

## Kvalitativno – kvantitativna analiza biodiverziteta mikroorganizama sirovog i pasteriziranog mlijeka

Suad Habeš

Izvorni znanstveni rad – Original scientific paper

UDK: 637.131

### Sažetak

U toku četverogodišnjeg rada (1996.-1999.) analizirana je kvalitativno-kvantitativna zastupljenost mikroorganizama u kravljem mlijeku po fazama proizvodnje i prerade. Ukupno je analizirano 840 uzoraka sirovog i pasteriziranog mlijeka i to: 672 uzorka sirovog mlijeka i 168 uzoraka pasteriziranog mlijeka.

Ukupan broj mikroorganizama u sirovom mlijeku bio je od  $2,2 \times 10^5$  do  $4,9 \times 10^7$ /ml, a u pasteriziranom mlijeku od  $2,3 \times 10^4$  do  $4,3 \times 10^4$ /ml.

Iz sirovog i pasteriziranog mlijeka izolirane su vrste *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophiticus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morgani*, *P. rettgeri*, *Streptococcus faecalis*, *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *Escherichia coli*. Kriterijima Pravilnika o uvjetima mikrobiološke ispravnosti sirovog i pasteriziranog mlijeka nije udovoljilo 597 uzoraka. Od tog broja higijenski neispravni uzorci najčešće su sadržavali vrstu *Escherichia coli* 34,37%, zatim vrste iz roda *Staphylococcus* 26,17%, vrste iz roda *Streptococcus* 21,89%, i vrste iz roda *Proteus* 7,28%.

### Uvod

Povećanje proizvodnje i potrošnje mlijeka, te poboljšanje njegove kvalitete uvjetovano je nizom faktora, kao što su: pasminski sastav muzara, hranidba i smještaj, zdravstvena zaštita, higijensko-tehnički uvjeti proizvodnje, obrada, prerada, držanje i prodaja, ekonomski i kulturni nivo proizvođača, cijena mlijeka, troškovi proizvodnje i plasmana, raspoloživost kapaciteta za obradu i preradu, te promidžba potrošnje mlijeka i mliječnih proizvoda (Hadžidedić, et al., 1969.). Presudan značaj za proizvodnju higijenski ispravnog i kvalitetnog mlijeka ima zdravstvena zaštita muzara i ostvarenje higijensko-tehničkih uvjeta u proizvodnji, obradi, preradi, transportu, uskladištenju i prodaji mlijeka (Grapin, 1996.).

Ostvarenje optimalnih higijenskih uvjeta od proizvodnje do prometa, predstavlja još uvijek veliki problem i u ekonomski i kulturno razvijenijim zemljama u kojima je, u pogledu ostvarenja higijensko-tehničkih uvjeta u navedenim tehnološkim procesima, postignut veliki napredak. I pored toga, relativno su česta alimentarna trovanja uzrokovana nespecifičnim mikroorganizmima kojima se mlijeko kontaminira, prvenstveno u procesu proizvodnje, a zatim za vrijeme transporta, obrade, prerade, skladištenja i prodaje (Hadžidedić, et al., 1969.).

Mikroorganizmi, a prvenstveno bakterije, mogu dospjeti u mlijeko na razne načine (Tratnik, 1998.), a pretežno sa i iz vimena za vrijeme mužnje kao kontaktnom infekcijom iz okoline. Nepodesan smještaj vimena, sredina u kojoj se vrši mužnja i kontakt mlijeka s raznim posuđem, priborom i uređajima pogoduju kontaminaciji mlijeka s različitim saprofitskim i fakultativno patogenim bakterijama, a stupanj kontaminacije uvjetovan je higijenskim i mikroklimatskim prilikama u procesu proizvodnje, obrade, prerade, uskladištenja i prodaje (Milamović, et al., 1992.). Te bakterije uzrokuju kvarenje mlijeka pa nisu za ljudsku prehranu.

Na biodiverzitet mikroorganizama kravljeg mlijeka djeluje niz faktora, a najjednostavnije ih možemo podijeliti na unutrašnje i vanjske. Unutrašnji faktori su obično genetski determinirani, predstavljaju stabilne faktore koji nisu podložni značajnim promjenama, za razliku od vanjskih faktora podložnih brzim i značajnim promjenama (Pobrić, 1983.). Kompleksnost djelovanja spomenutih faktora može se direktno odražavati na zastupljenost pojedinih mikrobioloških vrsta, odnosno njihovih skupina. Može se reći da sam medij-kravlje mlijeko, sa svim ostalim eko-faktorima koji su u i oko njega, predstavlja osnovu biodiverziteta mikroorganizama (Gau nt, 1980).

Svrha ovoga rada bila je temeljna kvalitativno-kvantitativna analiza biodiverziteta za čovjeka štetnih mikroorganizama kravljeg mlijeka. Veliki je značaj dat samoj proizvodnji i preradi i to od mjesta preuzimanja uzoraka (farma) pa kroz sve faze obrade mlijeka, radi utvrđivanja izvora i načina njegove kontaminacije mikroorganizmima.

#### ***Materijal i metode***

U toku četverogodišnjeg rada (1996.-1999.) analizirana je kvalitativno-kvantitativna zastupljenost mikroorganizama u kravljem mlijeku s farme Bojnik – ILIDŽA po fazama proizvodnje i prerade. Ukupno je analizirano 840

uzoraka sirovog i pasteriziranog mlijeka i to: 672 uzorka sirovog i 168 uzoraka pasteriziranog mlijeka. Uzorci sirovog mlijeka uzeti su u sterilne epruvete po fazama proizvodnje: izmuzište, laktofriz, transportna cisterna pri utovaru, transportna cisterna na rampi mljekare prije pasterizacije i iz tanka u mljekari poslije pasterizacije. Svi uzorci su odmah nakon uzorkovanja dostavljeni u laboratorij gdje je izvršen standardni postupak njihove obrade. Uzorci koji nisu odmah uzeti u postupak pohranjeni su u hladnjak na temperaturu od 0°C do 2°C (gdje su čuvani od 15 do 18 sati).

Mikrobiološka pretraga kravljeg mlijeka vršena je po Pravilniku o metodama obavljanja mikrobioloških analiza i superanaliza živežnih namirnica (Sl. list RBiH 2/92., 13 i 14/94.), metodom kvalitativno-kvantitativne mikrobiološke analize (Speck, 1976.).

Procjena ispravnosti obrađenih uzoraka vršena je u komparaciji s odredbama Pravilnika o uvjetima glede mikrobiološke ispravnosti kojima moraju odgovarati namirnice u prometu (Sl. list. RBiH 2/92.). Tim pretragama određen je ukupni broj mikroorganizama, zastupljenost vrsta i broj jedinki roda *Salmonella*, sulfitoreducirajućih klostridija, enterobakterija (posebno *Escherichia coli* i *Proteus sp.*), fekalnih streptokoka (s naglaskom na *Streptococcus faecalis*), stafilokoka, kvasaca i plijesni u 1 mL.

Hranjive podloge su zasijavane u odgovarajućem decimalnom razrjeđenju pripremljenom na uobičajeni način u aseptičnim uvjetima (1,0 mL u podlogu, odnosno 0,1 mL po površini podloge) ovisno o vrsti bakterije. Inkubacija je vršena na temperaturi od  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  i  $44 \pm 1^\circ\text{C}$  u 24, 48, 72 i više sati. Nakon inkubacije izbrojane su karakteristične kolonije u ili na podlogama sa odgovarajućim rastom mikroorganizama (30 – 100) kod zasijavanja u podlogu, odnosno (5 – 500) kod zasijavanja na površini podloge. Po potrebi je vršena morfološka, biokemijska i serološka identifikacija izolata.

Istraživanja su provedena u Mikrobiološkom laboratoriju kontrole kvalitete D.D. "Milcos" Mljekara Sarajevo i Zavodu za higijenski nadzor namirnica i zaštitu životne sredine Veterinarskog fakulteta u Sarajevu. Istraživanja su se odnosila na kvalitativno-kvantitativnu zastupljenost mikroorganizama u sirovom i pasteriziranom mlijeku, po lokacijama uzorkovanja. Istražena je biosistematska identifikacija i abundancija patogenih mikroorganizama.

**Rezultati rada**

Rezultati ispitivanja kvalitativno – kvantitativne analize biodiverziteta mikroorganizama sirovog i pasteriziranog mlijeka prikazani su u tablicama od 1 do 11 i grafikonima 1 i 2.

Tablica 1: Zastupljenost mikroorganizama u sirovom mlijeku s farme

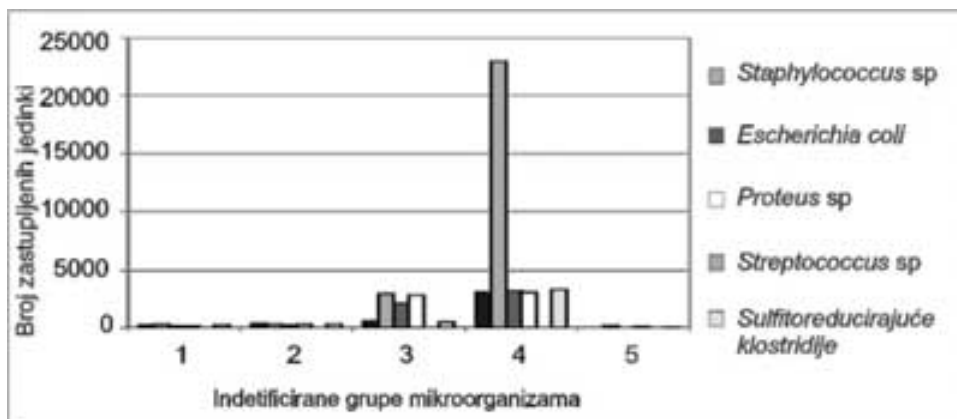
"Bojnik" - Ilidža jesen - zima od 1996. do 1999. (N = 420)

Table 1: Microorganisms presence in raw milk from «Bojnik»-Ilidža farm, during autumn- winter seasons from 1996 to 1999 (N= 420)

Vrsta uzorka Type of samples	Vrste i skupine mikroorganizama u 1 mL Type of microorganismis in 1 mL						
	Ukupan broj mikroorganizama Total number of microorganisms	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> sp	<i>Streptococcus</i> sp	Sulfitoreducirajuće klostridije <i>Sulphite reducing Clostridium</i>	Aerobne sporogene bakterije Aerobic sporogenes bacteria
Mlijeko iz izmuzišta Milk from milking parlour	$2,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	-	$2,2 \times 10^2$
Mlijeko iz laktofriza Milk from refrigerator	$4,1 \times 10^6$	$3,3 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	-	$2,8 \times 10^2$
Mlijeko iz trans. cisterne utovar Milk from trans. cistern (load)	$5,2 \times 10^6$	$5,2 \times 10^2$	$2,9 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,8 \times 10^3$	-	$4,3 \times 10^2$
Mlijeko iz cisterne prije pasterizacije Milk from cistern before pasteurisation	$3,7 \times 10^7$	$3,0 \times 10^3$	$2,3 \times 10^4$	$3,2 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$	-	$3,3 \times 10^3$
Mlijeko iz tanka poslije pasterizacije Milk from cistern after pasteurisation	$2,3 \times 10^4$	$\leq 10$	$1,5 \times 10^2$	$\leq 10$	$0,8 \times 10^2$	-	$0,4 \times 10^2$

\*Nisu izolirane sljedeće skupine: salmonele, sulfitoreducirajuće klostridije, kvasci i plijesni

\*Following species were not isolated: salmonella, sulphite reducing clostridium, yeasts and moulds



Grafikon 1: Komparativni prikaz zastupljenosti mikroorganizama u sirovom mlijeku s lokacije uzorkovanja

Graph 1: Comparative view of microorganisms presence in raw milk from sampling location

Tablica 2: Mikrobiološka ispravnost uzoraka sirovog mlijeka s farme "Bojnik" - Ilidža jesen - zima od 1996. do 1999. (N = 420)

Table 2: Microbiological analysis of raw milk samples from «Bojnik»-Ilidža farm, during autumn- winter seasons from 1996 to 1999 (N=420)

Vrsta uzorka Type of samples	Negativni uzorci Negative samples	Pozitivni uzorci Positive samples	Pozitivni Positive (%)
Mlijeko iz izmuzišta Milk from milking parlour	34	50	59,52
Mlijeko iz laktofriza - Milk from refrigerator	25	59	70,24
Mlijeko iz transportne cisterne – utovar - Milk from trans. cistern (load)	2	82	97,61
Mlijeko iz cisterne prije pasterizacije Milk from cistern before pasteurisation	-	84	100,00
Mlijeko iz tanka poslije pasterizacije Milk from cistern after pasteurisation	80	4	4,76
Svega: Total:	141	279	66,43

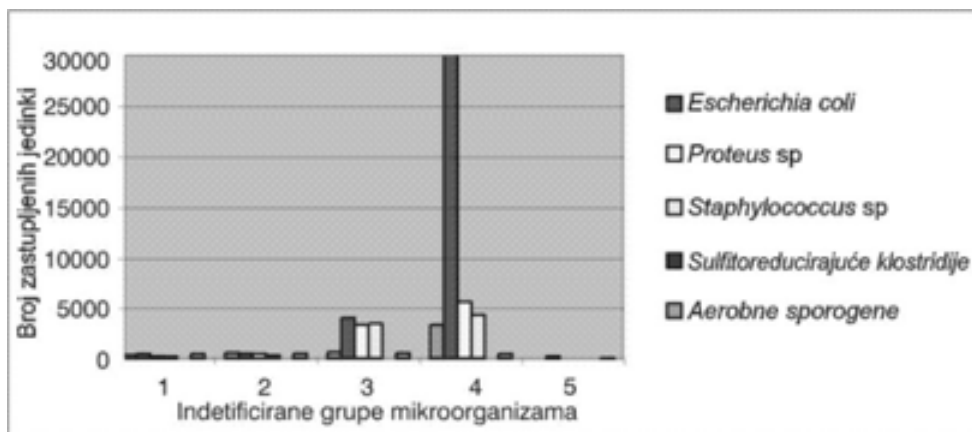
Tablica 3: Zastupljenost mikroorganizama u sirovom mlijeku sa farme "Bojnik" Ilidža proljeće - ljeto od 1996. do 1999. (N = 420)

Table 3: Microorganisms presence in raw milk from «Bojnik»-Ilidža farm spring-summer seasons from 1996 to 1999 (N=420)

Vrsta uzorka Species sample	Vrste i skupine mikroorganizama u 1 ml Type of microorganisms in 1ml						
	Ukupan broj mikroorganizama Total number of microorganisms	<i>Staphylococcus</i> sp	<i>E. coli</i>	<i>Proteus</i> sp	<i>Streptococcus</i> sp	Sulfitoreducirajuće klostridije Sulfite reducing clostridium	Aerobne sporogene bakterije Aerobic sporogenic bacteria
Mlijeko iz izmuzišta Milk from milking parlour	$4,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	-	$3,1 \times 10^2$
Mlijeko iz laktofriza Milk from refrigerator	$4,8 \times 10^6$	$3,7 \times 10^2$	$3,3 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	-	$3,4 \times 10^2$
Mlijeko iz trans. cisterne utovar Milk from trans. cistern (load)	$6,0 \times 10^6$	$4,1 \times 10^2$	$2,8 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	-	$3,6 \times 10^2$
Mlijeko iz cisterne prije pasterizacije Milk from cistern before pasteurisation	$4,9 \times 10^7$	$2,3 \times 10^3$	$2,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$		$3,0 \times 10^3$
Mlijeko iz tanka poslije pasterizacije Milk from cistern after pasteurisation	$4,03 \times 10^6$	$\leq 10$	$1,3 \times 10^2$	$\leq 10$	$\leq 10$	-	$0,2 \times 10^2$

\*Nisu izolirane sljedeće skupine: salmonele, sulfitoreducirajuće klostridije, kvasci i plijesni

\*Following species were not isolated: Salmonella, Sulfite reducing clostridium, yeasts moulds



Grafikon 2: Komparativni prikaz zastupljenosti mikroorganizama u sirovom mlijeku s lokacije uzorkovanja

Graph. 2: Comparative view of microorganisms presence in raw milk from sampling location

Tablica 4: Mikrobiološka ispravnost uzoraka sirovog mlijeka krava s farme "Bojnik" - Ilidža proljeće-ljeto od 1996. do 1999. (N = 420)

Table 4: Microbiological analysis of raw cow's milk samples from «Bojnik»-Ilidža farm spring-summer seasons from 1996 to 1999 (N = 420)

Vrsta uzorka Type of samples	Negativni uzorci Negative samples	Pozitivni uzorci Positive samples	Pozitivni Positive %
Mlijeko iz izmuzišta Milk from milking parlour	13	71	84,52
Mlijeko iz laktofriza - Milk from refrigerator	7	77	91,66
Mlijeko iz transportne cisterne – utovar Milk from trans. cistern (load)	-	84	100,00
Mlijeko iz cist. prije pasterizacije Milk from cistern before pasteurisation	-	84	100,00
Mlijeko iz tanka poslije pasterizacije Milk from cistern after pasteurisation	82	2	2,38
Svega: Total:	102	318	75,71

Tablica 5: Postotak mikrobiološki pozitivnih uzoraka u sirovom i pasterizovanom mlijeku analiziranih od 1996. do 1999.

Table 5: Percentage of microbiologically positive samples in raw and pasteurised milks, analysed from 1996 to 1996

Uzorci Samples	Period 1996.-1999. Period 1996-1999
Broj pozitivnih uzoraka Number of positive samples	597 100,00 %
Ukupni broj mikroorganizama Total number - microorganisms	62 10,29 %
Br. poz. uzoraka <i>Staphylococcus</i> Number of positive <i>Staphylococcus</i>	156 26,17 %
Br. poz. uzoraka <i>Proteus</i> Number of positive <i>Proteus</i>	43 7,28 %
Br. poz. uzoraka <i>Streptococcus</i> Number of positive <i>Streptococcus</i>	131 21,89 %
Br. poz. uzoraka <i>Escherichia</i> Number of positive <i>Escherichia</i>	205 34,37 %

Nisu izolirane sljedeće skupine: salmonele, sulfitoreducirajuće klostridije, kvasci plijesni

\* Following species were not isolated: Salmonella, sulfite reducing Clostridium, yeasts and moulds



Tablica 6: Determinacija izoliranih vrsta bakterija iz sirovog i pasteriziranog mlijeka analiziranog od 1996. do 1999.

Table 6: Isolated bacteria species from raw and pasteurised milks analysed from 1996 to 1999

Rod /Genera <i>Staphylococcus</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	82 (52,56)	76 (92,68)	6 (7,32)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	44 (28,20)	42 (26,92)	2 (1,28)
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	30 (19,24)	29 (96,70)	1 (1,28)
Rod (Genus) <i>Proteus</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Proteus vulgaris</i>	21 (48,84)	17 (80,95)	4 (19,05)
<i>Proteus mirabilis</i>	14 (32,56)	12 (85,71)	2 (14,29)
<i>Proteus morgani</i>	6 (13,95)	5 (83,33)	1 (16,67)
<i>Proteus rettgeri</i>	2 (4,65)	2 (4,65)	–
Rod (Genus) <i>Streptococcus</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Streptococcus faecalis</i>	62 (47,32)	58 (93,55)	4 (6,45)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	30 (22,90)	28 (93,33)	2 (6,67)
<i>S. streptococcus</i> <i>S. dysgalactiae</i>	19 (14,50)	17 (89,47)	2 (10,53)
<i>Streptococcus uberis</i>	16 (12,21)	15 (93,75)	1 (6,25)
<i>Streptococcus bovis</i>	4 (3,07)	3 (75,00)	1 (25,00)
Rod (Genus) <i>Escherichia</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Escherichia coli</i>	205 (34,37)	154 (75,12)	51 (24,88)

Tablica 7: Kvantitativna zastupljenost pripadnika roda *Staphylococcus* u sirovom i pasteuriziranom mlijeku analiziranom 1996. –1999.  
 Table 7: Quantitative analysis of *Staphylococcus* in raw and pasteurised milks from 1996 to 1999

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Staphylococcus aureus</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	76	45	20	11	12,73
Past. mlijeko Pasteurised milk	6	4	2	-	1,00
Ukupno Total	82	49	22	11	13,73
% pozitivnih % positive		8,21	3,68	1,84	13,73

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	42	29	8	5	7,35
Past. mlijeko Pasteurised milk	2	2	-	-	1,00
Ukupno Total	44	31	8	5	7,37
% pozitivnih % positive		5,19	1,34	0,84	7,37

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Staphylococcus saprophiticus</i>				
	Br.pozitiv. Uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	29	14	9	6	4,86
Past. mlijeko Pasteurised milk	1	1	-	-	0,16
Ukupno Total	30	15	9	6	5,02
% pozitivnih % positive		2,51	1,50	1,01	5,02

Tablica 8: Kvantitativna zastupljenost pripadnika roda *Proteus* u sirovom i pasteriziranom mlijeku analiziranom 1996.-1999. godine

Table 8: Quantitative analysis of *Proteus* in raw and pasteurised milks from 1996 to 1999

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Proteus vulgaris</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	17	10	5	2	2,84
Past. mlijeko Pasteurised milk	4	3	1	-	0,67
Ukupno Total	21	13	6	2	3,51
% pozitivnih % positive		2,17	1,00	0,34	3,51

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Proteus mirabilis</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	12	9	3	-	2,01
Past. mlijeko Pasteurised milk	2	2	-	-	0,33
Ukupno Total	14	11	3	-	2,34
% pozitivnih % positive		1,84	0,50	-	2,34

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Proteus morgani</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	5	4	1	-	0,84
Past. mlijeko Pasteurised milk	1	1	-	-	0,17
Ukupno Total	6	5	1	-	1,01
% pozitivnih % positive		0,84	0,17	-	1,01

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Proteus rettgeri</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	2	2	-	-	0,33
Past. mlijeko Pasteurised milk	-	-	-	-	
Ukupno Total	2	2	-	-	0,33
% pozitivnih % positive		0,33	-	-	0,33

Tablica 9: Kvantitativna zastupljenost pripadnika roda *Streptococcus* u sirovom i pasteuriziranom mlijeku analiziranom 1996.-1999. godine  
Table 9: Quantitative analysis of *Streptococcus* in raw and pasteurised milks from 1996 to 1999

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Streptococcus faecalis</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	58	46	12	-	9,71
Past. mlijeko Pasteurised milk	4	4	-	-	0,66
Ukupno Total	62	50	12	-	10,37
% pozitivnih % positive		8,36	2,01	-	10,37

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Streptococcus agalactiae</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	28	19	9	-	4,69
Past. mlijeko Pasteurised milk	2	2	-	-	0,33
Ukupno Total	30	21	9	-	5,02
% pozitivnih % positive		3,51	1,51	-	5,02

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Streptococcus dysgalactae</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	17	11	6	-	2,85
Past. mlijeko Pasteurised milk	2	2	-	-	0,33
Ukupno Total	19	13	6	-	3,18
% pozitivnih % positive		2,18	1,00	-	3,18

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Streptococcus uberis</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	15	10	5	-	2,51
Past. mlijeko Pasteurised milk	1	1	-	-	0,17
Ukupno Total	16	11	5	-	2,68
% pozitivnih % positive		1,84	0,84	-	2,68

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/ml Quantitative analysis in g/ml				
	<i>Streptococcus bovis</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	3	2	1	-	0,50
Past. mlijeko Pasteurised milk	1	1	-	-	0,17
Ukupno Total	4	3	1	-	0,67
% pozitivnih % positive		0,50	0,17	-	0,67

Tablica 10: Determinacija izoliranih vrsta bakterija iz sirovog i pasteriziranog mlijeka analiziranog od 1996. do 1999.

Table 10: Isolated bacteria species from raw and pasteurised milks analysed from 1996 to 1999

Rod /Genera <i>Staphylococcus</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz. mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	82 (52,56)	76 (92,68)	6 (7,32)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	44 (28,20)	42 (26,92)	2 (1,28)
<i>Staphylococcus saprophiticus</i>	30 (19,24)	29 (96,70)	1 (1,28)
Rod (Genus) <i>Proteus</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Proteus vulgaris</i>	21 (48,84)	17 (80,95)	4 (19,05)
<i>Proteus mirabilis</i>	14 (32,56)	12 (85,71)	2 (14,29)
<i>Proteus morgani</i>	6 (13,95)	5 (83,33)	1 (16,67)
<i>Proteus rettgeri</i>	2 (4,65)	2 (4,65)	–
Rod (Genus) <i>Streptococcus</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Streptococcus faecalis</i>	62 (47,32)	58 (93,55)	4 (6,45)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	30 (22,90)	28 (93,33)	2 (6,67)
<i>streptococcus dysgalactiae</i>	19 (14,50)	17 (89,47)	2 (10,53)
<i>Streptococcus uberis</i>	16 (12,21)	15 (93,75)	1 (6,25)
<i>Streptococcus bovis</i>	4 (3,07)	3 (75,00)	1 (25,00)
Rod (Genus) <i>Escherichia</i>	Broj poz. uzoraka Number of positive samples (%)	Sirovo mlijeko (%) Raw milk (%)	Pasteriz.mlijeko (%) Pasteurised milk (%)
<i>Escherichia coli</i>	205 (34,37)	154 (75,12)	51 (24,88)



Tablica 11: Kvantitativna zastupljenost roda *Escherichia* u sirovom i pasterizovanom mlijeku analiziranom 1996-1999. godine  
 Table 11: Quantitative analysis of *Escherichia* in raw and pasteurised milks from 1996 to 1999.

Vrsta uzorka Type of samples	Kvantitativna zastupljenost u g/mL Quantitative analysis in g/mL				
	<i>Escherichia coli</i>				
	Br.pozitiv. uzoraka Number of positive samples	$\leq 10^2$	$10^3-10^4$	$\geq 10^4-10^5$	Pozitiv. % Positive %
Sirovo mlijeko Raw milk	154	88	57	9	25,80
Past. mlijeko Pasteurised milk	51	34	17	-	8,54
Ukupno Total	205	122	74	9	34,34
% pozitivnih % positive		20,43	12,40	1,51	34,34

### Diskusija

Ispitivanja vršena u vremenu od 1996. do 1999. godine, a odnosila su se na zastupljenost mikroorganizama u sirovom i pasteriziranom mlijeku, pokazala su lošu kvalitetu sirovog mlijeka, zbog nalaza velikog ukupnog broja mikroorganizama u 1mL, kao i nalaza pojedinih patogenih vrsta. Već smo konstatirali da je ukupni broj mikroorganizama iznosio od  $2,2 \times 10^5$  do  $4,9 \times 10^7$ /mL (tab.1., 3.) što predstavlja jako veliku kontaminaciju sirovog mlijeka u odnosu na Pravilnik (3.000.000/mL).

Prvi rezultati odnosili su se na mikrobiološku kvalitetu sirovog mlijeka iz **izmužišta** i pokazali su da je ukupni broj mikroorganizama inosio od  $2,2 \times 10^5$  do  $4,3 \times 10^5$ /mL što predstavlja visoku kontaminaciju kod primarne proizvodnje sirovog mlijeka. Ovako visoki stupanj zastupljenosti ukupnog broja mikroorganizama ukazuje na loše higijensko-mikrobiološko stanje proizvodnog procesa sirovog mlijeka u samoj štali, na relaciji mliječna žlijezda, mužnja, izmužište.

Sirovo je mlijeko u **laktofrizu** imalo ukupni broj mikroorganizama od  $4,1 \times 10^6$  do  $4,8 \times 10^6$ /mL (tab.1., 3.) što predstavlja povećanje broja bakterijskih vrsta u odnosu na sirovo mlijeko iz izmuzišta. Ova vrijednost povećanja ukupnog broja mikroorganizama u svezi je s činjenicom da svježe pomuženo mlijeko nije dovoljno hlađeno. I ovdje su izvori kontaminacije sirovog mlijeka bili nedovoljno čišćenje, pranje, dezinfekcija uređaja i posuda za mužnju ili pak kontaminacija uslijed pranja s kontaminiranom vodom.

U sirovom mlijeku u – **transportnim cisternama** (utovar) utvrđen je ukupan broj mikroorganizama od  $5,2 \times 10^6$  do  $6,0 \times 10^6$ /mL (tab.1., 3.). Ovako veliki ukupni broj mikroorganizama posljedica je različitih primijenjenih mjera kod dobivanja i čuvanja sirovog mlijeka. Naši rezultati glede nalaza pojedinih vrsta mikroorganizama u odnosu na prethodne lokacije uzorkovanja, potvrđuju to (tab. 1., 3).

Sirovo mlijeko u - **transportnim cisternama prije pasterizacije** (istovar) imalo je ukupno od  $3,7 \times 10^7$  do  $4,9 \times 10^7$ /mL mikroorganizama (tab.1., 3.), što predstavlja veliko onečišćenje sirovog mlijeka. Međutim, u literaturi su zabilježena i veća onečišćenja sirovog mlijeka glede ukupnog broja (Miletić, et al., 1976.). Naši rezultati pokazuju također zastupljenost pojedinih vrsta odnosno skupina mikroorganizama, u sirovom mlijeku iz cisterni prije pasterizacije (tab.1.,3 ). Ovako visok stupanj zastupljenosti specifičnih vrsta i skupina bakterija utvrdili su i drugi autori (Hađžidedić, et al., 1969.; Mitić, et al., 1971.; Srna, 1972.; Milojević, et al., 1988.), što je približno podudarno s našim rezultatima i može se dovesti u vezu sa sličnim zdravstvenim stanjem mliječne žlijezde i higijenskim uvjetima u primarnoj proizvodnji sirovog mlijeka. Prateći u kontinuitetu zastupljenost vrsta i skupina mikroorganizama iz spomenutih rodova u odnosu na lokalitet uzorkovanja evidentno je da se broj jedinki povećavao od izmuzišta preko laktofriza, transportnih cisterni, do rampe mljekare što se može dovesti u svezu s načinom mužnje, vremenom i temperaturom uskladištenja, te transportom sirovog mlijeka do mljekare.

Kada su vršena mikrobiološka ispitivanja sirovog pasteriziranog mlijeka, nisu izolirane vrste iz roda *Salmonella* što upućuje na činjenicu da osobe koje su manipulirale sirovim i pasteriziranim mlijekom nisu bile potencijalni nosioci ovih vrsta, te nisu predstavljale mogući izvor infekcije ovim uzročnicima. Također, vrste iz roda *Clostridium* nisu izolirane. Kvasci i plijesni nisu izolirani iz sirovog i pasteriziranog mlijeka, iako se ovi mikroorganizmi u prirodi javljaju u velikom broju, što znači da sirovo i

pasterizirano mlijeko ne predstavlja podesnu sredinu za njihov rast, a to je u direktnoj vezi s hlađenjem sirovog mlijeka jer kvasci i plijesni rastu na temperaturama iznad 18<sup>0</sup>C, te osim temperature kvasci i plijesni zahtijevaju i kiselu sredinu.

Budući je sirovo mlijeko bilo loše higijenske kvalitete, ni - **pasterizirano mlijeko iz tanka** (pretraženo odmah po izvršenoj pasterizaciji) nije zadovoljavalo higijensku kvalitetu u odnosu na ukupni broj preživjelih mikroorganizama kao i na broj pojedinih vrsta, odnosno skupina mikroorganizama što upućuje na neispravno izvedenu pasterizaciju (tab.1., 3).

Prema našim rezultatima pasterizirano mlijeko iz tanka imalo je ukupni broj mikroorganizama od  $2,3 \times 10^4$  do  $4,3 \times 10^4$ /mL i nije ispunjavalo kriterije Pravilnika što je zahtijevalo obveznu repasterizaciju (tab.1., 3). U odnosu na Pravilnik mikrobiološku ispravnost sirovog mlijeka ne ispunjava ni jedan uzorak na rampi mljekare, te da nakon pasterizacije 6 (šest) uzoraka ne zadovoljava kriterije Pravilnika (tab.2., 4.).

Od ukupno 840 analiziranih uzoraka sirovog i pasteriziranog mlijeka, bilo je 597 pozitivnih uzoraka, a najveći broj pozitivnih uzorka odnosio se na vrstu iz roda *Escherichia*, što se može dovesti u vezu sa nedovoljno čistom opremom i priborom za mužnju, jer se oni nedovoljno čiste, peru i dezinficiraju, te lošim čuvanjem i hlađenjem mlijeka (tab. 5).

U sirovom i pasteriziranom mlijeku *Staphylococcus aureus* utvrđen je u 52,56% uzoraka, *Proteus vulgaris*- 48,84% uzoraka, *Streptococcus faecalis*- 47,32% uzoraka, *Escherichia coli* u 34,37% uzoraka (tab. 6).

Na osnovu rezultata koji su pokazali da od tri determinirane vrste u rodu *Staphylococcus* najveći je broj pozitivnih uzoraka bio kod vrste *S. aureus* 52,56% koje su dospjele u sirovo mlijeko iz različitih izvora, a glavni izvor kontaminacije su stafilokokni mastitisi, Navodi se (Altabari.1984.), da je oko 28,10% svih akutnih i 35,80% kroničnih mastitisa uzrokovano vrstom *Staphylococcus aureus*, odnosno da preko 50% krava daje mlijeko koje u sebi sadrži stafilokoke (tab. 7).

Determinacija vrste *Staphylococcus epidermidis* upućuje na to da su ove bakterije dospjele u sirovo mlijeko s ruku radnika koji su radili u proizvodnji istog (tab. 7).

Prisustvo vrste *Straphylococcus saprophiticus* upućuje na loše mikrobiološke uvjete, vjerovatno u štali (tab. 7).

Prema našim rezultatima sve tri vrste iz roda *Staphylococcus* kvantitativno su bile najzastupljenije pri decimalnoj potenciji  $\leq 10^2$  što upućuje na povoljna enterotoksinogena svojstva sojeva stafilokoka (tab. 7).

Relativna vrijednost determiniranih vrsta iz roda *Proteus* ukazuje na zanemarivanje načela higijene u proizvodnji sirovog mlijeka, uz povoljne mikroklimatske faktore. Osim toga moguće je pretpostaviti da se radi o sekundarnoj kontaminaciji čije je porijeklo iz otpadnih voda. Vrste iz roda *Proteus* često kontaminiraju namirnice pa tako i mlijeko i izazivaju njihovo kvarenje. S obzirom da su sve četiri determinirane vrste iz roda *Proteus* bile kvantitativno najzastupljenije pri decimalnoj potenciji  $\leq 10^2$  to su bile minimalne mogućnosti za njihovu proteolitičku aktivnost i produkciju biogenih amina (Andrews, et al., 1994.), (tab. 8).

Determinacija vrsta iz roda *Streptococcus* pokazala je najveću zastupljenost vrste *Streptococcus faecalis* čije prisustvo upućuje na fekalno zagađenje sirovog i pasteriziranog mlijeka. Streptokoke su veoma rašireni mikroorganizmi kod ljudi i životinja i u njihovoj okolini, pa stoga ne čudi što se često nađu u mlijeku koje se proizvodi u neodgovarajućim higijenskim uvjetima (tab. 9).

Determinacija vrste *Streptococcus agalactiae* upućuje na veći broj mastitisa bovinog tipa. Nadalje, determinacija vrste *Streptococcus dysgalactiae* i vrste *Streptococcus uberis* izazivaju mastitise, a njihovo prisustvo to potvrđuje (tab. 9).

Zanimljiva je konstatacija, da su jedinice vrste *Streptococcus bovis* najmanje zastupljene u sirovom i pasteriziranom mlijeku, a izuzetno je brojna i široko rasprostranjena vrsta u prirodi, što se teško može objasniti. Ipak, možda ovu činjenicu možemo dovesti u vezu s interspecifičkom kompeticijom unutar spomenutih medija (tab. 9).

Determinacija vrste *Escherichia coli* iz roda *Escherichia* u sirovom i pasteriziranom mlijeku čija je zastupljenost iznosila 34,37% upućuje na loše higijenske uvjete primarne proizvodnje sirovog mlijeka i ukazuje na nepravilno izvedenu pasterizaciju kod proizvodnje pasteriziranog mlijeka. Kvantitativno je bila najzastupljenija pri decimalnoj potenciji  $\leq 10^2$  što nije bilo dovoljno da potpuno razvije svoje biokemijske aktivnosti (tab. 10. i 11.).

Nakon provedene usporedne analize moguće je konstatirati da u našim uvjetima proizvodnje sirovog mlijeka, transporta, obrade i držanja mlijeka,

ima niz propusta, koji su uvjetovali lošu higijensku kvalitetu sirovog mlijeka, prvenstveno u proizvodnji sirovog mlijeka. Sirovo mlijeko je sadržavalo neopravdano veliki broj mikroorganizama, što se veoma nepovoljno odrazilo i na higijensku kvalitetu pasteriziranog mlijeka. Treba imati na umu da se propusti u higijeni proizvodnje sirovog mlijeka ne mogu otkloniti uobičajenim postupcima pasterizacije i prerade.

### Zaključci

Na osnovi rezultata do kojih smo došli tijekom provedenih ispitivanja, iznosimo sljedeće zaključke:

- Utvrđena je kvalitativno – kvantitativna zastupljenost mikroorganizama u sirovom mlijeku, gdje prisustvo velikog broja kontaminata ukazuje na lošu higijensku kvalitetu prema postojećim standardima i normama. Konstatiran je ukupni broj mikroorganizama čija se brojnost kretala kod sirovog mlijeka od  $2,2 \times 10^5$  do  $4,9 \times 10^7$  u 1mL.
- Higijenska kvaliteta pasteriziranog mlijeka iz tanka također ne zadovoljava. Ukupan broj mikroorganizama u pasteriziranom mlijeku iznosio je od  $2,3 \times 10^4$  do  $4,3 \times 10^4$  u 1mL.
- Biosistematska identifikacija i abundacija patogenih mikroorganizama iz sirovog i pasteriziranog mlijeka pokazala je prisustvo 13 vrsta bakterija *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. sapropiticus*, *Proteus vulgaris*, *P.mirabilis*, *P.morgani*, *P.rettgeri*, *Streptococcus faecalis*, *S. agalactiae*, *S.dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *Escherichia coli*. Sve determinirane vrste bile su najzastupljenije pri decimalnoj potenciji  $\leq 10^2$ .
- Kriterijima Pravilnika o uvjetima mikrobiološke ispravnosti mlijeka i proizvoda iz mlijeka nije udovoljilo 597 uzoraka. Od toga broja higijenski neispravni uzorci najčešće su sadržavali vrstu *Escherichia coli* 34,37%, zatim vrste iz roda *Staphylococcus* 26,17%, vrste iz roda *Streptococcus* 21,89%, i vrste iz roda *Proteus* 7,28%.
- Da bi mikrobiološka kvaliteta sirovog i pasteriziranog mlijeka bila bolja neophodno je osigurati bolje higijenske uvjete u proizvodnji, tj. čistoću štala, muzara, vimena, mužnje, pribora za mužnju i mužača; bolje higijenske uvjete u obradi i preradi mlijeka, tj. čistoću prostorija u kojima se mlijeko obrađuje i prerađuje i čistoću pribora i postrojenja koja služe obradi, preradi, transportu i uskladištenju; pravilnu pasterizaciju, te

efikasnu kontrolu nad higijensko – mikrobiološkom kvalitetom mlijeka, s tim da kvaliteta bude značajan faktor u formiranju cijene sirovog mlijeka.

## QUALITATIVE-QUANTITATIVE ANALYSIS OF MICROORGANISMS BIODIVERSITY IN RAW AND PASTEURISED MILK

### Summary

During four-years period (1996-1999) qualitative-quantitative analyses of microorganisms in cow's milk through producing and processing stages were investigated. 840 samples (672 samples of raw and 168 samples of pasteurised milk) were analyzed in total. Analyses showed that total count of microorganisms varied among the samples. It ranged from  $2.2 \times 10^5$  to  $4.9 \times 10^7$  per 1mL of raw milk and from  $2.3 \times 10^4$  to  $4.3 \times 10^4$  per 1mL of pasteurised milk

Flolosing species were isolated from raw and pasteurised milks: *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S.saphrophiticus*, *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morgani*, *P. rettgeri*, *Streptococcus faecalis*, *S. agalactiae*, *S. disgalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis*, *Escherichia coli*. 597 raw milk and pasteurised samples do not comply with current bosnian regulations. Among this number 34.37% contained *Escherichia coli*, 26.17% *Staphylococcus*, 21.89% *Streptococcus* and 7.28% *Proteus* species.

### Literatura

ALTABARI, G. (1984.): Enterotoksigena svojstva *Staphylococcus aureus* izoliranih iz namirnica i pogona prehrambene industrije i uticaj nekih faktora na njihov opstanak i razvoj. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet, Sarajevo.

ANDREWS, A.T.& VRELEY, J. (1994.): Biochemistry of Milk Product. Royal Society of Chemistry, Special Publication.

GAUNT, S. (1980.): Genetic variation in the yields and contents of milk constituents. Int. Dairy Fed. bull., 125: 73-82.

GRAPPIN, R. (1996.): Criteria for raw milk quality-Compositional quality. Symposium, Copenhagen, 10 -12.

HADŽIDEDIĆ, I. HADŽIBEGANOVIĆ, A. MILANOVIĆ, A. MARKOVIĆ, R. HADŽIHALILOVIĆ, F. MUFTIĆ, A. (1969.): Kvalitet mlijeka i mliječnih proizvoda nekih mljekara u SRBIH i mogućnost njihovog poboljšanja. *Veterinarija*, 18 (2):203-216.

MITIĆ, S. OTENHAJMER, I. BOROTA, M. (1971.): Procjena bakteriološkog kvaliteta sirovog mlijeka u odnosu na pravilnik o bakteriološkim ulovima kojima moraju odgovarati životne namornice u prometu. *Mljekarstvo* 21 (11): 255-258.

MILANOVIĆ, A. RUKAVINA, LJ. ZAHIROVIĆ, DŽ. (1992.): Higijenska ispravnost i kvalitet namirnica životinjskog porijekla u SRBIH u periodu 1981.-1991. g. Ref. XV Naučni skup poljoprivrednih stručnjaka SRBIH, Teslić.

MILETIĆ, S., SKELIN-LUKAČ, J. (1976.): Varijacije kvaliteta sirovog i pasteriziranog mlijeka. *Mljekarstvo* 26 (5): 106.

MILOJEVIĆ, Ž. ŠIRADOVIĆ, M. RIBAR, LJ. SPAIĆ, A. (1988.): Upoređivanje higijenske i tehnološke ispravnosti sirovog mlijeka. *Mljekarstvo* 38 (8): 205-208.

POBRIĆ, H. (1983.): Makro i mikromorfološko istraživanje vrha sise i stanja keratina u odnosu na kronično-kataralna oboljenja mliječne žlijezde kod krava. Doktorska disertacija, Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu.

PRAVILNIK o metodama vršenja mikrobioloških analiza i super analiza živežnih namirnica, Sl. list R BiH, 2/92. 13 i 14/94.

PRAVILNIK o uslovima u pogledu mikrobiološke ispravnosti kojima moraju odgovarati živežne namirnice u prometu, Sl. list R BiH, 2/92.

SPECK, L. N. (1976.) Compendium of Methodes for the Microbiological Examination of Foods, American Public Health Association, Washington.

SRNA, J. (1972.): Bacterial contamination of raw milk. *Veterinarstvo*, 22: 400-401.

TRATNIK. LJ. (1998.): *Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.

**Adresa autora - Author address:**

Dr.sc. Suad Habeš  
D. D. "Milcos" Sarajevo, BiH

**Prispjelo - Received:** 20. 11. 2002.

**Prihvaćeno - Accepted:** 01. 02. 2003.