

FIZIOLOŠKE KARAKTERISTIKE PSIHROTROFNIH BACILA IZOLOVANIH IZ SIROVOG MLEKA

Zora M. Mijačević, Snežana B. Bulajić

Predstavnici roda *Bacillus* često su prisutni kao kontaminanti u sirovom mleku. Njihova ubikvitarnost, stvaranje termorezistentnih spora, sposobnost rasta i biohemijska aktivnost pri niskim temperaturama kao i patogenost pojedinih sojeva aktueliziraju njihov značaj u industriji hrane. Izolacija psihrotrofnih bacila je izvedena posle inkubacije sirovog mleka od 10 dana na $7\pm 1^{\circ}\text{C}$. Psihrotrofni bacili su izolovani samo iz uzoraka koji su pokazivali promenu broja bacila na početku inkubacije I posle 10 dana inkubacije na $7\pm 1^{\circ}\text{C}$. Testirana su 56 psihrotrofna soja bacila izolovana iz sirovog mleka. Broj bacila se tokom inkubacije od 10 dana na $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ u 50 uzoraka sirovog mleka povećao sa $\log 0.81\pm 0.78$ na 1.73 ± 0.86 , a u 6 uzoraka sa $\log 0.10\pm 0.10$ na 2.07 ± 0.47 . Statistički je utvrđeno da je promena broja bacila u uslovima niskih temperatura za period od 10 dana visoko značajna. Izolovani psihrotrofni bacili su u 30,35% hemolitični, 64,28% lecitinaza pozitivni, 5,35% sojeva razlaže želatin, a 78,57% sojeva razlažu kazein. Sposobnost rasta u medijumu sa pH 5,7 pokazuje 97,07% sojeva, a 78,57% raste u prisustvu 7% NaCl.

KLJUČNE REČI: Psihrotrofni bacili, sirovo mleko, fiziološke karakteristike

UVOD

Predstavnici roda *Bacillus* često su prisutni kao kontaminanti u sirovom mleku. Njihova ubikvitarnost, stvaranje termorezistentnih spora, sposobnost rasta i biohemijska aktivnost pri niskim temperaturama kao i patogenost pojedinih sojeva aktueliziraju njihov značaj u industriji hrane.

Garcia-Armesto i sar. (1) su ocenjivali rast 50 izolata *Bacillus* spp. pri različitim temperaturnim uslovima ($6,5^{\circ}\text{C}/10$ dana; $30^{\circ}\text{C}/3$ dana i $40^{\circ}\text{C}/2$ dana). Diferenciranje psihrotrofnih bacila je izvedeno na osnovu njihove sposobnosti rasta na $6,5^{\circ}\text{C}$ tokom 10 dana i izostanka rasta na 40°C za 2 dana. Kriterijum za izučavanje psihrotrofnih bacila je i njihova sposobnost da rastu na niskim temperaturama. Inkubacijom sirovog mleka 10 dana na temperaturi $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ prema Mijačević i sar. (2) broj bacila se povećao za dva log/ml. Za higijenu namirnica je veoma značajna činjenica da pojedini sojevi iz *Bacillus cereus* grupe mogu rasti na

Dr Zora M. Mijačević, redovni profesor, Snežana B. Bulajić, asistent pripravnik, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Bulevar JA 18, 11000 Beograd, Jugoslavija.

temperaturama od 7 °C (3). Prisustvo psihrotrofnih bacila ima značaja jer se i u uslovima čuvanja namirnica na niskim temperaturama mogu stvoriti uslovi za nastajanje dovoljnih količina toksina, koji mogu izazvati trovanja ljudi.

Poslednjih godina se posvećuje značajna pažnja ispitivanjima produkcije toksina *B. cereus* pri različitim temperaturama. Utvrđena su i generacijska vremena ispitivanih sojeva bacila i dokazano je da na temperaturama >12°C generacijsko vreme iznosi 8,71h, a na temperaturama >10°C 18,9h. Sojevi su produkovali toksin u ekspanzionalnoj fazi rasta pri 32°C, dok je kod pojedinih sojeva bacila toksin dokazan u stacionarnoj fazi rasta pri 10°C(4). Ispitivanja koja su izveli Dafrenne i sar (5) su pokazala da su generacijska vremena psihrotrofnih sojeva *B. cereus* na temperaturama <7°C od 9,4-75h, da je lag faza vegetativnih ćelija značajno pod uticajem temperature inkubacije, a da su svi ispitivani sojevi produkovali dijareični tip toksina.

Chung i sar (7) su utvrdili da se u sirovom mleku psihrotrofne sporogene bakterije mogu dokazati na nivou od 0,8-120x10³/ml. Sporogene bakterije su identifikovane kao *B. firmus* u 46,3%, *B. megaterium* u 23%, *B. brevis* u 15,7%, a ostatak su činili *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mascerans*, *B. circulans* i *B. cereus*. Više od 85% spora *B. firmus* i *B. brevis* inokulisanih u mleko je germiniralo u toku 2 dana na 7°C, a sporulacija se javila posle 10 dana. Baker i Griffiths (8) su izvestili o nalazu psihrotrofnih sojeva *B. cereus* u sirovom i pasterizovanom mleku. Takođe su utvrdili da je sirovo mleko glavni izvor psihrotrofnih sojeva *B. cereus*-a u pasterizovanom mleku

Coghill i Juffs (9) su iz 160 uzoraka pasterizovanog mleka u 31% izolovali psihrotrofne bacile, s tim da je *B. cereus* dominantna vrsta. Van Netten i sar (10) su u 8% od 483 uzorka pasterizovanog mleka dokazali *B. cereus*, s tim da je približno polovina izolata bila sposobna da raste na temperaturi od 7°C.

Cristiansson i sar (3) su dokazali da psihrotrofni sojevi *Bacillus cereus* mogu stvarati toksin na temperaturi od 8°C u agitiranom mikrobiološkom mediju i mleku.

Griffiths (6) je dokazao da 85% psihrotrofnih izolata *Bacillus* spp. produkuje dijareični enterotoksin pri 25°C. Većina ovih sojeva je identifikovana kao *B. cereus* i *B. cereus*-u bliski sojevi. Četiri psihrotrofna izolata bacila su produkovala toksin tokom rasta u mleku na temperaturama od 6-21°C. Značajne količine enterotoksina se sintetišu tek pri broju bacila >10⁷cfu/ml.

Cilj ovog rada je da utvrdi prisustvo psihrotrofnih bacila u sirovom mleku, njihove fiziološke karakteristike i sposobnost razmnožavanja u uslovima niskih temperatura tokom 10 dana čuvanja mleka.

EKSPERIMENTALNI DEO

Izolacija psihrotrofnih bacila je izvedena posle inkubacije od 10 dana na 7±1°C. Psihrotrofni bacili su izolovani samo iz uzoraka koji su pokazivali promenu broja bacila na početku inkubacije i posle 10 dana inkubacije na 7±1°C. Testirana su 56 psihrotrofna soja bacila izolovanih iz sirovog mleka. Ispitivanja je sposobnost rasta pri temperaturama 44° i 56°C, u prisustvu 7% NaCl i u medijumu pH vrednosti 5,7. Enzimatska aktivnost značajna za tehnološke procese u mlekarstvu utvrđivana je ispitivanjem sposobnosti bacila da razlažu kazein, skrob i želatin. Ispitivanjem hemolize na krvnom agaru i aktivnosti lecitinaze dokazivana je njihova potencijalna patogenost.

REZULTATI I DISKUSIJA

Sirovo mleko je posle muže ohlađeno i u periodu od 2h kontrolisano na broj bacila. Početan nivo bacila u mleku je bio veoma različit a utvrđene vrednosti su iznosile manje od 1 bacila / ml do $1,5 \times 10^2$ /ml. Mleko je inkubirano na temperaturi $7 \pm 1^\circ\text{C}$ 10 dana i ponovo je određivan broj bacila. Promena log broja bacila posle 10 dana inkubacije na temperaturi od $7 \pm 1^\circ\text{C}$ prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Promene log broja bacila u sirovom mleku posle 10 dana na temperaturi $7 \pm 1^\circ\text{C}$
Table 1. The changes of log number of bacilli in raw milk after 10 days of incubation at temperature of $7 \pm 1^\circ\text{C}$

Grupa Group	Srednja vrednost log <i>Bacillus</i> spp u mleku The mean value of log number of <i>Bacillus</i> spp. in milk					
	1 dan 1 st day			10 dan 10th day		
	n	X±s	Kv	n	X±s	Kv
I	50	0,81±0,78	96	50	1,73±0,86	49
II	6	0,10±0,01	1	6	2,07±0,47	22

Prvu grupu uzoraka sirovog mleka čine bacili čiji se broj udvostručio za period od 10 dana na $7 \pm 1^\circ\text{C}$. Ova grupa je veoma heterogeno rasla i pokazivala velike varijacije u promeni broja bacila tokom perioda inkubacije, što potvrđuje veoma visok koeficijent varijacije. Druga grupa sirovog mleka je imala nisku kontaminaciju različitim sojevima *Bacillus* spp. na početku eksperimenta, ali se tokom stajanja broj *Bacillus* spp. 100 puta povećao. Ovakav rast bacila u uslovima niskih temperatura ukazuje na prisustvo striktnih psihrofilnih sojeva *Bacillus* spp. u sirovom mleku. Rast psihrofilnih sojeva *Bacillus* spp je ujednačen što potvrđuje I koeficijent varijacije.

U prvoj grupi log broja *Bacillus* spp. se tokom 10 dana povećao sa $0,81 \pm 0,78$ na $1,73 \pm 0,86$, dok se log broja *Bacillus* spp. u drugoj grupi tokom istog perioda čuvanja na niskim temperaturama povećao sa početnog <1 /ml na $\log 2,07 \pm 0,47$ /ml.

Statističkom obradom podataka utvrđena je statistički značajna razlika u broju *Bacillus* spp. prvog i desetog dana. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Statistička značajnost promene logaritamskog broja *Bacillus* spp. 1 i 10 dana čuvanja sirovog mleka na niskim temperaturama
Table 2. The statistical significance of changes of log number of *Bacillus* spp. 1 and 10 days of storage of raw milk at low temperatures

Čuvanje mleka The storage of milk	Statistička značajnost Statistical significance	
	I grupa I group	II grupa II group
1/10 dan	5,02***	10,62*****

t-testom je utvrđena visoka statistička značajnost promena srednjih vrednosti log broja *Bacillus* spp. prvog i desetog dana kako za prvu tako i za drugu grupu bacila.

Fiziološke karakteristike psihrotrofnih *Bacillus* spp. prikazane su u tabeli 3. Zapaža se da psihrotrofni bacili pokazuju značajnu aktivnost prema kazeinu, što utiče na održivost termički

tretiranih proizvoda. Ispitivani sojevi *Bacillus* spp. takođe rastu u uslovima visokih temperatura, u prisustvu 7% NaCl i pH 5,7 što potvrđuje sposobnost prilagodavanja bacila na različite uslove sredine. Kod ispitivanih sojeva psihrotrofnih bacila, u visokom procentu su zastupljeni sojevi koji daju hemolizu na krvnom agaru, zatim sojevi koji poseduju lecitinazu, i imaju sposobnost razlaganja skroba. Ove fiziološke karakteristike su oznaka patogenosti, pa namirnice koje sadrže ovakve sojeve bacila u određenom broju mogu biti štetne po zdravlje ljudi.

Tabela 3. Fiziološke karakteristike psihrotrofnih bacila (n56)
Table 3. The physiological characteristics of psychrotrophic bacilli (n56)

Fiziološke	Pozitivni sojevi psihrotrofnih bacila The positive strains of psychrotrophic bacilli	
Karakteristike The physiological characteristics	Broj Number	%
Hemoliza Haemolysis	17	30,35
Lecitinaza Lecithinase	36	64,28
Razgradnja skroba Hydrolysis of starch	21	37,50
Razgradnja želatina Degradation of gelatin	3	5,35
Razgrađuju kazein Degradation of casein	44	78,57
Rast na 44°C Growth on 44°C	56	100,0
Rast na 56°C Growth on 56°C	30	53,57
Rast pri pH 5,7 Growth at pH 5.7	51	97,07
Rast u medijumu sa 7% NaCl Growth in medium with 7%NaCl	44	78,57

Iz tabele 3 se vidi da je 30,35% sojeva *Bacillus* spp. hemolitično, a 64,28% sojeva razlaže lecitin. Prema Mijačević i sar (11) lecitinaza pozitivni sojevi daju citotoksični efekat na Vero ćelijama od 47-74% tokom inkubacije do 96h. Ispitivani psihrotrofni sojevi *Bacillus* spp. su u 64% lecitinaza pozitivni, što ukazuje na vrlo visok broj sojeva koji imaju sposobnost da stvaraju toksine i time predstavljaju opasnost po zdravlje ljudi koji konzumiraju kontaminiranu namirnicu. Utvrđeno je da 5,35% sojeva razlaže želatin, ali zato dve trećine psihrotrofnih sojeva *Bacillus* spp. degradira kazein. Česta karakteristika psihrotrofnih sojeva da hidrolizuju kazein ukazuje na smanjenu održivost konzumnog mleka. Svi ispitivani sojevi su rasli na 44°C, što je u suprotnosti sa rezultatima Garcia-Armesto i sar (1) koji su na osnovu sposobnosti bacila da ne rastu na 40°C, razlikovali psihrotrofne bacile od mezofilnih. U našem radu je zapaženo da 53,57% ispitivanih sojeva *Bacillus* spp. raste i u uslovima visokih temperatura (56°C), a čak 97,075% raste u medijumu sa pH 5,7 i 78,57% u medijumu sa 7% NaCl.

ZAKLJUČAK

Sirovo mleko je izvor psihrotrofnih sojeva *Bacillus* spp. Tokom čuvanja mleka 10 dana na $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ broj bacila se može povećati i do 100 puta. Polazeći od poznate činjenice da je *Bacillus* spp. veoma rasprostranjen u prirodi, da za rast i razmnožavanje ne zahteva posebne uslove, da je rezistentan i da preživljava termičke tretmane pasterezacije, a pored toga pojedini sojevi bacila imaju termorezistentne spore koje ne uništavaju ni temperature kratkotrajne sterilizacije, lako se može doći do zaključka da su bacili mikroorganizmi značajni za kvalitet proizvoda od mleka. Sposobnost pojedinih sojeva *Bacillus* spp. da se prilagode na niske temperature, povećava značaj ovih mikroorganizama u higijeni hrane. Psihrotrofni sojevi *Bacillus* spp. izolovani iz sirovog mleka su u 64,28% slučajeva lecitinaza pozitivni što ukazuje na značajan broj potencijalno toksogenih psihrotrofnih sojeva. Dve trećine ispitivanih psihrotrofnih sojeva *Bacillus* spp. razlaže kazein i direktno utiče na održivost namirnica u prometu.

LITERATURA

1. Garcia Armesto Mr., A. D. Sutherland: Temperature characterization of psychrotrophic and mesophilic *Bacillus* species from milk, *J. Dairy Res*, **64** (1997), 261- 270.
2. Mijačević Z., S. Bulajić: Examination of the biochemical characteristics of Bacilli isolated from raw milk, *Acta Veterinaria* **48** (1998), 59-68.
3. Christiansson A., Naidu AS, Nilsson I., Wadstrom T., H. E. Pettersson: Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures, *Appl. Environ Microbiol.* **55** (1989), 2595-600.
4. Fermanian C., Lapeyere C., Fremy J. M., M. Claisse: Diarrhoeal toxin production at low temperature by selected strains of *Bacillus cereus*, *J.Dairy Res*, **64** (1997), 551-559.
5. Dufrenne J., Bijwaard M.te Giffel M., Beumer R., S. Notermans: Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates, *Int J. Food Microbiol.* **27** (1995), 175-83.
6. Griffiths M.W.: Produkcija toksina od strane psihrotrofnih *Bacillus* spp. prisutnih u mleku, *J.F.Protection.* **53** (1990), 790-792.
7. Chung B.H., R.Y. Canon: Psihrotrofne sporogene bakterije u uzorcima sirovog mleka, A.D.S.A. 1971.
8. Baker J. M. and M. W. Griffiths: Predictive modeling of psychrotrophic *B. cereus*, **8** (1993), 684-688.
9. Coghill D., and H. S. Juffs: Incidence of psychrotrophic sporeforming bacteria in pasteurized milk and cream products and effect of temperature on their growth. *Aust. J. Dairy Technol.* **34** (1979), 150-153.
10. Van Netten, P. A., van de Moosdijk, P., van Hoensel, D. A. A. Mossel and I. Peral: Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. *J. Appl. Bacteriol.* **69** (1990), 73-79.
11. Mijačević Z., S. Bulajić, R. Ašanin: An investigation of the cytotoxic effect of *Bacillus* spp. isolated from raw milk on Vero cell cultures. *Acta Veterinaria.* **49** (1999), 353-361.

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTIC OF PSYCHROTROPHIC BACILLI ISOLATED FROM RAW MILK

Zora M. Mijačević, Snežana B. Bulajić

The strains of genus *Bacillus* are often present as contaminants in raw milk. Their ubiquitous nature, potentiality to produce thermoresistent spores, ability to grow and biochemical activity at low temperatures, so as pathogenicity of some strains have actualized their significance in food industry.

The isolation of psychrotrophic bacilli was conducted after incubation of 10 days at $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ (isolation is achieved only from milk samples which demonstrate the changes of *Bacillus* number at the start and after 10 days of incubation at $7\pm 1^{\circ}\text{C}$).

It was examined 56 psychrotrophic strains of bacilli isolated from raw milk. During incubation of 10 days at $7\pm 1^{\circ}\text{C}$, in 50 samples of raw milk the number of bacilli increased from $\log 0.81\pm 0.78$ to 1.73 ± 0.86 , whereas in 6 samples the *Bacillus* number ranged from $\log 0.10\pm 0.01$ to 2.07 ± 0.47 . The differences between mean values of *Bacillus* number on the first and tenth days of incubation at low temperatures (psychrotrophic condition) were subjected to the t-test. It was noticed a highly significant difference. It was also found that 30.35% of isolated strains were hemolytic, 64.28% degraded lecithin, 5.35% broke down gelatin, 78.57% degraded casein. A high percentage of isolated bacilli (97.07%) grew at pH 5.7 and 78.57% multiplied in the presence of 7% NaCl.

Prispeo 11. februara 2000.

Prihvaćen 20. juna 2000.