

# DOKAZIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIJE CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM I SRODNIH VRSTA U MLIJEKU

---

**Jurić, Matej**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Karlovac University of Applied Sciences / Veleučilište u Karlovcu**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:128:838586>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-22**



**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
Karlovac University of Applied Sciences

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Karlovac University of Applied Sciences - Institutional Repository](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**VELEUČILIŠTE U KARLOVCU**  
**STRUČNI STUDIJ PREHRAMBENA TEHNOLOGIJA**  
**PRERADA MLJEKA**

MATEJ JURIC

**DOKAZIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIJE *CLOSTRIDIUM***  
***TYROBUTYRICUM* I SRODNIH VRSTA U MLJEKU**

ZAVRŠNI RAD

KARLOVAC, 2022.

**Veleučilište u Karlovcu**

Stručni studij prehrambena tehnologija

Prerada mlijeka

Matej Jurić

**Dokazivanje prisutnosti bakterije**

***Clostridium tyrobutyricum* i srodnih vrsta u mlijeku**

Završni rad

Mentor: dr.sc. Marijana Blažić, prof.v.š.

Komentor: dr.sc. Bojan Matijević, prof.v.š

Broj indeksa studenta: 0314616002

Karlovac, siječanj 2022.



## IZJAVA O AUTENTIČNOSTI ZAVRŠNOG RADA

Ja, **Matej Jurić**, ovime izjavljujem da je moj završni rad pod naslovom **Dokazivanje prisutnosti bakterije *Clostridium tyrobutyricum* i srodnih vrsta u mlijeku** rezultat vlastitog rada i istraživa te se oslanja na izvore i radove navedene u bilješkama i popisu literature. Ni jedan dio ovoga rada nije napisan na nedopušten način, odnosno nije prepisan iz necitiranih radova i ne krši autorska prava.

Sadržaj ovoga rada u potpunosti odgovara sadržaju obranjenoga i nakon obrane uređenoga rada.

Karlovac, 31. siječanj 2022.

Matej Jurić

---

Veleučilište u Karlovcu  
Odjel prehrambene tehnologije  
Stručni studij prehrambena tehnologija

Završni rad

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

**DOKAZIVANJE PRISUTNOSTI BAKTERIJE *CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* I SRODNIH VRSTA U MLIJEKU**

*Matej Jurić*

**Rad je izrađen na Veleučilištu u Karlovcu.**

**Mentor:** dr.sc. Marijana Blažić, prof.v.š.

**Sažetak**

Tijekom proizvodnje mlijeka može doći do kontaminacije s različitim vrstama mikroorganizama, ali problem predstavljaju sporogene bakterije koje ne uništava pasterizacija, već samo sterilizacija. Jedna od grupe sporogenih bakterija su i bakterije iz roda *Clostridium*. *C. tyrobutyricum* i srodne vrste jedna su od najčešćih skupina bakterija odgovornih za kvarenje sira, ali mogu biti i prisutne u mliječnim proizvodima kao što je mlijeko u prahu. Cilj ovoga rada bio je utvrditi prisutnost bakterije *C. tyrobutyricum* i srodnih vrsta u svježem sirovom mlijeku i mlijeku u kamion cisterni kao potencijalnih kontaminanata mlijeka i uzroka kvarenja mliječnih proizvoda. Mali broj uzoraka svježeg sirovog mlijeka (25% obrađenih uzoraka) sadržavao je ispod  $10^2$  CFU/mL prisutnih klostridija, dok je znatno više bilo uzoraka (oko 40%) s više od  $10^3$  CFU/mL prisutnih klostridija. Mlijeko u kamion cisterni sadržavalo je  $1,3 \times 10^3$  CFU/mL prisutnih klostridija.

**Broj stranica:** 27

**Broj slika:** 10

**Broj tablica:** 6

**Broj literaturnih navoda:** 21

**Broj priloga:** -

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** *Clostridium tyrobutyricum*, dokazivanje, mlijeko, sporogene bakterije

**Datum obrane:** 31. siječanj 2022.

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr. sc. *Bojan Matijević*, prof.v.š
2. dr. sc. *Sandra Zavadlav*, prof.v.š.
3. dr. sc. *Marijana Blažić*, prof.v.š.
4. dr. sc. *Jasna Halambek*, v. pred. (zamjena)

**Rad je pohranjen u knjižnici Veleučilišta u Karlovcu, Trg J.J. Strossmayera 9, 4700 Karlovac, Hrvatska.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

**Karlovac University of Applied Sciences**  
**Department of Food Technology**  
**Professional Study of Food Technology**

**Final paper**

**Scientific Area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific Field: Food Technology**

### **DETECTION OF *CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* AND RELATED SPECIES IN MILK**

*Matej Jurić*

**Final paper performed at Karlovac University of Applied Sciences.**

**Supervisor:** Ph.D. *Marijana Blažić*, college prof.

#### **Abstract**

Contamination with different types of microorganisms can occur during milk production, but the problem is sporogenic bacteria that are not destroyed by pasteurization, but only by sterilization. The group of sporogenic bacteria are bacteria from the genus *Clostridium*. *C. tyrobutyricum* and related species are one of the most common groups of bacteria responsible for cheese spoilage, but may also be present in dairy products such as milk powder. The aim of this study was to determine the presence of *C. tyrobutyricum* and related species in raw milk and milk in a tanker truck as potential milk contaminants and causes of spoilage of dairy products. A small number of raw milk samples (25% of processed samples) contained less than  $10^2$  CFU/mL clostridia, while significantly more samples (about 40%) contained more than  $10^3$  CFU/mL clostridia. The milk in the tanker truck contained  $1.3 \times 10^3$  CFU/mL of clostridia.

**Number of pages:** 27

**Number of figures:** 10

**Number of tables:** 6

**Number of references:** 21

**Original in:** Croatian

**Key words:** *Clostridium tyrobutyricum*, detection, milk, sporogenic bacteria,

**Date of the final paper defense:** 31 January 2022

#### **Reviewers:**

1. Ph.D. *Bojan Matijević*, collage prof.
2. Ph.D. *Sandra Zavadlav*, collage prof.
3. Ph.D. *Marijana Blažić*, collage prof.r
4. Ph.D. *Jasna Halambek*, senior lecturer (substitute)

**Final paper deposited in:** Library of Karlovac University of Applied Sciences, J.J.Strossmayer Square No. 9, 47000 Karlovac, Croatia.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	2
<b>2.1. Predstavnici i svojstva bakterija iz roda <i>Clostridium</i></b> .....	2
2.1.1. <i>Clostridium botulinum</i> .....	2
2.1.2. <i>Clostridium perfringens</i> .....	3
2.1.3. <i>Clostridium tyrobutyricum</i> i srodne vrste .....	4
<b>2.2. Kontaminacija stočne hrane i sirovog mlijeka bakterijama iz roda <i>Clostridium</i></b> .....	6
2.2.1. Tlo izvor bakterija iz roda <i>Clostridium</i> .....	7
2.2.2. Stajski gnoj i gnojovke - organsko gnojivo i njihova uloga u bakterijskom onečišćenju tla	7
2.2.3. Kontaminacija biljaka s bakterijama iz roda <i>Clostridium</i> .....	9
2.2.4. Kontaminacija silaže bakterijama iz roda <i>Clostridium</i> .....	10
<b>2.3. <i>Clostridium</i> sp. u mlijeku i mliječnim proizvodima</b> .....	12
2.3.1. Suzbijanje prisutnosti bakterija iz roda <i>Clostridium</i> u preradi mlijeka.....	14
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	17
<b>3.1. Materijali</b> .....	17
<b>3.2. Metoda rada</b> .....	17
3.2.1. Priprema uzoraka za mikrobiološku analizu .....	17
3.2.2. Određivanje spora <i>Clostridium tyrobutyricum</i> .....	17
<b>4. REZULTATI</b> .....	20
<b>4.1. Rezultati broja spora bakterija <i>Clostridium tyrobutyricum</i> i srodnih vrsta na sabirnom mjestu</b> .....	20
<b>5. RASPRAVA</b> .....	23
<b>6. ZAKLJUČCI</b> .....	25
<b>7. LITERATURA</b> .....	26



## 1. UVOD

Na kvalitetu mlijeka i njegova senzorska svojstva utječu različiti mikrobnii kontaminanti. Ovi mikroorganizmi prisutni su na polju i dolaze sa stočnom hranom, u mikrobnii populaciji same farne, na životinjama ili na opremi za mužnju. Kako bi se očuvala kakvoća mlijeka, a time i direktno utjecali na kakvoću mliječnih proizvoda potrebno je broj bakterija u svježem sirovom mlijeku držati ispod određene  $10^5$  stanica u mL.

Brojne bakterijske vrste mogu kontaminirati mlijeko, ali problem predstavljaju sporogene bakterije koje ne uništava pasterezacija, već samo sterilizacija. Jedna od grupe sporogenih bakterija su i bakterije iz roda *Clostridium*. *Clostridium* sp. su gram-pozitivne štapićaste bakterije koje tvore ovalne ili sferične spore. Većina vrsta su obvezni anaerobi, iako su neke vrste kao što je *C. perfringens* fakultativni anaerobi i mogu tolerirati prisutnost kisika. Nekoliko vrsta ovog roda rasti u hrani, uzrokujući kvarenje hrane i/ili trovanje hranom kod ljudi. Većina vrsta iz roda *Clostridium* je nepatogena, ali ovaj rod uključuje i patogene kao što su *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* i *Clostridium perfringens*. Iako rijetke, *C. perfringens* i *C. botulinum* glavne su vrste *Clostridium* sp. koje mogu uzrokovati trovanje mliječnim proizvodima. Međutim, *C. tyrobutyricum* i srodne vrste jedna su od najčešćih skupina bakterija odgovornih za kvarenje sira, ali mogu biti i prisutne u mliječnim proizvodima kao što je mlijeko u prahu.

Cilj ovoga rada bio je utvrditi prisutnost bakterije *C. tyrobutyricum* i srodnih vrsta u svježem sirovom mlijeku i mlijeku u kamion cisterni kao potencijalnih kontaminanata mlijeka i uzroka kvarenja mliječnih proizvoda.

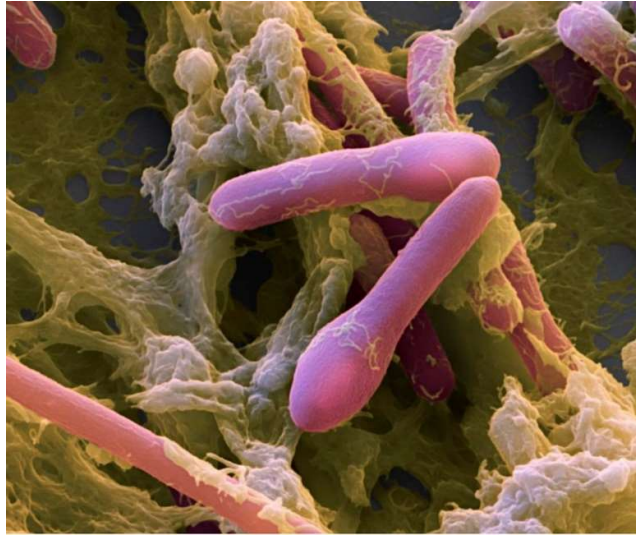
## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Predstavnici i svojstva bakterija iz roda *Clostridium*

Razred *Clostridia* uključuje četiri reda, *Clostridiales*, *Halanaerobiales*, *Natranaerobiales* i *Thermoanaerobacterales*, koje čine 17 obitelji. Bakterije iz razreda *Clostridia* problematične za preradu mlijeka pripadaju rodu *Clostridium* (obitelj *Clostridiaceae*) s 210 dokazanih vrsta. Bakterije koje pripadaju ovom rodu su izduženi gram-pozitivni štapići, s rubovima koji mogu biti zaobljeni ili ravni. Stanice imaju dužinu od 2 do 8  $\mu\text{m}$  i širinu od 0,5 do 2  $\mu\text{m}$ , mogu biti pokretne ili nepokretne, tvoriti ovalne ili sferične spore koje prelaze u vegetativnu stanicu. Većina vrsta su obvezni anaerobi, iako su neke vrste kao što je *C. perfringens* fakultativni anaerobi i mogu tolerirati prisutnost kisika. Neke vrste iz roda *Clostridium* mogu se naći u hrani, uzrokujući kvarenje hrane i/ili trovanje hranom kod ljudi. Većina vrsta je nepatogena, ali ovaj rod uključuje i patogene kao što su *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani*, *Clostridium difficile* i *Clostridium perfringens*. Iako rijetko prisutne, *C. perfringens* i *C. botulinum* mogu uzrokovati trovanje mliječnim proizvodima. S druge strane, *C. tyrobutyricum* i srodne vrste jedna su od najčešćih skupina bakterija odgovornih za kvarenje sira (Lopez-Brea i sur., 2018).

#### 2.1.1. *Clostridium botulinum*

*C. botulinum* proizvodi vrlo moćan neurotoksin koji uzrokuje botulizam, a pogađa ljude i životinje i može dovesti do smrti jer paralizira respiratorne mišiće vežući se na živčane završetke. Neurotoksin je bez mirisa i okusa; stoga hrana koja je neurotoksin ne pokazuje znakove upozorenja za potrošača. Ipak, neurotoksin se uništava zagrijavanjem na 80 °C tijekom 20 minuta ili na 85 °C tijekom 5 minuta. *C. botulinum* može proizvesti osam vrsta neurotoksina (A–H), na temelju njihovih seroloških svojstava, a opisani su i neki sojevi *C. botulinum* koji proizvode dva ili čak tri tipa neurotoksina. Osim toga, neki sojevi *Clostridium baratii* i *Clostridium butyricum* također mogu proizvoditi botulin. Sojevi *C. botulinum* mogu se kategorizirati u četiri fenotipske i genetski različite skupine. *C. botulinum* skupine I i II povezane su s botulizmom u ljudi, sojevi skupine III s botulizmom u životinja, a sojevi skupine IV nisu povezani s bolešću. Sojevi skupine I *C. botulinum* su mezofilne, proteolitičke bakterije, koje proizvode toksine tipova A, B, F i H i prisutni su u tlu. Sojevi skupine II su psihrotrofni i neproteolitički, proizvode toksine tipova B, E ili F i često se nalaze u vodenom okruženju.



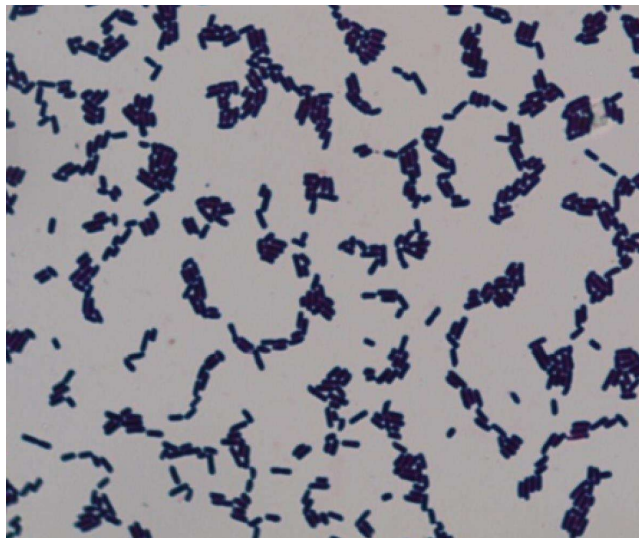
**Slika 1.** Izgled stanica bakterije *Clostridium botulinum* (Woudstra, 2016).

*C. botulinum* može uzrokovati dvije vrste bolesti koje se prenose hranom: klasični botulizam i botulizam dojenčadi. Klasični botulizam je intoksikacija uzrokovana konzumacijom neurotoksina prisutnog u hrani, dok je botulizam dojenčadi toksikoinfekcija koja se razvija gutanjem spora nakon čega slijedi klijanje i proizvodnja toksina u crijevima dojenčadi. Odrasli koji su bili izloženi intenzivnom liječenju antibioticima ili crijevnim lezijama također mogu patiti od ove potonje bolesti botulizma, ali je vrlo rijetka. Botulizam koji se prenosi hranom kod ljudi je rijetka, ali teška bolest. Stopa prijavljivanja epidemija botulizma (uključujući toksine koje proizvode *C. botulinum*, *C. perfringens* i nespecificirani *Clostridium* spp.) iznosila je 0,04 na 100 000 stanovnika u EU u 2014. godini, a epidemije uzrokovane *C. botulinum* 17%. Međutim, procijenjeni trošak po slučaju botulizma povezanog s komercijalnim prehrambenim proizvodima vrlo je visok. Na primjer, mliječni proizvod koji je bio netočno povezan s kontaminacijom *C. botulinum* na Novom Zelandu u 2013. koštao je stotine milijuna dolara. S druge strane, epidemije botulizma u goveda koje su se povećale posljednjih desetljeća i koje su često velike i pogađaju stotine životinja, uzrokuju ogromne ekonomske gubitke mliječnoj industriji zbog uginuća i eutanazije bolesnih životinja, uz smanjenje proizvodnja mlijeka (Lopez-Brea i sur., 2018).

#### 2.1.2. *Clostridium perfringens*

*C. perfringens* se najrasprostranjenijom patogenom bakterijom u prirodi, njezine spore su vrlo rasprostranjene u tlu i probavnom sustavu ljudi i životinja, brzo raste (generacijsko vrijeme manje od 10 min u optimalnim uvjetima), proizvodi preko 15 toksina koji uzrokuju

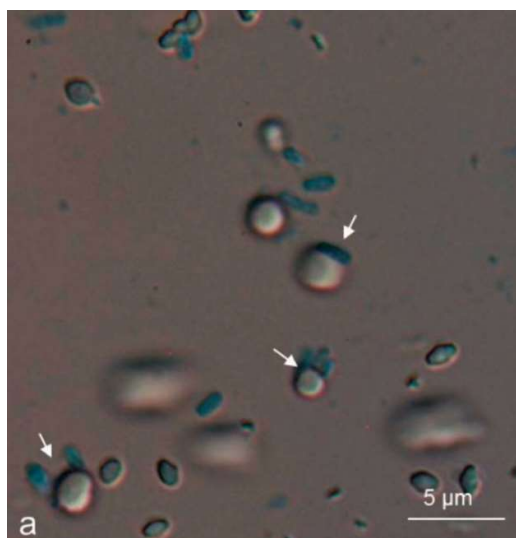
brojne bolesti ljudi i životinja i svrstan je među najčešće bolesti koje se prenose hranom u svijetu. Sojevi *C. perfringens* klasificirani su u pet toksigenih tipova (A-E) na temelju repertoara četiri glavna toksina (alfa, beta, epsilon i jota) koje svaki pojedinačni soj proizvodi. Sojevi tipa A i C povezani su s ljudskim bolestima, a trovanje hranom *C. perfringens* tipa A druga je najčešća bolest povezana s trovanjem hranom i prijavljena u Sjedinjenim Državama, uzrokujući milijun bolesti svake godine. Osim toga, *C. perfringens* također može proizvoditi razne druge toksine, kao što su enterotoksin. Bolest se javlja nakon gutanja velikog broja vegetativnih stanica *C. perfringens* koje proizvode enterotoksin, a preživjele su kisele uvjete želuca i u crijevima sporulirale uz istodobnu proizvodnju enterotoksina. Enterotoksin uzrokuje grčeve u trbuhu i dijareju oko 8-12 sati nakon konzumiranja kontaminirane hrane s vegetativnim stanicama *C. perfringens*. Bolest je uglavnom samo ograničavajuća, traje oko 24 h. Smrtni slučajevi su rijetki (ali mogući) i mogu se dogoditi zbog dehidracije, uglavnom kod starijih, vrlo mladih ili ljudi slabijeg zdravstvenog statusa (Lopez-Brea i sur., 2018).



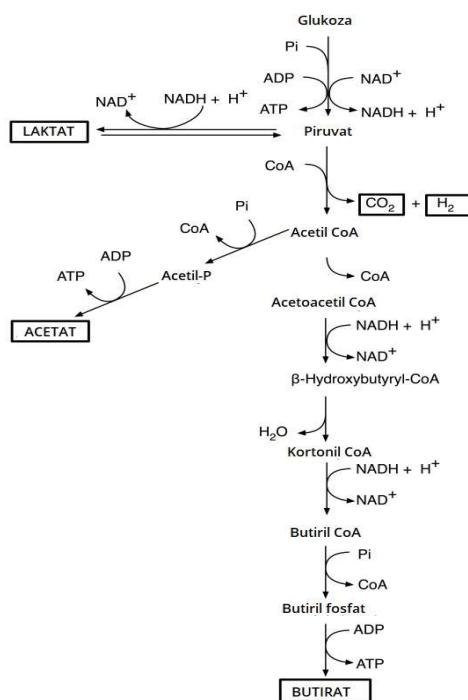
**Slika 2.** Izgled stanica bakterije *Clostridium perfringens* (Hafeez i sur., 2020).

### 2.1.3. *Clostridium tyrobutyricum* i srodne vrste

Bakterije *Clostridium tyrobutyricum*, *C. butyricum* i *C. beijerinckii* pripadaju grupi bakterija maslačnog vrenja i odgovorne su za kasno nadimanje sira. Ove bakterije razgrađuju mliječnu kiselinu u octenu i maslačnu kiselinu, te  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2$  (slika 4). Kasno nadimanje sira je ozbiljna pojava i ovim kvarenjem može biti zahvaćena velika količina sireva, a kada se pojavi nije ju moguće više ispraviti i sirarima stvara štetu.



**Slika 3.** Vrhnje kontaminirano sa sporama bakterije *Clostridium tyrobutyricum* (Incecco i sur., 2015).



**Slika 4.** Metabolički put razgradnje glukoze kod bakterije *C. tyrobutyricum* (Drouin i Lafrenière, 2012).

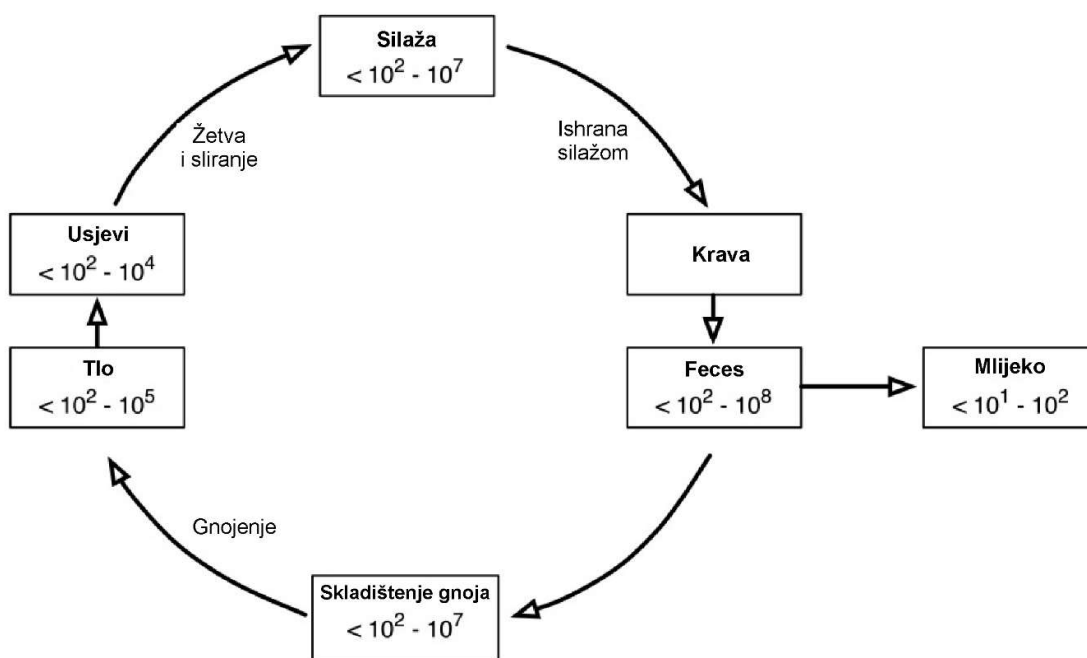
Kasno nadimanje sira najčešći je uzrok kvarenja polutvrdih i tvrdih sireva, a *C. tyrobutyricum* se smatra primarnim uzrokom. *C. tyrobutyricum* izaziva snažne kvaritelje sira,

a značajno utječući na pH-vrijednost i boju sira i dovodi do intenzivnog nadimanja, pucanja sira i nakupljanja hlapljivih spojeva koji su posljedica užeglosti (Lopez-Brea i sur., 2018).

## 2.2. Kontaminacija stočne hrane i sirovog mlijeka bakterijama iz roda *Clostridium*

Ovisno o klimatskim uvjetima, godišnjem dobu i specifičnim zahtjevima ishrane, prehrana preživača može uključivati svježiu hranu tijekom ljetnih mjeseci ili tijekom cijele godine u povoljnim klimatskim uvjetima, ili se hraniti sijenom, silažom i/ili žitaricama (uključujući kukuruz) tijekom zime. Bakterije iz roda *Clostridium* mogu kontaminirati sve ove vrste hrane, ali na različitoj razini i tako biti dio ciklusa kontaminacije bilo u proizvodnji sira ili predstavljaju potencijalni zdravstveni problem (*C. botulinum*) (Antonov i sur., 2004).

Čuvanje silaže na mliječnim farmama kao stočne od posebne je važnosti. Prisutnost spora bakterija iz roda *Clostridium* mogu kontaminirati mlijeko. Tijekom košnje i žetve dolazi do onečišćenja usjeva česticama tla i/ili stajskim gnojem. Tijekom fermentacije silaže, spore bakterija iz roda *Clostridium* mogu klijati u povoljnim uvjetima. Životinja jedu kontaminiranu silažu, a spore će se osloboditi izmetom. Također, spore završavaju u stajskom gnoju koji će se koristiti za usjeve. Također može doći i do kontaminacije vimena i na taj način direktno ulaze u mlijeko tijekom mužnje (slika 5).



**Slika 5.** Ciklus kontaminacije mlijeka na farmi s bakterijama iz roda *Clostridium* (Drouin i Lafrenière, 2012).

### 2.2.1. Tlo izvor bakterija iz roda *Clostridium*

Broj bakterija iz roda *Clostridium* prisutan u tlu kreće se ono  $10^4$  CFU/g i one prelaze na biljke i mogu kontaminirati silažu. Međutim, prisutnost ovih bakterija na površini biljaka raste nakon strojne košnje, bez obzira radi li se o kosilici, kombajnu ili balirki. Prilikom košnje dolazi do raspršivanja tla po površini biljaka. Vrsta korištene kosilice izravno utječe na kontaminaciju biljaka. Disk kosilice će pokupiti zemlju koja je suha i neravna. Brzine pri kojima se diskovi rotiraju omogućuju podizanje čestica tla. Kako bi se to izbjeglo noževi trebaju biti najmanje 7-8 cm iznad razine tla. Istraživanja pokazuju da se broj spora smanji za jedan red veličine (1 log CFU/g) kada je visina noževa postavljena na 10 cm u odnosu na 7 cm. To je osobito bitno kod tla koje je gnojeno stajskim gnojem, što bi moglo biti i do 3 reda veličine više (3 log CFU/g). Prevrtnje pokošene trave također uzrokuje kontaminaciju bakterijama *Clostridium* sp.

Metode čuvanja pokošene trave i usjeva imaju izravan utjecaj na kasniji broj klostridija. U sijenu se spore klostridija neće razviti. Međutim, kod silaža koja se sastoji od trava ili mahunarki može doći do značajnog porasta populacije klostridija. Mliječno kisela fermentacija silaže cijelog kukuruza općenito je dovoljno brza da osigura dobro očuvanje. U uvjetima aerobne nestabilnosti uočen je razvoj bakterija iz *Clostridium* sp. (Drouin i Lafrenière, 2012).

### 2.2.2. Stajski gnoj i gnojovke - organsko gnojivo i njihova uloga u bakterijskom onečišćenju tla

Stajski gnoj (kruti ili tekući) važan je izvor hranjivih tvari za biljke, a može se koristiti kao gnojivo, posebno uz trenutne visoke cijene mineralnih gnojiva. Njegova upotreba može utjecati na svojstva i prisutnost različitih mikrobnih vrsta u tlu. Stajsko gnojivo može kontaminirati biljke enterobakterijama i klostridijama te predstavlja potencijalni rizik za proizvodnju silaže, ali i zdravlje stoke.

Gnoj sadrži različite mikroorganizme, kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes*, protozoe *Cryptosporidium parvum* i viruse. Mikrobna kvaliteta i kvantiteta stajskog gnoja ovise o sezoni, temperaturi, vrsti stajskog gnoja (kruti ili tekući) i gospodarenju gnojivom (aeracijska laguna, kompost itd.). Broj stanica mikroorganizma može doseći  $10^{10}$  stanica u gramu gnoja. Ovisno o okolišnim uvjetima, veličina populacije patogenih vrsta se smanjiti brže u odnosu na ostale prisutne vrste mikroorganizama. Ipak, neki patogeni mikroorganizmi mogu živjeti i duže vrijeme u stajskom

gnoju. Neka istraživanja su pokazala da *E. coli* O157:H7 može preživjeti 21 mjesec u krutom gnoju, ali s kompostiranjem, preživljavanje je četiri mjeseca. Isto tako, *Cryptosporidium* i *Giardia* eliminirani iz stajskog gnoja kompostiranjem ako se temperatura održavala na 55 °C tijekom 15 dana. To je postignuto tijekom četvrtog tjedna kompostiranja s prozračivanjem dva puta tjedno. U tekućem gnoju, primjenom aerobnih ili anaerobnih procesa razgradnje znatno se smanjuje prisutnost patogenih mikroorganizama (Drouin i Lafrenière, 2012).

Stajski gnoj sadrži nekoliko različitih vrsta iz *Clostridium* sp. Prisutne vrste imaju (tablica 1) visoku proteolitičku aktivnost jer prisutni uvjeti sadrže veliku količinu prisutnih proteina i aminokiselina. Klostridije razgrađuju i prisutne polisaharide poput celuloze i lignina.

Provođenjem aeracije tekućeg gnoja na farmama prije širenja po polju može se pozitivno utjecati na sastav mikroorganizama. Aeracija smanjuje broj prisutnih bakterija kao što su *Bacillus* sp., *Campylobacter*, coliphages, *L. monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*. Ovu pojavu uzrokuje prisutnost radikala kisika, dominacija aerobnih mikroorganizama, povećanje pH-vrijednosti i nastajanje nitrita u tekućem gnoju. Gnojidba s aeriranim tekućim gnojem pozitivno utječe kvalitetu biljaka za silažu u odnosu na one biljke koje su gnojene neaeriranim tekućim gnojem. Međutim, aeracija ne utječe na smanjivanje broja prisutnih spora klostridija. Njihovu prisutnost moguće je smanjiti mliječno – kiselim vrenjem u proizvodnji silaže (Drouin i Lafrenière, 2012).

**Tablica 1.** Vrste bakterija iz roda *Clostridium* koje se nalaze u stajskom gnoju tekućem ili krutom (Drouin i Lafrenière, 2012).

Metabolička aktivnost	Vrsta bakterija
Razgradnja proteina	<i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium disporicum</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Clostridium propionicum</i>
Razgradnja polisaharida	<i>Clostridium cellulolyticum</i> <i>Clostridium thermocellum</i> <i>Clostridium cellulovorans</i> <i>Clostridium phytogermanan</i>



Raznolikost mikrobne populacije ovisi o vremenu koje je proteklo od upotrebe stajskog gnoja, a time i smanjenje neželjenih mikroorganizama. Svjetlost (UV zrake), prisutnost vode (aktivitet vode), kompeticija s mikroorganizmima u okolišu glavni su čimbenici koji utječu na smanjenje populacije enterobakterija nakon upotrebe stajskog gnoja. Istraživanja pokazuju da se populacija enterobakterija i klostridija smanjila nakon sedam tjedana od primjene gnojiva. Osim toga, nije bilo moguće detektirati prisutnost koliformnih bakterija koje čine normalnu mikrofloru gnoja (Drouin i Lafrenière, 2012).

Ostatci gnoja prisutni na tlu ili biljnim izdancima završavaju s biljkama u silosima. U silosu ti ostatci stvaraju „džepove“, mjesta gdje fermentacija nije učinkovita i dovode do povećanja pH-vrijednosti. Mikrobna populacija u tim „džepovima“ razlikuje se od ostatka mikrobne populacije usjeva prisutnih u silosima. Enterobakterije i klostridije čine mikrofloru tih „džepova“.

Osim stajskog gnoja, gnojenje polja može se provesti i razgrađenim aktivnim muljem iz obrade otpadnih voda. U anaerobnim procesima razgradnje aktivnog mulja sudjeluju i klostridije, te se njegovom primjenom polje može kontaminirati klostridijama, a time i silaža i mlijeko.

Primjenom organskih gnojiva i ne moramo unositi nepoželjne mikroorganizme u tlo, ali organska tvar iz gnojiva može utjecati na autohtonu mikrofloru tla.

Potrebno je voditi računa o ujednačenoj primjeni organskih gnojiva kako bi se izbjegao unos čestica stajskog gnoja s biljkama i kasnije kontaminirala silaža. Trebalo bi odrediti i interval između primjene i žetve kako bi se unos čestica stajskog gnoja u silos sveo na najmanju moguću mjeru tijekom žetve (Drouin i Lafrenière, 2012).

### 2.2.3. Kontaminacija biljaka s bakterijama iz roda *Clostridium*

Biljke tijekom rasta dolaze u različitim trenucima u kontakt s klostridijama. Nakon klijanja sjemena, krhke epidermalne stanice korijena i izbojaka su u izravnom kontaktu s tlom i mogu se lako kontaminirati s klostridijama, koje se vežu i ugrađuju u slojeve biljnih stanica kako biljka raste. Spore klostridija mogu prodrijeti i u korijen biljke nakon lomljenja vanjskog sloja ili ispašom preživača. Dijelovi biljke koji se nalaze iznad tla također mogu sadržavati spore klostridija koje dolaze s česticama prašine ili kapljicama kiše.

Prirodna kontaminacija biljaka klostridijama je vrlo mala i kada se utvrđuje standardnom metodom brojenja nalazi se ispod 2 log CFU/g biljnog tkiva. Prisutnost klostridija

je nešto veća u oštećenom, trulom ili mrtvom tkivu i kreće se oko 1 do 2 log CFU/g biljnog tkiva (Drouin i Lafrenière, 2012).

Istraživanje prisutnosti klostridija na stabljici kukuruza, listovima, svili i zelenom zrnju pokazuje znatne razlike, a rezultati su prikazani u tablici 2. Klostridije su uglavnom mikrobna populacija biljnog tkiva koje se raspada, a ne zdravog biljnog tkiva ili biljnih izlučevina.

**Tablica 2.** Prisutnost bakterija iz roda *Clostridium* na različitim dijelovima kukuruza (Drouin i Lafrenière, 2012).

Dijelovi kukuruza	Prisutnost klostridija (log CFU/g biljne mase)
Stabljika	2
Listovi	2 - 3
Svila	2,3 - 3,6
Zrno	3,4 - 3,6

#### 2.2.4. Kontaminacija silaže bakterijama iz roda *Clostridium*

Siliranje je način na koji se konzervira stočna hrana i u posljednjih pola stoljeća postala je popularna diljem svijeta. Ova se tehnika koristi za čuvanje krmnog bilja ili drugih fermentiranih usjeva za ishranu preživača. U stočarstvu silaža kao hrana čini od 40 do 100% stočne ishrane. Cilj izrade silaže je očuvanje hranidbene vrijednosti krmiva uz istodobno ograničavanje gubitka suhe tvari. Postupak proizvodnje silaže dobro je opisan u literaturi i ovdje se neće detaljno opisivati. Mikrobiološki gledano, razvoj klostridija u proizvodnji silaže treba izbjegavati jer one utječu na palatabilnost, manju energetska vrijednost hrane za životinje i mogu uzrokovati metaboličke poremećaje (Drouin i Lafrenière, 2012).

Siliranje je biotehnološki proces u kojemu se sprječava razvoj klostridija niskom pH – vrijednosti i podešavanjem suhe tvari. Snižavanje pH - vrijednosti uzrokovano je djelovanjem bakterija mliječno - kiselinskog vrenja koje fermentiraju šećere iz biljke i proizvode mliječnu kiselinu. Proizvedena mliječna kiselina snižava pH – vrijednost i sprječava rast klostridija.

Međutim, promjena pH – vrijednosti usko je povezana s udjelom pojedinih ugljikohidrata i puferskim kapacitetom smjese i suhe tvari.

Odnos između tih veličina može se prikazati sljedećim matematičkim modelom (Drouin i Lafrenière, 2012):

$$ST = 450 - 80 \times \frac{\text{udio ugljikohidrata topljivih u vodi}}{\text{puferski kapacitet}}$$

ST – suha tvar

Prema navedenom matematičkom modelu ugljikohidrati i puferski kapacitet određuju udjel suhe tvari kako bi se stvorila potrebna količina mliječne kiseline i konzervirala stočna hrana. Ugljikohidrati i puferski kapaciteti mogu varirati, ali i dalje su relativno povezani s biljnim vrstama koje se podvrgavaju siliranju. Simulacijski model je pokazao da se klostridije razvijaju u silaži s manjim omjerom ugljikohidrata i puferskog kapaciteta, manjem udjelu suhe tvari, te nižoj početnoj populaciji bakterija mliječne kiseline. Osim toga, visoka temperatura u proizvodnji silaže i visoka početna pH – vrijednost pogoduju razvoju klostridija.

Uvjeti u silosu mogu pogodovati rastu i razvoju klostridija, spore mogu klijati i prijeći u vegetativni oblik. Istraživanja pokazuju, ukoliko je početni broj klostridija u silaži bio između 3 i 5 log CFU/g u silosu taj broj može narasti i do 9 log CFU/g. Međutim, taj broj može znatno varirati. Na porast spora klostridija utječe i nivo silaže u silosu, prema jednom istraživanju, najviše spora je uočeno u prvih 50 cm dubine. Uz nisku količinu mliječne kiseline, na porast klostridija utječe i niska koncentracija nitrita u silaži (Drouin i Lafrenière, 2012).

Klostridije prisutne u silaži razgrađuju mliječnu kiselinu i stvaraju maslačnu kiselinu. Budući da je mliječna kiselina (pKa= 3.86) snažnija kiselina od maslačne kiseline (pKa = 4,82), njihova aktivnost dovodi do porasta pH – vrijednosti silaže. Porastom pH – vrijednosti i drugi mikroorganizmi dobivaju optimalne uvjete za svoj rast, a rastu i klostridije koje imaju proteolitičku aktivnost. Ove vrste razgrađuju proteine do aminokiselina i amonijaka i time smanjuju silaži prehrambenu vrijednost.

Prisutnost nitrita u travnatoj hrani može inhibirati klostridije. Visoka koncentracija nitrita u bilju za siliranje može se postići primjenom gnojiva bogatih s dušikom. Vrijednost nitrita može dostići od 1 do 8 g/kg suhe tvari (čak i do 30 g kg suhe tvari). Inhibitorni efekt nitrita na klostridije je prisutan i onda ako visoka količina dušika pridonosi smanjenom udjelu fermentabilnih ugljikohidrata i povećanom udjelu proteina, koji za posljedicu imaju i veći puferski kapacitet. Međutim, već nakon nekoliko sati nakon siliranja, bakterije i biljke počinju smanjivati nitrate koji dovode do nakupljanja nitrita i dušikova oksida tijekom prvog tjedna. To je razdoblje ključno za kvalitetu silaže jer odgovara vremenu u kojem su uvjeti klijanja optimalni za spore klostridije, pH - vrijednost nije dosegla razinu anaerobne stabilnosti.

Klostridije imaju sposobnost reduciranja nitrata do amonijaka. Istraživanje je pokazalo da trava inokulirana s bakterijom *C. tyrobutyricum* nije došlo do inhibicije s nitratom, već je količina u potpunosti smanjena. Naime, klostridije stvoreni amonijak iz nitrata koriste kao elektron akceptor i provode manje maslačne i octene kiseline. Nitrat i niska pH – vrijednost imaju sinergijski učinak, jer je oksidacija piruvata u octenu kiselinu u klostridija inhibirana s NO, razgradnim produktom nitrata (Drouin i Lafrenière, 2012).

Prisutnost enterobakterija u silaži pogoduje razvoju klostridija. Enterobakterije imaju sposobnost redukcije nitrata i ovise o prisutnosti fermentabilnih ugljikohidrata. Neke vrste enterobakterija imaju sposobnost deaminacije i dekarboksilacije aminokiselina čime stvaraju amonijak. U silaži enterobakterije se natječu s bakterijama mliječne kiseline za hranu, reduciraju nitrata na amonijak i svojom aktivnošću povećavaju puferski kapacitet silaže i odgađaju nagli pad pH – vrijednosti. Takvi uvjeti pogoduju rastu klostridija (Drouin i Lafrenière, 2012).

### **2.3. *Clostridium* sp. u mlijeku i mliječnim proizvodima**

*Clostridium* sp. su anaerobne bakterije koje u vegetativnom obliku imaju oblik gram-pozitivnih štapića i stvaraju endospore. U mljekarstvu ove bakterije najviše problema uzrokuju u proizvodnji polutvrdih i tvrdih sireva. Mikrobiološki nedostatak i prisutnost klostridija može se pojaviti 1 do 2 mjeseca nakon što je sir proizveden i stavljen na zrenje. Klostridije u siru razgrađuju mliječnu kiselinu u maslačnu kiselinu i pri tome stvaraju CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Stvoreni plinovi uzrokuju nadimanje sira. Kasno nadimanje sira (slika 6) utječe na kvalitetu proizvoda, deformacija, nepravilno formiranje sirnih očii, puknuće, stvaranje neugodnog okusa i mirisa, a u konačnicu u štetu za samu mljekaru. Iako je *Clostridium tyrobutyricum* najčešći uzročnik kasnog nadimanja sira, i spore drugih vrsta iz roda *Clostridium* mogu uzrokovati nadimanje kao što su *C. sporogenes*, *C. beijerinckii*, *C. butyricum*, *C. bifermentans*, *C. perfringens* i *C. tertium*. Međutim, one nisu glavni uzročnik već djeluju u sinergiji s *C. tyrobutyricum* (Šobar i sur., 1996, Bermúdez i sur., 2016).

Klostridije mogu biti prisutne u raznim dijelovima proizvodnje mlijeka, a *Clostridium tyrobutyricum* se učestalo nalazi u sirovom mlijeku i rasprostranjen u na farmama. Najčešći izvori kontaminacije na farmi su tlo, silaža i druga hrana za životinje te izmet, koji se kontaminacijom prljavštinom prenosi u sirovo mlijeko kontaminacijom vimena. Zapravo, loša kvaliteta silaže može biti glavni vanjski izvor kontaminacije sirovog mlijeka sporama klostridija. Kada se mliječne krave hrane silažom i drugom hranom, spore se koncentriraju u

probavnom traktu i mogu unakrsno kontaminirati mlijeko tijekom procesa mužnje, posebno kada vime nije adekvatno oprano i dezinficirano. U posljednjih petnaestak godina silaža, sijeno i koncentrat se najviše koriste u ishrani stoke u odnosu na ispašu kako bi proizvodnja mlijeka bila što veća. Kao posljedica intenziviranja proizvodnje mlijeka, javlja se problem s prisutnošću klostridija (Bermúdez i sur., 2016). Ukoliko se koristi kombinirana ishrana stoke, onda će broj klostridija u mlijeku porasti u zimskom periodu jer se uglavnom koristi silaža. U proljetnom periodu krave izlaze na ispašu i broj klostridija opada ispod 1 CFU/ mL (Chambers, 2002). Kontaminacija sirovog mlijeka s klostridijama moguće je spriječiti na farmama, poboljšanjem higijene krava, higijene okoliša i dobre higijenske prakse mužnje (Havranek i Rupić, 2003; Bermúdez i sur., 2016).

**Tablica 3.** Kriteriji za dopuštenu količinu sulfireducirajućih klostridija u mlijeku i mliječnim proizvodima (Benussi i sur., 2011).

Vrsta proizvoda	Kriterij
Sterilizirano mlijeko, sterilizirani mliječni napitci (nakon termostiranja 15 dana na 30°C ili 7 dana na 55 °C)	$M \leq 1 \text{ CFU/mL}$
Mlijeko u prahu i drugi praškasti proizvodi od mlijeka	$m = 10 \text{ CFU/g}; M = 10^2 \text{ CFU/g}$
Sirovo mlijeko, namijenjeno konzumaciji bez prethodne toplinske obrade	$m=10 \text{ CFU/mL}; M=10^2 \text{ CFU/mL}$
Sterilizirano slatko vrhnje i sterilizirane zamjene za slatko vrhnje (nakon termostiranja 15 dana na 30°C ili 7 dana na 55 °C)	$M \leq 1 \text{ CFU/g}$
Polutvrđi sirevi	$m = 10 \text{ CFU/g}; M=10^2 \text{ CFU/g}$
Tvrđi sirevi	$m =1 \text{ CFU/g}; M = 10 \text{ CFU/g}$
Topljeni sirevi	$m = 1 \text{ CFU/g}; M=10 \text{ CFU/g}$
Mliječni i sirni namazi (toplinski obrađeni)	$m = 1 \text{ CFU/g}; M = 10 \text{ CFU/g}$

m= granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim

M= granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati ne smatraju zadovoljavajućim.



**Slika 6.** Izgled sira kontaminiranoga s klostridijama (Izvor: Jurić, 2021).

Istraživanja pokazuju da klostridije ne stvaraju probleme u sirovom mlijeku (Chambers, 2002), ali pošto su termorezistentne i ne uništava ih pasterizacija, već sterilizacija mogu se pronaći u brojnim mliječnim proizvodima koji su dobiveni iz kontaminiranog mlijeka. Iz tog razloga mikrobiološka kontrola mliječnih proizvoda predviđa i utvrđivanje prisutnosti klostridija. Kriteriji za dopuštenu količinu klostridija u mlijeku i mliječnim proizvodima prikazani su u tablici 3, a temelje se na Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2009).

#### 2.3.1. Suzbijanje prisutnosti bakterija iz roda *Clostridium* u preradi mlijeka

Kontaminacija sirovog mlijeka s klostridijama moguće je spriječiti na farmama, ali i mljekara mora imati aktivan način kako ih ukloniti ili inhibirati njihovu aktivnost. Uklanjanje klostridija moguće je postići mikrofiltracijom i baktofugacijom, a dodatkom nitrata i lizozima suzbija se aktivnost i na taj način sprječava nastanak štete zbog mikrobiološki neispravnih proizvoda ili kasno nadimanje sireva.

##### *Baktofugacija*

Baktofuge su uređaji koji djeluju na principu djelovanja centrifugalne sile i iz mlijeka izdvajaju mikroorganizme. Danas se intenzivno koriste u preradi mlijeka kako bi se poboljšala mikrobiološka kakvoća sirovog mlijeka, a neposredno i mliječnih proizvoda kao što su sir, mlijeko u prahu i sirutka za dječju hranu.



**Slika 7.** Baktofuga za mlijeko Alfa Laval BB520 (Alfa Laval, 2021).

Učinak redukcije bakterija u mlijeku izražava se u %. Bakterije koje pripadaju rodu *Clostridium* koje su opasne kod proizvodnje sira uklanjaju se iz mlijeka s učinkom od 98% (Bylund, 2003).

#### *Mikrofiltracija*

Najvažniji aspekt za mljekarsku industriju je uklanjanje bakterija i spora iz sirovog mlijeka ili sirutke mikrofiltracijom na niskim temperaturama (najčešće 50°C) čime se izbjegava visoka toplinska obradba i promjene koje ona izaziva (Drgalić i Tratnik, 2004).

Osim toga, ovim se načinom uklanjaju gotovo sve žive i mrtve stanice mikroorganizama pa ne postoji mogućnost dvojbe oko aktivnosti enzima ili drugih intracelularnih komponenata iz mrtvih bakterijskih stanica. Mikrofiltracijom mlijeka postiže se novi način određivanja i karakterizacije kinetike rasta, acidifikacije, oblikovanja gruša i zrenja sireva za svaku dodanu kulturu (Drgalić i Tratnik, 2004).

Upotrebom dvostruke mikrofiltracije moguće je inaktivirati ili ukloniti iz mlijeka više od 99,5% ukupnih mikroorganizama. Pri tom se također može postići uklanjanje sporogenih bakterija i to *Bacillus cereus* (do 99,98%) i *Clostridium tyrobutyricum* (do 99,90%). Stoga mikrofiltracija mlijeka u proizvodnji sireva ima brojne prednosti: nepotrebna termalizacija svježeg mekog sira, nepotreban dodatak nitrata, lakša kontrola i kraće trajanje zrenja te produljena trajnost sira (Tratnik i Božanić, 2012).

### *Natrijev ili kalijev nitrat*

Neke zemlje, poput Nizozemske, ne dozvoljavaju dodatak inhibirajućih soli u proizvodnji polutvrdih sireva. Naime, nitrati se dodaju kao  $\text{NaNO}_3$  ili  $\text{KNO}_3$ , a djeluju kao neka vrsta konzervansa koja sprječava rast i razmnožavanje koliformnih bakterija ili klostridija.

Inhibicijski učinak na bakterije nemaju nitrati, već nitriti, koji nastaju redukcijom iz nitrata djelovanjem prirodnog enzima mlijeka, ksantin oksidaze. Nitriti su izrazito toksični za bakteriju *Clostridium tyrobutyricum*, koja se može razmnožavati u sirnom grušu i kada je prisutna veća količina soli, tj. nakon salamurenja.

Dodatak nitrita sprječava mane sira kao što je rano ili kasno nadimanje sira. Rano nadimanje sira nastaje najčešće uslijed aktivnosti koliformnih bakterija, dok se kasno nadimanje javlja kao posljedica anaerobnih sporogenih bakterija. Od svih kemikalija nitrati su našli svoju najveću upotrebu u sirarstvu, ali nisu dozvoljeni u svim zemljama.

Oni se obično dodaju u količini od 25 do 80 g na 100 L mlijeka, ali, kako veće količine upotrijebljenih nitrata mogu negativno utjecati na aromu sira, kao što je pojava gorkog ukusa, to se predlaže upotreba nitrata u količini do 30 g na 100 L mlijeka (Matijević, 2015).

### *Lizozim*

Lizozim je prirodni enzim koji se nalazi u kokošnjem jajetu u količini od 0,5 %. U malim količinama nalazimo ga i u kravljem mlijeku, suzama i slini.

Mlijeko žena sadrži veće količine lizozima od kravljeg mlijeka. Na tržištu ovaj enzim dolazi u obliku bijelih lako topljivih granulata koje se u mlijeko nakon otapanja u vodi dodaje 15-ak minuta prije dodatka mikrobnih kultura u cilju sprječavanja rasta klostridija, uzročnika kasnog nadimanja sira. Kasno nadimanje sira često je povezano s oblikovanjem nenormalnih sirnih oči, neugodnog okusa i mirisa tvrdih sireva koji prolaze duže razdoblje zrenja (više tjedana i mjeseci).

Lizozim pokazuje snažna antiklostridijalna svojstva, bez utjecaja na tehnološki postupak proizvodnje tvrdih sireva ili na aktivnost bakterijske flore mlijeka, što uvjetuje nepromjenjivost senzorskih svojstava sira. Lizozim se u mlijeko za sirenje dodaje u količini od 1 – 3 g na svakih 100 L mlijeka za sirenje, ovisno o riziku od kasnog nadimanja sira (Matijević, 2015; Lovrić, 2019).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

Za ispitivanje su prikupljeni pojedinačni uzorci mlijeka na sabirnim mjestima s područja Podravine. Uzorci mlijeka su uzrokovani tijekom svibnja 2021. godine i ispitani su na spore *Clostridium tyrobutyricum*. Za ispitivanje uzoraka korišteno je svježe sirovo mlijeko.

Za inokulaciju mlijeka korišten je dehidrirani Bryant i Burkey bujon s rezazurinom (osnova) BK141, proizvođača BIOKAR Diagnostics Francuska.

Za inokulaciju je korišteno 38.0 g dehidriranog bujona uz dodatak natrij laktata 10 g na 1000 mL destilirane vode.

#### 3.2. Metoda rada

Broj prisutnih spora klostridija određen je metodom prema HRN EN ISO 7218:2008.

##### 3.2.1. Priprema uzoraka za mikrobiološku analizu

Priprema uzoraka za mikrobiološku analizu vršena je po standardu HRN EN ISO 8261:2003.

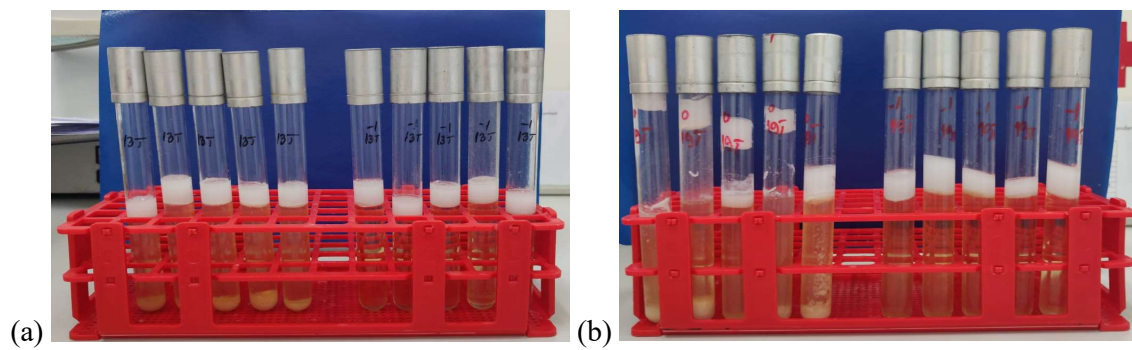
Za određivanje spora korišten je dehidrirani Bryant i Burkey bujon, modificiran prema Bergere s rezazurinom. Za svaki uzorak pripremljeno je 10 epruveta: 5 epruveta za razrjeđenje  $10^0$  i 5 epruveta za razrjeđenje  $10^{-1}$ . Anaerobni uvjeti postignuti su dodatkom uzorka mlijeka u podlogu i zalijevanjem parafinom. Inkubacija je provedena pri  $37\text{ }^{\circ}\text{C}/7$  dana.

##### 3.2.2. Određivanje spora *Clostridium tyrobutyricum*

Brojanje se vrši koristeći tablicu s najvišim vjerojatnim brojem (MPN) prema DeMan-u. Kod razrjeđenja  $10^0$  pozitivna epruveta zbraja se kao 10 spora na 1 mL mlijeka, a kod razrjeđenja  $10^{-1}$  pozitivna epruveta zbraja se kao 1 spora na 1 mL mlijeka. Zbroj pozitivnih epruveta odgovara određenom MPN-u prikazanom u tablici 4.

**Tablica 4.** Tablica najvišeg vjerojatnog broja (MPN) prema DeMan-u.

<b>Zbroj pozitivnih epruveta</b>	<b>MPN</b>	<b>Zbroj pozitivnih epruveta</b>	<b>MPN</b>
00	< 0,18	30	0,79
01	0,18	31	1,1
02	0,37	32	1,4
03	0,56	33	1,8
04	0,75	34	2,1
05	0,95	35	2,5
10	0,20	40	1,3
11	0,41	41	1,7
12	0,61	42	2,2
13	0,83	43	2,8
14	1,1	44	3,5
15	1,3	45	4,3
20	0,45	50	2,4
21	0,69	51	3,5
22	0,93	52	5,4
23	1,2	53	9,2
24	1,5	54	16,0
25	1,8	55	>16,0



**Slika 8.** Prikaz negativnog (a) i pozitivnog (b) uzorka na *Clostridium tyrobutyricum* (Izvor: Jurić, 2021)

## 4. REZULTATI

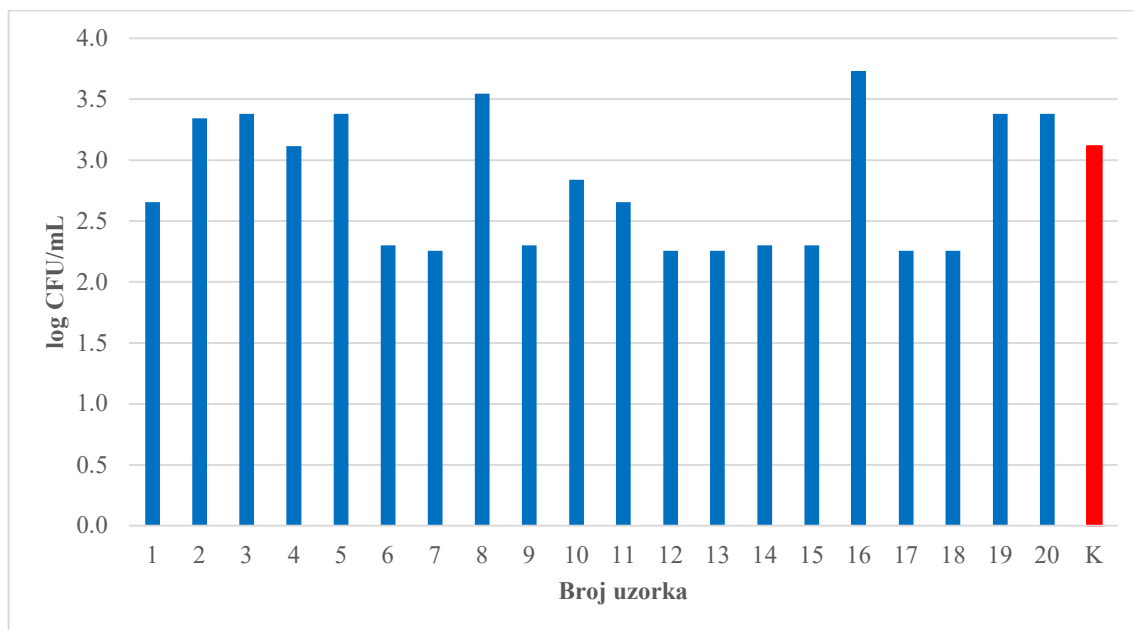
### 4.1. Rezultati broja spora bakterija *Clostridium tyrobutyricum* i srodnih vrsta na sabirnom mjestu

**Tablica 5.** Prikaz rezultata pozitivnih i negativnih epruveta za procjenu najvišeg vjerojatnog broja spora bakterija *Clostridium tyrobutyricum* i srodnih vrsta u svježem sirovom mlijeku na sabiralištu i mlijeku u kamion cisterni (K).

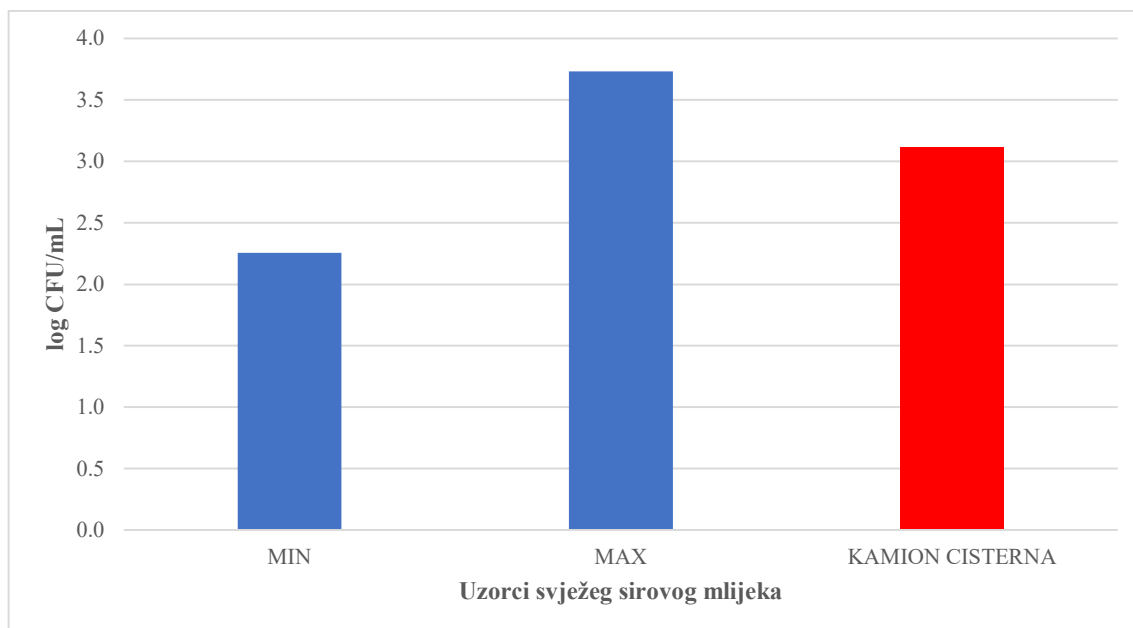
Uzorak	Pozitivne epruvete (Sirovo mlijeko)					Pozitivne epruvete (Razrjeđenje 1:10)				
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
19	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
20	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
K	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

**Tablica 6.** Procjena najvišeg vjerojatnog broja spora bakterija *Clostridium tyrobutyricum* prema De Man-u u svježem sirovom mlijeku na sabiralištu (1-20) i mlijeku u kamion cisterni (K)

Uzorak	Rezultat	MPN	Procjena broja spora (CFU/mL)
1	20	0,45	$4,5 \times 10^2$
2	42	2,2	$2,2 \times 10^3$
3	50	2,4	$2,4 \times 10^3$
4	40	1,3	$1,3 \times 10^3$
5	50	2,4	$2,4 \times 10^3$
6	10	0,20	$2 \times 10^2$
7	0	<0,18	$1,8 \times 10^2$
8	51	3,5	$3,5 \times 10^3$
9	10	0,20	$2 \times 10^2$
10	21	0,69	$6,9 \times 10^2$
11	20	0,45	$4,5 \times 10^2$
12	1	0,18	$1,8 \times 10^2$
13	0	<0,18	$1,8 \times 10^2$
14	10	0,20	$2 \times 10^2$
15	10	0,20	$2 \times 10^2$
16	52	5,4	$5,4 \times 10^3$
17	0	<0,18	$1,8 \times 10^2$
18	1	0,18	$1,8 \times 10^2$
19	50	2,4	$2,4 \times 10^3$
20	50	2,4	$2,4 \times 10^3$
K	40	1,3	$1,3 \times 10^3$



**Slika 9.** Grafički prikaz procijenjene najvišeg vjerojatnog broja spora bakterija *Clostridium tyrobutyricum* u uzorcima svježeg sirovog mlijeka na sabiralištu i mlijeku u kamion cisterni (K).



**Slika 10.** Grafički prikaz minimalne i maksimalne vrijednosti prisutnih bakterija *Clostridium tyrobutyricum* u uzorcima svježeg sirovog mlijeka na sabiralištu i mlijeku u kamion cisterni.

## 5. RASPRAVA

Bakterije iz roda *Clostridium* su anaerobni gram-pozitivni mikroorganizmi koji tvore endospore. Patogene vrste kao što su *Clostridium botulinum*, *Clostridium difficile*, *Clostridium tetani* i *Clostridium perfringens* proizvode do 18% svih poznatih bakterijskih toksina, što čini bakterije iz roda *Clostridium* jedne od najotrovnijih bakterija koje značajno mogu ugroziti zdravlje ljudi i životinja. Međutim, patogene bakterije *C. botulinum* i *C. perfringens* povezani s hranom od zanemarive su važnosti za mliječnu industriju. Pojava botulizma u sirevima Brie i Mascarpone povezana je s povišenom pH - vrijednosti u proizvodu i neadekvatnom temperaturom čuvanja. *C. botulinum* bio je prisutan i u jogurta s dodatkom lješnjaka, ali izvor kontaminacije bio je pire od lješnjaka, a ne svježe sirovo mlijeko (Reindl i sur., 2014).

Ipak, spore klostridija predstavljaju izazov za mliječnu industriju kao glavni organizmi kvarenja tvrdih i polutvrdih sireva. Ozbiljna mana pretežno kod ementalskog sira je stvaranje bijelih trulih mrlja u unutrašnjosti sira uzrokovanih intenzivnom proteolizom bakterija iz roda *Clostridium*. *Clostridium oceanicum* i *C. sporogenes* također mogu izazvati proteolizu na površini sira koji zrije u folijama, stvarajući bijele mrlje na površini sira praćene intenzivnim neugodnim mirisom. Najvažniji nedostatak je pretvorba mliječne kiseline u maslačnu, octenu kiselinu, CO<sub>2</sub> i vodik djelovanjem bakterije *Clostridium tyrobutyricum*. Posljedica ove pretvorbe je nastajanje pukotina, nepravilnog oblika ili pretjerano velikih sirmih očiju, pa čak i nadimanje sira, praćeno neugodnim okusom nakon nekoliko tjedana ili mjeseci zrenja. Druge klostridije (npr. *Clostridium beijerinckii*, *C. sporogenes*, *Clostridium butyricum* i *Clostridium bif fermentans*) također su otkrivene u neispravnim sirevima, ali se smatraju pojačivačima kasnog nadimanja sira. Međutim, sve ove vrste, kao i *Clostridium cochlearium*, mogu kvariti i topljene sireve jer spore preživljavaju temperature topljenja sira i mogu rasti zbog prisutnosti laktoze i relativno visoke pH - vrijednosti od 5,5 do 6,0 (Reindl i sur., 2014).

Glavni izvor klostridijalnih spora u sirovom mlijeku su silaže nedovoljne mikrobne kakvoće. Spore su koncentrirane u izmetu životinja koje doje i ulaze u mlijeko tijekom mužnje, posebno kada nepravilna higijenska praksa ne umanjuje prisustvo spora na površinama vimena (Reindl i sur., 2014).

Cilj ovoga rada bio je utvrditi prisutnost bakterije *C. tyrobutyricum* i srodnih vrsta u svježem sirovom mlijeku i mlijeku u kamion cisterni kao potencijalnih kontaminanata mlijeka i uzroka kvarenja mliječnih proizvoda.

Uzorci svježeg sirovog mlijeka prikupljeni su na sabiralištu i uzet je uzorak mlijeka u kamion cisterni. Prisutnost klostridija utvrđena je metodom najvjerojatnijeg broja po DeMan-u. Ukupno je obrađeno 20 uzoraka mlijeka i jedna kamion cisterna. U 15% uzoraka nije zabilježena pozitivna reakcija u epruvetama, ali je zato bilo 10% pozitivnih uzoraka pri razrjeđenju  $10^{-1}$ , a 75% pri 0 razrjeđenju, pri čemu su bile pozitivne od jedne do svih pet epruveta (tablica 6). Mlijeko u kamion cisterni pokazalo je pozitivnu reakciju, bilo je pozitivno 4 epruvete na 0 razrjeđenju. Ukoliko se broj pozitivnih epruveta pretvori u broj mogućih stanica, manje od  $1,8 \times 10^2$  CFU/mL sadržavalo je 25% uzoraka, ispod  $10^3$  CFU/mL 35% uzoraka. Međutim, više od  $10^3$  CFU/mL bilo je u 40% uzoraka svježeg sirovog mlijeka, kao i u mlijeku u kamion cisterni (slika 9 i 10).

Dokazivanje prisutnosti klostridija u svježem sirovom mlijeku nije predviđeno u Pravilnikom o utvrđivanju sastava svježeg sirovog mlijeka (NN 27/2017), već samo ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija. Međutim, mljekare u svom laboratoriju kontroliraju klostridije u svježem sirovom mlijeku. Detekciju prisutnosti klostridija kao kontaminanata preporučuje Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2011). U vodiču su prikazane dozvoljene količine spora klostridija za svježe sirovo mlijeko namijenjeno za konzumaciji bez prethodne toplinske obrade može sadržavati 10 CFU/mL, a svega 5% ispitanih uzoraka može imati maksimalno  $10^2$  CFU/mL.



## 6. ZAKLJUČCI

Mikrobiološkom analizom uzoraka prikupljenog svježeg sirovog mlijeka na sabiralištu i mlijeka u kamion cisterni mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Mali broj uzoraka svježeg sirovog mlijeka (25% obrađenih uzoraka) sadržavao je ispod  $10^2$  CFU/mL prisutnih klostridija.
2. Veliki broj uzoraka (oko 40%) svježeg sirovog mlijeka sadržavao je iznad  $10^3$  CFU/mL prisutnih klostridija.
3. Mlijeko u kamion cisterni sadržavalo je  $1,3 \times 10^3$  CFU/mL prisutnih klostridija.
4. Proizvodnjom mikrobiološki ispravne silaže i dobrom higijenskom praksom prilikom mužnje može se kontaminacija svježeg sirovog mlijeka s klostridijama svesti na minimum.
5. Koristiti mehaničke postupke obrade preradi mlijeka, baktofugaciju i mikrofiltraciju, kako bi se uklonile spore u mlijeku, a u proizvodnji sireva koristiti nitrata ili lizozim kako bi se spriječilo kasno nadimanje.

## 7. LITERATURA

1. Alfa Laval (2021): Disc stack separator for the dairy industry: Alfa Laval BB520, Alfa Laval Corporate AB, Lund.
2. Antov, G., Čobić, T., Antov, A. (2004): Siliranje i silaže, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
3. Benussi- Skukan, A., Brlek- Gorski, D., Boroš, K., Dugum, J., Hegeđušić, P., Humski, A., Karačić, T., Kovaček, I., Palcic- Jakopović, Katica Vazdar, Ružica & Vrdoljak Muheljić, V. (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, Zagreb, 30-46.
4. Bermúdez, J., González, M.J., Olivera, J.A., Burgueño, J.A., Juliano, P., Fox, E.M., Reginensi, S.M. (2016): Seasonal occurrence and molecular diversity of clostridia species spores along cheesemaking streams of 5 commercial dairy plants, *Journal of Dairy Science*, **99**, 3358–3366.
5. Bylund, G. (2003): Dairy processing handbook, Tetra Pak Processing Systems AB, Lund.
6. Chambers, J.V. (2002): The Microbiology of Raw Milk, Dairy Microbiology Handbook, 3rd Edition, Robinson, R.K. (ur), Wiley-Interscience, Inc., New York, 39 – 90.
7. Drgalić, I., Tratnik, Lj. (2004): Primjena i značaj mikrofiltracije u mljekarskoj industriji, *Mljekarstvo*, **54** (3) 225-245.
8. Drouin, P., Lafrenière, C.: (2012): Clostridial Spores in Animal Feeds and Milk, Milk Production - An Up-to-Date Overview of Animal Nutrition, Management and Health, Chaiyabutr N. (ed.), IntechOpen Limited, London, 375-394.
9. Hafeez, M., Ahmad; I., Qureshi, S., Kashoo, Z., Farooq, S., Wani, S., Asmi, O., Shah, F., Ahmad, B., Bhat, F., Hussna, S.R., Razak, N. (2020): Bacterial Load of Clostridium Perfringens in the Aquatic Environment of Dal Lake, Kashmir, *Acta Scientific Microbiology*, **3** (3), 01 – 06.
10. Havranek, J., Rupić, V. (2003): Mlijeko od farme do mljekare, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
11. HRN EN ISO 7218 (2008): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Opći zahtjevi i upute za mikrobiološka ispitivanja
12. HRN EN ISO 8261 (2003): Mlijeko i mliječni proizvodi - Opće smjernice za pripremu ispitnih uzoraka, osnovnih i decimalnih razrjeđenja za mikrobiološko ispitivanje
13. Incecco, P.D., Faoro, F., Silveti, T., Schrader, K., Pellegrino, L. (2015): Mechanisms of *Clostridium tyrobutyricum* removal through natural creaming of milk: A microscopy study, *Journal of Dairy Science*, **98**, 5164–5172.

14. Lopez-Brea, S.G., Gómez-Torres, N., Ávila Arribas, M. (2018): Spore-forming bacteria in dairy products, *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities*, John Wiley & Sons Ltd and the Institute of Food Technologists, Hoboken.
15. Lovrić, K. (2019): Korištenje lizozima u sprječavanju ranog i kasnog nadimanja polutvrđih i tvrdih sireva, Diplomski rad, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
16. Matijević, B. (2015): Dodaci u proizvodnji sira i njihov značaj, *Sirarstvo u teoriji i praksi*, Matijević, B. (ur.), Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 103 - 112.
17. Narodne Novine (2017): Pravilnik o utvrđivanju sastava sirovog mlijeka, Narodne Novine 27, Zagreb.
18. Reindl, A., Dzieciol, M., Hein, I., Wagner, M., Zangerl, P. (2014): Enumeration of clostridia in goat milk using an optimized membrane filtration technique, *Journal of Dairy Science*, **97** (10), 6036-6045.
19. Šobar, B., Perko, B., Rogelj, I., Kastelic, D., Miklič, M., Kovačić, S., Čeč-Kervina, M., Jeras, P. (1996): Higijenska proizvodnja mlijeka, Dukat mljekara Zagreb, Zagreb.
20. Tratnik, Lj., Božanić, R. (2012): Mlijeko i mliječni proizvodi, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
21. Woudstra, C. (2016): *Clostridium botulinum*, from toxin and flagellin genotyping to Whole Genome Sequencing: An insight into the genetic diversity of human and animal botulism associated Clostridia, Thses, L'Université Paris, Paris.