

BENEFITNI I PATOGENI MIKROORGANIZMI U NEOBRAĐENOM MLIJEKU

Milaković, Dominik

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:103196>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Dominik Milaković, apsolvent

Preddiplomski studij smjera Bilinogojstvo

**BENEFITNI I PATOGENI MIKROORGANIZMI U NEOBRAĐENOM
MLIJEKU**

Završni rad

Osijek, 2016.

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU**

Dominik Milaković

Preddiplomski studij smjera Bilinogojstvo

**BENEFITNI I PATOGENI MIKROORGANIZMI U NEOBRAĐENOM
MLIJEKU**

Završni rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu završnog rada:

1. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, predsjednik
2. Jurica Jović, mag.ing.agr., mentor
3. Izv.prof.dr.sc. Zvonimir Steiner, član

Osijek, 2016.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. IZVORI PODATAKA I METODE RADA.....	2
3. PORijeklo MIKROORGANIZAMA U SIROVOM MLIJEKU.....	3
4. RAZVOJ MIKROORGANIZAMA U SIROVOM MLIJEKU.....	5
5. BENEFITNI MIKROORGANIZMI U SIROVOM MLIJEKU.....	6
5.1. Benefitne bakterije.....	6
5.1.1 Bakterije roda <i>Lactobacillus</i>	6
5.1.2. Bakterije roda <i>Streptococcus</i>	9
5.1.3. Bakterije roda <i>Pediococcus</i>	11
5.1.4. Bakterije roda <i>Leuconostoc</i>	11
5.2. Benefitni kvasci.....	12
5.2.1. Askosporogeni kvasci	12
5.2.2. Asporogeni kvasci.....	12
6. PATOGENI MIKROORGANIZMI U SIROVOM MLIJEKU.....	13
6.1. Patogene bakterije.....	13
6.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
6.1.2. Patogeni streptokoki.....	14
6.1.3. Rod <i>Proteus</i>	15
6.1.4. Rod <i>Salmonella</i>	16
6.1.5. <i>Lysteria monocytogenes</i>	16
6.1.6. Rod <i>Clostridium</i>	18
6.2. <i>Escherichia coli</i>	19
6.2.1. <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	20
6.2.2. Metoda određivanja <i>E. coli</i> u mlijeku i mliječnim proizvodima.....	21
7. ZAKLJUČAK.....	22
8. POPIS LITERATURE.....	23
9. SAŽETAK.....	24
10. SUMMARY.....	25
11. POPIS SLIKA.....	26
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	27

1. UVOD

Mlijeko je hranjiva tekućina bijele boje koja nastaje u mliječnim žlijezdama ženki sisavaca. Ono je osnovni izvor hrane za novorođene sisavce dok su još nesposobni probaviti ostalu hranu. Mlijeko predstavlja jedinu kompletnu hranu jer sadrži sastojke koji su potrebni mladuncima za rast i razvoj: bjelančevine, ugljikohidrate, masti, vodu, minerale i enzime. Sirovo, odnosno neobrađeno mlijeko sadrži mješovitu mikrofloru koja proizlazi iz unutrašnjosti vimena, farme ili štale te od osoba i opreme koja je u dodiru s mlijekom pri mužnji. Mlijeko je izvrstan supstrat za razvoj svakojakih mikroorganizama, uključujući patogene i mikroorganizme koji izazivaju kvarenje. Ono je namirnica koja se najlakše i najčešće kontaminira nepatogenim i patogenim mikroorganizmima. Mlijeko se troši u veoma velikim količinama za ishranu stanovišta, naročito male djece i bolesnih ljudi, te je iz tog razloga ono od veoma velikog epidemiološkog značaja. Zastupljenost i raznolikost mikroorganizama tijekom mužnje i ostalim postupcima pružaju nam informacije o razini higijene.

Cilj ovoga rada jest istražiti i objasniti kako djeluju korisni i patogeni mikroorganizmi koji se nalaze u sirovom mlijeku, s posebnim osvrtom na nesporogenu bakteriju *Escherichia coli*.

2. MATERIJAL I METODE

U izradi samoga rada korištena je relevantna znanstvena i stručna literatura iz područja mikrobiologije mlijeka i mljekarstva, kao i određene internetske stranice. Opisana su svojstva benefiitnih i patogenih bakterija u sirovom mlijeku. Korištene su suvremene mikrobiološke metode. S Interneta su preuzete fotografije koje su pravilno citirane.

3. PORIJEKLO MIKROORGANIZAMA U SIROVOM MLIJEKU

Mlijeko je izvrstan hranjivi supstrat u kome se vrlo lako i brzo razmnožavaju mikroorganizmi. Ono sadrži mikroorganizme koji ga zakiseljavaju ili ga čine lužnatim, a njegove sastojke koriste kao izvor dušika – bjelančevine, kao izvor energije – laktozu i limunsku kiselinu, a za izgradnju protoplazme koriste soli limunske kiseline (Miletić,1994.).

Izvori primarne mikroflore uključuju unutrašnjost vimena. Razina i sastav primarne mikroflore može izravno utjecati na prirodni mikrobicidni sustav u mlijeku i inhibitorne tvari/lijekove koji se koriste za održavanje zdravlja vimena i za liječenje oboljelih životinja. Svježe pomuženo mlijeko, koje sadržava samo redovitu mikrofloru iz unutrašnjosti vimena, često se naziva „aseptično“ mlijeko. Od redovite prisutne mikroflore mlijeka koja potječu iz unutrašnjosti vimena prosječno prevladavaju mikrokoki. Ima i nešto bakterija *Streptococcus* spp. te priličan broj *Corynebacterium* spp., uključujući i *Corynebacterium bovis*. Te su bakterije vrlo rijetko uzročnici mastitisa (upala vimena) i ne utječu bitnije na kakvoću prinosa mlijeka. Od najbrojnijih bakterija iz roda *Micrococcus* ("koki vimena") u svježe pomuženom mlijeku mogu biti vrste: *Micrococcus freudenreichii*, *M. flavus*, *M. citreus*, *M. albus*, *M. casei*, *M. varians*, *M. luteus*, *M. epidermis* i drugi. Broj živih mikroorganizama veći od 100.000 u 1 mL svježe pomuženog mlijeka upućuje na prisutnost mikroflore iz okoline. Međutim, količina bakterija u svježe pomuženom mlijeku može biti povećana uzročnicima mastitisa. To su bakterije *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Streptococcus uberis* (Tratnik,1998.).

Pod sekundarnom mikroflorom podrazumijevamo faktore koji utječu na povećanje broja mikroorganizama u mlijeku nakon izlaska iz vimena i onečišćuju mlijeko. To se odnosi na hranu i stelju, nečistu opremu za mužnju, vodu, stočnu hranu, te na samog čovjeka, odnosno mužača, itd.

Sekundarnu mikrofloru uglavnom čine bakterije, rjeđe kvasci, a samo ponekad plijesni. Velika je mogućnost onečišćenja mlijeka, budući da je put sirovog mlijeka, od mužnje do prerade, u većini slučajeva dosta dug.

Hrana i stelja sadrže mikroorganizme koji se u mlijeko prenose direktno s prašinom iz staje ili posredno radnicima. Indirektno dospijevaju u mlijeko mikroorganizmi iz krme i ekskremenata. Izmet stoke je izvor enteropatogenih bakterija vrsta roda *Salmonella* i *Campylobacter* koji može onečistiti stelju, kožu, dojke vimena i sve što je u doticaju s

mlijekom. Također stočna hrana je u većini slučajeva inficirana enteropatogenom bakterijom *Listeria monocytogenes*.

Oprema za mužnju može biti izvor gram-negativnih psihrotrofnih bakterija kvarenja, posebno dijelovi opreme koji se teško čiste. Temeljito pranje i dezinfekcija stroja za mužnju u nekim je uvjetima vrlo težak posao.

Voda može biti glavni izvor vrsta bakterija iz roda *Aeromonas* i *Campylobacter*, ali i izvor infekcija vrstama iz roda *Salmonella* (Tratnik,1998.).

Mužać prenosi u mlijeko uzročnike bolesti te sve one mikroorganizme koji su se nakupili na njegovim rukama, koži, kosi i odjeći.



Slika 1. Prikaz kontaminacije mlijeka i ostalih proizvoda.

Izvor: <http://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/kontaminacija-animalnih-proizvoda-patogenim-bakterijama-12>

4. RAZVOJ MIKROORGANIZAMA U SIROVOM MLIJEKU

Tri su stadija razvoja mikroorganizama u svježem mlijeku.

Prva faza je tzv. faza mirovanja, odnosno „lag faza“. U ovoj fazi mikroorganizmi se prilagođavaju novoj sredini neposredno poslije njihovog dolaska u tu novu sredinu. Porast bakterija je slab ili nikakav, ali to ne znači da one nisu aktivne. Metabolizam im je aktivan i dovodi do povećanja RNA unutar stanica, a isto tako i dimenzija stanica.

Druga faza je faza logaritamskog razvoja ili „log faza“. Broj stanica i stanična masa rastu istom brzinom tako da veličina stanica ostaje konstantna (Petričić, 1984.).

Ova faza je stadij maksimalne brzine razmnožavanja i najintenzivnije razgradnje tvari. Iscrpljenje supstrata i gomilanjem toksičnih tvari, kao rezultat metabolizma, dovodi do smanjenja razmnožavanja i ubrzanog odumiranja stanica. To je „stacionarna faza“ i „faza odumiranja“.

Uz razvoj mliječno-kiselih mikroorganizama u mlijeku raste i stupanj kiselosti. Utvrđeno je da se tijekom kiseljenja mlijeka mogu odvijati 3 specifična stadija razvoja kiselosti: stadij inkubacije, stadij neograničenog kiseljenja i stadij ograničenog kiseljenja.

Karakteristična sposobnost bakterija da formiraju različite enzime omogućuje njihovu veliku aktivnost u procesima razgradnje sastojaka supstrata u kojem se nalaze (Miletić, 1994.). U nepovoljnim uvjetima za rast i razvoj, neke bakterije stvaraju spore unutar stanice, koje u povoljnim uvjetima prelaze u vegetativni oblik.

Valja spomenuti da su bakterije najosjetljivije u logaritamskoj fazi razvoja pa se tada najlakše uništavaju toplinom ili drugim agensima, dok su najotpornije u fazi mirovanja.

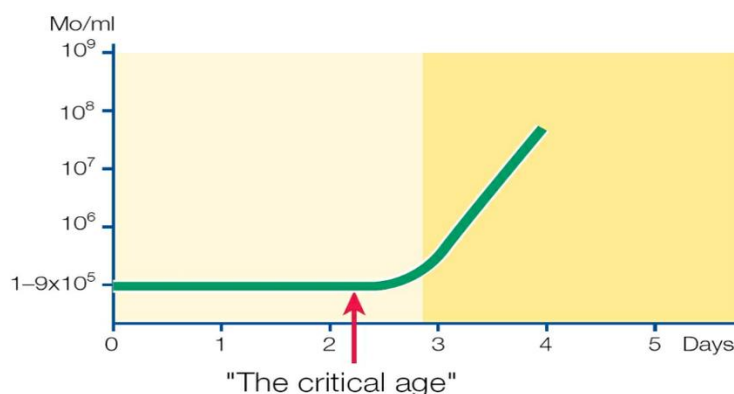


Fig. 1.13 Bacteria growth at +4 °C in raw milk.

Slika 2. Razvoj bakterija u svježem mlijeku na 4 °C.

Izvor: <http://www.dairyprocessinghandbook.com/chapter/microbiology>

5. BENEFITNI MIKROORGANIZMI U SIROVOM MLIJEKU

5.1. Benefitne bakterije

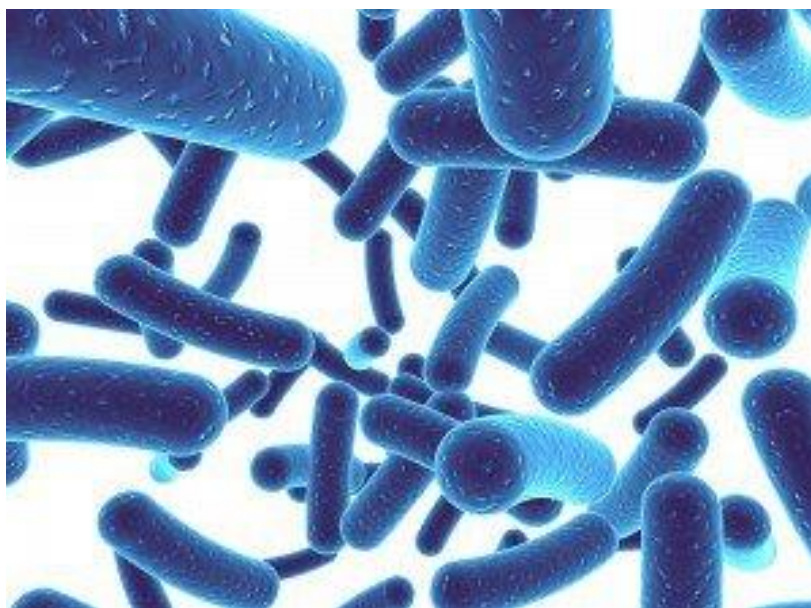
Najvažnije bakterije u mlijeku su bakterije mliječno-kiselog vrenja koje čine normalnu mikrofloru mlijeka i redovno su prisutne u mlijeku i mliječnim proizvodima.

Bakterije mliječne kiseline mogu biti homofermentativne vrste (*Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* i samo homofermentativne vrste roda *Lactobacillus*) ili heterofermentativne vrste (*Leuconostoc* i samo heterofermentativne vrste roda *Lactobacillus*). Ove vrste bakterija se ubrajaju u korisne bakterije zbog toga što se koriste za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda, a neke od njih i u proizvodnji sireva. Stvaranje mliječne kiseline u mlijeku ima posebno značenje, jer ono ima zaštitno djelovanje. Mliječna kiselina sprječava razvoj mnogih vrsta bakterija, posebno bakterija truljenja, koje se ne mogu razvijati, jer ne podnose kiselost.

5.1.1. Bakterije roda *Lactobacillus*

Pripadnici ovoga roda bakterija okarakterizirani su kao jedni od najvažnijih u mljekarstvu. *Laktobacili* su homofermentativni štapići dugi $6-7 \times 10^{-6}$ m. Anaerobni su ili fakultativno anaerobni. Pretežno proizvode mliječnu kiselinu iz glukoze. Razvoj im je na temp. 5-53 °C, optimalno između 30 i 40 °C. Otporni su na kiselinu, optimalni pH im je od 5,5-5,8, a podnose do 4% mliječne kiseline. (Petričić, 1984.). U mlijeko dopijevaju iz okoline. Bakterije ovoga roda korisne su u ljudskoj prehrani zbog beneficianog djelovanja, pretežito na imuni i digestivni sustav, te u borbi protiv raznih infekcija.

Lactobacillus acidophilus – Raste iznad 20 °C do maksimalno 48 °C, optimalno na 35-38 °C. Poznat je po tome što fermentira acidofilno mlijeko. Takvi proizvodi se cijene jer sadrže vitamine (folnu kiselinu) i antibiotike. Pomaže u porbi protiv gljivičnih infekcija, reducira netoleranciju laktoze jer proizvodi enzim laktazu koja pretvara laktozu u jednostavni šećer.



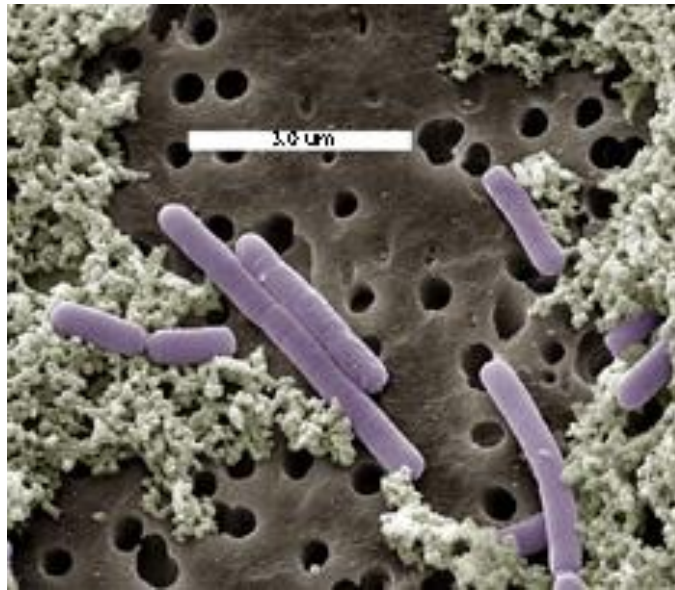
Slika 3. *Lactobacillus acidophilus*.

Izvor: <http://nootriment.com/acidophilus-capsules/>

Lactobacillus bifidus – Anaerobna je vrsta, optimum razvoja je na 37 °C, a uništava se grijanjem na 60 °C kroz 15 minuta. Nalazi se u probavnom traktu dojenčadi i male djece. Sudjeluje u proizvodnji bifidogenog fermentiranog mlijeka.

Lactobacillus bulgaricus – Optimalan razvoj ove bakterije odvija se na temperaturama između 45 i 50 °C, a minimalna temperatura za razvoj je 22 °C. Izolirao ga je Grigorov, a Mečnikov uveo u proizvodnju jogurta.

Lactobacillus casei – Mikroaerofilne bakterije koje rastu u obliku lanca. Optimalna temperatura razvoja je 30 °C, minimalna 10 °C, a maksimalna 40 °C. Prirodno se nalazi u ljudskoj usnoj šupljini i probavnom traktu. Jako je korisna za poboljšavanje imuniteta i digestivnog sustava ljudi. Nalazi se u svježim ili fermentiranim mliječnim proizvodima poput jogurta, sireva, pa čak i u fermentiranim zelenim maslinama. Spada u probiotike.



Slika 4. *Lactobacillus casei*.

Izvor: <http://genome.jgi.doe.gov/lacca/lacca.home.html>

Lactobacillus caucasicus – Raste između 25 i 45 °C, a optimalne temperature razvoja su do 40 do 44 °C. Nalazi se u kefirnim zrnima te sudjeluje u fermentaciji mlijeka kod proizvodnje kefira.

Lactobacillus helveticus – Razvija se na temperaturi 15-53 °C, optimalno kod 40-42 °C. Smatra se benefitnom bakterijom za zdravlje ljudi te spada u probiotike. Dospijeva u kiselo mlijeko i sirilo iz telećeg želuca (Petričić, 1984.). Dokazano je da stimulira imuni i digestivni sustav, sudjeluje u kontroliranju proljeva, reducira netoleranciju laktoze te inhibira štetne bakterije. Koristi se u proizvodnji raznih vrsta sireva kao npr. mozzarelle, ementalera, parmezana, švicarskog, cheddar sira i ostalih.

Lactobacillus lactis – Razvija se na 16-50 °C, dok je optimalni razvoj na temperaturama 40-43 °C. Sudjeluje u zrenju polutvrdih i tvrdih sireva te se nalazi u mljekarskim kulturama.

Lactobacillus leichmanii – Optimum razvoja mu je kod 35-40 °C, a raste između 15-45 °C. Mikroaerofilan je, a nalazi se u mlijeku i mliječnim proizvodima.

Lactobacillus thermophilus – Ova bakterija vrlo dobro podnosi visoke temperature. Suzbija se grijanjem na 71 °C kroz 30 minuta ili na 82 °C tokom 2 i pol minute. Optimalno se razvija na temperaturama između 50 i 62 °C. Pojavljuje se u pasteriziranom mlijeku i tvrdim sirevima.

5.1.2. Bakterije roda *Streptococcus*

Streptokoki su gram pozitivne bakterije, loptastog oblika, koje su raspoređene u vidu lanca ili niti. Pripadaju grupi fakultativno anaerobnih bakterija, nepokretne su i ne luče enzim katalazu.

Bakterije ovog roda rastu na temperaturama 10-45 °C, a ne razvijaju se kod 6,5% ili više NaCl, niti kod pH iznad 9,6. U mljekarstvu su korisne sljedeće vrste:

Streptococcus lactis – U mlijeku dolazi pojedinačno, u parovima ili kraćim lancima. Podnosi pH 4,0-9,2. Od laktoze proizvodi 0,8-1,2% mliječne kiseline, te može gotovo sav mliječni šećer pretvoriti u mliječnu kiselinu. Neki sojevi proizvode antibiotik nisin, koji spriječava rast *S. cremoris* i nekih patogenih organizama (npr. bakterije tuberkuloze). Optimalna temperatura rasta je između 30-35 °C, a raste između 10-40 °C. Korisno djeluje u mljekarskim kulturama, kod zrenja vrhnja za maslac, te kod proizvodnje i zrenja mnogih sireva i fermentiranih mlijeka. (Petričić, 1984). *S. lactis* ne dospijeva u mlijeko iz vimena nego iz okoline.

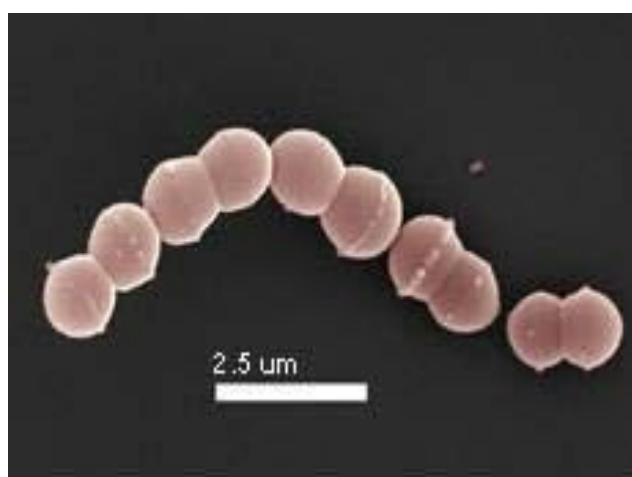
Streptococcus cremoris – Također proizvodi znatnu količinu mliječne kiseline. Razvija se između 10-40 °C, optimalna temp. mu je malo ispod 30 °C. Ova bakterija stvara aromu kod zrenja vrhnja, pojavljuje se u dugim lancima i proizvodi antibiotik diplokokcin koji djeluje protiv *S. lactis*. Pri nižim temp. i kod duljeg stajanja u mlijeku uzrokuje sluzavost. To se koristi u tehnologiji nekih proizvoda.



Slika 5. *Streptococcus cremoris*.

Izvor: <http://www.naturalabundance.co.nz/probiotics/caspian-sea-yogurt>

Streptococcus thermophilus – Optimalno se razvija na temp. 40-45 °C, ali dobro raste i na 50 °C. Zbog toga ga se može naći i u nisko, trajno pasteuriziranom mlijeku jer podnosi grijanje na 65 °C kroz 30 minuta (Petričić, 1984.). Ne raste u sredini s više od 2% NaCl, a podnosi pH 4-4,5. Posebno djeluje u mliječnim proizvodima koji se tijekom tehnološkog procesa griju na više temperature.

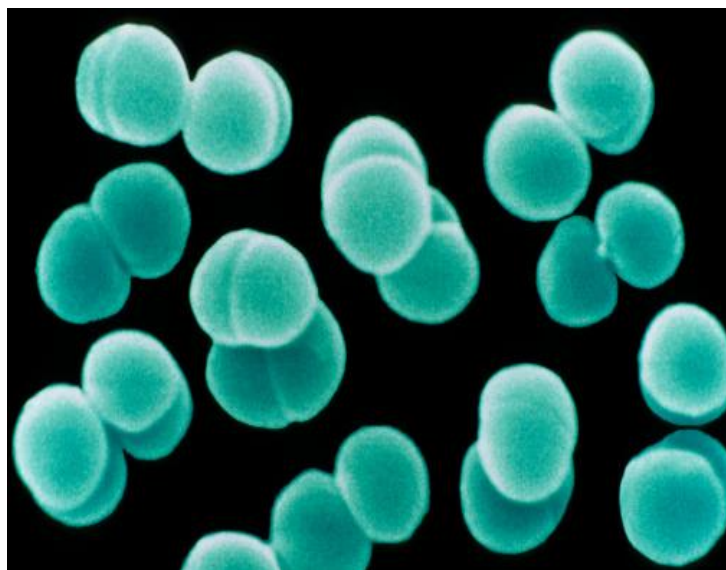


Slika 6. *Streptococcus thermophilus*.

Izvor: http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_2010/S_thermophilus.html

5.1.3. Bakterije roda *Pediococcus*

Pediococcus acidi lactici – Homofermentativna je vrsta, proizvodi mliječnu kiselinu iz ugljikohidrata. Promjera je $0,6-1 \times 10^{-6}$ m, a optimalni razvoj joj je kod $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, a do uništavanja dolazi grijanjem na $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 10 minuta. Koristi se u proizvodnji fermentiranih napitaka.



Slika 7. Mikroskopski prikaz baktaerija *Pediococcus*.

Izvor: <http://www.suggest-keywords.com/cGVkaW9jb2NjdXM/>

5.1.4. Bakterije roda *Leuconostoc*

Leuconostoc dextranicum – Pripada heterofermentativnim mliječno-kiselim streptokokima. Promjera je istog kao *Pediococcus acidi lactici*, razvija se na temp. $10-37\text{ }^{\circ}\text{C}$, optimalno kod $20-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pored mliječne kiseline stvara i druge proizvode kad je pH manji od 5. Stvara acetoin i diacetil koji se istodobno nalaze u mljekarskoj kulturi. Stvara sastojke arome kod polutvrdih sireva, kiselog vrhnja, jogurta i maslaca.

Lecuonostoc cremoris – Poznatiji je pod nazivom *L. citrovorum*. Fakultativno je anaeroban. Razvija se kod $10-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, optimalno na $18-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Biokemijske karakteristike su mu jako slične *Leuconostoc dextranicum*. Stvara aromu u sirevima, vrhnju, jogurtu i maslac.

5.2. Benefitni kvasci

Kvasci se u prirodi pojavljuju u velikom broju, ali u mljekarstvu nisu toliko značajni kao bakterije. Značajni su jer mogu proizvesti velik broj enzima te mogu kumulirati masti, bjelančevine i ugljikohidrate. Uglavnom su fakultativno aerobni. Acidofilni su i dobro se razmnožavaju kod 4-5 pH. Zahvaljujući tome svojstvu djeluju na smanjenje kiselosti sredine, te time pripremaju sredinu za razvoj proteolitičkih bakterija i ubrzavanja zrenja sira (A. Petričić, 1984.). Optimalni razvoj imaju na 20-30 °C. Dobro podnose niske temperature. Neki kvasci žive u simbiozi s bakterijama kao npr. u kefiru u kojima se stvaraju alkohol i mliječna kiselina. Dijele se u dvije grupe, askosporogene i asporogene kvasce. U mljekarstvu su značajni askosporogeni kvasci roda *Saccharomyces*, te asporogeni kvasci iz rodova *Torulopsis*, *Mycoderma* i *Candida*.

5.2.1. Askosporogeni kvasci

Među ove kvasce se ubrajaju kvasci iz roda *Saccharomyces*. Za mljekarsku industriju važne su vrste koje fermentiraju laktozu kao *Saccharomyces lactis*. Kvasci ove vrste fermentiraju laktozu i stvaraju alkohol. Koriste se u proizvodnji kumisa, kefira, a može i u proizvodnji alkoholnog napitka iz sirutke.

5.2.2. Asporogeni kvasci

Korisni su u proizvodnji mliječnih proizvoda, ali su vrlo su štetni u drugim proizvodima. Otporni su prema toplini i kemijskim djelovanjima (Petričić, 1984.).

U mljekarstvu su korisne vrste: *Torulopsis sphaerica* (pojavljuje se u siru, vrhnju i kondenziranom mlijeku), *Torulopsis casei* (usporava i spriječava razvoj nekih plijesni), *Torulopsis kefir* (nalazi se u kefiru).

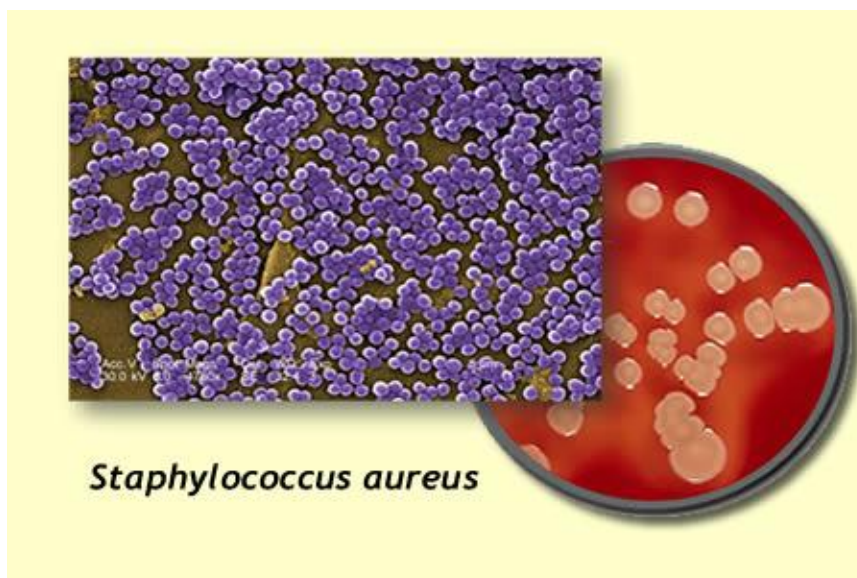
6. PATOGENI MIKROORGANIZMI U SIROVOM MLIJEKU

6.1. Patogene bakterije

6.1.1. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoki su fakultativno anaerobne, okrugle bakterije promjera $0,5-1,5 \times 10^{-6}$ m. Fermentiraju veliki broj ugljikohidrata. Mnoge vrste ovog roda su patogene, a najpoznatija patogena vrsta je *Staphylococcus aureus*.

Staphylococcus aureus su gram pozitivne, fakultivno anaerobne bakterije koje su zastupljeni u vodi, zraku, prašini i dr. Poznate su mnoge vrste roda *Staphylococcus*, ali samo *Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu i naziva se koagulaza pozitivni *Staphylococcus*. Optimalne su temperature $35\text{ }^{\circ}\text{C}$, a optimalnog pH je 7,4, a kolonije su obično neprozirne, okrugle, glatke, uzdignute. Može izdržati visoke temperature, npr. temperaturu $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ može izdržati 60 minuta, te su otporne na sušenje i visoke koncentracije NaCl i šećera. U mlijeko potječe iz kože, usta ili nosa osobe koja je radila s mlijekom. Njezina prisutnost je znak nedovoljne higijene. Mnogi sojevi su patogeni te se pojavljuju u gnojnim ranama i mogu se uzrokovati infekcije poput meningitisa, furunkuloze, trovanja hranom, gnojnih upala i dr.



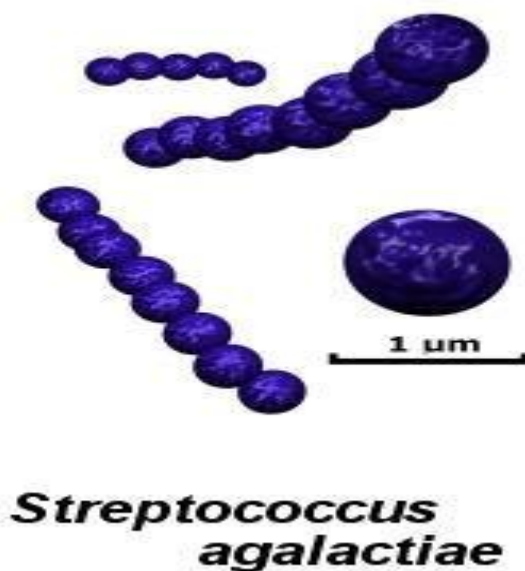
Slika 8. *Staphylococcus aureus* (zlatni stafilokok) na agaru.

Izvor: http://www.samaritanid.com/staphylococcus_aureus.ht

6.1.2. Patogeni *streptokoki*

U ovu grupu patogenih bakterija ubrajaju se bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu i druge produkte koji uzrokuju bolesti i smetnje u ljudskom ili životinjskom organizmu.

Streptococcus agalactiae u mlijeko dopijeva iz vimena krava zaraženih mastitisom. Razvija se na temperaturama 10-45 °C, a ne može preživiti grijanje na 60 °C kroz 30 minuta. Kod krava uzrokuje zaraznu upalu vimena (mastitis) uslijed koje dolazi do smanjenje kvalitete mlijeka jer se u njemu povećava broj leukocita i alkaliteta. Ako je terapija brza, brzo se i izliječi.



Slika 9. *Streptococcus agalactiae*.

Izvor: <https://www.pinterest.com/explore/streptococcus-agalactiae/>

Streptococcus faecalis – Ova bakterija u mlijeko dopijeva iz okoline, točnije porijeklom je iz probavnog trakta toplokrvnih životinja i ljudskih fekalija, što znači da u mlijeko dopijeva pri nehigijenskoj mužnji. Otporna je na visoke temperature, raste između 10-45 °C, a preživi grijanje na 60 °C kroz 30 minuta. Odgovara joj pH 4,0-9,6. Može biti uzrokom trovanja hranom.

Streptococcus pyogenes – Optimalni razvoj ove bakterije se događa na 37 °C, ne razvija se na temperaturama nižim od 10 °C ili višim od 45 °C. Odgovara joj pH 4,8-6,0. Suzbija se grijanjem na 60 °C kroz 30 minuta. Izaziva gnojne upale, sepsu i škrlatnu groznicu.

6.1.3. Rod *Proteus*

Rod *Proteus* spada u porodicu *Enterobacteriaceae* i sadrži više vrsta. U mlijeku su najčešće *P. vulgaris* i *P. mirabilis*. To su štapičaste bakterije, debljine 0,5-1 i duljine 1-3x10⁻⁶ m. Pojavljuju se pojedinačno u parovima i u lancima. Obično se nalazi u zemlji i na biljkama, te u digestivnom traktu ljudi i životinja. Na agaru kolonije su okrugle, glatke, svijetlo-ružičaste (laktoza – negativne). Optimum razvoja je na 37 °C. Pri temperaturi od 55°C u vlažnim uvjetima, umiru u roku od 1 sata. Osjetljive su na razna dezinfekcijska sredstva, posebno na fenolna i halogenska. Izazivaju sepsu, meningitis i urinarne infekcije. Ove bakterije daju neugodan miris amonijaka.



Slika 10. *Proteus vulgaris* na agaru.

Izvor: <https://www.pinterest.com/laurenreneria7/proteus-vulgaris-gram-stain/>

6.1.4. Rod *Salmonella*

Bakterije roda *Salmonella* su gram-negativni, fakultativno anaerobne bacili koji preko fekalija i urina kontaminiraju vodu, mlijeko i ostale namirnice, te sredinu u kojoj se kreću i borave ljudi i životinje. Optimalna temperatura za njihov razvoj je 35 °C.

Nisu otporne bakterije, temperatura od 56 °C ih ubija za 30 minuta. Osjetljive su na klor i klorne preparate. Toksične su jer proizvode endotoksin. Nisu striktno patogene za ljude i životinje. Uzrokuju enteralne groznice i gastrointestinalna oboljenja.

Salmonella typhi je uzročnik tifusa. Dospijeva u mlijeko od oboljelih ljudi ili vodom zaraženom tifusnim klicama.

Salmonella paratyphi je uzročnik paratifusa. Prenose je oboljeli ljudi, voda i dr.



Slika 11. *Salmonella* pod mikroskopom.

Izvor: <http://www.wikiwand.com/hr/Gastroenteritis>

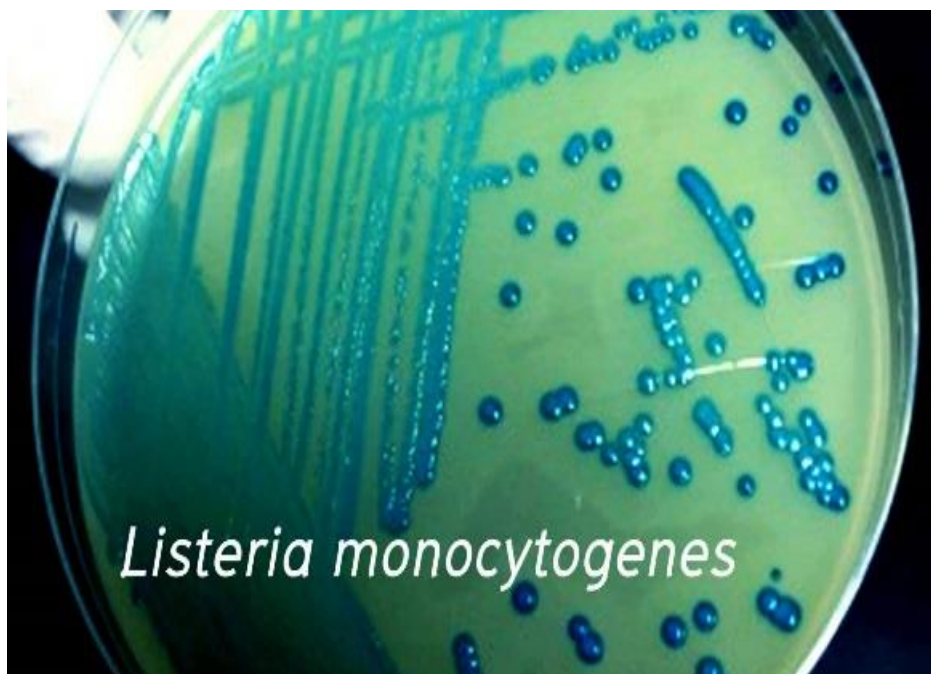
6.1.5. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes prvi puta je detaljno opisana 1926. godine kada ju je Murray izolirao iz kunića. Bakterija je gram-pozitivni asporogeni, kratki štapić. Raste od 1° C do 45 °C, s optimalnim rastom pri 30—37° C. Može rasti uz pH 5,0—9,0. *L. monocytogenes* je aerobna do fakultativno anaerobna i patogena je za čovjeka i životinje. Izaziva oboljenje listeriozu. Zaražena trudnica može transplacentarno prenijeti na fetus (Magdalenić, 1993.).

Pored listerioznog mastitisa mlijeko može biti lako kontaminirano ovom bakterijom iz prirodnih izvora kao što su zemlja, silaža, prljavi pribor ili fekalije. Takvo mlijeko može imati 2000—20000 bakterijskih stanica/ml.

U sirovom mlijeku se nalazi prirodni antimikrobni sustav - laktoperoksidaza tiocionin vodikov peroksid (LP). Proučavano je djelovanje laktoperoksidaze na rast *L. monocytogenes* u mlijeku. Kao test-mikroorganizmi uzeta su četiri soja *L. monocytogenes* (Seoti A., 5069, ATCC 19119, NCTC 11994) i istraživani su na niskim temperaturama nakon dodatka 0,25 mM natrium-tiocijanata i 0,25 mM vodikovog peroksida. Utvrđeno je da LP sustav baktericidno djeluje na sva četiri soja i to u uvjetima temperature od 4-8°C. Koncentracija tiocijanata znatno opada za vrijeme prvih 8 sati inkubacije kod obje temperature. Djelovanje LP sustava ovisi o temperaturi, trajanju inkubacije i o broju *L. monocytogenes* (Magdalenčić, 1993.). LP sustav u sirovom mlijeku može djelovati korisno za kontrolu razvoja *L. monocytogenes* na niskim temperaturama.

Listerija ulazi u stanice, uključujući i crijevne stanice, izravnom endocitozom. Može preživjeti unutar makrofaga i monocita. Pobačaj nastane zbog edema i nekroze placente. Listeriozni encefalitis je jednostrana akutna upala moždanog debla.



Slika 12. *L. monocytogenes* na agaru.

Izvor: <https://www.youtube.com/watch?v=CIJGpU0Fm8g>

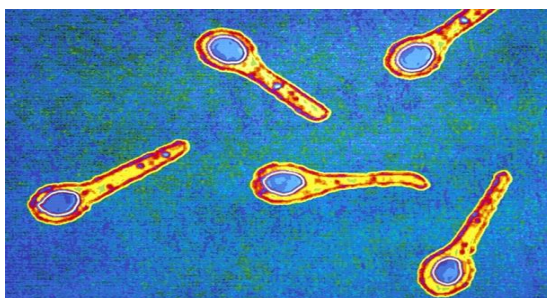
6.1.6. Rod *Clostridium*

Clostridium su anaerobne, sporogene, gram pozitivne bakterije, koje su rasprostranjene u prašini, zemljištu, na biljkama i u probavnom traktu ljudi i životinja. Štapićastog su oblika, duljine 7×10^{-6} m, a debljine oko $1,1 \times 10^{-6}$ m. Proizvode spore kruškolikog oblika. Fermentiraju laktozu u anaerobnim uvjetima, te proizvode maslačnu i octenu kiselinu. Otkriveno je oko 100 vrsta iz roda *Clostridium*, od kojih je za ljude patogeno oko 25-30 vrsta. Najpoznatije vrste koje izazivaju oboljenja su: *C. perfringes*, *C. botulinum*, *C. tetani* i drugi.

Clostridium perfringes – Ova bakterija je gram pozitivni, strogi anaerob. Razvoj je optimalan na temperaturi od 45°C . Nalazi se kao saprofit crijevne flore kod ljudi i životinja te raste na većini hranjivih podloga dajući okrugle zelenkaste kolonije. *C. perfringes* je opasan jer proizvodi 12 različitih toksina i izaziva plinovite gangrene i enteritise.

Clostridium botulinum – Optimalni razvoj ima između $20-30^{\circ}\text{C}$. Strogo je anaeroban, s vrlo otpornim sporama. Mlijeko zakiseljava lagano, bez koagulacije i stvaranja plinova. Ima više sojeva koji proizvode toksine, a uzrokuje bolest zvanu botulizam. Nalazi se u crijevima oboljelih životinja i zemlji.

Clostridium tetani – Ova bakterija i njene spore se najčešće nalaze u digestivnom traktu životinja i zemlji. Patogen je i vrlo toksičan. Proizvodi dva egzotoksina: tetanolizin i tetanospasmin, a tetanospasmin je neurotoksin koji kod ljudi uzrokuje opasnu bolest tetanus. Optimalni razvoj ima na 37°C , a ne raste na 45°C .



Slika 13. Sporogeni *C. tetani*.

Izvor: <http://www.ppdictionary.com/bacteria/gpbac/tetani.htm>

6.2. *Escherichia coli*

E. coli je prevladavajući nesporigeni, patogeni organizam iz porodice gram-negativnih bakterija znanih kao *Enterobacteriaceae*. Otkrio ju je njemački bakteriolog Theodor Escherich 1885. Spoznao je da su određeni sojevi bakterije odgovorni za proljev kod dojenčadi i gastroenteritisa, što je tada bilo važno otkriće. Iako je prvotno ime bilo *Bacteri coli*, kasnije je promijenjeno u *Escherichia coli* u čast čovjeku odgovornom za otkriće ove bakterije.

E. coli često spominju kao jedan od najviše proučavanih organizama. Identificirano je više od 700 serotipova. Većina serotipova ne uzrokuje oboljenja kod ljudi, neki su čak i korisni. Postoji nekoliko različitih oblika patogena *E. coli* kao što su uropatogena *E. coli* (UPEC), enterotoksigena *E. coli* (ETEC), enteropatogena (EPEC), enteroinvazivna (EIEC), enteroagregativna (EAEC) i enterohemoragična *E. coli* (EHEC) koja dovodi do pojave hemoragičnog kolitisa ili hemolitičko-uremičkog sindroma (HUS). *Coli* bakterije su veoma otporne i mogu dugo vremensko razdoblje preživjeti u vodi, zemlji ili na površini predmeta. Povišena temperatura ih uništava, npr. pri temperaturi od 60 °C preživljavaju svega 15 minuta. Rani simptomi zaraze *E. coli* svježim mlijekom su uglavnom nadraženi želudac, bol u abdomenu, povraćanje, proljev i simptomi slični gripi, uključujući glavobolju, temperaturu i ostalo.

Najopasniji serotipovi su oni koji uzrokuju kontaminaciju hrane i pića, odnosno tipovi koji proizvode Shiga toksin, zato što su gotovo identični onima koje proizvodi *Shigella dysenteria*. Najpoznatija i najštetnija *E. coli* bakterija koja proizvodi Shiga toksin je *E. coli* O157:H7.



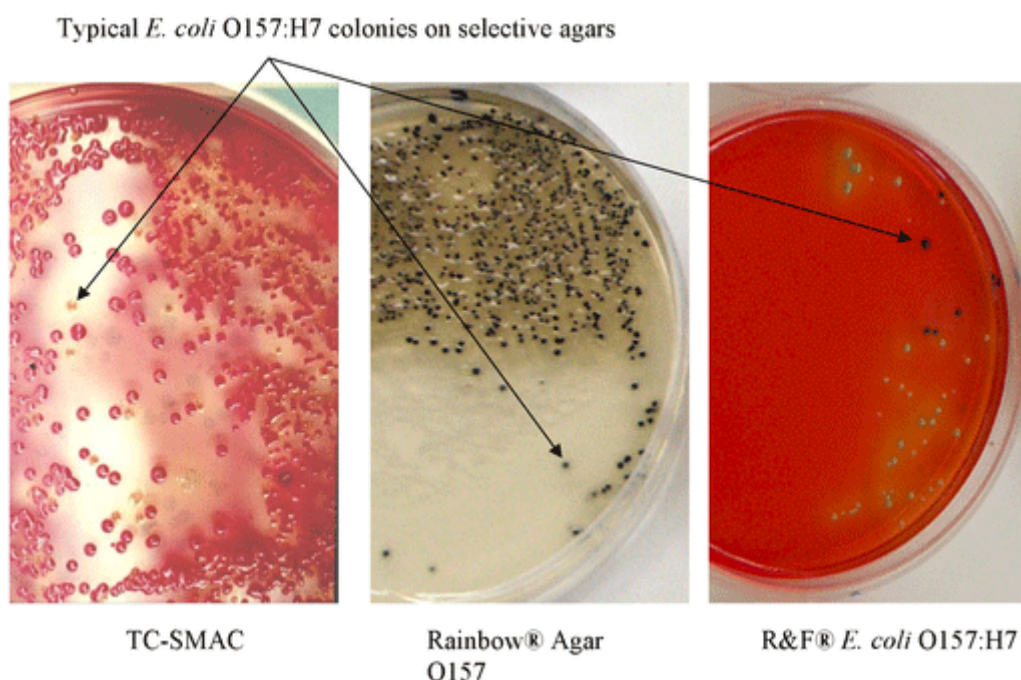
Slika 14. *E. coli*.

Izvor: <http://tinktura.com/escherichia-coli/>

6.2.1. *Escherichia coli* O157:H7

Otkrivena je 1982. godine kao ljudski patogen. *E. coli* O157:H7 redovno se nalazi u fekalijama zdrave stoke, a prenosi se kontanimiranom hranom, vodom i u kontaktu sa zaraženim ljudima ili životinjama. Kod ljudi uzrokuje širok raspon kliničkih bolesti uključujući proljev, hemoragijski kolitis, hemolitički uremični sindrom, pa i smrt.

E. coli O157:H7 je neumoljivo razvijajući, stalno mutirajući organizam koji se konstanto poprima nove karakteristike, uključujući i stjecanje virulencijskih čimbenika koji čine stalnu prijetnju pojave još opasnijih varijanti.



Slika 15. *E. coli* O157:H7 na selektivnim agarima.

Izvor:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm>

6.2.2. Metoda određivanja *E. coli* u mlijeku i mliječnim proizvodima

Identifikacija *E.coli* vrši se na način da 1 ml uzorka inkubiramo na brilijant zelenom bujonu sa Duramovom epruvetom, 24 do 48 sati na 44 °C. Ukoliko dođe do izdvajanja plina SO² i promijene boje podloge.

Potvrđni test vrši se precjepljivanjem sadržaja na ljubičasto-crveni žučni agar te se ponovno inkubira 24 do 48 sati na 44 °C. Potvrdu prisutstva *E.coli* predstavlja pojava karakterističnih ljubičasto-crvenih kolonija na agaru.

E. coli ne smije se nalaziti u 0,001 ml sirovog mlijeka, steriliziranog mlijeka i sterilnih mliječnih proizvoda. Pasterizirano mlijeko u originalnom pakiranju, dok se nalazi uskladišteno u mljekari, ne smije sadržati *E. coli* u 1 ml, niti u 1 ml zgusnutog zaslađenog niti zgusnutog zaslađenog obranog mlijeka. Ne smije se nalaziti u 0,1 ml pasteriziranog mlijeka i mliječnih proizvoda u trenutku prodaje potrošačima niti u 0,1 g mlijeka u prahu.

7. ZAKLJUČAK

Mlijeko je gotovo idealna podloga za rast i razvoj mikroorganizama, što se da zaključiti po njihovoj stalnoj prisutnosti, bilo to u većem ili manjem broju. Oni imaju veliku ulogu u kvaliteti mlijeka te svakako imaju svoje pozitivne i negativne utjecaje.

Ne samo patogeni i tehnološki štetni nego i tehnološki korisni mikroorganizmi mogu izazvati raznovrsne poteškoće u mljekarstvu ako se pojavljuju nekontrolirano odnosno ondje gdje nisu potrebni. Ubrzanim i stalnim unaprijeđenjem tehnologije u proizvodnji mlijeka, razumno je očekivati da će se pravilno iskoristiti utjecaj benefitnih mikroorganizama za bolji kvalitet mlijeka, te da u 100% proizvoda neće biti niti jednog patogenog mikroorganizma. Mikroorganizmima je malo potrebno da se razviju stoga je osiguranje bespriječnih higijenskih prilika u proizvodnji i preradi mlijeka temeljni preduvjet dobivanja kvalitetnih i zdravstveno ispravnih mliječnih proizvoda. Na ovo drugo obvezuju i zakonski propisi koji propisuju mikrobiološke standarde za pojedinu skupinu mliječnih proizvoda. Kod nas su oni sadržani u Pravilniku o mikrobiološkim standardima za namirnice (Narodne novine, br. 46/1994.)

8. POPIS LITERATURE

Knjiga:

Miletić S. (1994.): Mlijeko i mliječni proizvodi, Zagreb

Tratnik LJ. (1998.): Mlijeko-Tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb

Petričić. A (1984.): Konzumno i fermentirano mlijeko, Zagreb

Robinson R.K. (2002.): Dairy microbiology. Handbook, third edition, New York

Jedinica s interneta:

<http://documents.tips/documents/mikroorganizmi-u-mlijeku-i-proizvodima-od-mlijeka.html>, (13.09.2016.)

http://www.jhsph.edu/research/centers-and-institutes/johns-hopkins-center-for-a-livable-future/pdf/research/clf_reports/RawMilkMDJohnsHopkinsReport2014_1208.pdf, (13.09.2016.)

<http://www.probiotic.org/lactobacillus.htm>, (14.09.2016.)

<http://www.about-ecoli.com/>, (15.09.2016.)

Magdalenic B. (1992.): Znacaj nalaza *Listeria monocytogenes* u mlijeku i mliječnim proizvodima.

([file:///C:/Users/Dominik%209/Downloads/MAGDALENIC_Znacaj_nalaza_Listeria monocytogenes u mlijeku.pdf](file:///C:/Users/Dominik%209/Downloads/MAGDALENIC_Znacaj_nalaza_Listeria_monocytogenes_u_mlijeku.pdf)), (15.09.2016.)

<http://www.ppdictionary.com/index.html>, (17.09.2016.)

9. SAŽETAK

Neobrađeno mlijeko sadrži brojne mikroorganizme koji su prisutni kao stalna mikroflora ili u nj dolaze iz okoline. Benefitni mikroorganizmi u sirovom mlijeku su uglavnom bakterije mliječno-kiselog vrenja: *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. i *Pediococcus* spp. koje se u mlijeku nalaze kao stalna, normalna mikroflora i pozitivno utječu na ljudski i životinjski organizam te također imaju važnu ulogu u mljekarskoj proizvodnji. Među benefitne organizme sirovog mlijeka pripadaju i pojedini kvasci.

Patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku ima velik broj, a najviše bakterija. Najpoznatije i najčešće patogene su pojedine bakterije iz rodova *Clostridium*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Salmonella*, zatim vrste kao *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* koju se malo opširnije proučavalo.

Ključne riječi: mlijeko, mikroorganizmi, benefitni, patogeni, bakterije

10. SUMMARY

Unprocessed milk contains many microorganisms that exist as the permanent microflora of milk or they enter it from the environment. Beneficial microorganisms found in raw milk are mostly lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp. which is the permanent, normal microflora. They have beneficial effects on humans and animals and also play an important role in dairy production. Certain yeasts belong to beneficial microorganisms in raw milk. There is a plethora of pathogenic microorganisms in raw milk, mostly bacteria. The best known and the most common are the bacteria that belong to the genus of *Clostridium*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Salmonella*, followed by the types of bacteria such as *Lysteria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* which have been studied in more detail.

Key words: milk, microorganisms, beneficial, pathogenic, bacteria

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz kontaminacije mlijeka i ostalih proizvoda	4
Slika 2. Razvoj bakterija u svježem mlijeku na 4 °C.....	5
Slika 3. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	7
Slika 4. <i>Lactobacillus casei</i>	8
Slika 5. <i>Streptococcus cremoris</i>	10
Slika 6. <i>Streptococcus thermophilus</i>	10
Slika 7. Mikroskopski prikaz baktaerija <i>Pediococcus</i>	11
Slika 8. <i>Staphylococcus aureus</i> (zlatni stafilokok) na agaru.....	13
Slika 9. <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
Slika 10. <i>Proteus vulgaris</i> na agaru.....	15
Slika 11. <i>Salmonella</i> pod mikroskopom.....	16
Slika 12. <i>L. monocytogenes</i> na agaru.....	17
Slika 13. Sporogeni <i>C. tetani</i>	18
Slika 14. <i>E. coli</i>	19
Slika 15. <i>E. coli</i> O157:H7 na selektivnim agarima.....	20

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište J. J. Strossmayera,
Poljoprivredni fakultet u Osijeku,
Završni rad

BENEFITNI I PATOGENI MIKROORGANIZMI NEOBRAĐENOM MLIJEKU BENEFIT AND PATHOGEN MICROORGANISMS IN UNPROCESSED MILK

Dominik Milaković

Sažetak:

Neobrađeno mlijeko sadrži brojne mikroorganizme koji su prisutni kao stalna mikroflora ili u nj dolaze iz okoline. Benefitni mikroorganizmi u sirovom mlijeku su uglavnom bakterije mliječno-kiselog vrenja: *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. i *Pediococcus* spp. koje se u mlijeku nalaze kao stalna, normalna mikroflora i pozitivno utječu na ljudski i životinjski organizam te također imaju važnu ulogu u mljekarskoj proizvodnji. Među benefitne organizme sirovog mlijeka pripadaju i pojedini kvasci.

Patogenih mikroorganizama u sirovom mlijeku ima velik broj, a najviše bakterija. Najpoznatije i najčešće patogene su pojedine bakterije iz rodova *Clostridium*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Salmonella*, zatim vrste kao *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* koju se malo opširnije proučavalo.

Ključne riječi: mlijeko, mikroorganizmi, benefitni, patogeni, bakterije

Summary:

Unprocessed milk contains many microorganisms that exist as the permanent microflora of milk or they enter it from the environment. Beneficial microorganisms found in raw milk are mostly lactic acid bacteria: *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. and *Pediococcus* spp. which is the permanent, normal microflora. They have beneficial effects on humans and animals and also play an important role in dairy production. Certain yeasts belong to beneficial microorganisms in raw milk. There is a plethora of pathogenic microorganisms in raw milk, mostly bacteria. The best known and the most common are the bacteria that belong to the genus of *Clostridium*, *Streptococcus*, *Proteus*, *Salmonella*, followed by the types of bacteria such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* which have been studied in more detail.

Keywords: milk, microorganisms, beneficial, pathogenic, bacteria

Datum obrane: