

KARAKTERISTIČNE VRSTE PSIHROFILNIH BAKTERIJA U SIROVOM MLEKU*

Ivanka OTENHAJMER i Stojanka MITIĆ
Institut za mlekarstvo SFRJ, Beograd

Uvod

U savremenoj proizvodnji mleka, primarnoj manipulaciji mleka posvećuje se velika pažnja. Ova faza obrade mleka ima naročiti značaj za snabdevanje velikih gradova mlekom i fabrika za preradu mleka. Često je područje sa koga se mleko sabire veoma veliko, pa udaljenost od mesta proizvodnje onemogućava dvokratno prihvatanje mleka. Stoga se bez mogućnosti za održavanje niskih temperatura mleka ne može ni zamisliti snabdevanje većih mlekara mlekom.

Način dobijanja mleka (muža, sabiranje, transport i hlađenje) utiče na higijenski kvalitet mleka, a prisustvo psihrofilnih bakterija je od presudnog značaja.

U radu **Schmidt-Nielsen** (1902) je opisana grupa bakterija koje rastu na temperaturi bliskoj 0°C i prvi put upotrebljen termin »psihrofilan«. Ovi mikroorganizmi mogu da se razvijaju sporo na niskoj temperaturi, nižoj od 5°C, ali je njihovo razviće mnogo brže na 20—30°C te je dalo povoda da se nazovu hladnotolerantni ili psihrotolerantni. **Eddy** (1960) je dao predlog koji je akceptiran od više autora i daje logičan i odgovarajući termin »psihrotrofan« koji je predložio **Mossel** (1960) te njime označio sve bakterije koje rastu na 5°C ili nižoj, ne ulazeći u to koja im je optimalna i maksimalna temperatura rasta. Termin »psihrofilan« je zadržan, i dalje se koristi samo za sojeve s nižim temperaturnim optimumom, odnosno za sojeve koji mogu da se razmnožavaju na 3°C, a optimalna temperatura za njihovo razviće leži ispod 20°C.

Ovaj termin je sada opšte prihvaćen u mikrobiološkoj literaturi.

Osim psihrofilnih mikroorganizama u užem smislu te reči i mnogi mezofilni mikroorganizmi se mogu razvijati na temperaturama hlađenja mleka.

Davis (1951.) iznosi niz podataka o selektivnom dejstvu temperature na mikrofloru mleka i navodi da u mleku držanom na temperaturi ispod 5°C uglavnom preovlađuju *Pseudomonas* vrste, na temperaturi od 5—10°C *Proteus*, *Micrococcus* i *Alcaligenes*, a od 10—15° *Aerobacter* i mlečne streptokoke.

* Referat sa IX seminara za mljekarsku industriju, održanog 10—12. II 1971., Tehnološki fakultet, Zagreb.

S obzirom na činjenicu da su psihofilni mikroorganizmi široko rasprostranjeni u prirodi i da se nalaze u vodi, zemljištu, mulju i na biljnoj hrani, postoje mnogobrojne i vrlo različite mogućnosti za kontaminaciju mleka ovim mikroorganizmima. Jones i Thomas su zabeležili interesantan slučaj razvoja jedne vrste *Flavobacterium* u ledenoj vodi rashlađivača bučkalice. Voda je bila zagađena prljavštinom sa spoljne strane kante dok su niska temperatura i konstantno provetravanje vode dejstvovali selektivno na bakterijsku floru.

U mleku sa farme koje se hladi u rezervoarima i drži na 3—4°C ne vidi se razviće mikroorganizama za vreme od 48 časova. Posle trodnevnog lagerovanja često se zapaža razviće manje ili više važnih psihofilnih bakterija. To zavisi od broja i prirode bakterija, od vremena trajanja muže i hlađenja.

Ako temperatura lagerovanja dostigne 7—8°C, mogu se razviti psihofilne bakterije čak i pre 48 časova lagerovanja, a na 10°C razmnožavanje može biti obimno.

Psihofilni mikroorganizmi u mleku prvenstveno razlažu belančevine i masti, dok mlečni šećer gotovo uopšte ne transformišu. Zbog toga se reakcija mleka ne menja ili jedva primetno postaje alkalna. Međutim, usled nastalih proteolitičkih i lipolitičkih promena često dolazi do promene ukusa mleka.

Nashif i Nelson (1953) dokazali su da više sojeva psihofilnih bakterija koje nisu specijalno termorezistentne, proizvode termorezistentne lipaze koje se samo parcijalno inaktiviraju temperaturom od 99°C za više minuta.

Ovi encimi su sasvim sposobni da prežive pasterizaciju pavlake na način koji se obavlja u mlekarskoj industriji. Proizvodnja lipaze je varijabilna i zavisi od vrste i soja bakterija, optimalne temperature i pH.

Isti autori su ispitali lipazu koju proizvodi *Pseudomonas fragi*. Proizvodnja encima je aktivnija kada se bakterije kultiviraju na nižim temperaturama. Maslac menja izgled primetno za vreme lagerovanja na niskim temperaturama. Ove promene su izraženije na 5°C nego na —10°C.

Proteolitički encimi su najaktivniji na relativno visokim temperaturama, dok izvesni mogu biti aktivni i na nižim. Ekstracelularni proteolitički encimi koje proizvodi *Pseudomonas fluorescens*, oslobađaju se na 0° brže nego na višim temperaturama. Međutim, aktivnost ovih encima se povećava s temperaturom.

Usled nastalih proteolitičkih i lipolitičkih promena, često dolazi do promene ukusa mleka. Ljunggren i Storgards (1959) navode da se usled dejstva psihofila najčešće javlja gorak ukus koji može biti manje ili više izražen. Ovi autori smatraju da do gorkog ukusa dolazi usled prisustva tributirina, a da nastaje dejstvom lipolitičkih fermenta psihofilnih bakterija na fosfolipidnu membranu masnih kapljica.

Usled dejstva psihofilnih mikroorganizama u mleku dolazi do pojave lojavog i užeglog ukusa kao i mirisa na ribu i drugih stranih mirisa. Tako su *Pseudomonas fluorescens* i *Pseudomonas fragi* izolovani iz užeglog maslaca i pavlake. *Pseudomonas fragi* proizvodi karakterističan miris na majske jabuke. Miris se otkriva pre nego što se primeti užeglost. Izolovan je iz mleka, pavlake, maslaca i sitnog sira. *Pseudomonas nigricans* stvara tamnu skramu na blago soljenu maslacu, dok *Pseu-*

Domonas viscosum stvara žućkastu sluzavu skramu na sitnom siru koji postaje bljutavo gorak. Pored navedenih promena, psihrofili mogu da dovedu i do promene konzistencije mleka u čemu se naročito ističu neke vrste *Pseudomonas*.

Mleko podleže promenama za vreme čuvanja na niskim temperaturama u pogledu ravnoteže soli kalcijuma, rastvorljivih fosfata i koloida, koje se izražavaju naročito u produženju koagulacije mleka sirilom.

Zbog svoje slabe termorezistentnosti psihrofilne mikroorganizme uništava temperatura pasterizacije. Mali broj fakultativnih psihrofila odnosno psihrotrofa može da preživi temperaturu pasterizacije i da kasnije u mlečnim proizvodima dovede do neželjenih promena. Promenjen ukus (gorak, zagoreo, užegao) ne nestaje pasterizacijom.

Macaylas i sar. (1963) su ispitali efekat pasterizacije (73°C 15") na preživljavanje izvesnih sojeva *Pseudomonas* i *Alcaligenes* i suprotno mišljenju mnogih autora, dokazali da preživljavaju pasterizaciju.

Promene koje psihrofili izazivaju u mleku do njegove pasterizacije odražavaju se na kvalitet namirnica proizvedenih od takvog mleka koje mogu da dovedu kod osetljivih osoba i dece do poremećaja zdravlja, koje se uglavnom manifestuje simptomima od strane gastrointestinalnog trakta.

S obzirom na činjenicu da se u našoj zemlji sve više prelazi na jedno-dnevno i dvodnevno sakupljanje mleka uporedo s hlađenjem na mestu proizvodnje, utvrđivanju psihofilnih mikroorganizama u mleku obraća se sve veća pažnja. U našoj zemlji nije dovoljno proučena ova problematika pa smo odlučili da

- ispitamo zastupljenost psihofilnih bakterija u ukupnoj mikroflori mleka i
- izvršimo identifikaciju karakterističnih sojeva psihofilnih bakterija.

Materijal i metodika rada

Rad se odnosio na ispitivanje bakteriološkog kvaliteta sirovog mleka s posebnim osvrtom na prisustvo i dokazivanje psihofilnih bakterija. Ispitivanja su obavljena na području Županje tokom juna i oktobra meseca 1969. Uzorci mleka od večernje i jutarnje muže su uzimani pod sterilnim uslovima na farmama i sabiralištu, na rampi mlekare kao i iz prijemnog bazena mlekare, a transportovani i čuvani u priručnim frižiderima. Farme i sabirališta su snabdeveni rashladnim uređajima.

Analizirano je ukupno 32 uzorka mleka. Ispitivanje je usmereno na određivanje broja mezofilnih i psihofilnih bakterija kao i na izolovanje pojedinih sojeva psihofilnih bakterija i njihovu determinaciju. Radi utvrđivanja ukupnog broja mezofilnih bakterija zasejavanje je vršeno metodom po **Koch-u**, na Petri šolji koristeći kao podlogu hranljivi agar proizvodnje »Torlak«. Inkubacija je izvođena na 32°C u toku 48 časova. Ista metoda je korišćena i za određivanje ukupnog broja psihofilnih mikroorganizama s tim što je inkubacija trajala 21 dan na 4°C. Posle određene vremenske inkubacije vršeno je pikiranje karakterističnih kolonija sa Petri šolja i prenošenje u lakmus mleko. Izabrani sojevi su nekoliko puta pasažirani radi aktiviranja za zasejavanje na biohemijske serije.

Za determinaciju psihrofilnih gramnegativnih štapićastih bakterija i izdvajanje ovih bakterija iz porodice Enterobacteriaceae, korišćena je metoda po **Bittiaux-u** koja se primenjuje u Pasterovom institutu u Lilu, a sastoji se iz sledećih ispitivanja:

morfologija bakterija,
 pokretljivost,
 ispitivanje cilijarnog sistema,
 izgled kolonija,
 sposobnost stvaranja pigmenata,
 oksidacija i fermentacija ugljenih hidrata,
 razlaganje manita,
 stvaranje indola i H₂S
 ispitivanje oksidaze kao i
 korišćenje kiseonika.

Determinacija bakterija iz porodice Enterobacteriaceae izvršena je po **Kauffmann-u**, koristeći pored navedenih analiza i IMVi C. Bakterije iz rodova Micrococcus i Streptococcus su determinisane po **Bergey-u**.

Rezultati ispitivanja i diskusija

Bakteriološka kontaminacija sirovog mleka u pogledu broja aerobnih mezofilnih bakterija i broja psihrofilnih bakterija je prikazana u sledećoj tabeli.

Datum uzimanja uzorka	Ukupan broj mezofilnih bakterija	Ukupan broj psihrofilnih bakterija	Zastupljenost psihrofilnih bakterija u %
17. VI 1969.	$4,74 \times 10^6$	$1,92 \times 10^6$	40,5
17. VI	$3,8 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	39,47
18. VI	$1,45 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	89,65
18. VI	$2,52 \times 10^6$	$2,02 \times 10^6$	80,16
18. VI	$1,7 \times 10^6$	$1,68 \times 10^6$	98,82
18. VI	$3,6 \times 10^6$	$2,45 \times 10^6$	68,05
18. VI	$7,0 \times 10^6$	$4,3 \times 10^6$	61,43
18. VI	$6,6 \times 10^6$	$5,2 \times 10^6$	78,79
19. VI	$6,1 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	81,96
19. VI	$7,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	30,67
19. VI	$5,9 \times 10^6$	$2,75 \times 10^6$	46,61
19. VI	$4,0 \times 10^6$	$2,03 \times 10^6$	50,75
18. VI	$2,1 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	52,38
18. VI	$1,2 \times 10^7$	$5,5 \times 10^6$	45,83
19. VI	$1,05 \times 10^7$	$4,2 \times 10^6$	40,00
19. VI	$6,8 \times 10^6$	$2,77 \times 10^6$	40,73
9. X	$9,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	77,78
9. X	$6,1 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	81,96
9. X	$9,5 \times 10^6$	$7,5 \times 10^6$	78,95
9. X	$3,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$	42,86
9. X	$5,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	24,00
10. X	$4,2 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	23,81

Datum uzimanja uzorka	Ukupan broj mezofilnih bakterija	Ukupan broj psihofilnih bakterija	Zastupljenost psihofilnih bakterija u %
10. X	$3,8 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	38,16
10. X	$6,5 \times 10^6$	$1,52 \times 10^6$	23,38
10. X	$5,5 \times 10^6$	$2,25 \times 10^6$	40,91
10. X	$3,2 \times 10^6$	$2,29 \times 10^6$	71,56
9. X	$3,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	30,00
9. X	$4,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4$	15,00
9. X	$1,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	20,00
9. X	$1,7 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	29,41
9. X	$1,62 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	46,30
9. X	$1,3 \times 10^6$	$1,24 \times 10^5$	9,54

Kao što se iz tabele vidi procenat zastupljenosti psihofilnih bakterija u ukupnoj mikroflori mleka je varirao od 9,5 do 98,82. U 13 slučajeva procenat psihofilnih bakterija iznosio je preko 50, a u 19 ispod 50.

Takođe se iz tabele uočava da je 90,6% uzoraka sirovog mleka bilo bakteriološki ispravno u pogledu broja mezofilnih bakterija kontaminenata. Ovakva bakteriološka slika je rezultat pravilno primenjenih postupaka hlađenja. Konstatovanje velikog broja psihofilnih bakterija u sirovom mleku ukazuje da su higijenski uslovi na mestu proizvodnje i primarne obrade mleka loši ili da je voda koja se koristi za sanitizaciju opreme i uređaja na ovim mestima zagađena psihofilnim mikroorganizmima.

Rezultati naših ispitivanja u pogledu velike zastupljenosti psihofilnih bakterija otkrivaju zabrinjavajuće stanje hlađenog mleka, jer su poznate neželjene posledice njihove biohemijske aktivnosti. Smatramo, da je za kvalitet mleka mnogo važnije prisustvo specifičnih vrsta bakterija od ukupnog broja kontaminenata koji slabo razgrađuju komponente mleka.

Iz materijala je izolovano 128 sojeva psihofilnih bakterija. Njihova grupna determinacija je pokazala sledeću procentualnu zastupljenost:

gramnegativne štapičaste bakterije	69,5%
grampozitivne koke	28,8%
kvasnice	1,7%

Pojedinačni identifikovani sojevi pripadali su vrstama u okviru sledećih rodova:

Genus <i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium</i> spp.	21,9%
Genus <i>Escherichia</i>	<i>Escherichia coli</i>	16,4%
Genus <i>Achromobacter</i>	<i>Achromobacter</i> spp.	11,7%
Genus <i>Citrobacter</i>	<i>Citrobacter intermedium</i>	8,6%
Genus <i>Alcaligenes</i>	<i>Alcaligenes</i> spp.	4,6%
Genus <i>Aeromonas</i>	<i>Aeromonas</i> spp.	3,1%
Genus <i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	3,1%
Genus <i>Micrococcus</i>	<i>Micrococcus caseolyticum</i>	14,1%
	<i>Micrococcus candidus</i>	10,9%
	<i>Micrococcus roseus</i>	0,8%
	<i>Micrococcus luteus</i>	0,8%
Genus <i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	2,3%
Genus <i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces</i> spp.	1,7%

Kao što se vidi iz ovog pregleda procentualno su najviše bili zastupljeni sojevi *Flavobacterium*, *Achromobacter*, predstavnici roda *Micrococcus* i *Escherichia*. Do sličnih rezultata u pogledu zastupljenosti pojedinih vrsta došao je **Andrey** (1959.) analizirajući 220 sojeva psihrofilnih bakterija izolovanih iz mleka. Najzastupljenije vrste su bile:

<i>Achromobacter</i>	37%
<i>Flavobacterium</i>	29%
<i>Pseudomonas</i>	17%

dok su ostali sojevi pripadali rodovima: *Micrococcus* i *Aerobacter*.

Mossel (1964.) je ispitujući 42 uzorka hlađenih namirnica izolovao:

58% gramnegativnih štapićastih bakterija

28% grampozitivnih koka

7% kvasnica i

7% grampozitivnih štapićastih bakterija.

Naši podaci koji se odnose na prisustvo grampozitivnih koka se u potpunosti slažu sa gore navedenim rezultatom. U odnosu na ostale ispitivane grupe mikroorganizama uočena su izvesna odstupanja.

Zaključak

Na osnovu sprovedenih ispitivanja može se konstatovati sledeće:

- da su postojale vidljive razlike u procentualnoj zastupljenosti psihrofilnih bakterija u ukupnoj mikroflori mleka. Ove varijacije su iznosile od 9,5 do 98,82%;
- da veliki brojevi psihrofilnih bakterija hlađenog mleka ukazuju na nedovoljne higijenske mere kod primarnih manipulacija s mlekom;
- da su gramnegativne štapićaste bakterije predstavljale dominantnu mikrofloru u istraživanom materijalu;
- da je identifikovano 128 sojeva psihrofilnih bakterija.

Najveći procenat identifikovanih sojeva je pripadao sledećim vrstama: *Flavobacterium* spp. *Escherichia coli*, *Micrococcus caseolyticus* i *Achromobacter* spp.

LITERATURA:

- Andrey J. Jr. (1959): *Frazier W. C. J. Dairy Sci.* 42, 1781
Bergey D. H. (1957): *Manuel of Determinative Bacteriology*
Buttiaux R. (1969): *Curs CERBA*
Davis J. G. (1951): *Proc. Soc. Appl Bact.* 14, 216
Eddy B. P. (1960): *J. Appl. Bact.* 23, 189—190
Kauffmann, F.: *The Bacteriology of Enterobacteriaceae* (Baltimore)
Ljunggren B., Storgards T. (1961): *Le Lait* XLI 407: 448—449
Macaulay D. M., Hawirko R. (1963): *J. Appl Microbiol.* 11, 90
Mossel D. A. A., Zwart H. (1960): *J. Appl Bact.* 23, 185
Mossel D. A. A., Moosdijk A. (1964): *J. Appl Bact.* 27 (2) 221—223
Nashif S. A., Nelson F. E. (1953): *J. Dairy Sci.* 36, 698—706
Schmidt — Nielsen S. (1902): *Zbl. Bakt.* 9, 145
Vassal L., Auclair J. (1966): *Revue Laitière Fr.* 237