

# Utjecaj temperature na kinetiku rasta E. coli u mlijeku i jogurtu

---

**Košuta, Chiara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:706677>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-21**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Chiara Košuta

UTJECAJ TEMPERATURE NA KINETIKU RASTA *E. COLI*

U MLIJEKU I JOGURTU

Završni rad

U Rijeci, 2020.

SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET  
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ  
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Chiara Košuta

UTJECAJ TEMPERATURE NA KINETIKU RASTA *E. COLI*  
U MLIJEKU I JOGURTU

Završni rad

U Rijeci, 2020.

Mentor rada: doc. dr. sc. Mateja Ožanič

Završni rad obranjen je dana \_\_\_\_\_ u / na

\_\_\_\_\_, pred povjerenstvom u sastavu :

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

3. \_\_\_\_\_

Rad ima 28 stranica, 2 slike, 36 literaturnih navoda

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Mateji Ožanič na nesebičnoj pomoći , strpljenju te stručnim savjetima prilikom izvedbe te pisanja završnog rada.

Također zahvaljujem se prof. dr. sc. Marini Šantić na predloženoj temi završnog rada te ostalom osoblju Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri, rodbini te prijateljima na velikoj podršci te pomoći tijekom dosadašnjeg obrazovanja.

## SAŽETAK

*Escherichia coli* je gram negativni, oksidaza negativni, katalaza pozitivni fakultativno anaerobni bacil. Poznato je da neki sojevi *E. coli* čine dominantni dio crijevne mikroflore čovjeka te doprinose normalnoj fiziologiji probavnog sustava. S druge strane neki sojevi *E. coli* uzrokuju infekcije probavnog te mokraćnog sustava. Najčešći sojevi *E. coli* koji uzrokuju infekcije probavnog sustava su Enterotoksična *E. coli*, Enteropatogena *E. coli*, Enteroinvazivna *E. coli* te Enterohemoragična *E. coli*, dok je Uropatogena *E. coli* najčešći uzročnik infekcija mokraćnog sustava. *E. coli* se smatra mezofilnom bakterijom te joj za rast i razmnožavanje pogoduju temperature 20-40 °C. Prethodna istraživanja su dokazala da se *E. coli* uspješno razmnožava na temperaturama manjim od 30 °C te da u prirodi može dulje preživjeti na nižim nego na višim temperaturama u odnosu na optimalnu temperaturu rasta. Također su prethodna istraživanja dokazala da nekim sojevima *E. coli* za razmnožavanje više odgovaraju fluktuirajuće od stalnih temperatura. Cilj ovog završnog rada bio je ispitati utjecaj temperature na kinetiku rasta *E. coli* u uzorcima mlijeka i tekućeg jogurta. Kinetika rasta *E. coli* ispitivana je pri tri različite temperature (4 °C, 25 °C, 37 °C) tijekom razdoblja od deset dana. Broj bakterija u uzorcima mlijeka i tekućeg jogurta praćen je u vremenskim razdobljima od 0, 3, 5, 7 i 10 dana od inokulacije. TBX agar je podloga koja je korištena za određivanje broja bakterija. Bakterijske suspenzije su neposredno prije nasađivanja na TBX agar deseterostruko razrijeđene te potom su agari inkubirani na 37 °C tijekom 24 sata te je nakon navedenog razdoblja očitao broj bakterija. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da se *E. coli* u mlijeku razmnožava pri 4 °C, 25 °C te 37 °C, dok se u jogurtu *E. coli* razmnožava pri temperaturi od 25 °C i 37 °C, a pri temperaturi od 4 °C *E. coli* nema sposobnost razmnožavanja. Također dokazano je da se *E. coli* bolje razmnožava u mlijeku te da se pri temperaturi od 25 °C bakterije najbolje razmnožavaju.

Ključne riječi: *E. coli*, mlijeko, tekući jogurt, kinetika rasta, temperatura

## SUMMARY

*Escherichia coli* is gram negative, oxidase negative, catalase positive optional anaerobic bacillus. It is known that some strains of *E. coli* form a dominant part of the human intestinal microflora and contribute to the normal physiology of the digestive system. On the other hand, some strains of *E. coli* cause infections of the digestive and urinary systems. The most common strains of *E. coli* that cause gastrointestinal infections are Enterotoxigenic *E. coli*, Enteropathogenic *E. coli*, Enteroinvasive *E. coli*, and Enterohemorrhagic *E. coli*, while Uropathogenic *E. coli* is the most common cause of urinary tract infections. *E. coli* is considered a mesophilic bacterium and temperatures of 20-40 °C are favorable for its growth and reproduction. Previous research has shown that *E. coli* reproduces successfully at temperatures below 30 °C and that it can survive longer in nature at lower than at higher temperatures in relation to the optimal growth temperature. Also, previous research has shown that some strains of *E. coli* are more suitable for reproduction fluctuating than constant temperatures. The purpose of this final work is to examine the influence of temperature on the growth kinetics of *E. coli* in samples of milk and yogurt. The growth kinetics of *E. coli* were examined at three different temperatures (4 °C, 25 °C, 37 °C) during a period of ten days. The number of bacteria in milk and yogurt samples was monitored at 0, 3, 5, 7, and 10 days after inoculation. TBX agar is used to determine the number of bacteria. Bacterial suspensions were diluted tenfold immediately prior to inoculation on TBX agar, and then the agars were incubated at 37 °C for 24 hours, after which time the number of bacteria was read. The results of this study show that *E. coli* grows in milk at 4 °C, 25 °C and 37 °C, while *E. coli* grows in yogurt at a temperature of 25 °C and 37 °C, and *E. coli* does not have the ability to reproduce at a temperature of 4 °C. It has also been shown that *E. coli* reproduces better in milk and that bacteria grows the best at 25 °C.

Key words: *E. coli*, milk, yogurt, the growth kinetics, temperature

## SADRŽAJ

1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.2. Sojevi <i>E. coli</i> .....	2
1.2.1. Intestinalni sojevi <i>E. coli</i> .....	3
1.2.1.1. Enterotoksična <i>E. coli</i> ( ETEC).....	3
1.2.1.2 Enteropatogena <i>E. coli</i> (EPEC) .....	3
1.2.1.3. Enteroinvazivna <i>E. coli</i> (EIEC).....	4
1.2.1.4 Enterohemoragična <i>E. coli</i> (EHEC).....	4
1.2.2. Ekstraintestinalni sojevi <i>E. coli</i> .....	5
1.2.2.1. Uropatogena <i>E. coli</i> .....	5
1.3. Ostale infekcije <i>E. coli</i> .....	6
1.4. Prisutnost <i>E. coli</i> u okolišu .....	7
1.5. Otpornost na antibiotike i okolišne uvjete .....	7
1.5.1. Antimikrobna rezistencija.....	7
1.5.2. Utjecaj temperature na rast i razmnožavanje <i>E. coli</i> .....	8
1.6. Mikrobiologija mlijeka.....	9
1.6.1. Raznolikost mikroorganizama u mlijeku .....	10
1.6.1.1. Tehnološki važne bakterije mliječne kiseline (BMK).....	10



1.6.1.2. Uzročnici alimentarnih infekcija .....	11
1.7 <i>E. coli</i> kao indikator higijene mlijeka .....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	13
3. MATRIJALI I METODE .....	14
3.1. Bakterijski soj .....	14
3.2. TBX agar .....	14
3.3. Priprema bakterijske suspenzije.....	15
3.4. Inokulacija bakterija u mlijeko i tekući jogurt .....	15
3.5. Kinetika rasta bakterija u uzorcima mlijeka i tekućeg jogurta.....	16
4. REZULTATI .....	17
4.1. Kinetika rasta <i>E. coli</i> u mlijeku .....	17
4.2. Kinetika rasta <i>E. coli</i> u tekućem jogurtu .....	19
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČAK.....	24
7. LITERATURA.....	25

## 1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA

### 1.1. *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* je najznačajnija i najčešća vrsta koja se ubraja u rod bakterija *Escherichia*. Unutar porodice *Enterobacteriaceae*, *E. coli* uzrokuje najveći broj infekcija. Dimenzije ove bakterije u pravilu su od 1 do 1,5  $\mu\text{m}$  širine te od 2 do 6  $\mu\text{m}$  duljine (1). Bakterija je gram negativni, pokretni, oksidaza negativni te katalaza pozitivni štapić (1). *E. coli* je svestrani mikroorganizam koji ima važnu ulogu kao dio normalne crijevne mikroflore ljudi te nekih sisavaca. Ova bakterija često se koristi u istraživanjima, kao npr. prilikom kloniranja u rekombinantnoj DNA tehnologiji (2). U većini slučajeva, *E. coli* je bezopasni mikroorganizam koji kod ljudi ne uzrokuje bolest, međutim neki sojevi ove bakterije dovode do bolesti gastrointestinalnog, mokraćnog ili središnjeg živčanog sustava (3).

Oko 90 % sojeva *E. coli* posjeduje sposobnost fermentacije laktoze. Međutim, pojedini dijarealni sojevi, kao npr. Enteroinvazivna *E. coli*, ne razgrađuju laktozu. S obzirom da je 99 % sojeva pozitivno na Indol, odnosno razgrađuju triptofan do indola, taj test se smatra najpouzdanijim u diferencijaciji *E. coli* od ostalih bakterija iz porodice (4). Izolacija ove bakterije iz uzorka stolice provodi se na selektivnim i diferencijalnim podlogama Mac Conkey agaru ili eozin metilen – plavom agaru, inkubacijom pri 37 °C (5). Za izolaciju Enterohemoragične *E. coli* koristi se selektivna podloga s dodatkom sorbitola, s obzirom da jedino taj soj ne posjeduje sposobnost razgradnje sorbitola te se s obzirom na to svojstvo razlikuje od ostalih sojeva *E. coli* (1).

Sojevi *E. coli* koji su dio normalne crijevne mikroflore čovjeka su fakultativni anaerobi te ne uzrokuju infekcije kod ljudi osim u posebnim slučajevima kada te bakterije migriraju iz crijeva do drugih organa ili tkiva te tada prilikom razvoja infekcije koriste opće čimbenike

virulencije. *E. coli* je najzastupljeniji pripadnik crijevne mikroflore čovjeka te je zajedno s ostalim bakterijama zaslužna za stimulaciju imunog sustava domaćina. Bakterije crijevne mikroflore, uključujući *E. coli*, inhibiraju kolonizaciju crijeva patogenim mikroorganizmima te sudjeluju u procesu stvaranja vitamina K (1., 12).

Nadalje, pojedini sojevi *E. coli* uzrokuju intestinalne ili ekstraintestinalne infekcije zahvaljujući specifičnim čimbenicima virulencije. Intestinalni tipovi *E. coli* koji su odgovorni za crijevne infekcije kod ljudi mogu se podijeliti u šest kategorija: Enterotoksična *E. coli* (ETEC), Enteropatogena *E. coli* (EPEC), Enteroinvazivna *E. coli* (EIEC), Enterohemoragična *E. coli* (EHEC), Enteroagregativna *E. coli* (EAEC) te Difuzno adhezivna *E. coli* (DAEC) (4). Ovisno o čimbenicima virulencije koje posjeduju bakterije *E. coli*, sojevi bakterija mogu biti uzročnici neupalne dijareje karakterizirane vodenastim proljevima ili upale koja je praćena krvavo sluzavim proljevom. Virulentni sojevi *E. coli* se razlikuju od nevirulentnih po tome što imaju gene koji kodiraju različite čimbenike virulencije (6).

Ekstraintestinalna *E. coli* (EXPEC) je uzročnik infekcija mokraćnog sustava, meningitisa kod novorođenčadi, abdominalne sepse te septikemije, odnosno infekcija koje nisu vezane za gastrointestinalni trakt (7). Uropatogena *E. coli* smatra se glavnim uzročnikom infekcija mokraćnog sustava (1).

## 1.2. Sojevi *E. coli*

Intestinalni sojevi *E. coli* uzrokuju infekcije probavnog sustava, dok su ekstraintestinalni sojevi *E. coli* uzročnici infekcija izvan probavnog sustava.

### 1.2.1. Intestinalni sojevi *E. coli*

U intestinalne tj. dijarealne sojeve ubrajaju se Enterotoksična *E. coli* (ETEC), Enteropatogena *E. coli* (EPEC), Enteroinvazivna *E. coli* (EIEC), Enterohemoragična *E. coli* (EHEC), Enteroagregativna *E. coli* (EAEC) te Difuzno adhezivna *E. coli* (DAEC). Najčešći intestinalni sojevi su : ETEC, EPEC, EIEC te EHEC. (1)

#### 1.2.1.1. Enterotoksična *E. coli* (ETEC)

Enterotoksična *E. coli* smatra se glavnim uzročnikom putničke dijareje te dijareje kod djece mlađe od pet godina (8). Najvažniji čimbenici virulencije ove bakterije su termolabilni i termostabilni egzotoksini te faktori kolonizacije koji napadaju stanice crijeva (9). Infekcija uzrokovana ETEC započinje kolonizacijom crijeva. Faktori kolonizacije ETEC se razlikuju po strukturi, sastavu te funkciji. Pili se smatraju najvažnijim faktorom kolonizacije. Veliku ulogu pri kolonizaciji crijeva imaju i adhezini, odnosno jednostavni proteini vanjske membrane. Nakon kolonizacije, enterotoksična *E. coli* izlučuje toksine koji djeluju na povećano izlučivanje iona klora te vode iz epitelnih stanica crijeva (9). Kod pacijenata koji su zaraženi ETEC pojavljuje se karakteristični vodenasti proljev kojeg prati normalna ili blago povišena temperatura (6).

ETEC se najčešće prenosi kontaminiranom hranom i vodom. Infektivna doza koja je potrebna za razvoj infekcije je  $1 \times 10^8$  bakterija. Većina starijih osoba koje žive u zemljama gdje su infekcije ETEC prisutne, razvile su imunost u djetinjstvu prema ovom patotipu *E. coli* (1).

#### 1.2.1.2. Enteropatogena *E. coli* (EPEC)

Enteropatogena *E. coli* je prvi soj ove bakterije za koji je dokazano da uzrokuje proljeve kod čovjeka (1). EPEC najčešće uzrokuje infekcije kod djece koja su mlađa od dvije godine.

Infekcije uzrokovane ovim sojem *E. coli* su relativno rijetke u razvijenim zemljama, dok su česte u slabije razvijenim područjima s obzirom na lošije higijenske uvjete (10). EPEC ne izlučuje toksine, a vrlo značajnim čimbenikom virulencije smatraju se specifični pili koji su kodirani genima smještenim na plazmidu (1). EPEC kod čovjeka uzrokuje umjerenu do tešku kliničku sliku dijareje. Infekcija započinje prijanjanjem bakterija na enterocite pomoću specifičnih fimbrija, a adhezin intimin zaslužan je za dodatno vezanje za enterocite (11, 12). Oštećenje stanica praćeno je gubitkom mikrovila te izravnavanjem citoskeleta epitelnih stanica domaćina. Zbog gubitka mikrovila javlja se malapsorpcija i dijareja. Čimbenik virulencije koji je zaslužan za izravnavanje površine citoskeleta je LEE (*engl.* Locus of Enterocyte Effacement) koji utječe na stvaranje A/E lezija (1,11,12). Proljev uzrokovan ovim patotipom je najčešće praćen groznicom (6).

#### 1.2.1.3. Enteroinvazivna *E. coli* (EIEC)

Enteroinvazivna *E. coli* uzrokuje crijevne infekcije diljem svijeta, međutim infekcije uzrokovane ovim patotipom rijetke su u zemljama s dobrim higijenskim standardom, a češće se pojavljuju u zemljama u razvoju. Infekcije uzrokovane s EIEC su slične infekcijama koje su uzrokovane patogenom bakterijom *Shigella spp* (13). Invazivni antigen kodiran plazmidom smatra se glavnim čimbenikom virulencije EIEC (1). Bakterija EIEC uzrokuje upalu te stvaranje ulkusa na sluznici crijeva. U početnom stadiju infekcije prisutan je vodenasti proljev, dok se nedugo zatim javlja krvavo sluzavi proljev (1). EIEC se razlikuje od ostalih sojeva *E. coli* time što posjeduje ipaH-gen koji je prisutan isključivo kod EIEC i kod *Shigella spp.* (14).

#### 1.2.1.4. Enterohemoragična *E. coli* (EHEC)

Među sojevima bakterija *E. coli*, enterohemoragična *E. coli*, odnosno Shiga toksin producirajuća *E. coli* je najčešći uzročnik proljeva u razvijenim zemljama. EHEC može uzrokovati infekcije kod ljudi svih dobnih skupina, a rizične skupine smatraju se starije osobe

te djeca (1). EHEC izlučuje velike količine Shiga toksina koji je posredovan bakteriofagom te ujedino Shiga toksin predstavlja glavni čimbenik virulencije ovog patotipa (6). Serotip EHEC koji najčešće dovodi do bolesti u ljudi je O157: H7 (1). Podjedinica A Stx hidrolizira specifični adeninski ostatak ribosomske podjedinice 60 stanica sisavaca, dok se podjedinica B veže na globotriaosilceramid membranskog receptora Gb3 (15). Bolest uzrokovana sa EHEC započinje nakon inkubacije koja prosječno iznosi tri dana. Klinička slika karakterizirana je vodenastim proljevom koji je praćen grčevima u truhu. Nakon početne faze bolesti, vodenasti proljev prelazi u krvavi proljev. Slično kao i kod infekcija uzrokovanih s EPEC dolazi do gubitka mikrovila (1). Istraživanja su pokazala da se tjedan dana nakon pojave bolesti kod otprilike 15 % pacijenata javlja hemolitičko uremički sindrom (HUS) (15). Nakon crijevne infekcije Shiga toksini mogu prijeći crijevnu barijeru te oštetiti endotelne te tubularne stanice domaćina što može rezultirati zatajenjem bubrega (16). HUS je najteža komplikacija infekcije bakterijom EHEC te kod 3-5 % pacijenata dolazi do smrtnog ishoda (1).

Infektivna doza koja je potrebna za razvoj infekcije je izrazito niska te iznosi 10-100 bakterija. Osim čovjeka, EHEC kolonizira probavni sustav goveda te se stoga smatra kako je termički neobrađeno goveđe meso najčešći izvor infekcije (1).

### 1.2.2. Ekstraintestinalni sojevi *E. coli*

Najčešći ekstraintestinalni soj *E. coli* je Uropatogena *E. coli* (UPEC) , navedena bakterija uzročnik je infekcija mokraćnog sustava. Ostali ekstraintestinalni sojevi *E. coli* smatraju se uzročnicima bakterijemije, neonatalne sepse te meningitisa kod dojenčadi.

#### 1.2.2.1. Uropatogena *E. coli*

Istraživanja pokazuju da je uropatogena *E. coli* odgovorna za razvoj oko 80 % infekcija mokraćnog sustava te 50 % intrahospitalnih infekcija (17). UPEC je najčešći uzročnik

komplikiranih infekcija mokraćnog sustava (18). Uropatogene bakterije *E. coli* mogu migrirati iz crijeva do mokraćnog sustava te kolonizirati periuterino i vaginalno područje. Nakon početne kolonizacije bakterije se šire do mjehura te se pričvrste na površinski epitel pomoću fibrilarnih i nefibrilarnih adhezina (19). Istraživanja su pokazala da je UPEC razvila određene prilagodbe koje su potrebne za preživljavanje unutar mokraćnog sustava (19). Žene su znatno češće izložene infekcijama uzrokovanim UPEC s obzirom da je uretra ženske osobe anatomski kraća od muške. Glavni faktori virulencije smatraju se P-fibrije te se pomoću njih *E. coli* veže za molekulu D-galaktoze na P-antigenu. Ljudi koji posjeduju P-antigen krvnih grupa bit će osjetljiviji na infekcije mokraćnog sustava uzrokovane *E. coli*. Nadalje, K-antigen zaslužan je za razvoj biofilma koji se pojavljuje kod kroničnih infekcija uzrokovanih s *E. coli*. Čimbenici virulencije ove bakterije koji su zaslužni za liziranje epitelnih stanica su toksini hemolizini (1).

### 1.3. Ostale infekcije *E. coli*

Istraživanja navode da je 2001. godine sepsa uzrokovana s *E. coli* bila razlog smrti kod 40000 osoba, što je 500 puta više slučajeva smrti od onih uzrokovanih *E. coli* 0157:H7 (7.). Sepsa nastaje kao sekundarna infekcija nakon što bakterije *E. coli* iz mokraćnog te probavnog sustava dospiju u krv. Kod novorođenčadi neonatalna sepsa smatra se jednom od pet najčešćih neonatalnih infekcija u svijetu, a infekcija može biti stečena za vrijeme te nakon poroda (7.). Novorođenčad se smatra rizičnom skupinom za pojavu sepse zbog nedostatka IgM protutijela (12).

*E. coli* je uz streptokoke skupine B glavni uzročnik meningitisa kod dojenčadi (12). *E. coli* koja uzrokuje meningitis posjeduje kapsulu koja je antigenog tipa K1. Dakle čimbenik

virulencije K1 srodan je cerebralnim glikopeptidima te se smatra da organizam novorođenčadi ne prepoznaje taj gen iako mehanizam patogenosti nije u potpunosti istražen (1,12).

#### 1.4. Prisutnost *E. coli* u okolišu

S obzirom da je *E. coli* normalno prisutna kao dio crijevne mikroflore, bakterija može fekalijama lako dospjeti u okoliš. Samim time, prisutnost *E. coli* u okolišu predstavlja fekalno zagađenje te se bakterija koristi kao indikator fekalne kontaminacije voda (2).

Nekada se smatralo da *E. coli* ne preživljava dugo izvan domaćina, no danas je poznato da bakterija može dugo preživjeti izvan probavnog sustava te da se uspješno razmnožava u tlu, pijesku i sedimentu ukoliko su uspostavljeni osnovni uvjeti za rast. Istraživanja su pokazala kako je u okolišu prisutna velika razina gena *eaeA* koji kodira intimin koji je potreban bakteriji EPEC za virulenciju. Na postojanost enteropatogene *E. coli* u okolišu utječe sposobnost bakterije da kolonizira biljku, zatim genotip biljke te interakcije *E. coli* s fitobakterijama. Istraživanja su pokazala kako je mehanizam EPEC potreban za kolonizaciju povrća sličan mehanizmu koji bakterije koriste prilikom kolonizacije životinjske stanice (2). Također su kod pojedinih sojeva *E. coli* u okolišu otkriveni geni koji su zaslužni za rezistenciju na antibiotike (2).

#### 1.5. Otpornost na antibiotike i okolišne uvjete

##### 1.5.1. Antimikrobna rezistencija

*E. coli* ima sposobnost razvoja rezistencije prema različitim antibioticima. Zbog povećane rezistencije na antibiotike, antibiotici koji se primjenjuju prilikom liječenja infekcija



uzrokovanih *E. coli* trebaju biti pažljivo izabrani (20.). Istraživanja pokazuju da zadnjih godina *E. coli* razvija sve veću rezistenciju na antibiotike te da osim mutacija u genima, na razvoj otpornosti utječu višestruke crpke kao što su AcrAB- To/ C i Mex crpke koje imaju sinergistički učinak s drugim mehanizmima (21.). Nadalje, u istraživanju provedenom na 187 uzoraka sirovog mlijeka izolirano je 222 izolata *E. coli* te je kod njih 66 (29,7%) dokazana rezistencija na jedan ili više antimikrobnih lijekova. Rezistencija *E. coli* odnosi se na tetraciklin (27,5%), ampicilin (18,9%), streptomycin (18,5% ), sulfametoksazol – trimetoprim ( 11,3% ), cefotaksim (4,5 %), kanamicin (4,1% ), ceftazidim ( 3,6 %), kloramfenikol ( 2,3% ), nalidiksinska kiselina (1,8% ) te ciprofloksacin (1,4% ). Rezistencija *E. coli* na fosfomicin i imipenem nije uočena (22.).

#### 1.5.2 Utjecaj temperature na rast i razmnožavanje *E. coli*

Bakterije se s obzirom na optimalnu temperaturu rasta mogu podijeliti na psihrofile, mezofile te termofile. *E. coli* pripada mezofilima jer joj za rast i razmnožavanje odgovaraju temperature od 20°C do 40°C. Temperatura od 37°C je optimalna za rast ove bakterije, a s obzirom da je tjelesna temperatura čovjeka oko 37°C, na toj temperaturi je uspostavljen jedan od uvjeta nužnih za razmnožavanje *E. coli* unutar ljudskog organizma (23.).

*E. coli* u prirodi dulje preživljava pri nižim nego višim temperaturama te tako najčešće raste u okolišu pri temperaturama nižim od 30°C (2). Također, bakterije *E. coli* imaju mogućnost prilagodbe na temperaturne amplitude. Nekim sojevima *E. coli* više odgovaraju fluktuirajuće temperature pa mogu dulje preživjeti u tlu nego što bi preživjeli u okruženju konstantno viših temperatura. Međutim, neka istraživanja pokazala su kako enterohemoragična *E. coli* serotipa O157:H7 najbolje raste pri konstantnim temperaturnim uvjetima (2).

Nadalje, istraživanje kojim je ispitan utjecaj temperature na preživljavanje pojedinih sojeva *E. coli* u obranom mlijeku te mesnom bujonu dokazuje da su bakterije unutar bujona inaktivirane pri temperaturi od 55°C nakon 60 – 120 minuta izlaganja, dok je za inaktivaciju *E. coli* u mlijeku bila potrebna temperatura od 55°C u trajanju od 180 minuta. Bakterijske suspenzije izložene su i temperaturi od 60° C, pri čemu je u mesnom bujonu došlo do inaktivacije bakterija nakon 15-30 minuta, dok su u mlijeku nakon 30 minuta uništene bakterije samo jednog soja *E. coli*, a ostali sojevi uključujući i EHEC bili prisutni u koncentraciji od 40 CFU/ ml ( 24.).

Također prilikom kombinacije ultrazvučnog tretmana i povišene temperature dolazi do brže inaktivacije *E. coli*. Za inaktivaciju bakterije *E. coli* u mlijeku potreban je ultrazvuk frekvencije od 20 kHz. Dokazano je da je bakterija *E. coli* osjetljivija na ultrazvučni tretman u usporedbi sa gram pozitivnim bakterijama (25.).

## 1.6. Mikrobiologija mlijeka

Kravlje mlijeko te mliječni proizvodi smatraju se jednim od najčešće konzumiranih namirnica širom svijeta. Mlijeko se kao napitak konzumira u manjim količinama, dok se veće količine mlijeka izlažu postupku fermentacije kako bi se proizveli mliječni proizvodi kao što su jogurt, sir, vrhnje i slično (26). Tijekom prošloga stoljeća brojna su istraživanja ispitivala kombinaciju temperature i vremena potrebnih za provođenje pasterizacije. Kao referentna bakterija prilikom istraživanja korištena je *Mycobacterium tuberculosis* za koju se smatralo kako je otporna na toplinu. Godine 1924. definirana je kombinacija vremena od 30 minuta i temperature 61,1°C potrebnih za učinkovitu pasterizaciju ( 27). Iako se pasterizacijom mlijeka i mliječnih proizvoda smanjuje rizik od kvarenja te se osigurava značajna sigurnost namirnica, trenutno se provode brojna istraživanja čiji rezultati omogućavaju daljnji napredak

mikrobiologije mlijeka. Sekvencioniranjem genoma mikroorganizama omogućen je pregledniji uvid u mikroorganizme u mlijeku i mliječnim proizvodima koji mogu utjecati na poboljšanu kvalitetu nekog mliječnog proizvoda (28).

#### 1.6.1. Raznolikost mikroorganizama u mlijeku

Istraživanja pokazuju kako sirovo mlijeko sadrži mnogo različitih bakterijskih vrsta. S obzirom na veliki postotak vode te hranjivih tvari, mikroorganizmi u mlijeku svojim razmnožavanjem i metaboličkim procesima mogu utjecati na okus te teksturu sirovog mlijeka (29) U čimbenike odgovorne za raznolikost mikrobnog sastava u mlijeku ubrajaju se: različiti postupci mužnje, prisutnost bakterija na koži i zubima životinje, održavanje higijenskih uvjeta na farmama, vrsta hrane te smještaj životinja u otvorenom ili zatvorenom prostoru (30)

Bakterije u mlijeku mogu sudjelovati u procesima fermentacije te imati blagotvoran učinak (*Lactobacillus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Bifidobacterium spp.*), dok se s druge strane u mlijeku mogu nalaziti bakterije koje kod ljudi izazivaju infekcije (neki patotipovi *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria spp.*, *Brucella spp.*) te bakterije koje uzrokuju kvarenje mlijeka (*Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Clostridium spp.*) (31).

U sirovom kravljem mlijeku najzastupljenije su vrste *Lactococcus spp.* ( $8,2 \times 10^1 - 1,4 \times 10^4$  CFU/ml), *Lactobacillus spp.* ( $1 \times 10^2 - 10^4$  CFU / ml), *Leuconostoc spp.* ( $9,8 \times 10^1 - 2,5 \times 10^3$  CFU/ml) i *Enterococcus spp.* ( $2,57 \times 10^1 - 1,58 \times 10^3$  CFU/ ml). Ostale bakterije kao što su *Acinetobacter spp.*, *Aeromonas spp.* i *Pseudomonas spp.* prisutne su u različitim omjerima (29).

##### 1.6.1.1. Tehnološki važne bakterije mliječne kiseline (BMK)

Neki mikroorganizmi koji se prirodno nalaze u sirovom mlijeku smatraju se tehnološki važnim mikroorganizmima jer su zaslužni za provođenje procesa fermentacije. U procesu fermentacije mlijeka uključeni su *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Leuconostoc spp.*,

*Enterococcus spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Pediococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Aerococcus spp.* Navedene bakterije nazivaju se bakterijama mliječne kiseline (32).

BMK su gram pozitivne, nesporogene te aerotolerantne bakterije koje kao krajnji produkt katabolizma proizvode mliječnu kiselinu. BMK se uzgajaju na hranjivim podlogama u koje se dodaju aminokiseline te peptidi. Pojedine vrste i sojevi BMK koriste se za proizvodnju određenih spojeva te fermentiranih proizvoda. Metaboliti katabolizma BMK doprinose promijenjenom okusu i mirisu mliječnog proizvoda (32). Glavna osobitost mliječnih proizvoda bogatih BMK koji su prošli proces fermentacije je da imaju pogodan utjecaj na zdravlje ljudi jer su BMK zaslužne za održavanje crijevne mikroflore. Nadalje, fermentirani mliječni proizvodi djeluju antimikrobno i antimutageno te su zaslužni za apsorpciju kalcija i vitamina u probavnom sustavu. BMK prirodnim putem opskrbljuju probavni sustav aktivnim tvarima kao što su razni enzimi (laktaze, reduktaze) te tvarima koje mogu spriječiti rast nepoželjnih bakterija u crijevima ljudi. Patogene bakterije uzrokuju crijevne infekcije, a jedan od načina pomoću kojeg infekcije mogu biti inhibirane je povoljno djelovanje bifidobakterija koje fermentacijom proizvode mliječnu i octenu kiselinu, a niži pH u gastrointestinalnom sustavu zaustavlja rast patogenih bakterija. Također istraživanja su potvrdila da su bifidobakterije zaslužne za poboljšanu peristaltiku crijeva. Bakterije *L. casei*, *L. acidophilus* te bifidobakterije zaslužni su za poboljšanje crijevne mikroflore te navedenim bakterijama odgovaraju veće koncentracije žučnih kiselina pa nisu osjetljive na niži pH želuca (33).

#### 1.6.1.2. Uzročnici alimentarnih infekcija

Glavni uzročnici alimentarnih infekcija uzrokovanih konzumacijom mlijeka i mliječnih proizvoda su *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria spp.*, *Shigella spp.* te *Brucella spp.* (34).

*Listeria monocytogenes* se smatra jednim od najvažnijih patogena prisutnih u mlijeku, a odgovorna je za razvoj alimentarne infekcije. Bakterija *L. monocytogenes* posjeduje sposobnost razmnožavanja pri temperaturi hladnjaka tj. na 4 °C. Rizična hrana zaslužna za razvoj listerioze smatraju se nepasterizirani meki sirevi te je zato nužno osigurati ispravne postupke čuvanja hrane (35).

#### 1.7. *E. coli* kao indikator higijene mlijeka

Osim što se bakterija *E. coli* u mlijeku smatra uzročnikom alimentarne infekcije, *E. coli* se može koristiti i kao mikrobiološki indikator higijene mlijeka. Istraživanja su pokazala kako postotak sirovog mlijeka u kojem je dokazana *E. coli* iznosi 6,81 % kod mlijeka dobivenog ručnom mušnjom, dok je 88,6% uzoraka bilo pozitivno nakon strojne mužnje. Nadalje, istraživanja su pokazala da je u kantama za čuvanje mlijeka dokazano manje *E. coli* u odnosu na bazene za čuvanje mlijeka. U uzorcima mlijeka čuvanim u kantama, *E. coli* je dokazana kod 19,81% uzoraka, dok je prosječni postotak uzorka mlijeka pozitivnih na *E. coli* iznosio 43,36 % za mlijeko čuvano u bazenima (36).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati utjecaj temperature na kinetiku rasta bakterija *Escherichia coli* u mlijeku i tekućem jogurtu. Kinetika rasta *E. coli* ispitana je u uzorcima mlijeka i jogurta prilikom inkubacije pri različitim temperaturama ( 4 °C , 25 °C , 37°C ), tijekom razdoblja od 10 dana.

### 3 .MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Bakterijski soj

Prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela završnog rada korištena je bakterija *Escherichia coli*, soj American Type Culture Collection (ATCC). Bakterija *E. coli* uzgajana je na Trypton -žučnom glukuronidu (eng. Trypton Bile X-glucuronide) , TBX agaru te inkubirana pri temperaturi od 37 ° C , tijekom 24 sata.

#### 3.2. TBX agar

TBX agar je selektivna i diferencijalna podloga koja je korištena prilikom nasađivanja bakterija u svrhu pripreme bakterijske suspenzije i određivanja broja *E. coli* u uzorcima mlijeka i tekućeg jogurta. Agar ima selektivna svojstva zahvaljujući prisustvu kromogenog supstrata 5-brom- 4 -krom- 3- indol beta - D - glukuronida ( X-  $\beta$  – D – glukuronid ). Bakterija *E. coli* posjeduje enzim  $\beta$ - glukuronidazu koji razgrađuje veze između kromogenog supstrata 5- brom- 4 - krom - 3- indol te  $\beta$  – D – glukuronida što rezultira pojavom plavo – zelenih kolonija *E. coli* na TBX agaru

Sastav TBX agara - Trypton ( 20,0 g / L )

-Žučne soli (1,5 g / L)

- X-Glukuronid ( 0,075 g / L)

-Agar ( 15,0 g / L)

\* PH agara  $7,2 \pm 0,2$  pri 25 ° C

### 3.3. Priprema bakterijske suspenzije

Bakterijska suspenzija određene koncentracije pripravljena je spektrofotometrijski. Spektrofotometar je uređaj koji služi za određivanje optičke gustoće (engl. Optical Density) te gustoća vrijednosti 1 predstavlja koncentraciju od  $1 \times 10^9$  bakterija u mililitru suspenzije (CFU/mL). Prilikom određivanja optičke gustoće korištena je sterilna voda kao slijepa proba. Nakon porasta *E. coli* na TBX agaru, bakterije su brisnim štapićem pokupljene sa agara i umućene u 3 ml sterilne vode. Kako bi izmjerili optičku gustoću, 500  $\mu$ L tako pripremljene suspenzije odpipetirano je u kivetu. Bakterijska suspenzija je neposredno prije spektrofotometrije bila homogenizirana pomoću tresilice. Optička gustoća pripremljene suspenzije iznosila je 1,015 što znači da je broj bakterija u suspenziji iznosio  $1 \times 10^9$  CFU / mL.

### 3.4. Inokulacija bakterija u mlijeko i tekući jogurt

U cilju praćenja kinetike rasta *E. coli* u mliječnim proizvodima, korišteno je trajno mlijeko s 2,8 % mliječne masti i tekući jogurt također s 2,8 % mliječne masti. Proizvodi su bili ispravnog roka valjanosti. Po 30 ml mlijeka i jogurta prebačeno je u epruvete od 50 ml. U cilju postizanja koncentracije od  $1 \times 10^6$  bakterija/ml uzoraka mlijeka i jogurta, u 30 ml uzorka dodano je po 30  $\mu$ L suspenzije bakterija. Kako bi pratili kinetiku rasta *E. coli* u uzorcima mlijeka i jogurta pri različitim temperaturama, pripremljeni uzorci inkubirani su pri temperaturama od 4 °C , 25 °C , 37 °C tijekom 10 dana.



### 3.5. Kinetika rasta bakterija u uzorcima mlijeka i tekućeg jogurta

Broj bakterija u uzorcima mlijeka i jogurta praćen je u vremenskim razdobljima od 0, 3, 5, 7 i 10 dana nakon inokulacije. U svakom navedenom razdoblju pripravljena su deseterostruka razrjeđenja suspenzije kako bi se lakše i točnije odredio broj bakterija u uzorcima. Deseterostruka razrjeđenja suspenzije mlijeka i jogurta pripravljena su u prethodno obilježenim mikrotitar pločicama koje sadrže 96 jažica. Uzorci su prije razrjeđivanja homogenizirani na tresilici. Zatim je u prvi red jažica otpipetirano po 200  $\mu\text{L}$  svakog pojedinog uzorka mlijeka odnosno jogurta. U ostale redove jažica otpipetirano je po 180  $\mu\text{L}$  sterilne vode. Deseterostruka razrjeđenja uzoraka rađena su na način da je 20  $\mu\text{L}$  suspenzije mlijeka tj. jogurta preneseno iz prvoga reda u drugi red, te potom u svaki sljedeći red. Nakon toga, po 10  $\mu\text{L}$  svakog razrjeđenja nasadeno je na TBX agar. Nasađene podloge inkubirane su pri temperaturi od 37 °C tijekom 24 sata. Isti postupak deseterostrukog razrjeđenja te nasađivanja na TBX agar ponovljen je do 3, 5, 7 i 10 dana nakon inokulacije bakterija u uzorke mlijeka i jogurta. Porast kolonija *E. coli* na TBX agaru očitao je nakon inkubacije od 24 sata pri 37 °C te je prepoznat po karakteristično plavo- zelenoj boji.

## 4. REZULTATI

Tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada ispitan je utjecaj temperature na kinetiku rasta bakterija *E. coli* koje su inokulirane u uzorke trajnog mlijeka s 2,8 % mliječne masti te tekućeg jogurta također s 2,8% mliječne masti. Utjecaj temperature na razmnožavanje *E. coli* u uzorcima mlijeka i jogurta praćen je u vremenskom razdoblju od 10 dana.

### 4.1. Kinetika rasta *E. coli* u mlijeku

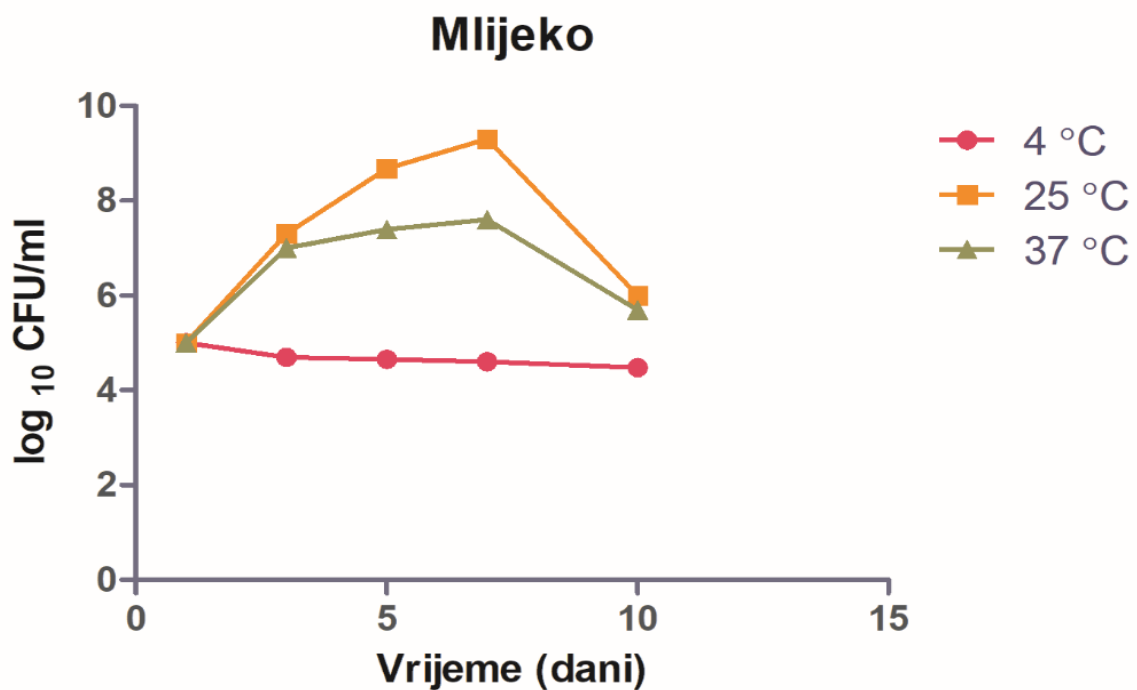
Neposredno nakon inokulacije *E. coli*, suspenzije mlijeka su deseterostruko razrijeđene i nasađene na TBX agar kako bi se odredila početna koncentracija bakterija u uzorcima. TBX agar je potom inkubiran tijekom 24 sata pri temperaturi od 37 °C, a broj bakterija očitani nakon navedenog razdoblja te je iznosio  $1 \times 10^5$  CFU/ml za sva tri uzorka mlijeka. Suspenzije mlijeka su neposredno nakon inokulacije inkubirane na tri različite temperature (4° C , 25 °C, 37° C). Isti postupak deseterostrukog razrjeđenja suspenzije te nasađivanja na TBX agar ponovljen je u vremenskim razdobljima od tri, pet, sedam te deset dana nakon inokulacije bakterija, a broj bakterija očitani nakon inkubacije od 24 sata.

Treći dan od inficiranja uzorka mlijeka inkubiranog na 4 °C, broj bakterija je iznosio  $5 \times 10^4$  CFU/ml. Petog dana broj bakterija je iznosio  $4,5 \times 10^4$  CFU/ml. Sedmog dana očitani je porast bakterija te je broj iznosio  $4 \times 10^4$  CFU/ml, dok je desetog dana od inokulacije broj bakterija iznosio  $3 \times 10^4$  CFU/ml.

Na TBX agaru, na kojeg je prethodno nasađena suspenzija mlijeka koja je bila inkubirana pri sobnoj temperaturi od 25 ° C, broj bakterija je trećeg dana iznosio  $2 \times 10^7$  CFU/ml. Petog dana od inokulacije broj bakterija je iznosio  $4,8 \times 10^8$  CFU/ml, dok je sedmog dana broj bakterija bio

$2 \times 10^9$  CFU/ml. To je ujedno i najveći broj bakterija koji je zabilježen tijekom ovog eksperimenta. Desetog dana od inokulacije broj bakterija iznosio je  $1 \times 10^6$  CFU/ml .

Suspenzija mlijeka koja je bila inkubirana pri  $37^\circ\text{C}$  također je deseterostruko razrijeđivana te nakapavana na TBX agar. Broj bakterija trećeg dana od inokulacije je iznosio  $1 \times 10^7$  CFU/ml, dok je petog dana broj bio  $2,5 \times 10^7$  CFU/ml. Sedmog dana očitano je broj bakterija od  $4 \times 10^7$  CFU/ml dok je desetog dana od inokulacije broj bakterija iznosio  $5 \times 10^5$  CFU/ml.



Slika 1. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u mlijeku nakon inkubacije pri temperaturama od  $4^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  i  $37^\circ\text{C}$ . Broj bakterija praćen je svakog drugog dana tijekom vremenskog razdoblja od 10 dana.

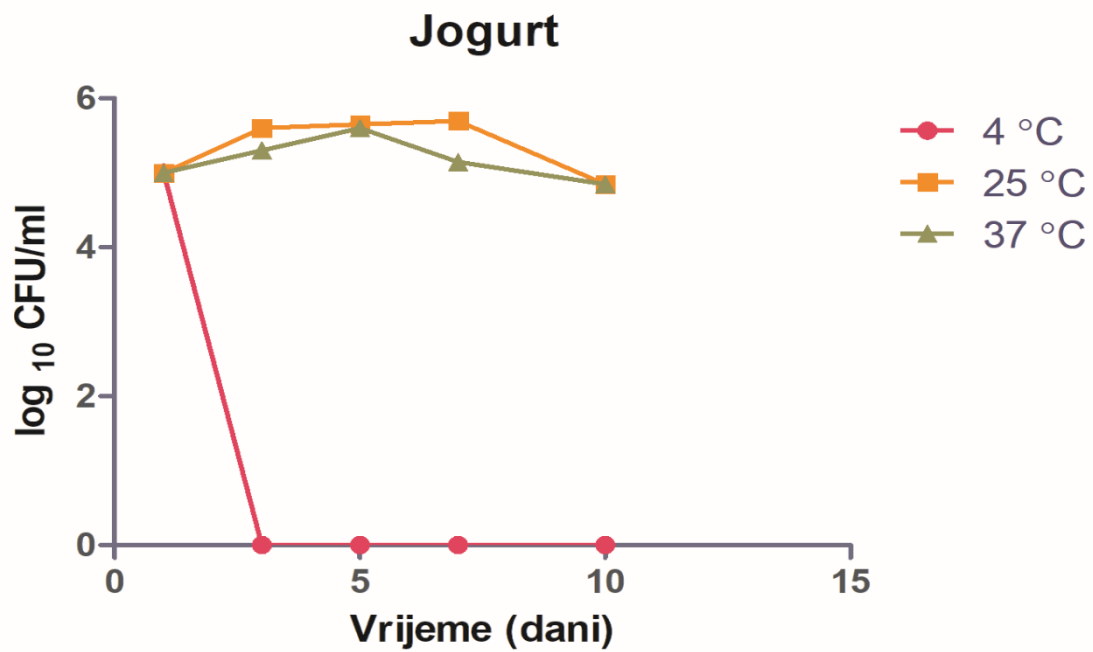
#### 4.2. Kinetika rasta *E. coli* u tekućem jogurtu

Prilikom praćenja kinetike rasta bakterije *E. coli* u tekućem jogurtu, također su provedeni postupci deseterostrukog razrjeđenja suspenzije te nasađivanja na TBX agar. Suspenzije jogurta bile su inkubirane pri tri različite temperature (4 °C , 25 °C , 37 °C) kao i suspenzije mlijeka. Praćenje kinetike rasta *E. coli* u jogurtu provedeno je tijekom razdoblja od deset dana na način da su suspenzije nasađene na TBX agar odmah nakon inokulacije bakterija te nakon tri, pet, sedam i deset dana. Uzorci su zatim inkubirani na 37 °C tijekom 24 sata te je nakon toga razdoblja očitani broj bakterija *E. coli*. Prvog dana broj bakterija u jogurtu iznosio je  $1 \times 10^5$  CFU/ml u sve tri suspenzije.

Praćenje kinetike rasta *E. coli* u uzorku jogurta inkubiranog pri 4 °C provedeno je tijekom deset dana, no već trećeg dana od inficiranja uzorka na TBX agaru nije došlo do porasta kolonija. Možemo zaključiti kako *E. coli* ne preživljava u jogurtu pri temperaturi od 4 °C.

Na TBX agaru na kojeg je nasađena suspenzija jogurta prethodno inkubirana na 25 °C te deseterostruko razrijeđena, trećeg dana od inokulacije očitani broj bakterija od  $4 \times 10^5$  CFU/ml. Broj bakterija je petog dana iznosio  $4,5 \times 10^5$  CFU/ml, dok je sedmog dana porastao do  $5 \times 10^5$  CFU/ml. Slično kao i kod suspenzije mlijeka, i u jogurtu je najveći broj bakterija očitani u periodu od sedam dana pri 25 °C. Nakon deset dana, broj bakterija u jogurtu je iznosio  $7 \times 10^4$  CFU/ml.

Kinetika rasta *E. coli* praćena je i u suspenziji jogurta koja je bila inkubirana pri temperaturi od 37 °C. Trećeg dana od inokulacije bakterija u jogurt, izbrojano je  $2 \times 10^5$  CFU/ml *E. coli*. Petog dana broj bakterija bio je  $4 \times 10^5$  CFU/ml, dok se nakon sedam dana broj bakterija spustio do  $1,4 \times 10^5$  CFU/ml, a desetog dana do  $7 \times 10^4$  CFU/ml.



Slika 2. Kinetika rasta bakterije *E. coli* u jogurtu nakon inkubacije pri temperaturama od 4 °C, 25 °C i 37 °C. Broj bakterija praćen je svakog drugog dana tijekom vremenskog razdoblja od 10 dana.

## 5. RASPRAVA

*Escherichia coli* je gram negativni fakultativno anaerobni bacil. Neki sojevi *E. coli* čine dominantni dio crijevne mikroflore čovjeka ljudi te doprinose normalnoj fiziologiji probavnog sustava, dok s druge strane neki sojevi *E. coli* uzrokuju infekcije gastrointestinalnog i mokraćnog sustava. Najčešći sojevi *E. coli* koji su uzročnici infekcija probavnog sustava jesu intestinalni sojevi: Enterotoksična *E. coli*, Enteropatogena *E. coli*, Enteroinvazivna *E. coli* te Enterohemoragična *E. coli*. Ekstraintestinalni sojevi bakterija uzrokuju infekcije izvan probavnog sustava. Najčešći ekstraintestinalni soj *E. coli* je Uropatogena *E. coli* koja uzrokuje infekcije mokraćnog sustava. Bakterija *E. coli* se i izvan organizma čovjeka brzo i lako razmnožava ukoliko su zadovoljeni optimalni uvjeti za rast. Također, bakterija *E. coli* se upotrebljava kao indikator fekalne kontaminacije voda te kao indikator higijene mlijeka.

*E. coli* je mezofilna bakterija te joj za rast i razmnožavanje odgovaraju temperature 20-40 °C. Iako se 37 °C smatra optimalnom temperaturom za razmnožavanje, prethodna istraživanja su dokazala da se *E. coli* uspješno razmnožava na temperaturama manjim od 30 °C te da u prirodi može dulje preživjeti na nižim nego na višim temperaturama u odnosu na optimalnu temperaturu rasta. Također prethodna istraživanja su dokazala da nekim sojevima *E. coli* za rast i razmnožavanje više odgovaraju fluktuirajuće temperature nego stalne temperature. U ovom istraživanju koje je provedeno u svrhu završnog rada praćen je utjecaj temperature na kinetiku rasta bakterija *E. coli* u mlijeku i tekućem jogurtu. Neposredno nakon inokulacije bakterija u uzorke mlijeka i jogurta, suspenzije su deseterostruko razrijeđene te nasadene na TBX agar, a broj bakterija bio je očitao nakon 24 sata. Isti postupak deseterostrukog razrjeđivanja te nanošenja na agar ponovljen je u periodima od tri, pet, sedam i deset dana od inokulacije. U svim navedenim periodima broj bakterija je očitao nakon 24 sata, a istraživanje je trajalo deset dana i ponovljeno je 2 puta.

Bakterija *E. coli* pokazala je sposobnost razmnožavanja u uzorcima mlijeka inkubiranim na tri različite temperature (4 °C, 25 °C, 37 °C), dok su se bakterije *E. coli* inokulirane u tekućem jogurtu razmnožavale samo pri temperaturama od 25 °C te 37 °C. Prilikom inkubacije jogurta na 4 °C, *E. coli* nije pokazala sposobnost razmnožavanja. Već trećeg dana od inokulacije nije došlo do porasta bakterija koje su bile inkubirane pri 4 °C u tekućem jogurtu te porast kolonija u tom uzorku nije očitani niti narednih dana. Očitani broj bakterija trećeg dana od inokulacije bio je veći nego prvog dana za sve uzorke osim za suspenziju mlijeka koja je bila inkubirana na 4°C. Nadalje, u odnosu na treći dan pokusa, petog dana od inokulacije u svim uzorcima je očitani je veći broj bakterija, a izuzetak je suspenzija jogurta inkubirana na 4 °C. Također broj bakterija u mlijeku je konstantno bio viši u odnosu na broj bakterija u tekućem jogurtu. Primjerice broj bakterija u mlijeku inkubiranih na 25 °C petog dana od inokulacije iznosio je  $4,8 \times 10^8$  CFU/ml, dok je istog dana broj bakterija u tekućem jogurtu inkubiranih na istoj temperaturi iznosio  $4,5 \times 10^5$  CFU/ ml. Sedmog dana od inokulacije očitani je najveći broj bakterija koje su bile inkubirane u mlijeku pri 25 °C i 37 °C te bakterija inkubiranih u tekućem jogurtu pri 25 °C. Očitani broj bakterija je sedmog dana od inokulacije bio manji u odnosu na peti dan jedino u uzorku mlijeka inkubiranog pri temperaturi od 4°C te tekućeg jogurta pri temperaturi od 37 °C. Devetog dana od inokulacije očitani broj bakterija na TBX agaru bio je manji nego sedmog dana za sve suspenzije mlijeka i tekućeg jogurta inkubirane na tri različite temperature. Stoga je za pretpostaviti da su do tada bakterije potrošile većinu prisutnih hranjivih tvari te su uvjeti nužni za razmnožavanje nakon sedmog dana od inokulacije postali manje pogodni.

Rezultati ovog istraživanja su pokazali da se *E. coli* u mlijeku razmnožava značajno bolje nego u tekućem jogurtu te je zaključeno da više odgovaraju uvjeti u mlijeku nego u tekućem jogurtu. Pretpostavljamo da je razmnožavanje *E. coli* u jogurtu inhibirano s obzirom na znatno niži pH te prisutnost drugih bakterija koje također troše hranjive sastojke.

Nadalje, istraživanje je također dokazalo da se bakterija *E. coli* najbolje razmnožava pri temperaturi od 25 °C. Primjerice očitani broj bakterija *E. coli* inkubiranih u mlijeku pri temperaturi od 25 °C sedmog dana od inokulacije je iznosio  $2 \times 10^9$  CFU/ ml, dok je istog dana od inokulacije broj bakterija inkubiranih pri 4°C iznosio  $4 \times 10^4$  CFU/ml, a  $4 \times 10^7$  CFU/ml predstavlja broj bakterija inkubiranih na 37 °C. Sedmog dana od inokulacije očitani broj bakterija inkubiranih u tekućem jogurtu pri temperaturi od 25 °C je iznosio  $5 \times 10^5$  CFU/ ml, dok je broj bakterija inkubiranih na 37 °C iznosio  $1,4 \times 10^5$  CFU/ ml.

S obzirom na dobivene rezultate, možemo zaključiti da bakteriji *E. coli* za razmnožavanje u mlijeku i jogurtu najviše odgovara temperatura od 25 °C u odnosu na temperature od 4 °C te 37 °C. Međutim temperatura je samo jedan od čimbenika nužnih uvjeta za razmnožavanje bakterija. Osim temperature bakterijama su za rast potrebne i optimalne pH vrijednosti, aktivitet vode, koncentracija kisika te ugljikovog dioksida.



## 6. ZAKLJUČAK

Zaključci koji su doneseni tijekom izrade završnog rada:

1. . Bakterija *E. coli* raste i razmnožava se u mlijeku pri temperaturama od 4° C, 25° C i 37° C.
2. Bakterija *E. coli* raste i razmnožava se jogurtu pri temperaturama od 25° C i 37° C, dok nema sposobnost razmnožavanja u jogurtu pri temperaturi od 4° C.
3. Bakterija *E. coli* pokazuje bolji porast u mlijeku u odnosu na jogurt.
4. U uzorcima mlijeka i jogurta bakterija *E. coli* najbolje se razmnožava pri temperaturi od 25° C.

## 7. LITERATURA

- (1) Kalenić S. i suradnici, Medicinska mikrobiologija, Medicinska naklada, Zagreb 2019., str. 207-213
- (2) Jang J, H-G Hur, Byappanahalli MJ, Yan T, Ishii S. Enviromental *E. coli* : Ecology and Public Health Implications- A Review. J. Appl Microbiol. 2017 Sep; 123 (3):570-581
- (3) Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *E. coli*. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb ; 2 ( 2) :123-40
- (4) Nataro JP, Kaper JB. Diarrhegenic *E. coli* , Clin. Microbiol. Rev, 1998 Apr ; 11 (2) :403
- (5) Balows A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology, 5th ed. Washington D. C : American Socienty for Microbiology ; 1991
- (6) Evans DJ, Evans DG , Baron S. *E. coli* in Diarrheal Disease, In Medical Microbiology., 4th edition. Galveston (TX) : University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 25.
- (7) Mellata M. Human and Avian Extraintestinal Pathogenic *E. coli* : Infections, Zoonotic Risk and Antibiotic Resistance Trends, Foodborne Pathog Dis. 2013 Nov ; 10 (11): 916-32
- (8) Iguchi A, Mentzer A, Kikuchi T, Thomson NR. An Untypeable Enterotoxigenic *E. coli* Represents One of the Dominant Types Causing Human Disease. Microb. Genom. 2017 Jul 3 ; 3 (9)
- (9) Vipin Madhavan TP, Sakellaris H. Colonization Factors of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Adv. Appl Microbial. Review, 2015 ; 90 : 155-97
- (10) Pearson JS, Giogha C, Tania Wong Fok Lung, Hartland EL. The Genetics of Enteropathogenic *E. coli* Virulence. Annu Rev Genet. 2016 Nov 23; 50:493-513

- (11) Mc Daniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, Kaper JB. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. PNAS 92 : 1664-68
- (12) Jawetz, Melnick & Adelberg , Medicinska mikrobiologija, Mc Graw Hill ,26. izdanje, 1. hrvatsko izdanje, Split 2015.
- (13) Michelacci V, Prosseda G, Maugliani A, Tozzoli R, Sanchez S, Dallmann T, Jenkins C, Caprioli A, Morabito S. Characterization of an Emergent Clone of Enteroinvasive *E. coli* Circulating in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 2016 Mar; 22 (3):287
- (14) Beld MJC, Reubsaet FAG. Differentiation Between Shigella, Enteroinvasive *E. coli* and Noninvasive *E. coli* . Eur J Clin Microbiol. Infect Dis 2012 Jun ; 31 (6) : 899-904
- (15) Karch H. The Role of Virulence Factors in Enterohemorrhagic Escherichia Coli (EHEC)—associated hemolytic-uremic syndrome . Semin Thromb Hemost. 2001 Jun ; 27 (3): 207-13
- (16) Karch H, Köhler B. New Knowledge of the Molecular Biology of Enterohemorrhagic Escherichia Coli. Gesundheitswesen 1999 Oct; 61 Spec No 1 : 546-51
- (17) Tabasi M , Karam MR , Habibi M , Mostafavi E , Bouzaris. Genotype characterization of virulence factors in *E. coli* isolated from patients with acute cystitis , pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. J Clin Diagn 2016; 10 (12)
- (18) Bartoletti R, Cai T, Wagenlehner FM ,Naber K , Bjerklund Johansen TE. Treatment of urinary tract infection and antibiotic stewardship. Eur Urol Suppl. 2016. Jul ; 15 (4):81-87
- (19) Mann R, Mediati DG, Duggin IG, Harry E, Bottomley AL. Metabolic Adaptation of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. Front Cell Infect Microbiol. 2017 Jun 8 ; 7
- (20) Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 1992. April; 36 (4) :695-703

- (21) Lixz , Plesiat P, Nikaido H. ,The challenges of efflux- mediated antibiotic resistance in Gram negative bacteria. Clin Microbiol. Rev. 2015 Apr; 28(2):337-418
- (22) Ombarak R, Hineoya A, Elbagory AM, Yamasaki S. Prevalence and molecular characterization of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from raw milk and raw cheese in Egypt. J. Food Prot. 2018 . Feb;81 (2):226-232
- (23) Duraković L, Duraković S. Mikrobiologija namirnica , Osnove i dostignuća , Kugler,2001. , str. 11.
- (24) Usajewicz I, Nalepa B .Survival of *E. coli* O157:H7 in Milk Exposed to High Temperature and High Pressure. Food Techol. Biotechol.44 (1) 33-39 (2006.)
- (25) Herceg Z, Režek Jambrak A, Lelas V, Mededović Thagard S. The effect of high intensity ultrasound treatment on the amount of *S. aureus* and *E. coli* in milk. Vol. 50. No. 1, 2012.
- (26) Hoskin R, Cessna J. From raw milk in dairy products. 2016. United States Department of Agriculture Economic Research Service, Washington; DC
- (27) Rosenau M.J. Pasterization in : Milk and its Relation to the Public Health. Hygienic Laboratory Bulletin No. 41. Goverment Printing Office , Washington, DC 1908:591-628
- (28) Boor KJ, Murphy WM, Alcaine S. A 100- Year Review: Microbiology and Safety of Milk Handling . J Dairy Sci. 2017 Dec; 100 (12):9933-9951
- (29) Qigley L, Sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross P, Fitzgerald G, Cotter PD. The Complex Microbiota of Raw Milk, Review. FEMS Microbiol. Rev. 2013. Sep;37 (5):664-98
- (30) Kable ME, Srisengfa Y, Laird M, Zaragoza J, Mc Lead J , Heidenreich J, Marceu ML. The Core and Seasonal Microbiota of Raw Bovine Milk in Tanker Trucks and the Impact of Transfer to Milk Processing . mBio. 2016 Aug 23; 7(4): e 00836-16

- (31) Svetlana Ferreira Lima, Marcela Lucas de Souza Bicalho, Rodrigo Carvalho Bicalho, Evaluation of Milk Sample Fractions for Characterization of Milk Microbiota From Healthy and Clinical Mastitis Cows , PLoS One. 2018 Mar 21; 13 (3)
- (32) Jelovac N, Perković A, Pupovac M, Trontel A, Slavica A. Catabolism of Amino Acids in the Cells of Lactis Acid Bacteria. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju , biotehnologiju i nutrcionizam 6 (1-2), 25-36 (2011.)
- (33) Kršev LJ. Fermented milks; influence on health .Mljekarstvo : časopis za unaprjeđenje proizvodnje i prerade mlijeka , Vol. 46, No.1 ,1996
- (34) Langer et al. Non pasteurized dairy products , disease out breaks and state laws – United State , 1993-2006. Emerg Infect Dis 18 : 385-391
- (35) Lopez- Valladares G, Danielsson-Tham ML, Tham W. Implicated Food Products for Listeriosis and Changes in Serovars of Listeria monocytogenes Affecting Human sin Recent Decadess, Foodborne pathogens and disease , Vol.15, No. 7, 2018.
- (36) Otanhajmer I. *E. coli* as an indicator of hygienic conditions in milk production . Veterinarski i mlekarski institut Zavod za mlekarstvo, Novi Beograd, Vol. 39, No. 7,1989.

## **ŽIVOTOPIS**

Rođena sam 27. svibnja 1998. godine u Rijeci. Osnovnu školu dr. Andrija Mohorovičić završila sam u Matuljima 2013. godine te sam iste godine upisala Gimnaziju Eugena Kumičića u Opatiji. Opći smjer navedene Gimnazije završila sam 2017. te potom iste godine upisala sveučilišni preddiplomski studij sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci.