

Mikroorganizmi u zraku staje kao mogući postsekretorni zagađivači mlijeka

Kristina Matković, Marija Vučemilo, Bara Vinković,
Željko Pavičić, Srećko Matković

Znanstvena bilješka – Scientific note

UDK: 579.8

Sažetak

Kvalitetno i higijenski ispravno mlijeko mora zadovoljavati uvjete koje propisuje Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN102/2000.). Ako znamo da svježije pomuzeno mlijeko može sadržavati i mikroorganizme iz zraka staje, provedeno istraživanje može pomoći u utvrđivanju mikroklimatskih uvjeta koji utječu na takvo onečišćenje. Istraživanje je provedeno u staji muznih krava pri čemu su analizirani osnovni pokazatelji mikroklimete te brojnost mikroorganizama u stajskom zraku. Mjerenja su obavljana ujutro, podne i večer jedan puta tjedno tijekom dva mjeseca. Pokazatelji mikroklimete utvrđivani su standardnim, atestiranim uređajima TESTO 400 (Testo Inc., Njemačka) i MERCK MAS-100, (MERCK KgaA, Darmstadt, Njemačka). Uzorci zraka su naciyepljeni na gotove podloge Columbia i Sabouraud agara (Biolife, Milano, Italija). Nakon inkubacije i brojenja izraslih kolonija najčešće kolonije su precijepljene na selektivne podloge te identificirane mikrobiološkim postupcima. Dobivene vrijednosti obrađene su statistički programom Statistica. Srednje vrijednosti ukupnog broja bakterija u stajskom zraku kretale su se između $8,81 \times 10^4$ CFU/m³ u podnevnom terminu, do $1,26 \times 10^5$ CFU/m³ u večernjem terminu mjerenja, a srednje vrijednosti ukupnog broja gljivica u stajskom zraku kretale su se u granicama od $5,23 \times 10^4$ CFU/m³ u podnevnom terminu, do $8,35 \times 10^4$ CFU/m³ u jutarnjem terminu mjerenja. Identificirano je 10 rodova bakterija, a najčešće zastupljene bile su gram-pozitivne bakterije, poglavito one iz roda Staphylococcus i Streptococcus. Od gljivica je identificirano 9 rodova, pri čemu su prevladavali rodovi Aspergillus, Penicillium, Rhizopus i kvasci. Wilcoxon-ovim testom ekvivalentnih parova na razini statističke značajnosti $p < 0,05$ dokazano je da na ukupan broj bakterija u zraku staje izravno utječe temperatura zraka, relativna vlaga i brzina strujanja zraka. Broj i vrsta identificiranih mikroorganizama u zraku staje može utjecati na higijensku kakvoću sirovog mlijeka. Radi sprječavanja postsekretornog onečišćenja mlijeka, nužno je uz

redovito provođenje zoohigijenskih mjera provoditi i redovitu higijenu vimena prije i poslije mužnje te pribora za mužnju.

Ključne riječi: mikroorganizmi, zrak, mlijeko, zagađenje

Uvod

Broj mikroorganizama u zraku staje ovisi o strukturi i funkcionalnosti objekta, gustoći populacije životinja, načinu držanja, mikroklimatskim pokazateljima (temperatura, relativna vlaga, brzina strujanja zraka, osvjetljenje), sustavu prozračivanja, načinu hranjenja, napajanja i uklanjanja gnoja. Ukoliko je povišena, očituje se negativnim djelovanjem na zdravlje i proizvodnost životinja (Lang i sur., 1997.; Seedorf i sur., 1998.; Takai i sur., 1998.).

Mikroorganizmi u zraku staja sastavni su dio bioaerosola koji predstavljaju nakupine različitih čestica biološkog materijala u zraku. Čestice koje obrazuju bioaerosol jesu čestice prašine, bakterijske stanice i njihovi dijelovi, zatim su to spore gljivica, fragmenti nuzprodukata njihovog metabolizma, čestice tekućina, odnosno sastojci hlapljivih organskih spojeva.

Ukupan broj mikroorganizama u zraku staja (CFU) isključuje mrtve mikroorganizme i one koje se ne prenose zrakom, nego predstavlja samo skupinu živih mikroorganizama, a uvjetovan je vrstom životinja i načinom držanja (Müller i Weiser, 1987.; Hartung, 1998.). Prema podacima iz literature taj se broj u nastambama za muzne krave može kretati od 10^2 do 10^9 CFU/m³ zraka (Seedorf i sur., 1998., Wijnand, 1997.; Hartung, 1994., 1998.).

Pravilnik o kakvoći svježeg sirovog mlijeka (NN 102/00) propisuje uvjete kojima mora udovoljavati sirovo mlijeko pri otkupu. Prema tom Pravilniku tržišnu vrijednost više ne određuje samo kemijski sastav, već i broj somatskih stanica i mikroorganizama u svježem sirovom mlijeku. Mlijeko standardne kakvoće ne smije sadržavati više od 100 000 mikroorganizama i ne više od 400 000 somatskih stanica u jednom mililitru. Nalaz somatskih stanica neposredno se vezuje uz zdravstveno stanje vimena. Mikroorganizami dospiju u mlijeko iz vimena i iz stajskog zraka u kojemu se nalaze kao sastavni dio bioaerosola.

Stoga istraživanje provedeno u staji za muzne krave, s posebnim naglaskom na brojnost bakterija i gljivica u stajskom zraku može pomoći u utvrđivanju mikroklimatskih činitelja koji mogu utjecati na takav oblik postsekretornog onečišćenja mlijeka.

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno u staji muznih krava pri čemu su analizirani pokazatelji mikrokline s naglaskom na brojnosti bakterija i gljivica u stajskom zraku.

Staja dimenzija 5,0 x 6,0 m, visine 3,0 m nalazi se u klasično građenom objektu na dnu okućnice. U njoj se nalazi 5 krava vezanih uz valove postavljene obostrano uz hranidbeni hodnik. Pod je betonski, a ležišta se stelje i redovito čiste.

Krave borave u staji tijekom čitave godine i hrane se sijenom, sjenažom i koncentratom. Vodu dobivaju iz komunalnog vodovoda u automatske pojilice. Muzu se jutrom i u večer pomoću prenosive muzilice. Pomuzeno mlijeko odmah se odvozi na sabirno mjesto, jer ovo gospodarstvo nema vlastiti rashladni uređaj.

Mjerenja su obavljana ujutro, u podne i uvečer jedan puta tjedno tijekom dva mjeseca.

Temperatura, relativna vlaga i brzina strujanja zraka mjereni su pomoću atestiranog uređaja TESTO 400 (Testo Inc., Njemačka). Uzorci zraka su naciyepljeni uređajem MERCK MAS-100, (MERCK KgaA, Darmstadt) na gotove podloge Columbia i Sabouraud agara (Biolife, Milano, Italija). Podloge su potom inkubirane 72 sata u inkubatoru na temperaturi 37 °C za bakterije i na 22 °C tijekom 5 dana za gljivice.

Nakon inkubacije brojene su izrasle kolonije, a one najzastupljenije su precijepljene na selektivne podloge i identificirane mikrobiološkim postupcima kako ih opisuju Quinn i sur. (1994.) te API sustavom (bio-Mérieux, Marcy-l'Etoile, France). Plijesni su identificirane nativnim preparatom.

Dobivene vrijednosti obrađene su statistički programom Statistica, Wilcoxon-ovim testom ekvivalentnih parova na razini statističke značajnosti od 5 % - $p < 0,05$.

Rezultati i rasprava

Srednje vrijednosti ukupnog broja bakterija u stajskom zraku kretale su se u granicama od $8,81 \times 10^4$ CFU/m³ u podnevnom terminu, do $1,26 \times 10^5$ CFU/m³ u večernjem terminu mjerenja. Srednje vrijednosti ukupnog broja gljivica kretale su se između $5,23 \times 10^4$ CFU/m³ u podnevnom terminu, do $8,35 \times 10^4$ CFU/m³ u jutarnjem terminu mjerenja. Rezultati provedenog istraživanja u skladu su s vrijednostima koje za ukupan broj mikroorganizama

iz zraka navode Wathes, 1994.; Hartung, 1994.; Wijnand, 1997.; Seedorf i sur., 1998.

Tablica 1: Deskriptivna statistička analiza broja bakterija, gljivica i osnovnih mikroklimatskih činitelja

Table 1: Descriptive statistic analysis of bacteria, fungi count and basic microclimate parameters

		n	Aritmetička sredina Arithmetic mean	Minimum Minimum	Maksimum Maximum	Varijanca Variance	Standardna devijacija Standard deviation	Standardna pogreška Standard error	
Bakterije Bacteria	Jutro Morning	8	1,14 ^a x 10 ⁵	1,97 x 10 ⁴	2,52 x 10 ⁵	7,03 x 10 ⁹	8,39 x 10 ⁴	2,96 x 10 ⁴	
	Podne Noon	8	8,81 ^a x 10 ⁴	3,10 x 10 ⁴	2,55 x 10 ⁵	6,42 x 10 ⁹	8,01 x 10 ⁴	2,83 x 10 ⁴	
	Večer Evening	8	1,26 ^a x 10 ⁵	3,09 x 10 ⁴	2,84 x 10 ⁵	8,15 x 10 ⁹	9,03 x 10 ⁴	3,19 x 10 ⁴	
Gljivice Fungi	Jutro Morning	8	8,35 ^a x 10 ⁴	1,97 x 10 ³	2,70 x 10 ⁵	8,29 x 10 ⁹	9,10 x 10 ⁴	3,22 x 10 ⁴	
	Podne Noon	8	5,23 ^a x 10 ⁴	1,45 x 10 ⁴	1,84 x 10 ⁵	3,01 x 10 ⁹	5,49 x 10 ⁴	1,94 x 10 ⁴	
	Večer Evening	8	7,07 ^a x 10 ⁴	1,11 x 10 ⁴	2,67 x 10 ⁵	6,68 x 10 ⁹	8,17 x 10 ⁴	2,89 x 10 ⁴	
Mikroklima Microclimate	Jutro Morning	t °C	8	14,00 ^b	10,04	18,60	6,65	2,58	0,91
		rv/rh %	8	77,10 ^b	67,40	83,10	29,30	5,41	1,91
		w m/s	8	0,07 ^b	0,04	0,11	0,00	0,02	0,01
	Podne Noon	t °C	8	1,60 ^b	9,76	18,40	12,60	3,55	1,25
		rv/rh %	8	68,40 ^b	53,80	81,40	121,00	11,00	3,88
		w m/s	8	0,09 ^b	0,04	0,10	0,00	0,02	0,01
	Večer Evening	t °C	8	14,00 ^b	9,48	20,30	13,10	3,62	1,28
		rv/rh %	8	73,60 ^b	62,90	79,60	41,70	6,46	2,28
		w m/s	8	0,08 ^b	0,05	0,14	0,00	0,03	0,01

n=broj mjerenja/number of measurements; CFU=broj kolonija/colony forming unit; rv/rh=relativna vlaga/relative humidity; ^{a,b}=aritmetičke sredine koje ne dijele isto slovo u eksponentu razlikuju se na razini statističke značajnosti p< 0,05 / arithmetic means that do not share the same letter in superscript were statistically significantly different at p<0.05

Izmjerene vrijednosti temperature u staji za muzne krave bile su između 9,5 °C i 20,3 °C, relativne vlage između 53,8 % i 83,1 %, a brzine strujanja zraka imale su vrijednost od 0,04 m/s do 0,14 m/s. Ti rasponi sugeriraju zaključak da životinje borave u primjerenim mikroklimatskim uvjetima. Naime, pretpostavlja se da je za muzne krave optimalna temperatura između 5

i 25 °C, uz udjel vlage 65 - 85 % (Caput, 1996.; Hinz i Linke, 1998.; Müller i Weiser, 1987.; Phillips i sur., 1998., Vučemilo, 2002.).

Wilcoxon-ovim testom ekvivalentnih parova na razini statističke značajnosti $p < 0,05$ dokazano je da na ukupan broj bakterija i gljivica u zraku staje izravno utječe temperatura, relativna vlaga i brzina strujanja zraka (tablica 1).

U zraku staje za muzne krave identificirano je 10 rodova bakterija. Najzastupljenije su bile gram-pozitivne bakterije, poglavito one iz roda *Staphylococcus* i *Streptococcus*. Gram-negativne bakterije bile su zastupljene u malom postotku - najčešće one iz roda *Moraxella*, *Pseudomonas* i enterobakterije (tablica 2).

Tablica 2: Identifikacija najčešćih bakterija

Table 2: Identification of the most common bacteria

Bakterija Bacteria	Jutro Morning (%)	Podne Noon (%)	Večer Evening (%)
<i>Alcaligenes</i> sp.	0,00	0,00	0,50
<i>Bacillus</i> sp.	13,00	15,50	16,00
<i>Corynebacterium</i> sp.	6,00	1,30	5,80
<i>Enterobacteria</i>	0,09	0,70	0,40
<i>Micrococcus</i> sp.	1,20	2,50	8,60
<i>Moraxella</i> sp.	0,23	0,70	0,00
<i>Proteus</i> sp.	0,19	0,30	0,01
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,19	0,00	0,05
<i>Staphylococcus</i> sp.	39,00	43,00	38,00
<i>Streptococcus</i> sp.	40,10	36,00	30,64

U stajskom zraku identificirano je i 9 rodova gljivica. Prevladavali su rodovi *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* i kvasci (tablica 3). Dobiveni rezultati o kvalitativnom sastavu zraka u staji za muzne krave odgovaraju podacima iz literature (Wilson i sur., 2002.; Zucker i Müller, 2000., Zucker i sur., 2000.).

Tablica 3: Identifikacija najčešćih gljivica

Table 3: Identification of the most common fungi

Gljivica Fungi	Jutro Morning (%)	Podne Noon (%)	Večer Evening (%)
<i>Alternaria</i> sp.	1,50	0,50	0,00
<i>Aspergillus</i> sp.	31,00	30,00	33,00
<i>Cladosporium</i> sp.	2,60	5,00	4,50
<i>Fusarium</i> sp.	1,30	8,30	7,50
Kvasac / Yeast	22,00	22,00	22,00
<i>Mucor</i> sp.	2,30	1,30	4,35
<i>Penicillium</i> sp.	25,00	25,00	21,00
<i>Rhizopus</i> sp.	13,00	7,83	7,50
<i>Scopulariopsis</i> sp.	1,30	0,07	0,15

Zaključak

Na ukupan broj bakterija i gljivica u stajskom zraku izravno utječe temperatura zraka, relativna vlaga i brzina strujanja zraka, što je potvrđeno Wilcoxon-ovim testom ekvivalentnih parova na razini statističke značajnosti $p < 0,05$.

Broj i vrsta identificiranih mikroorganizama u zraku staje može utjecati na higijensku kakvoću sirovog mlijeka, ali bi za objektivniju ocjenu bilo korisno istovremeno analizirati kvalitetu mlijeka te higijenu opreme za mužnju i higijenu mužača. Radi sprječavanja postsekretornog onečišćenja mlijeka, nužno je uz redovito provođenje zoohigijenskih mjera provoditi i redovitu higijenu vimena prije i poslije mužnje te pribora za mužnju.

MICROORGANISMS IN STABLE AIR AS POSSIBLE POSTSECRETORY MILK CONTAMINANTS

Summary

Quality and hygienic correct milk must satisfy conditions which are prescribed by Law on Raw Milk Quality (NN102/2000). If we know that freshly milked milk could contain a certain number of microorganisms originating from the stable air (so called postsecretory contamination), performed research can help in establishing microclimatic factors that can influence that kind of contamination. Research was carried out in a dairy stable, basic microclimatic parameters were analyzed as well as number of microorganisms in the stable air. Measurements were executed in the morning, at noon and in the evening, once a week, during two months. Microclimate parameters were determined by standard, attested Testo 400 device (Testo Inc., Germany) and Merck MAS-100 device (Merck KgaA, Darmstadt, Germany). Air samples were inoculated on prepared Columbia and Sabouraud agar (Biolife, Milan, Italy). After incubation and counting, the most common colonies were reinoculated on selective medium and identified by microbiological procedures. Obtained values were analyzed by statistical program Statistica. Mean values of total bacterial count in stable air were between 8.81×10^4 CFU/m³ at noon up to 1.26×10^5 CFU/m³ in the evening, and mean values of total moulds count in stable air were between 5.23×10^4 CFU/m³ at noon up to 8.35×10^4 CFU/m³ in the morning. Ten bacterial genus's were identified. The most common bacteria in stable air were gram-positive bacteria, specially *Staphylococcus* i *Streptococcus* genera. Nine mould genera were isolated, predominated by the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and yeasts. By Wilcoxon matched pair test at a level of statistical significance of $p < 0.05$ was demonstrated that air temperature, relative humidity and air flow velocity directly influence on total number of microorganisms in stable air. Number and species of identified microorganisms in stable air could have influence on hygiene quality of fresh milk. Therefore, by regularly conduction of zoohygienic measures, regulatory udder hygiene before and after milking as well as milking equipment hygiene have to be conducted, to prevent postsecretory milk contamination.

Key words: microorganisms, air, milk, pollution

Literatura

- HARTUNG, J. (1994): The effect of airborne particulates on livestock health and production. In: Pollution in livestock production system. (Dewi, I., Axford R. F. E., Fayez I., Marai M., Omed H. M.). *CAB International*. Wallingford. 55-69.
- HINZ, T., LINKE, S. (1998): A comprehensive experimental study of aerial pollutants in and emissions from livestock buildings. Part 1: Methods. *J. agric. Engng Res.* 70, 111-118.
- HARTUNG, J. (1998): Art und umfang der von nutztierställen ausgehenden luftverunreinigungen. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 105, 213-216.
- LANGE, J. L., THORNE, P. S., KULLMAN, G. J. (1997): Determinants of culturable bioaerosol concentrations in dairy barns. *Ann Agric Environ Med*, 4, 187-194.
- MÜLLER, W., WEISER, P. (1987): Dust and microbial emissions from animal production; The dispersion of windborne microbes and dust particles. In: Animal production and environmental health. (Strauch, D.). Elsevier. Amsterdam, Oxford, New York, Tokio. 74-81.
- QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K., CARTER, G. R. (1994): General procedures in microbiology. In: Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K., Carter, G. R. (ed.): *Clinical Veterinary Microbiology*. London, Wolfe Publishing: 648pp.
- PHILLIPS, V. R., HOLDEN, M. R., SNEATH, R. W., SHORT, J. L., WHITE, R. P., HARTUNG, J., SEEDORF, J., SCHRÖDER, M., LINKERT, K. H., PEDERSEN, S., TAKAI, H., JOHNSEN, J. O., GROOT KOERKAMP, P. W. G., UENK, G. H., SCHOLTENS, R., METZ, J. H. M., WATHES, C. M. (1998): The development of robust methods for measuring concentrations and emission rates of gaseous and particulate air pollutants in livestock buildings. *J. agric. Engng Res.* 70, 11-24.
- SEEDORF, J., HARTUNG, J., SCHRÖDER, M., LINKERT, K. H., PHILLIPS, V. R., HOLDEN, M. R., SNEATH, R. W., SHORT, J. L., WHITE, R. P., PEDERSEN, S., TAKAI, H., JOHNSEN, J. O., METZ, J. H. M., GROOT KOERKAMP, P. W. G., UENK, G. H., WATHES, C. M. (1998): Concentrations and emissions of airborne endotoxins and microorganisms in livestock buildings in Northern Europe. *J. agric. Engng Res.* 70, 97-109.
- TAKAI, H., PEDERSEN, S., JOHNSEN, J. O., METZ, J. H. M., GROOT KOERKAMP, P. W. G., UENK, G. H., PHILLIPS, V. R., HOLDEN, M. R., SNEATH, R. W., SHORT, J. L., WHITE, R. P., HARTUNG, J., SEEDORF, J., SCHRÖDER, M., LINKERT, K. H., WATHES, C. M. (1998): Concentrations and emissions of airborne dust in livestock buildings in Northern Europe. *J. agric. Engng Res.* 70, 59-77.
- VUČEMILO, M. (2002.): Govedarstvo. Higijena smještaja i držanja preživača na obiteljskim gospodarstvima. Skripta za tečaj za doktore veterinarske medicine. (Vučemilo, M., Tofant, A., Pavičić, Ž.). Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 10-28.
- WATHES, C. M. (1994): Air and surface hygiene. In: Livestock housing. (Wathers, C. M., D., Charles, R.). *CAB International*. Wallingford. 123-148.
- WIJNAND, E. (1997): Exposure to non-infectious microorganisms and endotoxins in agriculture. *Ann Agric Environ Med.* 4, 179-186.

WILSON, S. C., MOROW-TESCH, J., STRAUS, D. C., COOLEY, J. D., WONG, W. C., MITLÖHNER, F. M., McGLONE, J. J. (2002): Airborne microbial flora in a cattle feedlot. *Applied and environmental microbiology*. 68, 3238-3242.

ZUCKER, B. A., TROJAN, S., MÜLLER, W. (2000): Airborne gram-negative bacterial flora in animal houses. *J. Vet. Med. B - Infect Dis Vet Public Health*. 47, 37-46.

Adrese autora - Author's addresses:

Mr. sc. Kristina Matković¹

Prof. dr. sc. Marija Vučemilo¹

Dr. sc. Bara Vinković²

Prof. dr. sc. Željko Pavičić¹

Srećko Matković, dr. vet. med.³

¹ Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Zavod za animalnu higijenu, okoliš i etologiju
Heinzlova 55, Zagreb

² Hrvatski veterinarski institut
Odjel za zoohigijenu i tehnologiju stočarske proizvodnje
Savska cesta 143, Zagreb

³ Zvonimira Rogoza 8/1, Zagreb

Prispjelo - Recieved: 17.12.2006.

Prihvaćeno - Accepted: 08.01.2007.