

Patogeni mikroorganizmi u mlijeku i mliječnim proizvodima

Grgurovac, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:615882>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-11-29**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Maja Grgurovac

Patogeni mikroorganizmi u mlijeku i mliječnim proizvodima

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Završni rad

Patogeni mikroorganizmi u mlijeku i mliječnim proizvodima

Tehnologija prerade sirovina animalnog podrijetla

Predmetni nastavnik: Dr. sc. Vedran Slačanac, doc.

Student/ica: Maja Grgurovac (MB: 3315/10)

Mentor: Dr. sc. Vedran Slačanac, doc.

Predano (datum): **14.10.2014.god.**

Pregledano (datum):

Ocjena:

Potpis mentora:

Patogeni mikroorganizmi u mlijeku i mliječnim proizvodima

SAŽETAK

Mlijeko je vrlo važna namirnica animalnog podrijetla, zbog svog sastava lako podložna kvarenju. Samo kvarenje uzrokuju različiti mikroorganizmi, od kojih neki mogu biti imati vrlo štetno djelovanje za zdravlje čovjeka. Posebna važnost treba se pridati subjektima u doticaju sa mlijekom, koji su vrlo često prenositelji kontaminirajućih patogena. Neki od mogućih patogena jesu : mikrokoki (*Micrococcus*, *Staphylococcus*), fekalni enterokoki (*Enterococcus faecalis*), enterokoki mastitisa (*Enterococcus. agalactiae*, *E. dysgalactiae*), asporogene i sporogene grampozitivne štapičaste bakterije (*Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Arthobacter*, *Kurthia*, *Bacillus*) i asporogene gramnegativne bakterije (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Alcaligenes*). Stručno osoblje mora poznavati svakog od navedenih kontaminanata, znati ga identificirati te, uz odgovarajuće pravilnike brinuti o broju identificiranih mikroorganizama.

KLJUČNE RIJEČI:

Mlijeko, kemijski sastav, mikrobiologija mlijeka, izvori kontaminacije, tipovi kvarenja, najčešći patogeni mikroorganizmi, *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, morfološke osobine, otpornost, patogenost, toksičnost, mikrobiološko ispitivanje mlijeka, ukupan broj bakterija, metode izolacije, hranjive podloge, inkubacija, kolonije, kriteriji higijene

Pathogenic microorganisms in milk and dairy products

SUMMARY: Milk is an important food of animal origin, and due to its easily perishable. Deterioration can be caused by various microorganisms, some of which can be a very harmful effects for human health. Special importance should be given to subjects in contact with milk, which are often carriers of contaminating pathogens. Some of the possible pathogens are: micrococci (*Micrococcus*, *Staphylococcus*), fecal enterococci (*Enterococcus faecalis*), mastitis enterococci (*Enterococcus. Agalictiae E. dysgalactiae*), asporogene and sporulated gram-positive rod-shaped bacteria (*Microbacterium*, *Corynebacterium*, *Arthobacter*, *Kurthia*, *Bacillus*) and asporogene gramnegativne bacteria (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Alcaligenes*). Professional personnel must know each of these contaminants and take care about their number in milk and dairy products.

KEYWORDS: milk, chemical composition, milk microbiology, sources of contamination, types of decay, the most common pathogens, *Salmonella*, *Proteus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, morphological characteristics, resistance, pathogenicity, toxicity, microbiological testing of milk, the total number of bacteria , methods of isolation, culture media, incubation, colonies, hygiene criteria

SADRŽAJ

SAŽETAK	2
KLJUČNE RIJEČI:	2
SUMMARY	3
KEYWORDS:	3
1. UVOD	6
2. Mikrobiologija mlijeka i mliječnih proizvoda	6
2.1. Osnove mikrobiologije mlijeka	6
2.2. Osobine najčešćih patogenih bakterija mlijeka i mliječnih proizvoda	8
2.2.1. Bakterije roda Salmonella	8
2.2.2. Rod Staphylococcus aureus	9
2.2.3. Sulfitorreduktirajuće klostridije	10
2.2.4. Escherichia coli	11
2.2.5. Proteus	11
2.2.6. Listeria monocytogenes	12
3. METODE MIKROBIOLOŠKE KONTROLE MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA	13
3.1. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku	14
3.1.1. Referentna metoda detekcije ukupnog broja mezofilnih bakterija u mlijeku	14
3.1.2. Bactoscan - Određivanje ukupnog broja bakterija metodom protočne citometrije	15
3.2. Metode određivanja koliformnih bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima	16
3.3. Metode određivanja bakterija roda Salmonella	16
3.4. Metode određivanja bakterija roda Proteus	17
3.5. Metoda određivanja bakterija roda Staphylococcus	17
3.6. Metoda određivanja broja bakterija roda Clostridium	18
3.7. Metode određivanje <i>Listeria monocytogenes</i>	19
ZAKLJUČAK	20

Litreatura:..... 21

1.UVOD

U ovome radu pisati ću o važnosti poznavanja mogućih patogenih mikroorganizama mlijeka i mliječnih proizvoda, te važnosti njihove detekcije i kontrole.

Mlijeko je biološka tekućina, vrlo složenog sastava, žućkasto-bijele boje, koju izlučuje mliječna žlijezda sisavaca ili žene. Odlična je podloga za razmnožavanje svih bakterija i veoma velikog broja raznih vrsta gljiva i drugih mikroorganizama, te je ono namirnica koja se najlakše i najčešće kontaminira nepatogenim i patogenim mikroorganizmima. Mlijeko se troši u veoma velikom količinama za ishranu stanovišta, naročito male djece i bolesnih ljudi, te je iz tog razloga ono od veoma velikog epidemiološkog značaja.

Patogeni mikroorganizmi uzrokuju različite bolesti u ljudskom organizmu. Rast, razmnožavanje i konačni broj mikroorganizama u mlijeku ovisi vrsti prisutnih mikroorganizama i o uvjetima potrebnim za rast: O₂, CO₂, voda, hranjive tvari, pH sredine, te temperatura i vrijeme.

2. Mikrobiologija mlijeka i mliječnih proizvoda

2.1. Osnove mikrobiologije mlijeka

Iako se pretpostavlja da je mlijeko prilikom izlaska iz vimena gotovo sterilno, praksa je pokazala da je gotovo nemoguće proizvesti mlijeko bez mikroorganizama. Svježe pomuženo mlijeko može imati od nekoliko stotina do nekoliko tisuća mikroorganizama / mL. Vremenom se njihov broj uvećava, i uslijed njihovog metabolizma mijenjaju se senzorna, fizička i kemijska svojstva mlijeka. Zbog svog sastava mlijeko predstavlja veoma pogodnu podlogu za razvoj mikroorganizama, među kojima mogu biti patogeni za čovjeka.

Potrebno je voditi računa o svim operacijama od mužnje do plasmana ovih proizvoda na tržište, kako bismo dobili mikrobiološki ispravno mlijeko i mliječne proizvode. Mogući izvori kontaminacije mlijeka su slijedeći:

1. Uslijed prisutnosti mikroorganizama u muznim kanalima i vimenu
 - preko ruku i garderobe radnika, preko bolesnih i radnika
 - upotrebom kontaminiranog aparata za mužnju i drugih kontaminiranih posuda
 - nehigijenski uslovi prostorija za mužnju
2. iz zraka, vode, zemljišta, stočne hrane
3. u toku transporta
4. u toku obrade i prerade mlijeka
5. u toku skladištenja i distribucije

Tablica 1. Najčešći tipovi kvarenja mlijeka i bakterije koje ih prouzrokuju

TIP KVARENJA		UZROČNICI KVARENJA
UKISELJAVANJE	T = 10-37°C	<i>S.lactis</i> , koliformne bakterije, mikrokoki, laktobacili
	T = 37-50°C	<i>S. thermophilus</i> , <i>S. faecalis</i>
	T ≥ 50°	<i>L. thermophilus</i> , <i>B. calidolactis</i>
STVARANJE PLINOVA		Koliformne bakterije, kvasci <i>Clostridium</i> i <i>Bacillus spp</i>
PROTEOLIZA MLIJEKA	Kisela	mikrokoki, streptokoki
	Alkalna	<i>Serratia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Proteus</i> , <i>Microccus</i> , <i>Clostridium</i> i <i>Bacillus spp</i>
SLUZAVOST	Površinska	<i>Alcaligenes visiolactis</i>
	U svim slojevima	<i>L. bulgaricus</i> , <i>S. lactis</i> , <i>L. plantarum</i>
PROMENA UKUSA	Kiseo	<i>S. lactis</i>
	Kiseo-aromatični	<i>Leuconostoc spp</i> , mliječni streptokoki
	Oštar	koliformne bakterije
	Gorak	Proteolitičke i koliformne bakterije
	ukus na karamel	<i>S. lactis</i>
	Ukus na sapun	<i>Pseudomonas ichthyosmia</i>

PROMJENA BOJE	Plavo-siva	<i>Pseudomonas syncyanea</i>
	Tamno plava	<i>Pseudomonas syncyanea</i> i <i>S. lactis</i>
	Žuta boja površine	<i>P. synxantha</i>
	Crvena boja površine	<i>Serratia spp.</i>
	Crveni sediment	<i>Micrococcus roseus</i>
	Smeđa	<i>P. fluorescens</i>

Mikroorganizmi mlijeka mogu se podijeliti na tri grupe:

1. Tehnološko korisni mikroorganizmi mlijeka koji se koriste za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda. To su bakterije koje se dodaju mlijeku da bi fermentirale mliječni šećer, laktozu u mliječnu kiselinu.
2. Tehnološko škodljivi koji uzrokuju kvarenje mlijeka, te čine mlijeko neprihvatljivo za konzumiranje.
3. Patogeni mikroorganizmi koji uzrokuju različite bolesti.

2.2. Osobine najčešćih patogenih bakterija mlijeka i mliječnih proizvoda

2.2.1. Bakterije roda *Salmonella*

Morfološke i kulturalne osobine: Bakterije roda *Salmonella* jesu gram-negativni, fakultativno anaerobne bacili koji preko fekalija i urina kontaminiraju vodu, životne namirnice i sredinu u kojoj se kreću i borave ljudi i životinje. Optimalna temperatura na njihov uzgoj je 35 °C. Za izolovanje *Salmonella* koriste se tečne selektivne podloge, kao npr. Selenit bujon ili tetrationsat Kaufmann-Mullerov bujon. Čvrste podloge koriste se kao diferencijalne podloge, za razlikovanje *Salmonella* bakterija od drugih vrsta: Brillijant-zeleni agar, SS agar, Wilson-Blair agar i dr.

Otpornost: Nisu otporne bakterije, temperatura od 56⁰C ih ubija za 30 minuta. Osjetljive na klor i klorne preparate.

Toksičnost: *Salmonelle* proizvode endotoksin.

Patogenost: Nisu striktno patogene za ljude i životinje. Uzrokuju enteralne groznice i gastrointestinalna oboljenja.



Slika 1. *Salmonella* (izgled pod mikroskopom)

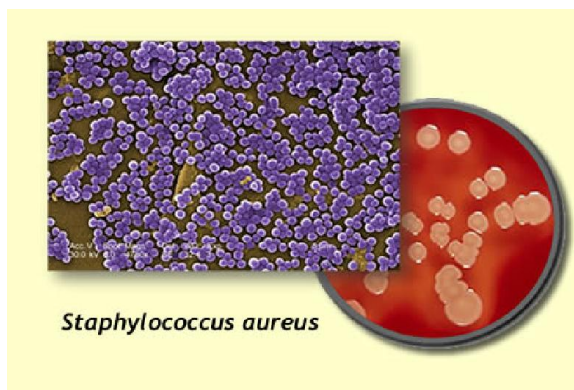
2.2.2. Rod *Staphylococcus aureus*

Morfološke i kulturalne osobine: To su gram pozitivne, fakultivno anaerobne bakterije koje su zastupljeni u vodi, zraku, prašini i dr. Poznate su nam 23 vrste roda *Staphylococcus*, ali samo *Staphylococcus aureus* posjeduje enzim koagulazu i naziva se koagulaza pozitivni *Staphylococcus*. Optimalne su temperature 35 °C, a optimalnog pH je 7,4, a kolonije su obično neprozirne, okrugle, glatke, uzdignute.

Metabolizam: Na sljedeće probe reaguju pozitivno: katalaza, koagulaza, aciduju manitol u aerobnim i anaerobnim uslovima, proizvode acetoin. Na Krvnom agaru oko kolonija se obrazuje zona β-hemolize. Katalaza test: + (pozitivan); Koagulaza test: + (pozitivan).

Otpornost: Može da izdrži visoke temperature, npr. temperaturu 60 °C može da izdrži 1 sat, te su otporne na sušenje i visoke koncentracije NaCl i šećera.

Patogenost i toksičnost: U namirnicu potječe iz kože, usta ili nosa osobe koja je radila sa hranom. Njezina prisutnost je znak nedovoljne higijene.



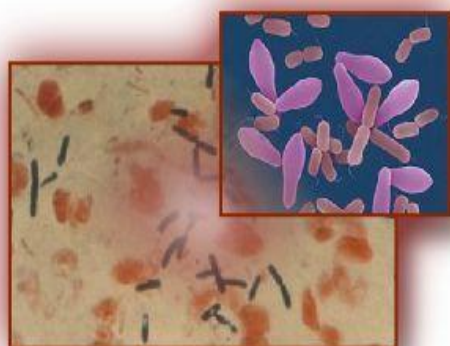
Slika 2. *Staphylococcus aureus*

2.2.3. Sulfitoreduktirajuće klostridije

Morfološke i kulturalne osobine: *Clostridium perfringens* je striktni gram pozitivni anaerob, sa optimalnom temperaturom od 45°C. Nalazi se kao saprofit crijevne flore kod ljudi i životinja, te raste na većini hranjivih podloga dajući okrugle zelenkaste kolonije .

Metabolizam: Sojevi *C.Perfringens* se razmnožavaju pri temperaturi od 37⁰C, dok im je optimalna temperatura 45⁰C. Proizvode aktivne enzime, te razlažu glukozu, fruktozu, laktozu i dr.

Toksičnost i patogenost: Proizvode 12 različitih toksina i izazivaju plinovite gangrene, enteritise i alimentarne toksikoinfekcije.



Slika 3. *Clostridium perfringens* (izgled pod mikroskopom)

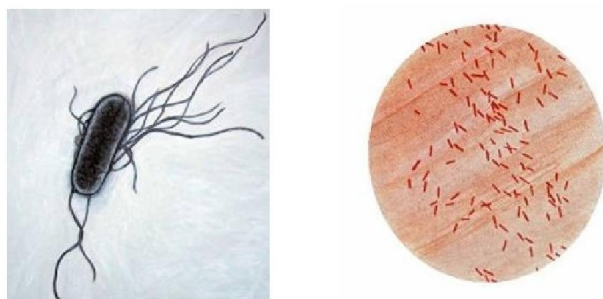
2.2.4. *Escherichia coli*

Morfološke i kulturalne osobine: *Escherichia* je Gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija. Veoma je raširena u prirodi, u vodi, u digestivnom traktu ljudi i životinja pa u okolišnu sredinu dolazi preko fekalija. Njihova prisutnost u namirnicama ili vodi znak je loših higijenskih uslova i mogućeg fekalnog zagađenja. Razmnožavaju se dobro na mnogim hranjivim podlogama.

Metabolizam: Proizvodi brojne enzime i razlaže laktozu, škrob i bjelančevine.

Otpornost: *Coli* bakterije su veoma otporne i mogu dugo vremensko razdoblje preživjeti u vodi, zemlji ili površini predmeta. Povišena temperatura ih uništava, npr. pri temperaturi od 60°C preživljavaju svega 15 minuta.

Patogenost i toksičnost: *Coli* je uvjetno patogena bakterija, jer je korisna za domaćina djelujući antagonistički na brojne patogene, no ako dospije u druge organe može uzrokovati različite infekcije.



Slika 4. *Escherichia coli* (izgled pod mikroskopom)

2.2.5. *Proteus*

Morfološke i kulturalne osobine: Rod *Proteus* spada u porodicu Enterobacteriaceae i sadrži više vrsta. U životnim namirnicama najčešće su *P. vulgaris* i *P. mirabilis*. Obično se nalazi u digestivnom traktu ljudi i životinja, u zemlji i na biljkama. Na Endo agaru kolonije su okrugle, glatke, svijetlo-ružičaste (laktoza – negativne). Kultura ima karakterističan, neugodan miris amonijaka.

Otpornost: Pripadaju relativno otpornim bakterije. Pri temperaturi od 55°C u vlažnim uvjetima, umiru u roku od 1 sata. Osjetljive su na razna dezinfekcijska sredstva, posebno na fenolna i halogenska. Izazivaju sepse, meningitis i urinarne infekcije.



Slika 5. *Proteus* (izgled pod mikroskopom)

2.2.6. Lysteria monocytogenes

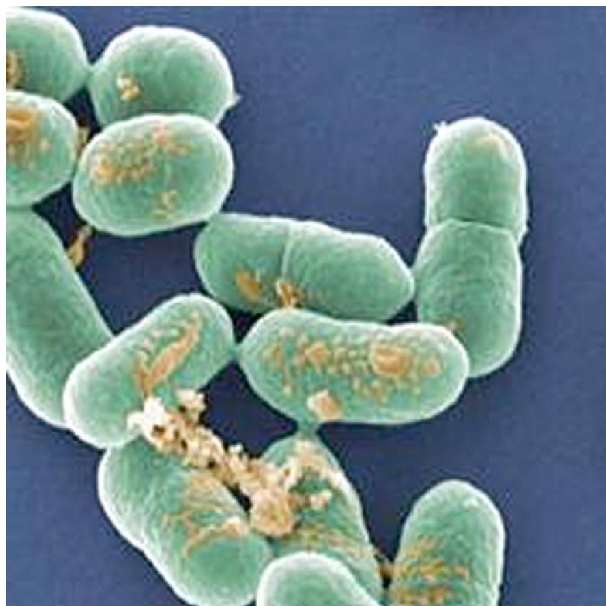
Morfološke i kulturalne osobine: *L.monocytogenes* je gram pozitivna bakterija sa pokretljivim, nekapsulirajućim štapićem. Raste na uobičajnim hranilištima u aerobnim uvjetima i fakultativni je anaerob. Na krvnom agaru tvori beta – hemolizu. Nalazi se u životinjskom i ljudskom fecesu, kanalizaciji, površinskim vodama, biljkama, životinjskoj hrani, u staji, te svugdje u okolišu.

Otpornost: „Može rasti i pri 0°C, može biti prisutna i u rashlađenoj hrani. Može preživjeti u nepovoljnim uvjetima uključivši sušenje i soljenje. Osim toga, bakterija *L. monocytogenes* može rasti u okolišu sa smanjenom koncentracijom kisika pa čak i bez prisutnosti kisika što joj omogućava rast u vakuum-pakiranoj hrani.“ Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: *Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 27.06.2008.*

Patogenost: „*Listerija ulazi u stanice, uključivši i crijevne stanice, izravnom endocitozom. Može preživjeti unutar makrofaga i monocita. Pobačaj nastane zbog edema i nekroze placente. Listeriozni encefalitis je jednostrana akutna*

upala moždanog debla.“ *Listerioza: Patogenoza,*

<http://hr.wikipedia.org/wiki/Listerioza>



Slika 6. *Listeria monocytogenes* pod mikroskopom

3.METODE MIKROBIOLOŠKE KONTROLE MLIJEKA I MLIJEČNIH PROIZVODA

Mikrobiološko ispitivanje mlijeka i mliječnih napitaka obuhvaća:

- utvrđivanje ukupnog broja bakterija (direktna, indirektna metoda)
- određivanje biokemijske aktivnost mikroorganizama
 - a) Utvrđivanje broja kvasaca i plijesni u mlijeku
 - b) Dokazivanje koliformnih bakterija u mlijeku
 - c) Dokazivanje roda *Salmonella*
 - d) Dokazivanje roda *Proteus*
 - e) Dokazivanje roda *Staphylococcus*
 - f) Dokazivanje *sulfitoreducirajućih clostridia*
 - g) Dokazivanje *Listerie monocytogenes*

3.1. Utvrđivanje ukupnog broja bakterija u mlijeku

„Uzorak mlijeka je određena količina mlijeka koja po osobinama i sastavu predstavlja ukupnu količinu mlijeka iz koje je uzet.“ Slačanac Vedran. *Kontrola kakvoće mlijeka:*

Uzimanje uzoraka za ispitivanje kakvoće mlijeka,

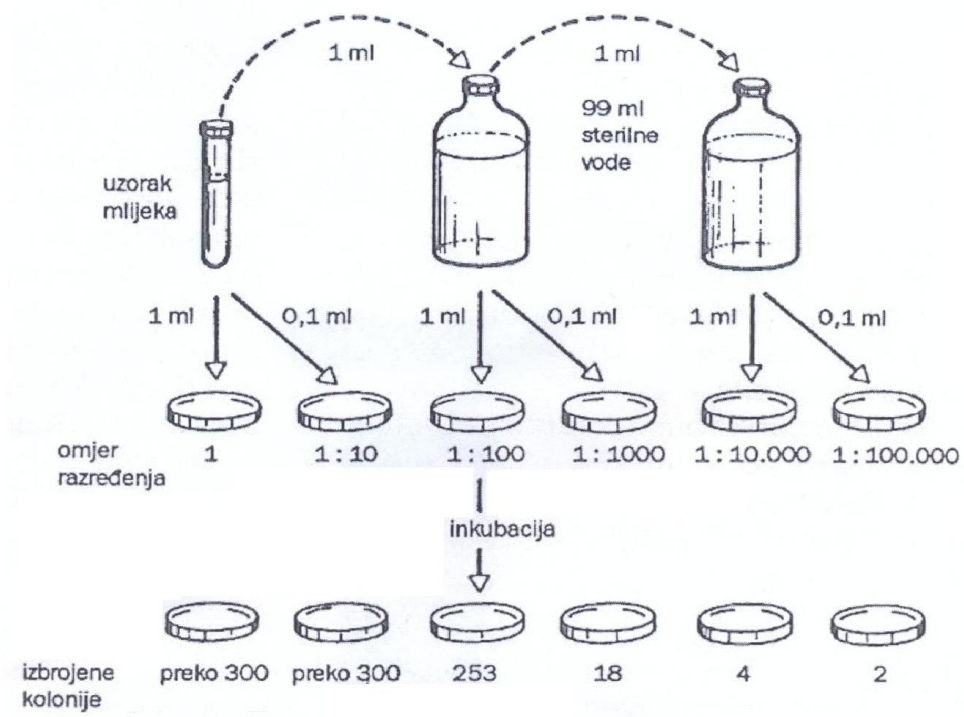
http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Sirovine_animalnog_podrijetla/mlijeko-jaja-med/predavanja/

Za uzimanje uzoraka je bitno ih provodi za to ovlaštena osoba, jednom mjesečno, nenajavljeno kako bi se izbjegle moguće manipulacije. I to: Dva za utvrđivanje udjela mliječne masti, dva za utvrđivanje udjela bjelančevina, jedan za utvrđivanje broja mikroorganizama, jedan za utvrđivanje broja somatskih stanica, jedan za utvrđivanje točke ledišta, jedan za utvrđivanje inhibitornih tvari. Priprema se prosječni uzorka iz svih kanti, te miješa i ulijevan u bočicu 40 ml (sterilna bočica s sterilnim gumenim čepom, graduirana na 40 ml). Bočica s uzetim uzorkom se označi bar-kod naljepnicom, a sabirač popunjava predatnicu, odlaže bočicu s uzorkom u kašetu s uzorcima, zatvara kašetu i odvozi u laboratorij.

3.1.1. Referentna metoda detekcije ukupnog broja mezofilnih bakterija u mlijeku

Određivanje se vrši brojanjem kolonija izraslih u hranjivom agaru. Određuje se broj živih bakterija u određenom volumenu, najčešće u 1 mL. Mlijeko se razrijedi sa fiziološkom otopinom u omjeru 1:100 ili 1:1000, te se 1 ml uzorka prenese u sterilnu Petrijevu zdjelicu i doda na 45°C ohlađen hranjivi agar.

Kada se ohladi i otvrdne, Petrijevka se stavlja na inkubaciju na 30°C / 72h. Nakon inkubacije broje se porasle kolonije, te se dobiveni broj množi sa stupnjem razrjeđenja i dobije se broj bakterija u 1 ml mlijeka.



Slika 7. Standardna metoda određivanja broja živih bakterija na čvrstoj podlozi u Petrijevoj zdjelici

Izračunavanje broja bakterija iz uzorka

(CFU- Colony forming unit)

“jedinice koje tvore kolonije”

$$CFU/ml = \frac{N}{V} r$$

N- broj poraslih kolonija;

r- recipročna vrijednost razrjeđenja;

V- upotrijebljeni volumen uzorka;

3.1.2. Bactoscan - Određivanje ukupnog broja bakterija metodom protočne citometrije

„Bakterije se boje fluorescentnom bojom, a dezagregiraju se sastojci mlijeka koje mogu ometati brojenje (kuglice masti, proteinske micelle i somatske stanice).

Detektor u aparatu registrira fluorescentno svjetlo koje emitira DNA obojenih bakterija. Registrirani svjetlosni impulsi pretvaraju se u elektronske, koje registrira detektor visoke osjetljivosti.“ Slačanac Vedran. *Mikrobiološka pretraga mlijeka:*

Bactoscan, http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Sirovine_animalnog_podrijetla/mlijek-jaja-med/predavanja/

3.2. Metode određivanja koliformnih bakterija u mlijeku i mliječnim proizvodima

One jesu štapičaste, gramnegativne, nesporogene bakterije. Mogu biti aerobne ili fakultativno anaerobne i obično imaju sposobnost fermentacije laktoze. U grupu koliformnih bakterija spadaju različiti rodovi enterobakterija. Najčešći *Enterobacteriaceae*: *Escherichia*, *Kluyvera*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, i *Enterobacter*.

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

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

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

3.3. Metode određivanja bakterija roda Salmonella

Identifikacija bakterija roda *Salmonella* vrši se na način da se 25 ml uzorka prenese u Erlenmayer-ovu tikvicu sa staklenim zrcima i dodavanjem 225 ml selenit bujona. Inkubacija se vrši 18 do 24 sata na 37°C.

Nakon perioda inkubacije, vrši se precjepljivanje na površinu *Salmonella-Shigella* (SS) i Wilson-Blair bizmut sulfidnog agara. Inkubacija se vrši na 37°C od 24 do 48 sati. Nakon inkubacije se na SS agaru primjećuju bijele kolonije, dok se na Wilson-Blair podlozi uočavaju smeđe do crne sa metalnim odsjajem.

Idući korak je bojanje po Gram-u koje se, ukoliko se uoče štapičaste bakterije, vrši precjepljivanje na Klingerov dvostruki šećer. Identifikaciju vršimo trostrukim precjepljivanjem na podloge sa ureom, KCN-om i indolom, te inkubacijom na 37°C u vremenu od 24 do 48 sati. Salmonela daje sve tri reakcije negativne.

Vrste roda *Salmonella* ne smiju se nalaziti u 25 ml svih vrsta mlijeka i napitaka od mlijeka, niti u 25 g mlijeka u prahu.

3.4. Metode određivanja bakterija roda Proteus

Bakterije roda *Proteus* su značajne po tome da se vrlo brzo razmnožavaju na običnim hranjivim podlogama, šire se po površini podloge stvarajući terasasti pokrivač. Obzirom da takova pojava otežava analizu uzoraka koji sadrže *Proteus* na prisutnost drugih vrsta, te je to razlog zašto selektivne podloge najčešće sadrže inhibitore rasta za vrste roda *Proteus*.

Izolacija roda *Proteus* se vrši na način da se 1 ml uzorka precjepljuje na hranjivi bujon i inkubira od 24 do 28 sati na 37°C.

Nakon bojanja po Gram-u, izrasle gramnegativne štapičaste bakterije se precjepljuju na dvostruku šećer po Klingeru, te se vrši identifikacija na urea, KCN i fenil-alanin testom, na koje su ove bakterije pozitivne.

Vrste roda *Proteus* ne smiju se nalaziti u 0,001 ml sirovog mlijeka, niti u 1 ml pasteriziranog mlijeka u originalnom pakovanju dok se nalazi skladišteno u mljekari, niti u 1 ml zgusnutog zaslađenog niti zgusnutog zaslađenog obranog mlijeka, niti u 0,1 g mlijeka u prahu.

3.5. Metoda određivanja bakterija roda Staphylococcus

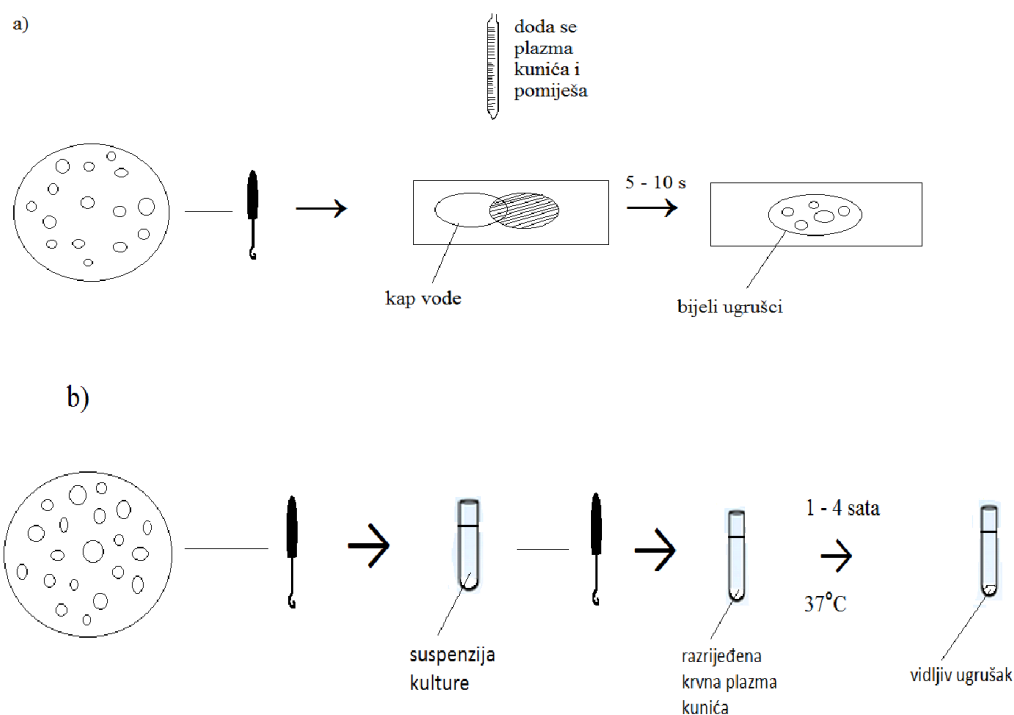
Staphylococcus aureus je bakterija vrlo rezistentna na natrijev klorid, koji inhibira rast većine gramnegativnih i većeg dijela grampozitivnih bakterija. Iz tog razloga selektivne podloge sadrže vrlo visoke koncentracije natrijevog klorida.

Identifikacija ovog roda vrši se na način da se uzorak precjepljuje na površinu slanog bujona, te ETGP podloge po Baird-Parkeru koja usporava rast drugih bakterija, a pospješuje rast pozitivnih stafilokoka. Kolonije koje se dobiju nakon inkubacije od 24 do 48 sati na 37°C jesu

crne, sjajne i konveksne. Oko samih kolonija se nakon 48 sati pojavljuju tamni prstenovi kao posljedica lipolitičke aktivnosti.

Potom slijedi test produkcije koagulaze, uz test koagulaze plazme i inkubaciju na 37°C. Rezultati se potom očitavaju nakon 2,4, 8 i 24 sata.

Koagulaza pozitivni stafilokoki se ne smiju nalaziti u 0,01 ml sirovog mlijeka, niti u 1 ml pastereziranog mlijeka u originalnom pakovanju dok se nalazi skladišteno u mljekari, niti u 1 ml zgusnutog zaslađenog, niti zgusnutog zaslađenog obranog mlijeka, niti u 0,1 g mlijeka u prahu.



Slika 8. Shematski prikaz dokazivanja a) vezane i b) slobodne koagulaze.

3.6. Metoda određivanja broja bakterija roda *Clostridium*

Clostridium perfringens pripada skupini sulfidoreducirajućih bakterija, zbog sposobnosti da natrijev-sulfit reduciraju u natrijev-sulfid. Upravo zbog te osobine njihova identifikacija se vrši pomoću sulfidnog agara.

Identifikacija se vrši na način da se odgovarajuće razrjeđenje pipetira u epruvetu i ostavlja da stoji 10 minuta na 80 °C. Potom stavljamo sulfidni agar i inkubiramo od 3 do 5 dana na 37°C. Ukoliko dođe do nastajanja crnih loptastih kolonija, slijedi bojanje po Gram-u i identifikacija grampozitivnih štapičastih bakterija sa ili bez spora.

Sulfidoreducirajuće klostridije se ne smiju nalaziti u 0,01 ml sirovog mlijeka, steriliziranog mlijeka, mliječnih proizvoda, 1 ml pasteriziranog mlijeka u originalnom pakovanju dok se nalazi skladišteno u mljekari, niti u 1 ml zgusnutog zaslađenog niti zgusnutog zaslađenog obranog mlijeka, niti u 0,01 g mlijeka u prahu

3.7. Metode određivanje *Listeria monocytogenes*

Za izolaciju *L. monocytogenes* upotrebljava se UVM bujon za revitalizaciju i namnožavanje listerije. Slijedeći stupanj selektivnog namnožavanja uključuje upotrebu drugog selektivnog bujona – Fraser bujona. Rast prateće mikroflore inhibiran je dodatkom litijeva – klorida, nalidiksične kiseline i akriflavina. Svako zacrnjenje Fraserova bujona upozorava na moguću prisutnost listerije, te se precjepljuje na selektivnu podlogu PALCAM agara. Porast listerije se očituje kao porast sitnih maslinastozelenih kolonija sa crnim halo efektom. Indetifikacija listerije uključuje pozitivne potvrdne testove – bojanje po Gram-u, katalaza test, CAMP test, test iskorištenja ugljikohidrata i test pokretljivosti.

ZAKLJUČAK

Mlijeko je vrlo važna animalna sirovina današnjice. Zbog svog kemijskog sastava podložna je kvarenjima. Patogeni kao što su bakterije rodova *Proteus*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium* su samo neki od brojnih koji se mogu pronaći u mlijeku i mliječnim proizvodima, a koji svojim prisutnošću i produktima metabolizma mogu imati štetno djelovanje za zdravlje čovjeka. Neophodno je imati stručno osoblje koje će znati metodama izolacije prepoznati mogućeg kontaminanta i provesti mjere zaštite potrošača.

Republika Hrvatska ima vrlo dobar sustav kontrole higijene mlijeka i mliječnih proizvoda. Odredbom da se otkupljivati može samo mlijeko kojem je određena kakvoća, oformljen je središnji laboratorij za kontrolu kakvoće mlijeka svih proizvođača u Hrvatskoj i to u Križevcima. Laboratorij je 2004. godine akreditiran sukladno normi HRN EN ISO/IEC 17025, te je više puta uspješno proveden godišnji nadzor od strane Hrvatske akreditacijske agencije, čime je potrošačima osigurano mlijeko vrhunske kvalitete.

Litreatura:

Tratnik Lj. : *Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija*, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 1998.

Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja RH: Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Narodne novine 27.06.2008.

http://studenti.ptfos.hr/Preddiplomski_studij/Sirovine_animalnog_podrijetla/mljeko-ajaja-med/predavanja/

<http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologijahrane/mikrobioloska-kontrola-mleka-mlecnih-proizvoda>

Brčina A. : *Mikrobiološka kontrola hrane*, interna skripta, Tuzla, 2013.