

Identifikacija aerobno mezofilnih bakterija MALDI-TOF tehnikom u mlijeku iz mljekomata

Darrer, Monica

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:936561>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**IDENTIFIKACIJA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA
MALDI-TOF TEHNIKOM U MLIJEKU IZ MLJEKOMATA**

DIPLOMSKI RAD

Monica Darrer

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Proizvodnja i prerada mlijeka

**IDENTIFIKACIJA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA
MALDI-TOF TEHNIKOM U MLIJEKU IZ MLJEKOMATA**

DIPLOMSKI RAD

Monica Darrer

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Nataša Mikulec

Komentor:

dr. sc. Snježana Kazazić

Zagreb, rujan, 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Monica Darrer**, JMBAG 0178119056 rođena 11.siječnja 2000. u Zagrebu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**IDENTIFIKACIJA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA
MALDI-TOF TEHNIKOM U MLIJEKU IZ MLJEKOMATA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studentice

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Monica Darrer**, JMBAG 0178119056 naslova

**IDENTIFIKACIJA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA
MALDI-TOF TEHNIKOM U MLIJEKU IZ MLJEKOMATA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Nataša Mikulec, mentor

2. dr. sc. Snježana Kazazić, komentor

3. prof. dr. sc. Neven Antunac, član

4. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka, član

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Cilj rada.....	2
2. Pregled literature	3
2.1. Sirovo mlijeko	3
2.2. Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem mljekomata.....	4
2.3. Mlijeko kao medij za mikrobnii rast	5
2.4. Izvori mikrobne kontaminacije sirovog mlijeka	7
2.5. Aerobno mezofilne bakterije u sirovom mlijeku	12
2.6. Gram-pozitivne aerobno mezofilne bakterije	13
2.6.1. <i>Lactococcus</i> spp.	13
2.6.2. <i>Enterococcus</i> spp.	13
2.6.3. <i>Leuconostoc</i> spp.	14
2.6.4. <i>Pediococcus</i> spp.	15
2.6.5. <i>Streptococcus</i> spp.	15
2.6.6. <i>Lactobacillus</i> spp.	16
2.6.7. <i>Micrococcus</i> spp.	16
2.6.8. <i>Bifidobacterium</i> spp.	17
2.7. Gram-negativne aerobno mezofilne bakterije	17
2.7.1. <i>Acinetobacter</i> spp.	17
2.7.2. <i>Serratia</i> spp.	18
2.8. Patogene bakterije	19
2.8.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
2.8.2. <i>Yersinia enterocolitica</i>	19
2.8.3. <i>Escherichia coli</i>	20
2.9. Metode određivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku.....	21
2.9.1. Klasična metoda utvrđivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku	21
2.9.2. Metoda protočne citometrije	22
2.9.3. MALDI-TOF tehnika identifikacije aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku	23
3. Materijali i metode.....	26
3.1. Uzorkovanje mlijeka	26
3.2. Priprema uzoraka mlijeka za analizu.....	27
3.3. Određivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku metodom protočne citometrije	27
3.4. Klasična metoda određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku	28

3.5. Identifikacija MALDI-TOF tehnikom	31
4. Rezultati i rasprava.....	34
4.1. Rezultati određivanja ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija	34
4.2. Rezultati identificiranja izraslih bakterijskih kolonija MALDI-TOF tehnikom.....	38
5. Zaključak.....	49
6. Literatura.....	50
Životopis.....	53

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Monice Darrer**, naslova

IDENTIFIKACIJA AEROBNO MEZOFILNIH BAKTERIJA MALDI-TOF TEHNIKOM U MLIJEKU IZ MLJEKOMATA

U mlijeku dobivenom higijenskom mužnjom zdravih krava dozvoljeno je prema Pravilniku o kakvoći svježeg sirovog mlijeka do 100 000 mikroorganizama/mL što predstavlja prirodnu mikrobiotu mlijeka i nema negativan utjecaj na ukupnu kvalitetu mlijeka. Međutim, nestručnim rukovanjem tijekom i nakon mužnje ono se lako kontaminira te postaje potencijalan medij za rast i razmnožavanje mikroorganizama od kojih mogu biti štetni po zdravlje ljudi. Budući je broj aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku jedan od pokazatelja higijenske kvalitete mlijeka, njihova je brojnost i identifikacija temeljna u kontroli sirovog mlijeka iz mljekomata. Iz pet različitih mljekomata prikupljeno je 30 uzoraka kojima je određivan ukupni broj aerobno mezofilnih bakterija metodom protočne citometrije. Identifikacija se provodila usporedbom MALDI-TOF spektra masa s referentnim spektrima pohranjenim u biblioteci mikroorganizama i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa. Uspješno je identificirano 30 rodova i 51 bakterijska vrsta. Rodovi koji prevladavaju su *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyveromyces lactis*, *Staphylococcus aureus*.

Ključne riječi: sirovo mlijeko, aerobno mezofilne bakterije, MALDI-TOF tehnika

Summary

Of the master's thesis – student **Monica Darrer**, entitled

IDENTIFICATION OF AEROBIC MESOPHILIC BACTERIA USING THE MALDI-TOF TECHNIQUE IN MILK FROM MILK VENDING MACHINE

According to the Regulation on the Quality of Fresh Raw Milk, up to 100 000 microorganisms/mL are allowed in milk obtained by hygienic milking of healthy cows, which represents the natural microbiota of milk and has no negative impact on the overall quality of milk. However, with unprofessional handling during and after milking, it is easily contaminated and becomes a potential medium for the growth and reproduction of microorganisms, some of which can be harmful to human health. Since the number of aerobic mesophilic bacteria in milk is one of the indicators of the hygienic quality of milk, their number and identification are fundamental in the control of raw milk from milk vending machine. From five different milk vending machines, 30 samples were collected from which the total number of aerobic mesophilic bacteria was determined using the flow cytometry method and the classic method of counting colonies on a nutrient medium. Identification was performed by comparing MALDI-TOF mass spectra with reference spectra stored in the microorganism library and processing using the MALDI Biotyper computer program. 30 genus and 51 bacterial species were successfully identified. Genus that predominate are *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Kluyveromyces lactis*, *Staphylococcus aureus*.

Keywords: raw milk, aerobic mesophilic bacteria, MALDI-TOF technique

1. Uvod

Porast konzumacije svježeg sirovog mlijeka iz mljekomata bilježi se u većini država članica Europske unije u posljednjih deset godina. Najčešći razlozi povećane potražnje su zahtjevi potrošača za mlijekom veće nutritivne vrijednosti i boljeg okusa, koje nije podvrgnuto prethodnoj obradi (Oliver i sur., 2009; Giacometti i sur., 2013; Kunova i sur., 2017). Takav trend uočen je i u Republici Hrvatskoj unatoč činjenici da je sirovo mlijeko zbog svog bogatog kemijskog sastava vrlo pogodan medij za rast i razmnožavanje brojnih mikroorganizama, uključujući i određene patogene (Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu, 2016). Osnovni sastojci mlijeka – proteini (kazein i proteini sirutke), laktoza i mliječna mast imaju veliku biološku i hranjivu vrijednost te su na taj način neiscrpan izvor hrane za mikrobnu populaciju. Uz kemijski sastav, mlijeko svojim fizikalnim svojstvima također pridonosi brzom rastu i razmnožavanju velikog broja mikroorganizma, u prvom redu bakterija. Fizikalna svojstva mlijeka pogoduju njihovom rastu pa se tako mogu izdvojiti neutralna pH vrijednost mlijeka (6,8) koja je optimalna za većinu bakterijskih vrsta, oksidoredukcijski potencijal od +200 mV te aktivitet vode koji je veći od 0,98. Također, jedna od važnih karakteristika mlijeka je i visoki udio vode (87,5%) koji ima značajnu ulogu u metabolizmu bakterijskih stanica (Antunac i Havranek, 2013.).

Temeljem temperaturnog raspona rasta bakterije se dijele na: psihrofilne, psihrotrofne, mezofilne i termofilne. Mezofilne bakterije su one za čiji je rast i razmnožavanje optimalna temperatura između 20 – 45 °C, a aerobne bakterije su one za čiji je rast potreban kisik. Velikom broju mezofilnih bakterija optimalna temperatura rasta je 37 °C pa većina patogenih bakterija pripada upravo toj skupini (Samaržija, 2021.). Osim fizikalne i kemijske kvalitete, ukupnu kvalitetu sirovog mlijeka čini i higijenska kvaliteta. Ona je najvažniji i najvarijabilniji parametar, a određena je ukupnim brojem bakterija te ukupnim brojem somatskih stanica prisutnih u mlijeku. U mlijeku dobivenom higijenskom mužnjom zdravih krava, dozvoljeno je prema Pravilniku do 100 000 mikroorganizama/mL, što predstavlja prirodnu mikrobiotu mlijeka i nema negativan utjecaj na ukupnu kvalitetu mlijeka (Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka, NN 136/20). U slučaju da uvjeti dobre higijenske prakse nisu ispunjeni tijekom i nakon mužnje, mlijeko može biti kontaminirano iz niza izvora: zraka, vode, stelje, tla, stočne hrane, aparata za mužnju, opreme za skladištenje i transport mlijeka te ljudi.

Budući je broj mezofilnih bakterija jedan od pokazatelja higijenske kvalitete mlijeka, njihovo brzo i efikasno određivanje u mljekarskoj industriji jest prioritet. U tu svrhu koristi se standardna metoda protočne citometrije kao referentna metoda prema HRN ISO 4833-1 i kvantitativna metoda za određivanje ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija. Identifikaciju i klasifikaciju bakterijskih vrsta unutar skupine aerobno mezofilnih bakterija, iz 30 uzoraka mlijeka iz mljekomata na području grada Zagreba i Zagrebačke županije, provodila se matricom potpomognutom ionizacijom desorpcijom laserskog zračenja – analizatorom masa s vremenom leta (*engl.* Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight; MALDI-TOF) spektrometrijom masa. .

1.1. Cilj rada

Cilj ovog rada jest identificirati bakterijske vrste aerobno mezofilne skupine koje su tijekom ili nakon mužnje kontaminirale mlijeko dopremljeno u mljekomate pomoću MALDI-TOF metode.

2. Pregled literature

2.1. Sirovo mlijeko

Prema definiciji (Codex Stan 206 – 1999.) sirovo mlijeko prirodni je sekret mliječne žlijezde, dobiveno redovitom i neprekinutom mužnjom jedne ili više zdravih muznih životinja, pravilno hranjenih i držanih, kojem nije ništa dodano niti oduzeto, namijenjeno za konzumaciju kao tekući proizvod ili za daljnju preradu. Kodeksom o higijenskoj praksi za mlijeko i mliječne proizvode (*engl. Code of Hygienic Practices for Milk and Milk Products; CAC/RCP – 57 – 2004.*) sirovo mlijeko koje se stavlja u promet mora zadovoljiti i sljedeće kriterije kvalitete:

- ◆ da je proizvedeno nakon osam dana od poroda
- ◆ da ima svojstven izgled, boju, miris i okus
- ◆ da ne sadržava nikakve kemijske i/ili fizikalne štetne tvari
- ◆ da nije kontaminirano mikrobnim vrstama u broju koji mijenja sastav i svojstva mlijeka ili ga čini škodljivim za ljudsko zdravlje.

Sirovo mlijeko prema tim prihvaćenim higijenskim standardima (CAC/RCP – 57 – 2005.) ne smije sadržavati kontaminante u količini koja može ugroziti zdravlje ljudi. U tom se smislu sirovo mlijeko smatra higijenski ispravnim ako ne sadržava:

- ◆ patogene mikroorganizme ili viruse
- ◆ mikroorganizme iz skupine zoonoza
- ◆ bakterijske toksine i toksine plijesni
- ◆ ostatke veterinarskih lijekova
- ◆ okolišne kontaminante
- ◆ mikrobne uzročnike kvarenja u broju koji može promijeniti fizikalno-kemijska svojstva mlijeka.

2.2. Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem mljekomata

Mljekomat je automatizirani sustav za točenje i prodaju rashlađenih prehrambenih tekućina. Mljekomat ima vlastito hlađenje, miješalicu i sustav za ispiranje. U mljekomat se mogu postaviti hermetički zatvoreni tankovi od 200, 250 i 300 litara. Naplata se vrši kovanicama, uz mogućnost naplate novčanicama. Iako je primarno namijenjen za prodaju mlijeka, ovaj sustav se može koristiti i za prodaju sokova i sličnih prehrambenih tekućina. Postoje dva tipa mljekomata s kojih su uzimani uzorci za potrebe ovog istraživanja. Na prvom tipu mljekomata moguća je kupnja samo svježeg sirovog mlijeka, dok je na drugom tipu mljekomata, uz mlijeko moguće kupiti i druge mliječne proizvode.

Prema Pravilniku o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (NN 84/16) prodaju sirovog mlijeka na jednom automatu može obavljati samo jedan proizvođač mlijeka i to od životinja iz vlastitog uzgoja. Mlijeko koje se prodaje putem mljekomata je sirovo mlijeko, dakle ono koje nije podvrgnuto termičkom postupku, tj. nije zagrijavano na temperaturu višu od 40 °C. Europska agencija za sigurnost hrane (EFSA) izdala je Znanstveno mišljenje o javno - zdravstvenom riziku vezanom za konzumacijom mlijeka za piće gdje je obavezno upozoriti potrošače da je preporučena toplinska obrada mlijeka prije konzumacije (EFSA, 2015). Stoga se unazad nekoliko godina preporuka nalazi na mljekomatima.

Ovakav način prodaje temelji se na zakonskoj osnovi navedenoj u: Pravilniku o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (NN 84/16), čl. 10. *Sirovo mlijeko namijenjeno prodaji putem automata (mljekomati)* i Pravilniku o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (NN 84/15). Proizvođači sirovog mlijeka moraju osigurati ispunjavanje sljedećih zahtjeva: Mlijeko namijenjeno za javnu potrošnju mora potjecati od životinja (NN 84/16):

- ◆ koje ne pokazuju simptome zaraznih bolesti prenosivih na ljude putem mlijeka
- ◆ koje su dobrog općeg zdravstvenog stanja i ne pokazuju znakove bolesti koje bi mogle dovesti do kontaminacije mlijeka; nemaju vidljive upale vimena koje nemaju nikakve ozljede vimena
- ◆ kojima nisu davane nedopuštene tvari ili proizvodi
- ◆ kod kojih su se poštivale propisane karence ako su im davani odobreni veterinarsko-medicinski proizvodi.

Proizvođač mlijeka u skladu s posebnim propisima treba ispunjavati zahtjeve za brucelozu i tuberkulozu. Opremu za mužnju i prostor za skladištenje mlijeka mora se zaštititi od štetočina, odvojiti od prostora u kojem se drže krave te ih redovito održavati u čistom i ispravnom stanju na način da održavanje higijene olakša korištenjem glatkih, lako perivih površina koje se mogu čistiti i po potrebi dezinficirati. Kod same mužnje moraju se osigurati higijenski uvjeti kako bi se mlijeko zaštitilo od kontaminacije. Osoba koja obavlja mužnju nosi odgovarajuću čistu radnu odjeću, održava osobnu higijenu i ne smije bolovati od bolesti koja se može prenijeti hranom (niti je kliconoša) te ne posjeduje kožne infekcije, rane ili inficirane ozljede kao ni dijareju (NN 84/16). Mlijeko se odmah nakon mužnje obavljene u higijenskim uvjetima hladi na odgovarajuću propisanu temperaturu ($< 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ kod svakodnevne otpreme mlijeka ili $< 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ako nije svakodnevna otprema). U tu svrhu proizvođač mlijeka treba imati instaliranu odgovarajuću opremu za hlađenje (NN 84/16).

2.3. Mlijeko kao medij za mikrobn rast

Mlijeko je tekućina složenog sastava s više od 100 različitih kemijskih sastojaka i više od 100 000 različitih vrsta molekula. Kemijski sastojci mlijeka su voda, suha tvar koja se sastoji od mliječne masti, suhe tvari bez masti, proteina, laktoze i mliječnog pepela (Antunac, 2013).

Proteine mlijeka čini skupina kazeina koji se acidifikacijom ($\text{pH} = 4,6 / 20\text{ }^{\circ}\text{C}$) precipitiraju iz otopine i skupina proteina sirutke koji ostaju topljivi u vodi u tim uvjetima reakcije. Kazeinska micela sastoji se od četiri različita proteina: α_{S1} -kazein, α_{S2} -kazein, β -kazein, κ -kazein koji se nazivaju kazeinske frakcije. Proteine sirutke čine α -laktalbumin, β -laktoglobulin, serum albumini, imunoglobulini i proteoza-peptoni. U mlijeku su u malim količinama prisutni i topljivi proteini β -mikroglobulin, lizozim, laktoferin, transferin (oba proteina u svojoj strukturi sadržavaju željezo), feritin i kalmodulin (protein koji se vezuje uz kalcij) te skupina acil-glikoproteina. Nепroteinski dušik mlijeka čine urea, aminokiseline, amonijak i u tragovima kreatin, kreatinin, urična kiselina, nukleozidi, nukleotidi, pirimidini i purini. Mliječna mast u formi je globule čiju membranu čine fosfolipidi, glikoproteini, kolesterol, enzimi. Njezinu unutrašnjost čine saturirani lipidi u obliku triacil-glicerola (estera masnih kiselina i alkohola glicerola), diacil-glicerola, monoacil-glicerola, slobodne masne kiseline, fosfolipidi, kolesterol i polarni lipidi. Mliječni šećer, laktoza glavni je disaharid mlijeka sastavljen od heksoznih šećera D-glukoze i D-galaktoze povezanih β -1,4 glikozidnom

vezom. Minerali ili soli (pepeo) u mlijeku su prisutni u koloidnom i topljivom obliku, a samo neznatno u ionskom obliku. Oni su odgovorni za stabilnost fizikalno-kemijske ravnoteže u mlijeku, a u njih ubrajamo kalcij, kalij, natrij, klor, magnezij, mangan, selen, jod, krom, kobalt, molibden, fluor, bakar, željezo, aluminij, cink i bor (Samaržija, 2021).

Biološki sastojci mlijeka su vitamini (topljivi u vodi: vitamini B- skupine, pantotenska kiselina, folna i vitamin C i vitamini topljivi u mastima: A, D, E i K) i enzimi (katalaza, peroksidaza, fosfataza, lipaza, reduktaza, proteaza i brojni drugi) (Antunac, 2013).

Sastojci mlijeka nalaze se u tri različite faze. Većina sastojaka mlijeka nalazi se u obliku prave otopine koju čine laktoza, organske i anorganske soli, vitamini i druge male molekule topljive u vodi. U vodenoj otopini mlijeka nalaze se proteini, neki kao koloidne otopine (sirutkini proteini), a drugi kao veliki koloidni agregati (koloidne suspenzije), promjera od 50 do 600 nm (kazeini). Mliječna mast se u mlijeku nalazi kao emulzija u obliku masnih globula, promjera od 0,1 do 20 μm (Antunac, 2013).

Upravo zbog specifičnog kemijskog sastava mlijeko je idealan izvor hranjiva za rast i razmnožavanje mnogobrojnih mikrobnih vrsta. Vitamine, makroelemente (Ca, P, Mg, K, Na, Cl) i elemente u tragovima (Fe, Cu, Cr, Mn, Zn, I, Se, Ni, Mo, B, Al) te purine i pirimidine koriste svi mikroorganizmi, a za većinu vrsta su esencijalni. Protein, mliječna mast, laktoza, citrat, glukoza, galaktoza, topljivi dušik (urea, amonijak, aminokiseline) potencijalni su izvor ugljika i dušika mnogim mikroorganizmima. Mlijeko svojim raspoloživim kemijskim sastojcima prisutnim u formi makromolekula i mikromolekula brojnim mikrobnim vrstama bakterija, kvasaca i plijesni osigurava idealne uvjete sredine koja im omogućava rast do reda veličine od 10^9 cfu mL^{-1} .

Što se tiče fizikalnih svojstava koji značajno pridonose povoljnim uvjetima sredine za brzi rast mikroorganizama valja istaknuti:

- ◆ gotovo neutralnu pH vrijednost ($\sim 6,7$)
- ◆ visoki puforni kapacitet
- ◆ aktivitet vode (a_w) veći od 0,98
- ◆ oksidoredukcijski potencijal (Eh) od + 200 mV (Samaržija, 2021).

Tablica 1. Prosječan kemijski sastav kravljeg, ovčjeg i kozjeg mlijeka (Samaržija, 2021)

Vrsta mlijeka	VODA (%)	SBM* (%)	MLIJEČNA MAST (%)	PROTEIN (%)	KAZEIN (%)	ALBUMIN/ GLOBULIN (%)	NEPROTEINSKI N (%)
KRAVLJE	86,6	9,0	4,1	3,2	2,6	0,6	0,2
OVČJE	81,0	12,0	7,9	6,2	4,2	1,0	0,8
KOZJE	88,7	8,9	3,8	3,4	2,4	0,6	0,4

SBM*= suha tvar bez masti

2.4. Izvori mikrobne kontaminacije sirovog mlijeka

Prema autorima Antunac i Havranek (2013.) mikroorganizmi se nalaze svuda oko nas, u zemlji, zraku, u živim i mrtvim bićima. U mlijeko dolaze:

- ◆ iz unutrašnjosti vimena (kod bolesti ili oštećenja vimena)
- ◆ s površine sisa i vimena ($100 - 1\ 000\ \text{mL}^{-1}$)
- ◆ s ruku mužača ili njegove odjeće
- ◆ iz stroja za mužnju i mljekarske opreme i pribora ($< 3\ \text{milijuna}\ \text{mL}^{-1}$)
- ◆ iz zraka ($100 - 15\ 000\ \text{mL}^{-1}$)
- ◆ iz vode

Iako je u tablici 2 prikazano veći broj izvora kontaminacije, uglavnom se navode četiri osnovna izvora, a to su unutrašnjost vimena, vanjska površina vimena i sisa, postupak s mlijekom i oprema za mužnju.

Tablica 2. Izvori kontaminacije sirovog mlijeka na mliječnoj farmi (Antunac i Havranek, 2013.)

	ČOVJEK	ZRAK	TLO	VODA	HRANA	STELJA	VIME	FECES	OPREMA
<i>Acinetobacter</i>	+								
<i>Alcaligenes</i>				+					
<i>Bacillus</i>		+	+		+	+	+		+
BMK					+				
<i>Corynebacterium</i>							+		
<i>Clostridium</i>			+		+	+			
<i>Coryneforms</i>				+					
<i>Enterococcus</i>	+						+		
<i>E. coli</i>								+	
<i>Klebsiella</i>						+			
koliformne bakterije	+			+					+
<i>Listeria</i>					+			+	
<i>Micrococcus</i>		+					+		+
<i>Mycobacterium</i>			+					+	
<i>Pseudomonas</i>			+	+					
<i>Salmonella</i>	+							+	
<i>Serratia</i>	+								
<i>Staphylococcus</i>	+						+	+	
<i>Streptococcus</i>		+					+		+

Mlijeko je u vimenu zdrave životinje sterilno, ali neposredno nakon higijenski provedene mužnje ono sadržava 5 000 bakterija/mL koje potječu iz unutrašnjosti sisnog kanala vimena. Te bakterije uglavnom pripadaju termolabilnim vrstama roda *Micrococcus* i *Staphylococcus* (30 – 99 %) te vrstama rodova *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Lactobacillus* (1 – 50 %). Uz njih, prirodne kontaminante čini i zanemariv broj ostalih gram-pozitivnih i gram-negativnih (< 10 %) bakterija te kvasci i plijesni (< 10 %). Navedene mikrobne vrste nemaju

utjecaj na povećanje broja bakterija (aerobno mezofilnih, psihrotrofnih, termorezistentnih i koliformnih bakterija) u spremniku ni na povećanje njihove brojnosti tijekom hladne pohrane mlijeka. Znatno povećanje broja bakterija u mlijeku primarna je posljedica bolesti životinje i/ili infektivnog vimena te izostanka dobre proizvođačke i higijenske prakse na farmama (Samaržija, 2021).

Prirodna mikrobna populacija i broj mikroorganizama koji kontaminiraju mlijeko preko vanjskog dijela vimena i sisa i opreme za mužnju i prihvata mlijeka čine njegovu početnu mikrobnu populaciju. U uvjetima higijenski čiste mužnje, početna je mikrobna kontaminacija $< 10^4$ cfu mL⁻¹ i smatra se prihvatljivom za mikrobiološku kvalitetu sirovog mlijeka. Početnu mikrobnu populaciju mlijeka uglavnom čine: a) vrste gram-negativnih bakterija koje pripadaju rodovima *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* i *Enterobacter*; b) vrste gram-pozitivnih bakterija koje pripadaju rodovima *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc* i c) kvasci i plijesni. Suprotno, u nehigijenskim uvjetima mužnje mlijeko uvijek sadrži više od 10^6 cfu mL⁻¹ mikroorganizama koji mogu pripadati mikrobim vrstama brojnih rodova. Međutim, mikrobne vrste i njihova brojnost u sirovom mlijeku tijekom pohrane primarno su određeni temperaturom.

Kontaminacija sirovog mlijeka patogenim bakterijama učestala je ako se ne provodi sustavna kontrola mastitisa u stadu. Od mogućih mikrobnih uzročnika mastitisa (bakterije, virusi, kvasci, plijesni) bakterije su najčešće izolirani uzročnici te infekcije. Prvenstveno se to odnosi na bakterije *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Escherichia coli*. Od ostalih vrsta, rjeđi su uzročnici mastitisa bakterije *Corynebacterium pyogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp. i koagulaza-negativni stafilocoki (Samaržija, 2021).

Predispozicija za nastanak bakterijski upale vimena je:

- ◆ genetska (nepravilna građa)
- ◆ fiziološka (hranidba, hormonalni poremećaj)
- ◆ bolesti (opće loše zdravstveno stanje muzare, ozljede kože)
- ◆ vanjski utjecaji (nehigijenski uvjeti mužnje, tehnički neadekvatni dizajn muzne jedinice, smještaj) (Samaržija, 2021).

Vanjski dijelovi vimena i sisa također su čest izvor mikrobnog kontaminacije sirovog mlijeka. Fekalni materijal, stelja, blato ili zemlja lako mogu zaprljati vime i sise pa izostankom dobre proizvođačke i higijenske prakse biti izvor kontaminacije sirovog mlijeka tijekom i nakon mužnje. Primjerice, *Listeria* spp. patogene su bakterije koje dospjevaju u mlijeko tim putem. Od ostalih mikroorganizama, kao isključive posljedice loše higijenske prakse, dominantu populaciju u rashladnim spremnicima za sirovo mlijeko čine koliformne, korinebakterije, *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Micrococcus* spp., *Pseudomonas* spp. te druge vrste gram-pozitivnih rodova i kvasaca koje mogu rasti na niskim temperaturama. U usporedbi s prirodnom mikrobnom populacijom kože sisa i sisnog kanala, mikrobnog populacija čiji je izvor prljavo vime ima znatan utjecaj na povećanje broja svih mikrobnih skupina (ukupnih bakterija, koliformnih, termorezistentnih i psihrotrofnih bakterija). Bakterija *Pseudomonas fluorescens* zbog svoje sposobnosti najbržeg rasta u ohlađenom sirovom mlijeku, smatra se dobrim indikatorskim organizmom za procjenu mikrobnog kontaminacije preko prljavog vimena (Samaržija, 2021).

Loše očišćena oprema i prostor za mužnju postaju znatan izvor mikrobnog kontaminacije sirovog mlijeka. Naime, i najmanja količina mlijeka mjerena u mililitrima koja nije uklonjena iz sustava, postaje optimalna sredina za rast i razmnožavanje brojnim mikrobnim vrstama. U ostacima mlijeka bakterije se brzo razmnožavaju do reda veličine $10^7 - 10^8$ cfu mL⁻¹ (prosječno generacijsko vrijeme za većinu bakterijskih vrsta je 20 – 30 minuta). Preventivne su mjere jednostavne, jedini je zadani uvjet potpuna čistoća kompletne opreme i prostora za mužnju. Rashladne spremnike za mlijeko (laktofrize) zbog glatkih unutarnjih i vanjskih stijenki lako je čistiti pa oni ni u jednom slučaju ne smiju biti izvor mikrobnog kontaminacije sirovog mlijeka. Katkad, ako je riječ o tvrdoj vodi koja služi za njihovo pranje, u određenim intervalima treba ih očistiti kiselim deterdžentima (Samaržija, 2021).

Na mikrobiološku kvalitetu sirovog mlijeka neizravni učinak ima i kvaliteta hrane za životinje kao i voda za piće. Muzne životinje hranjene nekvalitetnom i zdravstveno upitnom hranom i koje piju higijenski neispravnu vodu mogu zadobiti probavne tegobe čija je posljedica najčešće dijareja. Uzročno-posljedično, i prostor u kojem životinje borave postaje nehigijensko okruženje. Probavne tegobe uzrokovane hranom ili vodom za piće mogu izazvati i štetne posljedice na opće zdravlje muznih životinja, ali i neizravno biti uzrok mastitisa. U takvim slučajevima, velika je vjerojatnost i za mikrobnog kontaminaciju sirovog mlijeka čiji je izvor prostor u staji. Primjerice, loša kvaliteta silaže može biti izvor određenih mikrobnih

vrsta i/ili bakterijskih spora koji se mogu proširiti unutar staje i potom mušnjom dospjeti u mlijeko (Samaržija, 2021).

Prema autorici Tratnik (1998.) najveću štetu u hrani i stelji čine termostabilne bakterije roda *Bacillus* i *Clostridium*. Feces stoke je najveći izvor enteropatogenih bakterija roda *Salmonella* i *Campylobacter* koje mogu onečistiti stelju, vime, kožu i sve što dolazi u doticaj sa sirovim mlijekom. Stočna hrana često je inficirana enteropatogenom bakterijom *L. monocytogenes*, koja ako ikad dospije u sirovo mlijeko, predstavlja veliku opasnost za mljekarsku industriju jer može rasti u hladno pohranjenom mlijeku pa i pri temperaturi ledišta vode te ukoliko kontaminira tankove za pohranu sirovog mlijeka, predstavlja veliki mikrobiološki problem zbog svoje sposobnosti za stvaranjem biofilma, a također je vrlo otporna na dezinficijense (Luana i sur., 2019).

Prisutnost velikog broja mikroorganizama (> 100 000 cfu/mL) mijenja primarna svojstva i osobine mlijeka. Te promjene se najčešće odnose na pogreške okusa, arome, mirisa ili konzistencije mlijeka odnosno mliječnih proizvoda u daljnjoj preradi. Međutim, svaka i najmanja promjena uzrokovana prisutnošću mikrobni uzročnika kvarenja odnosno štetnih mikroorganizama, umanjuje prehrambenu vrijednost proizvoda (Tratnik i Božanić, 2012). Smanjena kvaliteta posljedica je prisutnosti različitih kemijskih i biokemijskih spojeva koji mijenjaju izgled, teksturu, okus i aromu proizvoda. Tvorba tih spojeva uzrokovana je metaboličkom razgradnjom pojedinih sastojka proizvoda djelovanjem samih patogenih mikroorganizama (Walstra i sur., 1999). Većina štetnih mikroorganizama prilagodljive je prirode pa se vrlo brzo razmnožavaju kako u mlijeku tako i u mliječnim proizvodima koji su idealan medij za njihov rast i razvoj. U Republici Hrvatskoj, mikrobiološka kvaliteta sirovog mlijeka regulirana je odgovarajućim propisima koji se odnose na nalaz patogenih organizama i njihovih, po ljudsko zdravlje, štetnih metabolita (Hadžiosmanović, 1995)

Broj bakterija u mlijeku izražen je brojem kolonija (*eng.* Colony Forming Unit - CFU), uz broj somatskih stanica, količinu mliječne masti i proteina predstavlja podlogu na osnovu koje se mlijeko razvrstava u klase (I, II, III) i prema tome plaća (Antunac i Havranek, 2013).

2.5. Aerobno mezofilne bakterije u sirovom mlijeku

Mezofilne bakterije skupina su različitih bakterijskih vrsta za čiji je rast i razmnožavanje optimalna temperatura između 20 – 45 °C. Važna karakteristika ove skupine bakterija je nemogućnost rasta na niskim temperaturama, a najviša temperatura na kojoj mogu rasti je oko 52 °C (Antunac i Havranek, 2013). Velikom broju mezofilnih bakterija optimalna temperatura rasta je 37 °C, što je ujedno i čovjekova tjelesna temperatura pa većina patogenih bakterija pripada upravo toj skupini. Prema zahtjevu za kisikom skupina aerobno mezofilnih bakterija raste i razmnožava se jedino u njegovu prisustvu (Samaržija, 2021).

Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (UBB) označava razinu bakteriološke kontaminacije sirovoga mlijeka nakon mužnje odnosno ukazuje na adekvatnost kontrole temperature i postupaka sanitacije tijekom prerade, transporta i skladištenja i otkriva kontaminacije tijekom proizvodnje (Herrera, 2001). Mikrobne vrste koje čine UBB u sirovom mlijeku pripadaju isključivo uzročnicima kvarenja mlijeka i/ili patogenim bakterijama. Zbog toga, UBB dogovorno se koristi za procjenu higijenskih uvjeta u primarnoj proizvodnji mlijeka (Samaržija, 2021). Njihova prisutnost u sirovom mlijeku je neizbježna jer je većina ovih rodova prisutna u vimenu, na rukama mužača, površini opreme i u zraku. Na broj mezofilnih bakterija u mlijeku izravno utječu uvjeti u kojima se mlijeko nalazi nakon mužnje. Sirovo mlijeko s ukupnim brojem aerobno mezofilnih bakterija većim od 100 000 cfu/mL ukazuje na lošu higijenu tijekom mužnje i proizvodnje, dok broj aerobno mezofilnih bakterija manji od 5 000 cfu/mL ukazuje na dobru proizvođačku praksu. Adekvatno hlađenje, dobra proizvođačka praksa i higijena tijekom mužnje učinkovite su mjere kojima se uspješno sprječava naknadna kontaminacija mlijeka ovom skupinom bakterija (Luana i sur., 2019.).

U aerobne mezofilne bakterije koje nalazimo u sirovom mlijeku ubrajaju se rodovi *Micrococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* i ostale (Weisglass, 1989). Antunac i Havranek (2013.) svrstali su aerobno mezofilne bakterije sirovog mlijeka u glavne tipove: mikrokoki, streptokoki, asporogene Gram-pozitivne bakterije roda *Mycobacterium* i *Corynebacterium* te sporogene bakterije roda *Bacillus*.

2.6. Gram-pozitivne aerobno mezofilne bakterije

2.6.1. *Lactococcus* spp.

Taksonomski, rod *Lactococcus* pripada porodici *Streptococcaceae*, redu *Lactobacillales* i koljenu *Firmicutes*. Do sada, rod *Lactococcus* čini sedam opisanih vrsta: *L. lactis*, *L. garvieae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. fujiensis* i *L. chungangensis*. Za mljekarsku industriju značenje ima jedino vrsta *Lactococcus lactis* čije su prirodno stanište zelene biljke. Međutim, zbog svoje metaboličke aktivnosti u fermentaciji mlijeka ta se vrsta u potpunosti adaptirala na rast u mlijeku i mliječnim proizvodima (Aseel, 2019).

Lactococcus lactis mikroaerofilna je gram-pozitivna bakterija koja se morfološki pojavljuje u obliku koka (sferni oblik) često povezanih u lance, premda se može pojavljivati i u formi monokoka ili diplokoka. Homofermentativna je bakterija, a rastom u mlijeku više od 95% njezina krajnjega metaboličkog produkta razgradnje laktoze je L (+) izomer mliječne kiseline. Raste na temperaturi od 10 °C, ali ne i na temperaturi od 45 °C. Premda ima sposobnost korištenja proteina mlijeka slabi je proteolitički organizam (Oneyeaka, 2022).

Unutar vrste *L. lactis* razlikuju se dvije podvrste i jedan biovar:

- ◆ *L. lactis* subsp. *lactis*
- ◆ *L. lactis* subsp. *cremoris*
- ◆ *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*

U tehnološkom se smislu podvrsta *L. lactis* subsp. *cremoris* razlikuje u većoj toleranciji prema višim temperaturama i višoj koncentraciji soli. Bakterija *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* jedina ima sposobnost metabolizma citrata prisutnog u mlijeku u diacetil, CO₂ i druge organske spojeve. Određeni sojevi laktokoka imaju i sposobnost tvorbe egzopolisaharida (Samaržija, 2021).

2.6.2. *Enterococcus* spp.

Bakterije roda *Enterococcus* pripadaju porodici *Enterococcaceae*, redu *Lactobacillales* i koljenu *Firmicutes*. Vrste unutar tog roda ne smatraju se osobito značajnim u prehrambenoj industriji. Ipak, određeni sojevi vrsta *E. faecium* i *E. faecalis* koriste se za sastav dopunskih kultura u proizvodnji nekih vrsta sireva te u svojstvu probiotičkih sojeva u prevenciji i liječenju intestinalnih tegoba u ljudi (Samaržija, 2021).

Enterokoki pripadaju gram-pozitivnim bakterijama s niskim mol % udjelom G + C u DNA molekuli. Morfološki se često pojavljuju u formi diplokoza u parovima ili kratkim lancima. Na temelju samo morfoloških karakteristika teško ih je razlikovati od streptokoka. Fakultativno su anaerobni i katalaza negativni organizmi. Sve vrste enterokoka pokazuju prirodnu otpornost na toplinu (preživljavaju zagrijavanje medija na ~ 60 °C/min) isušivanje i dezinfekcijska sredstva. Rastu na temperaturi između 10 i 45 °C i u mediju pH-vrijednosti između 4,0 i 9,6 te podnose relativno visoke koncentracije soli (6,5 %). Enterokoki pokazuju jaču proteolitičku aktivnost, imaju sposobnost razgradnje mliječne masti esterazama, a citratnim metabolizmom tvore aromatične spojeve poput diacetila, acetoina i acetaldehida. Homofermentativne su bakterije koje iz laktoze stvaraju DL ili L (+) laktat (Samaržija, 2021; Amidi-Fazli, 2022).

2.6.3. *Leuconostoc* spp.

Bakterije *Leuconostoc* spp. pripadaju porodici *Leuconostocaceae*, redu *Lactobacillales*, koljenu *Firmicutes*. Prema dosadašnjim spoznajama tom rodu pripada 19 opisanih vrsta i 6 podvrsta. Filogenetski je srodan rodovima *Lactobacillus* i *Pediococcus*, a zbog morfoloških svojstava pripada skupini mezofilnih heterofermentativnih koka (Samaržija, 2021).

Rod *Leuconostoc* su gram-pozitivne, mezofilne (~ 25 °C) bakterije koje imaju manje od 55 mol % G + C u svojim DNA molekulama. Nepokretne su, fakultativno anaerobne, katalaza negativne i vankomicin rezistentne bakterije. Za razliku od laktokoka koji iz glukoze stvaraju L (+) laktat i heterofermentativnih laktobacila koji iz glukoze stvaraju DL laktat, bakterije *Leuconostoc* spp. iz glukoze stvaraju izključivo D (-) laktat. Izgled im je varijabilan i često određen medijem u kojem rastu. Najčešće se pojavljuju u paru u formi koka ili tvore kratke lance, ali se mogu pojavljivati i u obliku bacila ili tvoriti nakupine. Neki sojevi tih vrsta imaju i sposobnost tvorbe egzopolisaharida. Slabo rastu u mlijeku zbog nedostatka dovoljne proteolitičke aktivnosti i stoga zahtjevaju dodavanje ili stvaranje aminokiselina ili peptida drugih mikroorganizama kako bi se potaknuo njihov rast. Imaju sposobnost stvaranja plina CO₂ koji je odgovoran za nastajanje oči kod nekih vrsta sireva, metaboliziraju laktozu i citrat te proizvode laktat, acetat, etanol, acetaldehid, diacetil, acetoin i 2,3-butilen glikol koji doprinose organoleptičkim svojstvima fermentiranih mliječnih proizvoda (Luana i sur., 2019).

Za mljekarsku industriju zbog sposobnosti fermentacije laktoze i citrata značenje imaju vrsta *Lc. lactis* i dvije podvrste *Lc. mesenteroides* subsp. *cremoris* i *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (Samaržija, 2021).

2.6.4. *Pediococcus* spp.

Bakterije roda *Pediococcus* taksonomski pripadaju porodici *Lactobacillaceae*, redu *Lactobacillales*, koljenu *Firmicutes*. Vrste tog roda homofermentativni su organizmi, a iz glukoze gotovo sve vrste stvaraju DL izomer mliječne kiseline. Nerado za izvor ugljika koriste laktozu i zbog toga one u mlijeku relativno slabo rastu. Neke od tih vrsta pokazuju iznimnu toleranciju na visoku temperaturu, veliki raspon pH-vrijednosti i visoke koncentracije NaCl u mediju. Morfološki su stanice pediokoka okruglog oblika, nikada nisu izdužene, pojedinačne stanice su rijetke, a nikada ne stvaraju lance već se pojavljuju u parovima ili nakupinama (Samaržija, 2021).

2.6.5. *Streptococcus* spp

Rod *Streptococcus* sastoji se od 97 vrsta i 17 podvrsta. U sirovom mlijeku često nalazimo *S. agalactiae*, *S. lactis* i *S. cremoris*. U ovu grupu ubrajaju se i mnoge patogene bakterije. *Streptococcus agalactiae* u sirovo mlijeko dospijeva preko vimena krava koje imaju mastitis i uzrokuje smanjenje kvalitete mlijeka jer se u njemu povećava broj leukocita i alkalitet mlijeka. *Streptococcus faecalis* u sirovo mlijeko dospijeva iz okoline, odnosno fekalnog je porijekla, što znači da u mlijeko dospijeva pri nehigijenskoj mužnji i čuvanjem mlijeka u nečistim kantama. *Streptococcus pyogenes* je isto tako patogena jer kod ljudi izaziva gnojne upale, septikemiju i groznicu.

Streptokoki su gram-pozitivne bakterije, morfološki okruglog oblika te se raspoređuju u oblik lanca ili niti. S obzirom na potrebu za kisikom pripadaju skupini fakultativno anaerobnih bakterija i nepokretne su. Bakterije ovog roda rastu na temperaturama 10 – 45 °C te time pripadaju skupini mezofilnih bakterija.

Mnogi streptokoki koje nalazimo u sirovom mlijeku uzrokuju mastitis (npr. *S. uberis*). Patogeni streptokoki povezani s mastitisom obično nastane sisni kanal i u mlijeko dospijevaju tijekom mužnje. Prisutnost ovih mikroorganizama narušava kvalitetu mlijeka i kvalitetu mliječnih proizvoda (Luana i sur., 2019).

2.6.6. *Lactobacillus* spp.

Rod *Lactobacillus* pripada porodici *Lactobacillaceae*, redu *Lactobacillales*, koljenu *Firmicutes*. Prema broju vrsta unutar skupine bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus* spp. najveći je i za mljekarsku industriju najvažniji rod. Ima široku rasprostranjenost u prirodi, bakterijske vrste ovog roda mogu se naći u hrani (mliječni proizvodi, fermentirano meso, voće, povrće, bezalkoholna pića), respiratornom, gastrointestinalnom i genitalnom sustavu ljudi i životinja te silaži i drugom biljnom materijalu.

Vrste roda *Lactobacillus* su gram-pozitivne nesporetvorne bakterije koje se pojavljuju u obliku bacila (štapića) koji su često izduženi i/ili filamentozni ili su oblikom kokobacili. Fiziološka osnova za daljnju podjelu vrsta unutar roda *Lactobacillus* obično je prisutnost ili odsutnost ključnih enzima fruktoza-1,6-difosfat aldolaze i fosfoketolaze, odgovornih za homofermentativnu ili heterofermentativnu fermentaciju. Na temelju te podjele vrste roda *Lactobacillus* svrstavaju se u tri skupine: obligatni homofermentativni laktobacili, fakultativno heterofermentativni laktobacili, obligatno heterofermentativni laktobacili.

Od bakterija prve fiziološke skupine laktobacila, u sustavu mikrobnih kultura najčešće se koriste *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* i *L. helveticus*. Te vrste u usporedbi s vrstama laktobacila iz drugih dviju skupina mogu rasti na višim temperaturama (> 45 °C). U odnosu na sve ostale bakterije mliječne kiseline te su vrste najtolerantnije na kiseli medij. Za početan rast u mediju zahtijevaju pH između 5,5 i 6,2, a fermentacijom laktoze pH mlijeka snižavaju na < 4. *L. acidophilus* iz sastava kultura zbog homofermentativne razgradnje laktoze ubraja se u prvu fiziološku skupinu. Inače, određeni sojevi *L. acidophilus* u mljekarskoj se industriji primarno koriste u funkciji promotora ljudskog zdravlja. U monokulturi laktobacili sporo rastu u mlijeku pa se najčešće kao kultura koriste u kombinaciji s bakterijom *S. thermophilus* (Samaržija, 2021).

2.6.7. *Micrococcus* spp.

Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da postoje 10 vrsta bakterija koje taksonomski pripadaju rodu *Micrococcus*. Prisutni su u tlu, slatkoj vodi te na koži čovjeka i životinje. *Micrococcus* spp. su aerobni, gram-pozitivni koki veličine od 0,5 do 2,0 µm u promjeru. Javljaju se u parovima, tetradama ili grozdovima, ali ne u lancima. Oni su katalaza pozitivni i često oksidaza pozitivni. Formiraju pigmentirane crvene ili žute kolonije, a optimalna

temperatura rasta iznosi od 25 do 37 °C. Mikrokoki su halotolerantni, odnosno podnose visoku koncentraciju soli te mogu rasti u koncentracijama soli od 5 % (Betts, 2006.)

2.6.8. *Bifidobacterium* spp.

Taksonomski, bakterije *Bifidobacterium* spp. pripadaju porodici *Bifidobacteriaceae*, redu *Bifidobacteriales*, razredu *Actinobacteria* i koljenu *Actinobacteria*. Unutar tog roda trenutno je opisano više od 48 vrsta, a podijeljene su u šest glavnih filogenetskih skupina: *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. pullorum*, *B. asteroides* i *B. pseudolongum*.

Vrste roda *Bifidobacterium* karakterizira visoki postotak zastupljenosti GC veza u DNA molekulama, koji varira od 54 do 67 mol %. Većina bakterija ovog roda sposobna je razgrađivati kompleksne ugljikohidrate. Bifidobakterije su gram-pozitivne, ne tvore spore i ne stvaraju plinove, katalaza su negativne osim *B. indicum* i *B. asteroides* vrsta. Prema zahtjevu za kisikom striktni su anaerobi iako određeni sojevi mogu tolerirati određenu koncentraciju kisika bolje od ostalih anaerobnih bakterija. Najbolje rastu u temperaturnom rasponu od 36 do 46 °C, a ne rastu na temperaturi < 20 °C i > 46 °C. U odnosu na bakterije mliječne kiseline slabije podnose kiselu sredinu i mogu rasti jedino u mediju pH-vrijednosti > 4,6.

Morfološki bifidobakterije imaju višestruko razgranati štapićasti oblik stanice i ovisno o uvjetima u kojima rastu pokazuju visok stupanj polimorfizma. Često bakterijska stanica ima oblik slova Y, ali sve stanice iz iste kulture ne moraju se pojavljivati u tom obliku već mogu biti pojedinačni kratki ravni štapići u lancima ili nakupinama.

U mljekarskoj se industriji koriste jedino probiotički sojevi vrsta *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* i *B. longum*. Za rast i preživljavanje tih probiotičkih sojeva u proizvodu nužna je prisutnost *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *S. thermophilus* ili drugih vrsta laktobacila (Samaržija, 2021).

2.7. Gram-negativne aerobno mezofilne bakterije

2.7.1. *Acinetobacter* spp.

Acinetobacter je rod bakterija iz razreda *Gammaproteobacteria*. Veliki broj vrsta koje uključuje prepoznate su kao patogeni mikroorganizmi (Carvahlo, 2023.) *Acinetobacter* spp. su gram-negativni kokobacili koji su striktni aerobi. Katalaza su pozitivni, a oksidaza negativni. Vrlo dobro rastu na temperaturama između 20 – 30 °C što ih čini mezofilima.

Rastu na medijima s prisustvom acetata, laktata ili piruvata što koriste kao izvor energije za rast i razmnožavanje. Ovaj rod čine štapičaste bakterije veličine 1 – 2,5 µm. Obično formiraju parove ili duge lance različitih duljina. Boja kolonija je obično bez pigmenta, bijela ili žućkasto bijela veličine 1 – 2 mm. Rod *Acinetobacter* je heterogena skupina bakterija koje žive kao saprofiti i mogu se naći gotovo svugdje u okolišu. Određene vrste roda povezuju se s raznim staništima kao što je tlo, voda, kanalizacija, čovjek, hrana i životinje. Ovaj rod smatra se normalnom florom ljudske kože i ljudskih respiratornih sekreta. Bakterije ovog roda često se povezuju s raznim bolestima kao što su pneumonija i septikemija. Vrsta *A. baumannii* otkrivena je u različitim prehrambenim proizvodima, kao što su svježe voće i povrće te sirovo mlijeko i mliječni proizvodi te se povezuje s raznim urinarnim i respiratornim infekcijama i meningitisom (Saad, 2018.)

2.7.2. *Serratia* spp.

Rod *Serratia* čine gram-negativne štapičaste bakterije. Većina je pokretna, zahvaljujući prisustvu flagela. Neki sojevi posjeduju kapsulu. Prisustvo kapsule je karakteristika koja bitno utječe na virulenciju ovih bakterija. Do danas je opisano oko 20 vrsta bakterija ovog roda, a izdvajaju se *Serratia marcescens* i *Serratia liquefaciens* koje se nalaze posvuda u okolišu i mogu izazvati infekcije kod ljudi i mnogih životinjskih vrsta uključujući i mastitis kod krava. Ovaj rod bakterija izoliran je iz vode, tla, iz raznih vrsta biljaka i insekata, nalazimo ih i u okolišu staje, posebice na ležištu i na muznoj opremi te u fecesu krava. Imaju sposobnost tvorbe biofilma na teško dostupnim površinama mljekarske opreme. Isto tako imaju sposobnost tvorbe termorezistentnih enzima i smatraju se čestim uzročnicima kvarenja mlijeka u fazi proizvodnje i prerade. Iako ovaj rod često uzrokuje probleme u mljekarskoj industriji, podvrsta *S. liquefaciens* može biti bitna za zrenje sireva od sirovog mlijeka zbog svoje preteolitičke aktivnosti (Friman i sur., 2019.).

Vrsta *S. marcescens* uzrokuje bolesti kod ljudi. Ova vrsta je aerobna gram-negativna bakterija koja uzrokuje dječju upalu pluća, posebno kod djece s oslabljenim imunim sustavom. Prema autoru Friman i sur. (2019.) povezuje se i s još nekim bolestima kao što su infekcija mokraćnog trakta ili respiratornog sustava pri čemu često uzrokuje i apscese na plućima. Može biti uzročnik meningitisa, sepse i endokarditisa. Gram-negativne bakterije ne izlučuju toksine kao što to čine gram-pozitivne bakterije. Njihovi endotoksini dio su lipopolisaharida bakterije. Većina se oslobađa tek tijekom lize stanica, ali neki se mogu

osloboditi tijekom stanične diobe. Kao i kod infekcija uzrokovanih stafilokokom, infekcije uzrokovane ovim rodovima bakterija ne mogu se izliječiti antibioticima.

2.8. Patogene bakterije

2.8.1. *Staphylococcus aureus*

Rod *Staphylococcus* pripada porodici *Staphylococcaceae* i koljenu *Firmicutes*, a čine ga do danas priznatih 49 vrsta i 26 podvrsta. Na temelju sposobnosti koagulacije plazme kunića, stafilokoki se dijele u dvije skupine, koagulaza pozitivni i koagulaza negativni stafilokoki. Od koagulaza pozitivnih stafilokoka jedino se *Staphylococcus aureus* smatra patogenom vrstom koja se može prenositi hranom. Patogenost je *S. aureus* u hrani povezana s enterotoksičnim sojevima koji sintetiziraju termostabilne enterotoksine. Zbog toga svojstva, uz *E. coli*, *Shigella*, *Bacillus* i *Clostridium* vrste, *S. aureus* se smatra vodećim uzročnikom otrovanja hrane toksinima. Od ukupnog su trovanja hranom kontaminiranom enterotoksičnim sojevima *S. aureus*, mlijeko i mliječni proizvodi uzrok u 5 % slučajeva. Dodatno, za mljekarsku je industriju bakterija *S. aureus* značajna i kao najčešći uzročnik infektivne upale vimena krava, koza i ovaca.

Staphylococcus aureus je gram-pozitivna fakultativno anaerobna bakterija, ali bolje raste u aerobnim uvjetima. Pojavljuje se u formi karakterističnih grozdastih nakupina koka. Sposobna je fermentirati različite šećere u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Raste na temperaturama u rasponu od 7 do 48 °C (optimalna 37 °C) i u uvjetima pH-sredine između 4 i 10 (optimalan pH 6 - 7). Katalaza je pozitivna i to svojstvo razlikuje je od ostalih gram-pozitivnih streptokoka, enterokoka i laktokoka (Samaržija, 2021).

2.8.2. *Yersinia enterocolitica*

Vrste roda *Yersinia* su gram-negativne štapičaste fakultativno anaerobne bakterije koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae* te su izolirane iz probavnog trakta svih domaćih životinja i okoliša. Od danas poznatih 15 vrsta za čovjeka su patogene tri: *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* i *Yersinia pseudotuberculosis*.

Y. enterocolitica prepoznata je kao patogena bakterija koja se prenosi hranom tek 1976. godine, a danas je zbog konzumacije zaražene hrane treća najčešća zoonoza. Patogenost je bakterije *Y. enterocolitica* povezana sa sposobnošću sinteze termostabilnog enterotoksina i njezinim mnogobrojnim virulentnim faktorima. U zaraženih je osoba jersinioza akutna infektivna bolest koja se najčešće iskazuje gastroenterokolitisom. Za određene je serotipove

Y. enterocolitica utvrđeno da osim gastrointestinalnih bolesti mogu biti i uzročnici drugih bolesti koje uključuju kožne bolesti, endokarditis, upalu pluća, upalu grla i meningitis. Pojavnost ove bakterije u sirovom kravljem, ovčjem i kozjem mlijeku je od 1 do 37 %.

Navedena bakterijska vrsta je sposobna rasti u rasponu temperatura od 0 do 44 °C, a optimalna temperatura joj je od 22 do 28 °C. Raste u mediju s pH-vrijednošću od 4,6 do 9, ali preferira alkalne uvjete. Karakteristično je da ima dobru kompetitivnu sposobnost rasta s mikrobnim uzročnicima kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda zbog čega sirovo mlijeko ili mliječni proizvodi od sirovog mlijeka mogu biti značajni prijenosnici infekcije.

Nadalje, uništavaju je svi temperaturno-vremenski uvjeti toplinske obrade sirovog mlijeka, ali ne i njezine termostabilne enterotoksine (Samaržija, 2021).

2.8.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli je gram-negativna, fakultativno anaerobna nesporotvorna bakterija i jedina je vrsta roda *Escherichia* koji pripada porodici Enterobacteriaceae. Prirodni je stanovnik u distalnom dijelu tankog crijeva i u debelom crijevu zdravih ljudi i toplokrvnih životinja. Uz ostale mikrobnе vrste crijevne mikrobiote, bakterija *E. coli* sudjeluje u razgradnji ostataka hrane i resorpciji nutrijenata. Prema serotipu, mehanizmu patogenog djelovanja, kliničkim simptomima i virulentnim faktorima svrstavaju se u sedam seroloških skupina.

Od šiga-toksigenih sojeva, serotip *E. coli* O157:H7 svrstan je u najopasnijeg uzročnika epidemijskih bolesti uzrokovanih trovanjem hranom. Morfološki i fiziološki *E. coli* O157:H7 slična je komenzalnim sojevima *E. coli*, koji čovjeku ne uzrokuje štetu. Optimalna temperatura rasta te bakterije je 37 °C, optimalni pH 6 – 7, a optimalan a_w 0,99. Od nepatogenih se sojeva *E. coli* razlikuje prema nemogućnosti rasta na temperaturi nižoj od 10 te višoj od 45 °C.

Glavni su prijenosnici serotipa *E. coli* O157:H7 uglavnom zdrava goveda, ovce i koze koje se drže na farmama. Muzne krave bez vidljivih simptoma bolesti u 2 – 6 % slučajeva fecesom izlučuju *E. coli* O157:H7 u okoliš, a ovce u približno 0,7 % slučajeva. Vrlo brzo životinjska koža ili runo te uprljano vime postaju njihov dodatan izvor. U proizvodnom se okruženju farme ovaj soj može širiti i oralno-fekalnim putem kao i s osobe na osobu koja opslužuju muzne životinje. U tom je smislu pojava *E. coli* O157:H7 u sirovom mlijeku posljedica ili izravne kontaminacije fekalno uprljanim vimenom i sisama ili neizravno preko vimena uprljanim zemljom, hranom, steljom, nečistom opremom za mužnju i manipulacijom

mlijekom zaražene osobe. Prolaskom kontaminiranoga sirovog mlijeka kroz opremu za mužnju i pohranu na farmi i u mljekari ona postaje dodatak izvor njezina širenja. Bakterija *E. coli* O157:H7 u približno 2 – 10 % slučajeva kontaminira sirovo mlijeko (Samaržija, 2021).

2.9. Metode određivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Ukupna kvaliteta sirovog mlijeka određena je kemijskim sastavom i higijenskom kvalitetom mlijeka. Ukupan broj bakterija u sirovom mlijeku i broj somatskih stanica su parametri koji određuju higijensku kvalitetu mlijeka. Kontrola higijenske kvalitete sirovog mlijeka je nužna za osiguranje zdravstvene ispravnosti mlijeka i mliječnih proizvoda. Prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 136/20), mlijeko svakog proizvođača se procjenjuje na temelju higijenske kvalitete sirovog mlijeka. Na osnovu higijenske kvalitete sirovog mlijeka ono se svrstava u 2 razreda: I razred $\leq 100\ 000$ i II razred $> 100\ 000$ mikroorganizama u 1 mL. Za svrstavanje u navedene razrede uzima se za broj somatskih stanica geometrijska sredina rezultata analiza u posljednja 3 mjeseca, a za ukupan broj bakterija uzima se geometrijska sredina u posljednja 2 mjeseca.

Postoje direktne i indirektne metode određivanja ukupnog broja bakterija. U direktne metode pripadaju brojanje bakterija na čvrstom hranilištu i mikroskopske metode. Druga podjela ovih metoda je na kvantitativne i kvalitativne. Kvalitativnim metodama određuje se samo prisutnost određenih bakterijskih vrsta, a kvantitativnim metodama određuje se broj prisutnih bakterija (Samaržija, 2021).

2.9.1. Klasična metoda utvrđivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Klasična metoda utvrđivanja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku odabrana je kao referentna metoda i standardizirana ISO standardom 4833-1:2013. Riječ je o horizontalnoj metodi temeljenoj na tehnici zalijevanja standardne mikrobiološke podloge na inokuliran uzorak u Petrijevu zdjelicu. Nakon inkubacije uzorka na temperaturi od 30 °C/72 sata utvrđuje se broj poraslih bakterijskih kolonija. Svaka kolonija razvija se iz pojedinačne bakterijske stanice i može sadržavati milijun i više pojedinačnih stanica. Radi usporedivosti rezultata, dogovorom je usvojeno da svaka kolonija predstavlja jednu bakterijsku stanicu i da se njihov broj izražava jedinicom cfu (*engl.* Colony Forming Unit) mL⁻¹. Za što točniju

procjenu rezultata propisano je i to da se u analizi koriste jedino one Petrijeve zdjelice na kojima je poraslo između 25 i 250 kolonija (cfu mL⁻¹).

Ukupan broj bakterija u 1 mL mlijeka potom se izračunava prema formuli:

$$\text{cfu} = \frac{\Sigma C}{(n1 + 0,1 \times n2) \times d}$$

cfu = broj bakterija u mililitru analiziranog uzorka

ΣC = zbroj svih poraslih kolonija na svim izbrojivim Petrijevim zdjelicama

n1 = broj Petrijevih zdjelica u prvom izbrojivom razrjeđenju

n2 = broj Petrijevih zdjelica u drugom izbrojivom razrjeđenju

d = prvo brojivo razrjeđenje

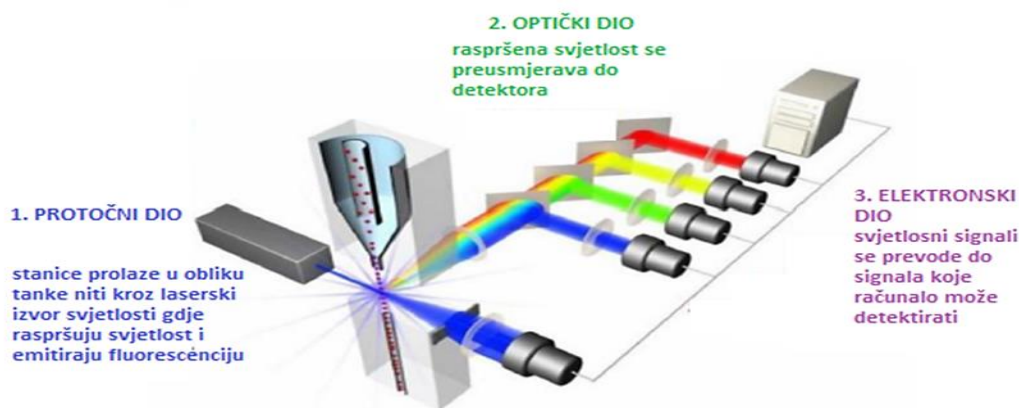
2.9.2. Metoda protočne citometrije

U mljekarskoj se industriji za analizu aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku danas uglavnom koristi brza instrumentalna metoda protočne citometrije koju je kao standardnu metodu na temelju njezine sukladnosti s ISO/IDF standardima verificirao EU Referentni laboratorij (EU-RL). Temeljna je razlika između klasične i metode protočne citometrije u iskazanom rezultatu. Za razliku od klasične, metodom se protočne citometrije u mlijeku utvrđuju i žive i nežive bakterijske stanice, a njihov se broj izražava kraticom IBC (*engl.* Individual Bacterial Count). Zbog toga, linearnom regresijom se broj IBC mora konvertirati u cfu broj u jednom mL mlijeka koji odgovara i prihvaća se kao dogovorena točnost. Nakon početne konverzije rezultata ukupan broj bakterija na zaslonu instrumenta prikazuje se i kao IBC i kao njegov ekvivalent izražen u cfu mL⁻¹.

Metoda protočne citometrije za utvrđivanje aerobno mezofilnih bakterija u mlijeku temelji se na fluorescenciji specifičnim reagensom obojene deoksiribonukleinske kiseline (DNK) svake bakterijske stanice prolaskom kroz kapilarnu mlaznicu. Osvijetljena laserskim snopom obojena stanica emitira fluorescentni svjetlosni impuls koji se skuplja optičkim sustavom, a fotoelektroničnim detektorom instrumenta prevodi u električni impuls. Optički sustav odgovoran je za osvjetljenje i sakupljanje svjetlosti unutar protočnog citometra, a sastoji se od lasera, leća i filtera. Detektori registriranu emitiranu fluorescenciju i raspršenu

lasersku svjetlost pretvaraju u fotoelektrični impuls i prosljeđuju u elektronički sustav koji služi za digitalizaciju i obradu podataka.

Osim brzine, u prednost te se metode ubraja i mogućnost detekcije izrazito malog broja bakterija od 1 500 do izrazito velikog broja od 10 000 000 cfu mL⁻¹. Prednost metode ogleda se i u mogućnosti da proizvođači u jednom danu riješe problem vezan za povećan broj bakterija u mlijeku. Drugim riječima, u relativno kratkom vremenu mogu dobiti odgovor je li taj problem povezan s nedovoljno očišćenom opremom, hlađenjem mlijeka ili sa zdravstvenim problemima u stadu (Samaržija, 2021).

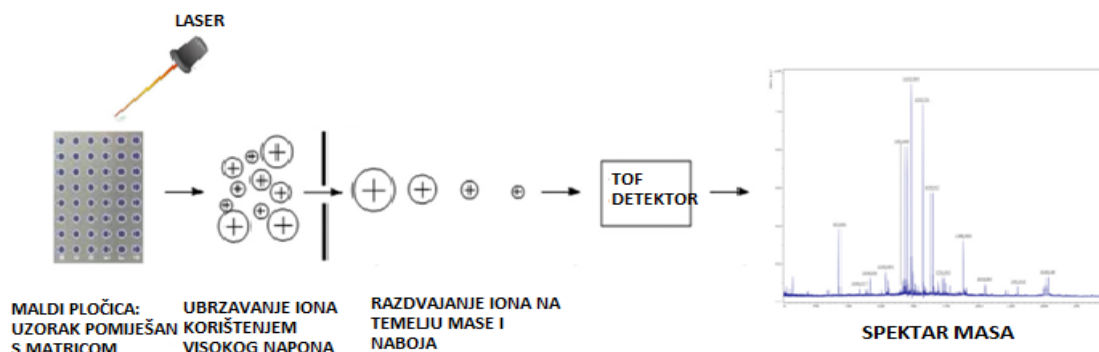


Slika 1. Princip rada instrumenta za protočnu citometriju s glavnim dijelovima (<https://www.iitk.ac.in/che/pdf/resources/Flow-Cytometry-reading-material.pdf>)

2.9.3. MALDI-TOF tehnika identifikacije aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Spektrometrija masa analitička je tehnika koja se koristi za identifikaciju nepoznatih spojeva, za određivanje strukturnih i kemijskih svojstava molekula te za kvantitativna mjerenja poznatih spojeva. Temelj spektrometrije masa je razdvajanje iona uzorka koji se analiziraju prema odnosu mase i naboja (m/z) u vakuumu. Osnovni dijelovi spektrometra masa su izvor iona, analizator i detektor. Do danas su razvijena različita instrumentalna rješenja koja se temelje na kombiniranju različitih sustava ionizacije (elektronskim udarom (EI), brzim atomima/ionima (FAB/FIB), elektroraspršenjem (ESI), kemijska (CI), desorpcijom laserskim zračenjem (LDI), matricom potpomognuta ionizacija desorpcijom laserskog zračenja (MALDI)) s različitim sustavima analizatora masa (magnetski sektorski, kvadrupolni, ionska stupica (IT), ionsko-ciklotronskom rezonancijom (ICR), s vremenom

proleta (TOF)). MALDI-TOF tehnika razvijena je 1987. godine što je omogućilo analizu termički nestabilnih biomolekula velikih masa (Karas i sur., 1987.).

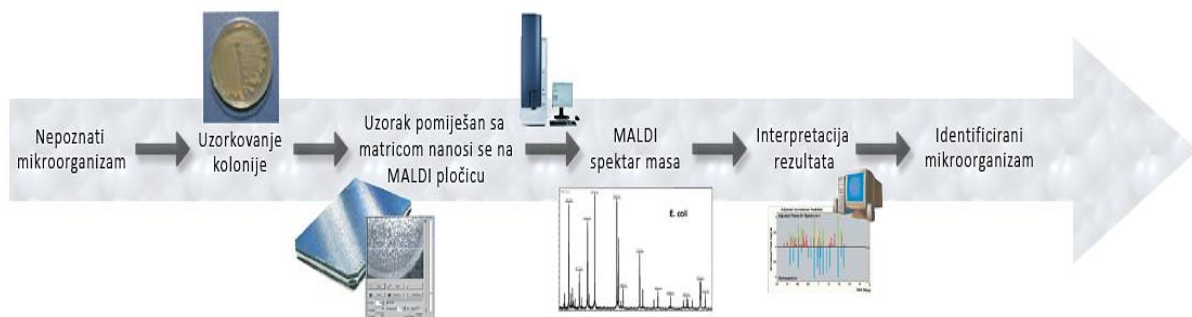


Slika 2. Dijagram tijekom rada MALDI TOF spektrometra masa (Singhal i sur.,2015.)

Uzorak za analizu priprema se miješanjem analita s otopinom organskog spoja koji apsorbira energiju laserskog zračenja, a naziva se matrica. Matrice koje se najčešće koriste su: α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina, 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, sinapinska kiselina. Otopina u kojoj se matrica otapa sastoji se od vode, organskog otapala (acetonitril, metanol ili etanol) i jake kiseline poput trifluorooctene kiseline. Uzorak unutar matrice ionizira se pomoću laserskog snopa što uzrokuje brzo zagrijavanje uzorka i prelazak u plinovitu fazu. Desorpcija i ionizacija laserskim snopom uglavnom generira pojedinačno protonirane ione iz analita u uzorku. Protonirani ioni potom se ubrzavaju u električnom polju s fiksnim potencijalom, pri čemu se oni međusobno odvajaju na osnovi njihovog omjera mase i naboja. Detektor bilježi broj iona pri svakoj vrijednosti m/z što rezultira stvaranjem spektra masa (Singhal i sur., 2015.).

Ova tehnika uspješno se koristi u istraživanjima za određivanje mase proteina i peptida te identifikaciju dosad nepoznatih proteina. Identifikaciju i klasifikaciju mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice (kvasci) i plijesni danas je moguće provesti brzo i jednostavno uz MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) sistem koji se sastoji od MALDI-TOF spektrometra masa, MALDI Biotyper računalnog programa za rad i analizu, biblioteke mikroorganizama i jednostavne metode za pripremu uzorka. Postupak identifikacije MALDI-TOF tehnikom počinje nanošenjem kolonije mikroorganizma kojeg želimo identificirati na MALDI pločicu, slijedi dodavanje matrice i unos u instrument gdje snimanje rezultira karakterističnim spektrima masa proteina za svaki mikroorganizam (*engl.* „fingerprint“).

Identifikacija i klasifikacija mikroorganizama provodi se usporedbom spektra uzorka s referentnim spektrom iz biblioteke mikroorganizama i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa. Računalni program uspoređuje pikove (*engl.* „peak“) neidentificiranog uzorka s referentnim spektrom. Ovisno o podudarnosti dvaju spektara, rezultati su prikazani ocjenama 2.00 do 3.00 što ukazuje na pouzdanu i vrlo vjerojatnu identifikaciju na razini vrste, 1.70 do 1.99 što ukazuje na sigurnu identifikaciju roda s mogućom identifikacijom vrste, i rezultat manji od 1.69 ukazuje na nepouzdanu identifikaciju.



Slika 3. Postupak identifikacije MALDI-TOF tehnikom (Kazazić S., 2020.)

Posljednjih godina ova tehnika je implementirana u laboratorijima i koristi kao inovativna metoda za identifikaciju bakterija, kvasaca i plijesni u medicinskoj dijagnostici, kontroli vode i hrane te istraživanju okoliša. Razne genetske metode za identifikaciju mikroorganizama su pouzdan alat u epidemiološkim studijama i znanstvenom radu, ali ih je teško primijeniti u rutinskom radu u laboratorijima koji rade s hranom.

3. Materijali i metode

3.1. Uzorkovanje mlijeka

Za istraživanje u okviru diplomskoga rada prikupljeno je 30 uzoraka svježeg sirovog mlijeka iz pet različitih mljekomata koji se nalaze u Zagrebu i Zagrebačkoj županiji. Mljekomati su locirani u zagrebačkim četvrtima Savica, Dugave, Jelkovec te ispred osnovne škole i doma zdravlja u Velikoj Gorici. Sirovo mlijeko uzorkovano je po dva puta tijekom veljače, ožujka i travnja. Mlijeko je skladišteno u sterilne boce s poklopcem od 1 L i dostavljeno na analizu najkasnije sat vremena od uzorkovanja. Temperatura mlijeka u transportu iznosi 6 °C.



Slika 4. Mljekomat u Zagrebu

3.2. Priprema uzoraka mlijeka za analizu

Bez obzira na analize koje se provode, mlijeko treba potpuno promiješati odnosno homogenizirati kako ne bi došlo do izdvajanja mliječne masti na površinu. U suprotnom rezultati mogu biti pogrešni. Uzorak treba uzeti odmah nakon miješanja, dok se mlijeko još giba. Uz miješanje mlijeko se zagrijava na 38 – 40 °C te potom hladi do 20 °C. Uzorci svježeg sirovog mlijeka namijenjeni za mikrobiološku analizu konzerviraju se na niskim temperaturama (1 – 4 °C) ako se analizi ne pristupa odmah. Obavezno je koristiti sterilno posuđe i pribor, a postupak provoditi u aseptičnim uvjetima (Božanić i sur., 2010).

3.3. Određivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku metodom protočne citometrije

Ukupan broj bakterija (cfu) u uzorcima sirovog mlijeka bilo je potrebno odrediti kako bi se kasnije, za potrebe klasične metode određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija, lakše odabrala potrebna razrjeđenja.

Analiza se provodila metodom protočne citometrije na instrumentu „Bactoscan FC” (Foss, Danska) u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode, Zavoda za mljekarstvo, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Instrument služi za brzo određivanje higijenske kvalitete uzoraka sirovog mlijeka brojanjem ukupnog broja bakterija u uzorku.

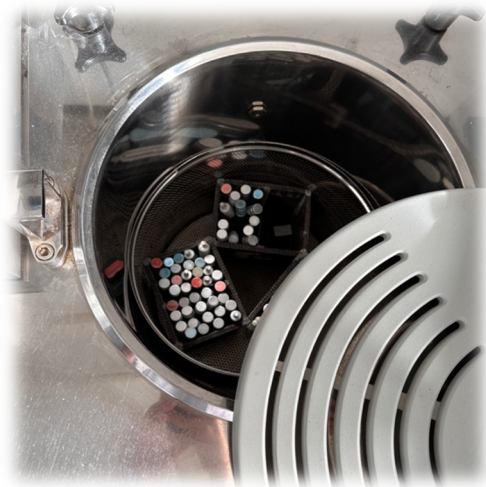
Bakterije se u inkubacijskoj jedinici boje fluorescentnom bojom: etidij bromid. Inkubirana mješavina uzorka i reagensa se uvodi u obliku vrlo tankog sloja u protočnu stanicu. Kod protočne stanice smješten je modul s detektorima fluorescencije koji detektiraju svjetlo koje emitiraju obojene bakterije. Na temelju intenziteta svjetla iz različitih detektora, svjetlosni signali se analiziraju i konvertiraju u električne impulse. Modul za brojanje sumira električne impulse i rezultat se prikazuje na zaslonu računala. Kako bi se iz uzorka izolirale sve čestice kao npr. kazeinske micelle, masne globule i somatske stanice – uzorak se kemijski tretira čime se sve navedene čestice osim bakterijske stanice unište. Na kraju instrument metodom linearne regresije preračunava rezultate iz pojedinačnih bakterija (*engl.* IBC) u broj živih bakterija koje formiraju kolonije (*engl.* CFU) (Samaržija, 2021).

3.4. Klasična metoda određivanja broja aerobno mezofilnih bakterija u sirovom mlijeku

Analiza se provodila standardnom metodom prema normi HRN EN ISO 4833:2003, neizravno, određivanjem broja živih bakterija. Ovom metodom određuje se broj živih bakterija u uzorku sirovog svježeg mlijeka s mljekomata, uz pretpostavku da se iz pojedine stanice na (ili u) čvrstom hranjivom supstratu u Petrijevim zdjelicama razvila po jedna odvojena kolonija. Ona se sastoji od mnoštva potomaka i ishodišne stanice ili skupine stanica. Metoda određivanja broja bakterija na hranjivoj podlozi zahtijeva pripremu peptona i hranjive podloge. Priprema otopine peptona započinje vaganjem 1 g peptona (slika 5).



Slika 5. Vaganje peptona



Slika 6. Sterilizacija u autoklavu

Slijedi postupno dolijevanje i miješanje 1 000 mL destilirane vode. Zatim se pomoću automatske birete po 9 mL pripremljene otopine peptona pipetira u epruvete i zatvara čepovima. Tako napunjene epruvete idu na sterilizaciju u autoklavu na temperaturu od 121 °C u trajanju od 22 minute (slika 6).

Nakon pripreme otopine peptona slijedi priprema hranjive podloge. Hranjiva podloga se priprema prema uputama proizvođača i to na način da se 24,5 g dehidrirane podloge u prahu otopi u 1 000 mL hladne destilirane vode. Dehidrirana podloga prvo se pomiješa s 250 mL destilirane vode uz snažno miješanje kako bi se dobila homogena suspenzija, a potom se dodaje ostatak vode pritom ispirući ostatke podloge na stjenkama posude. Otopina se zagrijava uz neprestano miješanje dok u potpunosti nestane sitnih čestica podloge. Prije sterilizacije pripremljena podloga se prelije u manje, vatrostalne bočice s navojem.

Sterilizacija se odvija na isti način kao za otopinu peptona, u autoklavu pri temperaturi od 121 °C u trajanju 15 – 20 minuta, što ne uključuje vrijeme potrebno za zagrijavanje na radnu temperaturu.



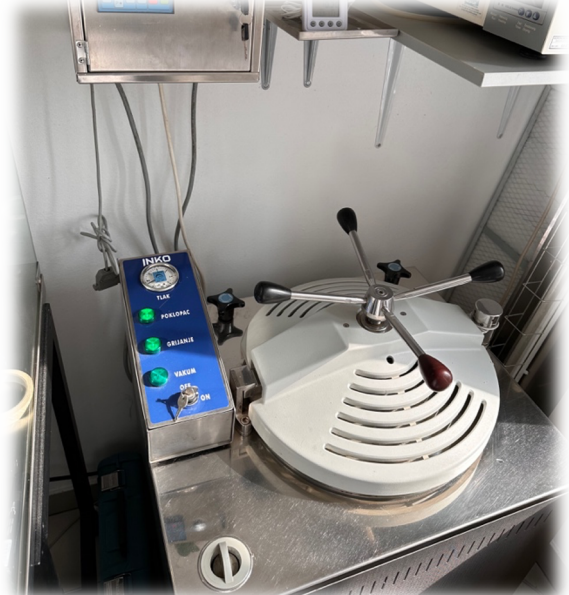
Slika 7. Vaganje hranjive podloge



Slika 8. Zagrijavanje hranjive podloge



Slika 9. Hranjiva podloga u bočicama

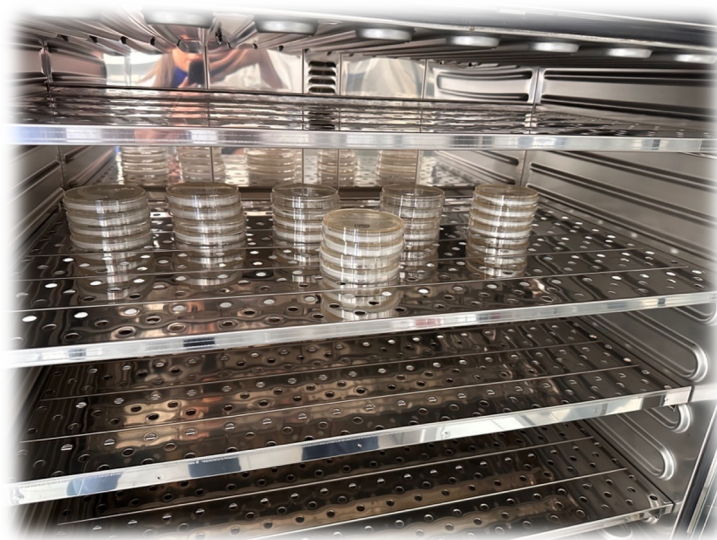


Slika 10. Autoklav za sterilizaciju

Ranije spomenutim instrumentom „Bactoscan FC“ analizirani su uzorci mlijeka te je određen ukupan broj bakterija što omogućuje lakši odabir razrjeđenja. Dodatni potrebni pribor za provođenje analize su:

- ◆ sterilizirane Petrijeve zdjelice
- ◆ sterilizirani nastavci za pipete
- ◆ sterilizirana automatska pipeta
- ◆ vibracijska mješalica za homogeniziranje uzoraka.

Radnu površinu je prije početka analize potrebno dezinficirati 70%-tnim etilnim alkoholom. Prije svake uporabe uzorka potrebno ga je promiješati na vibracijskoj mješalici desetak sekundi. Za pripremu uzorka mlijeka razrjeđenja 10^{-1} sterilno se pipetira 1 mL mlijeka u epruvetu s 9 mL sterilne otopine peptona. Za pripremu uzorka mlijeka razrjeđenja 10^{-2} iz priređenog uzorka mlijeka razrjeđenja 10^{-1} se pipetira 1 mL suspenzije u epruvetu s 9 mL sterilne otopine peptona. Isti postupak se ponavlja do potrebnog razrjeđenja. U praznu Petrijevu zdjelicu pipetira se 1 mL uzorka odgovarajućeg razrjeđenja. Uzorak se zatim preljeva s 12 - 15 mL hranjive podloge prethodno zagrijane na 45 °C. Nakon što se hranjiva podloga stvrdne, Petrijeve zdjelice stavljaju se na inkubaciju pri 30 °C u trajanju od 72 h.



Slika 11. Inkubacija uzoraka pri 30 °C / 72 h.

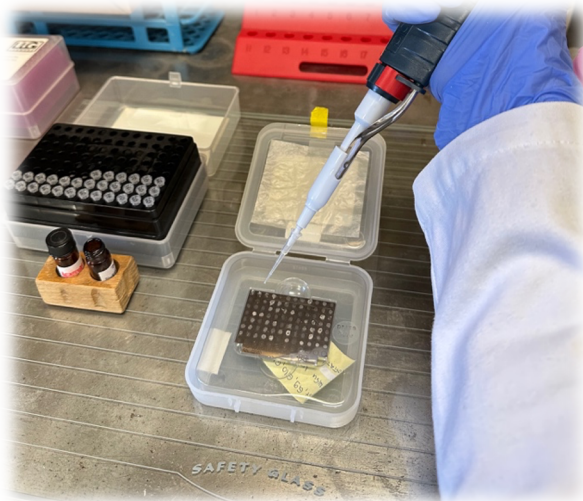
Nakon 72 h inkubacije uzoraka vrši se brojanje izraslih bakterijskih kolonija na hranjivoj podlozi te se provodi identifikacija na MALDI-TOF instrumentu.

3.5. Identifikacija MALDI-TOF tehnikom

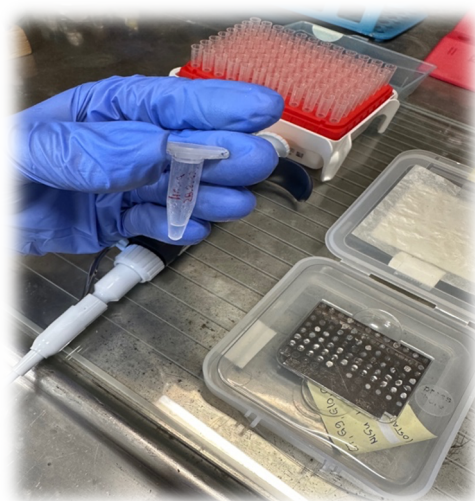
Identifikacija aerobno mezofilnih bakterija provodila se MALDI TOF tehnikom u Laboratoriju za spektrometriju masa i funkcionalnu proteomiku u sklopu Zavoda za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković. Za provođenje analiza korištene su:

- ◆ sterilne čačkalice
- ◆ uzorci s označenim bakterijskim kolonijama
- ◆ mravlja kiselina (CH_2O_2)
- ◆ automatska pipeta namještena na $1\ \mu\text{L}$
- ◆ MALDI matrica (α -cijano-4-hidroksicimetna kiselina)
- ◆ MALDI-TOF instrument (Bruker Daltonik, Bremen, Njemačka)
- ◆ softverski program MALDI Biotyper Compas HT 5.1 koji sadrži biblioteku mikroorganizama (v11)

Iz Petrijeve zdjelice uzima se uzorak narasle bakterijske kolonije pomoću sterilne čačkalice te se nanosi na MALDI pločicu. Na nanijeti uzorak nanosi se $1\ \mu\text{L}$ mravlje kiseline te nakon što se uzorak osuši dodaje se $1\ \mu\text{L}$ MALDI matrice. Kad se svi uzorci pripreme i osuše MALDI pločica se stavlja u MALDI-TOF instrument te se pokreće proces identifikacije kolonija koristeći softverski program MALDI Biotyper Compas HT 5.1.



Slika 12. Aplikacija mravlje kiseline



Slika 13. MALDI matrica i MALDI pločica

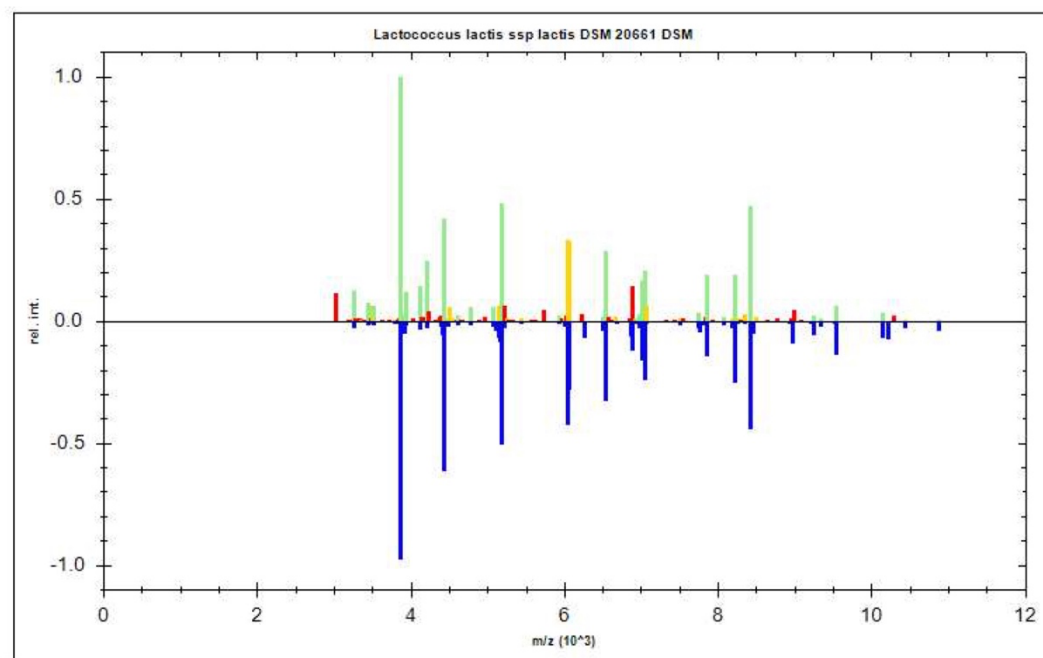
Identifikacija mikroorganizma provodi se usporedbom snimljenog MALDI-TOF spektra uzorka s referentnim spektrima pohranjenim u biblioteci. Algoritam izračunava

korelaciju između eksperimentalno dobivenog spektra i referentnih spektra u bazi podataka i rezultate prikazuje u obliku logaritamskih vrijednosti (*engl. score*) koje mogu biti u rasponu 0,00 – 3,00 označeni s tri boje. Prema uputama proizvođača vrijednosti od 2,00 do 3,00 pokazuju visoko pouzdanu identifikaciju, vrijednosti od 1,70 do 1,99 nisko pouzdanu identifikaciju, a za vrijednosti ispod 1,69 identifikacija nije pouzdana.

Tablica 3. Identifikacijski kriteriji na razini vrste i roda (*engl. Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results*)

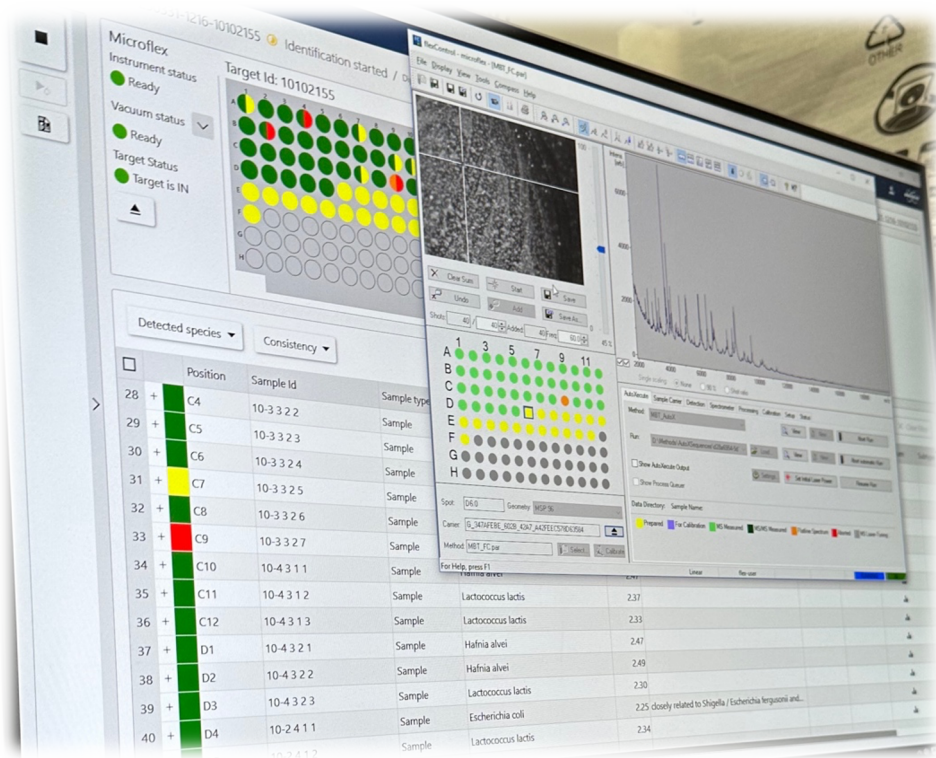
Ocjena	Opis	Simbol	Boja
2.00 – 3.00	Visoko pouzdana identifikacija	(+++)	zelena
1.70 – 1.99	Nisko pouzdana identifikacija	(+)	žuta
0.00 – 1.69	Nemoguća identifikacija organizma	(-)	crvena

Na slici 15. vidljiv je primjer identifikacije bakterijske podvrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* te ovisno o ocjeni njezina pouzdanost, a slika 16. rezultate identifikacije.



Slika 15. Identifikacija bakterijske podvrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Zelena boja označava potpuno preklapanje između spektra mase uzorka i referentnog spektra. Žuta boja označava djelomično preklapanje, a kada postoje razlike između spektra uzorka i referentnog spektra to je označeno crvenom bojom.



Slika 16. Ilustrativni prikaz rezultata identifikacije

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati određivanja ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija

Rezultati određivanja ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija (cfu) određenih metodom protočne citometrije na instrumentu „Bactoscan FC“ za 30 uzoraka svježeg sirovog mlijeka iz mljekomata prikazani su u tablicama 3 do 8.

Tablica 3. Ukupni broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu) I serije uzoraka mlijeka iz mljekomata

Uzorci I serije (početak veljače)	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu/mL)
1	53 000
2	387 000
3	169 000
4	48 000
5	60 000

U tablici 3 prikazani su rezultati I serije uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata prikupljenih početkom veljače. Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija u uzorcima utvrđen je metodom protočne citometrije. Ukupan broj varira od najnižeg koji iznosi 48 000 cfu/mL (uzorak 4) do 387 000 cfu/mL (uzorak 2). Uzorci 2 i 3 prelaze propisanu graničnu vrijednost od 100 000 cfu/mL te se svrstavaju u II razred (Prilog II, Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka, NN 136/20).

Tablica 4. Ukupni broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu) II serije uzoraka mlijeka iz mljekomata

Uzorci II serije (kraj veljače)	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu/mL)
1	969 000
2	446 000
3	12 000
4	15 000
5	15 000

Rezultati ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija II serije uzorkovane krajem veljače iz istih mljekomata navedeni su u tablici 4. Uzorci 3, 4 i 5 s 12 000 cfu/mL, odnosno 15 000 cfu/mL udovoljavaju kriterijima propisanim za higijensku kvalitetu sirovog mlijeka (NN 136/20).

Tablica 5. Ukupni broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu) III serije uzoraka mlijeka iz mljekomata

Uzorci III serije (početak ožujka)	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu/mL)
1	83 000
2	84 000
3	248 000
4	685 000
5	305 000

Rezultati III serije uzoraka svježeg sirovog mlijeka prikupljena početkom ožujka, navedeni su u tablici 5. Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija kretao se u rasponu od 83 000 cfu/mL do 685 000 cfu/mL.

Tablica 6. Ukupni broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu) IV serije uzoraka mlijeka iz mljekomata

Uzorci IV serije (kraj ožujka)	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu/mL)
1	291 000
2	112 000
3	98 000
4	208 000
5	196 000

Krajem ožujka s mljekomata su uzorkovani uzorci IV serije čiji su rezultati prikazani u tablici 6. Samo jedan uzorak sirovog mlijeka sadržavao je ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija ispod propisane vrijednosti od 100 000 cfu/mL.

Tablica 7. Ukupni broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu) V serije uzoraka mlijeka iz mljekomata

Uzorci V serije (početak travnja)	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu/mL)
1	11 000
2	4 708 000
3	76 000
4	198 000
5	5 838 000

Tablica 7. prikazuje rezultate ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija za uzorke V serije, prikupljene s mljekomata početkom travnja. Uzorci 2, 4 i 5 prelaze propisanu vrijednost od 100 000 mikroorganizama u 1 mL.

Tablica 8. Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu) VI serije uzoraka mlijeka iz mljekomata

Uzorci VI serije (kraj travnja)	Ukupan broj aerobno mezofilnih bakterija (cfu/mL)
1	156 000
2	311 000
3	3 848 000
4	250 000
5	1 041 000

Posljednja VI serija uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata uzorkovana je krajem travnja. Vrijednosti svih rezultata prelaze propisanu vrijednost za I razred od 100 000 aerobno mezofilnih bakterija u jednom mililitru mlijeka.

Rezultati ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija u uzorcima sirovog mlijeka s mljekomata ukazuju na veliku varijabilnost između istih. Razlozi za takvo stanje su uvjeti držanja stoke, mikroklimatski uvjeti, zdravlje stada, higijena mužnje te manipulacija s mlijekom nakon mužnje. Porastom temperature u travnju u odnosu na veljaču i ožujak, a u slučaju kada mlijeko nije odmah po mužnji ohlađeno na odgovarajuću propisanu temperaturu ($< 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ako nije svakodnevna otprema ili $< 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ kod svakodnevne otpreme mlijeka prema Pravilniku o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (NN 136/20) zamijećen je porast ukupnog broja aerobno mezofilnih bakterija u uzorcima s mljekomata. Prisutnost mikrobnih vrsta koje ulaze u ukupan broj bakterija sirovog mlijeka je neizbježna, ali je potrebno kontrolirati uvjete koji mogu utjecati na njihov porast.

4.2. Rezultati identificiranja izraslih bakterijskih kolonija MALDI-TOF tehnikom

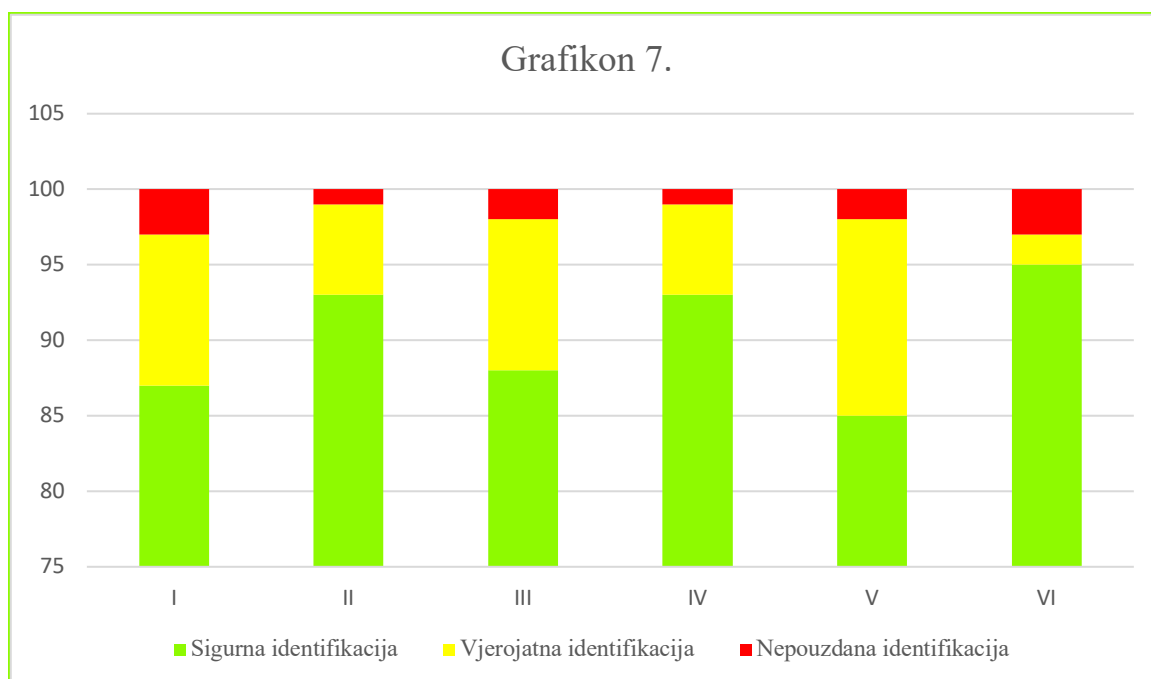
Za rezultate identifikacije izraslih bakterijskih kolonija na hranjivim podlogama korištena je MALDI-TOF tehnika. Prije pripreme MALDI pločice, izrasle kolonije se promotre i označe s brojevima za lakše uzorkovanje sterilnom čačalicom. Kolonije istih morfoloških karakteristika nisu uzorkovane dva puta. Označene i numerirane kolonije zapisuju se na MALDI listu (Slika 16.). Pripremljene MALDI pločice snimane su MALDI-TOF spektrometrom masa dva puta radi točnosti prikazanih rezultata. Cilj uzorkovanja bio je identificirati različite bakterijske vrste aerobno mezofilnih bakterija. Nakon izrade MALDI liste za očitavanje bakterijskih vrsta, programski paket automatski generira MALDI-TOF spektar masa te podudara rezultate s referentnim spektrom u biblioteci mikroorganizama. Na osnovi podudarnosti spektra mase izrasle kolonije uzorka i referentnog spektra rezultati se popisuju na zaslonu računala u tri boje.



Slika 17. Shematski prikaz liste bakterijskih kolonija za MALDI

Rezultati identifikacije bakterija na razini vrste i roda provedene softverskim programom MALDI Biotyper Compas HT 5.1. prikazani su grafikonima 1 do 6. Rezultati ukazuju na raznolikost točnosti rezultata dobivenih MALDI-TOF tehnikom za identifikaciju aerobno mezofilnih bakterija. Zelenom bojom označena je visoko pouzdana identifikacija čije su vrijednosti u rasponu od 2,00 do 3,00, žuta boja označava nisko pouzdanu identifikaciju u rasponu od 1,70 do 1,99, a crvenom bojom nepouzdana identifikacija s vrijednostima ispod 1,69.

Grafikon 1. Identifikacija bakterija na razini vrste i roda iz sirovog mlijeka iz mljekomata provedena softverskim programom MALDI-TOF Biotyper Compas HT 5.1.



U grafikonu 1. prikazana je identifikacija bakterija na razini vrste i roda iz uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata. Graf I označava seriju I uzorkovanu početkom veljače s visoko pouzdanom identifikacijom od 87 %, nisko pouzdanom identifikacijom od 10 % i nepouzdanom identifikacijom od 3 %. Graf II označava seriju II uzorkovanu krajem veljače s visoko pouzdanom identifikacijom od 93 %, nisko pouzdanom identifikacijom od 6 % i nepouzdanom identifikacijom od 1 %. Graf III označava seriju III uzorkovanu početkom ožujka s visoko pouzdanom identifikacijom od 88 %, nisko pouzdanom identifikacijom od 10

% i nepouzdanom identifikacijom od 2 %. Graf IV označava seriju IV uzorkovanu krajem ožujka s visoko pouzdanom identifikacijom od 93 %, nisko pouzdanom identifikacijom od 6 % i nepouzdanom identifikacijom od 1 %. Graf V označava seriju V uzorkovanu početkom travnja s visoko pouzdanom identifikacijom od 85 %, nisko pouzdanom identifikacijom od 13 % i nepouzdanom identifikacijom od 2 %. Graf VI označava seriju VI uzorkovanu krajem travnja s visoko pouzdanom identifikacijom od 95 %, nisko pouzdanom identifikacijom od 2 % i nepouzdanom identifikacijom od 3 %.

U **I seriji** uzoraka mlijeka s mljekomata, identificirano je 17 bakterijskih vrsta i rodova, a to su:

1. *Acinetobacter johnsonii*
2. *Buttiauxella gaviniae*
3. *Escherichia coli*
4. *Hafnia alvei*
5. *Kluyveromyces lactis*
6. *Kluyveromyces marxianus*
7. *Lactococcus lactis*
8. *Leuconostoc mesenteroides*
9. *Pichia kudriavzevii*
10. *Pseudomonas brenneri*
11. *Pseudomonas rhofesiae*
12. *Rahnella inusitata*
13. *Serratia proteamaculans*
14. *Staphylococcus aureus*
15. *Staphylococcus vitulinus*
16. *Streptococcus dysgalactiae*

17. *Yarrowia lipolytica*

Od ukupno 116 identificiranih kolonija najzastupljenija je bakterija *Staphylococcus aureus* (40,52 %) zatim *Lactococcus lactis* (28,45 %). Bakterija *Leuconostoc mesenteroides* čini 4% , *Kluyveromyces* spp. čini 3%, a preostale *Acinetobacter johnsonii*, *Buttiauxella gaviniae*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Pichia kudriavzevii*, *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas rhodesiae*, *Rahnella inusitata*, *Serratia proteamaculans*, *Streptococcus dysgalactiae* i *Yarrowia lipolytica* imaju udio manji od 2%.

U II seriji uzoraka identificirano je 22 bakterijske vrste i roda, a to su:

1. *Buttiauxella gaviniae*
2. *Carnobacterium maltaromaticum*
3. *Enterococcus faecalis*
4. *Enterococcus hirae*
5. *Escherichia coli*
6. *Hafnia alvei*
7. *Kluyveromyces lactis*
8. *Lactococcus lactis*
9. *Lactococcus raffinolactis*
10. *Leuconostoc citreum*
11. *Leuconostoc mesenteroides*
12. *Moraxella osloensis*
13. *Pantoea agglomerans*
14. *Pichia fermentans*
15. *Pichia kudriavzevii*
16. *Pseudomonas fluorescens*
17. *Pseudomonas lundensis*
18. *Pseudomonas rhodesiae*
19. *Serratia proteamaculans*
20. *Sphingobacterium faecium*
21. *Staphylococcus warneri*
22. *Yarrowia lipolytica*

Identificirano je ukupno 138 bakterijskih kolonija izraslih na Petrijevim zdjelicama. *Lactococcus lactis* bakterija čini 19,67 % u ukupnom broju kolonija i time je najbrojnija, iduća po redu bakterija je vrste *Leuconostoc mesenteroides* čiji je udio 10,14 %. Među ostalim bakterijskim vrstama i rodovima najviši udio ima *Escherichia coli* s 4,35 %, a ostale vrste i rodovi *Pseudomonas* spp., *Sphingobacterium faecium*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia* spp., *Pantoea agglomerans*, *Moraxella osloensis*, *Hafnia alvei*, *Kluyveromyces lactis*, *Enterococcus* spp., *Carnobacterium maltaromaticum* i *Buttiauxella gaviniae* svojim udjelom čine manje od 3 %.

U **III seriji** uzoraka identificirano je 17 bakterijskih vrsta i rodova, a to su:

1. *Acinetobacter johnsonii*
2. *Corynebacterium vitaeruminis*
3. *Hafnia alvei*
4. *Janthinobacterium lividum*
5. *Kluyveromyces lactis*
6. *Kocuria varians*
7. *Lactococcus lactis*
8. *Lutecoccus japonicus*
9. *Pantoea agglomerans*
10. *Pichia kudriavzevi*
11. *Pseudomonas azotoformans*
12. *Pseudomonas brenneri*
13. *Pseudomonas extremorientalis*
14. *Pseudomonas gessardii*
15. *Pseudomonas synxantha*
16. *Serratia marcescens*
17. *Stenotrophomonas* spp.

Identificirano je ukupno 133 izraslih bakterijskih kolonija. Najveću brojnost ima *Lactococcus lactis* s 15,04 % zatim *Hafnia alvei* 7,52 %. Ostatak bakterijskih kolonija *Acinetobacter johnsonii*, *Corynebacterium vitaeruminis*, *Janthinobacterium lividum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kocuria varians*, *Lutecoccus japonicus*, *Pantoea agglomerans*, *Pichia kudriavzevi*, *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens* i *Stenotrophomonas* spp. imaju udio manji od 5 %.

U **IV seriji** uzoraka identificirano je 14 bakterijskih vrsta i roda, a to su:

1. *Acinetobacter guillouiae*
2. *Acinetobacter johnsonii*
3. *Chryseobacterium vrystaatense*
4. *Escherichia coli*
5. *Hafnia alvei*
6. *Kluyveromyces lactis*
7. *Lactococcus lactis*
8. *Leuconostoc mesenteroides*
9. *Pichia kudriavzevii*
10. *Pseudomonas gessardii*
11. *Pseudomonas fluorescens*
12. *Pseudomonas proteolytica*
13. *Rahnella inusitata*
14. *Staphylococcus aureus*

Ukupan broj identificiranih izraslih kolonija iznosi 82. Najbrojnija bakterijska vrsta je *Lactococcus lactis* s udjelom od 24,39 %, slijedi ju *Kluyveromyces lactis* koji iznosi 13,41 % zatim *Hafnia alvei* s 12,2 %. Preostale bakterijske vrste i rodovi *Acinetobacter guillouie*, *Acinetobacter johnsonii*, *Chryseobacterium vrystaatense*, *Escherichia coli*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pseudomonas* spp., *Rahnella inusitata* i *Staphylococcus aureus* čini udio manji od 4,5 %.

U **V seriji** uzoraka identificirano je 12 bakterijskih vrsta i rodova, a to su:

1. *Acinetobacter guillouiae*
2. *Brochothrix thermosphacta*
3. *Escherichia coli*
4. *Hafnia alvei*
5. *Kluyveromyces lactis*
6. *Lactococcus lactis*
7. *Leuconostoc mesenteroides*

8. *Microbacterium lacticum*
9. *Serratia proteamaculans*
10. *Sphingobacterium faecium*
11. *Streptococcus uberis*
12. *Yersinia enterocolitica*

Bakterijskih kolonija koje su izrasle na hranjivoj podlozi ima 56. Bakterijska vrsta *Lactococcus lactis* je najmnogobrojnija s udjelom od 44,64 %, slijedi bakterija vrste *Hafnia alvei* 17,86 % u ukupnom udjelu pa *Leuconostoc mesenteroides* 7,14 %. Preostale izrasle kolonije čine *Acinetobacter guillouie*, *Brochothrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis*, *Microbacterium lacticum*, *Serratia proteamaculans*, *Sphingobacterium faecium*, *Streptococcus uberis* i *Yersinia enterocolitica* čiji udjeli ne prelaze postotak od 3,3.

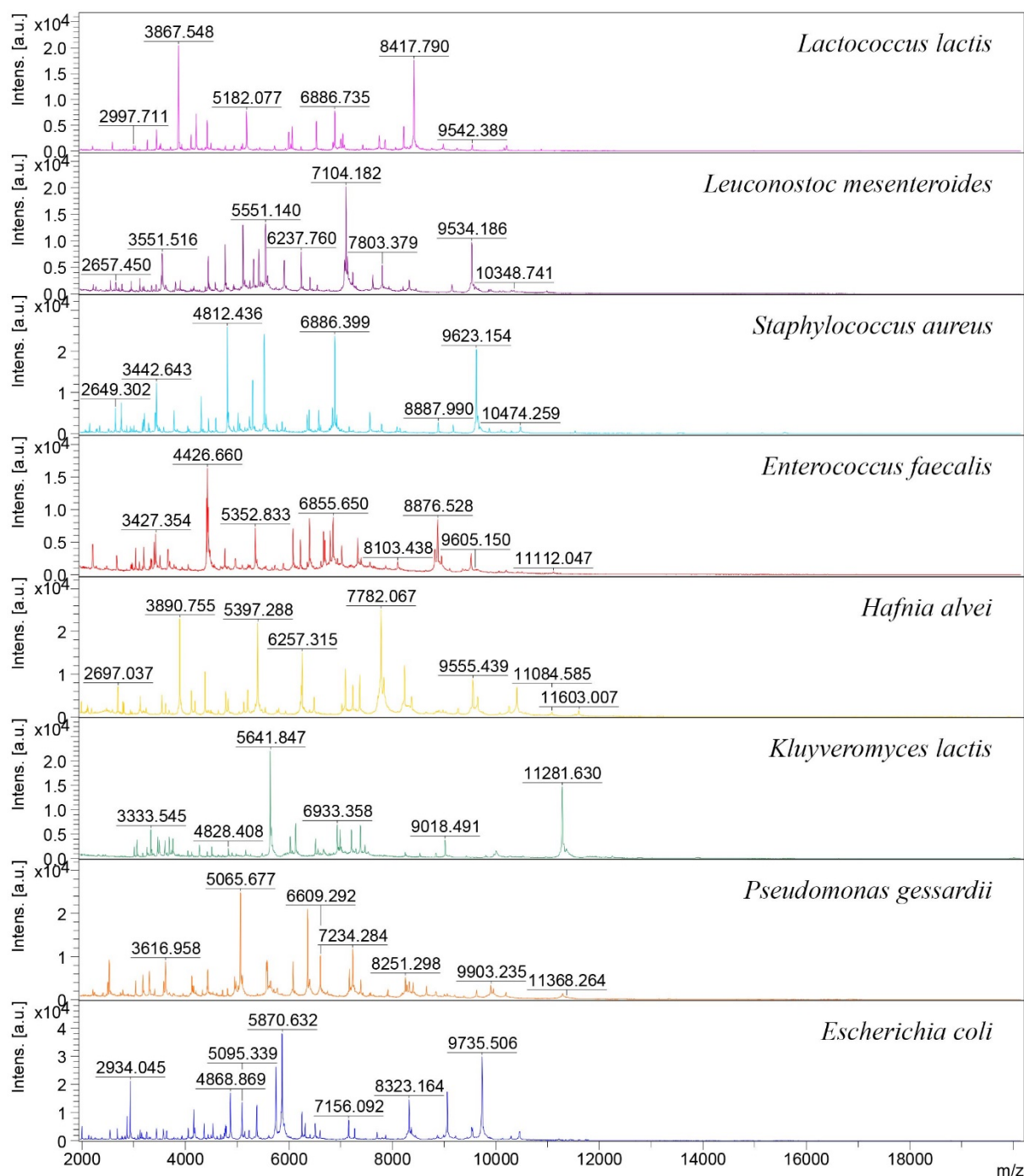
U **VI uzoraka** identificirano je 17 bakterijskih vrsta i rodova, a to su:

1. *Acinetobacter albensis*
2. *Buttiauxella gaviniae*
3. *Chryseobacterium scophthalmum*
4. *Escherichia coli*
5. *Hafnia alvei*
6. *Kluyveromyces lactis*
7. *Lactobacillus fructivorans*
8. *Lactococcus lactis*
9. *Pantoea agglomerans*
10. *Pseudomonas azotoformans*
11. *Pseudomonas fluorescens*
12. *Pseudomonas lundensis*
13. *Pseudomonas rhodesiae*
14. *Pseudomonas veronii*
15. *Rahnella inusitata*
16. *Staphylococcus borealis*
17. *Staphylococcus haemolyticus*

Od ukupno 87 identificiranih izraslih kolonija najzastupljenija je bakterija *Hafnia alvei* s udjelom od 14,94 %, a slijedi ju *Rahnella inusitata* s udjelom od 8,04 %. Bakterijska

vrsta *Lactococcus lactis* u ovoj seriji uzoraka je na trećem mjestu po zastupljenosti te iznosi 7,1 %. Kolonije bakterijskih rodova i vrsta *Acinetobacter albensis*, *Buttiauxella gaviniae*, *Chryseobacterium scophthalmum*, *Escherichia coli*, *Kluyveromyces lactis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus borealis* i *haemolyticus* čine manje od 5 % u ukupnom broju identificiranih kolonija izraslih na hranjivoj podlozi.

Slika 18. prikazuje referentne spektre za najčešće zastupljene bakterijske rodove u analiziranim uzorcima mlijeka. Prikazani pikovi svakog spektra predstavljaju jedinstveni uzorak za svaku pojedinu bakterijsku vrstu na temelju kojih MALDI Biotyper program provodi identifikaciju.



Slika 18. Referentni spektri MALDI-TOF programa za najčešće identificirane rodove bakterija u uzorcima mlijeka

Koristeći MALDI-TOF tehniku, autori Vithanage i sur. (2016.) navode da su iz sirovog mlijeka tri najčešće izolirana razreda bakterija *Actinobacteria*, *Bacilli* i *Gammaproteobacteria*. Tim razredima pripadalo je 94,8 % bakterijskih rodova, a 85 % svih izolata činilo je 30 vrsta. Prevladavajući bakterijski razred pronađen u sirovom mlijeku tog istraživanja je *Bacilli*, a obuhvaća rodove *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus* i *Staphylococcus* spp. Usporedno s dobivenim rezultatima istraživanja za diplomski rad, unutar poglavlja 4.2. vidljivo je da su također isti rodovi dominantni. Najveći udio čini vrsta *Lactococcus lactis*, zatim ju slijedi padajućim redoslijedom *Staphylococcus aureus*, *Leuconostoc mesenteroides* prisutni u svakoj seriji uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata. U seriji broj I najzastupljenija bakterijska vrsta je *S. aureus* s udjelom 40,52 % u ukupnom broju izoliranih kolonija, *L. lactis* zauzima 28,45 % te *L. mesenteroides* 4 %. Nadalje, *L. lactis* u II seriji iznosi 19,67 %, u III seriji 15,04 %, u IV seriji 24,39 %, u V 44,64 %, u VI seriji uzoraka 7,1 %. Iz istog razreda vrste *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus fructivorans*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis*, *Staphylococcus vitulinus*, *Staphylococcus haemolyticus* čine udio manji od 2 %. Prema istim autorima rod *Pseudomonas* prevladava unutar izoliranih bakterijskih kolonija razreda *Gammaproteobacteria* dok u ovome radu taj rod ne prelazi 5 % od ukupnog broja. Konkretno, u I seriji *P. brenneri* i *P. rhodesiae* čine manje od 2 % u ukupnom broju identificiranih kolonija izraslih na hranjivoj podlozi. U seriji II *P. fluorescens*, *P. lundensis* i *P. rhodesiae* čine do 3 %, u seriji III udio *P. brenneri*, *P. gesardii*, *P. synxantha*, *P. azotoformans*, *P. extremorientalis* ne prelazi postotak od 5 %. *P. fluorescens* i *P. proteolytica* u seriji IV čini 4,5 % od ukupnog broja izolata, a u seriji VI *P. fluorescens*, *P. azotoformans*, *P. lundensis*, *P. rhodesiae*, *P. veronii* čini udio od 5 %. U seriji broj V nije identificirana niti jedna bakterijska kolonija iz roda *Pseudomonas*. Treći po redu dominantni bakterijski razred izoliran iz uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata bio je *Actinobacteria*, uglavnom bakterijske vrste roda *Microbacterium* spp. Veliki udio u sirovom mlijeku čine bakterijske vrste rodova *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Aerococcus* spp., koji su svrstani u razred *Actinobacteria*. Od navedenih rodova u rezultatima identifikacije MALDI-TOF tehnikom 4.2. visoko pouzdanom identifikacijom u seriji V identificirana je vrsta *Microbacterium lacticum*.

Dobranić i sur. (2016.) proveli su istraživanje svježeg kravljeg mlijeka analizirajući njegov mikrobiološki sastav s naglaskom na oportunističke patogene enterokoka. Ukupan broj bakterija, broj bakterija mliječne kiseline, stafilokoka, enterokoka, enterobakterija, psihrotrofnih bakterija, *E. coli* i *Listeria* spp. utvrđen je klasičnom metodom. Uzorkovanje se

provodilo iz vimena zdravih krava te vimena liječenih krava zbog upale mliječne žlijezde. S obzirom na zdravstveno stanje vimena kod određivanja ukupnog broja bakterija i bakterija mliječna kiseline utvrđene su statistički značajne razlike. Rezultati identifikacije uzoraka *Enterococcus faecalis* pokazali su jednake rezultate primjenom navedenih metoda analize. Tim radom dokazana je hipoteza da je MALDI-TOF tehnika pouzdana metoda za identifikaciju enterokoka iz svježeg sirovog mlijeka. U rezultatima 4.2. prikazane su sve identificirane bakterijske vrste iz sirovog mlijeka iz mljekomata među kojima se pojavljuje i *Enterococcus faecalis* s visoko pouzdanom identifikacijom te udjelom nižim od 3 % čime se potvrđuje pouzdanost spomenute metode.

Istraživanja s ciljem provjere valjanosti sustava Bruker Daltonik (Bremen, Njemačka) MALDI-TOF MS potvrdile su valjanost tog sustava. Rezultati dobiveni spektrometrijom masa uspoređivani su s rezultatima postignutim biokemijskim sustavima za identifikaciju (Phoenix, Becton Dickinson, Heidelberg, Njemačka; i API, bioMérieux, Nürtingen, Njemačka). U slučaju odstupanja, provedeno je sekvencioniranje 16S-rDNA/28S-rDNA. Od 1 200 analiziranih uzoraka, 93,5 % identifikacija bilo je u skladu s rezultatima postignutim biokemijskim metodama. Dobiveni izolati obuhvaćali su 110 Gram-negativnih bakterija, 320 Gram-pozitivnih bakterija, 370 enterobakterija, 300 nefermentirajućih bakterija te 100 kvasaca. Kada su sekvence 16S-rDNA korištene kao standard, biokemijska diferencijacija bila je superiorna u 3 % slučajeva dok je MALDI-TOF MS identifikacija rezultirala s 3,5 %. U većini slučajeva kada MS MALDI-TOF nije dao rezultat, relevantne informacije o vrstama izostajale su iz baze podataka što je i bio razlog izostajanja rezultata identifikacije. Rezultati prikazani grafikonima 1, 2, 3, 4, 5, 6 pokazuju da je MALDI-TOF tehnika uspješna u prosječno 90,17 % odnosno visoko pouzdano identificirala kolonije uzoraka sirovog mlijeka iz mljekomata. Rezultati čija identifikacija nije bila moguća, označeni crvenom bojom, posljedica su premalo uzetog uzorka za premazivanje na MALDI pločicu ili uslijed izostanka referentnog spektra u biblioteci mikroorganizama za uzorkovanu bakterijsku koloniju.

5. Zaključak

- Temeljem rezultata svih analiziranih serija rod *Lactococcus* spp. čini najviši udio u svježem sirovom mlijeku iz mljekomata. Točnije, bakterijska vrsta *L. lactis* najbrojnija je te u seriji broj II iznosi 19,67 %, u III seriji 15,04 %, u IV seriji 24,39 %, a u V seriji 44,64 %. U I seriji prema zastupljenosti u uzorku nalazi se na drugom mjestu s udjelom od 28,45 %, a prethodi joj bakterijska vrsta *S. aureus* čineći 40,52 %. Također, u seriji VI nalazi se na trećem mjestu s postotkom od 7,1 dok su brojnije bakterijske kolonije bile *H. alvei* s 14,94 % i *R. inusitata* s 8,04 %.
- Ovisno o podudarnosti spektra uzorka s referentnim spektrom iz biblioteke mikroorganizama i obradom pomoću MALDI Biotyper računalnog programa rezultati su prikazani ocjenama, a u ovom radu je svaka serija imala preko 85 % sigurne identifikacije čime se ukazuje na korisnost MALDI-TOF metode za brzu i točnu identifikaciju aerobnih mezofilnih bakterija uzgojenih na hranjivoj podlozi.
- Ukupno je identificirano 30 rodova te 51 bakterijska vrsta po čijem podrijetlu se jasno zaključuje izvor kontaminacije. Na temelju rezultata svih analiziranih serija uzoraka bakterijski rod *Lactococcus* spp. čini najviši udio u svježem sirovom mlijeku. Međutim, u uzorcima mlijeka uočena je pojavnost i patogenih bakterija poput *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* te šiga-toksigenih sojeva *Escherichia coli*.
- Uvid u mikrobiološki sastav svježeg sirovog mlijeka s mljekomata koristan je i za unaprjeđenje higijenske prakse proizvođača, iako je unutar dozvoljenog broja mikroorganizama te konzumentu takvog nepasteriziranog mlijeka.

6. Literatura

1. Amidi-Fazli N., Hanifian Sh. (2022). Biodiversity, antibiotic resistance and virulence traits of *Enterococcus* species in artisanal dairy products. *International Dairy Journal*. 118 - 129.
2. Antunac N., Havranek J. (2013). *Mlijeko. Kemija, fizika i mikrobiologija*. Sveučilišni udžbenik u e-izdanju. Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet. Zagreb.
3. Aseel T. Issa, Reza Tahergorabi (2019). *Milk Bacteria and Gastrointestinal Tract. Dietary Interventions in Gastrointestinal Diseases*. 265 – 275.
4. Betts G. (2006). Other spoilage bacteria. *Food Spoilage Microorganisms* (C. de W. Blackburn, ur.) Padstow, Cornwall, England. 668 – 693.
5. Božanić, R., Jelčić, I., Bilušić, T. (2010) *Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda. Plejada*. Zagreb.
6. Carvahlo M., Barbosa J.B., Teixeira P., Bergogne-Berezin E. (2023). *Bacteria: Acinetobacter. Reference Module in Food Science*. 11 – 17.
7. Dobranić V., Kazazić S., Filipović I., Mikulec N., Zdolec N. (2016). Composition of raw cow's milk microbiota and identification of enterococci by MALDI TOF MS - short communication. *Veterinarski arhiv*. 86(4): 581 - 590.
8. EFSA (2015). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. EFSA – European Food Safety Authority. *EFSA Journal* 13, 3940 - 4035.
9. Friman M.J., Eklund M.H., Pitkälä A.H., Päivi J.R.S., Merja H. J. R. (2019). Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61: 54.
10. Giacometti, F., Bonilauri, P., Serraino, A., Peli, A., Amatiste, S., Arrigoni, N., Bianchi, M., Bilei, S., Cascone, G., Comin, D., Daminelli, P., Decastelli, L., Fustini, M., Mion, R., Petruzzelli, A., Rosmini, R., Rugna, G., Tamba, M., Tonucci, F., Bolzoni G. (2013). Four-year monitoring of foodborne pathogens in raw milk sold by vending machines in Italy. *Journal of Food Protection*, 76 (11), 1902 - 1907.
11. Hadžiosmanović, M. (1995). Uvjeti za kakvoću mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mlijeko–medicinski i prehrambeni problemi*. Hrvatska akademija medicinskih znanosti. Zagreb. 119 – 125.

12. Herrera A.G. (2001). Mesophilic Aerobic Microorganisms. Spencer J.F.T., de Ragout Spencer A.L. Food Microbiology Protocols. Methods in Biotechnology, vol 14. Humana Press.
13. HRN EN ISO (2013). Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C. Hrvatski zavod za norme. Zagreb.
14. Hrvatska agencija za poljoprivredu i hranu (2016). O javno zdravstvenom riziku vezanom za konzumaciju sirovog mlijeka. Znanstveno mišljenje. Osijek: Hrvatska Agencija za Hranu. Preuzeto 23.4.2023.
15. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. (1987). Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes. (78): 53 - 68.
16. Kunová S., Golian, J., Zeleňáková, L., Lopašovský, L., Čuboň, J., Haščík, P., Kačániová M. (2017) Microbiological quality of fresh and heat- treated cow's milk during storage. Potravinárstvo Slovak Journal of Food Sciences, 11 (1), 652 - 657.
17. Luana M. Perin., Juliano G. Pereira., Luciano S. Bersot., Luís A. Nero (2019). Raw Milk: Balance Between Hazards and Benefits. Microbiology of raw milk. London, United Kingdom, San Diego, CA, United States. 45 - 64.
18. Oliver S.P., Boor, K.J., Murphy S.C., Murinda S.E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. Foodborne Pathogens Disease, 6 (7), 793 - 806.
19. Oneyeaka H., Nwabor O. (2022). Lactic acid bacteria and bacteriocins as biopreservatives. Food Preservation and Safety of Natural Products. Vol 25.
20. Pravilnik o pregledu sirovog mlijeka namijenjenog javnoj potrošnji (2016). Narodne novine 84, Zagreb.
21. Pravilnik o registraciji subjekata te registraciji i odobravanju objekata u poslovanju s hranom (2015). Narodne novine 84, Zagreb.
22. Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka (2020). Narodne novine 136, Zagreb.
23. Saad B. Almasaudi (2018). Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi Journal of Biological Sciences. 25(3):586 – 596.
24. Samaržija, D. (2021). Mljekarska mikrobiologija. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.

25. Singhal N., Kumar M., Kanaujia Pawan K., Viridi Jugsharan S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 16(6): 1 - 4.
26. Tratnik Lj. (1998). Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 13 - 19.
27. Tratnik LJ. (2012). Mikrobiologija mlijeka. (Božanić, R., Tratnik, LJ). Mlijeko i mliječni proizvodi. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb. 69 – 82.
28. Vithanage N.R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E.A., Yeager, T.R., Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeratio conditions, seasonality and their spoilage potential. *International Dairy Journal*. 73 - 90
29. Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. (1999). Microbial Defects. *Dairy Technology. Principles of milk properties and processes*. New York, 149 – 170.
30. Weisglass H. (1983). Bakterije i bolesti čovjeka. Školska knjiga, Zagreb.

Životopis

Monica Darrer rođena je 11. siječnja 2000. godine u Zagrebu. Završila je dvije osnovne škole, Osnovnu školu Petra Zrinskog (2006.-2014.) te Glazbenu školu Blagoje Bersa (2007.-2013.). Srednjoškolsko obrazovanje nastavlja u općoj gimnaziji VII. Gimnazija (2014.-2018.), a paralelno trenira odbojku (2008.-2018.) i pohađa dodatni engleski u Školi stranih jezika Nova Varšavska (2011.-2018.). Po završetku gimnazije upisuje Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Agrarna ekonomika (2018.-2021.). Pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Nataše Mikulec brani završni rad naslova „Validacija analitičkih metoda“, a stručnu praksu odraduje u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u sklopu Službe za zdravstvenu ekologiju provodeći analize u referentnim laboratorijima. Akademske godine 2021./2022. upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mlijeka te dodatno izvršava poslove prikupljanja i pripreme uzoraka u Referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode u Zavodu za Mljekarstvo, Agronomskog fakulteta. Po završetku studija stručnu praksu radi u LEDO plus d.o.o. sudjelujući u proizvodnom pogonu za sladoledne smjese i laboratorijima za kontrolu kvalitete. Kao koautor sudjelovala je na dva međunarodna znanstvena skupa „Simpozij agronoma“ i „Međunarodni kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane“. Usavršavala se i u ljetnim školama na Università Bocconi položivši predmet International Business čime je ostvarila dodatnih 6 ECTS bodova te na University of Oxford predmet English Language and Literature. Položila je lovački ispit, vozački ispit B kategorije i stupanj naprednog jedrenja Academie Navalis Adriatica. Tijekom školovanja na fakultetu primala je STEM stipendiju MZO-a na temelju prosjeka ocjena.