLOG	26
3.2.4	Material in oprema za izolacijo DNA.....	26
3.2.5	Material in oprema za PCR.....	27
3.2.6	Material in oprema za analizo pomnožkov z gelsko elektroforezo	28
3.3	METODE.....	28
3.3.1	Oživljanje in priprava izolatov.....	29
3.3.2	Identifikacija s sistemom BIOLOG	29
3.3.3	Izolacija DNA.....	32
3.3.4	Identifikacija s PCR in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi	33
3.3.5	Analiza pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo.....	40
3.3.5.1	Priprava agaroznega gela.....	40
4	REZULTATI.....	42
4.1	USPEŠNOST IDENTIFIKACIJE IZOLATOV Z METODO BIOLOG	42

4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV IDENTIFIKACIJE IZOLATOV Z METODO BIOLOG IN PCR.....	44
4.3 SESTAVA PREVLADUJOČE MIKROBNE POPULACIJE OVČJIH SIROV.....	47
4.3.1 Slovenski tradicionalni ovčji siri	47
4.3.2 Hrvaški tradicionalni ovčji siri.....	48
4.3.3 Tradicionalni ovčji siri s področja Bosne in Hercegovine	49
4.3.4 Tradicionalni ovčji siri s področja Srbije	50
4.3.5 Primerjava mikrobne populacije sirov glede na njihovo področje izdelave	51
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	56
5.1 RAZPRAVA	56
5.2 SKLEPI.....	63
6 POVZETEK	64
7 VIRI	66

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema poteka identifikacije bakterijskih izolatov iz sirov z metodo BIOLOG in PCR	23
Slika 2: Prenos tipične kolonije z vatirano palčko (GEN III MicroPlate TM , 2008).....	30
Slika 3: Prenos zajete kolonije v inokulacijsko tekočino in umerjanje želene celične gostote na turbidimetru (GEN III MicroPlate TM , 2008)	31
Slika 4: Priprava delovnega prostora v brezprašni komori in inokulacija BIOLOG GEN III MicroPlate TM plošče.....	31
Slika 5: Postavitev plošče v MicroStation TM čitalnik in pričetek identifikacije s programsko opremo MICROLOG 3 Version 5.2.01	32
Slika 6: Gelska elektroforeza.....	41
Slika 7: Uspešnost identifikacije izolatov iz tradicionalnih ovčjih sirov z metodo BIOLOG (v %).....	42
Slika 8: Pozitivne reakcije (obarvani kanalčki) na plošči BIOLOG, na osnovi katerih računalniški program poda identifikacijo izolatov.....	43
Slika 9: Primerjava identifikacij izolatov iz tradicionalnih ovčjih sirov z metodo BIOLOG in PCR	45
Slika 10: Rezultati identifikacije izolatov iz slovenskih tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)	47
Slika 11: Rezultati identifikacije izolatov iz hrvaških tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)	48
Slika 12: Rezultati identifikacije izolatov iz tradicionalnih ovčjih sirov s področja Bosne in Hercegovine, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)	49
Slika 13: Rezultati identifikacije izolatov iz srbskih tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)	50
Slika 14: Sestava prevladujoče mikrobiote slovenskih sirov (A), hrvaških sirov (B), sirov iz Bosne in Hercegovine (C) in srbskih sirov (D), določena z metodo BIOLOG in za nekatere rodove potrjena s PCR	51

Slika 15: Vrste bakterij rodu <i>Enterococcus</i> v sirih iz različnih področij zahodnega Balkana, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR	52
Slika 16: Vrste bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> v sirih iz različnih področij zahodnega Balkana, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR	53
Slika 17: Vrste bakterij rodu <i>Lactococcus</i> v sirih iz različnih področij zahodnega Balkana, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR	54

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Število izolatov iz posameznih tradicionalnih ovčjih sirov s področja zahodnega Balkana.....	24
Preglednica 2: Odpipetiran volumen posameznih reagentov pri pripravi reakcijske mešanice za PCR.....	34
Preglednica 3: Program za izvedbo PCR pri posameznem rodu ali vrsti bakterije	36
Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi pri PCR za posamezen rod ali vrsto bakterije ter iskana velikost pomnožkov	39
Preglednica 5: Rezultati identifikacije izolatov s sistemom BIOLOG, pri katerih nismo naredili analize z metodo PCR.....	46
Preglednica 6: Rezultati identifikacije izolatov s sistemom BIOLOG, pri katerih smo naredili analizo z metodo PCR le na nivoju rodu	46
Preglednica 7: Vrste bakterij, izolirane iz sirov zahodnega Balkana, ki so predstavljale manjši delež mikrobne populacije, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR	55

KAZALO PRILOG

Priloga A: Rezultati identifikacije izolatov iz Dolenjskega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga B: Rezultati identifikacije izolatov iz Bovškega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga C: Rezultati identifikacije izolatov iz Kraškega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga D: Rezultati identifikacije izolatov iz Paškega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga E: Rezultati identifikacije izolatov iz Krčkega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga F: Rezultati identifikacije izolatov iz Travničkega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga G: Rezultati identifikacije izolatov iz Livanjskega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga H: Rezultati identifikacije izolatov iz Pirotskega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

Priloga I: Rezultati identifikacije izolatov iz Sjeničkega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (amplified fragment length polymorphism)
bp	bazni par
BUG	gojišče za pripravo izolatov pri identifikaciji z metodo BIOLOG
DGGE	gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu (denaturing gradient gel electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat (mešanica nukleotidov)
EDTA	etilendiamin-tetraacetat (ethylene diamine tetraacetate)
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
FAME	metilni estri maščobnih kislin (fatty acid methyl ester)
FISH	fluorescentna <i>in situ</i> hibridizacija (fluorescent <i>in situ</i> hybridisation)
<i>Lac.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
M	molarnost (mol/L)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MO	mikroorganizmi
MRS	gojišče de Man, Rogosa in Sharpe
M17	gojišče za mlečnokislinske bakterije
PCR	verižna reakcija s polimerazo (polymerase chain reaction)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (pulsed field gel electrophoresis)
RAPD	naključno pomnožena polimorfnna DNA (randomly amplified polymorphic DNA)
rDNA	ribosomska deoksiribonukleinska kislina (ribosomal deoxyribonucleic acid)
rep-PCR	PCR ponavljajočih se elementov v genomu mikroorganizma

	(repetitive genomic element PCR)
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism)
RNA	ribonukleinska kislina (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (ribosomal ribonucleic acid)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis)
spp.	vrste (species)
SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem (single strand conformation polymorphism)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
subsp.	podvrsta (subspecies)
T	transmitanca
TAE	tris acetatni pufer
Taq polimeraza	polimeraza, izolirana iz mikroorganizma <i>Thermus aquaticus</i>
T-RFLP	terminalni polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (terminal - restriction fragment length polymorphism)
TTGE	gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom (temporal temperature gradient electrophoresis)
UV	ultravijoličen (-a svetloba)
<i>W.</i>	<i>Weissella</i>

1 UVOD

V siru je prisotno veliko mikroorganizmov (MO), katerih glavni predstavniki so bakterije, sledijo jim kvasovke in plesni. Različne skupine MO se povezujejo v kompleksen mikrobnii ekosistem, ki sodeluje pri zorenju sira. Potek zorenja sira je najbolj odvisen od prisotne združbe mlečnokislinskih bakterij (MKB) saj so močno vključene v vse štiri procese zorenja: tvorbo kislin, tvorbo aromatičnih snovi, proteolizo in lipolizo. MKB izvirajo iz mleka in okolja, ki prihaja v stik z mlekom tekom njegove predelave (Beresford in sod., 2001). Med MKB najdemo veliko različnih rodov, ki so značilni za mlečne izdelke, kot so *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* in *Leuconostoc*. Siri iz surovega mleka, izdelani po tradicionalnih postopkih, vsebujejo zelo raznoliko in bogato mikrofloro. Ta biodiverziteta se lahko šteje kot glavni dejavnik pri vzdrževanju tipičnih lastnosti tradicionalnih sirov (Serhan in sod., 2009). Raziskave kažejo, da so avtohtona mikroflora surovega mleka in drugi naključni MO iz okolja odgovorni za večino fizikalno-kemijskih ter senzoričnih sprememb med izdelavo sira (Poznanski in sod., 2004). Obstaja širok spekter tehnik, s katerimi lahko analiziramo mikrobno populacijo.

Razdelimo jih lahko v tri skupine (Beresford in sod., 2001):

- kultivacijske metode, ki jim sledi fenotipska karakterizacija,
- kultivacijske metode, ki jim sledi molekularna karakterizacija,
- metode, ki temeljijo le na molekularni karakterizaciji.

Vse te metode imajo določene prednosti in slabosti. Uporaba fenotipskih metod kaže večjo uporabnost pri razumevanju prilagajanja MO na določeno okolje (Di Cagno in sod., 2010). Nekoliko težje je najti podatke, ki bi razjasnili uspešnost in uporabnost takšnega pristopa pri identifikaciji MKB. Primer tega je sistem BIOLOG, ki je avtomatiziran sistem za fenotipsko identifikacijo na nivoju vrste pa tudi podvrste. Vsebuje 96 testov z indikatorjem, ki omogoči hitro detekcijo metabolne aktivnosti in fenotipsko karakterizacijo MO. Metabolni prstni odtis, ki ga dobimo po inkubaciji, primerjamo z metabolnimi značilnostmi znanih MO v bazi podatkov (GEN III MicroPlateTM, 2008). Čeprav se raziskovalci bolj nagibajo k uporabi genotipskih metod, jih večina priporoča uporabo

kombinacije tako genotipskih kot fenotipskih metod (McCartney, 2002; Temmerman in sod., 2004).

1.1 CILJ NALOGE

Cilji diplomske naloge so bili:

- identificirati 170 izolatov iz tradicionalnih sirov zahodnega Balkana, na nivoju vrste, s sistemom za fenotipsko identifikacijo BIOLOG,
- preveriti rezultate identifikacije sistema BIOLOG z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) in začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za posamezne rodove in vrste MKB ter razjasniti uspešnost in uporabnost sistema BIOLOG, kot metode za identifikacijo MKB,
- opisati prevladujočo mikrobioto tradicionalnih ovčjih sirov s področja zahodnega Balkana.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Delovne hipoteze diplomske naloge so bile:

- Glede na različna geografska področja in klimatske razmere, v katerih se izdelujejo v raziskavo vključeni siri, pričakujemo razlike v sestavi prevladujoče mikrobne populacije.
- Rezultati fenotipske identifikacije s sistemom BIOLOG se bodo ujemali z rezultati genotipske identifikacije s PCR in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.

2 PREGLED OBJAV

Mleko in mlečni izdelki spadajo med osnovna živila. Posebno skupino pa predstavljajo avtohtoni mlečni izdelki. Ti ne predstavljajo le hrane, ki zadovolji osnovne potrebe našega organizma, ampak tudi del kulture in značilnosti nekega področja. Veliko sirov nosi oznako zaščitenega porekla, a še več je krajev, ki so znani zaradi sirov, ki se na njihovem območju izdelujejo. Postopki industrijsko izdelanih sirov v večini izvirajo iz tradicionalne proizvodnje sirov, značilne za to območje (Bijeljac in Sarić, 2005).

2.1 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Bakterije, ki jih uporabljamo v mlekarstvu, lahko grobo razdelimo, glede na njihovo optimalno temperaturo rasti, na mezofilne in termofilne MKB. Mezofilne bakterije imajo optimalno rast med 20 in 30 °C, termofilne pa med 30 in 45 °C. Tradicionalni fermentirani izdelki iz območja s subtropskim podnebjem vsebujejo predvsem termofilne MKB, medtem ko izdelki z mezofilnimi bakterijami izvirajo iz severnih in zahodnih evropskih držav (Wouters in sod., 2002).

MKB so heterogena skupina po Gramu pozitivnih in katalaza negativnih MO. Imajo sposobnost sinteze mlečne kisline iz laktoze in jih uporabljajo v proizvodnji velikega števila fermentiranih mlečnih in mesnih izdelkov ter fermentirane zelenjave. Zaradi svojih metabolnih sposobnosti prispevajo k razvoju arome in zorenju fermentiranih proizvodov (Beresford in sod., 2001). Pav tako pa proizvedejo veliko število protimikrobnih snovi kot so vodikov peroksid, diacetil in bakteriocine. To ima velik pomen pri fermentaciji živil in ohranjanju obstojnosti izdelka. Ena izmed njihovih najpomembnejših lastnosti, kar se tiče mlekarstva, je sposobnost proizvajanja ekstracelularnih proteinaz. Večina MKB, izoliranih iz fermentiranih mlečnih izdelkov, potrebuje za rast različne aminokisline, zato potrebujejo kompleksne proteolitične sisteme za razgradnjo mlečnih proteinov, še posebej kazeina, glavnega proteina v mleku. Na drugi strani pa imajo proteinaze pomembno vlogo pri oblikovanju tekture sira, saj s proteolizo kazeinov prispevajo k razvoju specifičnih senzoričnih lastnosti tekom zorenja (Topisirović in sod., 2007).

Ločimo starterske MKB in sekundarne MO ali nestarterske MKB (Berseford in sod., 2001). Izraz nestarterska kultura se uporablja za opis naključne bakterijske flore, sposobne rasti v selektivnih pogojih med zorenjem sira. Te bakterije lahko vstopijo v sir iz mleka, lahko so posledica post pasterizacijskih kontaminacij iz opreme za izdelavo sira ali pa pridejo iz okolja. Prisotne so v tradicionalno izdelanih sirih, proizvedenih v specifičnih ekoloških nišah in so esencialne za razvoj senzoričnih lastnosti tradicionalnih sirov. Razlike med temi siri pripisujejo prav prisotnosti različnih nestarterskih kultur, ki so značilne za regijo v kateri sir proizvajajo (Topisirović in sod., 2007).

Če surovo mleko pustimo na sobni temperaturi nekaj časa, se bo razvila mikroflora, v kateri sprva prevladujejo predvsem mezofilni laktokoki. Po določenem času vzdrževanja pri tej temperaturi pa se pojavijo tudi druge vrste, predvsem laktobacili. Odstotek laktokokov s časom počasi pada. Naraščajoča koncentracija kisline med fermentacijo inhibira rast drugih MO (Wouters in sod., 2002).

Mezofilne laktokoke uporabljajo kot starterske kulture v proizvodnji različnih tipov sira, masla in različnih vrst fermentiranega mleka. Izbira kulture je zasnovana na podlagi njihove vloge pri fermentaciji in želenih lastnosti produkta. Zanimivo je, da industrijske mezofilne starterske kulture večinoma vsebujejo samo vrsto *Lac. lactis*. V sirarstvu uporabljajo veliko različnih sevov te vrste oziroma podvrst *lactis* in *cremoris*. Kljub temu, da se razlikujejo, pa imajo veliko podobnih biokemijskih lastnosti. Njihova najpomembnejša lastnost je sposobnost proizvodnje kisline v mleku in pretvorba proteinov mleka do aromatičnih snovi. Kot že omenjeno, so aminokisline ključnega pomena pri izoblikovanju okusa sira. Njihova razgradnja poteka s pomočjo encimov, ki pretvarjajo aminokisline do aldehidov, alkoholov, ketonov, aminov, kislin, estrov in žveplo vsebujočih komponent (Wouters in sod., 2002).

V mlekarstvu kot starterske kulture uporabljajo tudi termofilne MKB, ki najpogosteje pripadajo vrstam *Str. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Termofilne MKB pretvarjajo laktozo v mlečno kislino in jih tradicionalno uporabljajo za izdelavo jogurta in nekaterih vrst sira (Delcour in sod., 2000). Prisotne so pri izdelavi švicarskega tipa sira, mocarele ter nekaterih sirov iz ovčjega in

kozjega mleka. Zaradi visokih temperatur tekom proizvodnje se je pri teh sirih izoblikovala specifična ekološka niša (Wouters in sod., 2002). *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* živita v simbiozi (Delcour in sod., 2000). Proteolitični encimi *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* razgradijo kazein do nizko molekularnih peptidov in aminokislin. Te molekule so rastni faktorji bakterije *Str. thermophilus*, ki s proizvodnjo CO₂ in mravljične kisline stimulira rast laktobacilov. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Str. thermophilus* med fermentacijo proizvajata eksopolisaharide, ki vplivajo na čvrstost končnega izdelka (Moreira in sod., 2000).

2.2 OVČJE MLEKO KOT SUROVINA ZA IZDELAVO SIRA

Proizvodnja ovčjega sira ima dolgo zgodovino. Siri so po navadi pridelani v manjših obratih, po tradicionalnih postopkih izdelave in imajo poseben okus in aroma, zelo različno v primerjavi s siri, izdelanimi iz kravjega mleka. Proizvodnja ovčjega mleka je v porastu, pridelujejo pa ga predvsem na področju mediteranskih držav (Kalantzopoulos, 1993).

Ovče mleko ima po nekaterih podatkih več kot dvakrat toliko proteinov in maščobe kot kravje mleko (McSweeney in sod., 2004). Predvsem ta razlika, ovčjega v primerjavi s kravjim mlekom, najbolj pripomore k različnim senzoričnim lastnostim končnega izdelka, saj so maščobe in proteini glavne komponente mleka, ki so pomembne pri izdelavi sira (Medina in Nuñez, 2004). Poleg tega vsebuje ovče mleko tudi manj laktoze, več kalcija, pomembno večji pa je še delež kazeina, zaradi katerega je tehnologija izdelave sirov nekoliko drugačna (Bajt in Golc-Teger, 2011). Koagulum je čvrst, sinereza je hitra in difuzija NaCl je počasna zaradi nizke vsebnosti vlage teh sirov (McSweeney in sod., 2004). Na sestavo mleka vplivajo tudi pasma, okoljski dejavniki, pogoji reje in laktacijsko obdobje (Medina in Nuñez, 2004). Genetski, fiziološki in okoljski dejavniki so torej odgovorni za razlike v sestavi mleka znotraj vrste (Kalantzopoulos, 1993).

2.3 TRADICIONALNI OVČJI SIRI S PODROČJA ZAHODNEGA BALKANA

2.3.1 Slovenski tradicionalni ovčji siri

2.3.1.1 Kraški ovčji sir

Izdelava Kraškega sira ima dolgoletno tradicijo. Na območju Krasa in Istre so ovčarji redili domačo avtohtono ovco, ki so ji rekli istrijanka, kraška ovca in celo ovca surovine volne (Perko, 2003). Za to območje je značilna velika heterogenost biocenoz. K bogati flori Kraših travnikov prispevajo trave, detelje in zlasti zelišča. Zelišča so zaradi specifičnih talnih in klimatskih posebnosti bogata z aromatskimi substancami, ki jih s pašo in senom uživajo ovce in tako vplivajo preko mleka na aroma sira. Kraški ovčji sir ima več kot stoletno sirarsko tradicijo. K značilnemu vonju, okusu in teksturi prispeva tudi prevladujoča avtohtonja mikroflora, ki je precej različna od tako imenovanih industrijskih sirov (Gerželj, 2006). V raziskavah so ugotovili, da v Kraškem ovčjem siru predstavljajo enterokoki, poleg laktobacilov, prevladujočo mikrobno populacijo. Zelo pomembna je prisotnost vrste *Ent. faecalis*, ki s svojim delovanjem močno prispeva k zorenju sira. Med laktobacili prevladuje *Lb. paracasei*, prisotne pa so še vrste *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus* (Rogelj, 2005).

Kraški ovčji sir je trdi tip sira, narejen iz surovega ali termiziranega mleka in ima priznano označbo porekla. Označba porekla je slovenska oznaka, podeljena sirom unikatne kvalitete, ki imajo tradicionalne postopke izdelave. V označbo porekla je vključena regija proizvodnje mleka in sira, pasma živali, postopek izdelave sira, sestava sira ter senzorične lastnosti kot so okus, tekstura, barva in aroma (Čanžek Majhenič in sod., 2007). Kraški ovčji sir ima obliko okroglega hlebca, teže od 2,5 do 5 kg, premera 20 do 26 cm in višine 9 do 10 cm. Zgornja stran sira je ravna, obodna je lahko rahlo izbočena, skorja sira je gladka, sivo rjave barve. Na prerezu je testo kompaktno, povezano, lomljivo vendar ne drobljivo, enakomerno sivo bež barve, načelno brez očes ali z drobnimi, redkimi očesi v velikosti majhne leče. Prisotna je lahko drobna luknjičavost ali drobne razpoke, ki pa ne prevladujejo. Testo starejših sirov je bolj kompaktno do školjkasto lomljivo. Vonj je aromatičen, intenziven, poln do rahlo pikanten, značilen za ovčji sir. Konzumno zrelost

doseže sir po najmanj 60 do 90 dneh, lahko zori tudi do enega leta. Sir vsebuje najmanj 60 % suhe snovi, 45 % maščobe v suhi snovi in od 1,5 do 2,5 % soli (Gerželj, 2006).

2.3.1.2 Bovški ovčji sir

Bovški sir je dobil ime po kraju Bovec. Izdelujejo ga izključno kmetije na Bovškem, v poletni pašni sezoni pa tudi na visokogorskih planinah. Spada med trde, polnomastne sire. Kot osnovno surovino za izdelavo Bovškega sira uporabljajo surovo ovčje mleko, dodajajo pa lahko tudi do 20 % kozjega ali kravjega mleka. Mleko mora biti prirejeno na območju, ki predstavlja območje občine Bovec z okolico. Bovški ovčji sir ima obliko okroglega hlebca s premerom 20 do 26 cm, višine od 8 do 12 cm, težak pa je 2,5 do 4,5 kg. Zgornja stran sira je ravna, obodna stran rahlo izbočena, robovi rahlo zaobljeni, skorja sira je čvrsta, gladka, sivo rjave do zamolklo bež barve. Testo je kompaktno, elastično, povezano, lomljivo, vendar ne drobljivo, enakomerno sivo-bež barve, z redkimi, enakomerno razporejenimi očesi velikosti leče ali majhnega grahovega zrna. Testo starejših sirov je bolj kompaktno in bolj lomljivo. Okus in vonj sta značilno aromatična, polna, intenzivna, rahlo pikantna, če je sir izdelan samo iz ovčjega mleka. V primeru dodanega kravjega ali kozjega mleka je okus milejši. Sir zori 60 do 90 dni, lahko tudi do dve leti. Večino mleka, ki ga pridelajo v Bovški sir, je od ovc avtohtone bovške pasme ali njenih križank. Zaradi specifičnih, težavnih pašnih površin na Bovškem, se je ta pasma oblikovala skozi stoletja (Koren in sod., 2003). Vzornik Bovškemu ovčjemu siru je pecorino Romano in po obliki deloma pecorino Ancona (Fischione, 1998).

Bovški sir lahko izdelujejo tudi s pomočjo starterskih kultur. Mikroflora fermentirane sekundarne sirotke, ki jo uporabljajo kot startersko kulturo, je termofilna in homofermentativna. Na osnovi fizioloških značilnosti so razvrstili MO fermentirane sekundarne sirotke v naslednje vrste ali biotipe: *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. delbruecki* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* in *Str. thermophilus*. V primeru vpeljave termične obdelave mleka v tehnološki postopek izdelave Bovškega sira je uporaba starterske kulture nujna (Perko, 2003).

2.3.1.3 Dolenjski ovčji sir

Dolenjski ovčji sir še nima priznane označbe porekla. Podrobni opis sira se pripravlja v okviru projekta SEE-ERA.NET. Dolenjski ovčji sir spada med trde, polnomastne sire. Za proizvodnjo tega sira uporabijo ovčje mleko jutranje in večerne molže. Siru dodajo termofilno startersko kulturo MKB za izpeljavo fermentacije oziroma kot podporno startersko kulturo naravni mikrobioti mleka. Sir solijo v slanici ali pa ga solijo po suhem postopku in zorijo najmanj 60 dni. Vsebuje 60 do 65 % suhe snovi, 45 do 55 % maščobe v suhi snovi in od 1,5 do 2,5 % soli. Dolenjski ovčji sir ima obliko okroglega hlebca s premerom 15 do 25 cm, višine od 8 do 10 cm, težak pa je 1 do 3 kg. Zgornja in bočna stran sira sta rahlo izbočeni, skorja sira je gladka, sivo rjave barve. Testo je trdo, čvrsto, kompaktno, vendar ne drobljivo, enakomerno sivo bež barve. Očesa so redka, v velikosti leče ter enakomerno razporejena po testu. Okus in vonj sta značilno aromatična, čista, polna do rahlo pikantna (še neobjavljeni podatki za poročilo projekta RegTraC, Rogelj, 2012).

2.3.2 Hrvaški tradicionalni ovčji siri

Najbolj znani hrvaški tradicionalni ovčji siri, Paški, Krčki, Olibski in Rabski sir, sodijo v skupino zelo trdih sirov iz ovčjega mleka. V to skupino spada tudi italijanski sir Pecorino, katerega značilnosti lahko med drugimi primerjamo tudi s Paškim sirom (Slanovec, 1982). Pecorino je trivialno ime za italijanske sire, narejene iz ovčjega mleka. Termofilne MKB, kot so *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* in *Lb. helveticus*, so dominantna mikroflora naravne starterske kulture. To kulturo pridobijo s fermentacijo sirotke, ki ostane po proizvodnji sira (Di Cagno in sod., 2003). Pri sirih, izdelanih s tradicionalnimi postopki, je mikrobiota zelo heterogena. Njena sestava se spreminja tekom zorenja. Sevi, ki prevladujejo v prvih stopnjah zorenja, niso nujno tudi dominantna mikroflora v kasnejših procesih zorenja (Terzić-Vidojević in sod., 2009). Sodeč po raziskavah Di Cagno in sod. (2003) je mikrobna združba teh tipov sira sestavljena iz predstavnikov rodov *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* in mezofilnih laktobacilov. Dominantna kultura se razlikuje in je odvisna od vrste ovčjega sira. Zajema pa bakterije vrst *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*, *Ent. durans*, *Ent.*

faecium, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Leuconostoc* spp. (Di Cagno in sod., 2003).

2.3.2.1 Paški ovčji sir

Paški sir izvira z otoka Paga. Ima obliko hlebčka s premerom 18 do 22 cm, višine 7 do 8 cm in teže 2 do 4 kg. Skorja je gladka, rjavo rumene barve. Testo je enakomerno rumenkasto in trdo. Praviloma nima očes. Po okusu pa je sir precej oster in pikanten. Sir zori dva do tri meseca. Po dveh mesecih zorenja ga premažejo z olivnimi tropinami, včasih pa tudi rahlo dimijo (Slanovec, 1982).

2.3.2.2 Krčki ovčji sir

Ovčarstvo na otoku Krku ima dolgo tradicijo in velik pomen v gospodarskem razvoju otoka. Krčki sir izdelujejo iz surovega ovčjega mleka in spada v skupino trdih in polnomastnih sirov. Za proizvodnjo uporabijo mleko jutranje in večerne molže. Mleko jutranje se meša z mlekom večerne molže in postopno segreva na temperaturo 33 do 35 °C. Doda se straterska kultura sestavljena iz *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, *Lac. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* in *Lb. helveticus*. Po stiskanju sir solijo v slanici in nato sledi zorenje. Optimalno zorenje Krčkega sira je 90 dni. Dimenzijs in masa sira so odvisni od zahtev tržišča. Povprečno pa je višina okoli 6,5 cm, premer 14,5 cm in masa okoli 1190 g (Antunac in sod., 2008).

2.3.3 Tradicionalni ovčji siri s področja Bosne in Hercegovine

Beli sir u kriškama, ki ga izdelujejo iz ovčjega ali kravjega mleka, lahko pa tudi iz mešanice obeh, je priljubljen sir Bosne in Hercegovine. Ima tipične značilnosti belih sirov, zorenih v slanici. Če izdelujejo sir v sirarni, so kosi pravilno oblikovani in tehtajo od 1 do 1,2 kg, sir domače izdelave pa je nepravilnih oblik in različno težak. Kosi belega sira imajo vlažno in mastno površino, enakomerno bele barve. Notranjost ima porcelanski sijaj. Testo je nežno, vendar zbito, brez ali z nekaj drobnimi očesci. Okus je kiselkast, slan, s čisto in specifično aromo. Po stiskanju maso razrežejo na kose, ki jih solijo v slanici, ponekod pa

jih solijo tudi na suho. Po soljenju zložijo kose sira v lesene, pločevinaste ali plastične posode. Med sloje sira dajo pergament papir in ga zalijejo s prekuhanou slano vodo. Zorenje traja 1 do 1,5 meseca. V to skupino sodijo beli Srbski sir, Travnički sir, Sjenički sir, Fetta in drugi (Slanovec, 1982). Za razvoj kisline in okusa po navadi uporabljajo mezofilne starterske kulture. Predvsem zaradi razvoja kisline pa pogosto uporabljajo tudi termofilne kulture. Starterska kultura ponavadi vključuje bakterije rodu *Lactococcus* in *Lactobacillus* (El-Salam in sod., 1993). Medtem, ko Carić (1993) navaja, da je mešanica kulture sestavljena iz vrst *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis* in *Lb. casei*.

2.3.3.1 Travnički ovčji sir

Na Vlaški planini ter okolici izdelujejo istoimenski sir, ki je na tržišču poznan pod imenom Travnički sir. Ima tipične značilnosti belih sirov, zorenih v slanici in je težak od 0,5 do 1 kg. Njegovo zorenje se odvija v dveh fazah. Prva je »aerobna«, med katero sir ni v slanici, in traja od enega do dveh dni. V tej fazi intenzivno delujejo mlečnokislinski MO, ki laktozo pretvarjajo v mlečno kislino. Druga faza pa je anaerobno zorenje, ki se odvija brez prisotnosti zraka, ko je sir v slanici ali sirotki. V tej fazi delujejo anaerobne bakterije, ki razgrajujejo beljakovine in mašcobe. Sir tekom zorenja negujejo. Na površini slanice, pod vplivom delovanja MO, nastaja sivo-beli sloj ali sirni cvet. Na začetku je ta pojav veliko bolj intenziven kot na koncu zorenja. Zato se najprej sir čisti enkrat do dvakrat na teden, kasneje pa vsakih 10 do 15 dni. Če sir ne negujejo redno, pride do hitrega razkroja beljakovin in mašcob, posledično pa do slabše kakovosti sira (Bijeljac in Sarić, 2005).

2.3.3.2 Livanjski ovčji sir

Tehnologija izdelave Livanjskega sira je zasnovana na podlagi izdelave švicarskega sira Gruyer. Začeli so ga izdelovati na območju Livna, Glamoča in Duvna, njegova proizvodnja pa traja že več kot 115 let in je postala tradicionalna za to področje. Livanjski sir spada v skupino trdih sirov in se avtohtono proizvaja iz ovčjega mleka. V novodobni proizvodnji pa uporabljajo mešano ovčje in kravje mleko v različnih razmerjih. Sir ima cilindrično obliko in tehta od 2 do 2,5 kg. Je slavnato rumene barve. Kot rezultat mikrobiološkega procesa nastajajo v siru plini, ki tvorijo majhna okrogla očesa, ki so na

prerezu pravilno razporejena. Konsistenza mora biti trda, vendar ne preveč čvrsta. Okus je rahlo slan, pikanten, tipičen za sire iz ovčjega mleka. Njegovo zorenje poteka okoli 2 meseca (Bijeljac in Sarić, 2005).

2.3.4 Tradicionalni ovčji siri iz Srbije

2.3.4.1 Pirotski ovčji sir

Pirotski kačkavalj je tradicionalna vrsta trdega sira, ki ga izdelujejo na področju Pirot. Izdelujejo ga iz polnomastnega kravjega ali ovčjega mleka, brez dodajanja starterske kulture. Lahko ga uživamo kot mladi sir, po enem mesecu zorenja, ali kot stari sir, po dveh mesecih zorenja (Milosavljević in sod., 2010). Spada k tipu sira pasta filata. Tehnološki postopek proizvodnje takšnega sira se razdeli v dve fazи. Prva je proizvodnja sirne mase in čedarizacija. Sledi termična obdelava sirnine pri 72-75 °C za 35-50 s v slani vodi (12-18 % soli). Ta postopek ima učinek pasterizacije in tako prispeva k pravilni fermentaciji in zorenju sira (Carić, 1993). Vroče plastično testo se nato ročno oblikuje. V oblikovalih ga pustijo tako dolgo, da se testo povsem prilega oblikovalu. Da postane sirnina čvrsta, model z vsebino postavijo še v hladno vodo. Po ohlajanju pa se sirno testo prenese v slanico (Perko, 2004). Za sire pasta filata je značilna unikatna tekstura, ki je elastična, gladka, vlaknata in rezljiva. Te značilnosti pridobi sir predvsem zaradi postopka kuhanja in raztezanja, ki pa je skupen vsem variantam tega sira, ne glede na to ali so mehki, pol trdi ali trdi (McSweeney in sod., 2004).

Sodeč po analizah Mijačević in sod. (2005) je mikrobnna populacija sira Pirotski kačkavalj sestavljena iz bakterij rodu *Lactococcus*, *Lactobacillus* in *Enterococcus*. Carić (1993) pa pravi, da se lahko pri proizvodnji sira Kačkavalj doda tudi kulturo, ki vsebuje *Str. thermophilus*, *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* in *Lb. casei*.

2.3.4.2 Sjenički ovčji sir

Sjenički sir spada v skupino belih sirov, zorenih v slanici. Izdelujejo ga iz ovčjega in kravjega mleka ali mešanice obeh. Pri izdelavi uporabljajo jutranje in večerno mleko. Po koagulaciji in stiskanju maso razrežejo na kose, ki jih zložijo v leseno posodo, kjer poteka tudi soljenje. Zorenje poteka v slani sirotki in traja 20-40 dni, med samim procesom pa sire negujejo in čistijo (Jovanović in sod., 2004). Raziskave Radulović in sod. (2006) so pokazale, da so najbolj zastopane vrste v Sjeničkem siru *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* in vrste rodu *Enterococcus*. Identificirali pa so tudi bakterije vrste *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* in *Leuconostoc* spp.

2.4 METODE IDENTIFIKACIJE MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ

MKB, zaradi njihove široke uporabe v proizvodnji fermentirane hrane in prehranskih dopolnil, podrobno preiskujejo glede na njihove metabolne lastnosti, uspešnost rasti, stabilnost med tehnološkimi postopki, obstojnosti v končnem izdelku, načinu delovanja in mnogo drugih lastnosti. Zaradi specifičnih razlik znotraj skupine in namembnosti je identifikacija ključnega pomena. Obstaja širok spekter tehnik, ki se razlikujejo v uspešnosti identifikacije, ponovljivosti in hitrosti. Metode, ki ne zahtevajo predhodne kultivacije MO imajo, zaradi krajskega trajanja analize, veliko prednost v primerjavi z drugimi tehnikami, ki kultivacijo potrebujejo. Vendar imajo slednje druge prednosti, vključno z zaneslivejšo identifikacijo. Kultivacijske metode se dodatno delijo še na fenotipske in genotipske (Temmerman in sod., 2004).

Identifikacijske metode s predhodno kultivacijo:

- fenotipske metode;
 - BIOLOG GEN III,
 - API,
 - poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE, angl. sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis),
 - tankoplastna kromarografija,
 - analiza metilnih estrov maščobnih kislin (FAME, angl. fatty acid methyl ester),

- genotipske metode:
 - verižna reakcija s polimerazo (PCR, angl. polymerase chain reaction) s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi,
 - sekvenciranje 16S ali 23S rRNA,
 - polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP, angl. restriction fragment length polymorphism),
 - polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP, angl. amplified fragment length polymorphism),
 - naključno pomnožena polimorfna DNA (RAPD, angl. randomly amplified polymorphic DNA),
 - PCR ponavljajočih se elementov v genomu mikroorganizma (rep-PCR, angl. repetitive genomic element),
 - ribotipizacija,
 - DNA-DNA hibridizacija,
 - profiliranje plazmidov.

Identifikacijske metode, ki ne potrebujejo predhodne kultivacije:

- fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH, angl. fluorescent *in situ* hybridisation),
- pretočna citometrija,
- gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu (DGGE, angl. denaturing gradient gel electrophoresis),
- gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom (TTGE, angl. temporal temperature gradient electrophoresis),
- terminalni polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (T-RFLP, angl. terminal - restriction fragment length polymorphism),
- enoverižni konformacijski polimorfizem (SSCP, angl. single strand conformation polymorphism).

Nekaj najpogosteje uporabljenih tehnik je v nadaljevanju bolj natančno opisanih.

2.4.1 Identifikacijske metode s predhodno kultivacijo

2.4.1.1 Fenotipske metode

Fenotipske metode se, zaradi nižje cene, pogosteje uporabljajo v primerjavi z genotipskimi tehnikami. Najbolj znana sta komercialna sistema API in BIOLOG. Za nekatere MKB se je aplikacija teh tehnik izkazala za uporabno. Še vedno pa velja, da sevi s podobnimi fenotipi nimajo vedno podobnega ali celo približno sorodnega genotipa, kar povzroča pri teh metodah težave. Raziskovalci se bolj nagibajo k uporabi genotipskih analiz, ki podajo zanesljivejšo klasifikacijo (McCartney, 2002). Ker pa imajo vse tehnike svoje slabosti, večina raziskovalcev priporoča uporabo obeh pristopov (Temmerman in sod., 2004).

Fenotipske metode vključujejo morfološko in fiziološko karakterizacijo, proučevanje fermentacije ogljikovih hidratov in profiliranje proteinov. Razne študije dokazujejo, da so te metode omejene zaradi slabe ponovljivosti in sposobnosti identifikacije, ki pogosto omogoča diferenciacijo le na nivoju rodu. Dobri lastnosti sta predvsem nezahtevna oprema in dostopnost identifikacijskih baz podatkov, ki pa so ponekod vseeno pomanjkljive (Temmerman in sod., 2004).

BIOLOG GEN III MicroPlate™ je standardizirana mikrometoda, ki uporablja 94 biokemijskih testov za profiliranje in identifikacijo širokega spektra po Gramu negativnih in po Gramu pozitivnih bakterij. S pomočjo dobljenega fenotipskega vzorca se naredi identifikacija z uporabo programskega sistema MICROLOG 3 Version 5.2.01. Na plošči je 71 testov za izkoriščanje vira ogljika in 23 testov za občutljivost MO proti različnim kemijskim dejavnikom. S testom pridobimo fenotipski prstni odtis bakterije, s pomočjo katerega lahko, po zagotovilih proizvajalca, določimo rod in vrsto bakterije. Z indikatorjem Tetrazolium redox dye se kolorimetrično zazna izkoriščanje vira ogljika ali odpornost proti inhibitornim snovem. Izolati se najprej gojijo na trdnem gojišču, potem pa se kolonije suspendirajo v poseben medij do določene celične gostote. S to suspenzijo cepimo mikrotiterske plošče s substrati, ki so najprej brezbarvni. Med inkubacijo pride do povečane aktivnosti v tistih kanalčkih, kjer celice lahko izkoriščajo substrat in se razmnožujejo. Povečana respiracija/fermentacija povzroči redukcijo indikatorja in vsebina

kanalčka se obarva vijolično. Tam kjer bakterije ne izkoriščajo substrata in se ne razmnožujejo ostane kanalček brezbarven, prav tako pa je brezbarvna negativna kontrola, ki ne vsebuje substrata. Potek analize potrdi pozitivna kontrola, kanalček s substratom, ki se po inkubaciji obarva. Dobljeni prstni odtis se po inkubaciji primerja z referenčnimi prstnimi odtisi v knjižnici BIOLOG (GEN III MicroPlate™, 2008).

Fermentativni profil je pogosto značilen za določen habitat. Postavljena je bila na primer hipoteza, da je izkoriščanje laktoze manj razširjeno pri mikrobnih izolatih iz rastlin v primerjavi s tistimi, ki jih najdemo v siru in človeškem gastrointestinalnem traktu (Di Cagno in sod., 2010). To naj bi bila posledica izražanja genov za metabolizem laktoze, ki je lahko odvisno od pogojev okolja (Siezen in sod., 2005). Glede na fenotipski profil pa po raziskavah Di Cagno in sod. (2010) s sistemom BIOLOG ni bilo možno klasificirati izolatov glede na njihov originalni habitat, kar je bila verjetno posledica nabiranja vzorcev iz zelo podobnega okolja. Na interpretacijo rezultatov lahko vplivajo tudi različne količine inokuluma ter trajanje inkubacije (Busse in sod., 1996). Rezultati analize pa so vseeno uporabni za razumevanje fenotipskih sprememb pri prilagajanju MO na določeno okolje, kar ima pomembno vlogo tekom tehnološkega procesa izdelave fermentiranega izdelka (Di Cagno in sod., 2010).

V primerjavi z metodo BIOLOG je analiza celičnih proteinov s poliakrilamidno gelsko elektroforezo z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), dokazano bolj zanesljiva identifikacijska metoda za MKB. Elektroforetska mobilnost proteinov je funkcija njihove dolžine in naboja polipeptidne verige. NaDS je anionski detergent, ki se nespecifično veže na protein in ga pri tem denaturira, na vsak protein pa doda tudi določeno število negativnih nabojev, v količinskem sorazmerju z njegovo maso. Ločevanje z elektroforezo, zaradi razmerja med nabojem in dolžino polipeptidnih verig, tako poteka le na podlagi velikosti proteinov. Identifikacija je uspešna, metoda ima dobro ponovljivost, slabost metode pa je, da zahteva veliko dela. Poleg tega navajajo avtorji težave pri ločevanju vrste in podvrste nekaterih laktobacilov. V takem primeru moramo uporabiti genotipske tehnike kot je na primer RAPD-PCR (Temmerman in sod., 2004).

Za fenotipsko identifikacijo mlečnokislinskih izolatov so preskušali tudi tankoplastno kromatografijo organskih kislin in analizo metilnih estrov maščobnih kislin (FAME). Pri analizi FAME se lipidi izolirajo, modificirajo do metilnih estrov in analizirajo s plinsko kromatografijo. Kromatogrami lipidnih profilov dajejo značilne vzorce, ki se med seboj primerjajo. Kljub nekaterim vzpodbudnim rezultatom pa se tankoplastna kromatografija organskih kislin in FAME v identifikaciji še nista široko uveljavili (Lee in sod., 2001).

Čeprav so genetske tehnike zelo uporabne, pa še vedno informacije, ki jih dobimo s fenotipsko karakterizacijo, ogromno povejo o potencialu sevov, ki kolonizirajo različna okolja (Di Cagno in sod., 2010). Za pridobitev bolj zanesljive identifikacije se lahko uporablja več različnih fenotipskih tehnik obenem. Na ta način se slabosti ene metode lahko kompenzirajo s prednostmi druge (Temmerman in sod., 2004).

2.4.1.2 Genotipske metode

V zadnjih dveh desetletjih so razvili številne identifikacijske tehnike in metode, ki temeljijo na analizi DNA. Njihova največja prednost je specifičnost in hitrost, omogočajo pa identifikacijo na nivoju vrste in celo seva.

Večina teh metod temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR), selektivnemu podvajjanju specifičnih zaporedij DNA z uporabo začetnih oligonukleotidov, ki imajo točno določeno zaporedje nukleotidov. Poleg začetnih oligonukleotidov je za uspešno reakcijo potrebna še termostabilna DNA-polimeraza, katere delovanje vodi ciklično spreminjanje temperature. Temepraturni cikel vključuje denaturacijo, ko se komplementarni verigi tarčne DNA ločita, prileganje, ko se začetni oligonukleotidi povežejo na tarčnih mestih z ločenima DNA verigama in podaljševanje, ko DNA-polimeraza sintetizira komplementarne verige. Rezultat večkratnih ponovitev takšnega cikla je veliko število kopij tarčnega DNA zaporedja (Boyer, 2005).

DNA-polimeraza omogoča pomnoževanje, ki je zaradi uporabe specifičnih začetnih oligonukleotidov selektivno za željeno tarčno zaporedje nukleotidov. Vsaka na novo sintetizirana veriga DNA lahko služi kot matrica, tako da koncentracija tarčnega zaporedja

narašča eksponentno (Boyer, 2005). V teoriji lahko z metodo PCR identificiramo katerikoli taksonomski razred. Problem nastopi, ko želimo identificirati oziroma ločiti sorodne vrste bakterij kot so MKB. Uspešnost in uporabnost metode PCR v teh primerih temelji predvsem na dobrem poznavanju tarčne bakterije, skrbnem zasnovanju začetnih oligonukleotidov ter na temeljiti optimizaciji in validaciji postopka (Temmerman in sod., 2004).

Za identifikacijo neznanih bakterijskih izolatov zaradi svoje natančnosti pogosto uporablajo sekvenciranje gena za 16S ali 23S rRNA (Vandamme in sod., 1996). Sekvenciranje poda točno informacijo o nukleotidnem zaporedju. Pridobljeno sekvenco primerjamo s sekvencami DNA, ki so shranjene v podatkovnih bazah. Uspešnost in uporabnost sekvenciranja ribosomskih genov je še vseeno močno odvisno od zanesljivosti in pokritosti taksonomskih skupin v dostopnih bazah podatkov. Zaradi variabilnosti določene sekvence se lahko zgodi, da ne moremo dobiti točnih identifikacijskih rezultatov (Nubel in sod., 1996).

DNA ali njeni pomnožki iz selektivne PCR se lahko razrežejo z uporabo restrikcijskih encimov, ki prepoznajo in režejo DNA na mestih, kjer se pojavi specifične kratke sekvence. Pridobljeni restrikcijski fragmenti se ločijo glede na njihovo dolžino z uporabo gelske elektroforeze in se lahko odtisnejo na membrano z metodo prenosa po Southernu. Dolžino fragmenta, ki vsebuje specifično sekvenco, se določi z hibridizacijo označene DNA sonde na membrani. Tej tehniki pravimo polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Hibridizacijska sonda je fragment DNA ali RNA različne dolžine, ki se uporablja pri analizi DNA ali RNA vzorcev za detekcijo prisotnosti določenega nukleotidnega zaporedja. Označena sonda se najprej denaturira v enoverižno DNA in nato hibridizira na tarčno DNA (prenos po Southernu) ali RNA (prenos po Northernu), ki je imobilizirana na membrani. Iste sonde lahko uporabljam tudi za *in situ* analize, kot je hibridizacija na osnovi kolonije (angl. colony hybridisation). RFLP se največkrat uporablja za ločevanje sevov znotraj posamezne vrste. Tako kot pri vseh molekularnih metodah je tudi pri tej metodi zelo pomembno, da se izolira čim bolj nedotaknjena kromosomska DNA ali RNA (Temmerman in sod., 2004). Pri uporabi restrikcijskih encimov, ki režejo na zelo redkih mestih na genomu, dobimo velike fragmente DNA, ki jih je potrebno ločiti z gelsko

elektroforezo v pulzirajočem električnem polju (PFGE, angl. pulsed field gel electrophoresis). Zaradi velikosti se ti fragmenti pri klasični elektroforezi slabo ločujejo, pri PFGE pa se spreminja usmerjenost električnega polja in s tem smer potovanja DNA. Manjši fragmenti se na spremembe električnega polja hitro odzovejo, medtem ko večji porabijo večino časa samo za orientacijo molekule znotraj polja (McCartney, 2002).

Ribotipizacija zajema pridobivanje prstnega odtisa iz DNA restriktičkih fragmentov, ki vsebujejo del ali celoten gen, ki kodira 16S in 23S rRNA. S to metodo lahko identificiramo bakterije na podlagi razlik v genih za rRNA. DNA se najprej izolira in nato razreže na fragmente. DNA fragmenti se prenesejo na membrano, kjer poteka hibridizacija s sondami. Sonde imajo lahko za tarčo del sekvence rDNA ali pa celotnega rDNA operona. Tako dobljen vzorec se posname in shrani v bazo podatkov. Razlike v poziciji in intenzivnosti lis se uporabijo za identifikacijo bakterije. Sposobnost ločevanja te metode je v veliki meri odvisna od števila in tipa uporabljenih restriktičkih encimov ter sond. Za hibridizacijo se lahko uporabijo fluorescentno ali radioaktivno označene sonde (Temmerman in sod., 2004).

Še bolj napredna tehnika iskanja prstnih odtisov, ki združuje PCR z restriktičnim rezanjem, se imenuje polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (AFLP). Restriktični encimi, ki se uporabljam pri tej metodi, režejo DNA verigo tako, da nastanejo lepljivi konci, na katere se z ligacijo doda označeno adaptersko zaporedje nukleotidov. Skupina restriktičkih fragmentov se potem selektivno pomnoži z začetnimi oligonukleotidi, ki so komplementarni adapterskemu zaporedju. Pomnožke ločujemo z elektroforetskimi tehnikami in jih vizualiziramo z uporabo autoradiografije ali fluorescentnih metod. AFLP omogoča tako ločevanje vrst kot sevov (Temmerman in sod., 2004).

K tehnikam iskanja prstnih odtisov DNA se šteje tudi metoda naključno pomnožene polimorfne deoksiribonukleinske kisline (RAPD) in PCR ponavljajočih se elementov v genomu mikroorganizma (rep-PCR). Metoda iskanja prstnih odtisov Rep-PCR bazira na uporabi PCR in začetnih oligonukleotidov, ki odgovarjajo naravno prisotnim, vrinjenim, ponavljajočim se elementom pri bakterijah (Temmerman in sod., 2004). Analize RAPD pa vključujejo začetne oligonukleotide, ki so kratki ter nespecifični in se vežejo na neznana

mesta po analiziranem genomu. Produkti so pomnožena naključna zaporedja, ki se ločijo z elektroforezo. Metoda je zaradi izbire začetnih oligonukleotidov zelo fleksibilna in se lahko uporabi pri identifikaciji MKB na nivoju rodu in vrste. Ker začetni oligonukleotidi niso zasnovani tako, da bi bili specifični, se pri daljših študijah pogosto pokaže problem ponovljivosti te metode (Olive in Bean, 1999).

DNA-DNA hibridizacija je metoda, ki nam pokaže stopnjo sekvenčne sorodnosti dveh DNA zaporedij in je uporabna za diferenciacijo zelo sorodnih MO. DNA enega MO se označi in zmeša z neoznačeno DNA drugega, primerjalnega MO. S postopkom denaturacije in ponovne renaturacije se omogoči formiranje hibridne dvostranske DNA. Hibridizirane sekvence z veliko stopnjo podobnosti se vežejo močneje in zahtevajo več energije pri ločevanju. Dvostranska DNA se veže na kolono, ki se stopenjsko segreva. Po vsaki stopnji segrevanja se kolono izpira, sekvence, ki pri denaturaciji postanejo enoverižne, pa detektira v izpirku. Temperatura, pri kateri se označena zaporedja izperejo iz kolone, se primerja s temperaturo, pri kateri se označena zaporedja izperejo v kontrolnem vzorcu. Kontrolni vzorec vsebuje označeno DNA samo testnega MO. Slabost te metode je uporaba izotopov in nezmožnost ustvarjanja centralne baze podatkov (Temmerman in sod., 2004).

Ena od metod je zasnovana na prisotnosti plazmidov. Veliko MKB ima plazmide v različnem številu in velikosti. Profiliranje le teh se včasih uporablja za identifikacijo sevov. Problem te metode je, da nimajo vse bakterije plazmidov oziroma, da prisotnost plazmidov ni stabilna lastnost (Temmerman in sod., 2004).

2.4.2 Identifikacijske metode, ki ne potrebujejo predhodne kultivacije

Metode, opisane v prejšnjem poglavju, zahtevajo, da se testne izolate kultivira. Kultivacijsko odvisne metode imajo včasih slabo ponovljivost zaradi pomanjkanja ustreznih selektivnih gojišč. Zaradi teh in drugih slabosti kultivacijsko odvisnih metod, preiskovani izolati ne predstavljajo vedno prave mikrobne sestave vzorca (Ampe in sod., 1999). Zato so razvili nekatere, predvsem molekularne metode, ki ne potrebujejo gojitvenih tehnik pred analizo (Temmerman in sod., 2004).

Ena izmed metod, ki ne potrebuje predhodne kultivacije, je fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH). Fiksirane celice hibridiziramo s fluorescentno označenimi DNA sondami. Označene bakterije pa lahko z uporabo fluorescenčne mikroskopije opazujemo in preštejemo (Temmerman in sod., 2004). Pomembna prednost metode FISH je možnost detekcije in kvantitativno določanje nekultivabilnih MO ter določanje *in situ* celične vsebnosti rRNA. FISH je najbolj natančna metoda za kvantitativno študijo mikrobne populacije v naravnem habitatu (Randazzo in sod., 2009).

S pretočno citometrijo lahko izvedemo kvalitativno in kvantitativno analizo. Bakterije so v tekočem vzorcu ali suspenziji fluorescentno označene s specifičnimi barvili ali sondami, ki jih detektor pri prehodu skozi sistem zazna in prešteje. Uporaba specifičnih barvil in sond omogoča kvalitativno in kvantitativno analizo mikrobne populacije (Buntolf in Abee, 2002).

Gelska elektroforeza v denaturacijskem gradientu je ena izmed najbolj primernih in široko uporabnih metod za študije kompleksnih bakterijskih populacij iz različnih ekoloških niš (Muyzer, 1999). Ta tehnika, ki temelji na uporabi PCR, omogoča ločevanje mešanice pomnoženih fragmentov DNA na akrilamidnem gelu, ki vsebuje gradient denaturacijskega sredstva. Za vsako aplikacijo se pripravi optimalen denaturacijski gradient z mešanjem dveh akrilamidnih raztopin, ki vsebujejo 0 ali 100 % denaturacijskega sredstva (40 % formamid in 7 M urea). Podoben princip kot DGGE ima gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom (TTGE), kjer se kot denaturacijsko sredstvo uporablja postopno višanje temperature. Pri konvencionalnih agaroznih in akrilamidnih gelskih elektroforezah je mobilnost vsakega fragmenta DNA povezana z njegovo velikostjo. Pri DGGE pa se ti fragmenti, ki so enake velikosti, ločijo glede na njihov denaturacijski profil. V naraščajočem denaturacijskem okolju dvostranska DNA prehaja v enoverižno in pridobiva obliko zadrge. Spona iz gvanina in citozina na enim koncu vijačnice prepreči popolno razpiranje v enoverižno DNA. Kot rezultat teh konformacijskih sprememb, se prehod fragmentov DNA skozi akrilamidni gel drastično upočasni ali celo ustavi. Pozicija fragmenta v gelu je odvisna od nukleotidne sekvene, predvsem od vsebnosti gvanina in citozina v fragmentu (Muyzer in sod., 1993). S to metodo je pri denaturaciji majhnih fragmentov DNA (200-700 bp) možno zaznati razlike v enem samem baznem paru

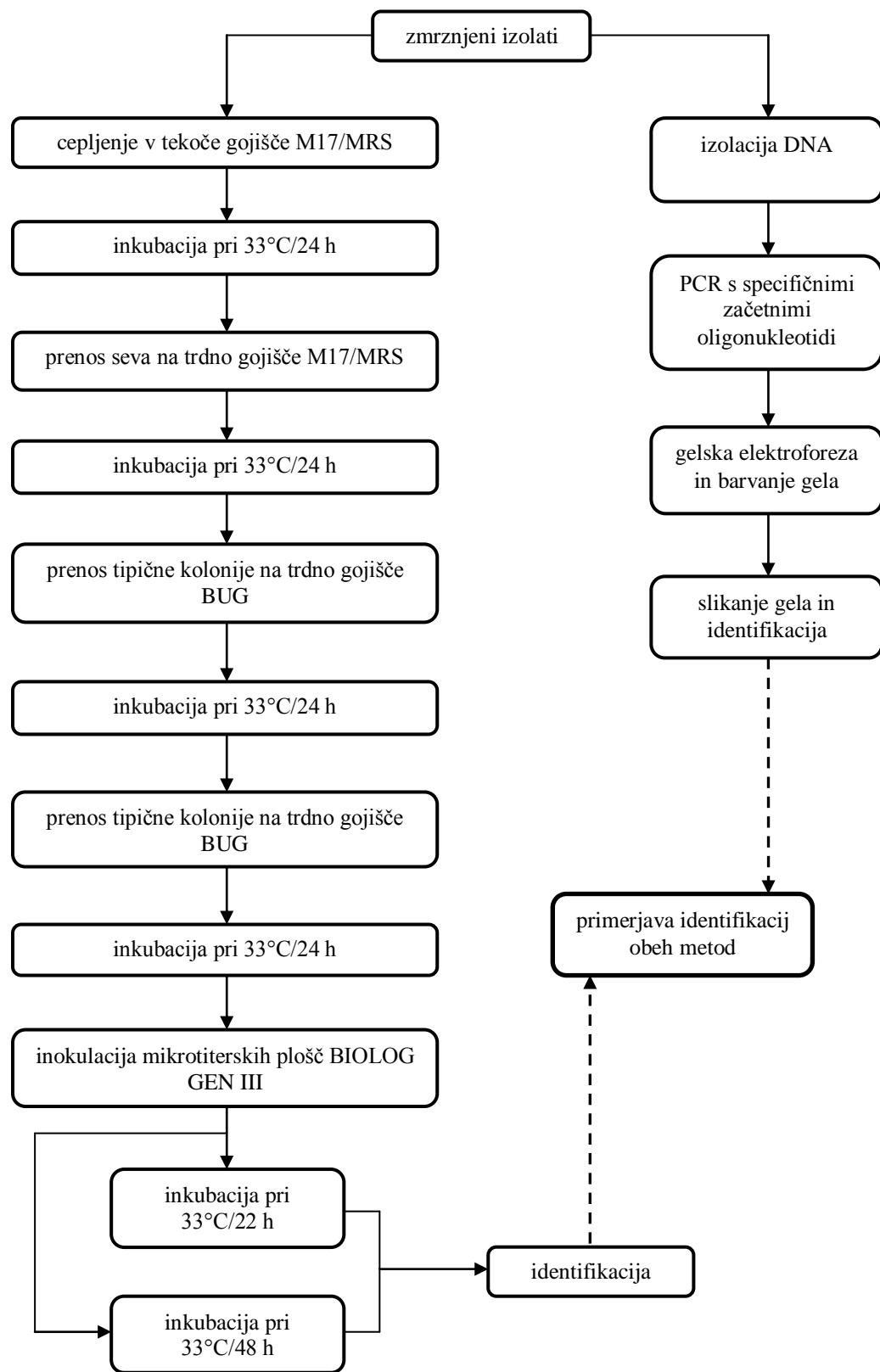
(Temmerman in sod., 2004). Univerzalni oligonukleotidi omogočajo analizo večine bakterijskih združb. Problem pri tej metodi je, da nekatere lise lahko zastopajo več različnih vrst in da dominantna mikroflora lahko prepreči vizualizacijo predstavnikov, ki so prisotni v nižjem številu (Zoetendal, 1998). Za izboljšanje detekcije teh predstavnikov v mikrobnem ekosistemu se uporabljo bolj specifični oligonukleotidi. DGGE pogosto sledi analiza dobljenih lis s sekvenciranjem, kar lahko naredi metodo dolgotrajno in težavno. DGGE se zadnje čase množično uporablja za analizo poteka različnih fermentacij (Temmerman in sod., 2004).

3 MATERIAL IN METODE DELA

Glavni cilj diplomske naloge je bil identificirati glavne predstavnike prevladajoče mlečnokislinske mikrobiote tradicionalnih ovčjih sirov Slovenije (Bovški ovčji sir, Kraški ovčji sir, Dolenjski ovčji sir), Hrvaške (Paški ovčji sir, Krčki ovčji sir), Srbije (Pirotški ovčji sir, Sjenički ovčji sir) ter Bosne in Hercegovine (Livanjski ovčji sir, Travnički ovčji sir) s sistemom BIOLOG za fenotipsko identifikacijo in preveriti/primerjati identifikacijo s PCR in začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za posamezne rodove in vrste MKB.

3.1 POTEK DELA

Preučevali smo 170 sevov, ki so jih raziskovalci v okviru SEE-ERA.NET projekta RegTraC predhodno izolirali iz tradicionalnih ovčjih sirov Slovenije, Hrvaške, Bosne in Hercegovine ter Srbije. Prečiščeni izolati so bili do analize z metodo BIOLOG shranjeni v tekočem gojišču MRS ali M17 z dodatkom glicerola (30 %) v zmrzovalniku pri - 80 °C. Do izolacije DNA in PCR pa smo prečiščene izolate hranili v tekočem gojišču MRS ali M17 v zmrzovalniku pri - 20 °C. Potek dela je prikazan na Sliki 1.



Slika 1: Shema poteka identifikacije bakterijskih izolatov iz sirov z metodo BIOLOG in PCR

3.2 MATERIAL

3.2.1 Bakterijski sevi izolirani iz prevladajoče mikroflore ovčjih sirov

170 sevov, ki smo jih vključili v raziskavo, so izolirali v okviru mednarodnega projekta RegTraC iz tradicionalnih ovčjih sirov zahodnega Balkana. Izolati so bili naključno izbrani iz gojišč M17 in MRS. Število izolatov iz posameznih sirov je prikazano v Preglednici 1.

Preglednica 1: Število izolatov iz posameznih tradicionalnih ovčjih sirov s področja zahodnega Balkana

IZOLATI		
siri	št. izolatov iz gojišča M17	št. izolatov iz gojišča MRS
slovenski tradicionalni ovčji siri		
Kraški ovčji sir	10	10
Bovški ovčji sir	10	10
Dolenjski ovčji sir	10	10
hrvaški tradicionalni ovčji siri		
Krčki ovčji sir	10	10
Paški ovčji sir	10	10
tradicionalni ovčji siri iz Bosne in Hercegovine		
Livanjski ovčji sir	10	10
Travnički ovčji sir	10	10
srbski tradicionalni ovčji siri		
Pirotski ovčji sir	10	/
Sjenički ovčji sir	10	10

3.2.2 Gojišča

3.2.2.1 Priprava tekočega gojišča MRS

Za pripravo tekočega gojišča MRS smo po navodilih proizvajalca v 1 L deionizirane vode raztopili 52,2 g/L gojišča MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija). Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom. Nato smo po 10 mL tekočega gojišča odpipetirali v epruvete ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko so se epruvete z gojiščem po končanem avtoklaviranju ohladile, smo jih do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.2.2 Priprava tekočega gojišča M17

Za pripravo tekočega gojišča M17 smo po navodilih proizvajalca v 1 L deionizirane vode raztopili 42,5 g/L gojišča M17 (Merck, Darmstadt, Nemčija). Gojišče smo dobro premešali z magnetnim mešalom. Nato smo po 10 mL tekočega gojišča odpipetirali v epruvete ter sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko so se epruvete z gojiščem po končanem avtoklaviranju ohladile, smo jih do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.2.3 Priprava trdnega gojišča MRS

Za pripravo 1 L trdnega gojišča MRS smo po navodilih proizvajalca v deionizirani vodi raztopili 68,2 g/L trdnega gojišča MRS (Merck, Darmstadt, Nemčija) in dobro premešali na magnetnem mešalu. Stopljeni gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na 45 - 55 °C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke, ki smo jih z delno odprtimi pokrovi pustili v brezprašni komori, dokler se gojišče ni ohladilo in strdilo. Nato smo petrijevke pokrili in do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.2.4 Priprava trdnega gojišča M17

Za pripravo 1 L trdnega gojišča M17 smo po navodilih proizvajalca v deionizirani vodi raztopili 55 g/L trdnega gojišča M17 (Merck, Darmstadt, Nemčija) in dobro premešali na magnetnem mešalu. Stopljeni gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na 45 - 55 °C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke, ki smo jih z delno odprtimi pokrovi pustili v brezprašni komori, dokler se gojišče ni ohladilo in strdilo. Nato smo petrijevke pokrili in do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.2.5 Priprava trdnega gojišča BUG

Za pripravo 1 L trdnega gojišča BUG smo po navodilih proizvajalca v deionizirani vodi raztopili 57 g/L gojišča BUG (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA) in dobro premešali na magnetnem mešalu. Stopljeni gojišče smo sterilizirali z avtoklaviranjem 15 min pri 121 °C. Ko se je gojišče ohladilo na 45 - 55 °C, smo ga nalili v sterilne plastične petrijevke, ki

smo jih z delno odprtimi pokrovi pustili v brezprašni komori, dokler se gojišče ni ohladilo in strdilo. Nato smo petrijevke pokrili in do uporabe shranili v hladilniku.

3.2.3 Material in oprema za delo s sistemom BIOLOG

Pri delu s sistemom BIOLOG smo uporabili sledeč material in opremo:

- brezprašna komora (TELSTAR),
- gojišče BUG (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- plastične eze za enkratno uporabo,
- inokulacijska tekočina IF-A in IF-C (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- Inoculatorz™ - sterilne vatirane palčke (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- multikanalska pipeta 10-100 µL (THERMO scientific),
- nastavki za pipete,
- turbidimeter (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- standardi za turbidimeter, 65% T in 85 % T (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- BIOLOG GEN III MicroPlate™ plošče (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- sterilne kadi,
- inkubator (Kambič),
- MicroStation™ čitalnik (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA),
- programska oprema MICROLOG 3 Version 5.2.01 (BIOLOG Inc., Hayward, ZDA).

3.2.4 Material in oprema za izolacijo DNA

Pri izolaciji DNA smo uporabili sledeč material in opremo:

- komercialni set za izolacijo DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega A1120, Madison, WI, ZDA),
- 50 mM EDTA, pH=8 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- lizocim (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),
- mutanolizin - *Streptomyces globisporus* (2500 U/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA),

- izopropanol (Merck, Dramstadt, Nemčija),
- 70 % etanol (Merck, Dramstadt, Nemčija),
- mikro-epruvete 1,5 mL,
- avtomatske pipete (THERMO scientific),
- nastavki za pipete,
- stojalo za mikro-epruvete,
- vrtičnik,
- centrifuga (Eppendorf),
- ledomat,
- vodna kopel.

3.2.5 Material in oprema za PCR

Za PCR smo uporabili sledeči material in opremo:

- 5 x Green GoTaq® Flexi Buffer - pufer brez MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 5 x Green GoTaq® Reaction Buffer - pufer z 7,5 mM MgCl₂ (Promega, Madison, WI, ZDA),
- 25 mM MgCl₂ Solution (Promega, Madison, WI, ZDA),
- začetni oligonukleotidi, 5µM (našteti v Preglednici 4) (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija),
- 10 mM deoksinukleotid trifosfati (dNTP) (Fermentas Life Sciences),
- GoTaq® DNA Polymerase - polimeraza, 5 U/µL (Promega, Madison, WI, ZDA),
- sterilna, deionizirana, mikrofiltrirana voda (miliQ),
- trakovi mikro-epruvet in pokrovčkov - po 8 skupaj,
- avtomatske pipete (THERMO scientific),
- nastavki za pipete,
- centrifuga (NovoAnalitica),
- hladilni podstavek za mikro-epruvete,
- vrtičnik,
- komora za PCR,

- ciklični termostat za pomnoževanje DNA pri PCR (Mastercycler Gradient, Eppendorf),
- DNA referenčnih sevov - pozitivna kontrola,
- izolirana DNA sevov, vključenih v analizo.

3.2.6 Material in oprema za analizo pomnožkov z gelsko elektroforezo

Za analizo pomnožkov smo uporabili sledeči material in opremo:

- 0,5 x TAE pufer,
- agarozna (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- barvilo SYBR Safe (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, ZDA),
- GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder - molekulski označevalec velikosti pomnožkov DNA (Fermentas International Inc., Litva),
- avtomatske pipete (THERMO scientific),
- nastavki za pipete,
- mikrovalovna pečica,
- pomnožki,
- aparatura za elektroforezo (BIO-RAD, California, ZDA),
- transiluminator (SYNGENE).

3.3 METODE

Identifikacijo izolatov MKB iz tradicionalnih ovčjih sirov smo naredili s fenotipsko metodo po sistemu BIOLOG in rezultate preverili/primerjali z molekularno metodo PCR in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi.

- Potek identifikacije z uporabo sistema BIOLOG:
 - priprava gojišč za oživljanje izolatov, shranjenih na - 80 °C,
 - oživljanje in priprava izolatov,
 - priprava gojišča BUG, namenjenega pripravi izolatov za postopek fenotipske identifikacije,

- cepljenje in inkubacija izolatov na gojišču BUG,
 - cepljenje in inkubacija izolatov na BIOLOG GEN III ploščah,
 - odčitavanje metabolne aktivnosti na BIOLOG GEN III ploščah s čitalnikom MicroStation™ in identifikacija s programsko opremo MICROLOG 3 Version 5.2.01.
- Potek identifikacije s PCR in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi:
 - izolacija DNA iz izolatov shranjenih na - 20 °C s setom za izolacijo DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit,
 - izpeljava PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za različne rodove in vrste MKB,
 - preverjanje produktov PCR z gelsko elektroforezo.

3.3.1 Oživljanje in priprava izolatov

Zmrznjene izolate smo najprej precepili z ezo v tekoče gojišče MRS ali M17 (odvisno od gojišča, na katerem je bil posamezen sev izoliran) in inkubirali 24 ur pri 33 °C. Med cepljenjem smo pazili, da se zmrznjena kultura v mikro-epruveti ne odtaja, zato smo izolate med samim postopkom hranili v hladilnem podstavku. Po inkubaciji smo z ezo prenesli sev iz tekočega gojišča na trdno gojišče MRS ali M17 in naredili razmaz. Nacepljena gojišča smo inkubirali 24 ur pri 33 °C. V naslednjem koraku smo prenesli eno tipično kolonijo iz trdnega gojišča MRS ali M17 na trdno gojišče BUG ter zopet inkubirali 24 ur pri 33 °C. Naslednji dan smo postopek ponovili in še drugič prenesli eno tipično kolonijo iz gojišča BUG na sveže gojišče BUG in inkubirali 24 ur pri 33 °C.

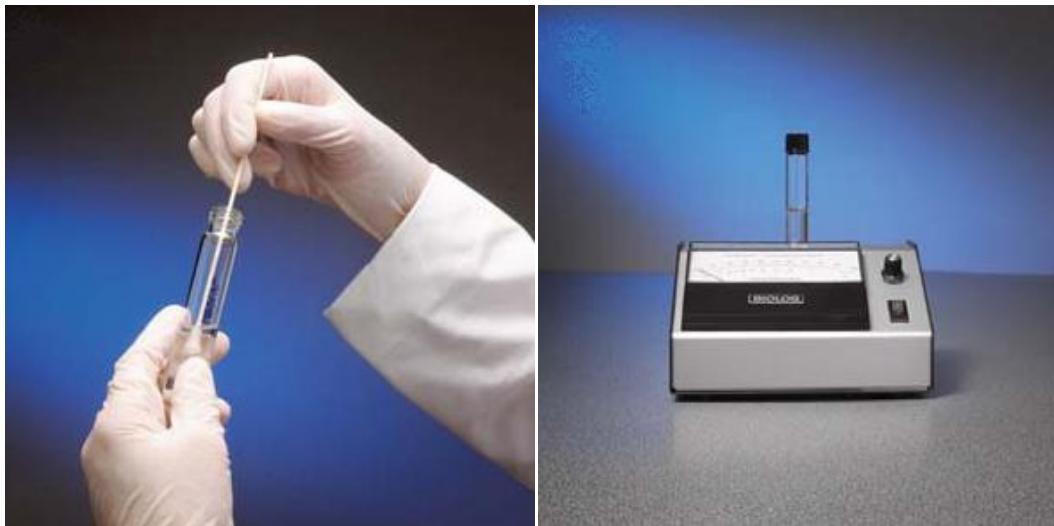
3.3.2 Identifikacija s sistemom BIOLOG

Preden smo začeli s celotnim postopkom, smo BIOLOG GEN III MicroPlate™ plošče in inokulacijsko tekočino IF-A ali IF-C ogreli na sobno temperaturo. Medtem smo brezprašno komoro, ki smo jo predhodno pol ure sterilizirali z UV svetlobo, zbrisali z etanolom in preverili točnost turbidimetra s standardi. Ko se je inokulacijska tekočina v epruveti ogrela, smo z nje s papirnato brisačo zbrisali prstne odtise, jo vstavili v turbidimeter ter ročno

nastavili transmitanco (T) na 100 %. Nato smo iz petrijevke BUG z Inoculatorz™ sterilno vatirano palčko zajeli tipične kolonije in jih prenesli v inokulacijsko tekočino do želene celične gostote. Proizvajalec v navodilih za uporabo sistema BIOLOG z GEN III mikrotiterskimi ploščami navaja štiri možne protokole (A, B, C1, C2). Med seboj se ločijo v vrsti inokulacijske tekočine in optični gostoti celic v tej tekočini, ki se uporablja za inokulacijo testnih mikrotiterskih plošč. Tri različne vrste inokulacijskih tekočin (A, B, C) se med seboj razlikujejo po tem, kako hitro se reducirajo do pozitivne barvne reakcije. Protokol izberemo glede na vrste bakterij, ki jih želimo identificirati. Protokol A je predstavljen kot splošni protokol, primeren za vse vrste bakterij, medtem ko proizvajalec za MKB priporoča protokola C1 in C2. Pri protokolu A in C1 je želena/priporočena celična gostota 90 - 98 % T, pri protokolu C2 pa 62 - 68 % T. Za določen protokol smo se odločili na podlagi hitrosti rasti izolatov na gojišču BUG. Če so bakterije na gojišču BUG slabo rasle, smo se odločili za protokol C2, ki je namenjen zelo počasi rastočim bakterijam. Drugače smo analizo izvajali po protokolu C1. Del vzorcev (20) smo vzporedno analizirali tudi po protokolu A. Pri prenosu kolonije z vatirano palčko smo pazili, da nismo zajeli delcev gojišča BUG, in da vzorca nismo kontaminirali.

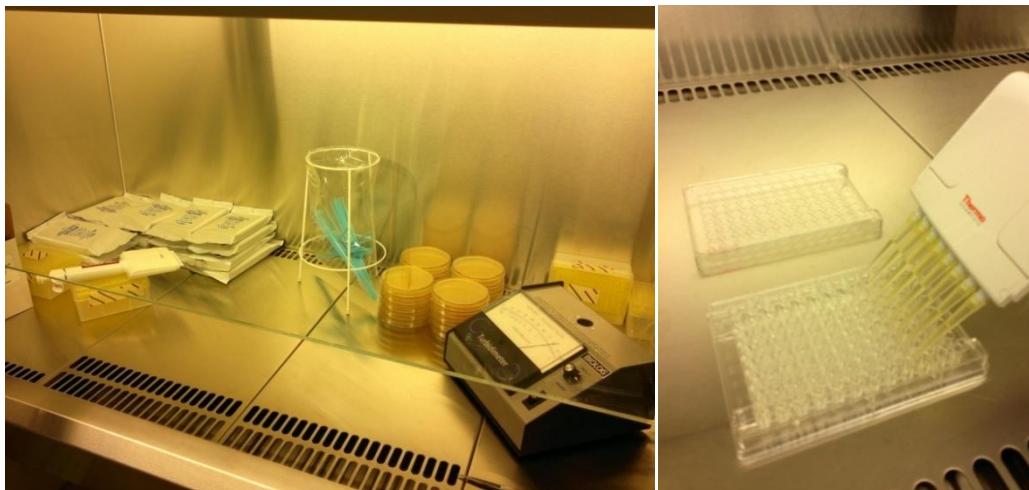


Slika 2: Prenos tipične kolonije z vatirano palčko (GEN III MicroPlate™, 2008)



Slika 3: Prenos zajete kolonije v inokulacijsko tekočino in umerjanje želene celične gostote na turbidimetru (GEN III MicroPlate™, 2008)

Inokulacijsko tekočino z želeno celično gostoto smo nato naložili v sterilno kad, iz katere smo z multikanalno pipeto odpipetirali po $100 \mu\text{L}$ vzorca v vsak kanalček na BIOLOG GEN III MicroPlate™ plošči. Pri pipetiranju v kanalčke smo pazili, da z nastavkom pipete nismo prenašali kemikalij v naslednje kanalčke. Plošče smo nato inkubirali 22 ur pri 33°C .



Slika 4: Priprava delovnega prostora v brezprašni komori in inokulacija BIOLOG GEN III MicroPlate™ plošče

Po končani inkubaciji smo plošče vstavili v MicroStation™ čitalnik in naredili identifikacijo s programsko opremo MICROLOG 3 Version 5.2.01. Meritve na vseh ploščah smo opravili po 22 in 48 urah inkubacije.



Slika 5: Postavitev plošče v MicroStation™ čitalnik in pričetek identifikacije s programsko opremo MICROLOG 3 Version 5.2.01

3.3.3 Izolacija DNA

DNA smo izolirali s komercialnim setom za izolacijo DNA Wizard® Genomic DNA Purification Kit, in sicer iz čiste kulture, shranjene v tekočem gojišču MRS ali M17 na - 20 °C. Suspenzijo kulture (1 ml) smo najprej centrifugirali v mikro-epruveti (2 minuti pri 16000 x g) in odlili supernatant. Nadaljnje postopke izolacije DNA, za po Gramu pozitivne bakterije, smo povzeli po proizvajalcu (Promega, Madison, WI, ZDA). Določene korake v protokolu smo spremenili.

Uvedene spremembe:

- reakcijsko mešanico za lizo celične stene smo pripravili iz 600 µL 50 mM EDTA z dodatkom 6 mg lizocima in 6 µL mutanolizina,
- encim RNAza smo dodali v končnem koraku, po rehidraciji DNA peleta z Rehydration Solution.

Izolirano in očiščeno DNA smo do analize s PCR shranili na - 20 °C.

3.3.4 Identifikacija s PCR in specifičnimi začetnimi oligonukleotidi

PCR smo izvedli na predhodno izolirani DNA iz čiste bakterijske kulture. Pred pričetkom dela smo pol ure sterilizirali brezprašno komoro z UV svetlobo in pri nadalnjem poteku analize obvezno uporabljali rokavice. Za vse testirane vzorce smo pripravili reakcijsko mešanico kot je navedeno v Preglednici 2. Reakcijsko mešanico smo razdelili v PCR mikro-epruvete, vstavljeni v hladilni podstavek. Nazadnje smo v posamezno mikro-epruveto z reakcijsko mešanicijo odpipetirali še DNA vzorca, pozitivne kontrole (DNA referenčnega seva) oziroma negativne kontrole (sterilna miliQ voda). Pozitivnih kontrol nismo imeli za vrste *Ent. asini*, *Ent. durans*, *Ent. villorum/porcinus*, *Leuc. mesenteroides*. Vzorce smo premešali na vrtičniku in jih za kratek čas vstavili v centrifugo, da se je raztopina zbrala na dnu mikro-epruvete. Nato smo mikro-epruvete naložili v ciklični termostat in nastavili želeni program (Preglednica 3). Po končanem pomnoževanju DNA smo do nanosa na gel za elektroforezo pomnožke shranili pri 4 °C.

Sestava reakcijske mešanice:

- sterilna voda miliQ,
- reakcijski pufer: 5 x Green GoTaq® Reaction Buffer / 5 x Green GoTaq® Flexi Buffer, 25 mM MgCl₂,
- začetni oligonukleotidi (5 µM),
- dNTP (10 mM),
- DNA-polimeraza.

Preglednica 2: Odpipetiran volumen posameznih reagentov pri pripravi reakcijske mešanice za PCR

rod/vrsta bakterije	reagent	odpipetiran volumen [µL]	vir
<i>Enterococcus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	sterilna voda miliQ	9,7	Deasy in sod., 2000; Lee in sod., 2000; Pfannebecker in Fröhlich, 2008; Forsman in sod., 1997; Torriani in sod., 1999
	GoTaq® pufer z MgCl ₂	4	
	začetni oligonukleotid I	2	
	začetni oligonukleotid II	2	
	dNTP	0,2	
	GoTaq® polimeraza	0,1	
	skupaj	18	
<i>Ent. asini</i> , <i>Ent. casseliflavus</i> , <i>Ent. durans</i> , <i>Ent. gallinarum</i> , <i>Ent. hirae</i> , <i>Ent. villorum/porcinus</i>	DNA vzorec	2	Jackson in sod., 2004
	sterilna voda miliQ	7,3	
	GoTaq® pufer brez MgCl ₂	4	
	MgCl ₂	2,4	
	začetni oligonukleotid I	2	
	začetni oligonukleotid II	2	
	dNTP	0,2	
<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i>	GoTaq® polimeraza	0,1	Dutka-Malen in sod., 1995
	skupaj	18	
	DNA vzorec	2	
	sterilna voda miliQ	6,1	
	GoTaq® pufer brez MgCl ₂	4	
	MgCl ₂	5,6	
	začetni oligonukleotid I	1	
<i>Lactobacillus</i>	začetni oligonukleotid II	1	Dubernet in sod., 2002
	dNTP	0,2	
	GoTaq® polimeraza	0,1	
	skupaj	17	
	DNA vzorec	3	
	sterilna voda miliQ	8,7	
	GoTaq® pufer z MgCl ₂	4	
<i>Lb. plantarum</i>	začetni oligonukleotid I	2	Walter in sod., 2000
	začetni oligonukleotid II	2	
	dNTP	0,2	
	GoTaq® polimeraza	0,1	
	skupaj	18	
	DNA vzorec	2	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 2: Odpipetiran volumen posameznih reagentov pri pripravi reakcijske mešanice za PCR

rod/vrsta bakterije	reagent	odpipetiran volumen [µL]	vir
<i>Lb. rhamnosus</i>	sterilna voda miliQ	8,1	Walter in sod., 2000
	GoTaq® pufer brez MgCl ₂	4	
	MgCl ₂	1,6	
	začetni oligonukleotid I	2	
	začetni oligonukleotid II	2	
	dNTP	0,2	
	GoTaq® polimeraza	0,1	
	skupaj	18	
	DNA vzorec	2	
<i>Lac. lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. paracasei</i>	sterilna voda miliQ	11,7	Barakat in sod., 2000; Ward in Timmins., 1999
	GoTaq® pufer z MgCl ₂	4	
	začetni oligonukleotid I	1	
	začetni oligonukleotid II	1	
	dNTP	0,2	
	GoTaq® polimeraza	0,1	
	skupaj	18	
	DNA vzorec	2	
<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Str. thermophilus</i>	sterilna voda miliQ	15,55	Collado in sod., 2009; Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997
	GoTaq® pufer z MgCl ₂	6	
	začetni oligonukleotid I	3	
	začetni oligonukleotid II	3	
	dNTP	0,3	
	GoTaq® polimeraza	0,15	
	skupaj	28	
	DNA vzorec	2	
<i>Lb. helveticus</i>	sterilna voda miliQ	4,3	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997
	GoTaq® pufer z MgCl ₂	4	
	MgCl ₂	1,2	
	začetni oligonukleotid I	4	
	začetni oligonukleotid II	4	
	dNTP	0,4	
	GoTaq® polimeraza	0,1	
	skupaj	18	
	DNA vzorec	2	

V cikličnem termostatu je potekala PCR v treh korakih. Prva faza je bila začetek reakcije, kjer se je reakcijska mešanica segrela na 95 °C za določen čas. Namen te faze je aktiviranje polimeraze. Sledila je faza pomnoževanja, ki je potekala v treh stopnjah: denaturacija DNA, prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje novo nastajajoče DNA verige s pomočjo polimeraze. V zadnjem koraku PCR smo določen čas vzdrževali temperaturo na 72 °C, z ciljem, da so se zaključile vse nedokončane reakcije pomnoževanja.

Preglednica 3: Program za izvedbo PCR pri posameznem rodu ali vrsti bakterije

rod/vrsta bakterije	faza reakcije	program	število ponovitev	vir
<i>Enterococcus</i>	začetek	95 °C/3 min	1	Deasy in sod., 2000
	denaturacija	95 °C/1 min		
	prileganje	60 °C/1 min	25	
	podaljševanje	72 °C/1 min		
<i>Ent. asini</i>	zaključek	72 °C/5 min	1	Jackson in sod., 2004
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	60 °C/45 s	30	
<i>Ent. casseliflavus</i>	podaljševanje	72 °C/45 s		Jackson in sod., 2004
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
<i>Ent. durans</i>	prileganje	55 °C/45 s	30	Jackson in sod., 2004
	podaljševanje	72 °C/45 s		
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	
<i>Ent. faecalis</i>	denaturacija	95 °C/30 s		Dutka-Malen in sod., 1995
	prileganje	55 °C/1 min	30	
	podaljševanje	72 °C/1 min		
	zaključek	72 °C/5 min	1	
<i>Ent. faecium</i>	začetek	95 °C/3 min	1	Dutka-Malen in sod., 1995
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	55 °C/30 s	30	
	podaljševanje	72 °C/30 s		
<i>Ent. gallinarum</i>	zaključek	72 °C/5 min	1	Jackson in sod., 2004
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	55 °C/45 s	30	
<i>Ent. hirae</i>	podaljševanje	72 °C/45 s		Jackson in sod., 2004
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
<i>Ent. villorum/porcinus</i>	prileganje	55 °C/1 min	30	Jackson in sod., 2004
	podaljševanje	72 °C/1 min		
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	62 °C/45 s	30	
	podaljševanje	72 °C/45 s		
	zaključek	72 °C/5 min	1	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3: Program za izvedbo PCR pri posameznem rodu ali vrsti bakterije

rod/vrsta bakterije	faza reakcije	program	število ponovitev	vir
<i>Lactobacillus</i>	začetek	95 °C/3 min	1	Dubernet in sod., 2002
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	55 °C/30 s	30	
	podaljševanje	72 °C/30 s		
<i>Lb. casei/paracasei</i>	zaključek	72 °C/5 min	1	Ward in Timmins., 1999
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	50 °C/30 s	30	
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	podaljševanje	72 °C/1 min		Torriani in sod., 1999
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/45 s		
<i>Lb. helveticus</i>	prileganje	58 °C/30 s	35	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997
	podaljševanje	72 °C/30 s		
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	92 °C/2 min	1	
<i>Lb. plantarum</i>	denaturacija	95 °C/30 s		Walter in sod., 2000
	prileganje	55 °C/30 s	30	
	podaljševanje	72 °C/30 s		
	zaključek	72 °C/5 min	1	
<i>Lb. rhamnosus</i>	začetek	95 °C/3 min	1	Walter in sod., 2000
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	58 °C/30 s	30	
	podaljševanje	72 °C/30 s		
<i>Lac. lactis</i>	zaključek	72 °C/5 min	1	Barakat in sod., 2000
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	55 °C/30 s	30	
<i>Leuc. mesenteroides</i>	podaljševanje	72 °C/30 s		Lee in sod., 2000
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/5 min	1	
	denaturacija	95 °C/1 min		
<i>Pediococcus</i>	prileganje	60 °C/1 min	30	Pfannebecker in Fröhlich, 2008
	podaljševanje	72 °C/2 min		
	zaključek	72 °C/10 min	1	
	začetek	95 °C/5 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	70 °C/30 s	32	
	podaljševanje	72 °C/30 s		
	zaključek	72 °C/5 min	1	

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3: Program za izvedbo PCR pri posameznem rodu ali vrsti bakterije

rod/vrsta bakterije	faza reakcije	program	število ponovitev	vir
<i>Pediococcus acidilactici</i>	začetek	95 °C/5 min	1	Collado in sod., 2009
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	66 °C/1 min	30	
	podaljševanje	72 °C/1 min		
<i>Staphylococcus</i>	zaključek	72 °C/5 min	1	Forsman in sod., 1997
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
	prileganje	55 °C/30 s	30	
<i>Streptococcus</i>	podaljševanje	72 °C/30 s		Forsman in sod., 1997
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	
	denaturacija	95 °C/30 s		
<i>Str. thermophilus</i>	prileganje	55 °C/30 s	30	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997
	podaljševanje	72 °C/30 s		
	zaključek	72 °C/5 min	1	
	začetek	95 °C/3 min	1	

Po končani PCR smo dobili pomnožke določene velikosti, na osnovi katerih smo določili rod in vrsto bakterij, izoliranih iz sirov.

Preglednica 4: Uporabljeni začetni oligonukleotidi pri PCR za posamezen rod ali vrsto bakterije ter iskana velikost pomnožkov

rod/vrsta bakterije	začetni oligonukleotid I	začetni oligonukleotid II	velikost pomnožkov	vir
<i>Enterococcus</i>	E1	E2	737 bp	Deasy in sod., 2000
<i>Ent. asini</i>	AS1	AS2	365 bp	Jackson in sod., 2004
<i>Ent. casseliflavus</i>	CA1	CA2	288 bp	Jackson in sod., 2004
<i>Ent. durans</i>	DU1	DU2	295 bp	Jackson in sod., 2004
<i>Ent. faecalis</i>	ddl E. faecalis E1	ddl E. faecalis E2	941 bp	Dutka-Malen in sod., 1995
<i>Ent. faecium</i>	ddl E. faecium F1	ddl E. faecium F2	550 bp	Dutka-Malen in sod., 1995
<i>Ent. gallinarum</i>	GA1	GA2	173 bp	Jackson in sod., 2004
<i>Ent. hirae</i>	HI1	HI2	187 bp	Jackson in sod., 2004
<i>Ent. villorum/porcinus</i>	PO1	PO2	280 bp	Jackson in sod., 2004
<i>Lactobacillus</i>	Lbl Ma1-rev	R16-1	~ 250 bp	Dubernet in sod., 2002
<i>Lb. casei</i>	Y2	CAS1	290 bp	Ward in Timmins., 1999
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Lb1	Llb1	1065 bp	Torriani in sod., 1999
<i>Lb. helveticus</i>	LheI	LheII	500-650 bp	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997
<i>Lb. paracasei</i>	Y2	Para1	290 bp	Ward in Timmins., 1999
<i>Lb. plantarum</i>	Lfpr	PlanII	~ 200 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lb. rhamnosus</i>	PrI	RhaII	186 bp	Walter in sod., 2000
<i>Lac. lactis</i>	27f	Lla	100 bp	Barakat in sod., 2000
<i>Leuc. mesenteroides</i>	Lmes-f	Lmes-r	1150 bp	Lee in sod., 2000
<i>Pediococcus</i>	Pedio23S_F	Pedio23S_R	701 bp	Pfannebecker in Fröhlich, 2008
<i>Pediococcus acidilactici</i>	PAC23S_F	P23S_R	213 bp	Collado in sod., 2009
<i>Staphylococcus</i>	STA I	STA II	100-200 bp	Forsman in sod., 1997
<i>Streptococcus</i>	STR I	STR II	150-210 bp	Forsman in sod., 1997
<i>Str. thermophilus</i>	ThI	ThII	205-304 bp	Tilsala-Timisjärvi in Alatossava, 1997

3.3.5 Analiza pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo

Po končani PCR smo pomnožke pregledovali z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravljen agarozni gel smo potopili v posodo za elektroforezo s TAE pufrom (5x). Pazili smo, da TAE pufer popolnoma prekriva gel. V žepke gela smo odpipetirali 10 µL pomnožkov iz reakcije PCR ter 3 µL molekulskega označevalca (GeneRuler 100 bp). Po tem, ko smo naložili vzorce, smo vzpostavili tok in potek elektroforeze vodili pri napetosti 100 V. Čas trajanja postopka smo določili s pomočjo reakcijskega pufra, ki vsebuje modro in rumeno barvo. V 1 % agaroznem gelu se modra barva v pufru premika s približno isto hitrostjo kot DNA fragmenti velikosti 3 - 5 kb, rumena barva pa skozi gel potuje s hitrostjo DNA fragmentov, ki so manjši od 50 bp. Tako smo vizualno detektirali prihod rumene barve na spodnji rob gela in takrat elektroforezo ustavili. Ločene fragmente DNA smo na gelu obarvali z raztopino barvila SYBR Safe (45 min). To barvilo se vrine med bazne pare DNA in ima maksimum vzbujanja svetlobe pri valovni dolžini 280 in 502 nm ter emisijski maksimum pri valovni dolžini 530 nm. Obarvana DNA postane vidna ob presvetlitvi z UV svetlogo ali virom svetlobe, ki ima valovno dolžino med 470 in 530 nm.

3.3.5.1 Priprava agaroznega gela

Za analizo smo pripravili 1,8 % agarozni gel po sledečem postopku:

- v 210 mL 5 x TAE pufra smo raztopili 3,78 g agaroze,
- raztopino smo segrevali v mikrovalovni pečici do popolne raztopitve in nato ohladili na 45 do 55 °C,
- ohlajeno agarozno raztopino smo vlili v model z glavnikom,
- po strditvi smo glavnik odstranili in gel vstavili v elektroforezo.

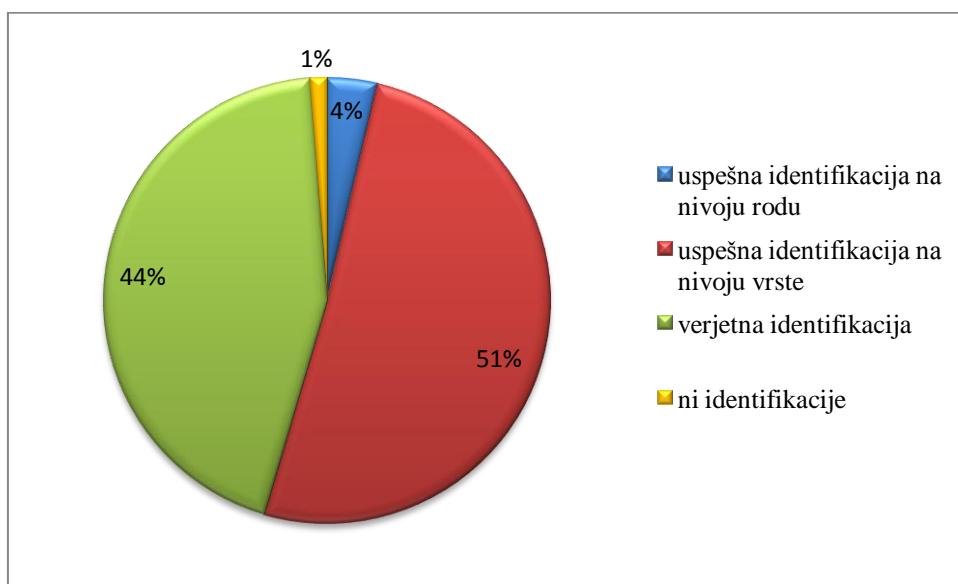


Slika 6: Gelska elektroforeza

4 REZULTATI

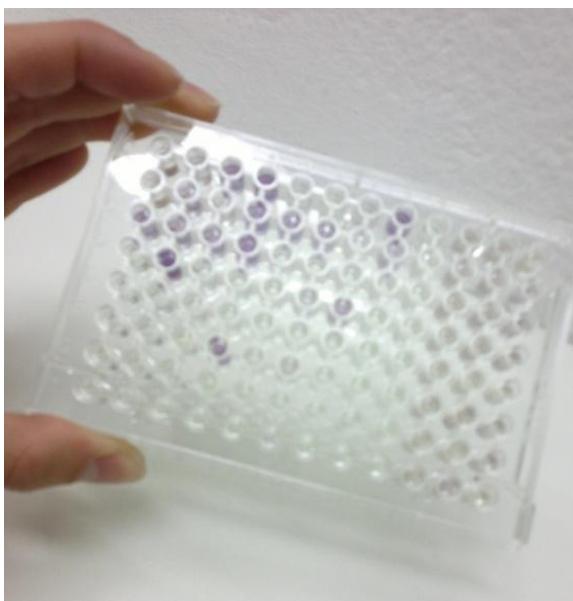
4.1 USPEŠNOST IDENTIFIKACIJE IZOLATOV Z METODO BIOLOG

Metoda BIOLOG omogoča identifikacijo bakterij na osnovi fenotipskih lastnosti, njeni prednosti pa sta enostavnost in zmožnost istočasne analize velikega števila izolatov. Zato smo jo izbrali za identifikacijo prevladajoče mikrobne populacije tradicionalnih ovčjih sirov Slovenije (Bovški ovčji sir, Kraški ovčji sir, Dolenjski ovčji sir), Hrvaške (Paški ovčji sir, Krčki ovčji sir), Srbije (Pirotški ovčji sir, Sjenički ovčji sir) ter Bosne in Hercegovine (Livanjski ovčji sir, Travnički ovčji sir). V raziskavo smo vključili 170 izolatov bakterij. Izolate smo najprej identificirali s sistemom za fenotipsko identifikacijo BIOLOG, nato pa rezultate skušali potrditi še s PCR in začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za posamezne robove in vrste MKB. Pri Pirotskem siru smo v raziskavo vključili le izolate, ki so izrasli na trdnem gojišču M17, ker na trdnem gojišču MRS, pri uporabljenih razredčitvah, ni bilo vidnih kolonij. Problem slabe rasti se je pojavil tudi pri petih izolatih iz Krčkega sira, ki smo jih med čiščenjem izgubili. Končno število analiziranih izolatov je bilo zato le 165.



Slika 7: Uspešnost identifikacije izolatov iz tradicionalnih ovčjih sirov z metodo BIOLOG (v %)

Iz slike 7 je razvidno, da smo od vseh izolatov z metodo BIOLOG uspešno identificirali samo 55 % izolatov na nivoju rodu oziroma 51 % izolatov na nivoju vrste. V primeru, kjer z metodo ni bilo možno pridobiti identifikacije, nam je program MICROLOG 3 javil najbolj verjetno možno identifikacijo izolata. Pri analizi smo tako v 44 % pridobili le predlog o najverjetnejši identifikaciji. Vsega skupaj se je pri 1 % izolatov zgodilo, da na gojišču BUG niso rasli ali pa je bil za analizo predlagan drug protokol. Pri večini izolatov smo se posluževali protokola C1, ki je namenjen počasi rastočim, mikraerofilnim, po Gramu pozitivnim kokom in palčkam. Ker rast in identifikacija laktobacilov na BIOLOG ploščah z uporabo tega protokola ni bila najbolj uspešna, smo v primerih, kjer je dovolj kolonij zraslo na gojišču BUG, uporabili protokol C2. Ta protokol je namenjen bolj zahtevnim in zelo počasi rastočim bakterijam, ki so občutljive za kisik. Dvajset izolatov, ki smo jih analizirali po protokolu C1 ali C2, smo ponovno analizirali še po protokolu A. Ta protokol naj bi bil uporaben za analizo večine bakterijskih vrst. Identifikacija je bila še manj uspešna, saj so bili pri 9 izolatih po 22 urah rezultati vseh reakcij negativni, po 48 urah pa v večini primerov identifikacije ni bilo, predlagana najverjetnejša identifikacija pa se je kar pri 14 izolatih razlikovala od predlagane identifikacije, ki smo jo dobili po protokolu C1 ali C2.

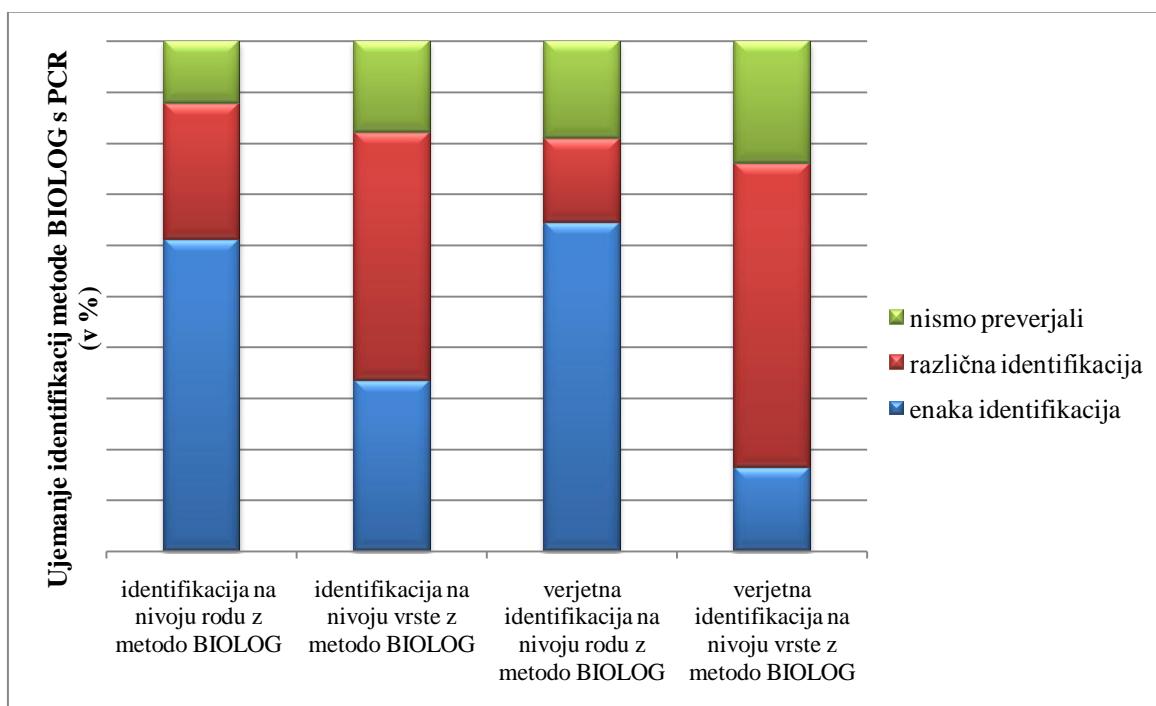


Slika 8: Pozitivne reakcije (obarvani kanalčki) na plošči BIOLOG, na osnovi katerih računalniški program poda identifikacijo izolatov

Pri rezultatih analize izolatov z metodo BIOLOG je prišlo do razlik tudi med meritvami po 22 in 48 urah in sicer se je kar pri 28 % primerov zgodilo, da je sistem podal pri drugi meritvi drugačen predlog identifikacije. V nekaterih primerih (3%) pa je bila kakršnakoli informacija o identifikaciji možna šele po 48 urah.

4.2 PRIMERJAVA REZULTATOV IDENTIFIKACIJE IZOLATOV Z METODO BIOLOG IN PCR

Rezultate identifikacij, ki smo jih dobili z metodo BIOLOG, nam je s PCR uspelo potrditi v 61 % na nivoju rodu in v 33 % na nivoju vrste (Slika 9). Različne identifikacije z metodo BIOLOG in PCR smo dobili za 27 % izolatov na nivoju rodu in za 49 % izolatov na nivoju vrste. Nekaj predlogov o možni identifikaciji, ki smo jih dobili z metodo BIOLOG, smo uspeli potrditi s PCR. In sicer 64 % na nivoju rodu in 17 % na nivoju vrste, medtem ko smo dobili različne rezultate pri 17 % predlaganih identifikacij na nivoju rodu in 59 % na nivoju vrste. Vsi rezultati identifikacij z metodo BIOLOG in PCR so prikazani v prilogah A - I. Potrebno je omeniti, da pri PCR za bakterije *Ent. asini*, *Ent. durans*, *Ent. villorum/porcinus* in *Leuc. mesenteroides* nismo imeli pozitivnih kontrol. Kot pozitiven rezultat smo upoštevali tiste rezultate, kjer so bili na gelu po barvanju vidni pomnožki z ustreznou velikostjo baznih parov za določeno vrsto.



Slika 9: Primerjava identifikacij izolatov iz tradicionalnih ovčjih sirov z metodo BIOLOG in PCR

Če povzamemo vse rezultate identifikacij, ki smo jih pridobili z metodo BIOLOG, tudi če identifikacije ni bilo in je bil podan le predlog o možni bakterijski vrsti, ter jih primerjamo z rezultati identifikacij z analizo PCR, se je 63 % identifikacij ujemalo na nivoju rodu in 25 % na nivoju rodu in vrste. Vsi izolati, ki so se po fenotipski identifikaciji (BIOLOG) uvrstili v vrsto *W. viridescens*, so se po genotipski identifikaciji (PCR) uvrstili v rod *Lactobacillus*. Podobno se je zgodilo tudi pri analizi sevov iz Pirotskega sira, kjer so se vsi streptokoki s PCR potrdili kot vrsta *Str. thermophilus*, sistem BIOLOG pa je kot rezultat identifikacije podal druge vrste streptokokov (*Str. bovis*, *Str. vestibularis*, *Str. mutans* in *Str. anginosus*).

V Preglednici 5 so prikazani rezultati identifikacije izolatov s sistemom BIOLOG, za katere nismo naredili analize z metodo PCR, v preglednici 6 pa rezultati identifikacije izolatov s sistemom BIOLOG, pri katerih smo z metodo PCR naredili analizo le na nivoju rodu. Genotipske identifikacije niso bile opravljene, ker nismo imeli ustreznih začetnih oligonukleotidov, saj smo sprva menili, da bomo z genotipsko metodo potrjevali le rezultate identifikacije naključno izbranih izolatov. Bakterijske vrste v Preglednici 5 in 6, ki jih je identificiral sistem BIOLOG, ne sodijo med tipične predstavnike prevladujoče

mikrobiote sirov. Poleg neobičajnih MKB so bile identificirane tudi vrste, ki ne pripadajo MKB.

Preglednica 5: Rezultati identifikacije izolatov s sistemom BIOLOG, pri katerih nismo naredili analize z metodo PCR

	vrste bakterij			
	slovenski siri	hrvaški siri	siri iz Bosne in Hercegovine	srbski siri
MKB	<i>Weissella viridescens</i>	<i>Weissella viridescens</i> , <i>Vagococcus fessus</i>	<i>Carnobacterium mobile</i>	<i>Weissella viridescens</i>
druge bakterije		<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Corynebacterium freneyi</i> , <i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	<i>Microbacterium marytipicum</i> , <i>Cellulomonas biazotea</i> , <i>Sanguibacter keddieii</i> , <i>Dermobacter hominis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Corynebacterium minutissimum</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i>

Preglednica 6: Rezultati identifikacije izolatov s sistemom BIOLOG, pri katerih smo naredili analizo z metodo PCR le na nivoju rodu

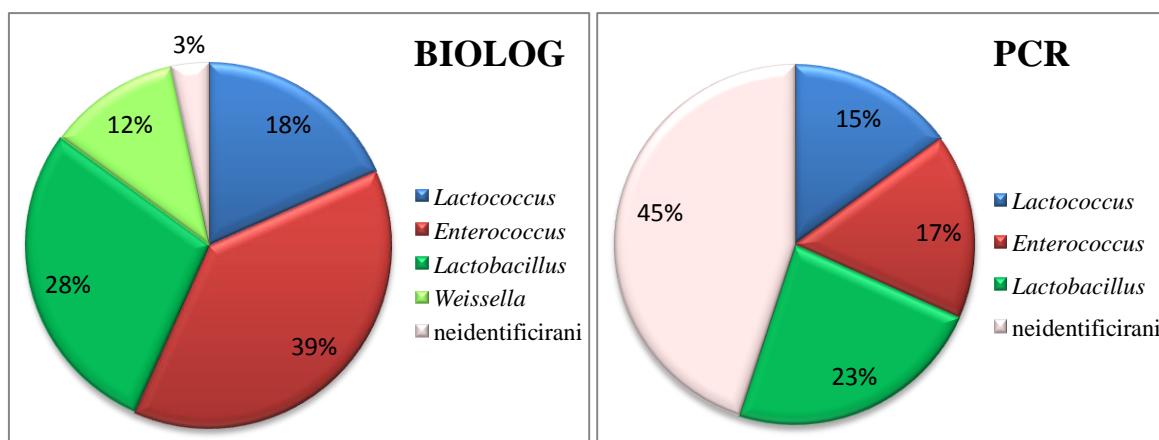
	vrste bakterij			
	slovenski siri	hrvaški siri	siri iz Bosne in Hercegovine	srbski siri
MKB	<i>Ent. pseudoavium</i> , <i>Ent. haemoperoxidus</i> , <i>Ent. gilvus</i> , <i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , <i>Lb. hamsteri</i> , <i>Lb. bifementas</i> , <i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. fructivorans</i> , <i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , <i>Ent. pseudoavium</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Str. galloyticus</i> subsp. <i>galloyticus</i>	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , <i>Lb. jensenii</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. sake</i>	<i>Str. bovis</i> , <i>Str. mutans</i> , <i>Str. vestibularis</i> , <i>Str. anginosus</i>
druge bakterije		<i>Staph. haemolyticus</i>		<i>Staph. haemolyticus</i> , <i>Staph. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i> , <i>Staph. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>

4.3 SESTAVA PREVLADUJOČE MIKROBNE POPULACIJE OVČJIH SIROV

Zaradi težav, s katerimi smo se srečali pri identifikaciji izolatov s sistemom BIOLOG, podajamo v nadaljevanju rezultate identifikacij izolatov ločeno za fenotipsko in genotipsko identifikacijo.

4.3.1 Slovenski tradicionalni ovčji siri

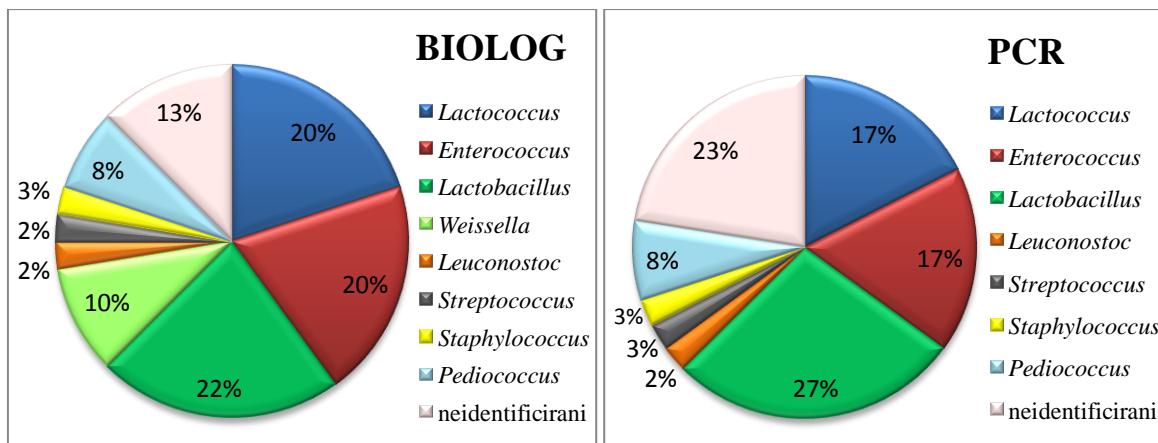
Z metodo BIOLOG smo iz slovenskih sirov identificirali 58 izolatov. Pri PCR smo izhajali iz osnovne identifikacije, ki jo je podal sistem BIOLOG in uspeli identificirati 33 izolatov. Po fenotipski identifikaciji (Slika 10) predstavljajo največji delež prevladujoče mikrobne populacije sirov predstavniki rodov *Enterococcus* (39 %), *Lactobacillus* (28 %), *Lactococcus* (18 %) in *Weissella* (12 %). Podobno sestavo mikrobne populacije smo dobili tudi z genotipsko identifikacijo, vendar se deleži posameznih rodov razlikujejo. Poleg tega je za 7 izolatov, ki smo jih s PCR potrdili kot predstavnike rodu *Lactobacillus*, metoda BIOLOG predlagala identifikacijo *W. viridescens*. Collins in sod. (1993) so prvi predlagali rod *Weissella*. Bakterija *W. viridescens* pa je bila prvotno locirana med laktobacili (Huys in sod., 2012). Rezultati identifikacije izolatov, ki smo jih osamili s trdnih gojišč M17 in MRS ter analizirali s sistemom BIOLOG in metodo PCR, so prikazani v Prilogi A - C.



Slika 10: Rezultati identifikacije izolatov iz slovenskih tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)

4.3.2 Hrvaški tradicionalni ovčji siri

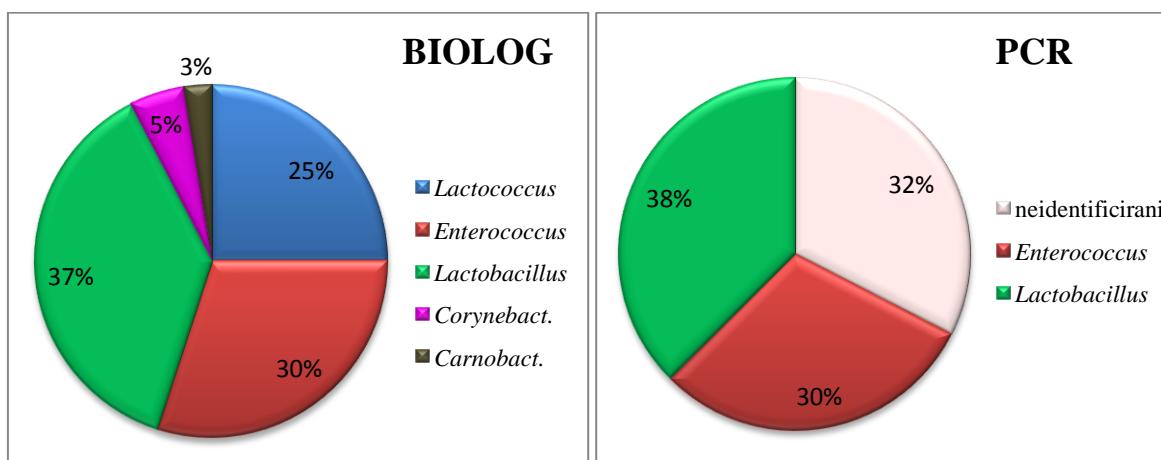
Z metodo BIOLOG smo iz hrvaških sirov identificirali 35 izolatov. Pri PCR smo izhajali iz osnovne identifikacije, ki jo je podal sistem BIOLOG in uspeli identificirati 31 izolatov. Po fenotipski identifikaciji (Slika 11) predstavljajo največji delež prevladujoče mikrobne populacije sirov predstavniki rodov *Lactobacillus* (22 %), *Enterococcus* (20 %) in *Lactococcus* (20 %). Identificirali pa smo tudi bakterije rodov *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* in *Pediococcus*. Podobno sestavo mikrobne populacije smo dobili tudi z genotipsko identifikacijo, vendar se deleži posameznih rodov razlikujejo. Poleg tega je za 4 izolate, ki smo jih s PCR potrdili kot predstavnike rodu *Lactobacillus*, metoda BIOLOG predlagala identifikacijo *W. viridescens*. Rezultati identifikacije izolatov, ki smo jih osamili s trdnih gojišč M17 in MRS ter analizirali s sistemom BIOLOG in metodo PCR, so prikazani v Prilogi D - E.



Slika 11: Rezultati identifikacije izolatov iz hrvaških tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)

4.3.3 Tradicionalni ovčji siri s področja Bosne in Hercegovine

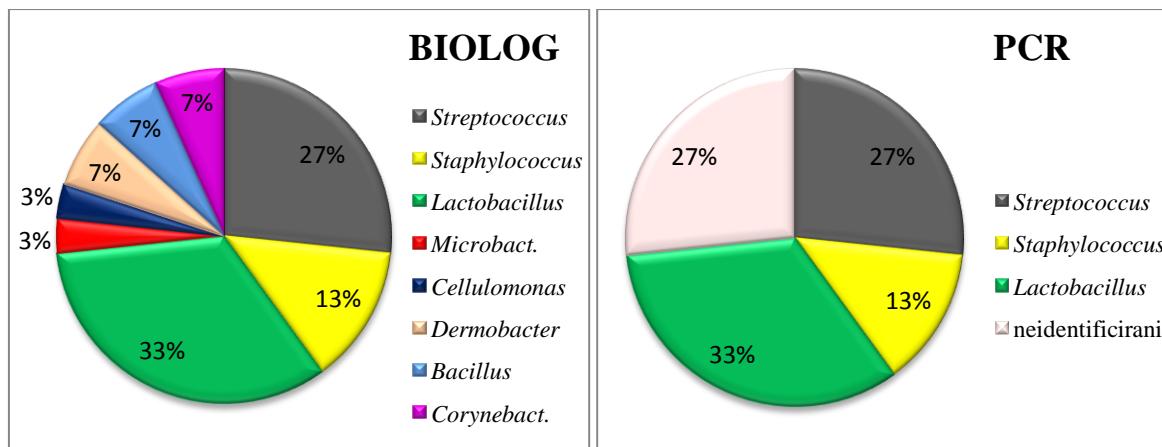
Z metodo BIOLOG smo iz sirov s področja Bosne in Hercegovine identificirali 40 izolatov. Pri PCR smo izhajali iz osnovne identifikacije, ki jo je podal sistem BIOLOG in uspeli identificirati 25 izolatov. Po fenotipski identifikaciji (Slika 12) predstavljajo največji delež prevladujoče mikrobne populacije sirov predstavniki rodov *Lactobacillus* (37 %), *Enterococcus* (30 %) in *Lactococcus* (25 %). V majhnem številu smo identificirali še rodova *Corynebacterium* in *Carnobacterium*. Podobno sestavo prevladujoče mikrobne populacije smo dobili tudi z genotipsko identifikacijo, z izjemo rodu *Lactococcus*. Rezultati identifikacije izolatov, ki smo jih osamili s trdnih gojišč M17 in MRS ter analizirali s sistemom BIOLOG in metodo PCR, so prikazani v Prilogi F - G.



Slika 12: Rezultati identifikacije izolatov iz tradicionalnih ovčjih sirov s področja Bosne in Hercegovine, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)

4.3.4 Tradicionalni ovčji siri s področja Srbije

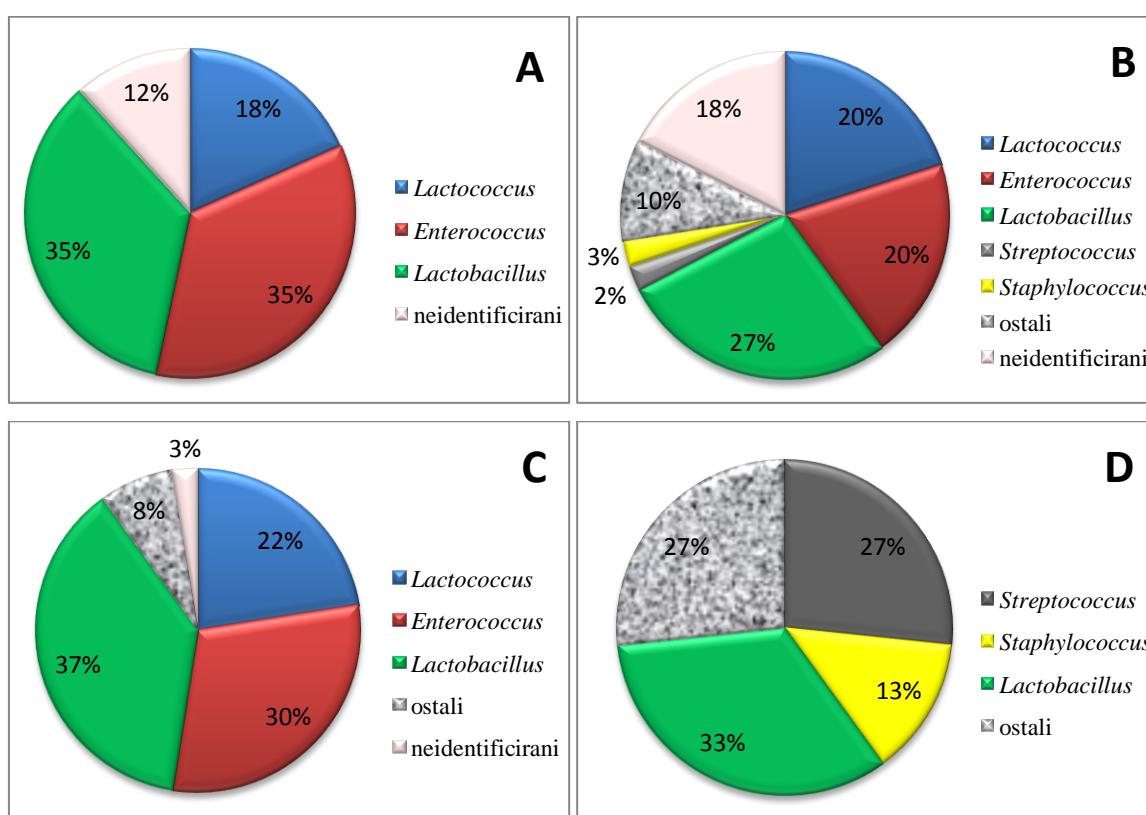
Z metodo BIOLOG smo iz srbskih sirov identificirali 30 izolatov. Pri PCR smo izhajali iz osnovne identifikacije, ki jo je podal sistem BIOLOG in uspeli identificirati 22 izolatov. Po fenotipski identifikaciji (Slika 13) predstavljajo največji delež prevladujoče mikrobne populacije sirov predstavniki rodov *Lactobacillus* (33 %), *Streptococcus* (27 %) in *Staphylococcus* (13 %). Enake deleže predstavnikov omenjenih rodov smo uspeli potrditi tudi z genotipsko identifikacijo, medtem ko je 27 % izolatov, ki jih je sistem BIOLOG identificiral kot predstavnike rodov *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Dermobacter*, *Bacillus* in *Corynebacterium* ostalo neidentificiranih, saj zaradi pomanjkanja začetnih oligonukleotidov, nismo izvajali PCR. Rezultati identifikacije izolatov, ki smo jih osamili s trdnih gojišč M17 in MRS ter analizirali s sistemom BIOLOG in metodo PCR, so prikazani v Prilogi H - I.



Slika 13: Rezultati identifikacije izolatov iz srbskih tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (v %)

4.3.5 Primerjava mikrobne populacije sirov glede na njihovo področje izdelave

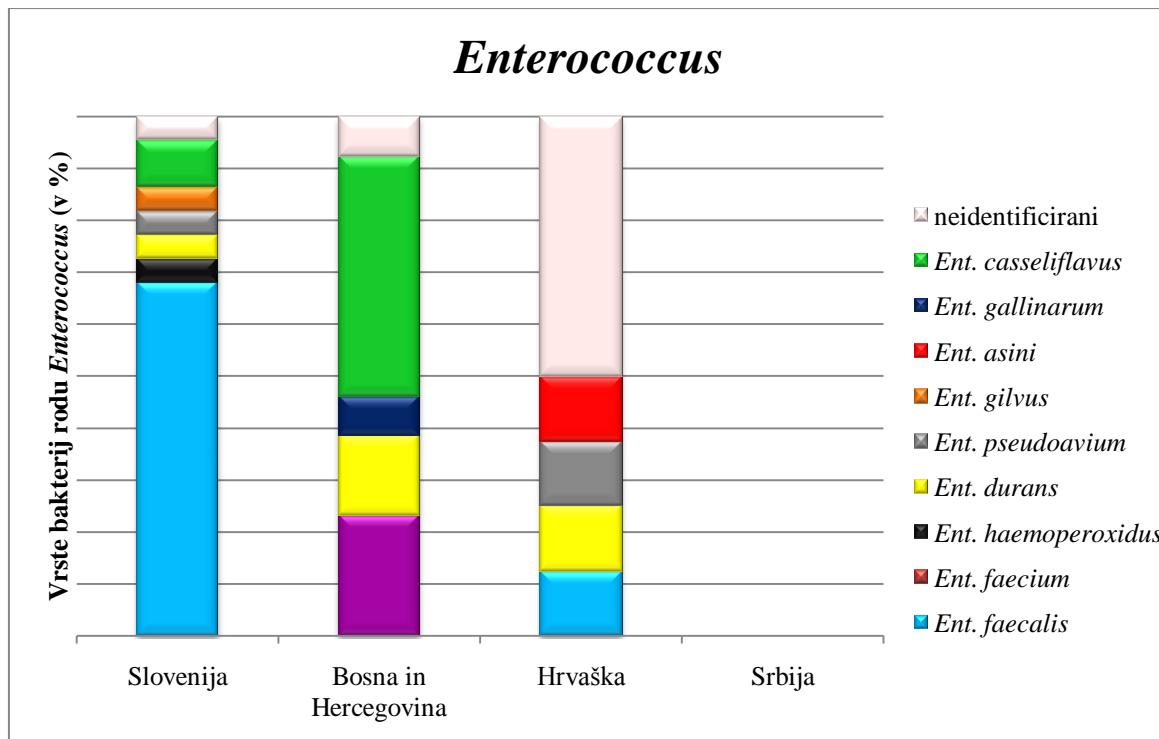
Med siri smo naredili primerjavo mikrobne združbe glede na področje izdelave. Pri interpretaciji rezultatov smo upoštevali identifikacije rodov in vrst s sistemom BIOLOG, ki so se ujemale z rezultati genotipske identifikacije, ter rezultate identifikacij s sistemom BIOLOG, za katere PCR nismo opravili, ker nismo imeli na voljo specifičnih začetnih oligonukleotidov (predvsem netipični predstavniki prevladajoče mikrobne populacije zrelih sirov) in so na Sliki 14 prikazani z oznako »ostali«.



Slika 14: Sestava prevladajoče mikrobiote slovenskih sirov (A), hrvaških sirov (B), sirov iz Bosne in Hercegovine (C) in srbskih sirov (D), določena z metodo BIOLOG in za nekatere rodove potrjena s PCR

Pri vseh sirih pripada največji delež bakterij prevladajoče mikrobiote rodu *Lactobacillus* (Slika 14). Pri interpretaciji rezultatov smo k laktobacilom šteli tudi po metodi BIOLOG identificirano vrsto *W. viridescens* (11), ki je bivša predstavnica rodu *Lactobacillus* (Huys in sod., 2012). S PCR smo pri teh izolatih rod *Lactobacillus* potrdili, vrste pa v celoti identificirali kot *Lb. casei/paracasei*. Razen pri srbskih sirih se v večjem deležu pojavljata

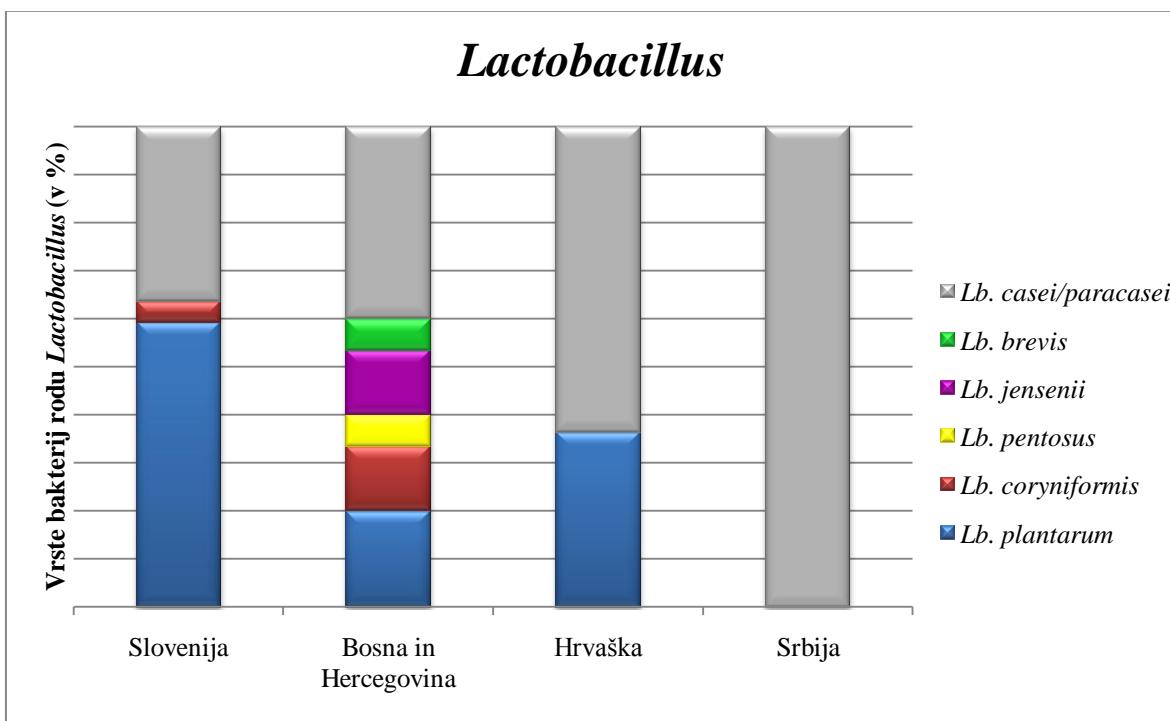
še rodova *Lactococcus* in *Enterococcus*. Od vseh sirov se po prevladujoči mikrobioti najbolj razlikujejo srbski siri, pri katerih so poleg laktobacilov v večjem deležu zastopani predstavniki rodu *Streptococcus* (27 %), sledijo jim stafilocoki (13 %), nato pa v manjših deležih, za prevladujočo mikrobioto sirov, netipični predstavniki rodov *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Dermobacter*, *Bacillus* in *Corynebacterium*.



Slika 15: Vrste bakterij rodu *Enterococcus* v sirih iz različnih področij zahodnega Balkana, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR

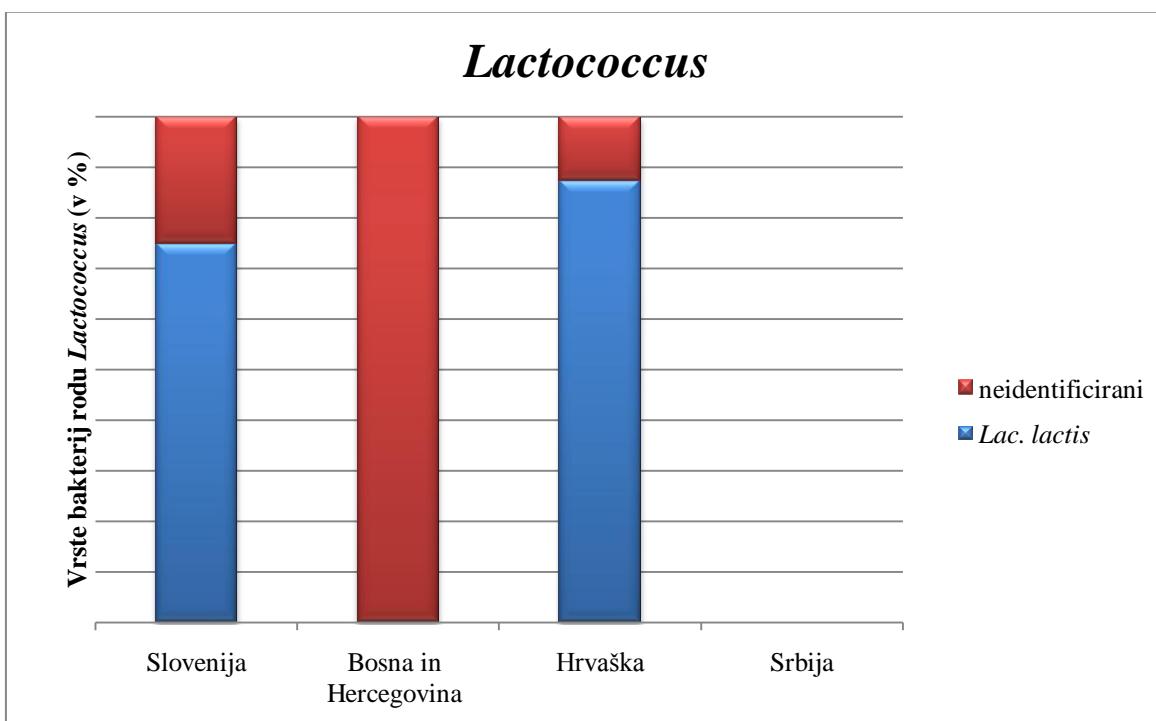
Iz slike 15 je razvidno, da se znotraj rodu *Enterococcus* pri slovenskih sirih najpogosteje pojavlja vrsta *Ent. faecalis*. Pri interpretaciji rezultatov smo za slovenske sire, pri nekaterih izolatih (10), upoštevali identifikacijo metode BIOLOG za vrsto *Ent. faecalis* kljub temu, da pri PCR nismo dobili pomnožkov z za rod in vrsto specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Glede na to, da je vrsta tipična predstavnica mikrobiote tradicionalnih sirov (Čanžek Majhenič in sod., 2005; Mohar Lorbeg in sod., 2009) je možno, da izolacija DNA in PCR nista bili uspešni. Pri slovenskih sirih so prisotne še vrste *Ent. haemoperoxidus*, *Ent. durans* in *Ent. gilvus*. Pri 2 izolatih iz slovenskih sirov in pri 6 izolatih sirov iz Bosne in Hercegovine, smo z metodo BIOLOG identificirali tudi vrsto

Ent. casseliflavus, kar pa s PCR na nivoju vrste nismo uspeli potrditi. Med enterokoki se, pri sirih iz Bosne in Hercegovine, pojavljajo še vrste *Ent. faecium*, *Ent. durans* in *Ent. gallinarum*. Pri hrvaških sirih smo identificirali enterokoke vrste *Ent. faecalis*, *Ent. durans*, *Ent. pseudoavium* in *Ent. asini*. Pri srbskih sirih enterokokov nismo zasledili.



Slika 16: Vrste bakterij rodu *Lactobacillus* v sirih iz različnih področij zahodnega Balkana, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR

Iz slike 16 je razvidno, da sta med laktobacili najpogosteje prisotni vrsti *Lb. plantarum* in *Lb. casei/paracasei*. Pri interpretaciji rezultatov smo za slovenske sire, pri nekaterih izolatih (6), upoštevali identifikacijo metode BIOLOG za vrsto *Lb. plantarum* kljub temu, da s PCR z za rod in vrsto specifičnimi začetnimi oligonukleotidi nismo dobili pomnožkov. Podobno kot za *Ent. faecalis* namreč velja, da je vrsta tipična predstavnica mikrobiote Kraškega ovčjega sira (Čanžek Majhenič in sod., 2007) zato je možno, da izolacija DNA in PCR nista bili uspešni. Najbolj pestro združbo laktobacilov so imeli siri iz Bosne in Hercegovine, v katerih smo poleg vrste *Lb. casei/paracasei* in *Lb. plantarum*, našli še *Lb. coryniformis* subsp. *torquens*, *Lb. pentosus*, *Lb. jensenii* in *Lb. brevis*. Druga skrajnost pa so bili srbski siri, katerih edini predstavnik laktobacilov je bila vrsta *Lb. casei/paracasei*.



Slika 17: Vrste bakterij rodu *Lactococcus* v sirih iz različnih področij zahodnega Balkana, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR

Z metodo BIOLOG smo pri sirih iz Slovenije, Hrvaške ter Bosne in Hercegovine med najpogostejšimi predstavniki mikrobne združbe identificirali tudi bakterijo *Lac. lactis* subsp. *lactis*. Pri analizi s PCR smo imeli le vrstno specifične začetne oligonukleotide. Pri sirih iz Bosne in Hercegovine se fenotipska identifikacija za vrsto *Lac. lactis* z genotipsko identifikacijo ni potrdila, fenotipska identifikacija pa se z genotipsko identifikacijo pri tej vrsti bakterije ni potrdila tudi pri manjšemu deležu slovenskih in hrvaških sirov (Slika 17). S PCR rodu nismo preverjali, vendar pa glede na raziskave drugih avtorjev velja, da tako laktokoki kot vrsta *Lac. lactis* spadajo med tipične predstavnike mikrobne združbe tradicionalnih sirov (Antunac in sod., 2008; Radulović in sod., 2011; Trmčić in sod., 2008; Carić, 1993).

Streptokoke in stafilokoke smo zasledili le med izolati iz sirov s področja Hrvaške in Srbije. Vsi streptokoki so se pri srbskih sirih s PCR potrdili za vrsto *Str. thermophilus*, sistem BIOLOG pa je kot rezultat identifikacije podal vrste *Str. bovis*, *Str. vestibularis*, *Str. mutans* in *Str. anginosus*. Vrsta *Str. thermophilus* je sicer tipična predstavnica Pirotskega

sira (Carić, 1993). Pri srbskih izolatih smo zasledili tudi pestro sestavo vrst znotraj rodu *Staphylococcus* in sicer *Staph. haemolyticus*, *Staph. capitis* subsp. *ureolyticus* ter *Staph. hominis* subsp. *hominis*, ki pa smo jih s PCR potrjevali le na nivoju rodu. Pri hrvaških sirih je bilo število streptokokov in stafilokokov v primerjavi s srbskimi siri občutno manjše, saj sta bila le dva izolata identificirana kot vrsti *Str. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* in *Staph. haemolyticus*.

Preglednica 7: Vrste bakterij, izolirane iz sirov zahodnega Balkana, ki so predstavljale manjši delež mikrobne populacije, identificirane z metodo BIOLOG in za nekatere vrste potrjene s PCR

	ostale vrste bakterij, zastopane v majhnem številu			
	slovenski siri	hrvaški siri (10 % izolatov)	siri iz Bosne in Hercegovine (8 % izolatov)	srbski siri (27 % izolatov)
MKB		<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Pediococcus parvulus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Carnobacterium mobile</i>	
druge bakterije		<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Corynebacterium freneyi</i> , <i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	<i>Microbacterium marytypicum</i> , <i>Cellulomonas biazotea</i> , <i>Dermobacter hominis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Corynebacterium minutissimum</i> , <i>Corynebacterium xerosis</i>

Pri srbskih sirih smo identificirali največ netipičnih predstavnikov mikrobne populacije sirov (27 %). Poleg laktobacilov, streptokokov in stafilokokov, ki predstavljajo večino, se tu nahajajo še bakterije vrste *Dermobacter hominis*, *Cellulomonas biazotea*, *Microbacterium marytypicum*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Corynebacterium minutissimum* in *Corynebacterium xerosis* (Preglednica 7). Tudi pri sirih iz Bosne in Hercegovine smo v manjšem številu zasledili neobičajne predstavnike mikrobne združbe sirov. Identificirali smo vrste *Carnobacterium mobile*, *Corynebacterium freneyi* in *Corynebacterium lipophiloflavum*. Pri hrvaških sirih manjši odstotek predstavljajo bakterije vrste *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus parvulus* in *Eikenella corrodens*. Pri slovenskih sirih, razen prevladujočih bakterij rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus* in *Enterococcus*, drugih bakterij nismo zasledili.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Proizvodnja sira in drugih mlečnih izdelkov ima dolgo tradicijo. Ti izdelki so bogat vir MKB, ki naseljujejo različne ekološke niše. Specifične lastnosti surovega mleka, prehrana živali, proces izdelave in naravno prisotna mikrobiota, ki je odgovorna za potek fermentacije in zorenja, imajo zelo pomembno vlogo pri oblikovanju okusa in drugih senzoričnih lastnosti sirov iz surovega mleka (Terzić-Vidojević in sod., 2009). Preučevanje prisotne mikrobne združbe in jasna identifikacija vrst in sevov, ki so vključeni v fermentacijo, je zelo pomembno. Medina in Nuñez (2004) omenjata, da je za vzdrževanje karakteristik različnih sirov potrebno ohraniti njihovo biološko raznolikost, od katere je odvisen proces zorenja. To pa je mogoče z uporabo avtohtonih starterskih kultur.

Mikrobiota v tradicionalnih sirih je zelo heterogena in se spreminja med zorenjem (Terzić-Vidojević in sod., 2009). Med proučevanimi izolati iz ovčjih sirov, ki so bili predstavniki prevladujoče mikrobne populacije ob zaključenem zorenju sirov, so bile najmočneje zastopane vrste rodu *Lactobacillus* in sicer *Lb. casei/paracasei* in *Lb. plantarum*. Vrsta *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* je pogosto prisotna v siru, narejenem iz surovega mleka (Terzić-Vidojević in sod., 2009). *Lactobacillus casei/paracasei* in *Lb. plantarum* sta bakteriji, ki se lahko razmnožujeta skozi celoten proces zorenja sira (Mannu in sod., 2000). Eden izmed razlogov za ta pojav je njihova sposobnost izkoriščanja citrata kot potencialnega vira ogljika (Palles in sod., 1998). Mezofilni laktobacili, ki ponavadi predstavljajo večino nestarterskih MKB pri zorenju tradicionalnih sirov, pomembno prispevajo k oblikovanju tipičnega okusa sira (Albenzio in sod., 2001). Razen pri srbskih sirih smo v večjem deležu identificirali še predstavnike rodov *Lactococcus* in *Enterococcus*. *Ent. faecalis* je pogosto najdena vrsta v tradicionalnih sirih (Čanžek Majhenič in sod., 2005; Mohar Lorbeg in sod., 2009; Centeno in sod., 1999). Visoka proteolitična aktivnost nekaterih sevov *Ent. faecalis* verjetno prispeva k senzoričnim in teksturnim značilnostim sira (Centeno in sod., 1999). Različne vrste laktokokov prav tako, s proizvodnjo kisline in proteolizo, pripomorejo k izoblikovanju specifičnih aromatičnih komponent, ki vplivajo na okus sira (Psoni in sod., 2007). Med temi komponentami so

najbolj pomembni alkoholi in aldehydi, ki jih prispevajo laktokoki z razgradnjo aminokislin preko transaminazne reakcije (Morales in sod., 2003). Raziskovalci se trudijo, da bi njihov vpliv pri zorenju sira natančno preučili ter nekatere seve nato vključili v starterske kulture. Z bolj raznovrstno startersko kulturo bi se tako lahko izboljšale in popestrile senzorične lastnosti izdelkov (Psoni in sod., 2007; Morales in sod., 2003).

Dolenjski, Bovški, Kraški, Paški, Krčki in Livanjski sir spadajo k trdim tipom sira iz ovčjega mleka. Po raziskavah Rogelj (2005) naj bi v Kraškem ovčjem siru enterokoki, poleg laktobacilov, predstavljeni prevladujočo mikrobno populacijo. Kot prevladujočo vrsto med enterokoki so identificirali vrsto *Ent. faecalis*, med laktobacili je prevladovala vrsta *Lb. paracasei*, ostali laktobacili pa so pripadali vrstam *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus* (Čanžek Majhenič in sod., 2007). V naši raziskavi smo pri Kraškem siru izmed laktobacilov zasledili le *Lb. plantarum*. V večjem številu pa smo identificirali še vrsto *Lac. lactis* subsp. *lactis*. Tako kot omenja Rogelj (2005) smo z metodo BIOLOG identificirali tudi enterokoke in sicer *Ent. faecalis*, vendar identifikacije s PCR nismo uspeli potrditi. Glede na to, da je vrsta tipični predstavnik mikrobiote tega sira, smo pri interpretaciji rezultatov vseeno upoštevali identifikacijo metode BIOLOG. Neuspešno identifikacijo z metodo PCR smo pripisali metodološki napaki, neuspešni izolaciji DNA ali PCR. PCR smo sicer za te izolate ponavljali, vendar je bil rezultat identifikacije zopet negativen. Pri pregledu dendrograma metode BIOLOG smo pri vzorcih Kraškega ovčjega sira za enterokoke, ki se s PCR niso ujemali, sicer opazili bližnjo sorodnost. Sorodnost pa smo opazili tudi med laktobacili, pri katerih se identifikacije z metodo BIOLOG in PCR niso ujemale. Med izolati iz slovenskih ovčjih sirov so tako kot pri Kraškem tudi pri Bovškem in Dolenjskem ovčjem siru predstavljeni pomemben delež prevladujoče mikrobne populacije predstavniki rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus* in *Lactococcus*. Poleg vrst *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* in *Ent. faecalis*, ki jih omenja Rogelj (2005), smo identificirali še vrsto *Lac. lactis* subsp. *lactis* in v manjšem številu vrste *Ent. durans*, *Ent. casseliflavus*, *Ent. gilvus*, *Ent. haemoperoxidus* in *Lb. coryniformis* subsp. *torquens*.

Kot že omenjeno, spadata hrvaška sira (Krčki in Paški) prav tako v skupino trdih sirov iz ovčjega mleka. Antunac in sod. (2008) pravijo, da se pri izdelavi Krčkega sira dodaja starterska kultura, sestavljena iz MKB *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, *Lac. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* in *Lb. helveticus*. Mi smo med izolati Krčkega sira poleg laktokokov in laktobacilov zasledili še bakterije rodov *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* in *Pediococcus*, ki so očitno predstavniki tipične, nestarterske mikroflore tega sira. V skupino trdih sirov iz ovčjega mleka spada tudi italijanski sir Pecorino, katerega mikrobnou populacijo lahko primerjamo s Kraškim, Dolenjskim, Bovškim, Paškim, Krčkim in Livanjskim ovčjim sirom. Pecorino je trivialno ime za italijanske sire narejene iz ovčjega mleka. Popolnoma zrel sir iz ovčjega mleka naj bi naseljevale bakterije rodu *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* in mezofilni laktobacili. Dominantna mikrobna populacija se sicer razlikuje od sira do sira, zajemala pa naj bi bakterije vrste *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. fermentum*, *Ent. durans*, *Ent. faecium*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Leuconostoc* spp. (Di Cagno in sod., 2003). Nekaj od teh vrst smo identificirali tudi med izolati iz ovčjih sirov, ki smo jih proučevali. Poleg enterokokov, ki jih navaja avtor, smo identificirali še vrste *Ent. faecalis*, *Ent. casseliflavus*, *Ent. haemoperoxidus*, *Ent. gilvus*, *Ent. asini*, *Ent. pseudoavium* in *Ent. gallinarum*, ki so, razen prvih dveh, manj pogosto navajani predstavniki tipične mikrobne populacije tradicionalnih sirov. Od laktobacilov smo mi zasledili le vrsti *Lb. plantarum* in *Lb. casei/paracasei* ter v manjšem številu vrsto *Lb. coryniformis* subsp. *torquens*.

Med izolati slovenskih, hrvaških in bosanskih sirov, ne pa srbskih, so od 18-22 % delež predstavljeni predstavniki rodu *Lactococcus*, ki jih Di Cagno in sod. (2003) ne navajajo. Zasledili smo tudi predstavnike rodu *Pediococcus* pri hrvaških sirih in predstavnike rodu *Corynebacterium* pri srbskih ter bosanskih sirih. Pediokoki in korinebakterije ne sodijo med tipične predstavnike prevladujoče mikrobiote tradicionalnih sirov, uporabljajo pa vrsti *P. acidilactici* in *P. pentosaceus* pri proizvodnji nekaterih sirov. Bakterije rodu *Corynebacterium* so prisotne med zorenjem sirov z rdečo mažo (Bockelmann in sod., 2005), ki za trde sire iz ovčjega mleka ni običajna, lahko pa je prisotna kot posledica kontaminacije iz sirarskega okolja.

Zaradi različnega geografskega porekla in specifičnih razlik v postopku izdelave ovčjih sirov na področju zahodnega Balkana, prihaja tudi do razlik v mikrobi združbi teh sirov. Pri trdih sirih iz ovčjega mleka, ki so bili vključeni v našo raziskavo, je mikrobična populacija podobna. Večji delež zastopajo bakterije rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus* in *Lactococcus*. Če pa pogledamo mikrobno združbo Sjeničkega in Pirotskega sira, ki imata drugo geografsko poreklo in precej drugačen postopek izdelave od trdih sirov, lahko opazimo razlike v vrstni sestavi bakterij. Pri teh dveh sirih so bile poleg laktobacilov v zelo velikem številu identificirane tudi bakterije rodu *Staphylococcus* in *Streptococcus*.

Srbski Pirotski ovčji sir spada k tipu sira pasta filata. Pri tem siru je bila najbolj zastopana bakterija rodu *Streptococcus* in sicer vrste *Str. thermophilus*. Zasledili pa smo tudi bakterije vrste *Microbacterium maritypicum* in *Cellulomonas biazotea*. Sodeč po analizah Mijačević in sod. (2005) je mikrobična populacija sira Pirotski kačkavalj sestavljena iz bakterij rodu *Lactococcus*, *Lactobacillus* in *Enterococcus*. Carić (1993) pa pravi, da se pri proizvodnji sira Kačkavalj doda startersko kulturo, ki vsebuje *Str. thermophilus*, *Lac. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus* in *Lb. casei*. Od mikrobne združbe bakterij, ki jih navajajo avtorji, smo mi identificirali le vrsto *Str. thermophilus*. Zanimivo je, da smo pri identifikaciji z metodo BIOLOG dobili rezultate, ki so nakazovali, da streptokoki pripadajo drugim bakterijskim vrstam in ne *Str. thermophilus*, ki smo ga s PCR potrdili. Vrsta *Str. thermophilus* drugače velja za tipično predstavnico mikrobiote tega sira (Carić, 1993). Bakterija *Microbacterium*, ki je rezultat identifikacije metode BIOLOG, se pojavlja med zorenjem sira z rdečo mažo (Bockelmann in sod., 2005) in za sira tipa pasta filata ni običajna. Identificirali smo tudi vrsto *Cellulomonas biazotea*, ki spada med korineformne bakterije in je zaradi vsebnosti mešanice karotenoidov rumeno obarvana (Weeks in sod., 1980). Sir ni njen naravni habitat, saj se ponavadi nahaja v prsti, lesu, na sladkornih poljih, izolirali pa so jo tudi iz aktivnega blata (Abt in sod., 2010).

Srbski Sjenički in bosanski Travnički sir uvrščamo k tipu sira Beli sir u kriškama oziroma k belim sirom, zorenim v slanici. El-Salam in sod. (1993) navajajo, da starterska kultura pri tej vrsti sira ponavadi vključuje rodove *Lactococcus* in *Lactobacillus*, ki ju večinoma zastopajo vrste *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* in *Lactobacillus casei* (Carić, 1993).

Naša identifikacija izolatov za Travnički sir se ujema z zapisi Carić (1993). Rezultati identifikacije, ki smo jih dobili kažejo, da prevladujejo vrste *Lactococcus* spp., *Lb. casei* in *Lb. plantarum*. Pri Sjeničkem ovčjem siru so bile najštevilčnejše bakterije vrste *Lb. casei/paracasei*. Ostale bakterije so pripadale vrstam *Staph. hominis* subsp. *hominis*, *Staph. haemolyticus*, *Staph. capitis* subsp. *ureolyticus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Dermobacter hominis*, *Corynebacterium xerosis* in *Corynebacterium minutissimum*. Stafilokoki in korineformne bakterije so halotolerantna mikroflora, ki jo pogosto najdemo na površini sirov, ki so zoreni v slanici (Litopoulou- Tzanetaki in Tzanetakis, 2011). Raziskave Radulović in sod. (2006) so sicer pokazale, da naj bi bile najbolj zastopane kulture v Sjeničkem siru vrste *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* in *Enterococcus* spp. Identificirali pa so tudi bakterije vrste *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* in *Leuconostoc* spp. Težko je primerjati izsledke obeh analiz, ker je raziskava Radulović in sod. (2006) potekala le na osnovi morfologije in biokemijskih testov. Se pa pridobljeni rezultati identifikacij razlikujejo, saj nismo zasledili ne laktokokov in ne enterokokov, ki naj bi bili na podlagi opisa avtorja, prav tako prisotni v tem siru. Štiri izolate smo identificirali kot predstavnike rodu *Staphylococcus*, ki so po navedbah drugih avtorjev soudeleženi pri zorenju sira, in sicer naj bi se na sir prenesli predvsem iz slanice (Bockelmann in sod., 2005; Bockelmann in Hoppe-Seyler, 2001). Identificirana vrsta *Bacillus amyloliquefaciens* je znana predvsem zaradi proizvodnje ekstracelularnih encimov, ki razgrajujejo ogljikove hidrate. Sir sicer ni njeno naravno okolje, ker se nahaja predvsem v prsti (Demirkan in sod., 2005). Obstajajo pa tudi zapisi, kjer je vrsta *Bacillus amyloliquefaciens*, zaradi svoje proteolitične aktivnosti, označena kot kvarljivec surovega mleka (De Jonghe in sod., 2010). Prisotnost vrste *Dermobacter hominis* v siru je zelo nenavadna, ker so to bakterijo v klinični mikrobiologiji velikokrat izolirali iz vzorcev krvi, izkazala pa se je tudi za povzročitelja bolezni (Gomez-Garces in sod., 2001).

Pri analizi z metodo BIOLOG se je zgodilo, da so se vse bakterije, ki so bile identificirane kot *W. viridescens*, pri PCR izkazale kot vrste rodu *Lactobacillus*. Collins in sod. (1993) so prvi predlagali rod *Weissella*. Predstavniki tega rodu so bili prej locirani med *Leuconostoc* in *Lactobacillus* vrstami (Huys in sod., 2012). Vrsta *Weissella viridescens*, ki smo jo zasledili med izolati slovenskih in hrvaških sirov, se je prvotno imenovala *Lactobacillus viridescens*. Vrstno specifičnih oligonukleotidov za vrsto *W. viridescens* nismo imeli, so

imeli pa vsi ti izolati pozitiven rezultat PCR z za vrsto *Lb. casei/paracasei* specifičnimi začetnimi oligonukleotidi. Pri interpretaciji rezultatov smo upoštevali identifikacijo metode PCR, saj je vrsta *Lb. casei/paracasei* tipična predstavnica mikrobiote tradicionalnih ovčjih sirov (Čanžek Majhenič in sod., 2007). Znano je, da sevi s podobnimi fenotipi nimajo vedno podobnega ali celo približno sorodnega genotipa, kar pri identifikaciji na osnovi fenotipskih lastnosti povzroča težave. Raziskovalci se bolj nagibajo k uporabi genotipskih tehnik, ki podajo zanesljivejšo identifikacijo (McCartney, 2002).

Prednosti sistema BIOLOG sta enostavnost in zmožnost istočasne analize velikega števila izolatov. Z metodo BIOLOG smo uspešno identificirali samo 55 % izolatov na nivoju rodu oziroma 51 % izolatov na nivoju vrste. V 44 % pa smo pridobili predlog o najverjetnejši identifikaciji. Pri potrjevanju identifikacij z metodo PCR se je 61 % identifikacij ujemalo na nivoju rodu in le 33 % na nivoju vrste. Čeprav smo pri postopku identifikacije s sistemom BIOLOG preskušali različne protokole, ki jih priporoča proizvajalec, se uspešnost identifikacije ni izboljšala. Naši rezultati kažejo, da metoda BIOLOG ni dovolj zanesljiva, da bi jo lahko uporabili kot edino metodo za identifikacijo izolatov mikrobiote sirov. Becker in sod. (2009) navajajo, da je razlog slabe identifikacije tega sistema slabša ločljivost pri analizi izolatov iz hrane. Podatki analize pa so vseeno lahko uporabni za razumevanje fenotipskih sprememb pri prilagajanju MO na določeno okolje (Di Cagno in sod., 2010). Temmerman in sod. (2004) pravijo, da se za pridobitev bolj zanesljive identifikacije lahko uporablja več različnih fenotipskih tehnik obenem. Na ta način se slabosti ene metode kompenzirajo s prednostmi druge. Raziskovalci so delali primerjavo metode BIOLOG s sistemom API. Izkazalo se je, da se profil izkoriščanja istih substratov ne ujema 100 %. To seveda povzroči dvome o zanesljivosti obeh sistemov. BIOLOG GEN III ima sicer, v primerjavi s sistemom API, veliko več biokemijskih testov, vendar pa je merjena sprememba barve pri sistemu API veliko bolj jasno vidna kot pojav vijolične barve pri metodi BIOLOG. Pri uporabi sistema BIOLOG GEN III lahko pride do napak, kadar je barva v posameznem kanalčku, po končani inkubaciji, v primerjavi s standardom, zelo slaba in se zabeleži kot negativen rezultat (osebni vir, Trmčić, 2012).

Identifikacija z metodo PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi je primerna, če iščemo prisotnost oziroma odsotnost dobro znane bakterije. Mi smo pri analizi z metodo PCR izhajali iz osnovne identifikacije, ki jo je podal sistem BIOLOG. Po zaključku analize z metodo BIOLOG in PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi bi lahko za bolj točne izsledke raziskave pri neidentificiranih izolatih uporabili še sekvenciranje 16S ali 23S rDNA.

Tudi PCR ni brez pomanjkljivosti. Zato je uporaba pozitivne in negativne kontrole pri analizi zelo pomembna. Tako lahko lažje zagotavljamo pravilnost identifikacije. Mi nismo imeli pozitivne kontrole za vrste *Ent. asini*, *Ent. durans*, *Ent. villorum/porcinus* in *Leuc. mesenteroides*. Za pravilno identifikacijo pa so pomembni tudi pogoji reakcije. Do napak lahko pride zaradi neprimernih začetnih oligonukleotidov, uporabe napačne temperature in časa reakcije, slabe aktivnosti polimeraze in neustrezne koncentracije Mg^{2+} , ki so kofaktorji polimeraze. Zato je vedno potrebno določiti optimalne pogoje in primerno sestavo reakcijske mešanice. Pomembna pa je tudi stabilnost temperature med samo reakcijo. Pogosti vzrok napak je še inhibicija PCR zaradi prisotnih nečistoč (Wilson, 1997).

Proučevanje kompleksnih mikrobnih združb je težavno in zahteva kombiniranje različnih identifikacijskih metod, kar se je pokazalo tudi v naši raziskavi. Dobljeni rezultati kažejo, da je sistem BIOLOG za identifikacijo bakterij, ki izhajajo iz specifičnih mikrobnih združb, premalo zanesljiv, da bi ga lahko uporabili kot edino metodo identifikacije. Kljub temu smo, na osnovi rezultatov fenotipske in genotipske identifikacije, ki so se ujemali, uspeli opisati prevladujočo mikrobioto ovčjih sirov zahodnega Balkana in njihove razlike.

5.2 SKLEPI

- Sestava prevladajoče mikrobne združbe ovčjih sirov zahodnega Balkana se razlikuje glede na geografsko področje in tip sira, vendar predstavljajo v vseh sirovih največji delež predstavniki rodu *Lactobacillus* (27 - 37 %).
- Poleg geografskega področja, vpliva na sestavo mikrobne združbe sira tudi postopek izdelave sira oziroma tip sira.
- Po sestavi se najbolj razlikuje prevladajoča mikrobiota srbskih sirov, v katerih nismo zasledili laktokokov in enterokokov, ki so predstavljeni pomemben delež mikrobne populacije ostalih sirov, v večjem deležu pa so bili prisotni streptokoki (27 %) in stafilokoki (13 %) ter v manjših deležih predstavniki rodov *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Dermobacter*, *Bacillus* in *Corynebacterium*.
- Sistem BIOLOG je uspešno identificiral 55 % izolatov na nivoju rodu, 51 % izolatov na nivoju vrste, za 44 % izolatov je podal le predlog o najverjetnejši identifikaciji, 1 % izolatov je ostalo neidentificiranih.
- Rezultati identifikacije s sistemom BIOLOG in PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi so se ujemali pri 61 % izolatov na nivoju rodu in le pri 33 % izolatov na nivoju vrste.
- Sistem BIOLOG ni dovolj zanesljiv, da bi ga lahko samostojno uporabili za identifikacijo bakterij, ki izhajajo iz specifičnih mikrobnih združb.

6 POVZETEK

Diplomska naloga je bila vključena v EU projekt, katerega namen je bil tehnološki, kemijski in mikrobiološki opis tradicionalnih ovčjih sirov s področja zahodnega Balkana. V okviru tega projekta so raziskovalci osamili 170 prevladujočih sevov iz tradicionalnih ovčjih sirov, ki jih izdelujejo na področju Slovenije (Bovški ovčji sir, Kraški ovčji sir, Dolenjski ovčji sir), Hrvaške (Paški ovčji sir, Krčki ovčji sir), Srbije (Pirotski ovčji sir, Sjenički ovčji sir) ter Bosne in Hercegovine (Livanjski ovčji sir, Travnički ovčji sir). Cilj naloge je bil identificirati osamljene seve na nivoju vrste s sistemom za fenotipsko identifikacijo BIOLOG, katerega prednost je enostavnost in zmožnost istočasne analize velikega števila izolatov. Rezultate fenotipske identifikacije, ki smo jih dobili s sistemom BIOLOG, smo preverjali/primerjali z rezultati identifikacije, ki smo jih dobili s PCR in začetnimi oligonukleotidi, specifičnimi za posamezne rodove in vrste bakterij.

V prevladujoči mikrobioti vseh sirov so bili v največjem deležu zastopani predstavniki rodu *Lactobacillus*. Razen pri srbskih sirih se v večjem deležu pojavljata tudi rodova *Lactococcus* in *Enterococcus*. Posebnost srbskih sirov je precejšnja zastopanost vrst rodov *Streptococcus* in *Staphylococcus*. Dolenjski, Bovški, Kraški, Paški, Krčki in Livanjski sir spadajo k trdim tipom sira iz ovčjega mleka. Pri tem tipu sira so bile v večini identificirane bakterije vrste *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Ent. faecalis*, *Lac. lactis* subsp. *lactis* ter v malo manjšem odstotku *Ent. casseliflavus*, *Ent. durans* in *Ent. faecium*. Pri hrvaškem Krčkem siru smo zasledili še bakterije vrste *Pediococcus* spp, ki jih tudi uporabljajo pri proizvodnji nekaterih vrst sira. Srbski Sjenički in bosanski Travnički sir imata drugačen postopek izdelave od trdih sirov in spadata k tipu sira Beli sir u kriškama oziroma k belim sirom, zorenim v slanici. Pri obeh smo identificirali vrsto *Lb. casei/paracasei*. Pri Travničkem ovčjem siru smo v večjem številu identificirali tudi vrste *Lac. lactis* subsp. *lactis* in *Lb. plantarum*. Medtem ko smo pri Sjeničkem ovčjem siru z metodo BIOLOG identificirali še predstavnike rodov *Staphylococcus*, *Dermobacter*, *Bacillus* in *Corynebacterium*, ki ne spadajo k MKB in niso tipični predstavniki prevladujoče mikrobiote sirov. Srbski Pirotski ovčji sir pa spada k tipu sira pasta filata. Najbolj zastopana bakterija v tem siru je *Str. thermophilus*. Prisotne pa so bile tudi bakterije vrste

Microbacterium maritypicum in *Cellulomonas biazotea*, ki prav tako nista tipičen predstavnik mikrobne populacije sira.

Z metodo BIOLOG smo uspešno identificirali samo 55 % izolatov na nivoju rodu oziroma 51 % izolatov na nivoju vrste. Pri primerjavi identifikacij smo naleteli na nekaj težav. Manjši delež izolatov, ki smo ga z metodo BIOLOG identificirali kot *Ent. faecalis* in *Lb. plantarum*, se z identifikacijo s PCR ni ujemal ne za rod in ne za vrsto teh bakterij. Neuspešno identifikacijo z metodo PCR smo pri teh izolatih pripisali metodološki napaki, neuspešni izolaciji DNA ali PCR. Pri analizi rezultatov identifikacij se je tudi izkazalo, da so bili vsi izolati, ki jih je sistem BIOLOG identificiral kot *W. viridescens*, s PCR potrjeni kot vrsta *Lb. casei/paracasei*. Pri primerjavi rezultatov obeh metod se je 61 % identifikacij ujemalo na nivoju rodu in le 33 % na nivoju vrste. Iz tega je razvidno, da sistem BIOLOG ni dovolj zanesljiv, da bi ga lahko samostojno uporabili za identifikacijo mikrobne populacije sirov.

7 VIRI

Abt B., Foster B., Lapidus A., Clum A., Sun H., Pukall R., Lucas S., Del Rio T.G., Nolan M., Tice H., Cheng J.-F., Pitluck S., Liolios K., Ivanova N., Mavromatis K., Ovchinnikova G., Pati A., Goodwin L., Chen A., Palaniappan K., Land M., Hauser L., Chang Y.-J., Jeffries C.D., Rohde M., Göker M., Woyke T., Bristow J., Eisen J.A., Markowitz V., Hugenholtz P., Kyrpides N.C., Klenk H.-P. 2010. Complete genome sequence of *Cellulomonas flavigena* type strain (134^T). Standards in Genomic Sciences, 3: 15-25

Albenzio M., Corbo M.R., Rehman S.U., Fox P.F., De Angelis M., Corsetti A., Sevi A., Gobbetti M. 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk, or by heating the curd in hot way. International Journal of Food Microbiology, 67: 35-48

Ampe F., Omar B.N., Moizan C., Wacher C., Guyot J.P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. Applied and Environmental Microbiology, 65: 5464-5473

Antunac N., Mikulec N., Bendelja D., Prpić Z., Barać Z. 2008. Karakterizacija i istraživanje kvalitete mlijeka u proizvodnji krčkog sira. Mlječarstvo, 58, 3: 203-222

Bajt N., Golc-Teger S. 2011. Izdelava jogurta, skute in sira. 3. natis. Ljubljana, Kmečki glas: 142 str.

Barakat R.K., Griffiths M.W., Harris L.J. 2000. Isolation and characterisation of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* spp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. International Journal of Food Microbiology, 62, 1-2: 83-94

Becker B., Weiss C., Holzapfel W.H. 2009. An evaluation of the use of three phenotypic

test-systems for biochemical identification of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*. Food Control, 20: 815-821

Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal, 11: 259-274

Bijeljac S., Sarič Z. 2005. Autohtoni mliječni proizvodi sa osnovama sirarstva. Sarajevo, Poljoprivredna fakulteta: 182 str.

Bockelmann W., Hoppe-Seyler T. 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. International Dairy Journal, 11: 307-314

Bockelmann W., Willems K.P., Neve H., Heller K.H. 2005. Cultures for the ripening of smear cheeses. International Dairy Journal, 15, 6-9: 719-732

Boyer R.F. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 349-351

Buntof C.J., Abbe T. 2002. Development of a flow cytometric method to analyze subpopulations of bacteria in probiotic products and dairy starters. Applied and Environmental Microbiology, 68: 2934-2942

Busse H.J., Denner E.B.M., Lubitz W. 1996. Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem: Overview of methods used in bacterial systematics. Journal of Biotechnology, 47: 3-38

Carić M. 1993. Ripened cheese varieties native to the Balkan countries. V: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 2. 2nd ed. Fox P.F. (ed.). London, Chapman & Hall: 263-279

Centeno J.A., Menendez S., Hermida M.A., Rodriguez-Otero J.L. 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. International Journal of Food Microbiology, 48: 97-111

Collado M.C., Delgado S., Maldonado A., Rodriguez J.M. 2009. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. Letters in Applied Microbiology, 48, 5: 523-528

Collins M.D., Samelis J., Metaxopoulos J., Wallbanks S. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc parmesenteroides* group of species. Journal of Applied Microbiology, 75, 6: 595-603

Čanžek Majhenič A., Mohar Lorberg P., Rogelj I. 2007. Characterization of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. International Journal of Dairy Technology, 60, 3: 182-190

Čanžek Majhenič A., Rogelj I., Perko B. 2005. Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. International Journal of Food Microbiology, 102: 239-244

Deasy B.M., Rea M.C., Fitzgerald G.F., Cogan T.M., Beresford T.P. 2000. A rapid PCR based method to distinguish between *Lactococcus* and *Enterococcus*. Systematic and Applied Microbiology, 23: 510-522

De Jonghe V., Coorevits A., De Block J., Van Coillie E., Grijspeerdt K., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M. 2010. Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. International Journal of Food Microbiology, 136: 318-325

Delcour J., Ferain T., Hols P. 2000. Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria. Current Opinion in Biotechnology, 11: 497-504

Demirkhan E.S., Mikami B., Adachi M., Higasa T., Utsumi S. 2005. α -Amylase from *B. amyloliquefaciens*: purification, characterization, raw starch degradation and expression in *E. coli*. Process Biochemistry, 40, 8: 2629-2636

- Di Cagno R., Banks J., Sheehan L., Fox P.F., Brechanay E.Y., Corsetti A., Gobbetti M. 2003. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. International Dairy Journal, 13: 961-972
- Di Cagno R., Minervini G., Sgarbi E., Lazzi C., Bernini V., Neviani E., Gobbetti M. 2010. Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. International Journal of Food Microbiology, 143: 246-253
- Dubernet S., Desmasures N., Gueguen M. 2002. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. FEMS Microbiology Letters. 214: 271-275
- Dutka-Malen S., Evers S., Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification of the species level of clinically relevant enterococci by PCR. Journal of Clinical Microbiology, 33, 1: 24-27
- El-Salam M.H. ABD, Alichanidis E., Zerfiridis G.K. 1993. Domiati and feta type cheeses. V: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 2. 2nd ed. Fox P.F. (ed.). London, Chapman & Hall: 301-335
- Fischione A. 1998. Sirarstvo na Tolminskem, Kobariškem in Bovškem. Ljubljana, Kmečki glas: 118 str.
- Forsman P., Tilsala-Timisjärvi A., Alatossava T. 1997. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. Microbiology, 143: 3491-3500
- GEN III MicroPlate™. 2008. Hayward, Biolog Inc.: 8 str. (Navodilo za uporabo)
- Gerželj E. 2006. Kraški ovčji sir, specifikacija o priznanju označbe porekla. Sežana,

Društvo rejcev drobnice: 41 str.

Gomez-Garces J.L., Oteo J., Garcia G., Aracil B., Alos J.I., Funke G. 2001. Bacteremia by *Dermabacter hominis*, a rare pathogen. Journal of Clinical Microbiology, 39, 6: 2356-2357

Huys G., Leisner J., Björkroth J. 2012. The lesser LAB gods: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, and affiliated genera. V: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 4th ed. Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., Von Wright A. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 93-122

Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. 2004. Use of a genus- and species- specific multiplex PCR for identification of enterococci. Journal of Clinical Microbiology, 42, 8: 3558-3565

Jovanović S., Maće O., Barać M. 2004. Karakteristike autohtone proizvodnje sjeničkog sira na području Sjeničko - Pešterske visoravni. Biotechnology in Animal Husbandry, 20, 1-2: 131-139

Kalantzopoulos G.C. 1993. Cheeses from ewes' and goats' milk. V: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 2. 2nd ed. Fox P.F. (ed.). London, Chapman & Hall: 507-543

Koren D., Perko B., Pretner S., Fischione A. 2003. Specifikacija za Bovški sir. Bovec, Društvo rejcev drobnice Bovške: 27 str.

Lee H.-J., Park S.-Y., Kim J. 2000 Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. FEMS Microbiology Letters, 193: 243-247

Lee K.Y., So J.S., Heo T.R. 2001. Thin layer chromatographic determination of organic acids for rapid identification of bifidobacteria at genus level. Journal of Microbiological Methods, 45: 1-6

Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. 2011. Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses. Small Ruminant Research, 101: 17-32

Mannu L., Comunian R., Scintu M.F. 2000. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR identification and evolution during cheese ripening. International Dairy Journal, 10: 383-389

McCartney A.L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. British Journal of Nutrition, 88, Suppl. 1: S29-S37

McSweeney P.L.H., Ottogalli G., Fox P.F. 2004. Diversity of cheese varieties: an overview. V: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 2. 3rd ed. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 1-22

Medina M., Nuñez M. 2004. Cheeses made from ewes' and goats' milk. V: Cheese: chemistry, physics and microbiology. Vol. 2. 3rd ed. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guinee T.P. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 279-299

Mijačević Z., Petrović M.P., Bulajić S. 2005. The specific characteristic of Pirot Kachkaval. Biotechnology in Animal Husbandry, 21, 5-6: 375-379

Milosavljević N.P., Joković N.M., Radulović N.S., Blagojević P.D., Savić D.S. 2010. Isparljiva jedinjenja Pirotskog kačkavalja od ovčjeg mleka. Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi, 21, 1-2: 122-126

Mohar Lorbeg P., Čanžek Majhenič A., Rogelj I. 2009. Evaluation of different primers for PCR-DGGE analysis of cheese-associated enterococci. Journal of Dairy Research, 76: 265-271

Morales P., Fernandez-Garcia E., Gaya P., Nuñez M. 2003. Formation of voltaile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese.

International Dairy Journal, 13, 2-3: 201-209

Moreira M., Abraham A., De Antoni G. 2000. Technological properties of milks fermented with thermophilic lactic acid bacteria at suboptimal temperature. *Journal of Dairy Science*. 83, 3: 395-400

Muyzer G., de Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700

Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinions in Microbiology*, 2: 317-322

Nubel U., Engelen B., Felske A., Snaidr J., Wieshuber A., Amann R.I., Ludwig W., Backhaus H. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology*, 178: 5636-5643

Olive D.M., Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 1661-1669

Palles T., Beresford T., Condon S., Cogan T.M. 1998. Citrate metabolism in *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 147-154

Perko B. 2004. Sirarstvo: skripta. Rodica, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 58 str.

Perko B. 2003. Slovenski avtohtoni siri - siri z geografskim poreklom: zgodovina, področje, tehnološki postopki. Rodica, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 53 str.

- Pfannebecker J., Fröhlich J. 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. International Journal of Food Microbiology, 128, 2: 288-296
- Poznanski E., Cavazza A., Cappa F., Cocconcelli P.S. 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. International Journal of Food Microbiology, 92: 141-151
- Psoni L., Kotzamanidis C., Yiagou M., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E. 2007. Genotypic and phenotypic diversity of *Locatococcus lactis* isolates from Batzos, a Greek PDO goat milk cheese. International Journal of Food Microbiology, 114, 2: 211-220
- Radulović Z., Miočinović J., Pudja P., Barać M., Miloradović Z., Paunović D., Obradović D. 2011. The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. Mljetkarstvo, 61, 1: 15-25
- Radulović Z.T., Radin D.D., Obradović D.B. 2006. Autohtona mikroflora sjeničkog sira. Prehrambena industrija - mleko i mlečni proizvodi, 17, 1-2: 48-51
- Randazzo C.L., Caggia C., Neviani E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. Journal of Microbiological Methods, 78: 1-9
- Rogelj I. 2012. "Opis Dolenjskega ovčjega sira v okviru projekta RegTraC". Rodica, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Irena.Rogelj@bf.uni-lj.si (osebni vir, april 2012)
- Rogelj I. 2005. Poročilo o raziskavah mikrobioloških značilnostih kraškega ovčjega sira. Rodica, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 11 str.
- Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.-M., Hosri C., Fanni J. 2009. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. Food Microbiology, 26: 645-652

Siezen R.J., Renckens B., van Swam I., Peters S., van Kranenburg R., Kleerebezem M., de Vos W.M. 2005. Complete sequences of four plasmids of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SK11 reveal extensive adaptation to the dairy environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8371-8382

Slanovec T. 1982. Sirarstvo. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 175 str.

Temmerman R., Huys G., Swings J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 348-359

Terzić-Vidojević A., Veljović K., Tolinacki M., Nikolić M., Ostojić M., Topisirović L. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlatar cheeses produced at two different geographical location. *Genetika*, 41, 1: 117-136

Tilsala-Timisjärvi A., Alatossava T. 1997. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1: 49-56

Topisirović L., Kojić M., Fira D., Golić N., Strahinić I., Lozo J. 2006. Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 112: 230-235

Topisirović L., Veljović K., Terzić Vidojević A., Strahinić I., Kojić M. 2007. Comparative analysis of antimicrobial and proteolytic activity of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese. *Genetika*, 39, 2: 125-138

Torriani S., Zapparoli G., Dellaglio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 10: 4351-4356

Trmčić A. 2012. "Primerjava sistemov za fenotipsko identifikacijo API in BIOLOG".

Rodica, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Aljosa.Trmcic@bf.uni-lj.si
(osebni vir, marec 2012)

Trmčić A., Obermajer T., Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2008. Short communication:
culture-independent detection of lactic acid bacteria bacteriocin genes in two traditional
slovenian raw milk cheeses and their microbial consortia. Journal of Dairy Science, 91,
12: 4535-4541

Vandamme P., Pot B., Gillis M., DeVos P., Kersters K., Swings J. 1996. Polyphasic
taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological Reviews, 60:
407

Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjärvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K.,
Alatossava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species
by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers.
Applied and Environmental Microbiology, 66, 1: 297-303

Ward L.J.H., Timmins M.J. 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus*
paracasei and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. Letters in Applied
Microbiology, 29: 90-92

Weeks O.B., Montes A.R., Andrewes A.G. 1980. Structure of the principal carotenoid
pigment of *Cellulomonas biazotea*. Journal of Bacteriology, 141, 3: 1272-1278

Wilson I.G. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Applied and
Environmental Microbiology, 63: 3741-3751

Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smith G. 2002. Microbes from raw milk for
fermented dairy products. International Dairy Journal, 12: 91-109

Zoetendal E.G., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. 1998. Temperature Gradient Gel
Electrophoresis Analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host

specific communities of active bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:
3854-3859

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Rogelj ter dr. Aljošu Trmčić za strokovno vodenje, pomoč ter predvsem za potrpežljivost in ves čas, ki sta ga namenila izdelavi te diplomske naloge.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Barbari Jeršek za hiter, strokovni pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se tudi Lini Burkan za nasvete pri urejanju in pregled diplomske naloge.

Hvala moji mami, Lenartu in prijateljem, ki so mi pomagali in v času študija stali ob strani.

PRILOGE

Opombe: Z zvezdico (*) so označeni rezultati identifikacij, pri katerih identifikacija s sistemom BIOLOG ni bila uspešna, program MICROLOG 3 pa je vseeno predlagal najbolj verjetno identifikacijo. Pri metodi BIOLOG so v oklepaju rezultati identifikacij izolatov, ki smo jih ponovno analizirali po protokolu A.

Priloga A: Rezultati identifikacije izolatov iz Dolenjskega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
kovc-0	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Str. hyovaginalis</i> *		
kovc-1	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i>	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i> *		
kovc-2	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	/ (/)	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Enterococcus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i> *	<i>Ent. pseudoavium</i> (/)		
kovc-3	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/ (/)	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> * (/)		
kovc-4	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>W. viridescens</i>	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>W. viridescens</i>		
kovc-5	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	/ (/)	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i> *	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> * (/)		
kovc-6	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>W. viridescens</i>	neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i> *	<i>W. viridescens</i>		
kovc-7	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i>	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i> *		
kovc-8	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lb. casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i> *	/		neg. (<i>Lb. rhamnosus</i>)
kovc-9	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i> (<i>W. viridescens</i>)	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i> * (<i>Lb. plantarum</i> *)		

Priloga B: Rezultati identifikacije izolatov iz Bovškega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
škc-0	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. hamsteri</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. bifermentas</i> *		
škc-1	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>W. viridescens</i> (<i>W. viridescens</i>)	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Str. hyovaginalis</i> * (<i>W. viridescens</i> *)		
škc-2	po 22 urah	/	<i>Ent. durans</i> *	/	<i>Enterococcus/ Ent. durans</i>
	po 48 urah	/	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *		
škc-3	po 22 urah	<i>Enterococcus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i> *	<i>Lb. plantarum</i>		
škc-4	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	/	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i>	/
	po 48 urah	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i> *	/		
škc-5	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> * (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>)	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i>	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i> *	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> * (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *)		
škc-6	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Enterococcus/ Ent. casseliflavus</i> *	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i>	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>
	po 48 urah	<i>Enterococcus</i>	<i>Ent. casseliflavus</i> *		
škc-7	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Ent. casseliflavus</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>
	po 48 urah	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i> *	<i>Ent. casseliflavus</i> *		
škc-8	po 22 urah	<i>Ent. gilvus</i> *	<i>Ent. faecalis</i>	neg. (<i>Ent. hirae</i>) <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i>
	po 48 urah	<i>Ent. hirae</i> *	<i>Enterococcus</i>		
škc-9	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i> *	<i>Lb. plantarum</i>		

Priloga C: Rezultati identifikacije izolatov iz Kraškega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
pec-0	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. pentosus</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. pentosus</i> *		
pec-1	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>		
pec-2	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i> *	<i>Lb. plantarum</i> *		
pec-3	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *		
pec-4	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i> *	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i> *		
pec-5	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. faecalis</i> *	<i>Lb. plantarum</i>		
pec-6	po 22 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *		
pec-7	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i>		
pec-8	po 22 urah	<i>Enterococcus</i>	<i>Lb. plantarum</i> *	neg. (<i>Enterococcus</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Enterococcus</i>	<i>Lb. plantarum</i>		
pec-9	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. alimentarius</i> *	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. plantarum</i> *		

Priloga D: Rezultati identifikacije izolatov iz Paškega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
HP-1	po 22 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Lb. rhamnosus</i> * (<i>W. viridescens</i> *)	<i>Enterococcus</i> / <i>Ent. durans</i>	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Ent. faecalis</i> * (<i>W. viridescens</i> *)		
HP-2	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. pentosus</i> *	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. plantarum</i>		
HP-3	po 22 urah	<i>Ent. hirae</i> *	<i>Lb. plantarum</i> * (/)	neg. (<i>Ent. hirae</i>) <i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. plantarum</i> * (<i>Carnobacterium</i> <i>inhibens</i> *)		
HP-4	po 22 urah	<i>Ent. villorum</i> *	<i>Lb. plantarum</i> *	Enterococcus neg. (<i>Ent.</i> <i>villorum</i>)	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Ent. villorum</i> *	<i>Lb. plantarum</i> *		
HP-5	po 22 urah	<i>Lb. fructivorans</i> *	<i>Lb. rhamnosus</i> * (<i>W. viridescens</i> *)	neg. (<i>Lactobacillus</i>)	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Lb. fructivorans</i> *	<i>Lb. rhamnosus</i> * (<i>Lb. rhamnosus</i> *)		
HP-6	po 22 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *	neg. (<i>Ent.</i> <i>durans</i>) <i>Enterococcus</i>	neg. (<i>Lactobacillus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i>	<i>Eikenella</i> <i>corrodens</i> *		
HP-7	po 22 urah	<i>Listeria grayi</i> *	<i>W. viridescens</i> *	neg. (<i>Ent.</i> <i>durans</i>) <i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>W. viridescens</i> *		
HP-8	po 22 urah	<i>Ent. asini</i> *	<i>W. viridescens</i>	Enterococcus/ <i>Ent. asini</i>	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>plantarum</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. asini</i> *	<i>Lb. plantarum</i> *		
HP-9	po 22 urah	<i>Leuconostoc lactis</i> *	<i>W. viridescens</i> *	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Leuconostoc lactis</i> *	<i>W. viridescens</i> *		
HP-10	po 22 urah	<i>Ent. pseudoavium</i>	<i>W. viridescens</i> *	/	<i>Lactobacillus</i> / <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i>
	po 48 urah	<i>Vagococcus fessus</i> *	<i>W. viridescens</i> *		

Priloga E: Rezultati identifikacije izolatov iz Krčkega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
HK-1	po 22 urah	<i>Staph. haemolyticus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> *	<i>Staphylococcus</i>	<i>Pediococcus neg. (Pediococcus acidilactici)</i>
	po 48 urah	<i>Staphylococcus/ Staph. haemolyticus</i> *	<i>Pediococcus parvulus</i> *		
HK-2	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus neg. (Pediococcus acidilactici)</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
HK-3	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus neg. (Pediococcus acidilactici)</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Actinomyces bovis</i> *		
HK-4	po 22 urah	<i>Ent. faecalis</i>	/	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis</i>	/
	po 48 urah	<i>Acinetobacter ursingii</i> *	/		
HK-5	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/		
HK-6	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/		
HK-7	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/		
HK-8	po 22 urah	<i>Str. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>Lb. plantarum</i> * (/)	<i>Streptococcus neg. (Str. thermophilus)</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Str. gallolyticus</i> subsp. <i>gallolyticus</i>	<i>Lb. pentosus</i> * (<i>Lb. hamsteri</i> *)		
HK-9	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	/	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	/
	po 48 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i> *	/		
HK-10	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. rhamnosus</i> *	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. casei/paracasei neg. (Lb. rhamnosus)</i>
	po 48 urah	<i>Ent. haemoperoxidus</i> *	<i>Lb. rhamnosus</i> *		

Priloga F: Rezultati identifikacije izolatov iz Travničkega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
T2/60-1	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> * (/)	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus</i>
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Actinomyces bovis</i> * (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *)		
T2/60-2	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	/ (/)	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus</i>
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Lb. brevis</i> * (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *)		
T2/60-3	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. pentosus</i> * (/)	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Carnobacterium gallinarum</i> * (<i>Lb. hamsteri</i> *)		
T2/60-4	po 22 urah	<i>Ent. casseliflavus</i> *	<i>Lb. sake</i> * (/)	neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. casei</i>
	po 48 urah	<i>Corynebacterium freneyi</i>	<i>Lb. jensenii</i> * (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *)		
T2/60-5	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lb. jensenii</i> *	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. casei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. jensenii</i> *		
T2/60-6	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. sake</i> *	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. casei</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. jensenii</i>		
T2/60-7	po 22 urah	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. casei</i>
	po 48 urah	<i>Lb. jensenii</i> *	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>		
T2/60-8	po 22 urah	<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *	<i>Gardnerella vaginalis</i> * (/)	<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	po 48 urah	<i>Lb. jensenii</i> *	<i>Lb. pentosus</i> * (<i>Pediococcus pentosaceus</i> *)		
T2/60-9	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. pentosus</i> *	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. pentosus</i> *		
T2/60-10	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> *	<i>Lb. pentosus</i> * (/)	neg. (<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. plantarum</i>
	po 48 urah	<i>Ent. durans</i> *	<i>Str. acidominimus</i> * (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> *)		

Priloga G: Rezultati identifikacije izolatov iz Livanjskega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
L2/60-1	po 22 urah	<i>Ent. casseliflavus</i>	<i>Ent. casseliflavus</i>	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>
	po 48 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Ent. casseliflavus*</i>		
L2/60-2	po 22 urah	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. faecium*</i>	neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Enterococcus/ Ent. faecium</i>
	po 48 urah	<i>Ent. faecium</i>	<i>Corynebacterium freneyi*</i>		
L2/60-3	po 22 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	/ (/)	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>	/ /
	po 48 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Corynebacterium lipophiloflavum*</i> (/)		
L2/60-4	po 22 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Ent. durans*</i>	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus/ Ent. durans</i>
	po 48 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Ent. durans*</i>		
L2/60-5	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Pediococcus parvulus*</i>	neg. (<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	<i>Enterococcus</i> neg. (<i>Ent. asini</i>)
	po 48 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Ent. asini*</i>		
L2/60-6	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis*</i>	<i>Carnobacterium mobile*</i>	<i>Enterococcus/ Ent. durans</i>	neg. (<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. durans*</i>	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis*</i>		
L2/60-7	po 22 urah	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis*</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>	neg. (<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>) neg. (<i>Enterococcus</i>)	<i>Lactobacillus/ Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb. rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. durans*</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>		
L2/60-8	po 22 urah	<i>Ent. casseliflavus</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i> (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens*</i>)	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>	<i>Lactobacillus/ Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb. rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Carnobacterium gallinarum*</i> (<i>W. viridescens</i>)		
L2/60-9	po 22 urah	<i>Ent. gallinarum</i>	<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> / <i>tonsillarum*</i> (/)	<i>Enterococcus/ Ent. gallinarum</i>	<i>Lactobacillus</i>
	po 48 urah	<i>Enterococcus/ Ent. faecalis*</i>	<i>Microbacterium lacticum*</i> (<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>)		
L2/60-10	po 22 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Ent. faecium</i>	neg. (<i>Ent. casseliflavus</i>) <i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus/ Ent. faecium</i>
	po 48 urah	<i>Ent. casseliflavus*</i>	<i>Ent. faecium</i>		

Priloga H: Rezultati identifikacije izolatov iz Pirotskega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
SS1-1	po 22 urah	<i>Microbacterium maritypicum</i> *	/	/	/
	po 48 urah	<i>Microbacterium maritypicum</i>	/		
SS1-2	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. bovis</i> *	/	<i>Streptococcus/ Str. Thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. bovis</i>	/		
SS1-3	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. salivarius</i> *	/	<i>Streptococcus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. bovis</i>	/		
SS1-4	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. salivarius</i> *	/	<i>Streptococcus/ Str. thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. bovis</i>	/		
SS1-5	po 22 urah	<i>Cellulomonas biazotaea</i> *	/	/	/
	po 48 urah	<i>Sanguibacter keddieii</i> *	/		
SS1-6	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. mutans</i> *	/	<i>Streptococcus/ Str. thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Streptococcus/ Str. anginosus</i> *	/		
SS1-7	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. vestibularis</i> *	/	<i>Streptococcus/ Str. thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. vestibularis</i>	/		
SS1-8	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. vestibularis</i> *	/	<i>Streptococcus/ Str. thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. vestibularis</i>	/		
SS1-9	po 22 urah	<i>Streptococcus/ Str. intermedius</i> *	/	<i>Streptococcus/ Str. thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. vestibularis</i>	/		
SS1-10	po 22 urah	<i>Str. vestibularis</i>	/	<i>Streptococcus/ Str. thermophilus</i>	/
	po 48 urah	<i>Str. vestibularis</i>	/		

Priloga I: Rezultati identifikacije izolatov iz Sjeničkega ovčjega sira, pridobljeni po sistemu BIOLOG in po metodi PCR

izolati	čas inkubacije	rezultati po sistemu BIOLOG		rezultati po metodi PCR	
		M17	MRS	M17	MRS
SS2-1	po 22 urah	<i>Staph. haemolyticus</i>	<i>W. viridescens*</i> (<i>W. viridescens*</i>)	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Staph. haemolyticus</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i> (<i>W. viridescens*</i>)		
SS2-2	po 22 urah	<i>Staph. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Staph. capitis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>		
SS2-3	po 22 urah	<i>Dermobacter hominis*</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	neg. (<i>Staphylococcus</i>)	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Staph. sciuri</i> subsp. <i>sciuri*</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>		
SS2-4	po 22 urah	<i>Staph. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Staph. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>		
SS2-5	po 22 urah	<i>Dermobacter hominis</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>	/	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Dermobacter hominis</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>		
SS2-6	po 22 urah	<i>Staph. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Staph. hominis</i> subsp. <i>hominis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>		
SS2-7	po 22 urah	<i>Bacillus amyloliquefaciens*</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>	/	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Corynebacterium minutissimum*</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>		
SS2-8	po 22 urah	<i>Bacillus amyloliquefaciens*</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	/	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>		
SS2-9	po 22 urah	<i>Corynebacterium minutissimum*</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	/	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb. paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Corynebacterium minutissimum*</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>		
SS2-10	po 22 urah	<i>Corynebacterium xerosis*</i>	<i>Lb. rhamnosus*</i>	/	<i>Lactobacillus/</i> <i>Lb.</i> <i>casei/paracasei</i> neg. (<i>Lb.</i> <i>rhamnosus</i>)
	po 48 urah	<i>Micrococcus luteus</i> A	<i>Lb. rhamnosus*</i>		