

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ

Петар М. Сикимић

**КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ИЗОЛАТА
ЛАКТОБАЦИЛА ПОРЕКЛОМ ИЗ МЛЕКА
КУЈА И ЊИХОВ АНТИМИКРОБНИ
ПОТЕНЦИЈАЛ**

докторска дисертација

Београд, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINAE

Petar M. Sikimić

**CHARACTERIZATION OF LACTOBACILLI
ISOLATES ORIGINATING FROM CANINE
MILK AND THEIR ANTIMICROBIAL
POTENTIAL**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2025.

Ментор:

др Радослава Савић Радовановић, спец. ветеринарске микробиологије
ванредни професор, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

Чланови комисије:

1. др Драган Василев, редовни професор, председник комисије
Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
2. др Драган Шефер, редовни професор, 1. члан
Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
3. др Владимир Димитријевић, редовни професор, 2.члан
Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду
4. 4. др Немања Здравковић, виши научни сарадник, 3. члан
Научни институт за ветеринарство Србије, Београд

Датум одбране:

Захвалница

Захваљујем се Проф. др Радослави Савић Радовановић на менторству, увођењу у рад у бактериолошкој лабораторији, усмеравању током израде докторске дисертације, драгоценим саветима и изузетном пожртвовању на путу ка заједничком циљу, који није био ни једноставан ни лак.

Захваљујем се Проф. др Драгану Василеву, Проф. др Драгану Шеферу и Проф. др Владимиру Димитријевић на разумевању и колегијалној подршци у току израде ове дисертације.

Посебну захвалност дугујем др Немањи Здравковић, вишем научном сараднику, на великој помоћи у експерименталном делу израде дисертације као и формирању коначне верзије штампаног облика. Његов допринос почевши од изолације, идентификације и даљег рада са изолатима су у истом нивоу као и све добронамерне, али и отрежњујуће речи у свим фазама овог истраживања.

Захваљујем се колегама са Катедре за хигијену и технологију намирница анималног порекла Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду, који су ми уступили лабораторије и просторије за даноноћни рад.

Захваљујем се за помоћ при сакупљању узорака: Центру за обуку паса војске Србије у Нишу, одгајивачу истарских краткодлаких гонича из Мале Дренове, Драгутину Бабићу, индивидуалним власницима паса из Суботице, Сомбора, Новог Сада, Зрењанина, Земунa, Београда, Ниша и Пирота.

Посебну захвалност и велико дивљење мојој супрузи Сањи, која је у време мог честог одсуствовања, преузимала највећи део породичних обавеза и подизање наших синова Димитрија, Данила и Душана. Они су ми били највећи "ветар у леђа" у овим сложеним временима у којима живимо.

Напомена: Докторска дисертација је рађена у оквиру пројекта Министарства науке, технолошког развоја и иновација Републике Србије (Уговор број 451-03-136/2025-03/200143).", на Катедри за хигијену и технологију намирница анималног порекла, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду

КРАТАК САДРЖАЈ

Млеко је секрет млечне жлезде и у почетном периоду живота после рођења сисара представља главну и најважнију храну. Истовремено је и извор воде, која је есенцијална за одвијање свих процеса у организму. Поред нутритивне улоге, млеко због садржаја антитела и имунокомпетентних ћелија има улогу у имунитету. Колострум и млеко престављају одличну подлогу за успостављање цревне микробиоте, а уједно испољавају пургативну улогу. Бактерије млечне киселине, припадници породице *Lactobacillaceae* (лактобацили), доспевају у млеко после муже и чине микробиоту колострума и млека. Уз велике промене у таксономској класификацији последње деценије а нарочито последњих година поред технолошког значаја и употребе у индустрији производње ферментисаних производа од млека, ове бактерије су предмет истраживања научника широм света. Истраживања су оријентисана у смеру антимикробних својстава према патогеним микроорганизмима и преживљавања при различитим температурама и условима како би се одабрали за употребу као пробиотске културе.

Циљ ове докторске дисертације је био да се изврши изолација лактобацила из млека куја, њихова карактеризација и испита антимикробни потенцијал према патогеним микроорганизмима.

Током испитивања одабрано је четири изолата, који су идентификовани испитивањем биохемијских особина, методом MALDI TOF и потврђени секвенцирањем гена за 16S компоненту рибозома као *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus paracasei* и *Ligilactobacillus murinus*. Сва четири изолата су расла при различитим температурама (20 °C, 25 °C, 32 °C и 42 °C) и у присуству жучних соли (5%), а најбољи раст је био при 37 °C. Такође, сви изолати су показали раст после лиофилизације. Испитивање антимикробног потенцијала изолата лактобацила у *in vitro* условима је показало да је *L. rhamnosus* инхибисао раст *S. aureus*, *S. Typhimurium* и *E. coli*, док *L. murinus* није испољио инхибиторни ефекат према тест микроорганизмима. Применом агар дифузионог теста доказано је да је највећи антимикробни ефекат испољио *L. rhamnosus* са зонама инхибиције код свих тест микроорганизама, сем код *P. aeruginosa*, *L. paracasei* је дао зоне инхибиције код три тест микроорганизма; *L. reuteri* према два и *L. murinus* према једном тест микроорганизму.

Резултати испитивања указују на могућност примене изолата лактобацила у пракси као пробиотских препарата, који се користе у превенцији гастроинтестиналних поремећаја код паса.

Кључне речи: млеко, пас, лактобацили, микробиота, MALDI TOF, антимикробни, пробиотик

SUMMARY

Milk is a secret of the mammary gland and represents the main and most important food in the initial period of life after birth of mammals. At the same time, it is also a source of water, which is essential for the development of all processes in the body. In addition to its nutritional role, milk due to the content of antibodies and immunocompetent cells, plays a role in immunity. Colostrum and milk represent an excellent substrate for the establishment of intestinal microbiota, and at the same time they exert a purgative role. Lactic acid bacteria, members of the *Lactobacillaceae* family (lactobaciles), enter milk after milking and make up the microbiota of colostrum and milk. With major changes in taxonomic classification in the last decade and especially in recent years, in addition to their technological importance and use in the fermented milk products industry, these bacteria are the subject of research by scientists around the world. Research is oriented towards antimicrobial properties against pathogenic microorganisms and survival at different temperatures and conditions in order to select them for use as probiotic cultures.

The aim of this doctoral dissertation was to isolate lactobacilli from bitch milk, characterize them and test their antimicrobial potency against pathogenic microorganisms.

During the study, four isolates were selected, which were identified by examining biochemical properties, the MALDI TOF method and confirmed by sequencing of the gene for the 16S ribosomal component as *Lactocaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lactocaseibacillus paracasei* and *Ligilactobacillus murinus*. All four isolates grew at different temperatures (20 °C, 25 °C, 32 °C and 42 °C) as well in the presence of bile salts (5%), and the best growth was at 37 °C. All isolates showed growth after lyophilization, as well. Determination of antimicrobial potential of lactobacilli isolates *in vitro* showed that isolate *L. rhamnosus* inhibited the growth of *S. aureus*, *S. Typhimurium* and *E. coli*, while *L. murinus* did not show an inhibitory effect on the test microorganisms. Using the agar diffusion test, it was proven that the greatest antimicrobial effect was exhibited by *L. rhamnosus* with zones of inhibition on all test microorganisms, except for *P. aeruginosa*, *L. paracasei* showed zones of inhibition on three test microorganisms; *L. reuteri* against two and *L. murinus* against one test microorganism.

The results of the study indicate the possibility of application lactobacilli isolates in practice as probiotic, used in the prevention of gastrointestinal disorders in dogs.

Key words: dog milk, lactobacilli, microbiota, MALDI TOF, antimicrobial, probiotic

САДРЖАЈ

1.	УВОД.....	1
2.	ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	3
2.1	Опште карактеристике и подела лактобацила.....	4
2.2	Налаз лактобацила у млеку куја и њихово антимикробно деловање.....	6
2.3	Пробиотици.....	10
2.4	MALDI-TOF MS.....	12
3.	ЦИЉ И ЗАДАЦИ.....	14
4.	МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА.....	15
4.1	Материјал.....	15
4.1.1	Одабир куја и узорковање млека.....	15
4.1.2	Подлоге.....	17
4.2	Методе.....	22
4.2.1	Изолација и идентификација лактобацила из млека куја.....	22
4.2.2	Изолација и одређивање броја микроорганизама у узорцима млека куја.....	22
4.2.3	Одређивање броја микроорганизама у узорцима млека куја.....	22
4.3	Фенотипска карактеризација изолата лактобацила.....	24
4.3.1	Биохемијске карактеристике изолата.....	24
4.3.2	Испитивање раста изолата лактобацила при различитим температурама.....	25
4.3.3	Испитивање преживљавања изолата у средини са жучним солима.....	25
4.3.4	Испитивање степена преживљавања поступка лиофилизације.....	25
4.3.5	Испитивање антимикробног потенцијала лактобацила у <i>in vitro</i> условима.....	27
4.3.6	Статистичка обрада података.....	28
5.	РЕЗУЛТАТИ.....	29
5.1	Одабир куја и узорковање млека.....	29
5.2	Изолација бактерија млечне киселине – лактобацила из млека куја.....	29
5.2.1	Примарна бактериолошка идентификација.....	29
5.2.2	Идентификација методом MALDI-TOF.....	29
5.2.3	Идентификација секвенцирањем гена за 16S RNK.....	30
5.3	Одређивање броја микроорганизама у млеку куја.....	31
5.4	Фенотипска карактеризација изолованих лактобацила.....	32
5.4.1	Биохемијске карактеристике.....	32
5.4.2	Испитивања преживљавања изолата лактобацила из млека куја при различитим температурама.....	34
5.4.3	Преживљавање изолата у средини са жучним солима.....	35

5.4.4	Испитивање степена преживљавања поступка лиофилизације.....	36
5.4.5	Резултати испитивања антимикробног потенцијала изолата у <i>in vitro</i> условима.....	36
6.	ДИСКУСИЈА.....	39
7.	ЗАКЉУЧЦИ.....	44
8.	ЛИТЕРАТУРА.....	45
9.	ПРИЛОЗИ:.....	52
	Изјава о ауторству.....	71
	Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада.....	72
	Изјава о коришћењу.....	73

1. УВОД

Пас спада међу прве животиње, које је човек припитомио. Контакт и квалитет међусобног односа је неупоредив у односу на друге животињске врсте. Највећи број теорија и радова говори да је процес припитомљавања почео пре око 15 000 година. Међутим, Perri и сар. (2021) наводе да су пси у Сибиру припитомљени пре 23 000 година. Како су људи у миграцијама водили псе са собом неки од њих су завршили у Америци. Нагли напредак у проучавању генома пса као мултидисциплинарне базе података, допринео је бољем разумевању генетског састава паса нарочито код адаптације и фенотипске разноликости (Zhang и сар., 2021). Рађене су и морфолошке анализе палеолитских паса као подузорка морфопопулације вукова (Galeta и сар., 2021). Као производ селекције, коју је спровео човек, данас је присутно неколико стотина раса паса јасног фенотипа (Galibert и сар., 2011). Руски научник Димитриј Бељајев је радио на сродним врстама као што је лисица и њиховом припитомљавању. Помињу се три медитеранска полуострва (балканско, иберијско и италијанско) као значајна подручја за проучавање припитомљавања паса (Tancredi и Cardinali, 2023). Тачна географска локација места доместикације је дуги низ година па и деценија дебатована у научним круговима. Доместикација се одвијала у источној Азији, на блиском истоку, у централној Азији, јужној Кини па до Европе као центра одомаћења. Такође упитан је и број доместикацијских процеса.

Може се рећи да је пас домаћа животиња, човеков пратилац и пријатељ са којом је остварио најјачи, најдубљи и најбољи контакт. Постоје материјални докази у виду археолошких налаза и фосилних остатака да је пас уз човека 9000 година, а по неким је тај период много дужи и износи 14 000 година, чему говоре у прилог налази остатака паса у Немачкој. Сматра се да је најстарији археолошки остатак за који се претпоставља да је припадао домаћем псу, лобања нађена у Русији (планина Алтај), за коју се процењује да је стара око 35 000 година, као и остаци нађени у Израелу, чија старост се процењује на 12 000 година. Ипак, треба имати у виду да постоје и знатно старији археолошки налази. Данас се у многим културама различитих земаља пас сматра делом породице и због блиског контакта са човеком има импликације не само на животињу, већ и на власника.

Домаћи пас, по зоолошкој класификацији, припада царству животиња (*Animalia*), типу кичмењака (*Chordata*), класи сисара (*Mamallia*), реду (*Carnivora*), суперпородици (*Canoidea*), породици (*Canidae*), потпородици (*Suinae*), роду (*Canis*), врсти (*Canis lupus*) и подврсти (*Canis lupus familiaris*). Суперфамилија *Canioidea*, која обухвата и медведе, ласице, творове, ракуне и пинипеде (фоке, морски лавови и моржеви). Фамилија *Canidae*, филогенетски се највише разликује од осталих чланова суперфамилије и процењује се да је до издвајања од осталих карнивора дошло пре више од 50 милиона година. Први подаци о еволутивном развоју месоједа потичу из периода од пре 50 до 100 милиона година. У том периоду је живео ситни месојед Креодонт. Према теорији еволуције, прапреси савремених месоједа су се развили пре два милиона година (током периода плиоцена и плеистоцена). Домаћи пас је последња подврста која се током еволуције издвојила у оквиру фамилије *Canidae*. Ова група животиња је широко распрострањена у целом свету, сем на Антарктику и пар острва Океаније (Pallin, 2012). Домаћи пас (*Canis lupus familiaris*) потиче од вука (*Canis lupus*) или златног шакала (*Canis aureus*) и још од времена Дарвина се полемисе ли је ова тврдња истинита. Данас се може потврдити ова чињеница да је вук предак пса анализом понашања, вокализације, морфологије и молекуларне биологије (Clutton-Brock, 2016). У прилог пореклу пса од вука су резултати анализа митохондријалне DNK пореклом од паса различитих раса и

вукова из различитих делова света. О односу човека и вука или пса постоји више легенди, а једна од њих је да је у старом Риму вучица, која је сишла на реку да се напије воде подојила близанце Ромула и Рема и старала се о њима да би они касније основали град Рим.

У исхрани свих сисара важан извор протеина представља млеко. Млеко је секрет млечне жлезде, који је првенствено намењен исхрани младунчади. То је храна која садржи градивне, енергетске и заштитне материје неопходне за правилан раст и развој младунчади, а које карактерише висока сварљивост, односно искористивост. Млеко не само да испуњава све нутритивне захтеве за раст штенади, већ има и протективни ефекат, јер их штити од инфективних болести. Заштитни ефекат млека куја је у вези са комбинованим деловањем заштитних фактора присутних у колоструму и млеку, као што су имуноглобулини, имунокомпетентне ћелије, масне киселине, полиамини, олигосахариди, лизозим и лактоферин. Лактација је критичан период у узгоју паса и прерано одбијање је обично повезано са високим морталитетом и морбидитетом штенади. Досадашња истраживања из ове области се углавном односе на идентификацију потенцијалних патогених бактерија у клинички манифестним перинаталним инфекцијама, укључујући маститисе код куја и септикемије код новорођених штенади. Млеко, због високог садржаја воде, приближно неутралне рН вредности (6,5–6,7) и присуства хранљивих материја је идеална средина за размножавање многих микроорганизама. Такође, млеко по напуштању млечне жлезде здравих животиња, садржи мали број непатогених микроорганизама, не више од 300 CFU/mL код крава, што представља секреторну или примарну контаминацију млека, која настаје при протицању млека кроз *ductus papillaris* код музних животиња. По напуштању млечне жлезде, млеко долази у контакт са спољашњом средином, одакле настаје постсекреторна или секундарна контаминација млека. Значајна групу микроорганизама, која чини непатогену микробиоту млека представљају бактерије млечне киселине (БМК), чији назив представља незваничну таксономску класификацију и обухвата микроорганизме, који имају способност да разлажу лактозу до млечне киселине. У групу бактерија млечне киселине сврставају се *Lactobacillus* врсте. Познато је да *Lactobacillus* врсте чине микробиоту различитих делова тела човека и животиња. У литератури се често бактерије млечне киселине називају „добре“ или „корисне“ бактерије. Заступљене су у индустрији хране нарочито у индустрији млека и производа од млека, индустрији пива, вина као и у фармацеутској индустрији. Налазе се на биљкама, слузокожи органа респираторног и дигестивног система људи и животиња. Лактобацили су Грам-позитивни, неспорогени, каталаза негативни штапићи, анаеробни а поједине врсте су факултативно аеробне или микроаерофилне. Непокретни су, могу да се боје варијабилно – нејасно да ли су црвене или плаве боје До 2020. године, род је обухватао преко 260 филогенетски, еколошки и метаболички различитих врста, док је касније напретком молекуларних техника током 2020. године предложена нова таксономска подела на 25 родова са 261 врстом.

Зависно од врсте варира њихова величина и облик по којем могу бити правилни кратки штапићи, дугачки танки, благо повијени на крајевима, често поређани у ланце. Расту на крвном агару у виду ситних и средње величине сивих колонија било уз одсуство или присуство алфа, а ретко бета хемолизе. На MRS (de Man Ragosa and Sharpe) агару расту у виду белих, често мукоидних колонија. Идентификација се врши секвенционирањем (16S rRNA) или методом MALDI-TOF, јер се идентификација испитивањем фенотипских карактеристика сматра непоузданом. За изолацију подлога користи се MRS (de Man, Ragosa i Sharpe) агар.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

У савременом добу научни приступ изучавању лактобацила се значајно проширује, поготово због чињенице да се употребом пробиотика може нормализовати интестинална микробиота у случају њеног поремећаја (Fuller, 1989; Zhang и сар., 2021). Припадници породице *Lactobacillaceae* (лактобацили) су од великог значаја за здравље људи и имају економски значај, јер се користе у већини ферментационих процеса хране за људе и сточне хране (Gänzle, 2015). Такође, саставни су део цревне микробиоте код многих животиња, укључујући и домаће животиње (Walter, 2008). Лактобацили, који се користе у процесу ферментације хране морају да буду безбедни (Bourdichon и сар., 2019) и носе статус квалификоване претпоставке безбедности (*Qualified Presumption of Safety-QPS*) од стране Европске агенције за безбедност хране или генерално сматране безбедним (GRAS) од Америчке агенције за храну и лекове (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) и сар., 2020). Лактобацили су нашли своју примену у пробиотицима за побољшање здравља људи или животиња (Hill и сар., 2014).

Употреба пробиотика код паса се заснива на искуствима и резултатима добијених из *in vivo* истраживања код људи, што често представља проблем с обзиром на другачије навике у исхрани паса, често лизање тела, другачији састав пљувачке и рН у дигестивном тракту паса (You и сар., 2022). Данас се повољан механизам деловања лактобацила објашњава кроз деловање различитих биолошких продуката лактобацила као што су масне киселине кратких ланаца, полипептиди, муропептиди засновани на пептидоглюкану, екстрацелуларни полисахариди, односно ћелијски лизати (Wegh и сар., 2019). Потенцијал примене ферментисаног млека произведеног са културама лактобацила, карактеризација и проучавање популације лактобацила код паса још увек нису довољно испитани (Kumar и сар., 2021). Природни извор лактобацила је млеко куја којим се нативни дигестивни тракт штенади насељава током сисања, а број лактобацила се креће од 132 до 609 CFU/mL (Martín и сар., 2010) што је слично вредностима утврђеним у млеку жена. Као најзначајније врсте лактобацила, узимајући у обзир расни састав испитиване групе јединки, географски положај са микроклиматским факторима, који условљавају локалну популацију бактерија, изоловани су: *L. reuteri*, *L. fermentum*, *L. animalis*, *L. murinus*, *L. johnsonii* (Martín и сар., 2010), *L. acidophilus* (Kumar и сар., 2021; Zhang и сар., 2021), *L. fermentum* (Zhang и сар., 2021).

Резултати испитивања (Kumar и сар., 2021) после давања производа добијених ферментацијом млека деловањем лактобацила показали су позитиван ефекат на дигестивни тракт одраслих паса који се огледао у значајном повећању концентрације укупних масних киселина кратких ланаца (Short Chain Fat Acids-SCFA), али и значајном повећању сирћетне, пропионске и бутерне киселине. Додатно су аутори утврдили повећање концентрације млечне киселине, смањење количине амонијака као и повећање броја бифидобактерија и лактобацила а пада броја клостридија и колиформних микроорганизама у микробиому фецеса (Martín и сар., 2010). Zhang и сарадници (2021) су такође испитивали пробиотски потенцијал лактобацила изолованих од паса у *in vitro* условима. Доказали су да испитивани сој *L. acidophilus* не подлеже ензимској разградњи лизозима (0,1g/L у трајању од 90 минута) у проценту од 22% почетног инокулума, да боље од других лактобацила преживљава дејство жучних соли и ниски рН желудачног и цревног сока, као и да испољава антимикуробну активност директним дејством и бактериоцинима према патогеним бактеријама као што су *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* и ентеротоксогене *E. coli* (Zhang и сар., 2021). You и сарадници (2022) су испитали деловање *L. acidophilus* изолата на кариогену и гингивалну патогену микробиоту усне дупље паса (*Streptococcus mutans*, *Actinomyces odontolyticus*,

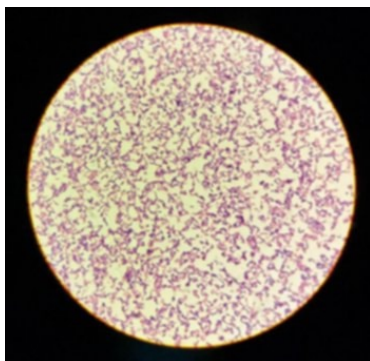
Porphyromonas gingivalis и *Prevotella intermedia*), као и микроорганизме (*Candida albicans*, *E. coli* и *Staphylococcus aureus*) где је установљено смањење броја до испод лимита детекције PCR методом у усној дупљи и знатна инхибиција у *in vitro* огледу. Аутори су такође испитали и квалитет сперме паса 0 и 4. недеље после примене лактобацила кроз суплементацију у храни и установили су да постоји разлика у концентрацији сперматозоида и њиховој покретљивости али да није статистички значајна (Wegh и сар., 2019; You и сар., 2022). Sherwani и Bukhari (2022) дају објашењење за механизам деловања пробиотских култура који се заснива на адхеренцији лактобацила на епител мукозе, стварање антимикробних супстанци и утицају на каскаду регулације имунског одговора (Fatima Sherwani и Ara Abbas Bukhari, 2022). Исти аутори описују и стварање витамина под утицајем пробиотске микробиоте и то витамина К, биотина, кобалтамина, фолата, никотинске киселине, пиридоксина, рибофлавина и тиамина, а цитирају и Holzera и Farzija (2014), који су представили утицај пробиотске културе на ментално здравље објашњавајући тиме да бифидобактерије и лактобацили стварају гама аминокбутерну киселину (GABA), али и да се серотонин може наћи као продукт микроорганизма родова *Enterococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* и *Candida*, као и допамин код рода *Bacillus* (Holzer и Farzi, 2014)..

2.1 Опште карактеристике и подела лактобацила

Фамилија *Lactobacillaceae* обухвата микроорганизме који по незваничној таксономској класификацији припадају групи бактерија млечне киселине (БМК). Често се називају „добре“ или „корисне“ бактерије због своје улоге у индустрији хране, нарочито индустрији млека и производа од млека, индустрији пива, вина као и у фармацеутској индустрији (Слика 2.1). Оптимална температура раста је између 30 и 40 °C, иако температура раста може да се креће од 2 до 53 °C; расту при рН од 3 до 8. Расту у анаеробним условима, али поједине врсте толеришу кисеоник или могу да расту микроаерофилним условима (10% CO₂) (Pot и сар., 2014). Лактобациле карактерише ферментативни метаболизам. Стварају млечну киселину као главни крајњи производ ферментације из шећера што је некада била основа таксономије рода, пошто је Орла-Јенсен (1919) већ разликовао три подрода – „*Thermobacterium*“ и „*Streptobacterium*“ за облигатно хомоферментативне и факултативно хетероферментативне бактерије, односно „*Betabacterium*“ за облигатне хетероферментаторе (Pot и сар., 2014). У зависности шта је крајњи производ разлагања лактозе, бактерије млечне киселине се деле на: хомоферментативне лактобациле, који стварају искључиво млечну киселину из хексоза путем Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) пута или путем гликолизе. Пентозе и глуколат се не ферментишу. Облигатни хомоферментативни лактобацили имају фруктоза-1,6-дифосфат (ФДП) алдолазе, али не и фосфокетолазе.

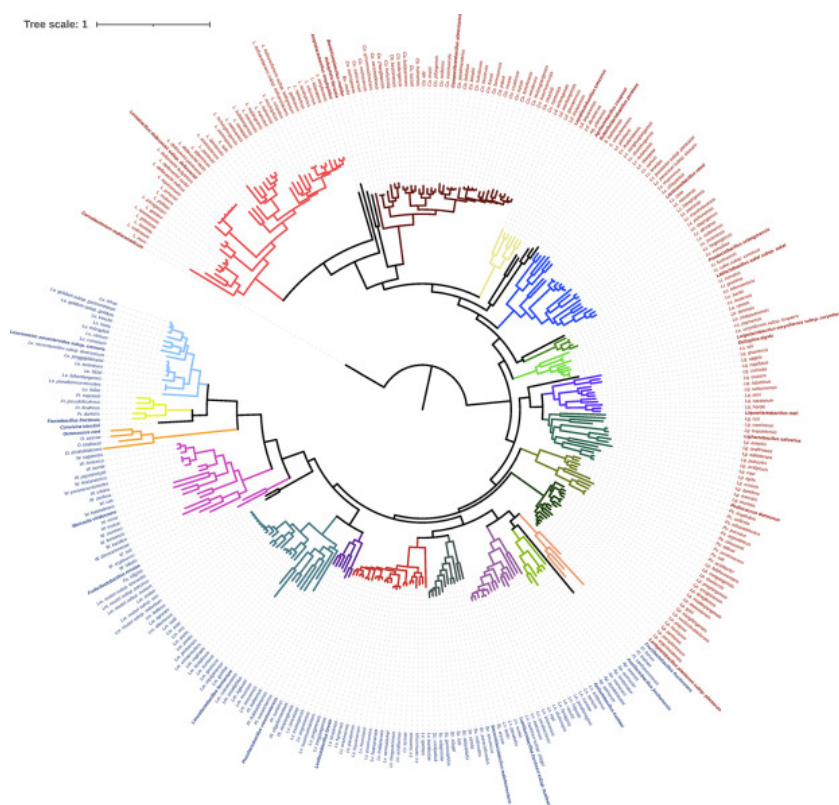
Факултативно хетероферментативне врсте немају ФДП алдолазе, ферментишу хексозе до млечне киселине преко EMP пута и могу да разграђују пентозе и глуколат преко индуковане фосфокетолазе са производњом сирћетне киселине, етанола и мравље киселине. Облигатни хетероферментативни лактобацили метаболишу пентозе и хексозе искључиво преко хетеролактичног фосфоглуколата пута (Hammes и Hertel, 2006) (Hammes и Vogel, 1995) и генерално не садрже ФДП алдолазу (Zhang и сар., 2021, 2022) Године 2020. Таксономском реорганизацијом бактерија млечне киселине рекласификовано је преко 300 врста, који су били сврстани у 7 родова и 2 породице, сада сврстано у једну фамилију, *Lactobacillaceae* са 25 родова, обухватајући *Lactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactocaseibacillus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Fructobacillus*, *Convivina*, *Limosilactobacillus*, *Oenococcus*, *Leuconostoc* тј. 23 нова рода, који обухватају организме који су раније класификовани као врсте рода *Lactobacillus*

(Zhang и сар., 2021). Секвенце 16S RNK гена нису довољне да се раздвоје филогенетски односи (Holzapfel и Wood, 2014) и стога није била могућа идентификација све док секвенце генома већине типских сојева лактобацила нису постале познате (Zheng и сар., 2015).



Слика 2.1.1 Лактобацили на микроскопском препарату обојеном по Граму

Научна класификација рода *Lactobacillus* је следећа: Домен: Bacteria; Тип: *Bacillota*; Класа: *Bacilli*; Ред: *Lactobaillales*; Породица: *Lactobacillaceae*; Род: *Lactobacillus*



Слика 2.1.2. Филогенетско стабло језгра генома од 336 сојева породице *Lactobacillaceae* са *Carnobacterium maltaromaticum* као излазном групом. Стабло максималне вероватноће је анализирано на основу спојених протеинских секвенци једнокопијских гена језгра као што су описали (Zhang и сар., 2021). Израчунато из 1000 понављања и све вредности су биле >90%. Врсте истог рода имају исту боју гране. Називи хомоферментативних и

хетероферментативних врста приказани су црвеном, односно плавом бојом преузето од Qiao и сар. (2022).

Да би се разјаснили филогенетски односи лактобацила није била довољна само метода секвенцирања 16S rRNA гена (Holzapfel и Wood, 2014), већ су биле потребне секвенце целог генома већине типова сојева лактобацила (Zheng и сар., 2015). Таксономски оквир за лактобациле је комплетиран крајем 2019. године и односи се на свих 261 врста лактобацила, који су описани у марту 2020. године (Zhang и сар., 2021). Од 2020. године описано је 37 нових врста (Слика 2.1.2.). Све ове врсте одговарају еколошким и метаболичким особинама одговарајућих родова које су раније предложене (Zhang и сар., 2020). Уз неколико изузетака, нове врсте *Lactobacillus* и *Limosilactobacillus* су описане као изолати адаптирани да колонизују животиње кичмењаке. Нове врсте *Bombilactobacillus* и *Apilactobacillus* су описане као изолати пореклом од инсеката и номадских, еколошких или родова, који се доводе у везу са биљкама и изолатима код спонтано ферментисаног поврћа. Додавање више од 40 генома после 2019. године потврдило је да су *Lactobacillaceae* монофилетске само ако су обухваћене и *Leuconostocaceae* Слика 2.1.2 (Zhang и сар., 2021). Повезаност раније *Leuconostocaceae* са осталим *Lactobacillaceae* се може прихватити са већом сигурношћу. Унутар хетероферментативних организама, родови кокусног или кокоидно облика формирају монофилетску групу, која је најсроднија *Furfurilactobacillus* (Слика 2.1.2). Таксономски оквир који су предложили (Zhang и сар., 2020) је потврђен накнадним филогенетским анализама и новим описима врста. Пре 2020. године, опис нових родова у породици *Lactobacillaceae* је у суштини био немогућ, јер би оставио преостали род *Lactobacillus* фрагментираним. Концептуални оквир који су предложили Zheng и сар., (2020) олакшава опис нових таксона у породици *Lactobacillaceae*. Нови изолати се лако идентификују на нивоу рода анализом секвенце гена 16S rRNA, као што је пример за 37 нових врста у породици *Lactobacillaceae* које су описане после 2020. године. Тренутна таксономија може да олакша регуларно одобравање употребе *Lactobacillaceae* у храни за људе и сточној храни, јер су отпорност на антибиотике и формирање биогених амина, два критеријума која се користе у процени безбедности *Lactobacillaceae*, делимично повезана са тренутном таксономијом на нивоу рода (EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) и сар., 2018). Препознајући предности нове таксономије, владине агенције неких земаља као што су Америчка агенција за храну и лекове, Министарство здравља Канаде и Европска агенција за безбедност хране су почеле да користе тренутну номенклатуру (Qiao и сар., 2022).

2.2 Налаз лактобацила у млеку куја и њихово антимикуробно деловање

У литератури су присутни подаци о налазу лактобацила у млеку куја и испитивању њиховог антимикуробног потенцијала у *in vitro* и *in vivo* условима. **Martin и сар. (2010)** су испитали узорке млека од девет куја различитих раса и изоловали лактобациле: Бостон теријер (*L. murinus*, *L. animalis*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*), кокер шпанијел (*L. murinus*, *L. animalis*, *L. fermentum*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *Streptococcus. salivarius*, *Staph. epidermidis*), далматинац (*L. murinus*, *L. animalis*, *L. reuteri* са белим и жутиим колонијама, *E. faecalis*, *Str. bovis*), 2 кује златног ретривера (код прве *L. murinus*, *L. animalis*, *L. reuteri*, *E. faecalis*, *Str. bovis*, *Staph. simulans* и код друге *L. murinus*, *E. faecium*, *Staph. simulans*, квасци), шпански мастиф (само *L. reuteri*), белгијски овчар (*Str. bovis*, *Staph. pseudointermedius*) и 2 кује јоркшир теријера (код прве *E. faecalis* и друге *L. fermentum*, *L. reuteri* са белим и жутиим колонијама, *W. viridescens*, *E. faecium*). За изолацију колонија лактобацила коришћени су паралелно плоче MRS и MRS-Cys (са додатком цистеина)

агара на којима је избројан број од $1,3$ до $6,1 \times 10^2$ CFU/mL за различите расе паса. Највећи број лактобацила је доказан у узорцима млека кује расе далматински гонич, најмањи број код Бостон теријера. На VRBG агару није било раста. Резултати ове студије су показали да у млеку куја могу да буду присутни лактобацили и на тај начин представљају њихов природни извор овог микроорганизма за штене које сиса. Изостанак раста на VRBG агару је био потврда да су узорци правилно узети и животиње држане у добрим хигијенским условима. Martin и сар. (2010) су профилисањем полиморфне DNK помоћу случајне амплификације доказали 28 различитих генетских профила изолата лактобацила. Пробиотски потенцијал је процењен помоћу различитих тестова као што је испитивање преживљавања у условима, који опонашају оне који постоје у гастроинтестиналном тракту, производњу антимикробних једињења, адхеренцију на цревни муцин, разградњу муцина и осетљивости на антимикробне лекове. Доказали су да неки сојеви у будућности имају потенцијал за примену као пробиотици код паса.

Fernandez и сар. (2019) су испитали пробиотски потенцијал два соја лактобацила изолованих из млека куја у *in vitro* и *in vivo* условима на експерименталном моделу пса како би се проценио њихов потенцијал за спречавање појаве гастроентеритиса. Методом 16S rRNA секвенцирања два соја лактобацила изолована у овом истраживању су идентификована као *L. rhamnosus* и *L. plantarum*, којима је Европска агенција за безбедност хране (EFSA) доделила статус квалификоване претпоставке безбедности (QPS) и налазе се у комерцијалним пробиотским препаратима тестираним за употребу код паса. У току студије испитана је антимикробна активност лактобацила, њихова адхеренција на епителне ћелије и муцин, разградња муцина, преживљавање при условима, који се могу наћи у гастроинтестиналном тракту и осетљивост на антимикробне лекове. Оба соја су показала висок пробиотски потенцијал у *in vitro* условима. Метода преливања (Magnusson и Schnürer, 2001) је коришћена да би се испитала способност сојева да инхибишу раст тест микроорганизама (*Clostridium perfringens* MP24, *Enterococcus faecalis* MP33, *Staphylococcus aureus* MP29, *Escherichia coli* MP07 (O157:H7), MP11 и MP17, *Salmonella enterica* MP46, *Campylobacter jejuni* MP42, *Proteus vulgaris* MP48, и *Klebsiella pneumoniae* MP68). Просечна зона инхибиције око линија засејавања *L. rhamnosus* MP 01 и *L. plantarum* MP 02 била је > 2 mm, што је доказ антимикробне активности према свим тест микроорганизмима, посебно ефикасан према Грам-негативним тест микроорганизмима. Међутим, неутрализацијом pH вредности култура оба соја лактобацила имало је за последицу губитак антимикробне активности. Способност оба соја да стварају бактериоцине је испитана агар дифузионом методом (Martín и сар., 2010). Као тест микроорганизми су коришћени: *Clostridium perfringens* MP24, *Enterococcus faecalis* MP33, *Staphylococcus aureus* MP29. Резултати, које су Fernandez и сар. (2019) добили су показали да бактериоциногена активност није доказана према индикатор микроорганизама сојева. Потенцијал за превенцију гастроинтестиналних инфекција је процењен на експерименталном моделу пса када су коришћени штенци стари један месец. Група од 12 штенаца немачког овчара, 6 мужјака и 6 женки, примала је *L. rhamnosus* MP01 дневно током 2 месеца, а друга група од 12 штенаца, 6 мужјака и 6 женки, исте расе, примала је *L. plantarum* MP02 током истог временског периода. Исти експериментални приступ је примењен за штенце јоркширског теријера. Испитивање је обухватило 12 паса сваке расе у плацебо групама. Резултати су показали да је примена сојева испољила значајни превентивни ефекат на појаву гастроинтестиналних инфекција код паса.

Од 53 изолата *Lactobacillus* spp. пореклом од 22 пса You и сар. (2022) су методом 16S rRNA секвенцирања идентификовали девет изолата као *Lactobacillus acidophilus*, који су показали антимикробни ефекат према *Streptococcus mutans*, изазивач обољења зубала

паса. Такође, антимикробни ефекат у *in vitro* условима је испитан према *Candida albicans* KACC 30071, *Escherichia coli* KACC 15541, *Staphylococcus aureus* KACC 13236 и *Streptococcus mutans* KACC 16833. Инхибиторни ефекат супернатанта одабраних изолата лактобацила према тест микроорганизмима је одређиван квантитативно мерењем оптичке густине (OD). Сојеви *Lactobacillus acidophilus* су умножени у TSB бујону, а супернатант култура је добијен после центрифуговања на 13 000 обртаја/мин. у трајању од 2 минута. Тест микроорганизми су такође умножени у TSB бујону, који је инкубисан при 37 °C 24 h. Супернатанти лактобацила (20%, v/v) су додати у MRS бујон, а потом су инокулисани патогени тест микроорганизми у концентрацији 1% (v/v). MRS бујон инокулисан са патогеним тест микроорганизмима без супернатанта лактобацила је била негативна контрола. Оптичка густина (OD) је мерена на таласној дужини 600 nm после 18 h и 24 h при 37 °C. После инкубације 24 h, сви изолати лактобацила су показали инхибиторну активност према четири различита патогена микроорганизма (*C. albicans*, *E. coli*, *S. aureus* и *S. mutans*). Сем једног изолата лактобацила са ознаком MJC180 за инхибицију *E. coli*, сви изолати су значајно инхибирали четири тест патогена микроорганизма у зависности од соја. Ови изолати су снажно инхибисали *S. mutans*, који је повезан са развојем каријеса. *L. acidophilus* MJC175 је имао највећу инхибиторну активност према *S. mutans*, а затим MJC179 и MJC178. Већу инхибицију *C. albicans* и *E. coli* је показао *L. acidophilus* MJC175 у односу на *L. acidophilus* (KACC 12419). На основу њихове антимикробне активности према *S. mutans*, одабрана су три изолата и коришћена у даљем експерименту. У току *in vivo* истраживања 3 соја лактобацила у моно и мешаној култури су перорално давана псима у концентрацији 10⁸-10⁹ CFU сваког дана током 4 недеље. Резултати *in vitro* и *in vivo* испитивања указују да изолати *L. acidophilus* пореклом од паса, посебно *L. acidophilus* MJC175, могу бити примењени као пробиотски препарати за очување оралне хигијене паса.

У прилог антимикробном потенцијалу лактобацила пореклом од паса су и резултати Zhang и сар. (2021) који су методом 16S rRNA секвенцирања идентификовали *L. acidophilus* (сој AR1), *L. acidophilus* (сој AR2) и *L. fermentum* чије су антимикробно деловање у *in vitro* условима испитали према Грам-негативним микроорганизмима (*Salmonella enterica* серотип Typhimurium ATCC14028), *Salmonella enterica* серотип Typhimurium SL1344 (SL1344), ентеротоксогена *Escherichia coli* k88 (ETEC). Инхибиторни потенцијал сојева лактобацила (AR1, AR2, AR3) на раст тест микроорганизама процењен је Оксфорд Агар дифузионом методом када је испитана бујонска културе после инкубације, бактеријске ћелије и супернатант. Патогени сојеви (ATCC14028, SL1344, ETEC, *S. aureus*) су (10⁷ CFU/mL) на плоче LB агар. Затим је 100 µl бујонске културе (10⁷ CFU/mL), супернатанти и бактеријске ћелије (10⁷ CFU/mL) сваког соја лактобацила (AR1, AR2, AR3) су инокулисани у отворе, а затим су плоче држане при 4 °C 3 h да инокулум дифундује у подлогу. После 12 h инкубације при 37 °C, мерен је пречник зона инхибиције. Зоне инхибиције > 15 mm сматране су високом инхибиторном активношћу испитаних сојева. Антимикробно деловање сојева лактобацила је испитано у моно и мешаној бујонској култури са тест микроорганизмима (10⁷ CFU/mL). Број живих бактерија и рН вредност мешаних и чистих култура сваке бактерије су мерени као оптичка густина (OD₆₀₀) у различитим интервалима (6 h, 12 h, 24 h). Да би испитали да ли је инхибиторни ефекат лактобацила на раст тест микроорганизама последица ниског рН или су и њихови метаболити, тест микроорганизми су засејани у MRS бујону са рН истим као рН вредности културе сојева лактобацила (AR1, AR2, AR3) током 24 h. Антимикробна активност бујонских култура свих сојева лактобацила показала је високу инхибиторну активност у односу на супернатанте и бактеријске ћелије. Саме бактеријске ћелије лактобацила нису показале антимикробну активност. Бујонска култура соја *L. acidophilus* AR1 је испољила највећу

инхибиторну активност, када је зона инхибиције била $19,03 \pm 0,2$ mm за *S. Typhimurium* ATCC14028, затим следе сој *S. Typhimurium* SL1344 (зона инхибиције од $17,47 \pm 0,55$ mm), *S. aureus* (зона инхибиције од $15,43 \pm 0,70$ mm) и ETEC (зона инхибиције од $14,90 \pm 0,46$ mm). Бујонска култура соја *L. acidophilus* AR2 је показала највећу инхибиторну активност ($18,80 \pm 0,85$ mm зона инхибиције) према *S. Typhimurium* SL1344, затим *S. Typhimurium* ATCC14028 ($17,67 \pm 0,61$ mm зона инхибиције), *S. aureus* ($14,57 \pm 0,9$ mm зона инхибиције) и ETEC ($13,90 \pm 1,03$ mm зоне инхибиције). Бујонска култура и супернатант соја *L. fermentum* AR3 су имали мању антимикуробну активност у поређењу са сојевима *L. acidophilus*. Лактобацили су инхибисали раст патогених бактерија у мешаним културама. Раст у моно и мешаној култури је био приближно исти, али у монокултури је био нешто слабији него у мешаној култури са патогеним тест микроорганизмима.

Zhang и сар. (2021) су доказали да се инхибиторни ефекат сваког лактобацила на раст различитих врста патогених микроорганизама разликује. Раст патогених микроорганизама је инхибисан у мешаној култури са лактобацилима. После 24 h број живих бактерија сваког патогена у чистој култури је био већи него у мешаној култури са лактобацилима. Стварање киселине је било приближно у моно и мешаној култури. Пад рН вредности је био спорији код моно култура патогених микроорганизама него код мешаних култура и моно култура лактобацила. Утврђено је да је број живих патогена већи када се гаје при рН вредности једнакој рН вредности културе лактобацила од 24 h него при ко-култури са лактобацилима. Раст патогених микроорганизама је био више инхибиран када су били у мешаној култури са лактобацилима него при ниској рН вредности као што је рН вредност културе лактобацила од 24 h, што указује да антимикуробна активност потиче од метаболита лактобацила. Сој *L. acidophilus* AR1 је био најотпорнији на ниску рН вредност и високу концентрацију жучних соли, затим *L. acidophilus* AR2 и *L. fermentum* AR3. Стопа преживљавања сваког соја се повећавала са повећањем рН и смањењем концентрације жучних соли.

У истраживању **Kumar и сар. (2021)** је испитиван ефекат синбиотика припремљеног комбинацијом ферментисаног млека произведеног са *Lactobacillus acidophilus* NCDC15 и праха корена биљке *Cichorium intybus* на здравље паса. Синбиотици подстичу раст корисних микроорганизама попут лактобацила и бифидобактерија, а истовремено смањују број потенцијално патогених микроорганизама код паса. Употреба синбиотика има и друге корисне ефекте на гастроинтестинални тракт и имунитет паса, што резултира повећаном производњом млечне киселине и масних киселина кратких ланаца и смањењем нивоа амонијака. У експерименту је учествовало 15 одраслих женки лабрадор ретривера насумично је распоређених у три групе. Прва група је храњена само домаћом основном храном и служила је као контролна група (CON), док су друге две групе храњене истом основном храном допуњеном ниским (LSL) и високим нивоима (HSL) синбиотика. Експеримент је трајао 9 недеља. Резултати студије су показали да су пси расе лабрадор ретривер добро реаговали на синбиотску формулацију ферментисаног млека *Lactobacillus acidophilus* NCDC15 и праха корена *Cichorium intybus*. Није било варијација ($p > 0,05$) између група у погледу добровољног уноса хране и сварљивости DM, OM, CP и EE. Међутим, сварљивост сирових влакана је имала тенденцију ($p = 0,051$) да буде већа у обе групе са суплементима у поређењу са CON. Физичке карактеристике фецеса су остале непромењене ($p > 0,05$) због дијететских третмана. Међутим, садржај лактата у фецесу је био повећан ($p < 0,05$) у обе групе храњене синбиотиком, уз истовремени пад фекалног амонијака у поређењу са контролном групом. Популација фекалних лактобацила и бифидобактерија показала је већи број ($p < 0,05$) у LSL и HSL групама него у CON. У LSL и HSL групама је била мања популација клостридија и колиформних бактерија него у CON. Налази ове студије указују да синбиотски препарат

има благотворан утицај на здравље гастроинтестиналног тракта и имунитет паса, а одговор на синбиотску суплементацију у нижим и вишим дозама био је сличан.

Tomusiak- Plebanek и сар. (2022) су испитали утицај изолата лактобацила из ректалних брисева на *Campylobacter*. У току овог истраживања је изоловано и идентификовано 30 сојева рода *Lactobacillus* и четири соја рода *Campylobacter*. Од 30 сојева *Lactobacillus*, 22 су показала инхибиторни ефекат према *Campylobacter*. Четири соја са најјачим антагонизмом према *Campylobacter* (*L. salivarius* 25 K/L/1, *L. rhamnosus* 42 K/L/2, *L. sakei* 50 K/L/1 и *L. agilis* 55 K/L/1) су одабрана за даљу процену њихових потенцијалних пробиотских карактеристика. За испитивање антимикубног ефекта аутори су користили агар дифузиони тест. Мерењем рН вредности спонтано закишељених супернатаната добијених из 24 h култура после инкубације изолата и *Lactobacillus* при 37 °C кретале су се од 3,8 до 4,5. Просечан пречник зона инхибиције раста изазваних природним закишељеним супернатантима од четири испитана *Lactobacillus* соја био је $16,26 \pm 0,79$ mm, где је пречник бунара био 9 mm. Од 30 сојева *Lactobacillus*, 22 су показала инхибиторни ефекат према два референтна соја *Campylobacter* (*C. jejuni* ATCC 29428 и *C. coli* ATCC 33559). Пречник зона инхибиције раста кретао се од $9,0 \pm 0,0$ mm до $21,25 \pm 1,1$ mm, где је 9 mm био пречник бунарчића. Активност испитаних сојева *Lactobacillus* према тест микроорганизмима била је углавном у корелацији са врстом. Сви испитани изолати *L. delbrueckii* (n = 3) нису показали антагонистичко деловање ($9,0 \pm 0,0$ mm) према *C. jejuni* и *C. coli*, али сојеви *L. rhamnosus* (n = 8) и *L. brevis* (n = 4) су показали антагонистичко деловање. Код сојева, који припадају врсти *L. salivarius*, примећена је велика хетерогеност у величини инхибиторних зона. У овој групи, четири од седам сојева нису показала антагонистичко деловање према тест микроорганизмима и један изолат је са најјачом инхибицијом раста *Campylobacter* (средња зона инхибиције $20,25 \pm 1,4$ mm). Просечан пречник зона инхибиције за *C. jejuni* је био $13,6 \pm 3,8$ mm, а за *C. coli* $12,6 \pm 3,4$ mm. Није било статистички значајних разлика ($p < 0,05$) у осетљивости ове две врсте *Campylobacter* на антимикубне супстанце које производе сојеви *Lactobacillus*. Супернатанти лактобацила са неутралисаним киселинама (pH 6,8—7,0) нису показали никакво антагонистичко деловање. Три од четири испитана соја су стварала екстрацелуларни H₂O₂. Највећа стопа стварања (10 mg/L после 10 минута од почетка експеримента и 30 mg/L 24 h касније) примећена је код соја 50 K/L/1. Сојеви 25 K/L/1 и 55 K/L/1 после 24 h инкубације показали су нижу продукцију H₂O₂, 1 mg/L, односно 3 mg/L. Сви испитани сојеви су показали веома добро или умерено преживљавање при pH 3,0 и 2,0 и високу толеранцију на 0,5% и 1% жучних соли.

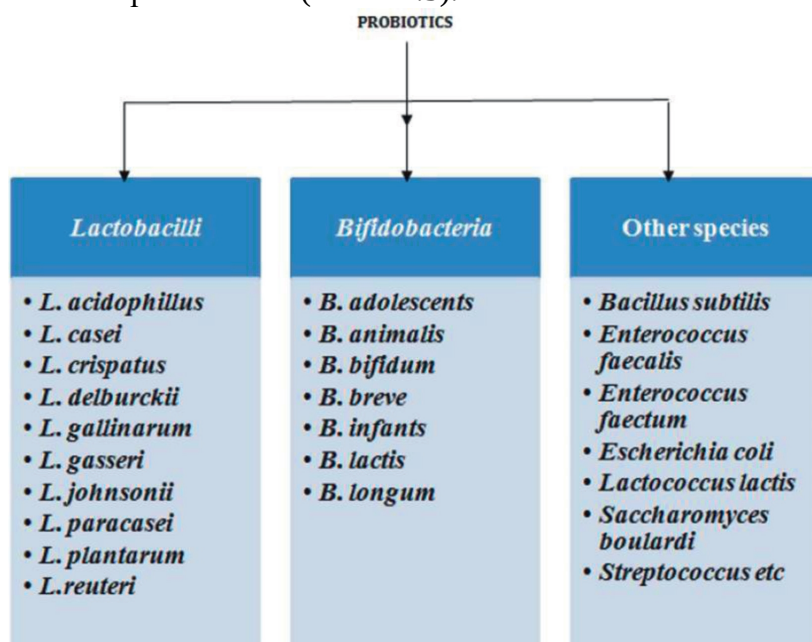
Hayasaka и сар. (2021) су доказали имуномодулаторни ефекат давања биогена *Lactobacillus* врста. Биогени су корисне биоактивне супстанце, које синтетишу лактобацили. Утичу на цревну микробиоту активишући имунолошку функцију црева и имунстимулаторни ефекат преко деловања на бактерије одговорне за производњу масних киселина кратких ланаца.

2.3 Пробиотици

Пробиотик (*Probiotic*) је грчка реч, која значи *Pro bios*-за живот (Fuller, 1989). Током деценија у лотератури је било више различитих објашњења значења. Једно је да је пробиотик микробиота живих култура, које побољшавају квалитет аутохтоне микробиоте када се дају људима или животињама. У историјату се наводи да је 1908. године Мечников дао прву дефиницију пробиотика по којој употреба ферментисаних производа од млека продужава рок трајања производа. Lilly и Stillwell су 1956. године закључили да неки микроорганизми синтетишу стимулаторе раста за друге

микроорганизме. Употреба речи пробиотик може указати на благотворно деловање на микроорганизме. Parker је сковао реч пробиотик да би дефинисао хемијске материје и микроорганизме, које доводе у равнотежу микроорганизме гастроинтестиналног тракта (Fuller, 1989). Ово значење је подигло значај речи супстанције и обухватало је антибиотике. Fuller је усавршио опис, који је дао Parker и описао пробиотике као живи микроорганизам, који има благотворно дејство на здравље топлокрвних животиња кроз обнављање нативне цревне микробиоте. Дефиниција Fullera је истакла преживљавање и благотворне ефекте пробиотика на животиње. Haveenar и Veld су их 1992. године описали као „одрживе микроорганизме“, који се дају људима или животињама као моно или мешане културе и имају повољно дејство на здравље домаћина, побољшавајући карактеристике интестиналне микробиоте (Calderaro и Chezzi, 2024). Schaafsma проширује концепт и према тој дефиницији пробиотици су живе бактерије које, ако се унесу перорално и ресорбују имају позитиван ефекат на здравље домаћина, Salminen је запазио да је пробиотик у производима од млека микробна култура. Сходно томе, матрикс хране је индикатор да се микроорганизам и храна сматрају пробиотицима. Међутим, пошто храна која није произведена од млека може да садржи пробиотске продукте, није било оправдано узимати у обзир само производе од млека као матрикс за пробиотике. Schrezenmeir и De Vrese су 2001. године пробиотике описали као живе микроорганизме који имају ефекте на здравље независно од места активности (Calderaro и Chezzi, 2024).

Од 2001. године WHO (World Health Organization) и FAO (Food and Agriculture Organization) препознаје пробиотике као „живе микроорганизме, који поспешују здравље домаћина ако се дају адекватно“. Нешто касније, 2014. године, ова дефиниција је проширена у „живи микроорганизме који утичу повољно на здравље домаћина када се примењују у одговарајућим количинама“. Овај концепт је научна заједница широко прихватила и представља критеријум у већини владиних агенција за процену лекова, хране и суплемената као пробиотика. Ови микроорганизми су широко распрострањени у природи и погодни су за употребу у индустрији хране. Неке намирнице се сматрају добрим извором пробиотика, као што су производи од млека, нпр. јогурт. Млеко и млечни производи се често повезују са микроорганизмима који обнављају дигестивни тракт корисним одржавањем (Tambekar и Bhutada, 2010). Лактобацили се сматрају најранијим описаним пробиотиком (Шема 2.3).



Шема 2.3 Сојеви пробиотских бактерија (Sherwani и Bukhar, 2022)

2.4 MALDI-TOF MS

Метода MALDI-TOF MS (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry*) је брза и осетљива аналитичка метода идентификације и карактеризације микроорганизама, која се заснива на процени масе јонизујућег узорка молекула кратким ласерским импулсима након њихове кристализације са органском киселином мале молекулске тежине, која се назива матрикс (Cain и сар., 1994; Singhal и сар., 2015).

MALDI-TOF MS представља револуционарну методу уведену последњих неколико година, која даје допринос у клиничкој микробиологији за идентификацију патогених бактерија и гљивица и откривање резистенције на антимикробне лекове (Calderago и Chezzi, 2024). Метода се заснива на протеомској анализи профила градивних протеина бактерија и гљивица (Clark и сар., 2013; Kassim и сар., 2017). Показало се да има предности, које се огледају у високој осетљивости, једноставног извођења и ниске цене, иако је цена спектрометра релативно висока. Масена спектрометрија (МС) је откривена у 19. веку и најранијих дана је коришћена само у хемијским наукама. Осамдесетих година 20. века, уведен је MALDI, који је побољшао употребу МС, омогућавајући њену примену за идентификацију биолошких макромолекула као што су протеини (Singhal и сар., 2015).

Научници John Fenn и Koichi Tanaka су 2002. године добили су Нобелову награду за хемију и примену ове методе, која је заснована на развоју техника јонизације меке десорпције за анализу биолошких макромолекула, обухватајући електроспреј и меку ласерску десорпцију. На слици 2.4. је MALDI-TOF уређај.

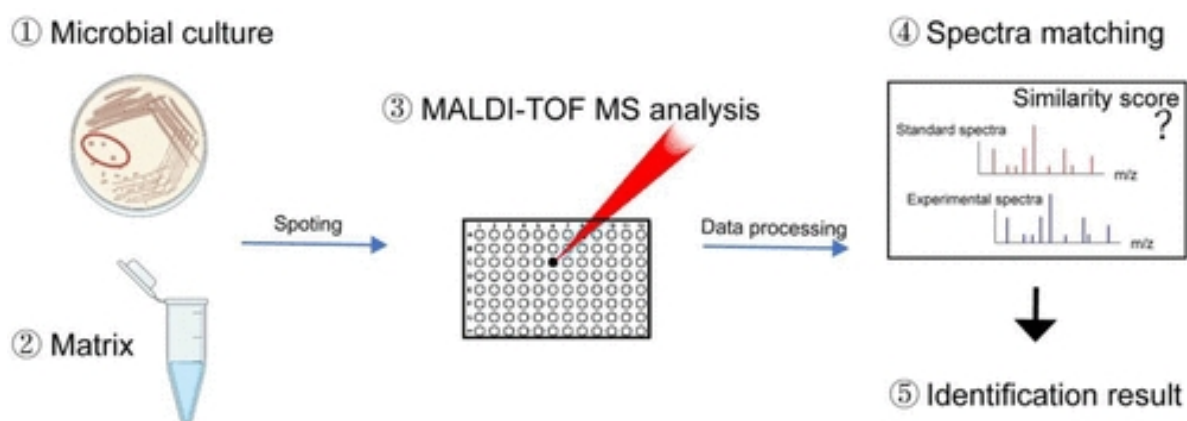


Слика 2.4. MALDI-TOF уређај (Bruker, SAD)

Ова техника чини анализу масене спектрометрије применљивом на велике и осетљиве поларне молекуле који имају виталну улогу у биолошким системима. Карактеристике електроспреј спектра за велике молекуле су кохерентне секвенце врхова чији су компонентни јони вишеструко наелектрисани, при чему се јони сваког врха разликују за једно наелектрисање од јона суседних врхова у секвенци. Спектри су добијени за биополимере олигонуклеотиде и протеине, MALDI-TOF MS се као метода, која комбинује анализу протеома са $C_{10}H_7NO_3$ као матриксом, показала корисном за брзу идентификацију микроорганизама и описали су је 1994. године Cain и сар. (1994). Током 1975. године изведени су први експерименти у којима је идентификација микроорганизама била помоћу MS, и иако су резултати били охрабрујући, нису били репродуцибилни због интерференције медијума за раст и услова раста (Anhalt и Fenselau, 1975). Велико побољшање методе донела је MALDI-TOF MS техника 80. година XX века омогућавајући анализу великих биомолекула протеина рибозома бактерија са предношћу да је било слабо ометање због медијума за култивацију и услова раста, а резултати идентификације су били репродуцибилни и поуздани на нивоу врсте микроорганизама (Fenselau и Demirev, 2001).

Последњих 10 година увођење MALDI-TOF MS у клиничке микробиолошке лабораторије је значајно изменило ток дијагностичког рада у идентификацији бактерија и гљивица. MALDI-TOF MS је 2009. године широко уведен у клиничке микробиолошке лабораторије и од тада је забележено побољшање методе. Најважнија промена се односила на претходну обраду бактерија, која је коришћена у раној фази примене MALDI-TOF MS идентификације. Показало је да је могуће одмах користити свеже колоније нанесене на MALDI циљне плоче једноставном припремом, и ова чињеница је брзо допринела практичној примени MALDI-TOF MS технологије за идентификацију микроорганизама широм света (Hillenkamp и Karas, 1990; Fenselau и Demirev, 2001; Croxatto и сар., 2012).

Последњих 10 година увођење MALDI-TOF MS у клиничке микробиолошке лабораторије је значајно изменило ток дијагностичког рада у идентификацији бактерија и гљивица (Quarti и сар., 2020; Li и сар., 2022). На шеми 2.4 приказан је рад на MALDI-TOF: узимање се чиста бактеријска култура (1), мешање са матриксом (2) и наношење на плочицу за читавање (3), апарат бележи запис спектра након ласерског упаравања (4) и упоређује са базом за коначни резултат (5).



Шема 2.4. Рад на MALDI-TOF апарату (Li и сар., 2022)

3. ЦИЉ И ЗАДАЦИ

Циљ истраживања је био да се испита присуство бактерија млечне киселине (лактобацила) у млеку куја, као и да се изврши карактеризација изолата и испита њихов антимикробни потенцијал.

За остваривање циља постављени су следећи задаци:

1. Извршити одабир куја и узорковати млеко
2. Извршити изолацију бактерија млечне киселине – лактобацила
3. Извршити идентификацију бактерија млечне киселине кроз фазе:
 - 3.1. Примарна бактериолошка идентификација
(микроморфологија, макроморфологија и биохемијске особине)
 - 3.2. Идентификација методом MALDI-TOF
 - 3.3. Идентификација секвенцирањем гена за 16S rRNA.
4. Извршити одређивање броја микроорганизама у узорцима млека куја и то:
 - 4.1. Број лактобацила
 - 4.2. Број коагулаза позитивних стафилокока
 - 4.3. Број *Enterobacteriaceae*
 - 4.4. Укупан број аеробних мезофилних бактерија
5. Извршити фенотипску карактеризацију изолованих лактобацила и то:
 - 5.1. Испитати биохемијске карактеристике
 - 5.2. Испитати раст изолата лактобацила при различитим температурама
 - 5.3. Испитати преживљавање изолата у средини са жучним солима
 - 5.4. Испитати степен преживљавања поступка лиофилизације
 - 5.5. Испитати антимикробни потенцијал изолата у *in vitro* условима

4. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ РАДА

4.1 Материјал

4.1.1 Одабир куја и узорковање млека

Материјал у току истраживања су представљали узорци млека, који су асептично узети од 30 куја различитих раса (немачки овчар, лабрадор, истарски гонич, кане канарио, чау чау, ротвајлер, бернски планински пас, стафордски теријер, мопс, доберман, лагото ромањоло, шарпланинац, пудла, боксер, бостон теријер) у различитим фазама лактације. Узорци млека куја су прикупљени са различитих географских локалитета у Републици Србији (Карта 4.1.1) .



Карта 4.1.1 Географски локалитети прикупљања узорка – црвене тачке (●)

Све кује су морале да испуњавају следеће критеријуме:

- 1) да су здраве
- 2) гравидитет протекао без компликација
- 3) није било употребе антибиотика и/или пробиотика током претходна два месеца
- 4) није било перинаталних проблема код штенaди.

Пре узимања узорaка млека куја млечна жлезда је припремана тако што је опрана, очишћена и осушена папирним убрoсом за једнократну употребу, а потом су врхови дезинфиковани ватом нaтопљеном етанолoм (70%) Асептично узети узорци у стерилне пластичне посудице су означаване и стављене у ручни фрижидер на температуру до 4°C.

Етичко одобрење

Будући да женке паса не спадају у музне животиње, пре започињања експеримента је било неопходно прибавити етичко одобрење за узимање узорaка млека. Протоколе за истраживање и учешће женки паса у експерименту одобрили су Управа за ветерину, Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде (Решење бр. 323-07-/2023-05/2) (Прилог 9.2) и Етичка комисија за заштиту добробити експерименталних животиња Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду (бр. 01-1/12) (Прилог 9.3).

Узимање узорaка

Узимање узорaка млека куја током различитих фаза лактације је приказано на Шеми 1.

Шема 1. Поступак узимања узорaка млека куја током лактације

Време (дани)			Лактациони период	
0. дан- <i>Partus</i> кује			14. дан	50. дан- крај
↑	Узорци	млека	↑	↑
нису узимани, јер је после штењења колострално млеко неходно за први подој штенaди и стицање имунитета у првим даним живота.			Узорци млека се узимају у количини до 2 ml, али не мање од 1,5 ml, како би могло да се направи основно разблажење преношењем 1 ml у 9 ml у средства за разблаживање (пуферисана пептонска вода) Сваки узорак је одлаган у ручну фрижидер-торбу (4-8°C) и тако допрема у лабораторију Факултета. Узимање узорaка је вршено после подоја, а у изузетном случају ако је дошло до устезања млека, да би се млеко спустило у цистерну млечне жлезде, дипл. ветеринар задужен за здравствену заштиту животиња је супкутано апликовао окситоцин (<i>Oxytocin</i> ®, Biovet, Шпанија) у дози од 2-10 i.j.. На исти начин су узимани узорци од индивидуалних власника и из одгајивачница, одн. из Центра за обуку паса Ниш. Напомена: Припрема млечне жлезде куја је била на следећи начин: После благе масаже, млечни комплекси су опрани водом, осушени папирним убрoсом за једнократну употребу, а затим ватом нaтопљеном алкохолoм (70% етанол) дезинфиковани врхови папила мамарних комплекса. Власник /лице задужено за дневну бригу о животињама	

је вршио мужу уз претходно стављене латекс рукавице, у стерилне пластичне посуде, које су претходно обележене. Током муже се благо поступало са животињама да не би дошло до стреса и устезања млека.



Слика 4.1. Узимање узорка млека куја на терену (Ауторска фотографија)

4.1.2 Подлоге

У току извођења експеримента коришћене су наведене микробиолошке подлоге:

Подлоге за изолацију и одређивање укупног броја различитих врста микроорганизама из узорака млека куја

Микробиолошке подлоге у експерименту су припремане из праха комерцијалних хранљивих подлога.

4.1.2.1 Средство за разблаживање, припрему основног и децималних разблажења узорака млека куја

За припрему основног и децималних разблажења коришћена је пуферисана пептонска вода (PPV).

Састав пуферисане пептонске воде (LAB, Енглеска) (g/L) је следећи:

Продукт ензимског разлагања казеина	10,0
Натријум хлорид (NaCl)	5,0
Динатријумхидрегенфосфат (анхидрид)	3,6
Калијумхидрогенфосфат	2,5

Подлога је према упутству произвођача припремана тако што је 20,1 g праха растварано у 1000 mL дестиловане воде и остављено да стоји при собној температури 10 минута, а потом је вршена стерилизација у аутоклаву при 121 °C 15 минута са крајњим pH 7,0±0,2.

4.1.2.2 Подлоге за излацију и бројање лактобацила

За изолацију и бројање лактобацила пореклом из млека куја је коришћен MRS (de Man, Rogosa Sharpe) агар.

Састав MRS агара (HiMedia, Индија) (g/L) је следећи:

Пептон	10,0
Екстракт меса	8,0
Екстракт квасца	4,0
D (+) глюкоза	20,0
Калијум хидроген фосфат (KH ₂ PO ₄)	2,0
Tween 80	1,0
Диамонијумхидрогенацетат	2,0
Натријум ацетат	5,0
Магнезијум сулфат (MgSO ₄)	0,2
Манган сулфат (MnSO ₄)	0,004
Агар	12,0

Подлога је припремљена тако што је 70 g праха растворено у 1 000 mL дестиловане воде. Загревањем подлога је отопљена и стерилисана при температури 121°C 15 минута, а крајњи pH је био 6,4±0,2 при 25°C.

Поред MRS агара у експерименту је за изолацију лактобацила из млека куја коришћен крвни агар-Columbia Blood Agar (CBA) са додатком 5% v/v овчије крви.

Састав Colimbia Blood Agar (HiMedia, Индија) (g/L):

Продукт ензимског разлагања казеина	12,0
Дигестат животињског ткива	5,0
Екстракт квасца	3,0
Екстракт меса	3,0
Кукурузни скроб	1,0
Натријум хлорид (NaCl)	5,0
Агар	13,5
Овчија дефибринисана крв	50 mL

Поступак припреме СВА подлоге је подразумевао да се на 950 mL расхлађене стерилне базе подлоге асептично дода 50 mL стерилне дефибринисане овчије крви.

4.1.2.3 Подлога за одређивање укупног броја *Enterobacteriaceae*

За одређивање укупног броја *Enterobacteriaceae*, као показатеља хигијене узимања узорака млека куја коришћен је VRBG (Violet Red Bile Glucose) агар.

Састав VRBG агара (LAB, Енглеска) (g/L) је следећи:

Екстракт квасца	3,0
Пептон	7,0
Натријум хлорид (NaCl)	5,0
Жучне соли	1,5
Глукоза	10,0
Неутрал црвено	0,03
Кристал виолет	0,002
Агар	12,0

Прах у количини од 38,5 g је растваран у 1000 mL дестиловане воде, остављен 10 минута да се хомогенизује уз повремено мешање, а потом је стављан да се прокува уз мешање тако да се не прегреје. Подлога је расхлађивана на 47°C и разливана у ерленмајере. Код ове подлоге није било потребно извршити стерилизацију у аутоклаву. Крајњи рН подлоге је био $7,4 \pm 0,2$.

4.1.2.4 Подлога за одређивање укупног броја стафилокока

За одређивање укупног броја стафилокока у узорцима млека куја током експеримента је коришћена подлога Baird Parker (ETPGA) (Egg, Telutite, Pyruvat, Glycocol Agar) агар.

Састав Baird Parker агара (LAB, Енглеска) (g/L) је следећи:

Триптон	10,0
Месни екстракт	7,5
Екстракт квасца	1,0
Глцин	12,0
Натријум пируват	10,0
Литијум хлорид (LiCl)	5,0
Агар	20,0

Подлогу је припремана тако што је 65,5 g праха растворено у 1 000 mL дестиловане воде. Загревањем подлога је отопљена и стерилисана у аутоклаву 15 минута при температури 121 °C, а крајњи рН је био $6,8 \pm 0,2$. У подлогу расхлађену на око 47 °C је додата суспензија жуманцета јајета (10 mL) и 1 mL 2 % калијум телурита на 100 mL подлоге.

4.1.2.5 Подлога за одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија

За одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима млека куја је коришћена подлога за укупан број бактерија.

Састав подлоге за укупан број бактерија (Торлак, Србија) (g/L) је био следећа:

Триптон „Торлак“	5,0
Екстракт квасца „Торлак“	2,5
Дектроза	1,0
Агар	15,0

Подлога је припремана тако што је 23,5 g праха растворено у 1000 mL хладне дестиловане воде и остави да стоји 15 минута. Подлога је затим пажљиво загрејана до кључања да се потпуно раствори и стерилише у аутоклаву при 120 °C 15 минута, а крајњи рН подлоге је морао да буде 7,0.

4.1.2.6 Медијум за лиофилизацију

За лиофилизацију изолата лактобацила пореклом из млека куја коришћен је медијум следећег састава:

10% обрано млеко (10g/100mL) 10% сахароза (10g/100mL) са додатком 2,5% мононатријум глутамата (2,5 g/100mL). Стерилизација је изведена у Коховом лонцу уз проверу стерилности. Додато је обрано млеко у односу 1:1 при коначној концентрацији од 20%. Хомогенизовано је на вортексу и директно разливано у ампуле пред лиофилизацију.

Састав медијума за изолате коришћене у експерименту где је испитивано преживљавање после лиофилизације је био следећи:

Ligilactobacillus murinus

15 mL соја + 1,5 mL обрано млеко + 1,5 mL сахарозе + Na глутамат

Разливано је 8 бочица по 2 mL.

Lactobacillus reuteri

20 mL соја + 2 mL обрано млеко + 2 mL сахарозе + Na глутамат

Разливано је 10 бочица по 2 mL.

Lactobacillus paracasei

15 mL соја + 1,5 mL обрано млеко + 1,5 mL сахарозе + Na глутамат

Разливано је 8 бочица по 2 mL.

Lactobacillus rhamnosus

15 mL соја + 1,5 mL обрано млеко + 1,5 mL сахароза + Na глутамат

Разливано је 7 бочица по 2 mL. Остатак је замрзнут.

4.1.2.7. Подлоге за одређивање антимикробног деловања изолата лактобацила из млека куја

За испитивање антимикробног деловања изолата лактобацила из млека куја коришћен је Хранљиви агар.

Састав Хранљивог агара (Торлак, Србија) (g/L) је био следећи:

Пептон „Торлак“	15,0
Месни екстракт	3,0
Натријум хлорид	5,0
Калијум хидрогенфосфат	0,3
Агар	18,0

У припреми подлоге 41,3 g праха је додавано у 1000 mL дестиловане воде и остављано да стоји 15 минута. Подлога је затим пажљиво загревана до кључања да се потпуно раствори, а онда је стерилисана у аутоклаву при 121°C 15 минута. Крајњи рН је био 7,3±0,2 на 25 °C.

За умножавање и одржавање изолата лактобацила је коришћен MRS (de Man, Rogosa Sharpe) бујон.

Састав MRS бујона (Торлак, Србија) (g/L) је био следећи:

Пептон „Торлак“	10,0
Екстракт мяса	10,0
Екстракт квасца	5,0
Декстроza	20,0
Калијумхидрогенофосфат	2,0
Натријум хлорид	5,0
Натријум ацетат	2,5
Магнезијум сулфат	1,1
Манган сулфат	0,2

После одмеравања 55,8 g праха подлоге, растворено је у 1000 mL хладне дестиловане воде. Подлога је уз мешање загревана до кључања да се потпуно раствори. У растворену подлогу је додато 1 mL Tween 80 (0,1%). Подлога разливана у епрувете и стерилисана у аутоклаву при 121°C 15 минута.

За испитивање антимикробног потенцијала лактобацила у *in vitro* условима методом преливања коришћен је Beain Heart Infusion (BHI) бујон (LAB, Енглеска) (g/L) чији је састав:

Мождано срчани инфуз	17,5
Триптоза	10,0
Глукоза	2,0
Натријум хлорид	5,0
Динатријумхидрогенфосфат	2,5



Слика 4.1.2 Складиштење припремљених подлога у фрижидеру

4.2 Методе

4.2.1 Изолација и идентификација лактобацила из млека куја

По доношењу узорака у лабораторију одмах је започињана анализа тако што је узорак засејаван за изолацију лактобацила и за бројање популација микроорганизама у млеку куја. За изолацију лактобацила узорак је засејан у MRS бујон као корак обогаћења, који је инкубисан аеробно при 37 °C 48 h, а након тога пресејаван је на Колумбија крвни агар (CBA) и MRS агар под истим условима инкубације. Примарна идентификација изолата је вршена испитивањем микроморфолошких (микроскопски препарат-бојење по Граму), макроморфолошких (изглед колонија) и биохемијских особина–каталаза тест. За изолацију и одређивање броја других микроорганизама узорци су обрађени према процедури описаној у тачки 4.2.2

4.2.1.1 Идентификација методом MALDI-TOF

За даљу идентификацију изолата коришћен је MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker, SAD) на Ветеринарском универзитету у Бечу.

4.2.1.2 Идентификација секвенцирањем гена за 16S RNK

Молекуларна идентификација је извршена секвенцирањем гена за 16S RNK. За реакцију је коришћен сет прајмера 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-TACGGYTACCTGTTACGACTT-3'), сет за PCR (DreamTaq PCR Master Mixe (2X) Thermo Scientific), 5 µL DNK изоловане из бактерија и вода за PCR (Thermo Scientific). Укупна запремина реактанта за PCR износила је 25 µL. Температурни режим PCR реакције обухватали су: иницијални корак од 5 минута при 96 °C, а затим 30 циклуса следећих режима: 30 s 94 °C, 30s 57 °C и 60 s 72 °C, и завршно са завршном елонгацијом 10 минута при 72 °C. Анализа завршене реакције је вршена на 1% (w/v) агарозном гелу TBE пуферу, а затим су успешно добијени продукти издвојени из агарозног гела комерцијалним китом (Agarose Out, EURX, Пољска) и отпремљени на комерцијално секвенцирање.

4.2.2 Изолација и одређивање броја микроорганизама у узорцима млека куја

Припрема узорка за испитивање је извршена према стандарду SRPS EN ISO 6887-5 (2020). Изолација и одређивање броја микроорганизама из узорака млека куја је вршена засејавањем узорка у средство за разблаживање тако што је 1 mL пребачен у 9 mL пуферисане пептонске воде (PPV) (Слика 4.2.3.1). Мала количина узорка за основно разблажење је била из разлога што је мужом било тешко добити већу количину млека од куја. Серија децималних разблажења прављена пребацивањем у наредну епрувету и тако до разблажења у којем је могло да се броји од 30-300 колонија после засејавања у хранљиву подлогу и инкубације. При преношењу у наредно разблажење обавезно је коришћена друга стерилна пипета и хомогенизација на вортекс мешалици. Из одговарајућег децималног разблажења узорак млека је засејаван у Петри плочу и преливан одговарајућом подлогом претходно отопљеном и расхлађеном на око 45 °C.

4.2.3 Одређивање броја микроорганизама у узорцима млека куја

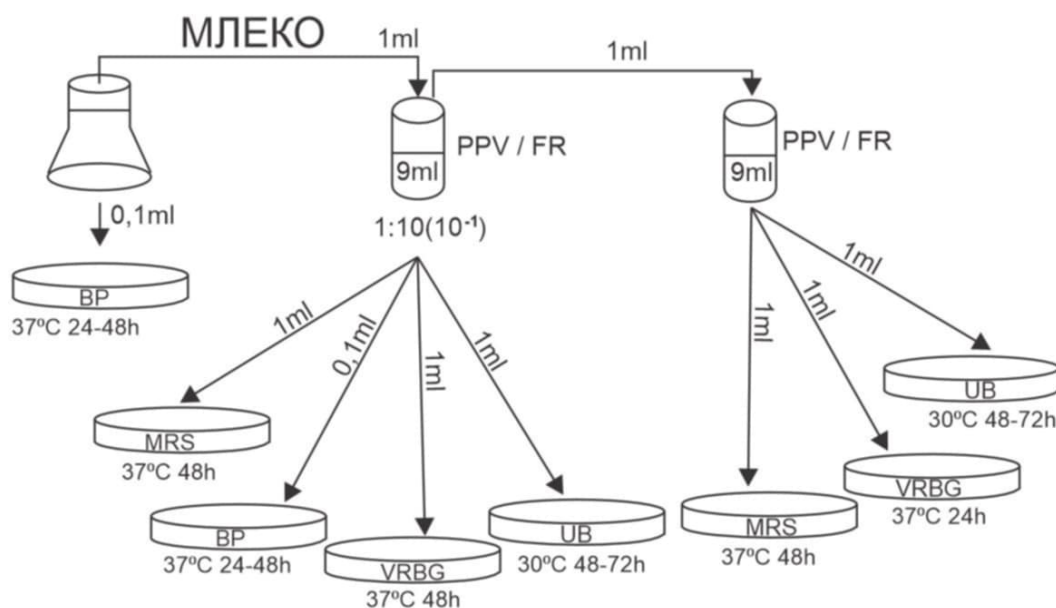
4.2.3.1 Број лактобацила

Изолација и бројање лактобацила из млека куја је рађено према ISO стандарду ISO 15214 (2018) методом преливања 1 mL узорка млека и из разблажења MRS агаром. Инкубација

засејаних плоча је била у анаеробним условима 37 °C 48 h. По инкубацији израсле колоније на MRS агару у бројане голим оком и помоћу лупе.

На Шеми 4.2.3 је приказана припрема узорка и прављење основног и децималних разблажења млека куја, као и засејавање у /на хранљиве подлоге за одређивање укупног броја лактобацила, стафилокока, *Enterobacteriaceae* и укупног броја аеробних бактерија. На слици 4.2.3.1 приказана је припрема узорка пре засејавања, засејавање и хомогенизација.

Шема 4.2.3 Припрема узорка млека куја и прављење децималних разблажења и засејавање у хранљиве подлоге



Слика 4.2.3.1. Хомогенизација узорка на вортекс мешалици

4.2.3.2 Број коагулаза позитивних стафилокока

За одређивање броја коагулаза позитивних стафилокока коришћен је стандард ISO 6888-1 (2023). Одређивање броја је вршено на подлози по Baird Parkeru при 37 °C 24-48 h.

За одређивање укупног броја *Enterobacteriaceae*, стафилокока и аеробних мезофилних бактерија коришћене су ISO стандардне методе.

4.2.3.3 Број бактерија које припадају фамилији *Enterobacteriaceae*

За одређивање укупног броја *Enterobacteriaceae* ISO 21528-2 (2017). Стерилне Петри плоче су биле засејане припремљеним узорцима млека куја из одговарајућег разблажења и преливане VRBG агаром за одређивање укупног броја *Enterobacteriaceae* при 37 °C 24 h како би се проценила хигијена добијања узорака млека.

4.2.3.4. Укупан број аеробних мезофилних бактерија

За одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија коришћена је стандардна метода ISO 4833-1 (2022), а засејане Петри плоче су инкубисане при 30 °C 72 h.

4.3 Фенотипска карактеризација изолата лактобацила

4.3.1 Биохемијске карактеристике изолата

Фенотипска карактеризација изолата према ферментационој способности на различите угљенохидратне компоненте (Martín и сар., 2010) је вршена помоћу BBL Crystal Identification Systems (BD, SAD). За испитивање биохемијских карактеристика 4 изолата лактобацила коришћен је систем за идентификацију (ID) Грам-позитивних бактерија (GP). Комплет BBL Crystal Test GP ID се састојао од: а) BBL Crystal GP ID поклопца за панеле, б) BBL Crystal база и в) BBL Crystal ANR, GP, RGP, N/HID епрувета за суспензију грам позитивних бактерија течносту. На поклопцу је било 29 дехидрованих биохемијских и ензимских супстрата. Иначе, база има 30 реакционих поља. Инокулум за испитивање је припреман са течносту за суспензију бактерија и њиме је пуњено свих 30 реакционих поља у бази. У првом реакционом пољу је била негативна контрола флуоресценције (FCT), а преосталих 29 реакционих поља је садржавало следеће супstrate:

4MU-β-D-глукозид (FCG), L-валин-АМС (FVA), L-фенилаланин-АМС (FHP), 4MU-α-D-(FSG) глукозид, L-пироглутаминска киселина -АМС (FPY), L-триптофан-АМС (FAR), 4 MU-N-ацетил-β-D-глюкозамид (FGA), 4MU-фосфат (FHO), 4MU-β-D глукоронид (FGN), L-изолеуцин (FIS), трехалоза (TRE), лактоза (LAC), метил-α и β глукозид (MAB), сахароза (SUC), манитол (MNT), малотриоза (MTT), арабиноза (ARA), глицерол (GLR), фруктоза (FRU), р-п-р-D глукозид (BGL), р-п-р-β-D-целобиозид (PCE), пролин-илеуцин-нитроанилид (PLN), р-п-р-фосфат (PHO), р-п-р-α-D-малтоза (PAM), ONPG и р-п-р-α-D галактозид (PGO), уреа (URE), ескулин (ESC), аргинин (ARG). Засејани панели са испитиваним изолатима лактобацила су стављани на инкубацију при 37 °C 18-24 h после чега је вршено читавање дела реакција голим оком на основу промене боје супстрата, а други део под извором светлости UV лампе (CAMAG, Швајцарска) на таласним дужинама 254 и 366 nm. Читавање резултата је било у оквиру 30 минута после вађења панела из термостата. После уношења резултата означених као позитивни (+) и негативни (÷) у табелу (Прилог 9.6). Идентификација је добијена после уношења у софтверски програм BBL Crystal Identification Systems (BD, SAD).

4.3.2 Испитивање раста изолата лактобацила при различитим температурама

Испитивање раста изолата лактобацила из млека куја је испитано у MRS бујону, у анаеробним условима при 20, 25, 32 и 42 °C (pH 6,2), 37 °C (pH 4,5). Такође, после лиофилизације и складиштења при -20 °C током 15 дана и при -80 °C током 30 дана у присуству 15% глицерола.

4.3.3 Испитивање преживљавања изолата у средини са жучним солима

Испитан је раст лактобацила у анаеробним условима при 37 °C у присуству жучних соли (5%) (ICE S.p.A, Италија) у MRS бујону, а као контрола је коришћена бујонска култура у MRS бујону инкубисана при 37°C (Zhang и сар., 2021).

4.3.4 Испитивање степена преживљавања поступка лиофилизације

Леофилизација или сушење у вакуму уз замрзавање је опште прихваћена дугорочна ефикасна техника очувања биолошких материјала (Zhang и сар., 2021). Састоји се у уклањању воде пре него што ће се замрзнути. У зависности од врсте и природе супстанци, која се леофилизује одређује се поступак и технологија поступка.

4.3.4.1 Поступак леофилизација

Поступак леофилизације је текао кроз 3 фазе:

- 1) **Замрзавање** - Будући да је на почетку култура изолата лактобацила из млека куја била у течном стању неопходно је било да се преведе у чврсто стање пре почетка сублимиције. Производ је замрзаван до температуре, која је испод тачке очвршћавања, а назива се еутектичка температура. Основна функција процеса замрзавања је да одвоји растварач од растворених материја,
- 2) **Примарно сушење** - Фаза када је сва замрзнута вода уклањана из производа сублимицијом. Када је производ у потпуности замрзнут, притисак у комори је смањиван помоћу вакуум пумпе. Полице леофилизатора су загреване да обезбеде довољно енергије за сублимицију. Настале гасне паре су ослобађане из бочице кроз отвор за затварање у околну комору. Водена пара је на крају долазила у кондензаторску комору, при чему су зидови коморе одржавани на ниским температурама поново замрзавајући молекуле воде у кристале леда и заробљавајући воду пре уласка у вакуум пумпу.
- 3) **Секундарно сушење** - Кондензатор је уклањао десорбовану водену пару из производа. Током ове фазе само неколико % воде (до 5%) отпарава, она која је заостала везана у материјалу, а то се постизало даљим повећањем температуре полица леофилизатора (платоа), а тиме и температуре производа и даљим смањењем притиска у комори.

Поступак леофилизације

Напуњене бочице поређане на тацнама за леофилизацију су убациване на полице-платоа леофилизатора (KLEIN Apparatebau 5905 Freudenberg – Niederndorf Baujahr 1979 Fabr.Nr. 12014/ 1 Z-Nr.:12914, Немачака), које су претходно расхлађене на 4°C. Напуњени леофилизатор је херметички затваран, а производ је сушен по прописаном програму леофилизације. Температурне сонде су биле постављене у производ у средишњем делу на сва четири платоа леофилизатора. Када је температура производа на свим полицама

достигла -30°C на тој температури је задржаван програм највише 4 сата. Након тога је следио постепени пораст температуре производа до 37°C . На овој температури је држан производ најмање 7–8 h. После завршеног процеса сушења, лиофилизати су затварани под вакуумом. На крају поступка лиофилизације на гумене затвараче су стављани алуминијумски поклопци и затварани машином за затварање бочица.

Ток лиофилизације:

Почетак лиофилизације је био 22.03.2024. (8:21h)

Завршетак лиофилизације 23.03.2024. (22:16 h)

Време трајања лиофилизације 37 h 55 минута (2.275 минута)

Кондензатор-Температура у току лиофилизације варирала је од -40°C до -80°C у зависности од количине пренете масе (паре која се кондензује) и типа расхладног уређаја. Процес лиофилизације је праћен мерењем температуре производа, кондензатора и платоа, при високом вакууму оствареном у комори лиофилизатора (Прилог 9.8).

Температура кондензатора

У фази замрзавања од почетних 26°C је температура расла до -66°C задржавала се на тој температури око 3,5 h. Потом, у фази примарног сушења опадала је до температуре -43°C , што је нормална појава услед оптерећености апарата и то је тренутак када је кондензатор највише оптерећен, тј. тренутак када се уклањало највише влаге из производа. После тога достигнута је и нижа температура (-68°C), а у завршним сатима лиофилизације температура кондензатора је одржавана на -63°C .

Температура платоа 1 и платоа 2

У фази замрзавања достигана је температура -37°C . На почетку примарне фазе сушења постепено се повећавала температура тј. платои су почињали да се греју, док се температура производа задржавала на нижим температурама. Потом, у секундарној фази сушења температуре производа су се пратиле са температурама платоа. Платои су служили као носачи производа, а уједно је обезбеђиван пренос топлоте потребан за сублимацију. Топлота је преношена кроз платое помоћу медијума за пренос топлоте-силиконско уље, које је најчешће у употреби.

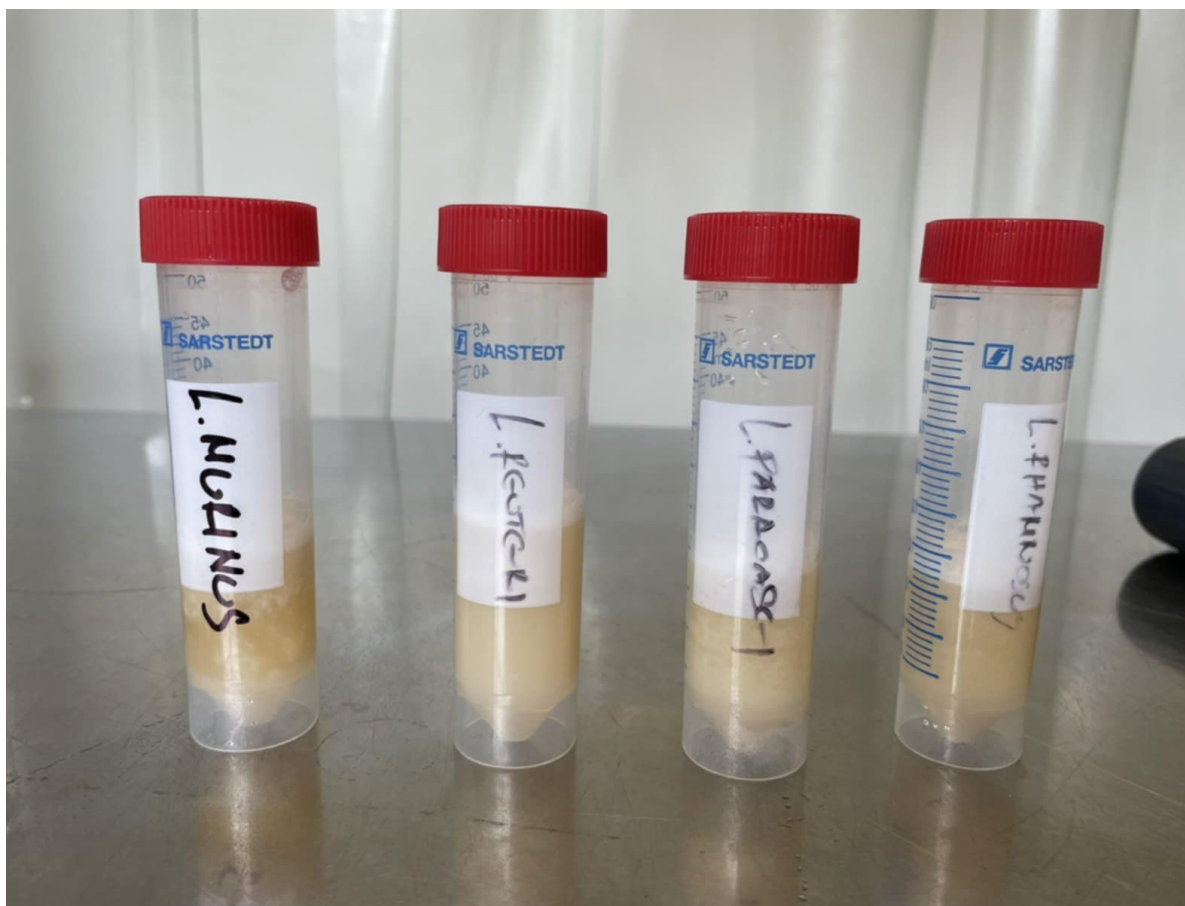
Температура производа 1,2,3,4

Производ се замрзавао до температуре -35°C . Време задржавања на тој температури је приближно 3,5 h. Током овог периода чиста вода се замрзавала, а криопротектори су се концентровани у остатак раствора. Потом, у примарној фази сушења уз постепено повећање температуре уклањана је вода из производа. У току секундарне фазе сушења температура производа је достигала температуру 31°C , 32°C и 33°C .

На слици 4.3.4. приказани су изолати у медијуму за лиофилизацију.

4.3.4.2 Испитивање степена преживљавања процеса лиофилизације

После складиштења лифилизованих култура при температури амбијента (око 20°C) током 2 месеца, бочице са лиофилизатима су реконституисане у 1 mL стерилног физиолошког раствора и засејане у MRS агар и на СВА, који су инкубирани при 37°C 24 h. После инкубације посматрано је да ли има раста карактеристичних колонија на подлози. Као негативна контрола су на инкубацију стављене незасејане подлоге.



Слика 4.3.4. Припрема изолата у медијуму за лиофилизацију

4.3.5 Испитивање антимикробног потенцијала лактобацила у *in vitro* условима

4.3.5.1 Испитивање антимикробног деловања изолата лактобацила из млека куја методом преливања

За испитивање антимикробног потенцијала лактобацила у *in vitro* условима коришћена је метода преливања (Schillinger и Lücke, 1989) тако што су плоче са MRS агаром у који су лактобацили инокулисани у линијама дугачким 2 cm и инкубиране при 37 °C 48 h у анаеробним условима. После инкубације плоче су накнадно преливане са 10 ml полутечне ВНИ подлоге (0,7%) са око 10^4 CFU тест микроорганизама (референтни сојеви *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 13216 и изолати *S. aureus*, који су изоловани из млека куја током испитивања). Плоче засејане тест микроорганизмима су инкубиране при оптималној температури (32-37 °C 48 h), а на основу зоне просветљења (инхибиције), која је >2 mm ће се процењивати процењивано антимикробно деловање.

4.3.5.2 Испитивање изолата лактобацила из млека куја да стварају бактериоцине

Бујонска култура изолата лактобацила после инкубације у MRS бујону при 37 °C 24h је центрифугована на 12 000 обртаја 10 минута при 4 °C и супернатанти су неутралисани са 1 M NaOH до pH 6,2, загрејани при 100 °C 5 минута и стерилисани пропуштањем кроз филтер промера 0,22 µm (GVS, Италија).

Даље испитивање је изведено према Оксфорд Агар дифузионој методи за испитивање бактерицидног деловања супернатанта без бактеријских ћелија: супернатант (100 µL) је наношен у отворе (R=7 mm) на BHI агар претходно засејан са 10⁵ CFU/mL тест микроорганизма (референтни сојеви *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028, *E.coli* ATCC 13216 и изолати *S. aureus*, који су изоловани из млека куја током испитивања). Петријеве плоче су стављане 1 час у фрижидеру при 4 °C како би супернатант могао да дифундује у подлоге, а потом су плоче пребачене у термостат на инкубацију при оптималној температури за раст тест микроорганизма (37 °C 24-48 h) (Martín и сар., 2010).

4.3.6 Статистичка обрада података

У статистичкој анализи добијених резултата као основне статистичке методе коришћени су дескриптивни статистички показатељи (мере централне тенденције, стандардна девијација, аритметичка средина и коефицијент варијације). Даља статистичка анализа се одвијала у зависности од тога да ли су анализирани подаци нормално дистрибуирани или не. Испитивање да ли добијени подаци потпадају под нормалну расподелу је изведено помоћу Колмогоров-Смирнов (Kolmogorov-Smirnov) теста. У случају нормалне дистрибуције података коришћен је Пирсонов коефицијент корелације, а за поређење сигнификантних разлика података параметријска анализа варијансе (one-way analysis of variances). У случају када подаци нису нормално дистрибуирани коришћен је Спирманов коефицијент корелације, а за поређење сигнификантних разлика непараметријска Крускал-Валисова анализа варијансе (Kruskal-Wallis analysis of variance). У случају када су постојале статистички сигнификантне разлике између посматраних изолата даље међусобно поређење је било коришћењем параметријског Такијевог (Tukey) теста, односно непараметријског Дановог (Dunn's Multiple Comparison) теста. Приказивање добијених резултата је табеларно и графички. Статистичка анализа изведеног експеримента је урађена у статистичком пакету Graph Pad Prism верзија 8 за Windows, (Graph Pad Software, San Diego, California, USA) и апликацијом MSExcel.

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1 Одабир куја и узорковање млека

Узорци млека су узети после подоја штенaди у количини до 2 mL код већих раса и до 1,5 mL код мањих раса (до 10 kg ТМ). Пре муже млечна жлезда припремана на следећи начин:

- после благе масаже и прања млечне жлезде водом, као и брисања папирним убрoсом за једнократну употребу, извршена дезинфекција врхова сиса ватом нaтопљеном алкохолом (етанол 70 %).

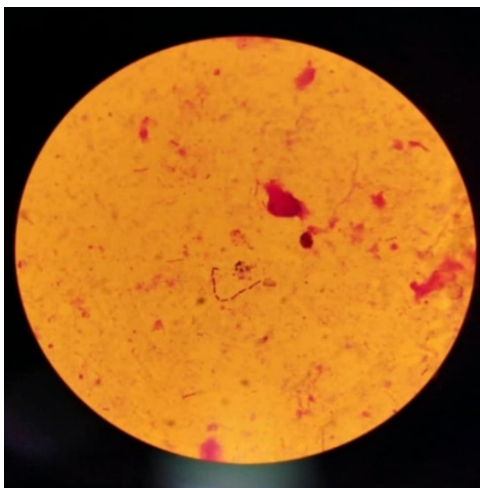
Мужа је обављена у периоду од 15. до 50. дана након штењења. На овај начин штенaд је била у могућности да у првим данима живота посиса колострум и тако добије неопходну заштиту од болести којима могу бити изложени у том периоду. Мужа куја је била после подоја штенaди, како се не би одузимала неопходна количина млека за редован подој. Осим тога, узимање узорaка млека измузањем стимулисало је синтезу млека између подоја штенaди. У случају да нека куја ускрати млеко, давао се хормон окситоцин под кожу, једнократно, који је требао да изазове лучење млека. Детаљнији подаци о кујама, фази лактације, величини легла и сл дати су у прилогу 9.1.

5.2 Изолација бактерија млечне киселине – лактобацила из млека куја

5.2.1 Примарна бактериолошка идентификација

Из 30 узорaка млека изоловане су 4 бактерије, које припадају фамилији *Lactobacillaceae*. Са Колумбија крвног агара изолати су умножени у MRS бујону и пресејани за даља испитивања. Сва четири изолата су били Грам-позитивни штапићи, каталаза негативни.

На слици 5.2.1 је микроскопски препарат изолата лактобацила.



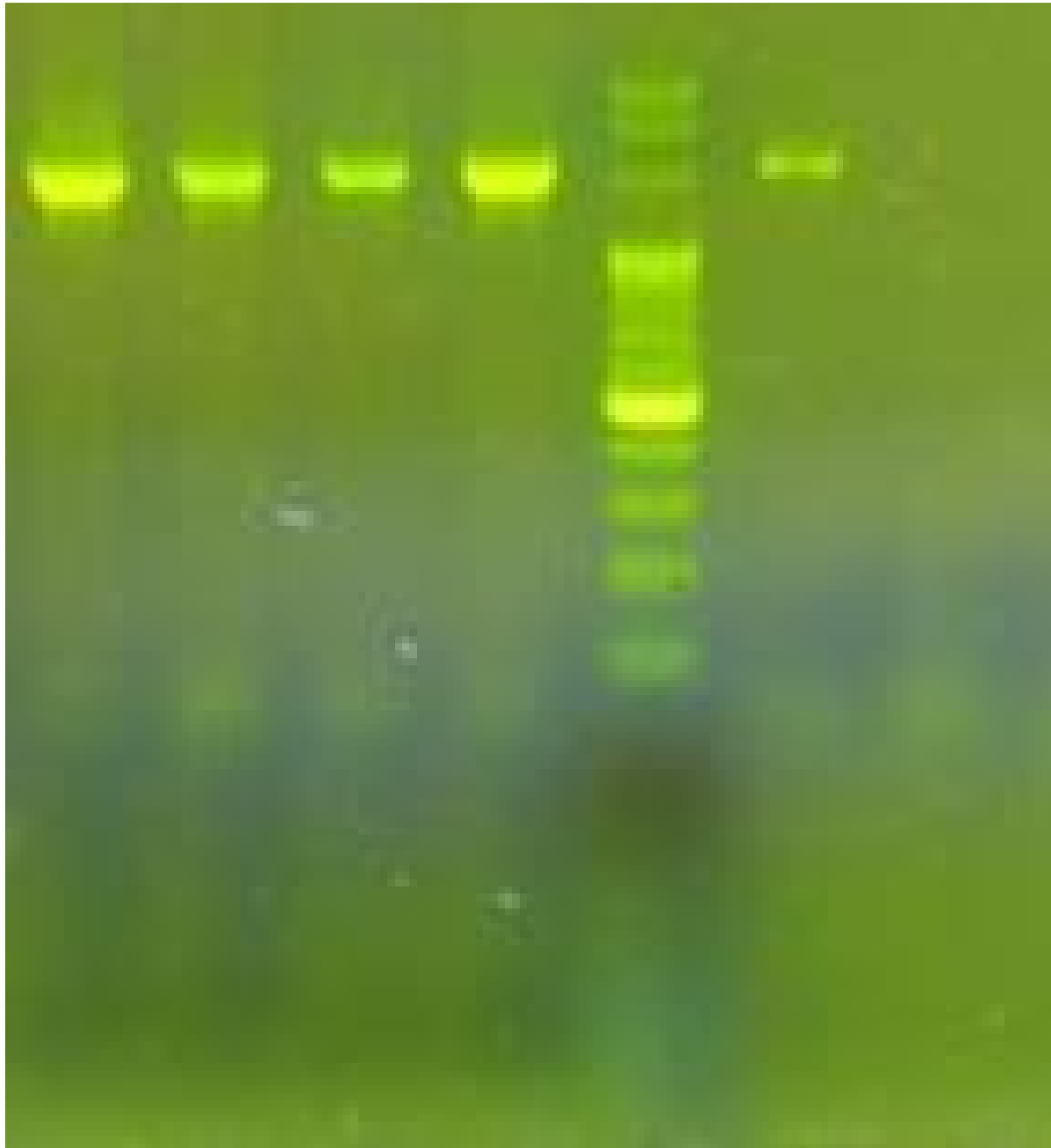
Слика 5.2.1 Лактобацили из млека куја у ланцу на микроскопском препарату

5.2.2 Идентификација методом MALDI-TOF

Идентификација на MALDI-TOF апарату је потврдила примарну идентификацију са високим степеном сигурности, (score >2). Резултати идентификације кроз оригинални машински запис дати су у прилогу 9.4.

5.2.3 Идентификација секвенцирањем гена за 16S RNK

По пријему резултата секвенци утврђен је дефинитивни идентитет изолата: *Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus paracasei* и *Ligilactobacillus murinus*. Секвенце и изглед резултата у NCBI бази дати су прилогу 9.5.



Слика 5.2.3. Изглед агарозног гела након електрофорезе, распоред са лева на десно: 4 узорка за секвенцирање, молекуларни маркер, позитивна и негативна контрола реакције.

5.3 Одређивање броја микроорганизама у млеку куја

У Табелама 5.3.1., 5.3.2., 5.3.3. и 5.3.4. су приказани резултати одређивања броја лактобацила, стафилокока, *Enterobacteriaceae* и укупног броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима млека куја.

Табела 5.3.1. Резултати одређивања броја лактобацила у узорцима млека куја (log CFU/mL)

Врста микроорганизма	Статистички параметар (log CFU/ml)			
	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	CV (%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,59±1,09	1,11	7,23	0,30

Табела 5.3.2. Резултати одређивања броја стафилокока у узорцима млека куја (log CFU/mL)

Врста микроорганизма	Статистички параметар (log CFU/ml)			
	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	CV (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	3,36±1,29	0,00	4,82	0,38

Табела 5.3.3. Резултати одређивања броја *Enterobacteriaceae* у узорцима млека куја (log CFU/mL)

Врста микроорганизма	Статистички параметар (log CFU/ml)			
	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	CV (%)
<i>Enterobacteriaceae</i> spp.	2,25±1,34	0,00	5,69	0,58

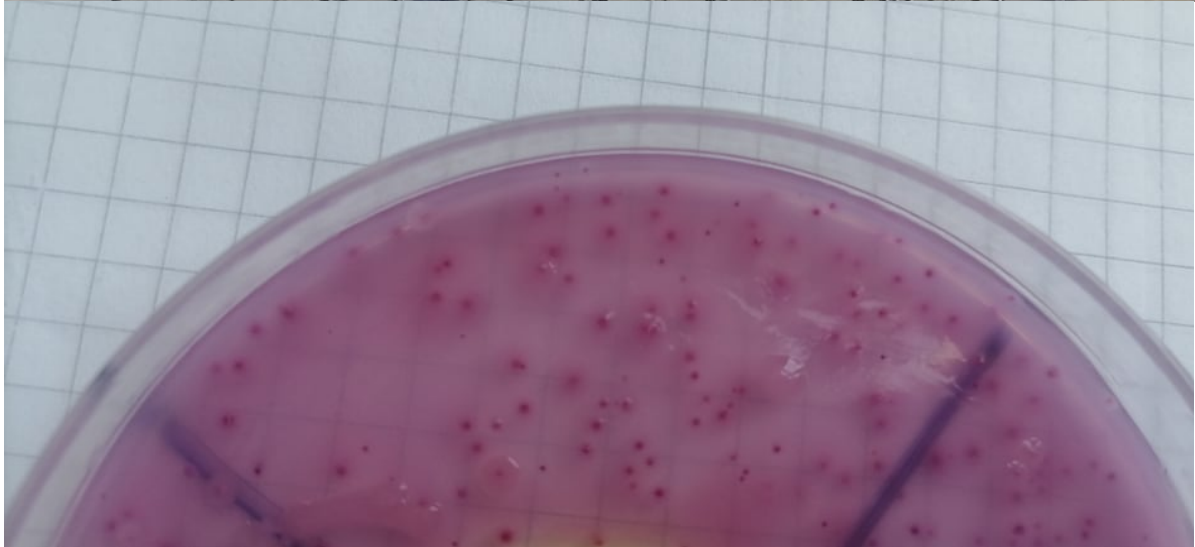
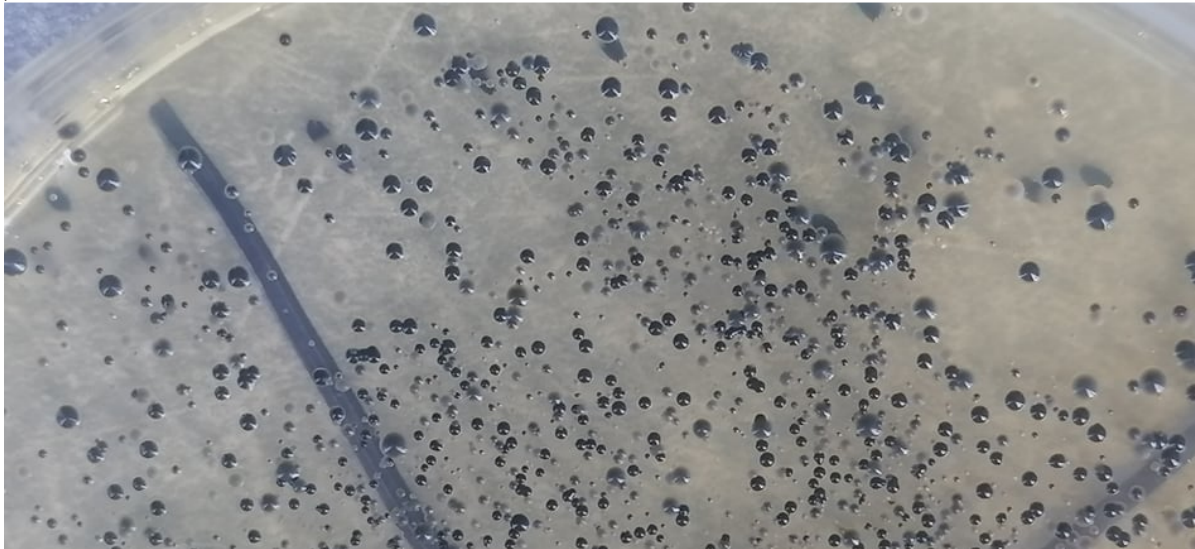
Табела 5.3.4. Резултати одређивања броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима млека куја (log CFU/mL)

Врста микроорганизма	Статистички параметар (log CFU/ml)			
	$\bar{X} \pm SD$	Xmin	Xmax	CV (%)
Укупан број бактерија	3,98±0,79	2,32	5,51	0,19

Детаљнији подаци о броју бактерија дати су у прилогу 9.7.

Изглед колонија на подлогама за бројање бактерја приказан је на слици 5.3. Види се пораст и типичних и нетипичних колонија.

а)



б)

Слика 5.3. Изглед подлога за бројање бактерија а) горе стафилоке на ВР
б) доле *Enterobacteriaceae* на VRBG

5.4 Фенотипска карактеризација изолованих лактобацила

5.4.1 Биохемијске карактеристике

Резултати испитивања биохемијских карактеристика изолата лактобацила из млека куја приказани су у Табели 5.4.1. док је на сликама 5.4.1 а) и б) изглед биохемијских реакција у плочи са базенчићима.

Табела 5.4.1. Резултати испитивања биохемијских реакција изолата лактобацила из млека куја.

СУПСТРАТ	РЕАКЦИЈА	<i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	<i>Ligilactobacillus murinus</i>
4-Метиллумбелиферил β -D-глюкопиранозид	Активност β -глюкозидазе	-	-	-	-
L-валин- ацетил-7-амидо-4-метилкумарин	аминопептидазе	-	$\pm$	$\pm$	-
L-фенилаланин-7-амидо-4-метикумарин	аминопептидазе	+	+	-	+
4-метиллумбилиферил- α -D-глюкоронозид	α -глюкозидаза	-	$\pm$	-	-
L-пироглутаминска киселина 7-амидо-4-метилкумарин	хидролиза	-	-	-	-
L-триптофан 7-амидо-4-метилкумарин	глюкозидазе, фосфатазе или естеразе	+	+	+	+
L-Аргинин 7-амидо-4-метилкумарин	аминопептидазе В катеписин Н	-	+	-	-
4- Метилумбелиферил -N-ацетил- β -D-глюкозонамид	N-ацетил- β -D-глюкозоаминидазе	-	-	-	-
4-Метилумбелиферил-фосфат	Алкалана или кисела фосфатазе	-	+	-	-
4- Метилумбелиферил - β -D-глюкоронид	глюкоронидаза	-	+	-	-
L-изолеуцин-7-Амидо-4-метилкумарин	хидролиза	$\pm$	-	+	-
Трехалоза	ферментација	+	+	+	$\pm$
Лактоза	ферментација	+	-	+	+
Метил- α & β -глюкозид	хидролиза	+	-	$\pm$	+
Сахароза	ферментација	+	+	+	+
Манитол	ферментација	+	-	+	+
Малтотриоза	ферментација	+	-	+	+
Арабиноза	ферментација	+	+	$\pm$	-
Глицерол	ферментација	+	-	+	+
Фруктоза	ферментација	+	-	+	+
p-нитрофенил- β -D-глюкозид	хидролиза	-	-	-	-
p- нитрофенил - β -D-целобиозид	хидролиза	-	+	-	-

Пролин и леуцин-р-нитроанилид	аминопептидазе	±	-	-	-
р-нитрофенил-фосфат	фосфатаза	-	-	-	-
р-нитрофенил- α -D-малтозид	α -малтозидаза	-	+	-	-
ONPG & р-п-р- α -D-галактозид	β -галактозидаза	-	-	-	+
Уреа	уреаза	-	-	-	-
Ескулин	Хидролиза ескулина	+	-	+	+
Аргинин	хидролиза	-	+	-	-

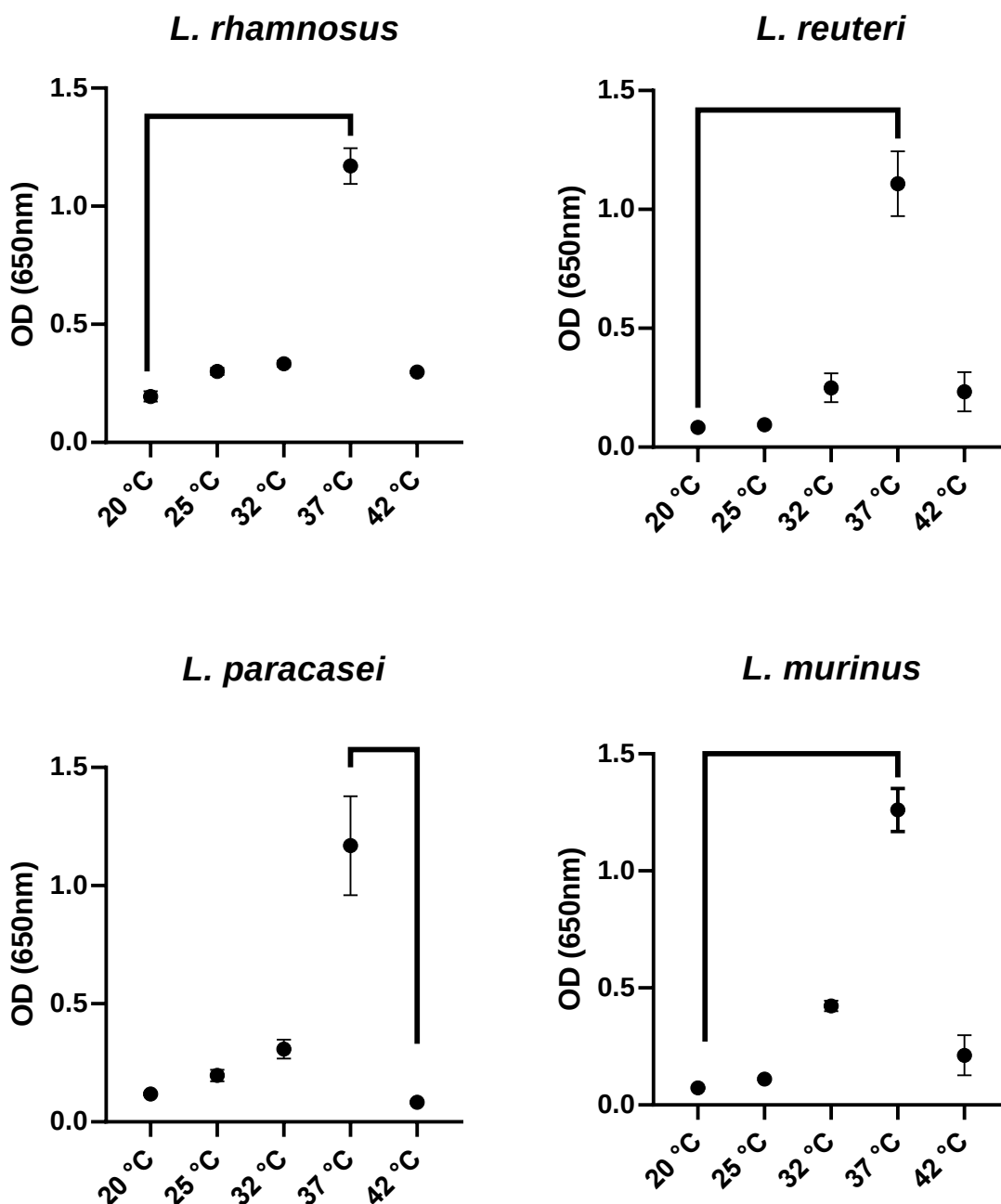


Слика 5.4.1. Резултати читавања испитивања биохемијских реакција у супстратима коришћењем видљиве светлости (лево) и под UV лампом

5.4.2 Испитивање преживљавања изолата лактобацила из млека куја при различитим температурама

Резултати испитивања преживљавања изолата лактобацила пореклом из млека куја при пет различитих температура су приказани у Графикону 5.4.2.

Добијени резултати су показали да је највећи пораст броја сва четири изолата лактобацила био при 37 °C, достижући вредност OD (650) од преко 1,0 код свих изолата. Статистичка разлика у расту сва четири изолата пронађена је: за *L. rhamnosus* између 20 °C и 37 °C ($p=0,0102$); *L. reuteri* између 20 °C и 37 °C ($p=0,0162$); *L. paracasei* између 37 °C и 42 °C ($p=0,0102$) и *L. murinus* између 20 °C и 37 °C ($p=0,0100$). Сви изолати су преживели складиштење на 20 °C током 15 дана и на -71 °C током 30 дана.



Графикон 5.4.2. Раст изолата лактобацила пореклом из млека куја при пет различитих температура ($\bar{X} \pm SD$). Звездица (*) означава статистички значајна разлику ($p < 0,05$).

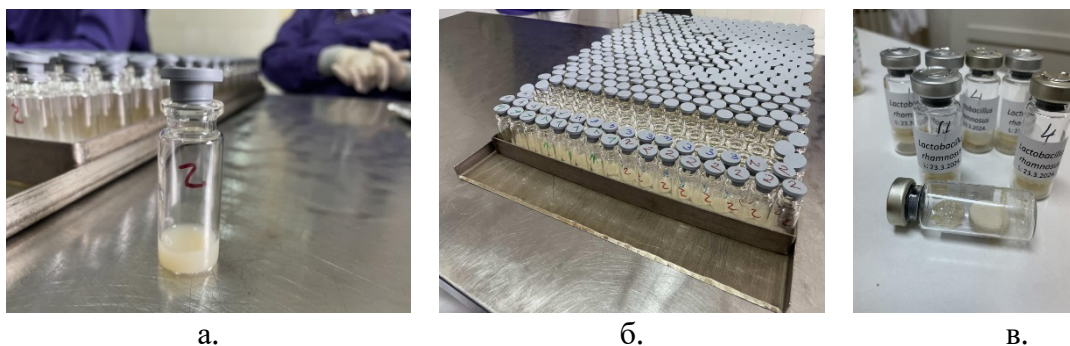
5.4.3 Преживљавање изолата у средини са жучним солима

Раст изолата лактобацила је испитан у MRS бујону, инкубацијау анаеробним условима при 20, 25, 32 и 42 °C (pH 6,2), 37 °C (pH 4,5), у присуству жучних соли (5%), а затим после лиофилизације и складиштења при 20 °C током 15 дана и при 80°C током 30 дана у присуству 15% глицерола. Испитан је раст у анаеробним условима при 37 °C, а као контрола су коришћене бујонске културе у MRS бујону инкубисане при 37 °C. Резултати су показали да су сва 4 изолата из млека куја (*Lactocaseibacillus rhamnosus*,

Limosilactobacillus reuteri, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Ligilactobacillus murinus*) показала раст у присуствз чучних соли.

5.4.4 Испитивање степена преживљавања поступка лиофилизације

Добијени резултати су показали да су сва 4 изолата (*Lacticaseibacillus rhamnosus*, *Limosilactobacillus reuteri*, *Lacticaseibacillus paracasei*, *Ligilactobacillus murinus*) преживела процес лиофилизације и да су после реконституисања у стерилној дестилованој води и засејавања у MRS агар инкубисаном при 37° С 48 h показали раст. На сликама 5.4.4. а,б,в је приказан процес лиофилизације и то изглед бочице пре процеса лиофилизације, непосредно пре стављања у лиофилизатор и после лиофилизације. Графикон тока лиофилизације је дат у Прилогу (9.8).



Слика 5.4.4. Леофилизација изолата лактобацила у апарату (Klein, Немачка)

5.4.5 Резултати испитивања антимикуробног потенцијала изолата у *in vitro* условима

5.4.5.1 Испитивање антимикуробног деловања изолованих лактобацила методом преливања

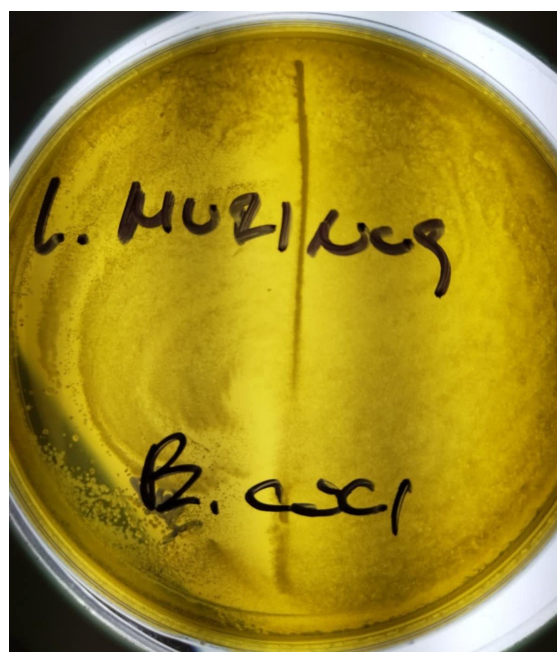
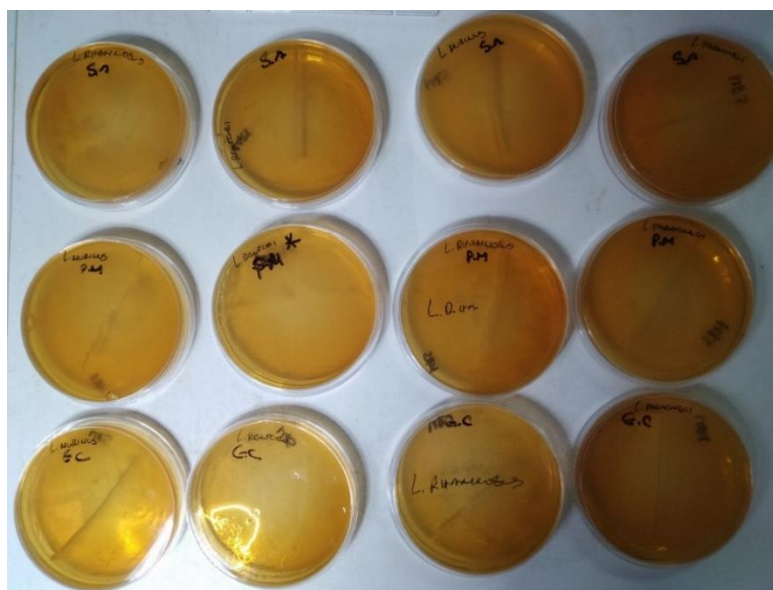
Резултати испитивања антимикуробног деловања изолата лактобацила из млека куја на тест микроорганизме су приказани у Табели 5.4.5.1. Највећи број тест микроорганизама (*S.aureus*, *S. Typhimurium* и *E.coli*) је инхибисао *L. rhamnosus* док *L.murinus* није испољио инхибиторни ефекат према тест микроорганизмима.

Највећу осетљивост од тест микроорганизама је показао *S. aureus* и то према 3 изолата лактобацила (*L. rhamnosus*, *L. reuteri* и *L. paracasei*), док су *E. coli* инхибисала два изолата лактобацила, а *S. Typhimurium* само један изолат. Код других тест микроорганизама нису биле присутне зоне инхибиције.

На слици 5.4.5.1. приказан је изглед теста директне инхибиције раста пред другу инкубацију, као и изглед једне од плоча током читавања.

Табела 5.4.5.1. Резултати одређивања зоне инхибиције раста тест микроорганизама коју стварају изолати лактобацила из млека куја (mm)

	<i>L.rhamnosus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L.paracasei</i>	<i>L. murinus</i>
<i>S. aureus</i>	5	4	4	n.d.
<i>P. mirabilis</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>S. Typhimurium</i>	3	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i>	4	n.d.	3	n.d.
<i>P. aeruginosa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Средње вредности зона директне инхибиције раста n.d. – није доказано, раст тест микроорганизама без инхибиције				



Слика 5.4.5.1. Део огледних плоча са подлогом за испитивање директне инхибиције раста пред инкубирање (горе) и зона инхибиције раста *E. coli* поред засејаног *L. murinus* (доле)

5.4.5.2 Испитивање изолата лактобацила из млека куја да стварају бактериоцине

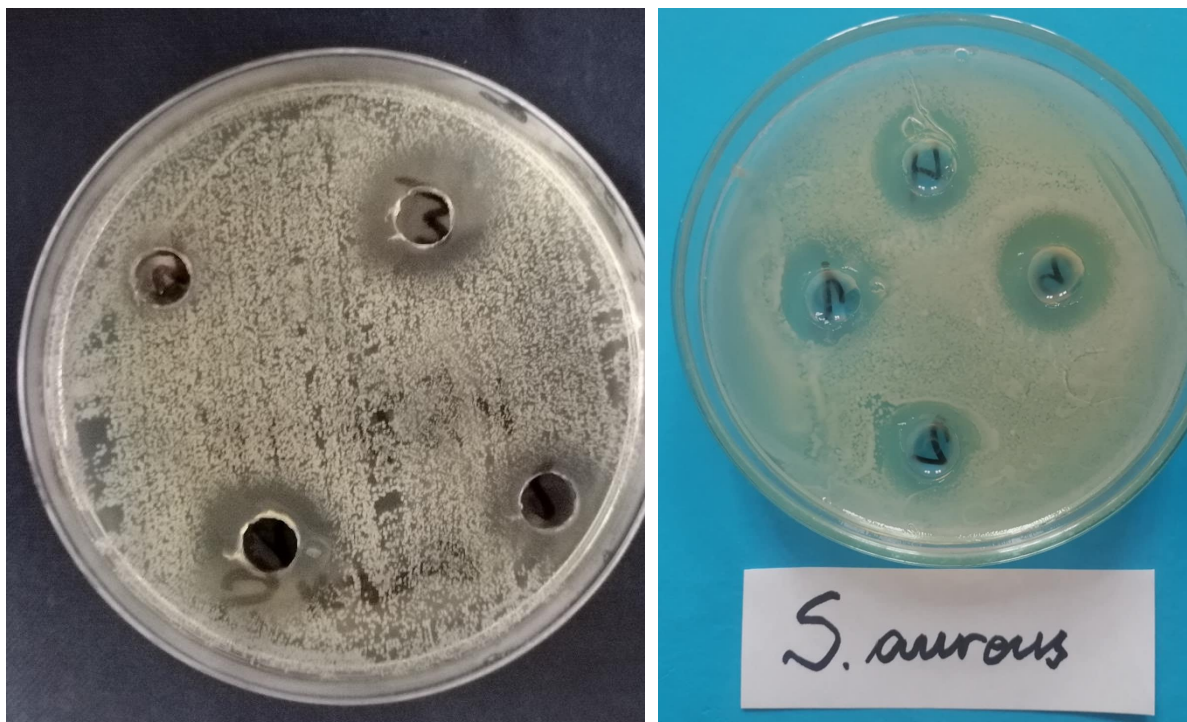
Резлтати испитивања лактобацила из млека куја да стварају бактериоцине су приказани у Табели 5.4.5.2 и на Слици 5.4.5.2 .

Највећи антимикуробни ефекат је испољио *L. rhamnosus* што се огледа у присуству зона инхибиције код свих тест микроорганизама, сем код *P. aeruginosa*, *L. paracasei* је испољио зоне инхибиције код три тест микроорганизама; *L. reuteri* према два и *L. murinus* према једном тест микроорганизму.

Табела 5.4.5. 2. Резултати одређивања зоне инхибиције раста тест микроорганизама коју стварају изолати лактобацила из млека куја

	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. reuteri</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. murinus</i>
<i>S. aureus</i>	18	18	17	/
<i>P. mirabilis</i>	18	17	14	13
<i>S. Typhimurium</i>	16	n.d.	n.d.	n.d.
<i>E. coli</i>	19	n.d.	17	n.d.
<i>P. aeruginosa</i>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Средње вредности зона директне инхибиције раста n.d. – није утврђено, раст тест микроорганизама без инхибиције				

На слици 5.4.5.2. Приказан је изглед теста по Оксфорд методи.



Слика 5.4.5.2. Приказ антимикуробног деловања изолата лактобацила Оксфорд методом према *S. aureus* (репликати).

6. ДИСКУСИЈА

Лактација код женки свих врста је врло важан, а у исто време и осетљив период у току кога може доћи до различитих поремећаја функције, па чак и престанка лучења млека (агалакције) што има последице по легло. Данас је технологија производње формула за млеко, замена и млека у праху на завидном нивоу и могуће је одхранити одојчад и на овај вештачки начин, међутим становиште науке и практичара је да је најбољи начин и пут развоја најмлађих јединки природна исхрана. Такође, треба нагласити да у овом перинаталном периоду присуство патогених бактерија може да изазове и маститисе (запаљење млечне жлезде) код куја дојиља као и различите септикемије изазваних стафилококама код штенaди.

У току истраживања су испитани узорци млека од 30 куја различитих раса, старосне категорије, броја штењења и услова држања и географског локалитета (Прилог 9.1). Један број куја је држан у војној одгајивачници где су категорије паса биле одвојене (приплодне кује, приплодни мужјаци, породилиште са одвојеним делом за штенaд после одбијања од мајки и делом за младе псе. Други мањи број куја је држан у приватној одгајивачници где су пси били подељени на радне и приплодне псе. Преостали део паса су били власнички пси, као јединке у власништву појединаца (Прилог 9.1).

Добијени резултати су показали да изолати лактобацила пореклом из млека куја припадају породици *Lactobacillaceae*, родовима: *Lacticasebacillus*, *Limosilactobacillus* и *Ligilactobacillus*. Иако су сада рекласификоване у три различита рода, све четири врсте су раније историјски припадале истом роду *Lactobacillus* (Hammes и Hertel, 2006). Тренутна таксономска класификација је и даље подложна променама због чињенице да бивши чланови *Lactobacillus* поседују велику разноликост у испољавању својих фенотипских карактеристика у условима природне биолошке разноликости и да тренутне методе класификације коришћењем једног „репрезентативног“ соја по врсти ограничавају ту разноликост (Pot и сар., 2014). Последица оваквог приступа класификације је да се у савременој литератури где су се аутори бавили микробиомом црева паса и штенaди, пробиотским ефектом и у *in vivo* условима своје изолате не идентификују до нивоа врсте већ објављују истраживања са наведеним лабораторијским заводним бројем (Lee и сар., 2025).

Прагматичнији приступ представља Орла-Јенсенова класификација из 1919. године, заснована на карактеристикама производа ферментације, која дели лактобациле на облигатно хомоферментативне, факултативно хетероферментативне и облигатно хетероферментативне (Hammes и Hertel, 2006). Од 4 изолата лактобацила из млека куја *L. reuteri* припада облигатно хетероферментативној групи, док су други факултативно хетероферментативни, што је вероватно повезано са њиховом физиолошком функцијом у гастроинтестиналном тракту паса (Martín и сар., 2010). Последњих година број истраживања и испитивања лактобацила је порастао због чињенице да употреба пробиотика може повољно да утиче на цревну микробиоту у случају њене дисфункције (Zhang и сар., 2021; Peng и сар., 2024). Пробиотско деловање *L. paracasei* је доказано и код промена на кожи (Ohshima-Terada и сар., 2015). Описано је деловање *L. paracasei* у студији на 15 паса са atopијским дерматитисом који су примали преднизолон (синтетички глукокортикоид (ГК) који се користи у лечењу atopијског дерматитиса дуже од 90 дана. Пси су континуирано третиран са *L. paracasei* пореклом из ферментисане хране као пробиотиком и трисахаридом кестозом као пребиотиком, током 90 дана. Симптоми atopијског дерматитиса су процењени коришћењем индекса лезија atopијског дерматитиса код паса (CADLI) и визуелних аналогних резултата пруритуса (PVAS) 30, 60 и 90 дана након примене синбиотика. Такође је процењена укупна употреба

преднизолону током 90 дана пре и после примене. Примена синбиотика значајно је смањила CADLI и PVAS и смањила укупну употребу преднизолону током 90 дана ($p < 0,001$) код 15 паса (Kawano и сар., 2023).

Микробиота млека куја, које доје може да садржи лактобациле који колонизују нативни дигестивни тракт штенаци током сисања (Martín и сар., 2010). Добијени резултати одређивања броја лактобацила у узорцима млека куја су показали да је просечан број лактобацила био $3,59 \log \text{ CFU/mL}$, што је виша вредност од $2,1\text{--}2,8 \log \text{ CFU/mL}$, резултата, које су добили Martín и сар. (2010) и сличне су броју добијеном испитивањем узорака свежег млека пореклом од жене (Perez и сар., 2007).

Наши резултати су потврдили присуство лактобацила у млеку куја, подржавајући налазе да овај биолошки медијум пружа природни и континуирани извор лактобацила за штенаци која сисају (Fernández и сар., 2019). Веће вредности за број лактобацила се могу објаснити неселективности подлоге MRS агара, коју смо користили у експерименту. Иако смо на основу података из литературе (Martín и сар., 2010) у MRS агар додали цистеин није било разлике у селективности и подстицању раста лактобацила у односу на подлогу без додатка ове аминокиселине. Испитивање микроморфолошких особина (бојење по Граму) и макроморфолошких особина (изглед колонија) нису били довољни за разликовање од *Enterococcus* spp., које су расле на MRS агару и које смо методом MALDI-TOF идентификовали као *Enterococcus faecium*. Како MALDI-TOF идентификација зависи од базе која је тренутно у оптицају, примећено је да се користи стара класификација лактобацила што се види из машинског записа у Прилогу 9.4.

Испитивање биохемијских карактеристика лактобацила пореклом из млека куја је показала да су сви изолати осим *L. reuteri* хидролизовали лактозу као примарни млечни шећер и да је само *L. murinus* показао β -галактозидазну активност (Табела 5.4.1). Што се тиче осталих карактеристика ферментације шећера у односу на киселину, најразличитије преференције супстрата показали су *L. rhamnosus* и *L. paracasei* у способности ферментације свих испитаних шећера, док је *L. reuteri* био најзахтевнији, са киселом ферментацијом само трехалозе, сахарозе и арабинозе, откривајући могућности у процесу варења хране ако се користи као пробиотска култура. Иако се данас сматра непрецизним за коначну идентификацију, биохемијска карактеристике свих испитаних изолата лактобацила из млека куја су у складу са карактеристикама сојева, које су описали други аутори (Hammes и Hertel, 2006; Pot и сар., 2014).

Због својих биохемијских карактеристика лактобацили се поред пробиотског дејства, посредно повезују са каријесом зуба, како су то су планктонски, опортунистички микроорганизми који насељавају анаеробне просторе у устима, ферментишу шећере и поспешују пријањање примарне кариогене микрофлоре на површину зуба (Caulfield и сар., 2015). Иако каријес зуба код паса не представља доминантно обољење усне дупеље, лактобацили на зубима паса су показали неке интересанте особине. Зубни плак представља форму биофилма која је сложене организације и остаје стабилна. Неки аутори су такође приметили повећање процента лактобацила пре појаве каријесних лезија. Селективни притисак употребе антимикробних лекова у хуманим и ветеринарским терапијама, као и ширење микроорганизма отпорних на антибиотике, отежали су стицање и ширење гена отпорности. Око 41% изолата лактобацила са зуба паса је отпорно на хлорамфеникол, 58% је отпорно на нитрофурантоин, а 88% је отпорно на тетрациклин, а према цефазолину и цефиксиму (100%) (Nouri Gharajalar, 2018). Осим фенотипске и молекуларна испитивања су потврдила лактобациле изоловане код паса као носиоце гена за резистенцију према антибиотицима тетрациклинима tetM, tetK, β -лактамским антибиотицима cfxA, blaTEM гена (Nouri Gharajalar, 2018).

Резултати других истраживања (Martín и сар., 2010) када је за идентификацију 28 изолата лактобацила коришћен API 50 CH идентификациони систем су показали фенотипску

разноликост чак и код изолата, који су припадали истој врсти. Овакви резултати нису ретки и неубичајени, јер коришћење испитивања ферментационих способности лактобацила може бити веома разнолика унутар саме врсте. У претходној студији, ниједан од 18 тестираних изолата *Lactobacillus crispatus* није имао исти фенотипски образац, 20 изолата *Lactobacillus gasseri* је дало 18 различитих образаца, 20 изолата *Lactobacillus vaginalis* је дало 15 различитих профила и 19 изолата *Lactobacillus jensenii* је дало 11 различитих образаца (Boyd, Antonio и Hillier, 2005). У истој студији, сви изолати *Lactobacillus iners* и три изолата *L. vaginalis* били су нереактивни за све тестове у систему API 50 CH. Такође, коришћење тренутне базе података API 50 CH за идентификацију коменсалних *Lactobacillus* spp. доводи до високе учесталости погрешне идентификације (Nagy и сар., 1991; Klein и сар., 1998); стога је идентификација лактобацила веома ограничена и употреба геномских метода, као што је секвенцирање 16S rRNA, је пожељна (Wilks и сар., 2004).

Примећено је да током упоређивања базе постоје подаци о идентификацији 16S rRNA секвенци и по старој и по новој номенклатури. Истраживачи се морају суочити са тим и зналачки прићи проблему идентификације. Профилисање ферментације угљених хидрата може пружити корисне информације за разликовање сојева лактобацила који припадају истој врсти. Из овог разлога смо у даљој идентификацији применили молекуларне методе (Sikimić и сар., 2025). У овом истраживању је за испитивање биохемијских особина изолата лактобацила коришћен BBL Identification System (BD,SAD). Добијени резултати идентификације су се подударили са резултатима 16S rRNA секвенцирања и методом MALDI-TOF.

Наши резултати испитивања раста лактобацила из млека куја при различитим температурама су показали да је раст свих 4 изолата лактобацила био је најбољи при 37 °C, што их сврстава у мезофилне микроорганизме, што је уједно и температура тела док штенци сисају. Може се претпоставити да су се лактобацили адаптирали за раст при овој температури. Раст је био присутан и при другим испитаним температурама (20 °C, 25 °C, 32 °C и 42 °C), али у мањој мери (Графикон 5.4.2). Статистичка разлика ($p < 0,05$) у расту је пронађена код сва четири изолата лактобацила за температуру 37 °C и једном од других температура, али резултати су добијени у току три понављања у експерименту. Када се експеримент изводи са више понављања, највероватније је да се статистичка разлика појави између 37 °C и свих осталих температура. За *L. rhamnosus* је описан врло широк распон температура раста од испод 15°C до изнад 40°C (Valík и сар., 2013) што је у сагласности са нашим резултатима. Оптимална рН вредност за његов раст је око 6,5 а минимална рН вредност до 3,4. Метаболизам *L. rhamnosus* је факултативно хетероферментативан (лактобацили Групе 2). Он претвара хексозе у L(+) млечну киселину, у складу са Ембден-Мајерхофовим путем; захваљујући алдолази и фосфокетолази, пентозе се такође ферментишу. До 1,5% млечне киселине се обично производи у глукозној подлози. У одсуству глукозе, *L. rhamnosus* производи млечну киселину, сирћетну и мрављу киселину (Valík и сар., 2013). За *Lactobacillus reuteri* је од раније познато да је оптимална температура раста 37 °C и да постоје ситнија одступања у зависности од соја (Burgé и сар., 2015), што је у складу и са резултатима које је испољио изолат из млека куја. Већи ограничавајући фактор у расту *L. reuteri* представља степен закишељавања подлоге, наиме крајњи производи ферментације коју изводе хетероферментативни лактобацили зависе од почетног супстрата, јер хексозе разлажу до лактата и етанола, док пентозе до лактата и ацетата, а како *L. reuteri* нема преференце између метаболичког Ембден-Мејерхоф пута (ЕМП) или фосфокетолазног пута (ПКП) релативно брзо обара рН вредност (Burgé и сар., 2015). Производња млечне киселине је веома битна карактеристика соја у пробиотској улози, али и други аутори саопштавају да извештај број изолата лактобацила не испољава биохемијски афинитет ка формирању

лактата па тако у свом раду Lee и сар (2025) саопштавају да је од 119 сојева, 40 (33,61%) произносило млечну киселину, док 79 (66,39%) није.

Да би изолати лактобацила били кандидати за пробиотице морају да поднесу присуство жучних киселина и осталих дигестивних сокова. Наше испитивање је потврдило преживљавање свих изолата у медијуму са жучним солима. Слично је забележено и у претходним студијама (Рапја и сар., 2023), а предности лактобацила су стабилан нутритивни статус и већа сварљивост, заједно са побољшаним резултатима испитивања фецеса и смањеним амонијаком код паса уз праћење хематолошких индекса, нутритивног статуса, сварљивости, ензимске активности и имунитета паса. Наши резултати, као и резултати наведене групе аутора се слажу у погледу наставка истраживања везана за нове сојеве лактобацила, који би у будућности могли да се користе као пробиотици код паса. Сматра се да је испитивање про и симбиотиске микробиоте паса запостављено у односу на друге животињске врсте (Martín и сар., 2010; Кумаг и сар., 2021), што је додатни хендикеп који се не односи само на лактобациле и бактерије млечне киселине већ и на друге врсте дигестивне микробиоте јер се показало да и *Enterococcus faecalis* и *Enterococcus faecium* боље везују муцин у цревима ако су пореклом од паса, а не од кокошака (Hanifeh и сар., 2021). Поставља се питање да ли ће будућност донети трагање за новим сојевима или инжењеринг приступу на њиховом стварању што је детаљније описано у прегледном раду Yang и сар (2025) који разматрају најновија достигнућа у инжењерингу лактобацила за лечење болести. сумирају лактобациле за изградњу синтетичких пробиотика, примену ових сојева добијених инжењерингом за лечење болести и терапијске исходе. Постоји више различитих инжењеринг стратегија за будући развој генетски модификованих сојева лактобацила са стабилним и безбедним карактеристикама (Yang и сар., 2025).

У току испитивања антимикуробног потенцијала изолата лактобацила пореклом из млека куја добијене зоне инхибиције раста тест микроорганизама директним тестом нису давале много информација. На многим плочама, након преливања топло инокулираних СА и ХА, формирала се замагљеност линије контакта са изолатима лактобацила, што је отежавало процену зоне инхибиције. Следећи проблем је била неравномерна зона инхибиције дуж трака/линија раста изолата лактобацила. Могуће је да су због топлотног стреса изолата лактобацила од недовољно рахлађене инокулисане подлоге СА и ХА резултати били лошији од очекиваних. Сличне потешкоће са директним тестом преливањем су и други аутори истицали (Martín и сар., 2010). Антимикуробни ефекат код *L. rhamnosus* добијен методом преливања може бити резултат утицаја рН медијума (Fernández и сар., 2019), што је касније доказано за више врста бактерија млечне киселине (Zhang и сар., 2021), тако да се ова метода препоручује само за сврхе скрининга изолата, који се испитују.

Тест са бактериоцинима показао се лакшим за извођење и читавање. Бактериоцини су антимикуробни пептиди које стварају бактерије млечне киселине ради конкурентске предности у микробиому или ради самоодржања (Rutter и сар., 2024). Резултати испитивања антимикуробног ефекта стварањем бактериоцина су показали да је *L. rhamnosus* је испољио антимикуробни потенцијал према 4 од 5 тест микроорганизама. Према *P. aeruginosa*, ниједан изолат лактобацила није показао инхибиторни ефекат. Овај микроорганизам спада у Грам-негативне штапиће и структура ћелијског зида доприноси отпорности на антимикуробне матаболите.

Још један Грам-негативан микроорганизам има значаја, јер неки сојеви *E. coli* могу да изазову неонаталну септикемију код штенаца, али је такође широм света позната по ентералним болестима различитих животињских врста, укључујући људе (Peng и сар., 2024). Наши резултати су показали да су само изолати *L. rhamnosus* и *L. paracasei* инхибисали раст *E. coli*. Представник коагулаза позитивних стафилокока *S. aureus* за које

се зна да изазивају озбиљне проблеме у неонаталном периоду паса са значајним морталитетом (Schäfer-Somi и сар., 2003; Meloni и сар., 2014; Nobre Pacifico Pereira и сар., 2022). Раст *S. aureus* су инхибисали изолати *L. rhamnosus*, *L. reuteri* и *L. paracasei*. Најзаступљеније бактерије колострума код вагиналног порођаја куја и рођења штенаца су стафилококе и лактобацили (Каждић и сар., 2021), што указује на значај колонизације црева и односа бактерија у неонаталном периоду.

Бактерије млечне киселине пореклом из млека куја нису довољно истражене (Martín и сар., 2010; Kumar и сар., 2021), а ова празнина је предмет интересовања науке последњих деценија, док је са друге стране очигледно повећање присуства производа са пробиотицима на тржишту за кућне љубимце за 7% (Data Intelligence SKU:VN3245, 2024). Власници кућних љубимаца посвећују све више пажње здрављу својих љубимаца, а употреба пробиотика је ефикасна стратегија за побољшање здравља паса и мачака где примена пробиотика може побољшати равнотежу цревне микробиоте, сузбити упале, побољшати имунолошку функцију и ублажити цревне поремећаје (Yang и Wu, 2023). Прецизнија карактеризација цревне микробиоте паса и мачака у различитим здравственим стањима може олакшати откривање нових пробиотика за употребу код кућних љубимаца. Ова чињеница има своју ветеринарско-медицинску потврду, јер бактерије млечне киселине утичу на смањење појаве дијареја (Fernández и сар., 2019), модулирају имуни одговор у колоструму куја (Alonge и сар., 2020), када се дају кујама, оне побољшавају гастроинтестиналне функције код младунаца (Melandri и сар., 2020) и показују општи имуномодулаторни ефекат код паса (Hayasaka и сар., 2021). У току нашег истраживања добијени су изолати лактобацила чијом карактеризацијом су потврђени као добри кандидати за даљи имуномодулаторни ефекат лактације код куја. Такође, изолат *L. rhamnosus* је показао добро преживљавање у симулираним условима гастроинтестиналног тракта паса (Fernández и сар., 2019).

7. ЗАКЉУЧЦИ

На основу добијених резултата изведени су следећи закључци:

1. Млеко куја може да представља извор лактобацила.
2. Изолација лактобацила је успешнија ако се користи корак обогаћења на специфичној подлози (MRS бујон).
3. Изоловано и успешно је идентификовано 4 изолата бактерија из породице *Lactobacillaceae*:
 - I. *Lacticaseibacillus rhamnosus*
 - II. *Limosilactobacillus reuteri*
 - III. *Lacticaseibacillus paracasei*
 - IV. *Ligilactobacillus murinus*
4. Биохемијска својства изолата на различитим супстратима су разнолика оцртавајући њихову разноврсну улогу у разлагању хранљивих материја унетог obroка при чему се издвајају *L. reuteri* као изолат са најмање и *L. rhamnosus* са највише ферментативних особина према супстратима из групе шећера.
5. Сви изолати лактобацила су показали најбољи раст при температури од 37°C.
6. Сви изолати добро преживљавају излагање жучним солима (5%) што указује на њихову природу да се кроз подој унесу и задрже у цревима штенади.
7. Сви изолати добро подносе режим лиофилизације што указује на могућност комерцијалне производње биолошких препарата.
8. Антимикробна способност изолата је испитана кроз две методе где се као најпотентнији показао *L. rhamnosus* супротно *L. murinus*.
9. Антимикробни потенцијал изолата је обећавајући и позива на даља испитивања у сврху постизања комерцијалне примене у виду пробиотика

8. ЛИТЕРАТУРА

Alonge, S. и cap. (2020) 'Pre- and Probiotics to Increase the Immune Power of Colostrum in Dogs', *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 570414. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.570414>.

Anhalt, J.P. and Fenselau, Catherine. (1975) 'Identification of bacteria using mass spectrometry', *Analytical Chemistry*, 47(2), pp. 219–225. <https://doi.org/10.1021/ac60352a007>.

Bourdichon, F., Laulund, S. and Tenning, P. (2019) 'Inventory of microbial species with a rationale: a comparison of the IDF/EFFCA inventory of microbial food cultures with the EFSA Biohazard Panel qualified presumption of safety', *FEMS Microbiology Letters*, 366(5). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz048>.

Boyd, M.A., Antonio, M.A.D. and Hillier, S.L. (2005) 'Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of *Lactobacillus* Species', *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), pp. 5309–5311. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.5309-5311.2005>.

Burgé, G. и cap. (2015) 'Relationships between the use of Embden Meyerhof pathway (EMP) or Phosphoketolase pathway (PKP) and lactate production capabilities of diverse *Lactobacillus reuteri* strains', *Journal of Microbiology*, 53(10), pp. 702–710. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-5056-x>.

Cain, T.C., Lubman, D.M. and Weber, W.J. (1994) 'Differentiation of bacteria using protein profiles from matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 8(12), pp. 1026–1030. <https://doi.org/10.1002/rcm.1290081224>.

Calderaro, A. and Chezzi, C. (2024) 'MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory', *Microorganisms*, 12(2), p. 322. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020322>.

Caufield, P.W. и cap. (2015) 'Oral *Lactobacilli* and Dental Caries: A Model for Niche Adaptation in Humans', *Journal of Dental Research*, 94(9_suppl), pp. 110S–118S. <https://doi.org/10.1177/0022034515576052>.

Clark, A.E. и cap. (2013) 'Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology', *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), pp. 547–603. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12>.

Clutton-Brock, J. (2016) 'Origins of the dog: The archaeological evidence', in J. Serpell (ed.) *The Domestic Dog: Its Evolution, Behavior and Interactions with People*. 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 7–21. <https://doi.org/10.1017/9781139161800.002>.

Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G. (2012) 'Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology', *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), pp. 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>.

Data Intelligence SKU:VH3245 (2024) *Data Intelligence: Pet probiotics market size, share, industry, forecast and outlook (2023- 2030)*. SKU:VH3245. SKU:VH3245. Hyderabad, India: Data Intelligence, p. 201. <https://www.datamintelligence.com/research-report/pet-probiotics-market> (Accessed: 9 October 2024).

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) и cap. (2018) ‘Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms’, *EFSA Journal*, 16(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) и cap. (2020) ‘Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019)’, *EFSA Journal*, 18(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5966>.

Fatima Sherwani, K. and Ara Abbas Bukhari, D. (2022) ‘Probiotics in Processed Dairy Products and Their Role in Gut Microbiota Health’, in H. El-Sayed (ed.) *Effect of Microbiota on Health and Disease*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.104482>.

Fenselau, C. and Demirev, P.A. (2001) ‘Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry’, *Mass Spectrometry Reviews*, 20(4), pp. 157–171. <https://doi.org/10.1002/mas.10004>.

Fernández, L. и cap. (2019) ‘Characterization of *Lactobacillus rhamnosus* MP01 and *Lactobacillus plantarum* MP02 and Assessment of Their Potential for the Prevention of Gastrointestinal Infections in an Experimental Canine Model’, *Frontiers in Microbiology*, 10, p. 1117. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01117>.

Fuller, R. (1989) ‘Probiotics in man and animals’, 66(5), pp. 365–378.

Galeta, P. и cap. (2021) ‘Morphological evidence for early dog domestication in the European Pleistocene: New evidence from a randomization approach to group differences’, *The Anatomical Record*, 304(1), pp. 42–62. <https://doi.org/10.1002/ar.24500>.

Galibert, F. и cap. (2011) ‘Toward understanding dog evolutionary and domestication history’, *Comptes Rendus. Biologies*, 334(3), pp. 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.011>.

Gänzle, M.G. (2015) ‘Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage’, *Current Opinion in Food Science*, 2, pp. 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>.

Hammes, W.P. and Hertel, C. (2006) ‘The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*’, in M. Dworkin и cap. (eds) *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US, pp. 320–403. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_10.

Hammes, W.P. and Vogel, R.F. (1995) ‘The genus *Lactobacillus*’, in B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (eds) *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Boston, MA: Springer US, pp. 19–54. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5817-0_3.

Hanifeh, M. и cap. (2021) ‘Ex-Vivo Adhesion of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* to the Intestinal Mucosa of Healthy Beagles’, *Animals*, 11(11), p. 3283. <https://doi.org/10.3390/ani11113283>.

Hayasaka, J. и cap. (2021) 'Immunomodulatory effects of Lactobacillus biogenic administration in dogs'. Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University. <https://doi.org/10.14943/jjvr.69.3.175>.

Hill, C. и cap. (2014) 'The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), pp. 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>.

Hillenkamp, F. and Karas, M. (1990) '[12] Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization', in *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 280–295. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)93420-P](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)93420-P).

Holzapfel, W.H. and Wood, B.J.B. (eds) (2014) *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. John Wiley & Sons.

Holzer, P. and Farzi, A. (2014) 'Neuropeptides and the microbiota-gut brain axis.', in *Health and Disease Advances in Experimental Medicine and Biology*. New York: Springer, pp. 195–219.

ISO 4833-1:2013/Amd 1: (2022) 'Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique (ISO 4833-1:2013)'. International Organization for Standardization.

ISO 6887-5: (2020) 'Microbiology of the food chain — Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products'. International Organization for Standardization.

ISO 6888-1:2021/A1: (2023) 'Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Method using Baird-Parker agar - Amendment 1'. International Organization for Standardization.

ISO 15214: (2018) 'Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique at 30 degrees C'. International Organization for Standardization.

ISO 21528-2: (2017) 'Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae — Part 2: Colony-count technique'. Geneva: International Organization for Standardization.

Kajdič, L. и cap. (2021) 'Impact of Type of Parturition on Colostrum Microbiota Composition and Puppy Survival', *Animals*, 11(7), p. 1897. <https://doi.org/10.3390/ani11071897>.

Kassim, A. и cap. (2017) 'Comparison of biomarker based Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) and conventional methods in the identification of clinically relevant bacteria and yeast', *BMC Microbiology*, 17(1), p. 128. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1037-z>.

Kawano, K. и cap. (2023) 'Clinical effects of combined Lactobacillus paracasei and kestose on canine atopic dermatitis', *Polish Journal of Veterinary Sciences*, pp. 131–136. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2023.145014>.

Klein, G. и cap. (1998) 'Peritonitis Associated with Vancomycin-Resistant *Lactobacillus rhamnosus* in a Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patient: Organism Identification, Antibiotic Therapy, and Case Report', *Journal of Clinical Microbiology*, 36(6), pp. 1781–1783. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.6.1781-1783.1998>.

Kumar, S., Pattanaik, A.K. and Jadhav, S.E. (2021) 'Potent health-promoting effects of a synbiotic formulation prepared from *Lactobacillus acidophilus* NCDC15 fermented milk and *Cichorium intybus* root powder in Labrador dogs', *Current Research in Biotechnology*, 3, pp. 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2021.06.001>.

Lee, G.-Y. и cap. (2025) 'Microbiota Analysis and Characterisation of the Novel *Limosilactobacillus* Strains Isolated from Dogs'. <https://doi.org/10.20944/preprints202503.2177.v1>.

Li, D. и cap. (2022) 'MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research', *ACS Measurement Science Au*, 2(5), pp. 385–404. <https://doi.org/10.1021/acsmeasuresciau.2c00019>.

Magnusson, J. and Schnürer, J. (2001) '*Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* Strain Si3 Produces a Broad-Spectrum Proteinaceous Antifungal Compound', *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), pp. 1–5. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.1-5.2001>.

Martín, R. и cap. (2010) 'Identification and evaluation of the probiotic potential of lactobacilli isolated from canine milk', *The Veterinary Journal*, 185(2), pp. 193–198. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.014>.

Melandri, M. и cap. (2020) 'A Biotic Support During Pregnancy to Strengthen the Gastrointestinal Performance in Puppies', *Frontiers in Veterinary Science*, 7, p. 417. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00417>.

Meloni, T., Martino, P.A. and Grieco, V. (2014) 'A survey on bacterial involvement in neonatal mortality in dogs', *Veterinaria Italiana*, (50(4)), pp. 293–299. <https://doi.org/10.12834/VetIt.45.2244.2>.

Nagy, E., Petterson, M. and MÅRdh, P. (1991) 'Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis', *APMIS*, 99(7–12), pp. 739–744. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1991.tb01253.x>.

Nobre Pacifico Pereira, K.H. и cap. (2022) 'Neonatal sepsis in dogs: Incidence, clinical aspects and mortality', *Theriogenology*, 177, pp. 103–115. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.10.015>.

Nouri Gharajalar, S. (2018) 'Molecular characterisation of multidrug resistant *Lactobacillus* isolated from dental plaque of dogs using a multiplex PCR assay', *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(4), pp. 436–444. <https://doi.org/10.15547/bjvm.2000>.

Ohshima-Terada, Y. и cap. (2015) 'Complementary effect of oral administration of *Lactobacillus paracasei* K 71 on canine atopic dermatitis', *Veterinary Dermatology*, 26(5), p. 350. <https://doi.org/10.1111/vde.12224>.

Ouarti, B. и cap. (2020) 'Development of MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lice isolated from farm animals', *Parasite*, 27, p. 28. <https://doi.org/10.1051/parasite/2020026>.

Pallin, A. (2012) *Lactobacilli in the gastrointestinal tract of dog and wolf*. master thesis. Swe.

Panja, K. и cap. (2023) 'Influence of dietary supplementation with new Lactobacillus strains on hematology, serum biochemistry, nutritional status, digestibility, enzyme activities, and immunity in dogs', *Veterinary World*, pp. 834–843. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.834-843>.

Peng, Z. и cap. (2024) 'Chapter 53 – Pathogenic Escherichia coli.', in Y.-W. Tang и cap. (eds) *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)*. Academic Press, pp. 1065–1096.

Perez, P.F. и cap. (2007) 'Bacterial Imprinting of the Neonatal Immune System: Lessons From Maternal Cells?', *Pediatrics*, 119(3), pp. e724–e732. <https://doi.org/10.1542/peds.2006-1649>.

Perri, A.R. и cap. (2021) 'Dog domestication and the dual dispersal of people and dogs into the Americas', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(6), p. e2010083118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010083118>.

Pot, B. и cap. (2014) 'The genus Lactobacillus', in H. Wilhelm H. and B.J.B. wood (eds) *Lactic Acid Bacteria Biodiversity and Taxonomy*. 1st edn. John Wiley&sons.

Qiao, N. и cap. (2022) 'After the storm—Perspectives on the taxonomy of Lactobacillaceae', *JDS Communications*, 3(3), pp. 222–227. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2021-0183>.

Rutter, J.W. и cap. (2024) 'A bacteriocin expression platform for targeting pathogenic bacterial species', *Nature Communications*, 15(1), p. 6332. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50591-8>.

Schäfer-Somi, S. и cap. (2003) 'Bacteriological Status of Canine Milk and Septicaemia in Neonatal Puppies – a Retrospective Study', *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(7), pp. 343–346. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2003.00672.x>.

Schillinger, U. and Lücke, F.-K. (1989) 'Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat', , *Applied and Environmental Microbiology*, 55(8), pp. 1901–1906. <https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989>.

Singhal, N. и cap. (2015) 'MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis', *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791>.

Sikimić, P. et al. (2025) 'Isolation and Characterization of Lactobacilli Isolates From Canine (Canis familiaris) Milk', *Acta Veterinaria*, 75(1), pp. 50–62. <https://doi.org/10.2478/acve-2025-0005>

Tambekar, D.H. and Bhutada, S.A. (2010) 'An evaluation of probiotic potential of Lactobacillus sp. from milk of domestic animals and commercial available probiotic preparations in prevention of enteric bacterial infections.', *Recent Research in Science and Technology*, 2, pp. 82–88.

Tancredi, D. and Cardinali, I. (2023) 'Being a Dog: A Review of the Domestication Process', *Genes*, 14(5), p. 992. <https://doi.org/10.3390/genes14050992>.

Tomusiak-Plebanek, A. и cap. (2022) 'In Vitro assessment of anti-Campylobacter activity of lactobacillus strains isolated from canine rectal swabs', *BMC Veterinary Research*, 18(1), p. 112. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03204-9>.

Valík, L. и cap. (2013) 'Evaluation of temperature effect on growth rate of *Lactobacillus rhamnosus* GG in milk using secondary models', *Chemical Papers*, 67(7). <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0365-1>.

Walter, J. (2008) 'Ecological Role of Lactobacilli in the Gastrointestinal Tract: Implications for Fundamental and Biomedical Research', *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), pp. 4985–4996. <https://doi.org/10.1128/AEM.00753-08>.

Wegh, C.A.M. и cap. (2019) 'Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), p. 4673. <https://doi.org/10.3390/ijms20194673>.

Wilks, M. и cap. (2004) 'Identification and H₂ O₂ Production of Vaginal Lactobacilli from Pregnant Women at High Risk of Preterm Birth and Relation with Outcome', *Journal of Clinical Microbiology*, 42(2), pp. 713–717. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.713-717.2004>.

Yang, Q. and Wu, Z. (2023) 'Gut Probiotics and Health of Dogs and Cats: Benefits, Applications, and Underlying Mechanisms', *Microorganisms*, 11(10), p. 2452. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11102452>.

Yang, Y. и cap. (2025) 'Metabolic engineering of Lactobacilli spp. for disease treatment', *Microbial Cell Factories*, 24(1), p. 53. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02682-4>.

You, I. и cap. (2022) 'Lactobacillus acidophilus novel strain, MJCD175, as a potential probiotic for oral health in dogs', *Frontiers in Veterinary Science*, 9, p. 946890. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.946890>.

Zhang, G. и cap. (2021) 'Evaluation of Probiotic and Antimicrobial Potential of Canine Derived–Lactobacilli'. <https://doi.org/10.20944/preprints202107.0239.v1>.

Zhang, M. и cap. (2022) 'Analysis and Comparison of Nutrition Profiles of Canine Milk with Bovine and Caprine Milk', *Foods*, 11(3), p. 472. <https://doi.org/10.3390/foods11030472>.

Zhang, X. и cap. (2020) 'Probiotic characteristics of Lactobacillus strains isolated from cheese and their antibacterial properties against gastrointestinal tract pathogens', *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(12), pp. 3505–3513. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.022>.

Zheng, J. и cap. (2015) 'A Genomic View of Lactobacilli and Pediococci Demonstrates that Phylogeny Matches Ecology and Physiology', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by J. Björkroth, 81(20), pp. 7233–7243. <https://doi.org/10.1128/AEM.02116-15>.

Zheng, J. и cap. (2020) 'A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), pp. 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>.

9. ПРИЛОЗИ:

Прилог 9.1. Подаци о кујама (раса, старост, паритет, фаза лактације, број штенади и број живих где нису сви преживели, количина млека за испитивање) и подаци о микробиолошком испитивању (Број *Enterobacteriaceae*, број *Staphylococcus* spp., укупан број бактерија)

Ред. бр.	Име / ознака кује раса	Датум рођења кује	Број лактац.	Фаза лактације у моменту узорковања (дан)	Број штенади (укупно/живих)	Напомена
1.	ИЛА немачки овчар	11.11.2015.	5	1.Узорак 23. 2.Узорак 29.	9 / 5	царски рез
2.	БАРСА немачки овчар	18.06.2018.	2	1.Узорак 21. 2.Узорак 27.	7 / 6	
3.	ДИНА лабрадор	01.12.2017.	2	1.Узорак 21. 2.Узорак 27.	8 / 7	
4.	БЕБА истарски краткодлакигонић	14.06.2018.	2	35.	5 / 2	
5.	ГАЗЕЛА истарски краткодлакигонић	01.06.2020.	1	30.	5	
6.	МОНИКА истарски краткодлакигонић	15.04.2020.	1	32.	6 / 4	
7.	ДОНА истарски краткодлакигонић	15.06.2020.	1	33.	5 / 3	примењен окситоцин
8.	ВАНИЈА канарска дога	24.09. 2018.	1	21.	10	
9.	АБРА ротвајлер	01.01. 2017.	2	20.	14	

10.	ВАНИЈА канарска дога узор. 2	24.09. 2018.	1	26.	10	
11.	АБРА риптвајлер узор. 2	01.01. 2017.	2	20.	14	
12.	КАЛИ Бернски планин. пас	07.11. 2018.	1	35.	1	
13.	КАЛА стафордски теријер	10.11. 2018.	2	42.	9	
14.	ЛИНДА чау чау	01.01. 2018.	3	42.	7 / 6	
15.	СПАРТА мопс	01.06. 2019.	1	26.	5	
16.	АИДА доберман	30. 05. 2018.	2	21.	6	царски рез
17.	ЗИТА лагото ромањоло	10.08. 2023.	3	16.	5	
18.	КУБА лагото ромањоло	15. 02.2016.	4	15.	9	
19.	ШИВА немачки овчар	25. 02. 2019.	1	19.	5	
20.	ЏЕНИ немачки овчар	06. 01. 2020.	1	22.	2	
21.	АВА немачки овчар	13. 03. 2019.	2	16.	5	
22.	ХАНА шарпланинац	10. 02. 2018.	1	21.	8	
23.	ЛИНДА пекинезер	05. 04. 2017.	2	19.	2	
24.	БЕБА пудла	16. 03. 2015.	7	24.	4	

25.	ШАРА шарпланинац	18. 05. 2018.	1	17.	8	
26.	БУЛА енглески булдог	08. 03. 2019.	1	18.	4 / 2	
27.	БЕТИ енглески булдог	08. 03. 2019.	1	19.	3 / 2	
28.	АЛФА боксер	14. 03. 2019.	2	19.	8 / 7	
29.	ЈЕВА бостон теријер	10. 12. 2020.	1	33.	5	
30.	ВИЛД бостон теријер	12. 09. 2019.	1	16.	5	

Прилог 9.2. Скен Решења Управе за ветерину Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде



Република Србија
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
-УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ-
Број: 323-07-75/2023-05/2
Датум: 22.03.2023. године
Београд

На основу члана 136. Закона о општем управном поступку ("Службени гласник РС" број 18/2016 и 95/18-аутентично тумачење), члана 34. Закона о добробити животиња ("Службени гласник РС" бр. 41/09) и Решења о овлашћењу министра пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије бр: 119-01-4/36/2022-09 од 28.12.2022. године, решавајући по захтеву који је поднела странка Факултет ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, ул. Булевар ослобођења 18, Београд за измену решења бр. 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године о одобрењу спровођења огледа на животињама, а у поступку промене назива огледа, в.д. директора Управе за ветерину, Доц. др Милош Петровић, доноси:

РЕШЕЊЕ О ИЗМЕНИ РЕШЕЊА

У диспозитиву и образложењу, став 1, решења број: **323-07-75/2023-05**, од **09.01.2023.** године, мења се:

Бришу се речи: "Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов пробиотски потенцијал".

Уписују се речи: "Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов антимикробни потенцијал".

Остали део Решења број: 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године остаје непромењен.

Ово решење је саставни део решења Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде-Управе за ветерину, бр. 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године.

Образложење

Факултет ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, ул. Булевар ослобођења 18, Београд, обратио се овом министарству дана 22.03.2023. године, захтевом за измену решења бр. 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године о одобрењу спровођења огледа на животињама, а у поступку промене назива огледа.

Увидом у достављену документацију као и службену евиденцију утврђено је да је за предметни оглед, под називом "Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов пробиотски потенцијал" издато Решење овог органа, предмет бр. 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године.

Странка је овом органу поднела Закључак Већа научних области, Универзитета о Београду, предмет бр. 61206-656/2-23, од дана 28.02.2023. године, као и мишљење Етичке комисије Факултета ветеринарске медицине, универзитета у Београду, предмет бр. 01-276/2, од дана 16.03.2023. године.

У складу са захтевом, Управа за ветерину је донела решење о измени решења број 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године, које се мења, тако да се у диспозитиву и образложењу, став 1, решења бришу речи: "Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов пробиотски потенцијал" и уписују се речи: "Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов антимикробни потенцијал".

Остали део Решења број: 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године остаје непромењен.

Ово решење је саставни део решења Министарства пољопривреде, шумарства и водопривреде-Управе за ветерину, бр. 323-07-75/2023-05, од 09.01.2023. године.

Упутство о правном средству: Ово решење је коначно у управном поступку. Против овог решења се може покренути управни спор подношењем тужбе Управном суду Србије у року од 30 дана од дана пријема решења.

На основу члана 18., тачка 1. ЗОАТ-а, подносилац пријаве је ослобођен плаћања таксе.

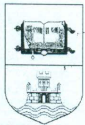
В.д. ДИРЕКТОРА

Доц. др Милош Петровић

Доставити:

1. Факултет ветеринарске медицине, Универзитета у Београду, Булевар ослобођења 18, 11000 Београд
2. Реп. ветеринарска инспекција, Велислава Вуловића 1А/4, 11000 Београд
3. Евиденција,
4. Архива

Прилог 9.3. Скен Мишљења Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња
Факултета ветеринарске медицине

	УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ ЕТИЧКА КОМИСИЈА ЗА ЗАШТИТУ ДОБРОБИТИ ОГЛЕДНИХ ЖИВОТИЊА Булевар ослобођења 18; 11000 Београд, Република Србија Тел: (+381 11) 3615 436; Факс: (+381 11) 2685 936, 2685 894 поштански факс: 370 www.vet.bg.ac.rs; E-mail: sekretar@vet.bg.ac.rs	
---	---	---


Бр. 01-1112
Датум 22. 12. 2022 год.
Београд

На основу члана 33. и 34. Закона о добробити животиња (Сл. Гласник РС бр. 41/09), Правилника о условима за упис у регистар за огледе на животињама и садржини и начину вођења тог регистра, програму обуке о добробити огледних животиња, обрасцу захтева за одобрење спровођења огледа на животињама, начину неге, поступања и лишавања живота огледних животиња, као и о садржини и начину вођења евиденције о држању, репродукцији, промету, односно спровођењу огледа на животињама (Сл. Гласник РС бр. 39/10), а на захтев проф. др Радославе Савић Радовановић од 01.12.2022. године, Етичка комисија на седници одржаној 19.12.2022. године донела је:

МИШЉЕЊЕ 06-12/2022

да планирани огледа Проф, др Радославе Савић Радовановић под називом: „**Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов пробиотски потенцијал.**“ има стичку оправданост спровођења огледа.

Напомена:
Категорија инвазивности: Б
Категорија истраживања: Е

Београд, 22.10.2022.

Председник Етичке комисије


Проф. др Мирјана Миловановић

Доставити:

- Управи за ветерину - Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде РС.

Прилог 9.4. Скен оригинално штампаних резултата идентификације изолата лактобацила из млека куја методом MALDI-TOF

Bruker MALDI Biotyper Identification Results



Run Info:

Run Identifier: 240422-1122-101
Comment:
Operator: flex-user@I102LAB04
Run Creation Date/Time: 2024-04-22T11:28:39.474
Number of Tests: 12
Type: Standard
BTS-QC: not present
BTS-QC Position:
Instrument ID: 269944.01833
Server Version: 4.1.100 (PYTH) 174 2019-06-158_01-16-09

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
B9 (+++)(A)	Lb A1 Par (Standard)	Lactobacillus paracasei	2.22	Lactobacillus paracasei	2.20
B10 (+++)(A)	Lb A2 Par (Standard)	Lactobacillus paracasei	2.22	Lactobacillus paracasei	2.21
B11 (+++)(A)	Lb D1 Par (Standard)	Lactobacillus paracasei	2.27	Lactobacillus paracasei	2.20
B12 (+++)(A)	Lb B1 Reu (Standard)	Lactobacillus reuteri	2.28	Lactobacillus reuteri	2.27
C1 (+++)(A)	Lb B2 Reu (Standard)	Lactobacillus reuteri	2.11	Lactobacillus reuteri	2.08
C2 (+++)(A)	Lb B3 Reu (Standard)	Lactobacillus reuteri	2.13	Lactobacillus reuteri	2.07
C3 (+++)(A)	Lb C1 Rha (Standard)	Lactobacillus rhamnosus	2.19	Lactobacillus rhamnosus	2.17

Result overview table--continued on next page

Result overview table--continued from previous page					
Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
<u>C4</u> (+++)(A)	Lb C2 Rha (Standard)	Lactobacillus rhamnosus	<u>2.46</u>	Lactobacillus rhamnosus	<u>2.43</u>
<u>C5</u> (+++)(A)	Lb C3 Rha (Standard)	Lactobacillus rhamnosus	<u>2.44</u>	Lactobacillus rhamnosus	<u>2.42</u>
<u>C6</u> (+++)(A)	Lb D1 Mur (Standard)	Lactobacillus murinus	<u>2.17</u>	Lactobacillus murinus	<u>2.11</u>
<u>C7</u> (+++)(A)	Lb D2 Mur (Standard)	Lactobacillus murinus	<u>2.15</u>	Lactobacillus murinus	<u>2.15</u>
<u>C8</u> (+++)(A)	Lb D3 Mur (Standard)	Lactobacillus murinus	<u>2.24</u>	Lactobacillus murinus	<u>2.13</u>

Прилог 9.5. Секвенце гена за 16S RNK и њихова идентификација у *National Institutes of Health* (NIH) бази секвенци за сва четири изолата означених као L1-L4.

L1_16S

GACAATTTTGTTCACCTTAGACGGCTCGCTCCCTAAAGGGTTACGCCACCGGCTTCGGGTGTT
 ACAAACCTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGGCGT
 GCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAA
 CTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCATCCAT
 TGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCGATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCC
 TCCGGTTTGTCAACGGCAGTCTTACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAAG
 GGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCA
 CCACCTGTCATTTTGGCCCCGAAGGGGAAACCTGATCTCTCAGGTGATCAAAGATGTCAAG
 ACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCC
 CCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCGTAATCCCAGGCGGAATGCTTAATGCG
 TTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCTCCAACACCTAGCATTTCATCGTTTACGGCATGG
 ACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAGA
 CCAGACAGCCGCTTCGCCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACAT
 GGAGTTCCACTGTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCAGTTTCCGATGCACTTCTCGGTTAA
 GCCGAGGGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCC
 GGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCT
 GGTTGGATAACGTCACGCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACAACAGAGT
 TTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGT
 GGAAGATTCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTGGGCCGGGTTTCAGTCCCATGGGGGCGAT
 CAACCTCCCAGTCGGCTACGATCATTGCCTGGGGGAGCCGTTACCTCCCAACTAGCTAAAAC
 CCCGGGGTCAATCCAAAACGAAAATTTACCCCTTTTTTCCCCAAAACCCGGGGGTTTTGGATT
 TTGGGGGTATAACCTTTTTTCCCAAGGTTTCCCCCTAGGGGGTCCCCGGTTCCCCCCCCC
 CCCCTTCAAAAAATAAAAAAACCTTTTAAAAAACCTTTTGTTTTGGCCCCCCCCCCCCC
 CCCGAAAACAAAAAAAAGGGGGGGGGGGGGGGGTACTTCGTCATCAACTTAATCATCCATT
 CTTTCCTAG

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 2890 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2231	2231	88%	0.0	96.74%	1474	MT611852.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 2770 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2231	2231	88%	0.0	96.74%	1475	MT611778.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 6592 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2231	2231	88%	0.0	96.74%	1473	MT463836.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 6356 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2231	2231	89%	0.0	96.67%	1475	MT463765.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain IGM2-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2231	2231	88%	0.0	96.74%	1476	MT197216.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain LNS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2231	2231	86%	0.0	97.56%	1385	MF185312.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 2949 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2230	2230	89%	0.0	96.67%	1472	MT611888.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 2948 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2230	2230	88%	0.0	96.74%	1476	MT611887.1
☒	Lactocaseibacillus rhamnosus strain 5513 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus rhamnosus	2230	2230	88%	0.0	96.74%	1479	MT510304.1

L2_16S

GGCCATCTGTCGCTTACGCGGCTCCTCCATAAAGGTTAGGCCACCGACTTTGGGCGTTACAA
 ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTG
 ATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGAAGTGA
 GAACGGCTTTAAGAGATTAGCTTACTCTCGCGAGCTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTA
 GCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATCTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCG
 GTTTGTACACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAGTAACAAGGGTT
 GCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCAC
 CTGTCAATTGCGTCCCCGAAGGGAACGCCTTATCTCTAAGGTTAGCGCAAGATGTCAAGACCT
 GGTAAGGTTCTTCGCGTAGCTTCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCG
 TCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTGACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAG
 CTCCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCATGGACTA
 CCAGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTGCAGACCAG
 ACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTCCACCGCTACACATGGAG
 TTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTCGCCCAGTTTCCGATGCACTTCTTCGGTTAAGCCG
 AAGGCTTTTCACATCAGACCTAAGCAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGAT
 AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGACTTTCTGTT
 GGATACCGTCACTGCGTGAACAGTTACTCTCACGCACGTTCTTCTCCAACAACAGAGCTTTA
 CGAGCCGAAACCCTTCTTCACTCACGCGGTGTTGCTCCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGGAA
 GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTATGGACCGTGTCTCAGTTCCATTGTGGCCGATC
 AGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATCGCCTTGGGAAACCGTTACCTTACCAACTAGCTAAG
 GCACCGCAGGGCCTTCCCCAAAGGGAAGCCAAGCCCTCTTTTAAACAAAACCAGGGGGTTTT
 TGTGTTTGGGATAAGACCTGTTTCAAAAGTTCCCCCCCCCGGGGGGGATCTACGGGTTTCCC
 CCGCCCCCCCCCGGGAACCCCCCAAGGGGGCCCCCACATGGGGGCGGGGGAAATTTG
 TTAGCCCCCGCCCCCCCCCTCGCCACGCAAAATAAAATAAAGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
 GGGCGCATACAATCCACGCTCGGCC

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Lactobacillus reuteri strain LPB0165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacill...	2309	2309	88%	0.0	97.57%	1435	MG324357.1
☒	Lactobacillus reuteri strain 6984 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacill...	2307	2307	88%	0.0	97.57%	1486	MT464031.1
☒	Limosilactobacillus reuteri strain 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacill...	2307	2307	88%	0.0	97.63%	1470	OM763681.1
☒	Lactobacillus reuteri strain LQ2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacill...	2307	2307	88%	0.0	97.57%	1485	KC348394.1
☒	Lactobacillus reuteri strain 3525 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Limosilactobacill...	2305	2305	88%	0.0	97.63%	1478	MT538422.1

L3_16S

ACAAATCTGGTCACCTTAGACGGCTCGCTCCCTAAAAGGGTTACGCCACCGGCTTCGGGTGT
TACAAACTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCG
TGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAGTCCGA
ACTGAGAATGGCTTTAAGAGATTAGCTTGACCTCGCGGTCTCGCAACTCGTTGTACCATCCA
TTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCGGTTTGTACACCGGCAGTCTTACTAGAGTGCCCAACTAAATGCTGGCAACTAGTCATAA
GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC
ACCACCTGTCATTTTGGCCCCGAAGGGGAAACCTGATCTCTCAGGTGATCAAAAGATGTCAA
GACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACACCATGCTCCACCGCTTGTGCGGGC
CCCCGTCAATTCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTGACTCCCCAGGCGGAATGCTTAATGC
GTTAGCTGCGGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACCTAGCATTTCATCGTTTACGGCATG
GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTACCCATGCTTTCGAGCCTCAGCGTCAGTTACAG
ACCAGACAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACA
TGGAGTTCCACTGTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCGATGCGCTTCCTCGGTTA
AGCCGAGGGCTTTACATCAGACTTAAAAAACCGCCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATC
CGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC
TGGTTGGATACCGTCACGCCGACAACAGTTACTCTGCCGACCATTCTTCTCCAACAACAGAG
TTTTACGACCCGAAAGCCTTCTTCACTACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTG
TGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGGGTCTCAGTCCCAAGGTGGC
CGATCAACCTCTCAGTTGCGCTACGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTACCTCCCCAACTAAC
TAAAAACCCGCGGGTCTCCAAAAGGAAAGTTTACGCCTCTTCCCCCAGAAAAATGGGGGT
TTTGAATTTGGGGGTAACTCTGTTTTCAATGGTTCCCCCCTTAGGGAGGGGTCCCCGGT
TTCCCCCGCCGCCCTTCTTCTTGTTAAATTTGGGGGGAACCCCATAAAAAATACTTT
TAATTGTTTTTTAGGCCCGCGCCTCCTCTTCTCCCGGGAAGAATATAATAAAAAAGGGAGG
GGGGGGGGGGGGGGGGGTACGAAACGCGTAATATGATACACTCAGGTGGTTCCGGGCCCACAC
CAACACTGAACTG

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Lactobacillus paracasei strain 3154 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus paracasei	2298	2298	86%	0.0	97.22%	1476	MT613527.1
☒	Lactobacillus paracasei strain 4885 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus paracasei	2298	2298	86%	0.0	97.35%	1477	MT505628.1
☒	Lactobacillus paracasei strain 6565 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus paracasei	2298	2298	86%	0.0	97.35%	1476	MT463809.1
☒	Lactobacillus paracasei strain 6561 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus paracasei	2298	2298	86%	0.0	97.35%	1478	MT463805.1
☒	Lactocaseibacillus paracasei strain a1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactocaseibacillus paracasei	2298	2298	85%	0.0	97.42%	1504	MZ836482.1

L4_16S

TACTTCGGTCACTTAGACGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCACCGGCTTTGGGTGTTACAAA
 CTCTCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGA
 TCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGA
 AACGGCTTTAAGAGATTTGCTAAACCTCGCGGTCTTGCGACTCGTTGTACCGTCCATTGTAG
 CACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGG
 TTTGTACCCGGCAGTCTTGCTAGAGTGCCCAACTTAATGCTGGCAACTAACATAAGGGTTG
 CGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACC
 TGTCATTCTGTCCCCGAAGGGAAAGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAAGATGTCAAGACCTG
 GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGT
 CAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCTACTCCCCAGGCGGAATGCTTATTGCGTTAGC
 TGCAGCACTGAAGGGCGGAAACCCTCCAACACTTAGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTAC
 CAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACCCACGCTTTCGAACCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGA
 GAGCCGCTTTGCGCACTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAGT
 TCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTCTCCAGTTTCCAATGCACTACTCCGGTTAAGCCGA
 AGGCTTTCACATCAGACTTAAAAGACCGCCTGCGTTCCCTTTACGCCCAATAAATCCGGATA
 ACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTA
 GATACCGTCGAAACGTGAACAGTTACTCTCACGCACTTTCTTCTCTAACAACAGGGTTTTAC
 GATCCGAAGACCTTCTTCACCCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAG
 ATTCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAATTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCATGGGGCCGATCAAC
 CTCTCAGTTCGGCTACCCATCATTGCCTTGGTAAGCCTTTCCTCCCAACTAGCTAAGGGCCG
 GGGGCCATCCAAAACGGTAGCAAACCACCTTTTAAATGTACCAGGGGGAACCTTGGTTTG

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Ligilactobacillus sp. strain 0900LM100037 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus...	2239	2239	99%	0.0	99.12%	1448	OQ874136.1
✓	Lactobacillus animalis strain 8872 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus...	2233	2233	99%	0.0	99.12%	1464	MT538857.1
✓	Ligilactobacillus animalis strain P38 chromosome, complete genome	Ligilactobacillus...	2233	13385	99%	0.0	99.12%	1906794	CP047141.1
✓	Ligilactobacillus animalis strain LL1 chromosome, complete genome	Ligilactobacillus...	2233	13402	99%	0.0	99.12%	2280577	CP039849.1
✓	Lactobacillaceae bacterium strain AGP1-07-35-08 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lactobacillaceae...	2233	2233	99%	0.0	99.12%	1524	MH699306.1
✓	Ligilactobacillus murinus strain KD6 chromosome, complete genome	Ligilactobacillus...	2233	13402	99%	0.0	99.12%	2276675	CP137688.1
✓	Ligilactobacillus animalis strain SRM217975 chromosome, complete genome	Ligilactobacillus...	2233	13363	99%	0.0	99.12%	1868883	CP129340.1
✓	Ligilactobacillus animalis strain SRM217969 chromosome, complete genome	Ligilactobacillus...	2233	13369	99%	0.0	99.12%	1882179	CP129339.1
✓	Ligilactobacillus animalis strain ZSB1 chromosome, complete genome	Ligilactobacillus...	2233	13402	99%	0.0	99.12%	1897301	CP123751.1
✓	Ligilactobacillus sp. strain 0900LM100038 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Ligilactobacillus...	2233	2233	99%	0.0	99.12%	1451	OQ874137.1

Прилог 9.6. Слика табеле за читавање реакција испитивања биохемијских карактеристика изолата лактобацила из млека помоћу BBL Crystal Identification Systems (BD, SAD) листова.

Gram-Positive ID System / BD BBLCRYSTAL GP 同定検査用紙

Reference # / 参照番号 / Références / Probes No. / N. campione / Número proba / Nº da amostra / Cúlas vzorky / N° de muestra / Provenienza

Source / Site / 検体採取部位 / Zone de prélèvement / Probe Entnahmestelle / Provenienza campione / Zdroj probky / Origen da amostra / Zdroj vzorky / Fuente de la muestra / Provenienza

LOT ロット

4 3 2 1

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	FCT	FPH	FTR	FHO	TRE	SUC	ARA	BGL	PHO	URE
2	FGC	FGS	FAR	FGN	LAC	MNT	GLR	PCE	PAM	ESC
1	FVA	FPY	FGA	FIS	MAB	MTT	FRU	PLN	PGO	ARG

+ Bacilli

+ Cocci

Organism ID / 細菌同定結果 / Organisme-ID / Organismide ID /

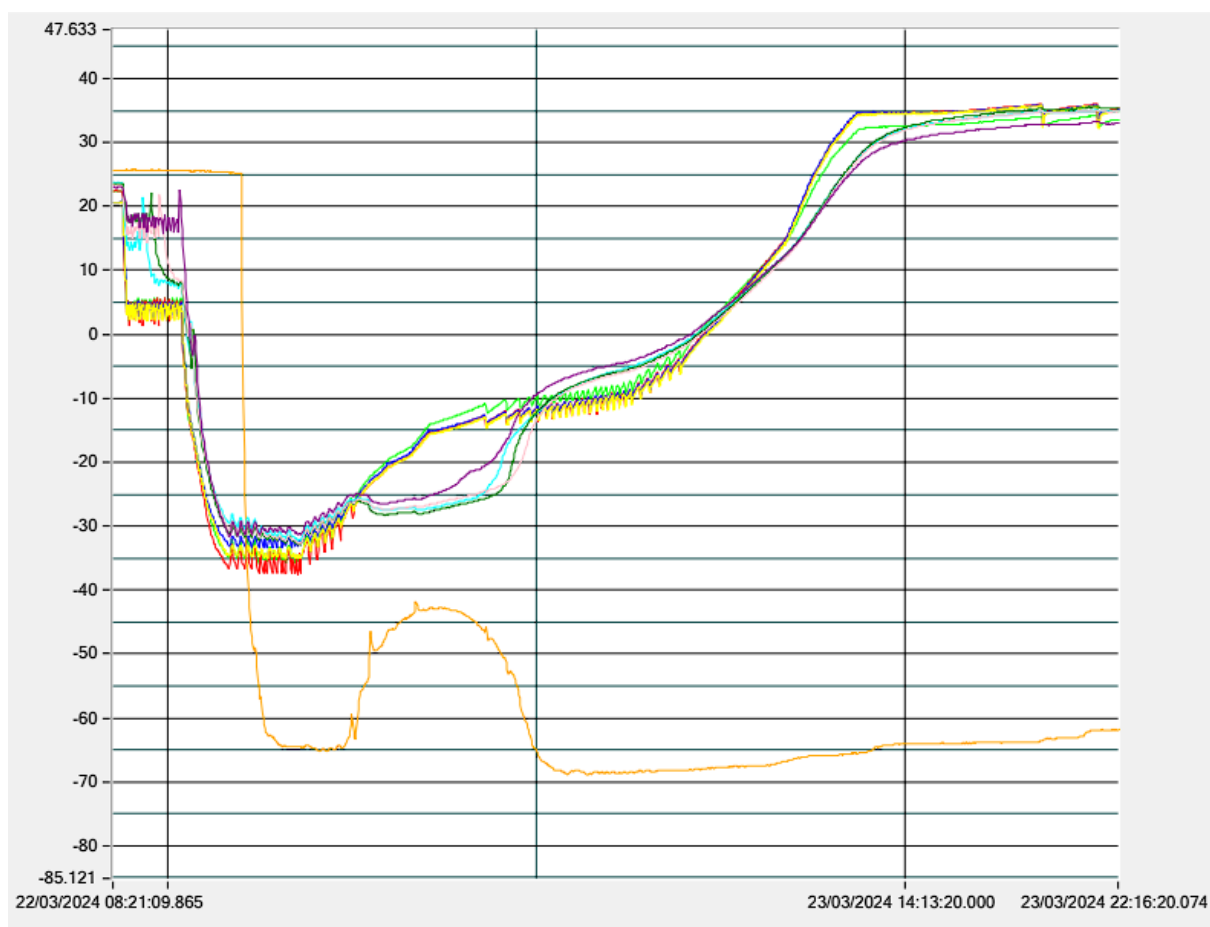
Прилог 9.7. Подаци о кујама (раса, старост, паритет, фаза лактације, број штенaди и број живих где нису сви преживели, количина млека за испитивање) и подаци о микробиолошком испитивању (Број *Enterobacteriaceae*, број *Staphylococcus* spp., укупан број бактерија)

Ред. бр.	Име / ознака кује раса	Број <i>Enterobacteriaceae</i> : (log CFU/ml)	Број <i>Staphylococcus</i> spp.: (log CFU/ml)	Укупан број бактерија; (log CFU/ml)	Напомена
1.	ИЛА немачки овчар	2.954	3.428	4.380	царски рез
2.	БАРСА немачки овчар	2.000	3.964	4.049	
3.	ДИНА лабрадор	3.342	4.825	5.068	
4.	БЕБА истарски краткодлакигонич	3.086	4.556	5.114	
5.	ГАЗЕЛА истарски краткодлакигонич	3.380	4.716	5.512	
6.	МОНИКА истарски краткодлакигонич	3.380	3.792	5.290	
7.	ДОНА истарски краткодлакигонич	1.699	4.255	3.462	примењен окситоцин
8.	ВАНИЈА канарио	1.845	4.505	4.380	
9.	АБРА рптвајлер	2.041	4.602	4.505	

10.	ВАНИЈА канарио узор. 2	1.477	3.866	4.041	
11.	АБРА рптвајлер узор. 2	3.029	3.670	4.358	
12.	КАЛИ Бернски планин. пас	3.863	4.179	4.161	
13.	КАЛА стафордски теријер	1.602	3.541	4.241	
14.	ЛИНДА чау чау	4.471	4.204	4.556	
15.	СПАРТА мопс	2.259	3.528	3.792	
16.	АИДА доберман	3.146	4.566	4.513	царски рез
17.	ЗИТА лагото ромањоло	1.010	4.365	4.000	
18.	КУБА лагото ромањоло	0.000	3.079	3.041	
19.	ШИВА немачки овчар	0.000	4.055	4.350	
20.	ЏЕНИ немачки овчар	0.000	3.553	4.350	
21.	АВА немачки овчар	5.699	3.369	3.365	
22.	ХАНА шарпланинац	3.342	1.869	3.477	
23.	ЛИНДА пекинезер	1.928	2.176	2.922	
24.	БЕБА пудла	2.041	1.491	2.778	

25.	ШАРА шарпланинац	1.362	0.000	2.322	
26.	БУЛА енглески булдог	1.978	3.322	2.556	
27.	БЕТИ енглески булдог	1.708	1.602	3.351	
28.	АЛФА боксер	0.000	3.250	3.892	
29.	ЈЕВА бостон теријер	2.176	2.477	3.672	
30.	ВИЛД бостон теријер	2.740	0.000	4.000	

Прилог 9.8. Графикон лиофилизације изолата лактобацила пореклом из млека куја



БИОГРАФИЈА

Петар Сикимић је рођен у Београду 2.августа 1965.год. где је завршио основну школу, као вуковац. Након тога уписује средњу архитектонску техничку школу. Већ тада показује велику љубав и интересовање за животиње и почиње да се бави одгојем кунића и паса које траје до данашњег дана. Након одслужења војног рока уписује Факултет ветеринарске медицине где дипломира 1997. год. са просечном оценом 7,08. где се одмах и запослио, као стручни сарадник а од 2005. год. као самостални стручно технички сарадник за постдипломске студије.

Завршио специјалистичке студије, Болести кунића и одбранио специјалистички рад под насловом: „Конгениталне морфолошке малформације и хромозомске аберације инбред кунића“2005. год.

Докторске академске студије уписао 2018. год. и положио све планом и програмом предвиђене испите са просечном оценом 9,41.

Ужу специјализацију из области хирургије и породилства завршио 2019.год. Завршио специјалистичке академске студије-анимална биотехнологија у репродукцији одбравивши рад под називом: „Ембриотрансфер код кунића племенитих краткодлаких раса: далматинер-рекс и кастор-рекс“ 2021. год.

Од 1988.год. је кинолошки судија, судија оцењивач - инструктор за куниће. Све време се такмичи на изложбама кунића где је освојио преко 20 шампионских титула и звање "мајстор одгоја". У кинологији област интересовања су шарпланинци, службени пси и обука паса. Боравио у Енглеској на усавршавању у периоду 1999-2005. у "The Animal Behaviour Centre" Dr Roger Mugford.

Завршио семинар код Марија Верслипеа (Белгија) који је био три пута светски првак у спорској обуци службених паса. Поседује своју одгајивачницу и мини ЗОО врт.

Ожењен, отац три сина.

Током 2024.године у оквиру CEPUS програма је провео месец дана на VETMEDUNI, Ветеринарски факултет у Бечу, Катедра за микробиологију.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а: Петар (Милорад) Сикимић

број уписа: 2018/5016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов
антимикробни потенцијал“.**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 8.5.2025.год.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Петар Сикимић

Број уписа: 2018/5016

Студијски програм Докторске академске студије ДАС14

Наслов рада „**Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов антимикробни потенцијал**“

Ментор Проф. др Радослава Савић Радовановић

Потписани _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 8. 5. 2025.год.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Карактеризација изолата лактобацила пореклом из млека куја и њихов антимикробни потенцијал“.

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 8.5.2025.год

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.