

Psihrotrofne bakterije i njihovi negativni utjecaji na kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda

Dubravka Samaržija, Šimun Zamberlin, Tomislav Pogačić*

Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za mljekarstvo,
Svetotošimunska 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prispjelo - Received: 21.02.2012.
Prihvaćeno - Accepted: 24.05.2012.

Sažetak

Osobine i svojstva mikrobnih populacija sirovog mlijeka u momentu prerade presudne su za pojavu kvarenja, vrijeme održivosti, organoleptičku kvalitetu i randman mlijeka i mliječnih proizvoda. Hlađenje i vremenski duža pohrana sirovog mlijeka na niskim temperaturama, uobičajena u današnjim uvjetima proizvodnje, pogoduje rastu psihrotrofnih bakterija. Zbog toga, broj tih bakterija u ohlađenom sirovom mlijeku u odnosu na broj mezofilnih aerobnih bakterija značajno je viši od njihovog idealnog omjera od 10 %. Većinu psihrotrofnih bakterija karakterizira sposobnost tvorbe ekstracelularnih i/ili intracelularnih termostabilnih enzima (proteaze, lipaze, fosfolipaze) koji mogu uzrokovati kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda. Određene vrste psihrotrofnih bakterija pokazuju i prirodnu otpornost na antibiotike i/ili mogu stvarati toksine te se istovremeno smatraju i uvjetno patogenim bakterijama. U smislu kvalitete sirovog mlijeka i mliječnih proizvoda psihrotrofne bakterije postale su ozbiljan problem s kojim se suočava današnja mljekarska industrija. Svrha ovog preglednog rada bila je opisati negativan utjecaj koji psihrotrofne bakterije imaju na kvalitetu sirovog mlijeka i gotovih mliječnih proizvoda. Također, u radu su opisane najznačajnije vrste, te značenje kontrole kojom se može umanjiti kontaminacija mlijeka i mliječnih proizvoda psihrotrofnim bakterijama.

Ključne riječi: psihrotrofne bakterije, kontaminacija, biofilm, kvaliteta mlijeka i mliječnih proizvoda, kontrola

Uvod

Nakon što je pedesetih godina 20. stoljeća uvedeno obvezno hlađenje sirovog mlijeka njegova bakteriološka kvaliteta u odnosu na ranije razdoblje značajno se poboljšala (Causin i Bramley, 1985). Od tada, acidifikacija sirovog mlijeka uzrokovana bakterijama mliječne kiseline i drugim mezofilnim bakterijama je gotovo u potpunosti zaustavljena. Također, prema službenim podacima Hrvatske poljoprivredne agencije (interno izvješće HPA, 2011), od ukupno isporučenih količina, 93 % sirovog mlijeka u 2011. godini dostiglo je EU standard za ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (≤ 100.000 cfu mL⁻¹) i broj somatskih stanica (≤ 400.000 mL⁻¹).

Međutim, duže vrijeme hladne pohrane sirovog mlijeka na niskim temperaturama (2-6 °C) značajno

mijenja sastav prisutnih mikrobnih populacija. U ohlađenom sirovom mlijeku početno dominantne Gram-pozitivne mezofilne aerobne bakterije zamijenjene su Gram-negativnim i Gram-pozitivnim psihrotrofnim bakterijama (Causin i Bremley, 1985; Lafarge i sur., 2004). Dominantnost psihrotrofnih bakterija u ukupnoj mikrobnj populaciji još je naglašenija kada se mlijeko proizvodi u higijenski lošijim uvjetima i/ili sadrži povećani broj somatskih stanica (Walstra i sur., 1999a; Barbano i sur., 2006). Iz tih razloga, od ukupno prisutne mikrobne populacije u ohlađenom sirovom mlijeku psihrotrofne bakterije u pravilu čine više od 90 % (Magan i sur., 2001). Također, Cempírková (2002) je na osnovu analiza dvogodišnjeg pokusa (tri stada) utvrdila visoku korelaciju ($r=0,69$) između broja psihrotrofnih bakterija i ukupnog broja bakterija u uzorcima skupnog sirovog mlijeka.

*Dopisni autor/Corresponding author: Tel./Phone: +385 1 2393 926; E-mail: samarzija@agr.hr

Osim sposobnosti rasta i razmnožavanja na niskim temperaturama, veliki broj tih bakterijskih vrsta ima sposobnost tvorbe ekstracelularnih i/ili intracelularnih hidrolitičkih termostabilnih enzima (Causin, 1982; Chen i sur., 2003). Svoju aktivnost ti enzimi zadržavaju i nakon uobičajene konvencionalne toplinske obrade mlijeka. Također, iz toplinski obrađenog mlijeka i mliječnih proizvoda psihrotrofne bakterije su najčešće izolirani uzročnici kvarenja u slučajevima naknadne mikrobne kontaminacije proizvoda (Larsen i Jørgensen, 1997; Eneroth i sur., 2000; Santana i sur., 2004). Upravo zbog tih osobina i svojstava psihrotrofnih bakterija kvarenje i umanjena kvaliteta mliječnih proizvoda mogu biti posljedica ili prisutnosti živih organizama i/ili njihovih termostabilnih enzima (Grosskopf i Harper, 1969; Fox i Stepaniak, 1983; Braun i sur., 1999; Koka i Weimer, 2001). Kvarenje se očituje u promjeni okusa, neželjenoj koagulaciji proteina mlijeka, povećanju koncentracije slobodnih masnih kiselina, te ovisno o vrsti mliječnog proizvoda u promjeni teksture i udjelu pojedinih nepoželjnih organskih spojeva (Cox, 1993; Boor i Murphy, 2002; McPhee i Griffiths, 2002; Cempírková i Mikulová, 2009). U odnosu na druge parametre kvalitete, negativan utjecaj psihrotrofnih bakterija očituje se i kroz umanjenu pogodnost mlijeka za preradu, manji prinos, te kraće vrijeme održivosti proizvoda na policama (Causin, 1982).

Većina psihrotrofnih bakterija koje uzrokuju kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda nije patogena. Međutim, određene vrste tih bakterija imaju sposobnost tvorbe toksina i/ili pokazuju rezistentnost na antibiotike te se moraju smatrati i uvjetno patogenim bakterijama (Netten i sur., 1990; Beattie i Williams, 2002; Finlay i sur., 2002; Munsch-Alatossava i Alatossava, 2006; Hemalatha i Banu, 2010; Senesi i Ghelardi, 2010).

Gotovo sve vrste psihrotrofnih bakterija imaju sposobnost adhezije na čvrstu površinu te na unutrašnjoj površini mljekarske opreme mogu stvoriti biofilm. U odnosu na slobodne stanice iste bakterijske vrste, biofilm se teško odstranjuje antibakterijskim sredstvima. Zbog toga, biofilm u mljekarskoj industriji može biti tvrdokoran izvor permanentne kontaminacije proizvoda psihrotrofnim bakterijama uzročnicima kvarenja i/ili uvjetno patogenim bakterijama (Sillankorva i sur., 2008; Simões i sur., 2010).

EU standard za vrhunsku kvalitetu sirovog mlijeka zahtijeva da ukupan broj mezofilnih aerobnih bakterija nije veći od 30.000 cfu mL⁻¹, a broj psihrotrofnih bakterija nije veći od 5000 cfu mL⁻¹. U tom smislu, svako povećanje udjela psihrotrofnih bakterija u mikrobnoj populaciji sirovog mlijeka u određenoj će mjeri negativno utjecati na kvalitetu proizvoda i indirektno na smanjenje prihoda. Tako se procjenjuje da današnja mljekarska industrija zbog kvarenja i umanjene kvalitete proizvoda uzrokovane psihrotrofnim bakterijama ima gubitke i do 30 % (Varnam i Sutherland, 1996a; 1996b; Garbutt, 1997; Randolph, 2006).

U kontekstu negativnih utjecaja psihrotrofnih bakterija na kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda ovaj pregledni rad ima za cilj opisati osobine i svojstva najvažnijih vrsta psihrotrofnih bakterija povezanih s mlijekom i mliječnim proizvodima i njihov potencijal za pojavu kvarenja sirovog mlijeka, toplinski obrađenog mlijeka, vrhnja, maslaca i sira. Također, opisani su najčešći izvori kontaminacije i značenje kontrole psihrotrofnih bakterija u mljekarskoj industriji.

Psihrotrofne bakterije

Psihrotrofne bakterije nisu specifična taksonomska skupina mikroorganizama, već one čine skupinu različitih bakterijskih vrsta koje mogu rasti na temperaturama nižim od 7 °C bez obzira na optimalnu temperaturu rasta (IDF Buletin, 1976). Psihrotrofne bakterije široko su rasprostranjene u prirodi, prvenstveno u vodi i tlu uključujući i raslinje. Mali broj psihrotrofnih bakterija može biti prisutan i u zraku. Svoju optimalnu metaboličku aktivnost iskazuju na temperaturama između 20 i 30 °C. Međutim, one mogu rasti i razmnožavati se na niskim temperaturama zbog adaptacijom uvjetovanog obogaćenja membranskih lipida poluzasićenim masnim kiselinama. Na taj način, promijenjena stanična membrana ima dovoljnu propusnost za aktivni transport metabolita potrebnih za rast i razmnožavanje na niskim temperaturama (Schinik, 1999). Osim toga, u mikrobiološkom smislu psihrotrofni rod *Pseudomonas* nedvojbeno obuhvaća ekološki najraznolikiju skupinu bakterija na Zemlji. Njegova univerzalna rasprostranjenost upućuje na zapanjujući stupanj fiziološke i genetske prilagodljivosti (Spier i sur., 2000).

Psihrotrofne bakterije izolirane iz mlijeka pripadaju Gram-negativnim i Gram-pozitivnim rodovima taksonomski klasificiranih u sedam razreda. *Gammaproteobacteria*, *Bacilli* i *Actinobacteria* su dominantni razredi koji pojedinačno sadrže između 18 i 21 vrsta, dok su *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Flavobacteria* i *Sphingobacteria* četiri manje značajna razreda (Hantsis-Zacharov i Halpern, 2007). Osim toga, Hantsis-Zacharov i Halpern (2007) iz sirovog ohlađenog mlijeka izolirali su oko 20 % izolata za koje pretpostavljaju da su nove vrste psihrotrofnih bakterija.

Značajan broj bakterijskih sojeva izoliranih iz mlijeka, koji pripadaju rodovima: *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* te vrsti *Burkholderia cepacia* (prije *Pseudomonas cepacia*) smatraju se uvjetno patogenim bakterijama. Naime, te bakterijske vrste su povezane s infekcijama ljudi i životinja, posebice u slučajevima imuno-represije, te pokazuju značajnu rezistentnost na antibiotike (Foght i sur., 1996; Svensson i sur., 2006; Munsch-Alatossava and Alatossava, 2005; Beena i sur., 2011).

Rodovi *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Enterobacter* i *Flavobacterium* uz izrazitu dominaciju roda *Pseudomonas* spominju se kao najčešći predstavnici Gram-negativne populacije izolirane iz sirovog mlijeka (Lück, 1972; Murray i Stewart, 1978; Zall, 1985; Sørhaug i Stepaniak, 1997; Stepaniak, 2002). Vrste roda *Pseudomonas* pokazuju osobitu fiziološku i genetsku prilagodljivost. Mnogobrojne molekularne studije potvrdile su zapanjujući stupanj polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata između sojeva iste vrste, a čak i između sojeva koji su fenotipski vrlo bliski (Spiers i sur., 2000; Martins i sur., 2006). Također, *Pseudomonas* spp. karakterizira veća genetska varijabilnost unutar sojeva iste vrste od genetske varijabilnosti utvrđene između različitih vrsta Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija (Martines i sur., 2006).

Pseudomonas spp. s izrazitom dominacijom *P. fluorescens* najčešće su izolirani uzročnici kvarenja sirovog i pasteriziranog mlijeka. Naime, većina tih bakterija (58-91 %) iskazuje izrazitu enzimatsku ekstracelularnu proteolitičku, lipolitičku i fosfolipolitičku aktivnost (Law, 1979; Stead, 1986; Wang i Jayarao, 1999; Wiedmann i sur., 2000). Utvrđene razlike u ekstracelularnoj enzimatskoj aktivnosti *Pse-*

udomonas spp. pripisuju se njihovoj pripadnosti točno određenoj genetskoj skupini (Wiedmann i sur., 2000; Dogan i Boor, 2003).

U odnosu na ostale psihrotrofne organizme *Pseudomonas* spp. karakterizira kratko generacijsko vrijeme (<4 h), što implicira da kontaminacija samo jednom mikrobnom stanicom može dovesti do njihovog broja većeg od 10^6 cfu mL⁻¹ nakon osmodnevne pohrane mlijeka na temperaturi od 4 °C (Langeveld i Cuperus, 1976). Ova tvrdnja podudara se s koeficijentom razmnožavanja 1×10^n mL⁻¹, što znači da će se broj bakterija unutar 48 sati povećati za približno $4 \times 10^{n+3}$ mL⁻¹ kada im je generacijsko vrijeme 4 sata. Istovremeno, povećanje broja bakterija bit će samo $1,6 \times 10^{n+1}$ mL⁻¹ ako je njihovo generacijsko vrijeme 12 sati (Suhren, 1989).

Gram-pozitivne psihrotrofne bakterije izolirane iz sirovog mlijeka pripadaju rodovima: *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Arthobacter*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Lactobacillus*. Osim *Arthobacter* i *Lactobacillus* svi ostali rodovi pripadaju skupini termorezistentnih psihrotrofnih bakterija (Washam i sur., 1977).

Između mikrobnih vrsta koje preživljavaju uobičajenu toplinsku obradu mlijeka, *Bacillus* spp. najčešće su izolirane Gram-pozitivne bakterije. Prema fiziološkim karakteristikama one pripadaju mezofilnim i termofilnim psihrotrofnim vrstama (Grosskopf i Harper, 1969; Thomas i Druce, 1969; Collins, 1981; Sørhaug i Stepaniak, 1997; Kumarsan i sur., 2007). *Bacillus* spp. su vrlo heterogena skupina bakterija koju karakteriziraju različiti nutritivni zahtjevi, sposobnost rasta u širokom temperaturnom i pH rasponu, te otpornost na osmotski tlak. Zbog različitih fizioloških svojstava koja iskazuju, standardizacija same procedure izolacije tih bakterija iz mlijeka i mliječnih proizvoda kao i definiranje uvjeta za njihovu inaktivaciju je otežana (McGuiggan i sur., 1994; Francis i sur., 1998).

Iz sirovog, toplinski obrađenog mlijeka i mliječnih proizvoda najčešće izolirane *Bacillus* vrste su: *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. circulans*. Spore tih termorezistentnih psihrotrofnih aerobnih ili fakultativno anaerobnih bakterija aktiviraju se odmah nakon toplinske obrade mlijeka prelaskom u svoj vegetativni oblik. U odnosu na *Pseudomonas* spp., vegetativne stanice *Bacillus* spp. imaju veću sposobnost tvorbe različitih termostabilnih ekstracelularnih i intracelularnih

hidrolitičkih enzima (Chen i sur., 2003; 2004). Iz mlijeka izolirane vrste roda *Bacillus* (uz izrazitu dominaciju vrste *B.cereus*) u 40-84 % slučajeva istovremeno iskazuje proteolitičku i lipolitičku aktivnost, a približno u 80 % slučajeva i fosfolipolitičku aktivnost (Muir, 1996; Matta i Punj, 1999). Također, određene vrste roda *Bacillus* mogu istovremeno tvoriti i više od jedne vrste proteinaza. Međutim, prema svojim karakteristikama hidrolitički enzimi koje tvore *Bacillus* spp. usporedivi su s hidrolitičkim enzimima bakterija *Pseudomonas* spp.

Osim hidrolitičkih termostabilnih enzima, *Bacillus* vrste poput *B. cereus*, *B. licheniformis* i *B. subtilis* sposobne su tvoriti i različite vrste toksina koji mogu uzrokovati bolest ili trovanje ljudskog organizma (Griffiths, 1990; Salkinoja-Salonen i sur., 1999; Svensson i sur., 2006). Posebno je zanimljivo da *Bacillus cereus*, koji vrlo često kontaminira mlijeko i mliječne proizvode, može tvoriti nekoliko različitih enterotoksina odgovornih za humanu infekciju ili intoksikaciju organizma. Tako se na primjer hemolitički BL (HBL) i ne-hemolitički enterotoksin (Nhe), te citotoksin K (CytK) povezuju s gastrointestinalnim bolestima i/ili drugim sistemskim infekcijama humanog organizma. Ti enterotoksini oslobađaju se u tankom crijevu tek nakon konzumacije kontaminiranog proizvoda. Međutim, emetički enterotoksini poput cereulida koje *B. cereus* izlučuje direktno u hranu odgovorni su za intoksikaciju organizma koja se manifestira pojavom mučnine i povraćanja unutar 1-6 sati od konzumacije proizvoda (Brown, 2000; Senesi i Ghelardi, 2010).

Gram-pozitivne spоротvorne bakterije u sirovom mlijeku su prisutne u značajno manjem broju u usporedbi s Gram-negativnim psihrotrofnim bakterijama (Suhren, 1898). Najvjerojatniji razlog za prisutnost manjeg broja tih bakterija u sirovom mlijeku je njihovo duže generacijsko vrijeme (~8,5 sati) i duža lag faza na temperaturama između 2-7 °C. Međutim, te bakterije u mlijeku postaju dominantne u slučajevima kada se ono duže vrijeme pohranjuje na temperaturi od 10 °C (što je česti slučaj u trgovinama), ili se ono proizvodi u poboljšanim proizvodnim i tehnološkim uvjetima. Tako je na primjer, u istraživanjima Wong i sur. (1988a) prisutnost *B. cereus* potvrđena u: 52 % uzoraka sladoleda, 29 % uzoraka mliječnog praha, 17 % uzoraka fermentiranog mlijeka i u 2 % uzoraka pasteriziranog mlijeka. Također, prema istraživanjima Griffiths i Phillips (1990)

oko 50 % iz mlijeka izoliranih sojeva *Bacillus* spp. sposobno je rasti na temperaturi od 2 °C. Stoga se *Bacillus* spp. danas s pravom smatraju glavnim mikrobnim uzročnicima kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda, te glavnim razlogom značajnih ekonomskih gubitaka u mljekarskoj industriji (Meer i sur., 1991; Brown, 2000).

Hidrolitički enzimi

Većina psihrotrofnih bakterija ima sposobnost tvorbe hidrolitičkih termostabilnih enzima koji hidroliziraju termostabilne sastojke mlijeka, mliječnu mast, bjelančevine i lecitin (Fox, 1981; McKellar, 1982; Rowe i sur., 1990; Dogan i Boor, 2003). Ti enzimi zadržavaju od 30-100 % svoje aktivnosti nakon konvencionalne toplinske obrade mlijeka (pasterizacije: 72 °C/15 s; sterilizacije 138 °C/2 s; 149 °C/10 s). S kvalitativnog i ekonomskog stanovišta hidrolitički termostabilni enzimi: proteaze, lipaze i fosfolipaze koje tvore bakterije *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp., imaju najveće značenje za mljekarsku industriju.

Općenito, proteinaze psihrotrofnih bakterija hidrolizom kazeina uvjetuju njegovu destabilizaciju, čija je posljedica formiranje gel strukture, ili koagulacije steriliziranog mlijeka tijekom pohrane. U proizvodnji sireva proteinaze (koje se ne izluče sirutkom) uzrokuju značajan gubitak prinosa (Adams i sur., 1976; Law i sur., 1977; Cousin, 1982; Cousin i Marth, 1977; Mitchell i Marshall, 1989). Također, proteoliza uvjetovana psihrotrofnim bakterijama ima negativan učinak na okus proizvoda koji se opisuje kao gorak, strani, nečisti, okus po voću, kvascima ili kao metalan okus (Marshall, 1982; Ren i sur., 1988).

Hidrolizom mliječne masti djelovanjem bakterijskih lipaza psihrotrofnih bakterija oslobađaju se slobodne masne kiseline koje su primarni uzrok promjene okusa proizvoda koji se opisuje kao užegnut, nečisti, sapunast ili gorak okus. Lipolitička pogreška okusa posebno je naglašena u vrhnju, maslacu, siru i steriliziranom (UHT) mlijeku (Stead, 1986; Champagne i sur., 1994).

Lecitinaze i druge fosfolipaze značajna su skupina lipaza psihrotrofnih bakterija koja narušava strukturu membrane masnih globula te mliječna mast postaje dostupna nativnim lipazama mlijeka (Shah, 1994). Lipaze Gram-negativnih i Gram-pozitivnih psihrotrofnih bakterija imaju molekularnu masu iz-

među 30 i 50 kDa i pH optimum između 7 i 9, te pokazuju određene specifičnosti u odnosu na mjesta cijepanja i brzinu hidrolize triacilglicerola, diacilglicerola, te monoacilglicerola (Chen i sur., 2003).

Aktivnost hidrolitičkih enzima *Pseudomonas* spp. u sirovom ohlađenom mlijeku je 100 %, nakon pasterezacije između 60-70 %, a nakon sterilizacije ti enzimi u mlijeku zadržavaju 30-40 % od svoje aktivnosti. Iz tih razloga, upravo su ti bakterijski enzimi najčešće proučavani i najbolje opisani enzimi (Fox i Stepainak, 1983; Sørhaug i Stepianiak, 1997; Braun i sur., 1999; Koka i Weimer, 2001). Određeni sojevi *Pseudomonas* spp. sposobni su istovremeno stvarati sve tri vrste hidrolitičkih enzima (proteinaze, lipaze i fosfolipaze), a neki samo lipaze ili samo proteinaze (Matta i Punj, 1999). Razlike u ekstracelularnoj enzimatskoj aktivnosti pojedinih sojeva najvjerojatnije su povezane su pripadnošću određenoj genetskoj skupini (Ercolini i sur., 2009). Tako na primjer, sojevi *Pseudomonas* spp. koji imaju 55-S-6 ribotip pokazuju veću proteolitičku aktivnost od onih koji pripadaju 50-S-8 ribotipu, dok je najjača lipolitička aktivnost povezana s pripadnosti tih bakterija 72-S-3 ribotipu (Dogana i Boor, 2003).

Proteinaze *Pseudomonas* spp. su uglavnom enzimi molekularne mase između 40-50 kDa, koji po molekuli sadrže najmanje jedan atom Zn i do 16 atoma Ca. Prema optimalnom pH proteinaze *Pseudomonas* spp. su neutralne (~7) ili alkalne (7-9). Većina tih proteinaza su ekstremno termostabilne, a neke su stabilne i nakon zagrijavanja mlijeka na 100 °C/30 minuta (Fox, 1981; McKellar, 1982; Kumura i sur., 1993). Također, u usporedbi sa sporama *B. stearothermophilus* proteinaze *P. fluorescens* iskazale su približno 4000 puta veću termostabilnost (Adam i sur., 1976). Usprkos izrazitoj termostabilnosti koju iskazuju, interesantan je podatak da je većina tih proteinaza nestabilna na temperaturama od 55-60 °C (McPhee i Griffiths, 2002). Međutim, na tim temperaturama gubitak aktivnosti proteinaza nije posljedica autoproteolize (koja se često događa u odsutnosti proteina) već je rezultat formiranja enzim-kazeinskog kompleksa u mlijeku (Chen i sur., 2003).

Proteinaze *Pseudomonas* spp. imaju sposobnost razgradnje κ , α_1 i β -kazeina mlijeka čije su posljedice fizikalna destrukcija koloidnog sustava koji se manifestira uglavnom u formi zgrušavanja i razvitaka intenzivnog gorkog okusa proizvoda (Muir, 1996).

Lipaze i fosfolipaze Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija hidroliziraju mliječnu mast i lecitin pri čemu se oslobađaju masne kiseline. Povećana razina slobodnih masnih kiselina kratkog ugljikovog lanca (C4-C8) uzrokuje uglavnom užegnuti okus proizvoda. Masne kiseline srednjeg ugljikovog lanca (C10-C12) su najčešći uzrok sapunastog, nečistog ili gorkog okusa proizvoda. Slobodne masne kiseline dugog ugljikovog lanca (C14-C18), smatra se, gotovo nemaju utjecaj na promjenu okusa mlijeka i mliječnih proizvoda (Al-Shabibi i sur., 1964; Champagne i sur., 1994). Potrebna koncentracija slobodnih masnih kiselina u proizvodu za uočljivu promjenu okusa je približno 8,0 g/kg (C8) do 27,5 mg/kg (C4).

Bacillus spp. u odnosu na *Pseudomonas* spp. pokazuju raznovrsniju proteolitičku aktivnost, a mnoge su vrste sposobne tvoriti više od jedne vrste ekstracelularnih i intracelularnih proteinaza (Nabrdalik i sur., 2010). Između kazeinskih frakcija proteinaze *Bacillus* spp. na temperaturama višim od 4 °C najbrže razgrađuju κ -kazein, a posljedica je formiranja para- κ -kazeinskog kompleksa. Razgradnja α - i β -kazeina na istim temperaturama je nešto slabija i općenito se ne uočava na temperaturi od 4 °C (Janštová i sur., 2004).

Posljedica proteolitičkih promjena uzrokovanih *Bacillus* spp. značajno je povećanje koncentracije slobodnog tirozina (Nabrdalik i sur., 2010), a ono u mlijeku može biti i do 2,13 mg mL⁻¹ kada se uspoređi s njegovom početnom (~0,65 mg mL⁻¹) vrijednosti (Janštová i sur., 2006).

Lipolitička aktivnost *Bacillus* spp. također je značajna na temperaturama višim od 4 °C, a lipaze gotovo svih vrsta izoliranih iz mlijeka pokazuju određeni stupanj specifičnosti za razgradnju mono- i diacilglicerola. Značajne lipolitičke promjene u smislu povećanja koncentracije slobodnih masnih kiselina utvrđene su za prisutnost *B. lihemiformis* i *B. cereus* (Chen i sur., 2004; Janštová i sur., 2006).

Za razliku od bakterija *Pseudomonas* spp. koje imaju sposobnost tvorbe divergentnih lipaza koje pripadaju u šest različitih biokemijskih skupina, bakterije roda *Bacillus* tvore blisko srodne ekstracelularne i intracelularne lipaze svrstane u dvije skupine (Chen i sur., 2004). U odnosu na proteinaze, lipaze *Bacillus* spp. imaju veću termostabilnost. Međutim, obje vrste enzima dovoljno su termostabilne na svim temperaturama toplinske obrade mlijeka i zbog toga

ostaju aktivne u gotovim mliječnim proizvodima uključujući i mliječni prah (Chen i sur., 2004).

Usprkos brojnim radovima vezanim na sposobnost tvorbe termostabilnih enzima i njihovog utjecaja na najvažnije sastojke mlijeka, sama regulacija sinteze ekstracelularnih i intracelularnih enzima tih bakterijskih vrsta još uvijek nije u potpunosti objašnjena. Ta činjenica s jedne strane potvrđuje njihovu složenost, a s druge strane onemogućava postavljanje cilja za njihovu kontrolu (Sørhaug i Stepaniak, 1997; McPhee i Griffiths, 2002; Němečková i sur., 2009).

Biofilm

Važna karakteristika psihrotrofnih bakterija povezanih s mlijekom i mliječnim proizvodima je njihova sposobnost tvorbe egzopolisaharida i/ili lipopeptida. Oni čine strukturalno različite grupe metabolita koji im omogućavaju adheziju na čvrstu površinu na kojoj formiraju biofilm (Watnick i Kolter, 2000; Raaijmakers i sur., 2010). Biofilm može formirati samo jedna bakterijska vrsta, ali češće ga istovremeno formira više bakterijskih vrsta. Zbog toga, biofilm se općenito definira kao kompleksna strukturalno heterogena, genetski divergentna zajednica mikroorganizama koja egzistira na čvrstoj površini u formi ekstracelularnog matriksa sastavljenog od polimeričnih spojeva. Priroda ekstracelularnog trodimenzionalnog matriksa, omjera razmnožavanja i interakcije između stanica unutar biofilma određena je raspoloživim uvjetima rasta, medijem i supstratom (Watnik i Kolter, 2000; Constantin, 2009).

Fiziološki blisko povezane stanice unutar biofilma pokazuju značajno različita svojstva i promjene u bakterijskoj fiziologiji u usredbi sa slobodnom bakterijskom stanicom (O'Toole i sur., 2000; Vlková i sur., 2008). Zbog nastalih promjena, zajednica bakterija unutar biofilma pokazuje znatniju otpornost na okolišni stres, poput djelovanja antibakterijskih sredstava ili rezistentnosti na većinu antibiotika (López i sur., 2010). Značajna je i činjenica da su bakterijske vrste *B. subtilis*, *B. cereus* (fakultativno anaerobne bakterije) i *P. fluorescens* (aerobna bakterija) sposobne zajedno formirati biofilm. U biofilmu te bakterije razvijaju fiziološki drugačija svojstva i osobine od svojih slobodnih stanica (Constantin, 2009). Tako je na primjer u binarnom biofilmu preživljavanje bakterije *P. fluorescens* nakon izlaganja klor dioksidu

(ClO₂) veće u prisutnosti vrste *B. cereus* (Lindsay i sur., 2002). Osim toga, Bester i sur. (2005) utvrdili su da biofilm ima funkciju izvora slobodnih bakterijskih stanica različitih karakteristika u odnosu na slobodne bakterijske stanice i stanice iste vrste povezane u biofilm. Naime, bakterijske stanice unutar biofilma razvijaju veću biomasu stanica i imaju mogućnost povremenog izdvajanja iz stvorenog biofilma. Iz tih razloga, biofilm u mljekarskoj industriji može biti tvrdokoran i dugotrajan izvor permanentne kontaminacije proizvoda psihrotrofnim bakterijama uzročnicima kvarenja i/ili uvjetno patogenim bakterijama (Mosteller i Bishop, 1993; Sillankorva i sur., 2008; Simões i sur., 2010).

Izvori kontaminacije

Psihrotrofne bakterije nisu prirodna mikroba populacija vimena i zbog toga je njihova prisutnost u sirovom mlijeku isključiva posljedica kontaminacije mlijeka nakon mužnje (Gaunot, 1986; Suhren, 1989; Munsch-Alatossava i sur., 2005). Najčešće spominjani izvori Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija su: rezidualna voda u muzlicima, mljekovodima ili hladionicima, nečiste sise i vime, neadekvatno očišćene površine mljekarske opreme za prihvatanje, transport i pohranu mlijeka, te biofilm (Santana i sur., 2004; Simões i sur., 2010).

U pogledu izvora psihrotrofnih sporotvornih bakterija poput onih iz roda *Bacillus* ne postoji jedinstveno prihvaćeno mišljenje. Općenito, pojava bakterija *Bacillus* spp. u sirovom mlijeku pripisuje se sezonskom utjecaju (Sutherland i Murdoch, 1994). Sijeno i prašina smatraju se njihovim izvorom u zimskim mjesecima, a sise uprljane zemljom tijekom vlažnih ljetnih mjeseci. Tako su Christiansson i sur. (1999) utvrdili da je broj spora u mlijeku u značajnoj korelaciji sa stupnjem kontaminacije sise zemljom. Suprotno, Lukaševa i sur. (2001) i Foltys i Kirchnerová (2006) na osnovi jednomjesečnih analiza uzoraka sirovog mlijeka prikupljenih tijekom godine dana s različitih farmi, nisu utvrdili značajan sezonski utjecaj na prisutnost bakterija *Bacillus* spp. u sirovom mlijeku. Visoku korelaciju između pojavnosti bakterija *Bacillus* spp. u sirovom mlijeku koja je utvrđena u kolovozu i listopadu, Lukaševa i sur. (2001) objašnjavaju promjenom obroka i lošom higijenom vimena prije mužnje, a ne sezonskim utjecajem.

Spremnici za mlijeko, mljekovodi i punilice značajan su izvor kontaminacije mlijeka i mliječnih proizvoda vrstama *Bacillus* (Mosteller i Bishop, 1993; Eneroth i sur., 1998; Sillankorva i sur., 2008; Simões i sur., 2010). Naime, istraživanja Wijman i sur. (2007) potvrdila su da *B. cereus* unutar 24 sata razvija biofilm u svim sistemima koji se tijekom tehnoloških operacija djelomično pune ili gdje zaostaje rezidualna tekućina nakon završenog procesa. Ovisno o uvjetima, biofilm sadrži i do 90 % spora, te najvjerojatnije predstavlja dobro mjesto za formiranje spora. Nakon toga spore *B. cereus* mogu se iz biofilma oslobađati u proizvodno okruženje. Zbog toga, prisutnost spora *Bacillus* spp. u pasteriziranom mlijeku u većini slučajeva nije rezultat post-pasterizacijske kontaminacije, kako se ranije smatralo (Griffiths i Phillips, 1990).

Sirovo mlijeko

Sirovo mlijeko, neposredno nakon higijenski provedene mužnje, uvijek sadrži manje bakterija od 5000 cfu mL⁻¹. Dominantnu populaciju tako proizvedenog mlijeka uglavnom čine bakterije rodova *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* i *Corynebacterium*, te zanemariv broj ostalih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Causin i Bremley, 1985). U usporedbi s ukupnim brojem prisutnih bakterija, udio psihrotrofnih bakterija u mlijeku je niži od 10 % (Gehring, 1980). U praksi to znači, da mlijeko proizvedeno u uvjetima čiste mužnje sadrži između 5000-20.000 cfu mL⁻¹ psihrotrofnih bakterija. Međutim, hlađenje i duža hladna pohrana sirovog mlijeka (~4 °C) mijenjaju prirodno prisutne mikrobne populacije. U tim uvjetima, dominantne Gram-pozitivne bakterije zamjenjuju se Gram-negativnim i Gram-pozitivnim psihrotrofnim bakterijama (Causin i Bremley, 1985; Lafarge i sur., 2004; Samaržija i sur., 2009). Između tih mikroorganizama, *Pseudomonas* spp. i *Bacillus* spp. su najčešće izolirane bakterijske vrste u trenutku kvarenja mlijeka (Mc Phee i Griffiths, 2002).

U istraživanjima provedenim na 7 gospodarstava u trajanju od 1,5 godinu, Cempíriková (2002; 2007) je utvrdila visoku korelaciju ($p < 0,001$) između psihrotrofnih Gram-negativnih bakterija (PB) i ukupnog broja mezofilnih aerobnih bakterija (UB) s proporcionalnim indeksom PB/UB od 0,18. U mikrobiološkoj procjeni kvalitete sirovog mlijeka u

Danskoj kada je UB prelazio 30.000 cfu mL⁻¹ (relativno niska razina kontaminiranosti) Holm i sur. (2004) utvrdili su dominantnost psihrotrofnih bakterija u 28 % slučajeva. Suprotno, u uvjetima nečiste mužnje broj psihrotrofnih Gram-negativnih bakterija u sirovom mlijeku čini između 75-99 % ukupne mikrobne populacije uz izrazitu dominaciju bakterije *P. fluorescens* (Marshall, 1982; Cox, 1993; Muir, 1996; Magan i sur., 2006).

U usporedbi s Gram-negativnim, sporotvorne Gram-pozitivne psihrotrofne bakterije u sirovom mlijeku su prisutne u zanemarivom broju <1 mL⁻¹ (Boor i Murphy, 2002). Međutim, upravo zbog njihovih psihrotrofnih svojstava, hlađenjem i dužom hladnom pohranom sirovog mlijeka one su u sirovom mlijeku prisutne u 27-58 % slučajeva (Johnston i Bruce 1982; Griffiths i Phillips, 1990). Od ukupnog broja sporotvornih bakterija, pojavnost bakterija *Bacillus* spp. u sirovom mlijeku je približno 95 % (Marth i Steele, 2001). Prisutnost bakterija *Bacillus* spp. od 10⁵ cfu mL⁻¹ utvrdili su Griffiths i Phillips (1990) nakon 7 dana pohrane sirovog mlijeka na temperaturi od 6 °C. Također, isti autori su za 50 % sojeva *Bacillus* spp. potvrdili njihovu sposobnost preživljavanja i na temperaturi od 2 °C. Analizom 294 uzorka skupnog sirovog mlijeka, prikupljenih sa 14 farmi u Slovačkoj tijekom godine dana, Foltys i Kirchnerová (2006) su utvrdili da je prisutnost mezofilnih aerobnih psihrotrofnih sporotvornih bakterija u sirovom ohlađenom mlijeku između 2,5- 340 cfu mL⁻¹.

Potencijalne izvore bakterije *B. cereus* u sirovom mlijeku istraživali su Christiansson i sur. (1999) tijekom dvije godine u vrijeme pašnog perioda. Ovisno u stupnju kontaminacije sisa zemljom utvrdili su da broj spora *B. cereus* u sirovom mlijeku može biti između <10 i 880 L⁻¹. U sirovom mlijeku prikupljenom na području zapadne Škotske (1040 farmi) Johnston i Bruce (1982) utvrdili su prisutnost *Bacillus* spp. u 27,2 % uzoraka. *B. cereus* je izoliran u 65,7 %, *B. licheniformis* u 19,9 %, a *B. coagulans* u 10,1 % slučajeva, dok su ostale vrste roda *Bacillus* u mlijeku bile prisutne u zanemarivom broju. Od 100 uzoraka sirovog mlijeka Matta i Punj (1999) prisutnost *Bacillus* spp. utvrdili su u 48 % uzoraka. Relativnom usporedbom pojavnosti pojedinih vrsta ovog roda u sirovom mlijeku, ta su istraživanja potvrdila da se *B. cereus* može smatrati njegovom najučestalijom vrstom (32,2 %). Suprotno, Lukaševa i

sur. (2001) u jednogodišnjem istraživanju kvalitete sirovog mlijeka koje je provedeno u Češkoj na 276 uzoraka, utvrdili su apsolutnu dominantnost *B. licheniformis* (85%), dok su ostale vrste roda *Bacillus* uključujući i *B. cereus* u sirovom mlijeku bile rjeđe prisutne. Na osnovi rezultata ovih i istraživanja drugih autora može se pretpostaviti da je dominantnost određene vrste roda *Bacillus* u velikoj mjeri regionalno specifična.

Brzina kojom će psihrotrofne bakterije doseći razinu kontaminiranosti od $\geq 10^6$ cfu mL⁻¹, a koja je u najčešćem broju slučajeva potrebna za uočljivu pojavu kvarenja, uvjetovana je njihovim početnim (inicialnim) brojem neposredno nakon mužnje i dužinom hladne pohrane sirovog mlijeka. Tako će primjerice broj psihrotrofnih bakterija prije pasterizacije mlijeka biti $> 10^7$ cfu mL⁻¹ i u slučajevima niske početne razine kontaminiranosti (< 50.000 cfu mL⁻¹) kada je ono 3-4 dana pohranjeno na temperaturi od 4-5 °C (Causin, 1982; Sørhaug i Stepaniak, 1997). Međutim, praćenjem dinamike rasta mikrobne populacije sirovog ohlađenog mlijeka (4 °C) molekularnim metodama temeljenim na analizi DNA, Lafarge i sur. (2004) utvrdili su da psihrotrofna mikrobna populacija postaje u mlijeku dominantnom populacijom neovisno o razini kontaminiranosti već za 24 sata.

Posljedice enzimatske aktivnosti psihrotrofnih bakterija u ohlađenom sirovom mlijeku su neželjene promjene mliječne masti, bjelančevina i lecitina koje negativno utječu na njegovu organoleptičku i preradbenu kvalitetu (Fox i Stepainak, 1983; Braun i sur., 1999; Koka i Weimer, 2001). Osim toga, termostabilnost tih enzima, od kojih su neki termostabilni i nakon zagrijavanja na temperaturi od 100 °C/30 minuta, može biti razlogom da je i toplinski obrađeno mlijeko neprihvatljivo za potrošnju i/ili proizvodnju visoko kvalitetnih mliječnih proizvoda (Fox, 1981; McKellar, 1982; Dogan i Boor, 2003; Hantsis-Zacharov i Halpern, 2007).

Strani okus sirovog mlijeka koji se opisuje kao gorak, voćni, po kvascima ili metalni, rezultat je rasta nesporogenih psihrotrofnih bakterija rodova *Proteus*, *Pseudomonas* (uz izrazitu dominaciju vrste *P. fluorescens*), *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes* i *Serratia* (Marshall, 1982; Muir, 1996; Magan i sur., 2001).

Za razliku od Gram-negativnih bakterija spore Gram-pozitivnih psihrotrofnih bakterija prisutne u

sirovom mlijeku preživljavaju temperature pasterizacije i sterilizacije. Zbog toga, vrijeme održivosti toplinski obrađenog mlijeka se smanjuje, nastaju pogreške okusa, te dolazi do pojave slatkog zgrušavanja toplinski obrađenog mlijeka (Johnston i Bruce, 1982; Svensson i sur., 2004). Osim toga, u usporedbi s Gram-negativnim psihrotrofnim bakterijama pojavnost *Bacillus* spp. značajno je veća u higijenski proizvedenom sirovom i toplinski obrađenom mlijeku (Ledford, 1998; Eneroth i sur., 2001). Naime, u odsutnosti kompetitivne mikrobne populacije, preživjele spore u povoljnim uvjetima stvorit će vegetativne stanice koje će se u mlijeku brzo razmnožiti. Zbog toga, za kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda spore predstavljaju puno veći problem od njihovih vegetativnih stanica (Brown, 2000; Barbano i sur., 2006).

Utjecaj kontaminiranosti sirovog mlijeka psihrotrofnim bakterijama prije toplinske obrade na kvalitetu mliječnih proizvoda prikazuje tablica 1.

Pasterizirano i sterilizirano mlijeko

Pogreške sirovog mlijeka uzrokovane povećanim brojem psihrotrofnih bakterija imaju negativan učinak na kvalitetu pasteriziranog (HTST) i steriliziranog mlijeka (UHT). Ispravno provedenim postupcima toplinske obrade mlijeka, eliminiraju se Gram-negativne psihrotrofne bakterije (najučestaliji kontaminanti sirovog ohlađenog mlijeka). Međutim, na tim temperaturama ne inaktiviraju se njihovi termostabilni hidrolitički enzimi, niti se uništavaju spore Gram-pozitivnih psihrotrofnih bakterija (Rogelj i Bogović, 1990; Elmher, 1998; Eneroth i sur., 2000). Tako je kvarenje HTST i UHT mlijeka posljedica rasta tih bakterija u sirovom mlijeku prije toplinske obrade i/ili aktivacije njihovih termorezistentnih enzima nakon toplinske obrade (Nelson, 1985; Craven i sur., 1994; Eneroth i sur., 2000; Budová i sur., 2002). Gram-negativne bakterije u pasteriziranom mlijeku vrlo su često i posljedica naknadne kontaminacije.

Između Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija, vrste *Pseudomonas* u 15-33 % slučajeva su uzročnici kvarenja pasteriziranog mlijeka, te je utvrđena njihova visoka korelacija ($r=0,857$) s prisutnim ukupnim brojem bakterija (Samaržija, 2003; Kumaresan i Annalvilli, 2008). Također, *Pseudomonas* spp. će i u slučajevima početno niske razine kontaminiranosti unutar 10 dana njegove hladne pohrane, dose-

Tablica 1. Utjecaj rasta psihrotrofne mikrobne populacije u sirovom mlijeku na kvalitetu mliječnih proizvoda

Proizvod	Vrsta pogreške	Uzrok
Pasterizirano mlijeko	Precipitacija kada se mlijeko doda u vrući napitak i gorak okus mliječne masti	Aktivnost fosfolipaza i proteinaza <i>Bacillus</i> spp. (destabilizacija mliječne masti)
	Zgrušavanje	Termostabilne proteinaze [Gram-pozitivnih i Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija ($\sim 10^6$ - 10^8 cfu mL ⁻¹)]
	Voćni okus	Sinteza estera; <i>P. fragi</i>
	Kraće vrijeme održivosti	Stimulirano prisutnim etanolom
	Slatko zgrušavanje	Hidroliza proteina
Sterilizirano mlijeko	Prihvatanje mlijeka za ploče pasterizatora	Smanjenje toplinske stabilnosti mlijeka uzrokovanih termostabilnim proteinazama
	Okus: užegnut, atipični okus, gorak, sapunasti	Veća koncentracija slobodnih masnih kiselina zbog aktivnosti termostabilnih lipaza; proteoliza zbog aktivnosti termostabilnih proteinaza
	Koagulacija nakon tjedan dana pohrane	Termostabilne proteinaze [Gram-pozitivnih i Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija ($\sim 10^8$ cfu mL ⁻¹)]
Vrhnje, Maslac	Gelarasta struktura nakon ~1-2 mjeseca	Termostabilne proteinaze [Gram-pozitivnih i Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija ($\sim 10^4$ cfu mL ⁻¹)]
	Okus: gorak, užegnut, voćni, sapunast	Visoka koncentracija lipaza i proteinaza u mlijeku (vrhnju) prije pasterizacije; naknadna kontaminacija (<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Bacillus</i> spp) Visoka koncentracija slobodnih masnih kiselina (C ₄ -C ₆ ; C ₁₀ -C ₁₂)
Sir	Okus: strani, užegnut	Aktivnost lipaza i proteinaza koje ostaju u grušu i nastavlja-ju svoje lipolitčko i proteolitičko djelovanje tijekom zrenja
	Manji prinos	Proteoliza izazvana proteinazama uglavnom <i>Pseudomonas</i> spp.
	Kraće vrijeme zgrušavanja	Veća koncentracija slobodnih aminokiselina (bakterijske proteinaze) koje stimuliraju rast bakterija iz sastava kultura
	Duže vrijeme zgrušavanja	Veća koncentracija slobodnih masnih kiselina (bakterijske lipaze) koje inhibiraju rast bakterija iz sastava kultura

(modificirano prema: Champagne i sur. 1994)

gnuti kritičnu razinu od 10^6 - 10^7 cfu mL⁻¹ (Eneroth i sur., 1998). Razina kontaminiranosti od 10^6 - 10^7 cfu mL⁻¹ uvjetuje kvarenje pasteriziranog mlijeka koje se manifestira stvaranjem gorkih komponenti i nečistim okusom mlijeka, te skraćenjem vijeka održivosti proizvoda. Za HTST mlijeko očekivano vrijeme održivosti može biti kraće i do 14 dana (Sørhaug i Stepanak, 1997; Aaku i sur., 2004). U usporedbi s HTST

mlijekom, atipični okus i zgrušavanje mlijeka koje se može dogoditi i nakon 5. dana pohrane naglašeniji su za UHT mlijeko (Nörnberg i sur., 2010). Naime, zbog znatnijih promjena proteinskih molekula, koje nastaju korištenjem viših temperatura toplinske obrade mlijeka, izgleda da proteinske molekule postaju boljim supstratom za enzimatsku razgradnju (McKeller, 1982).

Za razliku od Gram-negativnih, Gram-pozitivne sporotvorne psihrotrofne bakterije preživljavaju toplinsku obradu mlijeka i nastavljaju svoj rast u ohlađenom mlijeku (Larsen i Jørgensen, 1997; Huck i sur., 2007). Od Gram-pozitivnih psihrotrofnih bakterija, *Bacillus* spp. uz izraženu dominantnost vrsta, *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. licheniformis* najčešće su iz HTST i UHT mlijeka izolirane bakterije. Općenito, zbog njihovih istovremenih termorezistentnih i psihrotrofnih svojstava, rast svih triju vrsta favoriziran je temperaturom toplinske obrade (fizikalna aktivacija spora) te hladnom pohranom proizvoda (Brown, 2000). Vrste *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. licheniformis* brzo rastu i razmnožavaju se na temperaturama hlađenja toplinski obrađenog mlijeka. Zbog toga te bakterije u uvjetima kada nema kontaminacije drugim mikroorganizmima postaju njegovim glavnim uzročnicima kvarenja (Meer i sur. 1991; Muir, 1996; Lin i sur., 1998; Matta i Punj, 1999).

Slično kao i većina Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija, vegetativne stanice *Bacillus* spp. sposobne su tvoriti termorezistentne enzime koje se prema stupnju rezistentnosti na toplinsku obradu mlijeka mogu usporediti s enzimima bakterija *Pseudomonas* spp. Tako, na primjer, *Bacillus* spp. slično kao i *Pseudomonas* spp. uzrokuje biokemijske reakcije odgovorne za kvarenje mlijeka poput hidrolize kazeina u 84 % slučajeva, lecitina u 77 %, masti u 52 % a laktoze u 8 % slučajeva (Johanton i Bruce, 1982).

Za 108 bakterijskih vrsta roda *Bacillus* izoliranih iz mlijeka i mliječnih proizvoda Murugan i Villi (2009) analizirali su njihovu sposobnost induciranja proteolize u steriliziranom mlijeku. Mjereno na ukupni protein, autori su utvrdili smanjenje udjela kazeinskog dušika u mlijeku od 4,82 % kada je kontaminacija bila uzrokovana bakterijom *B. subtilis*, 4,15 % kada se radilo o vrsti *B. cereus*, a 4,08 % kada je uzročnik bila bakterija *B. licheniformis*. Sve tri vrste uzrokovale su strani okus i zgrušavanje mlijeka nakon 30 sati inkubacije na temperaturi od 37 °C. U smislu proteolitičkih i lipolitičkih promjena uzrokovanih zbog pojavnosti bakterija *Bacillus* spp. u steriliziranom mlijeku, Janštová i sur. (2004) utvrdili su smanjenje udjela ukupnog proteina sa 34,60 g/L na 29,46-32,86 g/L, a kazeina za 7,3 %. Istovremeno, udio β -kazeina unutar kazeinske micela se smanjio za 27,53 %, a α -kazeina za 43,95 %.

Značajno povećanje slobodnih masnih kiselina u steriliziranom mlijeku, kao posljedicu lipolize uzrokovane *Bacillus* spp., utvrdili su Janštová i sur. (2006). Naime, nakon 3. tjedna pohrane UHT mlijeka na temperaturi od 24 °C, početna koncentracija slobodnih masnih kiselina od 41,97 mmol kg⁻¹ povećala se na 1617,22 mmol kg⁻¹. Najveće povećanje koncentracije slobodnih masnih kiselina utvrđeno je u slučajevima istovremene kontaminacije UHT mlijeka bakterijama *B. licheniformis* i *B. cereus*. Osim toga, zbog sposobnosti ekstenzivne lipolize i proteolize smatra se da bakterije *Bacillus* spp. skraćuju vrijeme održivosti UHT mlijeka za 25 %. Također, *Bacillus subtilis* i/ili termostabilni proteolitički enzimi Gram-negativnih bakterija hidrolizom kazeina izazivaju destabilizaciju kazeinskog micela i koagulaciju sličnu koagulaciji himozinom (Law i sur., 1977; Mitchell i Marshall, 1989; Meer i sur., 1991; Hamamoto i sur., 1993; Rukure i Bester, 2001).

Pojavnost bakterije *B. cereus* u pasteriziranom mlijeku proizvedenom u tri mljekare u Danskoj pratili su Larsen i Jørgensen (1997) tijekom godine dana. Od ukupno 458 analiziranih uzoraka, *B. cereus* izoliran je iz 257 (56 %) uzoraka a njegova pojavnost u pasteriziranom mlijeku bila je značajno veća u ljetnim (72 %) u odnosu na zimske (28 %) mjesece. Utvrđeni broj *B. cereus* u pasteriziranom mlijeku bio je između 10³ i 3x10⁵ cfu mL⁻¹, a signifikantna razlika u njegovoj pojavnosti između mljekara nije utvrđena. Također, veću prisutnost te bakterijske vrste u pasteriziranom mlijeku tijekom ljetnog (svibanj-listopad) u odnosu na zimski period utvrdili su i López-Pedemonte i sur. (2003).

B. cereus u pasteriziranom je mlijeku dominantna mikrobnna vrsta u slučajevima kada je temperatura njegovog hlađenja viša od 7 °C, a vrijeme pohrane mlijeka duže (McGuigan i sur., 1994; TeGiffel i sur., 1997; Larsen i Jørgensen, 1999; Eneroth i sur., 2000). Naime, 53 % sojeva *B. cereus* sposobno je rasti na tim temperaturama uz generacijsko vrijeme od približno 8-9 sati (Dufrenne i sur., 1994; TeGiffel i sur., 1997). U prirodno kontaminiranom pasteriziranom mlijeku na kraju njegovog vijeka održivosti Larsen i Jørgensen (1999) pojavnosti *B. cereus* utvrdili su u 24 od ukupno 27 uzoraka. Istraživanja su provedena u tri različite mljekare u Danskoj, a uzeti uzorci tijekom pokusa bili su pohranjeni na temperaturi od 7±0,5 °C i analizirani svaki dan kroz 9 dana. Odmah nakon pasterizacije *B. cereus* utvrđen

je jedino u 2 od 27 uzoraka, ali se nakon 5 dana pohrane mlijeka njegov broj značajno počeo povećavati. Od ukupno 24 pozitivna uzorka nakon 9 dana pohrane, 11 ih je sadržavalo više od 10^3 mikroorganizama mL^{-1} . Premda ta razina kontaminacije ne uvjetuje kvarenje HTST niti UHT mlijeka, ona predstavlja opasnost za ljudsko zdravlje ukoliko se radi o patogenim sojevima *B. cereus* (IDF Bulletin, 2000; Christinsson, 2002; Svenson i sur., 2005). Pojavnost *B. cereus* u pasteuriziranom mlijeku veća od 10^6 cfu mL^{-1} uzrokuje promjenu karakterističnog okusa u nečisti, voćni, gorki, užegli te okus po kvascima.

Na temperaturno-vremenske uvjete sterilizacije mlijeka unutar *Bacillus* spp., *B. sporothermodurans* i *B. stearothermophilus* najtolerantnije su sporotvorne ne-patogene bakterije (Huemer i sur., 1998). Prisutne u dovoljnom broju te bakterije za razliku od *B. cereus*, *B. subtilis* i *B. licheniformis* uzrokuju kiselu koagulaciju i siru sličan okus i miris steriliziranog mlijeka.

Fermentirana mlijeka

Općenito, fermentirana mlijeka radi niske pH vrijednosti medija ($\sim 4,2-4,6$) nisu pogodna sredina za većinu bakterija uzročnika kvarenja (Rašić i Kurman, 1978; Robinson i sur., 2002; 2006). Međutim, u proizvodnji fermentiranih mlijeka problem je sirovo mlijeko koje se prije prerade duže vrijeme pohranjuje na niskim temperaturama (Rosslund i sur., 2005). U tim uvjetima psihrotrofnim bakterijama omogućena je hidrolitička razgradnja proteina i masti mlijeka. Posljedice tih hidrolitičkih promjena na kvalitetu fermentiranih mlijeka manifestiraju se u promjeni teksture i okusu. Na primjer, jogurt zbog hidrolize κ -kazeina u sirovom mlijeku ima čvršći gel i veću viskoznost, ali je istovremeno sinereza izraženija (Gassem i Frank, 1991). Interesantno je istaknuti da proteolitičke promjene pogoduju rastu mikrobnog kulture kroz povećanje koncentracije slobodnih aminokiselina. Međutim, istovremeno tipična aroma izostaje, a zbog naglašenih lipolitičkih promjena uzrokovanih lipazama psihrotrofnih bakterija proizvod ima atipičan okus koji se opisuje kao gorak, užegnut, nečist i okus po voću (Sørhaug i Stepaniak, 1997).

Vrhnje i maslac

Kako se u proizvodnji vrhnja i maslaca danas koristi gotovo isključivo ohlađeno mlijeko, psihrotrofne bakterije su u približno 25 % slučajeva glavni uzročni-

ci kvarenja i smanjene održivosti tih proizvoda (Cox, 1993; Larsen i Jørgensen, 1997; Spreer, 1998b). Pogreške mogu biti uzrokovane direktnom mikrobnom kontaminacijom proizvoda ili su one posljedica prethodnog rasta psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku (Causin, 1982; Cox, 1993; Marth, 1998; Spreer, 1998a; McPhee i Griffiths, 2002).

S obzirom da su vrhnje i maslac proizvodi koji sadrže veliki udjel mliječne masti, znatnije su podložni lipolitičkim u usporedbi s proteolitičkim promjenama uvjetovanim termostabilnim enzimima psihrotrofnih bakterija (Kornacki i Flowers, 1998). Gorak ili strani okus tih proizvoda također može biti i posljedica hidrolize proteina proteazama psihrotrofnih bakterija (Causin, 1982; McPhee i Griffiths, 2002).

P. fragi ili rjeđe *P. fluorescens* zbog svoje lipolitičke sposobnosti razgradnje masti do slobodnih masnih kiselina vrlo često su uzročnici pogreške užegnuto okusa vrhnja i maslaca (Stead, 1986). Osim toga, ukoliko distribucija vode u maslacu nije ravnomjerno raspoređena te bakterije mogu rasti i u samom proizvodu. Vrsta *P. fragi* će u tim slučajevima potaknuti tvorbu estera okusom sličnom jabuci, a potom će se javiti užegnuto okus, dok vrsta *P. putrefaciens* može rasti na površini maslaca na temperaturi njegove pohrane od 4-7 °C. Nakon 7-10 dana bakterijskog rasta dolazi do oslobađanja organskih kiselina, posebice izovalerične kiseline, a maslac tada ima izraziti miris po truleži. Također, bakterija *P. putrefaciens* uzročnik je i površinske pjegavosti na maslacu. Crna diskoloracija površine maslaca uz izrazito neugodan okus znatno je rjeđi oblik kvarenja a najčešće izolirani uzročnici su bakterije *P. mephitica* i *P. nigrificiens* (Jay, 1992; Koka i sur., 2001; Munsch-Alatossava i sur., 2005).

Sir

Svako povećanje broja psihrotrofnih bakterija u mlijeku za proizvodnju sira iznad $\sim 10^3$ cfu mL^{-1} uvijek u manjoj ili većoj mjeri ima negativan utjecaj na ukupnu kvalitetu sira. Prisutnost psihrotrofnih bakterija, čak i u relativno malom broju nakon dva dana hladne pohrane mlijeka, vrlo će se brzo povećati do razine kontaminiranosti od 10^5-10^8 cfu mL^{-1} . Ta razina bakterijske kontaminacije značajno umanjuje sposobnost mlijeka za preradu u sir. Prva negativna posljedica je destabilizacija prirodnog plazminskog sustava mlijeka. Naime, proteinaze psihrotrofnih bakterija stimulira-

ju oslobađanje plazmina i plazminogena iz kazeinske micela. U proizvodnji sira to znači da će se plazmin i plazminogen velikim dijelom izlučiti sirutkom, a poznato je da upravo te nativne proteinaze imaju značajnu ulogu u formiranju okusa, teksture i prinosa sira (Fajardo-Lira i Nielsen, 1998). Posljedično, vrijeme koagulacije dodatkom kimozina sirovom mlijeku značajno se skraćuje, a pasteriziranom produžuje. Kraće vrijeme koagulacije sirovog mlijeka objašnjava se vjerojatnim interakcijama između psihrotrofnih i drugih prirodno prisutnih bakterija u mlijeku koje imaju utjecaj na kimozin. Osim toga, kako su α i β kazein supstrat proteazama psihrotrofnih bakterija, κ -kazein postaje dostupniji kimozinu te se vrijeme koagulacije mlijeka skraćuje (Cousin i Marth, 1977). Suprotno, produženje vremena koagulacije toplinski obrađenog mlijeka pripisuje se sporijem djelovanju kimozina zbog modificiranih ili ireverzibilnih proteolitičkih promjena proteina mlijeka. Tako na primjer, proteini mlijeka koji su osjetljivi na temperature toplinske obrade mogu formirati različite proteinske komplekse poput kompleksa između β -laktoglobulina i kazeina. Neovisno o razlogu, vrijeme zgrušavanja mlijeka i kvaliteta grušā značajno su promijenjeni.

Problemi ispravnog zgrušavanja mlijeka najčešće su povezani s djelomičnom razgradnjom β -kazeina i njegovom tendencijom napuštanja kazeinske micela, što dovodi do smanjenja veličine i povećanja hidratacije micela. Rezultat izazvanih promjena kazeinskih micela, kao posljedice rasta psihrotrofnih bakterija u sirovom mlijeku, povećanje je stabilnosti micela, ali je koagulum lomljiv (krhak) i manje kompaktno. Pogreška sirnog koagulumā još je naglašenija u proizvodnji sireva iz ovčjeg mlijeka koje sadrži veći udjel β -kazeina ($\sim 1/2$ CN) u usporedbi s kravljim mlijekom, gdje je udjel β -kazeina u kazeinskoj miceli $\sim 1/3$ (Manfredini i Massari, 1989; Tavarā i sur., 2006). Također, važno je naglasiti da će i kontaminacija mlijeka psihrotrofnim bakterijama od $\sim 10^3$ cfu mL⁻¹, koje je na niskim temperaturama pohranjeno 48 sati, smanjiti prinos grušā za ~ 4 % (Leitner i sur., 2008). Bakterije *Pseudomonas* spp. i/ili njihovi termostabilni proteolitički enzimi najčešće su povezani s ovom vrstom pogreške (Fox, 1981; McSweeney, 1997; McPhee i Griffiths, 2002.). Osim toga, ti hidrolitički enzimi ostaju u sirnom grušu te kasnije tijekom zrenja posebice u polutvrđim i tvrdim sirevima uzrokuju atipični okus (Fox, 1981).

Djelovanje proteinaza *Pseudomonas* spp., a posebice *P. fluorescens* dovodi do pojave sluzavosti i pigmentiranosti svježih sireva, veći su gubici u proizvodnji polutvrđih i tvrdih sireva, te dolazi do pogreška okusa, teksture i stabilnosti sira (Walker, 1988; Mitchell i Marshall, 1989). Tako je na primjer potvrđeno da je želatinozna i/ili sluzava tekstura svježih sireva (55-80 % vlage) direktna posljedica kontaminiranosti sira Gram-negativnim psihrotrofnim bakterijama, najčešće vrstama *P. fluorescens*, *P. fragi* i *P. putida* (Brocklehurst i Lund, 1985; Fox i sur., 2000). Indirektno, slaba/loša tekstura svježih sireva posljedica je djelovanja termostabilnih proteolitičkih enzima tih bakterija.

U usporedbi s proteinazama koje se u značajnoj koncentraciji izlučuju sirutkom, lipaze psihrotrofnih bakterija adsorbiraju se na masne globule i ostaju u siru (Fox i Stepaniak, 1983; Stead, 1986; Cox, 1993). Zbog toga se neželjena lipoliza nastavlja do kraja zrenja, te su one uglavnom odgovorne za neželjeni okus sira. Ukoliko se radi o lipazi bakterije *P. fluorescens*, užegnutost tvrdih sireva nastaje nakon dva mjeseca zrenja. Odnosno, u tim sirevima u usporedbi sa sirevima kod kojih se ne događa negativna lipoliza, koncentracija slobodnih masnih kiselina veća je za 3-10 puta (Law, 1979; Corsetti i sur., 2001).

Bacillus spp. su bakterije koje preživljavaju uobičajenu temperaturu pasterizacije mlijeka (72 °C/15 sekundi) koja se koristi u proizvodnji velikog broja različitih vrsta sireva. Zbog toga se te bakterije smatraju sljedećom mikrobnom skupinom koja može utjecati na produžavanje vremena koagulacije i imati negativan utjecaj na kvalitetu grušā (Johnson, 1998; Caceres i sur., 1997; Rukure i Bester, 2001). Iz razloga što te bakterije slabo rastu u mlijeku, one su uzročnici kvarenja sira u slučajevima kada njihov broj u mlijeku dostigne razinu kontaminiranosti od $\geq 10^6$ cfu mL⁻¹. Najčešće te bakterije uzrokuju pogreške teksture sira, a sam izgled pogreške određen je vrstom sira.

Zbog činjenice da postoje brojne vrste sira, od kojih se svaka značajno razlikuje od drugih vrsta, izgled i vrsta pogreške uvjetovane psihrotrofnim bakterijama ne mogu se primijeniti za sve vrste (Spreer, 1998c; Walstra, 1999b; Walstra, 1999c; Corsetti i sur., 2001.). Međutim, pogreška koja je ipak zajednička svim vrstama je neispravno zgrušavanje i umanjena kvaliteta sirnog grušā.

Kontrola

Negativni utjecaj psihrotrofnih bakterija na kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda je neosporan. Njihova prilagodljiva priroda u proizvodnom okruženju i sposobnost brzog rasta na niskim temperaturama uvjetovali su da je ta skupina bakterija postala glavnim direktnim i/ili indirektnim uzročnikom kvarenja mlijeka i svih mliječnih proizvoda. Kontaminacija sirovog mlijeka psihrotrofnim bakterijama, niti uz najbolju proizvođačku praksu ne može se u potpunosti izbjeći. Međutim, hlađenje mlijeka na temperaturi od 2 °C, umjesto na temperaturama između 4 i 6 °C (koje su u praksi najčešće korištene temperature hlađenja), značajno se može usporiti njihov rast, te proteolitičko i lipolitičko djelovanje (Kumarsan i sur., 2007). Međutim, usporavanje rasta psihrotrofnih bakterija nižim temperaturama pohrane sirovog mlijeka ima učinak jedino u slučajevima kada je njihov početni broj $\leq 10^3$ cfu mL⁻¹. Termizacija sirovog mlijeka (65-69 °C/15 s) u pogonu prije pasterezacije može smanjiti broj Gram-negativnih psihrotrofnih bakterija za 77-97 %, ali ona nema učinka na sporotvorne Gram-pozitivne psihrotrofne bakterije (Champagne i sur., 1994).

Punilice u mljekarskoj industriji predstavljaju najčešće mjesto za rekontaminaciju proizvoda psihrotrofnim Gram-negativnim bakterijama. Stoga se preporuča permanentna kontrola čistoće punilica.

Suprotno, za Gram-pozitivne sporotvorne psihrotrofne bakterije pretpostavlja se da kontaminiraju toplinski obrađeno mlijeko i mliječne proizvode tijekom cijelog proizvodnog procesa preko "mrtvih" kuteva u proizvodnom sustavu i preko biofilma na površini mljekarske opreme (Eneroth i sur., 1998; Poulsen, 1999). Kako sporotvorne bakterije, posebice *Bacillus* spp. čine vrlo heterogenu skupinu bakterija koju karakteriziraju različita fiziološka svojstva, otežana je standardizacija same procedure izolacije tih bakterija iz mlijeka i mliječnih proizvoda, kao i definiranje uvjeta za njihovu inaktivaciju (McGuigan i sur., 1994; Francis i sur., 1998). U tom smislu, kombinacija temperatura hlađenja i toplinske obrade mlijeka uz njegovu baktofugaciju mogu biti od značajnije koristi. Međutim, problem naknadne kontaminacije gotovih proizvoda tim bakterijama nije jednostavno kontrolirati. Ipak, smatra se da dobro dizajnirana mljekarska oprema koja se lagano čisti može u velikoj mjeri smanjiti pojavnost sporo-

tvornih psihrotrofnih bakterija u proizvodu. Također, na osnovi dosadašnjih istraživanja može se pretpostaviti da je dominantnost određene *Bacillus* vrste u velikoj mjeri regionalno specifična. Stoga je važno za vlastitu proizvodnju utvrditi koja od tih vrsta ima najveću predispoziciju za kontaminaciju točno određenog mliječnog proizvoda.

Neovisno da li se radi o Gram-negativnim ili Gram-pozitivnim psihrotrofnim bakterijama, kontrola proizvodnog procesa preko HACCP ili sličnog sustava kontrole još uvijek se smatra najučinkovitijim vidom kontrole. Međutim, ovisno o vrsti mliječnog proizvoda za kontrolu rasta psihrotrofnih bakterija može se dodatno preporučiti kontrola aktiviteta vode, pH, te korištenje određenih dozvoljenih antimikrobnih spojeva, kao i osiguranje uvjeta za brzo hlađenje gotovih proizvoda na temperaturu ≤ 2 °C.

Umjesto zaključaka

U proteklih pedesetak godina objavljeni su brojni radovi o psihrotrofnim bakterijama, ali su mnoga pitanja vezana na psihrotrofnu populaciju povezanu s mlijekom i mliječnim proizvodima ostala neodgovorena (Hantsis-Zacharov i Halpern, 2007). S druge strane, za mljekarsku industriju psihrotrofne bakterije su i ozbiljan ekonomski problem (Varnam i Sutherland, 1996; Garbutt, 1997; Randolph, 2006). Te činjenice upućuju da će identifikacija i kontrola psihrotrofnih bakterije povezanih s mlijekom i mliječnim proizvodima biti i dalje predmetom mnogih znanstvenih i stručnih istraživanja.

Zbog činjenice da su psihrotrofne bakterije glavni mikrobnii uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda i činjenice da se određene vrste moraju smatrati patogenim bakterijama, kontrola prisutnosti psihrotrofnih bakterija treba u mljekarskoj industriji postati obveznom. Redovita i obvezna kontrola pojavnosti psihrotrofnih bakterija značajno će doprinijeti poboljšanju kvalitete mlijeka i mliječnih proizvoda i povećanju dobiti.

Temeljeno na dosadašnjim rezultatima istraživanja u smislu preventivnih mjera, čini se kako je najučinkovitije prihvatiti standard za kvalitetu sirovog mlijeka od ≤ 30.000 cfu mL⁻¹ za ukupni broj aerobnih mezofilnih bakterija i < 5000 cfu mL⁻¹ za broj psihrotrofnih bakterija.

Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality

Summary

The characteristics of bacterial populations in raw milk at the time of processing has a significant influence on shelf-life, organoleptic quality, spoilage and yields of raw milk, processed milk as well as on the other dairy products. Unfortunately, cold and extended storage of raw milk, as a common practice in dairy sector today, favour the growth of psychrotrophic bacteria. Therefore, their count in the refrigerated milk is more than the ideal limit of 10 % of the mesophilic count. Psychrotrophic bacteria are generally able to form extracellular or intracellular thermo-resistant enzymes (proteases, lipases, phospholipases) which can contribute to milk and dairy products spoilage. In addition, besides exhibiting spoilage features, some species belonging to the psychrotrophs are considered as emerging pathogens that carry innate resistance to antibiotics or produce toxins. In sense of quality, psychrotrophic bacteria have become major problem for today's dairy industry as leading cause in spoilage of cold-storage milk and dairy products. This review article focuses on the impact of psychrotrophs on quality problems associated with raw milk as well as on the final dairy products. Means of controlling the dominant psychrotrophic species responsible for undesirable activities in milk and dairy products were also discussed.

Key words: psychrotrophic bacteria, contamination, biofilm, milk and dairy products quality, control

Literatura

1. Aaku, E.N., Collison, E.K., Gashe, B.A., Mpuchane, S. (2004): Microbiological quality of milk from two processing plants in Gaborone Botswana. *Food Control* 15, 181-186.
2. Adams, D.M., Barach, J.T., Speck, M.L. (1976): Effect of Psychrotrophic Bacteria from Raw Milk on Milk Proteins and Stability of Milk Proteins to Ultrahigh Temperature Treatment. *Journal of Dairy Science* 59, 823-827.
3. Al-Shabibi, M.M.A., Langer, E.H., Tobias, J., Tuckey, S.L. (1964): Effect of Added Fatty Acids on the Flavour of Milk. *Journal of Dairy Science* 3, 295-296.
4. Barbano, D.M., Ma, Y., Santos, M.V. (2006): Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life. *Journal of Dairy Science* 89 (E. Suppl) E15-E19.
5. Beattie, S.H., Williams, A.G. (2002): Growth and diarrhoeagenic enterotoxin formation by strains of *Bacillus cereus* in vitro in controlled fermentations and in situ in food products and a model food system. *Food Microbiology* 19, 329-340.
6. Beena, A.K., Ranjini, A.R., Riya, T.G. (2011): Isolation of Psychrotrophic multiple drug resistant *Pseudomonas* from Pasteurised milk. *Veterinary World* 4, 349-352.
7. Bester, E., Wolfaardt, G., Joubert, L., Garny, K., Saftic, S. (2000): Planktonic-Cell Yield of a *Pseudomonas* Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 7792-7798.
8. Boor, K.J., Murphy, S.C. (2002): Microbiology of market milks. U knjizi: Dairy Microbiology Handbook, The microbiology of Milk and Milk Products, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 91-122.
9. Braun, P., Fehlhaber, K., Klug, C., Kopp, K. (1999): Investigations into the activity of enzymes produced by spoilage causing bacteria: a possible basis for improved shelf life estimation. *Food microbiology* 16, 531-540.
10. Brocklehurst, T.H., Lund, B.N. (1985): Microbiological changes in cottage cheese varieties during storage at +7 °C. *Food microbiology* 2, 207-233.
11. Brown, K.L. (2000): Control of bacterial spores. *British Medical Bulletin* 56, 158-171.
12. Budová, O., Baranová, M., Lauková, A., Róžańska, H., Rola, J.G. (2002): Hygiene of pasteurised milk depending on psychrotrophic microorganisms. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 46, 325-329.
13. Caceres, P., Castillo, D., Pizarro, M. (1997): Secondary Flora of Casar de Caceres Cheese: Characterization of *Micrococcaceae*. *International Dairy Journal* 7, 531-536.
14. Causin, M.A. (1982): Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection* 45, 172-207.
15. Causins, C. M., Bramley, A.J. (1985): The Microbiology of Raw Milk. U knjizi: Dairy Microbiology, The Microbiology of Milk, (vol.1) edited by Robinson, R.K. Elsevier Applied Science Publishers, New York, 119-164.
16. Cempírková, R. (2002): Psychrotrophic vs. total bacterial counts in bulk milk samples. *Veterinary Medicine Czech* 47, 227-233.
17. Cempírková, R. (2007): Contamination of cow's milk by psychrotrophic and mesophilic microflora in relation to selected factor. *Czech Journal of Animal Science* 52, 378-393.
18. Cempírková, R., Mikulová, M. (2009): Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's milk. *Czech Journal of Animal Science* 54, 65-73.
19. Cempírková, R., Mikulová, M., Trávníček, J. (2009): Counts of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk samples from the aspect of technological quality. *Journal of Agrobiology* 26, 113-121.
20. Champagne, C.P., Laing, R.R., Roy, D., Mafu, A. A. (1994): Psychrotrophs in Dairy Products: Their Effects and Their Control critical reviews *Food science and Nutrition* 34, 1-30.

21. Chen, L., Coolbear, T., Daniel, R.M. (2004): Characteristics of proteinases and lipases produced by seven *Bacillus* sp. Isolated from milk powder production lines. *International Dairy Journal* 14, 495-504.
22. Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powder (review). *International Dairy Journal* 13, 255-275.
23. Christiansson, A. (2002): *Bacillus cereus*. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 1., Roginski, H., Fuquay, W.J., Fox, F.P., Academic Press, 123-140.
24. Christiansson, A., Bertilsson, J., Svensson, B. (1999): *Bacillus cereus* Spores in Raw Milk: Factor Affecting The Contamination of Milk During the Grazing Period. *Journal of Dairy Science* 82, 305-314.
25. Collins, E.B. (1981): Heat Resistant Psychrotrophic Microorganisms. *Journal of Dairy Science* 64, 157-160.
26. Constantin, O.E. (2009): Bacterial biofilms formation at air liquid interfaces. *Innovative Romanian Food Biotechnology* 5, 18-22.
27. Corsetti, A., Rossi, J., Gobetti, M. (2001): Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface-ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69, 1-10.
28. Cousin, M.A., Marth, E.H. (1977): Changes in milk proteins caused by psychrotrophic bacteria. *Milchwissenschaft* 32, 377-341.
29. Cousin, M.A. (1982) Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. *Journal of Food Protection*, 45 172-207.
30. Cox, M.J. (1993): The significance of psychrotrophic *Pseudomonas* in dairy products. *The Australian Journal of dairy Technology* 48, 108-113.
31. Craven, H.M., Forsyth, S.R., Drew, P.G., Macauley, B. J. (1994): A new technique for early detection of Gram-negative bacteria in milk. *The Australian Journal of Dairy Technology* 49, 54-56.
32. Dogan, B., Boor, K.J. (2003): Genetic Diversity and Spoilage Potentials among *Pseudomonas* spp. Isolated from Fluid Milk Products and Dairy Processing Plants. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 130-138.
33. Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T., Notermans, S. (1994): Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 23, 99-109.
34. Elmher, H.M. (1998): Extended Shelf Life Refrigerated Foods: Microbiological Quality and Safety. *Food technology* 52, 57 - 62.
35. Eneroth, A., Ahrne, S., Molin, G. (2000): Contamination of milk with Gram negative spoilage bacteria during filling of retail containers. *International Journal of Food Microbiology* 57, 99-106.
36. Eneroth, A., Christiansson, A., Brendehang, J., Molin, G. (1998): Critical Contamination Site in the Production Line of Pasteurised Milk, with Reference to the Psychrotrophic Spoilage Flora. *International Dairy Journal* 8, 829-834.
37. Ercolini, D., Russo, F., Ferrocino, I., Villani, F. (2009): Molecular identification of mesophilic and psychrotrophic bacteria from raw cow's milk. *Food Microbiology* 26, 228-231.
38. Fajardo-Lira, C., Oria, M., Hayes, K.D., Nielsen, S.S. (2000): Effect of Psychrotrophic Bacteria an of an Isolated Protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the Plasmin System of Fres Milk. *Journal of Dairy Science* 83, 2190-2199.
39. Fajardo-Lira, C., Nielsen, S.S. (1998): Effect of psychrotrophic microorganisms on the plasmin system in milk. *Journal of Dairy Science* 81, 901-908.
40. Finlay, W.J.J., Logan, N.A., Sutherland (2002): *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiology* 19, 423-430.
41. Foght, J.M., Westlake, W.S., Johnson, W.M., Ridgway, H.F. (1996): Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiology* 142, 2333-2340.
42. Foltys, V., Kirchnerová, K. (2006): Mesophilic and psychrotrophic aerobe sporulating microorganisms in raw cow's milk. *Arhiva Zootehnica* 9, 41-55.
43. Fox, F.P. (1981): Proteinases in Dairy Technology. *Netherlands Milk and Dairy Journal* 35, 233-253.
44. Fox, P.F., Stepaniak, L. (1983): Isolation and some properties of extracellular heat-stable lipases from *Pseudomonas fluorescens* strain AFT36. *Journal of Dairy Research* 50, 77-89.
45. Fox, P.F., Guinee, T. P., Cogan, T.M., McSweeney, P.L.H. (2000): *Microbiology of Cheese Ripening*. U knjizi *Fundamentals of Cheese Science*, An Aspen Publication, Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland, 206-232.
46. Francis, K.P., Mayer, R., von Stetten, F., Gordon, S.A. Stewart, B., Scherer, S. (1998): Discrimination of Psychrotrophic and Mesophilic Strains of *Bacillus cereus* Group by PCR Targeting of Major Cold Shock Protein Genes. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 3525-3529.
47. Garbutt, J. (1997): Factor affecting the growth of microorganisms. U knjizi *Essentials of Food Microbiology*, Garbutt, J., Arnold, London, 54-86.
48. Gasse, M.A., Frank, J.F. (1991): Physical properties of yogurt made from milk treated with proteolytic enzymes. *Journal of Dairy Science* 74, 1503-1511.
49. Gaunot, A-M. (1986): Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Experimentaria* 42, 1192-1197.
50. Gehringer, G. (1980): Multiplikation of bacteria during farm storage. In *Factor influencing the bacteriological-quality of raw milk*. *International Dairy Federation Bulletin*, Document 120.
51. Griffiths, M.W. (1990): Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *Journal of Food Protection* 53, 790-792.

52. Griffiths, M.W., Phillips, J.D. (1988): Modelling the Relation Between Bacterial Growth and Storage Temperature in Pasteurised Milk of Varying Hygienic Quality. *Journal of the Society of Dairy Technology* 41, 96-102.
53. Griffiths, W.M., Phillips, J.D. (1990): Incidence, source and some properties of psychrotrophic *Bacillus* spp. found in raw and pasteurized milk. *International Journal of Dairy Technology* 43, 62-66.
54. Grosskopf, J., Harper, W.J. (1969): Role of Psychrophilic Sporeformers in Long - life Milk. *Abstr. Journal of Dairy Science* 52, 897.
55. Hamamoto, T., Kaneda, M., Horikoshi, K., Kudu, T. (1993): Characterization of a Protease from a Psychrotroph, *Pseudomonas fluorescens* 114. *Applied and Environmental Microbiology* 60, 3878-3880.
56. Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M. (2007): Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and their Proteolytic and Lipolytic Traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7162-7168.
57. Hemalatha, S., Banu, N., (2010): DNA fingerprinting of *Bacillus cereus* from diverse sources by restriction fragment length polymorphism analysis. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 1, 136-144.
58. Holm, C., Jepsen, L., Larsen, M., Jespersen, L. (2004): Predominant microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science* 87, 1151-1157.
59. Huck, J.R., Hammond, B.H., Murphy, S.C., Woodcock, N. H., Boor, K.J. (2007): Tracking Spore-Forming Bacterial Contaminants in Fluid Milk-Processing Systems. *Journal of Dairy Science* 90, 4872-4883.
60. Huemer, I.A., Klijn, N., Vogelsang, H.W.J., Langeveld, L.P.M. (1998): Thermal Death Kinetics of Spores of *Bacillus sporothermodurans* Isolated from UHT Milk. *International Dairy Journal* 8, 851-855.
61. IDF Buletin (1976): Psychrotrophs in milk and milk products. International Dairy Federation, Brussels, E-Doc 68.
62. IDF Bulletin (2000): *Bacillus thermodurans*. Detection and Identification of Spore-Forming Bacteria., International Dairy Federation, Brussels, 357/2000.
63. Janštová, B., Dračková, M., Vorlová, L. (2006): Effect of *Bacillus cereus* Enzymes on the Milk Quality following Ultra High Temperature Processing. *Acta Veterinaria Brno* 75, 601-609.
64. Janštová, B., Lukášová, J., Dračková, M., Vorlová, L. (2004): Influence of *Bacillus* spp. Enzymes on Ultra High Temperature-treated Milk Proteins. *Acta Veterinaria Brno* 73, 393-400
65. Jay, J.M. (1992): Characteristics and Growth of Psychrotrophic Microorganisms. U knjizi Modern Food Microbiology, edited by Jay, J.M., Van Nostrand-Reinhold, New York, 415-441.
66. Johnson, M.E. (1998): Cheese Products. U knjizi Applied Dairy Microbiology, edited by Marth, E.H., Steele, J.L., Marcel Dekker, Inc., New York, 213-249.
67. Johnston, D.W., Bruce, J. (1982). Incidence of thermophilic psychrotrophs in milk produced in West Scotland. *Journal of Applied Bacteriology* 52, 333-337.
68. Koka, R., Weimer, B.C. (2001): Influence of growth conditions on heat stable phospholipase activity in *Pseudomonas*. *Journal of Dairy Research* 68, 109-116.
69. Kornacki, J.L., Flowers, R.S. (1998): Microbiology of Butter and Related Products. U knjizi Applied Dairy Microbiology edited by Marth, E.H., Steele, J.L. Marcel Dekker, Inc., New York, 109-130.
70. Kumaresan, G., Annalvilli, R. (2008): Incidence of *Pseudomonas* species in pasteurised milk. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Science* 4, 56-59.
71. Kumarsan, G., Annalvilli, R., Sivakumar, K. (2007): Psychrotrophic Spoilage of Raw Milk at Different Temperatures of Storage. *Journal of Applied Science Research* 3, 1383-1387.
72. Kumura, H., Mikawa, K., Saito, Z. (1993): Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No. 33. *Journal of Dairy Research* 60, 229-237.
73. Lafarge, V., Ogier, J.L., Girard, Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchnet, A. (2004): Raw Cow Milk Bacterial Population Shifts Attributable to Refrigeration, *Applied and Environmental Microbiology* 70, 5644-5650.
74. Langeveld, L.P.M., Cuperus, F. (1976): The Relation Between Temperature and Growth Rate in Pasteurized Milk of Different Types of Bacteria Which are Important to the Deterioration of that Milk. *Netherlands Milk Dairy Journal* 34, 106-125.
75. Larsen, H.D., Jørgensen, K. (1997): The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 34, 179-186.
76. Larsen, H.D., Jørgensen, K. (1999): Growth of *Bacillus cereus* in pasteurized milk product. *International Journal of Food Microbiology* 46, 173-176
77. Law, B.A. (1979): Review of the progress of dairy science: Enzymes of psychrotrophic bacteria and their effects on milk and milk products. *Journal of Dairy Research* 46, 573-578
78. Law, B.A., Andrews, A.T., Sharpe, M.E. (1977): Gelation of UHT Milk by Proteases from a Strain of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Raw Milk. *Journal of Dairy Research* 44, 145-148.
79. Ledford, R.A. (1998): Raw Milk and Fluid Milk Products. *Applied Dairy Microbiology* 41, 55-64.
80. Leitner, G., Silanikove, N., Jacobi, S., Weisbült, L., Bernstein, S., Merin, U. (2008): The influence of storage on the farm and in dairy silos on milk quality for cheese production. *International Dairy Journal* 18, 109-113.
81. Lin, S., Schraft, H., Odumeru, J.A., Griffiths, M.W. (1998): Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *International Journal of Food Microbiology* 43, 159-171.
82. Lindsay, D., Brözel, V.S., Mostert, J.F., von Holy, A. (2002): Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single and binary biofilms of a dairy associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Journal of Applied Microbiology* 92, 352-361.

83. López, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2010): Biofilms. Cold Spring Harbor *Perspectives in Biology* 2:a000398, 1-11.
84. López-Pedemonte, T.J., Roig-Sague, A., X., Trujillo, A., J. (2003): Inactivation of Spores of *Bacillus cereus* in Cheese by High Hydrostatic Pressure with the Addition on Nisin or Lysozyme. *Journal of Dairy Science* 86, 3075-3081.
85. Lück, H. (1985): Quality Control in the Dairy Industry. U knjizi Dairy Microbiology, vol.2. ed. Robinsom, R. K. Elsevier Applied Science Publishers, London, 279-324.
86. Lukašová, J., Vyhňálková, J., Pácová, Z. (2001): *Bacillus* species in raw milk and in the farm environment. *Milch-wissenschaft* 56, 609-611
87. Magan, N., Pavlou, A., Chrysanthakis, I. (2001): Milk - sense: a volatile sensing system recognises spoilage bacteria and yeasts in milk. *Sensors and Actuators B* 72, 28-34.
88. Manfredini, M., Massari, M. (1989): Small ruminant milk. Technological aspects: Storage and processing. *Options Méditerranées* 6, 191-198.
89. Marshall, R.T. (1982): Relation ship between the bacteriological quality of raw milk and the final products a review. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte* 34, 149-157.
90. Marth, E.H. (1998): Extended Shelf Life Refrigerated Foods: Microbiological Quality and Safety. *Food technology* 52, 57-62.
91. Martins, M.L., Pinto, C.L.O., Rocha, R. B., de Araújo, E.F., Vanetti, M.C.D. (2006): Genetic diversity of Gram-negative, proteolytic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Food Microbiology* 111, 144 -148.
92. Matta, H., Punj, V. (1999): Isolation and identification of lipolytic, psychrotrophic spore forming bacteria from raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 52, 59-62.
93. McGuiggan, J.M., Gilmour, A., Lawrence, M.L. (1994): Factors influencing the recovery of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spp. from bulk raw milk. *Journal of the Society of Dairy technology* 47, 111-116.
94. McKellar, R.C. (1982): Factor in Fluencing the Production of Extracellular Proteinases by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology* 53, 305-316.
95. McPhee, J.D. & Griffiths, M.W. (2002): *Pseudomonas* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Edited by Roginski, H., Fuquay W.J., Fox, F.P., Academic Press, 2340-2350.
96. McSweeney, P.L.H. (1997): The flavour of milk and dairy products: III. Cheese taste. *International Journal of Dairy Technology* 50, 123 - 128.
97. Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. (1991): Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. *Journal of Food Protection* 54, 969-979.
98. Mitchell, S.L., Marshall, R.T. (1989): Properties of Heat-stable Proteinases of *Pseudomonas fluorescens*: Characterization and Hydrolysis of Milk Proteins. *Journal of Dairy Science* 72, 864-874.
99. Mosteller, T.M., Bishop, J.R. (1993): Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. *Journal of Food Protection* 56, 34-41.
100. Muir, D. D. (1996): The shelf life of dairy products: 1. Factors influencing raw milk and fresh products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 49, 24 - 32.
101. Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. (2006): The darker side of raw milk spoiling psychrotrophs. *Maataloustieteen Päivät www.smts.fi*
102. Munsch-Alatossava, P., Alatossava, T. (2005): Phenotypic characterization of raw milk associated psychrotrophic bacteria. *Microbiological Research* 161, 334-346.
103. Murray, J.G., Stewart, D. B. (1978): Advances in the Microbiology of Milk and Dairy Products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 31, 243-248.
104. Murugan, B., Villi, R. A. (2009): Lipolytic activity of *Bacillus* species isolated from milk and dairy products. *The Indian Veterinary Journal* 86, 80-81.
105. Nabrdalik, M., Grata, K., Latala, A. (2010): Proteolytic activity of *Bacillus cereus* strains. *Proceedings of ECO-pole 4*, 273-276.
106. Nelson, F.E. (1985): The microbiology of Market Milk. U knjizi: Dairy Microbiology vol.1., edited by Robinson, R.K., Elsevier Applied Science, Publishers, London, 165-207.
107. Nemečková, I., Pechačová, M., Roubal, P. (2009): Problems with Detection of Proteolytic Microorganisms and Their Undesirable Activities in Milk. *Czech Journal of Food Science* 27, Special Issue 2: S2-82-S2-89.
108. Netten Van, P., Moosdijak Van de, A., Hoensel Van, P., Mosel, D.A.A., Perales, I. (1990): Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *Journal of Applied Bacteriology* 69, 73-79.
109. Nörnberg, M.F.B.L., Friedrich, R.S.C., Weiss, R.D.N., Tondo, E.C., Brandelli, A. (2010): Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. *International Journal of Dairy Technology* 63, 41-46.
110. O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000): Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbial* 54, 49-79.
111. Poulsen, V.L. (1999): Microbial Biofilms in Food Processing. *LWT-Food Science and Technology* 32, 321-326.
112. Raaijmakers, J.M., De Bruijn, I., Nybroe, O., Ongena, M. (2010): Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 1037-1062.
113. Randolph, H. (2006): Identifying spoilage bacteria and potential shelf- life problems. *Dairy Food/Find Article* 1-3
114. Rašić, J.Lj., Kurman, J.A. (1978): Defects of Yoghurt. U knjizi: Yoghurt Scientific Grounda, Technology, Manufacture and Preparations, Published by the Authors, Copenhagen, 297-301
115. Ren, T.J., Frank, J.F., Christen, G.L. (1988): Characterization of Lipase of *Pseudomonas fluorescens* 27 Based on Fatty Profiles. *Journal of Dairy Science* 71, 1432-1438.

116. Robinson, R.K., Lucey, J.A., Tamime, Y. (2006): Manufacture of Yoghurt. U knjizi *Fermented milk* edited by Tamime, Y., Blackwell Science Ltd, Oxford, 53-71.
117. Robinson, R.K., Tamime, A.Y., Wszolek, M. (2002): Microbiology of fermented milks. U knjizi: *Dairy Microbiology Handbook, The microbiology of Milk and Milk Products*, edited by Robinson, R.K., third edition, Wiley Interscience, New York, 376-430.
118. Rogelj, I., Bogović, B. (1990): Utjecaj veličine populacije Gram negativnih psihrotrofa na njihovo preživljavanje pri pasterizaciji. *Mljekarstvo* 40, 323-329.
119. Rosslund, E., Langsrud, T., Sorhaug, T. (2005): Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 103, 69-77.
120. Rowe, M.T., Johanston, D.E., Kilpatric, D.J., Dunstall, G., Murphy, R.J. (1990): Growth and Extracellular Enzymes Production by Psychrotrophic Bacteria in Raw Milk Stored at Low Temperature. *Milchwissenschaft* 45, 459-499.
121. Rukure, G., Bester, B.H. (2001): Survival and growth of *Bacillus cereus* during Gouda cheese manufacturing. *Food Control* 12, 31-36.
122. Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio. R., Andersson, M.A., Kämpfer, P., Andersson, M.C., Honkanen-Buzalski T., Scoging, A.C. (1999): Toxicogenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4637-4645.
123. Samaržija, D., Podoreški, M., Sikora, S., Skelin, A., Pogačić, T. (2007): Mikroorganizmi - uzročnici kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda. *Mljekarstvo* 57, 251-273.
124. Samaržija, D. (1993): Upotreba Dip-slide metode za brzo određivanje ukupnog broja bakterija i broja *Pseudomonas* spp. u pasteriziranom mlijeku. Magistarski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 1-65.
125. Santana, E.H.W., de Beloti, V., Müller, E.E., Ferreira, M.A.de., Morales, L.B.de., Pereira, M.S., Gusmão, V.V. (2004): Milk contamination in different points of dairy process. ii) mesophilic, psychrotrophic and proteolytic microorganisms. *Semina: Ciências Agrárias; Londrina* 25, 349-358.
126. Schinik, B. (1999): Habitats of Prokaryotes. U knjizi: *Biology of Prokaryotes* Ed by Joseph W. Lengeler. Gerhard Drews i Hans G. Schlegel, Blackwell Science, New York, 763-801.
127. Senesi, S., Ghelardi, E. (2010): Production, Secretion and Biological Activity of *Bacillus cereus* Enterotoxins. *Toxins* 2, 1690-1703.
128. Shah, N.P. (1994): Psychrotrophs in milk: a review. *Milchwissenschaft* 49, 432-437.
129. Sillankorva, S., Neubauer, P., Azeredo, J. (2008): *Pseudomonas fluorescens* biofilms subjected to phage phiBB-PF7A. *BMC Biotechnology* 78, Open Access 1-12.
130. Simões, M., Simões, L.C., Vierira, M.J. (2010): A review of current and emergent biofilm control strategies. *Food Science and Technology* 43, 573-583.
131. Sorhaug, T., Stepaniak, L. (1997): Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology* 8, 35-41.
132. Spiers, J.S., Buckling, A., Rainey, P.B. (2000): The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* 146, 2345-2350.
133. Spreer, E. (1998a): Market Milk, Milk Drinks and Cream Products. U knjizi: *Milk and Dairy Product Technology*, Spreer, E., Marcel Dekker, Inc., New York, 155-198.
134. Spreer, E. (1998b): Butter Manufacture. U knjizi: *Milk and Dairy Product Technology*, Spreer, E., Marcel Dekker, Inc., New York, 203-241.
135. Spreer, E. (1998c): Cheese Manufacture. U knjizi: *Milk and Dairy Products Technology*, Spreer, E., Marcel Dekker, Inc., New York, 243-334.
136. Stead, D. (1986): Microbial lipases: their characteristic, role in food spoilage and industrial uses. *Journal of Dairy Research* 53, 481-505.
137. Stepaniak, L. (2002): Psychrotrophic Bacteria, Bacteria Other than *Pseudomonas* spp. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 4, Roginski, H., Fuquay, W.J., Fox, F.P., 2345-2351.
138. Suhren, G. (1989): Enzymes of Psychrotrophs in Raw Food. U knjizi: *Producer Microorganisms*. Edited by McKellar, R.C CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida, 4-34.
139. Sutherland, A.D., Murdoch, R. (1994): Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interaction with mesophilic *Bacillus* spp.. *International Journal of Food Microbiology* 21, 279-292.
140. Svenson, B., Monthan, A., Shaheen, R., Andersson, A.M., Salkinoja-Salonen, M., Christiansson, A. (2005): Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain, *International Dairy Journal* 16, 740-749.
141. Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H., Christiansson, A. (2004): Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* 14, 17-27.
142. Távria, F.K., Reis, P. J.M., Malcata, F.X. (2006): Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* 16, 895-902.
143. TeGiffel, M.C., Beumer, R.R., Granum, P.E., Rombouts, F.M. (1997): Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherland. *International Journal of Food Microbiology* 34, 307-318.
144. Thomas, S.B., Druce, R.G. (1969): Psychrotrophic Bacteria in Refrigerated Pasteurized Milk - A review. *Dairy Industries* 34, 351-355.
145. Varnam, A.H., Sutherland, J.P. (1996.a): Cream and cream-based products. U knjizi: *Milk and milk Products Technology, Chemistry and Microbiology*, Chapman and Hall, London, Marcel Dekker, Inc., New York, 183-216.
146. Varnam, A.H., Sutherland, J.P. (1996.b): Butter, margarine and spreads. U knjizi: *Milk and milk Products Technology, Chemistry and Microbiology*, Chapman and Hall, London, Marcel Dekker, Inc., New York, 224-268.
147. Vlková, H., Babák, V., Seydlová, R., Pavlík, I., Schlegelová, J. (2008): Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and in the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms- a review. *Czech. J. Food Sci.* 26, 309-323.

148. Walker, S.J. (1988): Major Spoilage Microorganisms in Milk and Dairy Products. *Journal of the Society of Dairy Technology* 41, 91-92.
149. Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. (1999a): Microbiology of Milk U knjizi: Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes, edited by Marcel Dekker, Inc, New York, 149-170.
150. Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J.S. (1999b): Microbial Defects U knjizi: Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes, edited by Marcel Dekker, Inc, New York, 639-649.
151. Walstra, P., Geurts, T.J., Noomen, A., Jellema, A., Van Boekel, M.A.J. S. (1999 c): Cheese Varieties. U knjizi: Dairy Technology, Principles of Milk Properties and Processes, Marcel Dekker, Inc, New York, 651-708.
152. Wang, L., Jayarao, B.M. (2001): Phenotypic and Genotypic Characterization of *Pseudomonas fluorescens* Isolated from Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science* 84, 1421-1429.
153. Washam, C.J., Olson, H.C., Vedamuthu, E.R. (1977): Heat-resistant psychrotrophic bacteria isolated from pasteurised milk. *Journal of Food Protection* 40, 101-108.
154. Watnick, P., Kolter, R. (2000): Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182, 2675-2679.
155. Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S.S., Ralyea, R., Boor, K.J. (2000): Molecular and Phenotypic Characterization of *Pseudomonas* spp. Isolated from Milk. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 2085-2095.
156. Wijman, J.G.E., de Leeuw, P.P.L.A., Moezelaar, R., Zwietering, M.H., Abee, T. (2007): Air-Liquid Interface Biofilms of *Bacillus cereus*: Formation, Sporulation and Dispersion. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 1481-1488.
157. Wong, H. C., Chang, M. H., Fan, J.Y. (1988a): Incidence and Characterization of *Bacillus cereus* Isolates Contaminating Dairy Products. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 699-702.
158. Wong, H.C., Chen, L.Y., Chen, C.L. (1988): Growth germination and toxigenic activity of *Bacillus cereus* in milk products. *Journal of Food Protection* 51, 707-710.
159. Zall, R.R. (1985): Control and Destruction of Microorganisms. U knjizi: Dairy Microbiology vol 1.ed. Robinson, R.K. Elsevier Applied Science Publishers, London, 77-117.