

## ZNANSTVENO MIŠLJENJE

### O mikrobiološkim opasnostima u svježim i polutvrđim sirevima na tržnicama RH i njihovim kemijskim parametrima

Donositelj znanstvenog mišljenja (sukladno članku 7. st. 3. Pravilnika o sadržaju, obrazloženju i objavi znanstvenih mišljenja HAH-a)

(Zahtjev HAH-Z-2016-1)

Usvojeno 08. studenog 2016.

#### ČLANOVI ZNANSTVENOG ODBORA ZA BIOLOŠKE OPASNOSTI

Prof. dr. sc. Lidija Kozačinski, Veterinarski fakultet, Zagreb, predsjednica ZO

Dr. sc. Relja Beck, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, zamjenik predsjednice ZO

Doc. dr. sc. Andrea Humski, Hrvatski veterinarski institut, Zagreb

Dr. sc. Andrea Benussi Skukan, Centar za kontrolu namirnica-Prehrambeno biotehnološki fakultet, Zagreb

Dr. sc. Ivančica Kovaček, Nastavni zavod za javno zdravstvo „Andrija Štampar“, Zagreb

#### Koordinatorice izrade Znanstvenog mišljenja

Dr. sc. Brigita Hengl, Hrvatska agencija za hranu

Danijela Stražanac, dipl. ing. preh. teh.

## SAŽETAK

Sir je svježi ili zreli proizvod dobiven grušnjem mlijeka uz izdvajanje sirutke i vrlo je popularna namirnica u mnogim zemljama zbog svoje arome i povoljnog utjecaja na zdravlje ljudi. Proizvodnja sira kompleksan je i dugotrajan proces sastavljen od niza postupaka te zahtjeva interdisciplinarni pristup s osobitim naglaskom na pridržavanje dobre higijenske prakse, kako bi konačni proizvod imao odgovarajuća senzorna, fizikalno-kemijska i mikrobiološka svojstva, te bio proizvod siguran za konzumaciju.

Mikrobiološka kakvoća sira predstavlja značajan javno-zdravstveni interes, te su kriteriji mikrobiološke ispravnosti sira i mlijeka veoma visoki (Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu). Udovoljavanje ovim mikrobiološkim kriterijima ovisi o nizu čimbenika: sirovini koja se koristi u proizvodnji sira, dakle o mlijeku i načinima njegova dobivanja, provođenju dobre higijenske prakse, tehnološkom procesu proizvodnje (proizvodnom pogonu), o uvjetima njegova čuvanja na mjestu proizvodnje, ali i domaćinstvu potrošača.

Proizvodnja sireva na obiteljskim gospodarstvima karakterizirana je malom proizvodnom serijom i predstavlja samo dio aktivnosti ili proizvodnje toga gospodarstva. Uvjeti proizvodnje sireva ovise o svjesnosti i edukaciji proizvođača koji se time bave i nisu ujednačeni kao što se očekuje u industrijskoj proizvodnji, stoga i može doći do odstupanja i u provođenju dobre proizvođačke prakse.

Mlijeko, kao sirovina za proizvodnju sira, može biti kontaminirano mikroorganizmima uslijed bolesti mliječne žlijezde ili je mlijeko kontaminirano tijekom daljnje obrade nakon mužnje. Ukoliko je izostavljena faza toplinske obrade, eventualno prisutni patogeni mikroorganizmi biti će prisutni i u proizvodima od takvog mlijeka. Također, moguća je naknadna kontaminacija sireva patogenim mikroorganizmima uslijed neadekvatne higijene tijekom proizvodnje, a na broj i vrstu prisutnih mikroorganizama u siru utjecat će i način transporta i pohrane sireva na prodajnom mjestu (nepoštivanje hladnog lanca).

Stoga je cilj ovog istraživanja bio dobiti uvid u mikrobiološku sliku tradicionalno proizvedenih sireva koji se prodaju na tržnicama velikih gradova u RH (Zagreb, Rijeka, Split i Osijek).

Osim mikrobiološke kakvoće (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 i *Salmonella* spp.) u ovom istraživanju određeni su i parametri kakvoće sira (udio vode, masti, bjelanjčevina i količina soli (NaCl), pH), te kao važan kriterij sigurnosti određena je i količina aflatoksina M<sub>1</sub> u sirevima.

Za potrebe istraživanja uzorkovani su tradicionalni (autohtoni) svježi i polutvrđi sirevi od kravljeg mlijeka proizvedeni na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, a koji se prodaju na tržnicama u Zagrebu, Osijeku, Splitu i Rijeci. Uzorkovanje je provedeno dva puta, u ljetnim i zimskim mjesecima.

Rezultati su pokazali kako niti jedan uzorak sira nije bio kontaminiran s bakterijama *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp. Prosječna kontaminacija s bakterijom *E. coli* u svježem siru iznosila je  $1,3 \times 10^2$  cfu/g, a u polutvrdom siru  $3,65 \times 10^1$  cfu/g. Kontaminacija sireva s bakterijom *E. coli* u broju do  $10^2$  cfu/g smatra se niskom, te predstavlja zanemarujući rizik za ljudsko zdravlje i pokazatelj je dobre higijene proizvodnje. Prosječna kontaminacija svježeg sira s bakterijom *S. aureus* iznosila je  $1,21 \times 10^1$  cfu/g, a u polutvrdom siru  $2,01 \times 10^1$  cfu/g, što je odraz zadovoljavajućeg stanja i niske mikrobiološke kategorije rizika.

Na aflatoksin M<sub>1</sub> analizirani su uzorci sireva iz zimskog uzorkovanja. Dva uzorka su imala vrijednost veću od 0,01 µg/kg (0,047 i 0,022 µg/kg AFM<sub>1</sub>), no to nije imalo veći utjecaj na prosječnu vrijednost koja je iznosila 0,011 µg/kg. Uobičajeno je da se prisutnost mikotoksina u hrani prati tijekom duljeg razdoblja, kroz barem 3 godine. Kako naši podaci predstavljaju rezultate tek jedne godine, ne mogu se kvalitativno procijeniti.

## KLJUČNE RIJEČI

Svježi i polutvrđi sirevi, mikrobiološka ispravnost, kemijski sastav, tržnice, sigurnost hrane

## SUMMARY

Cheese is a fresh or ripe product obtained by milk coagulation with a separation of whey and it is very popular food in many countries because of its flavor and favorable impact on human health. Cheese production is complex and time consuming process consisting of a series of procedures, and requires interdisciplinary approach with particular emphasis on maintaining good hygienic practice to get final product of desired sensory, physico-chemical and microbiological properties to be safe for consumption.

Microbiological quality of cheese represents a significant public health interest and the criteria of microbiological quality are very high (Regulation (EC) no. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs). Compliance with the microbiological criteria depends on a number of factors: used raw materials (the milk) and the way they are obtained, maintaining of good hygienic practice, technological process of production (manufacturing facility), storage conditions at the place of production, and consumer's household.

Cheese production on family farms is characterized by the small batch and represents only part of the activities or production of that farm. Production conditions depend on the awareness and education of producer and are not uniform as it is expected in industrial production. Therefore, the implementation of good manufacturing practices may vary.

Milk, as a raw material for cheese production, can be contaminated by microorganisms due to diseases of the mammary glands or it can be contaminated during the processing after milking. If phase of thermal processing is missing, eventual pathogen microorganisms will be present in products made from such milk. Furthermore, subsequent cheese contamination by pathogen microorganisms is possible due to inadequate hygienic conditions during the production, and number and type of pathogen microorganisms will depend on transportation and storage of cheese at the sales points (cold chain).

The purpose of this project was to gain insight into microbiological quality of traditionally produced cheeses sold at markets of major cities in Croatia (Zagreb, Rijeka, Split and Osijek).

In addition to microbiological quality (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella* spp.) in this study the quality parameters of the cheese are examined (content of water, fat, protein, salt (NaCl), and pH), as well as an important safety criterion, the proportion of aflatoxin M<sub>1</sub> in cheese.

For this study, samples of traditional (domestic) fresh and semi-soft cheeses from cow's milk produced on family farms that are sold at markets in Zagreb, Osijek, Split and Rijeka were taken. Sampling was carried out twice, in summer and winter months.

Results showed that none of samples were contaminated with bacteria *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. The average contamination of *E. coli* in fresh cheese was  $1.3 \times 10^2$  cfu/g, and in the semi-soft cheese  $3.65 \times 10^1$  cfu/g. Contamination of cheese to  $10^2$  cfu/g of *E. coli* is considered as low and it does not pose a risk for human health and is an indicator of good hygiene. The average contamination of fresh cheese with *S. aureus* was  $1.21 \times 10^1$  cfu/g, and in the semi-soft cheese it was  $2.01 \times 10^1$  cfu/g which is reflection of satisfying condition and low level of microbiological risk.

Samples from winter sampling are analyzed on aflatoxin M<sub>1</sub>. Two samples had values greater than 0.01 µg/kg (0.047 and 0.022 µg/kg AFM<sub>1</sub>) but this did not have a greater impact on the average value of 0.011 µg/kg. Common practice is to monitor presence of mycotoxins in food during longer period of time, for at least three years. As our data represent the results of only one year, these can not be qualitatively assessed.

## KEY WORDS

Fresh and semi-soft cheeses, microbiological safety, chemical composition, market, food safety

## **ZAHVALE**

Hrvatska agencija za hranu zahvaljuje svim članovima Znanstvenog odbora i vanjskim stručnjacima na doprinosu u izradi ovog znanstvenog mišljenja.

## SADRŽAJ

SAŽETAK.....	2
KLJUČNE RIJEČI .....	2
SUMMARY.....	3
KEY WORDS .....	3
ZAHVALE .....	4
UVOD .....	7
TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE SIRA .....	9
PROCJENA RIZIKA .....	10
1. IDENTIFIKACIJA OPASNOSTI .....	10
2. KARAKTERIZACIJA OPASNOSTI.....	11
2.1. <i>Escherichia coli</i> O157 (VTEC ili STEC).....	11
2.2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
2.4. <i>Salmonella</i> spp. ....	12
2.5. <i>Campylobacter</i> spp. ( <i>jejuni/coli</i> ).....	13
2.6. Aflatoksin M <sub>1</sub> i M <sub>2</sub> u mlijeku .....	13
3. PROCJENA IZLOŽENOSTI.....	14
3.1. Rezultati kemijske i mikrobiološke analize sira (Split, Zagreb, Rijeka, Osijek).....	14
3.1.1. UZORKOVANJE .....	14
3.1.2. MIKROBIOLOŠKE ANALIZE .....	15
ODREĐIVANJE bakterija <i>Campylobacter</i> spp. ....	15
3.1.3. KEMIJSKE ANALIZE .....	15
ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI SIRA .....	16
ODREĐIVANJE AFLATOKSINA .....	16
3.1.4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA .....	16
3.1.4.1. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE PRETRAGE SIREVA .....	16
3.1.4.2. REZULTATI KEMIJSKE PRETRAGE SIREVA .....	19
4. KARAKTERIZACIJA RIZIKA .....	21
<i>E. coli</i> u svježem siru .....	21
<i>E. coli</i> u polutvrdom siru .....	21
<i>S. aureus</i> u svježem siru .....	22
<i>S. aureus</i> u polutvrdom siru .....	22
Mikotoksini.....	24
ZAKLJUČCI.....	24
PREPORUKE.....	25
LITERATURA .....	26

<b>DODATAK 1</b> .....	30
<b>UPITNIK o podacima prikupljenih kravljih sireva na tržnicama RH</b> .....	30
<b>DODATAK 2</b> .....	31
<b>Predviđanje rasta bakterije <i>Escherichia coli</i> u svježim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i <math>a_w</math></b> .....	31
<b>Predviđanje rasta bakterije <i>Escherichia coli</i> u polutvrdim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i <math>a_w</math></b> .....	34
<b>Predviđanje rasta bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> u svježim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i <math>a_w</math></b> .....	37
<b>Predviđanje rasta bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> u polutvrdim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i <math>a_w</math></b> .....	40

## UVOD

Sir je namirnica koja se u mnogim zemljama konzumira zbog posebnosti arome, ali i povoljnog utjecaja na zdravlje uslijed prisutnosti prirodnih probiotika. Bogat je izvor kalcija, fosfora i bjelančevina. Proizvodnja sira kompleksan je i dugotrajan proces sastavljen od niza postupaka te zahtjeva interdisciplinarni pristup s ciljem dobivanja konačnog proizvoda željenih senzornih, fizikalno-kemijskih i mikrobioloških svojstava (Choi i sur., 2016).

Sir može biti kontaminiran kemijskim i mikrobiološkim kontaminantima. Od kemijskih kontaminanata propisi nalažu pratiti rezidue antibiotika i veterinarskih pripravaka, ostatke pesticida, te sredstva za čišćenje i dezinfekciju. Mikrobiološki kontaminanti obuhvaćaju patogene ili potencijalno patogene mikroorganizme.

Nadalje, mikrobiološka kakvoća mlijeka i sira predstavlja značajan javno-zdravstveni interes jer je riječ o vrsti namirnica koje su zbog svog kemijskog sastava idealni supstrat za rast i razmnožavanje brojnih mikroorganizama, a samim time mogu biti izvor različitih uzročnika bolesti.

Stoga je Uredba Komisije (EZ) br. 2073/2005 o mikrobiološkim kriterijima za hranu, koja se odnosi na mikrobiološku ispravnost mlijeka i sireva vrlo visoka u svojim zahtjevima. Udovoljavanje ovim mikrobiološkim kriterijima ovisi o nizu čimbenika: sirovini, odnosno o mlijeku i načinima njegova dobivanja, o tehnološkom procesu proizvodnje, tehnološkim uvjetima i izvedbi proizvodnih pogona, te o uvjetima čuvanja proizvoda na mjestu proizvodnje, u vlastitom domaćinstvu potrošača i na tržištu.

Neki autori smatraju (Kousta i sur., 2010) da su sirevi jedna od najsigurnijih vrsta hrane kada je u pitanju njihova mikrobiološka ispravnost. No, unatoč tome u svijetu su zabilježene epidemije uzrokovane raznim vrstama sireva, s velikim brojem oboljelih, ali i smrtnim ishodom (tablica 1). EFSA je u izvješću za 2006. godinu iznijela podatak da su među svim prijavljenim bolestima koje se prenose hranom u Europi, sirevi kao izvori zaraza bili zastupljeni 0,4 % (EFSA, 2008).

**Tablica 1** Prijavljene epidemije uzrokovane različitim vrstama sireva

Vrsta sira	Patogen	Broj zabilježenih slučajeva (smrtni slučajevi)	Godina	Zemlja podrijetla	Literatura
Meki sir od nepasteriziranog mlijeka	<i>L. monocytogenes</i>	122 (33)	1983-1987	Švicarska	Büla, Bille i Glauser (1995)
Meksički meki sir od pasteriziranog mlijeka	<i>L. monocytogenes</i>	142 (48)	1985	SAD	Linnan i sur. (1988)
Sir Camembert	<i>L. monocytogenes</i>	2	1989	Luksemburg	Ries, Dicato, Hemmer i Arendt (1990)
Sir s plavom plijesni / tvrdi sir	<i>L. monocytogenes</i>	26 (6)	1989-1990	Danska	Jensen, Frederiksen i Gerner – Smidt (1994)
Meki sir	<i>L. monocytogenes</i>	37 (11)	1995	Francuska	Vaillant, Maillot, Charley i Stainer (1998)
Meki sir	<i>L. monocytogenes</i>	14	1997	Francuska	Jacquet, Saint-Cloment, Brouille, Catimel i Rocourt (1998)
Meksički sir od sirovog mlijeka	<i>L. monocytogenes</i>	13	2000	SAD	MacDonald i sur. (2005)
Meki sir	<i>L. monocytogenes</i>	33	2001	Švedska	Carrique-Mas i sur. (2003)
Meki sir	<i>L. monocytogenes</i>	12 (3)	2005	Švicarska	Bille i sur. (2005)
Mozzarella	<i>Salmonella</i>	> 100	1981	Italija	Huchot, Bohnert, Cerf, Farrokh i Lahellec (1993)
Mozzarella od pasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i>	321 (2)	1981	SAD	Altekruse, Timbo, Mowbray, Bean i Potter (1998)
Cheddar od nepasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i>	> 1700	1984	Kanada	D'Aoust i sur. (1985)

Farmski sir*	<i>Salmonella</i>	35	1985	Finska	Huchot i sur. (1993)
Meki sir od nepasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i>	42	1989	Engleska i Wales	Maguire i sur. (1992)
Mozzarella od pasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i>	164	1989	SAD	Hedberg i sur. (1992)
Kozji sir od sirovog mlijeka	<i>Salmonella</i>	277	1990	Francuska	Grimont i Bouvet (1991)
Kozji sir od sirovog mlijeka	<i>Salmonella</i>	273 (1)	1993	Francuska	Desenclos i sur. (1996)
Meki sir sa farme od nepasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i>	35	1994	Kanada	Ellis i sur. (1998)
Mont d'Or sir od sirovog mlijeka	<i>Salmonella</i>	25 (5)	1995	Francuska	Vaillant i sur. (1996)
Mont d'Or sir od sirovog mlijeka	<i>Salmonella</i>	14 (1)	1996	Francuska	Infuso, Vaillant i Desenclos (1997)
Morbier sir od sirovog mlijeka	<i>Salmonella</i>	113	1997	Francuska	Delaroque Astagneau i De Walk (1998)
Meksički meki sir od nepasteriziranog mlijeka	<i>Salmonella</i>	17	1997	SAD	Villar i sur. (1999)
Svježi sir od sirovog mlijeka	<i>Salmonella</i>	215	2001	Francuska	Haeghebaert i sur. (2003)
Meki sir	<i>Salmonella</i>	82	2006-2007	Švicarska	Pastore i sur. (2008)
Brie i Camembert sirevi od pasteriziranog mlijeka	<i>E. coli</i>	170	1983	SAD	MacDonald i sur. (1985)
Krem sir sa farme od sirovog mlijeka	<i>E. coli</i>	4 (1)	1992	Francuska	Casenave i sur. (1993)
Farmski sir* od sirovog mlijeka	<i>E. coli</i>	22	1994	Škotska	Rampling (1996), Ammon (1997)
Krem sir sa farme od sirovog mlijeka	<i>E. coli</i>	4	1994	Francuska	Decludt (1995)
Sir Gouda od nepasteriziranog mlijeka	<i>E. coli</i> O157:H7	13	2002-2003	Kanada	Honish i sur. (2005)
Svježi nepasterizirani kozji sir	<i>E. coli</i> O157:H7	3	2004	Francuska	Espie i sur. (2006)
Sir od sirovog mlijeka	<i>S. aureus</i>	16	1981	SAD	Altekruse i sur. (1998)
Svježi ovčji sir od sirovog mlijeka	<i>S. aureus</i>	20	1983	Francuska	De Buyser, Janin i Dilasser (1985)
Sir od pasteriziranog mlijeka	<i>S. aureus</i>	2	1983	Engleska	Barrett (1986)
Ovčji sir od sirovog mlijeka	<i>S. aureus</i>	27	1984	Škotska	Bone, Bogie i Morgan-Jone (1989)
Meki sir (Vacherin Mont d'Or sir) od sirovog mlijeka	<i>S. aureus</i>	215	1985	Švicarska	Nepoznati autor (1986)
Stilton sir od nepasteriziranog mlijeka	<i>S. aureus</i>	155	1988	Engleska	Maguire i sur. (1991)
Sir od mlijeka (nije navedeno kojeg)	<i>S. aureus</i>	7	1994	Brazil	Pereira, Do Carmo, Dos Santos, Pereira i Bergdoll (1996)

Izvor: Kousta M., Mataragas M., Skandamis P., Drosinos E.H. (2010): Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farmand processing levels.

\*Farmski sir je vrsta sira koji se dobije prešanjem svježeg sira.

Mlijeko je sirovina izrazito pogodna za rast i razvoj brojnih mikroorganizama, pa i patogenih poput *S. aureus*, *Bacillus* spp., *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes*, enterotoksične *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. i *Brucella* spp. Stoga se i slučajevi bolesti povezani s konzumacijom sira u različitim zemljama stavljaju na posebno mjesto u znanstvenoj i stručnoj literaturi (Panday i sur., 2000; Hegarty i sur., 2002; Bordez-Benitez i sur., 2006; Espie i sur., 2006; Markov i sur., 2009).

Na rast mikroorganizama tijekom proizvodnje sira značajno utječu pasterizacija mlijeka, brzina zakiseljavanja ili pada pH vrijednosti i temperatura kuhanja gruš. Svi potencijalno opasni mikroorganizmi inaktiviraju se pasterizacijom, međutim, veliki broj vrsta autohtonih sireva u Hrvatskoj, proizvodi se iz sirovog, toplinski ne tretiranog mlijeka (Pavičić, 2006; Slačanac, 2007). Ukoliko je rast starter kulture za zrenje sira brz, pH gruš



također brzo pada i time je inhibiran rast potencijalno patogenih mikroorganizama koji se mogu naći u siru. Suprotno tome, ukoliko je rast starter kulture u grušu sira otežan (npr. prisutnost rezidua antibiotika u mlijeku) postoji realna opasnost rasta neželjenih mikroorganizama i lučenja njihovih enterotoksina koji će trajno ostati u proizvodu (Franz i sur., 1999; Cogan, 2000; Fox i sur., 2000). Bakteriocini koje proizvode mliječno-kisele bakterije iz starter kultura za zrenje sira također mogu biti značajan čimbenik sprječavanja rasta neželjene mikroflore u mlijeku i siru te samim time smanjivanja opasnosti po zdravlje ljudi (Stratton i sur., 1991; Loessner i sur., 2003). Kombinacija vrijeme/temperatura kuhanja gruša tijekom proizvodnje sira također je važan parametar mikrobiološke kakvoće sira. Temperature dogrijavanja gruša 34-40 °C pogoduju razvoju patogenih mikroorganizama, što se može u najvećoj mjeri izbjeći pravilnim odabirom starter kulture (Fox i sur., 2000).

Proizvodnja autohtonih sireva na malim gospodarstvima karakteristična je po postupku proizvodnje i predstavlja značajan dio tradicije u Hrvatskoj. Kao i u mnogim drugim zemljama ti su sirevi prepoznatljivi i povezani s lokalitetom gdje se proizvode. Međutim, sirevi proizvedeni na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima (OPG), mogu se zbog načina proizvodnje svrstati u rizičniju skupinu hrane, osobito svježiji i polutvrđi sirevi koji s obzirom na veći udio vode imaju i veći mikrobiološki rizik (Kyoung-Hee i sur., 2015). Dodatno je povećan rizik zbog specifičnog načina prodaje koja se odvija na tržnicama gdje se sirevi prodaju "na pultu". Sukladno preporukama o nabavci rashladnih komora za prodaju tradicionalnih mliječnih proizvoda, odnosno osiguranja hladnog lanca do krajnjeg potrošača, higijenski uvjeti prodaje sireva na tržnicama RH su se znatno popravili, ali ne i izjednačili s higijenskim uvjetima u velikim trgovačkim lancima.

Cilj ovog istraživanja bio je dobiti uvid u mikrobiološku sliku tradicionalno proizvedenih sireva koji se prodaju na tržnicama velikih gradova u RH (Zagreb, Rijeka, Split i Osijek).

Osim mikrobiološke kakvoće u ovom istraživanju određeni su i parametri kakvoće sira (udio vode, masti, bjelančevina i količine soli (NaCl), pH), te kao važan kriterij sigurnosti količina aflatoksina M<sub>1</sub>.

Dobiveni podaci i informacije mogu koristiti individualnim proizvođačima, kupcima, ali i struci koja treba raditi na edukaciji proizvođača s ciljem dobivanja što sigurnijeg proizvoda bolje i ujednačenije kakvoće.

## TEHNOLOŠKE KARAKTERISTIKE SIRA

Sir je svježiji ili zreli proizvod dobiven grušanjem mlijeka (sirutke, stepke, vrhnja ili njihove kombinacije) uz izdvajanje sirutke. Proizvodnja sira obuhvaća glavne postupke (sirenje ili grušanje mlijeka, sušenje gruša i oblikovanje sirnog zrna), koji se primjenjuju u proizvodnji svih tipova sira, te specifične postupke koji se primjenjuju pri daljnjoj obradi gruša u proizvodnji određene vrste sira (Tratnik, 1998).

Sirevi se obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira, konzistenciju i građu tijesta, proizvode i stavljaju na tržište kao: ekstra tvrdi sirevi, tvrdi, polutvrđi, meki i svježiji sirevi (tablica 2).

**Ekstra tvrdi sirevi** u bezmasnoj tvari sira sadrže manje od 51 % vode, a minimalan period zrenja ekstra tvrdih sireva je šest mjeseci.

**Tvrđi sirevi** u bezmasnoj tvari sira sadrže 49-56 % vode, a minimalan period zrenja tvrdih sireva je pet tjedana.

**Polutvrđi sirevi** u bezmasnoj tvari sira sadrže 54-69 % vode, a minimalan period zrenja polutvrđih sireva je dva tjedna. Polutvrđi sirevi se mogu proizvoditi s plemenitim plijesnima na površini i/ili unutrašnjosti sira. U proizvodnji polutvrđih sireva može se primjenjivati tehnološki postupak dimljenja sira. Ekstra tvrdi, tvrdi i polutvrđi sirevi mogu se proizvoditi sa ili bez kore, a koru je dozvoljeno njegovati jestivim uljima i zaštititi premazima.

**Meki sirevi** u bezmasnoj tvari sira sadrže više od 67 % vode, a minimalan period zrenja mekih sireva je sedam dana. Zrenje mekih sireva se može odvijati: djelovanjem plemenitih plijesni na površini i/ili unutrašnjosti sira, djelovanjem bakterija na površini sira, u salamuri.

**Svježi sirevi** u bezmasnoj tvari sira sadrže 69-85 % vode.

**Tablica 2** Vrsta sira obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 20/09, 141/13)

Naziv sira obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira	Udio vode u bezmasnoj tvari sira (%)
Ekstra tvrdi sir	< 51
Tvrdi sir	49-56
Polutvrdi sir	54-69
Meki sir	>67
Svježi sir	69-85

Ovim istraživanjem obuhvaćeni su svježi i polutvrđi sirevi koji se tradicionalno proizvode u RH. U kategoriju svježi sir svrstani su sir od sirutke, skuta, podlijevani sir, dok su u polutvrde sireve svrstani mladi sir, sir sa začинима i sir škripavac, i to na osnovu svojih kemijskih karakteristika (pH, voda, mast, bjelančevine, sol) i s obzirom na rok trajanja koji su propisali sami proizvođači.

## PROCJENA RIZIKA

### 1. IDENTIFIKACIJA OPASNOSTI

Proizvodnja sireva na obiteljskim gospodarstvima karakterizirana je malom proizvodnom serijom i predstavlja samo dio aktivnosti ili proizvodnje toga gospodarstva. Uvjeti proizvodnje sireva ovise o savjesnosti i edukaciji proizvođača i nisu ujednačeni kao što se očekuje u industrijskoj proizvodnji, stoga i može doći do odstupanja i u provođenju dobre proizvođačke prakse.

Kontaminacija mlijeka mikroorganizmima može biti posljedica bolesti mliječne žlijezde ili je mlijeko kontaminirano tijekom daljnje obrade nakon mužnje. Ukoliko je izostavljena faza toplinske obrade mlijeka, eventualno prisutni patogeni mikroorganizmi bit će prisutni i u proizvodima od takvog mlijeka. Također, moguća je naknadna kontaminacija sireva patogenim mikroorganizmima uslijed neadekvatne higijene tijekom proizvodnje, a na broj i vrstu prisutnih mikroorganizama u siru utjecat će i način transporta i pohrane sireva na prodajnom mjestu (nepoštivanje hladnog lanca).

Kako bismo mogli procijeniti rizik mogućeg štetnog utjecaja na zdravlje zbog konzumacije svježih i polutvrđih tradicionalno proizvedenih sireva, provedeno je istraživanje mikrobiološke ispravnosti sireva s obzirom na kontaminaciju sljedećim patogenim bakterijama: *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 i *Salmonella spp.* Navedene bakterijske vrste odabrane su na osnovi literaturnih podataka o njihovom nalazu u različitim vrstama sireva, a uzrokovale su bolest ljudi (Kousta i sur., 2010), ili je sir bio kontaminiran upravo tim patogenima (Araújo i sur., 2002; Conedera i sur., 2004; De Valk i sur., 2000; Foschino i sur., 2002; Haeghebaert i sur., 2003; Rudolf i sur., 2001).

Istraživanjem su obuhvaćena i kemijska svojstva sira kako bi se dobila potpuna slika o tim proizvodima, odnosno povezao utjecaj kemijskog sastava na mikrobiološke promjene u sirevima. Analiza sastava i kiselosti sira doprinosi i točnom razvrstavanju sireva u kategorije koje smo istraživali i usklađenosti s postojećim deklaracijama.

Ovim je istraživanjem utvrđena i količina mikotoksina u sirevima. Naime, iz literaturnih je podataka vidljivo da su prve studije vezane uz mikotoksine u sirevima još 60-tih godina prošlog stoljeća otkrile prisutnost aflatoksina, a kasnijim razvojem novih analitičkih metoda, kao što su LC-MS/MS brojne studije su također ukazale na tu problematiku (Hymery i sur., 2014).

Mikotoksini u prehrani ljudi i životinja imaju negativan zdravstveni značaj, jer imaju mogućnost kumulacije u organizmu. Hrana mliječnih krava (sjenaža, silaža, mljevene žitarice) predstavlja izvor mikotoksina, osobito aflatoksina koji se u mliječnoj žlijezdi metabolizira u aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub>, te se izlučuje s mlijekom. Udio mikotoksina u hrani mliječnih krava ovisi u mnogome o klimatskim uvjetima koji pogoduju razvoju plijesni (temperatura, vlaga), na koje se vrlo malo može utjecati.

## 2. KARAKTERIZACIJA OPASNOSTI

### 2.1. *Escherichia coli* O157 (VTEC ili STEC)

*E. coli* O157 (VTEC ili STEC) patogeni je mikroorganizam koji može biti izoliran iz sirovog mlijeka, u koje je dospio zbog fekalne kontaminacije kao posljedica nehigijenske mužnje, ali može biti izoliran i u mliječnim proizvodima od pasteuriziranog mlijeka, koji su bili kontaminirani naknadno (Keene i sur., 1997). Osim u mlijeku, ovaj patogen kontaminira i govede meso (posebno mljeveno meso), drugu hranu poput salate, voća, sirovih sjemenki, vode, a zabilježen je i prijenos s kućnih ljubimaca na čovjeka i s čovjeka na čovjeka. Inkubacija traje 3-9 dana, a patogen, nakon što invadira crijeva započinje proizvodnju toksina (ne proizvodi ih u hrani). Bolesna stanja koja su posljedica infekcije s *E. coli* O157:H7 obuhvaćaju asimptomatske infekcije (kliconoše), lakše oblike proljeva, krvavi proljev i hemolitički kolitis, hemolitičko uremijski sindrom povezan s proljevom i trombotičnu trombocitopeničnu purpuru (TTP) povezanu s proljevom, a u rjeđim slučajevima nastupa smrt kao posljedica zatajenja bubrega. Pretpostavlja se da shiga toksin kojeg proizvodi dolazi u interakciju sa stanicama endotela u bubrenim glomerulima (Murinda i sur., 2002). *E. coli* može rasti sa ili bez prisustva kisika. Temperature zamrzavanja nemaju utjecaja na smanjivanje njezinog broja, a može rasti u temperaturnom rasponu od 8 do 46 °C, optimalna temperatura rasta je 37 °C. Može preživjeti niski pH do 3,6, kao i isušivanje (minimalni  $a_w$  0,95). Brzo ju uništavaju visoke temperature (npr. 70 °C za 2 minute). Mnogi autori su dokazali kako su mliječne krave rezervoari *E. coli* O157:H7 u odnosu na ostala stada goveda, i da je ona prisutna i u slučajevima kada životinja ne pokazuje znakove bolesti. Čak štoviše, zaključeno je kako je infekcija individualne životinje prolazna, ali da se infekcija u stadu zadržava (Wells i sur., 1991).

### 2.2. *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* jedan je od čestih uzročnika bakterijskog trovanja hranom. Taj prilagodljivi patogen u ljudi i životinja dovodi do različitih bolesnih stanja, od lakših kožnih infekcija do teških oboljenja poput upale pluća ili septikemije. *S. aureus* najbolje raste i proizvodi enterotoksin uz prisustvo kisika, ali može rasti i u anaerobnim uvjetima. Odgovara mu temperatura 37 °C, (raspon 6-48 °C) i pH 7-7,5 (raspon 4,2-9,3). Dobro podnosi isušivanje tako da donja granica za aktivitet vode ( $a_w$ ) iznosi 0,85. Podnosi dodatak NaCl do 25 %, kao i zamrzavanje. Uništavaju ga uobičajene temperature kuhanja i pasteurizacije. *S. aureus* proizvodi različite enterotoksine (A, B, C, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R i U), vrlo često i nekoliko istodobno, ali u 95 % slučajeva radi se o A, B, C, D i E enterotoksinima (Pelisser i sur., 2009). To su termostabilni toksini čija se svojstva ne mijenjaju nakon termičke obrade hrane i nisu osjetljivi na gastrointestinalne proteaze poput pepsina (Pelisser i sur., 2009). Intoksikacija nastaje nakon unosa od 20 ng do >1 µg toksina (kad populacija *S. aureus* prijeđe 10<sup>5</sup> cfu/g proizvodi toksin u količini od 1 µg). Simptomi se javljaju nakon nekoliko sati (1-6) od unosa kontaminirane hrane, što ovisi o unesenoj količini i individualnoj

osjetljivosti. Simptomi koji se javljaju su mučnina, povraćanje, grčevi u želucu i proljev, a traju 24-48 sati. Iako vrlo rijedak, u male djece i starijih osoba moguć je i smrtni ishod (Normanno i sur., 2007). Mlijeko predstavlja dobar supstrat za rast *S. aureus*, kao i njegovi proizvodi, iz kojih ga se učestalo izolira (Pelisser i sur., 2009; Normanno i sur., 2007). Koža, mukozne membrane, vime i sise mliječnih životinja rezervoar su ovog patogena, osobito ukoliko u stadu postoji mastitis. Nadalje, trećina ljudi su asimptomatski nositelji, te se *S. aureus* može širiti preko ruku (ranama ili ozljedama), kihanjem ili kašljanjem. U slučaju neadekvatne higijene za vrijeme proizvodnog procesa, posebno u slučajevima neposrednog rukovanja s hranom u proizvodnji, otvaraju se mogućnosti za kontaminaciju s bakterijom *S. aureus*, te se ona može očekivati i u mliječnim proizvodima od pasteuriziranog i nepasteuriziranog mlijeka (Medvedova i sur., 2014).

### 2.3. *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* je patogen koji se prenosi hranom, a nalazi se i u okolišu. Infekcije u ljudi, listerioze, mogu vrlo ozbiljno ugroziti zdravlje, a potencijalno i ugroziti ljudski život (Posfay-Barbe i Wald, 2004). Svi pripadnici roda *Listeria* rasprostranjeni su u okolišu i izolirani iz tla, vegetacije, vode, otpadnih voda, hrane za životinje, svježeg i zamrznutog mesa, svježeg mlijeka, klaoničkog otpada i fecesa zdravih životinja. Upravo farmski držane životinje kao i njihov okoliš značajan su izvor kontaminacije hrane i infekcije ljudi. Listerije su Gram-pozitivni, nesporogeni bacili, u pravilu aerobni ili fakultativno anaerobni, katalaza pozitivni i oksidaza negativni. U literaturi se često spominju u proizvodima kao što su sirovo mlijeko, meki sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka, proizvodi od sirovog mesa i salate (Jemmi & Stephan, 2006). Slaba higijena u klaonicama i objektima za preradu mlijeka glavni je razlog kontaminacije listerijom. Važan izvor kontaminacije iz okoliša i opreme je križna kontaminacija, posebno u preradi hrane. Listerije se mogu zadržati i preživjeti na različitim proizvodnim površinama, a jedan od razloga za to je i mogućnost stvaranja biofilma koji ih štiti. Listerije rastu na temperaturama između 1 i 45 °C (dakle rastu na uobičajenim temperaturama u hladnjaku; do 8 °C), a optimalna im je temperatura 30-37 °C (Wemekamp-Kamphuis, 2004). Uništava ih temperatura od 64 °C za nešto manje od 10 minuta, a 70 °C za 2 minute (FDA, 2011).

### 2.4. *Salmonella* spp.

Postoji preko 1400 serotipova *S. enterica* subsp. *enterica* koji mogu izazvati bolest u ljudi (Brenner i sur., 2000). Salmoneloze se ubrajaju u vodeće bolesti probavnog sustava čiji se simptomi kreću od blagih gastroenteritisa do sistemskih bolesti poput septikemija i drugih ozbiljnijih bolesti. Hrana životinjskog podrijetla (meso, jaja i mlijeko) smatra se važnim izvorom salmoneloza u ljudi. *Salmonella* spp. su Gram negativne mezofilne bakterije. Mogu rasti na temperaturi hladnjaka od 4 °C do 10 °C, a dobro rastu i na temperaturi od 25° do 43 °C, dok su osjetljive na temperaturu iznad 55 °C. Odgovara im pH od 3,6 do 9,5, a najviše skoro neutralni pH (D'Aoust, 2001). U namirnicama s niskim  $a_w$  mogu preživjeti duži vremenski period, npr. u orasima 32 tjedna ili u maslacu od kikirikija 24 tjedna. D'Aoust (2001) navodi kako *Salmonella* spp. rastu pri  $a_w \geq 0,93$ , dok je optimalni  $a_w$  0,99. U prosjeku rast *Salmonella* spp. odvija se uz  $a_w$  0,93 i 0,96. Salmonele se prenose oralno - fekalnim putem, s osobe na osobu, putem hrane, vode i indirektno preko zaraženih životinja (Food standards, 2009). Simptomi bolesti mogu se podijeliti na enterokolitis i enteričku groznicu. Enterokolitis se javlja 8-72 sata nakon infekcije i ima samolimitirajući karakter, uz čestu remisiju nakon 4-5 dana. Karakterizira ga ozbiljna bol u abdomenu, proljev, povraćanje i groznica. Enterična groznica je akutna gastrointestinalna bolest koja nastaje kao posljedica prodora *S. Typhi* ili *S. Paratyphi* u tkivo humanog nosioca. Od ostalih simptoma prisutni su još i vodenasti proljev, produžena i pulsirajuća groznica, abdominalna bol i povraćanje. U rjeđim slučajevima dolazi do težih oboljenja kao što su artritis, upala slijepog crijeva, upala žučnog mjehura, endokarditis, lokalnih apscesa, meningitisa, osteomijelitisa, osteoartritisa, perikarditisa, upale pluća i mokraćnog mjehura (ICMSF, 1996). Na početku bolesti koja može potrajati i do 5 tjedana, veliki broj *Salmonella* spp. se izlučuje fecesom, ali i kasnije u smanjenoj količini. Otprilike 1 % oboljelih ostaju trajni kliconoše (Jay i sur., 2003). Velike su razlike u individualnoj

osjetljivosti na salmonele koja ovisi o već postojećem imunitetu, načinu prehrane, dobi, sposobnosti imunološkog odgovora, funkcionalnim i strukturalnim anomalijama u probavnom traktu, ili postojanju neke druge bolesti (Gerba i sur., 1996; Jay i sur., 2003). Iz tog je razloga vrlo teško utvrditi najmanju infektivnu dozu, koja je u pravilu niža kod nastanka epidemije nego što je doza u slučaju pokusnog hranjenja (D'Aoust, 1994). Ipak veći rizik od infekcije i razvoja težih oblika bolesti nakon izlaganja *Salmonella* spp. može se javiti kod jako mladih, starijih, trudnica i imunokompromitiranih osoba (transplantacija organa, osobe oboljele od raka i AIDS-a; Gerba i sur., 1996).

### 2.5. *Campylobacter* spp. (*jejuni/coli*)

S nastankom bolesti, kampilobakterioze, najčešće su povezane vrste *C. jejuni* i *C. coli*. Vrste *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* i *C. upsaliensis* nazivaju se još i termotoleranim kampilobakterima, jer optimalno rastu pri temperaturama od 41 °C do 43 °C, no ne pokazuju odlike pravih termofilnih bakterija jer ne rastu pri temperaturama od 55 °C i višim (Mikulić i sur., 2016; Levin, 2007). *Campylobacter* spp. neće preživjeti pH niži od 4,9, a može rasti u rasponu 4,9-9,0, dok mu optimalni pH za rast iznosi 6,5-7,5 (Keener i sur., 2004). Za rast su mu potrebni mikroaerofilni uvjeti i bolje preživljava na nižim nego na višim temperaturama (15 puta dulje na 2 °C nego na 20 °C). Na rukama može preživjeti i do sat vremena, a zamrzavanjem mu se broj smanjuje. Uništava ga temperatura od 55 °C i više, a osjetljiv je i na koncentracije NaCl iznad 1 %. Nakon inkubacije koja može trajati od 1 do 10 dana (najčešće između 2 i 5 dana) nastupaju simptomi koje karakterizira bol u mišićima, glavobolja i groznica na koju se nadovezuje krvavi proljev, bol u stomaku i povraćanje, koji se zadržavaju do tjedan dana kada bolest samostalno i prestaje. Ponekad se situacija može zakomplicirati artritisom (Reiterov sindrom) ili postinfekcijskom kljenuti mišića (Guillian-Barréov sindrom). U tom slučaju mogući su i smrtni ishodi u 3-8 % slučajeva. Iako vrlo rijetki, zabilježeni su slučajevi fekalno - oralnog prijenosa među ljudima. Najznačajniji izvor zaraze je perad, odnosno njihovo meso, ali također i sirovo mlijeko, meso drugih životinja, gljive, maslac, salate, plodovi mora i kontaminirana voda za piće. Najznačajniji put zaraze je križna kontaminacija koja nastaje kod ne pridržavanja dobre higijenske prakse.

### 2.6. Aflatoksin M<sub>1</sub> i M<sub>2</sub> u mlijeku

Aflatoksin M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) hidroksilirani je derivat AFB<sub>1</sub>, kojeg tvore s citokromom P450 povezani enzimi u jetri i koji se mliječnom žlijezdom životinja i čovjeka izlučuje u mlijeko, ukoliko se hranom unosi AFB<sub>1</sub> u organizam (Polychronaki i sur., 2007; Kamkar i sur., 2008; Fallah i sur., 2009; Gürbay i sur., 2010). Aflatoksin B<sub>1</sub> spada među najtoksičnije mikotoksine iz skupine aflatoksina (Domijan i Peraica, 2010). Ciljni organ toksičnoga djelovanja AFB<sub>1</sub>-a je jetra, a izraženost promjena ovisna je o dozi, dužini izloženosti, životinjskoj vrsti, uzgoju i uhranjenosti. Uz akutni i kronični toksični učinak, aflatoksini imaju imunosupresivno, mutageno, teratogeno i karcinogeno djelovanje. Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency for Research on Cancer – IARC) ocijenila je da ima dovoljno dokaza da su aflatoksini B<sub>1</sub> iz prirodnih izvora karcinogeni i uvrstila ih je u 1. skupinu karcinogena (IARC 2002). Europska komisija od 2002. godine propisuje vrijednosti za najveće dopuštene količine određenih kontaminanata u hrani za životinje, a time je obuhvaćen i mikotoksin aflatoksin B<sub>1</sub>, a korištenje hrane i proizvoda za hranidbu životinja, koji imaju nepoželjne tvari u količinama većim od najviših dozvoljenih, su zabranjeni. Glavni razlog propisivanja najveće dopuštene granice za AFB<sub>1</sub> je zaštita stanovništva od izloženosti metabolitu ovog mikotoksina koji se nalazi u mlijeku, aflatoksinu M<sub>1</sub> (Hengl i sur., 2015).

Ustanovljena je direktna povezanost u količini AFM<sub>1</sub> izlučenog u mlijeku s količinom AFB<sub>1</sub> unesenom u organizam preko hrane. Tako je utvrđeno da se otprilike 0,3–6,2 % AFB<sub>1</sub> kojeg unesu životinje transformira u AFM<sub>1</sub> koji se izluči u mlijeku, ali veličina pretvorbe razlikuje se ovisno o životinji, dobu dana i mužnji (Unusan, 2006; Ayar i sur., 2007). Visoko produktivne mliječne krave puno efikasnije konvertiraju AFB<sub>1</sub> u AFM<sub>1</sub> od slabije produktivnih krava (Frobish i sur., 1986; Masoero i sur., 2007). Aflatoksin M<sub>1</sub> može su utvrditi u mlijeku već 12 sati nakon prvog unosa u organizam. Nakon uklanjanja kontaminiranog izvora, koncentracija AFM<sub>1</sub> u mlijeku opada te se nakon 72 h ne

može niti detektirati (Sassahara i sur., 2005). Gallo, Moschini i Masoero (2007) utvrdili su kako je najveća koncentracija AFM<sub>1</sub> u mlijeku 8 sati nakon konzumacije hrane kontaminirane s AFB<sub>1</sub>, a ona već kod slijedeće mužnje padne za 80 %, dok se nakon 56 sati (peta mužnja) AFM<sub>1</sub> se u mlijeku više ne može niti detektirati. Izračunato je da krave, koje unesu količinu AFB<sub>1</sub> nižu od 40 µg/jedinki/dnevno proizvedu mlijeko sa sadržajem AFM<sub>1</sub> nižim od 0,05 µg/kg. Međutim, Hoogenboom i sur. (2001) izračunali su da se od hranom ukupno unesenog AFB<sub>1</sub>, sintetizira oko 3 % AFM<sub>1</sub>, čime je dozvoljena koncentracija od 0,02 mg/kg hrane upitna.

Prema Prandiniju i sur. (2009) na količinu AFM<sub>1</sub> u mlijeku ne utječu procesi prerade poput toplinske obrade kao što su pasterizacija i sterilizacija, kao ni hlađenje i zamrzavanje mlijeka ili dodavanje starter kultura koje potiču fermentaciju (npr. proizvodnja jogurta). Evaporacija, koncentracija i sušenje mlijeka djeluju na toksin na način da on postaje osjetljiviji na O<sub>2</sub>, svijetlost ili druge čimbenike koji ga mogu destabilizirati, te je u nekim studijama zabilježen veliki gubitak AFM<sub>1</sub>, dok u nekima ti oblici prerade nisu utjecali na njegovu količinu. S obzirom da je AFM<sub>1</sub> topljiv u vodi, njegova se količina u vrhnju smanjuje, a još se više smanjuje u maslacu (AFM<sub>1</sub> ostaje u sirutki nakon proizvodnje ovih proizvoda). Međutim, u mekim i tvrdim sirevima njegova se količina poveća 3-5 puta. To je vjerojatno posljedica njegovog vezanja za kazein, kojeg više ostaje u grušu nego u sirutki (Prandini i sur., 2009). Izloženost relativno malim količinama AFM<sub>1</sub> može narušiti ljudsko zdravlje, osobito djece koja su glavni konzumenti mlijeka i mliječnih proizvoda (Cavaliere i sur., 2006). Mikotoksin AFM<sub>1</sub> je od strane IARC klasificiran u Grupu 2B kao tvar s mogućim karcinogenim učinkom za ljude (IARC, 1993). Učestala prisutnost AFM<sub>1</sub> u mlijeku i mliječnim proizvodima, značajan unos ove vrste proizvoda, te moguća toksičnost i karcinogenost AFM<sub>1</sub> doveli su do uspostave najviših dozvoljenih koncentracija u mlijeku od strane Europske Komisije i Codex Alimentariusu na razinu od 0,05 µg/kg (Codex Alimentarius Commission, 2001; European Commission Regulation, 2006).

### **3. PROCJENA IZLOŽENOSTI**

#### **3.1. Rezultati kemijske i mikrobiološke analize sira (Split, Zagreb, Rijeka, Osijek)**

##### **3.1.1. UZORKOVANJE**

Za potrebe istraživanja uzorkovani su tradicionalni (autohtoni) svježi i polutvrđi sirevi od kravljeg mlijeka proizvedeni na obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvima, a koji se prodaju na tržnicama u Zagrebu, Osijeku, Splitu i Rijeci.

Uzorkovanje je provedeno dva puta, u ljetnim i zimskim mjesecima.

Ljetno uzorkovanje odvijalo se u srpnju i kolovozu 2014. godine, kojom prilikom je prikupljeno 12 uzoraka svježih i polutvrđih sireva u Rijeci, 40 u Zagrebu, 20 u Osijeku i 20 u Splitu. Zimsko uzorkovanje provedeno je u studenom i prosincu 2014. godine, i uzorkovano je 14 uzoraka svježih i polutvrđih sireva iz Rijeke, 40 iz Zagreba, 12 iz Osijeka i 17 iz Splita. Uzorkovanje je proveo Prehrambeno-tehnološki fakultet iz Osijeka, a mikrobiološke analize su napravljene na Hrvatskom veterinarskom institutu Zagreb, Veterinarskom zavodu Vinkovci. Kemijske analize koje su rađene samo na uzorcima iz zimskog uzorkovanja napravljene su na Prehrambeno - tehnološkom fakultetu iz Osijeka.

Uzorkovano je oko pola kilograma sira za daljnju mikrobiološku i kemijsku analizu (veličina uzorka ovisila je o vrsti sira). Uzorci su bili stavljeni u odgovarajuću ambalažu označenu s brojem uzorka i u prijenosnom hladnjaku u odgovarajućem vremenu dopremljeni u laboratorij. Proizvođači su zamoljeni da popune upitnik (dobrovoljni pristanak) s informacijama o siru koje su obuhvaćale uvjete proizvodnje, tehnološki postupak, vrstu mlijeka, korištenje starter kultura, mjesto proizvodnje, način i uvjete transporta do tržnice te način čuvanja sira na tržnici (Dodatak 1).

### 3.1.2. MIKROBIOLOŠKE ANALIZE

Uzorci svježih i polutvrdih sireva pretraženi su na prisutnost bakterija *E. coli*, *S.aureus*, *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp., a uzorci uzorkovani u zimskim mjesecima pretraženi su još i na prisutnost bakterija *Campylobacter* spp..

Priprema uzoraka za mikrobiološku analizu kao i sama mikrobiološka analiza provedena je u skladu s odredbama Uredbe 2073/2005, pri čemu su korišteni sljedeći postupci prema HRN EN ISO normama:

**HRN EN ISO 11290 – 1:1999**; Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* – 1. Dio: Metoda dokazivanja

**HRN EN ISO 11290 – 1: 1999/A1:2008**; Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* – 1. Dio: Metoda dokazivanja – Amandman 1

**HRN ISO 15213:2004**; Horizontalna metoda za brojenje sulfitoreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima

**HRN ISO 16649-2: 2001**; Metoda brojanja beta – glucuronidasa pozitivne *Esherichia coli* – 2.dio; Brojenje kolonija pri 44 °C uporabom 5 – bromo – 4 – chloro – 3 indolyl beta – D – glucuronide

**HRN EN ISO 6579:2003**; Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp

**HRN EN ISO 6579:2003/Ispr. 1:2008**; Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp

**HRN EN ISO 6888 – 1: 2004**; Horizontalni postupak brojenja koagulaza – pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) – 1. Dio: Postupak primjene Baird – Parkerove hranjive podloge na agaru.

#### ODREĐIVANJE bakterija *Campylobacter* spp.

Odvagano je 1 g ispitivanog uzorka sira u 10 mL fiziološke otopine, te razrijeđeno do razrijeđenja  $10^{-3}$ . Potom je pripravljeno razrijeđenje uzorka naciepljeno na kromogeni URI SELECT – 4 agar i inkubiran 24 sata na 37 °C.

Determinacija bakterija *C. jejuni* (*C. jejuni* ili *C. coli*\*) rađena je na kromogenom URI SELECT – 4 agaru (Biolife, Milano, Italy). Za određivanje broja *C. jejuni* (*C. jejuni* ili *C. coli*) korišten je *Campylobacter* Blood Free Medium (CCDA, Bolton, GB) (DHMZ Methods, Prescott et. Al., 1996) na kojeg su naciepljene kolonije *C. jejuni* (*coli*). Uzorci su inkubirani na 37 °C kroz 48 sati u mikroarofilnim uvjetima (Anaerobic jar s Anaerocult C izuzimačem, Merck, Darmstadt, Germany), te je s obzirom na kontrolni standard znane koncentracije (cfu/mL) određivana eventualna prisutnost i broj (cfu/mL) *Campylobacter jejuni*\*.

\* - *Campylobacter* raste u teško brojivim (nebrojivim) rasprostrtim kolonijama. Određivanje broja moguće je usporedbom sa standardnim kromogenim podlogama znanog broja kolonija.

### 3.1.3. KEMIJSKE ANALIZE

U prikupljenim sirevima analizirali su se sljedeći parametri kakvoće sira:

- udio masti
- udio vode
- udio bjelančevina
- udio soli
- pH

Za određivanje udjela masti, vode, bjelančevina i soli korišten je uređaj FoodScan (FOOS) s globalnom kalibracijom za sir.

Priprema uzorka:

Uzorci se prije mjerenja moraju usitniti. Uređaj istovremeno u istom uzorku određuje sve zadane parametre i analizira uzorak na 10-16 različitih mjesta. Konačni rezultat je srednja vrijednost svih mjerenja.

#### ODREĐIVANJE pH VRIJEDNOSTI SIRA:

Za određivanje pH vrijednosti sira korišten je pH - metar WTW pH 3210 (WTW) s ubodnom BlueLine 21(SCHOTT) elektrodom. pH metar je prije analize kalibriran puferima pH 4,01 i pH 7,00.

Za svaki sir provedena su dva mjerenja, a konačni rezultat je srednja vrijednost tih dvaju mjerenja.

#### ODREĐIVANJE AFLATOKSINA

Aflatoksin je određen imunoenzimskom metodom (ELISA) koja se koristi kao orijentacijski test u rutinskim analizama, uglavnom zbog svoje jednostavnosti i brzine te zbog osjetljivosti određivanja manje od 0,01 µg/L AFM<sub>1</sub>. Proizvođač kita je Euroclone (Aflatoxin M<sub>1</sub> ELISA KIT).

### 3.1.4. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Prilikom obrade podataka uzorkovani sirevi svrstani su u dvije skupine s obzirom na njihov kemijski sastav, tip sira i način proizvodnje. U grupu „svježih sireva“ uvršteni su svježi sir, skuta, sir od sirutke i podlijevani sir, dok je u grupu polutvrdih sireva uvršten mladi sir, sir sa začinima i sir škripavac.

#### 3.1.4.1. REZULTATI MIKROBIOLOŠKE PRETRAGE SIREVA

Niti u jednom uzorku nisu utvrđene bakterije *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. i *Campylobacter* spp..

Tablica 3 Rezultati pretrage uzoraka svježeg i polutvrdog sira

Mikrobiološki parametar	Mjesto uzorkovanja	Uzorkovanje							
		Ljeto		Zima		Ljeto		Zima	
		Svježi sir, $\bar{x}$	n	Svježi sir, $\bar{x}$	n	Polutvrđi sir, $\bar{x}$	n	Polutvrđi sir, $\bar{x}$	n
<i>S. aureus</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	1,01	10	0,95	3	0,95	10	1,51	14
	ZG	1,07	29	1,14	30	1,39	11	1,05	10
	RI	0,95	7	0,95	6	0,95	5	1,32	8
	OS	1,06	12	1,35	7	1,78	8	1,30	5
	ukupno	1,04	58	1,29	46	1,13	34	1,32	37
<i>E. coli</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	2,25	10	1,84	3	1,59	10	1,43	14
	ZG	2,04	29	1,83	30	1,68	11	1,35	10
	RI	1,38	7	2,22	6	2,32	5	1,59	8
	OS	3,52	12	2,10	7	1,89	8	0,95	5
	ukupno	1,90	58	1,85	46	1,93	34	1,35	37

$\bar{x}$  - prosječna vrijednost; n – broj uzoraka; ST=Split; ZG=Zagreb; RI=Rijeka; OS=Osijek

Uspoređujući prosječni broj bakterija *S. aureus* iz svježih sireva u ljetnom uzorkovanju uočava se da su vrijednosti vrlo slične, dok su jedino u Rijeci svi uzorci bili negativni. U zimskom uzorkovanju su uzorci svježeg sira i u Splitu i Rijeci bili negativni, dok su uzorci iz Osijeka imali nešto više vrijednosti od onih u Zagrebu, a uočen je nešto veći



ukupni prosječni broj *S. aureus* (1,29 log<sub>10</sub> cfu/g) u svježim sirevima iz zimskog uzorkovanja u odnosu na ljetno uzorkovanje (tablica 3).

Kod polutvrđih sireva *S. aureus* nije bio izoliran iznad 10 cfu/g u ljetnom uzorkovanju u uzorcima iz Splita i Rijeke, dok je u zimskom u svim gradovima bio utvrđen u vrijednosti preko 10 cfu/g, te su prosječne vrijednosti zimskih uzoraka vrlo slične među gradovima. Ukupne prosječne vrijednosti zimskih uzoraka kontaminiranih sa *S. aureus* nešto su više od prosječnih ljetnih vrijednosti (tablica 3).

Kontaminacija svježeg sira većim brojem *E. coli* (više od 2 log<sub>10</sub> cfu/g), utvrđena je u ljetnim uzorcima u svim gradovima izuzev Rijeke gdje je veća prosječna vrijednost bila u zimskim uzorcima. Uspoređujući Split i Zagreb, u ljetnom i zimskom uzorkovanju su imali slične vrijednosti, dok su se u Osijeku i Rijeci vrijednosti značajnije razlikovale. U Osijeku su bile veće vrijednosti ljeti (3,52 log<sub>10</sub> cfu/g) u odnosu na zimu (2,10 log<sub>10</sub> cfu/g). Bakterija *E. coli* izolirana je u polutvrđim sirevima u većem broju u ljetnim uzorcima i u svim gradovima, što se odrazilo i na njezinu veću ukupnu prosječnu vrijednost od 1,93 log<sub>10</sub> cfu/g (tablica 3).

Gledajući ukupne prosječne vrijednosti broja *E. coli* u uzorcima i svježeg i polutvrđog sira utvrđene su veće vrijednosti u ljetnom uzorkovanju u odnosu na zimu, dok je broj *S. aureus* u zimskim uzorcima bio veći od ljetnih (tablica 3).

**Tablica 4** Rezultati pretrage uzoraka svježeg i polutvrđog sira (godišnji rezultati)

Mikrobiološki parametar	Mjesto uzorkovanja	Uzorci			
		Svježi sir, $\bar{x}$	n	Polutvrđi sir, $\bar{x}$	n
<i>S. aureus</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	0,99	13	1,28	24
	ZG	1,10	59	1,23	21
	RI	0,95	13	1,18	13
	OS	1,17	19	1,59	13
	ukupno	1,08	104	1,30	71
<i>E. coli</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	2,15	13	1,50	24
	ZG	1,92	59	1,47	21
	RI	1,77	13	1,87	13
	OS	2,99	19	1,53	13
	ukupno	2,13	104	1,56	71

$\bar{x}$  - prosječna vrijednost; n – broj uzoraka; ST=Split; ZG=Zagreb; RI=Rijeka; OS=Osijek

U tablici 4 prikazani su ukupni godišnji rezultati za svježi i polutvrđi sir po gradovima, kao i ukupni podaci za cijelu Hrvatsku. Vidljivo je kako su prosječne vrijednosti broja bakterija *S. aureus* bile u sva četiri grada veće kod polutvrđih (1,18 – 1,59 log<sub>10</sub> cfu/g) u odnosu na svježe sireve (0,99 – 1,17 log<sub>10</sub> cfu/g).

Kod svježih sireva u odnosu na polutvrde, prisutne su veće vrijednosti *E. coli*, a najveću prosječnu vrijednost su imali svježi sirevi iz Osijeka (2,99 log<sub>10</sub> cfu/g), a najmanju iz Rijeke (1,77 log<sub>10</sub> cfu/g). Kod polutvrđih sireva prosječne vrijednosti broja *E. coli* bile su ujednačenije među gradovima, a najveća je bila u Rijeci (1,87 log<sub>10</sub> cfu/g). Veći broj bakterija *E. coli* utvrđen je u Osijeku, Splitu i Zagrebu, kod svježih sireva u odnosu na polutvrde.

Kod usporedbe kontaminacije svježih i polutvrđih sireva, kod svježih je sireva utvrđena veća godišnja prosječna vrijednost bakterije *E. coli* (2,13 log<sub>10</sub> cfu/g), dok je u polutvrđim sirevima utvrđen prosječno veći broj *S. aureus* (1,30 log<sub>10</sub> cfu/g).

**Tablica 5** Rezultati pretrage uzoraka svježeg sira proizvedenog od pasteriziranog i nepasteriziranog mlijeka (godišnji rezultati)

Mikrobiološki parametar	Mjesto uzorkovanja	Uzorci			
		Svježi sir od pasteriziranog mlijeka, $\bar{x}$	n	Svježi sir od nepasteriziranog mlijeka, $\bar{x}$	n
<i>S. aureus</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	1,03	7	0,95	6
	ZG	-	0	1,10	58
	RI	0,95	13	-	0
	OS	-	0	1,17	19
	ukupno	0,98	20	1,11	83
<i>E. coli</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	2,27	7	2,01	6
	ZG	-	0	1,94	58
	RI	1,77	13	-	0
	OS	-	0	2,99	19
	ukupno	1,91	20	2,18	83

$\bar{x}$  - prosječna vrijednost; n – broj uzoraka; ST=Split; ZG=Zagreb; RI=Rijeka; OS=Osijek

Ukupni prosječni godišnji rezultati pretrage (tablica 5) pokazuju kako je u svježi sirevima proizvedenima od pasteriziranog mlijeka broj bakterija *S. aureus* bio vrlo sličan nalazima bakterije u sirevima od nepasteriziranog mlijeka (0,98 log<sub>10</sub> cfu/g odnosno 1,11 log<sub>10</sub> cfu/g). Kod nalaza bakterije *E. coli* ta je razlika puno veća, te je svježi sir od pasteriziranog mlijeka imao manju prosječnu vrijednost (1,91 log<sub>10</sub> cfu/g) u odnosu na sireve od nepasteriziranog mlijeka (2,18 log<sub>10</sub> cfu/g).

**Tablica 6** Rezultati pretrage uzoraka polutvrđog sira proizvedenog od pasteriziranog i nepasteriziranog mlijeka (godišnji rezultati)

Mikrobiološki parametar	Mjesto uzorkovanja	Uzorci			
		Polutvrđi sir od pasteriziranog mlijeka, $\bar{x}$	n	Polutvrđi sir od nepasteriziranog mlijeka, $\bar{x}$	n
<i>S. aureus</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	1,23	16	1,38	8
	ZG	1,11	15	1,53	6
	RI	1,18	13	-	0
	OS	1,46	12	-	0
	ukupno	1,23	56	1,57	14
<i>E. coli</i> , log <sub>10</sub> cfu/g	ST	1,45	16	1,60	8
	ZG	1,42	15	1,58	6
	RI	1,87	13	-	0
	OS	1,41	12	-	0
	ukupno	1,53	56	1,68	14

$\bar{x}$  - prosječna vrijednost; n – broj uzoraka; ST=Split; ZG=Zagreb; RI=Rijeka; OS=Osijek

Ukupni godišnji rezultati za polutvrde sireve od pasteriziranog mlijeka pokazuju slične vrijednosti broja *E. coli* u odnosu na sireve od nepasteriziranog mlijeka (1,53 log<sub>10</sub> cfu/g; odnosno 1,68 log<sub>10</sub> cfu/g). Slična situacija je i kod *S. aureus* (1,23 log<sub>10</sub> cfu/g; 1,57 log<sub>10</sub> cfu/g) (tablica 6).

### 3.1.4.2. REZULTATI KEMIJSKE PRETRAGE SIREVA

Vrijednosti kemijskih parametara sireva (tablica 7) u pojedinačnim slučajevima pokazuju velike oscilacije, osobito kod najmanjih i najvećih vrijednosti u svim gradovima, kako za svježi tako i za polutvrđi sir. Posebno su velika odstupanja u udjelu masti u svježem siru, gdje su se pojedinačne vrijednosti kretale od 0,56 % do 32,79 % u Rijeci, dok su se u polutvrdom siru kretale od 5,91 % u Zagrebu do 37,79 % u Rijeci.

Bjelančevine u svježem siru kretale su se od 5,75 % u Splitu do 18,82 % u Rijeci, a u polutvrdom siru od 17,16 % u Zagrebu do 30,91 % u Rijeci.

Udio soli u svježim sirevima kretao se od 0,18 % u Zagrebu do 2,78 % u Splitu, a u polutvrđim sirevima od 0,65 % u Zagrebu do 4,23 % u Rijeci.

Ovakva veća odstupanja nisu imala značajni utjecaj na prosječne vrijednosti svježih i polutvrđih sireva među gradovima, s izuzetkom relativno niske prosječne vrijednosti masti u svježem siru iz Zagreba (5,22 %).

**Tablica 7** Rezultati kemijskih analiza uzoraka sira

		Uzorc									
		Svježi sir					Polutvrđi sir				
		pH	Mast (%)	Bjelančevine (%)	Voda (%)	NaCl (%)	pH	Mast (%)	Bjelančevine (%)	Voda (%)	NaCl (%)
prosjek ( $\bar{x}$ )	ST	5,42	17,64	8,10	70,65	1,27	5,65	26,29	21,04	47,76	1,33
	ZG	4,49	5,22	10,10	80,46	0,48	5,50	20,69	19,69	53,84	1,50
	RI	4,69	13,38	11,24	70,61	0,70	5,49	30,60	23,55	40,09	2,16
	OS	4,83	13,83	12,34	69,31	0,87	5,71	25,80	20,82	47,51	1,72
min	ST	4,37	10,70	5,75	62,49	0,38	5,02	20,36	17,69	35,34	0,75
	ZG	4,20	1,59	7,17	71,30	0,18	4,40	5,91	17,16	48,38	0,65
	RI	4,30	0,56	8,86	55,80	0,19	5,08	27,10	18,74	29,16	1,01
	OS	4,29	6,04	9,72	57,65	0,48	5,57	22,78	17,64	44,23	1,35
max	ST	6,11	28,45	9,40	75,35	2,78	5,96	31,46	28,29	55,70	2,73
	ZG	4,89	12,67	14,08	87,17	0,62	6,10	25,36	24,09	65,72	2,90
	RI	5,58	32,79	18,82	84,62	2,16	6,28	37,79	30,91	46,79	4,23
	OS	5,69	22,85	15,08	79,57	1,43	5,92	27,15	23,14	52,59	2,11

$\bar{x}$  - prosječna vrijednost; ST=Split; ZG=Zagreb; RI=Rijeka; OS=Osijek

Tijekom ljetnog uzorkovanja prikupljena su 92 uzorka ukupno (tablica 8) i uz svaki uzorak je pojedinačno popunjen prethodno pripremljeni upitnik (dobrovoljni pristanak) s informacijama o siru koje su obuhvaćale uvjete proizvodnje, tehnološki postupak, vrstu mlijeka, korištenje starter kultura, mjesto proizvodnje, način i uvjete transporta do tržnice te način čuvanja sira na tržnici (upitnik se nalazi u Dodatku 1).

Većina prikupljenih uzoraka na tržnicama bila je u postojećim rashladnim komorama, izuzetak je bilo pet uzoraka u Splitu gdje nisu postojale rashladne komore.

**Tablica 8** Temperatura zraka kod uzorkovanja i broj uzoraka sira po gradovima

Grad	Temperatura °C	Svježi sir (n)	Polutvrđi sir (n)
Zagreb	22,85	29	11
Osijek	27,5	12	8
Split	30	10	10
Rijeka	31	7	5

Svi uzorci svježih sireva prikupljenih u Zagrebu bili su od mlijeka koje nije bilo toplinski obrađeno (pasterizirano), dok je 72,73 % uzoraka polutvrđih sireva bilo od pasteriziranog mlijeka. U Osijeku su također svi uzorci svježeg sira bili od nepasteriziranog mlijeka, dok je 87,5 % polutvrđih sireva bilo od pasteriziranog mlijeka. Nešto drukčija situacija bila je među uzorcima prikupljenim u Splitu, gdje je 60 % svježih i 70 % polutvrđih sireva je bilo proizvedeno od pasteriziranog mlijeka. U Rijeci su svi uzorci sireva bili proizvedeni od toplinski obrađenog mlijeka. Mora se naglasiti kako su tržnice u Rijeci imale najbolju infrastrukturu i organizaciju, što je vidljivo kroz prisustvo rashladnih komora kod svakog prodajnog mjesta svježeg ili polutvrđog sira, i što je vrlo vjerojatno utjecalo na mikrobiološku sliku tih sireva koja je bila najbolja za sireve u Rijeci.

**Tablica 9** Temperatura zraka kod uzorkovanja i broj uzoraka sira po gradovima

Grad	Temperatura °C	Svježi sir (n)	Polutvrđi sir (n)
Zagreb	5-7	30	10
Osijek	5	7	5
Split	15	3	14
Rijeka	15	6	8

Tijekom zimskog prikupljanja uzoraka prikupljena su ukupno 83 uzorka (tablica 9) i također kao u ljetnom periodu uzorkovanja popunjen je upitnik uz svaki uzorak sira.

Većina prikupljenih uzoraka na tržnicama bila je od sireva iz rashladnih komora.

Slično kao i u ljetnom periodu i u zimskom su svježi sirevi prikupljeni u Zagrebu bili su od mlijeka koje nije bilo toplinski obrađeno 96,67 %, dok je 70 % uzoraka polutvrđih sireva bilo od pasteriziranog mlijeka. U Osijeku su svi uzorci svježeg sira bili od nepasteriziranog mlijeka, dok su svi polutvrđi sirevi bili od pasteriziranog mlijeka. U Splitu je 66,67 % svježih sireva bilo od nepasteriziranog mlijeka i 64,29 % polutvrđih sireva je bilo proizvedeno od pasteriziranog mlijeka. U Rijeci su svi uzorci sireva bili proizvedeni od toplinski obrađenog mlijeka, kao i kod ljetnih uzoraka.

**Tablica 10** Količina aflatoksina M1 (AFM1) u svježim i polutvrđim sirevima po mjestu uzorkovanja

Mjesto uzorkovanja	Broj uzoraka	Najmanja/Najveća vrijednost (µg/kg)	Prosječna vrijednost (µg/kg)
Zagreb	40	0,01/0,01	0,01
Split	17	0,01/0,01	0,01
Rijeka	14	0,01/0,047	0,013
Osijek	12	0,01/0,022	0,011
Ukupno	83	0,01/0,047	0,011

Ukupno je u sva 4 grada pretraženo 83 uzorka sira na mikotoksin aflatoksin M<sub>1</sub> (tablica 10). Analizirano je 40 uzoraka iz Zagreba i 17 uzoraka iz Splita i u svima je prisutnost aflatoksina M<sub>1</sub> bila ispod 0,01 µg/kg. Analizirano

je 14 uzoraka iz Rijeke, od kojih je u jednom vrijednost AFM<sub>1</sub> iznosila 0,047 µg/kg i 12 uzoraka iz Osijeka, od kojih je jedan iznosio 0,022 µg/kg AFM<sub>1</sub>.

#### 4. KARAKTERIZACIJA RIZIKA

##### *E. coli* u svježem siru

Prosječna kontaminacija *E. coli* u svježem siru u oba vremenska razdoblja u svim uzorcima iznosila je  $1,3 \times 10^2$  cfu/g. Najveća je bila u Osijeku ( $9,93 \times 10^2$  cfu/g), Splitu ( $1,42 \times 10^2$  cfu/g), Zagrebu ( $8,31 \times 10^1$  cfu/g) pa Rijeci ( $5,84 \times 10^1$  cfu/g). Ukoliko se pretpostavi da se u svježim sirevima broj  $>10$  *E. coli* smatra pozitivnim nalazom, onda je u svim uzorcima u oba razdoblja kontaminacija s *E. coli* iznosila 55,77 %, odnosno za ljeto 60,34 %, a za zimu 50 %. Najveća je bila u Osijeku 84,21 %, zatim u Zagrebu 50,85 %, dok su u Splitu i Rijeci bile najmanje i iznosile su 46,15 %. Ovisno o tome je li uzorak sira bio proizveden od toplinski obrađenog mlijeka ili ne, u oba razdoblja bilo je kontaminirano 47,62 % sireva od pasteriziranog mlijeka i 57,83 % od nepasteriziranog mlijeka. Kontaminacija sireva do  $10^2$  cfu/g *E. coli* smatra se niskom, ne predstavlja rizik za ljudsko zdravlje i pokazatelj je dobre higijene proizvodnje. Uredba 2073/2005 ne propisuje mikrobiološke kriterije sigurnosti hrane za *E. coli* u svježem siru. Propisani su kriteriji za proizvodni proces, ali samo za sireve od mlijeka koje je prošlo toplinski tretman. Propisani kriterij je  $10^2$ - $10^3$  cfu/g u 2 od 5 uzoraka. Ovi se kriteriji ne mogu u ovom slučaju primjenjivati jer se radi o gotovom proizvodu koji se nalazi na tržištu i mikroorganizmu koji se koristi kao indikator organizam za procjenu higijene procesa proizvodnje, a ne sigurnosti hrane. Kriterije propisane za proizvodni proces možemo koristiti usporedbe radi s prosječnom vrijednost *E. coli* u svježem siru ( $1,34 \times 10^2$  cfu/g), dok su prosječne vrijednosti u Zagrebu i Rijeci bile ispod  $10^2$  cfu/g, kao potvrdu dosta niske kontaminacije sira. Nešto viši prosječni rezultati za sireve od nepasteriziranog mlijeka, i pojedinačni rezultati u Zagrebu ( $3 \times 10^4$  cfu/g) i Osijeku ( $2,9 \times 10^4$  cfu/g) u ljetnom uzorkovanju te u zimskom uzorkovanju u Splitu ( $3 \times 10^5$  cfu/g) i Osijeku ( $2,9 \times 10^4$  cfu/g), mogu se smatrati zabrinjavajućima i odrazom lošije higijenske prakse kod proizvodnje. Prema *Smjernicama za procjenu mikrobiološke sigurnosti hrane spremne za konzumaciju („ready-to-eat“ hrane-RTE hrane) na tržištu (2015)*, bakterija *E. coli* je indikator fekalne kontaminacije u RTE hrani koja je u vrlo rijetkim slučajevima patogena. U hrani se može naći kao posljedica nedovoljnog kuhanja ili križne kontaminacije, nehigijenskog rukovanja s hranom, kontaktom hrane s nečistim proizvodnim površinama ili pohranom na neprimjerenim temperaturama. Rezultat za *E. coli* koji je veći od  $10^2$  cfu/g može se smatrati nezadovoljavajućim i znakom povećanog rizika sigurnosti hrane. Stoga se preporučuje pregled procesa proizvodnje, a osobito higijenskih postupaka, čišćenja i sanitacije.

##### *E. coli* u polutvrdom siru

Prosječna kontaminacija *E. coli* u polutvrdom siru u oba vremenska razdoblja u svim uzorcima iznosila je  $3,65 \times 10^1$  cfu/g. Najveća je bila u Rijeci ( $7,41 \times 10^1$  cfu/g), a potom u Osijeku ( $3,37 \times 10^1$  cfu/g), Splitu ( $3,15 \times 10^1$  cfu/g) i Zagrebu ( $2,93 \times 10^1$  cfu/g). Ukoliko se pretpostavi da su svi polutvrđi sirevi koji su sadržavali  $>10$  cfu/g *E. coli* pozitivni, onda je prevalencija za sve uzorke u oba razdoblja iznosila 28,17 %, odnosno za ljeto 38,24 %, a za zimu 18,92 %. Najveća je bila u Rijeci 38,46 %, zatim u Zagrebu 28,57 %, Splitu 25 % i Osijeku 23,08 %. S obzirom je li uzorak sira bio proizveden od toplinski obrađenog mlijeka ili ne, prevalencija je u oba razdoblja kod pasteriziranih uzoraka iznosila 26,79 %, a kod nepasteriziranih 33,33 %. Uredba 2073/2005 ne propisuje mikrobiološke kriterije sigurnosti hrane za *E. coli* u polutvrdom siru. Propisani su kriteriji za proizvodni proces, ali samo za sireve od mlijeka koje je prošlo termički tretman. Propisani kriterij je  $10^2$ - $10^3$  cfu/g *E. coli* u 2 od 5 uzoraka. Ovi se kriteriji ne mogu primjenjivati jer se radi o gotovom proizvodu koji se nalazi na tržištu i mikroorganizmu koji se koristi kao indikator organizam za procjenu higijene procesa proizvodnje, a ne sigurnosti hrane. Prosječna vrijednost broja *E. coli* u uzorcima polutvrđog sira iznosila je ispod  $10^2$  cfu/g, a takve su bile i vrijednosti u svakom gradu pojedinačno. Taj nalaz ukazuje na zadovoljavajuću higijenu proizvodnog procesa, pa je mogla biti prikazana kao niska kontaminacija polutvrđog sira. Nešto viši prosječni godišnji rezultati za polutvrđi sir od nepasteriziranog mlijeka u Osijeku ( $7,9 \times 10^2$  cfu/g), i najveći pojedinačni rezultati za ljetno razdoblje u svim gradovima, Split ( $1,1 \times 10^4$  cfu/g), Zagreb ( $1,4 \times 10^4$  cfu/g), Rijeka ( $1,7 \times 10^4$  cfu/g), Osijek ( $1,9 \times 10^4$  cfu/g) mogu se smatrati zabrinjavajućim, te odrazom lošije higijenske prakse kod proizvodnje. Prema *Smjernicama za procjenu*

*mikrobiološke sigurnosti hrane spremne za konzumaciju („ready-to-eat“ hrane-RTE hrane) na tržištu (2015),* bakterija *E. coli* je indikator fekalne kontaminacije u RTE hrani koji je u vrlo rijetkim slučajevima patogen. U hrani se može naći zbog nedovoljnog kuhanja ili križne kontaminacije, nehigijenskog rukovanja s hranom, kontaktom hrane s nečistim proizvodnim površinama ili pohranom na neprimjerenim temperaturama. Rezultat za *E. coli* koji je veći od  $10^2$  cfu/g može se smatrati nezadovoljavajućim i znakom povećanog rizika sigurnosti hrane. Stoga se preporučuje pregled procesa proizvodnje, a osobito higijenskih postupaka, čišćenja i sanitacije, ali u ovom slučaju samo u pojedinačnim situacijama (najveće kontaminacije). Prosječni rezultat od 20 do 100 cfu/g *E. coli* može se svrstati u graničnu mikrobiološku kategoriju rizika, znači provesti pregled svih higijenskih procesa.

#### *S. aureus* u svježem siru

Prosječna kontaminacija svježeg sira s bakterijom *S. aureus* u oba vremenska razdoblja uzorkovanja u svim uzorcima iznosila je  $1,21 \times 10^1$  cfu/g. Najveća je bila u Osijeku ( $1,46 \times 10^1$  cfu/g), Zagrebu ( $1,27 \times 10^1$  cfu/g), Splitu ( $0,99 \times 10^1$  cfu/g) i Rijeci (<math>10^1</math> cfu/g). Ukoliko se pretpostavi da su svi svježi sirevi koji su imali >10 cfu/g *S. aureus* pozitivni, onda je prevalencija za sve uzorke u oba razdoblja iznosila 13,46 %, odnosno za ljeto 12,07 %, a za zimu 15,22 %. Podjednake prevalencije su bile u Zagrebu i Osijeku (16,95 %, 15,79 %), zatim u Splitu 7,69 %, dok u Rijeci nije bilo pozitivnih uzoraka. S obzirom je li uzorak sira bio proizveden od toplinski obrađenog mlijeka ili ne, prevalencija je u oba razdoblja kod pasteriziranih uzoraka iznosila 4,76 %, a kod nepasteriziranih 15,66 %. Uredba 2073/2005 ne propisuje mikrobiološke kriterije sigurnosti hrane za *S. aureus* u svježem siru već propisuje odsutnost stafilokoknog enterotoksina u 25 g (u 0 od 5 uzoraka). Smatra se kako produkcija stafilokoknog enterotoksina može nastupiti kada broj *S. aureus* prijeđe  $10^5$  cfu/g. Vrijednosti u ovom istraživanju bile su daleko ispod potencijalno rizične granica. Prosječna vrijednost broja *S. aureus* u uzorcima svježeg sira bila je ispod 20 cfu/g, a takve su bile i vrijednosti u svakom gradu pojedinačno. Ovi se kriteriji ne mogu primjenjivati u ovom slučaju jer se radi o gotovom proizvodu koji se nalazi na tržištu i mikroorganizmu koji se koristiti kao indikator organizam za dokaz lošeg rukovanja i loše kontrole temperature. U Uredbi postoje u kriterijima higijene proizvodnog procesa kriteriji za koagulaza za pozitivne stafilokoke koji su različiti za sireve koji se dobivaju od termički obrađenog (vrijednost  $10^2$ - $10^3$  cfu/g, za 2 od 5 uzoraka) i termički neobrađenog mlijeka (vrijednost  $10^4$ - $10^5$  cfu/g, za 2 od 5 uzoraka). U svježim sirevima u ovom istraživanju utvrđena je niža kontaminacija od navedene u Uredbi. Prema *Smjernicama za procjenu mikrobiološke sigurnosti hrane spremne za konzumaciju („ready-to-eat“ hrane-RTE hrane) na tržištu (2015)*, kontaminacija *S. aureus* ispod 20 cfu/g smatra se niskom mikrobiološkom kategorijom rizika što znači da je stanje zadovoljavajuće i da se nikakve dodatne mjere ne trebaju poduzimati. Ipak pojedinačni slučajevi kontaminacije sa *S. aureus* koji su se kretali do  $4,50 \times 10^3$  cfu/g u Zagrebu i  $1 \times 10^3$  cfu/g u Osijeku, smatraju se graničnim i svrstavaju u umjerenu mikrobiološku kategoriju rizika. Posljedica su vjerojatno lošeg rukovanja, proizvodnog procesa i kontrole temperature, te je poželjno revidirati rukovanje i kontrolu proizvodnog procesa.

#### *S. aureus* u polutvrdom siru

Prosječna kontaminacija polutvrđog sira sa *S. aureus* u oba vremenska razdoblja uzorkovanja u svim uzorcima iznosila je  $2,01 \times 10^1$  cfu/g. Najveća je bila u Osijeku ( $3,92 \times 10^1$  cfu/g), Splitu ( $1,90 \times 10^1$  cfu/g), Zagrebu ( $1,69 \times 10^1$  cfu/g) i Rijeci ( $1,52 \times 10^1$  cfu/g). Ukoliko se pretpostavi da su svi polutvrđi sirevi koji su imali >10 cfu/g *S. aureus* pozitivni, onda je prevalencija za sve uzorke u oba razdoblja iznosila 15,49 %, odnosno za ljeto 21,05 %, a za zimu 9,09 %. Najveća je bila u Osijeku 30,77 %, zatim u Zagrebu 14,29 %, Splitu 12,5 % i u Rijeci 7,69 %. S obzirom je li uzorak sira bio od toplinski obrađenog mlijeka ili ne, prevalencija je u oba razdoblja kod pasteriziranih uzoraka iznosila 14,29 %, a kod nepasteriziranih 20%. Uredba 2073/2005 ne propisuje mikrobiološke kriterije sigurnosti hrane za *S. aureus* u polutvrdom siru već propisuje odsutnost stafilokoknog enterotoksina u 25 g (u 0 od 5 uzoraka). Smatra se kako produkcija stafilokoknog enterotoksina može nastupiti kada broj *S. aureus* prijeđe  $10^5$  cfu/g, a vrijednosti u ovom istraživanju bile su daleko ispod potencijalno rizične granica. Prosječna vrijednost uzoraka u RH iznosila je oko 20 cfu/g. U Uredbi postoje u kriterijima higijene proizvodnog procesa kriteriji za koagulaza pozitivne stafilokoke koji su različiti za sireve koji se proizvode od termički obrađenog (vrijednost  $10^2$ - $10^3$  cfu/g, za 2 od 5 uzoraka) i termički neobrađenog mlijeka (vrijednost  $10^4$ - $10^5$  cfu/g, za 2 od 5 uzoraka). Ti su

kriteriji viši od ovih koji su bili prisutni u polutvrđim sirevima. Nešto viši pojedinačni rezultati za polutvrde sireve od nepasteriziranog mlijeka u Splitu ( $2,5 \times 10^4$  cfu/g), Zagrebu ( $2,7 \times 10^3$  cfu/g) i Osijeku ( $1,8 \times 10^3$  cfu/g), još uvijek su ispod vrijednosti koja se smatra graničnom za postojanje rizika od proizvodnje stafilokoknog enterotoksina. Prema *Smjernicama za procjenu mikrobiološke sigurnosti hrane spremne za konzumaciju („ready-to-eat“ hrane-RTE hrane) na tržištu*, kontaminacije *S. aureus* veće od 20 cfu/g, a manje ili jednake od  $10^4$  cfu/g smatraju se umjerenom mikrobiološkom kategorijom rizika što znači da je stanje granično i da bi trebalo pregledati proizvodni proces, a vrijednosti iznad  $10^4$  cfu/g (uzorak iz Splita) da je mikrobiološki rizik visok, a stanje nezadovoljavajuće i trebaju se hitno revidirati način rukovanja s hranom, kontrola temperature i vremena te uzeti uzorke hrane i brisove iz okoliša za mikrobiološke analize.

Predviđanje rasta bakterija *E. coli* i *S. aureus* u svježim i polutvrđim sirevima (tablica 11)

**Tablica 11** Rezultati najmanje i najveće kontaminacije sireva bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*

Mikrobiološki pokazatelj	Mjesto uzorkovanja	Uzorkovanje							
		Ljeto				Zima			
		Svježi sir		Polutvrđi sir		Svježi sir		Polutvrđi sir	
		min	max	min	max	min	max	min	max
<i>S. aureus</i> , cfu/g	ST	<10	$3,00 \times 10^1$	<10	<10	<10	<10	<10	$2,50 \times 10^4$
	ZG	<10	$1,50 \times 10^2$	<10	$2,70 \times 10^3$	<10	$4,50 \times 10^3$	<10	$8,40 \times 10^1$
	RI	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	$8,20 \times 10^3$
	OS	<10	$1,50 \times 10^2$	<10	$7,50 \times 10^3$	<10	$1,00 \times 10^3$	<10	$5,00 \times 10^2$
<i>E. coli</i> , cfu/g	ST	<10	$1,60 \times 10^4$	<10	$1,10 \times 10^4$	<10	$4,00 \times 10^3$	<10	$2,60 \times 10^3$
	ZG	<10	$3,00 \times 10^4$	<10	$1,40 \times 10^4$	<10	$6,50 \times 10^4$	<10	$5,30 \times 10^2$
	RI	<10	$7,50 \times 10^2$	<10	$1,70 \times 10^4$	<10	$9,30 \times 10^3$	<10	$7,20 \times 10^3$
	OS	$3,00 \times 10^1$	$2,90 \times 10^4$	<10	$1,90 \times 10^4$	<10	$2,90 \times 10^4$	<10	<10

ST=Split; ZG=Zagreb; RI=Rijeka; OS=Osijek

Za predviđanje rasta bakterija *E. coli* i *S. aureus* u svježim i polutvrđim sirevima koristili smo Combase softver. Uzeli smo u obzir parametre koji mogu utjecati na njihov rast, poput inicijalne kontaminacije, temperature, pH i aktiviteta vode, te fiziološkog stanja, koje je u ovom softveru već unaprijed određeno za svaki specifični mikroorganizam. Za *E. coli* koristili smo vrijednost inicijalne kontaminacije koja je u slučaju najmanje kontaminacije iznosila <10 cfu/g, za prosječnu kontaminaciju za svježi sir  $1,34 \times 10^2$  cfu/g, a za polutvrđi  $3,65 \times 10^1$  cfu/g, i najvišu kontaminaciju koja je za svježi sir iznosila  $6,5 \times 10^4$  cfu/g, a za polutvrđi  $1,9 \times 10^4$  cfu/g. Za *S. aureus* koristili smo vrijednost inicijalne kontaminacije koja je u slučaju najmanje kontaminacije iznosila <10 cfu/g, za prosječnu kontaminaciju za svježi sir  $1,2 \times 10^1$  cfu/g, a za polutvrđi 20 cfu/g, i najvišu kontaminaciju koja je za svježi sir iznosila  $4,5 \times 10^3$  cfu/g, a za polutvrđi  $2,5 \times 10^4$  cfu/g. Podatke za pH koristili smo na temelju rezultata iz našeg istraživanja i koristili smo krajnje utvrđene vrijednosti (za svježi sir 4,5 i 5,4 pH, a za polutvrđi 5,5 i 5,7 pH). Aktivitet vode smo odredili na temelju literaturnih podataka, te smo za svježi sir koristili vrijednost od 0,98, a za polutvrde sireve 0,96. To su prema literaturi najveći utvrđeni iznosi  $a_w$  za ove vrste sireva. Osim toga vrijednost za  $a_w$  niža od 0,96 ne podržava rast *E. coli* ni u kojoj hrani, čime je pojašnjena činjenica da je u polutvrđim sirevima kontaminacija s *E. coli* bila niža u odnosu na svježije sireve. Na temelju predviđanja rasta zaključili smo kako na prisustvo *E. coli* i *S. aureus* u svježim i polutvrđim sirevima osim inicijalne kontaminacije najveći utjecaj ima temperatura, odnosno temperatura veća od 10 °C, jer do te vrijednosti temperature nije dolazilo do porasta, dok

je pri temperaturi od 20 °C i 30 °C došlo do povećanja njihovog broja, te do smanjivanja vremena koje je potrebno da se njihov broj udvostruči. S obzirom na važnost utjecaja temperature na rast ovih mikroorganizama, potrebno je osigurati „hladni lanac“ u svim fazama proizvodnje i distribucije ovih proizvoda, na što bi pažnju trebali obratiti i kupci, te nakon kupnje ovih sireva pohraniti ih u što je moguće kraćem vremenu u hladnjak. Imajući to u vidu, potpuno je opravdano postavljanje rashladnih vitrina na tržnice gdje se ti sirevi prodaju, te držanje istih na primjerenoj temperaturi (do 10 °C).

Grafički prikazi opisanog predviđanja rasta *E. coli* i *S. aureus* nalaze se u Dodatku 2.

#### Mikotoksini

Od ukupno 83 analizirana uzorka sira na aflatoksin M<sub>1</sub> dva uzorka (0,047 i 0,022 µg/kg AFM<sub>1</sub>) su imala vrijednost veću od 0,01 µg/kg (granica kvantifikacije za metodu). Ove dvije vrijednosti AFM<sub>1</sub> uzoraka sira koje su bile veće od 0,01 nisu imale veći utjecaj na prosječnu vrijednost koja je iznosila 0,011 µg/kg. Oba uzorka sira spadaju u kategoriju polutvrđih sireva. S obzirom na tehnološki proces i količinu mlijeka koja je potrebna u izradi polutvrđih sireva, te uzimajući u obzir kako je najveća dopuštena količina (NDK) AFM<sub>1</sub> u mlijeku 0,05 µg/kg (Uredba Komisije (EZ) br. 1881/2006 od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani), može se izračunati kako je količina AFM<sub>1</sub> u polutvrdom siru ne bi trebala prelaziti 0,25 µg/kg (Znanstveno izvješće o procjeni izloženosti s obzirom na konzumaciju mliječnih proizvoda s povišenim NDK vrijednostima za aflatoksin M<sub>1</sub>, HAH, prema vrijednosti za tvrdi sir). Vrijednosti dobivene u pojedinačnim uzorcima iz Rijeke i Osijeka, kao i prosječne vrijednosti svih uzoraka, niže su od vrijednosti koje su prihvatljive, u odnosu na NDK propisan za mlijeko.

Uobičajena je praksa prisutnost mikotoksina u hrani pratiti tijekom duljeg razdoblja, barem 3 godine. Kako naši podaci predstavljaju rezultate tek jedne godine, ne mogu se kvalitativno procijeniti. Prisutnost mikotoksina u mlijeku, a posljedično u siru, ovisi prvenstveno o izvoru aflatoksina (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) u hrani. Prisutnost u hrani varira od godine do godine i na nju najviše utječu klimatske prilike i nedovoljno pridržavanje dobre proizvođačke prakse. Naši rezultati ne ukazuju na postojanje osobitog rizika od mikotoksina iz sireva, ali nešto povećana količina u dva uzorka ne isključuje taj rizik u potpunosti, čak i uz pretpostavku kako su sirevi uzorkovani u godini kada klimatski uvjeti nisu pogodovali razvoju plijesni koje proizvode aflatoksine u hrani. Međutim za pouzdaniju procjenu rizika potrebno je pratiti prisutnost mikotoksina u siru nekoliko godina.

#### ZAKLJUČAK

U ovom su Znanstvenom mišljenju prikazani rezultati mikrobiološke kontaminacije tradicionalno proizvedenih sireva koji se prodaju na tržnicama velikih gradova u RH (Zagreb, Rijeka, Split i Osijek).

Rezultati su pokazali kako niti jedan uzorak sira nije bio kontaminiran s bakterijama *L. monocytogenes* i *Salmonella* spp.

Prosječna kontaminacija svježih sireva s bakterijom *E. coli* bila je nešto viša od 10<sup>2</sup> cfu/g, što bi se moglo smatrati nezadovoljavajućim rezultatom tj. postojanjem povećanog rizika za sigurnost sireva. Svježi sirevi iz Rijeke i Zagreba imali su prosječnu kontaminaciju nižu od 10<sup>2</sup> cfu/g, dok su prosječne vrijednosti u Splitu bile neznatno veće od 10<sup>2</sup> cfu/g. U Osijeku je prosječna vrijednost bila najveća, ali ipak nije prelazila 10<sup>3</sup> cfu/g. Na prosječnu vrijednost veću od 10<sup>2</sup> cfu/g najveći utjecaj imale su pojedinačne povišene vrijednosti, te je stoga potreban individualni pristup, dodatne edukacije i kontrole pojedinačnih proizvođača. S druge strane, bilo je proizvođača s dobrim rezultatima mikrobioloških analiza, što je dokaz dobre osviještenosti i kontinuiranog praćenja novih trendova, kao i sudjelovanja u dostupnim edukacijama, te primjena i provedba dobre higijenske prakse, što je rezultiralo proizvodnjom svježih sireva sigurnih za konzumaciju.

Kontaminacija bakterijom *E. coli* kod polutvrđih sireva bila je niska i odraz je zadovoljavajuće higijene. Ipak i tu se mogu zamijetiti pojedinačni slučajevi u kojima je kontaminacija bila nešto viša, posebno u sirevima od nepasteriziranog mlijeka i/ili u ljetnom periodu, te je provođenje dodatnih edukacija i kontrolnih mjera poželjno u takvim slučajevima. Niža kontaminacija polutvrđih u odnosu na svježe sireve posljedica je vrijednosti aktiviteta vode koji je bio blizu vrijednosti od 0,96, koja (i niže od nje) više ne podržava rast *E. coli* ni u kojoj hrani.



Prosječna kontaminacija svježih sireva s bakterijom *S. aureus* može se smatrati niskom, a isto takva je bila i prosječna kontaminacija po gradovima. Mogu se međutim primjetiti razlike u povećanoj kontaminaciji kod sireva od mlijeka koje nije prošlo toplinsku obradu, te neznatno veća kontaminacija sireva u zimskom periodu, i u unutrašnjosti zemlje (Osijek i Zagreb). Rezultati kontaminacije niti u jednom slučaju nisu prelazili  $10^5$  cfu/g, vrijednost koja se smata najnižom potrebnom za moguću produkciju stafilokoknih enterotoksina. U pojedinačnim slučajevima kontaminacija je iznosila oko  $10^3$  cfu/g, što bi takve sireve svrstalo u umjerenu kategoriju rizika, i kojem slučaju je potrebno revidiranje rukovanja i kontrole proizvodnog procesa.

Prosječna kontaminacija polutvrđih sireva bila je zadovoljavajuća (ispod do 20 cfu/g) i takva je zabilježena u svim gradovima osim u Osijeku. Veća kontaminacija sireva zabilježena je kod sireva dobivenih od toplinski neobrađenog mlijeka i/ili u ljetnom periodu. Najveća kontaminacija u pojedinačnim slučajevima ukazuje na nezadovoljavajuće stanje proizvodnog procesa, u kojem je slučaju potrebno revidirati način rukovanja s hranom, kontrolu temperature i vremena, te provesti dodatnu mikrobiološku kontrolu hrane i okoliša.

Na temelju predviđanja rasta zaključeno je kako na prisustvo *E. coli* i *S. aureus* u svježim i polutvrđim sirevima osim inicijalne kontaminacije najveći utjecaj ima temperatura, odnosno temperatura veća od 10 °C, jer do te vrijednosti temperature nije dolazilo do porasta, dok je pri temperaturi od 20 °C i 30 °C došlo kako do povećanja njihovog broja, te do smanjivanja vremena koje je potrebno da se njihov broj udvostruči. S obzirom na važnost utjecaja temperature na rast ovih mikroorganizama, potrebno je osigurati „hladni lanac“ u svim fazama proizvodnje i distribucije ovih proizvoda, na što bi pažnju trebali obratiti i kupci, te nakon kupnje ovih sireva pohraniti ih u što je moguće kraćem vremenu u hladnjak. Imajući to u vidu, potpuno je opravdano postavljanje rashladnih vitrina na tržnice gdje se ti sirevi prodaju, te držanje istih na primjerenom temperaturi (nižoj od 10 °C). Prisutnost aflatoksina M<sub>1</sub> u svježim i polutvrđim sirevima može se smatrati zanemarivim rizikom. Ipak, sirevi su bili uzorkovani u godini kada klimatski uvjeti nisu pogodovali razvoju plijesni koje proizvode aflatoksine u hrani, te bi se za pouzdaniju procjenu rizika trebalo pratiti prisutnost mikotoksina u siru kroz nekoliko godina.

## PREPORUKE

Bakterija *E. coli* u hrani se može naći zbog nedovoljnog kuhanja, križne kontaminacije, nehigijenskog rukovanja s hranom, kontaktom hrane s nečistim proizvodnim površinama ili pohranom na neprimjerenim temperaturama. Stoga se prilikom rukovanja s hranom tijekom proizvodnog procesa, pohrane i nakon kupnje hrane, pažnja treba posvetiti da se s hranom rukuje u skladu s dobrom higijenskom praksom koja bi trebala prevenirati sve ranije spomenute moguće načine kontaminacije i preživljavanja.

U slučaju kada je rezultat za bakteriju *E. coli* nezadovoljavajući (veći od  $10^2$  cfu/g) preporučuje se pregled procesa proizvodnje, a osobito higijenskih postupaka, čišćenja i sanitacije.

Kontaminacija *S. aureus* ispod 20 cfu/g smatra se niskom mikrobiološkom kategorijom rizika što znači da je stanje zadovoljavajuće i da se nikakve dodatne mjere ne trebaju poduzimati. Ipak pojedinačni slučajevi kontaminacije sa bakterijom *S. aureus* (koji su se kretali do  $4,50 \times 10^3$ ), smatraju se graničnim i svrstavaju u umjerenu mikrobiološku kategoriju rizika. Moguća su posljedica lošeg rukovanja i proizvodnog procesa, te slabe ili neprimjerene kontrole temperature, te je poželjno, u tom slučaju, revidirati rukovanje i kontrolu proizvodnog procesa.

Na temelju svega navedenog, preporuča se povremena kontrola svježih i polutvrđih sireva, kao i uvjeta njihove proizvodnje, te kontrola prisutnosti mikotoksina.

Kako je najveća odgovornost i primarni uvjet za kvalitetu i sigurnost sireva na subjektima u poslovanju s hranom koji proizvode te iste proizvode na svojim obiteljskim gospodarstvima, potrebno je provoditi trajne edukacije proizvođača o važnosti higijene u proizvodnji i preradi mlijeka budući da rezultati analiza pokazuju da postoje određeni problemi u zadovoljavanju mikrobioloških kriterija. Neophodno je osigurati „hladni lanac“ tijekom cijelog postupka proizvodnje i prodaje sira i voditi brigu održava li se rashladna oprema, kao i oprema za toplinsku obradu redovito i funkcionira li ispravno.

Isto tako potrebno je izvještavati potrošače o postupcima sa sirevima (i sličnom hranom) nakon kupnje, prilikom pripreme i pohrane, kako bi sami mogli doprinjeti konzumaciji sigurne hrane.

## LITERATURA

1. Araújo VS, Pagliares VA, Queiroz ML, Freitas-Almeida AC (2002): Occurrence of *Staphylococcus* and enteropathogens in soft cheese commercialized in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 92:1172-1177.
2. Ayar A, Sert D, Çon AH (2007): A study on the occurrence of aflatoxin in raw milk due to feeds. *Journal of Food Safety*, 27:199-207.
3. Benussi-Skukan A, Kozačinski L, Brlek-Gorski D, Humski A, Dunaj A (2008): Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in fresh meat: use of conventional microbiological methods and immunomagnetic separation. U *The 21st International ICFMH Symposium "Evolving Microbial Food Quality and Safety"*. Aberdeen, Škotska.
4. Benussi-Skukan A, Humski A (2004): Detection of *Listeria monocytogenes* in various foods. U *The 19th International ICFMH Symposium Food Micro*, str. 358. Portorož, Slovenija.
5. Bordez-Benitez A, Sanchez-Onoro M, Suarez-Bordon P, Garcia-Rojas AJ, Saez-Nieto JA, Gonzalez-Garcia A, Alamo-Antunez I, Sanchez-Maroto A, Bolanos-Rivero M (2006): Outbreak of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidermicus* infections in the island of Gran Canaria associated with the consumption of inadequately pasteurized cheese. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25:242-246.
6. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B (2000): *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7):2465-2467.
7. Cavaliere C, Foglia P, Pastorini E, Samperi R, Lagana A (2006): Liquid chromatography/tandem mass spectrometric confirmatory method for determining aflatoxin M1 in cow milk- Comparison between electrospray and atmospheric pressure photoionization sources. *Journal of Chromatography A*, 1101:69-78.
8. Choi KH, Lee H, Lee S, Kim S, Yoon Y (2016): Cheese microbial risk assessment – A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 29(3):307-314.
9. CAC, Codex Alimentarius Commission (2001): *Comments submitted on the draft maximum level for aflatoxin M1 in milk*. Codex committee on food additives and contaminants 33rd session, Hague, Netherlands.
10. Cogan TM (2002): Cheese: public health aspects. U: *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press, Elsevier Science Ltd., London.
11. ComBase (2016): ComBase (računalni program). Dostupno na: <http://browser.combase.cc/Search.aspx> (25.10.2016.)
12. Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G, Gramaglia M, Goffredo E (2004): Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 96:67-73.
13. D'Aoust JY (1994): *Salmonella* and the international food trade. *International Journal of Food Microbiology*, 24(1-2):11-31.
14. D'Aoust JY (2001): *Salmonella*. U: *Guide to Food-borne Pathogens*. Wiley, New York.
15. De Valk H, Jacquet C, Goulet V, Vaillant V, Perra A, Simon F, Desenclos JC, Martin P (2005): Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Eurosurveillance*, 10(10):251-255.
16. Domijan AM, Peraica M (2010): Carcinogenic mycotoxins. U: *Carcinogens*. Elsevier, Oxford Academic Press.
17. Doyle MP, Beauchat LR, Montville TJ (1997): *Food microbiology: fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington, USA.

18. Espie E, Vaillant V, Mariani-Kurkdijan P, Grimont F, Martin-Shaller R, De Walk H, Vernozoy Rozand C (2006): *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goat's cheese. *Epidemiology and Infection*, 134:143-146.
19. EFSA, European Food Safety Authority (2008): *Zoonoses data collection reports*. Dostupno na: [http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring\\_zoonoses/reports.html](http://www.efsa.europa.eu/en/science/monitoring_zoonoses/reports.html) (25.09.2008.)
20. Fallah AA, Jafari T, Fallah A, Rahnama M (2009): Determination of aflatoxin M1 levels in Iranian white and cream cheese. *Food and Chemical Toxicology*, 47:1872-1875.
21. FDA, Food and Drug Administration (2011): *Fish and fishery products hazards and controls guidance*. Food and Drug Administration, Department of health and human services public health service food and drug administration center for food safety and applied nutrition office of food safety, Florida Sea Grant, Gainesville.
22. Food Standards Australia New Zealand (2009): *Microbiological risk assessment of raw cow milk*. Food Standards Australia New Zealand.
23. Foschino R, Invernizzi A, Barucco R, Stradiotto K (2002): Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *Journal of Dairy Research*, 69:213-225.
24. Fox PF, Gine TP, Cogan TM, McSweeney PLH (2000): *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publishers, Gaithersburg, USA.
25. Franz CM, Holzapfel WA, Stiles ME (1999): Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology*, 47:1-24.
26. Frobish RA, Bradley BD, Wagner DD, Long-Bradley PE, Hairston H (1986): Aflatoxin residues in milk of dairy cows after ingestion of naturally contaminated grains. *Journal of Food Protection*, 49:781-785.
27. Gerba CP, Rose JB, Haas CN (1996): Sensitive populations: who is at the greatest risk? *International Journal of Food Microbiology*, 30(1-2):113-123.
28. Gürbay A, Sabuncuoglu SA, Girgin G, Sahin G, Yigit S, Yurdakök M, Tekinalp G (2010): Exposure of newborns to aflatoxin M1 and B1 from mothers' breast milk in Ankara, Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 48:314-319.
29. Haeghebaert S, Sulem P, Deroudille L, Vanneroy-Adenot E, Bagnis O, Bouvet P, Grimont F, Brisabois A, Le Querrec F, Hervy C, Espié E, de Valk H, Vaillant V (2003): Two outbreaks of *Salmonella enteritidis* phage type 8 linked to the consumption of Cantal cheese made with raw milk, France 2001. *Eurosurveillance*, 8:151-156.
30. Hegarty H, O'Sullivan MB, Buckley J, Foley-Nolan C (2002): Continued raw milk consumption on farms: why? *Communicable Disease and Public Health*, 5:151-156.
31. Hengl B, Gross-Bošković A, Šperanda M (2015): Količina aflatoksinu u hrani za mliječne krave i pojavnost AFM<sub>1</sub> u mlijeku. *Krmiva*, 56(4):169-177.
32. Hoogenboom LA, Tulliez J, Gautier JP, Coker RD, Melcion JP, Nagler MJ, Polman TH, Delort-Laval J (2001): Absorption, distribution and excretion of aflatoxin-derived ammoniation products in lactating cows. *Food Additives and Contaminants*, 18(1):47-58.
33. Humski A, Mikulić M, Klarić M, Havdra T (2011): *Listeria monocytogenes* u svježem kravljem siru. *Veterinarska stanica*, 42(4):317-321.
34. Hymery N, Vasseur V, Coton M, Mounier J, Jany JL, Barbier G, Coton E (2014): Filamentous fungi and mycotoxins in cheese: A review. *Food Science and Food Safety*, 13:437-456.
35. IARC, International Agency for Research on Cancer (1993): *Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins*. IARC, Lyon, France.
36. IARC, International Agency for Research on Cancer (2002): *Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene*. IARC, Lyon, France.
37. Jay S, Davos D, Dundas M, Frankish E, Lightfoot D (2003): *Salmonella*. U: *Foodborne microorganisms of public health significance*. Australian Institute of Food Science and Technology, Food Microbiology Group, Waterloo.
38. Kamkar A, Karim G, Aliabadi FS, Khaksar R (2008): Fate of aflatoxin M1 in Iranian white cheese processing. *Food Chemical and Toxicology*, 46:2236-2238.

39. Keene WE, Hedberg K, Herriott DE, Hancock DD, McKay RW, Barrett TJ, Fleming DW (1997): A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk. *The Journal of Infectious Diseases*, 176:815-818.
40. Keener KM, Bashor MP, Curtis PA, Sheldon BW, Kathariou S (2004): Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety*, 3(2):105-116.
41. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos EH (2010): Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control*, 21:805-815.
42. Kozačinski L, Hadžiosmanović M (2001): The occurrence of *Listeria monocytogenes* in home-made dairy products. *Tierärztliche Umschau*, 56:590-594.
43. Kozačinski L, Hadžiosmanović M, Zdolec N (2006): Microbial quality of poultry meat on the Croatian market. *Veterinarski arhiv*, 76:305-313.
44. Kyoung-Hee C, Heeyoung L, Soomin L, Sejeong K, Yohan Y (2015): Cheese microbial risk assessments - A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(3):307-314.
45. Levin RE (2007): *Campylobacter jejuni*: A review of its characteristics, pathogenicity, ecology, distribution, subspecies characterization and molecular methods of detection. *Food Biotechnology*, 21:271-347.
46. Loessner M, Guenther S, Stephan S, Scherer S (2003): A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhabits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Applied & Environmental Microbiology*, 69:1854-1857.
47. Lundén J, Tolvanen R, Korkeala H (2004): Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*, 87:6-11.
48. Mališa A (2012): Nalaz bakterije *L. monocytogenes* u svježem kravljem siru. *Diplomski rad*. Veterinarski fakultet, Zagreb.
49. Marinculić A, Habrun B, Barbić Lj, Beck R (2009): *Biološke opasnosti u hrani*. Hrvatska agencija za hranu, Osijek.
50. Markov K, Frece J, Čvek D, Delaš F (2009): *Listeria monocytogenes* i drugi kontaminanti u svježem siru i vrhnju domaće proizvodnje s područja grada Zagreba. *Mljekarstvo*, 59:225-231.
51. Masoero F, Gallo A, Moschini M, Piva G, Diaz D (2007): Carryover of aflatoxin from feed to milk in dairy cows with low or high somatic cell counts. *Animal*, 1(9):1344-1350.
52. Mikulić M, Humski A, Njari B, Ostović M, Cvetnić Ž (2016): Termotolerantni *Campylobacter* spp. – Uzročnici kampilobakterioze (I. DIO). *Veterinarska stanica*, 47(4):447-454.
53. Murinda SE, Nguyen LT, Ivey SJ, Gillespie BE, Almeida RA, Draughon FA, Oliver SP (2002): Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: A 12-month survey of dairy farms in east Tennessee. *Journal of Food Protection*, 65(5):752-759.
54. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggio A, Decastelli L, Mioni R, Scuto S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV (2005): Coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98:73-79.
55. Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV (2007): Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 115:290-296.
56. Panday A, Joshi VK, Nigam P, Soccol CR (2000): Enterobacteriaceae, coliforms and *E. coli*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London, UK.
57. Pavičić Ž (2006): *Mlijeko-od mužnje do sira*. Gospodarski list d.d., Zagreb.
58. Pelisser MR, Klein CS, Ascoli KR, Zotti TR, Arisil ACM (2009): Occurrence of *Staphylococcus aureus* and multiplex PCR detection of classic enterotoxin genes in cheese and meat products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40:145-148.

59. Polychronaki N, West RM, Turner PC, Amr H, Abdel-Wahhab M, Mykkanen H, El-Nezami H (2007): A longitudinal assessment of aflatoxin M1 excretion in breast milk of selected Egyptian mothers. *Food and Chemical Toxicology*, 45:1210-1215.
60. Posfay-Barbe KM, Wald ER (2004): Listeriosis. *Pediatric in Review*, 25:151-159.
61. Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47:984-991.
62. *Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva (2009)*. Narodne novine, br. 20/09 i 141/13.
63. Rudolf M, Scherer S (2001): High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 63:91-98.
64. Sassahara M, Netto DP, Yanaka EK (2005): Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxin M1 in raw milk in the north of Parana state. *Food and Chemical Toxicology*, 43:981-984.
65. Slačanac V (2007): *Proizvodnja sira na OPG Osječko-baranjske županije*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
66. Stratton JE, Hutkins RW, Taylor SL (1991): Biogenic amines in cheese and other fermented food: a review. *Journal of Food Protection*, 54:460-470.
67. Tratnik Lj (1998): *Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
68. Uhitil S, Jakšić S, Petrak T, Medić H, Gumhalter-Karolyi L (2004): Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria spp.* in cakes in Croatia. *Food Control*, 15:213-216.
69. Unusan N (2006): Occurrence of aflatoxin M1 in UHT milk in Turkey. *Food and Chemical Toxicology*, 44:1897-1900.
70. Upton PA, Coia JE (1994): Outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with pasteurized milk supply. *The Lancet*, 344(8928):1015.
71. *Uredba 2006/1881/EZ Europskog parlamenta i vijeća od 19. prosinca 2006. o utvrđivanju najvećih dopuštenih količina određenih kontaminanata u hrani*. Official Journal of the European Union, L364/5.
72. Wells JG, Shipman LD, Greene KD, Sowers EG, Green JH, Cameron DN, Downes FP, Martin ML, Griffin PM, Ostroff SM, Potter ME, Tauxe RV, Wachsmuth IK (1991): Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *Journal of clinical microbiology*, 29(5):985-989.
73. Wemekamp-Kamphuis HH, Sleator RD, Wouters JA, Hill C, Abee T (2004): Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:2912-2918.
74. *Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (2013)*. Narodne novine, br. 81/13.

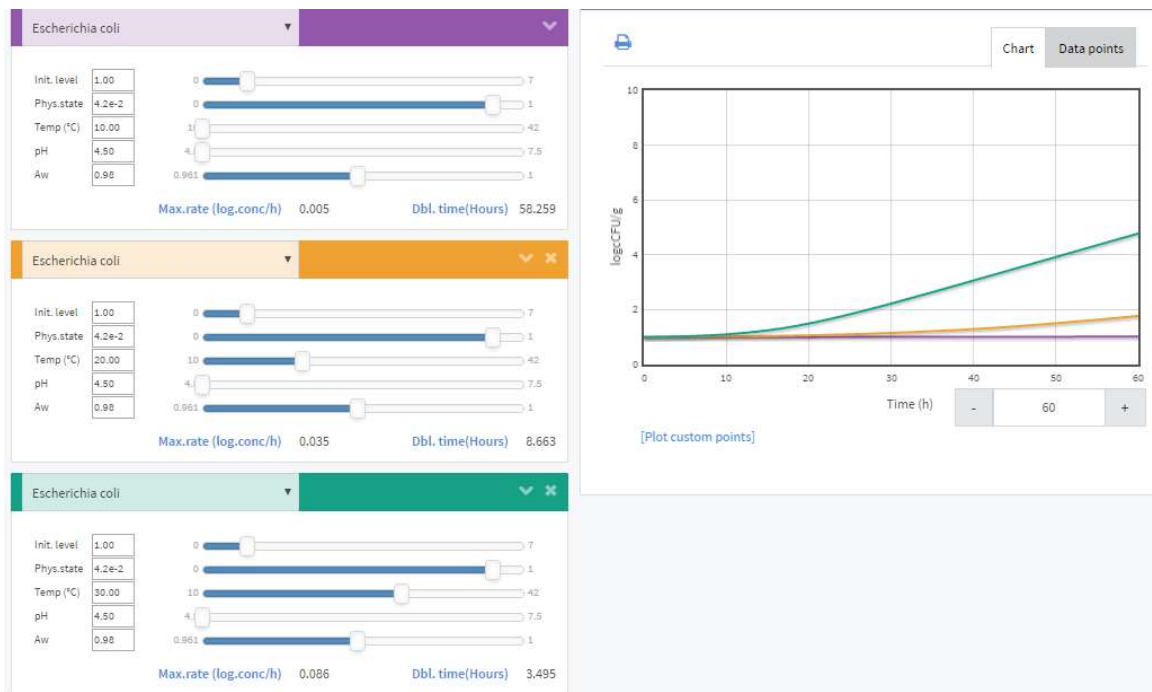
**Dodatak 1**

**UPITNIK o podacima prikupljenih kravljih sireva na tržnicama RH**

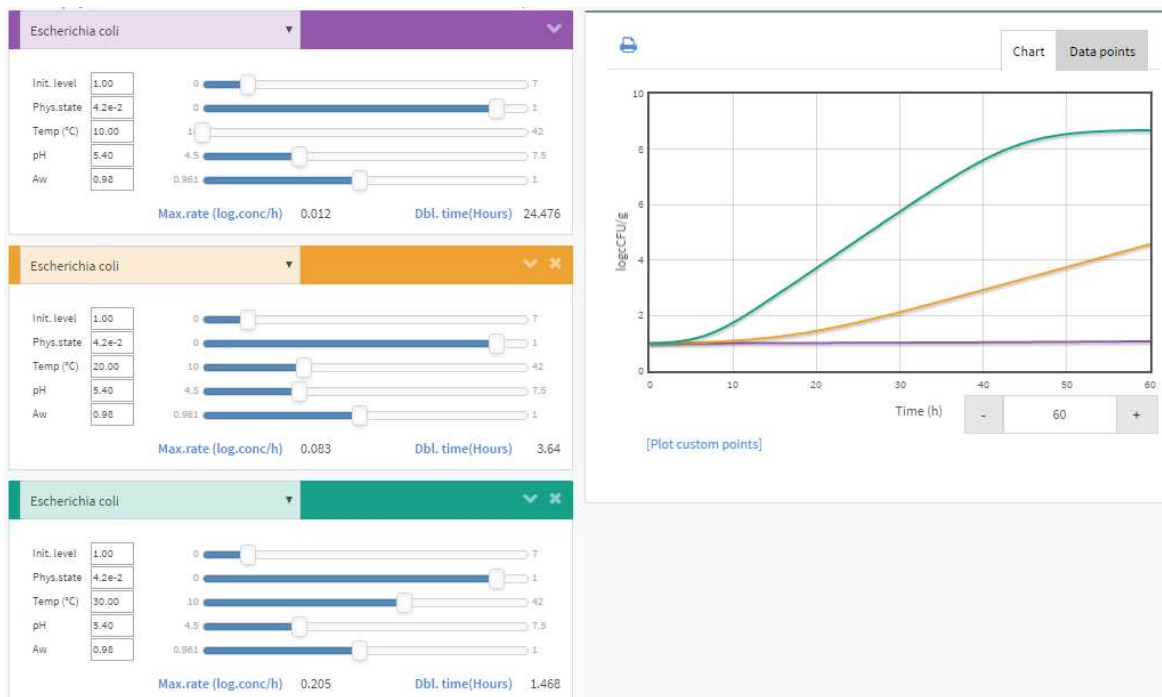
<b>UZORAK (broj)</b>	
<b>Mjesto prodaje (tržnica)</b>	a) Zagreb b) Osijek c) Rijeka d) Split
<b>Lokacija tržnice (adresa)</b>	
<b>Datum uzorkovanja</b>	
<b>Lokalitet proizvodnje sira (naziv OPG-a i adresa)</b>	
<b>Prodaje li se taj sir još na nekom mjestu? Ako da, na kojem (adresa)?</b>	
<b>Vrsta sira</b>	a) Svježi sir b) Polutvrđi sir
<b>Vrsta mlijeka od kojeg je sir napravljen</b>	a) Pasterizirano mlijeko b) Nepasterizirano mlijeko
<b>Ukupna količina proizvedenog sira (na tjednoj osnovi)</b>	
<b>Da li ima godišnjih varijacija u količini proizvedenog sira? (od min do max)</b>	
<b>Korištena starter kultura/sirilo</b>	
<b>Cijena sira/kg</b>	
<b>Jesu li sirevi prodavani na tržnicama u rashladnim komorama?</b>	a) DA b) NE
<b>Način i uvjeti transporta do tržnice</b>	

## Dodatak 2

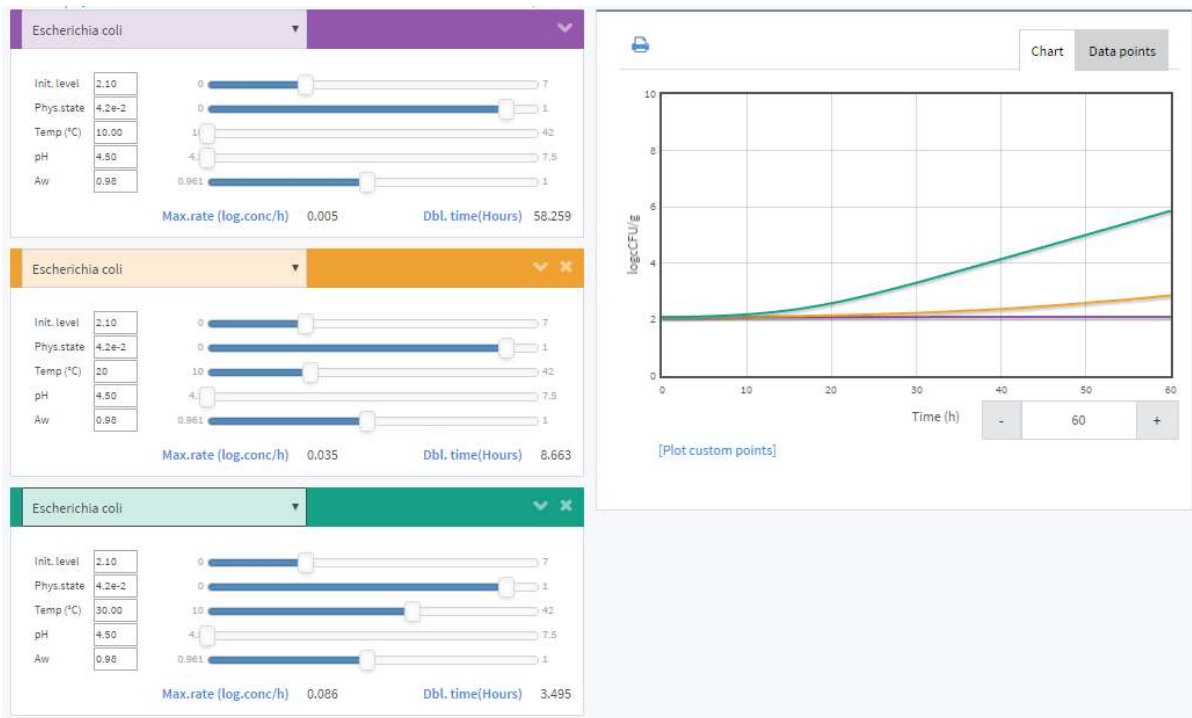
**Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i  $a_w$**



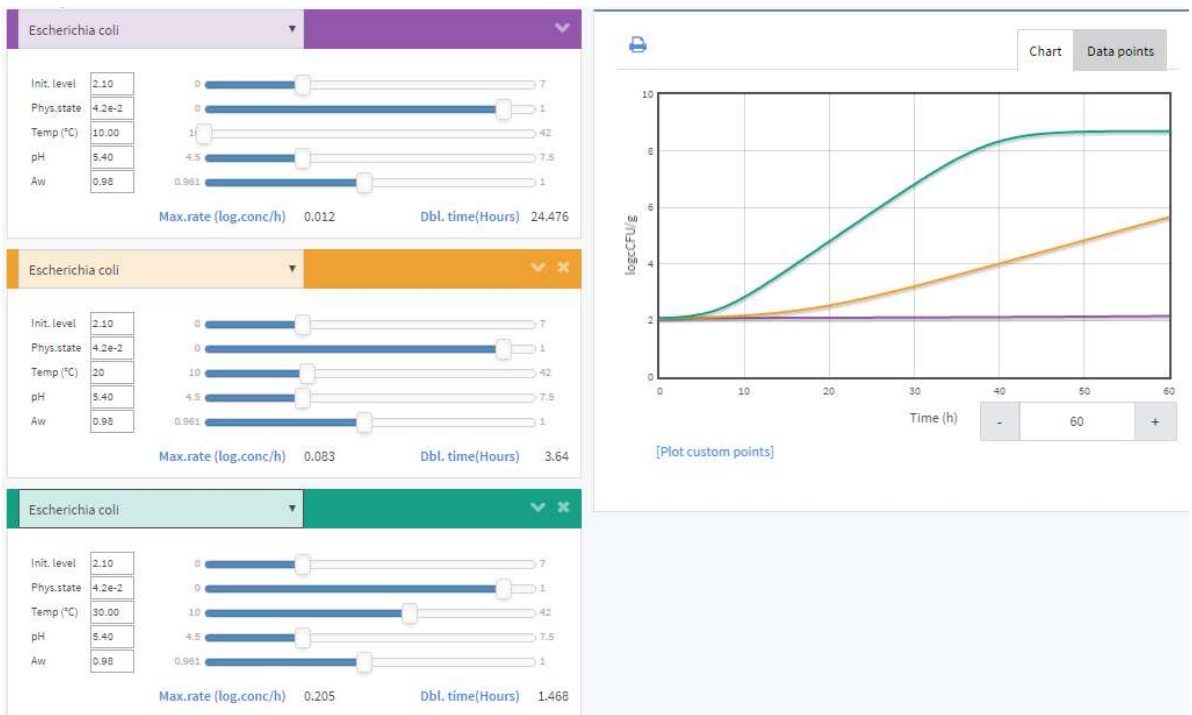
**Slika 1** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $<10$  cfu/g, pH 4,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,98



**Slika 2** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $<10$  cfu/g, pH 5,40, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,98

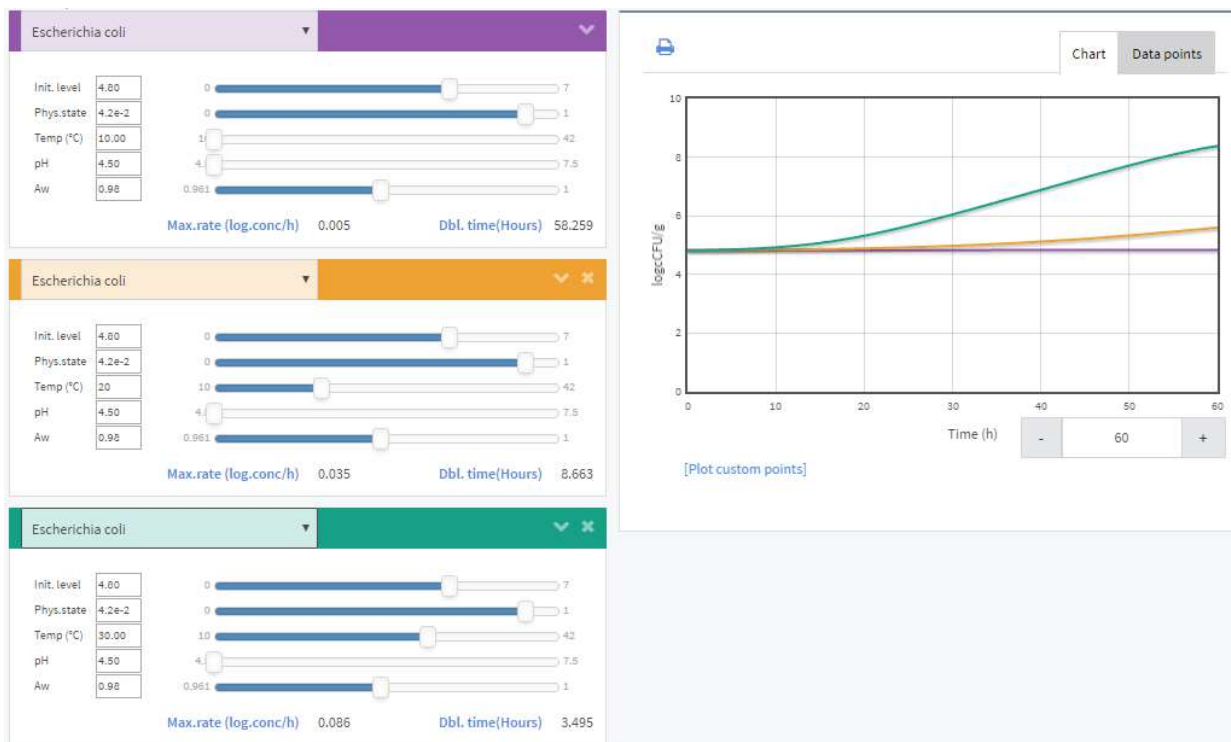


**Slika 3** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $1,34 \times 10^2$  cfu/g, pH 4,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,98

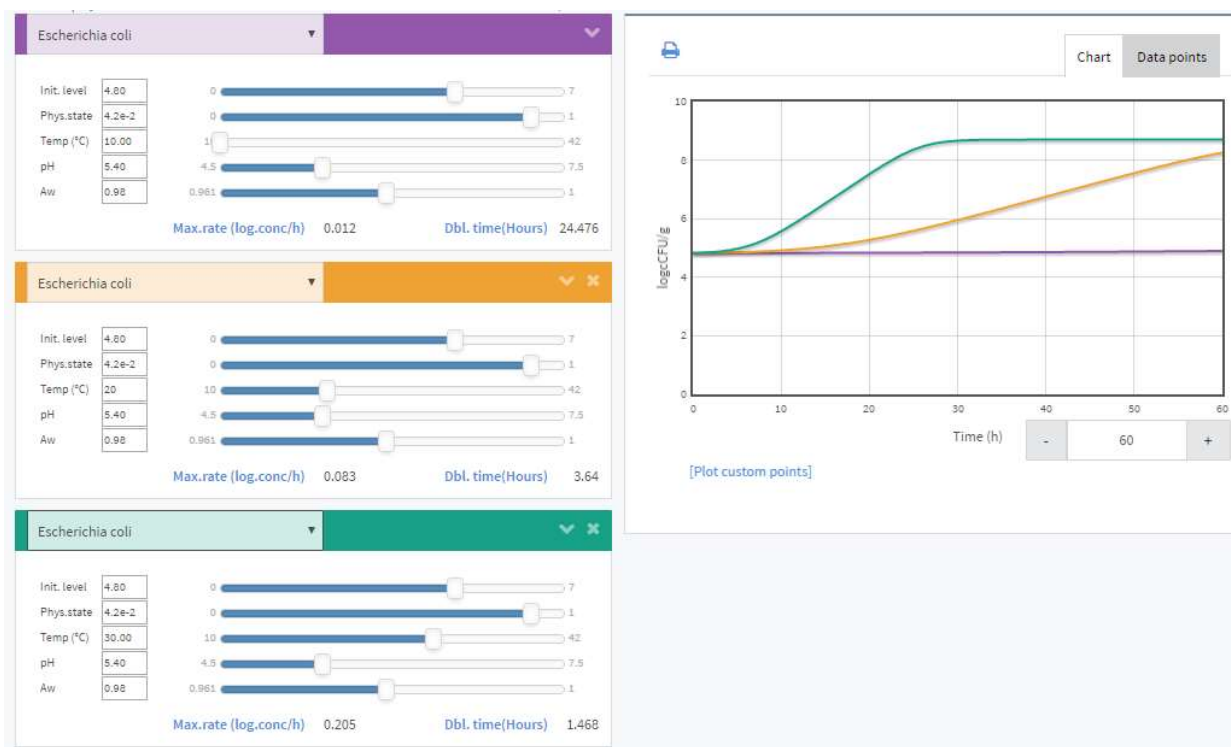


**Slika 4** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $1,34 \times 10^2$  cfu/g, pH 5,40, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,98



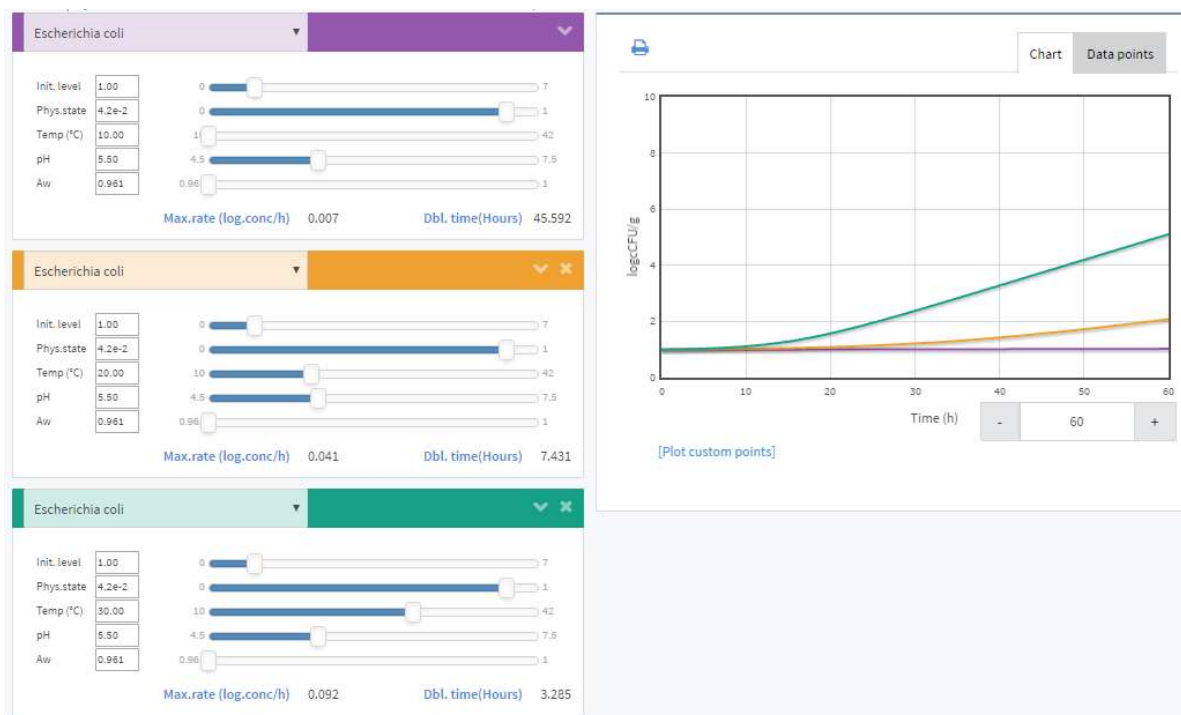


**Slika 5** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $6,5 \times 10^4$  cfu/g, pH 4,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,98

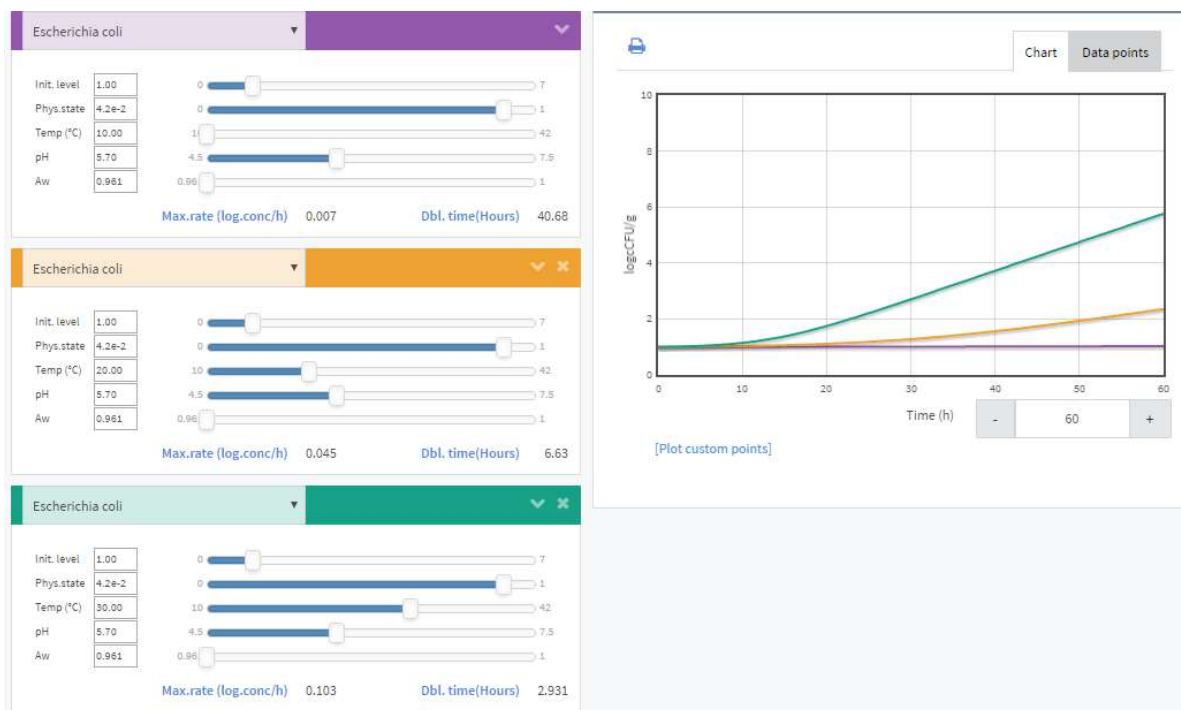


**Slika 6** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $6,5 \times 10^4$  cfu/g, pH 5,40, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,98

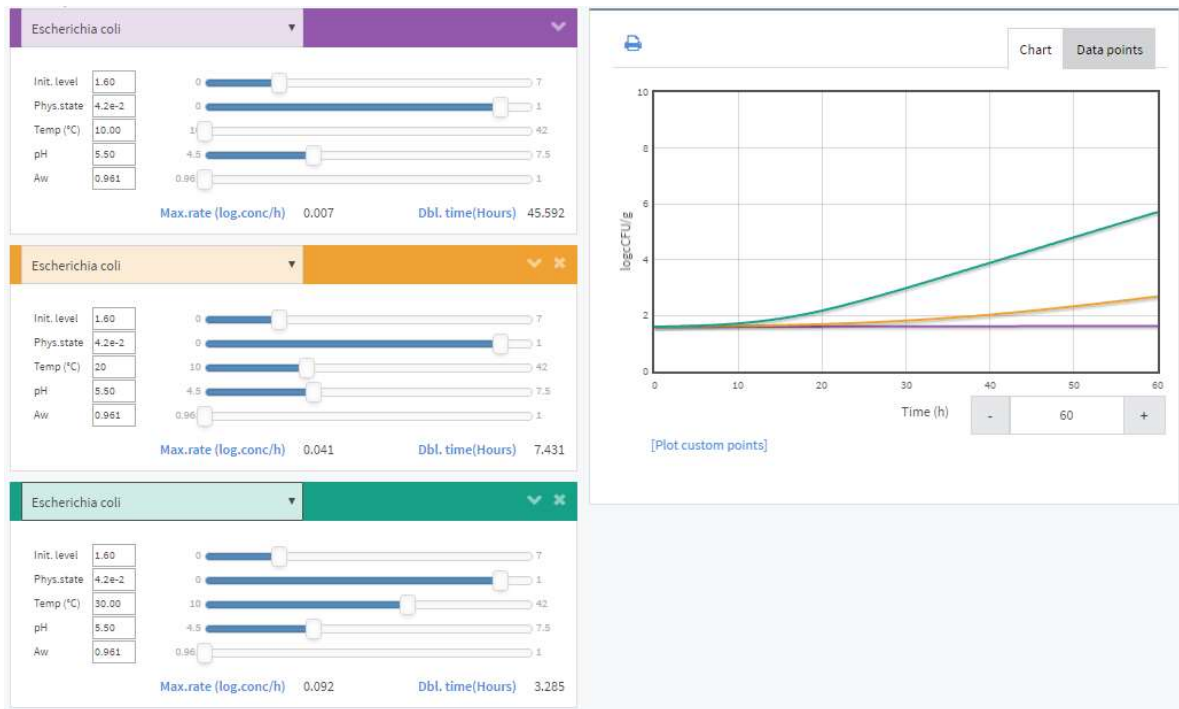
**Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i  $a_w$**



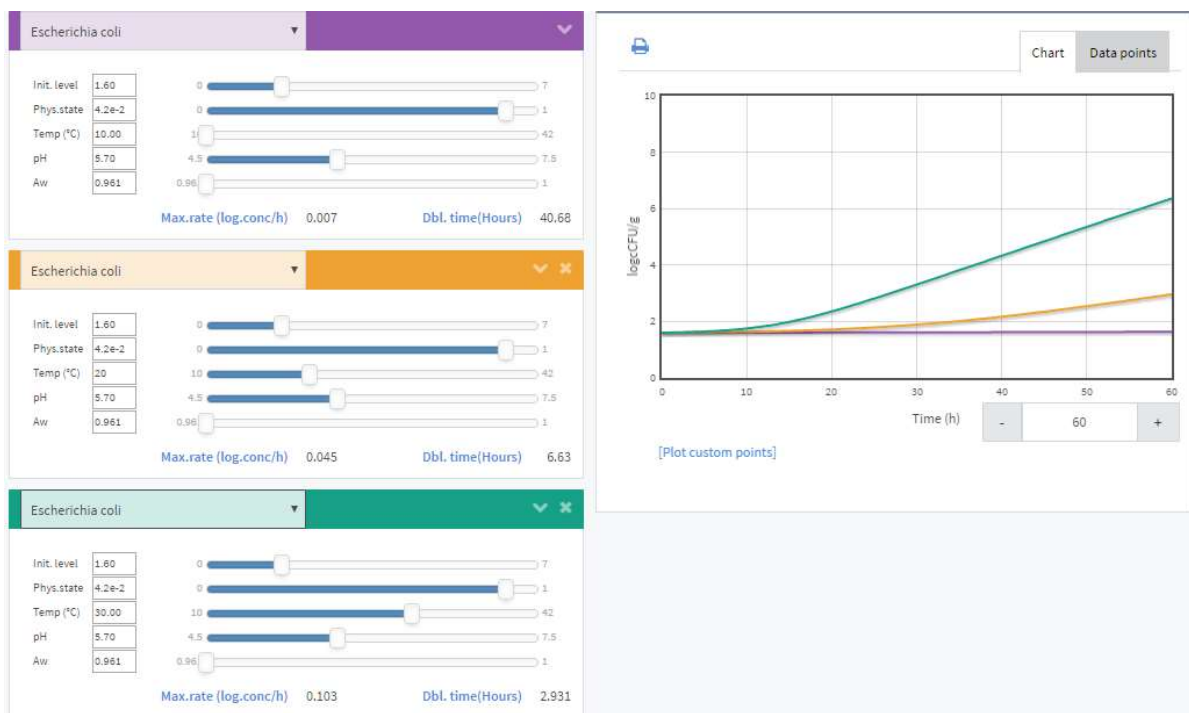
**Slika 7** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija <10 cfu/g, pH 5,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,961



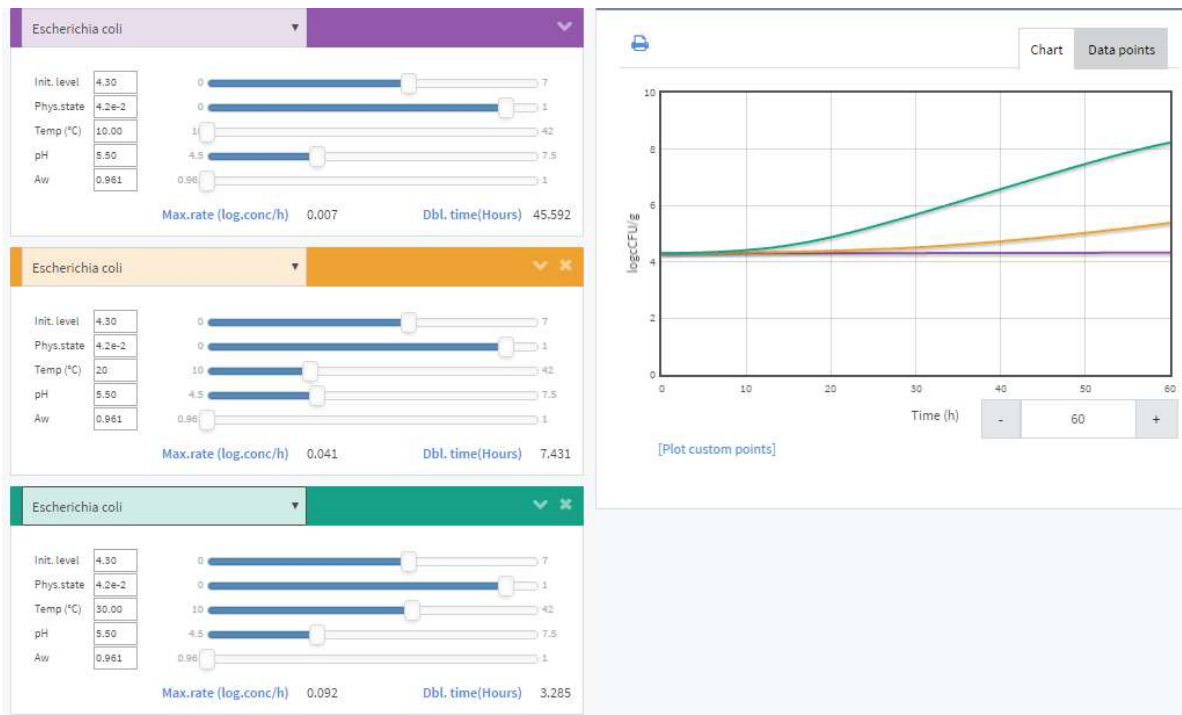
**Slika 8** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija <10 cfu/g, pH 5,70, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,961



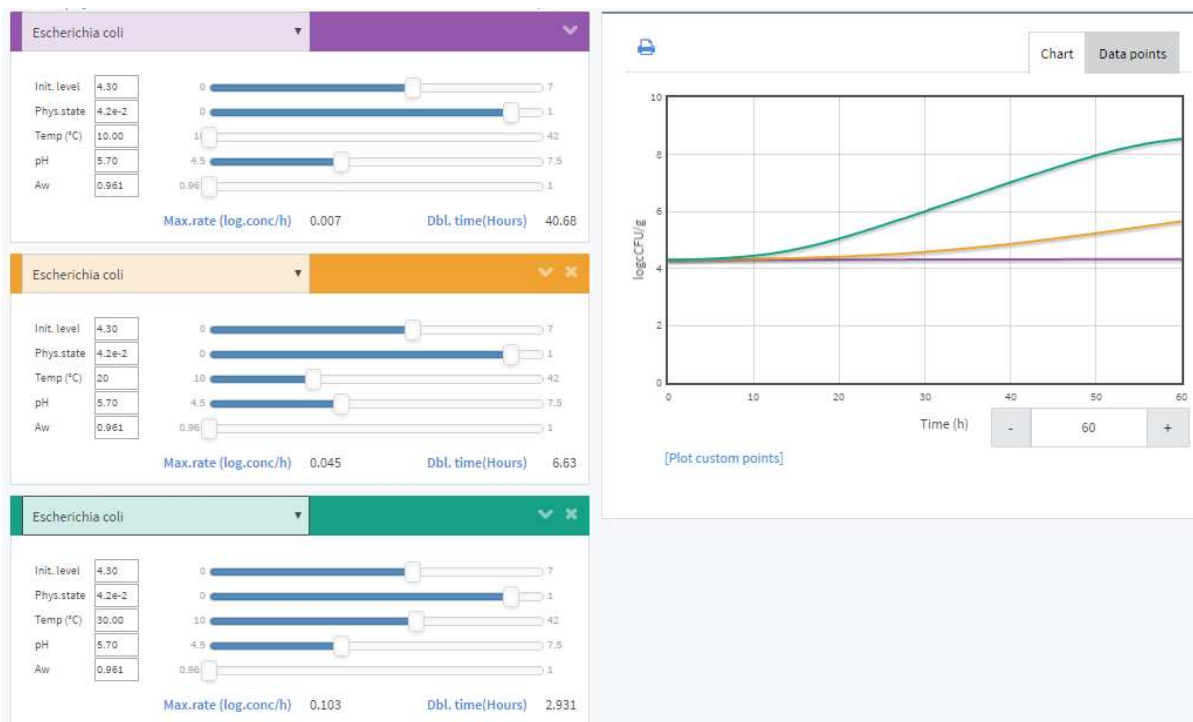
**Slika 9** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $3,65 \times 10^1$  cfu/g, pH 5,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,961



**Slika 10** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $3,65 \times 10^1$  cfu/g, pH 5,70, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,961

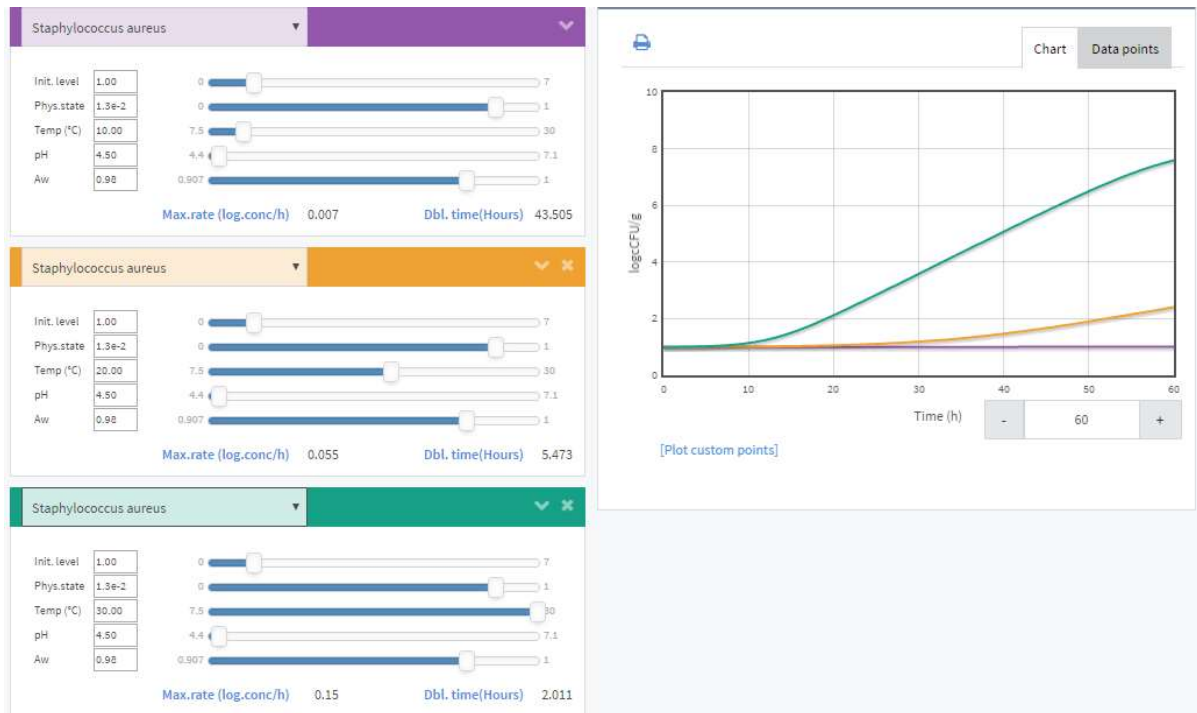


**Slika 11** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $1,9 \times 10^4$  cfu/g, pH 5,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,961

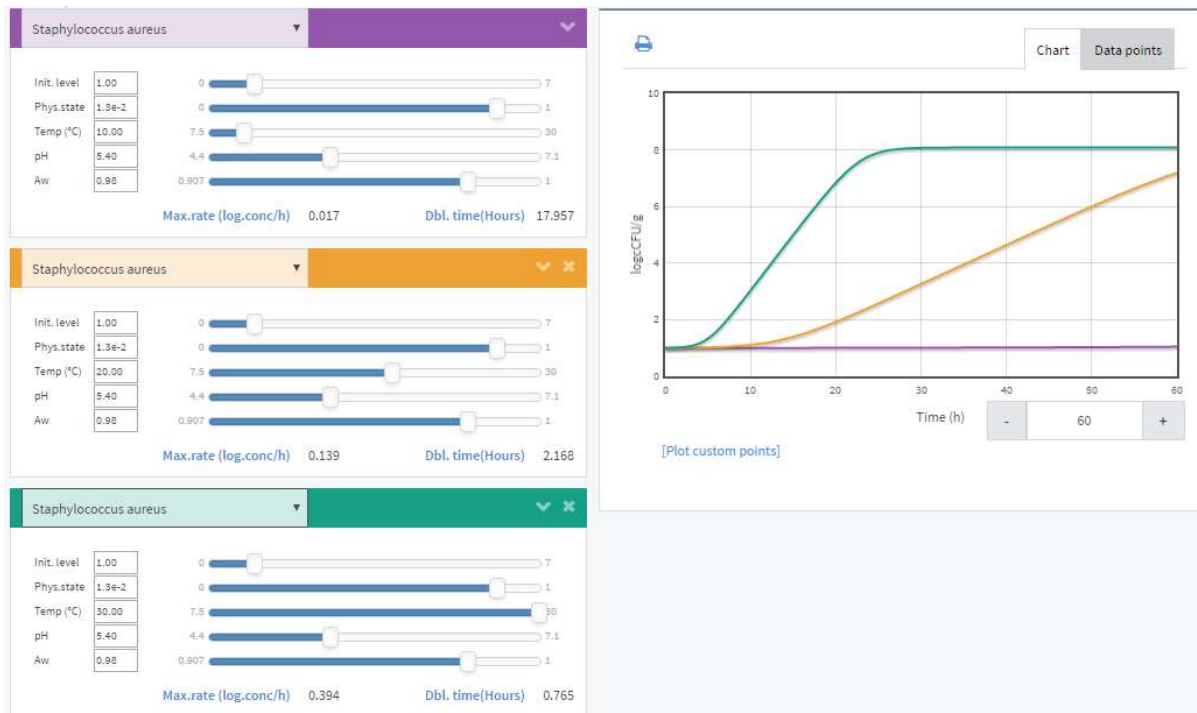


**Slika 12** Predviđanje rasta bakterije *Escherichia coli* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $1,9 \times 10^4$  cfu/g, pH 5,70, temperaturi 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,961

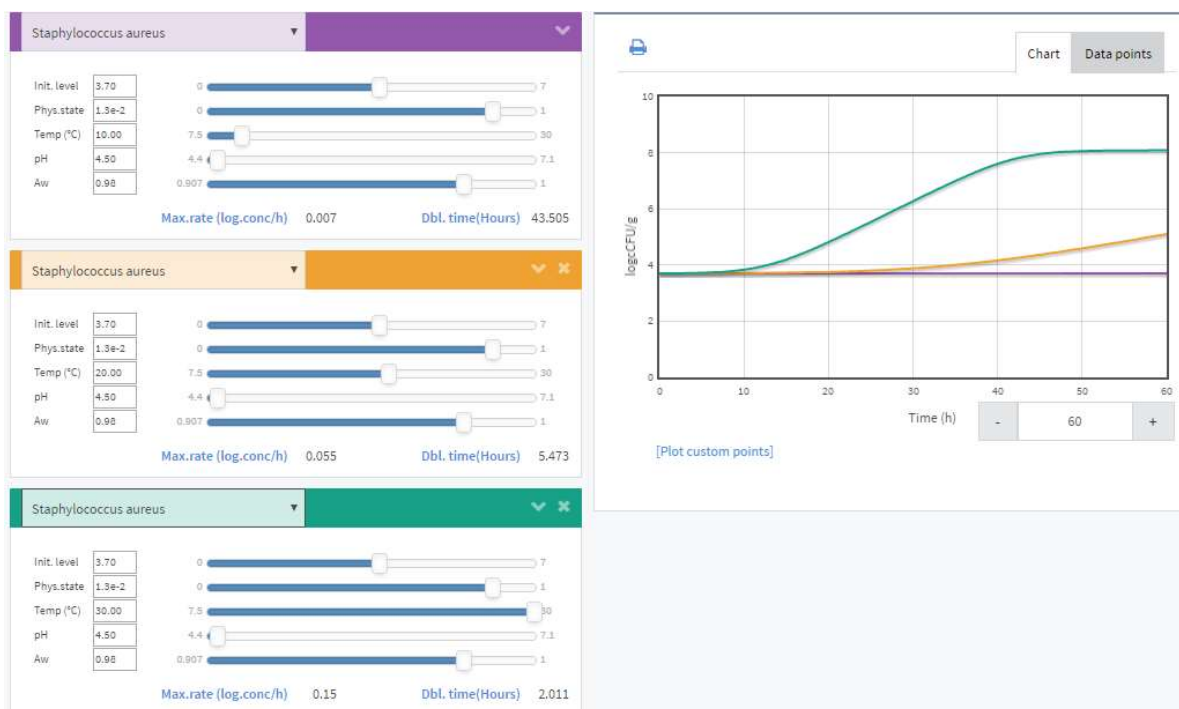
**Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i  $a_w$**



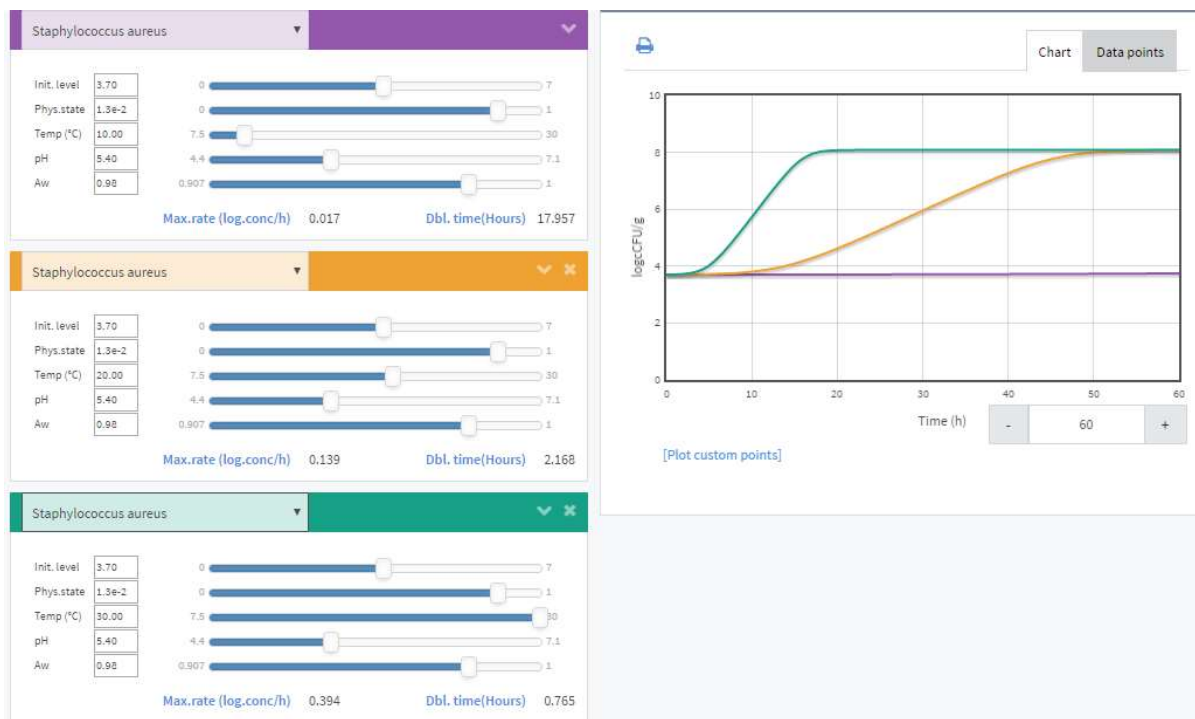
**Slika 13** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija <10 cfu/g, pH 4,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,98



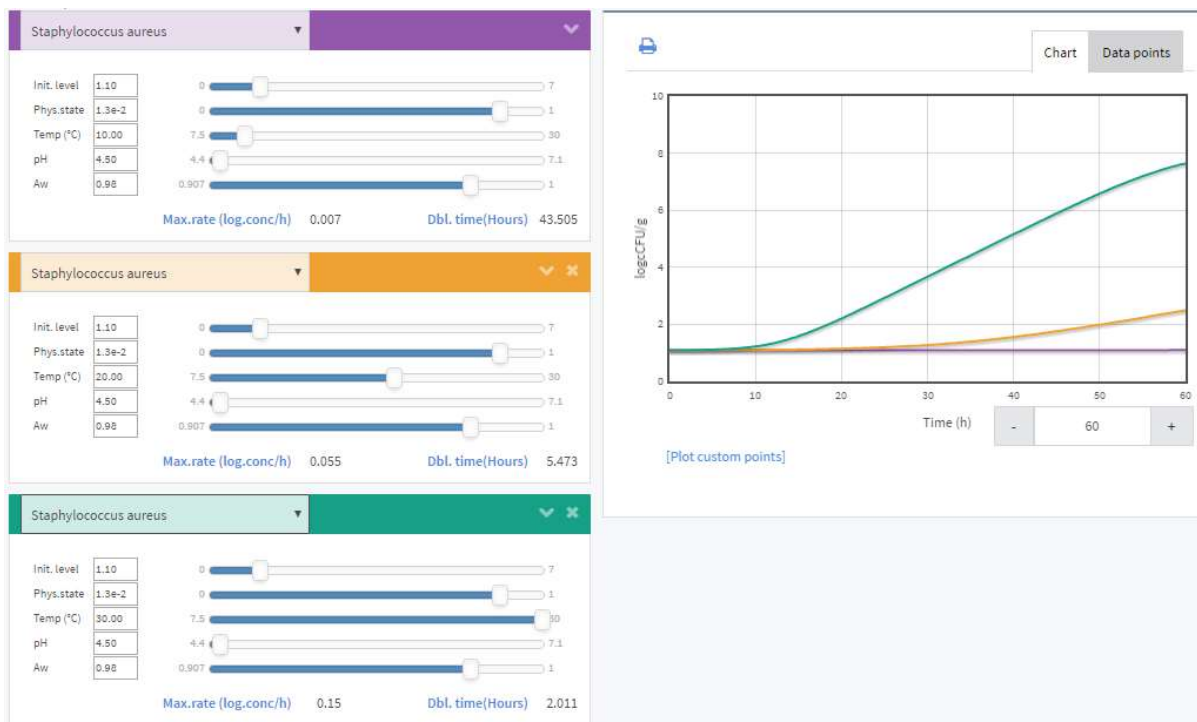
**Slika 14** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija <10 cfu/g, pH 5,40, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te  $a_w$  0,98



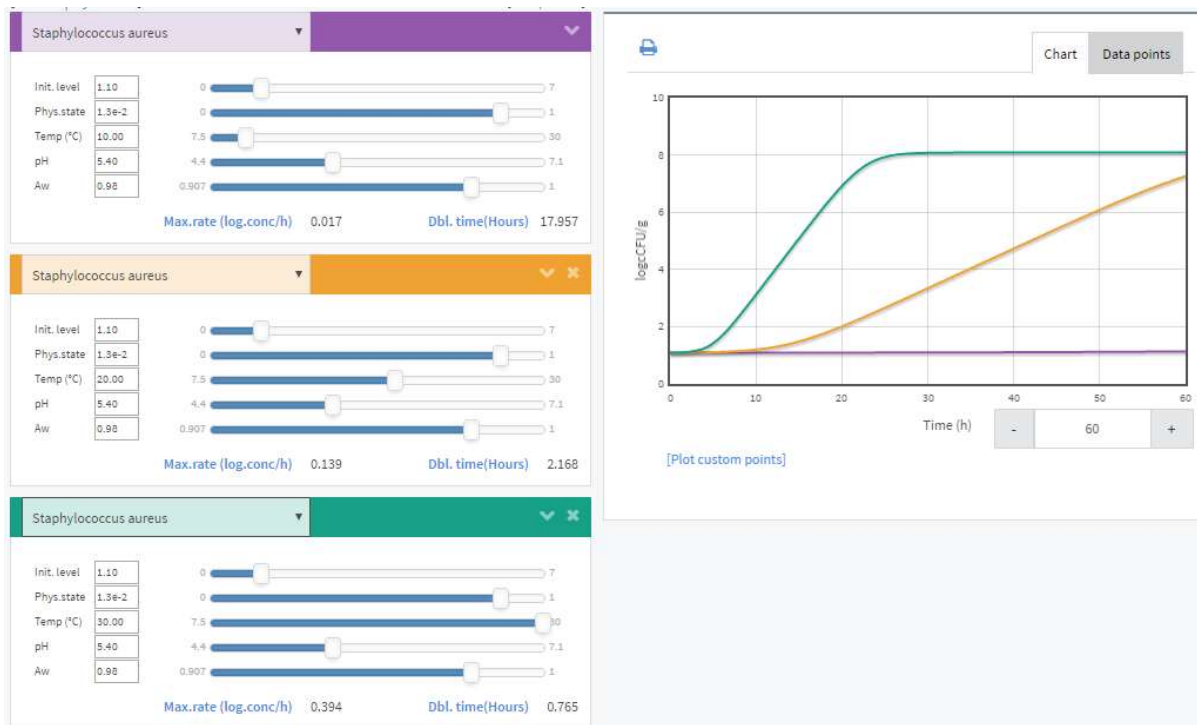
**Slika 15** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $4,5 \times 10^3$  cfu/g, pH 4,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,98



**Slika 16** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $4,5 \times 10^3$  cfu/g, pH 5,40, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,98

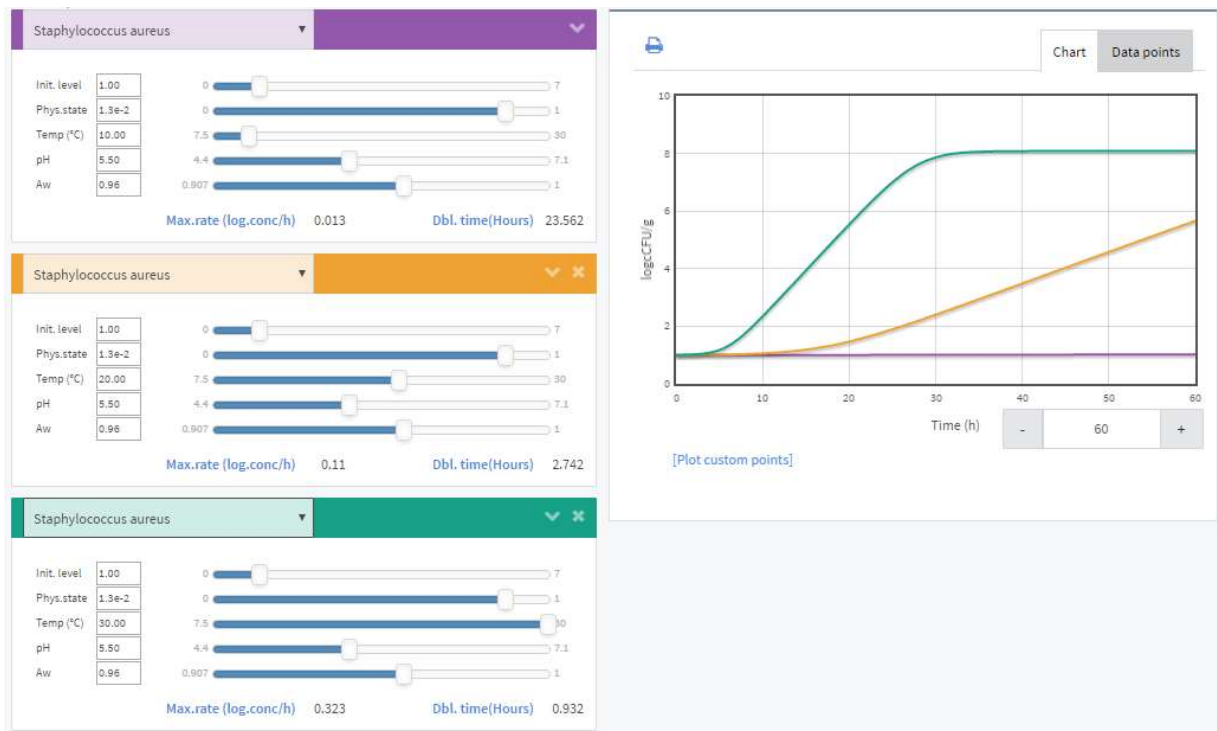


**Slika 17** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $1,21 \times 10^1$  cfu/g, pH 4,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,98

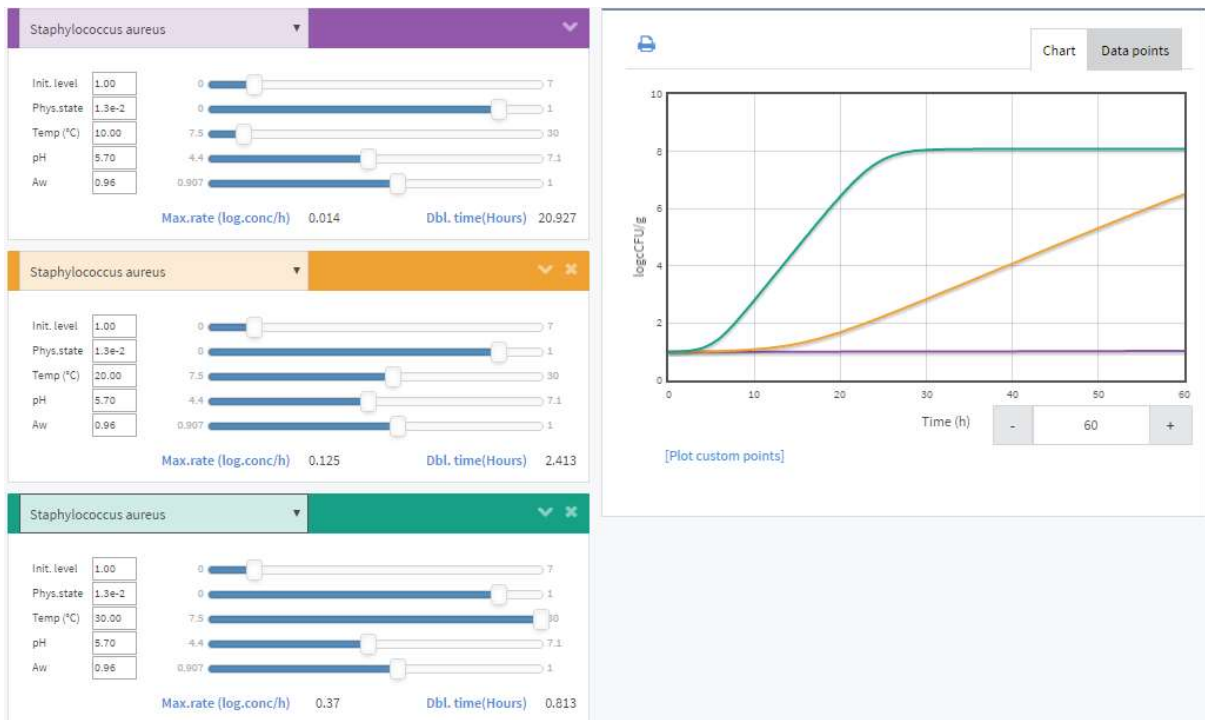


**Slika 18** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u svježim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $1,21 \times 10^1$  cfu/g, pH 5,40, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,98

**Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrdim sirevima ovisno o inicijalnoj kontaminaciji, pH, temperaturi i aw**

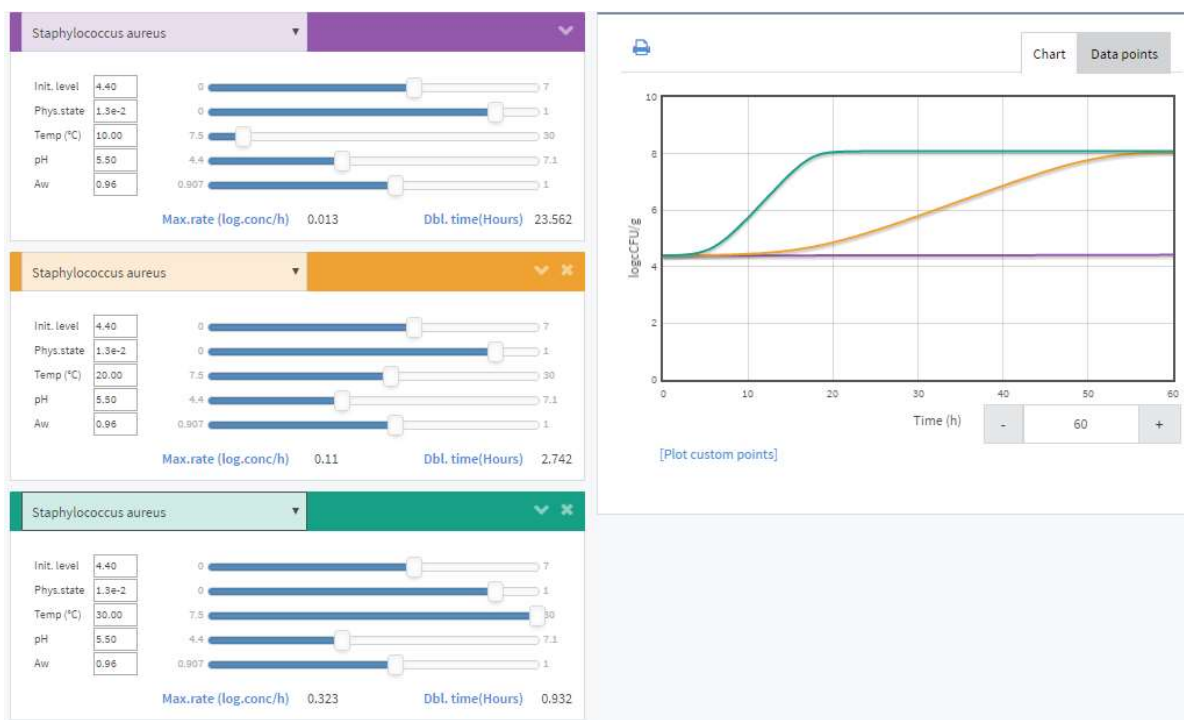


**Slika 19** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrdim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija <10 cfu/g, pH 5,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,96

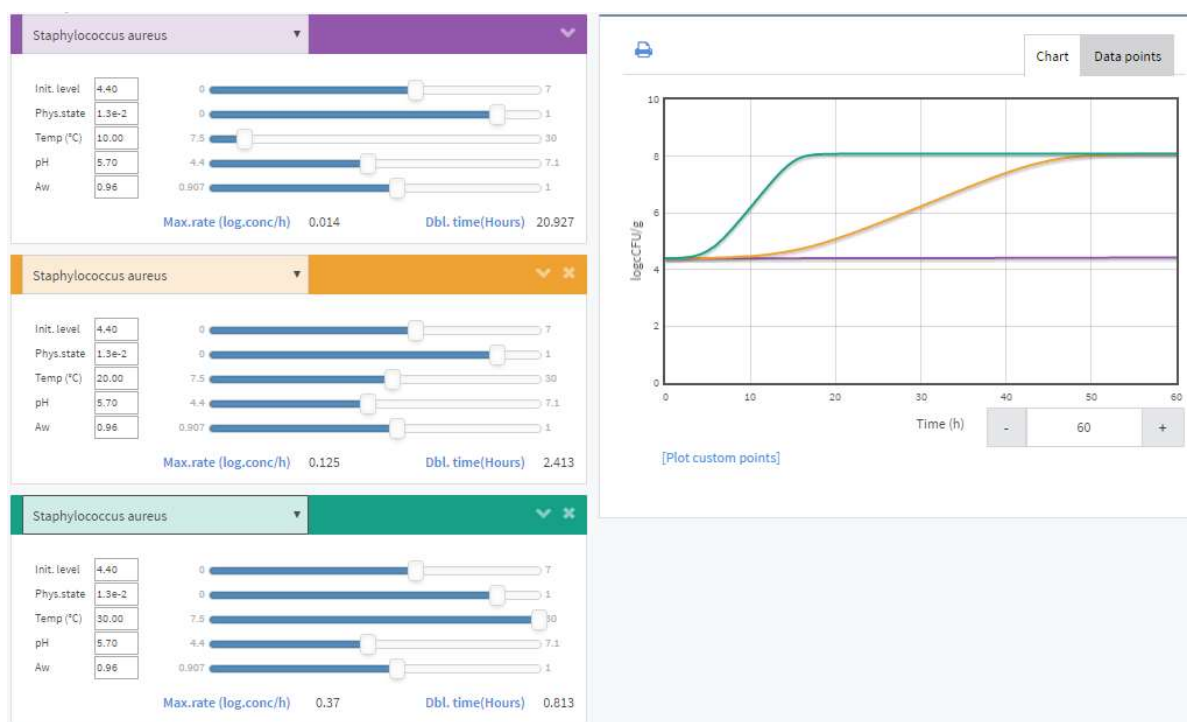


**Slika 20** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrdim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija <10 cfu/g, pH 5,70, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,96

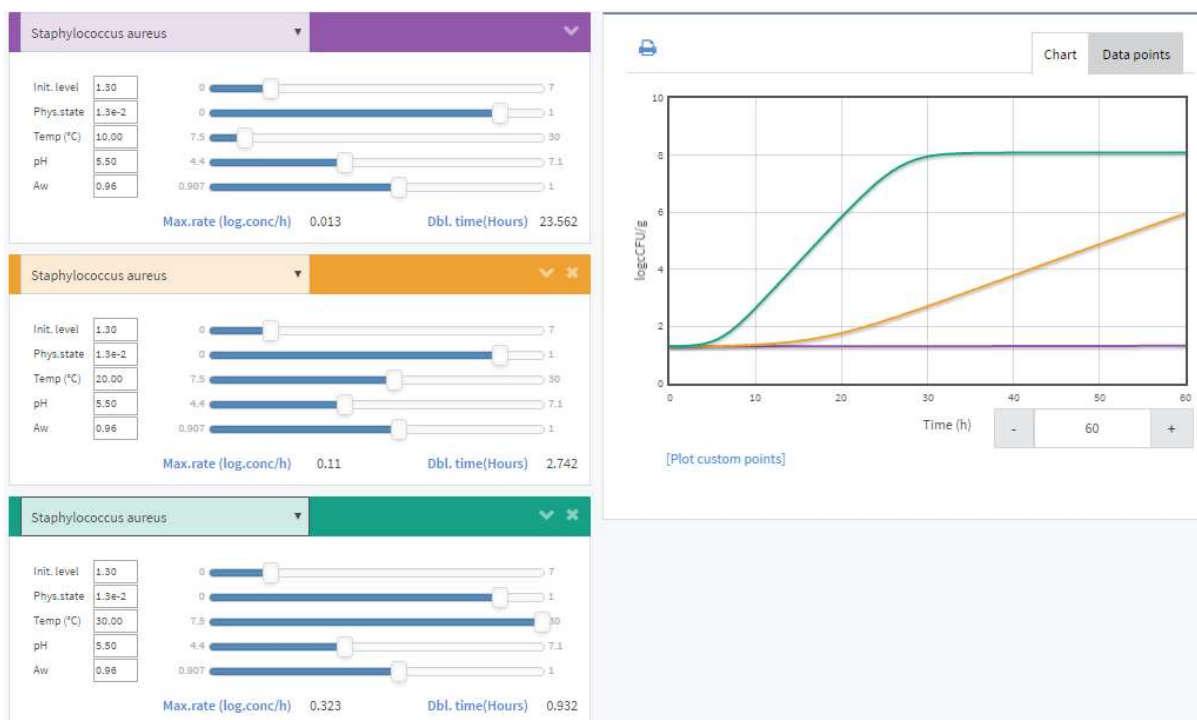




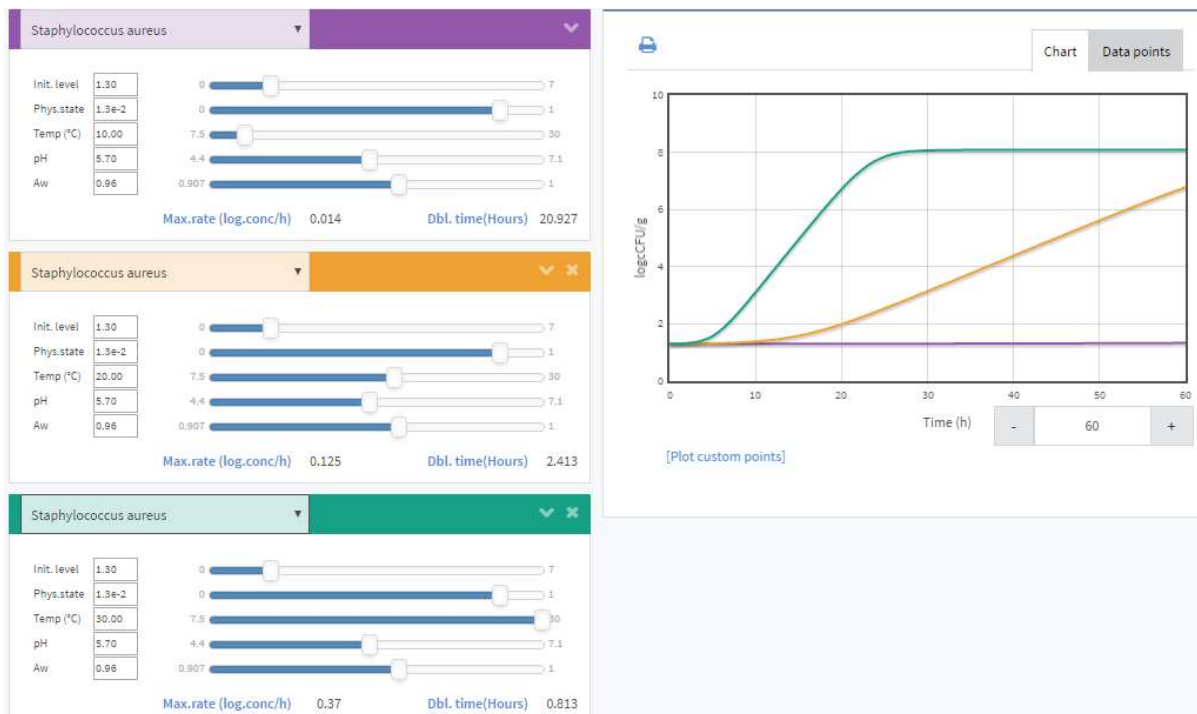
**Slika 21** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $2,5 \times 10^4$  cfu/g, pH 5,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,96



**Slika 22** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $2,5 \times 10^4$  cfu/g, pH 5,70, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,96



**Slika 23** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $2,01 \times 10^1$  cfu/g, pH 5,50, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,96



**Slika 24** Predviđanje rasta bakterije *Staphylococcus aureus* u polutvrđim sirevima ukoliko je inicijalna kontaminacija  $2,01 \times 10^1$  cfu/g, pH 5,70, temperatura 10 °C, 20 °C, 30 °C, te aw 0,96