

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Petra MIHOVEC

**UGOTAVLJANJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI
SUROVEGA MLEKA S STANDARDNIMI
METODAMI IN POSTOPKOM RIDA[®]COUNT**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2006

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Petra MIHOVEC

**UGOTAVLJANJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI SUROVEGA
MLEKA S STANDARDNIMI METODAMI IN POSTOPKOM
RIDA[®] COUNT**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW
MILK WITH STANDARD METHODS AND RIDA[®] COUNT TEST**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo - zootehnika. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za mlekarstvo na Oddelku za zootehniko, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Karmen Godič Torkar in za somentorico doc. dr. Stanislavo Golc Teger.

Recenzent: prof. dr. Irena ROGELJ

Komisija za oceno in zagovor diplomskega dela:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Karmen GODIČ TORKAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Stanislava GOLC TEGER
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Petra Mihovec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Vs
- DK UDK 637.1:579(043.2)=863
- KG mleko/sestava/mikrobiologija/mikroorganizmi/število/klasična metoda/metoda Rida[®] count
- KK AGRIS Q04
- AV MIHOVEC, Petra
- SA GODIČ TORKAR Karmen (mentorica)/ GOLC TEGER Stanislava (somentorica)
- KZ SI-1230 Domžale, Groblje 3
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
- LI 2006
- IN UGOTAVLJANJE MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI SUROVEGA MLEKA S STANDARDNIMI METODAMI IN POSTOPKOM RIDA[®]COUNT
- TD Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
- OP IX, 43 str., 17 pregl., 1 sl., 31 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AL V poskus smo vključili 203 vzorce surovega mleka, odvzete iz hladilnih bazenov posameznih proizvajalcev in iz transportnih cistern na sprejemu mlekarne. V zimskem obdobju smo s standardnimi metodami in z metodo Rida[®] count preiskali 100 vzorcev. V poletnem obdobju smo preiskali 103 vzorce mleka samo s standardnimi metodami. Ugotavljali smo skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, število koliformnih, psihrotrofnih, koagulaza pozitivnih mikroorganizmov ter število kvasovk in plesni. Vzorci mleka so v povprečju vsebovali $3,3 \times 10^4$ KE/ml skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, $1,2 \times 10^2$ KE/ml koliformnih bakterij, $2,1 \times 10^2$ KE/ml kvasovk in plesni, $5,7 \times 10^3$ KE/ml psihrotrofnih mikroorganizmov in 9,3 KE/ml koagulaza pozitivnih stafilokokov. Skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ni presegalo dovoljene meje $1,0 \times 10^5$ KE/ml. Ugotovili smo, da obstajajo statistično značilna odstopanja med rezultati standardne metode in metode Rida[®] count.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Vs
- DC UDK 637.1:579(043.2)=863
- CX milk/composition/microbiology/microorganisms/count/classical method/Rida[®] count method
- CC AGRIS Q04
- AU MIHOVEC, Petra
- AA GODIČ-TORKAR, Karmen (supervisor)/ GOLC TEGER Stanislava (co-supervisor)
- PP SI-1230 Domžale, Groblje 3
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Zootechnical Department
- PY 2006
- TI EVALUATION OF THE MICROBIOLOGICAL QUALITY OF RAW MILK WITH STANDARD METHODS AND RIDA[®]COUNT TEST
- DT Graduation thesis (Higher professional studies)
- NO IX, 43 p., 17 tab., 1 fig., 31 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB For this thesis 203 raw milk samples were taken from the cooling tanks of individual producers and from the transport tanks of raw bulk milk at the entrance of the dairy. In winter time 100 milk samples were analyzed using standard method and Rida[®] count test. In summer time 103 samples were analyzed only by standard methods. The total bacteria count, the number of coliforms and psychrotrophic microorganisms, the number of yeast and moulds and coagulase-positive staphylococci were evaluated. The average value of the total bacterial count in all milk samples was 3×10^4 CFU/ml. The average numbers of coliform bacteria, psychrotrophic microorganisms, yeasts and moulds, and coagulase-positive staphylococci were 1.2×10^2 CFU/ml, 5.7×10^3 CFU/ml, 2.1×10^2 CFU/ml and 9.3 CFU/ml, respectively. The total bacteria counts did not exceeded the limit 1.0×10^5 CFU/ml, as permitted by EU legislation. A statistically significant correlations between the results obtained by standard method and Rida[®] count tests were not confirmed.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 SESTAVA KRAVJEGA MELKA	2
2.1.1 Kemijska sestava kravjega mleka	2
2.1.1.1 Mlečna maščoba	2
2.1.1.2 Beljakovine	2
2.1.1.3 Laktoza	3
2.1.1.4 Mineralne snovi	3
2.1.1.5 Vitamini	3
2.1.1.6 Voda	4
2.1.2 Mikrobiologija surovega mleka	4
2.1.2.1 Vrste mikroorganizmov v mleku	5
2.1.2.2 Skupine mikroorganizmov, ki so prisotne v surovem mleku	5
2.1.2.3 Razmere za rast in aktivnost mikroorganizmov	7
2.1.2.4 Viri okužbe mleka	8
2.1.2.5 Zahteve Regulative EU o ravnanju z mlekom med in po molži	9
2.2 STATISTIČNI PODATKI O KAKOVOSTI SUROVEGA MLEKA V SLOVENIJI IN EVROPSKI UNIJI	10
2.2.1 Slovenija	10
2.2.2 Trženje in kakovost mleka v državah Evropske Unije	11
2.3 METODE ZA UGOTAVLJANJE MIKROORGANIZMOV V SUROVEM MLEKU	12
2.3.1 Klasične metode za ugotavljanje higienske kakovosti mleka	13
2.3.2 Nekatere hitre metode za ugotavljanje števila mikroorganizmov	13
2.3.2.1 Metoda Bactoscan	13
2.3.2.2 Metoda Petrifilm™	14
2.3.2.3 Metoda Rida® count	14
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 HIPOTEZA	15
3.2 POTEK PREISKAVE IN SHEMA DELA	15
3.3 MATERIAL	17

3.3.1	Razredčevala	17
3.3.2	Reagenti za uravnavanje vrednosti pH razredčeval in gojišč	17
3.3.3	Gojišča	17
3.3.4	Komercialna metoda RIDA[®]COUNT	19
3.3.5	Oprema	20
3.3.6	Potrošni material	20
3.4	METODE DELA	20
3.4.1	Potek poskusa	20
3.4.2	Izvajanje mikrobioloških preiskav	21
3.4.3	Postopek priprave ugotavljanja števila mikroorganizmov s standardnimi metodami	21
3.4.4	Postopek priprave ugotavljanja števila mikroorganizmov s komercialno metodo Rida[®] count	23
3.4.5	Štetje kolonij na gojišču in izračun števila kolonijskih enot	23
3.4.6	Statistična obdelava rezultatov	24
4	REZULTATI	25
4.1	OSNOVNA STATISTIKA	25
4.2	KORELACIJE	29
4.2.1	Korelacije med logaritemskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov mleka	29
4.2.2	Korelacije med logaritemskimi vrednostmi posameznih skupin mikroorganizmov v zimskem in letnem obdobju	30
4.2.3	Korelacije med skupinami mikroorganizmov pri vzorcih mleka odvzetih od posameznih proizvajalcev in iz transportnih cistern	32
4.2.4	Korelacije med metodo Rida[®] count in standardno metodo	34
4.2.5	Vpliv sezone in mesta odvzema na logaritemske vrednosti preskušanih skupin mikroorganizmov	34
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	37
5.1	RAZPRAVA	37
5.2	SKLEPI	39
6	POVZETEK	40
7	VIRI	41
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Pregl. 1: Najpomembnejše sestavine v mleku (Bajt in Golc-Teger, 2002)	2
Pregl. 2: Makroelementi v kravjem mleku (Mavrin in Oštir, 2001)	3
Pregl. 3: Vitamini v kravjem mleku (Kapš, 2004)	4
Pregl. 4: Delež mleka glede na bakteriološko kakovost v obdobju od 1994 do 2005 v Sloveniji (Valjavec, 2006)	11
Pregl. 5: Decimalno razredčevanje vzorca, števnost kolonij na petrijevih posodicah in pogoji inkubacije pri standardnih metodah mikrobioloških preiskav posameznih skupin mikroorganizmov	22
Pregl. 6: Decimalne razredčitve, inkubacije in števnost plošč pri metodi Rida [®] count	23
Pregl. 7: Osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev	25
Pregl. 8: Osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev glede na sezono	26
Pregl. 9: Osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev glede na odvzem pri posameznih proizvajalcih in v transportnih cisterna	28
Pregl. 10: Korelacije med logaritemskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka	29
Pregl. 11: Korelacije med logaritemskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka v zimskem obdobjem	30
Pregl. 12: Korelacije med logaritemskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka v letnem obdobju	31
Pregl. 13: Korelacije med logaritemskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorcev mleka, odvzetih pri posameznih proizvajalcih	32

Pregl. 14:	Korelacije med logaritetskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorcev mleka, odvzetih iz transportnih cistern	33
Pregl. 15:	Razlike med pari rezultatov standardne metode in metode Rida [®] count (rezultati so izraženi v logaritetskih vrednostih)	34
Pregl. 16:	Vpliv sezone in vrste vzorca (odvzetega pri posameznih proizvajalcih oziroma iz transportnih cistern) na logaritetske vrednosti preskušanih skupin mikroorganizmov	34
Pregl. 17:	Ocenjene srednje vrednosti posameznih skupin mikroorganizmov (v log) glede na sezono in vrsto vzorca po metodi najmanjših kvadratov	35

KAZALO SLIK

Slika 1:	Ocenjene srednje vrednosti števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev po sezoni (izraženo v logaritmih)	str. 36
----------	---	------------

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

KE	kolonijske enote
SŠMO	skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov
KF	število koliformnih mikroorganizmov
KV	število kvasovk in plesni
PS	število psihrotrofnih mikroorganizmov
SA	število koagulaza-pozitivnih stafilokokov
DK	družinske kmetije
LOG	logaritem
IE*	Internacionalne enote
E**	Dam-Glavindove enote
°C	stopinje Celzija
g	gram
ml	mililiter
D	diferenca ali razlika
DSŠMO30	SŠMO 30 (Rida [®] count, inkubacija pri temperaturi 30 °C) – SŠMO (standardna metoda)
DSŠMO35	SŠMO 35 (Rida [®] count, inkubacija pri temperaturi 35 °C) – SŠMO (standardna metoda)
DKF30	KF 30 (Rida [®] count, inkubacija pri temperaturi 30 °C) – KF (standardna metoda)
DKF35	KF 35 (Rida [®] count, inkubacija pri temperaturi 35 °C) – KF (standardna metoda)
DKV	KV (Rida [®] count) – KV (standardna metoda)

1 UVOD

Zaradi svoje sestave je mleko najidealnejše živilo. Vsebuje skoraj vse sestavine, ki so potrebne za rast in razvoj organizma. Sestavine so v takšni obliki, da jih organizem najlažje sprejme in prebavi. Velika hranljiva in zaščitna vrednost mleka pa ni samo v biološko vrednih beljakovinah, maščobah in laktozi, temveč tudi v vitaminih, mineralnih snoveh in nekaterih drugih biogenih faktorjih (Milohnoja in sod., 1970).

Mleko je torej popolna naravna hrana. Definiramo ga kot biološko tekočino, ki je proizvod mlečne žleze in je prva hrana novorojenega sesalca. S svojo pestro sestavo hranil, vitaminov in mineralov, encimov, zaščitnih snovi in rastnih faktorjev, omogoča novorojencu uspešen razvoj v prvem, najbolj občutljivem življenjskem obdobju (Rogelj, 2003).

Mleko je zaradi svoje bogate sestave tudi izvrsten rastni medij za različne mikroorganizme, od prehransko nezahtevnih do prehransko zahtevnih. Narava pridobivanja mleka je takšna, da okužbe mleka z mikroorganizmi praktično ne moremo preprečiti, zato je dobro poznavanje mikroflore, ki lahko prispe v mleko, izjemnega pomena. Poznavanje fizioloških in genetskih lastnosti mikroorganizmov ter njihovih biokemijskih aktivnosti, s katerimi spreminjajo fizikalne, kemijske, in senzorične lastnosti, omogoča strokovnjakom, da ugotovijo izvor okužbe mleka in mlečnih izdelkov in kontrolirajo pogoje razmnoževanja. Tako lahko uspešneje preprečujejo prekomerno okužbo mleka in mlečnih izdelkov z mikroorganizmi, omejijo oziroma kontrolirajo njihovo rast in aktivnost, zmanjšajo število že prisotnih mikroorganizmov ali pa vodijo in usmerjajo njihovo delovanje (Rogelj, 2003).

Število in vrsta mikroorganizmov v mleku sta odvisna predvsem od higienskih razmer v hlevu in od higiene pri molži. Glavni viri okužbe surovega mleka so slabo vzdrževana ali obolela krava molznica, slabo vzdrževana in neočiščena hlev ter molzišče, z mikroorganizmi okužena krma, slabo opran in vzdrževan molzni stroj, oziroma mlekovod, slaba higiena molznika pri molži, neustrezno hlajenje mleka, predolgo hranjenje mleka pred predelavo v neustreznih pogojih, itd (Mavrin in Oštir, 2002).

Za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov, ki je v Sloveniji normativ za plačevanje mleka, se poleg klasične, standardne metode ugotavljanja števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov na gojiščih, vse pogosteje uporabljajo tudi hitre metode. To so lahko instrumentalne metode pretočne citometrije (Bactoscan) ali pa metode z uporabo že pripravljenih gojišč na lističih (Petrifilm, Rida[®]count).

CILJI NALOGE:

1. ugotoviti mikrobiološko kakovost vzorcev surovega mleka, odvzetega pri posameznih proizvajalcih, družinskih kmetijah, zbiralnicah in v transportnih cisternah na sprejemu mlekarne,
2. ugotoviti razlike v nekaterih mikrobioloških parametrih kakovosti surovega mleka v zimskem in letnem obdobju,
3. primerjati uspešnost hitre metode Rida[®]count z rezultati standardnih metod.

2 PREGLED OBJAV

2.1. SESTAVA KRAVJEGA MLEKA

Z oznako mleko največkrat označujemo kravje mleko, ki ima nespremenjeno sestavo in je pridobljeno z redno, neprekinjeno, popolno molžo zdravih, pravilno krmljenih krav, ne glede na to ali je namenjeno za neposredno uporabo ali za predelavo. Izraz mleko se uporablja za surovo mleko in tudi za predpakirano mleko za pitje, ki je toplotno obdelano (Bajt in Golc-Teger, 2002).

2.1.1 Kemijska sestava kravjega mleka

Kravje mleko sestavlja približno 87 % vode in 13 % suhe snovi. Suha snov so vse sestavine mleka razen vode in plinov in so porazdeljene v treh oblikah (Mavrin in Oštir, 2002):

1. emulzija: voda in maščoba
2. koloidna raztopina: voda in beljakovine
3. prava raztopina: voda in laktoza, minerali

Preglednica 1: Najpomembnejše sestavine v mleku (Bajt in Golc-Teger, 2002)

Sestavina	%
Maščoba	5.8
Beljakovine	2.6-4.2
Laktoza	4.6-4.9
Minerali	0.6-0.8
Skupaj suha snov	11-14
Voda	86-89

2.1.1.1 Mlečna maščoba

V mleku je od 2,5 do 6,0 % mlečne maščobe, ki vpliva na aromo in okus mleka ter mlečnih proizvodov. Mlečna maščoba je zmes različnih lipidov, od katerih se nekateri nahajajo v plazmi mleka (mleko brez mlečne masti). V plazmi mleka se nahaja nekaj prostih sterolov, prostih mlečnih kislin ter fosfolipidov. Mlečna maščoba je v glavnem sestavljena iz triacilglicerola, majhne količine diacil - in monoacilglicerola, fosfolipidov, holesterola, itd. Druge sestavine so v zelo majhnih količinah. Mlečna maščoba vpliva na prijeten okus mleka ter na aromo, konsistenco in teksturo mlečnih izdelkov. V mleku se mlečna maščoba nahaja v obliki maščobnih kroglic (Tratnik, 1998).

2.1.1.2 Beljakovine

V mleku sta dve vrsti mlečnih beljakovin: kazeini ter sirotkine beljakovine. Poleg teh je v mleku dokazana še majhna količina dušikovih spojin, ki so delno produkt razpada visoko molekularnih spojin (Milohnoja in sod., 1970). Beljakovine mleka so zgrajene iz aminokislin, ki so lahko esencialne ali neesencialne (Bajt in Golc-Teger, 2002).

V beljakovinah mleka se nahajata dva glavna tipa beljakovin: kazein in sirotkine beljakovine.

Količinsko največji del beljakovin v mleku predstavlja kazein, ki je sestavljen iz α_{S1} -; α_{S2} -; β -; γ -; in κ -kazein. Vsi, razen γ -kazeina, so genski proizvod mlečne žleze. Frakcije kazeina so med seboj povezane v posebnih kazeinskih micelah globularne oblike. Pri oblikovanju in vzdrževanju njihove strukture so pomembni kalcijevi ioni (Tratnik, 1998).

2.1.1.3 Laktoza

Laktoza je disaharid, sestavljen iz molekule α - D- glukoze in β - D- galaktoze. Kravje mleko vsebuje od 4,5 do 4,8 % laktoze (Tratnik, 1998).

Je manj sladka kot drugi sladkorji (saharoza, glukoza, itd.). Laktozo razgrajujejo mlečnokislinske bakterije, ki sodelujejo pri nastanku fermentiranih mlečnih izdelkov. Bakterije pretvorijo mlečni sladkor v mlečno kislino, ki v fermentiranih mlečnih izdelkih, skuti in sirih, vpliva na njihovo kakovost, trajnost, okus in konsistenco (Bajt in Golc-Teger, 2002).

2.1.1.4 Mineralne snovi

Minerali so pomembni pri vzdrževanju fizikalno-kemijskega ravnotežja koloidnega sistema in tehnoloških lastnosti mleka (Kapš, 2004).

V mleku je več kot 40 mineralov v obliki makroelementov, kot so kalcij, fosfor, magnezij, kalij, natrij, klor, pa tudi v obliki mikroelementov, med katerimi so železo, mangan, baker, cink, fluor, jod. Njihova količina v mleku je odvisna od vrste krme (Bajt in Golc-Teger, 2002). Vseh mineralnih snovi je v mleku približno 0,7 %. Količinsko največji delež predstavljajo minerali, prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: Makroelementi v kravjem mleku (Mavrin in Oštir, 2002)

Mineral	Količina (v %)
Kalij (K)	0.155
Kalcij (Ca)	0.120
Klor (Cl)	0.110
Fosfor (P)	0.100
Natrij (Na)	0.058
Žveplo (S)	0.030
Magnezij (mg)	0.012

2.1.1.5 Vitamini

Količina vitaminov v mleku je odvisna od krme, zastopani pa so vsi znani vitamini, topni v vodi in topni v maščobi (Preglednica 3) (Bajt in Golc-Teger, 2002).

Preglednica 3: Vitamini v kravjem mleku (Kapš, 2004)

Vitamin	Količina (v IE*)
Vitamin A	40
Vitamini skupine B:	
-vitamin B ₁ (tiamin)	
-vitamin B ₂ (riboflavin)	157
-nikotinska kislina	85
-vitamin B ₆ (piridoksin)	58
-pantotenska kislina	350
-folna kislina	0.2
-holin	13
-biotin	3.5
-vitamin B ₁₂	0.6
Vitamin C	1.800
Vitamin D	0.3 do 0.4
Vitamin E	100
Vitamin K	100 E**

*Internacionalne enote

**Dam-Glavindove enote

2.1.1.6 Voda

Voda predstavlja največji delež mleka, t.j. od 86 % do 89 % in sicer v dveh oblikah:

1. prosta voda
2. vezana voda ali hidratacijska voda

Voda je disperzijsko sredstvo ali topilo za mnoge mlečne sestavine, ki so hidrofilne ali topne v vodi (laktoza, minerali, nekateri vitamini). Poznamo pa tudi v vodi netopne ali hidrofobne sestavine (maščobe in fosfolipidi) (Mavrin in Oštir, 2002).

2.1.2 Mikrobiologija surovega mleka

Proizvodnja mleka poteka v različnih podnebnih, higienskih in tehnoloških pogojih, zato se začetno število mikroorganizmov in sestava mikrobne populacije surovega mleka precej razlikujejo. Kljub različnim proizvodnim pogojem, so glavni viri okužbe mleka z mikroorganizmi vedno trije: notranjost mlečne žleze in seskov, zunanost vimena in seskov ter molzni stroj (roke molznika) in mlekarska oprema. Poleg naštetih virov okužbe, ki prispevajo v mleku največje število mikroorganizmov, so lahko vir okužbe tudi ljudje, ki z mlekom rokujejo, insekti, krma, voda, zrak. Ločimo primarno in sekundarno mikrofloro mleka. Število in vrsta mikroorganizmov, ki so prisotni v mleku neposredno po molži, predstavljajo začetno ali primarno mikrofloro mleka. Mikrofloro, ki je prisotna v mleku pri prevzemu mleka s farne, torej po prečrpavanju mleka skozi molzni sistem v bazen in skladiščenju v njem, imenujemo sekundarna mikroflora. Velikost in sestava sekundarne mikroflore sta odvisna od hitrosti in temperature hlajenja mleka po molži, dolžine skladiščenja, higiene opreme za hlajenje in števila ter vrste primarne mikroflore mleka. Pomembna dejavnika, ki preprečujeta hitro razmnoževanje primarne mikroflore, sta hitrost in končna temperatura hlajenja. Optimalno je, da mleko takoj po molži, v obdobju dveh ur, ohladimo do temperature $< 4^{\circ}\text{C}$ in ga pri tej temperaturi skladiščimo (Rogelj, 2003).

Predpostavljamo, da bi mleko v trenutku, ko pride iz vimena med molžo, moralo biti sterilno, vendar temu ni tako. Kljub vzdrževanju najvišje stopnje higienskih razmer, ni mogoče proizvesti mleka brez mikroorganizmov. Mleko je namreč primerno gojišče za razvoj številnih mikroorganizmov. Način pridobivanja mleka je takšen, da se je praktično nemogoče izogniti kontaminaciji mleka z različnimi mikroorganizmi (Milohnoja in sod., 1970). Mikroorganizmi prispejo v vime skozi odprtine v seskih, razmnožujejo se v mlečni žlezi in med molžo postanejo normalna mikroflora mleka. Sveže pomolzeno mleko zdravih krav ima lahko nekaj sto ali več tisoč mikroorganizmov v ml mleka (Tratnik, 1998).

2.1.2.1 Vrste mikroorganizmov v mleku

V mleku od mikroorganizmov prevladujejo bakterije, vendar so lahko prisotne tudi kvasovke in plesni (Mavrin in Oštir, 2002):

Glede na njihovo delovanje jih razdelimo na :

- tehnološko koristne mikroorganizme, ki jih kot starter kulture uporabljamo za izdelovanje fermentiranih mlečnih izdelkov (mlečnokislinske bakterije, propionske bakterije, žlahtne plesni, itd.),
- tehnološko škodljive mikroorganizme, ki povzročajo kvarjenje, oziroma napake mleka (proteolitični in lipolitični mikroorganizmi, itd.),
- zdravju škodljive ali patogene mikroorganizme, ki ogrožajo zdravje potrošnika (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, idr.)

2.1.2.2 Skupine mikroorganizmov, ki so prisotne v surovem mleku

Mikroorganizmi živijo in so aktivni v različnih temperaturnih območjih, zato jih razvrstimo v naslednje skupine (Hayes, 1985):

- psihrotrofni- minimalna temperatura od 0 do 5 °C, optimalna temperatura od 20 do 35 °C maksimalna temperatura od 25 do 40 °C
- psihofilni- minimalna temperatura 0 °C, optimalna temperatura od 5 do 20 °C.
- mezofilni- minimalna temperatura od 5 do 20 °C optimalna temperatura od 30 do 45 °C maksimalna temperatura od 40 do 50 °C.
- termofilni- minimalna temperatura od 35 do 45 °C, optimalna temperatura od 45 do 70 °C, maksimalna temperatura od 60 do 80 °C.

▪ Skupno število mikroorganizmov (SŠMO)

Skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov v surovem mleku, med katerimi vedno prevladujejo bakterije, se lahko giblje od manj kot 1000 v ml ob minimalni okužbi med molžo, do več kot 10^6 v ml ob močni okužbi. Pri metodi štetja kolonij mikroorganizmov, poraslih na trdnem gojišču, izražamo rezultat kot število kolonijskih enot (KE) v ml mleka. Vrsto let skupno število mikroorganizmov določa bakteriološko sprejemljivost oziroma higiensko kakovost surovega mleka, saj je dober indikator bakteriološke okužbe med pridobivanjem mleka. Nizko skupno število mikroorganizmov v surovem mleku je znak dobre proizvodne prakse. Visoko skupno število mikroorganizmov, ki presega 100.000 KE v ml mleka, je znak slabe higiene pri proizvodnji mleka (Rogelj, 2003).

- Koliformne bakterije

Koliformne bakterije so gram–negativne, oksidaza–negativne, nesporogene palčke, ki lahko rastejo aerobno ali fakultativno anaerobno, v prisotnosti žolčnih soli ali drugih, površinsko aktivnih snovi s podobnimi zaviralnimi lastnostmi. Dobro rastejo pri temperaturi 37 °C ter fermentirajo laktozo do kislin in plina. Število koliformnih bakterij je dober pokazatelj higienskih pogojev v celotni proizvodni verigi. Ob dobrih higienskih pogojih pridobivanja, transporta in skladiščenja mleka ter hlajenju, vsebuje surovo mleko manj kot 100 koliformnih bakterij v ml. Stopnjo njihovega razmnoževanja povečuje visoko začetno število mikroorganizmov, temperatura, višja kot 5 °C in čas skladiščenja. Koliformne bakterije se hitro razmnožujejo v vlagi in ostankih mleka v neočiščenem molznem stroju in na mlekarski opremi, ki postane tako glavni vir okužbe mleka (Rogelj, 2003).

- Termodurne bakterije

Pomembna podatka pri ocenjevanju kakovosti surovega mleka sta število in vrsta prisotnih termodurnih bakterij. To so bakterije, ki prežive laboratorijsko pasterizacijo mleka pri temperaturi 63 °C 30 minut. Termodurne bakterije rastejo pri 5 °C zelo počasi, v mleku, ohlajenem na nižje temperature kot 5 °C ali na hladilnih površinah mlekarske opreme, pa se ne razmnožujejo. Če so v surovem mleku prisotne v velikem številu, je to zanesljiv znak slabega, nerednega čiščenja in razkuževanja molznega stroja, oziroma zanemarjene, močno kontaminirane opreme za molžo in ostale mlekarske opreme (Rogelj, 2003).

- Sporotvorne bakterije

Nekateri predstavniki rodov *Bacillus* in *Clostridium* so najpogostejši sporotvorni mikroorganizmi v mlekarski predelovalni verigi. Vrste iz rodu *Clostridium* so anaerobne in tvorijo endospore. Laktozo–fermentirajoči klostridiji *Cl. tyrobutyricum*, *Cl. butyricum* velikokrat povzročajo probleme pri izdelavi sirov (t.i. pozno napihovanje sirov), v mleku pa se nahajajo tudi patogeni sulfitreduktorni klostridiji. Za rod *Bacillus* so značilne endospore. To so aerobni oziroma fakultativno anaerobne bakterije. Bakterijske celice so paličaste, gibljive, Gram–pozitivne, čeprav stare kulture pogosto kažejo tendenco k Gram–negativni reakciji. Predstavniki tega rodu so razširjeni povsod, v vodi, zemlji, na rastlinah, nekatere vrste pa so patogene za živali in ljudi (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

- Psihrotrofne bakterije

Vpeljava sodobnih tehnologij v pridelavi in predelavi mleka, predvsem pa vpeljava hlajenja na celotni poti mleka od molže do porabnika, je povzročila tudi spremembo njegove mikroflore. V mlekarstvu opisujemo psihrotrofne bakterije kot bakterije, ki rastejo pri temperaturi 7 °C ali nižjih temperaturah, ne glede na njihove optimalne temperature rasti. Število psihrotrofnih bakterij v mleku je odvisno od vrste in števila prisotnih bakterij po molži, temperature ter časa skladiščenja. Mleko, pridobljeno v higiensko ustreznih pogojih vsebuje manj kot 10 % psihrotrofov glede na celotno populacijo, mleko pridobljeno v higiensko neustreznih razmerah, pa tudi 75 % ali več (Rogelj, 2003).

- Proteolitične bakterije

Proteoliti so mikroorganizmi, ki s svojimi encimi proteazami razgrajujejo mlečni kazein preko peptidov do aminokislin, aminov, ketonskih kislin in amonijaka. Najpogostejši predstavniki proteolitov so iz rodov *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium* in *Micrococcus* (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

▪ Lipolitične bakterije

Lipoliti so mikroorganizmi, ki s svojimi encimi razgrajujejo mlečno maščobo do prostih maščobnih kislin in glicerola. Njihovi encimi se vežejo na hidrofobni ovoj okrog maščobnih kroglic v mleku. Z razgradnjo maščob povzročajo neprijetne spremembe v okusu (žarkost) in vonju mleka, zlasti pri izdelkih z večjo vsebnostjo maščob (smetana, surovo maslo). Najpomembnejši predstavniki lipolitov so iz rodov *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* in *Bacillus* (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

2.1.2.3 Razmere za rast in aktivnost mikroorganizmov

Za svoj razvoj in aktivnost mikroorganizmi potrebujejo: hrano, ustrezno temperaturo, prisotnost ali odsotnost kisika, okolje z ustreznimi vrednostmi pH in brez prisotnih zaviralnih snovi.

- Hrana:
mikroorganizmi se v prehranskih zahtevah zelo razlikujejo, razlikujejo pa se tudi po sposobnosti izkoriščanja določenih hranilnih snovi. Mleko je bogato z vsemi hranilnimi snovmi (laktozo, beljakovinami, maščobami), zato najdejo številne vrste mikroorganizmov dovolj hranljivih snovi za aktivnost in razmnoževanje. Rezultat je znan-hitro kvarjenje mleka (Rogelj, 2003).
- Ustrezna temperatura:
glede na območje rasti in aktivnosti jih delimo v psihrofilne, psihrotrofne, mezofilne in termofilne mikroorganizme (gl. točko 2.1.2.2) (Rogelj, 2003).
- Voda:
pomemben dejavnik, ki vpliva na razmnoževanje, aktivnost in preživetje mikroorganizmov v živilih, je poleg razpoložljivih hranil tudi voda (Rogelj, 2003).
- Prisotnost ali odsotnost kisika:
glede na potrebe po kisiku delimo mikroorganizme v obligatno aerobne, mikroaerofilne, fakultativno anaerobne, obligatno anaerobne in od kisika neodvisne organizme. Njihovo aktivnost opazimo takrat, ko se v izdelku ustvarijo zanje ustrezni pogoji (Rogelj, 2003).
- Vrednosti pH:
mleko je z vrednostjo pH med 6,5 in 6,7 idealno živilo za aktivnost večine mikroorganizmov (Rogelj, 2003).
- Odsotnost zaviralnih snovi (Rogelj, 2003):
poleg številnih ugodnih lastnosti, ki jih ima mleko za rast mikroorganizmov, pa vsebuje tudi različne protimikrobne snovi, ki oblikujejo tako imenovani protimikrobni sistem mleka. Glede na njihov izvor jih lahko razdelimo v tri skupine:
 - naravno prisotne protimikrobne snovi
 - protimikrobne snovi, ki jih tvorijo mikroorganizmi in
 - dodane snovi s protimikrobnim delovanjem

2.1.2.4 Viri okužbe mleka

Okužbo mleka z mikroorganizmi takoj ob molži imenujemo primarna okužba.

Glavni viri okužbe surovega mleka so (Mavrin in Oštir, 2002):

- krava,
- hlev,
- krma,
- molzišče,
- molzni stroji,
- mlekovodi,
- molznik.

a.) Krava –lahko na svoji koži in dlaki zadržuje veliko prahu in ostale nečistoče iz okolice. V mleko zato padajo luske odmrle kože, dlaka in ostala nečistoča iz okolice. Na 1 gramu dlake je lahko do 5 milijonov mikroorganizmov, zato sta nega in čiščenje živali pomembna. Pred molžo je zato potrebno dobro oprati in osušiti vime in če se molze ročno, zavezati kravi rep, saj je v repu največ nezaželenih mikroorganizmov (Miletič, 1994). Pravilen postopek čiščenja vimena stimulira kravo, da spusti mleko. Pri ročni molži je nevarnost, da bi umazanija, dlake ali delci kože padli v molzni vrč med molžo seveda večja kot pri strojni molži. Zato nekateri priporočajo tudi britje vimena in bokov krave, da se v največji možni meri zmanjša okužba z umazanijo. Pri strojni molži je zadostno čiščenje vimena in seskov na »suh«^o, še posebno, če se krave pasejo ali imajo suha ležišča. Krave z zelo umazanimi vimeni je potrebno umiti z vodo in raztopino razkužila ter potem dobro osušiti s papirnato brisačo. Temperatura vode naj bo približno 37 °C (Tumpej, 2002).

b.) Hlev –zrak v hlevu zadržuje zelo veliko bakterij iz krme in stelje. Infekcije mleka z mikroorganizmi lahko zmanjšamo, če hleva ne čistimo neposredno pred in med molžo ter tudi s čimprejšnjim hlajenjem mleka po molži. Ob rednem čiščenju korita za hranjenje, ležalnega in blatnega kanala, se higiena v hlevu bistveno poveča, s tem pa tudi čistoča živali. V svetlih, zračnih, čistih in redno beljenih hlevih se ne pojavljajo neprijetni vonji in ni insektov. Hlev se mora redno razkuževati, posebno po zidovih za stojišči krav (Miletič, 1994).

c.) Krma- v sebi zadržuje mikroorganizme, ki se v mleko prenesejo direktno s prahom iz staje ali preko obleke molznika (Miletič, 1994). Pogosto je krma okužena z enteropatogeno bakterijo *Listeria monocytogene*, in kadar prispe v mleko, predstavlja veliko nevarnost za potrošnike in mlekarsko industrijo, ker lahko raste v hladno skladiščenem mleku in celo pri temperaturi 0 °C (Tratnik, 1998). V krmi so lahko prisotne tudi spore mikroorganizmov ter spore plesni. Plesni lahko tvorijo toksične mikotoksine, ki lahko pridejo v mleko. Zato mora biti krma ustrezna in mikrobiološko neoporečna (Rogelj, 2003).

d.) Molzišče - mora biti čisto, prav tako tla in stene (Rogelj, 2003).

e.) Molzni stroji in mlekovodi- postopki pri sami molži so zelo pomembni, nič manj pa redno in pravilno čiščenje ter razkuževanje molzne opreme. Ko mleko začne iztekati iz mlečnih celic je sterilno, vendar mikroorganizmi pridejo vanj, še preden priteče iz vimena. Molzna oprema in molzni stroj morajo biti izdelani iz materialov, ki so odporni proti obrabi in koroziji ter se lahko čistijo. Vsa oprema mora biti izdelana tako, da lahko vse površine, ki pridejo v stik z mlekom, po molži dobro očistimo in razkužimo. Zaradi ostankov mleka na opremi lahko mikroorganizmi na površinah tvorijo biofilme in se uspešno razmnožujejo. Ob ponovni molži se izplaknejo v mleko (Chambers, 2002). Mlekovodi so na vakuumski vod običajno pritrjeni z dvojnimi objemkami in morajo imeti pravilen padec, da lahko po čiščenju in razkuževanju raztopina detergenta in vode dobro izteče. Potrebna je redna kontrola sesnih gum ter cevi in kolen mlekovoda. Razpoke na gumijastih delih so namreč idealna podlaga za bakterije in njihovo rast (Tumpej, 2002). Če je mlekarska oprema očiščena, razkužena in suha, je število mikroorganizmov v surovem mleku po molži nizko. V mikroflori mlekarske opreme prevladujejo mikroorganizmi iz skupin mikrokokov, streptokokov, gram-negativnih palčk ali nesporogenih pozitivnih palčk. Mikroflora se lahko s časom spreminja, v glavnem pa velja, da je neočiščena oprema za molžo izvor termodurov, hladilni bazeni in cisterne pa psihrotrofov. V hladilnih bazenih so termoduri redki, saj se večina pri nizkih temperaturah slabo ali ne razmnožuje (Rogelj, 2003).

f.) Molznik - je ključna oseba pri molži, pripravi žival za molžo, izpelje molžo ter oskrbi žival, vimena in seske po molži. Molznik je redko pomemben vir okužbe mleka, še posebno pri strojni molži. Pomemben dejavnik tveganja pa postane, kadar je prenašalec kužnih bolezni, oziroma patogenih mikroorganizmov, zato je za molznike priporočljiva vsaj občasna zdravstveno-higienska kontrola (Rogelj, 2003).

2.1.2.5 Zahteve Regulative EU o ravnanju z mlekom med in po molži

Surovo mleko je mleko pridobljeno z izločanjem mlečne žleze domače živali, ki ni bilo izpostavljeno temperaturam nad 40 °C. Zdravo mleko mora prihajati iz mlečne žleze živali, ki ne kaže simptomov bolezni, ki bi bila lahko nevarna za človeka, mora biti v dobri zdravstveni kondiciji in ne sme imeti drugih poškodb, ki bi vplivale na kakovost mleka (Regulation No 853/2004 ..., 2004).

A.) Prostori in oprema za shranjevanje mleka

Mlekarska oprema in prostori, kjer se mleko shranjuje, morajo biti narejeni in opremljeni tako, da je v njih majhna možnost okužbe. Prostori za shranjevanje surovega mleka morajo biti tudi zaščiteni pred mrčesom. Površina opreme, ki prihaja v stik z mlekom, mora biti primerna za čiščenje in razkuževanje. Pred in po uporabo mora biti vedno očiščena in razkužena (Regulation No 853/2004 ..., 2004).

B.) Higiena mleka med molžo, shranjevanjem in transportom

Mleko vsake krave mora biti pregledano, saj v njem ne smejo biti prisotni povzročitelji raznih nalezljivih bolezni. Mleko je potrebno takoj po molži shraniti v čistih posodah in v ustreznih higienskih pogojih. Takoj mora biti ohlajeno na temperaturo pod 8 °C, če se pobira isti dan in pod temperaturo 6 °C, če pobiranje ni dnevno. Med transportom se mora hladna veriga vzdrževati in temperatura mleka na cilju ne sme preseči 10 °C (Regulation No 853/2004 ..., 2004).

C.) Kriteriji za sveže kravje mleko (Regulation No 853/2004 ..., 2004).

Skupno število mikroorganizmov 30 °C (v ml)	≤ 100 000
Število somatskih celic (v ml)	≤ 400 000

D.) Temperatura

Mleko je lahko skladiščeno na višji temperaturi od 6 °C, če gre takoj po molži ali v roku 4 ur po molži v obdelavo (Regulation No 853/2004 ..., 2004).

E.) Molznik mora vzdrževati visok nivo higiene, njegova oblačila pa morajo biti čista.

Obvezno je redno pranje rok (Regulation No 853/2004 ..., 2004).

2.2. STATISTIČNI PODATKI O KAKOVOSTI SUROVEGA MLEKA V SLOVENIJI IN EVROPSKI UNIJI

2.2.1. Slovenija

Odkup mleka je od leta 1993, ko so slovenske mlekarne odkupile 346,1 milijona litrov mleka, nenehno rasel. V letu 2004 je še znašal 485,1 milijona litra. Lanski odkup je bil za 36,6 milijona litrov manjši kot leto prej in je znašal 448,5 milijona litrov (Valjavec, 2006).

a) Povprečni mesečni odkup:

Povprečna količina odkupljenega mleka niha glede na sezono. Nihanje količine odkupljenega mleka po mesecih je vsa leta približno enako. Odkup mleka po mesecu februarju vedno raste in junija ali julija doseže vrh, nato pa se proti decembru znova zmanjšuje (Valjavec, 2006).

b) Povprečni dnevni odkup:

V letu 2005 je bil največji dnevni odkup mleka aprila oziroma maja, ko je znašal okrog 1.370.000 litrov, najmanjši pa novembra oziroma decembra (Valjavec, 2006).

▪ Vsebnost maščob v mleku:

Vsebnost maščobe v mleku se vsako leto giblje v približno enaki krivulji: januarja, februarja in marca je visoka, ker se živali hranijo v hlevu, najnižja je v juniju, juliju in avgustu, ko so na prosti paši, nakar se proti decembru spet vzpenja. V letu 2005 je januarja vsebnost maščobe v mleku znašala približno 4,2 %, avgusta se je spustila na najnižjo točko, okrog 4,1 % in se decembra povzpela na 4,24 % (Valjavec, 2006).

▪ Vsebnost beljakovin v mleku:

Nihanje vsebnosti beljakovin je podobno nihanju vsebnosti maščob. V januarju je vsebnost beljakovin v mleku visoka, nato do julija upada in se decembra povzpne do najvišje točke. V letu 2005 je imelo odkupljeno mleko v Sloveniji povprečno 3,39 % beljakovin, junija samo 3,26 %, decembra pa največ okoli 3,45 % odstotka (Valjavec, 2006).

▪ Higienska kakovost mleka:

Rezultati higienke kakovosti slovenskega mleka so odlični. Leto 2005 je bilo izjemno, nihanja so bila neznatna, vse leto je krivulja tekla domala v ravni horizontali in kazala, da je v povprečju kar 99 % ali več mleka odlične kakovosti oziroma v rangu mleka, ki vsebuje do 100.000 mikroorganizmov v ml. Za obdobje pred letom 2000 je bil značilen občuten upad higienke kakovosti mleka sredi leta, a le redko pod 95 odstotkov. Lansko leto je bilo nedvomno prelomno in visoka higienka kakovost je postala še bolj prepoznavna lastnost slovenskega mleka (Valjavec, 2006).

Preglednica 4: Delež mleka glede na bakteriološko kakovost v obdobju od 1994 do 2005 v Sloveniji (Valjavec, 2006)

Leto	Delež mleka do 50.000 m.o./ml	Delež mleka do 100.000 m.o./ml
1994	43.5 %	60.0 %
1995	61.0 %	77.6 %
1996	62.9 %	78.8 %
1997	68.6 %	83.0 %
1998	69.9 %	84.6 %
1999	70.0 %	86.0 %
2000	85.0 %	95.0 %
2001	90.6 %	95.7 %
2002	90.8 %	96.8 %
2003	92.0 %	98.8 %
2004	92.9 %	98.6 %
2005	93.6 %	99.5 %

m.o.: mikroorganizmi

▪ Glavni dejavniki napredka

Med poglavne dejavnike napredka v proizvodnji mleka štejemo (Ferčej, 1999):

1. želje in hotenja naprednih kmetov, da povečajo dohodke na svojih gospodarstvih s proizvodnjo za trg, s produktivnostjo, ki jo omogoča nova tehnika in sodobno znanje, kažejo pa jo napredni govedorejci v razvitih evropskih deželah.
2. zadovoljiv trg, ki mleko sprejema, ga predeluje in vnovčuje.
3. delovanje strokovnjakov, od znanstvenih delavcev, ki spremljajo razvoj znanosti v svetu, raziskujejo in prenašajo novo znanost v prakso z razmeroma velikim številom strokovnjakov, ki sodelujejo s kmeti.
4. država s svojimi ukrepi razvoj gospodarskih dejavnosti vzpodbuja, usmerja in jim materialno pomaga. Posebno učinkovitih programov za prestrukturiranje in povečanje produktivnosti kmetijstva in govedoreje pa ni razvijala.

2.2.2 Trženje in kakovost mleka v državah Evropske Unije

V maju 2004, se je Evropska unija povečala z dosedanjih 15 na skupno 25 članic. Vstop novih članic ni le političen, ampak tudi gospodarski izziv. Na skupnem trgu EU so vsi proizvajalci mleka tekmeci drug drugemu. Regije, ki imajo neugodno strukturo kmetij, so se prisiljene spoprijeti z velikimi spremembami na trgu z mlekom in izredno veliko konkurenco. Zaradi povečanja EU se je trg z mlekom in mlečnimi izdelki povečal za eno petino (Fuchs, 2004).

V 25 državah članicah EU trenutno proizvaja mleko kar 2,3 milijona rejcev. Večina teh rejcev je v državah- novih članicah EU-10. Struktura kmetij v država EU-10 je zelo različna. Nekatere države proizvajajo mleko na velikih farmah, (Češka, Slovaška), druge imajo zelo majhne črede, ki štejejo v povprečju tri ali manj krav (Fuchs, 2004).

▪ Presežki mleka v državah EU

Proizvodnja mleka je najpomembnejša kmetijska dejavnost v skoraj vseh državah EU, saj pomeni dobrih 18 odstotkov celotne kmetijske proizvodnje v uniji. Proizvodnja mleka v EU zaradi mlečnih kvot omejeno raste že od leta 1990, medtem ko število krav molznic pada. Potrošnja mleka je dokaj stabilna. EU je zaradi svojih presežkov mleka (približno 10 odstotkov) izvoznica mlečnih izdelkov. Takšno situacijo otežuje tudi konkurenca iz neevropskih držav- Amerike, Avstralije, Oceanije. Prav tako proizvodnjo mleka povečujejo posamezne države srednje in vzhodne Evrope. Vse to vpliva na naše možnosti izvoza na trge unije, na drugi strani pa je čutiti pritisk evropskih proizvajalcev na naših tradicionalnih izvoznih trgih in domicilnem trgu Slovenije (Valjavec, 2006).

2.3. METODE ZA UGOTAVLJANJE MIKROORGANIZMOV V SUROVEM MLEKU

V začetku razvoja mikrobiologije je klasifikacija mikroorganizmov služila izključno za identifikacijo. Identifikacija mikroorganizmov je služila predvsem odkrivanju pomena bakterij pri povzročitvi različnih infekcij, okužb hrane, pretvorbi organskih snovi, tvorbi komercialno uporabnih snovi, itd. Mnogo postopkov in značilnosti t.i. klasične taksonomije danes ni več uporabnih, saj je bakterijska taksonomija postala zelo kompleksna in zapletena. Tako smo v zadnjih dvajsetih letih bili priča opaznim spremembam v bakterijski klasifikaciji in identifikaciji. Uporaba biokemijskih, genetskih, fizioloških ter novih mikroskopskih metod, analize celične stene, numerična taksonomija, preučevanje celičnih lipidov in nukleinskih kislin, je zelo hitro spremenila pogled na samo bakterijsko klasifikacijo in identifikacijo, kjer si moramo sedaj pomagati tudi z matematičnimi in statističnimi modeli (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

Nekaj desetletij nazaj je klasifikacija mikroorganizmov temeljila na klasičnih metodah: mikroskopskem pregledu bakterijske oblike, morfologije, reakciji na različna barvanja, prisotnosti, oziroma odsotnosti ter obliki in namestitvi spor, gibljivosti, zahtevah po določenih hranilih, zmožnosti razgrajevanja določenih sladkorjev, itd. Z razvojem elektronske mikroskopije, kromatografij, masne spektrometrije, genetskih metod, se klasične metode identifikacije uporabljajo vse manj, vedno bolj pa se uveljavljajo biokemijske in molekularno-genetske metode (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

2.3.1 Klasične metode za ugotavljanje higienske kakovosti mleka

Klasične metode za laboratorijsko ugotavljanje prisotnosti in števila mikroorganizmov so mešanica mikrobioloških, kemijskih in fizikalnih metod. Največkrat se uporabljajo za rast in namnožitev preučevanih mikroorganizmov hranljiva, selektivna ali diferencialna trdna ali tekoča gojišča. Rast mikroorganizmov ugotavljamo s štejetem poraslih kolonij na trdnih gojiščih in motnost v tekočih gojiščih v kombinaciji z različnimi indikatorji. Štetje poraslih kolonij je kvantitativna metoda, kvalitativne metode temeljijo na identifikaciji mikroorganizmov z različnimi biokemijskimi testi. Klasične oziroma standardizirane metode za ugotavljanje higienske kakovosti mleka so primerne za ugotavljanje mikrobiološke kakovosti v surovem mleku in mlečnih izdelkih (Houghtby in sod., 1992).

2.3.2 Nekatere hitre metode za ugotavljanje števila mikroorganizmov

Uvajanje programa zagotavljanja kakovosti v prehransko industrijo zahteva novo organizacijo dela tudi v mikrobioloških laboratorijih. Zato sledimo novemu pristopu v razmišljanju o kakovosti dela in storitev. Industrijski mikrobiološki laboratoriji, ki se odločajo za pridobitev akreditacije, morajo posebno pozornost posvetiti kakovosti izvajanja postopkov in pripravi mikrobioloških gojišč, z vpeljavo kritičnih kontrolnih točk pri opravljanju svojega dela. Postopki morajo biti dokumentirani in so dokazilo dobre ponovljivosti analitskega dela. Mikrobiološka gojišča morajo biti redno testirana. Opravljena mora biti kontrola sterilnosti in kontrola mikrobiološke aktivnosti (Golc Teger in sod., 1996).

Zahtevnost in dolgotrajnost postopka priprave mikrobioloških gojišč spodbuja laboratorije k uporabi pripravljenih gojišč (angl.: ready to use media). Čas in delo, namenjeno temu opravilu, izkoristijo laboratoriji za izpolnjevanje drugih zahtev. Uporaba pripravljenih gojišč omogoča boljše učinkovitost, ponovljivost in produktivnost laboratorija: večje število testov, opravljenih v krajšem času (Golc Teger in sod., 1996).

2.3.2.1 Metoda BactoScan

BactoScan je instrument za avtomatsko določanje mikrobiološke kakovosti surovega mleka, namenjen predvsem plačevanju mleka po kakovosti. Metoda temelji na štejetju posameznih bakterijskih celic v vzorcu mleka (Golc Teger in Godič Torkar, 2003). Rezultat analize vzorca je znan že po sedmih minutah, kar je velika prednost pred klasično metodo štetja mikroorganizmov na petrijevih ploščah, pri kateri dobimo rezultat analize šele po 48 ali celo 72 urah (Arsov, 1987). Princip delovanja instrumenta BactoScan je kontinuirana epifluorescentna mikroskopija, t.j. instrument zazna (meri) svetlobo, ki se odbija od površine s fluorescenčnim barvilom obarvanega objekta, v tem primeru obarvane bakterije. Bakterije, pri katerih je obarvana molekula RNK, instrument šteje direktno. Suspenzija bakterij z barvilom potuje skozi tanko kapilaro. Po obsevanju z ksenonovo žarnico obarvane bakterije fluorescirajo rdeče oranžno svetlobo, ki jo zazna občutljiv fotometer (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

2.3.2.2 Metoda Petrifilm[™] (3M Company, ZDA)

Metoda z uporabo Petrifilm[™] temelji na štetju kolonij na papirnatih ploščah s selektivnimi gojišči. To je sistem pripravljenih gojišč za štetje kolonij specifičnih skupin mikroorganizmov. To so že pripravljene, sterilni lističi, na katere so nanešena specifična selektivna gojišča, želirna snov, topna v hladni vodi, indikatorji aktivnosti ali določeni encimski substrati ter barvila. Če imamo tekoč vzorec (mleko), ga pripravimo in razredčujemo po standardnih predpisih o pripravi in razredčevanju vzorcev, ostale vzorce pa pripravimo tako, da naredimo osnovno suspenzijo vzorca in nato izvajamo postopek, ki velja za mleko in tekoče mlečne izdelke. Postopek moramo izvajati v sterilnih pogojih. Tvrdka 3M Company, ZDA, nudi Petrifilme za določitev skupnega števila mikroorganizmov, kvasovk in plesni, enterobakterij, *E. coli* in koliformnih bakterij (Golc Teger in Godič Torkar, 1996).

V programu zagotavljanja kakovosti z izvajanjem sistema analize tveganosti kritičnih kontrolnih točk (HACCP), kjer je pogostnost analize nujna, je uporaba Petrifilma omogočila porast števila analiz v eni uri za 104 % (podatki za 85 tovarn v letih 1993,1994) (Golc Teger in Godič Torkar, 2003).

2.3.2.3 Metoda Rida[®]Count (R-Biopharm, ZDA)

Na podobnem principu kot metoda Petrifilm[™] temelji tudi metoda Rida[®] count.

- Metoda RIDA[®]COUNT je bila priznana pri mednarodni organizaciji AOAC-RI (Certificate No.011001):

Metoda Rida[®]count je sistem že pripravljenih gojišč za štetje kolonij posameznih mikroorganizmov v hrani ali opremi. To so že pripravljene sterilni lističi, na katerih so nanešena gojišča, ki omogočajo dobro absorbcijo vzorca in so prekrite s plastično folijo, ki preprečuje dodatne okužbe (R- Biopharm' s ,...2004)

Rida[®] count lističi so na voljo za ugotavljanje različnih skupin mikroorganizmov:

- : RIDA[®]COUNT za skupno število mikroorganizmov,
- : RIDA[®]COUNT za koliformne mikroorganizme,
- : RIDA[®]COUNT za kvasovke in plesni,
- : RIDA[®]COUNT za vrste *Salmonella spp.*,
- : RIDA[®]COUNT za koagulaza-pozitivne stafilokoke.

3 MATERIAL IN METODE

Namen diplomskega dela je bil:

1. ugotoviti mikrobiološko kakovost vzorcev surovega mleka, odvzetega pri posameznih proizvajalcih, družinskih kmetijah, zbiralnicah in v transportnih cisternah na sprejemu mlekarne,
2. ugotoviti razlike v nekaterih mikrobioloških parametrih kakovosti surovega mleka v zimskem in letnem obdobju,
3. primerjati rezultate hitre metode Rida[®] count z rezultati standardnih metod.

3.1 HIPOTEZA

Predpostavljamo, da bo:

- kakovost mleka boljša v zimskem obdobju
- število psihrotrofnih mikroorganizmov višje v zimskem obdobju
- mikrobiološka kakovost vzorcev mleka, odvzetih pri posameznih mlekarških obratih in družinskih kmetijah boljša, kot pri vzorcih mleka iz transportnih cistern
- se bodo rezultati preiskav, dobljenih s hitro metodo Rida[®] count statistično značilno ujemali z rezultati standardnih metod.

3.2 POTEK PREISKAVE IN SHEMA DELA

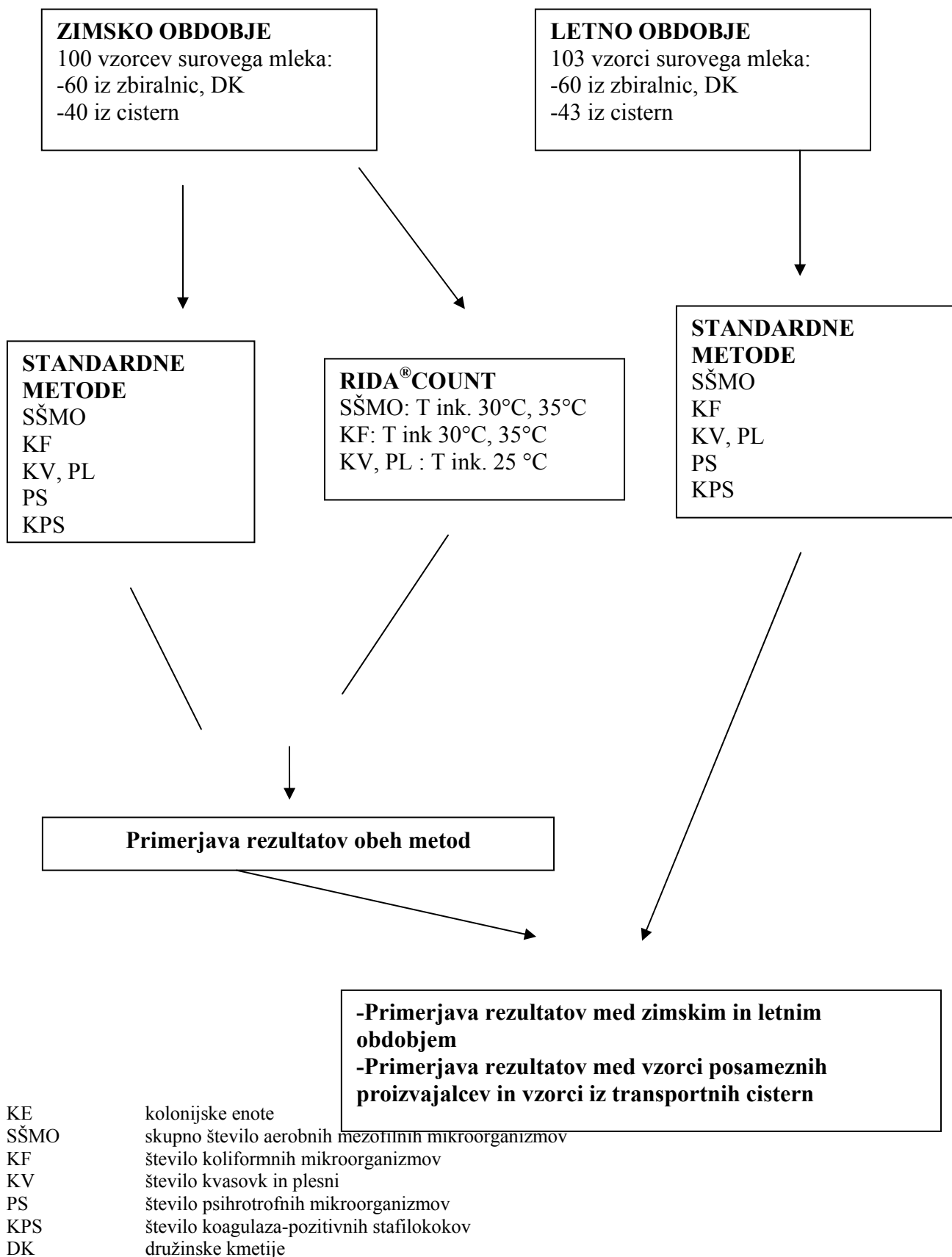
Naloga je vsebinsko razdeljena na dva dela. V prvem delu smo primerjali rezultate hitre komercialne metode Rida[®] count z rezultati standardiziranih mikrobioloških preiskav surovega mleka, predpisanih z mednarodnimi standardi ISO ali IDF za ugotavljanje skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov (skupno število mikroorganizmov), števila koliformnih mikroorganizmov ter števila kvasovk in plesni. V drugem delu smo v zimskem in letnem obdobju ugotavljali mikrobiološko kakovost vzorcev mleka posameznih proizvajalcev, družinskih kmetij, zbiralnic in skupnega surovega mleka iz transportnih cistern na sprejemu mlekarne, glede na nov način odvoza mleka po dveh dneh.

V zimskem in v letnem obdobju smo preiskali vsakič po 60 vzorcev mleka posameznih mlekarških obratov, družinskih kmetij in zbiralnic. V zimskem obdobju smo preiskali 40 vzorcev, v letnem pa 43 vzorcev skupnega surovega mleka iz transportnih cistern na sprejemu mlekarne.

Preiskave:

V vzorcih mleka smo ugotavljali skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov (SŠMO), število koliformnih mikroorganizmov (KF), število psihrotrofnih mikroorganizmov (PS), število kvasovk in plesni (KV, PL) ter število koagulaza-pozitivnih stafilokokov (*Staphylococcus aureus* in sorodne vrste) (KPS).

SHEMA DELA



3.3 MATERIAL

3.3.1 Razredčevala

Ringerjeva raztopina $\frac{1}{4}$ jakosti

Ringerjevo raztopino smo uporabili za decimalno razredčevanje vzorcev mleka.

Sestava:

– natrijev klorid	2,25 g
– kalijev klorid	0,105 g
– kalcijev klorid	0,06 g
– natrijev hidrogen karbonat	0,05 g
– destilirana voda	1000 ml

1 tableto Ringer (Merck, Nemčija, 1.15525), smo raztopili v 500 ml destilirane vode (Mili Q, Milipore, Danska). Mešali smo z magnetnim mešalom, da so se tablete povsem raztopile. Vrednost pH raztopine smo uravnavali na $6,9 \pm 0,1$. Po 9,4 ml raztopine smo z dispensorjem nalili v epruvete in sterilizirali v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minut. Po sterilizaciji smo še enkrat preverili vrednosti pH in količino Ringerjeve raztopine v nekaj naključno izbranih epruветah. Odstopanje je smelo biti v območju $9,0\text{ ml} \pm 2\%$ (ISO 8261:2001/IDF 122:2001).

3.3.2 Reagenti za uravnavanje vrednosti pH razredčeval in gojišč:

1 N NaOH:

Priprava: 8 g NaOH (Merck, Nemčija, 1.06498) raztopimo v 200 ml destilirane vode.

1N HCl:

Priprava: 9,38 ml 32 % HCl (Merck, Nemčija, 1.00319) dopolnimo z destilirano vodo do 100 ml.

Za uravnavanje vrednosti pH že sterilnih gojišč ali gojišč, ki se ne avtoklavirajo, smo uporabili sterilni raztopini NaOH in HCl.

3.3.3 Gojišča

▪ Gojišče PCA

Gojišče PCA smo uporabili za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov in psihrotrofnih mikroorganizmov.

Sestava:

– glukoza	1,0 g
– kvasni ekstrakt	2,5 g
– agar	14,0 g
– pepton iz kazeina	5,0 g
– destilirana voda	1000 ml
– mleko v prahu	1,0 g

Odtehtali smo 22,5 g PCA gojišča v prahu PCA (Merck, Nemčija, 1.05463) in ga raztopili v 1000 ml destilirane vode. Zmes smo nato zmešali na magnetnem mešalu in segrevali, dokler se ni raztopila. Gojišče ni smelo zavreti ali se predolgo segrevati. Ko se je gojišče raztopilo, smo ga nekoliko ohladili in nato primešali raztopino posnetega mleka v prahu. Raztopino mleka smo pripravili tako, da smo odtehtali 1 g mleka v prahu (Merck, Nemčija, 1,15363) in ga raztopili v cca 20 ml destilirane vode, ki smo jo odvzeli od 1000 ml. Ko se je zmes ohladila, smo uravnali pH gojišča na $7,0 \pm 0,2$. Še tekoče gojišče smo prelili v plastične erlenmajerice in sterilizirali v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minut. Po avtoklaviranju smo še enkrat preverili vrednosti pH gojišča (ISO 4833:2004).

▪ Gojišče VRBL

Gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila koliformnih mikroorganizmov v vzorcih mleka.

Sestava:

– kvasni ekstrakt	3,0 g
– natrijev klorid	5,0 g
– pepton iz kazeina	7,0 g
– laktoza	10,0 g
– agar	12-18 g
– nevtral rdeče	0,03 g
– kristalno vijolično	0,002 g
– žolčne soli	1,5 g
– destilirana voda	1000 ml

V 150 ml destilirane vode smo raztopili 39,5 g gojišča v prahu VRB (Merck, Nemčija, - 1.01406). Zmes smo nato zmešali na magnetnem mešalu in previdno segrevali dokler se ni raztopila. Ko se je zmes ohladila smo uravnali vrednost pH gojišča na $7,4 \pm 0,2$. Tega gojišča nismo sterilizirali. Nalili smo ga v sterilne erlenmajerice (ISO 4832:2006).

▪ Gojišče YGC

Gojišče YGC smo uporabili za ugotavljanje števila kvasovk in plesni.

Sestava:

– glukoza	20,0 g
– kloramfenikol	0,1g
– kvasni ekstrakt	5,0 g
– agar	14,9 g
– destilirana voda	1000 ml

Odtehtali smo 40,0 g gojišča v prahu YGC (Merck, Nemčija, 1.16000) in ga raztopili v 1000 ml destilirane vode. Zmes smo zmešali na magnetnem mešalu in nato segrevali, dokler se ni raztopila. Vrednost pH smo uravnali na $6,6 \pm 0,2$. Še tekoče gojišče smo prelili v plastične erlenmajerice in sterilizirali v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minut. Po avtoklaviranju smo še enkrat preverili, če je vrednost pH gojišča ustrezna (ISO 6611:2004/IDF 94:2004).

- Gojišče Baird Parker z dodatkom kunčje plazme in fibrinogena (gojišče RPF).

Gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila koagulaza-pozitivnih stafilokokov (*S. aureus* in sorodnih vrst).

Sestava:

– kvasni ekstrakt	1,0 g
– mesni ekstrakt	5,0 g
– tripton	10,0 g
– natrijev piruvat	10,0 g
– glicin	12,0 g
– litijev klorid	5,0 g
– agar agar	5,0 g
– destilirana voda	1000 ml

V 150 ml destilirane vode smo raztopili 9,15 g gojišča v prahu Baird Parker (Biolife, Italija, 2C083). Zmes smo premešali na magnetnem mešalu in segrevali v mikrovalovni pečici, da se je gojišče raztopilo. Vrednost pH smo uravnali na $7,2 \pm 0,2$. Gojišče smo sterilizirali v avtoklavu pri $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 minut. Po avtoklaviranju smo še enkrat preverili, če je vrednost pH gojišča ustrezna (ISO 6888-2:1999).

- ❖ Kunčja plazma in fibrinogen (Rabbit Plasma Fibrinogen, Biolife, Italija, 423101)

Sestava suplementa:

Fibrinogen (380 mg), tripsin inhibitor (1,5 mg), kunčja plazma (3,0 ml). Pripravek smo v sterilnih pogojih ob gorilniku raztopili v 50 ml sterilne destilirane vode in ga primešali k 150 ml na $45\text{--}47\text{ }^{\circ}\text{C}$ ohlajenega gojišča Baird Parker. Gojišče smo takoj po pripravi prelivali v petrijeve posodice, ker pride drugače do precipitacije fibrinogena.

3.3.4 Komercialna metoda RIDA[®]COUNT

Komercialna metoda RIDA[®]COUNT (Biofarm, Nemčija) vsebuje lističe, na katerih je nanešena plast že pripravljene selektivnega gojišča za posamezne skupine mikroorganizmov. Uporabljali smo lističe RIDA[®]COUNT za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov, koliformnih bakterij ter kvasovk in plesni.

A) Oprema, ki jo potrebujemo za pregled vzorca po metodi Rida[®] count:

- laboratorijska tehtnica
- mehanski stresalnik
- polavtomatske pipete
- sterilizirane epruvete
- inkubator ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- lističe Rida[®] count
- Ringerjeva raztopina 1/4 jakosti

3.3.5 Oprema

- tehtnica (EB 300 M Mettler Toledo, Švica)
- magnetno mešalo (Tehtnica, Slovenija)
- avtoklav (Kambič, Slovenija)
- mikrovalovna pečica (Bosch, Nemčija)
- Bunsenov plinski gorilnik (Elektromedicina, Slovenija)
- PH meter (Mettler Toledo, MP 120, Švica)
- vodna kopel (Labo, Slovenija)
- mehanski stresalnik (Tehtnica, Slovenija)
- sušilnik (Kambič, Slovenija)
- inkubator (Labo, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Slovenija)
- števec kolonij Eško (Labo, Slovenija)

3.3.6 Potrošni material

- polavtomatske pipete
- pinceta
- merilni valji
- merilne bučke
- erlenmajerice
- petrijevke 90mm
- epruvete bakto

3.4 METODE DELA

3.4.1 Potek poskusa

Vzorčenje je potekalo v dveh letnih obdobjih in sicer v januarju in februarju ter maju in juniju 2005. Skupno smo preiskali 203 vzorce surovega mleka, od tega 120 vzorcev posameznih mlekarških obratov in vzorcev mleka z družinskih kmetij ter 83 vzorcev skupnega surovega mleka iz zbiralnic in iz transportnih cistern na sprejemu mlekarne. V zimskem obdobju je bilo odvzetih 100 vzorcev (60 vzorcev posameznih proizvajalcev in 40 vzorcev iz transportnih cistern), poleti pa 103 vzorci (60 vzorcev posameznih proizvajalcev in 43 vzorcev iz transportnih cistern) Vzorce so odvzeli kontrolorji kmetijskih zadrug iz ljubljanskega območja ter sodelavci Laboratorija za mlekarstvo ter jih v hladni verigi dostavili v Laboratorij za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete. Čas med odvzemom vzorca in preiskavo ni bil daljši od 6 ur.

3.4.2 Izvajanje mikrobioloških preiskav

Delo v mikrobiološkem laboratoriju je potekalo pod sterilnimi pogoji, tako da ni bila možna okužba iz okolja. Pribor, ki smo ga uporabljali za delo, smo predhodno sterilizirali. Delovne površine in roke smo predhodno razkužili z ustreznim razkužilom. Mikrobiološke preiskave smo izvajali ob prižganem gorilniku.

Ker smo predvidevali, da je število mikroorganizmov v 1 ml vzorca mleka v večini primerov tako visoko, da bi ob neposredni nacepitvi vzorca na gojišču po inkubaciji poraslo preveč kolonij, smo vzorec razredčevali. Bistvo decimalnega razredčevanja je namreč v tem, da zmanjšamo število mikroorganizmov na enoto volumna in s tem omogočimo optimalni rezultat preiskave (Arsov, 1994).

Vzorec mleka smo predhodno 25-krat dobro premešali. Po končanem penjenju smo s sterilno pipeto odpipetirali 1 ml mleka v epruveto z 9 ml Ringerjeve raztopine. Temperatura razredčevala je morala biti približno enaka testnemu vzorcu (18-20 °C), da ne bi prišlo do poškodbe mikroorganizmov. Ringerjevo raztopino z vzorcem smo cca 10 sekund mešali na mehanskem stresalniku. Dobili smo desetkratno razredčitev vzorca to je (10^{-1}).

Nadaljnje decimalne razredčitve smo dobili tako, da smo zmešali 1 ml osnovne razredčitve (10^{-1}) z 9 ml Ringerjeve raztopine, 1 ml pa smo prenesli tudi v označene petrijeve posodice in vmešali v 10-15 ml ustreznega gojišča s temperaturo 45-47 °C. S serijo decimalnega razredčevanja in prenašanja razredčitev v petrijeve posodice smo nadaljevali glede na predvideno število mikroorganizmov v vzorcu. Za vsako vrsto preiskave smo pripravili petrijeve posodice z najmanj dvema zaporednima decimalnima razredčitvama. Ko se je gojišče z vzorcem strdilo, smo petrijeve posodice obrnili na krovno stran in jih inkubirali po navodilih v posameznih standardih. Po inkubaciji smo prešteli kolonije na vseh števnih ploščah in rezultat preračunali po formuli (1). Rezultat smo izrazili v številu kolonijskih enot na 1 mililiter vzorca (KE/ml).

3.4.3 Postopek priprave ugotavljanja števila mikroorganizmov s standardnimi metodami

Za preiskave vzorcev smo uporabili standardne metode štetja kolonij na trdih gojiščih v petrijevih posodica. Uporabili smo gojišča PCA (ISO 4833:2004) za skupno število mikroorganizmov, VRBL (ISO 4832:2006) za ugotavljanje števila koliformnih mikroorganizmov, YGC (ISO6611:2004/IDF 94:2004) za ugotavljanje števila kvasovk in plesni, PCA (ISO 6730:2005/IDF 101:2005) za ugotavljanje števila psihrotrofnih mikroorganizmov ter Baird Parker z RPF (ISO 6888-2:1999) za ugotavljanje števila koagulaza-pozitivnih stafilokokov. Postopek priprave vzorca in decimalnega razredčevanja smo izvajali tako, kot je navedeno v točki 3.4.2. Tako smo iz epruvete z ustrežno decimalno razredčitvijo odpipetirali 1 ml vzorca v sterilne petrijeve posodice, dodali 10-15 ml gojišča, ohlajenega na temperaturo 45-47 °C in ga enakomerno porazdelili po petrijevi posodici. Ko se je gojišče z vmešanim vzorcem strdilo, smo obrnjene petrijeve posodice pri ustrezni temperaturi inkubirali za predpisan čas (Preglednica 5). Po inkubaciji smo prešteli vse vidne kolonije v petrijevih posodica. Za primerjavo z rezultati metode Rida[®] count smo za vsak vzorec izvedli preiskavo v paralelkah.

Preglednica 5: Decimalno razredčevanje vzorca, števnost kolonij na petrijevih posodicah in pogoji inkubacije pri standardnih metodah mikrobioloških preiskav posameznih skupin mikroorganizmov.

	<u>SŠMO</u>	<u>KF</u>	<u>KV+PL</u>	<u>PS</u>	<u>SA</u>
Razredčitev	$10^{-3} 10^{-4}$	$10^0 10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-1} 10^{-2}$	$10^{-2} 10^{-3}$	$10^{-1} 10^{-2}$
Štetje kolonij	15-300	10-150	10-150	10-150	15-100
Pogoji inkubacije (h/°C)	72 ±2 / 30 ±1	24 ±2 / 30 ±1	3-5 dni / 25 ±1	10 dni / 6,5	18-24 / 37

SŠMO- log vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF- log vrednosti števila koliformnih mikroorganizmov

KV- log vrednosti števila kvasovk in plesni

PS- log vrednosti števila psihrotrofnih mikroorganizmov

SA- log vrednosti števila koagulaza -pozitivnih stafilokokov

3.4.4 Postopek priprave ugotavljanja števila mikroorganizmov s komercialno metodo Rida[®] count

Pripravili smo si ustrezno število lističev Rida[®] count in jih označili s številko vzorca in ustrezno decimalno razredčitvijo. Decimalno razredčevanje smo izvajali istočasno s klasično metodo. Krovni listič smo pod sterilnimi pogoji previdno dvignili in na gojišče nanesti 1 ml ustrezne razredčitve vzorca. Gojišče z vzorcem smo previdno prekrili s krovnim lističem in pustili nekaj minut, da se je vzorec enakomerno razporedil po površini gojišča. Vsak vzorec smo izvedli v paralelkah. Eno serijo smo inkubirali pri temperaturi po navodilih klasične metode, drugo serijo pa po navodilih Rida[®] count. Po inkubaciji smo prešteli obarvane kolonije na ploščah.

Preglednica 6: Decimalne razredčitve, inkubacije in števnost plošč pri metodi Rida[®] count.

	<u>SŠMO</u>	<u>KF</u>	<u>KV+PL</u>
Razredčitev	10 ⁻³ 10 ⁻⁴	10 ⁰ 10 ⁻¹	10 ⁻¹ 10 ⁻²
Pogoji inkubacije (h/ °C)	-72 ±2 /30 ±1, -24-48/35(navodilo proizvajalca)	-24 ±2 /30 ±1 -24-48/35(navodilo proizvajalca)	3-5 dni/25 ±1
Značilne kolonije	Rdeče kolonije	Zelene kolonije	Kolonije kvasovk, z gladkimi robovi Kolonije plesni temnejše in večje kot kvasovke.
Števnost plošč	15 do 300 kolonij	10 do 150 kolonij	10 do 150 kolonij

SŠMO- log vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF- log vrednosti števila koliformnih mikroorganizmov

KV- log vrednosti števila kvasovk in plesni

PS- log vrednosti števila psihrotrofnih mikroorganizmov

SA- log vrednosti števila koagulaza -pozitivnih stafilokokov

3.4.5 Štetje kolonij na gojišču in izračun števila kolonijskih enot posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorca mleka

Kolonije smo prešteli na vseh petrijevih posodicah, na katerih je zraslo po standardih določeno števno število kolonij. Kadar so porasle na petrijevih posodicah majhne kolonije, smo morali paziti, da jih nismo zamenjali z neraztopljenimi delci gojišča, zato smo pri štetju uporabljali števec kolonij z ustrezno presvetlitvijo in povečavo. Posebno oblikovane, (razpršene) razširjene kolonije smo šteli kot skupek kolonij, torej kot eno kolonijo. Če je bila takšna kolonija precej razraščena in je prekrila eno četrtino petrijeve posodice, smo šteli kolonije na preostali površini in preračunali število na celotno površino plošče. Če je takšna kolonija prerasla več kot četrtino plošče je bilo štetje izključeno, plošče nismo šteli.

Če je bilo število kolonij na ploščah manjše od 10 (ali 15-odvisno od mejnih vrednosti števnosti za posamezne skupine mikroorganizmov), smo izrazili rezultat: manj kot 10 kolonijских enot pomnoženo s stopnjo decimalne razredčitve v 1 ml mleka.

Število kolonijских enot v 1 ml mleka smo izračunali po formuli:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2) * d} \quad (1)$$

$\sum C$ – Število prešteti kolonij na vseh petrijevih posodicah

n_1 - Število števnih petrijevih posodic prve razredčitve

n_2 - Število števnih petrijevih posodic druge razredčitve

d - Razredčitveni faktor, ki ustreza prvi razredčitvi

3.4.6 Statistična obdelava rezultatov

Statistično obdelavo podatkov so opravili sodelavci centra za strokovno delo v živinoreji s pomočjo statističnega programskega paketa SAS. Vse vrednosti, ki smo jih dobili po štetju mikroorganizmov na petrijevih posodicah ob koncu analiz, smo pretvorili v logaritemske vrednosti zato, da smo dobili normalno porazdelitev.

MODEL:

$$y_{ij} = \mu + S_i + P_j + e_{ijk} \quad (2)$$

y_{ij} .odvisna spremenljivka (mikroorganizmi)

μ -srednja vrednost modela

S_i -sistemski vpliv sezone

P_j -sistemski vpliv proizvajalca

e_{ij} -slučajni ostanek

Za primerjavo rezultatov klasičnih metod in metode Rida[®] count smo uporabili Wilcoxonov t-test neparametrične podobnosti razlik med posameznimi parametri.

4 REZULTATI

V tem poglavju predstavljamo rezultate statistične analize podatkov, dobljenih po preiskavi 100 vzorcev mleka v zimskem in 103 vzorcev mleka v poletnem obdobju. Preiskave skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, koliformnih mikroorganizmov ter kvasovk in plesni so bile v zimskem času opravljene v paralelkah zaradi primerjave med rezultati standardnih metod in metode Rida[®]count. V prvem delu je prikazana osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih skupin mleka vseh vzorcev. Prikazani so torej rezultati povprečnih logaritmskih vrednosti števila kolonijskih enot/ml (KE/ml) za posamezne skupine mikroorganizmov, mediane, standardni odkloni, koeficienti variabilnosti, najmanjše in največje vrednosti. Podana je tudi osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev. V naslednjem poglavju predstavljamo analizo povezav med logaritmskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov mleka, analizo razlik med zimskim in letnim obdobjem, ter analizo razlik med vzorci mleka posameznih proizvajalcev in transportnih cistern. V zadnjem delu je prikazan vpliv sezone in vrste vzorca na rezultate preiskav.

4.1 OSNOVNA STATISTIKA

Preglednica 7: Osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev.

log ₁₀ št.KE/ml	Št. meritev	Povprečje	Mediana	Standardni odklon	Koeficient variabilnosti	Najmanj	Največ
log₁₀_SŠMO	303	4.5276	4.5563	0.5505	12.1580	2.6021	6.0414
log₁₀_KF	303	2.0885	2.1761	1.0795	51.6880	0.0000	4.5315
log₁₀_KV	303	2.3227	2.4472	0.7189	30.9530	0.3010	4.1761
log₁₀_PS	203	3.7594	3.9345	0.8928	23.7483	2.0000	5.5051
log₁₀_SA	203	1.9703	2.1761	0.6286	31.9040	1.0000	3.1703

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

V preglednici 7 navajamo število meritev, povprečje, mediano, standardne odklone, koeficient variabilnosti, najmanjše in največje vrednosti za logaritmirane osnovne meritve. Za skupine skupnega števila aerobnih mikroorganizmov, koliformnih mikroorganizmov in kvasovk ter plesni so bile opravljene skupno 303 meritve, za psihrotrofne mikroorganizme in koagulaza-pozitivne stafilokoke pa skupno 203 meritve. V povprečju so bile največje vrednosti števila KE dobljene pri preiskavah skupnega števila mikroorganizmov (log 4,52),

za te so bile tudi minimalne in maksimalne vrednosti števila KE večje kot pri ostalih obravnavanih skupinah mikroorganizmov (min 2,6 log in max 6,04 log). Najmanjše število KE glede na vse skupine mikroorganizmov dosegajo koagulaza-pozitivni stafilokoki (povprečje log 1,97) (Preglednica 7). Število koliformnih mikroorganizmov predstavlja 0,37 %, število kvasovk in plesni 0,62 %, število psihrotrofnih mikroorganizmov 17,1 % in število koagulaza-pozitivnih stafilokokov 0,27 % povprečne vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov.

Preglednica 8: Osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev glede na sezono.

log ₁₀ št.KE/ml							
	Št. meri tev	Povprečje	Mediana	Standardni odklon	Koeficient variabilnosti	Najmanj	Največ
log₁₀_SŠMO							
poletje	103	4.7071	4.8261	0.5163	10.9676	3.2041	5.8195
zima	200	4.4352	4.4314	0.5459	12.3079	2.6021	6.0414
log₁₀_KF							
poletje	103	2.2762	2.5315	0.9627	42.2936	0.0000	4.1761
zima	200	1.9918	2.1139	1.1251	56.4853	0.0000	4.5315
log₁₀_KV							
poletje	103	2.4933	2.6335	0.7628	30.5954	0.3010	3.9445
zima	200	2.2348	2.3979	0.6807	30.4572	1.0000	4.1761
log₁₀_PS							
poletje	103	3.7442	3.9345	0.9148	24.4326	2.0000	5.2553
zima	100	3.7750	3.9370	0.8739	23.1486	2.0000	5.5051
log₁₀_SA							
poletje	103	1.9813	2.1761	0.6139	30.9859	1.0000	3.1703
zima	100	1.9589	2.1761	0.6463	32.9906	1.0000	3.0531

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

Iz preglednice 8 je razvidno, da je bilo število mikroorganizmov vseh skupin, razen psihrotrofnih mikroorganizmov, večje v poletnem obdobju. Tako v poletnem kot zimskem obdobju smo ugotovili najmanjše število koagulaza-pozitivnih stafilokokov in največje število skupnega števila mikroorganizmov.

Število koliformnih mikroorganizmov predstavlja poleti 0,37 %, pozimi pa 0,36 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov, število kvasovk in plesni predstavlja poleti 0,61 %, pozimi pa 0,63 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov. Število psihrotrofnih mikroorganizmov predstavlja poleti 10,9 %, pozimi 21,9 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov, število koagulaza-pozitivnih stafilokokov predstavlja poleti 0,20 %, pozimi pa 0,33 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov.

Pozimi je bilo skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov za 0,27 log nižje kot poleti, prav tako je bilo pozimi nižje število koliformnih mikroorganizmov in sicer za 0,28 log. Število kvasovk in plesni je bilo v zimskem obdobju nižje za 0,25 log, število koagulaza-pozitivnih stafilokokov pa za 0,02 log. Samo število psihrotrofnih mikroorganizmov je bilo pozimi višje za 0,03 log (Preglednica 8).

Preglednica 9: Osnovna statistika za logaritemske vrednosti števila KE posameznih mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev glede na odvzem pri posameznih proizvajalcih in v transportnih cisternah.

log ₁₀ št.KE/ml	Št. meri tev	Povprečje	Mediana	Standardni odklon	Koeficient variabilnosti	Najmanj	Največ
log₁₀_SŠMO							
proizvajalec	180	4.3463	4.2670	0.5897	13.5678	2.6021	5.5315
cisterna	123	4.7930	4.7482	0.3469	7.2382	4.1461	6.0414
log₁₀_KF							
proizvajalec	180	1.5015	1.5676	0.9289	61.8636	0.0000	4.0414
cisterna	123	2.9475	2.9542	0.6053	20.5352	1.2304	4.5315
log₁₀_KV							
proizvajalec	180	2.0258	2.0000	0.7323	36.1469	0.3010	4.1761
cisterna	123	2.7571	2.7574	0.4153	15.0622	1.0792	3.9445
log₁₀_PS							
proizvajalec	120	3.3865	3.4548	0.9097	26.8628	2.0000	5.2553
cisterna	83	4.2985	4.3222	0.5146	11.9726	3.0414	5.5051
log₁₀_SA							
proizvajalec	120	1.9200	2.1300	0.6891	35.8920	1.0000	3.1703
cisterna	83	2.0431	2.1761	0.5246	25.6761	1.0000	3.0000

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

Iz preglednice 9 je razvidno, da je bilo število mikroorganizmov vseh skupin višje pri vzorcih, odvzetih iz transportnih cistern. Največja odstopanja pri povprečjih med proizvajalci in cisternami so bila pri številu koliformnih mikroorganizmov, najmanjša pa pri številu koagulaza-pozitivnih stafilokokov. Število koliformnih mikroorganizmov predstavlja pri vzorcih proizvajalcev 0,14 %, pri vzorcih iz cistern pa 1,42 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov. Število kvasovk in plesni predstavlja pri vzorcih proizvajalcev 0,48 %, pri vzorcih iz cistern pa 0,92 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov. Število psihrotrofnih mikroorganizmov predstavlja pri vzorcih proizvajalcev 11 %, pri vzorcih iz cistern pa 32 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov. Število koagulaza-pozitivnih stafilokokov predstavlja pri vzorcih posameznih proizvajalcev 0,37 %, pri vzorcih cistern pa 0,18 % povprečne vrednosti skupnega števila mikroorganizmov.

Skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov je bilo pri vzorcih iz cistern višje za 0,44 log, prav tako je bilo pri vzorcih iz cistern višje število koliformnih mikroorganizmov in sicer za 1,45 log, število kvasovk in plesni za 0,73 log, število psihrotrofnih mikroorganizmov za 0,91 log in število koagulaza-pozitivnih stafilokokov za 0,12 log.

4.2 KORELACIJE

4.2.1 Korelacije med logaritetskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov mleka

Preglednica 10: Korelacije med logaritetskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka.

lastnosti	KF	KV	PS	SA	SŠMO
KF	1.00000 303	0.64638 <.0001 303	0.69627 <.0001 203	0.05079 0.4718 203	0.56468 <.0001 303
KV		1.00000 303	0.59134 <.0001 203	0.01536 0.8278 203	0.51771 <.0001 303
PS			1.00000 203	-0.04167 0.5550 203	0.65708 <.0001 203
SA				1.00000 203	0.02991 0.6718 203
SŠMO					1.00000 303

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

p- tveganje $\leq 0,05$ statistično značilno (meja statistične značilnosti)

Vse korelacije med posameznimi skupinami mikroorganizmov so visoko statistično značilne ($p < 0,0001$) z izjemo števila koagulaza-pozitivnih stafilokokov, ki ni v statistično značilni korelaciji z nobeno izmed ostalih skupin preiskanih mikroorganizmov. Korelacija med številom psihrotrofnih mikroorganizmov in številom koagulaza-pozitivnih stafilokokov je celo negativna (glej preglednico 10).

4.2.2 Korelacije med logaritemskimi vrednostmi posameznih skupin mikroorganizmov v zimskem in letnem obdobju

Preglednica 11: Korelacije med logaritemskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorca v zimskem obdobju.

lastnosti	KF	KV	PS	SA	SŠMO
KF	1.00000	0.66315 <.0001	0.73544 <.0001	0.06662 0.5102	0.58150 <.0001
	200	200	100	100	200
KV		1.00000	0.58119 <.0001	0.07743 0.4438	0.50024 <.0001
		200	100	100	200
PS			1.00000	0.04158 0.6812	0.71191 <.0001
			100	100	100
SA				1.00000 100	0.16684 0.0971 100
SŠMO					1.00000 200

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza- pozitivnih stafilokokov

p- tveganje $\leq 0,05$ statistično značilno (meja statistične značilnosti)

Vse korelacije med posameznimi skupinami mikroorganizmov so visoko statistično značilne ($p < 0,0001$). Število koagulaza-pozitivnih stafilokokov ni v statistično značilni korelaciji z nobeno izmed ostalih skupin preiskanih mikroorganizmov (glej preglednico 11).

Preglednica 12: Korelacije med logaritetskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorca v letnem obdobju.

lastnosti	KF	KV	PS	SA	SŠMO
KF	1.00000	0.60662 <.0001	0.68032 <.0001	0.02745 0.7831	0.49333 <.0001
KV		1.00000	0.62054 <.0001	-0.04459 0.6547	0.50059 <.0001
PS			1.00000	-0.12243 0.2179	0.65777 <.0001
SA				1.00000	-0.12847 0.1959
SŠMO					1.00000

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

p- tveganje $\leq 0,05$ statistično značilno (meja statistične značilnosti)

V letnem obdobju so vidne visoko značilne korelacije ($p < 0,0001$) med vsemi skupinami mikroorganizmov. Število koagulaza-pozitivnih stafilokokov ni v statistično značilnih korelacijah z ostalimi skupinami mikroorganizmov (glej preglednico 12).

4.2.3 Korelacije med skupinami mikroorganizmov pri vzorcih mleka odvzetih pri posameznih proizvajalcih in v transportnih cisternah

Preglednica 13: Korelacije med logaritetskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorcev mleka, odvzetih pri posameznih proizvajalcih.

lastnosti	KF	KV	PS	SA	SŠMO
KF	1.00000 180	0.51250 <.0001 180	0.54472 <.0001 120	-0.06318 0.4930 120	0.45112 <.0001 180
KV		1.00000 180	0.50405 <.0001 120	-0.12066 0.1893 120	0.45608 <.0001 180
PS			1.00000 120	-0.14640 0.1106 120	0.57860 <.0001 120
SA				1.00000 120	-0.00335 0.9710 120
SŠMO					1.00000 180

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza- pozitivnih stafilokokov

p- tveganje $\leq 0,05$ statistično značilno (meja statistične značilnosti)

Vse korelacije med posameznimi skupinami mikroorganizmov so visoko statistično značilne ($p < 0,0001$). Število koagulaza-pozitivnih stafilokokov ni v statistično značilni korelaciji z nobeno izmed ostalih skupin preiskanih mikroorganizmov. Korelacija med številom koagulaza-pozitivnih stafilokokov in številom koliformnih mikroorganizmov, številom kvasovk in plesni ter psihrotrofnih mikroorganizmov je negativna (glej preglednico 13).

Preglednica 14: Korelacije med logaritmskimi vrednostmi števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml vzorcev mleka, odvzetih iz transportnih cistern.

lastnosti	KF	KV	PS	SA	SŠMO
KF	1.00000 123	0.38599 <.0001 123	0.64812 <.0001 83	0.12902 0.2451 83	0.38663 <.0001 123
KV		1.00000 123	0.28983 0.0079 83	0.24513 0.0255 83	0.15662 0.0836 123
PS			1.00000 83	0.03115 0.7798 83	0.62836 <.0001 83
SA				1.00000 83	-0.01502 0.8928 83
SŠMO					1.00000 123

KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

p- tveganje $\leq 0,05$ statistično značilno (meja statistične značilnosti)

Med številom kvasovk in plesni ter številom psihrotrofnih mikroorganizmov ($r=0,29$) ter med številom kvasovk in plesni in številom koagulaza-pozitivnih stafilokokov je korelacija statistično značilna. Med skupnim številom aerobnih mezofilnih mikroorganizmov in številom kvasovk in plesni ni statistično značilne korelacije. Število koagulaza-pozitivnih stafilokokov ni razen s kvasovkami in plesnimi v statistično značilni korelaciji z nobeno izmed ostalih skupin preiskanih mikroorganizmov. Korelacija med številom koagulaza-pozitivnih stafilokokov in skupnim številom aerobnih mezofilnih mikroorganizmov je negativna. Ostale korelacije so visoko statistično značilne ($p<0,0001$) (glej preglednico 14).

4.2.4 Korelacije med metodo Rida[®] count in standardno metodo

Preglednica 15: Razlike med pari rezultatov standardne metode in metode Rida[®] count (rezultati so izraženi v logaritamskih vrednostih).

	SŠMO 30	SŠMO 35	KF 30	KF 35	KV 25
Log	4846	8888	4805,5	2630	-5274
P vrednost	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,002	<0,0001

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

p- tveganje $\leq 0,05$ statistično značilno (meja statistične značilnosti)

D-diferenca ali razlika

DSŠMO30= SŠMO 30 (Rida[®] count, inkubacija pri temperaturi 30 °C) – SŠMO (standardna metoda)

DSŠMO35= SŠMO 35 (Rida[®] count, inkubacija pri temperaturi 35 °C) – SŠMO (standardna metoda)

DKF 30 = KF 30 (Rida[®] count, inkubacija pri temperaturi 30 °C) – KF (standardna metoda)

DKF 35 = KF 35 (Rida[®] count, inkubacija pri temperaturi 35 °C) – KF (standardna metoda)

DKV= KV (Rida[®] count) – KV (standardna metoda)

Razlike med metodama statistično značilno odstopajo od pričakovane vrednosti (nič). Vrednosti so $p < 0,0001$, razen pri razlikah med logaritamskimi vrednostmi KF mikroorganizmov pri temperaturi inkubacije lističev Rida[®] count 35 °C ($p < 0,00019$) (Preglednica 15).

4.2.5 Vpliv sezone in mesta odvzema na logaritamske vrednosti preskušanih skupin mikroorganizmov

Preglednica 16: Vpliv sezone in vrste vzorca (odvzetega pri posameznih proizvajalcih oziroma iz transportnih cistern) na logaritamske vrednosti preskušanih skupin mikroorganizmov.

Skupina mikroorganizmov (v log)	Vpliv sezone		Vpliv vrste vzorca (posamezni proizvajalci, transportne cisterne)	
	Vrednosti F	Tveganje p	Vrednosti F	Tveganje p
SŠMO	19,71	<0,0001	59,42	<0,0001
KF	7,04	0,0084	234,13	<0,0001
KV	10,91	0,0011	102,64	<0,0001
PS	0,18	0,6679	68,07	<0,0001
SA	0,05	0,81	1,87	0,17

SŠMO- log vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF- log vrednosti števila koliformnih mikroorganizmov

KV- log vrednosti števila kvasovk in plesni

PS- log vrednosti števila psihrotrofnih mikroorganizmov

SA- log vrednosti števila koagulaza-pozitivnih stafilokokov

p- tveganje $\leq 0,05$: statistično značilno (meja statistične značilnosti)

Vpliv sezone na logaritemske vrednosti psihrotrofnih mikroorganizmov ($p = 0,67$, $F = 0,18$) in na logaritemske vrednosti števila koagulaza-pozitivnih stafilokokov ($p = 0,18$, $F = 0,05$) ni statistično značilen. Prav tako ni statistično značilen vpliv vrste vzorca (odvzetega pri posameznih proizvajalcih oziroma iz transportnih cistern skupnega mleka) na logaritemske vrednosti koagulaza-pozitivnih stafilokokov ($p = 0,17$, $F = 1,87$). Vpliv sezone in vrste vzorca na logaritemske vrednosti skupnega števila aerobnih mikroorganizmov, števila koliformnih mikroorganizmov ter kvasovk in plesni je statistično značilen (preglednica 16).

Preglednica 17: Ocenjene srednje vrednosti posameznih skupin mikroorganizmov (v log) glede na sezono in vrsto vzorca po metodi najmanjših kvadratov.

Skupina mikroorganizmov (v log)	Sezona		Vrsta vzorca (posamezni proizvajalci, transportne cisterne)	
	Poletje	Zima	Posamezni proizvajalci	Transportne cisterne
SŠMO	4,74	4,48	4,39	4,48
KF	2,39	2,13	1,54	2,98
KV	2,55	2,30	2,06	2,79
PS	3,81	3,86	3,38	4,29
SA	1,99	1,97	1,92	2,04

SŠMO- log vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

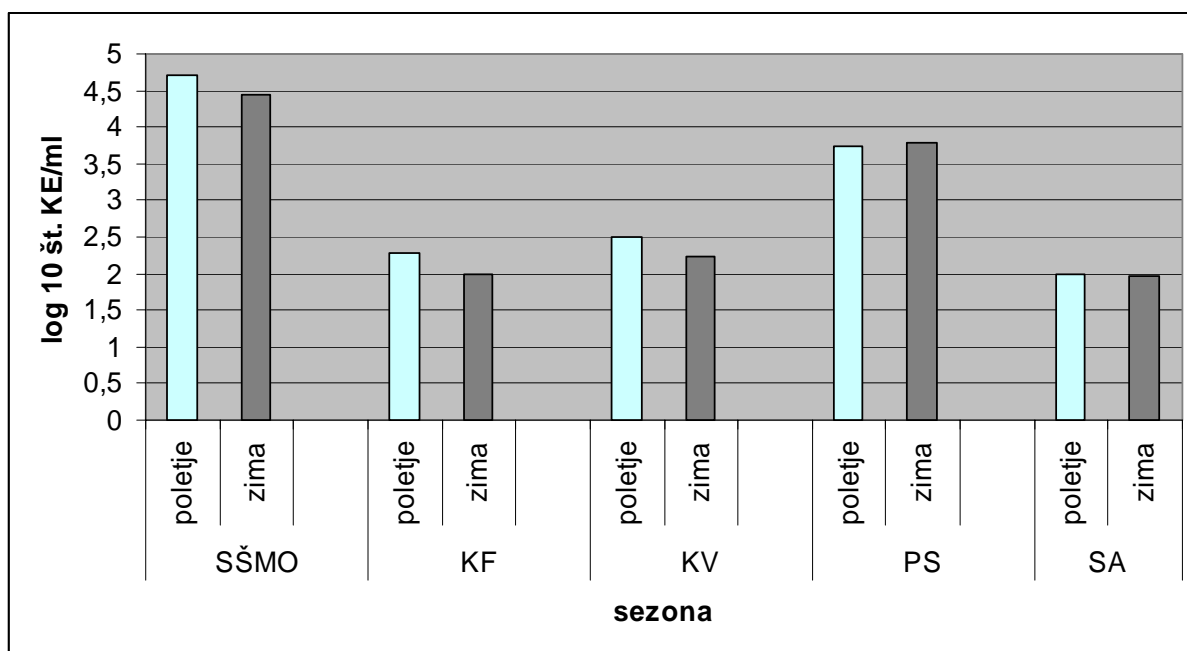
KF- log vrednosti števila koliformnih mikroorganizmov

KV- log vrednosti števila kvasovk in plesni

PS- log vrednosti števila psihrotrofnih mikroorganizmov

SA- log vrednosti števila koagulaza-pozitivnih stafilokokov

Ocenjene srednje vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov so pri poletnih vzorcih višje (4,74) kot pri zimskih vzorcih (4,48), prav tako so srednje vrednosti višje pri vzorcih iz transportnih cistern (4,48), kot pri vzorcih posameznih proizvajalcev. Ocenjene srednje vrednosti skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov so višje od srednjih vrednosti vseh ostalih skupin mikroorganizmov. Najnižje srednje vrednosti so pri številu koagulaza-pozitivnih stafilokokov, nizke so tudi ocenjene srednje vrednosti koliformnih mikroorganizmov pri posameznih proizvajalcih (Preglednica 17).



KE – kolonijske enote

SŠMO – skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

KF – število koliformnih mikroorganizmov

KV – število kvasovk in plesni

PS – število psihrotrofnih mikroorganizmov

SA – število koagulaza-pozitivnih stafilokokov

Slika 1: Ocenjene srednje vrednosti števila KE posameznih skupin mikroorganizmov v ml mleka vseh vzorcev po sezoni (izraženo v logaritmih).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Nekatere mlekarne so pred časom vpeljale prakso odvzemanja mleka od posameznih proizvajalcev vsake dva dni in ne več vsakodnevno. Tako mleko ostane dva dni v hladilnem bazenu pri posameznih proizvajalcih. Ob vsaki molži se v hladilni bazen dotoči sveže pomolzeno toplo mleko. Mikrobiološka kakovost in razmerje med posameznimi skupinami mikroorganizmov je v takšnih razmerah drugačno. Velik vpliv na mikrobiološko kakovost takšnega mleka ima higiena pri molži, ustrezno čiščenje mlekarske opreme, zdravje krav molznic, hitrost in intenzivnost hlajenja ter sezona (letno obdobje).

Na osnovi dobljenih rezultatov smo ugotovili naslednje:

Sveže mleko je v povprečju vsebovalo $3,3 \times 10^4$ KE/ml skupnega števila aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, $1,2 \times 10^2$ KE/ml koliformnih bakterij, $2,1 \times 10^2$ KE/ml kvasovk in plesni, $5,7 \times 10^3$ KE/ml psihrotrofnih mikroorganizmov in 93 KE/ml koagulaza-pozitivnih stafilkokokov. Pravilnik Evropske skupščine o higieni prehrabnenih izdelkov (Regulation No 853/2004..., 2004) določa, da skupno število mikroorganizmov ne sme presegati 100 000 kolonijskih enot na ml mleka. Glede na pravilnik je bila mikrobiološka kakovost mleka ustrezna. V letu 2001 je bilo povprečno skupno število mikroorganizmov v mleku iz transportnih cistern $4,7 \times 10^5$ KE/ml, povprečno število koliformnih mikroorganizmov pa $3,3 \times 10^3$ KE/ml (Arhiv LML, 2001). Rezultati našega poskusa torej potrjujejo trditve Valjavčeve (2006) o izboljšanju higienske kakovosti odkupljenega mleka v zadnjih petih letih, kljub uvajanju dvodnevnega odvzema mleka. Povprečno število mikroorganizmov v vzorcih iz transportnih cistern je bilo v poskusu $6,2 \times 10^4$ KE/ml, število koliformnih mikroorganizmov pa $8,7 \times 10^2$ KE/ml. Število koliformnih mikroorganizmov je bilo pri poletnih in zimskih vzorcih visoko statistično značilno v povezavi s skupnim številom aerobnih mezofilnih mikroorganizmov ($r = 0,56$), psihrotrofnih mikroorganizmov ($r = 0,69$) in kvasovk ter plesni (0,64). Povezava med skupnim številom in številom koliformnih mikroorganizmov je razumljiva, saj koliformne bakterije predstavljajo del mikroflore, ki je zajeta tudi v skupnem številu mikroorganizmov. Po podatkih Bramleya s sod. (1990) predstavljajo 10-30 % psihrotrofne mikroflore. V našem poskusu je število koliformnih mikroorganizmov predstavljalo v povprečju 2,1 % psihrotrofne mikroflore in 0,37 % skupnega števila mikroorganizmov. Korelacija med številom koliformnih in psihrotrofnih mikroorganizmov je nekoliko večja pozimi, njihova korelacija s skupnim številom pa je v obeh sezonah podobna. Koliformne bakterije najdemo na površini neoprane in vlažne mlekarske opreme, lahko pa so tudi znak fekalne kontaminacije. Povprečno število koliformnih mikroorganizmov se ponavadi giblje okrog 100 v 1 ml surovega mleka (Bramley, 1990). Število koliformnih mikroorganizmov je bilo v našem poskusu v vseh vzorcih dokaj nizko (povp. 120 KE/ml), čeprav so razlike v njihovem številu glede na sezono od vseh preiskanih skupin mikroorganizmov največje. Največji delež skupnega števila mikroorganizmov so predstavljali psihrotrofni mikroorganizmi (10,9 % poleti in 21,9 % pozimi), kar se ujema s podatki Bramleya s sod. (1990), ki navaja 10-50 % delež psihrotrofnih od skupnega števila mikroorganizmov. Število psihrotrofnih mikroorganizmov je bilo večje v zimskem času (3,74 poleti in 3,77 log pozimi). Vpliv sezone je namreč statistično značilen za vse skupine mikroorganizmov razen za psihrotrofne mikroorganizme in koagulaza-pozitivne stafilkoke.

Predpostavljamo, da je bilo hlajenje mleka, predvsem v hladilnih bazenih posameznih proizvajalcev, zelo intenzivno in zunanje temperature niso vplivale na higiensko kakovost mleka. Tudi v Španiji so pri preskušanju 402 vzorcev hlajenega surovega mleka ugotovili najvišjo korelacijo med skupnim številom mikroorganizmov in psihrotrofnimi mikroorganizmi ($r=0,82$), v našem poskusu je bil ta korelacijski koeficient nekoliko nižji ($r=0,71$) (Villar in sod., 1996).

Število koagulaza-pozitivnih stafilkokokov ni v statistično značilno korelaciji z drugimi skupinami mikroorganizmov niti ni odvisno od sezone, saj je njihov izvor v glavnem mleko, pridobljeno pri kravah molznicah, obolelih za mastitisom. Večina jih je prilagojena tudi na temperaturo okrog 37 °C, kakršna je v vimenu (Bramley, 1990). V večini primerov so korelacije med skupinami mikroorganizmov večje in statistično značilnejše pri zimskih vzorcih. Število posameznih mikroorganizmov je v povprečju višje poleti, kar je vpliv višje temperature in s tem hitrejše rasti mikroorganizmov. Na splošno je bilo število vseh preiskanih skupin mikroorganizmov v vzorcih iz transportnih cistern višje kot v vzorcih posameznih proizvajalcev.

Na tržišču pa se pojavljajo različne verzije hitrih postopkov, katerih prednost je v tem, da omogočijo lažjo in hitrejšo determinacijo posameznih vrst ali skupin mikroorganizmov. Eden izmed teh hitrih komercialnih postopkov je RIDA[®]COUNT. V našem poskusu pa smo ugotovili, da obstajajo statistično značilna odstopanja med rezultati obeh metod. Pri metodi Rida[®]count smo imeli težave pri štetju kolonij, zlasti pri ovrednotenju števila kvasovk in plesni. Metoda je nova in se šele uvaja v analitiko, do sedaj smo uspeli pridobiti zelo malo literaturnih podatkov o uspešnosti te metode, zlasti v mlekarstvu. Nekoliko večje ujemanje rezultatov smo opazili takrat, ko smo pri metodi Rida[®]count uporabili enake temperature inkubacije kot pri klasičnih metodah.

5.2 SKLEPI

Na osnovi rezultatov poskusa lahko oblikujemo naslednje sklepe:

- Vzorci surovega mleka so v povprečju kljub dvodnevnemu zbiranju mleka, vsebovali $3,3 \times 10^4$ mikroorganizmov v ml mleka, kar ustreza normativom EU.
- Število posameznih skupin mikroorganizmov je z izjemo psihrotrofnih mikroorganizmov višje poleti, kar je posledica višjih temperatur in hitrejšega razmnoževanja mikroorganizmov, kar se kaže zlasti pri nekoliko slabši kakovosti vzorcev iz transportnih cistern, odvzetih na sprejemu mlekarne.
- Največji delež skupnega števila mikroorganizmov predstavljajo psihrotrofni mikroorganizmi, na katere sezona nima statistično značilnega vpliva.
- Rezultati primerjave standardnih metod in metode Rida[®]count so pokazali statistično značilna odstopanja, zato ne priporočamo uporabe metode Rida[®]count za ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov, števila koliformnih mikroorganizmov in števila kvasovk ter plesni v mlekarstvu. Za realnejšo oceno bi bilo potrebno izvesti več preiskav.

6 POVZETEK

Nekatere mlekarne so pred časom uvedle prakso odzemanja mleka vsake dva dni in ne več vsak dan. Tako mleko ostane v hladilnem bazenu dva dni, ob vsaki molži pa se vanj dodaja novo namolzeno, toplo mleko, zato se mikrobiološka kakovost in razmerje med posameznimi mikroorganizmi spreminja.

- * Cilj naloge je bilo ugotoviti mikrobiološko kakovost mleka po dvodnevem odvzemu ter vpliv sezone na sestavo mleka
- * Ugotoviti smo želeli mikrobiološko kakovost mleka posameznih proizvajalcev, družinskih kmetij, zbiralnic v primerjavi z skupnim surovim mlekom iz transportnih cistern
- * Zanimalo nas je razmerje med posameznimi skupinami mikroorganizmov v mleku
- * Primerjali smo rezultate standardnih metod s komercialnim postopkom Rida[®] count.

V poskus smo vključili v zimskem in letnem obdobju vsakič po 60 vzorcev mleka posameznih mlekarskih obratov, družinskih kmetij in zbiralnic, v zimskem obdobju smo preiskali 40 vzorcev, v letnem pa 43 vzorcev skupnega surovega mleka iz transportnih cistern na sprejemu mlekarne.

V zimskem obdobju smo po standardnih metodah in z metodo Rida[®] count preiskali 100 vzorcev surovega mleka, v poletnem obdobju pa smo preiskali 103 vzorce mleka samo z standardno metodo. Ugotavljali smo skupno število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, število koliformnih mikroorganizmov, število kvasovk in plesni, število psihrotrofnih mikroorganizmov ter število koagulaza-pozitivnih stafilokokov. Razredčene vzorce smo odpipetirali po 1 ml v sterilne petrijeve posodice in prelili s hranljivo podlogo. Po inkubaciji smo prešteli kolonije.

V povprečju je bilo izmerjeno najvišje število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov, najmanjše pa število koagulaza-pozitivnih stafilokokov. V poletnem obdobju je porast vseh vrst mikroorganizmov razen psihrotrofnih mikroorganizmov večji kot v zimskem obdobju, iz transportnih cistern pa ugotavljamo večje število mikroorganizmov kot od posameznih proizvajalcev.

Z izračunom korelacij smo ugotovili, da vse povezave med posameznimi mikroorganizmi, povezave med rezultati, dobljenimi znotraj letnega in zimskega obdobja ter rezultati vzorcev, odvzetih znotraj transportnih cistern in pri posameznih proizvajalcih, niso statistično značilne.

7 VIRI

Arhiv LML. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko (neobjavljeno)

Arsov A. 1994. Opis postopka izvedbe mikrobiološke analize (ISO 6610:1992). V: Seminar. Standardizacija analitike in predstavite nekaterih pomembnejših postopkov v mlekarški mikrobiologiji, Domžale, 16-17. feb. 1994 (neobjavljeno)

Arsov A. 1996. Mlekarska mikrobiologija. V: Seminar. Mlekarska mikrobiologija, higienska kakovost surovega mleka in hitre metode determinacije mikroorganizmov in mikrobiološka kakovost mleka v sodobnih pogojih pridobivanja, Domžale, 7. mar. 1996 (neobjavljeno)

Arsov A. 1987. Higiensko pridobivanje mleka. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 124 str.

Bajt N., Golc-Teger S. 2002. Izdelava jogurta, skute in sira. Ljubljana, ČZP Kmečki glas: 14-21

Bramley, A.J., McKinnon, C.H. 1990. The microbiology of raw milk. V: Dairy microbiology handbook. Second edition. Robinson K.R. (ed). New York, John Wiley and Sons: 261-208

Chambers J. 2002. The microbiology of raw milk. V: Dairy microbiology handbook. Third edition. Robinson K.R. (ed). New York, John Wiley and Sons: 66-67

Ferčej J. 1999. Kako z govedorejo v Evropo? Govedorejski zvonci, 1, 4: 21

Fuchs C. 2004. Trg mleka po širitvi EU. Sodobno kmetijstvo, 37, 8: 37-40

Golc Teger S., Godič Torkar K. 2003. Laboratorij za mlekarstvo. Vaje za študente univerzitetnega študija mikrobiologije. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.

Golc Teger S., Emser K., Godič-Torkar K. 1996. Mlekarska mikrobiologija. V: Seminar. Petrifilm - sodobna tehnika v mikrobiologiji, Domžale, 15. okt. 1996 (neobjavljeno)

Hayes P.R. 1985. Food Microbiology and Hygiene. London, New York, Elsevier Applied Science Publisher.

Houghtby G.A., Maturin L.J., Koenig E.K. 1992 Microbiological count methods. V: Standard Methods for Examination of Dairy products. 16th edition. Marshall R.T (ed). Washington, American public health association: 213-216

ISO 6730:2005/IDF 101:2005. Milk – Enumeration of colony forming units of psychrotrophic micro-organisms: Colony – count technique at 6,5 °C. 2005: 8 str.

ISO 6888-2:1999. Mikrobiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) PART 2: technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium. 1999: 7 str.

ISO 6611:2004/IDF 94:2004. milk and milk products- Enumeration of colony - forming units of yeasts and for moulds: Colony - count technique at 25 °C. 2004: 6 str.

ISO 4832:2006. Mikrobiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the enumeration of coliforms :colony count technique. 2006: 6 str.

ISO 4833:2004. Mikrobiologija živil in krme-Horizontalna metoda za ugotavljanje števila mikroorganizmov: Tehnika štetja kolonij pri 30 °C. 2004: 8 str.

ISO 8261:2001/IDF 122:2001. Mleko in mlečni proizvodi-splošno navodilo za pripravo vzorcev, začetnih suspenzij in decimalnih vzorčenj za mikrobiološke preiskave. 2001:11 str.

Kapš P. 2004. Mleko za zdravje. Ljubljana, Karantanija: 26-57

Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 30-49

Miletič S. 1994. Mlijeko i mliječni proizvodi. Zagreb, Hrvatsko mljekarsko društvo: 46-47

Milohnoja M., Komar M., Marinšek M. 1970. Higiena živil. Ljubljana, Univerzitetna tiskarna Ljubljana: 296-312

R-Biopharm's innovative microbiological product line. 2004. New food. The quarterly business review of new technology for european food and drink manufacturers, 1: 55

Regulation (EC) No 853/2004 of European parliament and of the council of 29 April 2004 Laying down specific hygiene rules for on the hygiene of foodstuffs. 2004. Official Journal of the European Union, L 139/55.

RIDA[®]COUNT- the test sheet that counts for you. Product Launch Folder. R- Biopharm AG.

Rogelj I. 2003. Mleko: V: Mikrobiologija mleka in mlečnih izdelkov. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 512-527

Tratnik L. 1998. Mlijeko-tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga: 20-53

Tumpej M. 2002. Higienško pridobivanje mleka. Domžale, Združenje govedorejcev Slovenije:7-12

Valjavec I. 2006. Zgovorna statistika GIZ mlekarstva Slovenije. Glasilo Ljubljanskih mlekarn, April 2006. www.lj-mlek.si/novice/april06 (6. apr. 2006)

Villar A., Garcia J.A., Iglesias L., Garcia M. L., Otero A.1996. Application of Principal Component Analysis to the Study of Microbial Populations in Refrigerated Raw Milk from Farms. International Dairy Journal, 6: 937-945

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc.dr. Karmen Godič Torkar za ves trud, strokovne nasvete ter potrpežljivost ob izvedbi diplomske naloge.

Zahvaljujem se doc. dr. Stanislavi Golc Teger za somentorstvo pri izvedbi diplomske naloge.

Zahvaljujem se dr. Klemenu Potočniku za pomoč pri statistični obdelavi podatkov.

Zahvaljujem se prof. dr Ireni Rogelj za recenziranje diplomskega dela.

Zahvaljujem se dr. Nataši Siard za pomoč pri urejanju in pregledu diplomske naloge.

Hvala mojima staršema za ves trud, ki sta ga vložila vame in mi omogočila študij.

Hvala vsem, ki me imajo radi in so mi v času študija stali ob strani.

Hvala!!!